

**Der Mechanismus der Kontaktinhibition während
der Migration von cranialen Neuralleistenzellen
in *Xenopus laevis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften,

am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Sarah Becker

aus

Baden-Baden

Dekan:	Prof. Dr. Peter Roesky
Referentin:	Prof. Dr. Doris Wedlich
Korreferent:	Dr. habil. Clemens Franz
Tag der mündlichen Prüfung:	18. Juli 2014

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für molekulare Entwicklungs- und Zellbiologie (Zoologisches Institut II) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von August 2011 bis Juni 2014 durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Sarah Becker,
Karlsruhe im Juni 2014

Danksagungen

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Wedlich für die Möglichkeit diese Arbeit zu verfassen, für ihre wohlmeinende Unterstützung in allen Bereichen und ihre Art mich zu inspirieren.

Vielen Dank an Herrn Dr. habil. Clemens Franz für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gute Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken, welche diese Arbeit und meine Ausbildung gefördert hat. Ausserdem danke ich dem Karlsruher House of Young Scientists (KHYS) am KIT für die Unterstützung während des Gaststipendiums von Genevieve Abbruzzese.

Ich danke besonders meinem Betreuer, Herrn Dr. Jubin Kashef, für all die Unterstützung und die Herausforderungen, die mich haben wachsen lassen. Vielen Dank für all das Wissen und die Fähigkeiten, die ich lernen konnte. Dafür auch Danke an Herrn Dr. habil. Dietmar Gradl und Frau Dr. Almut Köhler.

Ein herzlicher Dank geht außerdem an alle Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten des Zoologischen Instituts II – besonders an Chaolie Huang, Rahul Langhe, Anne Merks, Isabelle Rottmann und unsere fleissigen AzuBienen – sowie Carina Gonnermann und Dr. Tetyana Gudzenko vom DFG-Center für funktionale Nanostrukturen (CFN) für die Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zusätzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Dominique Alfandari und Genevieve Abbruzzese für die gute Zusammenarbeit und den konstruktiven Austausch bedanken.

Ich ehre unsere besten Mitarbeiter: alle *Xenopus laevis* Weibchen, Männchen und Embryonen. Dank ihnen habe ich Geduld, Demut, Hoffnung und Respekt gegenüber dem Leben gelernt und was es bedeutet, etwas wirklich zu wollen und dafür alles zu geben.

Zu guter Letzt gebührt mein größter Dank meiner gesamten Familie. Omitakoyasin.

Awanestika.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuralleistenzellen	1
1.2	Einteilung der NLZ	1
1.3	Entwicklung der NLZ	2
1.4	Molekulare Mechanismen der cNLZ-Migration	3
1.5	Kontaktinhibition	7
1.6	Cadherin-11	11
2	Zielsetzung der Arbeit	15
3	Materialien	16
3.1	Antikörper	16
3.2	Bakterien	16
3.3	Chemikalien	16
3.4	Enzyme	17
3.5	Geräte	17
3.6	Kits	19
3.7	Konstrukte zur Herstellung von mRNA	19
3.8	Konstrukte zur Injektion von DNA	20
3.9	Konstrukte zur Klonierung	20
3.10	Konstrukte zur Herstellung Digoxigenin-markierter RNA als ISH-Sonden	20
3.11	Komplementäre Morpholino-Oligonukleotide	20
3.12	Primer zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente	20
3.13	Puffer und Lösungen	21
4	Methoden	24
4.1.	<i>Methoden der Embryologie</i>	24
4.1.1	Haltung von <i>X. laevis</i>	24
4.1.2	Eiablage	24
4.1.3	Testisextraktion	25
4.1.4	<i>In vitro</i> -Fertilisation	25
4.1.5	Entfernen der Gallerthülle	25

4.1.6	Anfärben albinotischer Embryonen	25
4.1.7	Mikroinjektion	26
4.1.8	Embryonenpflege	27
4.1.9	Gen-Suppression durch komplementäre Einzelstrang-Morpholino-Oligonukleotide	27
4.1.10	Fixierung und Lagerung von <i>X. laevis</i> Embryonen	28
4.1.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung	28
4.1.12	Knorpelfärbung	29
4.1.13	Explantation von cNLZ	30
4.1.14	Konfrontationsanalyse	31
4.1.15	Kollisionsanalyse	33
4.1.16	Transplantation von cNLZ	33
4.1.17	Reaggregationsanalyse zur Untersuchung von Zelladhäsion	35
4.1.18	Proteinextraktion aus <i>X. laevis</i> Embryonen	36
4.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	37
4.2.1	Transformation von Plasmiden in chemisch-kompetente <i>E.coli</i> -Bakterien	37
4.2.2	Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab	37
4.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	38
4.2.4	Fällung und Reinigung von DNA und RNA	38
4.2.5	Restriktionsanalyse von DNA	39
4.2.6	Analytische Flachbett-Gelelektrophorese	39
4.2.7	Präparative Flachbett-Gelelektrophorese	40
4.2.8	<i>In vitro</i> -Transkription	40
4.2.9	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	40
4.2.10	Mutagenese-PCR	41
4.2.11	Dephosphorylierung und Ligation	42
4.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	43
4.3.1	SDS-PAGE	43
4.3.2	Western Blot	43
4.3.3	Immunodetektion	44

5	Ergebnisse	45
5.1	Die Expression von dn-Xcad-11 führt zu einer veränderten Zell-Zell-Adhäsion	45
5.2	Die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 wird für die Migration der cNLZ <i>in vivo</i> benötigt	48
5.3	Der Verlust der Adhäsionsfunktion von Xcad-11 führt nicht zu einer zeitlichen Verzögerung der Migration der cNLZ, sondern zu cranialen Knorpeldefekten	52
5.4	Die Überexpression von Xcad-11 spezifisch in cNLZ hat keinen Einfluss auf die Migration	54
5.5	Die adhäsive Funktion von Xcad-11 ist für die directionale Migration der cNLZ notwendig	57
5.6	Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11 führt zu erhöhter Invasivität von cNLZ <i>in vitro</i>	59
5.7	Xcad-11 vermittelt die repulsive Reaktion von kollidierenden cNLZ <i>in vitro</i>	62
5.8	Überexpression von Adam13 beeinflusst die Kontaktinhibition in cNLZ <i>in vitro</i>	64
5.9	Trio ist an der Zellmembran in Zell-Zell-Kontakten und an der Migrationsfront lokalisiert	69
5.10	GEF-Trio fördert die Migration der cNLZ <i>in vivo</i>	70
5.11	Migrationsdefekte durch Verlust von Trio führen zu Missbildungen der cranialen Knorpelstrukturen im Kaulquappen-Stadium	72
5.12	Verlust von Trio führt zur erhöhten Invasivität der cNLZ <i>in vitro</i>	73
5.13	GEF-Trio ist notwendig für die repulsive Antwort innerhalb der Kontaktinhibition	75
5.14	GEF2 ist für die directionale Migration der cNLZ notwendig	76
5.15	Die kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 agieren unterhalb von Trio in der cNLZ-Migration	78
5.16	Dishevelled rekonstituiert cNLZ-Migration trotz Verlust von Trio	81
5.17	PDZ- und DEP-Domäne von Dishevelled können den Verlust von Trio rekonstituieren	82
6	Diskussion	85
6.1	Die Xcad-11 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion fördert die Kontaktinhibition	85
6.2	Adam13 moduliert die Kontaktvermittlung durch Xcad-11 innerhalb der Kontaktinhibition	88
6.3	GEF-Trio vermittelt innerhalb der Kontaktinhibition die Migration der cNLZ	90
6.4	Ein neuer molekularer Mechanismus der Kontaktinhibition	94

7	Zusammenfassung	96
8	Literaturverzeichnis	97
9	Abkürzungsverzeichnis	109
10	Anhänge	114
11	Begleit-DVD	119
12	Publikationen	120
13	Curriculum Vitae	122

1 Einleitung

1.1 Neuralleistenzellen

Neuralleistenzellen (NLZ) sind eine hoch motile, multipotente und für Wirbeltiere spezifische Zellpopulation. Während der Embryogenese sind sie an der Entwicklung verschiedener Zellderivate wie z.B. Knorpel, Knochen, Melanozyten und Teile des peripheren Nervensystems (PNS) beteiligt (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999; Le Douarin und Kalcheim, 1999; Mayor und Theveneau, 2013). Durch ihre morphologische Ähnlichkeit zu metastasierenden Krebszellen sind NLZ ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von Zellmigration, Zell-Zell-Kommunikation und -Interaktion. Zusätzlich lässt sich durch ihr Stammzellen-ähnliches Differenzierungspotential der Einfluss von verschiedenen Signalwegen auf die Pluripotenz von Zellen während deren Entwicklung und Differenzierung untersuchen. Embryonale Fehlentwicklungen während der Proliferation, Migration oder Differenzierung der NLZ können zu Piebaldismus, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Gesichtsdysmorphien oder Gehörlosigkeit führen (Treacher Collins, 1900; Waardenburg, 1951; Goldenhar, 1952; DiGeorge, 1968; Hall, 1979; Spritz, 1994). Bereits 1868 wurden die NLZ erstmals durch den Schweizer Embryologen Wilhelm His als „Zwischenstrang“ zwischen der Neuralplatte und der späteren Epidermis in Hühnerembryonen beschrieben, während elf Jahre später die Bezeichnung „Neuralleiste“ (engl. „neural crest“) durch Arthur Milnes Marshall eingeführt wurde (His, 1868; Hall, 1999). Jüngste Untersuchungen zeigen den ersten Nachweis von rudimentären NLZ in Nicht-Vertebraten. Dabei führt die Fehlexpression von NLZ-spezifischen Genen in der Tunikate *Ciona intestinalis* zur Umwandlung der cephalen Melanozyten in migrierende Ektomesenchym-Zellen (Abitua et al., 2012).

1.2 Einteilung der NLZ

Entsprechend ihrer Lokalisation im Embryo und ihrer spezifischen Derivate werden NLZ in vier Gruppen unterteilt: Craniale NLZ, Rumpf-NLZ, Herz-NLZ und vagale/sacrale NLZ.

Craniale NLZ (cNLZ) entwickeln sich anterior, im Bereich des späteren Metencephalon, als Teil des dorsalen Neuralrohrs und migrieren in drei Strömen in den mandibularen, hyoidalen und die branchialen Kiemenbögen, wo sie zur Ausbildung von craniofacialen Strukturen beitragen. Dazu gehören unter anderem auch Schwann-Zellen im cranialen PNS, parasymphatische Ganglien und Neuronen der cranialen Nerven (D'Amico-Martel und Noden, 1983; Le Douarin et al., 1993). Zusammen mit Mesoderm-Derivaten sind cNLZ für die Entstehung von Knorpel und Knochen im Kopf bzw. Nacken verantwortlich und somit an der Bildung der Kieferknochen, des frontnasalen Fortsatzes und des Hyoidknorpels des Nackens beteiligt (Osumi-Yamashita et al., 1994; Trainor und Tam, 1995;

Gross und Hanken, 2005). Ebenso partizipieren sie an der Entwicklung der Gehörknöchelchen im Mittelohr (Wood et al., 2010), an Teilen der Zähne wie Dentin und Odontoblasten (Chai et al., 2000), an okularen und peri-okularen Strukturen (Creuzet et al., 2005), an Pigmentzellen (Bagnara et al., 1979), an glatten Muskelzellen und dem Bindegewebe der Blutgefäße (Noden, 1983) sowie der Bildung von Thymus, Schilddrüse und Nebenschilddrüse (Bockman und Kirby, 1984). Posterior vom Metencephalon entstehen die Rumpf-NLZ, welche überwiegend Melanocyten, aber ebenso Teile des PNS wie sympathische und parasympathische Ganglien, Schwann-Zellen und Zellen des Nebennierenmarks bilden (Le Douarin und Teillet, 1973; Bagnara et al., 1979; Collazo et al., 1993; Le Douarin und Kalcheim, 1999). Vagale und sacrale NLZ sind ebenfalls an der Bildung von parasympathischen Ganglien beteiligt (Le Douarin und Teillet, 1973; Pomeranz et al., 1991), während Herz-NLZ pluripotent zu Neuronen, Melanocyten, Knorpel und Herz-spezifischem Gewebe, wie z.B. dem Septum und der Wand der Aortenbögen, differenzieren (Le Lièvre und Le Douarin, 1975; Kirby et al., 1983).

1.3 Entwicklung der NLZ

NLZ durchlaufen in ihrer Entwicklung die Prozesse der Induktion, Spezifikation, Aufrechterhaltung, Migration und Differenzierung. Während der Gastrulation erfolgt die Induktion der NLZ an der Neuralplattengrenze durch definierte Level an Wnt, Bmp, Fgf, Retinsäure und Notch (Sauka-Sprengler und Bronner-Fraser, 2008; Steventon und Mayor, 2012). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges und die Inhibition des Tgf β -Signalweges durch die angrenzende Dorsomarginalzone des späteren paraxialen Mesoderms führen zur anterior-posterioren bzw. mediolateralen Musterung der Neuralplattengrenze. Anschließend wird die Neuralplattengrenze im Überlappungsbereich der Transkriptionsfaktoren Pax3 und Zic1 unter Einfluss der Homeoproteine Msx1 und Dlx5 spezifiziert (McLarren et al., 2003; Tribulo et al., 2003; Monsoro-Burq et al., 2005; Hong und Saint-Jeannet, 2007). Durch die komplexe Interaktion von NLZ-Genen (u.a. Snail1, Snail2, Twist, Ap-2 α , FoxD3, Phb1, Sox8/9/10, Vangl1, Prl3, c-Myc, Hairy2, Id3) erfolgt die Spezifikation und Aufrechterhaltung der NLZ (Meulemans und Bronner-Fraser, 2004; Schneider et al., 2010; Nichane et al., 2010; Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001; Vega et al., 2004; Kee und Bronner-Fraser, 2005; Cheung et al., 2005).

Die Migrationsfähigkeit der NLZ wird durch die Veränderung der Zellmorphologie ermöglicht. Die transkriptionelle Repression der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion, welche durch die Transkriptionsfaktoren Snail1 und Snail2 erfolgt, führt zum Verlust des epithelialen Charakters der NLZ (Duband et al., 1995; Cano et al., 2000; Bolós et al., 2003; Acloque et al., 2009; Kalluri, 2009). Statt einer apikal-basalen Polarität liegt nun eine mesenchymale Morphologie mit einer führenden Migrationsfront und einer kontraktiven Hinterflanke vor, welche die Migration fördert. Zu diesem

Zeitpunkt weisen NLZ vergleichbare Merkmale mit metastasierenden Tumorzellen auf, wodurch sie als ein geeignetes Modell in der Krebsforschung fungieren. Die Differenzierung zu den verschiedenen Derivaten erfolgt durch die Kombination von Ursprungslokalisation, Migrationsweg und parakrinen Umgebungsfaktoren am Zielort, wie z.B. Fgf2, Nrg1, Bmp2 und Edn3 (Bronner-Fraser und Fraser, 1988; Le Douarin und Kalcheim, 1999; Hagedorn et al., 1999; Dupin et al., 2000; Martinez-Morales et al., 2007).

1.4 Molekulare Mechanismen der cNLZ-Migration

Im Gegensatz zu anderen Modellorganismen (z.B. *G. gallus*), in denen die Emigration der cNLZ durch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und die Delamination einzelner Zellen erfolgt (Le Lièvre und Le Douarin, 1975; Pegoraro und Monsoro-Burq, 2012; Smith, 1990), liegen cNLZ in *X. laevis* bereits im Zellverband mit einer mesenchymalen Morphologie vor. Während der Neurulation kommt es im Stadium 15/16 zur Verdickung der Neuralwülste (Sadaghiani und Thiébaud, 1987), welche leicht zu explantieren sind und somit *X. laevis* zu einem attraktiven Modellorganismus für *in vitro*-Experimente macht. Kurz vor dem Schließen des Neuralrohrs beginnen die cNLZ als Zellverband kollektiv zu migrieren. Nach etwa vier bis fünf Stunden erfolgt mit der Vereinzelung der cNLZ der zweite Schritt der Migration (Alfandari et al., 2010). Die vereinzelt wandern in Strömen gerichtet in den mandibularen (ma), den hyoidalen (hy) und die branchialen (br) Kiemenbögen ein (Köntges und Lumsden, 1996; s. Abbildung 1.1). Zellen, deren Ursprungsort nahe der späteren Rhombomere 3 bzw. 5 liegen, verteilen sich auf die jeweils angrenzenden Ströme und bilden somit cNLZ-freie Zonen (Farlie et al., 1999).

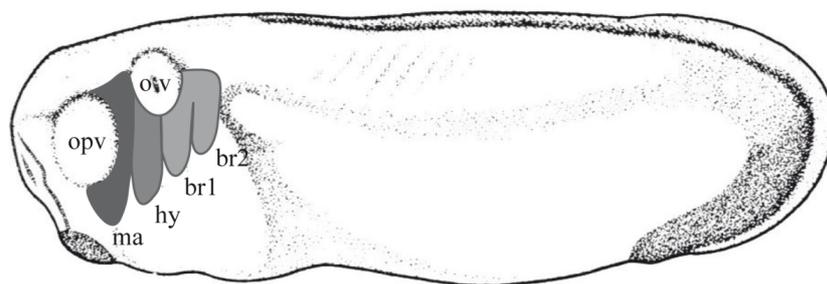


Abbildung 1.1: Migrationswege der cNLZ.

Schematische Darstellung der Migrationswege von cNLZ in *X. laevis*, laterale Ansicht im Stadium 26, anterior links, dorsal oben. Die cNLZ migrieren gerichtet ventral in Strömen in den mandibularen (ma), den hyoidalen (hy) und die zwei branchialen (br1/2) Kiemenbögen. opv = Optisches Vesikel, ov = Otitisches Vesikel. (verändert nach Nieuwkoop und Faber, 1967)

Die extrazelluläre Matrix (ECM) dient als Orientierung für die migrierenden cNLZ. Sie ist notwendig als Substrat für die Zellen, da sie nur durch die Anhaftung an die ECM die innere Zugkraft in eine Migrationsbewegung umsetzen können (Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007). Im Hühnchen-Embryo sind die ECM-Komponenten Fibronectin, Laminin, Aggrecan und PG-M/Versican als migrationsstimulierend bekannt (Ffrench-Constant und Hynes, 1988; Perris et al., 1996a; Perris et al., 1996b). In *X. laevis* wurde bislang nur Fibronectin als Substrat der migrierenden cNLZ beschrieben (Newgreen und Thiery, 1980). Dabei wird die Zell-Substrat-Adhäsion über die Bindung von Fibronectin durch Transmembranproteine wie Syndecan-4 und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin in den Fokalkontakten vermittelt (Matthews et al., 2008a; Alfandari et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass für die cNLZ-Migration die zentrale Zell-Bindedomäne (CCBD) von Fibronectin notwendig ist. Diese enthält das RGD-Motiv für die Interaktion mit Integrinen und eine Synergie-Domäne. Die HepII-Domäne, welche Syndecan-4 bindet, ist ebenfalls notwendig für die cNLZ-Migration (Alfandari et al., 2003). Dem entsprechend hat die Modulation der ECM durch Transmembranproteine wie z.B. denen der Adam-Familie einen Einfluss auf die Migration der cNLZ. Adams können über ihre Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne sowohl Integrine als auch ECM-Moleküle binden bzw. schneiden. Für die cNLZ-Migration in *X. laevis* konnte gezeigt werden, dass Adam9, Adam13 und Adam19 notwendig sind, da Verlust bzw. Überexpression dieser Adams zu Migrationsdefekten führen (Alfandari et al., 1997; Alfandari et al., 2001; McCusker et al., 2009). Vor allem für Adam13 wurde eine Rolle in der Delamination der cNLZ vorgeschlagen, da das Transmembranprotein sowohl die HepII-Domäne von Fibronectin binden und somit die ECM modulieren kann, als auch die Zell-Zell-Adhäsion über die Spaltung von Cadherin-11 verändert (Alfandari et al., 2001; Alfandari et al., 2003; McCusker et al., 2009).

Die Vorwärtsbewegung der cNLZ erfolgt zum einen über die Anhaftung am ECM-Substrat, welche über Fokalkontakte vermittelt wird und welche am Zytoskelett verankert sind. Dadurch erhält die Zelle den notwendigen Halt, um die Kraft in eine Bewegung umzusetzen (Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007). Zum anderen bedarf es der Ausbildung von Zellausläufern an der Migrationsfront. Dynamische Aktinpolymerisation führt zur Formation von fingerartigen Filopodien und breit gefächerten Lamellipodien. Die Lokalisation dieser Zytoskelettstrukturen wird innerhalb der Zelle durch die Aktivität der kleinen Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 vermittelt (Jaffe und Hall, 2005). Während RhoA über die Rho-assoziierte Protein-Kinase (ROCK) für die Myosin II-bedingte Kontraktion in den Stressfasern am hinteren Ende der Zelle sorgt, inhibiert RhoA über ROCK gleichzeitig Rac1. Rac1 wiederum hemmt RhoA direkt. Dies führt somit zur Bildung eines internen RhoA-Rac1-Gradienten (s. Abbildung 1.2). Aktives Rac1 wiederum fördert die Bildung und Stabilisierung von Zellausläufern an der Migrationsfront, wodurch die Zelle eine definierte Migrationsrichtung erhält (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010; Shoval und Kalcheim, 2012).

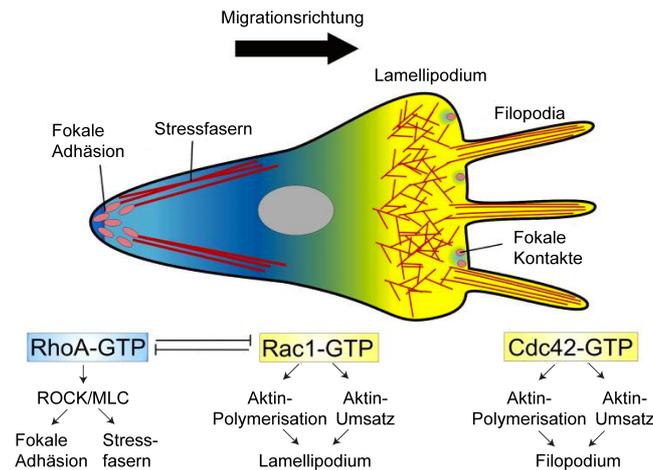


Abbildung 1.2: Polarität innerhalb der cNLZ.

Schematische Darstellung der lokalen Aktivierung der kleinen Rho GTPasen in cNLZ. Aktives RhoA führt zur Bildung von Stressfasern, welche den kontraktilen Bereich der Zelle definiert. Durch die gegenseitige Inhibition von RhoA und Rac1 kommt es zur Aktivierung von Rac1 und Cdc42 an der Migrationsfront, wodurch die Bildung von Zellausläufern (Lamellipodia bzw. Filopodia) gefördert wird. (verändert nach Mayor und Carmona-Fontaine, 2010)

Die gerichtete Migration von cNLZ wird durch das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen ermöglicht. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass eine Synergie von kollektiver Chemotaxis, Co-Attraktion und Kontaktinhibition (CIL) notwendig ist, damit cNLZ ihr Ziel erreichen können (Theveneau et al., 2010; Theveneau et al., 2013; Carmona-Fontaine et al., 2011; Carmona-Fontaine et al., 2008).

Kollektive Chemotaxis beschreibt die directionale Führung von migrierenden cNLZ durch Faktoren wie das Chemokine Sdf-1 (Stomal-derived factor 1, auch Cxcl12a genannt), welches die Ausbildung von Zellausläufern an der Front eines Zellverbandes induziert und stabilisiert. Sdf-1 wird in *X. laevis* sowohl vor, als auch während der Migration im Ektoderm, welches an die cNLZ angrenzt, bzw. zwischen den cNLZ-Strömen exprimiert. Gleichzeitig exprimieren cNLZ den Sdf1-Rezeptor Cxcr4. Der Verlust von Sdf-1 bzw. Cxcr4 führt zu Migrationsdefekten (Theveneau et al., 2010).

Neuste Erkenntnisse zeigen, dass es sich bei dem Sdf-1 exprimierenden Ektoderm um plakodale Vorläuferzellen handelt, welche bei Kontakt mit cNLZ von diesen weg migrieren, die cNLZ jedoch durch das Sdf-1 permanent chemotaktisch anziehen (Theveneau et al., 2013; s. Abbildung 1.3 A, B). Dadurch entsteht eine ständig wiederkehrende Attraktion und Repulsion zwischen den beiden Zelltypen, welche die fortlaufende ventral gerichtet Migrationsfront beschreibt (s. Abbildung 1.3 C). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass vereinzelte Zellen zwar das Sdf-1 Signal empfangen können, die Direktionalität jedoch nur durch die Interaktion von mehreren Zellen ausgelöst wird. Durch den Kontakt werden die Zellausläufer an der Migrationsfront stärker stabilisiert als an anderen Stellen des Zellverbandes. Dies geschieht durch die erhöhte Aktivität der kleinen Rho GTPase Rac1 an

den Zellgrenzen ohne Kontakt (s. Abbildung 1.3 C). Für die Vermittlung des Zellkontaktes innerhalb der kollektiven Chemotaxis wurde N-Cadherin vorgeschlagen, da es an der Kontaktstelle Rac1 inhibiert (s. Abbildung 1.3 C; Theveneau et al., 2010).

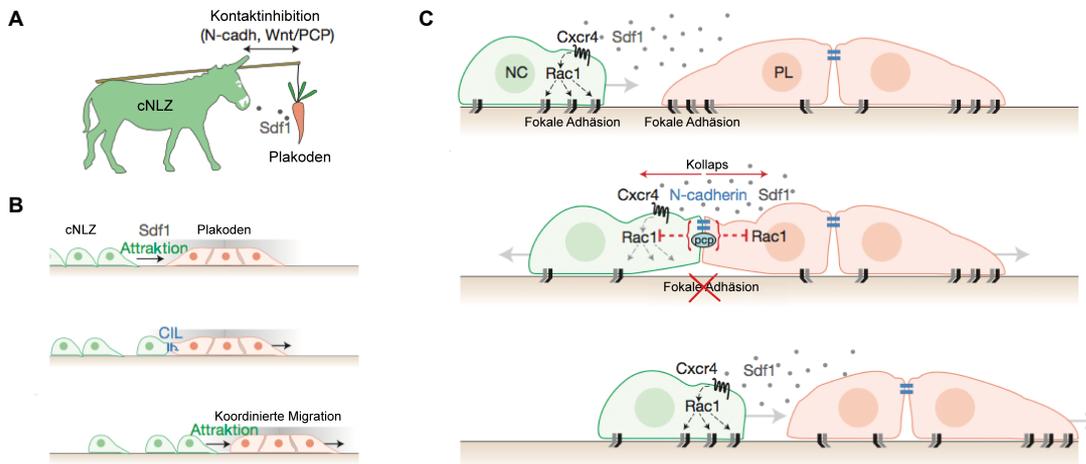


Abbildung 1.3: Mechanismus der kollektiven Chemotaxis.

(A) Das Verhalten von cNLZ und präplakodalem Ektoderm (Plakoden) ähnelt dem Bild vom Esel, der von der Karotte angezogen wird, jedoch die Karotte sich in Abhängigkeit zum Fortschritt des Esels bewegt. (B) cNLZ werden durch die Plakoden angezogen, welche jedoch bei Kontakt mit den cNLZ repulsiv reagieren, flüchten und damit die gerichtete Migration der cNLZ hervorrufen. (C) Schematische Darstellung des molekularen Mechanismus. (verändert nach Theveneau et al., 2013)

Als Co-Attraktion wird das soziale Verhalten der cNLZ bezeichnet, bei dem die Zellen sich gegenseitig anziehen. Dabei exprimieren cNLZ das komplementäre Fragment C3a und seinen Rezeptor C3aR. C3a ist ein kleines Anaphylatoxin-Peptid, dessen chemotaktisches Potential aus dem Immunsystem bekannt ist (Cravedi et al., 2013).

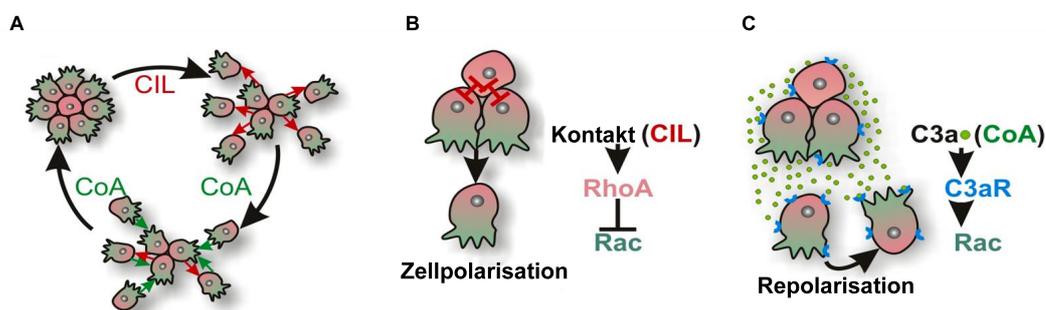


Abbildung 1.4: Synergie der Co-Attraktion (CoA) und der Kontakthemmung (CIL) während der kollektiven Migration von cNLZ.

(A) Ein permanenter Zyklus von Zellausdehnung und Zellanziehung ist für die gerichtete cNLZ-Migration notwendig. (B) Dabei führt CIL kontaktabhängig zur Polarisation der cNLZ durch lokale Regulation der kleinen Rho GTPasen. (C) Als Gegenbalance kommt es durch die C3a/C3aR vermittelte CoA zur Repolarisation der cNLZ. Dabei wird dem Chemoattraktant C3a zugewandt Rac aktiviert, wodurch die Zellen wieder aufeinander zu wandern. (verändert nach Carmona-Fontaine et al., 2011)

Die Interaktion des sekretierten C3a mit dem Rezeptor C3aR führt zur Stabilisierung der Zellausläufer, welche dem Chemoattraktant zugewandt sind. Dies erfolgt durch die Aktivierung von Rac1, welche durch das chemotaktische Paar ausgelöst wird. Untermauert wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Inhibition von aktivem Rac1 die Co-Attraktion verhindert. Zusätzlich ist das soziale Verhalten der Co-Attraktion notwendig, damit cNLZ extrinsische Faktoren wie Sdf-1 interpretieren können. Während die C3a-C3aR-Interaktion weder die Motilität, noch die Adhäsion beeinflusst, ist sie essentiell für die kollektive Direktionalität der cNLZ. Sie verhindert, dass die Zellen sich zu sehr vereinzeln und ermöglicht als Gegenbalance zur Kontaktinhibition, dass die cNLZ kollektiv migrieren können (s. Abbildung 1.4; Carmona-Fontaine et al., 2011).

1.5 Kontaktinhibition

Die Kontaktinhibition (engl. ‚Contact Inhibition of Locomotion‘, CIL) wurde erstmals 1921 von Leo Loeb in Hämocyten des Pfeilschwanzkrebses beschrieben (Loeb, 1921). Später wurde sie in Michael Abercrombies Arbeiten als „das Stoppen der kontinuierlichen Fortbewegung einer Zelle in die gleiche Richtung nach dem Zusammenstoß mit einer anderen Zelle“ charakterisiert (Abercrombie, 1970). Dieses soziale Verhalten wird in vielen Zelltypen beobachtet, wobei man zwischen homotypischer Kontaktinhibition, welche zwischen Zellen des gleichen Zelltyps erfolgt, und heterotypischer Kontaktinhibition zwischen Zellen verschiedener Zelltypen unterscheidet.

Für die cNLZ-Migration in *X. laevis* konnte gezeigt werden, dass die Zellen homotypische Kontaktinhibition ausüben, jedoch andere Zelltypen ungehindert durchwandern, um ihren Zielort zu erreichen (Carmona-Fontaine et al., 2008). Dabei bedarf es CIL sowohl für die gerichtete Emigration der cNLZ aus dem Zellverband, als auch für die directionale Wanderung einzelner cNLZ in den pharyngalen Strömen. Während die cNLZ kollektiv im Zellverband wandern, inhibieren sich die inneren Zellen in ihrer Migration durch den Kontakt gegenseitig. Sie scheinen keine innere Polarität aufzuweisen, da ihre Zellausläufer klein und in alle Richtungen ausgebildet werden. Nur an den freien Rändern des Zellverbandes werden größere und gerichtete Zellausläufer gebildet, da dort keine Kontaktinhibition stattfindet (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010; s. Abbildung 1.5 A). Bei Kontakt von zwei vereinzelt cNLZ kollabieren die Zellausläufer, welche den Kontakt hergestellt haben. Nach kurzer Zeit bilden sich an der gegenüber liegenden Seite der Zelle neue Zellausläufer. Damit kommt es zu einer Richtungsänderung der Migration nach dem Kontakt der cNLZ (Carmona-Fontaine et al., 2008; s. Abbildung 1.5 B).

Es konnte gezeigt werden, dass der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg in der Kontaktinhibition eine Rolle spielt (Carmona-Fontaine et al., 2008). Interessanterweise werden die nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt11 und Wnt11r vor der Migration im cNLZ-angrenzenden Ektoderm, jedoch nicht

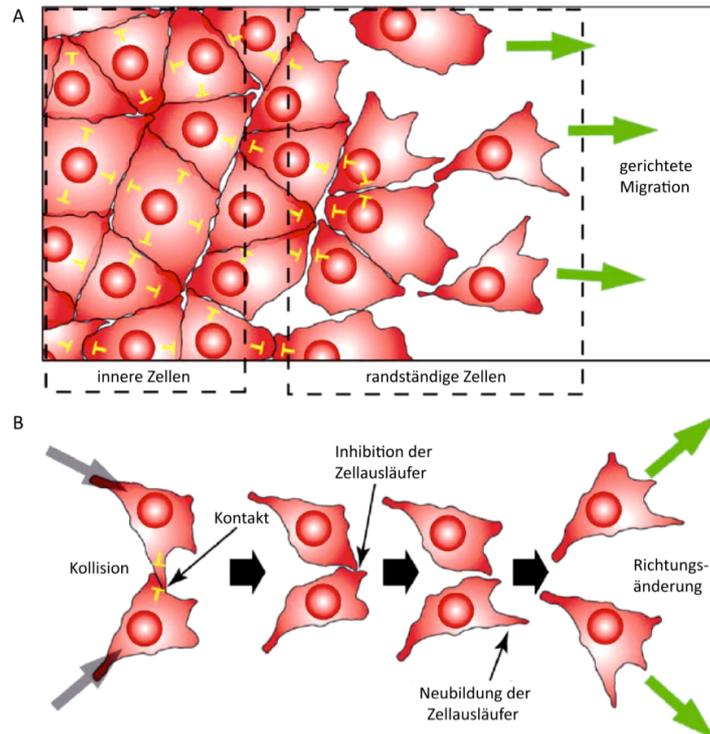


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Kontaktinhibition.

(A) Im Zellverband verhindert der Kontakt der inneren Zellen die Ausbildung von Zellausläufern und nur randständige Zellen sind zur Emigration befähigt. (B) Wenn vereinzelte Zellen kollidieren bewirkt der Kontakt die Inhibition der Zellausläufer an der Kontaktstelle und die Richtungsänderung erfolgt durch die Ausbildung neuer Zellausläufer. (verändert nach Mayor und Carmona-Fontaine, 2010)

in den cNLZ exprimiert. Dabei wird Wnt11r medial zu den cNLZ exprimiert, während Wnt11 in einem dünnen Band am lateralen Rand der cNLZ vorliegt. Der Verlust bzw. die Überexpression beider Wnt-Liganden führt zu Migrationsdefekten der cNLZ, wobei es sich jedoch nicht um eine redundante Funktion handelt. Der Effekt auf die cNLZ-Migration ist nicht zellautonom und somit sind Wnt11 und Wnt11r als ein externes Signal involviert (De Calisto et al., 2005; Matthews et al., 2008b). Es ist naheliegend zu behaupten, dass aufgrund ihrer Expressionslokalisation Wnt11 als ein chemoattraktives und Wnt11r als ein chemorepulsives Molekül die Direktionalität der cNLZ bestimmen könnten. Jedoch widerspricht dem, dass bei Verlust von Wnt11r die cNLZ dorsal stecken bleiben, jedoch nicht in neurales Gewebe einwandern (Matthews et al., 2008b). Alternativ wurde vorgeschlagen, dass die Expression von beiden Wnt-Liganden dafür sorgt, dass in allen cNLZ der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg aktiv ist und möglicherweise als ein temporales Signal zur Emigration dient.

Durch die Bindung der nicht-kanonischen Wnt-Liganden an den Rezeptor Frizzled-7 wird das Mediatorprotein Dishevelled (Dsh) hyperphosphoryliert und an die Membran rekrutiert (Rothbacher et al., 2000). Dsh besitzt drei hoch konservierte Domänen: N-terminal liegt die DIX-Domäne, gefolgt von der PDZ-Domäne und der C-terminal gelegenen DEP-Domäne. Während für den kanonischen

Wnt-Signalweg überwiegend die DIX- und PDZ-Domäne notwendig sind, bedarf es für die nicht-kanonischen Wnt/PCP- bzw. Wnt/Ca²⁺-Signalwege ausschließlich die PDZ- und DEP-Domäne (Rothbächer et al., 2000; Wallingford und Habas, 2005; s. Abbildung 1.6). Interessanterweise kann die Blockierung der cNLZ-Migration, welche über die Expression von dominant-negativem Wnt11 erfolgt, durch die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges mittels der Expression der PDZ/DEP-Domäne (Dsh-ΔN oder Dsh-ΔDIX) rekonstituiert werden (De Calisto et al., 2005). Im Gegensatz dazu wird die cNLZ-Migration durch die Überexpression der DEP-Domäne (Dsh(DEP+)) blockiert (De Calisto et al., 2005). Die DEP-Domäne ist hauptsächlich für die Membran-Lokalisation von Dsh notwendig (Rothbächer et al., 2000). Wird dieses Konstrukt überexprimiert, blockiert dies selektiv den nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg über kompetitive Inhibition, da das endogene Dsh die Membran nicht mehr binden kann, jedoch für die Kontaktinhibition die PDZ- und DEP-Domäne notwendig sind.

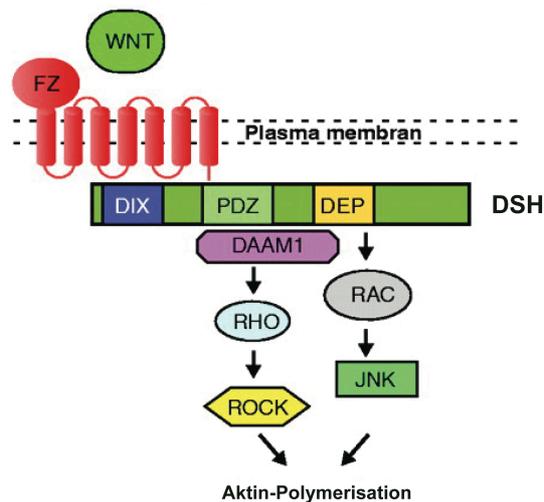


Abbildung 1.6: Funktion von Dsh im nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg.

Bindet der nicht-kanonische Wnt-Ligand an Frizzled (Fz), wird Dsh an die Membran lokalisiert. Innerhalb des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges sind die PDZ- und DEP-Domäne notwendig für das Auslösen der Signalkaskade, welche zur Modulation des Aktin-Zytoskeletts über die kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 führt. (verändert nach Wallingford und Habas, 2005)

Für die Kontaktinhibition wurde gezeigt, dass die Membranlokalisation von Dsh am Kontakt zur Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA führt (Carmona-Fontaine et al., 2008; Matthews et al., 2008a). So führt die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges durch Überexpression von Dsh-ΔDIX zu einer erhöhten RhoA-Aktivität, während die Inhibition des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges mittels Überexpression von Dsh(DEP+) die RhoA-Aktivität senkt (Matthews et al., 2008a). Zusätzlich inhibiert aktives RhoA die Aktivierung seines Antagonisten Rac1 am Zell-Zell-Kontakt, wodurch innerhalb der cNLZ ein Gradient entsteht (Shoval und Kalcheim, 2012; s. Abbildung 1.2). Während RhoA am Zell-Zell-Kontakt über die Rho-assoziierte Protein-Kinase (ROCK) vermehrt

die Bildung von Stressfasern und damit die Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts fördert, wird die Ausbildung von Zellausläufern am Zell-Zell-Kontakt über die Inhibition von Rac1 verhindert. Interessanterweise sorgt Syndecan-4 ebenfalls für die Blockierung von Rac1 am Zell-Zell-Kontakt (Matthews et al., 2008a). Während der Verlust von Syndecan-4 keinen Einfluss auf die Delamination oder Motilität der cNLZ hat, kommt es zellautonom zur Verminderung der Direktionalität durch eine fünffache Erhöhung der Rac1-Aktivität, wodurch die cNLZ ähnlich wie bei der Inhibition von RhoA/ROCK Zellausläufer in alle Richtungen bilden. Damit wurde ein Modell vorgestellt, in dem Syndecan-4 parallel zum nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg für die Kontrolle der Rac1-Aktivität und somit für die Ausbildung von polarisierten Zellausläufern notwendig ist (Matthews et al., 2008a).

Aufgrund der Inhibition durch Syndecan-4 bzw. RhoA/ROCK ist Rac1 ausschließlich an kontaktfreien Bereichen der Zellen aktiv und sorgt dort für die Bildung neuer Zellausläufer. Jüngste Studien konnten zeigen, dass aktives Rac1 Lamellipodin bindet und über den Scar/WAVE-Komplex das F-Actin-bindende Protein Arp2/3 beeinflusst, welches die Verzweigung des Zytoskelettes in Lamellipodien ermöglicht (Law et al., 2013).

Auch wenn die molekularen Mechanismen der intrazellulären Antwort in der Kontaktinhibition zum Teil bereits verstanden werden, ist noch immer nicht vollständig geklärt, welche Moleküle den Kontakt zwischen zwei cNLZ vermitteln und wie die Aktivierung von RhoA induziert wird. Für die Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes werden verschiedene Transmembranproteine wie Ephrine, Nectine oder Cadherine vorgeschlagen. Dabei könnten diese durch ihre extrazelluläre Domäne den Kontakt erkennen, während ihre intrazellulären Signalfunktionen die entsprechende Zellreaktion auslösen würden.

Der Einfluss von Ephrinen und Eph-Rezeptoren ist in der Kontaktinhibition bekannt. So können Zellen der metastasierenden Prostatakrebs-Zelllinie PC-3 über konkurrierende Ephrin-EphR-Bindungen zelltypabhängig unterscheiden, ob Kontaktinhibition ausgelöst wird oder die Zellen einen invasiven Charakter aufweisen. EphA-EphrinA-Interaktionen lösen bei homotypischem Kontakt eine Richtungsänderung in PC-3-Zellen aus, wodurch es zur größtmöglichen Verteilung der malignen Zellen kommt. Im Gegensatz dazu führen heterotypische Kollisionen mit Fibroblasten über EphB-EphrinB2-Interaktionen zu einer erhöhten Invasion (Astin et al., 2010).

In cNLZ werden Ephrine und ihre Rezeptoren in den beiden branchialen Strömen exprimiert (Helbling et al., 1998). Sie gelten als chemotaktisch repulsive Signalmoleküle. Während der Verlust des Eph4A-Rezeptors zur ungerichteten Invasion der Zellen in unzulässiges Gewebe führt (Smith et al., 1997), kommt es bei der Depletion von Ephrin-B1 und Ephrin-B2 zu Migrationsdefekten bzw. Gaumenspalten (Adams et al., 2001; Davy et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die repulsive Eigenschaft von Ephrinen und die daraus resultierende gerichtete Zellbewegung möglicherweise auf

der Destabilisierung von Lamellipodien über Ephrin-B2 beruht und vermutlich zusätzlich über Proteine der Ena/VASP-Familie gefördert wird (Evans et al., 2007). Interessanterweise wurde für die posterior gelegenen Rumpf-NLZ gezeigt, dass Ephrine für die gerichtete Migration der Zellen durch den rostralen Teil der Somiten verantwortlich sind (Rickmann et al., 1985; Krull et al., 1997). Dabei verhindert die Ephrin-Eph-Rezeptor-Interaktion über eine zweiseitige Signalkaskade repulsiv die Migration durch den posterioren Teil der Somiten (Wang und Anderson, 1997).

Nektine und Nektin-ähnliche Moleküle (Necls) sind als Immunoglobulin-ähnliche Transmembranproteine für die Calcium-unabhängige Zelladhäsion und -kommunikation in verschiedenen Prozessen wie Zellpolarisation, Differenzierung, Proliferation, Migration und Vitalität bekannt (Fournier et al., 2010). Neuere Studien zeigen, dass ein Komplex aus Necl5, Integrin $\alpha\beta3$ und PDGFR über den Src-Signalweg in NIH/373-Zellen die kleine Rho GTPase RhoA inhibiert (Ikeda et al., 2004). Bei Kontakt von zwei Zellen kommt es über die heterotypische Interaktion von Nektin3 und Necl5 zur Endozytose von Necl5, wodurch der inhibierende Komplex aufgelöst wird und RhoA am Zell-Zell-Kontakt aktiv ist (Fujito et al., 2005). Jedoch ist bisher noch nicht geklärt, ob es sich bei diesem Mechanismus tatsächlich um die Vermittlung der Kontaktinhibition in diesem Zelltyp handelt, da sowohl die Zellmigration als auch die Zellproliferation verlangsamt wird (Miyoshi und Takai 2007).

Ebenso sind Cadherine für die cNLZ-Migration notwendig. So wurde gezeigt, dass N-Cadherin innerhalb der kollektiven Chemotaxis kontaktabhängig die Stabilisierung der Sdf-1 zugewandten Zellausläufer fördert (Theveneau et al., 2010). Die Protocadherine PCNS und PAPC werden ebenfalls während der Migration in cNLZ exprimiert (Rangarajan et al., 2006; Schneider et al., 2014). Dabei führt der Verlust von PCNS zu starken Migrationsdefekten der cNLZ (Rangarajan et al., 2006). Jüngste Untersuchungen zeigen, dass die Überexpression von PAPC ebenfalls Migrationsdefekte hervorruft, jedoch den Verlust von PCNS ersetzen kann (Schneider et al., 2014).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das mesenchymale Cadherin-11. Als klassisches Cadherin vermittelt es zum einen Zell-Zell-Adhäsion, zum anderen ist Cadherin-11 auch bekannt dafür, mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor GEF-Trio zu interagieren und somit die Aktivität der kleinen Rho GTPasen zu beeinflussen (Borchers et al., 2001; Kashef et al., 2009).

1.6 Cadherin-11

Wie alle klassischen Cadherine vom Typ II besteht das mesenchymale Cadherin-11 aus fünf extrazellulären Domänen (EC), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne (siehe auch Becker et al., 2012). Über die EC1-Domäne vermittelt das Cadherin durch ‚strand-swapping‘ Zell-Zell-Adhäsion (Posy et al., 2008; Zhang et al., 2009). Dabei interagieren die aromatischen Ringe des Tryptophan-2 und Tryptophan-4 mit der hydrophoben Tasche in der

EC1-Domäne des gegenüberliegenden Cadherins (Blaschuk et al., 1990; Nose et al., 1990; Shapiro et al., 1995; Patel et al., 2006; Boggon et al., 2002). Die hydrophobe Tasche enthält Alanin-80, welches im QAV-Motiv (Glutamin, Alanin, Valin; Typ II) konserviert ist (Nose et al., 1990; Blaschuk et al., 1990). Um die Bindung von *trans*-Interaktionen zwischen Cadherinen zweier benachbarter Zellen zu stärken, kommt es zu lateralen *cis*-Interaktionen innerhalb der Zellmembran (Volk et al., 1987; Pertz et al., 1999). Dabei wird die EC2-Domäne von der EC1-Domäne gebunden (Boggon et al., 2002). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar, da dies im Widerspruch mit anderen Modellen steht, in denen alle EC-Domänen für die *cis*-Interaktion benötigt werden (Sivasankar et al., 1999; Chappuis-Flament et al., 2001; Zhu et al., 2003).

In ihrer intrazellulären Domäne besitzen klassische Cadherine konservierte Bindestellen für die zytoplasmatischen Proteine p120- und β -Catenin. Die Interaktion mit p120-Catenin in der Juxtamembranregion reguliert den Transport, die Stabilität und die laterale Gruppierung der Cadherine (Reynolds und Carnahan, 2004; Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002; Yap et al., 1998). Zusätzlich kontrolliert p120-Catenin die Lokalisation der kleinen Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 und beeinflusst darüber sowohl die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts als auch die Zellpolarität (Anastasiadis und Reynolds, 2001; Davis et al., 2003; Anastadiadis, 2007). Die C-terminale Bindung von β -Catenin vernetzt die Cadherine via α -Catenin dynamisch mit dem Aktin-Zytoskelett (Aberle et al., 1994; Pokutta und Weiss, 2000; Huber und Weiss, 2001; Gumbiner, 2000; Huber et al., 2001; Rimm et al., 1995; Yamada et al., 2005; Drees et al., 2005; Pokutta et al., 2008). Des Weiteren kann die Sequestrierung von β -Catenin durch Cadherine den kanonischen Wnt-Signalweg beeinflussen (Gumbiner, 1993; Gumbiner, 1995).

Homologe von Cadherin-11 sind im Mensch (OB-Cadherin), sowie in Maus und Ratte bekannt (Tanihara et al., 1994; Okazaki et al., 1994; Hoffmann und Baling, 1995; Simonneau et al., 1995). Cadherin-11 ist nicht nur während der Embryonalentwicklung für verschiedene Prozesse notwendig, sondern spielt auch im adulten Organismus in pathologischen Zusammenhängen eine Rolle. In der Embryogenese ist das Adhäsionsprotein an der Migration von NLZ, der Somitenbildung, der Gliedmaßenknospung, der Verzweigung des Lungen- und Nierengewebes und der mesenchymalen Kondensation während der Knochenbildung beteiligt (Kimura et al., 1995; Simonneau et al., 1995; Hoffmann und Baling, 1995).

