

Unterschiede und Gemeinsamkeiten der nicht-kanonischen  
Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Veronika Wallkamm

aus

Stuttgart - Bad Cannstatt

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Korreferent: PD Dr. Véronique Orian-Rousseau

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2014

## **Erklärung**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von Januar 2011 bis Mai 2014 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlichen oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Veronika Wallkamm, Juni 2014

# Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	VIII
1. Einleitung .....	1
1.1. Die Unterscheidung in kanonische und nicht-kanonische Wnt-Moleküle ist eine Vereinfachung .....	2
1.2. Das Wnt-Signalnetzwerk .....	3
1.2.1 Kanonischer Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg .....	4
1.2.2 Nicht-kanonisches Wnt Signalnetzwerk .....	5
1.2.3 Modulatoren der Wnt Signaltransduktion .....	8
1.2.4 Vernetzungen innerhalb des Wnt-Signalnetzwerkes .....	9
1.2.5 Evolutive Konservierung der Wnt-Signalwege.....	9
1.2.6 Die Wnt 3D - Struktur gleicht keiner bisher bekannten Proteinstruktur .....	10
1.2.7 Die posttranslationale Modifikation funktionalisiert die Wnt-Moleküle .....	12
1.2.8 Lipidmodifikation der Wnt-Moleküle beeinflusst den intrazellulären Transport und die Etablierung des Morphogengradienten.....	13
1.3. Kollektive Zellmigration.....	14
1.3.1 Die konvergente Extension führt zu einer Streckung der anterioren-posterioren Körperachse.....	15
1.3.2 Das mediolaterale Interkalationsverhalten ist verantwortlich für den Blastoporuschluss .....	16
1.4. PAPC beeinflusst die Zelladhäsion während der konvergenten Extension .....	17
1.4.1 Das Wnt-Signalnetzwerk während der konvergenten Extension .....	18
2. Zielsetzung .....	20
3. Material .....	21
4. Methoden .....	31
4.1. Entwicklungsbiologische Methoden .....	31
4.1.1 Tierhaltung.....	31
4.1.2 Testisextraktion und Eiablage .....	31
4.1.3 <i>In vitro</i> Fertilisation.....	31
4.1.4 Mikroinjektion.....	32
4.1.5 Gensuppression mittels Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotide.....	32
4.1.6 Embryonenpflege und Fixierung .....	33
4.1.7 Präparation animaler Kappen und <i>open face</i> Kellerexplantate .....	33
4.1.8 Lebendzellaufnahmen der Gewebeexplantate .....	34
4.1.9 Blastomeren Adhäsionsassay.....	34
4.1.10 Elongationsassay.....	35

4.1.11	Untersuchung des Molekültransports während der konvergenten Extension.....	35
4.1.12	Doppelachsenassay.....	36
4.1.13	<i>whole mount in situ</i> Hybridisierung.....	36
4.2.	Immunologische Methoden.....	36
4.2.1	Immunfärbung.....	36
4.2.2	Herstellung von NOP-Lysaten.....	37
4.2.3	Koimmunopräzipitation .....	37
4.3.	Proteinbiochemische Methoden .....	38
4.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
4.3.2	Western Blot .....	38
4.3.3	Proteinbestimmung - BCA Assay .....	39
4.3.4	Nachweis der Proteinexpression mittels <i>in vitro</i> Transkription und Translation.....	39
4.4.	Molekularbiologische Methoden .....	40
4.4.1	Messung der Nukleinsäurekonzentration .....	40
4.4.2	Restriktionsanalyse von DNA.....	41
4.4.3	Flachbrett Gelelektrophorese.....	41
4.4.4	Polymerase Kettenreaktion .....	41
4.4.5	DNA - Aufreinigung aus dem Agarosegel.....	43
4.4.6	Anfügen von 3' Adenosin-Überhängen.....	43
4.4.7	Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende.....	44
4.4.8	Ligation .....	44
4.4.9	Transformation chemokompetenter Bakterien.....	44
4.4.10	Blau/Weiß Selektion.....	44
4.4.11	Plasmid DNA Isolierung .....	45
4.4.12	Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	45
4.4.13	Sequenzanalyse .....	46
4.4.14	<i>In vitro</i> Synthese von Cap mRNA.....	46
4.4.15	Herstellung RNA Sonde für die <i>in situ</i> Hybridisierung .....	46
4.4.16	Isolierung von Gesamt RNA aus DMZ Explantaten.....	47
4.4.17	Aufkonzentrieren der RNA .....	48
4.4.18	Bestimmung der RNA Integrity Number mit dem Bioanalyzer .....	48
4.4.19	Synthese der cDNA mittels Reverser Transkription.....	49
4.4.20	RealTime PCR.....	50
4.4.21	Microarray.....	51
4.5.	Zellkulturmethoden.....	51
4.5.1	Zellhandling .....	51
4.5.2	Mycoplasmennachweis mittels PCR Reaktion .....	52

4.5.3	Kryokonservierung von Zellen.....	52
4.5.4	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer .....	52
4.5.5	Transfektion mittels kationischer Polymere .....	52
4.5.6	Transfektion durch Calciumphosphat Präzipitation.....	53
4.5.7	Reportergenassay.....	53
4.6.	Ni/NTA-Affinitätschromatographie .....	54
4.6.1	Vorbereiten der Proben für die Affinitätschromatographie .....	54
4.6.2	Reinigen und Bepacken einer Chromatographiesäule .....	54
4.6.3	Reinigungsprogramm der FPLC-Anlage .....	55
4.7.	Auswertung .....	56
4.7.1	Blastoporuschluss.....	56
4.7.2	<i>in situ</i> Hybridisierung.....	56
4.7.3	Reportergenassay.....	56
4.7.4	<i>open face</i> Kellerexplantate.....	57
4.7.5	Adhäsionsassay.....	57
4.7.6	Kolokalisation.....	57
4.7.7	Microarray.....	57
5.	Ergebnisse .....	59
5.1.	Charakterisierung von xWnt5a und xWnt11 während der konvergenten Extension .....	59
5.1.1	Die Funktionen von xWnt5a und xWnt11 lassen sich mit einfachen Analysesystemen nicht verlässlich unterscheiden.....	59
5.1.2	xWnt5a hemmt die Konstriktion, wohingegen xWnt11 die Elongation inhibiert.....	63
5.2.	Molekulare Analyse von xWnt5a und xWnt11.....	65
5.2.1	xWnt5a-eGFP ersetzt im Elongationsassay endogenes xWnt5a.....	65
5.2.2	xWnt5a-eGFP und xRor2-mCherry diffundieren gemeinsam in der Membran .....	67
5.2.3	Die xWnt5a Membranlokalisation ist Lef-abhängig.....	70
5.3.	Zellbiologische Analyse von xWnt5a und xWnt11.....	71
5.3.1	xPAPC, xFz7 und xWnt11 vermindern die C-Cadherin vermittelte Zelladhäsion .....	72
5.3.2	Reduktion der C-Cadherin <i>cis</i> -Dimerbildung .....	73
5.3.3	xC-Cadherin wird während der konvergenten Extension nicht internalisiert .....	75
5.3.4	xFz7 bildet sowohl einen Komplex mit xC-Cadherin, als auch mit xPAPC .....	76
5.3.5	Wnt/PCP Signalmoleküle zeigten keine polare Lokalisation während der konvergenten Extension .....	77
5.3.6	Wnt/PCP Komponenten werden nicht Mikrotubuli abhängig transportiert.....	78

5.4.	Analyse funktionaler Bereiche innerhalb der Wnt-Proteine .....	82
5.4.1	Der C-Terminus in xWnt8a realisiert die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade .....	82
5.4.2	Chimäre Konstrukte aus xWnt5a und xWnt11 sind funktionale nicht-kanonische Wnt-Moleküle .....	86
5.4.3	Die Entscheidung der nicht-kanonischen Signalwegaktivierung wird vom N-Terminus in xWnt5a und xWnt11 getroffen .....	88
5.4.4	Sowohl die N-Terminale Pseudostelle 3, als auch die C-Terminale Bindestellen 1 sind an der Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalnetzwerkes beteiligt.....	91
5.4.5	PS3-3 ist beteiligt an der xWnt5a Spezifizierung .....	91
5.5.	Spezifität durch Punktmutationen zu entschlüsseln ist schwer realisierbar .....	95
5.6.	Analyse der xWnt5a und xWnt11 regulierten differentiellen Genexpression .....	95
5.6.1	Qualitätsprüfung der Gesamt-RNA vor der Microarray Analyse .....	96
5.6.2	Identifikation xWnt-abhängiger Zielgene .....	97
5.6.3	Verifizierung der Zielgene im NanoString.....	100
6.	Diskussion.....	101
6.1.	Wnt5a und Wnt11 können mittels einfacher Analysesysteme nicht unterschieden werden .....	101
6.2.	Phänotypische Unterscheidung von Wnt5a und Wnt11 im Elongationsassay .....	104
6.3.	Analyse von Wnt5a und Wnt11 auf zellulärer Ebene .....	105
6.4.	Wnt5a bindet <i>in vivo</i> an Ror2.....	106
6.5.	Adhäsionsmodulationskomplexe modulieren die Adhäsion während der konvergenten Extension .....	108
6.5.1	Fibronectinpolymerisation ist Mikrotubuli abhängig .....	110
6.6.	Der C-Terminus von Wnt8a ist entscheidend für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges.....	112
6.7.	Die Spezifität der nicht-kanonischen Wnts ist im N-Terminus verankert .....	113
6.8.	Die Analyse einzelner Mutationen zur Feststellung der Spezifität ist schwer zu realisieren.....	116
6.9.	Identifikation von Wnt5a, Wnt11 und Lef Zielgenen .....	116
7.	Literaturverzeichnis .....	119
8.	Anhang.....	130
8.1.	Abkürzungen .....	130
8.2.	Klonierungsprimer .....	130
8.3.	Proteinaufreinigung .....	131
8.4.	<i>in vivo</i> Funktionalität der chimären Konstrukte.....	133
8.5.	Vektorkarten.....	137
8.6.	Inhaltsverzeichnis Begleit-CD.....	138

Danksagung.....	139
Publikationen.....	140
Lebenslauf.....	141

## Zusammenfassung

Die nicht-kanonischen Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes sind wichtige Regulatoren der konvergenten Extension während der *Xenopus* Gastrulation. Dabei übernehmen die nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 unterschiedliche, nicht-redundante Aufgaben. Diese distinkten Aufgaben lassen sich im Elongationsassay an Explantaten der dorsalen Marginalzone unterscheiden. Somit eignet sich dieses System, Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Wnt5a und Wnt11 auf zellulärer, molekularer und transkriptioneller Ebene zu charakterisieren.

Wnt5a-eGFP, das erste funktionale, nicht-kanonische, Fluoreszenz-markierte Wnt Molekül, war in diskreten Clustern an der Zellmembran lokalisiert und rekrutierte Ror2 in diese Cluster. In Kollaboration mit René Dörlich (Institut für Angewandte Physik, KIT) konnte erstmals *in vivo* eine Bindung von Wnt5a an Ror2 nachgewiesen werden.

Wnt11 modulierte zusammen mit Fz7 die Adhäsion während der konvergenten Extension, durch die Bildung von zwei unterschiedlichen Adhäsionsmodulationskomplexen (AMC) mit PAPC (AMCP) oder C-Cadherin (AMCC). Dabei förderte Wnt11 die Bildung des AMCCs. Dieser konkurrierte mit der Bildung von C-Cadherin *cis* Dimeren an der Zellmembran.

Auf molekularer Ebene konnte durch die Analyse von Chimären aus Wnt8a und Wnt11 gezeigt werden, dass für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges der C-Terminus entscheidend ist. Eine funktionale Charakterisierung von Chimären aus Wnt5a und Wnt11 zeigte hingegen, dass die Aktivierung der nicht-kanonischen Wnt-Signalkaskade im N-Terminus verankert ist. Dabei konnten zwei unterschiedliche nicht-konservierte Bereiche identifiziert werden, in der die Spezifizierung distinkter Zweige des nicht-kanonischen Wnt-Signalnetzwerkes begründet ist.

Auf transkriptioneller Ebene scheint sich der Unterschied zwischen Wnt5a und Wnt11 zu bestätigen, da von beiden ein nicht-überlappendes Set an Zielgenen reguliert wird. Somit wurden erstmals Kandidatengene identifiziert, die durch verschiedene Zweige des nicht-kanonischen Wnt-Signalnetzwerkes differentiell reguliert werden.

## 1. Einleitung

Die feinmaschige Regulation eines Signalnetzwerkes, welches durch die sezernierten Wachstumsfaktoren der Wnt-Signalmoleküle aktiviert wird, ist während der Embryonalentwicklung Voraussetzung für die Entstehung eines komplexen Organismus. Das Wnt-Signalnetzwerk ist an zahlreichen Entwicklungsprozessen maßgeblich beteiligt, Wnt-Proteine agieren dabei als Morphogene (Kiecker and Niehrs, 2001). Obwohl inzwischen die durch Wnt-Proteine aktivierten Signaltransduktionskaskaden als komplexes Wnt-Signalnetzwerk betrachtet werden, lassen sich einzelnen Zweigen dieses Signalnetzwerkes immer noch distinkte Funktionen zuweisen. So wird zu Beginn der Embryonalentwicklung die dorsoventrale Achse des Embryos durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges angelegt (Tao et al., 2005). In der weiteren Entwicklung entsteht während der Gastrulation, durch kollektive Zellwanderungen, aus einer Hohlkugel ein längsgestreckter Embryo. Die für die Streckung verantwortliche konvergente Extension wird durch das Zusammenspiel der nicht-kanonischen,  $\beta$ -Catenin unabhängigen, Wnt-Signalkaskade realisiert (Schambony and Wedlich, 2007).

Die Fehlregulation der konvergenten Extension ist ursächlich für einen der häufigsten Geburtsfehler. Bei einer von 1000 Geburten, schließt sich das Neuralrohr unvollständig (Wang and Nathans, 2007), wobei diese Fehlentwicklung sicherlich nicht immer auf Veränderungen der nicht-kanonischen Wnt-Signalkaskade zurückzuführen ist. Das Robinow Syndrom dagegen, eine Erbkrankheit die durch fehlerhafte Kraniofacial- und Skelettentwicklung gekennzeichnet ist, geht ursächlich auf eine Punktmutation in Wnt5a zurück (Person et al., 2010), basiert somit auf einem fehlregulierten nicht-kanonischen Wnt-Signal. Eine Auswirkung von fehlreguliertem  $\beta$ -Catenin abhängigem Signal kann das Fehlen aller vier Extremitäten sein. Diese als Tetraamelia bezeichnete seltene genetische Erkrankung basiert auf einer Null-Mutation in Wnt3 (Niemann et al., 2004).

Im adulten Organismus ist die Homöostase des Wnt-Signalnetzwerkes von immenser Bedeutung, da eine Deregulation die Entstehung von Osteoporose oder Krebs fördert (Lodewyckx and Lories, 2009). Die häufigste Ursache von Darmkrebs ist die konstitutive Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade, durch Mutationen im *apc* oder  *$\beta$ -catenin* Gen (Morin et al., 1997). Bei der erblichen Form von Darmkrebs FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) bilden Betroffene früh im Leben zahlreiche Polypen im Dickdarm aus. Verantwortlich dafür ist eine Mutation des *apc* Gens in der Keimbahn, dies resultiert in einem trunkierten APC Protein, wodurch der Degradationskomplex nicht mehr gebildet werden kann (Kinzler et al., 1991; Nishisho et al., 1991).

Fehlregulationen von Wnt5a oder Wnt11 führen in Krebszellen häufig zu einer höheren Invasivität, wodurch die Metastasierung begünstigt wird (Luga et al., 2012; Pukrop et al., 2006).

Insgesamt reguliert die nicht-kanonische und kanonische Signaltransduktionskaskade die selben Vorgänge in der Zelle während der Embryonalentwicklung und in entarteten Krebszellen. Die nicht-kanonischen Zweige regulieren hauptsächlich die Polarität, Mobilität und Migration der Zellen. Der  $\beta$ -Catenin abhängige Zweig hingegen induktive Vorgänge.

### **1.1. Die Unterscheidung in kanonische und nicht-kanonische Wnt-Moleküle ist eine Vereinfachung**

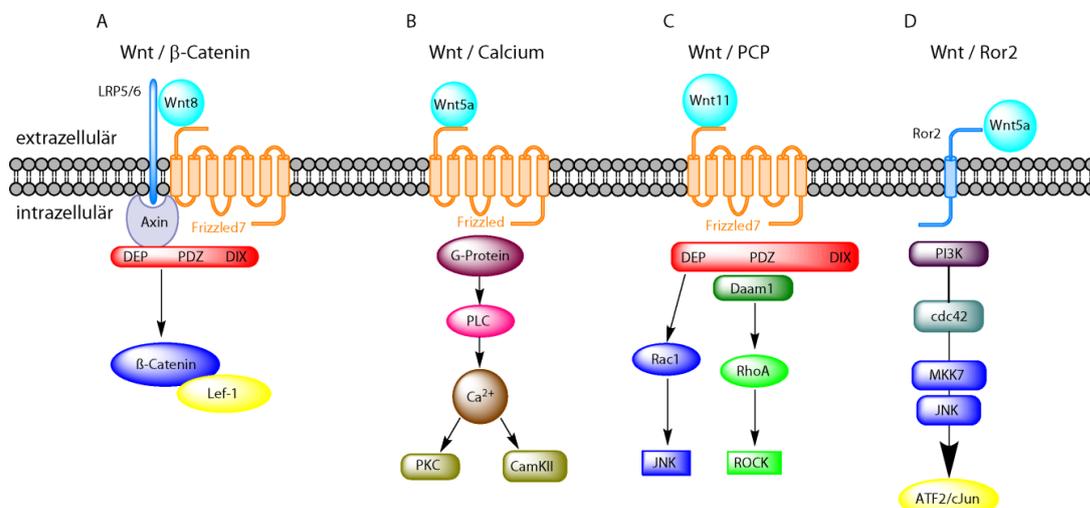
Wnt-Moleküle bilden eine evolutionär hoch konservierte Familie von Signalmolekülen (Rijsewijk et al., 1987). In *Xenopus* konnten 16 Wnt Gene identifiziert werden (The Wnt Gene Homepage). Ursprünglich wurden die Wnt-Moleküle anhand von Schlüsselexperimenten in zwei Klassen eingeteilt: kanonische und nicht-kanonische Wnt-Moleküle. Die Wnts der unterschiedlichen Klassen schalten im Inneren der Zelle verschiedene Signalkaskaden an. Der Gruppe der kanonischen Wnt Moleküle wurden Wnts zugeordnet, die zum Einen in der Lage waren die Zellmorphologie von C57MG Zellen von einer kubischen zu einer spindelförmigen Morphologie zu transformieren (Jue et al., 1992) und zum Anderen eine ektopische Achse in *Xenopus* Embryonen zu induzieren (McMahon and Moon, 1989; Sokol et al., 1991). Wohingegen diejenigen, die C57MG Zellen nicht transformieren konnten sowie keine sekundäre Achse induzierten, als nicht-kanonische Wnt-Moleküle bezeichnet wurden. Zu den kanonischen Wnts wird zum Beispiel Wnt1 gezählt, wohingegen Wnt5a und Wnt11 Vertreter der nicht-kanonischen Wnt-Moleküle darstellen (Rigo-Watermeier et al., 2012).

Nach heutigem Forschungsstand ist eine strikte Trennung zwischen kanonisch und nicht-kanonischen Wnt-Molekülen und der damit verbundenen Signaltransduktion nicht mehr sinnvoll. Bereits früh wurde nachgewiesen, dass die Entscheidung welcher Wnt-Signalweg tatsächlich aktiviert wird, häufig vom Zellkontext abhängt. So induzierte das nicht-kanonische Wnt5a, wenn es mit dem Fz5 Rezeptor koinjiziert wurde, eine sekundäre Achse und verhielt sich somit wie ein kanonisches Wnt (He et al., 1997). Darüber hinaus aktivierte Wnt5a in HEK293 Zellen, die eine Kombination der Rezeptoren Fz4/Lrp5 überexprimierten, den kanonischen Wnt Signalweg (Mikels and Nusse, 2006). Zudem aktivierte Wnt11 nicht ausschließlich nicht-kanonische Signalwege. Die Bildung der dorsoventralen Achse, durch Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade, wurde durch maternales Wnt11 initiiert (Tao et al., 2005). Diese Beispiele stützen die Hypothese, dass

die Aktivierung der unterschiedlichen Wnt-Signalwege wesentlich vom zellulären Kontext abhängt, und nicht ausschließlich in der Wnt Proteinsequenz verankert ist (Willert and Nusse, 2012). Obwohl es sich offensichtlich um ein Wnt-Signalnetzwerk handelt, wird zur Vereinfachung und zum Verständnis in kanonische und nicht-kanonische Wnt-Liganden und somit in kanonische und nicht-kanonische Signaltransduktion unterschieden.

## 1.2. Das Wnt-Signalnetzwerk

Die Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Wnt-Signalwege, nicht als einzelne, getrennt voneinander agierende Signalwege betrachtet werden können, sondern vielmehr als ein Signalnetzwerk, das weitreichend miteinander interagiert und sich gegenseitig beeinflusst (Kestler and Kuhl, 2008). Allen Wnt-Signalwegen ist gemeinsam, dass sie durch die Bindung eines Wnt-Moleküls an einen Rezeptor der Frizzled (Fz) Familie aktiviert werden (Abbildung 1.1). Die Fz Rezeptoren bestehen aus einer aminoterminalen Cystein reiche Domäne (CRD) sowie 7 Transmembrandomänen und einem kleinen cytoplasmatischen Anteil, der ein PDZ Bindungsmotiv enthält (Bhanot et al., 1996). Phylogenetisch gesehen gehören die Fz Rezeptoren zu der großen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Bjarnadottir et al., 2006).



**Abbildung 1.1: Das Wnt-Signalnetzwerk**

(A) Die Wnt/β-Catenin Signalkaskade wird durch die Bindung von Wnt8 an Fz7 und den Korezeptor Lrp5/6 aktiviert. Durch die Aktivierung von Dsh rekrutiert Lrp5/6 Axin. Dadurch wird β-Catenin stabilisiert und bindet im Zellkern den Transkriptionsfaktor Lef-1, dies führt zur Zielgenaktivierung. Das nicht-kanonische Signalnetzwerk umfasst den (B) Wnt/Calcium, den (C) Wnt/PCP und (D) Wnt/Ror2 Signalweg. (B) Die Aktivierung der Wnt/Calcium Signalkaskade führt über G-Proteine und PLC zur transienten Ausschüttung von  $Ca^{2+}$  und dadurch zur Aktivierung von PKC und CamKII. (C) Wnt11 aktiviert den Wnt/PCP Signalweg, wodurch Dsh (DEP Domäne) über Rac1 JNK aktiviert. Die Bindung von Daam1 an Dsh (PDZ Domäne) führt zur Aktivierung von RhoA und dessen Effektorprotein Rock. (D) Wnt5a aktiviert zusammen mit Ror2 über eine intrazelluläre Signalkaskade PI3K, cdc42, Mkk7 und JNK den Transkriptionsfaktor ATF2.

### 1.2.1 Kanonischer Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg ist der am besten erforschte Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes. Dieser reguliert Prozesse wie Zellproliferation, Zellschicksal und Stammzellen Erneuerung (Reya et al., 2003; Willert et al., 2003).

In Abwesenheit der Wnt-Liganden bildet sich der Degradationskomplex, der die Glykogensynthetase Kinase 3 (GSK3), Casein Kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), Axin und Adenomatous Polyposis Coli (APC) umfasst. Die beiden Kinasen GSK3 $\beta$  und CK1 $\alpha$  des Degradationskomplexes phosphorylieren  $\beta$ -Catenin, wodurch es durch die SKP1-cullin 1-F-box E3 Ligase erkannt werden kann und ubiquitiniert wird. Dadurch ist  $\beta$ -Catenin für die Degradation am 26S Proteasom markiert (Kimelman and Xu, 2006).

Durch die Interaktion der Wnt-Liganden mit dem Fz Rezeptor und seinem Korezeptor Lrp 5/6 (*low density lipoprotein receptor-related protein*) wird Dishevelled (Dsh) aktiviert (Abbildung 1.1A). Daraufhin wird Axin von Lrp5/6 rekrutiert (Tamai et al., 2004). Da davon ausgegangen wird, dass das Axin Level in den Zellen gering ist, steht dieses aufgrund der Rekrutierung an Lrp5/6 nicht mehr für die Bildung des Degradationskomplexes zur Verfügung. Dadurch wird  $\beta$ -Catenin nicht mehr phosphoryliert und ist somit im Cytoplasma stabilisiert.  $\beta$ -Catenin wird in den Zellkern transportiert (Angers and Moon, 2009) und bindet dort an die Transkriptionsfaktoren Lymphoid Enhancer-binding Factor (Lef) und T Cell Factor (Tcf) und reguliert als Koaktivator die Zielgenexpression (Arce et al., 2006; Hoppler and Kavanagh, 2007).

Ausschlaggebend für die Signalwegaktivierung ist die Bildung von Signalosomen. Dabei induziert Wnt die Bildung von Clustern aus Fz, Lrp6 und Dsh. Wobei Dsh zum Einen die Aggregation in größere Cluster fördert, zum Anderen eine signalwegaktivierende Phosphorylierung von Lrp6. An diese Plattform wird Axin rekrutiert und es kommt zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin (Bilic et al., 2007).

Darüber hinaus werden die gebildeten Wnt Rezeptor Komplexe Caveolin-abhängig endocytisiert (Bilic et al., 2007). Die Endocytose wird durch die Phosphorylierung von Lrp6 durch CK1 $\gamma$  und GSK3 initiiert (MacDonald et al., 2009). Der Wnt Rezeptor Komplex bindet im Cytoplasma Komponenten des  $\beta$ -Catenin Degradationskomplex. Durch Reifung der frühen Endosomen in multivesikuläre Endosomen kommt es zur Internalisierung der Wnt Rezeptor Komplexe. Dadurch wird GSK3 in intraluminalen Vesikeln vom Cytosol abgesondert. Neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin wird somit im Cytosol stabilisiert. Die Absonderung von GSK3 in multivesikulären Endosomen ist wichtig für die anhaltende Signalweiterleitung des kanonischen Wnt-Signals (Taelman et al., 2010).

## 1.2.2 Nicht-kanonisches Wnt Signalnetzwerk

Das nicht-kanonische Wnt-Signalnetzwerk wird in mehrere Zweige unterteilt, ihnen gemeinsam ist, dass ihre Signaltransduktion  $\beta$ -Catenin unabhängig ist (Abbildung 1.1B,C,D). Diese Signalwege regulieren die Zellmigration und Zellpolarität und haben somit einen Einfluss auf die Zellmorphologie (van Amerongen, 2012).

### 1.2.2.1 Wnt/Calcium Signalweg

Die Aktivierung des Wnt/Calcium Signalweges führt zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium (Abbildung 1.1B). Die Freisetzung des intrazellulären Calciums ist abhängig von heterotrimeren G-Proteinen und der Aktivierung der Phosphatidylinositol Kaskade (Ma and Wang, 2006; Slusarski et al., 1997). Das Calcium aktiviert die Calcium abhängigen Proteine Proteinkinase C (PKC) und Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CamKII) (Kuhl et al., 2000; Slusarski et al., 1997). Die Aktivierung des Wnt/Calcium Signalweges wird häufig mit Wnt5a assoziiert, wobei in Zebrafisch gezeigt wurde, dass sowohl die Injektion von Wnt5a, als auch Wnt11 zu einer transienten Freisetzung von Calcium führt (Slusarski et al., 1997; Westfall et al., 2003).

Epistasis Experimente in *Xenopus* zeigten, dass die durch den Wnt/Calcium Signalweg aktivierte PKC entscheidend für die Bildung der Brachet's Cleft ist. Durch die Bildung der Brachet's Cleft in der Gastrulation wird das involutierende Mesoderm vom darüber liegenden Ektoderm getrennt. Dadurch kann das involutierende Mesoderm entlang des Blastocoeldachs migrieren. Durch den Knockdown von Fz7 wird das Gewebe während der Gastrulation nicht mehr getrennt, durch eine Koinjektion von PKC wird die Brachet's Cleft wieder gebildet (Winklbauer et al., 2001).

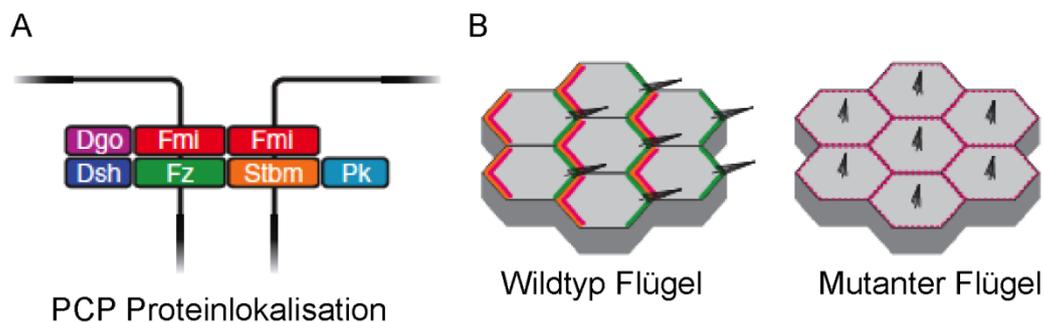
### 1.2.2.2 Wnt/PCP Signalweg

Als planare Zellpolarität bezeichnet man die polare Ausrichtung innerhalb einer zweidimensionalen Fläche. Bekannte Beispiele hierfür sind die Ausrichtung der Haarsinneszellen im Innenohr und die nach distal zeigenden Trichome auf den Flügeln von *Drosophila*. Im *Drosophila* Flügel sind die Proteine der planaren Zellpolarität, von der frühen Flügelentwicklung an, asymmetrisch über die Membran verteilt.

Der planare Zellpolarität (PCP) Signalweg wurde umfassend in *Drosophila* erforscht. Dort konnte auch die polare Lokalisation wichtiger Signalwegkomponenten des PCP Signalweges gezeigt werden (Abbildung 1.2A). Fz ist zusammen mit den cytosolischen Proteinen Dsh und Diego distal lokalisiert (Axelrod, 2001; Feiguin et al., 2001; Strutt, 2001), während das Transmembranprotein Strabismus (Stbm) und das cytosolische Prickle (Pk) auf proximal begrenzt sind (Bastock et al., 2003; Tree et al., 2002). Das

sieben Transmembran Cadherin Flamingo hingegen ist distal und proximal vorhanden (Chen et al., 2008).

Der Funktionsverlust eines der PCP Kernproteine resultiert in Trichome, die in der Mitte des Flügels lokalisiert sind, im Gegensatz zur distalen Lokalisation im Wildtyp (Abbildung 1.2B) (Wong and Adler, 1993). Über die Etablierung und Aufrechterhaltung der polaren Lokalisation der PCP Proteine wurden eine Vielzahl von Modellen aufgestellt. Heute wird davon ausgegangen, dass die polare Lokalisation innerhalb der Zelle durch einen intrazellulären Feedbackmechanismus zwischen den proximal und distal lokalisierten Proteinen etabliert wird (Tree et al., 2002). Wohingegen die asymmetrische Zell-Zell Koordination auf die Bildung von asymmetrischen Zell-Zell Kontakten beruht (Chen et al., 2008; Wu and Mlodzik, 2008). Wie aber die Polarität über den ganzen Flügel etabliert wird, konnte bis heute nicht beantwortet werden. Der globale Signalgeber wurde noch nicht identifiziert, wobei Wnt-Moleküle als globaler Signalgeber ausgeschlossen werden konnten, da in den Flügeln manipulierter *Drosophila* trotz Wnt Funktionsverlustes die Polarität ausgebildet wurde (Chen et al., 2008). Aus diesem Grund kann in *Drosophila* ausschließlich von einem PCP Signalweg gesprochen werden.



**Abbildung 1.2: Lokalisation der PCP Proteine im *Drosophila* Flügel**

(A) Lokalisation der PCP Proteine an den Adhäsionsverbindungen in den epithelialen Zellen des *Drosophila* Flügels. Der asymmetrische Adhäsionskomplex wird gebildet zwischen den Transmembranproteinen Fmi, Fz und den cytosolischen Proteinen Dgo und Dsh und in der gegenüberliegenden Zellmembran den Transmembranproteinen Stbm und Fmi und dem cytosolischen Protein Pk. (B) Im Wildtyp Flügel werden die Trichome distal gebildet, wobei der Funktionsverlust der PCP-Proteine zu einer Trichombildung in der Mitte der Zelle führt. (Entnommen aus: Goodrich and Strutt (2011)).

Dass tatsächlich Wnt-Signalmoleküle die planare Zellpolarität regulieren, erschloss sich aus der Wnt-abhängigen Regulation der Gastrulation in *Xenopus*.

Planare Zellpolarität kann auch in dreidimensionalen Geweben ausgebildet werden, wie zum Beispiel während der konvergenten Extension im dorsalen Mesoderm von *Xenopus*. Wobei ausschließlich die Beteiligung von PCP Proteinen wie zum Beispiel Fz, Dsh und Stbm gezeigt werden konnte, aber nicht deren polare Lokalisation (Darken et al., 2002;

Djiane et al., 2000; Wallingford and Harland, 2001). Wohingegen in Zebrafisch die polare Lokalisation von Pk anterior und Dsh posterior während der konvergenten Extension nachgewiesen werden konnte (Yin et al., 2008). Essentiell für die Regulation der konvergenten Extension ist die Aktivierung der kleinen GTPasen RhoA und Rac durch Wnt11 und Fz (Habas et al., 2003; Habas et al., 2001). Die Aktivierung erfolgt über zwei distinkte Domänen von Dsh die DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) und PDZ (PSD-95, Discs-large, ZO-1) Domäne (Wallingford et al., 2000). Die Bindung von Daam1 (*Dishevelled associated activator of morphogenesis*) an die PDZ Domäne von Dsh führt zur Aktivierung von RhoA. Diese wiederum aktiviert die Rho-abhängige Kinase Rock (Habas et al., 2003; Marlow et al., 2002). Wohingegen über die Dsh DEP Domäne Rac aktiviert wird, welches das Effektorprotein JNK aktiviert (Habas et al., 2003; Li et al., 1999). Sowohl RhoA, als auch Rac werden für die Reorganisation des Aktincytoskeletts und die damit verbundenen Änderungen der Zellmorphologie, als Voraussetzung für die Migration, benötigt. Dabei ist Rac für das Ausbilden der Filopodien verantwortlich und RhoA für die Etablierung der bipolaren Zellmorphologie. Gemeinsam sorgen sie für die Ausbildung der Lamellipodien und die polare Orientierung der cytoplasmatischen Zellausläufer, ebenso wie eine dynamische Regulation dieser (Tahinci and Symes, 2003). Nicht nur das Aktincytoskelett ist wichtig während der konvergenten Extension, sondern auch die Wnt11 abhängige Polarisierung des Mikrotubulicytoskeletts (Kwan and Kirschner, 2005; Rigo-Watermeier et al., 2012).

Wie der Einfluss auf die Zellmigration und Zellmorphologie des Wnt/PCP Signalweges auf molekularer Ebene umgesetzt wird, ist nicht bekannt. Nicht umsonst wird dieser Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes nicht wie der Wnt/ $\beta$ -Catenin, Wnt/Calcium und Wnt/Ror2 nach einer spezifischen Komponente der Signaltransduktion benannt, sondern nach der Auswirkung seiner Aktivierung. Darüber hinaus sind keine spezifischen Zielgene in *Xenopus* bekannt, die durch den Wnt/PCP Signalweg reguliert werden.

### **1.2.2.3 Wnt/Ror2 Signalkaskade**

Auch der nicht-kanonische Wnt5a/Ror2 Signalweg wurde umfassend während der konvergenten Extension in *Xenopus* analysiert. In Mäusen wurde dieser Zweig bestätigt, denn Wnt5a und Ror2 defiziente Mäuse zeigten einen nahezu identischen Phänotyp (Oishi et al., 2003).

In *Xenopus* reguliert der Wnt5a/Ror2 Signalweg die Expression des Paraxialen Protocadherins (PAPC), welches für die Koordination der Zellpolarität verantwortlich ist (Schambony and Wedlich, 2007; Unterseher et al., 2004). Zur Regulation der Transkription werden unterhalb von Wnt5a/Ror2 folgende Komponenten aktiviert:

Phosphoinositide 3 Kinase (PI3K), cdc42 und MKK7 (Abbildung 1.1D). Dies führt zur Aktivierung der JNK Signalkaskade, wodurch die Transkriptionsfaktoren ATF2 und c-Jun aktiviert werden. Dabei ist der Wnt5a/Ror2 Signalweg klar vom Wnt5a/Calcium Signalweg zu trennen, da die Effektormoleküle dieser Signalkaskade CamKII und PKC keinen Einfluss auf die Modulation der PAPC Expression haben (Schambony and Wedlich, 2007). Ob Ror2 in diesem Kontext als alternativer Fz Rezeptor agiert oder zusätzlich als Korezeptor ist unklar. *In vitro* konnte eine direkte Bindung zwischen Wnt5a und der CRD Domäne von Ror2 gezeigt werden, (Mikels and Nusse, 2006; Oishi et al., 2003), für eine endgültige Aussage muss die Bindung *in vivo* bestätigt werden.

### 1.2.3 Modulatoren der Wnt Signaltransduktion

Nicht nur aufgrund der hohen Konservierung der Wnt-Fz Bindung, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass nicht-kanonische Wnt-Moleküle kontextabhängig die kanonische Wnt Signalkaskade aktivieren können, müssen weitere Faktoren an der Spezifizierung des Wnt Signales und der damit verbundenen Signaltransduktion beteiligt sein. Für den kanonischen Wnt Signalweg ist gezeigt, dass für dessen Aktivierung der Lrp5/6 Korezeptor benötigt wird (Tamai et al., 2000). Wie kommt es aber zur Spezifizierung des nicht-kanonischen Wnt Signals und damit zur Unterscheidung der nicht-kanonischen Wnt-Moleküle auf Ligand-Rezeptor Ebene?

Als Korezeptoren für nicht-kanonische Wnt Signalwege sind unter anderem Ror2 (Minami et al., 2010), PTK7 (Peradziryi et al., 2012) und Ryk (Kim et al., 2008) beschrieben. Inwiefern diese ausschließlich als Korezeptoren oder auch als alternative Rezeptoren agieren können, ist nicht bekannt. Ror2 besitzt wie Fz eine CRD Domäne (Masiakowski and Yancopoulos, 1998; Xu and Nusse, 1998), wohingegen Ryk eine WIF (*Wnt-inhibitory factor 1*) Domäne besitzt (Patthy, 2000). Für Ror2 und Ryk wurde gezeigt, dass sie an der konvergenten Extension beteiligt sind, wobei Ryk mit Wnt11 und Ror2 mit Wnt5a assoziiert wurde (Kim et al., 2008; Schambony and Wedlich, 2007). PTK7 ist ebenfalls ein Regulator der konvergenten Extension (Lu et al., 2004). Inwiefern diese Korezeptoren an der Spezifizierung des nicht-kanonischen Wnt Signals beteiligt sind, muss noch analysiert werden. Darüber hinaus ist Glypican 4, ein Heperansulfat Proteoglykan, als positiver Regulator des Wnt/PCP Signalweges beschrieben (Ohkawara et al., 2003).

Aber nicht nur die unterschiedliche Verwendung von Korezeptoren, sondern auch die Modulation durch Inhibitoren und Aktivatoren könnten eine Rolle bei der Spezifizierung spielen. Dabei wurde das sFRP Crescent als positiver Modulator des Wnt11/PCP Signalweges identifiziert (Shibata et al., 2005).

### 1.2.4 Vernetzungen innerhalb des Wnt-Signalnetzwerkes

In der Vergangenheit wurde davon ausgegangen, dass die Entscheidung welcher Wnt Signalweg aktiviert wird, in der Nutzung eines bestimmten Ligand-Rezeptor Paares begründet ist. Heute jedoch ist naheliegender, dass eine bestimmte Kombination von Wnt-Liganden, Fz Rezeptoren und Korezeptoren sowie intrazellulären Signalkomponenten die Spezifität bestimmen (Kestler and Kuhl, 2008).

Neben der schon beschriebenen Kontextabhängigkeit auf die Aktivierung des jeweiligen Signalweges, gibt es zahlreiche intrazelluläre Vernetzungspunkte zwischen den Wnt-Signalkaskaden. Das über Ror2 vermittelte Wnt5a Signal führt in vielen Fällen zu einer Hemmung der kanonischen Wnt-Signalkaskade (van Amerongen, 2012). Zum Beispiel kann die Induktion von Doppelachsen mit Wnt1 durch eine Wnt5a Koinjektion gehemmt werden (Torres et al., 1996). Dies könnte in der Aktivierung der JNK begründet sein, da diese nicht nur die Zellmigration der nicht-kanonischen Signalwege reguliert, sondern gleichzeitig den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg inhibiert (Liao et al., 2006). Darüber hinaus sind die Signalwegkomponenten nicht auf einen bestimmten Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes beschränkt. Dsh zum Beispiel wird für die Signalweiterleitung eines kanonischen und nicht-kanonischen Wnt Signals benötigt (Boutros et al., 1998; Sheldahl et al., 2003). Auch die G-Protein Untereinheit  $G\alpha_0$  scheint an der Weiterleitung des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt Signals beteiligt zu sein (Katanaev et al., 2005). Die Aktivierung von kleinen GTPasen ist nicht auf die nicht-kanonische Signalkaskade beschränkt, sondern für die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern wird ebenfalls aktives Rac1 benötigt (Wu et al., 2008). Die durch den kanonischen Signalweg regulierte Proteinkinase CK1 $\epsilon$  kann wiederum Ror2 aktivieren (Kani et al., 2004). Darüber hinaus scheint CK1 $\epsilon$  ebenfalls für den PCP Signalweg benötigt zu werden (Klein et al., 2006; Strutt et al., 2006).

Dies zeigt zum Einen, dass nicht nur Signalwegkomponenten gemeinsam genutzt werden, sondern die Signalkaskaden auch gegenseitig moduliert werden. Aus diesem Grund ist es schwierig ein Analysesystem zu finden, anhand dessen ausschließlich ein Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes untersucht werden kann.

### 1.2.5 Evolutive Konservierung der Wnt-Signalwege

Im Human- als auch Mausgenom wurden 19 Wnt Gene identifiziert, die in 13 Subfamilien eingeteilt werden können. Die evolutive Entwicklung der Wnt Signaltransduktion geht mindestens 500 Millionen Jahre zurück, da bereits Cnidarier eine Vielzahl an Wnt-Genen exprimieren (Chen et al., 2002; Chen et al., 2000; Kusserow et al., 2005). Aus *Nematostella* konnten 14 Wnt-Gene isoliert werden, die 12 der 13 Subfamilien repräsentieren. Dabei werden diese in einem aufeinanderfolgenden und teilweise

überlappenden Muster entlang der oralen-aboralen Achse exprimiert (Kusserow et al., 2005). Darüber hinaus wurden zahlreiche Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges und des nicht-kanonischen Signalweges im Genom von Cnidariern identifiziert (Guder et al., 2006). Bis heute konnten keine Wnt Gene in einzelligen Eukaryoten identifiziert werden (King et al., 2003).

Die heterologe Expression der nicht-kanonischen Nematostella (Nv) Wnt5a und Wnt11 hat gezeigt, dass diese eine inverse Funktion in *Xenopus* besitzen. Somit kann NvWnt5a spezifisch den Funktionsverlust von xWnt11 und NvWnt11 spezifisch den Funktionsverlust von xWnt5a retten. Darüber hinaus ist NvWnt1 in der Lage Doppelachsen zu induzieren (Rigo-Watermeier et al., 2012). Dies zeigt, dass bereits auf den NvWnts alle Strukturelemente vorliegen, um das ganze Spektrum an Wnt Signalwegen auch in Vertebraten anschalten zu können. Entsprechend ergab die Analyse der Strukturdaten der Kristallstruktur eine lange Koevolution von Wnt-Liganden und Fz Rezeptoren (Bazan et al., 2012).

### **1.2.6 Die Wnt 3D - Struktur gleicht keiner bisher bekannten Proteinstruktur**

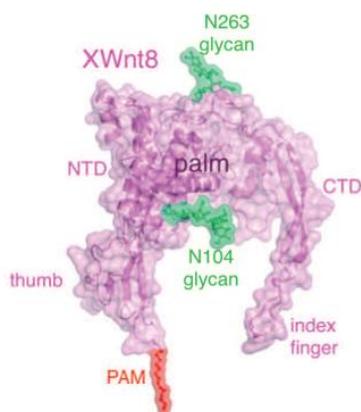
Bis heute ist noch kein Sequenzmotiv oder Strukturmerkmal bekannt, anhand dessen die Wnt-Moleküle als kanonisch oder nicht-kanonisch klassifiziert werden können. Stattdessen überwiegen strukturelle Gemeinsamkeiten und Sequenzhomologien, wie zum Beispiel 23 bis 24 Cysteinreste in hoch konserviertem Abstand. Über Disulfidbrückenbindungen, zwischen diesen Cysteinen, wird die Tertiärstruktur der Wnt-Moleküle etabliert (Janda et al., 2012).

Die Koexpression von xWnt8 mit mFz8-CRD im Komplex, ermöglichte es ausreichende Mengen an funktionalen Wnt-Molekülen aufzureinigen, um die Wnt Kristallstruktur entschlüsseln zu können (Janda et al., 2012). Weder die Struktur von xWnt8 noch die Bindung an die CRD von mFz8 ähnelt einer bisher bekannten Proteinstruktur oder einem bekannten Proteinkomplex. xWnt8 umfasst einen verlängerten Daumen (NTD) und einen Zeigefinger (CTD), die von einer zentralen Handfläche ausgehen. Die NTD besteht aus einer alpha-helikalen Domäne, die den Lipid modifizierten Daumen beinhaltet. Durch zahlreiche Cysteinreste in der CTD wird das, den Zeigefinger bildende,  $\beta$ -Faltblatt stabilisiert. Die Daumenspitze ist am Serin187 lipidmodifiziert (Abbildung 1.3). Dabei ist die Palmitoleinsäure kovalent gebunden (Takada et al., 2006).

Bildlich gesprochen hält xWnt8 die mFz8-CRD an zwei gegenüberliegenden Seiten im Pinzettengriff. Dabei schmiegt sich die Lipid-Daumen Struktur in eine hydrophobe Furche der CRD von Fz, wo sie mit 9 Resten interagiert und die Spalte in der CRD komplett ausfüllt. Die Bindung wird durch die Lipidgruppe dominiert. Darüber hinaus interagieren 4

Aminosäuren der Daumenschlaufe (Aminosäure 182-188) mit der Fz-CRD. Die treibende Kraft der Lipid/CRD Interaktion scheint zum Einen die hydrophobe Assoziation zu sein und zum Anderen die Oberflächenkomplementarität der beiden Interaktionspartner. Die Konservierung der hydrophoben Aminosäuren in der Fz-CRD, welche die Bindung zwischen der Acylgruppe und der CRD Domäne vermitteln, legen nahe, dass die Bindung zwischen der Fz-CRD und den Wnts konserviert ist. Die Lipid-Daumenstruktur wird als Bindestelle 1 bezeichnet. Auch die Bindestelle 2 (Zeigefinger) befindet sich in der Fz-CRD Domäne, allerdings auf der gegenüberliegenden Seite. Diese Interaktion wird ebenfalls von hydrophoben Resten vermittelt. Die relevanten Aminosäuren im C-Terminus des Wnt-Proteins sind hoch konserviert. Auf Rezeptorebene ist dieser Bereich weniger stark konserviert, was die Möglichkeit eröffnet, dass dieser Bereich für differentielle Affinitäten distinkter Ligand/Rezeptor Paare verantwortlich sein könnte.

Insgesamt spricht die hohe Konservierung der Bindungsstellen in der Fz-CRD und den Wnts dafür, dass es keinen Wnt-Fz Interaktionscode gibt, in dem einzelne Wnt-Liganden einem bestimmten Fz Rezeptor zugeordnet werden können. Der Fz7 Rezeptor aktiviert zum Beispiel sowohl den kanonischen, als auch den nicht-kanonischen Wnt Signalweg (Medina et al., 2000), dies liegt wahrscheinlich an der Rekrutierung, signalwegspezifischer Faktoren, wie zum Beispiel Korezeptoren.



**Abbildung 1.3: xWnt8 Kristallstruktur**

xWnt8 umfasst einen verlängerten Daumen (NTD) und einen Zeigefinger (CTD), die von einer zentralen Handfläche ausgehen. Die NTD besteht aus einer alpha-helikalen Domäne, die den Lipid modifizierten Daumen beinhaltet. Durch zahlreiche Cysteine-Reste in der CTD wird das, den Zeigefinger bildende,  $\beta$ -Faltblatt stabilisiert. Die Daumenspitze ist mit einer Palmitoleinsäure modifiziert (Entnommen aus: Janda et al. (2012)).

Neben den beiden Interaktionsstellen mit dem Rezeptor, wurde anhand der xWnt8 Kristallstruktur ein weiteres Strukturelement identifiziert. Diese Struktur wurde Pseudostelle 3 genannt und ist in drei Domänen unterteilt. Die physiologische Relevanz dieser Struktur konnte bisher nicht aufgeklärt werden, wobei die Autoren spekulierten, dass es sich um eine Oligomerisierungsstelle handeln könnte. Dieses Strukturelement ist im Gegensatz zu den Fz Bindestellen 1 und 2 nicht konserviert.