Im pathologischen Zusammenhang wurden die verstärkte Expression bzw. aberante Isoformen von Cadherin-11 in Prostata-, Brust-, Knochen- und Nieren-Krebs, in Rhabdomyosarcoma, sowie der Einfluss von Cadherin-11 auf die Metastasierung gezeigt (Pishvaian et al., 1999; Markus et al., 1999; Kashima et al., 1999; Lee et al., 2010; Bussemakers et al., 2000; Tomita et al., 2000; Chu et al., 2008; Tamura et al., 2008; Huang et al., 2010; Satcher et al., 2014; Lee et al., 2013). Dies führt zu einer

beschleunigten Invasion der malignen Zellen in gesundes Gewebe und weist auf eine migrationsfördernde Funktion von Cadherin-11 hin (Pishvaian et al., 1999; Satcher et al., 2014; Lee et al., 2013). Ebenso hat Cadherin-11 einen Einfluss in der inflammatorischen Arthritis. Dabei wird die Ausbreitung von Zellen der Synovia in das Knochengewebe vermutlich auf eine ähnliche Art gefördert wie bei der Metastasierung von Krebszellen in das Knochengewebe (Lee et al., 2007). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Cadherin-11 die Expression inflammatorischer Faktoren in Fibroblasten induziert, wodurch rheumatische Arthritis ausgelöst wird (Chang et al., 2011). Aufgrund dieses Einflusses von Cadherin-11 wird nach therapeutischen Ansätzen gesucht, welche, wie z.B. Celecoxib, direkt auf Cadherin-11 zielen und somit die Fehlregulierung des Cadherins kompensieren können (Assefnia et al., 2013).

Während der Embryogenese von *X. laevis* wird Cadherin-11 (Xcad-11) bereits maternal exprimiert und ist in frühen Stadien in der animalen Hemisphäre des Embryos lokalisiert. In späteren Stadien liegen Transkripte von Xcad-11 in den cNLZ, im Sklerotom und im lateralen Mesoderm vor (Hadeball et al., 1998; Vallin et al., 1998). Untersuchungen in isolierten animalen Kappen zeigen, dass Wnt8 und Activin die Expression von Xcad-11 in der Gastrulation induzieren und Bmp4 als negativer Regulator wirkt. Jedoch hemmt die Überexpression von Xcad-11 im Mesoderm die konvergente Extension während der Gastrulation, wodurch es zur Posteriorisierung der Embryonen kommt (Hadeball et al., 1998).

Ebenso hat die Überexpression von Xcad-11 einen Einfluss auf die Migration der cNLZ. *In situ*-Hybridisierungen gegen NLZ-spezifische Marker wie AP-2 α , Snail1 und Twist zeigen, dass die Injektion von Xcad-11 im Zwei-Zellstadium zu Migrationsdefekten der cNLZ führt. Dabei verlieren die cNLZ ihren undifferenzierten Status und werden durch die Blockierung der Migration zu neuralem Gewebe. Dabei werden die cNLZ-Marker unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg von neuronalen Markern wie 2G9, Nrp-1 und N-Tubulin ersetzt. Bei den Migrationsdefekten durch die Überexpression von Xcad-11 handelt es sich um ein zellautonomes Verhalten, da in Transplantationsanalysen Donor-cNLZ, welche mit einer hohen Dosis Xcad-11 mRNA co-injiziert wurden, nicht in der Lage sind, in die Kiemenbögen einzuwandern. Ähnliche Ergebnisse erhielt man bei Studien mit der Deletionsmutante Xcad-11- Δ c, welcher die intrazelluläre Domäne einschließlich eines Großteils der p120- und der β -Catenin-Bindestelle fehlt. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression der Deletionsmutante Xcad-11- Δ e, in welcher Teile der extrazellulären Domäne einschließlich des QAV-Motivs deletiert wurden, zu einer verfrühten Emigration der cNLZ, welche dennoch in der Lage sind, in die Kiemenbögen einzuwandern (Borchers et al., 2001).

Letzteres deutet darauf hin, dass für den Beginn und die Geschwindigkeit der cNLZ-Migration eine definierte Stärke der Xcad-11-vermittelten Adhäsion notwendig ist. Diese wird unter anderem von

der Metalloprotease Adam13 reguliert, welche die adhäsive Funktion von Xcad-11 durch die Spaltung zwischen den extrazellulären Domänen EC3 und EC4 moduliert. Das Spaltprodukt kann homophil an ungespaltene Xcad-11-Moleküle binden und somit die Adhäsion vermindern bzw. die Migration fördern. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Spaltung nicht die intrazelluläre Interaktion mit β -Catenin beeinflusst (McCusker et al., 2009).

Genfunktionsverluststudien zeigen, dass der Verlust von Xcad-11 mittels eines spezifischen Morpholino-Oligonukleotides (Xcad-11-MO) die Migration der cNLZ in den hyoidalen und die branchialen Kiemenbögen hemmt. Die Wanderung der cNLZ in den mandibularen Kiemenbogen wird davon jedoch nicht beeinflusst (Kashef et al., 2009). Die Xcad-11-depletierten cNLZ weisen dabei eine „blebbende“ Zellmorphologie auf, welche nicht durch Apoptose, sondern durch mangelnde Zell-Substrat-Adhäsion entsteht. Die subzelluläre Lokalisation von Xcad-11 beschränkt sich dabei nicht nur auf die Zellmembran, sondern konnte mittels TIRF auch in Zellausläufern und Fokalkontakten sichtbar gemacht werden. Zusätzlich verdeutlichen Rekonstitutionsversuche und Bindungsstudien, dass für die Ausbildung von Zellausläufern auf Fibronectin die Transmembrandomäne sowie Teile der intrazellulären Domäne notwendig sind (Kashef et al., 2009; Langhe et al., in Revision). Es konnte gezeigt werden, dass Xcad-11 über seine Intermediärdomäne den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Trio (GEF-Trio) bindet. Interessanterweise fungiert Trio oberhalb der kleinen Rho GTPasen und reguliert die Bildung von Zellausläufern in cNLZ (Kashef et al., 2009).

GEF-Trio gehört zur Unterfamilie der Dbl-GEFs, welche zwei Dbl-Homologie-Pleckstrin-Homologie-Domänen (GEF1 und GEF2) besitzen (Stam und Collard, 1999; Whitehead et al., 1997). Dabei konnte in Fibroblasten gezeigt werden, dass die N-terminale GEF1-Domäne die Aktivierung von Rac1 und RhoG katalysiert, während die C-terminale GEF2-Domäne RhoA aktiviert und darüber die Ausbildung von Stressfasern fördert (Bellanger et al., 1998a; Bellanger et al., 1998b; Ridley et al., 2003; van Rijssel et al., 2012). In beiden GEF-Domänen ist die DH-Domäne für den Austausch des Nukleotides verantwortlich, während die PH-Domäne für die subzelluläre Lokalisation von Trio sorgt (Bellanger et al., 1998b; Bellanger et al., 2000). Zudem kann die Co-Expression beider GEF-Domänen simultan sowohl RhoA als auch Rac1 aktivieren (Bellanger et al., 1998b).

In cNLZ wurde gezeigt, dass Trio mit Par3 am Zell-Zell-Kontakt co-lokalisiert. Die Aufgabe von Par3 in der cNLZ-Migration wurde mit der Depolymerisierung der Mikrotubuli an der Kontaktseite in Zusammenhang gebracht. Dabei führt die Depletion von Par3 zum Verlust der Kontaktinhibition in kollidierenden cNLZ, welche durch die Stabilisierung des Mikrotubuli-Systems am Zell-Zell-Kontakt keine repulsive Zellreaktion zeigen. Interessanterweise kann dies durch die Depletion von Trio wieder aufgehoben werden (Moore et al., 2013). Dies weist darauf hin, dass GEF-Trio ebenfalls ein Kandidat innerhalb des Mechanismus der Kontaktinhibition ist.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den molekularen Mechanismus der Kontaktvermittlung durch Xcad-11 in der Kontaktinhibition während der Migration von cNLZ in *X. laevis* zu charakterisieren.

Für die Kontaktinhibition konnte bereits gezeigt werden, dass durch den Zell-Zell-Kontakt der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg innerhalb der migrierenden Zellen aktiviert wird. Die Lokalisation des Mediatorproteins Dsh an die Zellmembran der Kontaktseite und die Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA führt zur Repolarisierung der cNLZ (Carmona-Fontaine et al., 2008). Durch den damit entstehenden Gradient von RhoA und Rac1 erfolgt die Ausbildung neuer Zellausläufer durch Rac1 ausschließlich an kontaktfreien Stellen der Zelle (Carmona-Fontaine et al., 2008; Shoval und Kalcheim, 2012).

Bisher wurde das Adhäsionsmolekül N-Cadherin für die Vermittlung des Kontaktes vorgeschlagen (Theveneau et al., 2010). Ein weiterer, interessanter Kandidat ist jedoch auch das mesenchymale Cadherin-11 (Xcad-11), welches in der Migration der cNLZ eine migrationsfördernde Rolle spielt (Borchers et al., 2001; Kashef et al., 2009). Zudem ist bekannt, dass die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 durch die Metalloprotease Adam13 reguliert werden kann (McCusker et al., 2009). Zusätzlich interagiert Xcad-11 mit GEF-Trio, welcher die Aktivität der kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 katalysiert (Kashef et al., 2009; Bellanger et al., 1998b).

In dieser Arbeit soll die Rolle von Xcad-11 als Adhäsionsvermittler der Kontaktinhibition durch ein dominant-negatives Konstrukt gegen die adhäsive Funktion von Xcad-11 validiert werden (Becker, Diplomarbeit, 2011). Mittels *in situ*-Hybridisierung und Transplantationsanalysen soll das Migrationsverhalten der cNLZ *in vivo* beschrieben werden. Zusätzlich wird über Konfrontations- und Kollisionsanalysen das Migrationsverhalten der cNLZ *in vitro* ermittelt. Ebenso wird der Einfluss der Metalloprotease Adam13 auf die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 innerhalb der Kontaktinhibition untersucht.

Da GEF-Trio unterhalb von Xcad-11 die kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 und darüber die Zellpolarität der migrierenden cNLZ beeinflusst, soll durch Depletion von Trio mittels eines spezifischen Morpholino-Oligonukleotids (Trio-MO) die Rolle von GEF-Trio innerhalb der Kontaktinhibition durch Konfrontations- und Kollisionsanalysen untersucht werden. Zusätzlich sollen über Zellmorphologiestudien und *in situ*-Hybridisierungen der Einfluss der einzelnen GEF-Domänen, der kleinen Rho GTPasen und des Mediatorproteins Dsh auf die Migration der cNLZ beschrieben werden.

3 Materialien

3.1 Antikörper

9E10 Maus α -Myc (unverdünnter Zellkultur-Überstand)		DSHB Hybridoma Bank, USA
α -Digoxigenin-AP Fab Fragments	1:3000	Roche Applied Science, Mannheim
Ziege α -Maus-AP	1:1000	Dianova GmbH, Hamburg

3.2 Bakterien

<i>E.coli</i> -Stamm JM-109		Promega, Mannheim
Genotyp:	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (rk- mk+) <i>relA1 supE44 D(lacproAB)</i> [F' <i>traD36 proABlacIqZDM15</i>]	

3.3 Chemikalien

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

2-log DNA Marker		New England Biolabs, Frankfurt/M
Agarose		peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
cOmplete mini EDTA free tablets		Roche Applied Science, Mannheim
Desoxyribonukleotide (dNTPs)		Promega GmbH, Mannheim
Dextran Fluorescein		Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Dextran Rhodamin		Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Midori Green Advanced DNA Stain		Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Natriumdodecylsulfat (SDS)		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Nukleasefreies H ₂ O		Promega GmbH, Mannheim
NBT/BCIP Stocklösung		Roche Applied Science, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (100x)		PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)		PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Select Agar		Life Technologies GmbH, Darmstadt
TEMED		Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tween-20		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

3.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen (+ Puffer)

Bsp119I (SfuI, AsuII)

Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA

NotI, HindIII, XbaI, EcoRI

Promega GmbH, Mannheim

KAPA High Fidelity DNA-Polymerase (+ Puffer)

Promega GmbH, Mannheim

PfuTurbo DNA Polymerase (+ Puffer)

Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA

T4 DNA Ligase (+Puffer)

Promega GmbH, Mannheim

Thermosensitive Alkalische Phosphatase (+ Puffer)

Promega GmbH, Mannheim

SP6, T3, T7 RNA Polymerase (+ Puffer)

Ambion Inc., TX, USA

3.5 Geräte

Binokulare und Zubehör

Leica L2

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Leica KL 200 LED

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Leica S6E

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Fiber Optic Light Source EK-1 (Euromex)

H. Saur Laborbedarf, Reutlingen

Brutschränke und Inkubatoren

37°C

Binder, Tuttlingen

16°C

Thermo Fisher Scientific, USA

14°C Sanyo Incubator

Panasonic Biomedical Sales Europe BV, UK

4°C

Privileg, Stuttgart

-20°C comfort

Liebherr-International GmbH, Biberach

-80°C Ultra low temperatur freezer

New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen

Colibri Microvolume Spectrometer

Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim

Easypet

Eppendorf, Hamburg

Feinwaage

Sartorius, Göttingen

Flachbett-Gelelektrophoresekammern

OWL Separation Systems, NH, USA

Power Supply Model 200/ 2.0

Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA

Fluoreszenzbinokulare und Zubehör

Leica HZ FLIII

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Leica MZ10

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Digitalkamera RetigaExi

QImaging, BC, Kanada

Kaltlichtquelle KL 1500 LCD

Leica Mikrosysteme, Bensheim

Software Openlab 3.1.1

Openlab, Heidelberg

Fluoreszenzmikroskop und Zubehör

Spinning Disc (Axio Observer.Z1)	C. Zeiss AG, Deutschland
Laser (445 nm, 665 nm)	C. Zeiss AG, Deutschland
10x Plan Apochromat NA 0,45 Luft Objektiv	C. Zeiss AG, Deutschland
63x Plan Apochromat NA 1,4 Öl Objektiv	C. Zeiss AG, Deutschland
Kamera AxioCamMRm	C. Zeiss AG, Deutschland
AxioVision 4.8.2	C. Zeiss AG, Deutschland

Geldokumentationsanlage

Gel Max	Intas, Göttingen
UV-Lampe	Bioblock Scientific, Illkirch, FR
PCR iCycler	Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA
Lab-Tek™ Chambered Coverglass Objektträger	NUNC, Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Schwabach
Mikropipetten Puller Model P-97	Sutter Instruments, CA, USA
Mikroinjektionsanlage	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Kaltlichtquelle, Fiber Optic Light Source EK-1	Euromex Microscopen B.V., NL
Membranpumpe MZ2	Vacuubrand GmbH & CoKG, Wertheim
Pneumatische Picopumpe PV 820	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Stereomikroskop MIC 1630 ZS	Euromex Microscopen B.V., NL
Mikroinjektionsanlage FemtoJet	Eppendorf, Hamburg
Mini Protean II™ PAGE-Apparatur	Bio-Rad, München
Mini Trans Blotapparatur	Bio-Rad, München
pH-Meter	WTW, Weilheim
Präzisionspinzetten	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttelinkubator Orbital Shaker	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Schüttelwasserbad GFL 1086	GFL, Althütte
Software	
Adobe® Photoshop® CS3	Adobe Systems GmbH, München
Adobe® Illustrator® CS3	Adobe Systems GmbH, München
ApE – A plasmid Editor v2.0.45	Freeware von M. Wayne Davis, USA
AxioVision 4.7.2	C. Zeiss AG, Deutschland
ImageJ	Freeware von Wayne Rasband, NIH, USA
MatLab R2011b	The MathWorks, Inc.
Sterilwerkbank Microflow 2	NUNC, Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Taumel-Rollenmischer Roll TRM-V	IDL, Nidderau
Terasaki 60 well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler Intelli-Mixer RM-2	ELMI, Riga, Lettland
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Waage	Satorius, Göttingen
Wippschüttler DRS-12	LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg
Zentrifugen	
Centrifuge 5414 D	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5414 R	Eppendorf, Hamburg
Hettich Zentrifuge	Hettich Laborapparate, Bäch, CH
Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
X-well Zellkulturkammern	Sarstedt, Nürnberg

3.6 Kits

Digoxigenin RNA-Labeling Kit	Roche Applied Science, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science, Mannheim
illustra™ Probe Quant™ G-50 Micro Columns	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
mMessage mMachine®	Ambion Inc., TX, USA
NucleoBond® Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren

3.7 Konstrukte zur Herstellung von mRNA

Name	Vektor	Polymerase	Restriktion	Referenz
GAP43-GFP	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	E. DeRobertis, Los Angeles, USA
GAP43-mcherry	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	B. Kraft, Karlsruhe
Histon2B-mcherry	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	R. Mayor, London, UK
Xcad-11- full length-6xmyc	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	S. Becker, Karlsruhe
Xcad-11- Δ WW Δ QAV-6xmyc	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	S. Becker, Karlsruhe
Xcad-11-EC1-3	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	G. Abbruzzese, Amherst, USA
Xcad-11-EC-NHB	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	G. Abbruzzese, Amherst, USA
Adam13-full length	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	D. Alfandari, Amherst, USA
Xdsh-DEP+myc	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	R. Mayor, London, UK
Xdsh- Δ DIX-GFP	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	R. Moon, Seattle, USA
Xdsh- Δ DEP-GFP	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	R. Moon, Seattle, USA
Xdsh- Δ PDZ-GFP	pCS2+	SP6	<i>NotI</i>	R. Moon, Seattle, USA

3.8 Konstrukte zur Injektion von DNA

Name	Vektor	Referenz
hTrio-full length-HA	pMT2	Q. Medley, Boston, USA
hTrio-GEF1-HA	pMT2	Q. Medley, Boston, USA
hTrio-GEF2-HA	pMT2	Q. Medley, Boston, USA
caRhoA	pCS2+	A. Schambony, Karlsruhe
caRac1	pCS2+	A. Schambony, Karlsruhe
caCdc42	pcDNA3.1	A. Schambony, Karlsruhe
mTrio-GFP	pEGFP-C2	A. Debant, Montpellier, FR

3.9 Konstrukte zur Klonierung

Name	Vektor	Referenz
Xcad-11mut-myc	pCDNA3.1	J. Kashef, Karlsruhe
Xcad-11	pCDNA3.1	J. Kashef, Karlsruhe
Δ WW Δ QAV-myc-His		
6xmyc	pCS2+	R. Rupp, Seattle, USA
6xmyc- <i>Sful</i> mut	pCS2+	S. Becker, Karlsruhe

3.10 Konstrukte zur Herstellung Digoxigenin-markierter RNA als ISH-Sonden

Name	Transkription	Restriktion	Bindung	Referenz
AP-2 α	T7	<i>HindIII</i>	anti-sense	A. Borchers, Ulm
Twist	T7	<i>XbaI</i>	anti-sense	M. Sargen, London
Sox10	T3	<i>EcoRI</i>	anti-sense	Y. Aoki, Philadelphia, USA

3.11 Komplementäre Morpholino-Oligonukleotide (MO, Gene Tools, LLC, USA)

Kontroll-MO (CoMO)	5'-ATA TTT AAC ATT GAC TCC ATC CTC C-3'
Xcad-11-MO	5'-TGT TGT GAT GGT TTT TAC TTC TTT C-3'
Adam13-MO	5'-GTC CCA GCC GAC CCT CC-3'
Trio-MO	5'-TGC GCA TAG CTA CAG CTG AAA AAA A-3'

3.12 Primer zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Biomers GmbH, Ulm)

Name	Sequenz	Länge	T _M	% C/G
Xcad-11 <i>Sful</i> for	5'-CG TTC GAA ATG AAA AAG GAC TTT TGC TTA CAC GG-3'	34	52°C	41%
Xcad-11 <i>Sful</i> rev	5'-CG TTC GAA AGA ATC ATC TTC ACA AGT GTC TTT GAA C-3'	36	52°C	42%
<i>Sful</i> mut for	5'-CGT ACC CCA TGT CTG TGT TCG AAG CTG CTG TCC CAG GGG-3'	39	74°C	62%
<i>Sful</i> mut rev	5'-CCC CTG GGA CAG CTT CGA ACA CAG ACA TGG GGT ACG-3'	36	74°C	62%

3.13 Puffer und Lösungen

Alzianblau-Färbelösung	0,8 mg/ml Alzianblau in 70% (v/v) Ethanol und 30% (v/v) HAC
Ampicillin-Stammlösung (1000x)	100 mg/ml Ampicillin in Aqua bidest., bei -20°C lagern
AP-Puffer	0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl
BCIP Stocklösung	50 mg/ml in 100% (v/v) Dimethylformamid
Blockierlösung	3% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
BSA-Lösung	Danilchik's Puffer, 3% (w/v) BSA
Coomassie Färbelösung	2,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie Entfärbelösung	45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Danilchik's Puffer	53 mM NaCl, 15 mM NaHCO ₃ , 13,5 mM Na ₂ CO ₃ , 4,5 mM K-Gluconat, 5 mM Bicin, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ ; zunächst den pH mit 1 M HEPES auf 8,3 einstellen und anschließend CaCl ₂ und MgSO ₄ dazugeben, steril filtrieren
DEPC-H ₂ O	1 ml Diethylpyrocarbonat über Nacht in einem Liter Aqua bidest. rühren und anschließend durch Autoklavieren inaktivieren
Dissoziationspuffer	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO ₃ , 7,5 mM Tris-HCl pH 7,6
cNLZ-Dissoziationspuffer	0,3 mM EGTA in Danilchik's Puffer ohne CaCl ₂
HEMA	12 mg/ml Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in 95% (v/v) EtOH
<i>in situ</i> Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer	0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 0,1% (v/v) Tween-20
<i>in situ</i> Bleichlösung	30% (v/v) H ₂ O ₂ (30%), 5% (v/v) Formamid, 2,5% (v/v) SCC (20x) in 100% (v/v) EtOH
<i>in situ</i> Blockierungslösung	10% (w/v) Boehringer Mannheim Blockierungsreagenz (BMB) in 5x MAB
<i>in situ</i> Denhardts Lösung (50x)	1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1% (w/v) Ficoll
<i>in situ</i> Färbelösung	1,5 µl/ml NBT, 1,5 µl/ml BCIP in AP-Puffer
<i>in situ</i> Heparin-Lösung	100 mg/ml Heparin in DEPC-H ₂ O
<i>in situ</i> Hybridisierungspuffer	50% (v/v) Formamid deionisiert, 5x SSC, 2% (v/v) Torula-RNA-Lösung, 0,1% (v/v) Heparinlösung, 1x Denhardts Lösung, 0,1% (v/v) Tween-20, 0,1% (v/v) HAPS, 500 µl 0,5 M EDTA

<i>in situ</i> SSC (20x)	300 mM Na-Citrat pH 7,0, 300 mM NaCl
<i>in situ</i> Torula-RNA-Lösung	50 mg/ml Torula-RNA in DEPC-H ₂ O bei 80°C lösen
<i>in situ</i> Waschlösung 1	50% (v/v) Formamid, 2x SSC, 0,1% (v/v) Tween-20
<i>in situ</i> Waschlösung 2	25% (v/v) Formamid, 2x SSC, 0,1% (v/v) Tween-20
<i>in situ</i> Waschlösung 3	12,5% (v/v) Formamid, 2x SSC, 0,1% (v/v) Tween-20
<i>in situ</i> Waschlösung 4	2x SSC, 0,1% (v/v) Tween-20
<i>in situ</i> Waschlösung 5	0,2x SSC, 0,1% (v/v) Tween-20
Ladepuffer für DNA-Auftrennung	0,25% (w/v) Orange G, 40% (w/v) Saccharose in Aqua bidest., bei 4°C lagern
L-Cysteinhydrochlorid-Lösung	2% (w/v) Cystein in 0,1x MBSH, pH 8,2
Luria Bertani (LB-) Medium	10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Wasser, pH 7,5, autoklavieren, Lagerung bei 4°C
LB-AMP-Medium	1 ml Ampicillinlösung pro Liter LB-Medium (1:1000)
LB-AMP-Agar-Platten	1,5 % (w/v) Select Agar in LB-Medium lösen, autoklavieren, nach Abkühlen (auf 55°C) 1 ml Ampicillin-Stammlösung pro Liter zugeben und in Pertrischalen (Ø 9,4 cm) gießen, erkaltete Platten kopfüber bei 4°C lagern
MAB (5x)	0,5 M Maleinsäure, 0,75 M NaCl, pH 7,5
MBSH (10x)	880 mM NaCl, 24 mM NaHCO ₃ , 100 mM KCl, 4 mM CaCl ₂ , 3,3 mM Ca(NO ₃) ₂ , 100 mM HEPES, 8 mM MgSO ₄ , pH 7,4
MEM (1x)	100 mM MOPS pH 7,4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO ₄
MEMFA	3,7% (v/v) Formaldehyd in 1x MEM
MMR-Reaggregationspuffer (1x)	0,1 M NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 5 mM HEPES pH 7,4
MS222 (Froschnarkotikum)	2,5 g/l Aminobenzoessäure-Ethylester in H ₂ O, pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen, drei Monate bei 4°C lagerbar
NBT-Stocklösung	100 mg/ml NBT in 70% (v/v) Dimethylformamid
Nilblau-Färbelösung	0,5 M Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M NaH ₂ PO ₄ , 0,1 g/l Nile Blue (Chlorid) in H ₂ O
NP40-Puffer (1%)	1% NP40 (Igepal) in 1x PBS, 1 Tablette cOmplete mini EDTA free
NP40-Lysispuffer	1% NP40-Puffer, 10 mg/ml Leupeptin, 10 mg/ml Aprotinin, 10 mg/ml PMSF
P1-Puffer	50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
P2-Puffer	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3-Puffer	2,8 M Kaliumacetat

PBS (1x)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
PTW	0,1% (v/v) Tween-20 in 1x PBS
SABU-ME (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	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SOB-Medium	20 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 g MgCl ₂ , ad 1 l Aqua bidest., pH 7,0, autoklavieren
SOC-Medium	SOB-Medium, 20 mM MgCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, steril filtrieren
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris/Acetat pH 8,3, 1 mM EDTA
TBS (10x)	25 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂
TBS-T	0,1% (v/v) Tween-20 in 1x TBS
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol

4 Methoden

4.1 Methoden der Embryologie

4.1.1 Haltung von *X. laevis*

Jeweils zehn bis 15 adulte *X. laevis* werden nach Geschlecht und Phänotyp (pigmentiert und albinotisch) getrennt in Aquarien bei einer Wassertemperatur zwischen 18°C und 20°C gehalten. Für eine einheitliche circadiane Rhythmik der Tiere beträgt die Belichtungsdauer der Aquarien 14 Stunden. Die Entkeimung des in der Anlage zirkulierenden Wassers erfolgt durch einen Bakterienfilter und UV-Bestrahlung. Als Nahrung erhalten die adulten Frösche zweimal in der Woche Rinderherz bzw. Trockenfutter der Firma Tetra GmbH (Tetra Pond Sticks). In der Nachzucht werden juvenile Tiere mit Maden bzw. Kaulquappen mit einem Pulvergemisch aus Brennnessel, Proteinen und Hefe gefüttert.

4.1.2 Eiablage

Bei weiblichen *X. laevis* wird die Eireifung durch die subkutane Injektion des humanen Hormons Choriogonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack der Tiere induziert. Dazu werden 15 Stunden vor dem Beginn der gewünschten Eiablage 600 Einheiten hCG injiziert. Um eine zeitlich versetzte Eiablage zu induzieren, ist alternativ eine Präinjektion möglich, bei der 100 Einheiten 20 bis 24 Stunden und 600 Einheiten acht Stunden vor der gewünschten Eiablage injiziert werden.

Die Eiablage erfolgt, indem die Weibchen behutsam am Rücken massiert werden bzw. Druck auf zwei Punkte dorsal und ventral ausgeübt wird. Letztere Methode vermindert die Überreizung der Froschhaut. Zu beachten ist, dass die Haut der Tiere permanent feucht bleibt, um durch Reibung bedingte Hautreizungen möglichst zu verhindern. Durch den Druck auf den Unterleib geben die Tiere die Eier aus der Kloake ab, welche in einer Petrischale aufgefangen werden können. Die Eiablage findet stündlich statt, jedoch höchstens viermal pro Weibchen. Es werden ausschließlich gesunde Gelege mit reifen Eiern und normaler Gallerthülle befruchtet.

Um Infektionen und Hautreizungen nach der Eiablage möglichst gering zu halten, werden die Weibchen eine Nacht in ein Regenerationsbad mit 3% (w/v) NaCl gesetzt, bevor sie erneut in gesonderten Abblanchbecken in die Aquarienanlage eingegliedert werden. Nach einer dreimonatigen Ruhepause können sie wieder zur Eiablage herangezogen werden.

4.1.3 Testisextraktion

Für die *in vitro*-Fertilisation der Eier werden jede Woche die Hoden von einem Männchen benötigt. Für die tierschutzgerechte Behandlung wird das Männchen vor der Explantation der Testis 20 bis 30 Minuten in kalter 0,25% (v/v) Aminobenzolsäure-Ethylester-Lösung (MS222) betäubt. Der Tod erfolgt durch das Durchtrennen der Halswirbelsäule, wonach die peripheren Nervenstränge mittels einer Kanüle getrennt werden. Die Öffnung der Bauchhöhle wird durch einen paramedianen Schnitt auf der ventralen Seite von posterior zu anterior durch die Haut und Muskeln der Bauchdecke durchgeführt. Die als helle, ovale Organe im dorsalen Fettgewebe vorliegenden Testis werden nach ihrer Entnahme von Fett- und Blutresten gereinigt und können etwa 1-2 Wochen in 1x MBSH bei 4°C gelagert werden.

4.1.4 *In vitro*-Fertilisation

Für eine möglichst gleichmäßige und synchrone Entwicklung vieler Embryonen wird die *in vitro*-Fertilisation angewendet. Dafür wird die Testis-Suspension aus einem Drittel des in 1x MBSH mazerierten Hodens 1:10 mit sterilem Aqua bidest. verdünnt und über den frisch gelegten Eiern verteilt. Durch die Verdünnung werden die Spermien, welche in hohen Salzkonzentrationen immobilisiert sind, bewegungsfähig und befruchten die Eier. Eine erfolgreiche Befruchtung ist durch die kortikale Rotation der Embryonen innerhalb von 30-60 Minuten zu erkennen, wonach die pigmentierte animale Seite nach oben zeigt.

4.1.5 Entfernen der Gallerthülle

Die in der Natur zum Schutz dienende Gallerthülle, welche der Vitellinmembran aufliegt, muss für die Manipulation der Embryonen entfernt werden. Dazu wird das Gelege für etwa fünf bis zehn Minuten in einer 2% (w/v) L-Cysteinhydrochlorid-Lösung (pH 8,2) vereinzelt und anschließend mehrmals in 0,1x MBSH gewaschen.

4.1.6 Anfärben albinotischer Embryonen

Um die Zuordnung der Entwicklungsstadien bei unpigmentierten Embryonen zu erleichtern, werden diese nach dem Entfernen der Gallerthülle zehn bis zwanzig Minuten in einer Nilblau-Färbelösung inkubiert. Anschließend werden die bläulichen Embryonen in 0,1x MBSH gewaschen. Die Färbung kann später durch die Behandlung der fixierten Embryonen mit 100% Ethanol entfernt werden. Für Lebendzellanalysen mit fluoreszierenden Proteinen sollten die Embryonen nicht gefärbt werden, da der Farbstoff die Fluoreszenz überdeckt.

4.1.7 Mikroinjektion

Mithilfe der Mikroinjektion ist es möglich Kleinstmengen an Molekülen wie z.B. DNA, RNA oder komplementäre Morpholino-Oligonukleotide mittels technischem Stickstoff oder Luftdruck gezielt in Embryonen zu injizieren. Dazu werden mit einem Mikropipettenzieher ultrafeine Glaskapillaren für die Injektion hergestellt und das Injektionsvolumen über ein Gitter der Elektronenmikroskopie eingestellt. Dabei entspricht ein Tropfen innerhalb des Gitterinnenraums (205 μm) einem Injektionsvolumen von etwa 4 nl.

Die Injektion erfolgt entweder im Zwei-Zellstadium einseitig in die Blastomere A und/oder B, während im Acht-Zellstadium (Stadium 4) – speziell auf die Domäne der cNLZ beschränkt – in die animal dorsale Blastomere D1 bzw. für eine größere Ausdehnung der Expression im posterioren Bereich auch in die animal ventrale Blastomere V1 injiziert wird (siehe Abbildung 4.1).

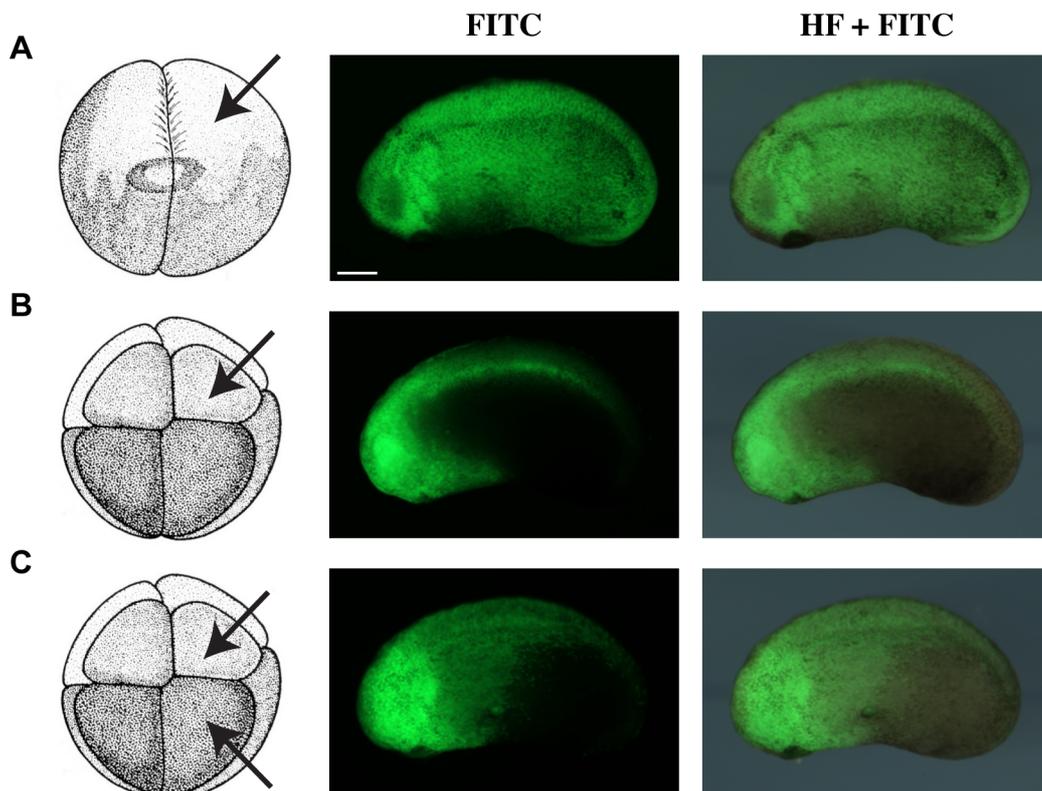


Abbildung 4.1: Mikroinjektion von *X. laevis* Embryonen.

Erste Spalte: Schematische Darstellung der injizierten Stadien nach Nieuwkoop und Faber, 1967. Zweite Spalte: Fluoreszenz-Kanal (FITC), laterale Ansicht im Stadium 25, anterior links, dorsal oben. Dritte Spalte: Überlagerung Hellfeld und Fluoreszenz-Kanal (HF+FITC), laterale Ansicht im Stadium 26, anterior links, dorsal oben. (A) Im Stadium 2 in eine Blastomere mit Dextran-FITC injizierter Embryo. (B) Im Stadium 4 in eine Blastomere mit Dextran-FITC injizierter Embryo. (C) Im Stadium 4 in zwei Blastomeren mit Dextran-FITC injizierter Embryo. Maßstab: 250 μm .

Parallel zur Injektion der zu untersuchenden Substanzen werden als Injektionskontrolle fluoreszenzmarkierte Proteine bzw. Zucker co-injiziert. Bei den Fluoreszenzproteinen handelt es sich um 500 pg mRNA von Fusionskonstrukten. Als Membranmarker dient die Fusion eines fluoreszenten Proteins (mGFP oder mcherry) mit dem Palmitoylationssignal von GAP-43. Für die Lokalisation im Nucleus ist Histon 2B mit dem Fluoreszenzprotein mcherry fusioniert. Alternativ können 4 ng mit Fluorescein- oder Rhodamin-isothiocyanat gekoppeltes Dextran in die Zelle eingebracht werden, welches cytoplasmatisch verteilt ist.

Um die Wundheilung nach der Injektion zu unterstützen werden die Embryonen eine Stunde in 1x MBSH kultiviert und anschließend für ihre weitere Entwicklung entsprechend der verschiedenen Versuche in 0,1x MBSH überführt.

4.1.8 Embryonenpflege

Für die Gewährleistung einer optimalen Entwicklung und einer hohen Überlebensrate werden tote Embryonen regelmäßig entfernt und das Kulturmedium (0,1x MBSH) zweimal täglich gewechselt. Die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen ist temperaturabhängig und kann daher durch die Wahl der Umgebungstemperatur (14°C, 16°C oder 25°C) reguliert werden. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber, 1967.

4.1.9 Gen-Suppression durch komplementäre Einzelstrang-Morpholino-Oligonukleotide

Durch die Tetraploidie von *X. laevis* ist das gezielte Ausschalten eines Gens über homologe Rekombination nicht möglich. Dennoch lässt sich die Translation von Proteinen gezielt über die *antisense*-Technologie mittels Morpholino-Oligonukleotide (MO) herunterregulieren. MO stellen chemisch modifizierte Nukleinsäure-Analoga dar, welche komplementär zur endogenen Ziel-mRNA sind. Im Gegensatz zu endogenen Oligonukleotiden besitzen sie jedoch anstelle der Desoxyribose einen heterozyklischen Morpholinring und ihre Phosphatbrücken sind durch eine Amidatgruppe im Vergleich zu Nukleinsäuren ungeladen (siehe Abbildung 4.2). Dadurch reagieren oder interagieren sie nur schwer mit intrazellulären Proteinen. Des Weiteren besitzen sie im Embryo eine hohe Stabilität, da sie von endogenen Nukleasen nicht erkannt und somit nicht abgebaut werden können.

Bedingt durch die Watson-Crick-Basenpaarung komplementiert das MO mit hoher Spezifität die Ziel-mRNA und bildet somit einen Doppelstrang. MO binden überwiegend an das 5'-Ende der mRNA und verhindern somit die Erkennung durch Ribosomen und die Translation des Zielgenes. Mit jeder Furchung und Zellteilung wird die MO-Konzentration jedoch verdünnt, wodurch nicht zu hundert

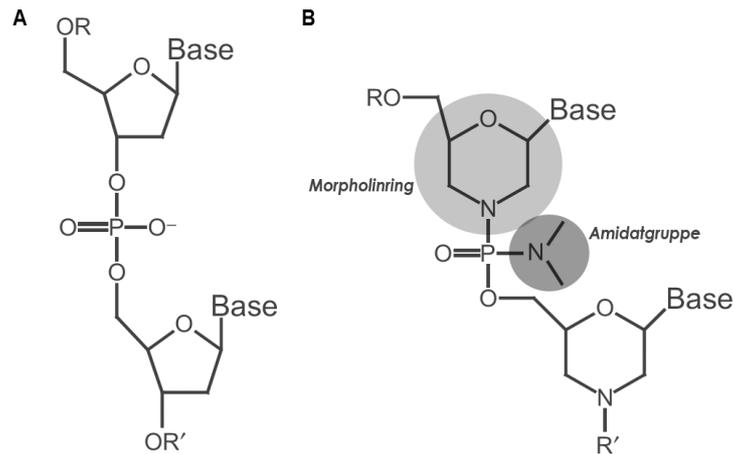


Abbildung 4.2: Struktureller Unterschied zwischen DNA- und Morpholino-Nukleotiden.

(A) DNA enthält als Grundstruktur Desoxyribose (Pentose), wobei die Nucleotide über Phosphodiester-Brücken verbunden sind. (B) Im Gegensatz dazu besitzen Morpholino-Oligonucleotide heterozyklische Morpholinringe und eine Amidatgruppe. (verändert nach Corey und Abrams, 2001)

Prozent jedes endogene Ziel-mRNA-Molekül gebunden werden kann und es nicht zu einer vollständigen Repression der Translation (*knockout*) kommt, sondern nur zu einer Suppression (*knockdown*). Für die optimale Löslichkeit sollte das MO vor der Verwendung durch fünfminütige Inkubation bei 65°C aktiviert werden.

4.1.10 Fixierung und Lagerung von *X. laevis* Embryonen

Für die Ganzkeim-*in situ*-Hybridisierung werden die Embryonen bis zum gewünschten Stadium kultiviert und durch eine einstündige Inkubation in MEMFA fixiert. Die Lagerung erfolgt in 100% (v/v) Ethanol bei -20°C.

4.1.11 *In situ*-Hybridisierung

Zur Ermittlung der zeitlichen und räumlichen Genexpression eines bestimmten Proteins wird die Ganzkeimfärbung mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) genutzt. Dabei binden markierte *antisense*-Sonden komplementär an die mRNA des Ziel-Proteins. Die Sonde wird mittels *in vitro*-Transkription linearisierter DNA hergestellt, wobei eine indirekte Markierung mit Fluorescein bzw. Digoxigenin erfolgt, welche kovalent mit dem C₅-Atom der Uridinbase verknüpft sind. Nach der Hybridisierung kann die gebundene mRNA über einen alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Antikörper farblich detektiert werden.

Die ISH erfolgt, mit kleineren Modifikationen, wie in der Literatur beschrieben (Harland, 1991). Die fixierten Embryonen werden in Schraubdeckelgläsern überführt und können – wenn nötig – mittels

einer Wasserstoffperoxid-Lösung unter Lichtbestrahlung gebleicht werden, wodurch die Pigmentierung verloren geht und die Detektion der Sonde vereinfacht wird. Nach der Rehydrierung der Embryonen in einer absteigenden Ethanol-Reihe werden diese mittels PTW permeabilisiert. Anschließend erfolgt für vier bis sechs Stunden eine Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer bei 62-65°C, welche der Blockierung unspezifischer Bindestellen für die RNA-Sonden dient. Für die Hybridisierung über Nacht bei 62-65°C im Wasserbad wird der Hybridisierungspuffer mit der Sonde versetzt und es kommt zur Bildung von Hybridmolekülen zwischen der endogenen mRNA der Embryonen und der eingesetzten Sonde. Formamid, welches im Hybridisierungspuffer enthalten ist, ermöglicht die Hybridisierung bei Temperaturen, die nicht gewebeschädigend sind, da es durch seine starke Polarität die Wasserstoffbrücken zwischen Nukleotiden schwächt. Stabilisiert werden die Hybride zum einen durch den Hoch-Salz-(SSC)-Puffer, zum anderen durch EDTA, welches als Chelator Kationen bindet. Des Weiteren unterdrückt die enthaltene Denhardts-Lösung unspezifische Anlagerungen. Nach der Entfernung der Sonde, welche recycelt werden kann, werden nicht oder unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle durch mehrere Waschschrte (10 min Waschlösung 1-4, 30 min Waschlösung 5, zweimal 10 min 1x PTW bei 62-65°C) entfernt. Anschließend werden die Embryonen zweimal 10 min in 1x MAB umgepuffert und zwei Stunden in 2% MAB-BMB-Blockierungspuffer äquilibriert. Die Embryonen werden in 2% MAB-BMB-Blockierungspuffer mit Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmenten (1:3000) überführt. Während der vierstündigen Inkubation werden die markierten RNA-Hybride von dem Antikörper gebunden. Dabei wird die markierte Sonde mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welcher mit dem Antikörper fusioniert ist. Nachdem der unspezifisch gebundene Antikörper durch 1x MAB-Puffer bei 4°C über Nacht ausgewaschen wurde, werden die Embryonen zehn Minuten in AP-Puffer bei RT äquilibriert. In diesem Puffer erfolgt nach Zugabe von 350 µg/ml NBT und 225 µg/ml BCIP die Färbung. Dabei setzt die alkalische Phosphatase die Substrate in einen blauen, schwer löslichen Indigo-Farbstoff (Formazan) um, welcher kovalent im Gewebe gebunden ist. Um unspezifische Hintergrund-Färbung zu vermeiden, erfolgt der Färbevorgang im Dunkeln bei 4°C. Die Reaktion wird durch das Waschen mit Aqua bidest. gestoppt und unspezifische Farbstoffeinlagerungen durch einmaliges Inkubieren in 100% (v/v) Ethanol entfernt. Nach einer absteigenden Ethanolreihe werden die Embryonen eine Stunde in MEMFA fixiert und können in 1x MEM bei 4°C gelagert werden.

4.1.12 Knorpelfärbung

Die Färbung von cranialen Knorpelstrukturen ermöglicht die Analyse von Neuralleistenderivaten in späteren Entwicklungsstadien. Dafür werden im Stadium 4 injizierte Embryonen bis Stadium 45 in 0,1x MBSH kultiviert und anschließend fünf Minuten mit MS222 betäubt, eine Stunde in MEMFA fixiert und in 100% (v/v) Ethanol gelagert. Eine dreitägige Inkubation in Alzianblau-Färbelösung färbt

die sich auf dem Knorpel befindenden sauren Mukosubstanzen (Glykosaminglykane) tiefblau. Anschließend werden die Embryonen dreimal 15 Minuten in 100% (v/v) Ethanol gewaschen und über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert (100%, 75%, 50%, 25% (v/v) Ethanol in 2% (v/v) Kaliumhydroxid). Für eine höhere Stabilität der Knorpelstrukturen werden die Embryonen über eine aufsteigende Glycerinreihe (jeweils einstündige Inkubation in 20%, 40%, 60% (v/v) Glycerin in 2% (v/v) Kaliumhydroxid) in 80% (v/v) Glycerin in 2% (v/v) Kaliumhydroxid umgepuffert und können darin gelagert werden.

Damit die Knorpelstrukturen deutlicher zu erkennen sind, werden Epidermis, Augen und Rumpf mit Präzisionspinzetten entfernt. Die Knorpelstrukturen lassen sich anschließend unter dem Binokular fotografieren und können in 80% (v/v) Glycerin in 2% (v/v) Kaliumhydroxid bei 4°C gelagert werden.

4.1.13 Explantation von cNLZ

Für *in vitro*-Untersuchungen von cNLZ können diese im Stadium 16 explantiert werden. Dazu werden die Embryonen nach der Injektion kultiviert und zwischen Stadium 14 und 16 nach ihrer Injektionsseite und Fluoreszenzstärke unter dem Fluoreszenz-Binokular sortiert (siehe Abbildung 4.3 A, B). Die Entwicklungsgeschwindigkeit kann deutlich verlangsamt werden, wenn die Embryonen auf Eis gelagert werden und ermöglicht somit eine maximale Zeitspanne für die Explantation im Stadium 16 bis 17.

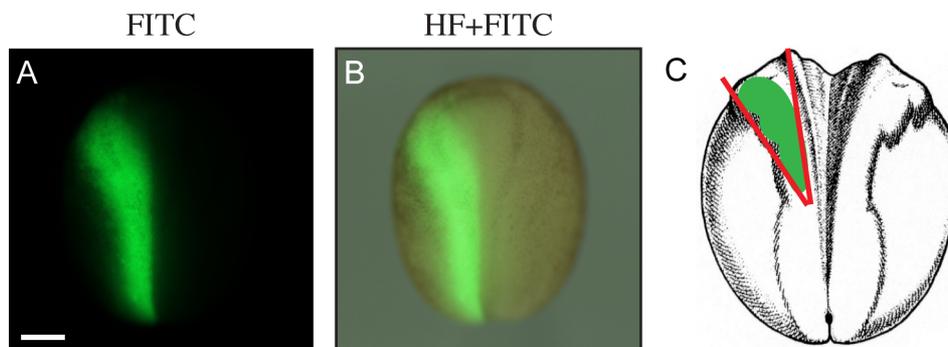


Abbildung 4.3: Dorsale Ansicht eines *X. laevis*-Embryos im Stadium 16.

Dorsale Ansicht von *X. laevis* Embryonen im Stadium 16, anterior ist oben. (A) Fluoreszenzmarkierte cNLZ im FITC-Kanal. (B) Überlagerung von Hellfeld und FITC-Kanal (HF+FITC). (C) Schematische Darstellung der epidermalen Schnitte (rot) im Bereich der fluoreszenzmarkierten cNLZ (verändert nach Neuwkoop und Faber, 1967). Maßstab: 250 µm.

Die schützende Vitellinmembran, welche die Embryonen umgibt, wird mit zwei Präzisionspinzetten entfernt. Anschließend werden die Embryonen aus ihrem Kulturmedium in Danilchik's Puffer mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin überführt, welcher in mit 2% (w/v) Agarose beschichteten Petrischalen vorliegt. Zur Immobilisierung der Embryonen wird eine flache, rechteckige Vertiefung in der Größe

des Embryos aus der Agarose herausgeschnitten. Als Werkzeuge für die Explantation dienen humane Wimpern, welche mit Nagellack in einer Kanüle fixiert werden. Für die Explantation der cNLZ wird auf der fluoreszierenden Seite des Embryos die Epidermis durch zwei Schnitte entfernt. Dabei erfolgt der erste Schnitt parallel zur Neuralfalte entlang der Neuralplattengrenze und der zweite in einem Winkel von etwa 45° zum ersten Schnitt (s. Abbildung 4.3 C, rote Linien). Mit den Wimpernnadeln lässt sich nun die Epidermis anheben und die grau schimmernden cNLZ können vorsichtig entnommen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die darunter liegenden Mesodermzellen nicht explantiert werden, welche wesentlich größer sind und die Ergebnisse verfälschen würden.

Für die mikroskopische Untersuchung der cNLZ werden Lab-Tek™ Chambered Coverglass Objektträger bzw. X-well Zellkulturkammern („2 well“ bzw. „8 well“) eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 50 µg/ml Fibronectin beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Danilchick's Puffer können die explantierten cNLZ mit einer Pipettenspitze, welche mit 3% (w/v) BSA-Lösung blockiert wurde, in die vorbereiteten Objektträger überführt werden. Die Zell-Substrat-Adhäsion und Ausbildung der Zellausläufer ist nach ein- bis zweistündiger Inkubation abgeschlossen und die cNLZ lassen sich entsprechend des Versuchsaufbaus mithilfe von Mikroskopieaufnahmen untersuchen.