### 1.2.7 Die posttranslationale Modifikation funktionalisiert die Wnt-Moleküle

Die erste erfolgreiche Aufreinigung eines Wnt Proteins, durch das Labor von Roel Nusse, ließ lange auf sich warten, zeigte jedoch warum die Aufreinigung eine Herausforderung darstellte. Die Analyse des aufgereinigten mWnt3a Proteins ergab, dass dieses posttranslational lipidmodifiziert und daher schwer löslich in Wasser ist (Willert et al., 2003). Das konservierte Cystein77 in mWnt3a ist mittels einer Thioesterbindung palmitoyliert (Willert et al., 2003). Die Kristallstruktur von xWnt8 zeigte dagegen, dass dieses Cystein eine Disulfidbrückenbindung eingeht und an der Etablierung der räumlichen Struktur der Wnts beteiligt ist und somit nicht mit einer Fettsäure modifiziert werden kann (Janda et al., 2012). Die Modifikation am konservierten Serin209 in mWnt3a über eine Oxyesterbindung mit einer Palmitoleinsäure ist dagegen weniger umstritten (Takada et al., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass alle Wnt-Moleküle diese Lipidmodifikation besitzen. Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur von xWnt8 im Komplex mit mFz8 zeigte, dass die Palmitoleinsäure am Serin209 von zentraler Bedeutung für die Wnt-Fz Interaktion ist (Janda et al., 2012). Ob die Palmitoleinsäure Modifikation ebenfalls für eine erfolgreiche Sekretion benötigt wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Anhand der Mutation des Serins209 in ein Alanin im mWnt3a, konnte gezeigt werden, dass die Lipidmodifikation für eine erfolgreiche Sekretion benötigt wird, da das mutierte mWnt3a im Endoplasmatischen Retikulum verbleibt (Takada et al., 2006). Wohingegen die entsprechende Mutation im *Drosophila* Wingless (Wg) keinen Einfluss auf dessen Sekretion und Membranassoziation hatte (Franch-Marro et al., 2008a).

Die Mutation von Cystein77 resultiert, in Wnt3a, Wnt5a und Wg, in Wnt-Molekülen mit einer verringerten Aktivität (Franch-Marro et al., 2008a; Kurayoshi et al., 2007; Willert et al., 2003). Die Kristallstruktur von xWnt8 zeigte, dass alle Cysteine eine Disulfidbrückenbindung eingehen (Janda et al., 2012). Daher sind die Beobachtungen wohl nicht aufgrund einer fehlenden Lipidmodifikation, sondern beruhen vielmehr darauf, dass die Tertiärstruktur nicht vollständig etabliert werden konnte. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Wnt5a (Kurayoshi et al., 2007), Wnt3a (Komekado et al., 2007) und Wg (Franch-Marro et al., 2008a), bei denen das konservierte C77 mutiert wurde, nicht an Fz Rezeptoren binden können. Trotz der offensichtlichen Diskrepanz ist das aufkommende Modell, dass die Acylierung der Wnt-Moleküle für deren erfolgreiche intrazelluläre Prozessierung und deren Signalaktivität benötigt wird (Willert and Nusse, 2012).

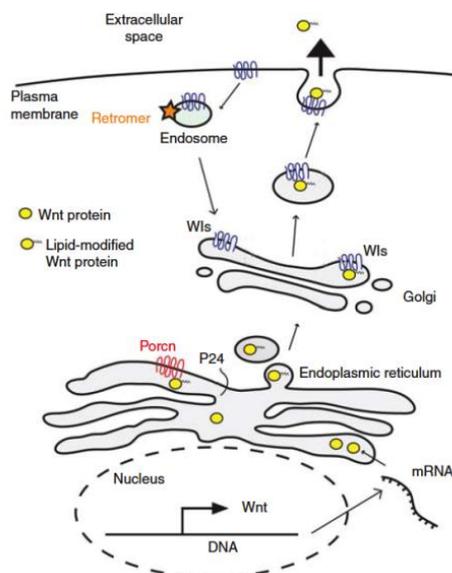
Über die Funktion der Glykosylierung der Wnt-Moleküle ist wenig bekannt. Nicht alle Wnt-Moleküle tragen die gleiche Anzahl an N-Glykosylierungen (Willert and Nusse, 2012). Bei *Drosophila* soll die N-Glykosylierung für die Sekretion und Aktivität von Wg keine Rolle

spielen (Tang et al., 2012). Wohingegen gezeigt wurde, dass die N-Glykosylierung wichtig für die Sekretion von Wnt5a, aber nicht für dessen Signalaktivität ist (Komekado et al., 2007; Kurayoshi et al., 2007).

Insgesamt ist die Notwendigkeit posttranslationaler Modifikationen der Wnt Moleküle unumstritten, ihre Bedeutung im Einzelnen, aber oft noch unklar.

### 1.2.8 Lipidmodifikation der Wnt-Moleküle beeinflusst den intrazellulären Transport und die Etablierung des Morphogengradienten

Das N-Terminale Signalpeptid markiert die Wnts für den sekretorischen Transportweg, der über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat mit der Sekretion der Wnt-Moleküle aus der Zelle endet (Abbildung 1.4). Die im Endoplasmatischen Retikulum membranständige O-Acetyltransferase Porcupine (Porcn) katalysiert das Anfügen der Palmitoleinsäure (Serin209) an die Wnt-Moleküle (Takada et al., 2006; Tanaka et al., 2000). Für den Export der Wnts aus dem Endoplasmatischen Retikulum wird p24 benötigt (Buechling et al., 2011; Port et al., 2011). Der Wnt Transport vom Golgi Apparat zur Zellmembran wird durch Evenness interrupted (Evi) eskortiert (Bartscherer et al., 2006). Das anschließende Recycling von Evi über den Retromer Komplex ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Wnt Sekretion (Belenkaya et al., 2008; Franch-Marro et al., 2008b).



**Abbildung 1.4: Wnt Sekretion**

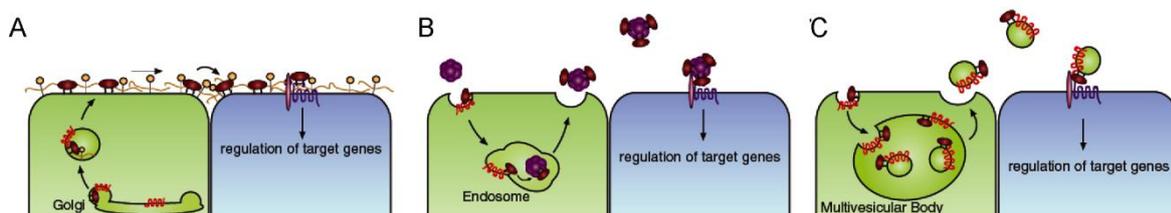
Wnt Proteine verlassen auf dem sekretorischen Transportweg die Zellen. Im Endoplasmatischen Retikulum werden die Wnt-Moleküle durch Porcn lipidmodifiziert. p24 wird für den Export der Wnt-Moleküle aus dem Endoplasmatischen Retikulum benötigt. Evi eskortiert die Wnt-Moleküle zur Zellmembran, wo diese sekretiert werden. Evi wird über den Retromer-Komplex recycelt. (Verändert nach Willert and Nüsse (2012))

Wnt-Proteine können aufgrund ihrer Lipidmodifikation vermutlich nicht durch den extrazellulären Raum diffundieren und wie hydrophile Proteine mittels Diffusion einen Morphogengradienten ausbilden. Trotzdem wurde in Embryonen gezeigt, dass Wnt-Proteine als Morphogene wirken (Kiecker and Niehrs, 2001). Wie die hydrophoben Wnt-

Proteine einen Morphogengradienten aufbauen war lange ein Rätsel. Heute gibt es eine Vielzahl von Studien und Modelle, die zeigen, wie es den Wnts ermöglicht wird, durch die extrazelluläre Matrix zu diffundieren.

Ein Modell beschreibt den Transport der Wnt-Moleküle direkt von Zelle zu Zelle (Abbildung 1.5A). Dabei handelt es sich um einen Mechanismus des *short range signaling*. Dieser Transport wird von den Heparansulfat Proteoglykanen auf der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix unterstützt. Heparansulfat Proteoglykane können Wnt-Proteine binden und verteilen (Yan and Lin, 2009).

Ein weiteres Modell besagt, dass Wnt Proteine durch die Bindung an hydrophile Partikel solubilisiert und somit diffusibel werden (Abbildung 1.5B). Tatsächlich konnten an Lipoproteinpartikel gebundene Wnt Moleküle identifiziert werden (Neumann et al., 2009; Panakova et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit stellt die Sekretion auf Exosomen dar. Dabei befinden sich die Wnt-Moleküle auf der Oberfläche der Exosomen und können somit auch als Exosomen gebundene Wnts Wnt-Signalkaskaden aktivieren (Abbildung 1.5C) (Gross et al., 2012). Sowohl der Transport an Lipoproteinpartikeln gebunden, als auch auf Exosomen ermöglicht es den Wnt Proteinen größere Distanzen zu überwinden. Diese Mechanismen verwirklichen das *long range signaling*. Wie die Wnts letztendlich transportiert werden, hängt wahrscheinlich vom zellulären Kontext ab.



**Abbildung 1.5: Modelle zur Ausbildung des Wnt Morphogengradienten**

(A) Das *short range signaling* wird durch den Transport der Wnt Moleküle mittels Heparansulfat Proteoglykane von Zelle zu Zelle verwirklicht. Größere Distanzen im extrazellulären Raum können Wnt-Proteine an (B) Lipoproteinpartikel gebunden oder (C) auf Exosomen überwinden und somit das *long range signaling* verwirklichen. (Entnommen aus Port and Basler (2010)).

### 1.3. Kollektive Zellmigration

Im Verlauf der Gastrulation, die zur Bildung der drei Keimblätter führt, setzt auch die Längsstreckung des Embryos ein. Sie basiert auf einer kollektiven Zellwanderung, gekennzeichnet durch weitreichende Veränderungen in der Zelladhäsion und Zellpolarität und führt letztendlich zur konvergenten Extension, der Verschmälerung und Streckung eines Gewebes. Dabei handelt es sich um einen biomechanischen Prozess (Keller et al., 2003).

### 1.3.1 Die konvergente Extension führt zu einer Streckung der anterioren-posterioren Körperachse

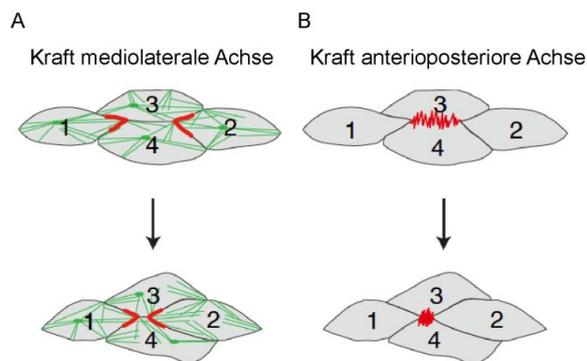
Im involutierten Mesoderm und dem darüber liegenden Neuroektoderm findet die konvergente Extension statt, eine Wanderungsbewegung, die das Gewebe in ihrer mediolateralen Dimension verschmälert, wobei es gleichzeitig in der anterior-posterioren Dimension verlängert wird. Darüber hinaus treibt die konvergente Extension die Involution des Mesoderms an und führt zu einem asymmetrischen Blastoporuschluss (Keller et al., 2003). Diese Bewegungen sind allgegenwärtig in der Entwicklung von Vielzellern, wie bei der Keimbandverlängerung in *Drosophila* (Irvine and Wieschaus, 1994) und der Verlängerung des dorsalen, axialen Gewebes von Vertebraten (Keller et al., 2000).

Die konvergente Extension ist eine autonome und aktiv Kraft produzierende Bewegung. Sowohl mesendodermale Explantate (Keller and Danilchik, 1988), als auch Explantate des neuralen Gewebes (Elul and Keller, 2000) führen diese Bewegung, unabhängig von einem externen Substrat oder Signalen aus dem Embryo, aus.

Nach der Einwanderung werden die ursprünglich multipolaren Zellen des dorsalen Mesoderms polarisiert und zeigen dann eine typische bipolare Morphologie. Nicht nur die Zellmorphologie wird polarisiert, sondern auch die protrusive Aktivität. Es bilden sich Lamellipodien an den medialen und lateralen Enden der Zellen. Die medialen und lateralen Zellausläufer scheinen Kraft auf die benachbarten Zellen auszuüben und rufen dadurch Spannungen in der mediolateralen Achse hervor (Abbildung 1.6A). Dadurch interkalieren die Zellen. Dies resultiert sowohl in einer mediolateralen Verschmälерung (Konvergenz), als auch einer anterioren-posterioren Elongation (Extension) (Keller et al., 2000; Keller et al., 1992). Ein Schwachpunkt dieses Modells ist, dass die Zellen gleichzeitig eine Kraft ausüben und migrieren, aber auch als Substrat für weitere Zellen dienen, die wiederum eine Kraft ausüben. Bei dem bisher angenommenen Mechanismus wird die Kraft an den medialen und lateralen Zellausläufern produziert.

Wohingegen kürzlich Shindo and Wallingford (2014) zeigten, dass die Kraft durch aktive Verkürzung der anterior-posterioren Membran produziert wird (Abbildung 1.6B). Dabei sind Aktin und Myosin in den anterior-posterioren Zellkontakten konzentriert. Dadurch kommt es zu einer Kontraktion an diesen Zellkontakten, was in einer Verkürzung der Membranen resultiert. Durch diesen Mechanismus wird eine aktive Kraft erzeugt, welche die mediolaterale Zellinterkalation antreibt. Das PCP Protein Septin7 vermittelt dabei die Konzentrierung von Aktin/Myosin in den anterior-posterioren Zellkontakten. Die Konzentrierung ist die Voraussetzung für die Verkürzung und Septin7 nimmt somit eine zentrale Rolle in der konvergenten Extension ein (Shindo and Wallingford, 2014). Darüber hinaus kontrollieren PCP Proteine die konvergente Extension in Epithelzellen der

Vertebraten, wo die Zellinterkalation ebenfalls durch die Verkürzung der Zellverbindungen realisiert wird (Lienkamp et al., 2012; Nishimura et al., 2012). Dieser Mechanismus erinnert an die konvergente Extension während der Keimbandverlängerung in *Drosophila*, wobei dies ein Prozess ist, der unabhängig von bekannten PCP Proteinen abläuft (Bertet et al., 2004; Blankenship et al., 2006; Zallen and Wieschaus, 2004).

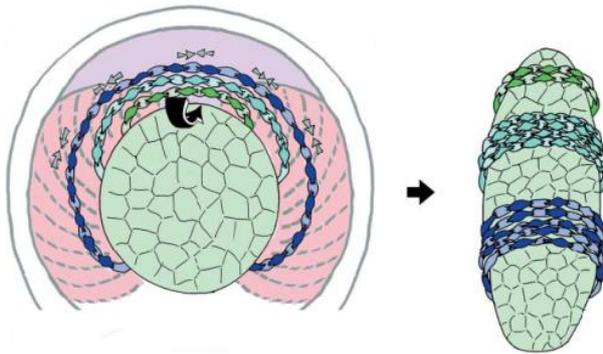


#### Abbildung 1.6: Modelle der konvergenten Extension

(A) Durch die Ausbildung von mediolateralen Zellausläufern entsteht eine Kraft auf der mediolateralen Achse, wodurch die Zellen des dorsalen Mesoderms interkalieren. (B) Durch aktives Verkürzen der vertikalen Zellmembran wird die mediolaterale Zellinterkalation angetrieben. (Entnommen aus Shindo and Wallingford (2014)).

### 1.3.2 Das mediolaterale Interkalationsverhalten ist verantwortlich für den Blastoporusschluss

Das Ende der Gastrulation ist gekennzeichnet durch den Schluss des Blastoporus. Das andauernde mediolaterale Interkalationsverhalten führt zu einer Umfangsspannung. Diese treibt zum Einen die Involution des Mesoderms und zum Anderen den asymmetrischen Schluss des Blastoporus an. Der Prozess der Interkalation wird von komplexen Zellbewegungen, die unter dem Begriff „mediolateral intercalation behaviour“ (MIB) zusammen gefasst werden, realisiert. Dies umfasst die Ausbildung der mediolateralen polarisierten Zellausläufer und die Zugkraft der Zellen aufeinander. Die mediolaterale Interkalation beginnt anterior und lateral im axialen und paraxialen Mesoderm und weitet sich nach medial und posterior aus (Domingo and Keller, 1995; Lane and Keller, 1997; Shih and Keller, 1992a; Shih and Keller, 1992b). Der Verlauf und mechanische Fortschritt der MIB kann anhand einer Serie von Bögen visualisiert werden (Abbildung 1.7). Dabei ist zu beachten, dass im Embryo das gesamte mesodermale Gewebe die MIB ausführt. Die Bögen, deren Enden am vegetalen Endoderm verankert sind, umspannen die dorsale Lippe. Durch die Konvergenz der Bögen wird eine Umfangsspannung erzeugt, was in einer Zugkraft resultiert, dadurch involutiert die Marginalzone. Die Konvergenz auf der dorsalen Seite resultiert in der anterior-posterioren Extension, wohingegen die Konvergenz auf der ventralen Seite zu weniger Extension, sondern vielmehr zu einer Verdickung des Gewebes führt. Dadurch kommt es zum Blastoporusschluss auf der ventralen Seite des Embryos (Keller and Shook, 2008).



**Abbildung 1.7 Interkalationsverhalten**

In der vegetalen Aufsicht können die bipolaren mesodermalen Zellen als eine Serie von Bögen visualisiert werden, die an beiden Enden in der Nähe des vegetalen Endoderms verankert sind. Durch Verkürzung dieser Bögen kommt es zur Involution des Mesoderms und zum Blastoporuschluss. (Entnommen aus: Keller et al. (2003))

#### 1.4. P APC beeinflusst die Zelladhäsion während der konvergenten Extension

Die Modulation der Adhäsion ist Voraussetzung für die Realisierung der konvergenten Extension in der Gastrulation. Die maternal exprimierten Zelladhäsionsmoleküle EP- oder C-Cadherin und XB- oder U-Cadherin vermitteln die Zell-Zelladhäsion in allen Geweben. Wobei C-Cadherin das vorherrschende Adhäsionsmolekül ist, das Zellen der Gastrula und Blastula miteinander verbindet (Heasman et al., 1994; Lee and Gumbiner, 1995).

C-Cadherine sind Membranproteine, die zur großen Familie der klassischen Cadherine gehören, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Zelladhäsion vermitteln. Die extrazelluläre Domäne der klassischen Cadherine besteht aus 5 extrazellulären Cadherindomänen (EC), zwischen denen jeweils  $\text{Ca}^{2+}$  Bindestellen lokalisiert sind (Niessen et al., 2011). Cadherine bilden an der Membran *cis* Dimere, durch die Interaktion zwischen der EC1 und EC2 Domäne, wodurch die Adhäsion verstärkt wird (Boggon et al., 2002; Briehner and Gumbiner, 1994). Wie die Cadherine *trans*, also zwischen den Zellen, miteinander interagieren und die Zelladhäsion vermitteln ist letztendlich nicht aufgeklärt. Derzeit wird ein Modell favorisiert, in dem eine schwache erste Interaktion über die EC1 essentiell ist für eine stärkere Interaktion über die EC3 Domäne. Dieses Modell stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Adhäsionsstärke zwischen den Ektodomänen mit der Dauer des Kontaktes zunimmt (Boggon et al., 2002; Niessen et al., 2011; Perret et al., 2004).

PAPC gehört zur Familie der Protocadherine, diese ist gekennzeichnet durch eine variable Anzahl von extrazellulären Cadherindomänen und einer nicht konservierten cytoplasmatischen Domäne (Frank and Kemler, 2002). PAPC besitzt sechs EC Domänen, an die cytoplasmatische Domäne binden in *Xenopus* ANR5 und Sprouty (Chung et al., 2007; Wang et al., 2008). PAPC ist ein Regulator der konvergenten Extension. Aber nicht aufgrund der Bildung homophiler *trans* Kontakte und der damit verbundenen Adhäsion zwischen den Zellen, sondern vielmehr durch die Verringerung der C-Cadherin vermittelten Adhäsion (Chen and Gumbiner, 2006). Auch eine Aktivin vermittelte Induktion

von mesodermalem Schicksal und konvergenter Extension, resultiert in einer schwächeren C-Cadherin vermittelten Adhäsion (Briehar and Gumbiner, 1994). Wohingegen ein Antikörper, der einen verstärkenden Effekt auf die C-Cadherin vermittelte Adhäsion ausübt, die konvergente Extension in Aktivin behandelten animalen Kappen inhibiert (Zhong et al., 1999). Darüber hinaus wird durch die Interaktion von Integrin mit Fibronectin die C-Cadherin Adhäsion vermindert während der konvergenten Extension (Marsden and DeSimone, 2003). Dies deutet darauf hin, dass eine Verminderung der C-Cadherin vermittelten Adhäsion, eine Voraussetzung für die konvergente Extension darstellt.

Darüber hinaus ist PAPC das Bindeglied zwischen Zelladhäsion und dem Wnt/PCP Signalweg während der konvergenten Extension. PAPC selbst besitzt eine intrinsische Signalaktivität und kann über RhoA JNK aktivieren. Dabei ist eine genaue Regulation von RhoA, sowohl durch PAPC als auch dem Wnt/PCP Signalweg wichtig, um die Gastrulationsbewegungen zu koordinieren und zu synchronisieren (Unterseher et al., 2004). Die PAPC Signalaktivität wird durch die cytoplasmatischen Effektorproteine ANR5 und Sprouty unterstützt (Chung et al., 2007; Medina et al., 2004). Durch die Bindung von Sprouty an PAPC kann dieses die Gastrulationsbewegung, durch die Hemmung der RhoA Aktivität, nicht mehr beeinträchtigen (Medina et al., 2004). Letztendlich ist der Mechanismus noch nicht entschlüsselt, mit dem PAPC die C-Cadherin vermittelte Adhäsion vermindert.

#### **1.4.1 Das Wnt-Signalnetzwerk während der konvergenten Extension**

Ein wichtiger Regulator der konvergenten Extension ist das Wnt-Signalnetzwerk. Die Etablierung der bipolaren Zellmorphologie und die anschließende Zellmigration erfordern eine ausgeklügelte molekulare Steuerung, die über die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege erfolgt. Interessanterweise führen die beiden Signalmoleküle xWnt11 und xWnt5a zu unterschiedlichen, nicht redundanten Effekten bezüglich der konvergenten Extension in *Xenopus* (Schambony and Wedlich, 2007). Dies bietet ein hervorragendes experimentelles System Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Wnt5a und Wnt11 abhängiger Regulation der konvergenten Extension zu analysieren.

Für vier Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes ist bisher beschrieben, dass sie einen Einfluss auf die konvergente Extension ausüben. Dabei scheint der Wnt11/PCP Signalweg vor allem die Ausrichtung des Mikrotubulocytoskeletts bei der Etablierung der bipolaren Zellmorphologie zu regulieren (Rigo-Watermeier et al., 2012). Der Wnt5a/Ror2 Signalweg dagegen steuert die mediolaterale Zellinterkalation der bipolaren Zellen des dorsalen Mesoderms. Die Effekte der Wnt5a/Ror2 Signalkaskade werden unter anderem durch die

Regulation der Expression von APC realisiert (Schambony and Wedlich, 2007; Unterseher et al., 2004).

Der Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges auf die Gastrulationsbewegungen scheint in wesentlichen Teilen auf der Regulation des  $\beta$ -Catenin abhängigen Wnt-Zielgens Xnr (Xenopus nodal related) 3 zu beruhen. Darüber hinaus inhibieren die durch den Wnt/Calcium Signalweg aktivierten Kinasen CamKII und PKC den kanonischen Wnt-Signalweg. Folglich ist die Regulation des Crosstalks zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin und dem Wnt/Calcium Signalweg wichtig für die konvergente Extension (Kuhl et al., 2001).

Die Wnt-Liganden xWnt5a und xWnt11 sind die wichtigsten Regulatoren der konvergenten Extension, da sie für die Etablierung der polaren Zellmorphologie zuständig sind und die anschließende Zellmigration zur dorsalen Mittellinie.

## 2. Zielsetzung

Aufgrund der intensiven und breitgefächerten Erforschung des Wnt-Signalnetzwerkes konnten zahlreiche Mechanismen und Komponenten der Signalkaskade entschlüsselt werden. Dabei stand weitestgehend der kanonische Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes im Vordergrund. Die vorliegende Arbeit fokussiert auf Unterschiede zwischen den nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 und darauf, worin diese Unterschiede auf zellulärer, molekularer und transkriptioneller Ebene begründet sind.