4.1.14 Konfrontationsanalyse

Zur Untersuchung der Kontaktinhibition von cNLZ im Zellverband werden Embryonen im Stadium 4 mit membranbindenden Fluoreszenzfarbstoffen und den zu untersuchenden Konstrukten injiziert. Die Explantation erfolgt im Stadium 16 wie unter 4.1.13 beschrieben. In der Konfrontationsanalyse werden je ein grün und ein rot fluoreszierender Zellverband mit etwa 50 µm Abstand zueinander auf dem mit Fibronectin beschichteten Lab-Tek™ Chambered Coverglass „2 well“ Objektträger bzw. der X-well Zellkulturkammer gegenübergestellt (siehe Abbildung 4.4 A). Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, werden ausschließlich Zellverbände ausgewählt, welche stark fluoreszierend als geschlossener Zellverband vorliegen und keine Mesodermzellen enthalten. Das Migrationsverhalten der cNLZ im Zellverband wird nach der Adhäsionsphase für zehn Stunden bei 16-19°C Raumtemperatur unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Spinning Disc, 10x Objektiv) untersucht. Dabei werden die Zellen im Abstand von drei bis fünf Minuten in 5-7 Ebenen im Grün- (445 nm) und Rotkanal (665 nm) fotografiert. Durch das Zusammenfügen der einzelnen Ebenen über die „Erweiterte Tiefenschärfe-Funktion (Extended Focus)“ der AxioVision-Software ist eine räumliche Darstellung und Signalverstärkung möglich. Die Aufnahmen der verschiedenen Zeitpunkte lassen sich durch den Export der Daten im .mov-Format chronologisch zu einem Film anordnen.

Für die statistische Auswertung der Konfrontationsanalyse wird mittels MatLab (MathWorks) der Überlappungs-Index OI (engl. „Overlapping-Index“; [0,1]) berechnet. Dieser gibt zum Zeitpunkt der höchsten Überlappung Δt an, welches Verhältnis der überlappende Teil des Explantats zum normalisierten Explantat hat und ermöglicht somit einen Vergleich zwischen verschiedenen Ansätzen. Die Normalisierung der Explantate $2d^2$ über die Kontaktgrenze d (s. Abbildung 4.4 B, C) ist notwendig, damit der Überlappungsindex unabhängig von unterschiedlichen Explantatgrößen ist.

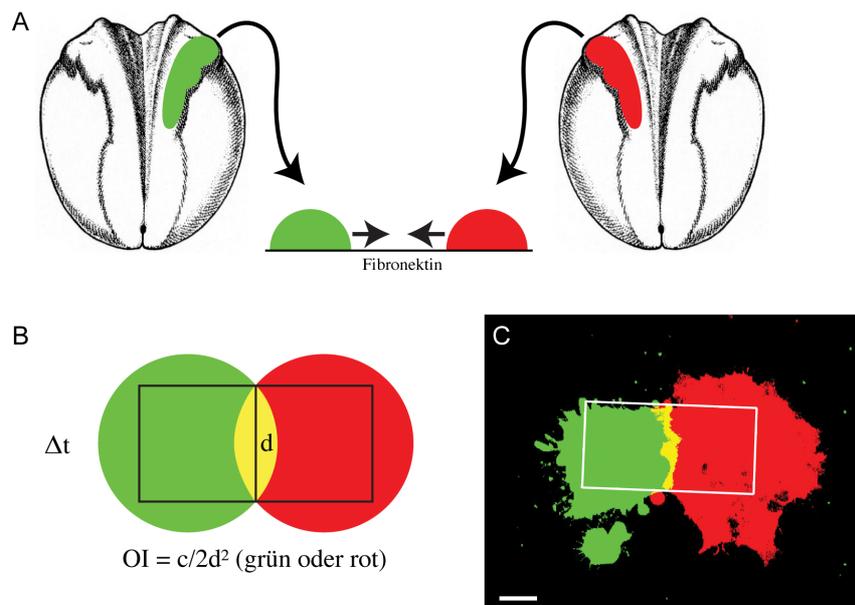


Abbildung 4.4: Konfrontationsanalyse.

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die cNLZ-Explantate werden im Stadium 16 entnommen und auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberflächen gegenüber gestellt. (B) Schematische Darstellung der Explantate am Zeitpunkt Δt . Der Überlappungsbereich der Explantate wird als c (gelb) definiert und mit d als Kontaktgrenze über $2d^2$ normalisiert. (C) Konfrontation von grün und rot fluoreszenzmarkierten Wildtyp-cNLZ mit stark erhöhter Signalstärke. Die Überlappung der Explantate erscheint gelb. Der weiße Rahmen markiert den Normalisierungsbereich $2d^2$. Maßstab: 50 μm .

Bei einem niedrigen Überlappungsindex weisen die Zellen eine Kontaktinhibition auf, während bei erhöhtem OI die Invasivität der Zellen mangels Kontaktinhibition deutlich wird. Der Zeitpunkt der höchsten Überlappung Δt wird pro Konfrontationsansatz optisch gewählt, indem das Fluoreszenzsignal beider Kanäle so stark erhöht wird, dass die Überlappung der grünen und roten Signale gelb erscheint (siehe Abbildung 4.4 B, C). Dieses Bild wird in das MatLab-Programm importiert, welches den gemittelten OI vom Verhältnis gelb:grün (normalisiert) und gelb:rot (normalisiert) ausgibt. Der kommentierte Quellcode des MatLab-Programms ist dem Anhang zu entnehmen (s. Anhang A1).

4.1.15 Kollisionsanalyse

Die repulsive Zellantwort einzelner cNLZ durch Kontaktinhibition kann mittels der Kollisionsanalyse untersucht werden. Embryonen werden im Acht-Zellstadium mit einem membranbindenden roten Fluoreszenzfarbstoff (mbcherry) und den zu untersuchenden Konstrukten injiziert. Nach der Explantation im Stadium 16 werden die Zellverbände in Danilchik's Puffer ohne CaCl_2 überführt und durch Zugabe von 0,3 mM EGTA vereinzelt. Die Zellen werden in Lab-Tek™ Chambered Coverglass Objektträger bzw. X-well Zellkulturkammern („2 well“ oder „8 well“) überführt und lassen sich für zehn Stunden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Spinning Disc, 10x Objektiv) im Abstand von drei bis fünf Minuten in 5-7 Ebenen im Grün- (445 nm) bzw. Rotkanal (665 nm) fotografieren.

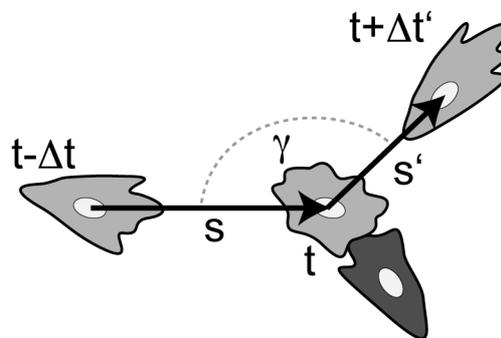


Abbildung 4.5: Kollisionsanalyse.

Schematische Darstellung der Auswertung der Kollision von zwei vereinzelt cNLZ. Die Ortsveränderung vor ($t-\Delta t$), während (t) und nach ($t+\Delta t'$) der Kollision gibt die Geschwindigkeit der Zelle nach dem Kontakt als $v = s'/\Delta t'$ und den Winkel der Richtungsänderung γ .

Für die statistische Auswertung wird die Ortsveränderung der Zellen nach der Kollision ermittelt. Es werden ausschließlich Kollisionen von einzelnen Zellen untersucht. Mittels manuellem Tracking über die ImageJ-Software werden die Koordinaten der Zellen vor ($t-\Delta t$), während (t) und nach ($t+\Delta t'$) der Kollision bestimmt. Der genaue Zeitabstand Δt wird über die relative Zeitachse der AxioVision-Software angegeben. Mithilfe eines MatLab-Programms lässt sich die Geschwindigkeit $v = s'/\Delta t'$ und der veränderte Winkel γ nach dem Kontakt berechnen (siehe Abbildung 4.5). Diese werden über die MatLab-Software in Vektordiagrammen dargestellt und zeigen die Richtungsänderung nach dem Kontakt für zehn verschiedene Zellen. Der kommentierte Quellcode des MatLab-Programms ist dem Anhang zu entnehmen (s. Anhang A2).

4.1.16 Transplantation von cNLZ

Die Untersuchung des Migrationsverhaltens von cNLZ *in vivo* erfolgt mittels der Transplantation von fluoreszenzmarkierten Donor-Zellen in nicht fluoreszierende Akzeptor-Embryonen (s. Abbildung 4.6 A). Die Donor-Embryonen werden dafür im Stadium 4 mit 4 ng FITC-gebundenem Dextran zusätzlich

zu dem entsprechenden Konstrukt co-injiziert. Parallel dazu werden uninjizierte Kontrollembryonen bis Stadium 16 kultiviert. Die Sortierung nach Injektionsseite und Fluoreszenzstärke erfolgt in Stadium 14 bis 16. Um eine maximale Zeitspanne für die Transplantation zu erhalten, werden die Embryonen auf Eis gelagert und damit die Entwicklungsgeschwindigkeit verlangsamt.

Nach der Explantation der Neuralleiste des Donor-Embryos wird die Neuralleiste des Akzeptor-Embryos durch diese ersetzt und die Epidermis wieder geschlossen. Nach etwa einer halben Stunde ist die Wundheilung vollendet und die Embryonen können über Nacht bei 14°C in 0,1x MBSH inkubiert und am folgenden Tag im entsprechenden Stadium unter dem Fluoreszenz-Binokular fotografiert werden.

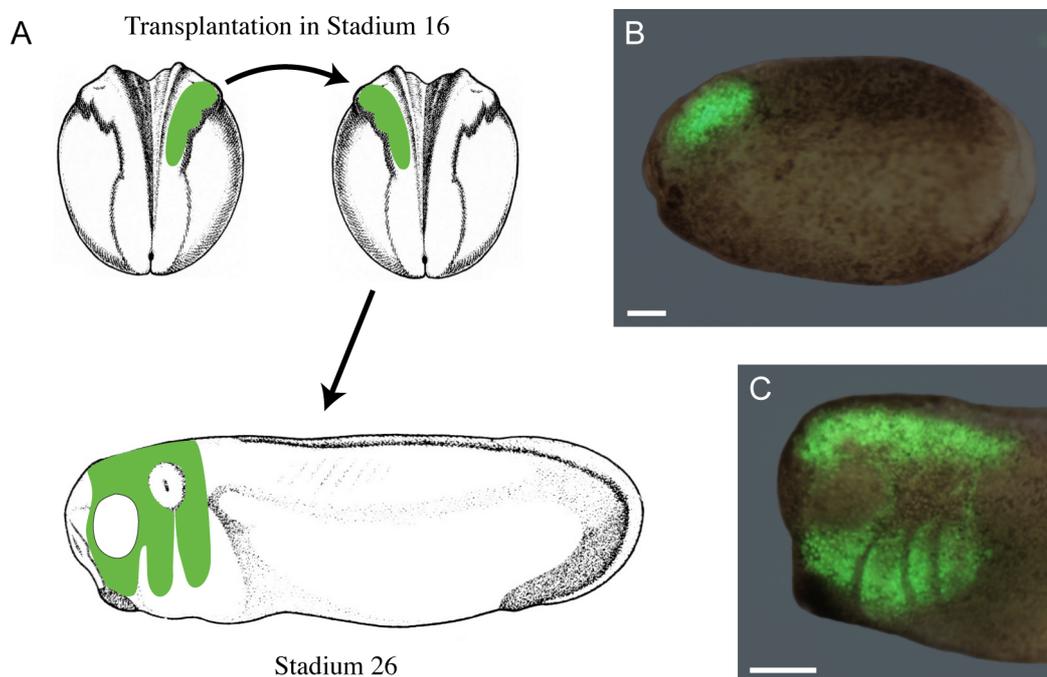


Abbildung 4.6: Transplantation von cNLZ.

(A) Schematische Darstellung der Transplantation von cNLZ aus einem injizierten Donor-Embryo in einen uninjizierten Akzeptor-Embryo im Stadium 16 und der Weiterentwicklung bis Stadium 26. (B) Laterale Ansicht eines transplantierten Wildtyp-Akzeptor-Embryos vor der NLZ-Migration im Stadium 19. Anterior ist links, dorsal ist oben, Überlagerung von Hellfeld und FITC-Kanal. (C) Transplantiertes Wildtyp-Akzeptor-Embryo nach der cNLZ-Migration im Stadium 26. Anterior ist links, dorsal ist oben, Überlagerung von Hellfeld und FITC-Kanal. Die fluoreszenzmarkierten cNLZ sind in die Kiemenbögen eingewandert. Maßstab: 250 µm.

Der Erfolg der Analyse ist abhängig von der Transplantation der kompletten Neuralleiste und von der korrekten Positionierung des Transplantates. In der Statistik werden daher Migrationsdefekte als das Fehlen, die Unvollständigkeit oder die Fusion des hyoidalen bzw. der branchialen Kiemenbögen definiert.

4.1.17 Reaggregationsanalyse zur Untersuchung von Zelladhäsion

Die Dissoziations- und Reaggregationsanalyse von animalen Kappen ermöglicht die Untersuchung der Zell-Zell-Adhäsion. Dazu werden 4 ng mit Fluorescein bzw. Rhodamin gekoppeltes Dextran in beide Blastomeren von Embryonen im Zwei-Zellstadium injiziert. Je nach Versuchsansatz wird die mRNA der entsprechenden Adhäsionsmoleküle co-injiziert. Die Embryonen werden bis zum Blastula-Stadium 9 kultiviert und die Vitellinmembran entfernt. Die animalen Kappen können mithilfe von Präzisionspinzetten entnommen und je drei grün- und rot-fluoreszierende Zellverbände in eine vorbereitete Terasaki-Kammer überführt werden. Diese wurde zunächst mit HEMA beschichtet, mit Aqua bidest. gewaschen und enthält Magnesium- und Calcium-freien MBSH-Puffer als Dissoziationspuffer. In den Kammern lassen sich die Zellverbände mittels einer Kanüle vereinzeln und vermischen. Nach 30 Minuten wird der Dissoziationspuffer durch Reaggregationspuffer (1x MMR) ersetzt und die Zellen werden 10-24 Stunden bei 16°C für die Reaggregation inkubiert (s. Abbildung 4.7 A).

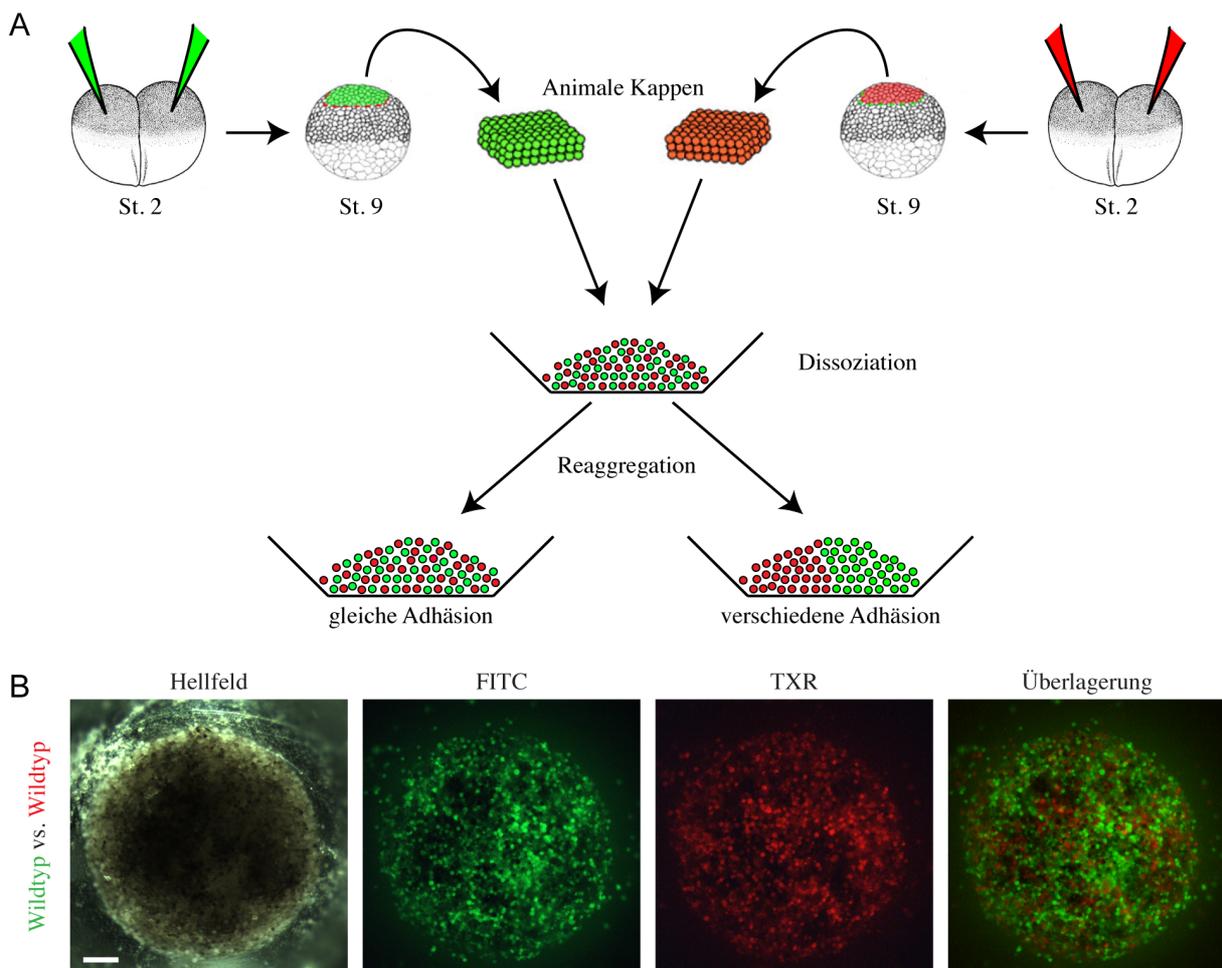


Abbildung 4.7: Reaggregationsanalyse.

(A) Schematische Darstellung der Reaggregationsanalyse. (B) Reaggregationsanalyse von Wildtyp-Populationen im Hellfeld, FITC- und TXR-Kanal. Die Überlagerung zeigt, dass die Zellen vermischt vorliegen und beide Wildtyp-Zellpopulationen ein gleiches Adhäsionsverhalten aufweisen. Maßstab: 200 µm.

Das Adhäsionsverhalten lässt sich unter dem Fluoreszenz-Binokular photographisch auswerten. Dazu wird das Fluoreszenz-Signal im Grünkanal (FITC) und im Rotkanal (TXR) aufgenommen und mittels der MatLab-Software in einem Bild zusammengefügt (s. Abbildung 4.7 B). Liegen grün- und rot-fluoreszierende Zellen gemischt vor, haben beide Zellpopulationen die gleiche Adhäsion. Kommt es jedoch bei der Reaggregation zu zwei getrennten Zellhaufen, verdeutlicht dies einen Unterschied in der Zell-Zell-Adhäsion (s. Abbildung 4.7 A, B).

4.1.18 Proteinextraktion aus *X. laevis* Embryonen

Die Proteinextraktion dient dem Nachweis der Expression von injizierten Konstrukten in *X. laevis* Embryonen. Dafür wird die mRNA der Konstrukte, welche einen immunodetektierbaren Tag enthalten, in beide Blastomeren des Zwei-Zellstadiums injiziert. Die Embryonen werden bis Stadium 9 kultiviert und zwischen 25 und 50 Embryonen in Reaktionsgefäße überführt. Nach Entnahme des überschüssigen Puffers werden die Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 100 µl 1% NP40-Lysispuffer mittels einer Kanüle aufgeschlossen und eine Stunde bei 4°C im Rotationsschüttler lysiert. Durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm werden die Zellbestandteile aufgetrennt und es bilden sich drei Phasen. Neben den pelletierten Zelltrümmern wird die lösliche Phase, welche die Proteine enthält, von einer fetthaltigen Phase überlagert, welche es zu umgehen gilt. Die lösliche Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Um übernommene Fette zu entfernen, werden die Proben zu gleichen Teilen mit Freon versetzt und invertiert. Nach einer Zentrifugation von zehn Minuten bei 4°C und 13.000 rpm kann die obere Fraktion entnommen, mit SABU-ME versetzt werden und für proteinbiochemische Versuche genutzt werden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Transformation von Plasmiden in chemisch-kompetente *E.coli*-Bakterien

Die Veränderung des Genotyps einer Bakterienzelle durch Einbringen zusätzlicher DNA-Plasmide wird als Transformation bezeichnet. 100 µl chemokompetenter *E.coli*-Bakterien werden dazu vorsichtig mit 1 µl des einzubringenden Plasmids gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis erfolgt ein Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C. Dadurch entstehen Poren in der Zellmembran der Bakterien, wodurch die Fremd-DNA aufgenommen werden kann. Für die optimale Regeneration der Bakterien nach der Behandlung werden 900 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 2.000 rpm kann das Pellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert werden. Nach der Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C kann das transformierte Plasmid in monoklonalen Schüttelkulturen amplifiziert werden.

4.2.2 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab

Für die Isolierung im Kleinmaßstab werden die mit Plasmiden transformierten *E.coli*-Bakterien in 3-5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (1:1000) bei 37°C schüttelnd über Nacht kultiviert. Anschließend wird die Kultur fünf Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert. Alternativ zu einem Kit wird eine preiswertere, schnellere und fast ebenso saubere Methode verwendet. Dazu wird das Zellpellet in 300 µl RNase-haltigem P1-Puffer resuspendiert und DNA, Proteine und Phospholipide mit 300 µl NaOH-SDS-haltigem P2-Puffer denaturiert. Durch Zugabe von 300 µl hochkonzentriertem Kaliumacetat im P3-Puffer wird der Ansatz neutralisiert, wodurch die Komplexbildung von Kaliumdodecylsulfat mit denaturierten Proteinen, zellwandgebundener bzw. chromosomaler DNA und Zelltrümmern gefördert wird. Die kleineren, ringförmigen Plasmid-DNA-Moleküle bleiben jedoch in Lösung. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis können die Plasmid-Moleküle mittels Zentrifugation (10 min, 4°C, 13.000 rpm) von den Zellresten getrennt und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Die Zugabe von 630 µl Isopropanol fördert die Präzipitation der DNA, welche durch Zentrifugation (15-20 min, 13.000 rpm, RT) pelletiert wird. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA lässt sich in 50 µl Nuklease-freiem H₂O aufnehmen und verwenden.

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Mittelmaßstab erfolgt über das NucleoBond® Xtra Midi Kit der Firma MACHEREY-NAGEL GmbH. Dazu werden die transformierten *E.coli*-Bakterien in 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (1:1000) bei 37°C und 225 rpm über Nacht geschüttelt. Die Zellen werden für 15 Minuten bei 4°C und 6000x g abzentrifugiert und das Pellet in

8 ml Resuspensionspuffer gelöst. Die Lysis der Zellen erfolgt durch 8 ml Lysispuffer, welcher 5 min bei RT inkubiert wird. Parallel dazu werden die Säule und der Filter mit 12 ml Equilibrationspuffer vorbereitet. Nach der Neutralisation des Zelllysates mittels 8 ml Neutralisationspuffer werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 4°C, 6000x g) und auf die vorbereitete Säule gegeben, welche erneut mit 5 ml Equilibrationspuffer gewaschen wird. Anschließend wird der Filter entfernt und die Säule mit 8 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt durch 5 ml Elutionspuffer in ein frisches Falcon. Die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol führt durch starkes Vortexen zur Präzipitation der DNA, welche mittels Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 30 Minuten pelletiert wird. Das Pellet wird mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut bei maximaler Geschwindigkeit und RT für fünf Minuten zentrifugiert und fünf bis zehn Minuten getrocknet. Die DNA wird in dem gewünschten Volumen in Aqua bidest. aufgenommen und kann bei -20°C gelagert werden.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren werden die absorbierenden Eigenschaften der Basen bei 260 nm genutzt. Dabei ist die Konzentration das Produkt aus der Absorption der Probe bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm, dem Verdünnungsfaktor V und dem Multiplikationsfaktor F, welcher bei doppelsträngiger DNA 50 und für einzelsträngige RNA 40 ist.

Die Reinheit der Probe wird durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bzw. 260 nm und 230 nm gespiegelt. Während das Absorptionsmaximum von aromatischen Proteinen und Phenolen bei 280 nm liegt, absorbieren Salze bei 230 nm. Wenn keine Verunreinigungen vorliegen, beträgt der Reinheitsquotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0.

4.2.4 Fällung und Reinigung von DNA und RNA

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren erfolgt entweder über die illustraTM Probe QuantTM G-50 Micro Columns der Firma GE Healthcare oder das High Pure PCR Product Purification Kit der Firma Roche Applied Science.

Die Aufreinigung über die illustraTM Probe QuantTM G-50 Micro Columns ermöglicht die Aufreinigung von mRNA nach der *in vitro*-Transkription. Die Vorbereitung der Säule erfolgt, indem diese gevortext, leicht geöffnet und die Spitze abgebrochen wird. Durch die Zentrifugation bei 3.000 rpm wird die Matrix-Lösung entfernt und hinterlässt die Sephadex-Matrix in der Säule. Auf diese werden 50 µl der mRNA gegeben, welche durch Zentrifugieren bei 3.000 rpm für zwei Minuten eluiert werden kann. Auch wenn diese Methode die Ausbeute verringert, zeichnet sie sich durch eine hohe Reinheit der mRNA aus.

Für die Aufreinigung von DNA wird das High Pure PCR Product Purification Kit der Firma Roche Applied Science genutzt. Dazu wird die Probe wenn nötig mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 500 µl Membran-Bindelösung versetzt. Zur Aufreinigung über Zentrifugation wird die Probe auf die Säule überführt, welche sich in einem Sammelröhrchen befindet. Mittels Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT) wird der Puffer entfernt und die DNA liegt an der Säule gebunden vor. Nach zwei Waschdurchgängen mit 500 µl bzw. 200 µl ethanolhaltiger Wasch-Lösung wird die Säule getrocknet. Die DNA kann anschließend mit 50 µl Aqua bidest. eluiert werden.

4.2.5 Restriktionsanalyse von DNA

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, palindromische DNA-Sequenzen, welche glatt oder mit überhängenden Enden geschnitten werden können. Diese Eigenschaft wird für das gezielte Trennen von DNA in der Analyse und Klonierung genutzt.

Dafür wird die zu schneidende DNA mit 1 µl Restriktionsendonuklease und dem entsprechenden zehnfach konzentrierten Puffer versetzt. Die Reaktionszeit ist gegeben durch die Menge an DNA, wobei 1 µl Enzym bei optimaler Reaktionstemperatur etwa 1 µg DNA pro Stunde schneiden kann. Für die Analyse der Restriktion lässt sich die Probe mittels der analytischen Flachbett-Gelelektrophorese untersuchen.

4.2.6 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können Nukleinsäuren in einem Agarosegel aufgrund ihrer negativen Ladung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei durchwandern die DNA-Moleküle die Agarosematrix schneller, je kleiner sie sind. Über einen standardisierten Größenmarker können somit eine ungefähre Größenbestimmung und eine qualitative Abschätzung der Konzentration der eingesetzten Probe erfolgen.

Dazu wird 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst, aufgeköcht und mit 0,06 µl/ml Midori Green Advanced DNA Stain versetzt. Die Lösung kann nun in eine Gelform gegossen werden, abkühlen und aushärten, wobei durch Kämmen Taschen für die Proben ausgespart werden. Sowohl Marker (z.B. 2-log DNA Marker) als auch die mit 5x Orange G versetzten Proben werden in die Taschen gegeben. Die Auftrennung erfolgt in Laufkammern in 1x TAE bei einer Spannung von 80 bis 120 V.

Die DNA wird durch das Midori Green im Gel sichtbar gemacht, da dieses Reagenz mit der DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$ oder $\lambda = 254 \text{ nm}$) fluoresziert.

4.2.7 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

Für die Präparation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten kann die unter 4.2.6 beschriebene Flachbett-Gelelektrophorese verwendet werden. Dabei wird nach der Auftrennung der DNA die entsprechende Bande aus dem Gel isoliert. Mittels 600 µl der Membran-Bindelösung aus dem High Pure PCR Product Purification Kit der Firma Roche Applied Science wird die Agarose durch eine fünfminütige Inkubation bei 65°C gelöst. Die Zugabe von 300 µl Isopropanol führt zur Präzipitation der DNA, welche an die Säule gebunden wird. Die weitere Aufreinigung erfolgt wie unter 4.2.4 beschrieben.

4.2.8 *In vitro*-Transkription

Für die Mikroinjektion bedarf es der Synthese von spezifischer mRNA, welche durch die *in vitro*-Transkription ermöglicht wird. Nachdem die Plasmid-DNA durch das entsprechende Restriktionsenzym linearisiert und anschließend aufgereinigt wurde, erfolgt die Synthese über das mMessage mMachine® Kit der Firma Ambion, Inc. Dabei bindet die im Enzym-Mix enthaltene RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7) an den Promotor des Plasmids und synthetisiert mittels der eingesetzten Ribonukleotide die mRNA. Analog zu eukaryotischer mRNA erhält die RNA an ihrem 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kappe, wodurch eine höhere Stabilität der RNA gewährleistet wird.

Der Transkriptionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthält 6 µl linearisierte Plasmid-DNA, 10 µl Ribonukleotide (2x NTP/CAP), 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl Enzym-Mix. Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wird die DNA-Matrix durch eine 15-minütige Inkubation mit 1 µl DNase bei 37°C verdaut. Die Aufreinigung der mRNA erfolgt mittels der illustra™ Probe Quant™ G-50 Micro Columns der Firma GE Healthcare, wie unter 4.2.4 beschrieben.

4.2.9 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. „polymerase chain reaction“) ermöglicht die spezifische *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten, welche über zwei Oligonukleotid-Primer begrenzt werden. Dabei erfolgt in n Zyklen eine Vervielfältigung von 2^n . Da die eingesetzte Polymerase thermostabil ist, können in mehreren Zyklen die drei Schritte der PCR wiederholt werden. Die Denaturierung bei 95-98°C führt zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen der DNA. Während der Anlagerungsphase binden die spezifischen, komplementären Primer an den jeweiligen Einzelstrang. Die Temperatur ist dabei durch die Bindungstemperatur der Primer gegeben, welche leicht unterhalb der Schmelztemperatur T_M liegt und durch die Basenzusammensetzung des Primers berechnet werden kann. Außerhalb dieses

Temperaturbereiches kommt es entweder zu keiner oder zu unspezifischen Primerbindungen. Daher ist beim Entwerfen der Primer darauf zu achten, dass beide Oligonukleotide eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen. Während der Elongation komplementiert die DNA-Polymerase bei 72°C die Einzelstränge, indem sie am 3'-Ende der Primer die Anlagerung von dNTPs ermöglicht. Die Länge des komplementären Stranges wird von der Elongationszeit beeinflusst, wobei die meisten Polymerasen eine Geschwindigkeit von etwa 1.000 bp/min haben. Durch die Denaturierung im nächsten Zyklus wird die DNA-Polymerase gestoppt und die Doppelstränge erneut getrennt.

Ein 25 µl PCR-Ansatz besteht aus 50-100 µg DNA, 1 µl 10 mM dNTPs, je 1 µl 10 µM Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotidprimer, entsprechendem 5x Puffer und 0,5 µl Polymerase. Die Reaktion findet im Thermocycler mit folgendem Programm statt:

1 Zyklus	5 Minuten bei 98°C
30 Zyklen	1 Minute bei 98°C
	1 Minute bei entsprechender Anlagerungstemperatur der Primer
	1 Minute bei 72°C
1 Zyklus	5 Minuten bei 72°C

Anschließend wird der Ansatz bei 4°C gekühlt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

4.2.10 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR ermöglicht das Einbringen von spezifischen Mutationen in eine bekannte DNA-Sequenz. Dabei können durch spezifische Mutagenese-Primer einzelne Basen eingeführt, deletiert oder ersetzt werden. Für die korrekte Anlagerung der Primer an die DNA sollten die Mutagenese-Primer eine Länge von 25-40 bp und eine Bindungstemperatur von etwa 78°C besitzen. Der G/C-Gehalt sollte über 40% liegen.

Ein 50 µl PCR-Ansatz besteht aus 5-50 µg DNA, 1 µl 10 mM dNTPs, je 1 µl 10 µM Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotidprimer, entsprechendem 10x Puffer und 1 µl PfuTurbo DNA Polymerase. Die Reaktion findet im Thermocycler mit folgendem Programm statt:

1 Zyklus	30 Sekunden bei 95°C
16 Zyklen	30 Sekunden bei 95°C
	1 Minute bei 55°C
	2 Minuten/ kbp bei 68°C
1 Zyklus	10 Minuten bei 68°C

Anschließend erfolgt die Inkubation mit 1 µl *DpnI* für eine Stunde bei 37°C. Dieses Restriktionsenzym schneidet ausschließlich methylierte Basen und entfernt somit das ursprüngliche DNA-Template. Der

PCR-Ansatz kann anschließend direkt in *E.coli*-Bakterien transformiert werden und Veränderung der Sequenz mittels Sequenzierungsanalysen untersucht werden.

4.2.11 Dephosphorylierung und Ligation

Wenn die Klonierung das Einfügen eines DNA-Fragments über eine einzelne Restriktionsschnittstelle erfordert, muss der linearisierte Vektor vor der Ligation dephosphoryliert werden. Dabei verhindert das Abspalten der Phosphatgruppe am 5'-Ende durch eine Phosphatase, dass es zu einer Rezirkularisierung des Vektors kommt. Dazu wird 1 µg des linearisierten Vektors mit 10x Puffer und 1 µl thermosensitiver alkalischer Phosphatase in einem 19 µl Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer zusätzlichen Zugabe von 1 µl der thermosensitiven alkalischen Phosphatase und erneuter Inkubation (30 Minuten bei 37°C) wird die DNA aufgereinigt und kann für die Ligation eingesetzt werden.

Während der Ligation werden die geschnittenen Enden des Vektors mittels der T4-Ligase mit denen des einzufügenden DNA-Fragments über eine Phosphodiester-Bindung verknüpft. Dabei enthält ein 10 µl Ansatz 1 µl des linearisierten Vektors, 1 µl T4-Ligase, 10x Ligase-Puffer und 1 µl, 3 µl oder 5 µl des DNA-Fragments. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 16°C. Der neu entstandene Vektor kann direkt in *E.coli*-JM109-Bakterien transformiert und anschließend auf Agar-Platten ausgebracht werden.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen über ein angelegtes elektrisches Feld. Dies geschieht in einem Polyacrylamid-Gel, welches aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht. Durch die Zugabe von TEMED und APS polymerisiert das Gel je nach Konzentration und Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid mit einer bestimmten Porengröße bzw. Vernetzungsgrad aus. Die Proteine werden zunächst durch Zugabe von SABU-ME und einer fünf minütigen Inkubation bei 95°C denaturiert und in ihre Primärstruktur gebracht. Die Eigenladung der Proteine wird durch SDS maskiert, welches sich unspezifisch wie ein negativ geladener Film um die denaturierten Proteine legt. Dabei lagert sich der hydrophile Alkylrest des SDS an die Proteine an, während der negativ geladene Sulfatrest nach außen orientiert ist. Dadurch entspricht die Masse des Proteins seiner negativen Ladung durch das SDS und kann somit im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden.

Ein 5%iges Sammelgel besteht aus 2,1 ml Aqua bidest., 500 µl 29,22% (w/v) Acrylamid, 0,79% (w/v) Bisacrylamid, 380 µl 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 30 µl 10% (w/v) SDS, 3 µl TEMED und 30 µl 10% (w/v) APS und bedarf einer Spannung von 60 V. Durch den Fokussierungseffekt des Glycins an der Trennschicht zum Trenngel werden die Proteine zunächst aufkonzentriert. Die eigentliche Auftrennung erfolgt im Trenngel (10%), welches aus 1,9 ml Aqua bidest., 1,7 ml 29,22% (w/v) Acrylamid, 0,79% (w/v) Bisacrylamid, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 50 µl 10% (w/v) SDS, 2 µl TEMED und 50 µl 10% (w/v) APS besteht. Hier laufen die Proteine im SDS-Laufpuffer entsprechend ihrer Ladung und Größe parallel zu einem bekannten gefärbten Protein-Marker bei 120 V. Das Gel kann anschließend für eine Detektionsmethode wie z.B. eine Coomassie-Färbung oder Immunodetektion nach einem Western Blot genutzt werden.

Durch die Coomassie-Färbung können die Proteine im Gel sichtbar gemacht werden. Dabei lagert sich der Triphenylmethan-Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und kann somit Proteine unspezifisch anfärben. Dazu wird das Gel für 15 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend dreimal zehn Minuten in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Für die weitere Aufbewahrung wird das Gel in Fisch-Gelantine-Folie gespannt und getrocknet.

4.3.2 Western Blot-Analyse

Durch den Western Blot werden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, auf welcher diese mittels Antikörper detektierbar sind. Da die Proteine im Gel

ausgewaschen werden können, transferiert man die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF), welche hydrophob ist und eine gleichmäßige Porenstruktur besitzt. Für die semi-trockene elektrophoretische Methode wird die Membran in Methanol aktiviert und auf drei Filterpapiere gebracht, welche vorher in Transferpuffer inkubiert wurden. Das Trenngel wird vorsichtig auf die Membran gelegt und von drei weiteren getränkten Filterpapieren bedeckt (s. Abbildung 4.8). Dabei ist es wichtig, dass die einzelnen Bestandteile luftblasenfrei übereinander gelegt werden. Der Transfer erfolgt für 90 Minuten bei 0,05 Ampere pro Blot.

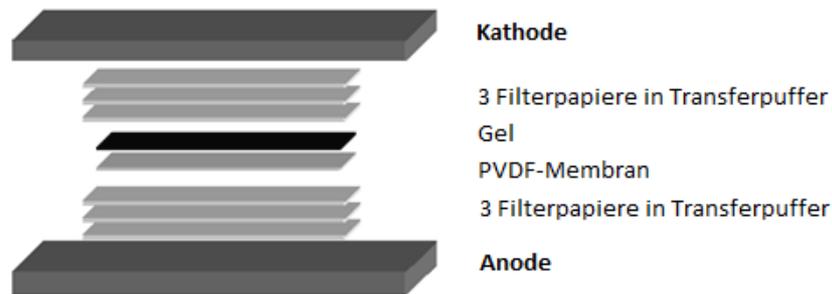


Abbildung 4.8: Aufbau des semi-trockenen Western Blots.

Schematische Darstellung des semi-trockenen Western Blots. Der Transfer erfolgt vom Gel auf die Membran, welche von je drei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren umgeben sind. Das elektrische Feld zwischen Kathode und Anode überträgt die Proteine aus dem Gel auf die Membran.

4.3.3 Immunodetektion

Die indirekte Immunodetektion ermöglicht die spezifische Färbung des zu detektierenden Proteins. Dabei bindet ein für das Protein spezifischer primärer Antikörper sein Antigen auf der Membran. Da es sehr kostspielig wäre, jeden dieser Antikörper zu markieren, setzt man einen Sekundär-Antikörper ein, der gegen den konstanten Teil des Primär-Antikörpers gerichtet ist. Dieser enthält ein Enzym oder Fluorochrom zur Detektion. Dazu kann unter anderem die alkalische Phosphatase genutzt werden, welche das Substrat BCIP oxidiert, dadurch NBT reduziert und sich ein indigoblauer Farbstoff bildet. Da mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können, kommt es über diese indirekte Methode zusätzlich zu einer Signalverstärkung.

Zunächst wird die geblottete Membran für 30 Minuten mit 3% (w/v) Milchpulver in TBS-T behandelt, um freie und unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei zehnmütigen Waschschritten in TBS-T wird die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Die Färbereaktion erfolgt in AP-Puffer durch die Umsetzung von BCIP/NBT (225 µg/ml BCIP, 350 µg/ml NBT in AP-Puffer) durch die alkalische Phosphatase. Durch Waschen mit Aqua bidest. kann die Reaktion nach Belieben gestoppt werden.

5 Ergebnisse

Für die Kontaktinhibition wurde gezeigt, dass der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg und die Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA am Zell-Zell-Kontakt für die Polarität und damit für die gerichtete Migration der cNLZ notwendig sind (Carmona-Fontaine et al., 2008). Die Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes während der Kontaktinhibition und der molekulare Mechanismus der damit intrazellulär ausgelösten Signalkaskaden sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Ein möglicher Kandidat für die Kontaktvermittlung ist Cadherin-11 (Xcad-11). Zum einen ist es als Calcium-abhängiges Adhäsionsmolekül in der Lage homophile *trans*-Interaktionen zwischen zwei Zellen einzugehen. Zum anderen ist bekannt, dass Xcad-11 über seine cytoplasmatische Domäne den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF-) Trio bindet und innerhalb der Signalkaskade oberhalb der kleinen Rho GTPasen steht. Daher liegt es nahe dieses Adhäsionsmolekül im Kontext der Kontaktinhibition zu untersuchen.

5.1 Die Expression von dn-Xcad-11 führt zu einer veränderten Zell-Zell-Adhäsion

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 eine Rolle in der Kontaktinhibition spielt, wird ein dominant negatives Konstrukt gegen die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 (dn-Xcad-11) genutzt. Im Gegensatz zum vollständigen Xcad-11 (fl-Xcad-11) wird durch das dn-Xcad-11 Konstrukt die homophile Bindung des Cadherins verhindert, indem sowohl die beiden Tryptophane (W2S, W4G) als auch das QAV-Motiv (Q79L, A80K, V81G) in der EC1-Domäne substituiert wurden (s. Abbildung 5.1).

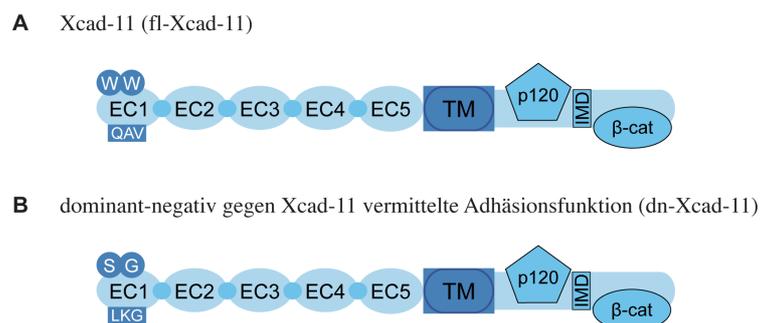


Abbildung 5.1: Struktur der verwendeten Xcad-11-Konstrukte.

Schematische Darstellung der verwendeten Xcad-11-Konstrukte. Klassische Cadherine vom Typ II besitzen fünf extrazelluläre Domänen (EC1-5) und sind über ihre Transmembrandomäne (TM) in der Plasmamembran verankert. Die intrazelluläre Domäne von Xcad-11 besitzt neben den p120- und β -Catenin-Bindestellen eine Intramediärdomäne (IMD), über welche GEF-Trio gebunden werden kann. (A) Die EC1-Domäne von fl-Xcad-11 enthält die Tryptophane W2/ W4 und ein QAV-Motiv für die *trans*-Interaktion. (B) Das dominant-negative Konstrukt gegen die Xcad-11 vermittelte Adhäsionsfunktion enthält Punktmutation in der EC1-Domäne (W2S, W4G, Q79L, A80K, V81G).

Um die Expression von fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 in cNLZ zu zeigen, wurden beide Konstrukte mittels PCR amplifiziert und durch Primer mit *SfuI*-Schnittstellen in den offenen Leserahmen des Expressionsvektors pCS2+6xmyc*SfuI*mut kloniert, welcher mittels Mutagenese-PCR hergestellt wurde. Über den 6xmyc-Tag kann die Translationseffizienz und korrekte Größe der Proteine durch Immunodetektion gegen das Myc-Epitop validiert werden. Dazu werden je 1 ng mRNA von fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 in beide Blastomeren von *X. laevis* Embryonen im Zwei-Zellstadium injiziert. Die Embryonen werden im Stadium 9 lysiert und die Proteine extrahiert. Die Immunodetektion erfolgt über einen Antikörper gegen Myc (9E10).

Im Gegensatz zu uninjizierten Kontrollembryonen sind in den Proben, welche mit fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 injiziert wurden, je zwei Banden im Bereich von 130 kDa zu erkennen (s. Abbildung 5.2). Für Xcad-11 ist eine Proteingröße von ca. 120 kDa bekannt (McCusker et al., 2009), jedoch führt die Fusion des 6xmyc-Tags zu einem zusätzlichen Molekulargewicht von 7 kDa. Die Pro-Domäne von Xcad-11 wird nach der Externalisierung der extrazellulären Domänen abgespalten, wodurch das reife Xcad-11 entsteht, welches eine geringere Proteingröße aufweist. Dies erklärt die zweite, etwas tiefere Bande.

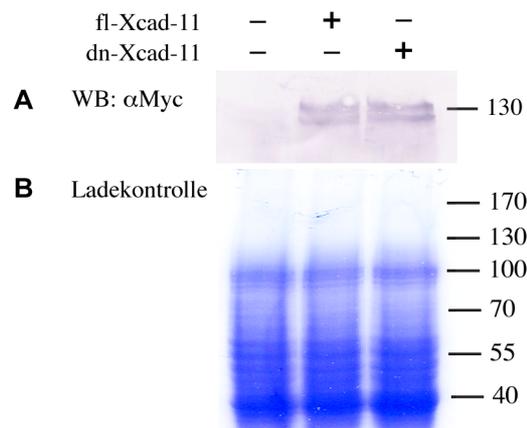


Abbildung 5.2: fl-Xcad-11 und dn-Xcad-11 werden in *X. laevis* Embryonen exprimiert.

(A) Immunodetektion der exprimierten Proteine durch die Konstrukte fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 mittels Antikörper gegen das Myc-Epitop. In Kontrollembryonen lassen sich keine Banden detektieren. Die Injektion von fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 führt zu zwei Banden im Bereich von 130 kDa. (B) Die Ladekontrolle mittels Coomassie-Färbung zeigt eine gleichmäßige Beladung der Proben.

Mittels der Zell-Sortierungsanalyse in animalen Kappen von *X. laevis* wird untersucht, ob die Expression von dn-Xcad-11 tatsächlich zu einer veränderten Zell-Zell-Adhäsion im Vergleich zu fl-Xcad-11 führt. Durch diese Methode erhält man Aufschluss über die Adhäsionsfähigkeit von verschiedenen Zellpopulationen. Dazu werden *X. laevis* Embryonen im Zwei-Zellstadium in beide Blastomeren mit je 4 ng fluoreszenzmarkiertem Dextran und je 1 ng der mRNA des zu untersuchenden Proteins co-injiziert. Im Blastula-Stadium 9 werden die animalen Kappen entnommen, wodurch man nach der Dissoziation ein Gemisch von Zellen erhält, welche sich durch

ihre Markierung mittels Fluorescein- bzw. Rhodamin-Dextran deutlich unterscheiden lassen. Liegt in beiden Zell-Populationen eine gleiche Adhäsionsfähigkeit vor, bleiben die Zellen vermischt. Wenn jedoch eine Population eine veränderte Adhäsionsfähigkeit aufweist, separieren sich die Zellpopulationen voneinander, wenn sie wieder reaggregieren.

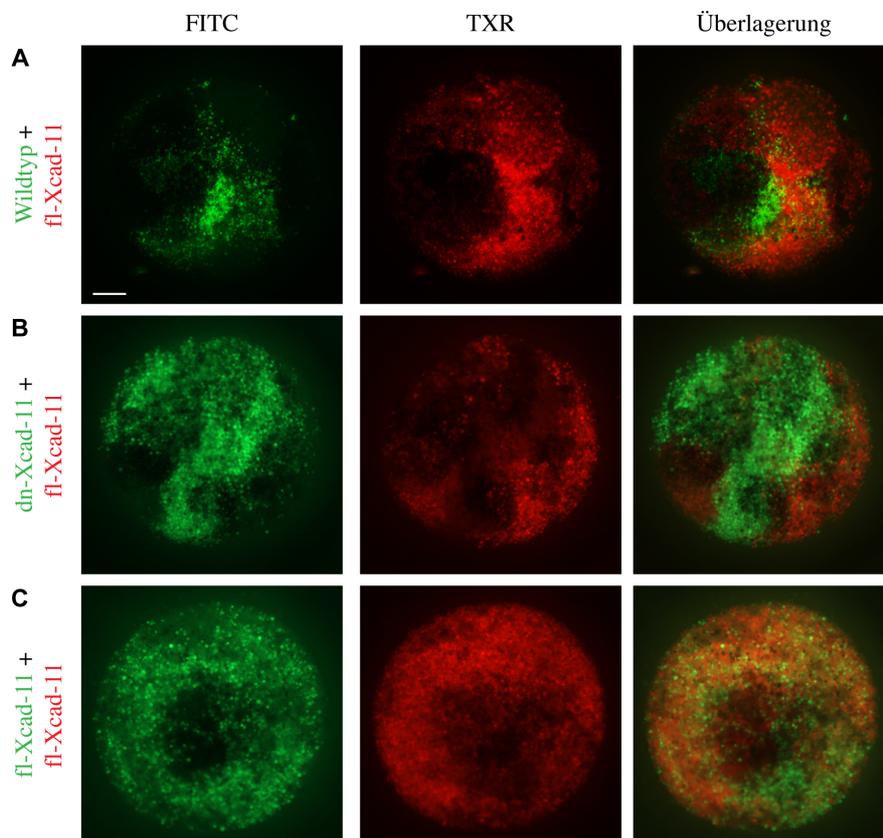


Abbildung 5.3: dn-Xcad-11 führt zu einer veränderten Zell-Zell-Adhäsionsfähigkeit.

Zell-Sortierungsanalyse in animalen Kappen von *X. laevis*. Linke Spalte: Mit Fluorescein-Dextran markierte Zellpopulation im FITC-Kanal. Mittlere Spalte: Mit Rhodamin-Dextran markierte Zellpopulation im TXR-Kanal. Rechte Spalte: Überlagerung beider Fluoreszenz-Kanäle. (A) Wildtyp-Zellen und Zellen, welche fl-Xcad-11 überexprimieren, separieren sich voneinander. (B) Zellen, welche dn-Xcad-11 bzw. fl-Xcad-11 überexprimieren, weisen eine unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit auf und liegen getrennt vor. (C) Gleiche Adhäsionsfähigkeit durch Überexpression von fl-Xcad-11 in beiden Zellpopulationen führt zur homogenen Mischung der Zellen. Maßstab, 200 µm.

Die Positiv-Kontrolle zeigt, dass die Überexpression von fl-Xcad-11 zu einer veränderten Adhäsion der Zellen führt, wodurch sie sich von Wildtyp-Zellen separieren und zwei getrennte Zellpopulationen entstehen (s. Abbildung 5.3 A). In der Negativ-Kontrolle überexprimieren die Zellen beider Populationen fl-Xcad-11, besitzen somit die gleiche Adhäsionseigenschaft und liegen vermischt vor (s. Abbildung 5.3 C). Interessanterweise separieren sich die fluoreszenzmarkierten Zellpopulationen, wenn von der einen fl-Xcad-11 und von der anderen dn-Xcad-11 überexprimiert wird (s. Abbildung 5.3 B). Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression von dn-Xcad-11 zu einer veränderten Adhäsionseigenschaft führt.

5.2 Die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 wird für die Migration der cNLZ *in vivo* benötigt

Die direktionale Migration der cNLZ in die Kiemenbögen basiert neben der kollektiven Chemotaxis und der Co-Attraktion auf dem Mechanismus der Kontaktinhibition (Theveneau et al., 2010; Theveneau et al., 2013; Carmona-Fontaine et al., 2008; Carmona-Fontaine et al., 2011). Jedoch sind die Moleküle, welche den Zell-Zell-Kontakt innerhalb der Kontaktinhibition vermitteln, und der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig verstanden.

Für die Untersuchung der cNLZ-Migration *in vivo* bietet sich die Visualisierung von cNLZ-spezifischen Markergenen wie AP-2 α im Stadium 26 an, wenn die cNLZ bereits vollständig in die Kiemenbögen gewandert sind. Um den Einfluss von Xcad-11 auf die Migration zu klären, werden mittels Mikroinjektion 8 ng des *antisense* Morpholino-Oligonukleotids gegen Xcad-11 (Xcad-11-MO) bzw. je 500 pg der mRNA von dn-Xcad-11 oder Dsh(DEP+) einseitig im Acht-Zellstadium in die Embryonen injiziert.

ISH gegen den cNLZ-Marker AP-2 α zeigt, dass im Wildtyp die cNLZ vollständig ventral in die Kiemenbögen einwandern (96% +/- 0,8; n=178; N=3; s. Abbildung 5.4 A, E). Dabei sind die Bögen deutlich von einander zu unterscheiden und die injizierte Seite (*) gleicht der uninjizierten Kontrollseite (s. Abbildung 5.4 A). Im Gegensatz dazu wandern die cNLZ in Embryonen, in denen mittels Xcad-11-MO die Translation des Proteins herunter reguliert wurde, nicht in die Bögen ein. In 86% der untersuchten Embryonen ist das Signal von AP-2 α nur im dorsalen Teil des Kopfes zu erkennen (+/- 0,7; n=48; N=3; p< 0,005 verglichen zum Wildtyp; s. Abbildung 5.4 B, E; Kashef et al., 2009). Die Überexpression von 500 pg dn-Xcad-11 führt ebenfalls zu Migrationsdefekten. Dabei wird in 58% der Embryonen die Migration des hyoidalen und der branchialen Kiemenbögen gestört, welche unvollständig wandern und/oder fusioniert vorliegen (+/- 5,5; n=102; N=4; p< 0,005 verglichen zum Wildtyp; s. Abbildung 5.4 C, E).

Für die Kontaktinhibition ist die Lokalisation des Mediator-Proteins Dishevelled (Dsh) an die Membran notwendig, damit der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg aktiv ist (De Calisto et al., 2005; Carmona-Fontaine et al., 2008). Als Positiv-Kontrolle dient daher die Überexpression eines Dsh-Konstruktes, welches ausschließlich aus der DEP-Domäne besteht (Dsh(DEP+)) und selektiv den nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg blockiert, jedoch keinen Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg hat (De Calisto et al., 2005). Interessanterweise zeigen Embryonen, welche Dsh(DEP+) überexprimieren, einen ähnlichen Phänotyp wie jene, welchen dn-Xcad-11 injiziert wurde. Das AP-2 α -Signal weist in 52% der untersuchten Embryonen auf unvollständig und fusioniert wandernde cNLZ hin (+/- 1,7; n=236; N=5; p< 0,005 verglichen zum Wildtyp; s. Abbildung 5.4 D, E). Dies deutet darauf hin, dass sowohl der Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11 als auch die Blockierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges zu Migrationsdefekten führen.

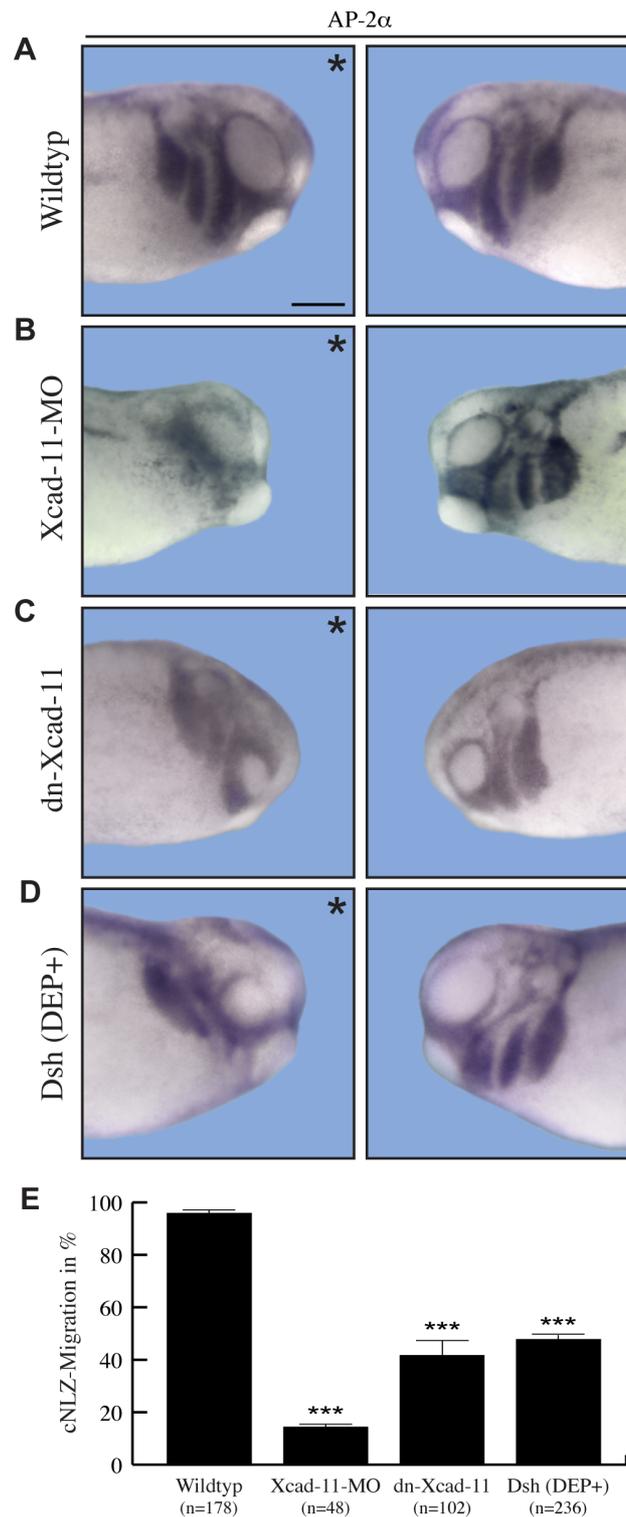


Abbildung 5.4: Die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 wird für die Migration von cNLZ *in vivo* benötigt.

Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. (A) Wildtyp-cNLZ migrieren in deutlich getrennten Strömen in die Kiemenbögen ein. (B) Xcad-11-MO injizierte Embryonen zeigen das AP-2 α -Signal nur im dorsalen Teil des Kopfes verglichen mit der uninjizierten Seite. (C) Überexpression von dn-Xcad-11 und (D) Dsh(DEP+) führen zu unvollständiger und fusionierter Wanderung der hyoidalen und branchialen Kiemenbögen. (E) Prozent der vollständigen cNLZ-Migration mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (***) Signifikanz zum Wildtyp mit $p < 0,005$ nach Studentischem T-Test. Maßstab, 250 μm .

Die ISH an fixierten Embryonen ist eine Momentaufnahme und gibt ausschließlich Auskunft über die Expression des Markergenes zu einem bestimmten Zeitpunkt. Um die Dynamik der cNLZ-Migration zu untersuchen, werden Transplantationsexperimente durchgeführt. Dadurch kann zusätzlich analysiert werden, ob es sich bei der cNLZ-Migration um zellautonomes Verhalten handelt oder weitere extrazelluläre Signale eine Rolle spielen.

Als Kontrolle, dass die Transplantation der cNLZ vollständig und korrekt durchgeführt wird, werden Wildtyp-Embryonen im Stadium 16 die cNLZ entnommen und diese fixiert. Gleichzeitig wird die Epidermis der Donor-Embryonen geschlossen und diese im Stadium 26 fixiert. Die ISH gegen AP-2 α zeigt, dass auf der explantierten Seite der Donor-Embryonen das Signal der Sonde fast vollständig verschwunden ist verglichen zur Kontrollseite (s. Abbildung 5.5 B, C). Die cNLZ-Explantate zeigen eine positive Färbung für AP-2 α (s. Abbildung 5.5 A). Dies deutet darauf hin, dass ausschließlich cNLZ explantiert wurden.

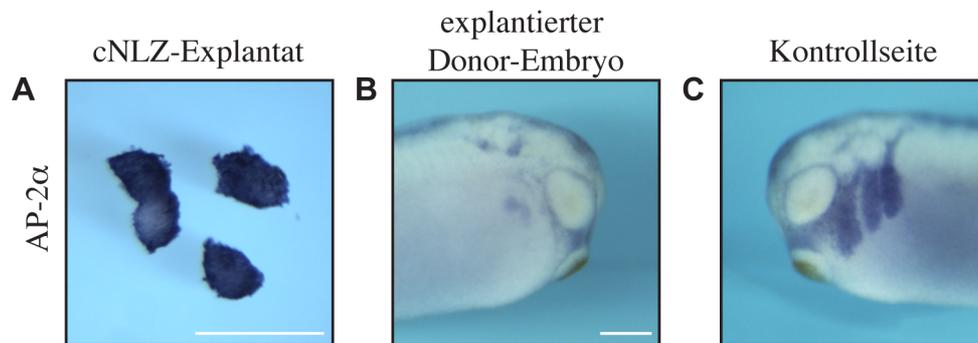


Abbildung 5.5: Kontrollversuch zur Transplantation von cNLZ.

(A) ISH gegen AP-2 α auf fixierten cNLZ-Explantaten. (B, C) Laterale Ansicht auf einen *X. laevis* Embryo im Stadium 26, dem im Stadium 16 einseitig die cNLZ entnommen wurden. Die Färbung markiert cNLZ mittels ISH gegen den spezifischen Marker AP-2 α . Im Gegensatz zur (C) Kontrollseite, in der die cNLZ in die Kiemenbögen eingewandert sind und deutlich durch die ISH detektiert werden können, ist das Signal auf der (B) explantierten Seite fast vollständig verschwunden. Maßstab, 250 μ m.

In früheren Untersuchungen wurde bereits die Dynamik der cNLZ-Migration zwischen Stadium 19 und 26 mittels Lebendzellanalyse und Verfolgung von transplantierten cNLZ untersucht (Becker, Diplomarbeit, 2011). Allerdings konnte bisher durch die geringe Anzahl der durchgeführten Versuche keine statistische Signifikanz der Ergebnisse gezeigt werden. Für die zusätzlichen Transplantationsexperimente werden *X. laevis* Embryonen im Acht-Zellstadium mit 4 ng Fluorescein-Dextran injiziert. Entsprechend den Ansätzen werden 8 ng Xcad-11-MO bzw. je 500 pg dn-Xcad-11 oder Dsh(DEP+) mRNA co-injiziert. Die Transplantation der Donor-cNLZ in uninjizierte Akzeptor-Embryonen erfolgt im Stadium 16.

Während 87% der transplantierten Wildtyp-Embryonen im Stadium 26 das Fluoreszenzsignal in allen Kiemenbögen zeigen (\pm 1,6; n=80; N=3; s. Abbildung 5.6 A, E), ist die Migration von Xcad-11-MO

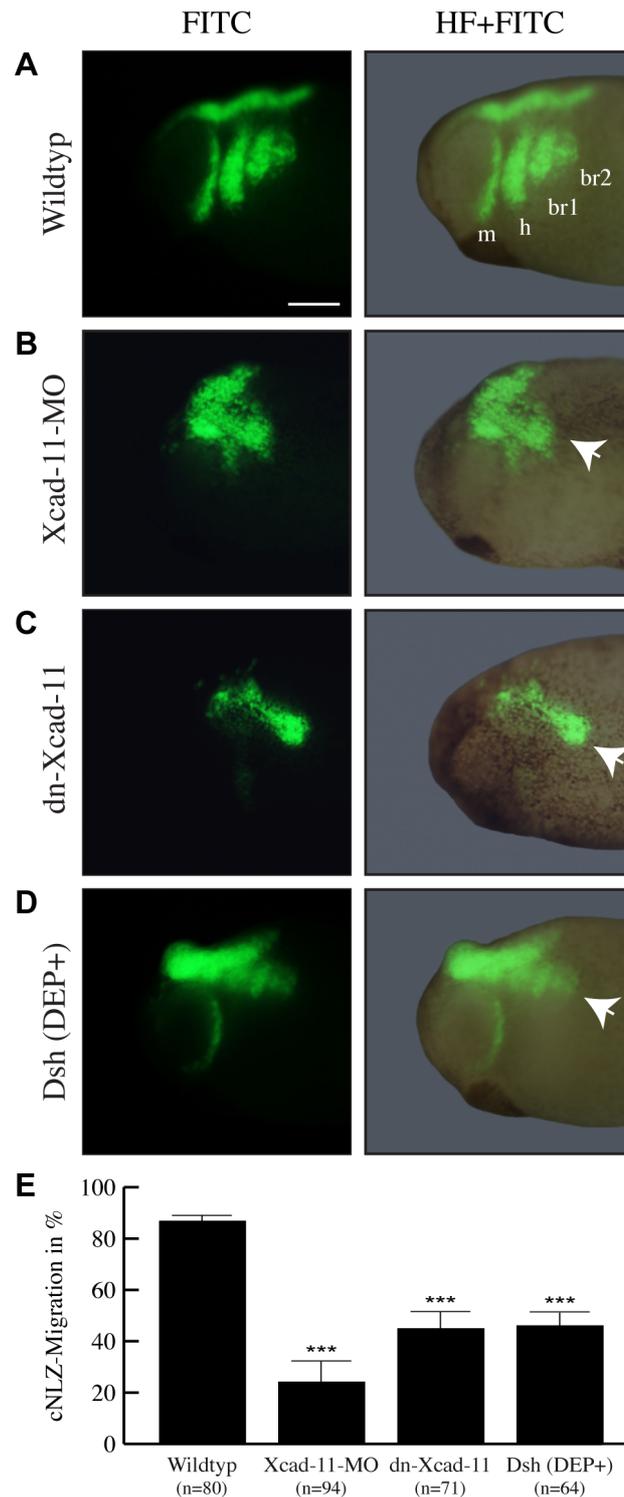


Abbildung 5.6: Der Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11 blockiert die cNLZ-Migration *in vivo*.

Laterale Ansicht auf transplantierte *X. laevis* Embryonen im Stadium 26, anterior links, dorsal oben. Donor-cNLZ sind mit Fluorescein-Dextran markiert. Linke Spalte: Fluoreszenz-Signal im FITC-Kanal, rechte Spalte: Überlagerung von FITC-Kanal und Hellfeld (HF+FITC). (A) Wildtyp-cNLZ wandern in deutlich getrennten Strömen in die Kiemenbögen ein (m: mandibular, h: hyoidal, br1/2: branchial). (B) Verlust von Xcad-11 mittels MO führt zu unvollständiger cNLZ-Migration (weißer Pfeil). (C) Überexpression von dn-Xcad-11 und (D) Dsh(DEP+) verhindert directionale cNLZ-Wanderung. Zellen im zweiten branchialen Strom migrieren leicht nach posterior (weißer Pfeil). (E) Prozent der vollständigen cNLZ-Migration mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (***) Signifikanz zum Wildtyp mit $p < 0,005$ nach Studentischem T-Test. Maßstab, 250 μm .

injizierten Donor-cNLZ signifikant blockiert (76% +/- 7,7 Migrationsdefekte, n=94, N=5; p< 0,005 verglichen zum Wildtyp; s. Abbildung 5.6 B, E; weißer Pfeil). Ebenfalls kann bestätigt werden, dass die cNLZ-Migration sowohl durch die Überexpression von dn-Xcad-11 als auch Dsh(DEP+) signifikant verringert ist. Sowohl die Statistik als auch der Phänotyp, welcher durch beide Konstrukte hervorgerufen werden, ähneln sich sehr stark. So kommt es in 55% der Embryonen, deren Donor-cNLZ mit dn-Xcad-11 injiziert wurden, zu einer unvollständigen Migration, wobei Zellen im zweiten branchialen Bogen die Tendenz zeigen posterior zu wandern (+/- 6,5; n=71; N=5; p< 0,005 verglichen zum Wildtyp; s. Abbildung 5.6 C, E; weißer Pfeil). Vergleichbar zeigen 54% der Embryonen, deren Donor-cNLZ Dsh(DEP+) überexprimieren, deutliche Migrationsdefekte, welche unvollständige und fehlgeführte Migration beinhalten (+/- 5,4; n=64; N=4; p< 0,005 verglichen zum Wildtyp; s. Abbildung 5.6 D, E; weißer Pfeil).

Diese Ergebnisse bestätigen die bisherigen Motilitätsstudien, in welchen mittels Lebendzellverfolgung von transplantierten, fluoreszenzmarkierten cNLZ die Dynamik der Migration beschrieben wurde. Dabei zeigen transplantierte Wildtyp-cNLZ eine hohe Motilität und wandern geordnet in Strömen in die Kiemenbögen ein. Im Gegensatz dazu zeigen Zeitrafferaufnahmen von Xcad-11-MO injizierten Donor-cNLZ, dass die Zellen nur sehr schwach motil sind, sich nicht vereinzeln und keine Zellströme bilden. Donor-cNLZ, welche dn-Xcad-11 bzw. Dsh(DEP+) überexprimieren, sind nicht in der Lage koordiniert in Strömen zu emigrieren und zeigen eine unvollständige und ungerichtete Migration (Becker, Diplomarbeit, 2011).

Zusätzlich verdeutlichen die Transplantationsanalysen, dass es sich bei den Migrationsdefekten um ein zellautonomes Verhalten handelt. Zum einen verdeutlichen sie, dass die Migration nicht durch extrazelluläre Faktoren rekonstituiert werden kann. Zum Anderen schließen sie aus, dass die Migrationsdefekte durch die Injektion der Konstrukte in einem größeren Gebiet als den cNLZ hervorgerufen werden.

5.3 Der Verlust der Adhäsionsfunktion von Xcad-11 führt nicht zu einer zeitlichen Verzögerung der Migration der cNLZ, sondern zu cranialen Knorpeldefekten

Um auszuschließen, dass es sich bei den Migrationsdefekten, um eine zeitliche Verzögerung der cNLZ-Migration handelt, werden transplantierte Embryonen im Schwanzknospenstadium (Stadium 33-34, s. Abbildung 5.7 A) untersucht. In diesem Entwicklungsstadium ist die Migration vollständig abgeschlossen und die cNLZ liegen an ihrem endgültigen Differenzierungsort vor.

In Wildtyp-Transplantaten ist das Fluoreszenz-Signal deutlich in den pharyngalen Taschen zu erkennen (s. Abbildung 5.7 C). Im Gegensatz dazu verbleiben die fluoreszenten Donor-cNLZ der Xcad-11-Morphanten im dorsalen Teil des Kopfes (s. Abbildung 5.7 D). Nur im Bereich des

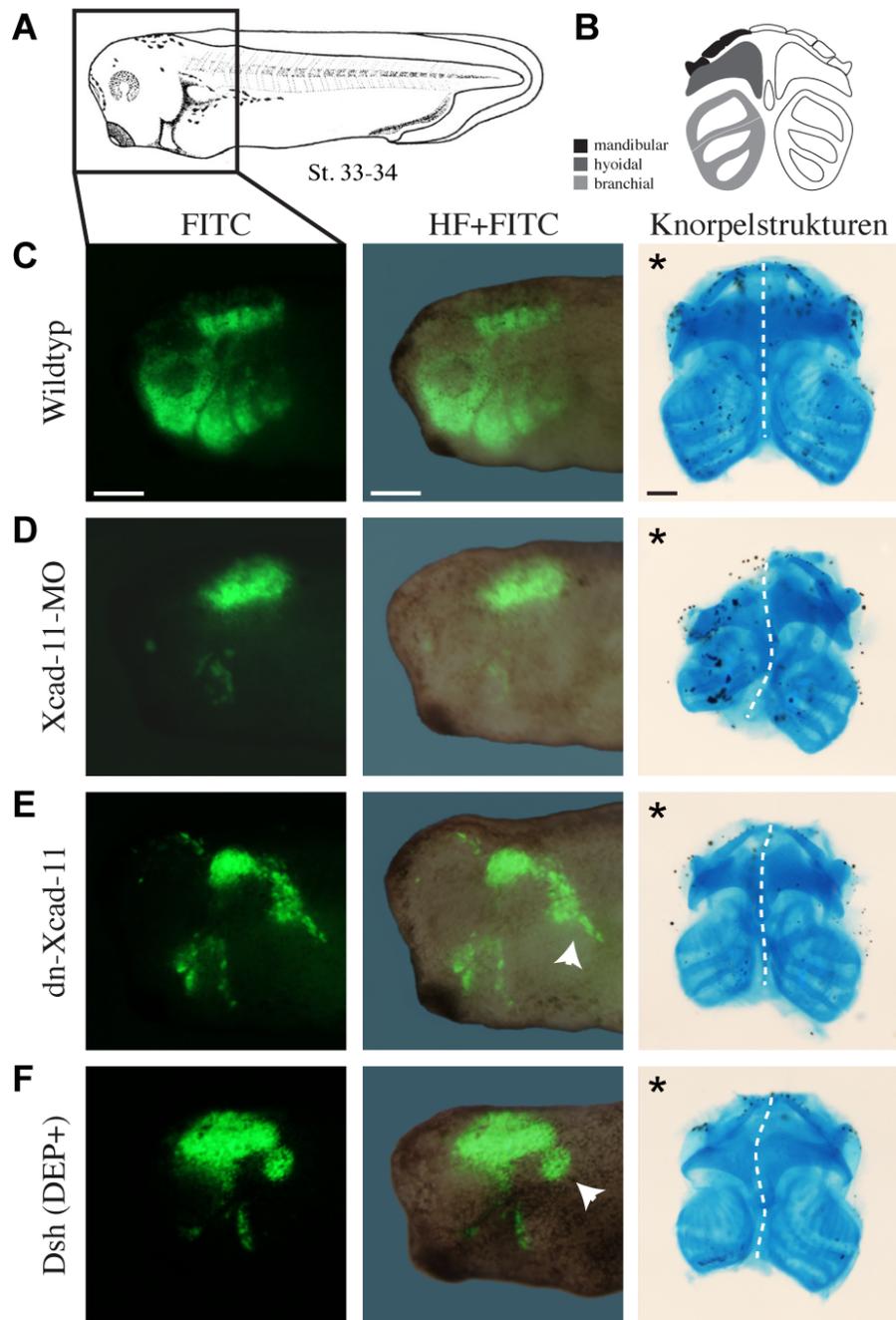


Abbildung 5.7: Blockierung von Xcad-11 vermittelter Adhäsion führt auch in späteren Stadien zu Migrationsdefekten und zum Verlust von Knorpelstrukturen.

(A) Schematische Darstellung von *X. laevis* im Schwanzknospenstadium (Stadium 33-34; Nieuwkoop und Faber, 1967). (B) Schematische Darstellung der Knorpelstrukturen von *X. laevis*-Kaulquappen in Stadium 45 mit entsprechender Beteiligung des mandibularen, hyoidalen und der branchialen cNLZ-Ströme. (C-F) Erste und zweite Spalte: Laterale Ansicht auf transplantierte *X. laevis* Embryonen im Stadium 33-34. Anterior links, dorsal oben. Donor-cNLZ sind mit Fluorescein-Dextran markiert. Erste Spalte: Fluoreszenz-Signal im FITC-Kanal. Zweite Spalte: Überlagerung von FITC-Kanal und Hellfeld (HF+FITC). Dritte Spalte: Dorsale Ansicht auf explantierte Knorpelstrukturen nach Alzianblau-Färbung. Anterior oben, (*) injizierte Seite. Weiße Linie verdeutlicht bilaterale Mittelachse. (C) Wildtyp-cNLZ wandern in deutlich getrennten Strömen in die Kiemenbögen ein und weisen eine bilaterale Symmetrie in den Knorpelstrukturen auf. (D) Depletion von Xcad-11 mittels MO inhibiert cNLZ-Migration und führt zu schweren Knorpeldefekten. (E) Überexpression von dn-Xcad-11 und (F) Dsh(DEP+) verhindert direktionale cNLZ-Wanderung auch in späteren Stadien (weiße Pfeile) und führt zu reduzierten posterioren Knorpelstrukturen. Maßstab, 250 µm.

mandibularen Kiemenbogens ist ein schwaches Fluoreszenzsignal zu erkennen. Die Migrationsdefekte durch die Überexpression von dn-Xcad-11 und Dsh(DEP+) bleiben ebenfalls auch in späteren Stadien bestehen. Interessanterweise zeigt sich weiterhin eine leichte Tendenz des zweiten branchialen Kiemenbogens zum posterioren Bereich des Embryos zu wandern, welcher außerhalb der bekannten Domäne der cNLZ liegt (s. Abbildung 5.7 E, F; weißer Pfeil).

Da cNLZ nach ihrer Differenzierung unter anderem an der Bildung von Knorpelstrukturen beteiligt sind (Osumi-Yamashita et al., 1994; Trainor und Tam, 1995; Gross und Hanken, 2005), können sich diverse Migrationsdefekte in der Missbildung dieser Strukturen widerspiegeln. So bildet der mandibulare cNLZ-Strom den Meckel'schen Knorpel, sowie den Palatoquadratum (erster Kiemenbogen) und den subokularen Knorpel. Der hyoidale cNLZ-Strom differenziert sich zum ceratohyalen Knorpel, während durch die branchialen Ströme die ceratobranchialen Knorpel gebildet werden (Baltzinger et al., 2005; s. Abbildung 5.7 B).

Im Kaulquappen-Stadium (Stadium 45) weisen Wildtyp-Embryonen vollständige und bilateral symmetrische Knorpelstrukturen auf (s. Abbildung 5.7 C). Wird die Migration der cNLZ einseitig durch Injektion von 8 ng Xcad-11-MO blockiert, kommt es zu deutlichen Knorpelmissbildungen. Neben dem Verlust der bilateralen Symmetrie und des Meckel'schen Knorpels sind die ceratobranchialen Knorpelstrukturen deutlich reduziert (s. Abbildung 5.7 D). Auch die Beeinträchtigung der adhäsiven Funktion von Xcad-11 sowie die Blockierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges führen zu erkennbaren, wenn auch schwächeren, Knorpeldefekten. Neben dem Verlust der bilateralen Symmetrie sind ebenfalls die posterioren Knorpelstrukturen reduziert (s. Abbildung 5.7 E, F).

5.4 Die Überexpression von Xcad-11 spezifisch in cNLZ hat keinen Einfluss auf die Migration

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Überexpression von Xcad-11 einen Einfluss auf die Migration von cNLZ hat. Dabei führt die Injektion von 1 ng fl-Xcad-11 mRNA im Zwei-Zellstadium zur Blockierung der cNLZ-Migration *in vivo* (Borchers et al., 2001; McCusker et al., 2009). Da die Injektion im Zwei-Zellstadium auch das Mesoderm beeinflusst und die Überexpression von Xcad-11 die konvergente Extension während der Gastrulation hemmt (Hadeball et al., 1998), könnten die Migrationsdefekte auch durch die Fehlentwicklung der cNLZ während der Induktion und Spezifikation hervorgerufen werden. Zusätzlich moduliert Xcad-11 über seine intrazelluläre β -Catenin-Bindestelle den kanonischen Wnt-Signalweg, indem es zytoplasmatisches β -Catenin sequestriert und somit die Spezifikation der cNLZ beeinflusst (Köhler et al., 2013). Demnach könnte es sich bei der Überexpression von dn-Xcad-11 um ein Überexpressionsartefakt handeln, wodurch die Migrationsdefekte nicht durch die Veränderung der adhäsiven Funktion von Xcad-11 hervorgerufen werden würden, sondern durch die erhöhte intrazelluläre Funktion von Xcad-11.

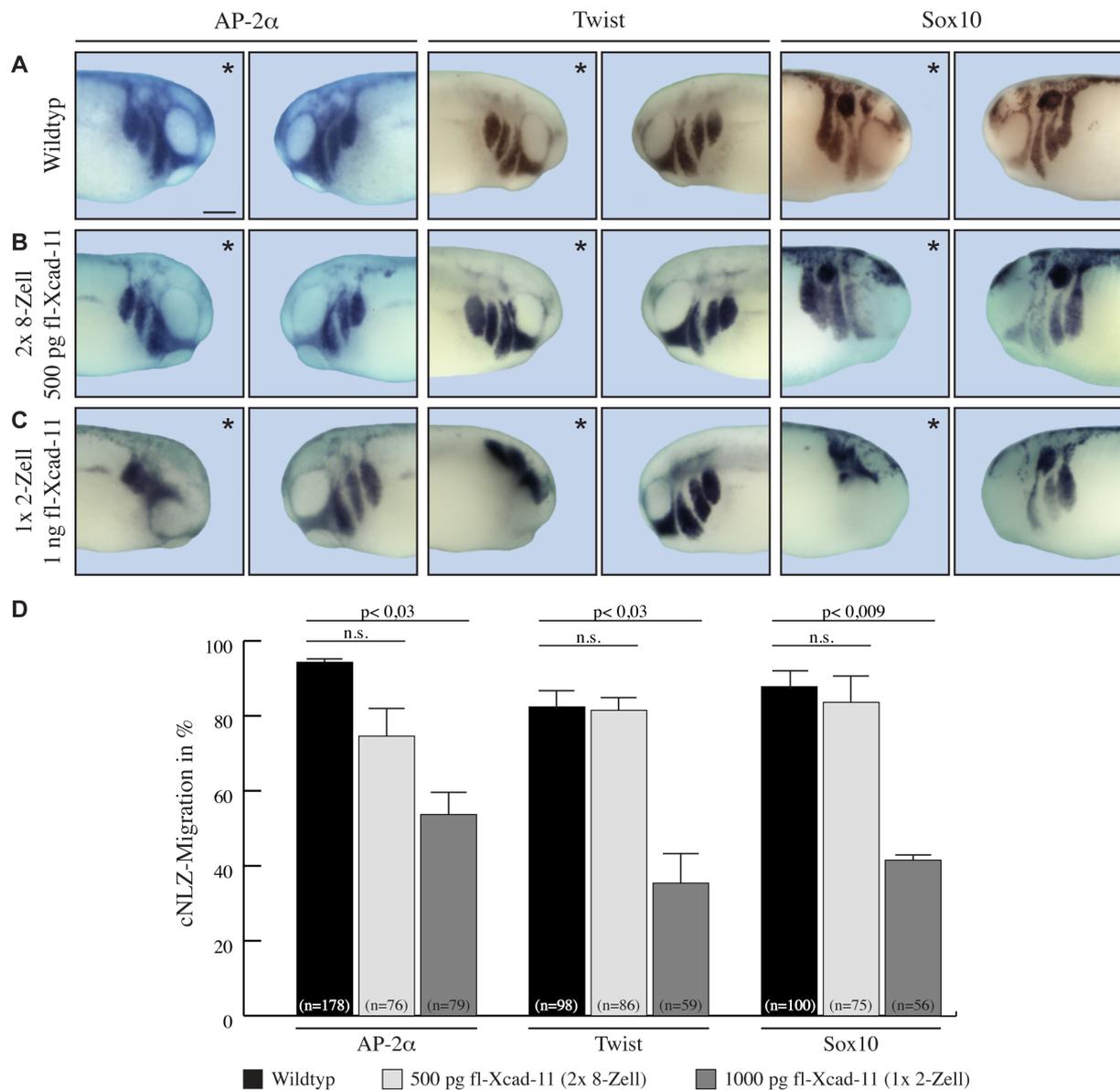


Abbildung 5.8: Überexpression von Xcad-11 spezifisch in cNLZ führt zu vollständiger cNLZ-Migration.

Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen AP-2 α , Twist bzw. Sox10 markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. Vollständige cNLZ-Migration erfolgt in (A) Wildtyp-Embryonen und (B) in Embryonen, welche 500 pg fl-Xcad-11 (2x in Acht-Zellstadium injiziert) überexprimieren. (C) Überexpression von 1 ng fl-Xcad-11, welche im Zwei-Zellstadium injiziert wurden, führt teilweise zu deutlichen Migrationsdefekten. (D) Prozent der vollständigen cNLZ-Migration mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test. n.s.: nicht signifikant. Maßstab, 250 μ m.

Um den Einfluss der Dosis bzw. der Ausdehnung der Überexpression von Xcad-11 zu untersuchen, werden zum einen 1 ng fl-Xcad-11 mRNA in eine Blastomere im Zwei-Zellstadium (1x 2-Zell) injiziert. Dabei wird Xcad-11 ebenfalls im Mesoderm überexprimiert und dient als Vergleich und Validierung der bereits durchgeführten Versuche. Parallel dazu werden 500 pg fl-Xcad-11 mRNA in zwei Blastomeren des Acht-Zellstadiums (2x 8-Zell) injiziert, wodurch gezielt der zukünftige Bereich der cNLZ manipuliert wird. Letzteres ist der gleiche Versuchsansatz wie für die Untersuchungen mit

dn-Xcad-11. Die Migration der cNLZ wird mittels ISH gegen die drei verschiedenen Markergene AP-2 α , Twist und Sox10 analysiert (s. Abbildung 5.8 und Tabelle 5.1).

Verglichen mit dem Wildtyp weist das Signal der ISH-Sonden bei der Injektion von 500 pg fl-Xcad-11 (2x 8-Zell) auf keine signifikante Inhibition der cNLZ-Migration hin (AP-2 α : Wildtyp 95,0% +/- 0,8; n=178; N=4; 500 pg fl-Xcad-11 74,7% +/- 7,1; n=76; N=3; Twist: Wildtyp 82,4% +/- 4,3; n=98; N=3; 500 pg fl-Xcad-11 81,5% +/- 3,3; n=86; N=3; Sox10: Wildtyp 87,9% +/- 4,2; n=100; N=3; 500 pg fl-Xcad-11 83,7% +/- 7,1; n=75; N=3; nach Studentischem T-Test nicht signifikant verschieden; s. Abbildung 5.8 A, B und D). Im Gegensatz dazu reduziert die Injektion von 1 ng fl-Xcad-11 im Zwei-Zellstadium die Migration der cNLZ auf der injizierten Seite (AP-2 α : 53,7% +/- 5,8; n=79; N=3; p< 0,03 verglichen zum Wildtyp; Twist: 35,4% +/- 7,8; n=59; N=3; p< 0,03 verglichen zum Wildtyp; Sox10: 41,5% +/- 1,2; n=56; N=3; p< 0,009 verglichen zum Wildtyp; statistische Analyse nach Studentischem T-Test; s. Abbildung 5.8 C, D). Dies bestätigt frühere Ergebnisse, dass eine hohe Dosis von Xcad-11, welche in einem großen Bereich des Embryos exprimiert wird, die cNLZ-Migration blockiert (Borchers et al., 2001; McCusker et al., 2009). Beschränkt sich die Überexpression jedoch auf den Bereich der cNLZ durch die Injektion im Acht-Zellstadium, kommt es bei einer Dosis von 500 pg fl-Xcad-11 pro Blastomere zu keiner signifikanten Inhibition der cNLZ-Migration.

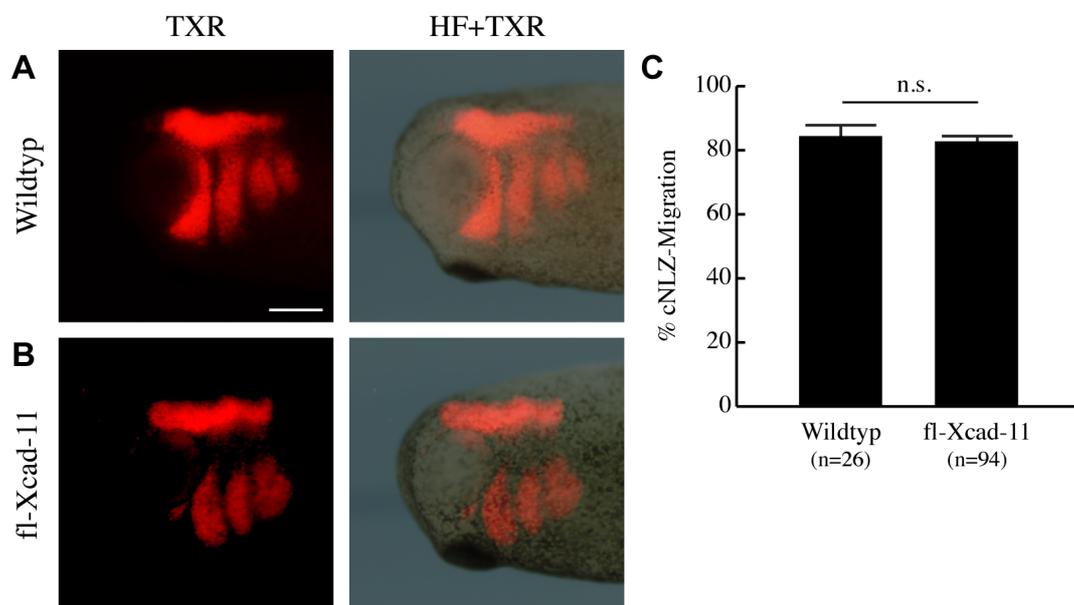


Abbildung 5.9: Überexpression von 500 pg Xcad-11 hat keinen Einfluss auf die cNLZ-Migration *in vivo*.

Laterale Ansicht auf transplantierte *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. Anterior links, dorsal oben. Donor-cNLZ sind mit rot-fluoreszierendem Rhodamin-Dextran markiert. Linke Spalte: Fluoreszenz-Signal im TXR-Kanal, rechte Spalte: Überlagerung von TXR-Kanal und Hellfeld (HF+TXR). (A, B) Sowohl Wildtyp-cNLZ als auch cNLZ, welche fl-Xcad-11 überexprimieren, migrieren in deutlich getrennten Strömen in die Kiemenbögen ein. (C) Prozent der vollständigen cNLZ-Migration mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. n.s.: nicht signifikant nach Studentischem T-Test. Maßstab, 250 μ m.

Ebenso weisen transplantierte Embryonen keinerlei Migrationsdefekte auf, wenn die Donor-cNLZ 500 pg fl-Xcad-11 überexprimieren und im Acht-Zellstadium injiziert wurden (Wildtyp: 84,2% +/- 3,7; n=26; N=3; 500 pg fl-Xcad-11: 82,6% +/- 1,7; n=94; N=4; nach Studentischem T-Test nicht signifikant verschieden; s. Abbildung 5.9).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Migrationsdefekte, welche in Embryonen auftreten, in denen dn-Xcad-11 überexprimiert wird, keine Überexpressionsartefakte sind, sondern durch den Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11 hervorgerufen werden.

5.5 Die adhäsive Funktion von Xcad-11 ist für die directionale Migration der cNLZ notwendig

Da die Daten der vorangegangenen Experimente auf Überexpressionsstudien basieren und die Gefahr artifizierlicher Effekte bergen, werden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Dazu wird das endogene Xcad-11 mittels eines spezifischen MO depletiert und eine mögliche Rekonstitution des Phänotypes durch Einbringen von fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 mRNA untersucht.

Zunächst gilt es zu ermitteln, mit welcher Menge fl-Xcad-11 mRNA die Migrationsdefekte, welche durch die Depletion von Xcad-11-MO hervorgerufen werden, wieder rekonstituiert werden können. Dazu werden 8 ng Xcad-11-MO und 75 pg bzw. 100 pg fl-Xcad-11 mRNA in die animal dorsale Blastomere im Acht-Zellstadium mit 4 ng Fluorescein-Dextran als Fluoreszenzmarker co-injiziert und die cNLZ der im Stadium 26 fixierten Embryonen mittels ISH gegen AP-2 α markiert.

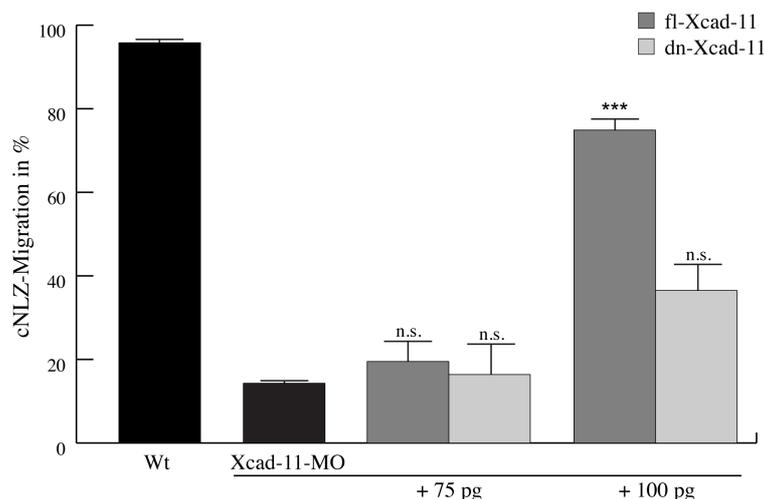


Abbildung 5.10: Rekonstitution erfolgt durch 100 pg fl-Xcad-11, jedoch nicht durch dn-Xcad-11.

Statistische Analyse der Migration der cNLZ in *X. laevis* Embryonen, in denen Xcad-11-MO mit 75 pg bzw. 100 pg fl-Xcad-11 oder dn-Xcad-11 co-injiziert wurden. cNLZ wurden durch ISH gegen AP-2 α markiert und die Migration analysiert. 75 pg von beiden Konstrukten sind nicht in der Lage den Wildtyp-Phänotyp wieder herzustellen. Während 100 pg fl-Xcad-11 die Migrationsdefekte durch Xcad-11-MO rekonstituiert, zeigen Embryonen, welche mit 100 pg dn-Xcad-11 co-injiziert wurden, Migrationsdefekte. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test. (***) Signifikanz mit $p < 0,002$; n.s.: nicht signifikant verglichen zu Xcad-11-MO.

Während 75 pg fl-Xcad-11 mRNA nicht in der Lage sind, den Wildtyp-Phänotyp signifikant wieder herzustellen (19,6% cNLZ-Migration +/- 4,7; n=36; N=3; p= nicht signifikant verglichen zu Xcad-11-MO; s. Abbildung 5.10), wandern bei Co-Injektion von Xcad-11-MO und 100 pg fl-Xcad-11 die cNLZ in 75,0% der Embryonen in die Kiemenbögen ein (+/- 2,8; n=170; N=3; p< 0,002 verglichen zu Xcad-11-MO; s. Abbildung 5.10 und 5.11 A, C). Im Gegensatz dazu können sowohl 75 pg als auch 100 pg dn-Xcad-11 mRNA den Wildtyp-Phänotyp nicht signifikant wieder herstellen und zeigen deutliche Migrationsdefekte (75 pg dn-Xcad-11: 16,4% +/- 7,4; n=110; N=4; 100 pg dn-Xcad-11: 36,6% +/- 6,3; n=115; N=3; p= nicht signifikant verglichen zu Xcad-11-MO; s. Abbildung 5.10 und 5.11 B, C).

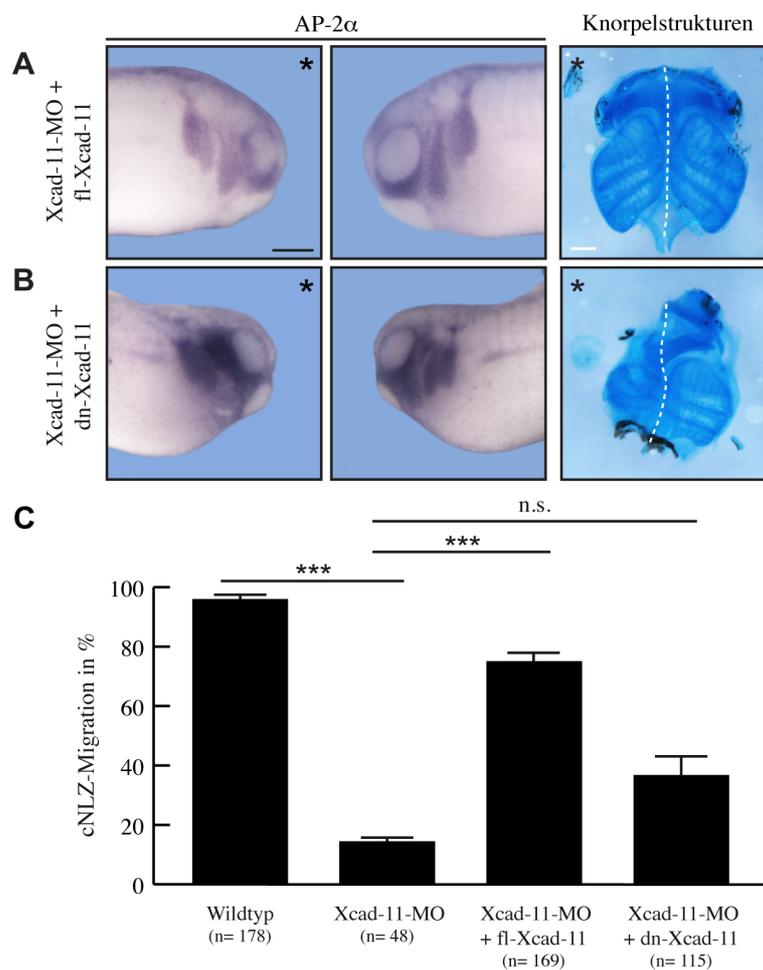


Abbildung 5.11: Die adhäsive Funktion von Xcad-11 ist für die direktionale Migration der cNLZ notwendig.

Erste und zweite Spalte: Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. Dritte Spalte: Dorsale Ansicht auf explantierte Knorpelstrukturen nach Alzianblau-Färbung. Anterior oben, (*) injizierte Seite. Weiße Linie verdeutlicht bilaterale Mittelachse. (A) Co-Injektion von 100 pg fl-Xcad-11 rekonstituiert den Wildtyp-Phänotyp in Xcad-11-MO injizierten Embryonen. (B) Injektion von 100 pg dn-Xcad-11 und Xcad-11-MO führt zu Defekten in der cNLZ-Migration und in Stadium 45 zu bilateraler Asymmetrie und reduzierten Knorpelstrukturen. (C) Statistische Analyse der ISH in Prozent der vollständigen cNLZ-Migration mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (***) Signifikanz mit p< 0,005; n.s.: nicht signifikant nach Studentischem T-Test. Maßstab, 250 μ m.

Zusätzlich zeigt die Alzianblau-Färbung von Knorpelstrukturen im Stadium 45, dass die Co-Injektion von 100 pg fl-Xcad-11 die Migrationsdefekte durch Xcad-11-MO rekonstituieren kann und die Migration der cNLZ zu bilateral symmetrischen und vollständig ausgebildeten Knorpelstrukturen führt (s. Abbildung 5.11 A). In Embryonen, die einseitig mit Xcad-11-MO und 100 pg dn-Xcad-11 injiziert wurden, kommt es zum Verlust der bilateralen Symmetrie. Neben dem Verlust der Knorpelderivate, welche durch den mandibulare cNLZ-Strom gebildet werden, sind sowohl der ceratohyale als auch die ceratobranchialen Knorpel deutlich reduziert und weisen auf Migrationsdefekte der cNLZ hin (s. Abbildung 5.11 B).

5.6 Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11 führt zu erhöhter Invasivität von cNLZ *in vitro*

Die vorherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die adhäsive Funktion von Xcad-11 die Migration von cNLZ beeinflusst. Da die Überexpression von dn-Xcad-11 einen ähnlichen Phänotyp wie die Blockierung des Wnt/PCP-Signalweges durch Überexpression von Dsh(DEP+) aufweist, liegt die Hypothese nahe, dass Xcad-11 eine Rolle in der Kontaktinhibition spielt. Um dies zu testen, werden Konfrontationsanalysen durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgt über den Überlappungsindex (OI), welcher den Überlappungsbereich zweier Explantate mit der normalisierten Größe der einzelnen Explantate vergleicht. Verlust der homotypischen Kontaktinhibition spiegelt sich in einer erhöhten Invasivität und somit einem erhöhten Überlappungsindex wider. Erste Ergebnisse aus früheren Arbeiten zeigen bereits die Tendenz der hier präsentierten Daten (Becker, Diplomarbeit, 2011). Jedoch ermöglichen neue, computergestützte Analysemethoden eine präzisere Auswertung und damit zuverlässigere Ergebnisse.