Um die Wnt-Moleküle mittels Lebendzellaufnahmen analysieren zu können, sollen Fluoreszenz-markierte nicht-kanonische Wnt Konstrukte erstellt und auf ihre Funktionalität getestet werden. Diese Fluoreszenz-markierten Konstrukte sollen zur Analyse der subzellulären Lokalisation der Liganden genutzt werden und für *in vivo* Bindungsstudien am Korezeptor Ror2.

Darüber hinaus soll untersucht werden ob Wnt11 und damit der Wnt/PCP Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes das Bindeglied zwischen P APC und der Verminderung der C-Cadherin vermittelten Adhäsion darstellt und damit über die Modulation der Zelladhäsion die konvergente Extension beeinflusst.

Die Aktivierung distinkter Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes liegt sicherlich in der unterschiedlichen Zusammensetzung von Ligand/Rezeptor/Korezeptor Komplexen. Um zu analysieren wie distinkte Liganden einzelne Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes aktivieren, sollen zahlreiche chimäre Konstrukte im Elongationsassay der dorsalen Marginalzone analysiert werden. Damit sollen Regionen/Domänen identifiziert werden, die für die Spezifizierung einzelner Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes verantwortlich sind. Darüber hinaus sollen mittels eines Microarrays, Zielgene identifiziert werden, die ausschließlich von Wnt5a oder Wnt11 reguliert werden. Damit würde erstmals gezeigt, dass distinkte Zweige des nicht-kanonischen Wnt-Signalnetzwerkes unterschiedliche Zielgene regulieren.

### 3. Material

#### 3.1. Antikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Quelle/Referenz
IgG	Maus	IP: 3 µg	New England Biolabs, Frankfurt am Main
α-C-Cadherin 6B6	Maus	IF: unverdünnt WB: unverdünnt	Hybridoma Zellkulturüberstand, DSHB Hybridoma Bank Iowa (Briehar and Gumbiner, 1994)
α-C-Cadherin	Kaninchen	WB: 1:10000	Carien Niessen, Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK), Uniklinik Köln
α-Fibronektin 6D9	Maus	IF: unverdünnt	Hybridoma Zellkulturüberstand, DSHB Hybridoma Bank Iowa
α-GFP	Huhn	WB: 1:2000	abcam, Cambridge, UK
α-GFP	Kaninchen	WB: 1:2000	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
α-HA	Maus	WB: 1:500	abcam, Cambridge, UK
α-myc 9E10	Maus	IP: 3 µg WB: unverdünnt	Hybridoma Zellkulturüberstand, DSHB Hybridoma Bank Iowa (Evan et al., 1985)
α-myc	Ziege	WB: 1:2000	abcam, Cambridge, UK
α-α-Tubulin	Maus	IF: 1:1000 WB: 1:2000	abcam, Cambridge, UK
α-β1 Integrin 8C8	Maus	IF: unverdünnt	Hybridoma Zellkulturüberstand, DSHB Hybridoma Bank Iowa
α-β-Catenin PGDS 7D12	Ratte	IF: unverdünnt	Ralph Rupp, Ludwigs-Maximilians-Universität München

**Tabelle 3.1 Primärantikörper**

In der Arbeit verwendete Primärantikörper mit der entsprechenden Verdünnung. IF=Immunfärbung, WB=Western Blot, IP=Immunopräzipitation

Name	Gerichtet gegen	Herkunft	Verdünnung	Quelle/Referenz
D-α-Huhn-AP	Huhn IgG, AP-konjugiert	Esel	WB: 1:2000	abcam, Cambridge, UK
G-α-Kaninchen-AP	Kaninchen IgG, AP-konjugiert	Ziege	WB: 1:2000	Dianova, Hamburg
G-α-Maus-AP	Maus IgG; AP-konjugiert	Ziege	WB: 1:2000	Dianova, Hamburg
G-α-Maus-Cy2	Maus IgG, Cy™-2 konjugiert	Ziege	IF: 1:400	Dianova, Hamburg
G-α-Maus-Cy3	Maus IgG, Cy™-3 konjugiert	Ziege	IF: 1:400	Dianova, Hamburg
G-α-Ratte-Cy3	Ratte IgG, Cy™-3 konjugiert	Ziege	IF: 1:400	Dianova, Hamburg
α-Digoxigenin-AP	Fab-Fragmente, AP-konjugiert	Schaf	ISH: 1:3000	Roche Applied Science, Mannheim

**Tabelle 3.2 Sekundärantikörper**

In der Arbeit verwendete Primärantikörper mit der entsprechenden Verdünnung. IF=Immunfärbung, WB=Western Blot, ISH=*in situ* Hybridisierung

### 3.2. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> ( $r_k^-$ $m_k^+$ ) <i>relA1 supE44 Δ(lac-proAB) F'</i> ( <i>traD36proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>lacZΔM15</i> )	Promega, Mannheim
NEB 5-alpha	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Tabelle 3.3 Bakterienstämme

### 3.3. Chemikalien

Die nicht aufgeführten Reagenzien wurden über AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.

Chemikalie	Bezugsquelle
2-log DNA Marker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
cOmplete Protease Inhibitor, EDTA-frei	Roche Applied Science, Mannheim
Desoxyribonukleotide	Promega GmbH, Mannheim
Dextran-FITC	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
DMEM High Glucose (4,5g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
FCS (Fetal Calf Serum)	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad, Hercules, USA
Magermilchpulver	Sucofin, TSI GmbH & Co. KG; Zeven
Midori Green Advance	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren
PageRuler™ Prestained Protein Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Pferdeserum	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Applied Science, Mannheim
Profinity™ IMAC Ni-charged Resin	BioRad Laboratories GmbH, Mannheim
RNA/later® RNA Stabilization Solution	ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
RNaseZap® RNase Decontamination Solution	ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
TransPass™ COS/HEK293 Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Trypsin EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Vivaspin15 Zentrifugalfiltereinheiten	Sartorius, Göttingen

Tabelle 3.4 Chemikalien

### 3.4. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PureLink <sup>™</sup> DNase	Invitrogen <sup>™</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Promega, Mannheim
RNase A	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	TAKARA BIO INC., Shiga, Japan
T4 DNA Polymerase	Promega, Mannheim
TSAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Promega, Mannheim

**Tabelle 3.5 Enzyme**

### 3.5. Kits

Kit	Bezugsquelle
Ambion mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit	Invitrogen <sup>™</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt
DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7)	Roche Applied Science, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science, Mannheim
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Applied Science, Mannheim
illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare, Solingen
Novagen <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Merck KGaA, Darmstadt
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey Nagel GmbH, Düren
PCR Mycoplasmen - Testkit	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNeasy <sup>®</sup> MinElut <sup>®</sup> Cleanup	Quiagen, Hilden
TNT <sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Mannheim
Transcend <sup>™</sup> t-RNA colorimetric non-radioactive translation detection system	Promega, Mannheim
TRizol <sup>®</sup> Plus RNA Purification Kit	Invitrogen <sup>™</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt

**Tabelle 3.6 Kits**

### 3.6. Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen mit A. bidest oder DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) H<sub>2</sub>O verdünnt. Nicht autoklavierbare Chemikalien, wie zum Beispiel Methanol, Glukose oder Tween 20 wurden bei Bedarf durch Sterilfiltration (Porendurchmesser 0,2 µm) entkeimt.

4% Paraformaldehyd / APBS	4 g Paraformaldehyd bei 55°C in 60 ml A. bidest. und 200 µl 1 M NaOH lösen und filtrieren, dann 10 ml 10x APBS hinzugeben und mit A. bidest auf 100 ml auffüllen; pH 7.4 mit NaOH oder HCl, Lagerung bei -20°C
Alkalischer Lyse Puffer (Minipräparation)	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Alkalischer Phosphatase Puffer (Western Blot)	100 mM Tris/HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl
Ampicillin Stammlösung (1000x)	100 mg/ml Ampicillin; Lagerung bei -20°C
APBS (10x)	27 mM KCl, 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.03 M NaCl, 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7.5 mit NaOH
APBS/CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub> in 1x APBS
APBS-T	0.1% (v/v) Triton X-100 in 1x APBS
Blot Blockierungspuffer	10% Magermilchpulver in TBS-T
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
BSA/MBSH	1% (w/v) BSA in 1x MBSH
CMFM (Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> freies Medium)	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 7.5 mM Tris; pH 7.6 mit HCl
Cysteinhydrochlorid Lösung	2% (w/v) Cysteinhydrochlorid in 0.1x MBSH; pH 8.0 mit NaOH
Cytochalasin D Stammlösung (1mM)	1 mg Cytochalasin D in 2 ml DMSO, Lagerung bei -20°C im Dunkeln. Gebrauchslösung (20 µM) in 1x MBSH/Pen/Strep
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Stammlösung: 1mg/ml DAPI in DMF, Lagerung bei -20°C im Dunkeln. Gebrauchslösung: Stammlösung 1:1000 in 1x APBS
Dent's Fixierlösung	20% (v/v) DMSO, 80% (v/v) Methanol
DEPC H <sub>2</sub> O	1 ml Diethylpyrocarbonat über Nacht in einem Liter A. bidest. schütteln und anschließend durch autoklavieren inaktivieren
DMEM-Einfriermedium	40% (v/v) DMEM-Komplettmedium, 40% (v/v) DMSO, 20% (v/v) inaktiviertes FCS; Lagerung -20°C
DMEM-Komplettmedium	89 % (v/v) DMEM High Glucose (4,5 g/l), 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x)
Elutionspuffer (Proteinaufreinigung)	500 mM Imidazol in 1x HBS
Frosch Betäubungslösung	2,5 g/l Aminobenzoesäure-Ethylester in A. bidest; pH 7.4 mit NaOH; Lagerung bei 4°C
HBS (1x)	10 mM HEPES, 150 mM NaCl; pH 7.5 mit NaOH
HeBS (10x)	1.36 M NaCl, 0.05 M KCl, 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2 M HEPES, 1% (w/v) Glukose; pH 7.1 mit NaOH
<i>in situ</i> Alkalischer Phosphatase Puffer	0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.1% (v/v) Tween 20
<i>in situ</i> Bleichlösung	20% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 5% Formamid, 0.5x SSC
<i>in situ</i> Blockierlösung	2% (w/v) BMB in 1x MAB
<i>in situ</i> Denhardt's Lösung (50x)	1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficoll
<i>in situ</i> Hybridisierungspuffer	50% (v/v) Formamid, 5x SSC, 1x Denhardt's Lösung, 1 mg/ml RNA, 100 µg/ml Heparin, 0.1% (w/v) CHAPs, 10 mM EDTA; auf 60°C erhitzen bis alles gelöst ist, Zugabe 0.1% Tween 20

<i>in situ</i> NBT/BCIP Färbelösung	1.5 µl NBT und 1.5 µl BCIP pro ml AP-Puffer
<i>in situ</i> PTW	1x PBS, 0.1% (v/v) Tween 20
<i>in situ</i> SSC (20x)	3 M NaCl, 0.3 M Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ; pH 7.0 mit HCl
<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
Kanamycin Stammlösung (1000x)	100 mg/ml Kanamycin; Lagerung bei -20°C
LB Agarplatten	1.5% (w/v) Agar in 1x LB-Medium, für selektive LB-Agarplatten entsprechendes Antibiotikum dazu geben
LB-Medium (5x)	5% (w/v) Trypton, 2.5% (w/v) Hefeextrakt, 5% (w/v) NaCl mit A. bidest. auffüllen; pH 7.5 mit NaOH
LuziAssay Puffer (1x)	33.3 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1.07 mM MgCO <sub>3</sub> *Mg(OH) <sub>2</sub> , 2.67 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Tricin
Luziferase Reagenz	2.12 mg CoenzymA-Trilitiumsaz-Dihydrat, 1.32 mg Beetle-Luziferin, 2.92 mg ATP in 10 ml LuziAssay Puffer lösen
LuziLyse (1x)	25 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.8), 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) TritonX-100
MAB (5x)	0.5 M Maleinsäure, 750 mM NaCl, pH 7.5 mit NaOH
Magnesium Lösung (100x)	0.1 M MgCl <sub>2</sub> , 4.5 M β-Mercaptoethanol
MBSH (10x)	880 mM NaCl, 100 mM HEPES, 10 mM KCl, 8.2 mM MgSO <sub>4</sub> , 24 mM NaHCO <sub>3</sub> , 4.1 mM CaCl <sub>2</sub> , 3.3 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; pH 7.4 mit NaOH
MEM (1x)	100 mM MOPS (pH 7.4), 2 mM EGTS, 1 mM MgSO <sub>4</sub>
MEMFA	3,7% (v/v) Formaldehyd in 1x MEM
MFM (1x)	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 7.5 mM Tris, 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7.6 mit HCl
MMR (10x)	1 M NaCl, 50 mM HEPES, 20 mM KCl, 20 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7.4
Mowiol/DABCO	6 g Glycerin und 2.4 g Mowiol in 6 ml sterilem H <sub>2</sub> O und 12 ml Tris/HCl (pH 7.8) laut Herstellerangaben lösen; 25 mg/ml DABCO hinzugeben, zentrifugieren 15 min bei 15000 g; Lagerung bei -20°C
NBT/BCIP Färbelösung für Western Blot	1.75 µl NBT und 3.5 µl BCIP pro ml Alkalischer Phosphatase Puffer
Neutralisationspuffer (Minipräparation)	2.8 M K-Acetat; pH 5.1 mit Eisessig
Nocodazol Stammlösung (10 mg/ml)	20 mg in 2ml DMSO lösen; Lagerung bei Raumtemperatur. Gebrauchslösung (15 µg/ml) in 1x MBSH/Pen/Strep.
NOP-Puffer (Cadherine)	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7.8), 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,75 mM CaCl <sub>2</sub> , 2% (v/v) NP40
ONPG-Substrat	4 mg/ml ONPG in 0.1 M NaPhosphat Puffer (pH 7.5)
Orange G DNA Ladepuffer (6x)	0.25% (w/v) Orange G, 40% (w/v) Saccharose in A. bidest., Lagerung bei 4°C
PBS (10x)	1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7.5
Resuspensionspuffer (Minipräparation)	50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 100 µg/ml RNase A
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	1% (w/v) SDS, 250 mM Tris, 1.92 M Glycin

SDS-Ladepuffer (5x)	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 12% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptopropandiol, 0.2% (w/v) Bromphenolblau
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 0.05% (w/v) NaCl, 0.25% (w/v) $MgCl_2$ , pH 7.0 mit NaOH; Lagerung bei -20°C
SOC-Medium	SOB-Medium mit 20 mM $MgCl_2$ , 20 mM $MgSO_4$ , 20 mM Glukose; Lagerung -20°C
Startpuffer (Proteinaufreinigung)	10 mM Imidazol in 1x HBS (pH 7.5)
TAE (50x)	2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0.1 M EDTA (pH 8.0)
TBS (10x)	500 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl
TBS-T	1x TBS, 0.1% (v/v) Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0)

Tabelle 3.7 Lösungen und Puffer

### 3.7. Morpholino *antisense* Oligonukleotide

Alle Morpholino *antisense* Oligonukleotide wurden von Gene Tools (Philomath, USA) bezogen.

Name	Sequenz	Referenz
xWnt11MO	5'-ccagtgacgggtcggagccattggt-3'	(Pandur et al., 2002)
xWnt5aMO	5'-ggtgcaaccagggcacaattacttt-3'	(Schambony and Wedlich, 2007)
Standard Control Oligo	5'-cctcttacctcagttacaatttata-3'	Gene Tools
xLefMO1	5'-tacggagtcgagagacctcgctccc-3'	(van Venrooy et al., 2008)
xLefMO2	5'-caagacctcgggtacggagtcgagag-3'	(van Venrooy et al., 2008)

Tabelle 3.8 Morpholinos

### 3.8. Primer/Oligonukleotide

Alle Primer wurden von biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert.

Name	Sequenz	Annealing Temperatur
ODC_fwd	5'-gccattgtgaagactctctccattc-3'	62°C
ODC_rev	5'-ttcgggtgattccttgccac-3'	62°C
PAPC_fwd	5'-cccagtcgggtctcttcttttg-3'	62°C
PAPC_rev	5'-ttgctgatgctgctcttggttag-3'	62°C

Tabelle 3.9 qRT-PCR Primer

Die zur Klonierung verwendeten Primer sind in Tabelle 8.1 im Anhang aufgelistet.

### 3.9. Vektoren

Vektor	Referenz
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
pGEM <sup>®</sup> -T Vector Systems	Promega, Mannheim
pCS2+	R. Rupp, München

**Tabelle 3.10: Klonierungsvektoren**

Konstrukt	Vektor	Referenz/Klonierung
EMTB-tomato	pCS2+	(Faire et al., 1999)
GAP43-GFP	pCS2+	(Kim et al., 1998)
GAP43-mCherry	pCS2+	(Kraft et al., 2012)
H2B-mCherry	pCS2+	(Kraft et al., 2012)
Sep2-GFP	pCS107	(Kim et al., 2010)
xC-Cadherin-eGFP	pCDNA3.1(+)	(Ogata et al., 2007)
xC-Cadherin-myc-YC	pCS2+	(Kraft et al., 2012)
xC-Cadherin-myc-YN	pCS2+	(Kraft et al., 2012)
xFz7	pCS2+	(Medina et al., 2000)
xFz7-myc	pCS2+	(Medina et al., 2000)
xLef-ΔHMG	psp64T	(Behrens et al., 1996)
xPAPC-3xHA	pCS2+	(Kraft et al., 2012)
xPAPC-6xmyc	pCS2+	(Kraft et al., 2012)
xPk-eGFP	pCS2+	xPk wurde aus xPk_pCS107 (Wallingford et al., 2002) amplifiziert und über Clal und BamHI in eGFP_pCS2+ kloniert
xRor2-mCherry	pCS2+	(Feike et al., 2010)
xWnt11	pCS2+	(Du et al., 1995)
xWnt11-eGFP	pCS2+	xWnt11 ORF wurde mit eGFP ORF fusioniert und über EcoRI und XhoI in pCS2+ kloniert
xWnt5a	pCS2+	(Moon et al., 1993)
xWnt5a-eGFP	pCS2+	xWnt5a ORF wurde mit eGFP ORF fusioniert und über XhoI in pCS2+ kloniert
xWnt8a	pCS2+	xWnt8a ORF wurde über EcoRI in pCS2+ kloniert
xWnt8a/11	pCS2+	Tina Klessing, Bachelorarbeit
xWnt11/8a	pCS2+	Bianca Kraft, Karlsruhe
xWnt5a_B1/11_B2	pCS2+	Tina Klessing, Bachelorarbeit
xWnt11_B1/5a_B2	pCS2+	Bianca Kraft, Karlsruhe
xWnt5a_P3/11_B1	pCS2+	Fusions-PCR zur Chimären Erstellung, über EcoRI und XhoI in pCS2+ (siehe Anhang)
xWnt11_P3/5a_B1	pCS2+	Fusions-PCR zur Chimären Erstellung, über EcoRI und XhoI in pCS2+ (siehe Anhang)
xWnt5a_P3-2/11_P3-3	pCS2+	Fusions-PCR zur Chimären Erstellung, über EcoRI und XhoI in pCS2+ (siehe Anhang)
xWnt11_P3-2/5a_P3-3	pCS2+	Fusions-PCR zur Chimären Erstellung, über EcoRI und XhoI in pCS2+ (siehe Anhang)
xWnt5a_P3-1/11_P3-2	pCS2+	Fusions-PCR zur Chimären Erstellung, über EcoRI und XhoI in pCS2+ (siehe Anhang)
xWnt11_P3-1/5a_p3-2	pCS2+	Fusions-PCR zur Chimären Erstellung, über EcoRI und XhoI in pCS2+ (siehe Anhang)

**Tabelle 3.11 Konstrukte zur mRNA Synthese**

Konstrukt	Vektor	Referenz/Klonierung
xBra	pSP72	(Medina et al., 2000)
xChordin_Klon59	pBluescriptSK	(Sasai et al., 1994)

Tabelle 3.12: Konstrukte für die *in situ* Hybridisierung

### 3.10. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK 293	menschliche embryonale Nierenzellen

Tabelle 3.13 Zelllinien

### 3.11. Geräte

Embryologie	
Kühlinkubator Model MIR-254	SANYO Electric Co., Ltd., München
Mikro-Druckinjektor Model PV 820	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Mikromanipulator, Model M1	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Mikropipettenpuller Model P-97	Sutter Instrument Company, Novato USA
Stereomikroskop MIC 1639 ZS, ausgestattet mit EUROMEX Kaltlichtleuchte EK-1	EUROMEX Mikroskope BV, Arnheim, Niederlande

Zellkultur	
Begasungsbrutschrank für Zellkultur Series II Water Jacketed CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kühltischzentrifuge Hettich Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Medingen Wasserbad WB 12	PD-Industriegesellschaft mbH, Dresden
Sterilbank Microflow 2 Advanced Bio Safety Cabinet Class II	Bioquell Ltd, Hampshire, UK
Stickstofftank Thermo Cytotechnics Biorack 5400	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Vakuumpumpe Laboport N811KT.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg

Mikroskopie	
Spinning Disk Mikroskop Cell Observer SD, ausgestattet mit inversen Mikroskop Axio Observer.Z1, konfokale Bildaufnahme Yokogawa CSU-X1, drei Laserlinien (405, 288, 532/561 nm), Digitalkamera AxioCam MRm, Definite Focus, Uniblitz, Model VCM-D1 und externer Fluoreszenz Lichtquelle HXP 120	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
digitales Fluoreszenz-Stereomikroskop Leica MZ10F, ausgestattet mit externer Leica Kaltlichtquelle KL 1500 LCD, externer Fluoreszenz Lichtquelle Leica EL6000 und Digitalkamera Retiga EXi Fast 1394 Color 12 bit	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

<b>Proteinaufreinigung</b>	
Chromatographie-Säulen Serie ECOplus (TAC15/125PE0-AB-1)	KronLab Chromatographie Technology, Dinslaken
BioLogic HR Chromatography System ausgestattet mit BioLogic Workstation, Fraction Collection Model 2128	Bio-Rad Laboratories, München
<b>Sonstige Geräte</b>	
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Blot-Apparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Brutschrank APT.line™ Serie BD/ED/FD	Binder GmbH, Tuttlingen
Colibri Microvolume Spectrometer	Titertek-Berthold, Pforzheim
Eppendorf® Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf® Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Flachbettelektrophoresekammern Perfect Blue™ Minigelsysteme	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Folienschweißgerät SEVERIN Folie	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Geldokumentationsanlage Gel Max mit monochromen Videoprinter Mitsubishi P91 D und Fisher Bioblock Scientific UV-Tisch	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Luminometer Lumat LB 9507	Bethold Technologies, Bad Wildbad
Mini-Protean® 3 Cell/PowerPac 200/300 Stromversorgung	Bio-Rad Laboratories, München
Mini-Protean® 3 Elektrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, München
PCR Cycler, iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, Laboratories, München
Plattformschüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Präzision-pH-mV-Meter pH521	WTW GmbH, Weilheim
Sartorius Analysewaage BP 221S	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius Präzisionswaage PT 310	Sartorius AG, Göttingen
Sterilbank Microflow 2 Advanced Bio Safety Cabinet Class II	Bioquell Ltd, Hampshire, UK
Tischkühlzentrifuge Eppendorf™ 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Tischschüttelinkubator, Forma Optical Shaker Model 420	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Überkopf-Rotator INTELLI-MIXER RM-2	ELMI Ltd., Riga, Litauen
UV/Visible Spectrophotometer, Ultospec™ 2100 pro	Amersham Bioscience, Freiburg
Wasserbad Modell WNB 7	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach

### 3.12. Software

<b>Verwendete Software</b>	
2100 Expert Version 2.8.0.520	Agilent Technologies, Waldbronn
Adobe Illustrator CS5 Version 15.1.0	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Photoshop CS5 Extended Version 12.0	Adobe Systems GmbH, München
ApE - A Plasmid Editor V1.12	M. Wayne Davis
AxioVision Release 4.8.2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
BioLogic HR System Software	Bio-Rad-Laboratories, München

---

ChemBioDraw Ultra Version 13.0.2.3021	PerkinElmer Inc., Rodgau
Fiji 1.48v	W. Rasband, USA
IBM SPSS Statistics Version 21	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
ImageJ 1.45s	W. Rasband, USA
MATLAB R2012a	MathWorks, Ismaning
Microsoft Excel 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Word 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Openlab 5.5.0	PerkinElmer Inc., Rodgau

---

## **4. Methoden**

### **4.1. Entwicklungsbiologische Methoden**

#### **4.1.1 Tierhaltung**

Die adulten *Xenopus* werden nach Geschlechtern getrennt, in 50 l Aquarien, bei einer Wassertemperatur von 20°C gehalten. Das Anlagenwasser wird mit einem Bakterienfilter und zusätzlicher UV-Bestrahlung entkeimt. Der Tag-Nacht Rhythmus ist automatisch gesteuert und ist auf 12 Stunden Licht pro Tag eingestellt. Die Tiere bekommen je einmal die Woche zerkleinertes Rinderherz und Fertigfutter in Form von Pellets.