Für die Konfrontationsanalyse werden zum einen Embryonen im Acht-Zellstadium mit 500 pg mRNA eines membrangebundenen grün fluoreszenzmarkierten Protein (GAP43-GFP) injiziert. Parallel dazu werden Embryonen mit 500 pg eines membrangebundenen rot fluoreszenzmarkierten Protein (GAP43-mcherry) und den entsprechenden Konstrukten co-injiziert. Im Stadium 16 werden die cNLZ explantiert und je ein grün-fluoreszierendes Wildtyp-cNLZ-Explantat einem rot-fluoreszierenden co-injizierten cNLZ-Explantat auf einer Fibronectin-beschichteten Oberfläche gegenüber gestellt.

Fluoreszenzmarkierte Wildtyp-cNLZ weisen eine normale Zellmorphologie mit dynamischen Filopodien und Lamellipodien auf (s. Abbildung 5.12 A, weiße Pfeile). Die Konfrontation dieser Explantate führt zu einer geringen Invasion bedingt durch homotypische Kontaktinhibition und somit nur zu einer transienten und schwachen Überlappung der Explantate mit $OI = 13,1\%$ ($\pm 1,8$; $n=34$; $N=8$; s. Abbildung 5.12 A, E; s. Film Z1). Die Gegenüberstellung von einem grün fluoreszenzmarkierten Wildtyp-Explantat und einem rot markierten, dessen Zellen durch Xcad-11-MO nicht in der Lage sind Xcad-11 zu translatieren, weist einen signifikant höheren Überlappungsbereich auf.

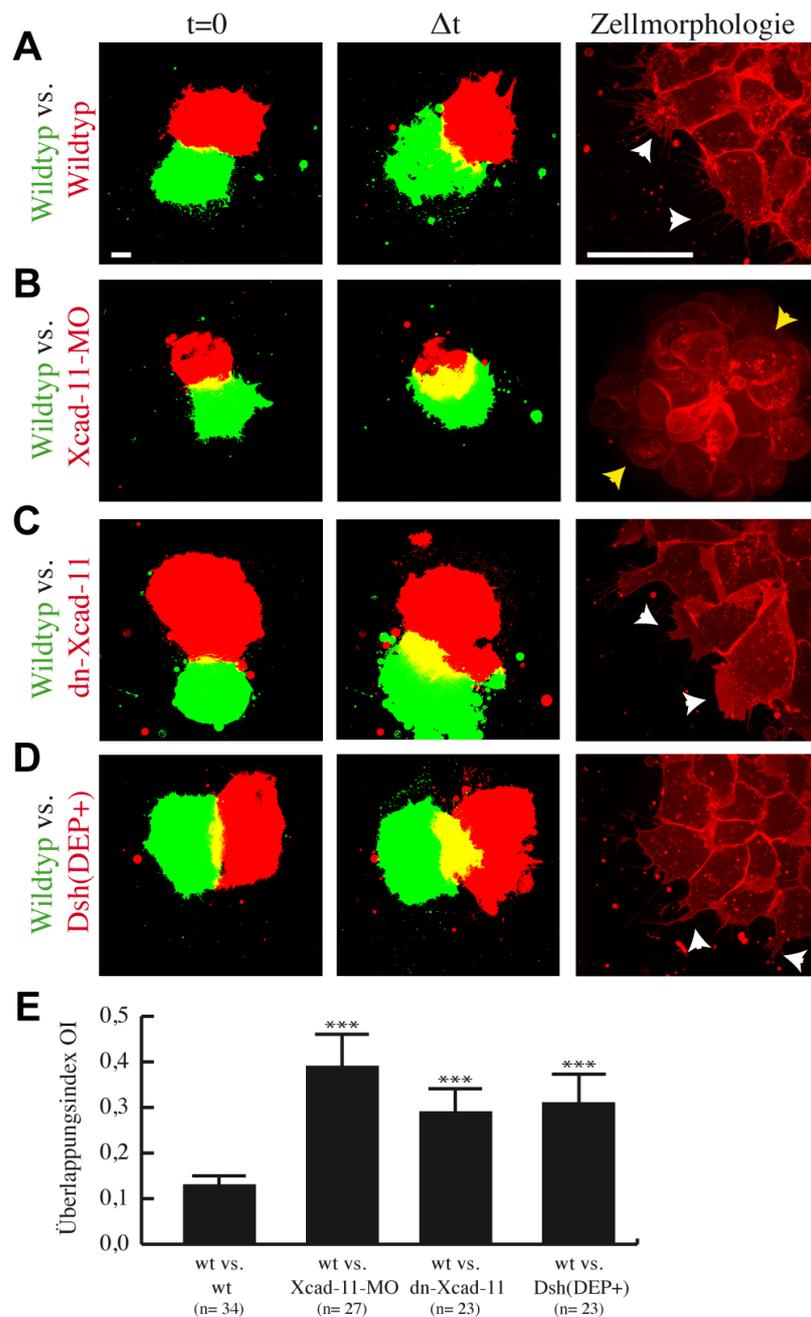


Abbildung 5.11: Verlust der Xcad-11 vermittelten Adhäsion erhöht die Invasivität von cNLZ *in vitro*.

Konfrontationsanalyse von fluoreszenzmarkierten cNLZ-Explantaten. Erste Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt $t=0$. Zweite Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt der höchsten Überlappung Δt . Dritte Spalte: Zellmorphologie der co-injizierten cNLZ. Außer in (A) Wildtyp vs. Wildtyp kommt es bei der Konfrontation von Wildtyp-Explantaten mit Explantaten, welche mit (B) Xcad-11-MO, (C) dn-Xcad-11 oder (D) Dsh(DEP+) injiziert wurden, zu einem erhöhten Überlappungsbereich (gelb). Verlust von Xcad-11 mittels Xcad-11-MO (B) führt zu einer bleibenden Zellmorphologie (gelbe Pfeile), während in den Ansätzen A, C und D die cNLZ Zellausläufer bilden (weiße Pfeile). (E) Gemittelter Überlappungsindex OI mit $n =$ Anzahl der Konfrontationen. (***) Signifikanz zu Wildtyp vs. Wildtyp mit $p < 0,001$ nach Studentischem T-Test. Maßstab, 50 μm .

Der gemittelte Überlappungsindex beträgt $OI = 39,7\%$ ($\pm 7,2$; $n=27$; $N=8$; s. Abbildung 5.12 B, E; s. Film Z2). Da die Zellmorphologie der depletierten cNLZ jedoch keine Zellausläufer aufweist (s. Abbildung 5.12 B, gelbe Pfeile), welche für die Migration der cNLZ auf Fibronektin notwendig sind,

kann es sein, dass der hohe Überlappungsindex auf die Unfähigkeit der Zellen zu migrieren zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu sind Zellen, welche dn-Xcad-11 überexprimieren, durchaus in der Lage Zellausläufer zu bilden und somit aktiv zu migrieren (s. Abbildung 5.12 C; weiße Pfeile). Dennoch führt der Verlust der Xcad-11 vermittelten Adhäsion ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Invasion von gegenüber gestellten cNLZ-Explantaten (OI= 29,2% +/- 4,9; n=23; N=4; s. Abbildung 5.12 C, E; s. Film Z3). Erneut weist die Inhibition des Wnt/PCP-Signalweges durch Überexpression von Dsh(DEP+) einen ähnlichen Phänotyp auf wie der Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11. Der gemittelte Überlappungsindex der konfrontierten Explantate ist mit OI= 31,9% signifikant höher als der Wildtyp (+/- 5,1; n=23; N=5; s. Abbildung 5.12 D, E; s. Film Z4). Die erhöhte Invasivität bestätigt die Notwendigkeit des Wnt/PCP-Signalweges in der Kontaktinhibition während der cNLZ-Migration.

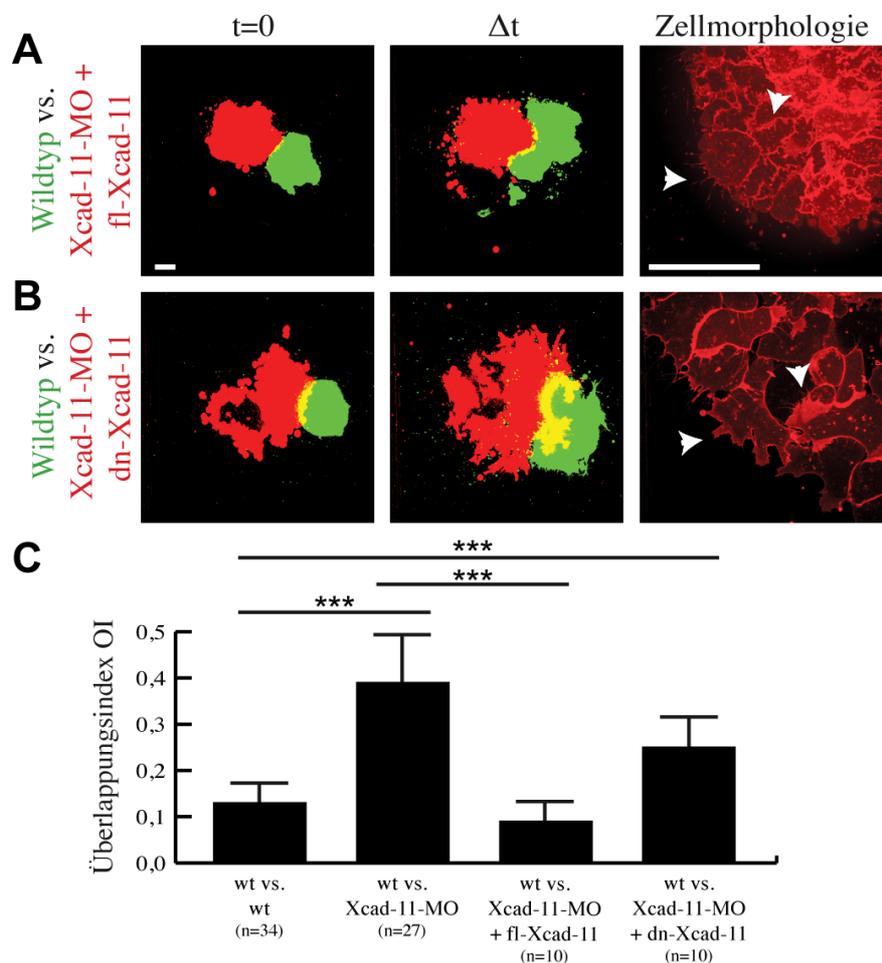


Abbildung 5.13: Die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 senkt die Invasivität von cNLZ *in vitro*.

Konfrontationsanalyse von fluoreszenzmarkierten cNLZ-Explantaten. Erste Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt $t=0$. Zweite Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt der höchsten Überlappung Δt . Dritte Spalte: Zellmorphologie der co-injizierten cNLZ. (A) Rekonstitution mit fl-Xcad-11 stellt die Kontaktinhibition wieder her, während (B) dn-Xcad-11 im Xcad-11-MO-Hintergrund zu einer erhöhten Invasivität führt. In beiden Ansätzen kann der bleibende Phänotyp der Xcad-11 depletierten cNLZ durch die Co-Injektion der Konstrukte rekonstituiert werden und die cNLZ weisen Zellausläufer auf (weiße Pfeile). (C) Gemittelter Überlappungsindex OI mit n = Anzahl der Konfrontationen. (***) Signifikanz mit $p < 0,005$ nach Studentischem T-Test. Maßstab, 50 μm .

Um sicher zu stellen, dass es sich bei der Überexpression von dn-Xcad-11 nicht um ein Überexpressionsartefakt handelt, wird untersucht, ob die Wildtyp-Situation durch die Co-Injektion von fl-Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 mRNA im Xcad-11-MO-Hintergrund wieder hergestellt werden kann. Explantate, welche mit Xcad-11-MO und 100 pg fl-Xcad-11 co-injiziert und Wildtyp-Zellen gegenüber gestellt werden, zeigen eine deutliche Kontaktinhibition. Der OI beträgt 9,5% (+/- 1,4; n=10; N=3; s. Abbildung 5.13 A, C; s. Film Z5) und ist mit $p < 0,005$ signifikant verschieden zum Xcad-11-MO-Ansatz. Die cNLZ-Morphologie gleicht der von Wildtyp-cNLZ mit der Ausbildung von Zellausläufern (s. Abbildung 5.13 A; weiße Pfeile). Ebenso sind cNLZ, welche mit 100 pg dn-Xcad-11 co-injiziert werden, in der Lage den blebbenden Phänotyp von Xcad-11-MO injizierten cNLZ zu rekonstituieren und Zellausläufer zu bilden (s. Abbildung 5.13 B; weiße Pfeile). Im Gegensatz jedoch kommt es in den Konfrontationen von Wildtyp- und Xcad-11-MO + dn-Xcad-11 injizierten cNLZ zu einer erhöhten Überlappung (OI= 24,6% +/- 4,4; n=10; N=3; s. Abbildung 5.13 B, C; s. Film Z6), welche mit $p < 0,005$ signifikant verschieden zum Wildtyp-Ansatz ist.

5.7 Xcad-11 vermittelt die repulsive Reaktion von kollidierenden cNLZ *in vitro*

Die Kontaktinhibition wurde erstmals als die Richtungsänderung einer einzelnen Zelle nach der Kollision mit einer anderen Zelle beschrieben (Aberchrombie, 1970). In früheren Arbeiten wurde allerdings auch die Kollision einer einzelnen Zelle mit Zellen, die im Zellverband vorlagen, in die Auswertung mit einbezogen (Becker, Diplomarbeit, 2011). Um zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, werden in dieser Arbeit ausschließlich Kollisionen einzelner Zellen untersucht. Zusätzlich zeigen frühere Analysen, dass Wildtyp-cNLZ in heterotypischen Kollisionen immer eine repulsive Reaktion nach der Kollision mit einer anderen Zelle aufweisen (Becker, Diplomarbeit, 2011). Daher werden in dieser Arbeit ausschließlich homotypische Kollisionen zwischen cNLZ untersucht, welche die gleichen Eigenschaften besitzen.

Für die Kollisionsanalyse werden Embryonen im Acht-Zellstadium mit einem membrangebundenen fluoreszenzmarkierten Protein (GAP43-mcherry) und dem entsprechenden Konstrukt in die animal dorsale Blastomere co-injiziert. Im Stadium 16 werden die cNLZ explantiert, mittels des cNLZ-Dissoziationspuffers vereinzelt und auf eine mit Fibronectin beschichtete Oberfläche überführt.

Die Kollision von zwei Wildtyp-cNLZ führt zu einer repulsiven Reaktion der Zellen, wodurch sie ihre Migrationsrichtung im Vergleich zum initialen Geschwindigkeitsvektor (rot, 6 $\mu\text{m}/\text{min}$) verändern, wie der relativen Geschwindigkeitsanalyse zu entnehmen ist (n=10; s. Abbildung 5.14 A). Xcad-11-MO co-injizierte cNLZ prallen von einander ab ohne eine Richtungsänderung in der Migration aufzuweisen. Die Geschwindigkeitsvektoren sind zufällig verteilt und überwiegend klein (n=10; s. Abbildung 5.14 B). Die Überexpression von dn-Xcad-11 oder Dsh(DEP+) verhindert die repulsive

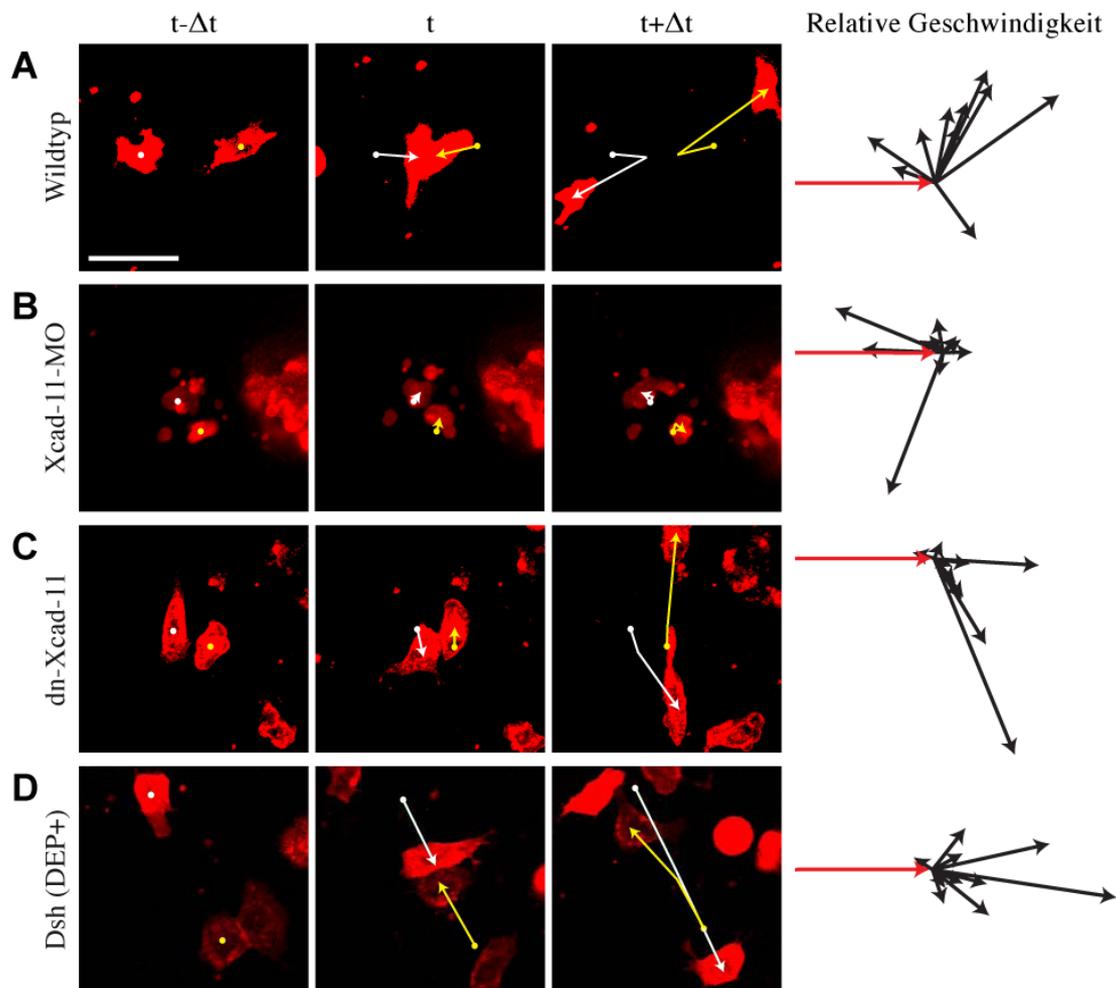


Abbildung 5.14: Xcad-11 vermittelt die repulsive Reaktion von kollidierenden cNLZ *in vitro*

Kollisionsanalyse. Links: Kollision von zwei vereinzelt cNLZ zum Zeitpunkt vor ($t-\Delta t$), während (t) und nach ($t+\Delta t$) der Kollision. Gelbe und weiße Vektoren geben die Ortsveränderung an. Rechts: relative Geschwindigkeit und Veränderung der Migrationsrichtung nach der Kollision ($n=10$; initialer Geschwindigkeitsvektor in rot). (A) Wildtyp-cNLZ zeigen eine Veränderung der Migrationsrichtung nach der Kollision. (B) Xcad-11-MO injizierte cNLZ zeigen nur eine schwache und zufällig verteilte Reaktion. cNLZ, welche (C) dn-Xcad-11 und (D) Dsh(DEP+) überexprimieren, weisen eine reduzierte repulsive Antwort auf den Zellkontakt auf und gleiten aneinander vorbei. Maßstab, 50 μm .

Reaktion der cNLZ. Die Zellen sind in der Lage, Zellausläufer auszubilden und zu migrieren, jedoch gleiten sie ohne Änderung der Migrationsrichtung aneinander vorbei ($n=10$; s. Abbildung 5.14 C, D).

Noch deutlicher wird dieses Verhalten in Rekonstitutionsexperimenten. Bei der Co-Injektion von 100 pg fl-Xcad-11 und Xcad-11-MO reagieren die cNLZ wie Wildtyp-Zellen nach der Kollision mit einer deutlichen Richtungsänderung verglichen zum initialen Geschwindigkeitsvektor ($n=10$; s. Abbildung 5.15 A). Im Gegensatz dazu gleiten cNLZ durch den Verlust der adhäsiven Funktion von Xcad-11 durch Co-Injektion von dn-Xcad-11 und Xcad-11-MO aneinander vorbei und zeigen keine Änderung der Migrationsrichtung (s. Abbildung 5.15 B).

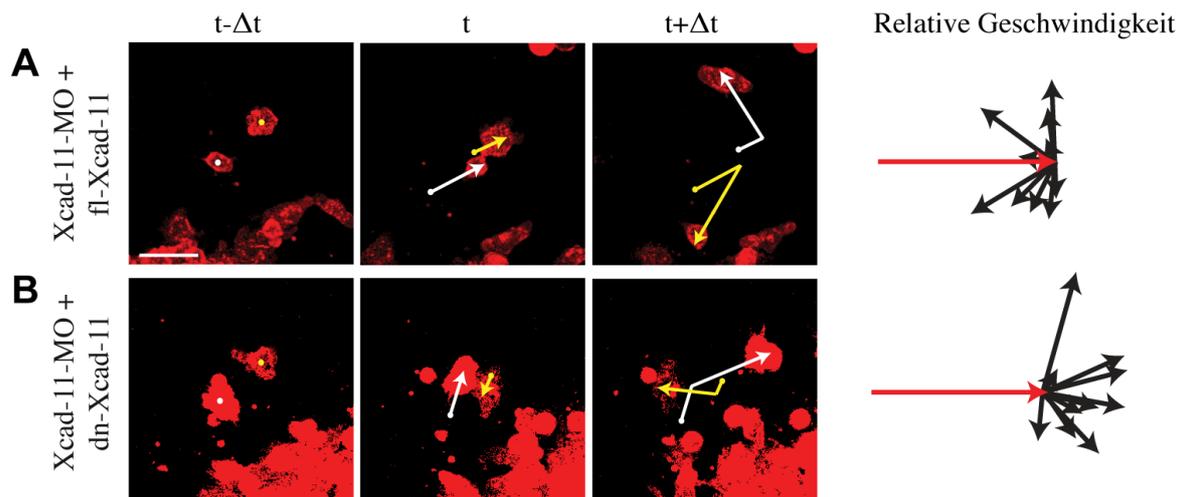


Abbildung 5.15: Die adhäsive Funktion von Xcad-11 ist notwendig für die repulsive Reaktion von kollidierenden cNLZ *in vitro*

Kollisionsanalyse. Links: Kollision von zwei vereinzelt cNLZ zum Zeitpunkt vor ($t-\Delta t$), während (t) und nach ($t+\Delta t$) der Kollision. Gelbe und weiße Vektoren geben die Ortsveränderung der Zellen an. Rechts: relative Geschwindigkeit und Veränderung der Migrationsrichtung nach der Kollision ($n=10$; initialer Geschwindigkeitsvektor in rot). (A) Rekonstitution des Verhaltens von Wildtyp-cNLZ durch Co-Injektion von fl-Xcad-11 im Xcad-11-MO-Hintergrund. (B) Co-Injektion von dn-Xcad-11 kann die Migrationsfähigkeit und die Ausbildung von Zellausläufern in Xcad-11-MO injizierten cNLZ wieder herstellen, jedoch nicht das Verhalten nach einer Kollision. Die cNLZ zeigen eine verminderte bzw. keine repulsive Zellantwort und verändern nach einer Kollision ihre Migrationsrichtung nicht deutlich. Maßstab, 50 μm .

5.8 Überexpression von Adam13 beeinflusst die Kontaktinhibition in cNLZ *in vitro*

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Xcad-11 eine wichtige Rolle in der Vermittlung des Zell-Zell-Kontakts innerhalb der Kontaktinhibition spielt. Jedoch muss nach der Repolarisation der cNLZ der Kontakt wieder gelöst werden, damit die kollidierenden Zellen sich trennen und in ihre neue Migrationsrichtung wandern können. Daher ist die Modulation der Xcad-11 vermittelten Zell-Zell-Adhäsion für die Kontaktinhibition notwendig. Ein potentieller Kandidat ist die Metalloprotease Adam13, welche vor und während der Migration in den cNLZ exprimiert wird (Alfandari et al., 2001).

Adam13 ist in der Lage Xcad-11 zwischen den extrazellulären Domänen EC3 und EC4 zu spalten und somit die Adhäsionsfähigkeit des Cadherins zu modulieren. Es wurde bereits gezeigt, dass die proteolytische Aktivität der Metalloprotease für die gerichtete Migration der cNLZ notwendig ist (McCusker et al., 2009). ISH gegen den cNLZ-Marker Sox10 und gezielte Injektion im 16-Zellstadium zeigen, dass sowohl die Überexpression (Adam13-OE) als auch der Verlust der Metalloprotease durch ein spezifisches Morpholino-Oligonukleotid (Adam13-MO) die cNLZ-Migration inhibiert. Interessanterweise sind in Transplantationsanalysen die Donor-cNLZ in der Lage gerichtet zu migrieren. Dies deutet darauf hin, dass durch ektopische Signale des Akzeptor-Embryos die Migration rekonstituiert werden kann (Alfandari et al., 2001; McCusker et al., 2009).

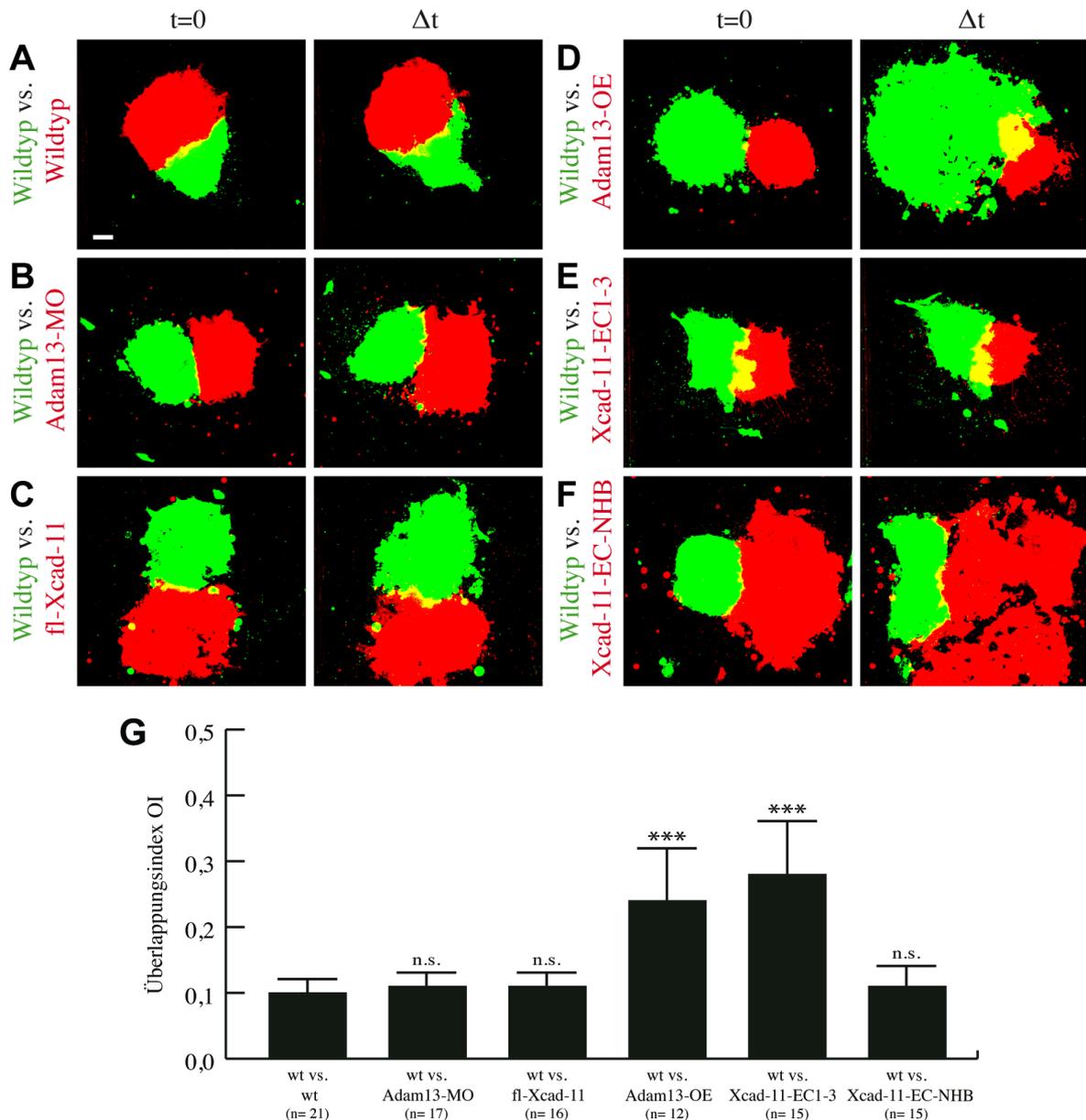


Abbildung 5.16: Überexpression von Adam13 erhöht die Invasivität der cNLZ *in vitro*.

Konfrontationsanalyse von fluoreszenzmarkierten cNLZ-Explantaten. Linke Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt $t=0$. Rechte Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt der höchsten Überlappung Δt . Konfrontationen von Wildtyp-cNLZ mit (A) Wildtyp-cNLZ, (B) cNLZ, in welchen Adam13 mittels Adam13-MO depletiert ist und (C) cNLZ, welche fl-Xcad-11 überexprimieren, führen zu einer schmalen Überlappungsgrenze und weisen Kontaktinhibition auf. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Überexpression von (D) Adam13 (Adam13-OE) bzw. (E) des Spaltproduktes Xcad-11-EC1-3 zu einer erhöhten Invasivität. Die Invasivität sinkt jedoch, wenn (F) das Spaltprodukt keine homophile Bindung eingehen kann (Xcad-11-EC-NHB). (G) Gemittelter Überlappungsindex OI mit n = Anzahl der Konfrontationen. (***) Signifikanz mit $p < 0,005$; n.s.= nicht signifikant nach Studentischem T-Test verglichen mit Wildtyp vs. Wildtyp. Maßstab, 50 μm .

Bisher wurde für die Rolle von Adam13 in der cNLZ-Migration überwiegend die Funktion in der Delamination der Zellen zu Beginn der Migration vorgeschlagen. Um die Hypothese zu untersuchen, dass Adam13 für die Kontaktinhibition notwendig ist, wurden in Zusammenarbeit mit Genevieve Abbruzzese (Universität von Massachusetts, Amherst, MA, USA) im Rahmen des KHYS-

Gaststipendiums Konfrontations- und Kollisionsanalysen durchgeführt. Die in Abbildung 5.16 und 5.17 gezeigten Daten wurden zu gleichen Teilen von G. Abbruzzese und S. Becker erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit den beschriebenen MatLab-Skripten durch S. Becker.

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Xcad-11 vermittelte Adhäsion die Kontaktinhibition beeinflusst, werden Konfrontations- und Kollisionsanalysen mit cNLZ durchgeführt, welche entweder durch die Injektion von 2 ng Adam13-MO nicht in der Lage sind Adam13 zu translatieren bzw. durch die Überexpression von Xcad-11 (500 pg fl-Xcad-11) eine erhöhte Menge an ungespaltenem Xcad-11 besitzen. Im Gegensatz dazu wird durch die Überexpression von 1 ng Adam13 (Adam13-OE) die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 stark verringert, da die Rate des gespaltenen und damit nicht adhäsiven Xcad-11 steigt. Ebenso wird die adhäsive Funktion von Xcad-11 durch die Überexpression von 1 ng des extrazellulären Spaltproduktes (Xcad-11-EC1-3) verringert. Die cNLZ exprimieren das nicht membrangebundene Fragment, welches auf Grund der vorhandenen Pro-Domäne von den Zellen sezerniert wird und somit extrazellulär vorliegt (McCusker et al., 2009). Damit kann es die für die Kontaktinhibition notwendigen *trans*-Interaktionen und die Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes durch Xcad-11 blockieren. Zusätzlich wird untersucht, ob das extrazelluläre Spaltprodukt die Kontaktinhibition auch beeinflusst, wenn es nicht in der Lage ist homophile Bindungen (NHB) einzugehen. Dazu werden 1 ng Xcad-11-EC-NHB injiziert, wobei dieses Xcad-11-EC1-3-Konstrukt Punktmutationen in der EC1-Domäne (W2A, W4A, A80M) besitzt.

Für die Konfrontationsanalysen werden cNLZ-Explantate aus Embryonen, welche mit 500 pg mRNA eines membrangebundenen grün fluoreszenzmarkierten Protein (GAP43-GFP) injiziert werden. Diese werden auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche cNLZ-Explantaten gegenüber gestellt, welche aus Embryonen stammen, die im Acht-Zellstadium mit 500 pg eines membrangebundenen rot fluoreszenzmarkierten Protein (GAP43-mcherry) und den entsprechenden Konstrukten co-injiziert werden.

Die Konfrontation von Wildtyp-cNLZ führt zu homotypischer Kontaktinhibition mit einer schwachen Invasion der cNLZ. Der Überlappungsindex (OI), welcher den Überlappungsbereich beider Explantate mit der normalisierten Größe der einzelnen Explantate vergleicht, liegt bei 10,4% (+/- 1,9; n=21; N=6; s. Abbildung 5.16 A, G; s. Film Z7). Interessanterweise zeigen Konfrontationen von Wildtyp-cNLZ mit Explantaten, welche durch Adam13-MO bzw. Überexpression von fl-Xcad-11 eine erhöhte Adhäsion aufweisen, keine erhöhte Invasivität. Der OI ist bei Adam13-MO mit 11,4% (+/- 1,9; n=17; N=5; s. Abbildung 5.16 B, G; s. Film Z8) bzw. bei der Überexpression von fl-Xcad-11 mit 11,0% (+/- 1,8; n=16; N=4; s. Abbildung 5.16 C, G; s. Film Z9) nicht signifikant verschieden zum Wildtyp.

Im Gegensatz dazu steigt die Invasivität bei Verringerung der adhäsiven Funktion von Xcad-11 durch die Überexpression von Adam13 (Adam13-OE) signifikant auf OI= 24,0% (+/- 7,9; n=12; N=3; p= 0,008

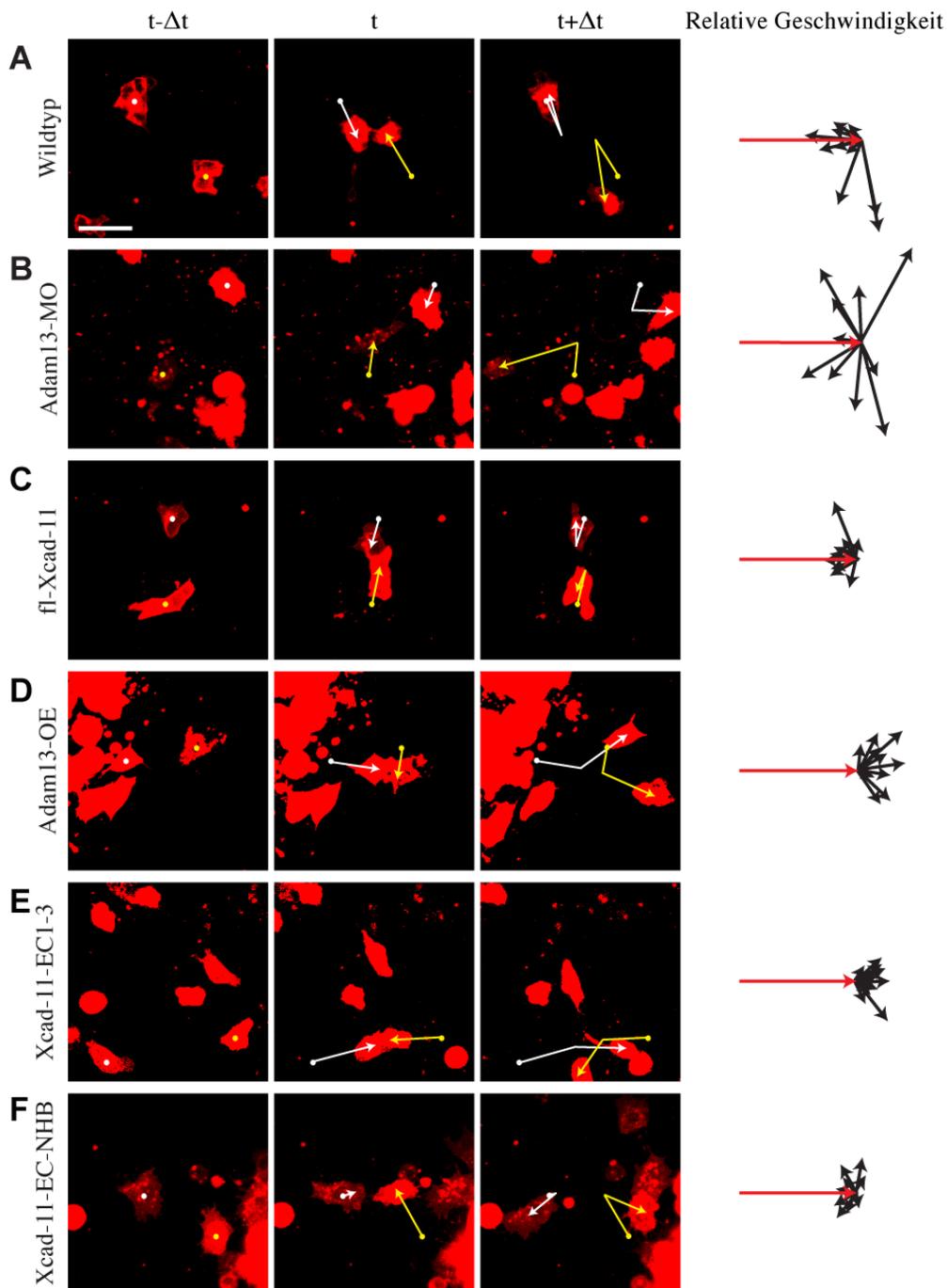


Abbildung 5.17: Überexpression von Adam13 führt zu einer verringerten repulsiven Reaktion bei einer cNLZ-Kollision *in vitro*.

Kollisionsanalyse. Links: Kollision von zwei vereinzelt cNLZ zum Zeitpunkt vor ($t-\Delta t$), während (t) und nach ($t+\Delta t$) der Kollision. Gelbe und weiße Vektoren geben die Ortsveränderung der Zellen an. Rechts: relative Geschwindigkeit und Veränderung der Migrationsrichtung nach der Kollision ($n=10$; initialer Geschwindigkeitsvektor in rot). Kollisionen von (A) Wildtyp-cNLZ, (B) Adam13 depletierten cNLZ und (C) fl-Xcad-11 überexprimierenden cNLZ zeigen eine repulsive Reaktion auf den Zell-Zell-Kontakt. Die cNLZ verändern deutlich ihre Migrationsrichtung nach der Kollision. Die Überexpression von (D) Adam13 (Adam13-OE) bzw. (E) dem Spaltprodukt Xcad-11-EC1-3 führen zu einer verminderten Xcad-11 vermittelten Adhäsion und damit zum Verlust der Kontaktinhibition. Die cNLZ weisen keine Richtungsänderung auf, sondern gleiten aneinander vorbei. (F) Überexpression des nicht-homophil bindenden Spaltprodukts Xcad-11-EC-NHB hat keinen Einfluss auf die Kontaktinhibition. Die cNLZ zeigen eine repulsive Reaktion auf den Zell-Zell-Kontakt. Maßstab, 50 μm .

verglichen zu Wildtyp vs. Wildtyp; s. Abbildung 5.16 D, G; s. Film Z10). Noch deutlicher wird die Notwendigkeit der Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes durch Xcad-11, wenn diese durch die Überexpression von Xcad-11-EC1-3 blockiert wird. Die Explantate zeigen eine starke Überlappung und somit eine gesteigerte Invasivität mit einem OI= 28,5% (+/- 7,7; n=15; N=3; p< 0,001 verglichen zu Wildtyp vs. Wildtyp; s. Abbildung 5.16 E, G; s. Film Z11). Interessanterweise sinkt die Invasivität der cNLZ, wenn das Xcad-11-EC1-3-Konstrukt nicht in der Lage ist homophile Bindungen einzugehen. Die Konfrontation von Wildtyp-Explantaten mit cNLZ, welche Xcad-11-EC-NHB sezernieren, führt zu einem OI von 11,3% (+/- 2,9; n=15; N=2; s. Abbildung 5.16 F, G; s. Film Z12) und ist nicht signifikant verschieden verglichen zum Wildtyp.

Ähnliche Ergebnisse zeigen auch homotypische Kollisionen der jeweiligen Ansätze in der Kollisionsanalyse. Dazu werden Embryonen im Acht-Zellstadium mit den entsprechenden Konstrukten und 500 pg eines membrangebundenen fluoreszenzmarkierten Protein (GAP43-mcherry) co-injiziert. Die cNLZ werden im Stadium 16 explantiert, dissoziiert, auf eine mit Fibronectin beschichtete Oberfläche gegeben und das Migrationsverhalten bei einer Kollision untersucht.

Laut der Definition von M. Aberchromie kommt es durch die Kontaktinhibition zur Richtungsänderung der Zellen nach dem Kontakt (Aberchrombie, 1970). Dies ist sowohl für Wildtyp-cNLZ, als auch in cNLZ mit erhöhter adhäsiver Funktion von Xcad-11 durch Verlust von Adam13 mittels Adam13-MO bzw. durch die Überexpression von fl-Xcad-11 zu beobachten, wobei diese Zellen mit einer Repulsion auf den Zell-Zell-Kontakt antworten (s. Abbildung 5.17 A, B, C). Im Gegensatz dazu verändern kollidierende cNLZ, welche durch Überexpression von Adam13 (Adam13-OE) bzw. dem Spaltprodukt Xcad-11-EC1-3 eine verminderte Xcad-11 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion aufweisen, ihre Migrationsrichtung nicht nach einem Kontakt. Sie gleiten vielmehr aneinander vorbei und zeigen eine verminderte repulsive Antwort (s. Abbildung 5.17 D, E). Die Überexpression des nicht-homophil bindenden Spaltprodukts Xcad-11-EC-NHB führt jedoch zu einer repulsiven Reaktion auf den Zell-Zell-Kontakt. Die cNLZ verändern nach der Kollision deutlich ihre Migrationsrichtung (s. Abbildung 5.17 F).

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhte Adam13-abhängige Modulation der Adhäsionsfunktion von Xcad-11 durch proteolytische Spaltung die Kontaktinhibition blockiert und zu einer erhöhten Invasivität führt. Wenn auch der Verlust von Adam13 und die dadurch resultierende erhöhte Xcad-11 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion keinen Einfluss auf die Kontaktinhibition hat, bedarf es des richtigen Maßes der Adhäsionsfunktion von Xcad-11 für die Kontaktinhibition.

5.9 Trio ist an der Zellmembran in Zell-Zell-Kontakten und an der Migrationsfront lokalisiert

Die Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA am Zell-Zell-Kontakt ist für die Repolarisation innerhalb der Kontaktinhibition notwendig (Carmona-Fontaine et al., 2008). Ein möglicher Kandidat dafür ist der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF)-Trio. Interessanterweise bindet Trio an die Intermediärdomäne von Xcad-11 (Kashef et al., 2009), welches für die Kontaktinhibition benötigt wird, und könnte somit Teil der intrazellulären Signalkaskade für die Repolarisation nach dem Zell-Zell-Kontakt sein.

Für die subzelluläre Lokalisation von Trio wird ein Fusionskonstrukt aus mTrio und einem grün-fluoreszierenden Protein (mTrio-GFP) genutzt. Durch Injektion von je 500 pg mTrio-GFP und GAP43-mcherry als Membranmarker in Embryonen im Acht-Zellstadium lassen sich die cNLZ im Stadium 16 explantieren und auf einer mit Fibronektin beschichteten Oberfläche untersuchen.

Das Fluoreszenzsignal ist dabei in cNLZ überwiegend an der Zellmembran zu detektieren (s. Abbildung 5.18; Moore et al., 2013). Neben der Lokalisation an der Zellmembran in Zell-Zell-Kontakten (s. Abbildung 5.18; weiße Pfeilspitzen) ist das Signal von mTrio-GFP in der Zellmembran an der Migrationsfront und in Zellausläufern zu erkennen (s. Abbildung 5.18; weiße Pfeile).

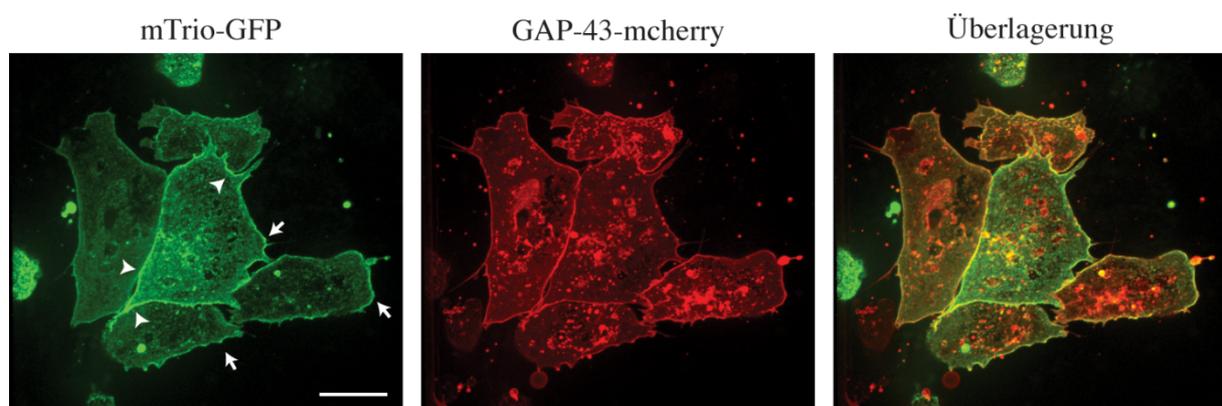


Abbildung 5.18: Subzelluläre Lokalisation von mTrio-GFP in cNLZ.

Fluoreszenzsignal von mTrio-GFP in cNLZ. GAP43-mcherry dient als Membranmarker. Die Überlagerung beider Signale verdeutlicht, dass mTrio-GFP überwiegend an der Zellmembran lokalisiert ist. Dabei liegt es sowohl im Zell-Zell-Kontakt (weiße Pfeilspitzen), als auch in Zellausläufern an der freien Migrationsfront (weiße Pfeile) vor. Maßstab, 20 μm .

Bisher konnte die Sequenz von XTrio von *X. laevis* nicht bestimmt werden. Über Sequenzvergleiche von bekannten Sequenzbereichen mit einer Genom-Datenbank von *X. laevis* (*Xenopus* Genom Projekt, Marcotte Labor, Universität von Texas, Austin, TX, USA) lässt sich *in silico* eine mögliche Sequenz vorhersagen (s. Anhang A.3). Da XTrio jedoch nicht in einem exprimierbaren Vektor vorliegt, handelt es sich bei den genutzten Konstrukten um DNA von Trio-Homologen aus Mensch (hTrio) oder Maus (mTrio).

5.10 GEF-Trio fördert die Migration der cNLZ *in vivo*

Dass Trio während der Migration der cNLZ exprimiert wird und am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist, impliziert eine prominente Rolle von GEF-Trio innerhalb der Kontaktinhibition. Um die Funktion von Trio zu blockieren wurde ein MO entwickelt, welches gegen die bekannte 5'UTR von Trio in *X. laevis* gerichtet ist und dessen Spezifität bereits gezeigt wurde (Trio-MO; Anne Merks, Masterarbeit, 2012; Moore et al., 2013).

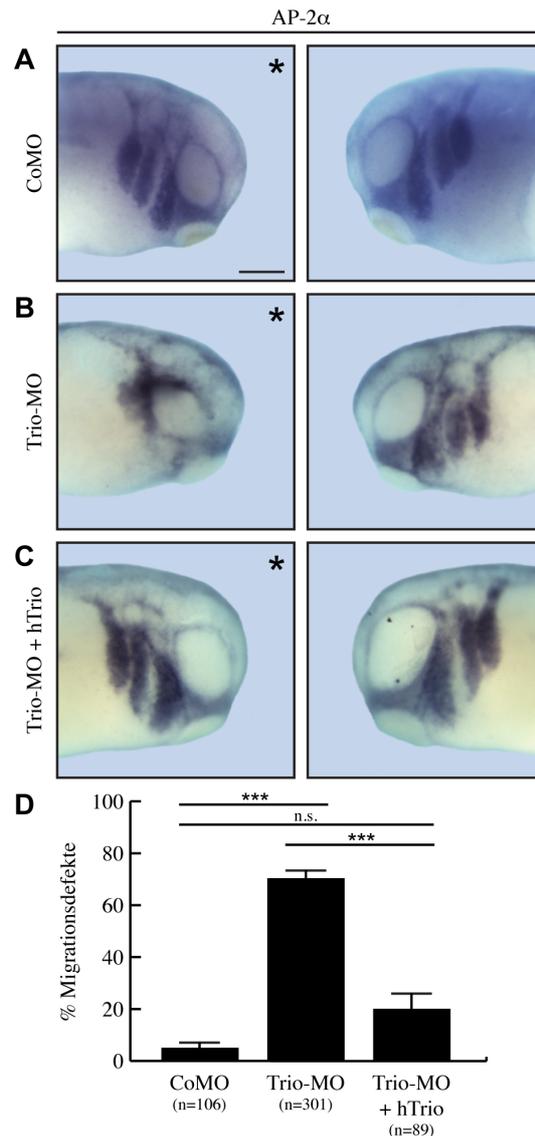


Abbildung 5.19: Verlust von GEF-Trio inhibiert die cNLZ-Migration *in vivo*.

Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. (A) Injektion eines Kontroll-MO (CoMO) zeigt keinen Einfluss auf die Migration der cNLZ. Die cNLZ wandern bilateral symmetrisch in die Kiemenbögen ein. (B) Verlust von GEF-Trio mittels Trio-MO führt zu starken Migrationsdefekten. Die mRNA von AP-2 α ist überwiegend im dorsale Bereich des Kopfes zu detektieren. (C) Co-Injektion von hTrio DNA im Trio-MO-Hintergrund führt zum Wildtyp-Phänotyp. hTrio ist in der Lage, die Migration der cNLZ wieder herzustellen. (D) Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test mit (***) p < 0,001 und n.s.: nicht signifikant. Maßstab, 250 μ m.