Nach der Eiablage werden die Weibchen über Nacht in Salzwasser (30g/10l) gesetzt, um Hautreizungen und Infektionen vorzubeugen.

#### **4.1.2 Testisextraktion und Eiablage**

Die männlichen *Xenopus* werden in kalter 0.25% (v/v) Aminobenzoesäure-Ethylester-Lösung vor der Testisextraktion betäubt. Nach 30 min kann das Tier schmerzfrei mittels Durchtrennung der Halswirbelsäule getötet werden. Die Bauchdecke wird mit einem medianen Schnitt geöffnet und die Hoden, welche im dorsalen Fettgewebe ventral der Nieren liegen, entnommen. Der Hoden kann für 5 Tage in sterilem 1x MBSH bei 4°C gelagert werden.

Die Eireifung der weiblichen *Xenopus* wird durch Injektion des Schwangerschaftshormons hCG (humanes Choriongonadotropin) in den Lymphsack induziert. Injektion von 600 Einheiten hCG induziert die Eiablage in 14-16 Stunden. Soll hingegen die Eiablage erst 20-22 Stunden nach der ersten Injektion erfolgen, injiziert man zunächst 50 Einheiten und nochmals 600 Einheiten 5-6 Stunden vor der Eiablage. Zur Eiablage werden die Weibchen im sogenannten Froschgriff gehalten und die Lendenregion sanft massiert, wobei die Bewegung immer Richtung Kloake ausgeführt wird. Jedes Weibchen kann einmal pro Stunde zur Eiablage gebracht werden, dies sollte nicht öfter als viermal pro Tag erfolgen. Pro Weibchen erfolgt die Eiablage in einem 3 monatigen Turnus.

#### **4.1.3 *In vitro* Fertilisation**

Die *in vitro* Befruchtung ermöglicht eine möglichst zeitgleiche Befruchtung der Eier und führt somit zu sich synchron entwickelnden Embryonen.

Zur Befruchtung wird ein Stück des Hodens abgeschnitten und in sterilem 1x MBSH mazeriert. Die Eier werden durch Zugabe von zehnfach verdünnter Hodensuspension befruchtet. Aufgrund der verringerten Salzkonzentration erlangen die Spermien ihre Beweglichkeit. Nach der Befruchtung hebt sich die Gallerthülle ab und der Embryo kann

aufgrund der Gravitation rotieren, wobei der schwere Dotter durch die Gravitationskraft nach unten sinkt. Dadurch kann die erfolgte Befruchtung nach circa 30 min aufgrund der Rotation des Eies festgestellt werden, denn die animale pigmentierte Seite zeigt jetzt nach oben.

#### 4.1.4 Mikroinjektion

Eine Stunde nach der Eiablage wird die Gallerthülle entfernt, damit die Embryonen mittels Mikroinjektion manipuliert werden können. Dazu werden die Gelege in 2% Cysteinhydrochlorid Lösung so lange inkubiert, bis keine Zygoten mehr aneinander haften. Die Cysteinhydrochlorid Lösung wird durch dreimaliges Waschen mit 0.1x MBSH entfernt. Tote oder beschädigte Embryonen werden regelmäßig aus dem Gelege entfernt. Durch Mikroinjektion von mRNA oder Morpholino *antisense* Oligonukleotide können an den Embryonen verschiedene Gewinn- und Verluststudien durchgeführt werden. Die Mikroinjektion erfolgt per N<sub>2</sub>-Druck mittels einer Glaskapillare. Diese wird mit Hilfe eines Eichgitters so geeicht, dass pro N<sub>2</sub> Ausstoß immer genau 4 nl Lösung entweicht. Pro Blastomere werden generell 4 nl injiziert.

In welche Blastomere die Mikroinjektion erfolgt, hängt von der Fragestellung des jeweiligen Experiments ab. Schließt sich an die Mikroinjektion die Präparation von *open face* Kellerexplantaten oder die Darstellung der Markergene *xBra* oder *chordin* an, wird die Mikroinjektion dorsal in 4- oder 8-Zell-Stadien vorgenommen. Sollen anschließend animale Kappen präpariert werden, erfolgt die Injektion animal in alle 4 Blastomere im 4-Zell-Stadium. Wohingegen für einen Doppelachsenassay im 4-Zell-Stadium in die beiden ventralen Blastomeren eines 4-Zellers injiziert wird.

Verifiziert wird die gerichtete Injektion durch die Analyse der Lokalisation des koinjizierten Dextran-Fluorescein.

#### 4.1.5 Gensuppression mittels Morpholino *antisense* Oligonukleotide

Die Injektion eines spezifischen Morpholino *antisense* Oligonukleotids erwirkt den Knockdown, also die verminderte Expression eines Gens. Das Morpholino bindet an seine komplementäre Zielsequenz in der Nähe des Startcodons der Ziel mRNA. Dadurch wird der Translationsinitiationskomplex blockiert und diese mRNA kann nicht in ein Protein translatiert werden. Morpholinos besitzen ein von Nukleinsäuren abweichendes Rückgrat. Dieses besteht aus einem heterozyklischen Morpholin Ring und nicht ionischem Phosphorodiamidate. Da zelleigene Enzyme Morpholinos nicht erkennen können, werden diese nicht degradiert.

#### 4.1.6 Embryonenpflege und Fixierung

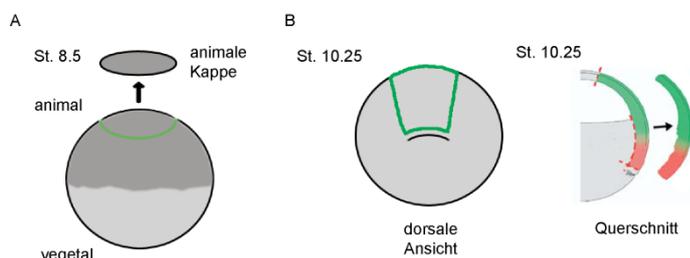
Die injizierten Embryonen werden in 0.1x MBSH bei 13°C +/- 3°C kultiviert. Die Entwicklung der Embryonen ist temperaturabhängig und kann durch niedrige Temperatur verlangsamt bzw. durch hohe Temperatur beschleunigt werden. Das Kulturmedium wird regelmäßig gewechselt und die toten Embryonen aussortiert. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).

Im gewünschten Entwicklungsstadium werden die Embryonen in MEMFA für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Die Lagerung erfolgt in 100% Ethanol bei -20°C. Für eine Proteinextraktion werden die Embryonen nicht fixiert, sondern kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.1.7 Präparation animaler Kappen und *open face* Kellerexplantate

Die Präparation erfolgt in 1x MBSH/Pen/Strep. Bevor spezifische Gewebestücke heraus präpariert werden können, wird die Vitellinmembran mit Hilfe zweier Uhrmacherpinzetten vorsichtig entfernt. Die Präparation der animalen Kappe erfolgt im Stadium 8.5. Dabei wird das pigmentierte Gewebe des animalen Pols mit zwei Uhrmacherpinzetten entnommen (Abbildung 4.1A).

Die Präparation der *open face* Kellerexplantate ermöglicht die Untersuchung der konvergenten Extension außerhalb des Embryos. Dazu wird die dorsale Marginalzone (Keller et al., 1992) im Stadium 10.25 entnommen (Abbildung 4.1B). Mittels feiner Härchen, die als Messer dienen, wird links und rechts des Blastoporus ein Schnitt in Richtung animal gesetzt. Senkrecht zu diesen beiden Schnitten wird ein dritter animal gesetzt, so dass sich das Gewebestück in Richtung Blastoporus aufklappen lässt. Dieses *open face* Kellerexplantat wird oberhalb des Blastoporus aus dem Embryo präpariert. Das Kopfmesoderm und Endoderm werden sorgfältig entfernt.



#### Abbildung 4.1: Präparation

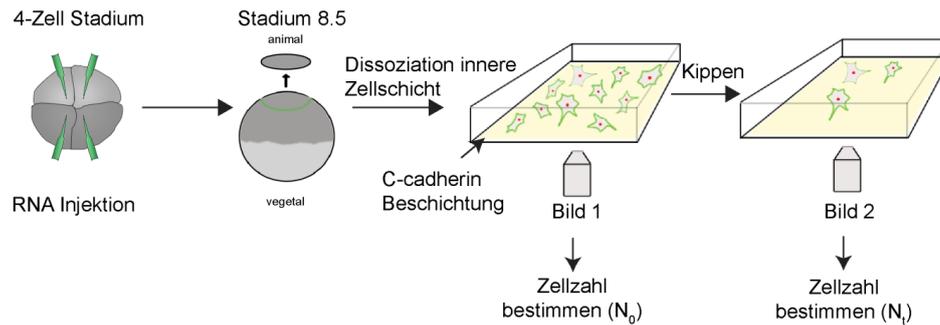
(A) Präparation der animalen Kappe im Stadium 8.5. (B) Präparation der *open face* Kellerexplantate im Stadium 10.25. (Querschnitt entnommen aus: (Kuroda et al., 2004)).

#### **4.1.8 Lebendzellaufnahmen der Gewebeexplantate**

Die Lebendzellaufnahmen der Gewebeexplantate erfolgten in beschichteten Kammerdeckgläsern. Für den Split-YFP Assay und für Protein Lokalisationsstudien werden die Deckgläser über Nacht bei 4°C mit 1% BSA in 1x MBSH/Pen/Strep beschichtet. Wohingegen für einen Polaritätsassay die Kammerdeckgläser mit 50 µg/ml Fibronectin über Nacht bei 4°C beschichtet werden. Die Beschichtung soll die extrazelluläre Matrix imitieren. Die Explantate werden unter Deckgläsern mit Silikonfüßchen fixiert, somit wird ein Abkugeln dieser verhindert. Die Explantate werden 30 min nach der Präparation, dies entspricht ungefähr Stadium 10.5, mikroskopiert. Bei Durchführung eines Polaritätsassay werden die Explantate 5 h nach der Präparation erneut analysiert. Zu diesem Zeitpunkt haben die mesodermalen Zellen ihren bipolaren Charakter etabliert. Kontrollembryonen befinden sich jetzt im Stadium 12, haben die Gastrulation nahezu beendet und gehen über in die Neurulastadien.

#### **4.1.9 Blastomeren Adhäsionsassay**

Als Vorbereitung auf den Blastomeren Adhäsionsassay wird eine Petrischale mit Spots aus 1 µg/ml CEC 1-5 (verdünnt in 1x MFM) in einer feuchten Kammer beschichtet. Die beschichtete Petrischale wird über Nacht bei 4°C mit 0,5% (w/v) BSA in 1x MFM blockiert. Unmittelbar vor dem Assay wird die Blockierungslösung gegen 1x MFM ausgetauscht. Embryonen im 4-Zell Stadium werden mit H2B-mCherry, GAP43-GFP und dem zu untersuchenden Konstrukt animal injiziert. Je Ansatz werden 10 animale Kappen im Stadium 8.5 präpariert. Die Epidermis wird entfernt und lediglich die inneren Zellschichten in einer mit HEMA beschichteten Kammer in CMFM dissoziiert. Die Dissoziation des Gewebes wird durch Rotation unterstützt. Die vereinzelt Zellen werden in 1x MFM umgepuffert. Das im MFM Puffer enthaltene Ca<sup>2+</sup> ermöglicht den Zellen eine Adhäsion an die extrazelluläre Domäne von C-Cadherin. 15 µl der Zellsuspension werden pro CEC1-5\_Fc Spot überführt und für 30 min inkubiert. Danach wird die Petrischale in einer mit 1x MFM gefüllten Kammer für 10 min umgedreht. Es werden Fluoreszenz Bilder vor und nach dem Assay aufgenommen und die Zellen gezählt (Abbildung 4.2).



#### Abbildung 4.2: Blastomeren Adhäsionsassay

Embryonen werden im 4-Zell Stadium in alle 4 Blastomere animal injiziert, die animale Kappe wird im Stadium 8.5 entnommen. Die innere Zellschicht der animalen Kappe wird dissoziiert und die vereinzelteten Zellen auf eine mit der extrazellulären Domäne von C-Cadherin beschichteten Oberfläche gespottet. Nach der 30 minütigen Inkubation wird die Petrischale für 15 min gekippt. Es wird ein Fluoreszenz Bild vor und nach dem Kippen der Petrischale aufgenommen und die jeweilige Zellzahl bestimmt.

#### 4.1.10 Elongationsassay

Der Elongationsassay ermöglicht es den Einfluss unterschiedlicher Moleküle auf die konvergente Extension in Gewebeexplantaten zu untersuchen. Explantate dorsaler Marginalzonen werden in einer mit 1% BSA beschichteten Petrischale unter Deckgläschen mit Silikonfüßchen in 1x MBSH/Pen/Strep kultiviert. Wenn sich die Kontrollembryonen im Stadium 13 befinden ist bei Explantaten aus uninjizierten Embryonen sowohl eine Elongation, als auch Konstriktion der Explantate zu beobachten. Die *open face* Kellerexplantate werden mit einer Endkonzentration von 9% Formaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert.

#### 4.1.11 Untersuchung des Molekültransports während der konvergenten Extension

Das Mikrotubulocytoskelett ist zu Beginn der Gastrulation von essentieller Bedeutung. Wird es während der ersten 30 Minuten der Gastrulation zerstört, wird die konvergente Extension gehemmt. Eine Mikrotubulidepolymerisation zu einem späteren Zeitpunkt hat keinen Einfluss auf den Fortlauf der Gastrulation (Kwan and Kirschner, 2005; Lane and Keller, 1997). Aus diesem Grund wird untersucht, ob das Mikrotubulocytoskelett für den Transport von bestimmten Proteinen des Wnt/PCP Signalweges von Bedeutung ist. Hierfür werden die dorsalen Marginalzonen im Stadium 10.25 präpariert und unmittelbar in 15  $\mu\text{g/ml}$  Nocodazol oder 20  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D inkubiert. Nocodazol hemmt den Aufbau des Mikrotubulocytoskeletts und führt somit zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli. Cytochalasin D hemmt die Aktinpolymerisation, dies induziert die Destabilisierung des Aktins.

Ob die Depolymerisation des Aktin- oder Mikrotubulicytoskeletts eine Auswirkung auf die Proteinlokalisierung hat, wird sowohl an Lebendzellaufnahmen, als auch mittels Immunfärbung untersucht.

#### **4.1.12 Doppelachsenassay**

Die Injektion von *xWnt8a* in die Marginalzone beider ventraler Blastomere des 4-Zell Stadiums führt zur Induktion einer ektopischen Körperachse. Die Embryonen werden im Stadium 20 ausgewertet. Da bei Induktion einer sekundären Körperachse ein zweites Neuralrohr zu erkennen ist.

#### **4.1.13 *whole mount in situ* Hybridisierung**

Mittels der *whole mount in situ* Hybridisierung kann die zeitliche und räumliche Expression eines Gens nachgewiesen werden.

Pigmentierte Embryonen werden zunächst in Bleichlösung entfärbt. Nach dem Bleichen werden die Embryonen für 30 min in MEMFA fixiert. Anschließend werden die Embryonen mittels einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Die Membran wird durch Inkubation mit PTW permeabilisiert. Für die Sonde unspezifische Bindestellen werden mit dem RNA enthaltenden Hybridisierungspuffer für mindestens 2,5 h bei 62 - 65 °C blockiert. Die Embryonen werden mit einer Digoxigenin markierten Sonde über Nacht bei 62°C - 65°C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag werden die Embryonen stringent gewaschen. Dies umfasst mehrere Waschschriffe bei 62 - 65°C, in welchen die Stringenz erhöht wird (Waschlösung 1-5). Anschließend wird mit PTW permeabilisiert und mit 1x MAB gewaschen. Unspezifische Antikörperbindestellen werden 2 h bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer blockiert. Die Inkubation mit dem Alkalischen Phosphatase gekoppelten  $\alpha$ -Dig Antikörper erfolgt 4 h bei Raumtemperatur. Danach folgen mehrere Waschschriffe mit 1x MAB, bevor in AP-Puffer umgepuffert wird. Entwickelt wird mit einer NBT/BCIP Färbelösung. BCIP ist das chromogene Substrat der Alkalischen Phosphatase und NBT dient zur Verstärkung der Farbreaktion. Die Farbreaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit A. bidest. gestoppt. Die Färbung wird für 1 h in 1x MEMFA fixiert und die Embryonen bei 4°C in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

### **4.2. Immunologische Methoden**

#### **4.2.1 Immunfärbung**

*Open face* Kellereplantate werden für circa 1h, bis die Kontrollembryonen Stadium 11 sind, bei Raumtemperatur in mit 1% (v/v) BSA beschichteten Petrischalen unter einem Deckglas mit Silikonfüßchen kultiviert. Wird mit Nocodazol oder Cytochalasin D inkubiert,

werden diese vor der Fixierung entfernt. Die Explantate werden 2 x 15 min mit 1x MBSH/Pen/Strep gewaschen und einmal für 15 min mit 1x APBS/CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Die Explantate werden in 4% Formaldehyd/1x APBS vorfixiert. Die Deckgläser können nun gelöst werden. Die Kellereplantate werden über Nacht in Dent's Lösung bei -20°C nachfixiert. Am darauf folgenden Tag werden die *open face* Kellereplantate mittels einer absteigenden Methanolreihe rehydriert. Durch Inkubation für 15 min mit APBS-T werden die Zellmembranen permeabilisiert. Unspezifische Antikörperbindestellen werden mit 20% Pferdeserum in 1x APBS für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Der primäre Antikörper wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Explantate erst kurz, dann 3x 15 min und 2x 10 min mit 1x APBS gewaschen. Wiederum werden unspezifische Antikörperbindestellen für 1h bei Raumtemperatur mit 20% Pferdeserum/1x APBS blockiert. Der Fluoreszenz-gekoppelte sekundäre Antikörper wird über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wird kurz mit 1x APBS gewaschen bevor für 5 min mit DAPI Gebrauchslösung die Zellkerne angefärbt werden. Nach wiederholtem Waschen für 3x 15 min und 2x 30 min in 1x APBS, werden die Explantate in Mowiol/DABCO eingedeckelt.

#### **4.2.2 Herstellung von NOP-Lysaten**

Die Explantate/Embryonen werden in 10 µl NOP/Inhibitor Puffer pro Embryo oder pro 3 *open face* Kellereplantaten durch Aufziehen über eine 0.4 mm Kanüle lysiert und homogenisiert. Die NOP-Lysate werden 1 h bei 4°C über Kopf rotiert, um neben cytoplasmatischen auch membranständige Proteine zu solubilisieren. Die Embryonentrümmer werden bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Die klaren Überstände werden mit 5x SDS Ladepuffer versetzt. Die NOP-Lysate können gleich im Western Blot analysiert werden oder für eine Koimmunopräzipitation eingesetzt werden.

#### **4.2.3 Koimmunopräzipitation**

Die Mitglieder eines Proteinkomplexes können mittels Koimmunopräzipitation untersucht werden. Aus 60 *open face* Kellereplantaten werden NOP-Lysate hergestellt. 150 µl des NOP-Lysats werden für die IP eingesetzt, 50 µl werden direkt für die SDS-Page vorbereitet und als Input Kontrolle aufgetragen.

Zur Präzipitation des myc-markierten Fz7 werden die NOP-Lysate mit 3µg aufgereinigtem 9E10 Antikörper versetzt. Als Negativkontrolle wird mit IgG präzipitiert. Das Protein-Antikörper Gemisch wird mindestens 1 h bei 4°C über Kopf rotiert. Währenddessen wird die Protein-G Sepharose dreimal mit NOP-Puffer gewaschen. Das Protein-Antikörper Gemisch wird nach Zugabe von 60 µl Protein G Sepharose 2 h über Kopf bei 4°C rotiert

und damit immobilisiert. Das Immunopräzipitat wird dreimal mit NOP Puffer gewaschen und in 5x SDS-Ladepuffer aufgenommen.

### 4.3. Proteinbiochemische Methoden

#### 4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die in 5x SDS Ladepuffer aufgenommenen Proben für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) werden 5 min bei 95°C erhitzt, zur Denaturierung der Proteine.

Zuerst wird das Trenngel gegossen und mit A. bidest. überschichtet, um eine gerade Trennfläche zu erhalten. Auf das polymerisierte Trenngel wird das Sammelgel gegossen. Der Anteil an 30% Acryl:Bisacrylamid (37.5:1) im Trenngel bestimmt die Porengröße und damit den optimalen Trennungsbereich.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel 8%</b>	<b>Trenngel 10%</b>
H <sub>2</sub> O	0.68	2.3	1.9
30% Acryl:Bisacrylamid	0.17	1.3	1.7
0.5M Tris-HCl (pH 6,8)	0.13	-	-
1.5M Tris-HCl (pH 8,8)	-	1.3	1.3
10% SDS	0.01	0.05	0.05
10% Ammoniumpersulfat	0.01	0.05	0.05
TEMED	0.001	0.003	0.002

**Tabelle 4.1 Polyacrylamidgel**

Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels, Mengenangaben in ml.

Zusätzlich zu den Proben wird ein Größenstandard, zur Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine, aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einer Elektrophoresekammer, die mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt ist. Bis die Proben das Sammelgel passiert haben, wird eine Spannung von 80 V angelegt, dann wird die Spannung auf 120 V erhöht. Die Auftrennung der Proben erfolgt mittels des Glycin/Tris Puffersystems nach Laemmli (1970). Dadurch werden die Proteine im Sammelgel gestapelt und im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt.

#### 4.3.2 Western Blot

Die nach der Größe aufgetrennten Proteine werden im Western Blot Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. In der vorliegenden Arbeit wird mit dem semi-dry System von Biorad geblottet. Bei 0,05 mA pro Minigel, für 90 - 120 min, werden die Proteine auf die Nitrocellulose Membran übertragen. Dadurch sind die Proteine zugänglich für eine spezifische Antikörperdetektion. Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen unter Schütteln. Die Membran wird 1 h in 10% Milchpulver in TBS-T blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C

inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran 3x 15 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Unspezifisch gebundener sekundärer Antikörper wird von der Membran durch 3x 15 min TBS-T gewaschen. Durch Umpuffern mit AP-Puffer wird das pH-Optimum für die, von der Alkalischen Phosphatase, katalysierte enzymatische Farbreaktion geschaffen. Die Inkubation mit der Western Blot Färbelösung erfolgt bis eine deutlich sichtbare Färbung zu sehen ist. Die Farbreaktion wird mit A. bidest. gestoppt.

#### **4.3.3 Proteinbestimmung - BCA Assay**

Die Proteinkonzentration einer Lösung wird mit dem Novagen® BCA Protein Assay Kit (Merck kGaA, Darmstadt) bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe wird eine BSA Kalibrierungsreihe erstellt. Je 10 µl der Standardlösungen und der Proben werden mit 200 µl der Arbeitslösung vermischt. Die Arbeitslösung besteht zu 50 Teilen aus einer BCA Lösung vermischt mit einem Teil Kupfersulfat. Die Standards und die Proben werden 30 min bei 37°C inkubiert. In alkalischem Milieu reduzieren Peptidbindungen  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$  Ionen. Das gebildete  $\text{Cu}^{+}$  ist proportional zur Proteinmenge in der Lösung. Die  $\text{Cu}^{+}$  Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, welcher Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert. Die Extinktion wird gegen die Proteinkonzentration der BSA Kalibrierungsreihe aufgetragen, somit kann die Proteinkonzentration anhand des Diagramms bestimmt werden.

#### **4.3.4 Nachweis der Proteinexpression mittels *in vitro* Transkription und Translation**

Das TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Mannheim) ermöglicht es die Transkription und Translation in einer Reaktion miteinander zu koppeln. Der Nachweis von *in vitro* synthetisierten Proteinen erfolgt durch den Einbau von biotinyliertem Lysin. Dies ist besonders hilfreich, wenn die Konstrukte, wie die Wnt Chimären, keine Markierung besitzen und auch kein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. Das biotinylierte Lysin wird zu der Translationsreaktion als  $\epsilon$ -biotinylierter Lysin-tRNA Komplex gegeben. Im Western Blot lassen sich die Biotin markierten Proteine über einen mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Streptavidin Antikörper nachweisen.

## Reaktionsansatz:

TNT Kaninchen Retikulozyten Lysat	25 µl
TNT Reaktionspuffer	2 µl
TNT RNA Polymerase SP6	1 µl
Aminosäure Mix, Minus Leucin, 1 mM	0,5 µl
Aminosäure Mix, Minus Methionin, 1 mM	0,5 µl
RNasin Ribonuklease Inhibitor	1 µl
DNA Template	1 µg
Transcend™ tRNA	1 µl
Nuklease freies Wasser	ad 50 µl

Als Negativkontrolle wird anstatt DNA Wasser verwendet, als Positivkontrolle dient eine für Luciferase codierende Plasmid-DNA im Kit.

Die kombinierte Transkriptions- und Translationsreaktion erfolgt für 120 min bei 30°C. 1/15 tel der Translationsreaktion werden im Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Blockiert wird die Membran in 15 ml TBS-T (TBS + 0.5% (v/v) Tween 20) 1 h bei Raumtemperatur. Der Streptavidin-AP wird 1:2500 in TBS-T verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wird 2x 10 min mit TBS-T und 2x 10 min mit AP-Puffer gewaschen. Schließlich erfolgt die Detektion mit NBT/BCIP.

#### 4.4. Molekularbiologische Methoden

##### 4.4.1 Messung der Nukleinsäurekonzentration

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$c \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = A_{260} * V * F$$

$A_{260}$  gibt die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm an,  $V$  ist der Verdünnungsfaktor und  $F$  der Multiplikationsfaktor. Dieser ist für doppelsträngige DNA 50 und für einzelsträngige RNA 40, da 50 µg/ml doppelsträngiger DNA beziehungsweise 40 µg/ml RNA einer Extinktion von 1 entspricht.

Zur Bestimmung der Reinheit misst man zusätzlich die Absorption bei 280 nm und 230 nm. Bei 280 nm haben aromatische Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum. Trizol absorbiert UV-Licht bei ungefähr 270 nm und bei 230 nm. Der Extinktionsquotient 260 nm / 280 nm gibt nicht nur Aufschluss über eine Kontamination mit Proteinen, sondern auch mit Trizol. Der Wert liegt bei 1,8 für eine reine DNA Lösung und bei 2,0 für eine reine RNA Lösung. Kleinere Werte weisen auf eine Kontamination hin. Der Extinktionsquotient 260

nm / 230 nm sollte für reine DNA oder RNA Präparation größer 2,0 sein. Geringere Werte als 2,0 weisen auf Kontaminationen mit Polysacchariden oder Trizol hin.

#### 4.4.2 Restriktionsanalyse von DNA

DNA kann an spezifischen Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Der Restriktionsverdau wird zum Einen zur Überprüfung der DNA eingesetzt, zum Anderen für Klonierungen und zur Linearisierung der Vektoren vor der mRNA Synthese. Ein 20 µl Ansatz enthält 3 µg Plasmid DNA, 2 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl Restriktionsendonuklease. Der Restriktionsverdau erfolgt im Temperaturoptimum des Enzyms.

#### 4.4.3 Flachbrett Gelelektrophorese

In der Flachbrett Gelelektrophorese wird DNA ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Kurz vor dem Gießen des Agarosegels wird pro 100 ml gelöster Agarose 6 µl Midori Green hinzu gegeben. Als Ladepuffer wird 5x Orange G verwendet. Durch Anlegen einer Spannung wandert die DNA im elektrischen Feld, aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates, zur Anode. Für die relative Mobilität ist die Porengröße der Agarosematrix verantwortlich. Die Größe der DNA Fragmente wird durch Vergleich mit einem Größenstandard bestimmt. Das im Gel enthaltene Midori Green interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht.

#### 4.4.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein semiquantitatives *in vitro* Verfahren zur Amplifikation definierter DNA Stücke. Die PCR wurde 1985 von Kary Mullis (Saiki et al., 1985) entwickelt und ist mittlerweile eine Standardmethode. Zur Amplifikation wird die Phusion DNA Polymerase (NEB) eingesetzt, da diese eine 3'-5' Exonuklease Aktivität besitzt und damit das Amplifikat korrigieren kann.

Folgender PCR-Ansatz wird mit der Phusion DNA Polymerase verwendet:

DNA-Template	5 - 50 ng
5x Phusion HF/GC Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM pro Nucleotid)	1,25 µl
Primer forward (10 µM)	2 µl
Primer reverse (10 µM)	2 µl
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Soll eine DNA Sequenz ohne einen nicht komplementären Überhang amplifiziert werden, so werden 25 - 35 Zyklen mit der gleichen Annealing Temperatur durchgeführt. Um einen

nicht komplementären Überhang am 3' und 5' Ende einzufügen, wird ein 2 Stufen Programm verwendet. Die Annealing Temperatur  $X_1$  wird basierend auf dem GC-Gehalt des Primers ohne den nicht komplementären Überhang errechnet.  $X_2$  ist die Annealing Temperatur, die aus der kompletten Primer Sequenz errechnet wird. Nach 10 Zyklen wird die Annealing Temperatur  $X_2$  verwendet, da die Anzahl der Templates zu denen der komplette Primer komplementär ist mit jedem Zyklus steigt.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Bemerkung
1x	30 sek	98°C	Denaturierung
10x	10 sek	98°C	Denaturierung
	15 sek	$X_1$	Annealing
	30 sek/kb	72°C	Elongation
20x	10 sek	98°C	Denaturierung
	15 sek	$X_2$	Annealing
	30sek/kb	72°C	Elongation
1x	10 min	72°C	finale Elongation
1x	∞	4°C	

Die Spezifität und die Größe des Amplifikats wird in einer Flachbrett Gelelektrophorese überprüft.

#### 4.4.4.1 Fusions-PCR

Mit der Fusions-PCR wurden zahlreiche unterschiedliche Chimäre hergestellt, die aus xWnt5a und xWnt11 bestehen. In einer Fusions-PCR werden zwei unabhängig voneinander vervielfältigte DNA-Stücke zu einem DNA Stück zusammengefügt. In einem ersten Schritt werden die beiden DNA Stücke, die zusammen gefügt werden sollen unabhängig voneinander in einer 2 Stufen PCR amplifiziert. An das 5' Ende und das 3' Ende der späteren Chimäre wird jeweils eine Restriktionsschnittstelle angefügt. An der Fusionsstelle wird jeweils eine Teilsequenz vom zu fusionierenden Partner eingefügt, so dass die Partner über 6 Basen komplementär zueinander sind. Über die komplementären Basen können beide Partner in einer Fusions PCR zusammen gefügt werden. Sie dienen dabei als Primer für die Amplifikation. Die flankierenden Primer zur Amplifikation der zusammen gefügten Partner, also der Chimären werden erst nach 10 Zyklen dazu gegeben.

Folgender PCR-Ansatz wird mit der Phusion DNA Polymerase verwendet:

DNA-Template 1	5 - 50 ng
DNA-Template 2	5 - 50 ng
5x Phusion HF/GC Puffer	10 µl
dNTPs (10mM pro Nukleotid)	1,25 µl
Primer forward (10 µM)	2 µl (erst nach 10 Zyklen dazu geben)
Primer reverse (10 µM)	2 µl (erst nach 10 Zyklen dazu geben)
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Zyklus	Zeit	Temperatur	Bemerkung
1x	4 min	98°C	Denaturierung
10x	30 Sek.	98°C	Denaturierung
	30 Sek.	45°C	Annealing
	1 min/kb	72°C	Elongation
1x	∞	4°C	
30x	30 Sek.	98°C	Denaturierung
	30 Sek.	X <sub>2</sub>	Annealing
	1 min/kb	72°C	Elongation
1x	5 min	72°C	finale Elongation
1x	∞	4°C	

Eine erfolgreiche Fusion wird in einer Flachbrett Gelelektrophorese überprüft.

#### 4.4.5 DNA - Aufreinigung aus dem Agarosegel

Wird das DNA Fragment für weitere Arbeitsschritte benötigt, wird es mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim) aus dem Agarosegel aufgereinigt. Das DNA Fragment mit der erwarteten Größe wird aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wird in Bindungspuffer, der Guanidinthiocyanat enthält, bei 56°C gelöst. Das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat bewirkt nicht nur, dass sich das Gelstück löst, sondern auch eine Bindung der DNA an die Silikamembran, mit deren Hilfe die DNA aufgereinigt wird.

#### 4.4.6 Anfügen von 3' Adenosin-Überhängen

Die mit der Phusion DNA Polymerase amplifizierten DNA Fragmente besitzen keine 3' Adenosin (A)-Überhänge. Damit das aufgereinigte DNA-Fragment in einen TA-Klonierungsvektor wie pGMT-Easy (Promega, Mannheim) ligiert werden kann, muss ein A an das 3' Ende angefügt werden. Die Taq Polymerase (Promega, Mannheim) kann an die 3' Enden ein A anfügen.

Der Reaktionsansatz mit 19 µl aufgereinigtem DNA Fragment, 5 µl 5x GoTaq<sup>®</sup> Reaktionspuffer, 1 µl dATP (10 mM), 0,25 µl GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase wird für 10 min bei 72°C inkubiert.

#### **4.4.7 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende**

Das 5'-Phosphatende des linearisierten Vektors wird dephosphoryliert, wenn der Vektor nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wird. Damit kann die Religation des Vektors verhindert werden, da das Phosphat von der Ligase für die Religation benötigt wird. Das 5'-Phosphatende wird mittels der Phosphatase TSAP (Promega, Mannheim) abgespalten. 17 µl linearisierter Vektor wird mit 2 µl 10x MultiCore Puffer und 1 µl T-SAP versetzt und für 15 min bei 37°C dephosphoryliert. Danach wird die Phosphatase für 15 min bei 75°C hitzeinaktiviert.

#### **4.4.8 Ligation**

Mit Hilfe einer Ligase können die 3'-OH Gruppe und 5'-Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung verbunden werden. Diese Reaktion wird von der T4 DNA Ligase katalysiert. Um die Erfolgsquote einer Ligation zu erhöhen werden unterschiedliche molare Verhältnisse von Vektor und zu insertierendem DNA-Fragment eingesetzt. Generell werden Ligationen mit den molaren Verhältnissen von 1:3, 1:1 und 3:1 angesetzt. Zu dem Vektor Insert Gemisch kommen 1 µl Ligase und je nach Konzentration des Puffers, die richtige Menge an Puffer, das ganze wird mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt.

#### **4.4.9 Transformation chemokompetenter Bakterien**

Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme von Plasmid DNA durch kompetente Bakterien.

Bei einer Klonierung werden 5 µl DH 5α (NEB) chemokompetente Bakterien mit 1 µl Ligationsansatz gemischt. Für eine Retransformation werden zu 30 µl JM109 chemokompetente Bakterien 1 µl der Plasmid DNA pipettiert. Der Transformationsansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt der Hitzeschock für 45 Sek. bei 42°C und eine nochmalige Inkubation auf Eis für 2 min. Die Bakteriensuspension wird in 450 µl SOC-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Abhängig von der erwarteten Anzahl an Kolonien werden 50 - 400 µl der Bakteriensuspension auf einer selektiven LB-Platte mit einem Drigalskispatel ausplattiert.

#### **4.4.10 Blau/Weiß Selektion**

Die Klonierung in einen TA Vektor hat den Vorteil, dass man eine Blau/Weiß Selektion durchführen kann. Der Polylinker im TA-Vektor liegt innerhalb des LacZ Gens. Wird ein Insert eingefügt, wird das LacZ Gen zerstört und es kann keine funktionsfähige β-Galactosidase exprimiert werden. Zur Detektion der β-Galactosidase Expression werden auf den selektiven LB-Platten 40 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-

galactopyranosid, 50 mg/ml in DMF) und 80 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, 0.1 M) ausplattiert. Dies lässt man 30 min bei 37°C im Dunkeln einziehen. Anschließend wird die Bakteriensuspension ausplattiert. IPTG induziert das LacZ Operons. X-Gal dient als Substrat, das durch die β-Galactosidase unter anderem zu einem blauen unlöslichen Indigo-Farbstoff hydrolysiert wird. Damit zeigen blaue Kolonien an, dass kein DNA Fragment insertiert wurde, wobei bei weißen Kolonien von einer Insertion auszugehen ist.

#### **4.4.11 Plasmid DNA Isolierung**

Um die Plasmid DNA in Bakterien zu vervielfältigen werden für den Kleinmaßstab 3 ml selektives LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft, für die Präparation größerer DNA Mengen werden 100 ml angeimpft. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt.

Die Plasmidpräparation im mittleren Maßstab (Midi-Präp) wird mit dem Kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey Nagel) laut den Herstellerangaben durchgeführt. Das Kit verwendet eine Anionenaustausch Chromatographie, um die Plasmid DNA aufzureinigen. Dabei bindet die negativ geladene DNA an die positiv geladene Trägermatrix.

Die Gewinnung der Bakterien DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präp) erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim (Birnboim and Doly, 1979). Zunächst werden 2 ml der Bakteriensuspension bei 7000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Die Bakterien werden in 400 µl RNase haltigem Resuspensionspuffer durch votexen resuspendiert. Durch Zugabe von 400 µl alkalischer Lysis Puffer werden die Bakterien lysiert. Die Lösung wird durch Zugabe von 400 µl Neutralisationspuffer neutralisiert. Das entstandene Präzipitat aus SDS, Proteinen und chromosomaler DNA wird für 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Aus 800 µl des klaren Überstandes wird die Plasmid DNA mittels Isopropanolfällung gefällt und gereinigt.

#### **4.4.12 Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren müssen für die weitere Verwendung oftmals gereinigt werden, dazu werden sie gefällt. Die Nukleinsäuren fallen aus, wenn ihnen die Hydrathülle entzogen wird, dazu tragen monovalente Kationen und Alkohol bei.

##### **4.4.12.1 Isopropanolfällung**

Die DNA Lösung wird mit einer Endkonzentration von 40% (v/v) Isopropanol versetzt und durch votexen vermischt. Die Suspension wird 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Präzipitat mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Präzipitat

an der Luft getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen sterilem A. bidest. aufgenommen.

#### **4.4.12.2 Ethanolfällung**

Bei der Ethanolfällung wird die DNA Lösung mit 1/20 Volumen 0.5 M EDTA und 1/10 Volumen 3 M NaAcetat versetzt, bevor mit dem 2.5 fachen Volumen Ethanol präzipitiert wird. Nach 15 min bei -20°C werden die Nukleinsäurepräzipitate durch 15 minütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C sedimentiert. Das DNA Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in einem geeigneten Volume A. bidest. gelöst.

#### **4.4.12.3 mRNA Reinigung mittels G50 Säule**

Die Reinigung mittels G50 Säulen wird nach der mRNA Synthese eingesetzt. Die synthetisierte mRNA wird hier mittels Gelfiltration von den nicht zur Synthese benötigten NTPs befreit. Die Reinigung erfolgt entsprechend der Herstellerangaben.

#### **4.4.13 Sequenzanalyse**

Die Sequenzanalysen werden bei der Firma GATC-Biotech, Konstanz in Auftrag gegeben. Die Sequenz wurde von allen klonierten Plasmiden, sowie Plasmiden aus anderen Laboren überprüft. Sequenziert wird mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977), dabei werden Fluoreszenz-markierte ddNTPs verwendet.

#### **4.4.14 *In vitro* Synthese von Cap mRNA**

Die durch Mikroinjektion in die *Xenopus* Embryonen eingebrachte mRNA wird *in vitro* mit dem mMessage mMachine Kit (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies GmbH, Darmstadt) synthetisiert. Zur Synthese einer mRNA muss sich das Gen in einem Vektor befinden, der stromaufwärts vom Gen eine Bindestelle für eine DNA-abhängige RNA Polymerase besitzt. Vor der Synthese werden 3 µg Plasmid DNA stromabwärts des Gens hinter dem Poly-Adenylierungs Signal durch einen Restriktionsverdau mit einem geeigneten Enzym linearisiert. Das linearisierte Plasmid wird durch eine Ethanolfällung aufkonzentriert und in 7 µl A. bidest. aufgenommen, wobei 1 µl zur Überprüfung der Linearisierung aufbewahrt wird. Der Reaktionsansatz aus 6 µl linearisierter DNA, 10 µl 2x NTP/CAP, 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl Enzym Mix wird 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Template DNA durch Zugabe von 2 µl DNase I über 15 min bei 37°C verdaut. Die synthetisierte mRNA wird über eine G50 Säule gereinigt und bei -80°C gelagert.

#### **4.4.15 Herstellung RNA Sonde für die *in situ* Hybridisierung**

Für die *in situ* Hybridisierung werden markierte RNA Sonden mit dem Fluorescein/Digoxigenin RNA Labelling Kit (Roche Applied Science, Mannheim)

hergestellt. Zum spezifischen Nachweis einer mRNA wird eine markierte *antisense* Sonde synthetisiert. Als Negativkontrolle wird zusätzlich eine *sense* Sonde hergestellt. Die Template DNA wird wie für die mRNA Synthese präpariert.

Für die Transkription wird folgender Ansatz verwendet:

linearisiertes DNA Template	14 µl
Fluorescein oder Digoxigenin Labelling Mix (10x)	2 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
RNA Polymerase (T7 bzw. Sp6)	2 µl

Die *in vitro* RNA Transkription erfolgt 2 h bei 37°C. Durch Zugabe von 2 µl DNase I für 15 min bei 37°C wird das DNA-Template verdaut. Die synthetisierte RNA wird über eine Ethanolfällung aufkonzentriert und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Die Sonden werden bis zur ihrem Gebrauch bei -20°C eingefroren. Vor dem Gebrauch werden die Sonden in Hybridisierungspuffer verdünnt und zum Aufbrechen der Sekundärstruktur bei 85°C für 5 min erhitzt.

#### 4.4.16 Isolierung von Gesamt RNA aus DMZ Explantaten

Die Isolierung der Gesamt RNA für die Transkriptom Analyse mittels Microarray erfolgt aus 30 *open face* Kellerexplantaten pro Ansatz. Die kultivierten *open face* Kellerexplantate werden in 100 µl RNA*later* RNA Stabilization Solution (ambion®, Life Technologies, Darmstadt) überführt. Die Isolierung wird entweder sofort im Anschluss durchgeführt oder die Explantate werden max 7 Tage bei 4°C gelagert.

Die Extraktion der Gesamt RNA erfolgt mit dem TRIzol® Plus RNA Purification Kit (ambion®, Life Technologies, Darmstadt), das auf einer Trizol/Chloroform Extraktion basiert. Das Trizol Reagenz, welches unter anderem Guanidinthiocyanat und Phenol enthält, wahrt die Integrität der RNA, während sie die Zellen und Zellkomponenten zerstört. Darüber hinaus werden RNasen während der Homogenisierung und Extraktion effizient gehemmt. Zu den in RNA*later* RNA Stabilization Solution gelagerten Kellerexplantaten wird 1 ml Trizol Reagenz gegeben. Durch Aufziehen über eine 0.4 mm Kanüle werden die Kellerexplantate homogenisiert. Das Lysat wird zur vollständigen Dissoziation der Nukleotid Protein Komplexe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach 200 µl Chloroform zu dem Gemisch pipettieren, gut vermischen und 3 min bei Raumtemperatur inkubieren. Die Phasentrennung erfolgt mittels Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12000 g. Es entsteht eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, eine mittlere milchige Interphase und eine obere farblose, wässrige Phase, welche die RNA enthält. Es werden circa 400 µl der oberen wässrigen Phase abgenommen und mit 400 µl 70% Ethanol durch Vortexen gemischt.

Die RNA-Aufreinigung erfolgt mittels einer Silikamembransäule. Auf die Säule werden maximal 700 µl der Probe geladen und für 15 Sek. bei 12000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt bis die komplette Probe auf die Säule geladen ist. Die Säule mit 350 µl Waschpuffer I waschen und 15 Sek. bei 12000 g abzentrifugieren.

Die an die Membran gebundene DNA wird mit dem On-Column PureLink™ DNase Treatment Kit (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt) entfernt. Der Reaktionsansatz enthält 8 µl 10x DNase I Reaktionspuffer, 10 µl DNase I und wird mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 80 µl aufgefüllt. Das Gesamtvolumen von 80 µl direkt auf die Säulchenmembran geben und für 15 min inkubiert.

Anschließend wird mit 350 µl Waschpuffer I und zweimal mit 500 µl Waschpuffer II die Säulchenmembran gewaschen, wobei der Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation 15 Sek. bei 12000 g entfernt wird. Zum Trocknen der Säulchenmembran wird ohne Waschpuffer nochmals für 1 min bei 12000g zentrifugiert. Danach erfolgt die Elution mit 50 - 100 µl RNase freiem Wasser. Nach 1 min Inkubation wird 2 min bei 12000 g eluiert. Die Gesamt RNA wird bei -80°C gelagert.

#### **4.4.17 Aufkonzentrieren der RNA**

Da für den Microarray von Agilent 1 µg Gesamt RNA benötigt werden in einer Konzentration von 100 µg/ml werden die Proben, die nach der RNA Isolierung eine geringere Konzentration aufwiesen, mit dem RNeasy® MinElut® Cleanup Kit (Quiagen, Hilden) konzentriert. Dies wird gemäß des Protokolls RNA Cleanup und Concentration durchgeführt, diese Konzentrierung wird mit einer Silikamembransäule laut Herstellerangaben durchgeführt. Eluiert wird die Gesamt RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser.

#### **4.4.18 Bestimmung der RNA Integrity Number mit dem Bioanalyzer**

Die Qualität der Gesamt RNA für die Microarray basierte Transkriptomanalyse wird mit Hilfe eines Bioanalyzer bestimmt. Dieser misst die RNA Integrity Number (RIN Wert), welche die Qualität der RNA widerspiegelt. Dazu wird die Gesamt RNA auf einem Chip elektrophoretisch aufgetrennt. Jeder RNA Chip besteht aus einem Netz miteinander verbundener Mikrokanäle, die mit einem Polymer (Gel-Matrix) und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt werden. Zur Bestimmung des RIN Wertes wird das Verhältnis zwischen 18S und 28S rRNA bestimmt. Ein RIN Wert von 10 bedeutet eine perfekte RNA Präparation ohne jegliche Degradationsprodukte, wohingegen ein RIN Wert von 1 eine vollständig degradierte Probe bedeutet.

Vor der Analyse muss die RNA Gel-Matrix vorbereitet werden, dazu werden 550 µl dieser bei Raumtemperatur für 30 min äquilibriert und danach 10 min bei 1500 g zentrifugiert.

Das RNA Dye-Konzentrat wird ebenfalls für 30 min bei Raumtemperatur äquilibriert. 1 µl des RNA Dye-Konzentrats werden zu 65 µl RNA Gel-Matrix gegeben. Gemisch votexen und bei 13000 g für 20 min zentrifugieren. Danach wird der RNA Nano Chip laut Herstellerangaben mit dem Gel-Dye Gemisch, mit Hilfe einer Priming Station, beladen. Vor dem Laden der Proben werden diese für 2 min bei 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen aufzubrechen. Pro Probe werden 2 µl geladen und zusätzlich 1 µl Marker. Der Marker ist ein 50 bp DNA Fragment, das die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie ein 25 Nukleotid langes RNA Fragment aufweist. Es wird zusätzlich ein Größenstandard geladen, der aus 6 RNA Transkripten definierter Länge und Konzentration besteht. Der nun beladene Chip wird in den Votexer eingespannt und für 60 Sek. bei 2400 rpm gevotext. Der Chip kann nun in den Bioanalyser zur Analyse gelegt werden.

Während die Proben elektrophoretisch aufgetrennt werden, wird die Fluoreszenz über die Zeit bestimmt. Anhand des RNA Größenstandards werden zwei Zeitfenster für die 18S und 28S rRNA bestimmt. Mittels einer komplexen mathematischen Formel errechnet die 2100 Expert Software den RIN Wert (Schroeder et al., 2006).

Für die Microarray Analyse werden ausschließlich Proben verwendet, die einen RIN Wert von über 8 besitzen.

#### **4.4.19 Synthese der cDNA mittels Reverser Transkription**

Für die quantitative Real Time PCR wird Gesamt RNA durch die M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) in cDNA umgeschrieben.

Zu 150 ng Gesamt RNA in 8 µl werden 2 µl Oligo d(T) Primer gegeben. Die Gesamt RNA wird zunächst bei 70°C für 5 min denaturiert. Nachdem der Ansatz auf 4°C abgekühlt ist, wird er mit 10 µl Transkriptions-Mix versetzt.