Die Ergebnisse aus Abbildung 5.19 wurden bereits teilweise veröffentlicht und bestehen zu 31,6% aus Daten von Anne Merks (Merks, Masterarbeit, 2012) und zu 57,9% aus Daten von Isabelle Rottmann (Rottmann, Bachelorarbeit, 2013), deren Arbeit von mir betreut wurde.

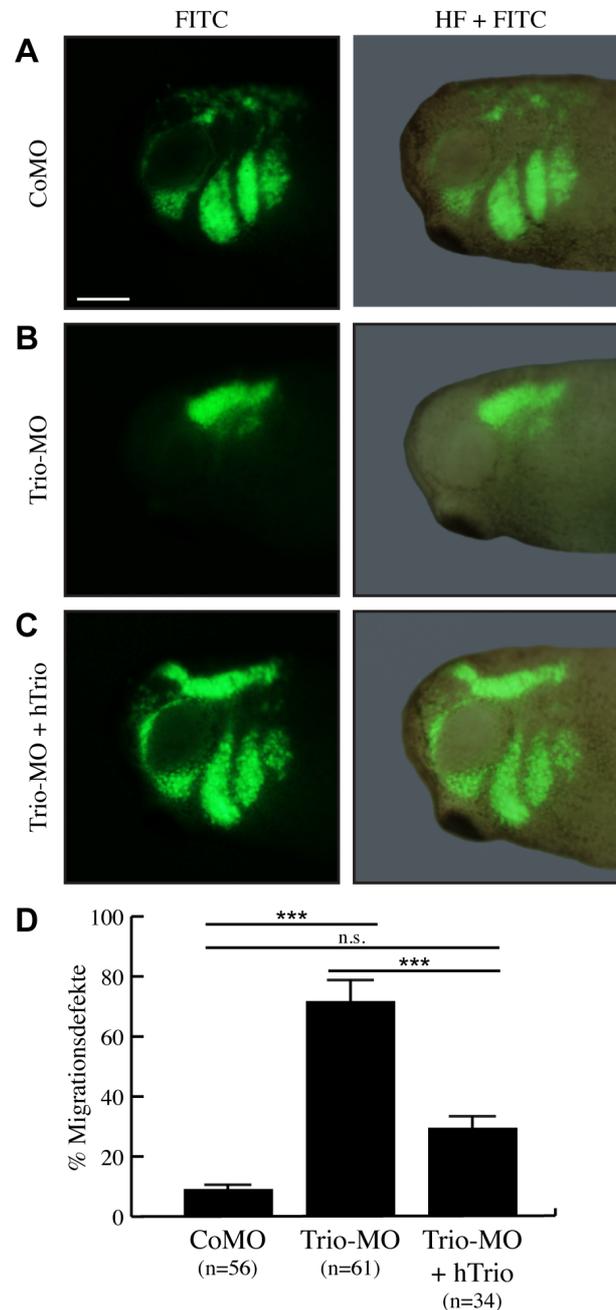


Abbildung 5.20: Migrationsdefekte durch den Verlust von GEF-Trio sind zellautonom verursacht.

Laterale Ansicht auf transplantierte *X. laevis* Embryonen im Stadium 26, anterior links, dorsal oben. Donor-cNLZ sind mit Fluorescein-Dextran markiert. Linke Spalte: Fluoreszenz-Signal im FITC-Kanal, rechte Spalte: Überlagerung von FITC-Kanal und Hellfeld (HF+FITC). (A) Trotz der Injektion des Kontroll-MO (CoMO) wandern cNLZ in die Kiemenbögen ein. (B) Donor-cNLZ, welche mit Trio-MO injiziert wurden, sind nicht in der Lage zu wandern, sondern bleiben im dorsalen Bereich des Kopfes stecken. (C) Co-Injektion von Trio-MO und hTrio ermöglicht den cNLZ die Migration in die Kiemenbögen. (D) Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test mit (***) $p < 0,009$ und n.s.: nicht signifikant. Maßstab, 250 μm .

ISH gegen den cNLZ-Marker AP-2 α zeigen die Inhibition der cNLZ-Migration durch die Injektion von 8 ng Trio-MO (s. Abbildung 5.19 B). Dabei kommt es in 70,2% der mit Trio-MO injizierten Embryonen zu starken Migrationsdefekten (+/- 3,4; n=301; N=11; p< 0,001 verglichen zu CoMO, s. Abbildung 5.19 B, D), wobei die cNLZ in der injizierten Seite nicht in der Lage sind, gerichtet in die Kiemenbögen einzuwandern und überwiegend fusioniert im dorsalen Bereich des Kopfes vorliegen (s. Abbildung 5.19 B). Im Gegensatz dazu weisen nur 4,9% der Embryonen, welche mit 8 ng eines nicht spezifisch bindendem Kontroll-MO (CoMO) injiziert werden, Migrationsdefekte auf (+/- 2,6; n=106; N=5; s. Abbildung 5.19 A, D). Die Co-Injektion von 10 pg hTrio DNA ist in der Lage die Migrationsdefekte durch Trio-MO aufzuheben und den Wildtyp-Phänotyp wieder herzustellen (19,9% +/- 5,9 Migrationsdefekte; n=94; N=3; p= 0,16 verglichen zu CoMO; s. Abbildung 5.19 C, D), was die Spezifität des MO unterstreicht.

Durch Transplantationsanalysen kann untersucht werden, ob es sich bei der Blockierung der cNLZ-Migration durch den Verlust von Trio um ein zellautonomes Verhalten handelt. Die Transplantation der cNLZ erfolgt in Stadium 16. Durch die Co-Injektion von 4 ng Fluorescein-markiertem Dextran kann die Migration der cNLZ im Stadium 26 analysiert werden. Dabei spiegeln die Daten die Ergebnisse aus der ISH gegen AP-2 α wider. cNLZ, welche mit 8 ng des Kontroll-MO (CoMO) injiziert wurden, sind in der Lage in die Kiemenbögen einzuwandern (Migrationsdefekte: 9,0% +/- 1,5; n=56; N=3; s. Abbildung 5.20 A, D). Im Gegensatz dazu ist das Fluoreszenzsignal von mit 8 ng Trio-MO co-injizierten Donor-cNLZ im dorsalen Bereich des Kopfes zu detektieren. Die Zellen sind nicht fähig die pharyngalen Kiementaschen zu erreichen, was zu starken Migrationsdefekten führt (71,6% +/- 7,2; n=61; N=4; p< 0,005 verglichen zu CoMO; s. Abbildung 5.20 B, D). Die Co-Injektion von 8 ng Trio-MO und 10 pg hTrio rekonstituiert die Migrationsdefekte. Dabei zeigen 70,6% der Embryonen ein Signal in den Kiemenbögen und die Migrationsdefekte gehen auf 29,4% zurück (+/- 3,9; n=34; N=3; p< 0,009 verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.20 C, D). Dies zeigt, dass es sich bei der Blockierung der cNLZ-Migration durch Trio-MO um ein zellautonomes Verhalten handelt.

5.11 Migrationsdefekte durch Verlust von Trio führen zu Missbildungen der cranialen Knorpelstrukturen im Kaulquappen-Stadium

Der Verlust von Trio führt zu starken Migrationsdefekten *in vivo*, welche durch eine zeitlich verzögerte Migration der cNLZ bedingt sein könnten. Um dies auszuschließen und den Einfluss der Depletion von Trio auf spätere Entwicklungsprozesse zu untersuchen, wird eine Alzianblau-Färbung an fixierten Kaulquappen im Stadium 45 durchgeführt.

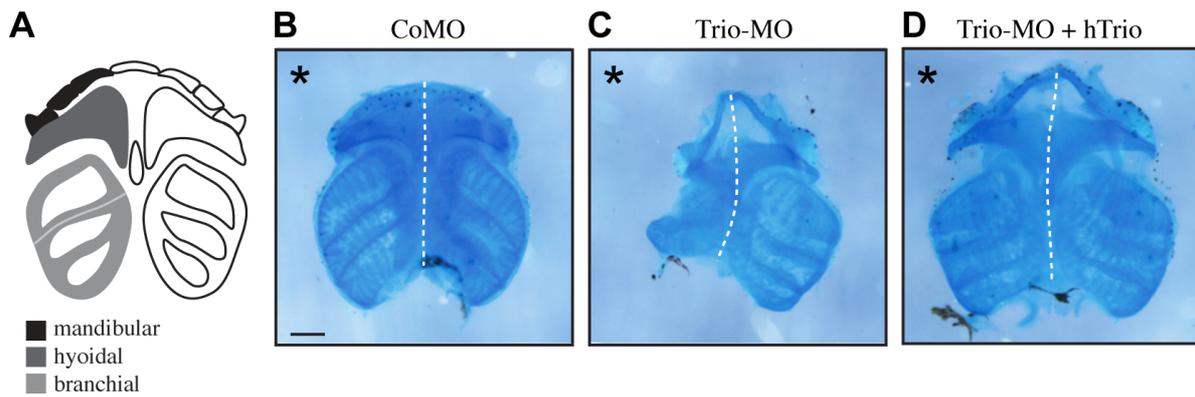


Abbildung 5.21: Migrationdefekte der cNLZ durch Verlust von Trio führen zu Missbildungen der cranialen Knorpelstrukturen.

Dorsale Ansicht auf explantierte Knorpelstrukturen nach Alzianblau-Färbung. Anterior oben, (*) injizierte Seite. Weiße Linie verdeutlicht bilaterale Mittelachse. (A) Schematische Darstellung der Knorpelstrukturen von *X. laevis*-Kaulquappen in Stadium 45 mit entsprechender Beteiligung des mandibularen, hyoidalen und der branchialen Kiemenbögen. (B) Injektion des Kontroll-MO (CoMO) hat keinen Einfluss auf craniale Knorpelstrukturen, welche bilateral symmetrisch ausgebildet werden. (C) Verlust von Trio mittels Trio-MO führt zu starken Missbildungen der Knorpelderivate mit stark reduzierten posterioren Strukturen und der Verlust der bilateralen Symmetrie. (D) Co-Injektion von Trio-MO und hTrio rekonstituiert vollständig ausgebildete Knorpelstrukturen mit bilateraler Symmetrie. Maßstab, 250 µm.

Die Knorpelstrukturen von mit 8 ng des Kontroll-MO injizierten Embryonen zeigen, dass die Entwicklung der cNLZ nicht beeinflusst wird. Die Knorpelderivate liegen vollständig und bilateral symmetrisch vor (s. Abbildung 5.21 B). Im Gegensatz dazu führt der Verlust von Trio zu starken Missbildungen der cranialen Knorpelstrukturen. Neben dem Verlust der bilateralen Symmetrie sind sowohl die ceratohyalen als auch die ceratobranchialen Knorpelstrukturen stark reduziert (s. Abbildung 5.21 C). Die Co-Injektion von 8 ng Trio-MO und 10 pg hTrio kann die Knorpeldefekte wieder vollständig rekonstituieren. Die Knorpelderivate können den einzelnen cNLZ-Strömen zugeordnet werden und es liegt eine bilaterale Symmetrie vor (s. Abbildung 5.21 A, D). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten, welche bereits durch Anne Merks für den Verlust von Trio gezeigt wurden (Merks, Masterarbeit, 2012).

5.12 Verlust von Trio führt zur erhöhten Invasivität der cNLZ *in vitro*

GEF-Trio bindet Xcad-11 an der intrazellulären Intermediärdomäne (Kashef et al., 2009). Dabei ist Xcad-11 für die Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes innerhalb der Kontaktinhibition notwendig (diese Arbeit), während Trio die Aktivierung von RhoA am Zell-Zell-Kontakt vermitteln kann (Bellanger et al., 1998b). Damit könnte Xcad-11 für die Rekrutierung von Trio an den Zell-Zell-Kontakt verantwortlich sein und somit die Aktivierung von RhoA innerhalb der Kontaktinhibition induzieren, welche für die Repolarisierung der Zelle notwendig ist (Carmona-Fontaine et al., 2008). Auf Grund dieser Hypothese soll der Einfluss von Trio auf die Kontaktinhibition untersucht werden.

Für die Kontaktinhibition ist die Bildung von Zellausläufern notwendig (Carmona-Fontaine et al., 2008). Jedoch zeigen Zellmorphologiestudien, dass die Injektion von 8 ng Trio-MO zum Verlust von Lamellipodien und Filopodien führt und die cNLZ einen blebbenden Phänotyp aufweisen (Merks, Masterarbeit, 2012; Rottmann, Bachelorarbeit, 2013). Damit die Zellen migrationsfähig sind, wird für die Konfrontations- und Kollisionsanalysen die Depletion von Trio mit 2 ng Trio-MO durchgeführt. ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α zeigen, dass die Embryonen trotz der niedrigeren Dosis deutliche Migrationsdefekte aufweisen (61,0% +/- 3,1; n=63; N=3; p< 0,001 verglichen zum Kontroll-MO und nicht signifikant verschieden verglichen zu 8 ng Trio-MO; s. Abbildung 5.22).

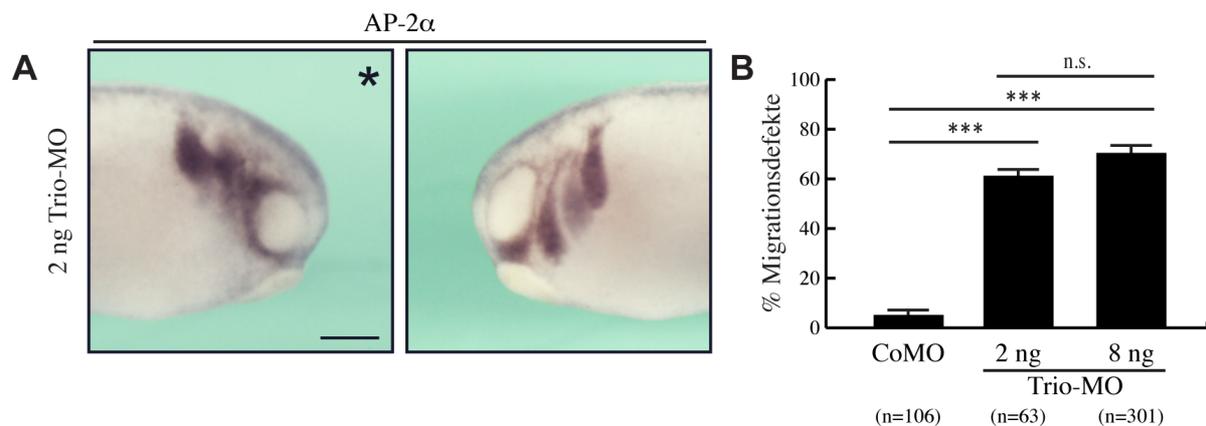


Abbildung 5.22: Verlust von GEF-Trio durch 2 ng Trio-MO inhibiert die cNLZ-Migration *in vivo*.

(A) Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. Verlust von GEF-Trio mittels 2 ng Trio-MO führt trotz geringerer Dosis zu deutlichen Migrationsdefekten. (B) Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test mit (***) p< 0,001 und n.s.: nicht signifikant. Maßstab, 250 μ m.

Die Konfrontationsanalyse wird auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche durchgeführt. Die Gegenüberstellung grün fluoreszenzmarkierter cNLZ-Explantaten durch 500 pg GAP-43-mGFP erfolgt mit cNLZ aus Embryonen, welche im Acht-Zellstadium mit 500 pg GAP43-mcherry und 8 ng eines Kontroll-MO (CoMO) bzw. 2 ng Trio-MO co-injiziert werden. Die Konfrontation von Wildtyp-cNLZ mit CoMO injizierten cNLZ führt zu einer geringen Überlappung der Explantate mit OI= 9,3% (+/- 1,3; n=11; N= 3; s. Abbildung 5.23 A, C; s. Film Z13). Diese entspricht in etwa der Überlappung von Wildtyp-Explantaten, wie sie in vorherigen Versuchen gezeigt wurde (s. Abbildung 5.13 A, E und 5.16 A, G). Im Gegensatz dazu kommt es in der Konfrontation von Wildtyp-cNLZ mit Trio-depletierten cNLZ zu einer signifikant erhöhten Invasivität von 20,6% (+/- 3,4; n=10; N=3; p< 0,001 verglichen zu CoMO; s. Abbildung 5.23 B, C; s. Film Z14).

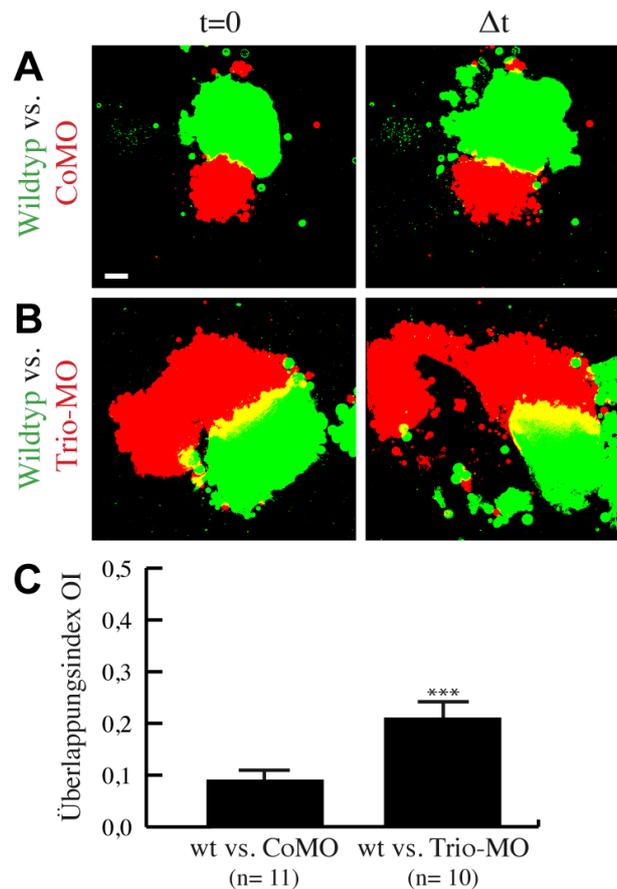


Abbildung 5.23: Verlust von Trio führt zu einer erhöhten Invasivität *in vitro*

Konfrontationsanalyse von fluoreszenzmarkierten cNLZ-Explantaten. Linke Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt $t=0$. Rechte Spalte: Konfrontation zum Zeitpunkt der höchsten Überlappung Δt . (A) Konfrontationen von Wildtyp-cNLZ mit cNLZ, welche mit einem Kontroll-MO (CoMO) injiziert wurden, zeigen einen kleinen Überlappungsbereich und damit Kontaktinhibition zu den Wildtyp-cNLZ. (B) cNLZ, in welchen Trio mittels Trio-MO depletiert ist, weisen eine größeren gelben Überlappungsbereich und somit eine erhöhte Invasivität auf. (C) Gemittelter Überlappungsindex OI mit n = Anzahl der Konfrontationen. (***) Signifikanz mit $p < 0,005$ nach Studentischem T-Test. Maßstab, 50 μm .

5.13 GEF-Trio ist notwendig für die repulsive Antwort innerhalb der Kontaktinhibition *in vitro*

Um den Einfluss von Trio in der ursprünglichen Definition der Kontaktinhibition (Aberchromie, 1970) zu ermitteln, wird das Migrationsverhalten einzelner cNLZ nach einer homotypischen Kollision analysiert. Neben der Fluoreszenz-Markierung durch 500 pg GAP-43-mcherry mRNA werden die cNLZ im Acht-Zellstadium mit 8 ng eines nicht spezifisch bindenden CoMO bzw. 2 ng des Trio-MO injiziert. Die Neuralleiste wird in Stadium 16 explantiert und die vereinzelt cNLZ nach der Dissoziation auf eine mit Fibronektin beschichtete Oberfläche überführt.

Die Injektion des Kontroll-MO (CoMO) führt vorwiegend zu einer repulsiven Zellreaktion, wobei die cNLZ ihre Migrationsrichtung verglichen zum initialen Geschwindigkeitsvektor (rot, 6 $\mu\text{m}/\text{min}$) nach dem Kontakt verändern (s. Abbildung 5.24 A). Dabei verhalten sich die Zellen ähnlich wie Wildtyp-cNLZ, welche ebenfalls nach einer Kollision ihre Migrationsrichtung ändern, wie in vorherigen

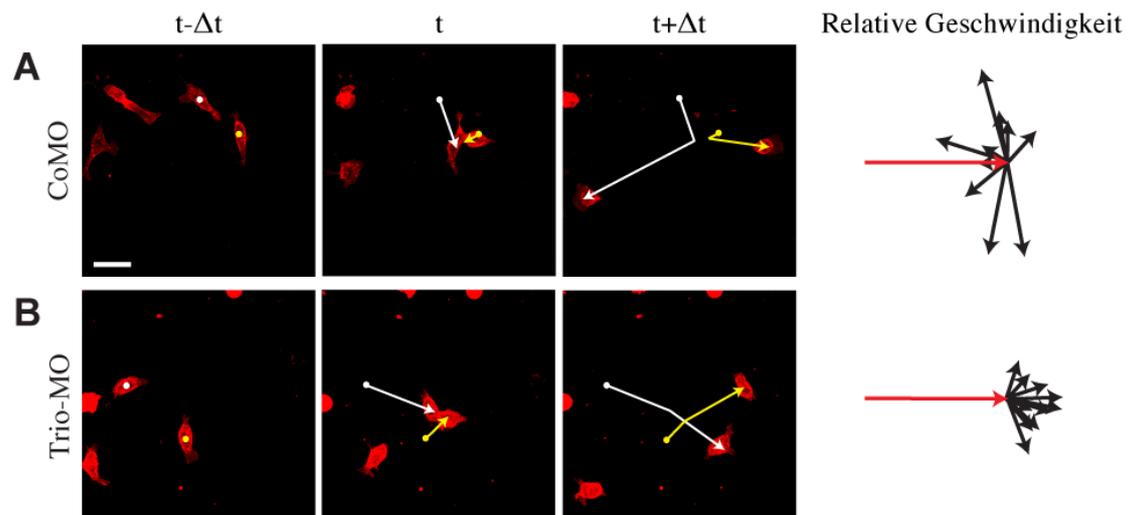


Abbildung 5.24: Trio ist notwendig für die repulsive Antwort in der Kontaktinhibition *in vitro*.

Kollisionsanalyse. Links: Kollision von zwei vereinzelt cNLZ zum Zeitpunkt vor ($t-\Delta t$), während (t) und nach ($t+\Delta t$) der Kollision. Gelbe und weiße Vektoren geben Ortveränderung der Zellen an. Rechts: relative Geschwindigkeit und Veränderung der Migrationsrichtung nach der Kollision ($n=10$; initialer Geschwindigkeitsvektor in rot). Während Kollisionen von (A) cNLZ, welche mit CoMO injiziert wurden, in einer repulsiven Zellantwort resultieren, gleiten (B) Trio-depletierte cNLZ aneinander vorbei und es kommt zu keiner deutlichen Richtungsänderung nach dem Kontakt. Maßstab, 50 μm .

Versuchen bereits gezeigt (s. Abbildung 5.14 und Abbildung 5.17). Im Gegensatz dazu führt die Depletion von Trio durch die Injektion von 2 ng Trio-MO zum Verlust der Kontaktinhibition. Nach der Kollision kommt es zu einer reduzierten bzw. keiner repulsiven Antwort der cNLZ, wobei die Migrationsrichtung überwiegend beibehalten wird (s. Abbildung 5.24 B). Dies lässt darauf schließen, dass Trio innerhalb der Signalkaskade der Kontaktinhibition notwendig ist.

5.14 GEF2 ist für die directionale Migration der cNLZ notwendig

GEF-Trio besitzt zwei Dbl-Homologie (DH)-Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen, welche als GEF1 und GEF2 katalytisch aktiv sind (Stam und Collard, 1999; Whitehead et al., 1997). Während die N-terminale GEF1-Domäne für die Aktivierung von Rac1 und RhoG verantwortlich ist, fördert die C-terminale GEF2-Domäne die Aktivierung von RhoA und darüber die Ausbildung von Stressfasern (Bellanger et al., 1998a; Bellanger et al., 1998b; Ridley et al., 2003; van Rijssel et al., 2012). Dabei sorgt die DH-Domäne für den Austausch des Nukleotides, während die PH-Domäne für die subzelluläre Lokalisation von Trio notwendig ist (Bellanger et al., 1998b; Bellanger et al., 2000). In Fibroblasten wurde bereits gezeigt, dass die Co-Expression beider GEF-Domänen simultan sowohl RhoA als auch Rac1 aktivieren kann (Bellanger et al., 1998b).

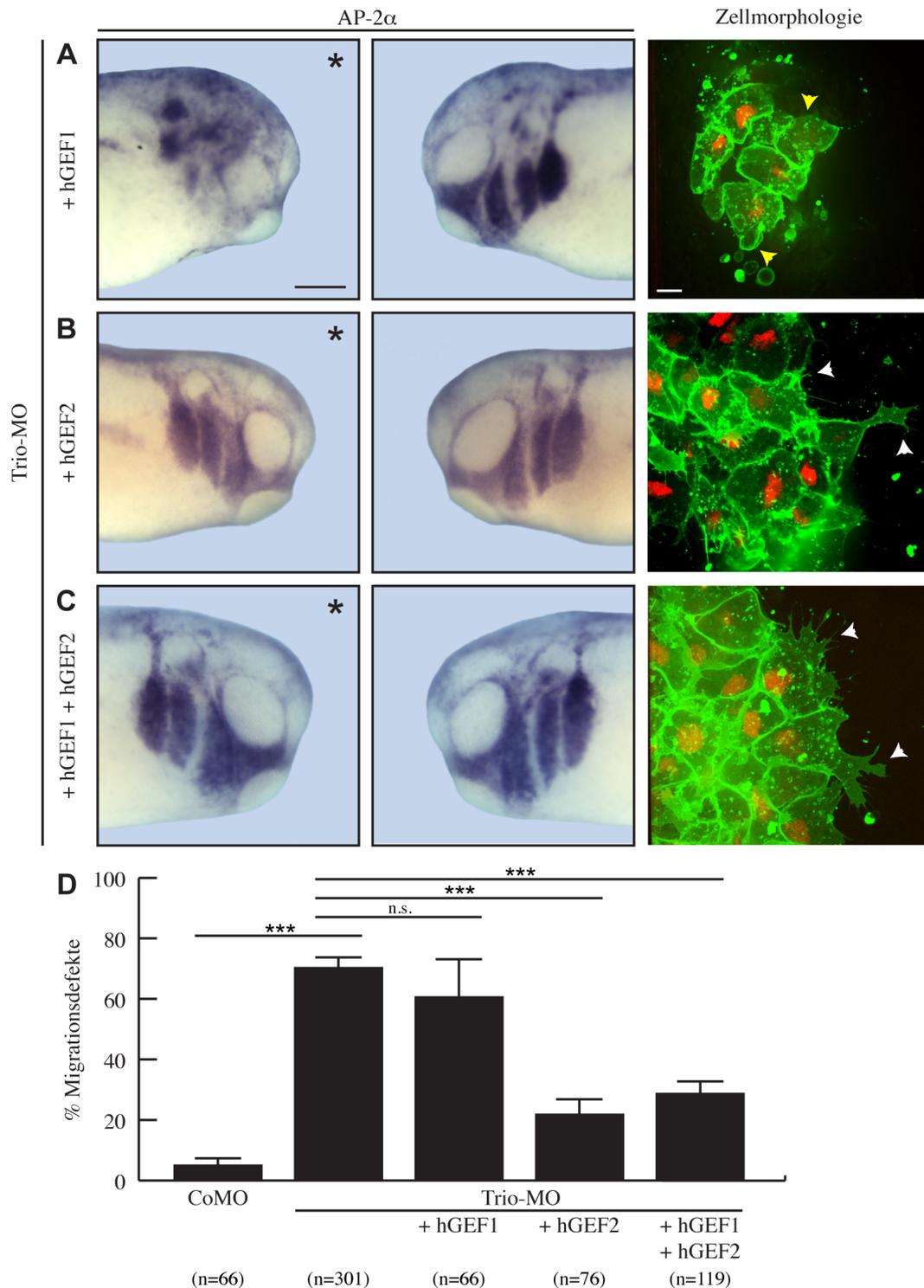


Abbildung 5.25: GEF2 ist für die directionale Migration der cNLZ notwendig.

Erste und zweite Spalte: Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. Dritte Spalte: *in vitro*-Zellmorphologiestudie explantierter cNLZ auf Fibronektin. GAP-43-mGFP als Membranmarker. Histon-2B-mcherry als Marker für den Zellkern. (A) Die Co-Injektion von Trio-MO und GEF1 führt zu Migrationsdefekten *in vivo*, wobei die cNLZ *in vitro* eine blebbende Zellmorphologie aufweisen. Jedoch kann durch die Co-Injektion von (B) GEF2 bzw. (C) GEF1+GEF2 *in vivo* die vollständige cNLZ-Migration in die Kiemenbögen und *in vitro* die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien wieder hergestellt werden. (D)

Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test mit (***) $p < 0,003$ und n.s.: nicht signifikant. Maßstab, 250 μm .

Um *in vivo* zu untersuchen, welche der GEF-Domänen für die gerichtete Migration von cNLZ notwendig ist, werden Embryonen im Acht-Zellstadium mit 8 ng Trio-MO und 10 pg DNA von humanem GEF1 bzw. GEF2 oder je 5 pg GEF1 und GEF2 co-injiziert. Die Embryonen werden bis Stadium 26 kultiviert und eine ISH gegen den cNLZ-Marker AP-2 α durchgeführt. Die ISH wurde von Isabelle Rottmann unter meiner Aufsicht durchgeführt (Rottmann, Bachelorarbeit, 2013).

Parallel dazu wird die Zellmorphologie der cNLZ *in vitro* analysiert. Die fluoreszente Markierung der Membran und des Zellkerns erfolgt über die Co-Injektion von 500 pg GAP-43-GFP und 500 pg Histon 2B (H2B)-mcherry mit den entsprechenden Konstrukten im Acht-Zellstadium. Im Stadium 16 werden die cNLZ explantiert, auf Fibronectin ausgebracht und können unter dem Fluoreszenz-Mikroskop auf ihre Zellmorphologie untersucht werden.

Die Co-Injektion von Trio-MO und GEF1 führt zu deutlichen Migrationsdefekten *in vivo*, wobei in 60,4% der Embryonen die cNLZ nicht in der Lage sind gerichtet in die Kiemenbögen einzuwandern (+/- 12,6; $n=66$; $N=3$; p = nicht signifikant verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.25 A, D). *In vitro* bilden die cNLZ keine Zellausläufer, sondern weisen einen blebbenden Phänotyp auf (s. Abbildung 5.25 A; gelbe Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu sinkt die Anzahl der Migrationsdefekte durch die Co-Injektion von Trio-MO und GEF2 auf 21,7% (+/- 4,8; $n=76$; $N=3$; $p < 0,003$ verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.25 B, D), während 78,3% der Embryonen eine vollständige cNLZ-Migration in die Kiemenbögen aufweist. Zellmorphologiestudien zeigen, dass die cNLZ *in vitro* in der Lage sind, sowohl Lamellipodien als auch Filopodien auszubilden (s. Abbildung 5.25 B; weiße Pfeilspitzen). Ähnliche Ergebnisse liegen bei der simultanen Expression von GEF1 und GEF2 vor. Während in 30,5% der Embryonen die Migration unvollständig ist (+/- 4,3; $n=119$; $N=4$; $p < 0,001$ verglichen zu Trio-MO), sind in 59,5% der Embryonen die cNLZ in der Lage in die Kiemenbögen einzuwandern (s. Abbildung 5.25 C, D). Die Untersuchung der Zellmorphologie der cNLZ *in vitro* zeigt, dass die Zellen deutliche Zellausläufer ausbilden können und die Morphologie der Wildtyp-cNLZ wieder herstellt ist (s. Abbildung 5.25 C; weiße Pfeilspitzen). Dies deutet darauf hin, dass die GEF2-Domäne für die Migration der cNLZ notwendig ist.

5.15 Die kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 agieren unterhalb von Trio in der cNLZ-Migration

Für die Veränderung der Migrationsrichtung, welche durch die Kontaktinhibition ausgelöst wird, braucht es die Repolarisierung der cNLZ. Dabei kommt es zur Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA am Zell-Zell-Kontakt (Carmona-Fontaine et al., 2008). Während RhoA über ROCK zur Myosin II-bedingten Kontraktion in den Stressfasern am hinteren Ende der Zelle führt, erfolgt die Bildung und

Stabilisierung von Zellausläufern an der Migrationsfront durch aktives Rac1, wodurch die Zelle eine definierte Migrationsrichtung erhält (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010; Shoval und Kalcheim, 2012). Da die Aktivität von RhoA und Rac1 durch GEF-Trio moduliert werden kann (Bellanger et al., 1998b), stellt sich die Frage, welchen Einfluss Trio in der cNLZ-Migration auf die Aktivierung der kleinen Rho GTPasen hat.

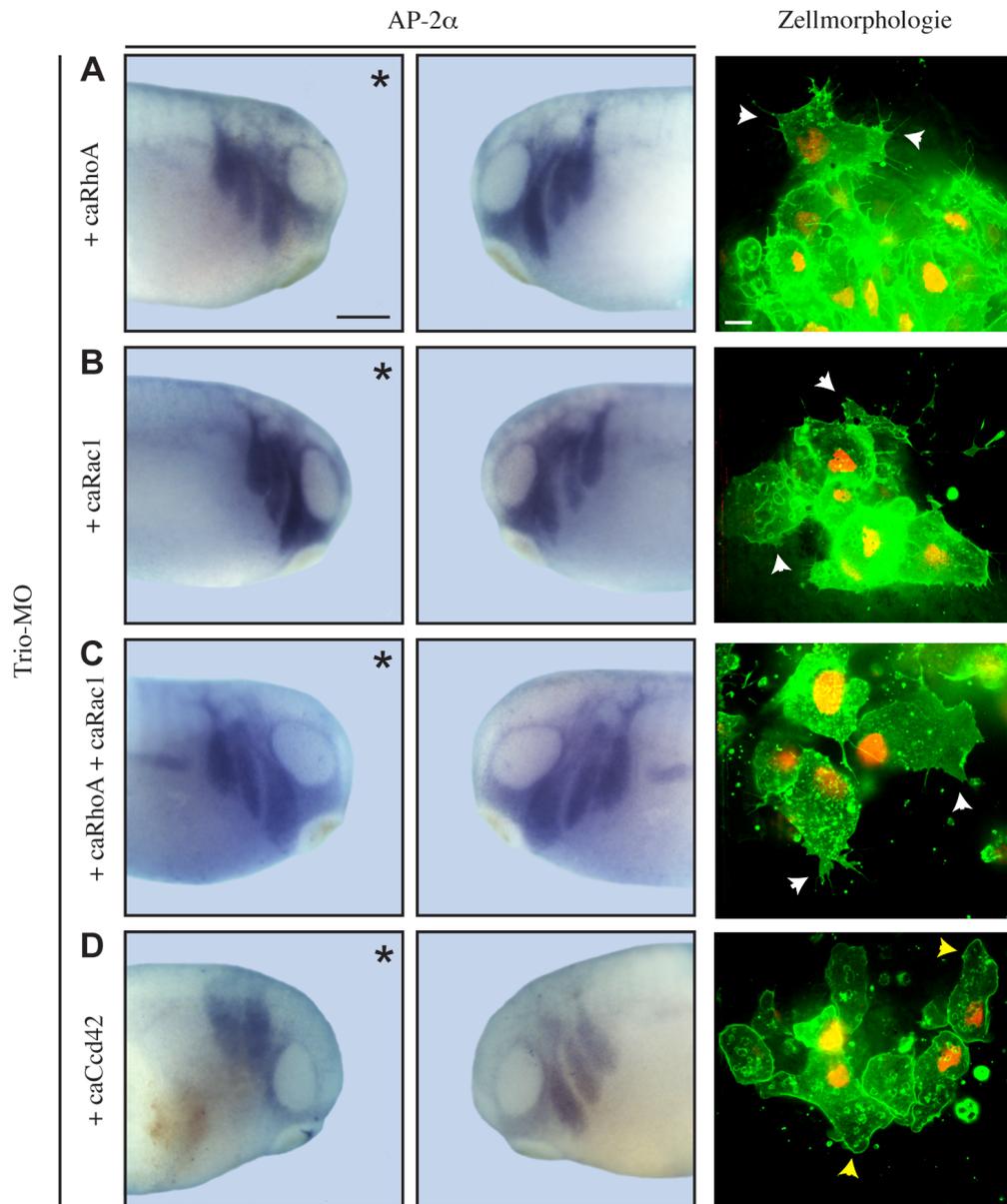


Abbildung 5.26: RhoA und Rac1 agieren unterhalb von Trio in der cNLZ-Migration.

Erste und zweite Spalte: Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. Dritte Spalte: *in vitro*-Zellmorphologiestudie explantierter cNLZ auf Fibronektin. GAP-43-mGFP als Membranmarker. Histon-2B-mcherry als Marker für den Zellkern. Die Co-Injektion von Trio-MO und (A) caRhoA, (B) caRac1 und (C) caRhoA+caRac1 führt *in vivo* zur vollständigen cNLZ-Migration in die Kiemenbögen und *in vitro* zur Ausbildung von Zellausläufern. (D) Embryonen, welche mit caCdc42 co-injiziert werden, sind nicht in der Lage die Migrationsdefekte durch Trio-MO zu reduzieren, wobei die cNLZ *in vitro* eine blebbende Zellmorphologie aufweisen. Maßstab, 250 μ m.

Dazu werden *X. laevis* Embryonen im Acht-Zellstadium mit 8 ng Trio-MO und 10 pg (bzw. 5 pg + 5 pg) DNA von konstitutiv aktiven Konstrukten der kleinen Rho GTPasen co-injiziert. Die konstitutive Aktivität der GTPasen wird durch eine Punktmutation hervorgerufen (caRhoA: V14X, caRac1: V12X, caCdc42: V12X), welche die intrinsische GTPase-Funktion blockiert, wodurch die GTPasen ausschließlich in ihrer GTP-gebundenen Form vorliegen und mit den entsprechenden Effektoren interagieren (Barbacid, 1987). Parallel zu einer ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α wird die Auswirkung der konstitutiv aktiven Konstrukte auf die Depletion von Trio *in vitro* mittels Zellmorphologiestudien untersucht.

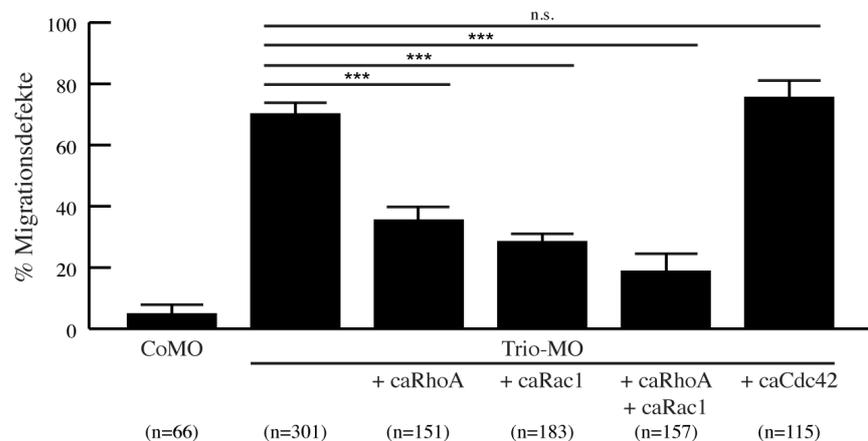


Abbildung 5.27: RhoA und Rac1 agieren unterhalb von Trio in der cNLZ-Migration.

Statistische Analyse der ISH gegen AP-2 α . Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Nach Studentischem T-Test mit (***) $p < 0,001$ und n.s.: nicht signifikant.

Sowohl die Co-Injektion von Trio-MO mit caRhoA bzw. caRac1, als auch die Kombination von beiden Konstrukten, führt zu einer vollständigen Migration der cNLZ *in vivo*. Dabei sinken die Migrationsdefekte, welche durch den Verlust von Trio hervorgerufen werden, signifikant. In Embryonen, welche mit Trio-MO und caRhoA co-injiziert werden, weisen nur 35,5% der untersuchten Individuen Migrationsdefekte auf (+/- 4,6; n=151; N=5; $p < 0,001$ verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.26 A und Abbildung 5.27). Die Zellmorphologie zeigt die Ausbildung von Zellausläufern *in vitro* (s. Abbildung 5.26 A; weiße Pfeilspitzen). Die Co-Injektion von Trio-MO und caRac1 führt in 71,5% der Embryonen zu einer vollständigen cNLZ-Migration in den Kiemenbögen, während nur 28,5% der Embryonen Migrationsdefekte der cNLZ aufweisen (+/- 2,6; n=183; N=3; $p < 0,001$ verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.26 B und Abbildung 5.27). Interessanterweise gleicht die Kombination von caRhoA und caRac1 den Verlust von Trio am stärksten aus. In nur 18,8% der Embryonen sind die cNLZ nicht in der Lage in die Kiemenbögen einzuwandern (+/- 5,7; n=157; N=4; $p < 0,001$ verglichen zu Trio-MO), während 81,2% der Embryonen eine vollständige cNLZ-Migration aufweisen (s. Abbildung 5.26 C und Abbildung 5.27). Die Zellmorphologie dieser cNLZ zeigt die Bildung von Zellausläufern (s.

Abbildung 5.26 C; weiße Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu senkt die Co-Injektion von Trio-MO und caCdc42 die Migrationsdefekte nicht. In 75,6% der Embryonen sind die cNLZ nicht in der Lage in die Kiemenbögen einzuwandern (+/- 5,4; n=115; N=3; p= 0,51 und nicht signifikant verschieden verglichen mit Trio-MO; s. Abbildung 5.26 D und Abbildung 5.27). Ebenso weisen die cNLZ *in vitro* eine blebbende Zellmorphologie auf (s. Abbildung 5.26 D; gelbe Pfeilspitzen). Dies lässt darauf schließen, dass zwar die kleinen Rho GTPasen Rac1 und RhoA, nicht jedoch Cdc42 unterhalb von Trio agieren.

5.16 Dishevelled rekonstituiert cNLZ-Migration trotz Verlust von Trio *in vivo*

Die Lokalisation von Dsh an der Membran des Zell-Zell-Kontaktes ist für die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges während der Kontaktinhibition notwendig (Carmona-Fontaine et al., 2008). Dies kann zum einen durch die Bindung der nicht-kanonischen Liganden Wnt11 und Wnt11r an den Rezeptor Fz7 erfolgen, jedoch braucht es einen zusätzlichen Mechanismus, welcher die Kontaktvermittlung mit der Membranlokalisation verbindet. Interessanterweise konnte in Cos-7-Zellen gezeigt werden, dass GEF-Trio in der Lage ist Dsh zu binden (unpublizierte Daten, Jubin Kashef). Somit könnte Xcad-11 den Zell-Zell-Kontakt über Trio vermitteln und der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg an der Stelle des Kontaktes aktiviert werden.

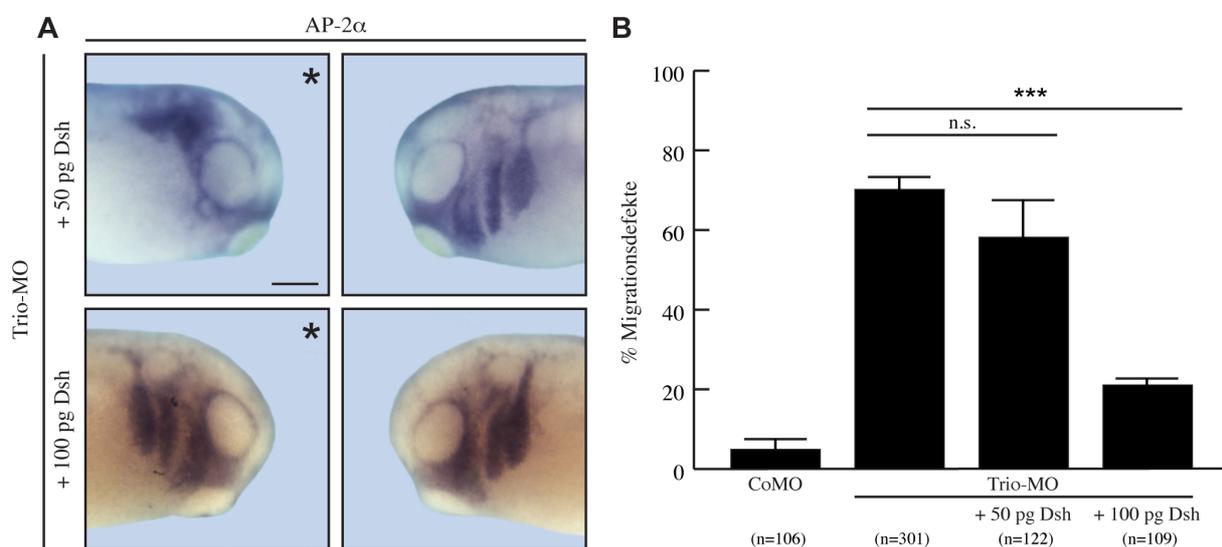


Abbildung 5.28: Dishevelled rekonstituiert cNLZ-Migration trotz Verlust von Trio *in vivo*.

Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. (A) Co-Injektion von 50 pg Dsh ist nicht in der Lage die cNLZ-Migration nach dem Verlust von Trio zu rekonstituieren. Erhöht man die Dosis auf 100 pg Dsh mRNA, migrieren die cNLZ trotz der Depletion von Trio in die Kiemenbögen ein. (B) Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test mit (***) p < 0,001 und n.s.: nicht signifikant. Maßstab, 250 μ m.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von Trio und Dsh einen Einfluss auf die cNLZ-Migration hat, wird zunächst analysiert, ob und welche Menge an Dsh RNA in der Lage ist die Migrationsdefekte durch Trio-MO zu rekonstituieren. Dazu werden *X. laevis* Embryonen im Acht-Zellstadium zusätzlich zu 4 ng Fluorescein-Dextran mit 8 ng Trio-MO und 50 pg bzw. 100 pg Dsh mRNA co-injiziert. ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α im Stadium 26 verdeutlichen, dass 50 pg Dsh RNA die Migrationsdefekte, welche durch den Verlust von Trio entstehen, nicht stark beeinflussen. In 58,2% der Embryonen sind die cNLZ nicht in der Lage in die Kiemenbögen einzuwandern (+/- 9,6; n=122; N=3; p=0,42 und nicht signifikant verschieden verglichen mit Trio-MO; s. Abbildung 5.28). Im Gegensatz dazu ist die cNLZ-Migration bei Co-Injektion von 100 pg Dsh mRNA in 78,9% der Embryonen vollständig und die Migrationsdefekte sinken auf 21,1% (+/- 1,7; n=109; N=4; p< 0,001 verglichen mit Trio-MO; s. Abbildung 5.28).

5.17 PDZ- und DEP-Domäne von Dishevelled können den Verlust von Trio rekonstituieren

Da die Co-Injektion von 100 pg Dsh mRNA die cNLZ-Migration nach dem Verlust von Trio rekonstituieren kann, stellt sich die Frage, welche Domänen von Dsh innerhalb der Signalkaskade benötigt werden. Dsh besteht aus drei Domänen, wobei die PDZ- und DEP-Domäne für die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg verantwortlich sind, während die DIX- und PDZ-Domäne den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren (Wallingford und Habas, 2005).

Um zu untersuchen, welche Domäne den Verlust von Trio rekonstituieren kann, werden Embryonen im Acht-Zellstadium mit 8 ng Trio-MO und 100 pg der verschiedenen Dsh-Deletionskonstrukte mit 500 pg GAP-43-GFP und 500 pg Histon2B-mcherry co-injiziert. *In vivo* wird die cNLZ-Migration mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α untersucht, während parallel dazu die Zellmorphologie *in vitro* analysiert wird.

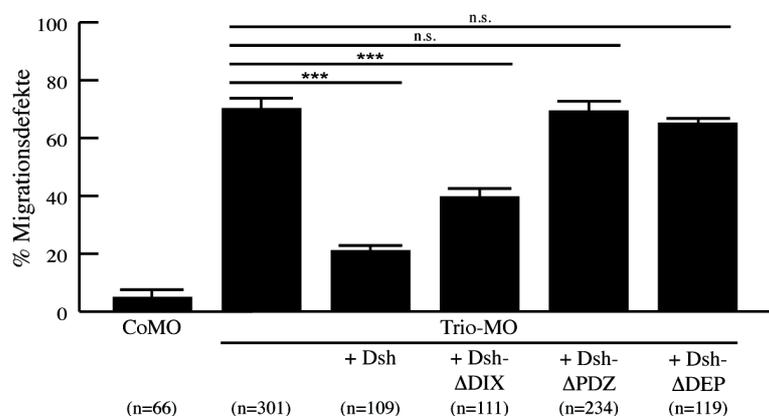


Abbildung 5.29: PDZ- und DEP-Domäne von Dsh sind notwendig für die cNLZ-Migration.

Statistische Analyse der ISH gegen AP-2 α . Prozent der Migrationsdefekte mit n = Anzahl der Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Statistische Analyse nach Studentischem T-Test mit (***) p< 0,001 und n.s: nicht signifikant.

Wie bereits gezeigt, führt die Co-Injektion von Trio-MO und 100 pg Dsh RNA zur Wiederherstellung der cNLZ-Migration, während nur 21,1% der Embryonen Migrationsdefekte aufweisen (+/- 1,7; n=109; N=4; $p < 0,001$ verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.28, Abbildung 5.29 und Abbildung 30 A). Die cNLZ sind in der Lage Zellausläufer zu bilden (s. Abbildung 5.30 A; weiße Pfeilspitzen).