Transkriptions-Mix:

5x M-MLV Reaktionspuffer	4 µl
dNTPs (10 mM pro Nukleotid)	1 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	0,5 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

Die Hybridisierung des Oligo d(T) Primers an den Poly (A) Schwanz der mRNA erfolgt für 5 min bei 25°C, die reverse Transkription schließt sich mit 60 min bei 42 °C an. Als Negativkontrolle wird immer ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase angesetzt, um DNA Kontaminationen auszuschließen. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

#### 4.4.20 RealTime PCR

Die quantitative RealTime PCR ermöglicht eine Quantifizierung der eingesetzten cDNA und damit der isolierten mRNA über eine kontinuierliche Fluoreszenzfarbstoffmessung während der PCR Zyklen. Dazu wird SYBR<sup>®</sup> Green I verwendet, welches ausschließlich an doppelsträngige DNA bindet. Am Ende jedes PCR Zyklus wird die Emission des Farbstoffes SYBR Green I bei 530 nm gemessen. Zu Beginn der PCR wird die DNA exponentiell vervielfältigt, somit sind nach n Zyklen  $2^n$  Moleküle doppelsträngiger DNA vorhanden, entsprechend steigt die Fluoreszenzemission. Daraus folgt, dass wenn sich die DNA Konzentration zweier Proben um den Faktor zwei unterscheidet, liegen die Ct Werte genau um einen Zyklus auseinander. Die DNA Quantifizierung findet im exponentiellen Teil der PCR Reaktion statt, dazu wird der Schwellwert: Ct-Wert („Cycle Threshold“) bestimmt. Dieser Wert gibt diejenige Zykluszahl an, in dem die gemessene Fluoreszenz erstmals deutlich über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Die Auswertung erfolgt mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Die  $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$  Methode gibt die Änderung der Genexpression, normalisiert mit dem Haushaltsgen Ornithin-Decarboxylase (ODC), relativ zur Kontrolle an. Die Voraussetzung für die Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ist, dass die PCR Effizienz nahe 1 ist, was impliziert, dass die Effizienz der Kontrollprobe und der Testprobe ungefähr gleich ist. Aus diesem Grund wird für jedes Primerpaar die optimale Bindungstemperatur und die optimale Verdünnung bestimmt.

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

SYBR Green Supermix	10 µl
Primer Mix	1 µl
stetiles A. bidest	7 µl
cDNA (1:4 verdünnt)	2 µl

Die RealTime PCR wird in einem speziell ausgestatteten PCR-Cycler (iCycler von Biorad) mit folgendem Programm durchgeführt:

Zyklus	Zeit	Temperatur	Bemerkung
1x	5 min	95°C	Denaturierung
40x	30 Sek.	95°C	Denaturierung
	30 Sek.	X °C	Annealing
	30 Sek.	72°C	Elongation
80x	10 Sek.	Temperaturgradient	Schmelzkurve
1x	∞	4°C	

Die Spezifität jeder RealTime PCR Reaktion wird anhand einer Schmelzkurve überprüft. Jedes amplifizierte DNA Fragment besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, definiert durch seine Länge und seinen GC-Gehalt. Dazu wird für jeweils 10 Sek. die DNA schrittweise geschmolzen. Die Anfangstemperatur beträgt 60°C und pro Zyklus erhöht sich die Temperatur um 0,5°C. Das Schmelzen der DNA führt zu einem Abfall der Fluoreszenz. Somit kann man unspezifische Amplikons und Primerdimere von einer spezifischen Amplifikation unterscheiden.

#### **4.4.21 Microarray**

In einer Microarray Analyse wurde die Veränderung des Transkriptoms in einem xWnt5a und xWnt11 knockdown Hintergrund und die korrespondierenden Rekonstitutionsexperimente untersucht. Das Ziel dieser Analyse ist, zum Einen Gene zu identifizieren, die spezifisch von xWnt11 oder xWnt5a reguliert sind, zum Anderen Gene, die von xWnt5a und xWnt11 reguliert werden. Die Analyse findet in *open face* Kellerexplantaten im Stadium 12.5 statt.

Der Microarray wurde von der Firma ATLAS Biolabs GmbH, Berlin, durchgeführt. Verwendet wird der *Xenopus* 4x44K Genexpressions Mikroarray von Agilent. Auf diesem sind 43803 Proben gespottet, die aus folgenden Quellen stammen: RefSeq (Release 34), Unigene (Build 86) und TIGR (Release 10.1).

Die Gesamt RNA wird aus Kellerexplantaten im Stadium 12.5, mittels Trizol/Chloroform Extraktion, isoliert. Der Knockdown wird überprüft, in dem dessen Einfluss auf die PAPC Expression in einer quantitativen RealTime PCR untersucht wird. Der Knockdown von Wnt5a führt zu einer Reduktion der PAPC Expression (Schambony and Wedlich, 2007). Des Weiteren wird der RIN Wert der RNA Präparationen bestimmt. Für den Microarray werden nur Proben mit einem RIN-Wert von über 8 verwendet. Es wird mindestens 1 µg Gesamt RNA in einer Konzentration von 100 ng/µl für die Microarray Analyse von drei unabhängigen Experimenten verwendet.

Alle weiteren Schritte werden von ATLAS Biolabs durchgeführt. Dies umfasst die cDNA Synthese, cRNA Synthese und Markierung, Fragmentierung, Hybridisierung und anschließendes Scannen des Microarrays.

### **4.5. Zellkulturmethoden**

#### **4.5.1 Zellhandling**

Humane Zelllinien werden bei 37°C mit 7% CO<sub>2</sub> in DMEM Komplettmedium kultiviert. Die in den Kulturflaschen befindlichen Zellen werden regelmäßig in einem geeigneten Verhältnis passagiert. Dazu werden die adhärenenten Zellen zweimal mit 1x PBS

gewaschen und mittels Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst. Ein geeignetes Volumen der Zellsuspension wird in eine Kulturflasche mit frischem DMEM Kulturmedium überführt. Die verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf eine Kontamination mit Mycoplasmen getestet.

#### **4.5.2 Mycoplasmennachweis mittels PCR Reaktion**

Die Zelllinien werden mit einem PCR Mycoplasmatest Kit (AppliChem GmbH, Darmstadt) auf eine Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Dazu wird der von den Zellen verbrauchte Zellkulturüberstand gesammelt und mit diesem laut Herstellerangaben den PCR basierten Mycoplasmentest durchgeführt.

#### **4.5.3 Kryokonservierung von Zellen**

Die Zellen können mittels Kryokonservierung über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Konfluente Zellen werden dreimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die gelösten Zellen werden in 3 ml Kompletmedium aufgenommen und für 5 min bei 900 rpm bei 4°C abzentrifugiert, in 1ml DMEM-Kompletmedium resuspendiert und schrittweise DMEM-Einfriermedium dazu geben (5x 200 µl). Zwischen jedem Schritt werden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Die Kryoröhrchen werden 14-21 Tage bei -80°C gelagert und dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zur Lagerung überführt.

Zur Rekultivierung der konservierten Zellen, werden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein Falcon überführt und mit DMEM-Kompletmedium auf 15 ml aufgefüllt. Die Zellen werden für 5 min bei 900 rpm und 4°C abzentrifugiert, in 5 ml DMEM-Kompletmedium resuspendiert und auf Gewebekulturflaschen verteilt.

#### **4.5.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer**

Die Neubauer Zählkammer wird mit 10 µl einer Zellsuspension durch Kapillarkräfte gefüllt. Es werden die 4 Großquadrate ausgezählt und gemittelt. Dieser Mittelwert ergibt, mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor multipliziert, die Anzahl Zellen pro ml der Suspension.

#### **4.5.5 Transfektion mittels kationischer Polymere**

Kationische Polymere bilden einen positiv geladenen Komplex mit der negativ geladenen DNA. Dieser positiv geladene Komplex kann an die negativ geladene Membran binden und wird vermutlich über Endozytose aufgenommen.

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Transfektions-Kits benutzt. Die Zellen werden nach Herstellerangaben ausgesät und transfiziert.

#### **4.5.6 Transfektion durch Calciumphosphat Präzipitation**

Für den Reportergenassay werden HEK293 Zellen mittels Calciumphosphat Präzipitation nach Gorman et al. (1984) transfiziert. 4 h vor der Transfektion wird das Medium der semikonfluenten HEK293 Zellen gewechselt, genau 2 ml pro Well der 6-Well Platte, um den Stoffwechsel anzukurbeln. Folgender Transfektionsansatz wird in 400 µl HEPES verdünnt: 0,4 µg CMV-β-Galactosidase, 0,8 µg Reporter mit Luciferase-Markierung und 1 µg des zu testenden DNA Konstrukts. Zu diesem Ansatz werden 20 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> langsam eingerührt. Das Transfektionsgemisch inkubiert 20 min bei Raumtemperatur und wird anschließend zu den Zellen gegeben. Die zu transfizierende DNA bindet in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat an das ausfallende Calciumphosphat, die entstandenen Kristalle werden auf die Zellen gegeben. Die HEK293 Zellen nehmen diese Kristalle, die auch DNA enthalten, auf. Nach 4 h wird das Medium wieder gewechselt.

#### **4.5.7 Reportergenassay**

48 h nach der Transfektion kann der Reportergenassay durchgeführt werden. Die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalkaskade kann anhand des Luziferase gekoppelten ATF-2 Promotors bestimmt werden (Ohkawara and Niehrs, 2011). Wird der Promotor aktiviert, wird das Enzym Luziferase vermehrt exprimiert.

Für den Assay werden die Zellen in 1,5 ml 1x PBS aufgenommen. 900 µl werden für den β-Galactosidase Assay eingesetzt und 450 µl für den Luziferase Assay.

##### **4.5.7.1 Luziferase Assay**

Alle folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C werden die Zellen in 150 µl 1x LuziLyse resuspendiert. Durch Aufziehen über eine 0.4 mm Kanüle werden die Zellen lysiert. 20 µl der Proben werden mit 100 µl Luziferase Reagenz versetzt. Die Luziferase katalysiert die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, die freigesetzte Lichtmenge wird an einem Luminometer gemessen.

##### **4.5.7.2 β-Galactosidase Assay**

Zur Bestimmung der Transfektionsrate der einzelnen Ansätze und zur späteren Normalisierung wird der β-Galactosidase Assay durchgeführt. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C werden die Zellen in 150 µl 0.25 M Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> resuspendiert. Durch Aufziehen über eine 0.4 mm Kanüle werden die Zellen lysiert. Zum Entfernen der Zelltrümmer wird die Zellsuspension erneut 5 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert.

20 µl des Zelllysats werden mit 600 µl Assay Mix (6 µl 100x Magnesium Lösung, 132 µl ONPG-Substrat, 462 µl 0,1 M NaPhosphat-Puffer) vermischt. Dieses Gemisch wird bei Raumtemperatur inkubiert bis eine Gelbfärbung zu erkennen ist. Die Reaktion wird mit 1 ml 1 M NaHCO<sub>3</sub> gestoppt und die Extinktion bei 420 nm gemessen.

#### **4.6. Ni/NTA-Affinitätschromatographie**

Mit der Affinitätschromatographie können heterolog exprimierte Proteine, aufgrund ihrer Affinität zu einer immobilisierten stationären Phase, aufgereinigt werden. Zur Aufreinigung von Proteinen mit einer sechsfachen Histidin-Markierung (His<sub>6</sub>-Markierung) wird die Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC) benutzt. Dabei bilden Ni<sup>2+</sup> mit Nitriloessigsäure-(NTA)-Rest einen Chelatkomplex, der an Agarose immobilisiert ist (stationäre Phase). IMAC beruht auf der Affinität zwischen Ni<sup>2+</sup> und Histidin in einer wässrigen Lösung. Dabei bindet der Histidin Imidazolring an Ni<sup>2+</sup>. Die mobile Phase ist Zellkulturüberstand mit heterolog produzierten His<sub>6</sub>-markierten Proteinen.

##### **4.6.1 Vorbereiten der Proben für die Affinitätschromatographie**

Semikonfluente HEK293 Zellen werden transient mit einem Plasmid, das die His<sub>6</sub>-markierte extrazelluläre Domäne von C-Cadherin unter dem CMV-Promotor exprimiert, mittels kationischen Polymeren transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wird zum ersten Mal Medium gesammelt und mit der Selektion der transfizierten Zellen begonnen. Zur Selektion werden 400 µl der 100 mg/ml G418 Stammlösung pro 20 ml Medium dazu gegeben. Der Überstand wird alle zwei Tage gesammelt, bis die Zellen absterben. Abgestorbene Zellen oder Zelltrümmer werden durch 10 min Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C aus dem gesammelten Überstand entfernt. Pro 100 ml gesammelter Überstand wird eine Proteaseinhibitor Tablette dazu gegeben und bei 4°C gelagert. 500 ml Überstand werden mittels Druckluft durch einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert. Der Überstand wird bei 4°C mittels Vivaspin 15 Zentrifugalfilter mit einem MWOC von 30 kDa eingeeengt. Der eingeeengte Überstand wird anschließend gegen 1x HBS Puffer dialysiert und nochmals durch einen Spritzenfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert. Aus dem eingeeengten und filtrierten Überstand kann nun die His<sub>6</sub>-markierte extrazelluläre Domäne von C-Cadherin mit IMAC aufgereinigt werden.

##### **4.6.2 Reinigen und Bepacken einer Chromatographiesäule**

Für jedes aufzureinigende Protein wird eine Chromatographiesäule mit frischem Säulenmaterial (Ni-NTA Beads) bepackt.

Die Säule wird vor der Benutzung gereinigt. Der Säulen-Glaskörper und die Konterschraube und -mutter werden über Nacht in 0.1 M NaOH Lösung eingelegt. Der Stempel mit Dichtungsring und Fritte wird für 30 min mit 0.1 M NaOH Lösung behandelt. Der Säulen-Glaskörper und der Stempel werden gründlich mit A. bidest. abgespült bevor sie zusammen gesetzt werden. Dabei ist die Säule ausschließlich von unten zu schließen, damit sie von oben gefüllt werden kann. Die Säule wird mit 6 ml der Ni-NTA Beads Suspension gefüllt und zuerst mit zweifachem Säulenvolumen A. bidest. und anschließend mit zweifachem Säulenvolumen filtriertem 1x HBS gewaschen. Auf die bepakte Säule wird luftblasenfrei der zweite Stempel aufgesetzt und befestigt. Anschließend wird die Säule an die FPLC Anlage angeschlossen, während diese mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute läuft.

#### 4.6.3 Reinigungsprogramm der FPLC-Anlage

CEC1-5 wird mittels eines linearen Imidazol Gradients gereinigt. Dieser startet bei einem Puffervolumen von 30 ml und einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min bei 10 mM Imidazol und endet bei 500 mM Imidazol. In der folgenden Tabelle ist das Reinigungsprogramm aufgeführt.

	Beschreibung		
1	Sammeln von 1 ml Fraktionen während des gesamten Laufs		
2	Position der Pre-Säule		
3	Position der Post-Säule		
4	Beladung der Säule mit Probe	Laden: A2-Rohextrakt direkte Injektion	V: Rohextraktvolumen + 5 ml Fluss : 0.5 ml/min
5	Isokratischer Fluss	A1-HBS/ 10 mM Imidazol	V: 15 ml Fluss : 0.5 ml/min
6	Linearer Gradient	A1-HBS/ 10 mM Imidazol 100% - 0% B-HBS/500mM Imidazol 0% - 100%	V: 30 ml Fluss : 0.5 ml/min
7	Isokratischer Fluss	B-HBS/500mM Imidazol	V: 15 ml Fluss : 0.5 ml/min
8	Isokratischer Fluss	A1-HBS/ 10 mM Imidazol	V: 15 ml Fluss : 0.5 ml/min
9	UV-Lampe wird ausgeschaltet		

Zunächst wird das Rohextrakt über den Schlauch A2 auf die stationäre Phase, die Ni/NTA Beads, geladen. Unspezifische Bindungen an das Ni<sup>2+</sup> wird durch Spülung mit 15 ml Startpuffer (HBS/10 mM Imidazol) entfernt. Der lineare Imidazol Gradient bis zu HBS/ 500 mM Imidazol bewirkt die Elution des Proteins. Nach Ende des Gradienten wird die Säule mit Elutionspuffer gespült und anschließend in Startpuffer umpuffert.

Die Elutionsfraktionen werden mittels eines Fraktionssammlers in 1.5 ml Volumen gesammelt. Zur Ermittlung proteinhaltiger Fraktionen wird während der Elution kontinuierlich die UV-Absorption bestimmt. Von diesen Fraktionen werden 20 µl abgenommen und im Western Blot überprüft. Die positiven Fraktionen werden über einen Viva Spin Filter mit einem MWOC von 30 kDa gepoolt. Dazu wird der Viva Spin Filter 3x 10 min bei 4000 rpm für 10 min gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 1% BSA/HBS blockiert. Die Fraktionen werden auf den Filter gegeben und 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, dies wird wiederholt, bis die Fraktionen auf circa 1 ml eingeeengt sind. Zu den eingeeengten Fraktionen wird DTT in einer Endkonzentration von 1 mM gegeben und bei -80°C gelagert.

#### **4.7. Auswertung**

##### **4.7.1 Blastoporuschluss**

Eine Beeinträchtigung der konvergenten Extensionsbewegung, lässt sich auch in einem verzögerten Schluss des Blastoporus beobachten (Keller and Shook, 2008). Wenn die Kontrollembryonen Stadium 13 (vollständig geschlossener Blastoporus) erreicht haben, wird ausgewertet bei welchem Anteil der injizierten Embryonen eine Verzögerung im Blastoporuschluss beobachtet werden kann. Aufgrund der Binomialverteilung und des großen Stichprobenumfangs wurde mit dem  $\chi^2$ -Test bestimmt, ob zwei Stichproben signifikant unterschiedlich sind.

##### **4.7.2 *in situ* Hybridisierung**

Im Stadium 13 wird *chordin* in der prechordalen Platte und im Notochord exprimiert. Aufgrund dessen kann die Streckung der Körperachse anhand der Chordin Expression bestimmt werden, diese wird mittels einer *in situ* Hybridisierung sichtbar gemacht. Es werden drei Phänotypen unterschieden: langgestrecktes Notochord, verbreitertes Notochord und keinerlei Streckung des Notochords. Hinsichtlich *xBra* konnten ausschließlich zwei Phänotypen unterschieden werden Expression kreisrund um den Blastoporus und im Notochord oder ausschließlich kreisrund um den Blastoporus. Aufgrund der Binomialverteilung und des großen Stichprobenumfangs wurde mit dem  $\chi^2$ -Test bestimmt, ob zwei Stichproben signifikant unterschiedlich sind.

##### **4.7.3 Reporteragenassay**

Die Werte des Luziferase Assays werden auf die Werte des  $\beta$ -Galactosidase Assays normalisiert.

$$\text{Normalisierung} = \frac{\text{Werte Luciferase Assay}}{\text{Werte } \beta - \text{Galactosidase Assay} * 1000}$$

Diese Werte werden zusätzlich für die Kontrolltransfektion auf eins gesetzt, somit werden die Test-Werte als x-fache Luziferaseaktivität dargestellt.

#### 4.7.4 **open face Kellerexplantate**

Die *open face* Kellerexplantate werden phänotypisch ausgewertet. Es sind drei unterschiedliche Phänotypen definiert: Elongation und Konstriktion, ausschließlich Elongation und keinerlei Elongation (Abbildung 5.4). Dabei werden die Elongation und Konstriktion getrennt voneinander ausgewertet:

$$\text{Elongation: Anteil Explantate mit Elongation} = \frac{\sum \text{Elongierte}}{\sum \text{Explantate Gesamt}}$$

$$\text{Konstriktion: Anteil Explantate mit Konstriktion} = \frac{\sum \text{Elongierte mit Konstriktion}}{\sum \text{Elongierte}}$$

Die Ergebnisse werden zusätzlich für die jeweilige Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS von IBM. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs und der Binomialverteilung der Ergebnisse, wurde zur Bestimmung des Signifikanzlevels der exakte Test nach Fisher angewendet.

#### 4.7.5 **Adhäsionsassay**

Die auf CEC1-5 adhären Zellen werden vor ( $N_0$ ) und nach dem Assay ( $N_t$ ) mit der Cell Counter Funktion von ImageJ gezählt. Zur Bestimmung der relativen Adhäsion an CEC1-5 wird der Quotient aus  $N_t$  und  $N_0$  bestimmt und auf die Adhäsion an Kontrolloberflächen normalisiert.

#### 4.7.6 **Kolokalisation**

Zur quantitativen Auswertung der xWnt5a-eGFP Membranlokalisierung wurde der Manders Koeffizient 2 bestimmt (Manders et al., 1993), dieser gibt die Kolokalisation von xWnt5a-eGFP mit der Membranfärbung Gap43-mCherry wieder.

#### 4.7.7 **Microarray**

Die bioinformatische Auswertung wurde von ATLAS Biolabs übernommen. Durch den bioinformatischen Vergleich der Signale der Kontrollmorpholino Explantate und der Knockdown Explantate, können die differentiell zur Kontrolle regulierten Gene identifiziert werden.

Die Auswahl der Gene erfolgte anhand der fachen Veränderung des Signals und der Signifikanz. Zur Verifikation und weiteren Analyse der Knockdowns wurden ausschließlich die Gene mit einer fachen Veränderung von +/- 2 ausgewählt, die eine Signifikanz von weniger als 0.05 aufweisen, für die xWnt11 Überexpression wurden die Kriterien auf +/- 1.9 und einen p-Wert < 0.09 gelockert. Die Auswahl der Gene wurde mit Hilfe von Matlab getroffen, dabei wurden die Listen nach den jeweiligen Kriterien gefiltert und dann aus diesen gefilterten Listen eine Auswahl getroffen.

## 5. Ergebnisse

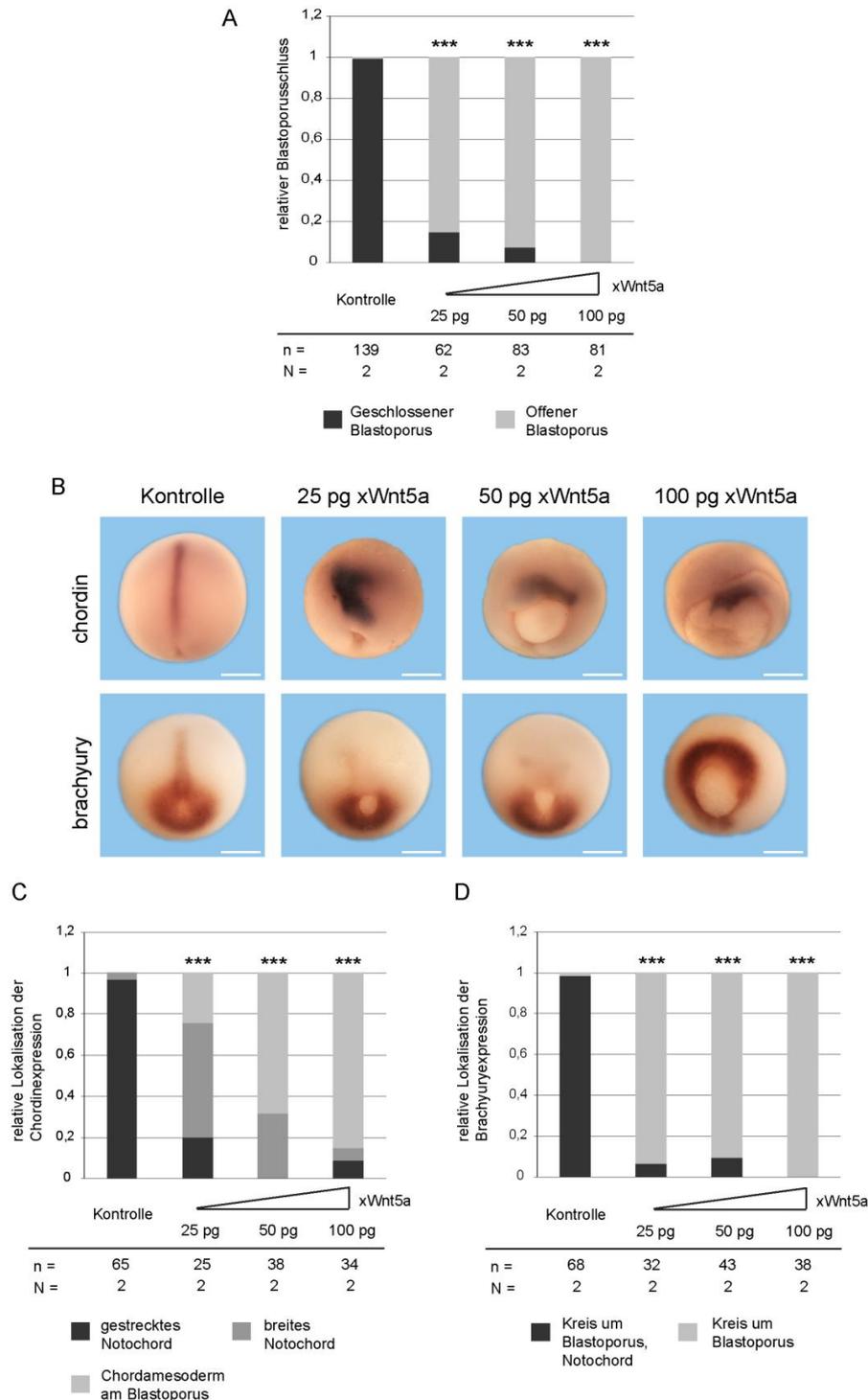
### 5.1. Charakterisierung von xWnt5a und xWnt11 während der konvergenten Extension

Die nicht-kanonischen Wnt-Liganden xWnt5a und xWnt11 besitzen eine nicht-redundante Funktion in der konvergenten Extension während der Gastrulation (Schambony and Wedlich, 2007). Wie eine Zelle während der konvergenten Extension zwischen beiden Liganden unterscheiden kann und in welchen Strukturelementen der Wnt-Moleküle diese Unterscheidung verankert ist, ist bisher unerforscht. Als Basis für diese Analysen wurden im Folgenden erst geeignete Analysesysteme identifiziert und etabliert, die eine einfache und zuverlässige Unterscheidung, zwischen xWnt5a und xWnt11 Funktionen, ermöglichten.