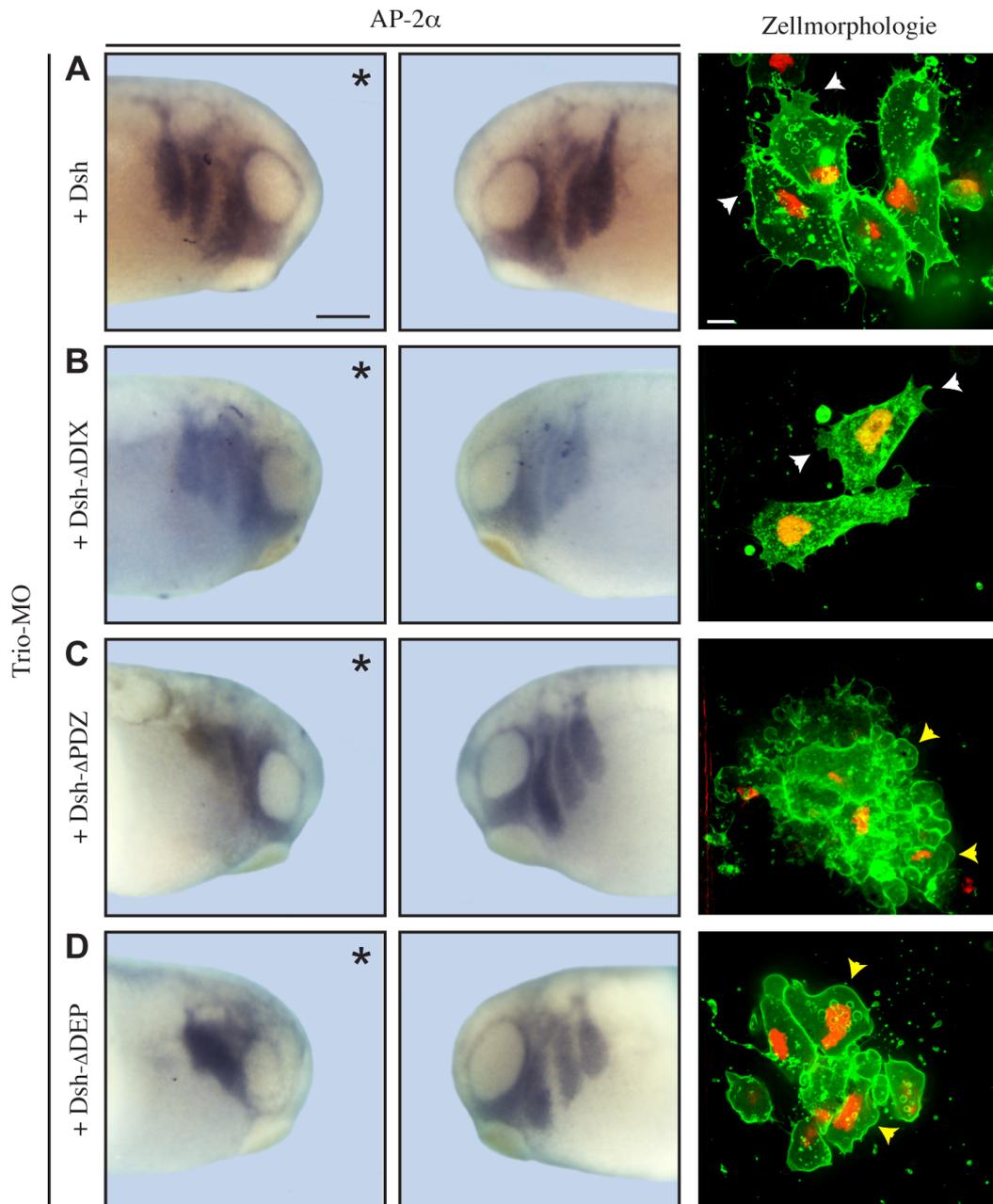


Abbildung 5.30: PDZ- und DEP-Domäne von Dsh sind notwendig für die cNLZ-Migration.

Erste und zweite Spalte: Laterale Ansicht auf *X. laevis* Embryonen im Stadium 26. cNLZ sind mittels ISH gegen den cNLZ-spezifischen Marker AP-2 α markiert. Linke Spalte: Injizierte Seite (*), rechte Spalte: nicht injizierte Seite. Dritte Spalte: *in vitro*-Zellmorphologiestudie explantierter cNLZ auf Fibronektin. GAP-43-mGFP als Membranmarker. Histon-2B-mcherry als Marker für den Zellkern. Die Co-Injektion von Trio-MO und (A) Dsh bzw. (B) Dsh- Δ DIX führt zur vollständigen cNLZ-Migration, während die cNLZ *in vitro* Zellausläufer ausbilden. Embryonen, welche mit (C) Dsh- Δ PDZ bzw. (D) Dsh- Δ DEP co-injiziert werden, weisen *in vivo* Migrationsdefekte und *in vitro* eine blebbende Zellmorphologie auf. Maßstab, 250 μ m.

Interessanterweise ist das Deletionskonstrukt Dsh- Δ DIX in der Lage, die durch Trio-MO hervorgerufenen Migrationsdefekte auf 39,7% zu reduzieren (\pm 2,6; n= 111; N=3; p< 0,001 verglichen zu Trio-MO; s. Abbildung 5.29 und Abbildung 5.30 B). Die Zellmorphologie zeigt die Ausbildung von Zellausläufern in explantierten cNLZ (s. Abbildung 5.30 B; weiße Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu senken weder die Co-Injektion von Dsh- Δ PDZ noch von Dsh- Δ DEP die Migrationsdefekte. Während bei Dsh- Δ PDZ in 65,1% der Embryonen die cNLZ nicht in der Lage sind in die Kiemenbögen einzuwandern (\pm 0,8; n=119; N=3; p= 0,20 und nicht signifikant verschieden verglichen mit Trio-MO; s. Abbildung 5.29 und Abbildung 5.30 C), sind es bei Dsh- Δ DEP 69,4% Embryonen mit Migrationsdefekten (\pm 3,0; n=234; N=3; p= 0,88 und nicht signifikant verschieden verglichen mit Trio-MO; s. Abbildung 5.29 und Abbildung 5.30 D). In beiden Fällen führt die Co-Injektion der Deletionsmutanten zu einer blebbenden Zellmorphologie (s. Abbildung 5.30 C, D; gelbe Pfeilspitzen).

6 Diskussion

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Xcad-11 über seine Adhäsionsfunktion den Zell-Zell-Kontakt während der Kontaktinhibition in der cNLZ-Migration vermittelt. Dabei ist die adhäsive Funktion von Xcad-11 für die gerichtete Migration der cNLZ *in vivo* notwendig. Die Xcad-11 vermittelte Adhäsion wird dabei durch die Metalloprotease Adam13 moduliert, welche somit einen Einfluss auf die Kontaktinhibition hat. Interessanterweise spielt intrazellulär der Guaninnukleotid-Austauschfaktor GEF-Trio eine Rolle in der Richtungsänderung der cNLZ nach einer Kollision. Trio agiert dabei oberhalb der kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 innerhalb der cNLZ-Migration und interagiert mit dem Mediatorprotein Dsh des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges.

6.1 Die Xcad-11 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion fördert die Kontaktinhibition

Der Mechanismus der Kontaktinhibition führt zur Repolarisation der Zelle, wobei an der Kontaktstelle über den nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg die kleine Rho GTPase RhoA aktiviert wird (Carmona-Fontaine et al., 2008). Der molekulare Mechanismus der Aktivierung von RhoA am Zell-Zell-Kontakt ist jedoch noch nicht geklärt. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten verdeutlichen die Notwendigkeit von Xcad-11 in der Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes während der Kontaktinhibition.

Xcad-11 wird während der Migration in cNLZ exprimiert (Hadeball et al., 1998; Vallin et al., 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass Xcad-11 für die Migration der cNLZ notwendig ist und mit GEF-Trio interagiert, welcher in der Lage ist die kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 zu modulieren (Kashef et al., 2009). Der Verlust von Xcad-11 durch ein komplementäres MO (Xcad-11-MO) führt zu einem *in vivo* zu massiven Migrationsdefekten der cNLZ, zum anderen verändern die Zellen *in vitro* und *in vivo* ihr Zellverhalten zu einem blebbenden Phänotyp (Kashef et al., 2009). Interessanterweise handelt es sich bei dem *Blebbing* der Zellen um nicht-apoptotische Vorgänge innerhalb der Zelle und wird durch den Verlust von F-Aktin in den runden Zellausstülpungen hervorgerufen (Kashef et al., 2009). Die Ausbildung von Zellausläufern ist jedoch essentiell für die Kontaktinhibition innerhalb der Migration der cNLZ (Carmona-Fontaine et al., 2008). Um die adhäsive Funktion von Xcad-11 zu verändern und gleichzeitig die Ausbildung von Zellausläufern zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit das dominant negative Konstrukt gegen die Adhäsionsfähigkeit von Xcad-11 (dn-Xcad-11) genutzt. Mittels Zell-Sortierungsanalysen in animalen Kappen wurde gezeigt, dass Punktmutationen in der EC1-Domäne, welche die homophile Bindung von klassischen Cadherinen vermittelt, zu einer veränderten Adhäsionsfunktion von Xcad-11 führen. Über quantitative Methoden wie Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder Duale Pipetten-Analysen könnte

zusätzlich ermittelt werden, in welchem Maß sich die Adhäsionseigenschaft der cNLZ durch das Einbringen von dn-Xcad-11 verändert (Baumgartner et al., 2000; Chu et al., 2004). Dabei wird gemessen, welche Kraft aufgebracht werden muss, um zwei Zellen voneinander zu trennen. So bedarf es in der Rasterkraftmikroskopie einer Kraft von 1,1 nN (bei 5 s Kontaktzeit), 2,9 nN (bei 30 s Kontaktzeit) und 7,1 nN (bei 120 s Kontaktzeit) um zwei einzelne Wildtyp-cNLZ voneinander zu lösen (mündliche Aussage, Carina Gonnermann, CFN, KIT, Karlsruhe). Hier wäre es von besonderem Interesse zu untersuchen, welche Kräfte durch die Adhäsion in cNLZ vermittelt werden, welche durch den Verlust von Xcad-11 mittels Xcad-11-MO oder die Überexpression von Xcad-11 bzw. dn-Xcad-11 eine Veränderung der Adhäsion aufweisen.

Sowohl die Überexpression von dn-Xcad-11, als auch Rekonstitutionsversuche mit dn-Xcad-11 im Xcad-11-MO-Hintergrund führen zu Migrationsdefekten *in vivo*. Diese werden zellautonom hervorgerufen, wie in dieser Arbeit mittels Transplantationsstudien verdeutlicht wurde. Die Migrationsdefekte könnten jedoch auch durch eine zeitliche Verzögerung der cNLZ-Migration ausgelöst werden. Transplantationsstudien in späteren Stadien zeigen, dass die Migrationsdefekte auch im Stadium 33 bestehen bleiben. Ebenso kommt es zu starken Missbildungen der cranialen Knorpelstrukturen. cNLZ sind zusammen mit Mesoderm-Derivaten an der Bildung von Knorpel- und Knochenstrukturen beteiligt (Osumi-Yamashita et al., 1994; Trainor und Tam, 1995; Gross und Hanken, 2005). Dabei differenziert sich der mandibularen cNLZ-Strom zum Meckel'schen Knorpel, dem Palatoquadratum und dem subokularen Knorpel, während aus dem hyoidalen Strom der ceratohyale Knorpel entsteht und die branchialen cNLZ-Ströme sich zum ceratobranchialen Knorpel ausbilden (Baltzinger et al., 2005). Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass es sich bei den Migrationsdefekten nicht um eine zeitliche Verzögerung der cNLZ-Migration handelt, sondern die Zellen ihren Differenzierungsort in den pharyngalen Kiementaschen nicht erreichen.

In der Kontaktinhibition während der Migration von cNLZ verhindern die Zellverbände die gegenseitige Invasion, während sie jedoch in der Lage sind, andere Zelltypen wie z.B. das Mesoderm oder das epitheliale Ektoderm zu durchwandern (Carmona-Fontaine et al., 2008). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Xcad-11 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion dabei eine wichtige Rolle spielt. Sowohl Konfrontations- als auch Kollisionsanalysen verdeutlichen, dass die Reduktion der adhäsiven Funktion von Xcad-11 durch dn-Xcad-11 sowohl in Überexpressions- als auch in Rekonstitutionsversuchen – und damit in Abwesenheit von endogenem Xcad-11 – zum Verlust der repulsiven Zellantwort auf den Kontakt und zu einer erhöhten Invasivität der cNLZ-Zellverbände führt. Die cNLZ sind nicht in der Lage den Zell-Zell-Kontakt zu vermitteln, was sich im Verlust der Kontaktinhibition ausdrückt. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass Wildtyp-cNLZ nach einer Kollision mit Zellen, welche dn-Xcad-11 überexprimieren bzw. Xcad-11 durch Xcad-11-MO nicht translatieren, dennoch in der Lage sind ihre Migrationsrichtung zu ändern (Becker, Diplomarbeit, 2011). Dies deutet darauf hin,

dass Xcad-11 für die Signalvermittlung des Kontaktes und die darauf folgende Richtungsänderung notwendig ist, jedoch noch weitere Moleküle an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt sind.

Innerhalb der Familie der Cadherine sind weitere Kandidaten für die Vermittlung der Kontaktinhibition bekannt. So spielt die Gruppe der Protocadherine weniger eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion, sondern besitzt vielmehr regulative Funktionen (Chen et al., 2007; Bononi et al., 2008; Medina et al., 2004; Kraft et al., 2012). Während der Wanderung der cNLZ werden PCNS und P APC exprimiert (Rangarajan et al., 2006; Schneider et al., 2014). Dabei führen der Verlust von PCNS bzw. die Überexpression von P APC zu Migrationsdefekten der cNLZ, wobei P APC den Verlust von PCNS rekonstituieren kann (Rangarajan et al., 2006; Schneider et al., 2014). Jedoch wurden die beiden Protocadherine bisher noch nicht in Bezug auf die Kontaktinhibition untersucht. Ebenso wurde der Einfluss von atypischen Cadherinen wie Flamingo, Fat oder Dachsous noch nicht erörtert. Diese Cadherine sind in der Lage den nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg über die Membranlokalisation von Dsh zu aktivieren (Halbleib und Nelson, 2006; Witzel et al., 2006).

Von den klassischen Cadherinen werden neben Xcad-11 auch XB-Cadherin, E-Cadherin und N-Cadherin während der Migration der cNLZ exprimiert. Dabei führt sowohl der Verlust von E-Cadherin als auch von N-Cadherin zu Migrationsdefekten, welche nicht durch einen Einfluss auf die Induktion der cNLZ hervorgerufen werden (mündliche Aussage, Chaolie Huang, KIT, Karlsruhe; Theveneau et al., 2010). Während der Einfluss von E-Cadherin auf die Kontaktinhibition noch nicht näher untersucht wurde, konnte für die Blockierung von N-Cadherin mittels eines spezifischen Antikörpers (NCD2) gezeigt werden, dass die cNLZ-Zellverbände eine erhöhte Invasivität zeigen (Theveneau et al., 2010). Rekonstitutionsversuche zeigen, dass N-Cadherin sowie Xcad-11 *in vivo* partiell die Funktion des jeweils anderen Cadherins übernehmen können (mündliche Aussage, Chaolie Huang, KIT, Karlsruhe). In Bezug auf eine mögliche synergistische bzw. redundante Funktion einzelner Domänen wären weitere Rekonstitutionsversuche mit Chimären-Konstrukten bzw. die Untersuchung einer möglichen Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation interessant. Erste vorläufige Ergebnisse zeigen, dass N-Cadherin und Xcad-11 bei der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in der Zellmembran am Zell-Zell-Kontakt miteinander interagieren (eigene Beobachtung). Die subzelluläre Lokalisation der beiden Cadherine unterscheidet sich jedoch. Während N-Cadherin ausschließlich in der Zellmembran am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist (Becker et al., 2012; Langhe et al., in Revision), lässt sich Xcad-11 zusätzlich in Fokalkontakten auf der Zell-Substrat-Ebene und an der Migrationsfront detektieren (Kashef et al., 2009; Becker et al., 2012; Langhe et al., in Revision). Somit könnte Xcad-11 neben seiner Funktion in der Zell-Substrat-Adhäsion für die initiale Erkennung des Zell-Zell-Kontaktes und die Vermittlung des Signales an unterhalb liegende Komponenten der Signalkaskade verantwortlich sein. Die Rolle von N-Cadherin innerhalb der Kontaktinhibition zwischen cNLZ müsste jedoch noch genauer untersucht werden.

Interessanterweise zeigen cNLZ gegenüber präplakodalem Ektoderm ebenfalls Kontaktinhibition, welche innerhalb der kollektiven Chemotaxis von Bedeutung ist (Theveneau et al., 2013). Da die Vorläuferzellen der ektodermalen Plakoden, welche an der Bildung des Seitenlinienorgans in *X. laevis* beteiligt sind, ebenfalls N-Cadherin exprimieren (Theveneau et al., 2013), könnte es sein, dass durch die unterschiedliche Expression der Cadherine zellinteraktionsspezifisch Kontaktinhibition vermittelt wird.

Frühere Untersuchungen zeigen, dass die Überexpression von vollständigem Xcad-11 bedingt durch eine verstärkte Zell-Zell-Adhäsion ebenfalls zu Migrationsdefekten führt (Borchers et al., 2001; McCusker et al., 2009). Dabei ist jedoch die Blockierung der cNLZ-Migration abhängig vom Ausdehnungsbereich der Manipulation. Beschränkt sich die Manipulation durch die Injektion der Konstrukte in die animal dorsale Blastomere des Stadiums 4 auf den Bereich der zukünftigen cNLZ, führt die Überexpression von Xcad-11 zu einer vollständigen cNLZ-Migration. Erfolgt die Überexpression von Xcad-11 jedoch im gesamten Embryo, hemmt dies die konvergente Extension während der Gastrulation (Hadeball et al., 1998). Demnach wird eine bestimmte Stärke der adhäsiven Funktion von Xcad-11 ebenfalls für die Migration des Mesoderms benötigt (Hadeball et al., 1998; Köhler et al., 2013). Das durch die Überexpression von Xcad-11 beeinflusste Mesoderm ist jedoch für die Induktion der cNLZ notwendig (Steventon und Mayor, 2012). Zusätzlich kann Xcad-11 über seine intrazelluläre β -Catenin-Bindestelle den kanonischen Wnt-Signalweg modulieren, wobei es zytoplasmatisches β -Catenin sequestriert und die Spezifikation der cNLZ beeinflussen kann (Köhler et al., 2013). Demnach könnten Migrationsdefekte der cNLZ durch die Überexpression von Xcad-11 im gesamten Embryon als Konsequenz einer defizitären Induktion oder Spezifikation hervorgerufen werden.

6.2 Die adhäsive Funktion von Xcad-11 wird durch Adam13 innerhalb der Kontaktinhibition moduliert

Die Konfrontations- und Kollisionsanalysen in dieser Arbeit zeigen, dass der Verlust von Adam13 den Mechanismus der Kontaktinhibition nicht blockiert. Die Ursache für die Migrationsdefekte durch das Adam13-MO liegt demnach nicht an dem Verlust der Kontaktinhibition. Im Gegensatz dazu erhöht die Überexpression der Metalloprotease jedoch die Invasivität der cNLZ-Explantate bzw. verhindert die repulsive Reaktion nach der Kollision vereinzelter cNLZ. Dies lässt vermuten, dass Adam13 über seine erhöhte proteolytische Aktivität die Kontaktvermittlung durch Xcad-11 während der cNLZ-Migration blockiert. Damit stellt Adam13 einen möglichen Regulator der Kontaktinhibition dar.

Für die Migration der cNLZ bedarf es einer zeitlich und räumlich modulierten Zell-Zell-Adhäsion, welche es den Zellen einerseits ermöglicht einen motilen Charakter anzunehmen und andererseits

den Zell-Zell-Kontakt innerhalb der Kontaktinhibition zu vermitteln. Zudem muss der Zell-Zell-Kontakt nach der Kollision zweier cNLZ wieder gelöst werden. Adam13, welches vor und während der cNLZ-Migration exprimiert wird (Alfandari et al., 2001), ist in der Lage, Xcad-11 zwischen der EC3- und EC4-Domäne zu spalten (McCusker et al., 2009).

Während der Verlust von Adam13 zu Migrationsdefekten der cNLZ *in vivo* führt (Alfandari et al., 2001), können diese Defekte durch die Überexpression des Spaltproduktes Xcad-11-EC1-3 rekonstituiert werden (mündliche Aussage, Dominique Alfandari, UMass, Amherst, MA, USA). Demnach scheint das Xcad-11-EC1-3-Fragment die Xcad-11 vermittelte Adhäsion zu senken, wobei es für die Migration der cNLZ eine bestimmte Menge an Spaltprodukt bedarf. Im Gegensatz dazu ist die Rekonstitution durch unspaltbares Xcad-11 bzw. Xcad11-QMV (Punktmutation im QAV-Motiv) nicht möglich (mündliche Aussage, Dominique Alfandari, UMass, Amherst, MA, USA).

Interessanterweise ist das Spaltprodukt von Xcad-11, welches durch Adam13 hervorgerufen wird, in der Lage FGFR1 und EGFR zu binden (mündliche Aussage, Dominique Alfandari, UMass, Amherst, MA, USA), wodurch weitere Signalwege beeinflusst werden könnten. Ausserdem scheint das Spaltprodukt nicht nur in der Blockierung der homophilen Bindung anderer Xcad-11-Moleküle eine Rolle zu spielen. Erste vorläufige Untersuchungen zeigen, dass die Überexpression von Xcad-11-EC1-3 zu einer Steigerung der Expression von pAkt (Regulator des Androgen-Rezeptors AR) führt (mündliche Aussage, Dominique Alfandari, UMass, Amherst, MA, USA). Eine Studie über invasiven Brustkrebs zeigt, dass 81,1% der Patientinnen eine erhöhte Expression des Regulators aufweisen und dieser damit ein potentieller Kandidat in der Brustkrebs-Prognose darstellt (Sultana et al., 2014).

Xcad-11 bzw. seine Homologe in Mensch, Maus und Ratte (OB-Cadherin, Cadherin-11) wurden ebenfalls mit einer pathologischen und migrationsfördernden Rolle in malignen Zellen in Zusammenhang gestellt (Pishvaian et al., 1999; Satcher et al., 2014; Lee et al., 2013). Dabei wurden eine verstärkte Expression bzw. aberante Isoformen des Cadherins in verschiedenen Krebsformen (in Prostata, Brust, Niere, Knochen, Rhabdomyosarcoma) und der Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren beobachtet (Pishvaian et al., 1999; Markus et al., 1999; Kashima et al., 1999; Bussemakers et al., 2000; Tomita et al., 2000; Chu et al., 2008; Tamura et al., 2008; Lee et al., 2010; Huang et al., 2010; Satcher et al., 2014). Zusätzlich induziert Cadherin-11 die Expression von inflammatorischen Faktoren in Fibroblasten, welche zu rheumatischer Arthritis führen (Lee et al., 2007; Chang et al., 2011). Das Verständnis über den Einfluss und die Regulation von Cadherin-11 in diesen Prozessen bildet damit eine wichtige Grundlage für mögliche therapeutische Ansätze (Assefina et al., 2013).

6.3 GEF-Trio vermittelt innerhalb der Kontaktinhibition die Migration der cNLZ

Die Repolarisation der Zelle und die damit verbundene Reorganisation des Zytoskeletts sind für die repulsive Zellreaktion nach einer Kollision innerhalb der Kontaktinhibition von Bedeutung (Mayor und Carmona-Fontaine, 2010). Dazu bedarf es der Aktivierung der kleinen Rho GTPase RhoA am Zell-Zell-Kontakt (Carmona-Fontaine et al., 2008). Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor GEF-Trio, welcher mit Xcad-11 interagiert und ab Beginn der cNLZ-Migration verstärkt in diesen Zellen exprimiert wird, ist in der Lage parallel sowohl RhoA als auch Rac1 zu aktivieren (Kashef et al., 2009; Merks, Masterarbeit, 2012; Bellanger et al., 1998b).

Der Verlust von Trio führt zu deutlichen Migrationsdefekten der cNLZ *in vivo*, welche zellautonom sind, nicht durch defizitäre Induktion der cNLZ hervorgerufen werden und durch die Zugabe des humanen Homologs von Trio aufgehoben werden können (Moore et al., 2013; Merks, Masterarbeit, 2012; Rottmann, Bachelorarbeit, 2013; diese Arbeit). Zellverfolgungsanalysen von transplantierten cNLZ könnten dabei Aufschluss über die veränderte Dynamik der cNLZ-Migration *in vivo* geben. *In vitro* zeigen die cNLZ nach dem Verlust von Trio – ähnlich wie durch den Verlust von Xcad-11 – ein blebbendes Zellverhalten auf, welche sich durch den Verlust von F-Aktin in den runden Zellausstülpungen auszeichnet (Merks, Masterarbeit, 2012; Rottmann, Bachelorarbeit, 2013). Dies könnte bedeuten, dass die Zellpolarität, welche durch den RhoA-Rac1-Gradienten besteht, durch den Verlust von Trio gestört wird und dies die Ausbildung von Zellausläufern verhindert. Interessanterweise führt auch eine geringe Dosis des Trio-MO *in vivo* zu Migrationsdefekten, während die cNLZ *in vitro* ihre mesenchymale Zellmorphologie beibehalten. Um daher sicher zu stellen, dass es sich bei dem blebbenden Phänotyp um ein nicht-apoptotisches Verhalten handelt, könnten *in vivo* eine TUNEL-Analyse bzw. *in vitro* eine Immunodetektion gegen Caspasen, welche die wichtigsten Enzyme in der Apoptose sind (McIlwain et al., 2013), durchgeführt werden. Gleichsam könnten die runden Zellausstülpungen durch eine reduzierte Zell-Substrat-Adhäsion hervorgerufen werden, welche z.B. bei dem Verlust von Xcad-11 beobachtet wird (Langhe et al., in Revision). Zell-Substrat-Analysen bzw. AFM-Messungen könnten darüber Aufschluss bringen.

Die Konfrontations- und Kollisionsanalysen in dieser Arbeit zeigen, dass GEF-Trio innerhalb der Kontaktinhibition notwendig ist. Dabei könnte Trio das Bindeglied zwischen der Kontakterkennung durch Xcad-11 und der Aktivierung von RhoA am Zell-Zell-Kontakt darstellen, da Trio in der Lage ist über die Intermediärdomäne von Xcad-11 mit dem Cadherin zu interagieren (Kashef et al., 2009). Um diese Bindung in Bezug auf die Kontaktinhibition zu validieren, könnten Konfrontations- und Kollisionsanalysen mit dem Xcad-11- Δ IMD-Konstrukt, in welchem die Intermediärdomäne deletiert wurde, im Xcad-MO-Hintergrund durchgeführt werden. Sollte dadurch die Kontaktinhibition blockiert

werden, könnte man daraus schließen, dass die Intermediärdomäne und damit die Bindung von Trio an Xcad-11 für die Signalvermittlung des Kontaktes notwendig ist.

Interessanterweise ist fluoreszenzmarkiertes Trio sowohl in der Zellmembran am Zell-Zell-Kontakt als auch an der Migrationsfront zu detektieren (Moore et al., 2013; diese Arbeit). Dies lässt auf zwei unterschiedliche Funktionsbereiche von Trio schließen: (1) Trio scheint über seine GEF1-Domäne Rac1 an der Migrationsfront zu aktivieren und das Aktin-Zytoskelett über seine Interaktion mit Filamin zu beeinflussen und (2) Trio kann über die GEF2-Domäne am Zell-Zell-Kontakt die Aktivierung von RhoA kontaktabhängig katalysieren (Bellanger et al., 1998a; Bellanger et al., 1998b; Bellanger et al., 2000; Ridley et al., 2003; van Rijssel et al., 2012; Spillane et al., 2012). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass im Gegensatz zur GEF1-Domäne die GEF2-Domäne für die gerichtete Migration der cNLZ *in vivo* und die Ausbildung der Zellausläufer *in vitro* notwendig ist. Dies könnte bedeuten, dass die GEF2-Domäne für die Repolarisation der cNLZ während der Kontaktinhibition ausreichend ist, da RhoA am Zell-Zell-Kontakt aktiviert wird und somit Rac1 inhibiert (Carmona-Fontaine et al., 2008; Shoval und Kalcheim, 2012). Dem widerspricht jedoch, dass die Inhibition der Interaktion von GEF1 und Rac1 durch den Inhibitor NSC 23766 zu einem blebbenden Zellverhalten führt (Merks, Masterarbeit, 2012). Jedoch handelt es sich bei NSC 23766 um einen unspezifischen Inhibitor der Rac1-Aktivierung, da ebenso die Interaktion von Rac1 mit GEF-Tiam verhindert wird. Alternativ könnten Versuche mit dem spezifischeren Inhibitor ITX3, welcher als selektiver, nicht-toxischer und zellaktiver Inhibitor des endogenen Trio-RhoG-Rac1-Signalweges identifiziert wurde (Bouquier et al., 2009), Aufschluss über die Notwendigkeit der einzelnen GEF-Domäne bringen. Zusätzlich wäre es von Interesse, die subzelluläre Lokalisation der einzelnen GEF-Domänen zu untersuchen und in Konfrontations- und Kollisionsanalysen zu beobachten, welche der GEF-Domänen die Kontaktinhibition *in vitro* im Trio-MO-Hintergrund blockiert.

Die Migration und die Ausbildung der Zellausläufer der cNLZ kann durch die konstitutive Aktivität von RhoA und Rac1 trotz Verlust von Trio rekonstituiert werden, während *in vitro* die Ausbildung der Zellausläufer auf eine cNLZ-typische mesenchymale Morphologie hinweist. Im Gegensatz dazu ist Cdc42 in seiner konstitutiv aktiven Form nicht in der Lage die Bildung von Zellausläufern bzw. die vollständige Migration der cNLZ in die Kiemenbögen wieder herzustellen. Dies zeigt, dass RhoA und Rac1, nicht jedoch Cdc42 unterhalb von Trio aktiv sind. Um dies zu validieren, wäre die subzelluläre Lokalisation von aktivem RhoA bzw. Rac1 von Interesse, welche mittels FRET-Analysen visualisiert werden könnte. Zusätzlich könnten Rekonstitutionsversuche mit Effektorproteinen wie ROCK (Rho-assoziierte Kinase) oder PAK (p21-aktivierte Kinase) im Trio-MO-Hintergrund durchgeführt werden. Interessanterweise kann die cNLZ-Migration *in vivo* nach Verlust von Xcad-11, welches in der Signalkaskade oberhalb von Trio liegt, ebenfalls durch konstitutiv aktives RhoA und Rac1, aber auch durch Cdc42 wieder hergestellt werden (Kashef et al., 2009). Dies verdeutlicht, dass Trio als

Guaninnukleotid-Austauschfaktor für RhoA und Rac1 fungiert (Bellanger et al., 1998b), während Xcad-11 offenbar Cdc42 innerhalb einer anderen Signalkaskade modulieren kann. Auch wenn der Signalweg für die Aktivierung von Cdc42 in cNLZ von *X. laevis* noch unklar ist, scheinen p120-Catenin, welches an klassische Cadherine bindet, bzw. GEF-Vav2, GEF-RICS oder GEF-Dbl potentielle Kandidaten für die Stimulierung der Cdc42-Aktivierung zu sein, wobei die Expression der GEFs in cNLZ von *X. laevis* noch zu untersuchen wäre (Noren et al., 2000; Okabe et al., 2003; Rossmann et al., 2005; Schmitt und Hall, 2002).

Für die Kontaktinhibition ist die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges notwendig (Carmona-Fontaine et al., 2008). Jüngste Untersuchungen ergaben, dass Trio Dsh bindet und somit eine mögliche Verbindung der Signalwege entsteht (unveröffentlichte Daten, Jubin Kashef). Die Rekonstitutionsversuche von Trio-MO mit Dsh zeigen, dass Dsh Trio funktionell ersetzen kann und in der Lage ist die cNLZ-Migration *in vivo* bzw. *in vitro* die Bildung der Zellausläufer trotz des Verlustes von Trio wieder herzustellen. Dies untermauert die Hypothese eines Dsh-Trio-Komplexes an der Membran. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PDZ- und DEP-Domäne von Dsh für die Rekonstitution notwendig sind, welche für die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges verantwortlich sind (Rothbacher et al., 2000; Wallingford und Habas, 2005). Dabei ist vor allem die DEP-Domäne für die Lokalisation von Dsh an die Membran notwendig (Rothbacher et al., 2000). Hier wäre es von Interesse, mittels Co-Immunopräzipitation zu untersuchen, ob Xcad-11 ebenfalls mit Dsh interagiert. Sollte dies der Fall sein, könnten Rekonstitutionsversuche mit Dsh bzw. den Deletionskonstrukten von Dsh im Xcad-11-MO-Hintergrund den Mechanismus der RhoA-Aktivierung innerhalb der Kontaktinhibition weiter erleuchten. Die Bindung von Wnt11 bzw. Wnt11r an den Rezeptor Fz7 führt zur Lokalisation von Dsh an die Membran (De Calisto et al., 2005; Matthews et al., 2008b). Über den Komplex mit Trio und Xcad-11 könnte somit die Membran-Lokalisation von Dsh kontaktspezifisch zur Aktivierung von RhoA führen. Bekannt ist, dass die Rac1-Aktivität über die DEP-Domäne von Dsh reguliert wird, während die Interaktion von Daam1 mit der PDZ- und DEP-Domäne zur Aktivierung von RhoA führt (Habas und He, 2006; Wharton, 2003). Ein weiterer potentieller Kandidat ist die Proteinkinase PTK7, welche im Komplex mit Fz7 in der Lage ist Dsh an die Membran zu rekrutieren (Shnitsar und Borchers, 2008).

Interessanterweise inhibiert Syndecan-4 parallel zum nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg Rac1 (Matthews et al., 2008a). Xcad-11 wiederum vermittelt über die Interaktion mit Syndecan-4 die Anhaftung der cNLZ an Fibronectin (Langhe et al., in Revision). Weitere Konfrontations- und Kollisionsanalysen könnten zeigen, ob und welche Rolle Syndecan-4 möglicherweise im Zusammenhang mit der Kontaktinhibition spielt.

Ebenso führt die Interaktion von Trio mit dem Polaritätsprotein Par3 zur Inhibition von Rac1 am Zell-Zell-Kontakt. Zusätzlich kommt es durch Par3 zur Depolymerisierung der Mikrotubuli am Zell-Zell-Kontakt, wodurch das Mikrotubuli-System überwiegend an der Migrationsfront stabilisiert wird. Dies führt zur Polarisierung des intrazellulären Transports und der spatialen und temporalen Koordination der Migration (Etienne-Manneville, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Par3 die Kontaktinhibition blockiert, diese jedoch durch den gleichzeitigen Verlust von Trio rekonstituiert werden kann (Moore et al., 2013). Dies unterstreicht die Bedeutung von Trio in der Kontaktinhibition. Somit könnte Par3 am Zell-Zell-Kontakt über eine mögliche Bindung der GEF1-Domäne die Aktivierung von Rac1 blockieren. Bindungsstudien mit den einzelnen GEF-Domänen könnten darüber Aufschluss geben. Außerdem wäre eine mögliche Interaktion von Par3 und Xcad-11 innerhalb eines Komplexes mit Trio nicht ausgeschlossen.

Der Einfluss von Trio auf Migrationsprozesse scheint phylogenetisch konserviert zu sein. In *M. musculus* konnte gezeigt werden, dass Trio zusammen mit Cadherin-11 an der neuronalen Clusterbildung und dem Wachstum bzw. der Führung von Axonen beteiligt ist (Backer et al., 2007; Song und Giniger, 2011). In *D. melanogaster* spielt der Delta/Notch-Signalweg in der Motilität und Führung von Motor-Axonen eine Rolle, wobei Notch mit der Tyrosin-Kinase Abl interagiert, welche wiederum GEF-Trio binden kann (Song und Giniger, 2011). In *C. elegans* wurde beobachtet, dass Trio an der Neurotransmission und der Steuerung der Axon-Führung partizipiert (Steven et al., 2005; Vanderzalm et al., 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Trio in *M. musculus* M-Cadherin bindet und an der Bildung der Skelettmuskulatur beteiligt ist (O'Brien et al., 2000; Charrasse et al., 2007). Aufgrund der Vielzahl verschiedener Bindungspartner von Trio, welches somit in unterschiedlichen Entwicklungsprozessen eine Rolle spielt, wäre es interessant weitere Interaktionspartner von Trio in *X. laevis* cNLZ zu finden. Dazu könnten z.B. Co-Immunopräzipitationen bzw. Rekonstitutionsversuche mit Cadherinen wie N-Cadherin, PCNS oder PAPC durchgeführt werden. Zusätzlich könnte die in dieser Arbeit vorgestellte mögliche Sequenz (s. Anhang A3), welche durch *in silico*-Analysen basierend auf der Genom-Datenbank des Marcotte Labors (Universität von Texas, Austin, TX, USA) erstellt wurde, mittels 5'RACE-PCR validiert werden. Die momentan bekannte Sequenz von Trio in *X. laevis* umfasst nur 914 bp. Sequenzvergleiche mit den bekannten murinen und humanen Orthologen weisen auf eine Übereinstimmung von 71% der Aminosäure-Identität hin, während die GEF1-Domäne sogar in 90% identisch ist (Kashef et al., 2009). Vor allem das C-terminale Ende von Trio ist jedoch verstärkt variabel zwischen den verschiedenen Spezies, da es sich in zusätzlichen regulatorischen Elementen unterscheidet (Bateman und Van Vactor, 2001; Kashef et al., 2009; van Rijssel und van Buul, 2012). Vor allem diese Elemente könnten Aufschluss über weitere Interaktionspartner und die Regulation von Trio innerhalb der Kontaktinhibition geben.

6.4 Ein neuer molekularer Mechanismus der Kontaktinhibition

Die Daten dieser Arbeit geben ein neues Verständnis über die Funktion von Xcad-11 innerhalb des molekularen Mechanismus der Kontaktinhibition während der Migration der cNLZ in *X. laevis* (s. Abbildung 6.1). Dabei wird der Zell-Zell-Kontakt durch die homophile Bindung von Xcad-11 vermittelt. Gleichsam wird die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 über die proteolytische Spaltung durch Adam13 moduliert. Intrazellulär bindet der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Trio an die Intermediärdomäne von Xcad-11, worüber die kleinen Rho GTPasen und damit die Organisation des Aktin-Zytoskeletts reguliert werden.

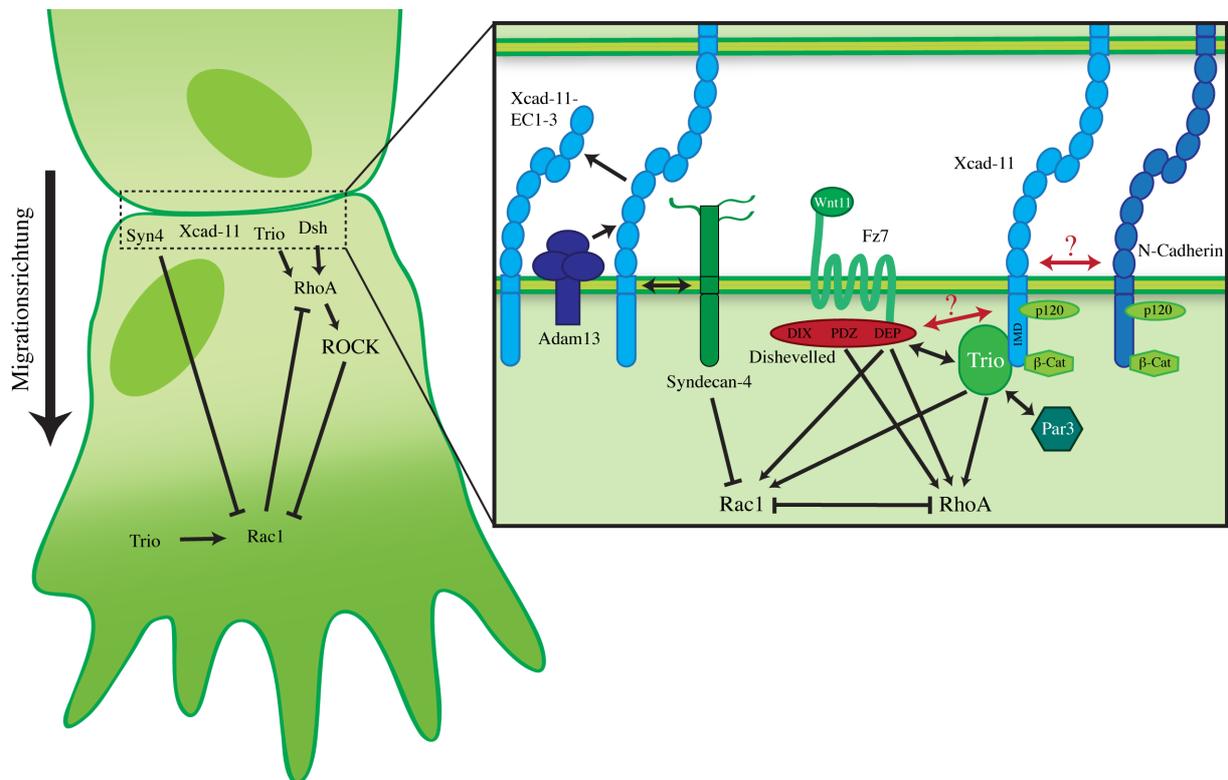


Abbildung 6.1: Molekularer Mechanismus der Xcad-11 vermittelten Kontaktinhibition.

Schematische Darstellung des Mechanismus der Kontaktinhibition in cNLZ. Der Zell-Zell-Kontakt wird durch Xcad-11 vermittelt, dessen adhäsive Funktion durch Adam13 beeinflusst wird. Xcad-11 bindet intrazellulär Trio, welches mit Dsh interagiert und für die Aktivierung von RhoA verantwortlich ist. RhoA hemmt über ROCK Rac1, welches somit an der Migrationsfront aktiv ist und für die Ausbildung der Lamellipodien sorgt.

Über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus wird RhoA ausschließlich am Zell-Zell-Kontakt aktiviert. Dies kann zum einen durch eine Konformationsänderung von Trio durch die Bindung von Xcad-11 erfolgen. Zum anderen können weitere Bindungspartner von Trio wie Dsh oder Par3 einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der beiden GEF-Domänen haben. Eine weiterer Mechanismus der spezifischen RhoA-Aktivierung wäre ein potentieller Komplex aus Xcad-11, Trio und Dsh, welcher die vorherigen Möglichkeiten nicht ausschließt. Dabei könnte die Kontaktvermittlung durch eine mögliche Interaktion von Xcad-11 mit N-Cadherin beeinflusst werden.

Die über die Adhäsionsfunktion von Xcad-11 vermittelte Aktivierung von RhoA am Zell-Zell-Kontakt führt zur Repolarisation der Zelle nach der Kollision und damit zur Richtungsänderung der Migration. Zum einen kommt es über RhoA und ROCK zur Ausbildung von Stressfasern durch das Aktin-Zytoskelett am hinteren Ende der Zelle. Zum anderen inhibiert RhoA über ROCK Rac1, welches wiederum RhoA direkt hemmt (Shoval und Kalcheim, 2012). Aktives Rac1 liegt somit ausschließlich an der Migrationsfront vor, wo es über Lamellipodin, den Scar/WAVE-Komplex und Arp2/3 für die Ausbildung von Lamellipodia verantwortlich ist (Law et al., 2013). Damit verändert die Zelle nach einer Kollision ihre Migrationsrichtung.

7 Zusammenfassung

Die in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien an Xcad-11 belegen, dass dieses mesenchymale Cadherin eine essentielle Rolle in der Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes während der Kontaktinhibition besitzt. Zusätzlich wurde die Rolle von GEF-Trio in der gerichteten Migration untermauert und der Einfluss auf die Kontaktinhibition verdeutlicht.

In situ-Hybridisierungen, Transplantationsanalysen und Knorpelfärbungen weisen auf die Notwendigkeit der adhäsiven Funktion von Xcad-11 während der cNLZ-Migration *in vivo* hin. Konfrontations- und Kollisionsanalysen verdeutlichen *in vitro* den Einfluss der Adhäsionsfunktion von Xcad-11 auf die Kontaktinhibition. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Adam13 die Xcad-11 vermittelte Adhäsion moduliert, jedoch der Verlust von Adam13 und eine erhöhte Adhäsion durch Xcad-11 die Kontaktinhibition nicht blockieren. Gleichsam bedarf es eines bestimmten Maßes an gespaltenem und ungespaltenem Xcad-11 in der Kontaktinhibition für die gerichtete Migration der cNLZ.

Zusätzlich konnte über *In situ*-Hybridisierungen, Transplantationsanalysen und Knorpelfärbungen gezeigt werden, dass GEF-Trio für die Migration der cNLZ *in vivo* notwendig ist. *In vitro*-Analysen der Kontaktinhibition (Konfrontations- und Kollisionsanalysen) deuten darauf hin, dass Trio ebenso innerhalb der Kontaktinhibition eine Rolle spielt. *In situ*-Hybridisierungen und Zellmorphologiestudien verdeutlichen dabei, dass die GEF2-Domäne für die gerichtete Migration der cNLZ verantwortlich ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Trio in der Migration der cNLZ oberhalb der kleinen Rho GTPasen RhoA und Rac1 aktiv ist.

Die Rolle des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges innerhalb der Kontaktinhibition wurde durch die Daten dieser Arbeit bestätigt. Dabei untermauern *in situ*-Hybridisierungen, Transplantationsanalysen, Knorpelfärbungen sowie Konfrontations- und Kollisionsanalysen, dass die spezifische Blockierung des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweges zum Verlust der Kontaktinhibition führt. Gleichsam konnte gezeigt werden, dass Dsh, welches Trio bindet, unterhalb von Trio agiert. Dabei sind die PDZ- und DEP-Domäne notwendig, um trotz des Verlustes von Trio die gerichtete cNLZ-Migration *in vivo* und die Bildung von Zellausläufern *in vitro* wieder herzustellen.

8 Literatur

- Abercrombie M (1970) Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* 6, 128–142.
- Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R und Hoschuetzky H (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex *in vitro* with recombinant proteins. *J Cell Sci.* (Pt12):3655-63.
- Abitua PB, Wagner E, Navarrete IA und Levine M (2012) Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature* 492: 104-7.
- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M und Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 119(6):1438-49.
- Adams RH, Diella F, Hennig S, Helmbacher F, Deutsch U und Klein R (2001) The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* 104(1):57-69.
- Alfandari D, Wolfsberg TG, White JM und DeSimone DW (1997) ADAM 13: A Novel ADAM Expressed in Somitic Mesoderm and Neural Crest Cells during *Xenopus laevis* Development. *Dev. Biol.* 182, 314–330.
- Alfandari D, Cousin H, Gaultier A, Smith K, White JM, Darribère T und DeSimone DW (2001) *Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr Biol.* 11 (12): 918-30.
- Alfandari D, Cousin H, Gaultier A, Hoffstrom BG und DeSimone DW (2003) Integrin alpha5beta1 supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. *Dev Biol.* 260(2):449-64.
- Alfandari D, Cousin H und Marsden M (2010) Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adh Migr* 4: 553-60.
- Ananthakrishnan R und Ehrlicher A (2007) The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci* 3: 303-17.
- Anastasiadis PZ und Reynolds AB (2001) Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 13(5):604-10.
- Anastasiadis PZ (2007) p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 34-46.
- Assefnia S, Dakshanamurthy S, Auvil JM, Hampel C, Anastasiadis PZ, Kallakury B, Uren A, Foley DW, Brown ML, Shapiro L, Brenner M, Haigh D und Byers SW (2013) Cadherin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies. *Oncotarget.*
- Astin JW, Batson J, Kadir S, Charlet J, Persad RA, Gillatt D, Oxley JD und Nobes CD (2010) Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat Cell Biol.* 12(12):1194-204.
- Backer S, Hidalgo-Sanchez M, Offner N, Portales-Casamar E, Debant A, Fort P, Gauthier-Rouviere C und Bloch-Gallego E (2007) Trio controls the mature organization of neuronal clusters in the hindbrain. *J Neurosci* 27, 10323-10332.
- Bagnara JT, Matsumoto J, Ferris W, Frost SK, Turner WA Jr, Tchen TT und Taylor JD (1979) Common origin of pigment cells. *Science* 203(4379):410-5.

- Baltzinger M, Ori M, Pasqualetti M, Nardi I und Rijli FM (2005) Hoxa2 knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Dev Dyn* 234: 858-67.
- Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.
- Bateman J und Van Vactor D (2001) The Trio family of guanine-nucleotide-exchange factors: regulators of axon guidance. *J Cell Sci* 114, 1973-1980.
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H und Drenckhahn D (2000) Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4005-10.
- Becker SF (2011) Die Funktion von Cadherin-11 in der Kontakt-Inhibition während der Migration von Neuralleistenzellen in *Xenopus laevis*. Diplomarbeit.
- Becker SF, Langhe R, Huang C, Wedlich D und Kashef J (2012) Giving the right tug for migration: cadherins in tissue movements. *Arch Biochem Biophys* 524: 30-42.
- Bellanger JM, Zugasti O, Lazaro JB, Diriong S, Lamb N, Sardet C und Debant A (1998a) [Role of the multifunctional Trio protein in the control of the Rac1 and RhoA gtpase signaling pathways]. *C R Seances Soc Biol Fil* 192: 367-74.
- Bellanger JM, Lazaro JB, Diriong S, Fernandez A, Lamb N und Debant A (1998b) The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link the Rac1 and the RhoA pathways *in vivo*. *Oncogene* 16: 147-52.
- Bellanger JM, Astier C, Sardet C, Ohta Y, Stossel TP und Debant A (2000) The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2: 888-92.
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S und Pouliot Y (1990) Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol.* 139(1):227-9.
- Bockman DE und Kirby ML (1984) Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science* 223(4635):498-500.
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM und Shapiro L (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296: 1308-13.
- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M und Cano A (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 116(Pt3):499-511.
- Bononi J, Cole A, Tewson P, Schumacher A und Bradley R (2008) Chicken protocadherin-1 functions to localize neural crest cells to the dorsal root ganglia during PNS formation. *Mech Dev* 125: 1033-47.
- Borchers A, David R und Wedlich D (2001) *Xenopus* cadherin-11 restrains cranial neural crest migration and influences neural crest specification. *Development* 128(16):3049-60.
- Bouquier N, Vignal E, Charrasse S, Weill M, Schmidt S, Leonetti JP, Blangy A und Fort P (2009) A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chem Biol* 16, 657-666.
- Bronner-Fraser M und Fraser SE (1988) Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335(6186):161-4.

- Bussemakers MJ, Van Bokhoven A, Tomita K, Jansen CF und Schalken JA (2000) Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 85(3):446-50.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F und Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76–83.
- Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, Moreno M, Dunn GA, Parsons M, Stern CD und Mayor R (2008) Contact inhibition of locomotion *in vivo* controls neural crest directional migration. *Nature* 456:957-961.
- Carmona-Fontaine C, Theveneau E, Tzekou A, Tada M, Woods M, Page KM, Parsons M, Lambris JD und Mayor R (2011) Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Dev Cell* 21: 1026-37.
- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP und Sucov HM (2000) Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127(8):1671-9.
- Chang SK, Noss EH, Chen M, Gu Z, Townsend K, Grenha R, Leon L, Lee SY, Lee DM und Brenner MB (2011) Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(20):8402-7.
- Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Kay CM und Gumbiner BM (2001) Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol* 154: 231-43.
- Charrasse S, Comunale F, Fortier M, Portales-Casamar E, Debant A und Gauthier-Rouviere C (2007) M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 18: 1734-43.
- Chen X, Molino C, Liu L und Gumbiner BM (2007) Structural elements necessary for oligomerization, trafficking, and cell sorting function of paraxial protocadherin. *J Biol Chem* 282: 32128-37.
- Cheung M, Chaboissier MC, Mynett A, Hirst E, Schedl A und Briscoe J (2005) The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell*. 8(2):179-92.
- Chu YS, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP und Dufour S (2004) Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 167: 1183-94.
- Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, Yu-Lee LY, Zhang S, Yeh ET, Hu MC, Logothetis CJ und Lin SH (2008) Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* 6: 1259-67.
- Collazo A, Bronner-Fraser M und Fraser SE (1993) Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration. *Development* 118(2):363-76.
- Corey DR und Abrams JM (2001) Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol*. 2(5): 1015.1-1015.3.
- Cravedi P, Leventhal J, Lakhani P, Ward SC, Donovan MJ und Heeger PS (2013) Immune cell-derived C3a and C5a costimulate human T cell alloimmunity. *Am J Transplant* 13: 2530-9.
- Creuzet S, Vincent C und Couly G (2005) Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol*. 49(2-3):161-71.

- D'Amico-Martel A und Noden DM (1983) Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat.* 166(4):445-68.
- Davis MA, Ireton RC und Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol.* 163(3):525-34.
- Davy A, Aubin J und Soriano P (2004) Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev.* 18(5):572-83.
- De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF und Mayor R (2005) Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 132(11):2587-97.
- DiGeorge AM (1968) Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: concurrence with congenital hypoparathyroidism. *IV(1) White Plains, NY: March of Dimes-Birth Defects Foundation* 116-21.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ und Weis WI (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123(5):903-15.
- Duband JL, Monier F, Delannet M und Newgreen D (1995) Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat (Basel)* 154(1):63-78.
- Dupin E, Glavieux C, Vaigot P und Le Douarin NM (2000) Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 pp7882–7887.
- Etienne-Manneville S (2013) Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29: 471-99.
- Evans IR, Renne T, Gertler FB und Nobes CD (2007) Ena/VASP proteins mediate repulsion from ephrin ligands. *J Cell Sci.* 120(Pt 2):289-98.
- Farlie PG, Kerr R, Thomas P, Symes T, Minichiello J, Hearn CJ und Newgreen D (1999) A paraxial exclusion zone creates patterned cranial neural crest cell outgrowth adjacent to rhombomeres 3 and 5. *Dev Biol.* 213(1):70-84.
- Ffrench-Constant C und Hynes RO (1988) Patterns of fibronectin gene expression and splicing during cell migration in chicken embryos. *Development* 104: 369-82.
- Fournier G, Garrido-Urbani S, Reymond N und Lopez (2010) [Nectin and nectin-like molecules as markers, actors and targets in cancer]. *Med Sci (Paris)* 26(3):273-9.
- Fujito T, Ikeda W, Kakunaga S, Minami Y, Kajita M, Sakamoto Y, Monden M und Takai Y (2005) Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3. *J. Cell Biol.* 171(1):165–173.
- Goldenhar M (1952) Associations malformatives de l'oeil et l'oreille, en particulier le syndrome dermoïde épibulbaire-appendices auriculaires-fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J Genet Hum* 1:243-82.
- Gross JB und Hanken J (2005) Cranial neural crest contributes to the bony skull vault in adult *Xenopus laevis*: insights from cell labeling studies. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 304(2):169-76.
- Gumbiner BM (1993) Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11(4):551-64.
- Gumbiner BM (1995) Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 7(5):634-40.

- Gumbiner BM (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol.* 148(3):399-404.
- Habas R und He X (2006) Activation of Rho and Rac by Wnt/frizzled signaling. *Methods Enzymol* 406: 500-11
- Hadeball B, Borchers A und Wedlich D (1998) *Xenopus* cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mech Dev.* 72(1-2):101-13.
- Hagedorn L, Suter U und Sommer L (1999) P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF-beta family factors. *Development* 126(17):3781-94.
- Halbleib JM und Nelson WJ (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20(23):3199-214.
- Hall BD (1979) Choanal atresia and associated multiple anomalies. *J Pediatr.* 95(3):395-8.
- Hall BD (1999) The Neural Crest in Development and Evolution. *Springer-Verlag, New York.*
- Harland RM (1991) *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36: 685-95.
- Helbling PM, Tran CT und Brändli AW (1998) Requirement for EphA receptor signaling in the segregation of *Xenopus* third and fourth arch neural crest cells. *Mech Dev.* 78(1-2):63-79.
- His W (1868) Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. *F. C. W. Vogel, Leipzig.*
- Hoffmann I und Balling R (1995) Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin. *Dev Biol.* 169(1):337-46.
- Hong CS und Saint-Jeannet JP (2007) The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol Biol Cell.* 18(6):2192-202.
- Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, Kim SM, Ortiz A, Wu FL, Logothetis CJ, Yu-Lee LY und Lin SH (2010) Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* 70: 4580-9.
- Huber AH und Weis WI (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105(3):391-402.
- Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ und Weis WI (2001) The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem.* 276(15):12301-9.
- Ikeda W, Kakunaga S, Takekuni K, Shingai T, Satoh K, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T und Takai Y (2004) Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, Nectin-3-independent manner. *J Biol Chem* 279: 18015-25.
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F und Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol.* 159(3):465-76.
- Jaffe AB und Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247-69
- Kalluri K (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 119(6):1417-9.

- Kashef J, Köhler A, Kuriyama S, Alfandari D, Mayor R und Wedlich D (2009) Cadherin-11 regulates protrusive activity in *Xenopus* cranial neural crest cells upstream of Trio and the small GTPases. *Genes Dev.* 23 (12): 1393-8.
- Kashima T, Kawaguchi J, Takeshita S, Kuroda M, Takanashi M, et al. (1999) Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis. *Am J Pathol* 155: 1549-55.
- Kee Y und 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(6):744-55.
- Kimura Y, Matsunami H, Inoue T, Shimamura K, Uchida N, Ueno T, Miyazaki T und Takeichi M (1995) Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev Biol.* 169(1):347-58.
- Kirby ML, Gale TF und Stewart DE (1983) Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220(4601):1059-61.
- Köhler A, Schlupf J, Schneider M, Kraft B, Winter C und Kashef J (2013) Loss of *Xenopus* cadherin-11 leads to increased Wnt/beta-catenin signaling and up-regulation of target genes c-myc and cyclin D1 in neural crest. *Dev Biol* 383: 132-45.
- Köntges G und Lumsden A (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 122(10):3229-42.
- Kraft B, Berger CD, Wallkamm V, Steinbeisser H und Wedlich D (2012) Wnt-11 and Fz7 reduce cell adhesion in convergent extension by sequestration of PAPC and C-cadherin. *J Cell Biol* 198: 695-709.
- Krull CE, Lansford R, Gale NW, Collazo A, Marcelle C, Yancopoulos GD, Fraser SE und Bronner-Fraser M (1997) Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr Biol.* 7(8):571-80.
- LaBonne C und Bronner-Fraser M (1999) Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 81-112.
- Langhe RP, Gudzenko T, Bachmann M, Becker SF, Gonnermann C, Franz CM und Kashef J (in Revision) Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell substrate adhesion. *Nature Communications*.
- Law AL, Vehlow A, Kotini M, Dodgson L, Soong D, Theveneau E, Bodo C, Taylor E, Navarro C, Perera U, Michael M, Dunn GA, Bennett D, Mayor R und Krause M (2013) Lamellipodin and the Scar/WAVE complex cooperate to promote cell migration *in vivo*. *J Cell Biol* 203: 673-89.
- Le Douarin NM und Teillet MA (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 30(1):31-48.
- Le Douarin NM, Ziller C und Couly GF (1993) Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: *in vivo* and *in vitro* studies. *Dev Biol.* 159(1):24-49.
- Le Douarin NM und Kalcheim C (1999) The Neural Crest. *Cambridge University Press* (2. Auflage).
- Le Lièvre CS und Le Douarin NM (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 34(1):125-54.

- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M und Brenner MB (2007) Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 315(5814):1006-10.
- Lee YC, Cheng CJ, Huang M, Bilen MA, Ye X, Navone NM, Chu K, Kao HH, Yu-Lee LY, Wang Z und Lin SH (2010) Androgen depletion up-regulates cadherin-11 expression in prostate cancer. *J Pathol* 221: 68-76.
- Lee YC, Bilen MA, Yu G, Lin SC, Huang CF, Ortiz A, Cho H, Song JH, Satcher RL, Kuang J, Gallick GE, Yu-Lee LY, Huang W und Lin SH (2013) Inhibition of cell adhesion by a cadherin-11 antibody thwarts bone metastasis. *Mol Cancer Res* 11: 1401-11.
- Loeb L (1921) Amoeboid Movement, Tissue Formation and Consistency of Protoplasm. *Science* 53: 261-2.
- Markus MA, Reichmuth C, Atkinson MJ, Reich U, Hoffmann I, Balling R, Anderer U und Höfler H (1999) Cadherin-11 is highly expressed in rhabdomyosarcomas and during differentiation of myoblasts *in vitro*. *J Pathol* 187: 164-72.
- Martinez-Morales JR, Henrich T, Ramialison M und Wittbrodt J (2007) New genes in the evolution of the neural crest differentiation program. *Genome Biol.* 8(3):R36.
- Matthews HK, Broders-Bondon F, Thiery JP und Mayor R (2008) Wnt11r is required for cranial neural crest migration. *Dev Dyn* 237: 3404-9.
- Matthews HK, Marchant L, Carmona-Fontaine C, Kuriyama S, Larraín J, Holt MR, Parsons M und Mayor R (2008) Directional migration of neural crest cells *in vivo* is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 135(10):1771-80.
- Mayor R und Carmona-Fontaine C (2010) Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol* 20:319-328.
- Mayor R und Theveneau E (2013) The neural crest. *Development* 140: 2247-51.
- McCusker C, Cousin H, Neuner R und Alfandari D (2009) Extracellular cleavage of cadherin-11 by ADAM metalloproteases is essential for *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Mol Biol Cell* 20:78-89.
- McIlwain DR, Berger T und Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008656.
- McLarren KW, Litsiou A und Streit A (2003) DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate. *Dev Biol.* 259(1):34-47.
- Medina A, Swain RK, Kuerner KM und Steinbeisser H (2004) *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *EMBO J* 23: 3249-58.
- Merks A (2012) Funktion und Charakterisierung von *Xenopus*-Trio in der Neuralleistenzellentwicklung. Masterarbeit.
- Meulemans D und Bronner-Fraser M (2004) Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell.* 7(3):291-9.
- Miyoshi J und Takai Y (2007) Nectin and nectin-like molecules: biology and pathology. *Am J Nephrol* 27: 590-604.

- Monsoro-Burq AH, Wang E und Harland R (2005) Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Dev Cell*. 8(2):167-78.
- Moore R, Theveneau E, Pozzi S, Alexandre P, Richardson J, et al. (2013) Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development* 140: 4763-75.
- Newgreen D und Thiery JP (1980) Fibronectin in early avian embryos: synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res*. 211(2):269-91.
- Nichane M, Ren X und Bellefroid EJ (2010) Self-regulation of Stat3 activity coordinates cell-cycle progression and neural crest specification. *EMBO J*. 29(1):55-67.
- Nieuwkoop PD und Faber J (1967) Normal Tables of *Xenopus laevis* (Daudin). *North Holland Publishing Cy* (Zweite Ausgabe).
- Noden DM (1983) The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol*. 96(1):144-65.
- Noren NK, Liu BP, Burrige K und Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150: 567-80.
- Nose A, Tsuji K und Takeichi M (1990) Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61(1):147-55.
- O'Brien SP, Seipel K, Medley QG, Bronson R, Segal R und Streuli M (2000) Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12074-12078.
- Okabe T, Nakamura T, Nishimura YN, Kohu K, Ohwada S, Morishita Y und Akiyama T (2003) RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem* 278: 9920-7.
- Okazaki M, Takeshita S, Kawai S, Kikuno R, Tsujimura A, Kudo A und Amann E (1994) Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J Biol Chem*. 22;269(16):12092-8.
- Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H und Eto K (1994) The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol*. 164(2):409-19.
- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR und Shapiro L (2006) Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124(6):1255-68.
- Pegoraro C und Monsoro-Burq AH (2012) Signaling and transcriptional regulation in neural crest specification and migration: lessons from *Xenopus* embryos. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 247-59.
- Perris R, Perissinotto D, Pettway Z, Bronner-Fraser M, Morgelin M und Kimata K (1996) Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. *FASEB J* 10: 293-301.
- Perris R, Brandenberger R und Chiquet M (1996) Differential neural crest cell attachment and migration on avian laminin isoforms. *Int J Dev Neurosci* 14: 297-314.

- Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A und Engel J (1999) A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* 18:1738–47.
- Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA und Byers SW (1999) Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 59(4):947-52.
- Pokutta S und Weis WI (2000) Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:237-61.
- Pokutta S, Drees F, Yamada S, Nelson WJ und Weis WI (2008) Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochem Soc Trans* 36: 141-7.
- Pomeranz HD, Sherman DL, Smalheiser NR, Tennyson VM und Gershon MD (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(4):625-42.
- Posy S, Shapiro L und Honig B (2008) Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J Mol Biol* 378: 954-68.
- Rangarajan J, Luo T und Sargent TD (2006) PCNS: a novel protocadherin required for cranial neural crest migration and somite morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol.* 295(1):206-18.
- Reynolds AB und Carnahan RH (2004) Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 15(6):657-63.
- Rickmann M, Fawcett JW und Keynes RJ (1985) The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J Embryol Exp Morphol.* 90:437-55.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT und Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-9.
- Rossman KL, Der CJ und Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 167-80.
- Rothbacher U, Laurent MN, Deardorff MA, Klein PS, Cho KW und Fraser SE (2000) Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBO J* 19: 1010-22.
- Rottmann I (2013) Funktion und Charakterisierung von GEF-TRIO während der Migration von Neuralleistenzellen in *Xenopus laevis*. Bachelorarbeit.
- Sadaghiani B und Thiébaud CH (1987) Neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Dev Biol.* 124(1):91-110.
- Satcher RL, Pan T, Cheng CJ, Lee YC, Lin SC, Yu G, Li X, Hoang AG, Tamboli P, Jonasch E, Gallick und Lin SH (2014) Cadherin-11 in renal cell carcinoma bone metastasis. *PLoS One* 9: e89880.
- Sauka-Spengler T und Bronner-Fraser M (2008) Evolution of the neural crest viewed from a gene regulatory perspective. *Genesis* 46: 673-82.
- Schmidt A und Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16: 1587-609.

- Schneider M, Schambony A und Wedlich D (2010) Prohibitin1 acts as a neural crest specifier in *Xenopus* development by repressing the transcription factor E2F1. *Development* 137(23):4073-81.
- Schneider M, Huang C, Becker SF, Gradl D und Wedlich D (2014) Protocadherin PAPC is expressed in the CNC and can compensate for the loss of PCNS. *Genesis* 52: 120-6.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR und Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374(6520):327-37.
- Shnitsar I und Borchers A (2008) PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. *Development* 135: 4015-24.
- Shoval I und Kalcheim C (2012) Antagonistic activities of Rho and Rac GTPases underlie the transition from neural crest delamination to migration. *Dev Dyn* 241: 1155-68.
- Simonneau L, Kitagawa M, Suzuki S und Thiery JP (1995) Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? *Cell Adhes Commun.* 3(2):115-30.
- Sivasankar S, Briehner W, Lavrik N, Gumbiner B und Leckband D (1999) Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11820-4.
- Smith J (1990) The avian neural crest as a model system for the study of cell lineages. *Int J Dev Biol* 34: 157-62.
- Smith A, Robinson V, Patel K und Wilkinson DG (1997) The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr Biol.* 7(8):561-70.
- Song JK und Giniger E (2011) Noncanonical Notch function in motor axon guidance is mediated by Rac GTPase and the GEF1 domain of Trio. *Dev Dyn* 240, 324-332.
- Sonnenberg-Riethmacher E, Mische M, Stolt CC, Goerich DE, Wegner M und Riethmacher D (2001) Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10. *Mech Dev.* 109(2):253-65.
- Spillane M, Ketschek A, Donnelly CJ, Pacheco A, Twiss JL und Gallo G (2012) Nerve growth factor-induced formation of axonal filopodia and collateral branches involves the intra-axonal synthesis of regulators of the actin-nucleating arp2/3 complex. *J Neurosci* 32, 17671-17689.
- Spritz RA (1994) Molecular basis of human piebaldism. *J Invest Dermatol.* 103(5 Suppl): 137S–140S.
- Stam JC und Collard JG (1999) The DH protein family, exchange factors for Rho-like GTPases. *Prog Mol Subcell Biol* 22: 51-83.
- Steven R, Zhang L, Culotti J und Pawson T (2005) The UNC-73/Trio RhoGEF-2 domain is required in separate isoforms for the regulation of pharynx pumping and normal neurotransmission in *C. elegans*. *Genes Dev* 19, 2016-2029.
- Steventon B und Mayor R (2012) Early neural crest induction requires an initial inhibition of Wnt signals. *Dev Biol* 365: 196-207.

- Sultana A, Idress R, Naqvi ZA, Azam I, Khan S, Siddiqui AA und Lalani EN (2014) Expression of the Androgen Receptor, pAkt, and pPTEN in Breast Cancer and Their Potential in Prognostication. *Transl Oncol* (in press).
- Tamura D, Hiraga T, Myoui A, Yoshikawa H und Yoneda T (2008) Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. *Int J Oncol* 33: 17-24.
- Tanihara H, Sano K, Heimark RL, St John T und Suzuki S (1994) Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun.* 2(1):15-26.
- Theveneau E, Marchant L, Kuriyama S, Gull M, Moepps B, Parsons M und Mayor R (2010) Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell.* 19(1):39-53.
- Theveneau E, Steventon B, Scarpa E, Garcia S, Trepas X, Streit A und Mayor R (2013) Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. *Nat Cell Biol* 15: 763-72.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ und Schalken JA (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 60(13):3650-4.
- Trainor PA und Tam PP (1995) Cranial paraxial mesoderm and neural crest cells of the mouse embryo: co-distribution in the craniofacial mesenchyme but distinct segregation in branchial arches. *Development* 121(8):2569-82.
- Treacher Collins E (1900) Case with symmetrical congenital notches in the outer part of each lower lid and defective development of the malar bones. *Trans Ophthalmol Soc UK*20: 90.
- Tribulo C, Aybar MJ, Nguyen VH, Mullins MC und Mayor R (2003) Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification. *Development* 130(26):6441-52.
- Vallin J, Girault JM, Thiery JP und Broders F (1998) *Xenopus* cadherin-11 is expressed in different populations of migrating neural crest cells. *Mech Dev.* 75(1-2):171-4.
- van Rijssel J, Hoogenboezem M, Wester L, Hordijk PL und Van Buul JD (2012) The N-terminal DH-PH domain of Trio induces cell spreading and migration by regulating lamellipodia dynamics in a Rac1-dependent fashion. *PLoS One* 7: e29912.
- van Rijssel J und van Buul JD (2012) The many faces of the guanine-nucleotide exchange factor trio. *Cell Adh Migr* 6.
- Vanderzalm PJ, Pandey A, Hurwitz ME, Bloom L, Horvitz HR und Garriga G (2009) *C. elegans* CARMIL negatively regulates UNC-73/Trio function during neuronal development. *Development* 136, 1201-1210.
- Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I und Nieto MA (2004) Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18(10):1131-43.
- Volk T, Cohen O und Geiger B (1987) Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells. *Cell* 50(6):987-94.
- Waardenburg PJ (1951) A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet* 3:195-253.

- Wallingford JB und Habas R (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132: 4421-36.
- Wang HU und Anderson DJ (1997) Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18: 383–396.
- Wang X, Su H und Bradley A (2002) Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and *cis*-alternative splicing model. *Genes Dev* 16: 1890-905.
- Wharton KA Jr (2003) Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 253: 1-17.
- Whitehead IP, Campbell S, Rossman KL und Der CJ (1997) Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1332: F1-23.
- Witzel S, Zimyanin V, Carreira-Barbosa F, Tada M und Heisenberg CP (2006) Wnt11 controls cell contact persistence by local accumulation of Frizzled 7 at the plasma membrane. *J Cell Biol* 175: 791-802.
- Wood JL, Hughes AJ, Mercer KJ und Chapman SC (2010) Analysis of chick (*Gallus gallus*) middle ear columella formation. *BMC Dev Biol.* 10:16.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI und Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123(5):889-901.
- Yap AS, Niessen CM und Gumbiner BM (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol.* 141(3):779-89.
- Zhang Y, Sivasankar S, Nelson WJ und Chu S (2009) Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 109-14.
- Zhu B, Chappuis-Flament S, Wong E, Jensen IE, Gumbiner BM und Leckband D (2003) Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J* 84: 4033-42.

9 Abkürzungsverzeichnis

Zusätzlich zu SI-Einheiten, beschriebenen Variablen, Produktnamen, Artnamen, den Summenformeln chemischer Verbindungen und Abkürzungen für Nukleotide und Aminosäuren werden folgende Abkürzungen verwendet:

%	Prozent
(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewichts-Volumen-Verhältnis
2G9	HEF1 Antikörper
2-log	Logarithmus mit Basis 2
9E10	Myc Antikörper
α	anti
β -cat	β -Catenin
Abl	Abelson
Adam	A disintegrin and metalloprotease
Adam-MO	MO komplementär zu Adam13
AFM	Rasterkraftmikroskopie
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Ap-2 α	Aktivator protein 2 α
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
Arp2/3	Actin-Related Proteins 2/3
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BMB	Boehringer Mannheim Blockierungsreagenz
Bmp	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
br	branchial
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C3a	Complement component 3 fragment a
C3aR	C3a-Rezeptor
ca	konstitutiv aktiv
CCBD	central cell binding domain
Cdc42	Cell division cycle 42
CFN	Center für funktionale Nanotechnologie
CH	Schweiz
CIL	Kontaktinhibition
c-Myc	Myc proto-oncogene protein
cNLZ	craniale Neuralleistenzellen
CoA	Co-Attraktion
CoMO	Kontroll-Morpholino-Oligonukleotid

Cxcl12a	CXC-Motiv-Chemokinligand 12a
Cxcr4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Dbl	dichaete beadex lethal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEP-Domäne	Dishevelled, EGL-10 und pleckstrin Domäne
DH-Domäne	Dbl-Homologie-Domäne
DIX-Domäne	Dishevelled-Axin-Domäne
Dlx5	Distal-less homeobox 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotide
dn-Xcad-11	dominant-negatives Konstrukt von Xcad-11
Dsh	Dishevelled
Dsh (DEP+)	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Dishevelled
Dsh-ΔN	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Dishevelled
Dsh-ΔDIX	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Dishevelled
Dsh-ΔDEP	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Dishevelled
Dsh-ΔPDZ	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Dishevelled
EC	Extrazelluläre Domäne
ECM	Extrazellulärmatrix
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
Edn3	Endothelin 3
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Ena	<i>Drosophila</i> Enabled
EphR	Ephrin-Rezeptor (erste Entdeckung in erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma line)
Ephrin	Eph family receptor interacting proteins
F-Actin	filamentous actin
Fgf	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FoxD3	Forkhead box D3
FR	Frankreich
FRET	Föster-Resonanzelektronentransfer
Fz	Frizzled
GAP-43	Growth associated protein 43
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grünes fluoreszentes Protein
GTPase	Guaninnukleotid-Triphosphatase
H2B	Histon 2B
HA	Human influenza hemagglutinin
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEMA	Poly(2-hydroxyethylmethacrylate)

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepII	Heparin II
HF	Hellfeld
hTrio	Trio-Homolog aus <i>H. sapiens</i>
hy	hyoidal
Id3	Inhibition of DNA 3
IMD	Intermediärdomäne
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
ITX3	Inhibitor of Trio exchange 3, (2E)-(-2-((2,5-Dimethyl-1-phenyl-pyrrol-3-yl)methylene)thiazolo[3,2-a]benzimidazol-1-one
KIT	Karlsruhe Institut für Technologie
LB	Luria Bertani
ma	mandibular
MAB	Maleic Acid Buffer
mb	membrangebunden
M-Cadherin	Muskel-Cadherin
mcherry	monomeres cherry-Protein
MBSH	Modified Barth's saline with Hepes
MEM	MOPS/EGTA/magnesium sulfate buffer
MEMFA	MOPS/EGTA/magnesium sulfate/formaldehyde buffer
mGFP	monomeres GFP
MMR	Marc's Modified Ringers
MO	komplimentäres Morpholino-Oligonukleotid
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mTrio	Trio-Homolog aus <i>M. musculus</i>
mRNA	messenger RNA
Msx1	Msh homeobox 1
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-Cadherin	Neurales Cadherin
NCD2	N-Cadherin Antikörper
Necl	Nektin-like protein
NHB	nicht homophil bindend
NIH/3T3	mouse embryonic fibroblast cell line
NL	Niederlande
NLZ	Neuralleistenzellen
NP40	Nonidet P-40
Nrg1	Neuregulin 1
Nrp-1	Neuropilin 1
n.s.	nicht signifikant
NTP/CAP	Nucleotid-Triphosphate/ 5' Capping
N-Tubulin	Neurales Tubulin
OB-Cadherin	Osteoblastisches Cadherin
OI	Überlappungsindex
opv	optisches Vesikel
ov	otisches Vesikel
pAkt	phosphorylierte Protein-Kinase B

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PAPC	Paraxial Protocadherin
Par3	Protease activated receptor 3
Pax3	Paired-box 3
PBS	Phosphatgepufferte Salzlosung
PC-3	prostate cancer cell line 3
PCNS	Protocadherin in Neural Crest and Somites
PCP	Planar cell polarity
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDZ-Domäne	Post Synaptic Density-95, Discs large and Zonula-occludens 1- Domäne
PG-M	Synonym für Versican
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
Phb1	Prohibitin 1
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
PrI3	Phosphatase of regenerating liver 3
PTK7	Protein Tyrosin Kinase 7
PTW	phosphate buffered saline with Tween
PVDF	Polyvinyl-difluorid
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RACE	rapid amplification of cDNA ends
Rho	Ras homolog gene family member
RICS	ROP interactive CRIB motif-containing proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROCK	Rho-assozierte Proteinkinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SABU-ME	sample buffer with Mercaptoethanol
Scar	suppressor of cAMP receptor
Sdf1	Stromal cell-derived factor-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Glucose
Sox	Sry related HMG Box
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SSC	Hochsalzpuffer
St.	Stadium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tgf β	Transforming growth factor β
Tiam	T-lymphoma invasion and metastasis

TIRF	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
Trio-MO	MO komplementär zu <i>Xenopus</i> Trio
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TXR	Texas red (Sulforhodamin-101-Sulfonylchlorid)
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolettes Licht
Vangl1	Van Gogh-like 1
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
Vav2	Proto-Onkogen Vav2
WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein-family verprolin homology protein
Wnt	Wingless/ INT-related
Wt	Wildtyp
XB-Cadherin	Homolog zu plazentalem Cadherin in <i>Xenopus</i>
Xcad-11	<i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xcad-11-MO	MO komplementär zu <i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xcad-11 Δ c	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xcad-11 Δ e	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xcad-11 Δ IMD	Deletionsmutante von <i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xcad-11-EC1-3	Extrazelluläres Fragment von <i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xcad-11-EC-NHB	nicht homophil bindendes extrazelluläres Fragment von <i>Xenopus</i> Cadherin-11
Xdsh	<i>Xenopus</i> Dishevelled
z.B.	zum Beispiel
Zic1	Zinc finger protein 1

10 Anhänge

Anhang A1 MatLab-Code Konfrontationsanalyse

```

% create filename for fnb pictures with same name and different number
fnb = 1:10;
filenamemask = 'wt%02d';
filenameextension = 'TIF';
% initialize vectors
Olrynorm = zeros(1,fnb);Olgynorm = zeros(1,fnb);Olmidnorm = zeros(1,fnb);
% do analyse for all chosen pictures
for fn = 1:length(fnb)
    filename = sprintf(filenamemask,fnb(fn));
    filename = [filename, '.',filenameextension];
    disp(['processing: ',filename]);
    pic = imread(filename); pic2 = mat2gray(im2double(pic));
%Thresholding
    picred = pic2(:,1);picred(picred(:)<0.5) = 0;picred(picred(:)>0.5) = 1;
    picgreen = pic2(:,2);picgreen(picgreen(:)<0.5) = 0;picgreen(picgreen(:)>0.5) = 1;
    picblue = pic2(:,3);picblue(picblue(:)<0.5) = 0;picblue(picblue(:)>0.5) = 1;
%delete white fonts
    whitemask = picred.*picgreen.*picblue;
    picred(:) = picred(:)-whitemask(:);
    picgreen(:) = picgreen(:)-whitemask(:);
%label objects in image; connectivity; access of list of arrays :comp.PixelIdxList{1}
    compred = bwconncomp(picred,4);
    compgreen = bwconncomp(picgreen,4);
% get out dirt: gets all objects in this area range defined as false objects
    labred = labelmatrix(compred); labgreen = labelmatrix(compgreen);
    pr = regionprops(compred,'All');pg = regionprops(compgreen,'All');
    badidxr = find([pr.Area]<1000);badidgx = find([pg.Area]<2000);
    bwr = ismember(labred,badidxr);bwg = ismember(labgreen,badidgx);
% throw away the false objects from the labeled image
    labred(bwr) = 0;labgreen(bwg) = 0;
    picred = labred>0;picgreen = labgreen>0;
% closeholes
    mask2 = strel('disk',6,0); mask1 = true(3,3); mask = true(3,3);
    ccr = imclose(picred,mask2);ccg = imclose(picgreen,mask2);
    ccr = ccr | picred;ccg = ccg | picgreen;
% make the new array smaller than the borders of the original
    ccr2 = imerode(ccr,mask1);ccg2 = imerode(ccg,mask1);
% add up original and new array by or
    picred = picred | ccr2;picgreen = picgreen | ccg2;
% erode 2 times
    picred = imerode(picred,mask1);picred = imerode(picred,mask1);
    picgreen = imerode(picgreen,mask1);picgreen = imerode(picgreen,mask1);

```

```

% 2nd time: get out dirt: gets all objects in this area range defined as false objects
labred = labelmatrix(compred); labgreen = labelmatrix(compgreen);
pr = regionprops(compred,'All');pg = regionprops(compgreen,'All');
badidxr = find([pr.Area]<1500);badidxg = find([pg.Area]<1000);
bwr = ismember(labred,badidxr);bwg = ismember(labgreen,badidxg);
% throw away the false objects from the labeled image
labred(bwr) = 0;labgreen(bwg) = 0; picred = labred>0;picgreen = labgreen>0;
% fill holes and sharpen borders
picred = imdilate(picred,mask1);picred = imerode(picred,mask1);
picgreen = imdilate(picgreen,mask1);picgreen = imerode(picgreen,mask1);
%just get the border of the whole object with any internal stuff
smallred = imerode(picred,mask); borderedred = picred&~ smallred;
smallgreen = imerode(picgreen, mask);
bordergreen = picgreen&~ smallgreen;
getred = borderedred; getgreen = bordergreen;
% sharpen the borders to have no gaps; fill it completly - not for measuring
% but for getting the border points!
wholered = imfill(borderedred,'holes'); wholegreen = imfill(bordergreen,'holes');
%just gettheborderofthewholeobjectwithoutanyinternalstuff
smallred = imerode(wholered,mask); borderedred = wholered&~ smallred;
smallgreen = imerode(wholegreen, mask);
bordergreen = wholegreen&~ smallgreen;
borderred = imdilate(borderedred,mask); bordergreen = imdilate(bordergreen,mask);
borderred = imerode(borderedred,mask); bordergreen = imerode(bordergreen, mask);
yellowpoints = ((borderred==1) & (bordergreen==1));
yellowpoints = bwmorph(yellowpoints,'shrink',Inf);
% make the yellow picture
picyellow = picred.*picgreen;
picyellow = imdilate(picyellow,mask);
% connectivity; access of list of arrays :comp.PixelIdxList{1}
compyel = bwconncomp(picyellow,4);
% get out dirt of yellow pic: gets all objects in this area range defined as false objects
labyel = labelmatrix(compyel); py = regionprops(compyel,'All');
badidxy = find([py.Area]<1500); bwy = ismember(labyel,badidxy);
% throw away the false objects from the labeled image
labyel(bwy) = 0;picyellow = labyel>0; picyellow = imerode(picyellow,mask);
dpointspic = ((picyellow ==1) & (yellowpoints==1));
%get yellow pixels of crossing points of borders
listyellow = [];
for yyel = 1:(size(dpointspic,2)-1)
    for xyel = 1:(size(dpointspic,1)-1)
        if (dpointspic(xyel,yyel) == 1)
            listyellow = [listyellow;(xyel),(yyel)];
        end
    end
end
end

```

```

%find the two points with highest distance!!!
xvec = listyellow(:,2); yvec = listyellow(:,1);
[X,Y] = meshgrid(xvec,yvec);
dX = X-X'; dY = Y-Y';
dist = hypot(dX,dY);
[xi,yi] = find(dist == max(dist(:)));
far = [X(xi,yi),Y(yi,xi)];
dsx = far(1,1); dsy = far(1,3); dex = far(1,2); dey = far(1,4);
% get the mask 2d^2
n = size(picred,1); m = size(picred,2);
% Koordinaten sämtlicher n*m Matricelemente
y = repmat((1:n)',m,1); x = kron((1:m)',ones(n,1));
% Koordinatentransformation: Ursprung in Punkt 1
[theta,r] = cart2pol(dex-dsx,dey-dsy);
% u-Achse läuft von Punkt 1 nach Punkt 2; v-Achse senkrecht dazu
u = (x-dsx)*cos(theta)+(y-dsy)*sin(theta);
v = -(x-dsx)*sin(theta)+(y-dsy)*cos(theta);
% Maske basteln
maskpic = ones(n,m);maskpic(u<0) = 0;maskpic(u>r) = 0;maskpic(v<-r) = 0;
maskpic(v>r) = 0;
% normalized OI: grün, rot und gelb normalisieren
greenmasked = picgreen.*maskpic;redmasked = picred.*maskpic;
yellowmasked = picyellow.*maskpic;
% flaeche berechnen
areagreen = sum(greenmasked(:));areared = sum(redmasked(:));
areayellow = sum(yellowmasked(:));
%OI berechnen
Olrnorm(fn)= areayellow/areared;Olgynorm(fn)= areayellow/areagreen;
Olmidnorm(fn) = (Olrnorm(fn)+Olgynorm(fn))/2;
%Kontrollbild
colour = pic2;addmask= imdilate(maskpic,mask);addmask = imdilate(addmask,mask);
addmask = imdilate(addmask,mask);maskpic = addmask-maskpic;
white(:,1) = maskpic; white(:,2) = maskpic; white(:,3) = maskpic;
all = colour+white; imtool(im2uint8(all));
end% for fn = 1:length(fnb)

Olgymean = sum(Olgynorm(:))/length(fnb);
Olrmean = sum(Olrnorm(:))/length(fnb);
Olmidmean = sum(Olmidnorm(:))/length(fnb);

disp(['Green-yellow normalized OI:', num2str(Olgymean)]);
disp(['Red-yellow normalized OI:', num2str(Olrmean)]);
disp(['Middle normalized OI of ry/gy:', num2str(Olmidmean)]);

```

Anhang A2 MatLab-Code Kollisionsanalyse

```

% load the data; be aware of ,and .; filename: wt.txt;
% structure first row: 1 dt1 dt2 x1 y1 x2 y2 x3 y3
    datna = 'wt';
    datname = [datna, '.txt']
    daten = load(datname, '-ascii');
    dt1 = daten(:,2); dt2 = daten(:,3);
    x1 = daten(:,4); y1 = -daten(:,5);
    x2 = daten(:,6); y2 = -daten(:,7);
    x3 = daten(:,8); y3 = -daten(:,9);
% move point of origin to x2/y2
    px1 = x1 - x2; py1 = y1 - y2; px3 = x3 - x2; py3 = y3 - y2;
% Cartesian to polar coordinate system with theta = angle in radiant and rho = distance in pixel
    [thetaA, rhoA] = cart2pol(px1, py1); [thetaB, rhoB] = cart2pol(px3, py3); % in Radiant
% conversion from pixel to myem with 78px = 50mym
    rhoA = rhoA./78.*50; rhoB = rhoB./78.*50;
% get the angle between vector A & B and the velocity after collision in mym/sec
    vwinkel = pi - thetaA + thetaB;
    velocity = rhoB./dt2;
% polar to cartesian system
    [cx, cy] = pol2cart(vwinkel, velocity);
% insert the normalized vector (initial velocity vector) for velocity = 0.1 myem/sec
    ivvwinkel = pi; ivvvelo = 0.1;
    [vx, vy] = pol2cart(ivvwinkel, ivvvelo);
    cx = [cx; vx]; cy = [cy; vy];
% make the real compass
    velofig = figure;
    picvelo = compass(cx, cy, '-k');
    hold on;
% Modify the velocity compass
    radius2 = findall(gcf, 'linestyle', ':');
    delete(radius2);
    radtext = findall(gcf, 'type', 'text');
    delete(radtext);
    set(picvelo, 'LineWidth', 1.1);
    hold on;
    filename = [datna, 'velo.tif'];
    saveas(velofig, filename);

```

Anhang A3 putative Aminosäuresequenz von XTrío

>Taira201203_XENLA_stage_00168219

MSTSSTASSGSTNIGTGHAAGSNTGEGAEETAKDSADITAFYRSGFRKNEELKAMEVLPILKEKVAYLSGGRDKR
GGPILTFPARSNHDRIRQEDLRRLISYLACIPSEEVCKRGFTVIVDMRGSKWDSIKPLLKILQESFPCCIHVALI
IKPDNFWQKQRTNFGSSKFEFETSMVSLEGLTKVVDPSQLTPEFEGCLEYNHEEWIEIRVAFEDFITNATHMLSR
LEELQEMLAIKELPQDLEGARNMIEEHSQMKKRVIKAPIEDLDVEGQKLLQIIQSSESFPKKNSSSGNADLQNL
PKVSTMLDRLHSTRQHLHQLWHMRKVKLDQCFQLRRLFQDAEKMFWDWITHNKGLFLTSYTDIGTSHNHAMELQTO
HNHFAMNCMVVYVNI SRIMSVANRLVESGHYASQOIKQIANQLEQEWKAFAAALDERSTLLDMSAIFHQKAEQYM
SNVDSWCKACGEVDLPSELQDLEDAIHGGIYEHINLAYSEVSQDGKSLLDKLRPLTPGSSDSL TASANYSKA
VHVLDIAIHEVLHHRQLENIWQHRKVRHLHRLQLCVFQODVQVLDWIENHGEAFLSKHTGVGKSLHRARALQK
RHEDFEEVAQNTYTNADKLLAEAEQLAQTGECDEEIIYQAAHQLEDRIQDFVRRVEQRKVLDDMSVFSHSHVKEL
WTWLEDLQKELLDDVYAESVEAVQDLIKRFGQQQTTLQFTVNVIKEGEDLIQQLRDSAISSNKTPHSSSINHIE
TVLQQLDEAQSQMEELFQERKIKLELFLQLRIFERDAIDIISDLESWNDELSQOMNDFDTEDLTAEQRLQHHAD
KALTMNNLTFDVIHQGQELLQYVNEVQNSGVELLCDRDVDMATRVDLLEFLHEKQQLDLAAEQHRKHLEQCVO
IRHLQAEVKQVLGWIRNGESMLNAGLITASSLQEAELQREHEQFOHAIKETHQSALQVQQAETMLQANHYDMD
MIRDCAEKVASHWQQLMLKMEDRLKLVNASVAFYKTSQVCSVLESLEQYKREEDWCGGADKLGPNSETDHTVTP
MISKHLEQKEAFLKACTLARRNADVFLKYLHRNSVNMPGMVTHVKAPEQVKNILNELFORENRVLHYWTLRKR
LDHCQQYVVFERSAKQALEWIQDNGEFYLSHTSTGSTIQHTQELLKEHEEFQITAKQTKERVKLLIQLADGFCE
KGAHSAEIKKCVTAVDKRYRDFSLRMEKYRTCLEKALGISSDSNKSSKSLQLDIIPVSAPGSEVKLRDATHLN
EEKRKSARRKEFIMAELIQTEKAYVRDLRECMDTYLWEMTSGVEEIPPGIVNKEHIFGNMQEIEYFHNNIFLKE
LEKYEQLPEDVGHCFVTWADKQFQMYVSYCKNKPDESTQILEQAGTYFDEIQQRHELANSISSYLKPVQRITKYQ
LLLKELLTCCEEGKGEIKDGLEVMLSVPKRANDAMHLSMLEGFDENIESOGELILOESFQVWDPKTLIRKGRERH
LFLFEMSLVFSKEVKDSSGRSKYIYKSKLFTSELGVTEHVEGDPCKFALWIGRTPSTDNKIVLKGSSIENKQDWI
KHIREVIQDRTIHLRGALKEPIHIPKTAATAAKQKAARRDGEDLDSQGDASSQPDITISASRTSQNTLDSKLSGG
CELTVVIHDFACNSNELTIKRGQTVEVLERHHRDPDWCLVRTTDRSPAEEGLVPSSSLCIAHSRSSMEMEGIFN
HKDSLVSNSNDASPPASVISLQPHMIGAQSSPGPKRPGNTLRKWLTSVRRLLSSGKADGHVKKLEKLAHKHKKHR
EVRKNTDSGSQKSDSDSAATPQDETIDERVRNEGLSSGTLKSSSSGMQSCGEEEGEGPDSVPLPPMAIQQHS
LLQPEQDDKTSSRLLVRPTSSETPSAAELVSAIEELVKSKMALEDPSLQVDQGDSSSPFNPSDTSLLSSSS
PIDEMEEKSSSLKRRHYVLQELVETERDYVRDLGYVVEGYMALKEDGVPDDMKGDKIVFGNIHQIYEWHRDF
FLGELEKCLDEPEKLASLQVVKHERRLHMYIVYCQNKPKSEHIVSEYIDTYFEDLKQRLGHRLQLTDLLIKPVQRI
MKYQLLLKDFLKFSSKACVDVAELERAVEVMCIVPKRCNDMMNVGRLLQGFQDKIVAQKLLQLDFTFLVTEQDTGL
LPRCKERRVFLFEQIIIFSEPLDKKKGYSMPGFLFKNNIKVCSLSLEECVSDPCNFALLSRSADSTEMYVLHSS
SPGVRKLWIHEINQILENQRNFLNALTSPIEYHRNHTGGSSGSNVFTTSSPSNCSGLSGSSRSRPSRIPQVRRH
SPVLVSSAASAQSEADKMSGMSARHAPVPLSLSLDNSPSQKGRVTAAPETGYQDKESNSVPKMKMFDGLRKS
GIPTLADGAQKEMGSDSTEDSRPRNALGTLTLGKPRNGSASPLNSPV TANFPSSFGKESGPPSSPLQKGSFWSSIP
GSPASRPGSFTFPQSDSLQRQIHRHSTHNKDTDRMSTCSSTSEQSVHSTQSNSESSSSSNISTMLVTHDYTAV
KEDEINVYQGEVQILASNQQNMFLVFRAATDECPAAEGWIPSYVLGHTSAIITEMTDATMKKSSSWHTALIRK
KSERKEKDGKRETKLENGYRKSREGLSNKVSVKLLPNYIYDAPPEFILPLNEVTCETGETVILRCKVCGRPKAS
ITWKGPDHNTLCNDGHYSISYDLGEATLKI LGVTPEDDGVYTCIATNDLGSVSTSSSIRILGSWSDGLRVIWKE
NFDIAYNEVAELGRGRFSVVKKCEQRTVTRQVATKFNKLMKRDQVTHELGILQSLQHPQLISLLDTFETPAS
VLVLEIADQGRLLDYVVQWGNLTEEKITLYLREVLEALQYLHNCRIAHLDLKPENILVDQSLTKPTIKLSDFGDA
VQLNSTYYYIHQLLGSTEFAPAEIILGNPVSLTSDIWSIGVLTYVLLSGVSPFLDESVEETCLNICRLDFSPDDY
FKGVSQKAKEFVCFLLQGEQTKRPSAAVCLQEQWLQPGQHKSSGTLDMSTRITSFIERRKHQNDVRIKSIKNFLQ
SRLLPRI

11 Begleit-DVD

Die beigelegte Begleit-DVD beinhaltet die in dieser Arbeit durchgeführten Zeitrafferaufnahmen aus der Konfrontationsanalyse der cNLZ-Explantate.

Inhalt der Begleit-DVD:

Film Z1	Wildtyp (grün) gegen Wildtyp (rot)
Film Z2	Wildtyp (grün) gegen Xcad-11-MO (rot)
Film Z3	Wildtyp (grün) gegen dn-Xcad-11 (rot)
Film Z4	Wildtyp (grün) gegen Dsh (DEP+) (rot)
Film Z5	Wildtyp (grün) gegen Xcad-11-MO + fl-Xcad-11 (rot)
Film Z6	Wildtyp (grün) gegen Xcad-11-MO + dn-Xcad-11 (rot)
Film Z7	Wildtyp (grün) gegen Wildtyp (rot)
Film Z8	Wildtyp (grün) gegen Adam13-MO (rot)
Film Z9	Wildtyp (grün) gegen fl-Xcad-11 (rot)
Film Z10	Wildtyp (grün) gegen Adam13-OE (rot)
Film Z11	Wildtyp (grün) gegen Xcad-11-EC1-3 (rot)
Film Z12	Wildtyp (grün) gegen Xcad-11-EC-NHB (rot)
Film Z13	Wildtyp (grün) gegen CoMO (rot)
Film Z14	Wildtyp (grün) gegen Trio-MO (rot)

Die Filme zeigen die Konfrontation des grünen mit GAP-43-mGFP fluoreszenzmarkierten Wildtyp-cNLZ-Explantat mit dem jeweiligen roten mit GAP-43-mcherry fluoreszenzmarkierten cNLZ-Explantat. Eine erhöhte Überlappung (gelb) verdeutlicht eine verstärkte Invasion der cNLZ-Explantate. Die Bilder wurden etwa alle drei Minuten über eine Zeit von mehreren Stunden, wie es die relative Zeitachse angibt, mit einem Axio Observer.Z1 Spinning Disc Konfokalmikroskop (10x Plan Apochromat NA 0,45 Luft Objektiv) aufgenommen. Maßstab, 50 µm.

12 Publikationen

Veröffentlichungen

Becker SF, Langhe R, Huang C, Wedlich D und Kashef J (2012)

Giving the right tug for migration: cadherins in tissue movements.

Arch Biochem Biophys 524: 30-42.

Becker SF, Mayor R und Kashef J (2013)

Cadherin-11 Mediates Contact Inhibition of Locomotion
during *Xenopus* Neural Crest Cell Migration

PLoS One 8:e85717.

Schneider M, Huang C, Becker SF, Gradl D und Wedlich D (2014)

Protocadherin PAPC is expressed in the CNC and can compensate for the loss of PCNS.

Genesis 52: 120-6.

Langhe RP, Gudzenko T, Bachmann M, Becker SF, Gonnermann C, Franz CM und Kashef J

Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell substrate adhesion.

(in Revision, Nature Communications)

Stipendien

KHYS-Gaststipendium 2012 für Genevieve Abbruzzese und Sarah Becker

Vorträge

“Cadherin-11 in Contact Inhibition of Locomotion”

13th Young Scientist Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ)

“Cell Biology shapes the Embryo”

20.09.2012 - 22.09.2012

Jena, Deutschland

Poster

EMBO Conference Series: Morphogenesis and Dynamics of Multicellular Systems

EMBL Heidelberg, Deutschland, 7.9.2012 - 9.9.2012

13th Young Scientist Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ)

“Cell Biology shapes the Embryo”, Jena, Deutschland, 20.09.2012 - 22.09.2012

Joint meeting FOR1759 and SFB937:

“Physics of the embryo”, Göttingen, Deutschland, 29.09.2013 - 01.10.2013

International Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ)

Regensburg, Deutschland, 18.3.2014 - 21.3.2014

13 Curriculum Vitae

Name	Sarah Frieda Sophie Becker
Geburtstag	08. März 1986
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig

Akademische Ausbildung

Seit 2011	Promotion am Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie (Zoologie II) Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland
2008-2011	Hauptstudium Biologie Diplom Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland Abschluss: Diplom 2011, Note 1,4 Diplomarbeit: „Die Funktion von Cadherin-11 in der Kontakt-Inhibition während der Migration von Neuralleistenzellen in <i>Xenopus laevis</i> “ am Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie (Zoologie II)
2005-2008	Grundstudium Biologie Diplom Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Deutschland
2002-2005	Paul-Natorp-Gymnasium Berlin-Schöneberg Abschluss: Abitur 2005, Note 1,9
1998-2002	Max-Planck-Gymnasium Berlin-Mitte
1992-1998	12. Grundschule Berlin-Mitte