#### 5.1.1 Die Funktionen von xWnt5a und xWnt11 lassen sich mit einfachen Analysesystemen nicht verlässlich unterscheiden

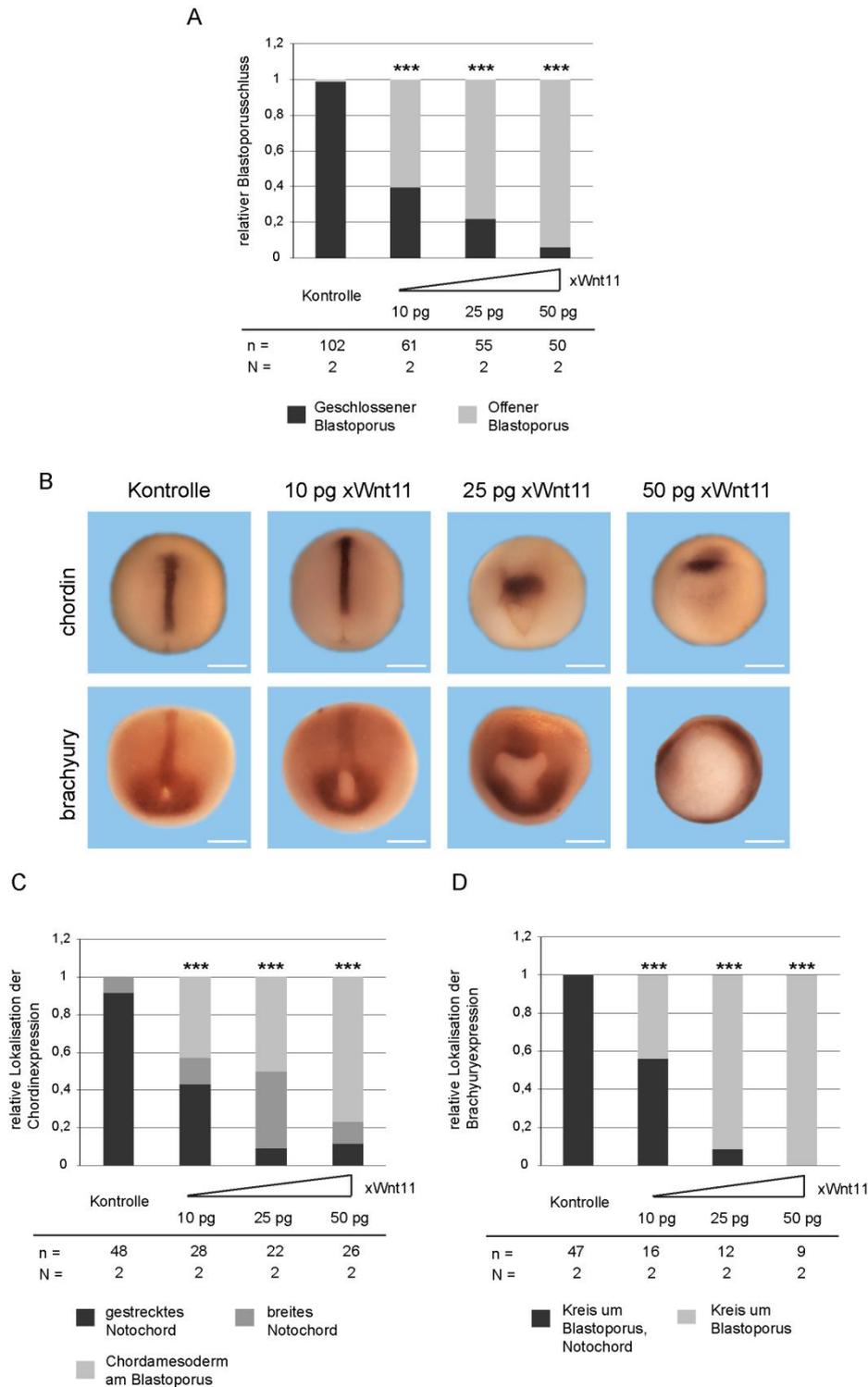
Die konvergente Extension bewirkt zum Einen den Schluss des Blastoporus und zum Anderen die Streckung des Notochords (Keller et al., 2000). Somit führt eine Beeinflussung der konvergenten Extension zu einer Verzögerung des Blastoporusschlusses und zu einem nicht vollständig gestreckten Notochord. Der Einfluss von xWnt5a und xWnt11 auf die konvergente Extension wurde konzentrationsabhängig, mittels Funktionsgewinn-Studien, untersucht. Die injizierten Embryonen wurden ausgewertet, als die nicht-injizierten Geschwister Stadium 13 erreicht hatten und somit deren Blastoporus geschlossen war.

Bereits bei einer Überexpression von 25 pg xWnt5a mRNA zeigten über 80% der Embryonen eine Verzögerung im Blastoporusschluss. Die Erhöhung der Dosis auf 100 pg führte dazu, dass nahezu 100% der Embryonen eine Verzögerung des Blastoporusschlusses aufwiesen. Beide Veränderungen waren im  $X^2$ -Signifikanztest hochsignifikant (Abbildung 5.1). Die Analyse des pan-mesodermalen Markergens *xBra* und des Notochord-spezifischen Markergens *chordin* unterstützten diese Ergebnisse. Dabei scheint *xBra* besonders empfindlich auf die Überexpression von xWnt5a zu reagieren, da bereits bei 25 pg xWnt5a mRNA die Expression auf einen Ring um den Blastoporus beschränkt war, wohingegen nur etwas mehr als 50% eine verbreiterte Expression von *chordin* im Notochord detektiert wurde. Bei einer Erhöhung der xWnt5a Konzentration wurde die Streckung des Notochord fast vollständig gehemmt und das Chordamesoderm befand sich oberhalb des Blastoporus (Abbildung 5.1).



### Abbildung 5.1: xWnt5a Überexpression beeinflusst den Blastoporuschluss und die Streckung des Notochords

(A) Die Überexpression von xWnt5a mRNA resultiert konzentrationsabhängig in einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und (B) veränderter Lokalisation der *chordin* und *xBra* Expressionsdomäne. (C) Statistische Auswertung der *chordin* Phänotypen. Mit steigender xWnt5a Konzentration nimmt der Anteil an Embryonen zu, die keinerlei Streckung des Notochords zeigen. (D) Statistische Auswertung der *xBra* Phänotypen. *xBra* kann mit steigender xWnt5a Konzentration ausschließlich kreisförmig um den Blastoporus detektiert werden. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen;  $\chi^2$  Signifikanztest: \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ ).



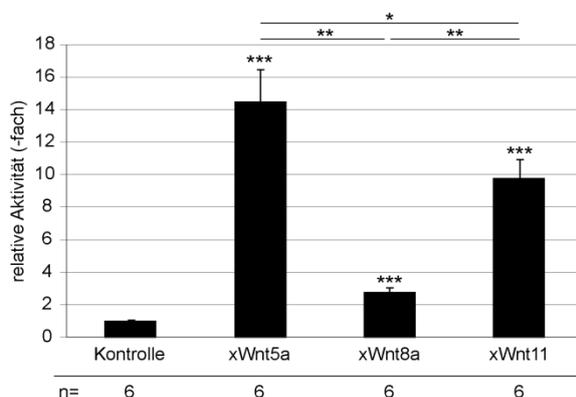
### Abbildung 5.2: xWnt11 beeinflusst den Blastoporuschluss und die Streckung des Notochords

(A) Die Überexpression von xWnt11 mRNA resultiert konzentrationsabhängig in einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und (B) veränderter Lokalisation der *chordin* und *xBra* Expressionsdomäne. (C) Statistische Auswertung der *chordin* Phänotypen. Mit steigender xWnt11 Konzentration nimmt der Anteil an Embryonen zu, die keinerlei Streckung des Notochords zeigen. (D) Statistische Auswertung der *xBra* Phänotypen. *xBra* kann mit steigender xWnt11 Konzentration ausschließlich kreisförmig um den Blastoporus detektiert werden. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen;  $\chi^2$  Signifikanztest: \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ ).

Wie xWnt5a mRNA führte auch überexprimierte xWnt11 mRNA konzentrationsabhängig zu einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und zu einer Veränderung der spezifischen Lokalisation der Markergene *xBra* und *chordin*. Die Effekte zeigten ebenfalls eine deutliche Dosisabhängigkeit, dabei wirkten xWnt5a und xWnt11 im selben Konzentrationsbereich (Abbildung 5.2). Dies war insofern überraschend als vorhergehende Experimente zeigten, dass die konvergente Extension in der Gastrula auf überexprimierte xWnt11 mRNA sensibler reagiert als auf überexprimierte xWnt5a mRNA (Rigo-Watermeier et al., 2012).

Insgesamt stellt weder die Analyse des Blastoporuschlusses, noch die Analyse der Expressionsdomäne der mesodermalen Markergene ein geeignetes Analysesystem dar, um funktionale Unterschiede zwischen xWnt5a und xWnt11 zu detektieren. Beide Wnts beeinflussen die konvergente Extension, nicht aber die Mesoderminduktion. Die Überexpression beider Wnts resultierte in einem verzögerten Blastoporuschluss, sowie einer veränderten Lokalisation des Mesoderms.

Als alternatives Analysesystem zur Unterscheidung zwischen xWnt5a und xWnt11 spezifischen Funktionen, wurde die Aktivierung des ATF2 gekoppelten Luziferase Reporters untersucht. In *Xenopus* Embryonen wurde gezeigt, dass dieser Reporter sowohl durch xWnt5a, als auch xWnt11 aktiviert wird (Ohkawara and Niehrs, 2011). In transfizierten HEK293 Zellen aktivierte kotransfiziertes xWnt5a den ATF2-Reporter 14-fach und damit deutlich stärker als kotransfiziertes xWnt11, das den ATF2-Reporter nur 9,5 fach aktiviert. Dieser Unterschied der Aktivierung war im Zellkultursystem im einseitigen studentischen t-Test signifikant. Auch kotransfiziertes xWnt8a aktivierte den Reporter über 2-fach, dies aber signifikant schwächer als die nicht-kanonischen Wnt-Moleküle (Abbildung 5.3). Somit scheint sich der ATF2-Luziferase Assay als Analysesystem zu eignen, um *in vitro* zwischen xWnt5a und xWnt11 zu unterscheiden. Die Unterschiede sind allerdings gering. Eine überzeugende Aussage über xWnt5a und xWnt11 spezifische Funktionen kann letztendlich ausschließlich *in vivo* getroffen werden.



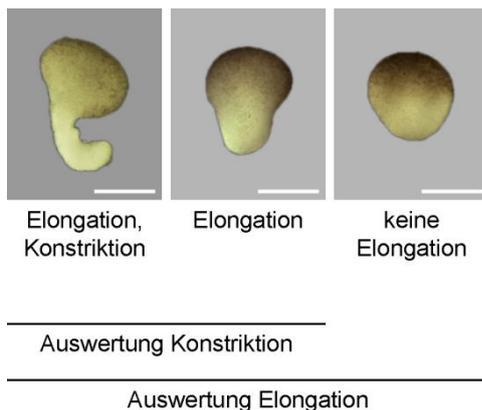
**Abbildung 5.3: Aktivierung des ATF2-Luziferase Reporters**

Der ATF2-Luziferase Reporter wird durch xWnt5a, xWnt8a und xWnt11 aktiviert, wobei xWnt5a und xWnt11 den Reporter stärker aktivieren als xWnt8a. (n= Anzahl unabhängiger Transfektionen; Student'scher t-Test: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

### 5.1.2 xWnt5a hemmt die Konstriktion, wohingegen xWnt11 die Elongation inhibiert

Da die einfachen Analysesysteme offensichtlich nicht geeignet sind, zuverlässig zwischen xWnt5a oder xWnt11 vermittelten Effekten zu unterscheiden, wurde der Elongationsassay von dorsalen Marginalzonen etabliert. Das Ziel war, die Unterschiede quantitativ erfassbar zu machen.

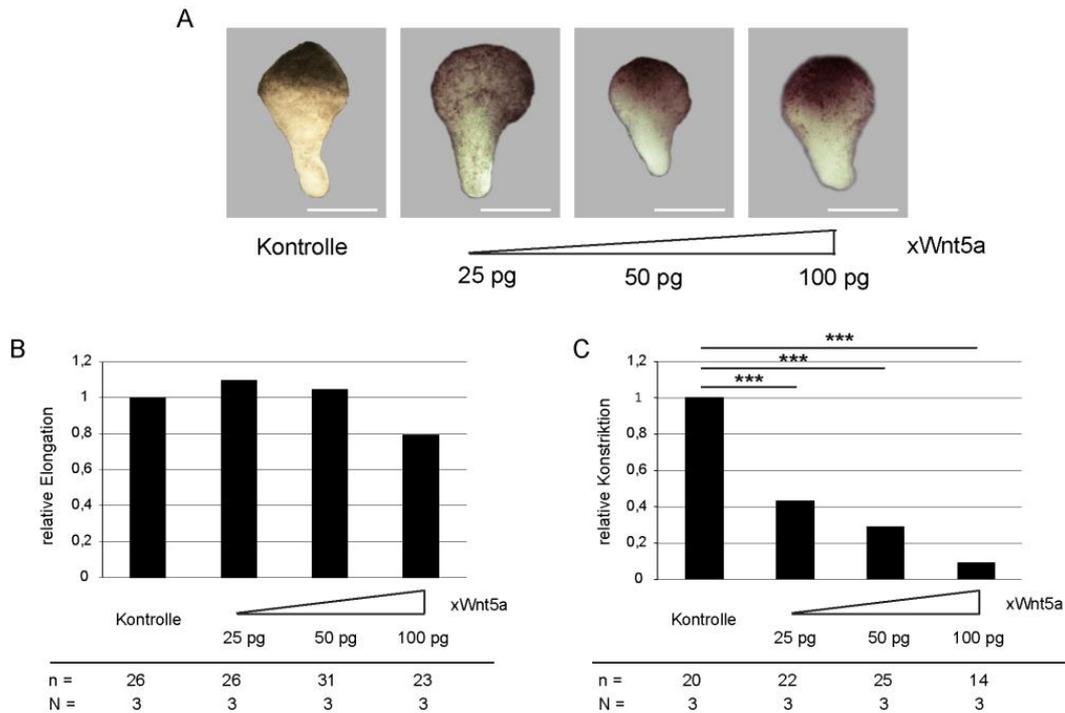
Die *open face* Kellereplantate der dorsalen Marginalzone wurden im Stadium 10.25 explantiert und anschließend kultiviert, bis sich die Kontrolleplantate im Stadium 13 befanden. Diese zeigten aufgrund der konvergenten Extension einen elongierten und verschmälerten Phänotyp. Bei Inhibition der Konstriktion, waren die Explantate elongiert, jedoch nicht verschmälert. Eine Hemmung der Elongation resultierte in Explantaten, die sich zwar leicht strecken, aber letztendlich nicht zur Elongation fähig waren. Eine Inhibition der Konstriktion kann ausschließlich an elongierten Explantaten ausgewertet werden (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4: Auswertung Elongationsassay**

Zur Auswertung des Elongationsassays wurden 3 Phänotypen definiert: Elongation und Konstriktion, ausschließlich Elongation und keinerlei Konstriktion. Die Konstriktion wurde ausschließlich anhand derer ausgewertet, die eine Elongation und Konstriktion oder ausschließlich eine Elongation zeigten. Zur Auswertung der Elongation wurden diejenigen, die keinerlei Elongation zeigten, zusätzlich in Betracht gezogen. (Maßstab: 200 µm).

Die meisten der xWnt5a überexprimierenden Explantate elongierten. Erst bei einer Überexpression von 100 pg xWnt5a war eine zu vernachlässigende nicht signifikante ( $p > 0.05$ ) Inhibition der Elongation zu beobachten. Wohingegen die Konstriktion der Explantate deutlich beeinträchtigt war. Die Hemmung der Konstriktion war hoch signifikant und konzentrationsabhängig. Bei Überexpression von 25 pg xWnt5a zeigten nur knapp über 40% der Explantate eine Konstriktion, bei 50 pg nur noch 25% und bei 100 pg weniger als 10% (Abbildung 5.5).



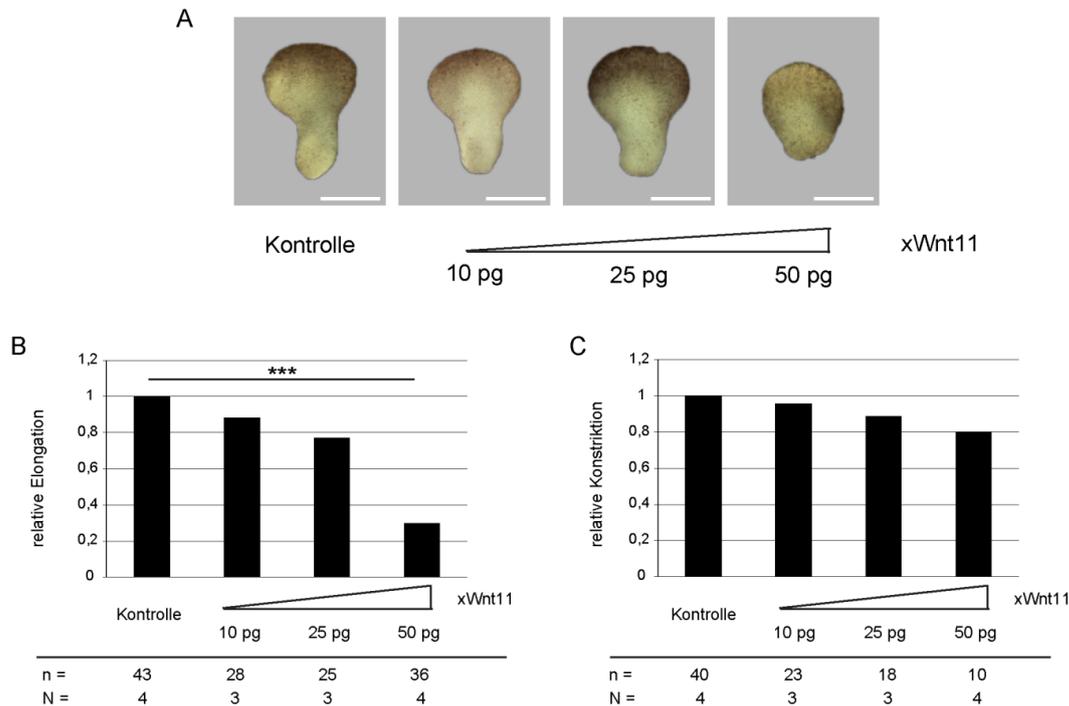
### Abbildung 5.5: Überexpression von xWnt5a hemmt die Konstriktion

(A) Die Überexpression von xWnt5a resultiert in breiteren, elongierten Explantaten. (B) Dabei ist die Elongation nicht beeinflusst, (C) wohingegen die Konstriktion konzentrationsabhängig gehemmt wird. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen; exakter Test nach Fisher: \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ ).

Bei Überexpression von xWnt11 dagegen war die Elongation signifikant und konzentrationsabhängig gehemmt. Nach Applikation von 50 pg xWnt11 elongierten nur noch 25% der Explantate. Diese wenigen elongierten Explantate zeigten jedoch keinerlei signifikante Veränderung der Konstriktion (Abbildung 5.6).

Damit lassen sich mit Hilfe des Elongationsassays die xWnt5a und xWnt11 vermittelten Effekte deutlich unterscheiden. 50 pg xWnt5a mRNA verhindert die Konstriktion ohne die Elongation zu beeinflussen, wohingegen 50 pg xWnt11 mRNA die Elongation hemmt ohne eine Beeinträchtigung der Konstriktion.

Aufbauend auf diesen Analysensystemen können molekulare Mechanismen betrachtet werden, die diesen funktionalen Unterschieden zugrunde liegen. Darüber hinaus ist es möglich zellbiologische sowie transkriptionelle Veränderungen zu untersuchen. Somit lassen sich die, der xWnt5a induzierten Inhibition der Konstriktion und der xWnt11 induzierten Inhibition der Elongation zugrunde liegenden Mechanismen erforschen.



### Abbildung 5.6: Überexpression von xWnt11 hemmt die Elongation

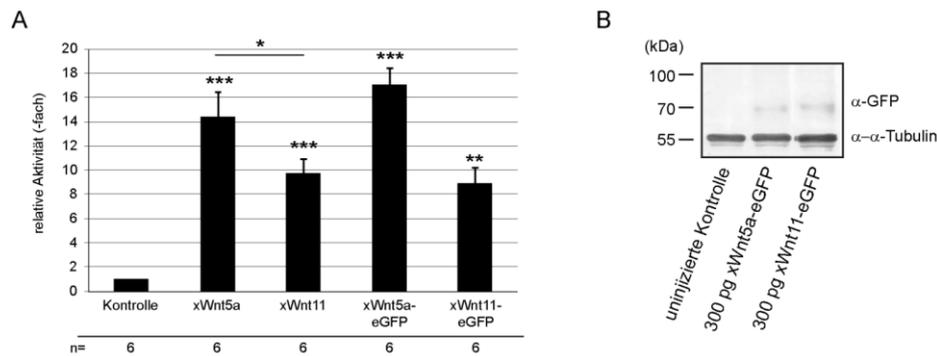
(A) Die Überexpression von xWnt11 resultiert in einer Hemmung der Elongation. (B) Die Elongation ist konzentrationsabhängig gehemmt (C) wohingegen die Konstriktion nicht beeinflusst wird. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen; exakter Test nach Fisher: \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )

## 5.2. Molekulare Analyse von xWnt5a und xWnt11

Um das Wnt-Signalnetzwerk auch mittels Lebendzellaufnahmen, während der konvergenten Extension, untersuchen zu können, wurden Fluoreszenz-markierte Wnt-Moleküle kloniert. Das Anhängen einer Markierung an Wnt-Moleküle resultiert häufig in funktionslosen Wnts, für *Xenopus* gibt es erst ein markiertes, funktionales Wnt-Molekül, xWnt2b-eGFP (Holzer et al., 2012). Aus diesem Grund wurden xWnt5a-eGFP und xWnt11-eGFP umfassend auf deren Funktionalität untersucht.

### 5.2.1 xWnt5a-eGFP ersetzt im Elongationsassay endogenes xWnt5a

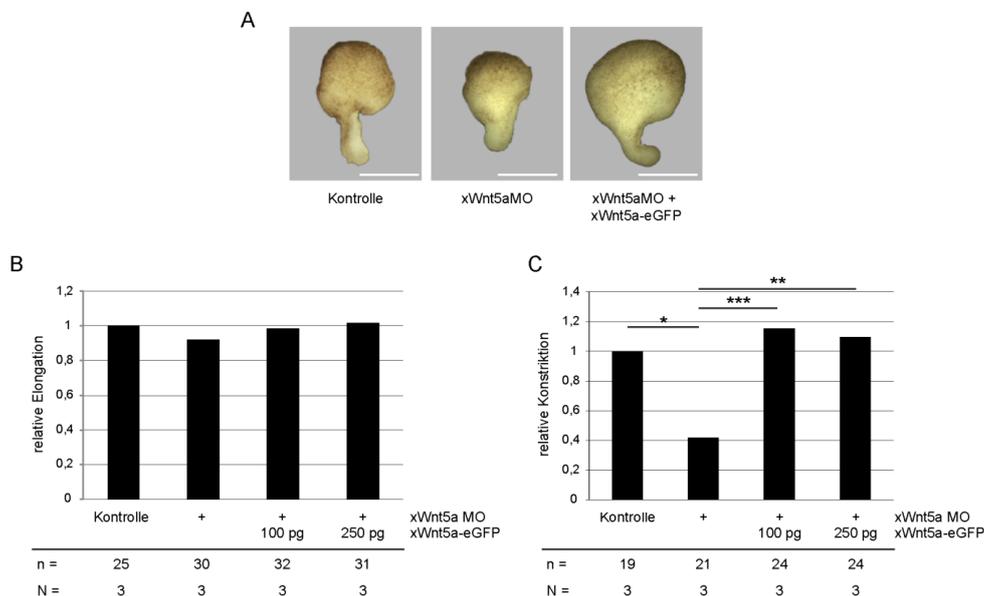
Sowohl xWnt5a-eGFP, als auch xWnt11-eGFP aktivierten den ATF2-Luziferase Reporter in HEK293 Zellen vergleichbar, wie das jeweilige nicht markierte Wnt Konstrukt (Abbildung 5.7). Darüber hinaus scheinen beide Konstrukte im Embryo stabil zu sein, da im Western Blot keine Degradationsprodukte der Fusionsproteine nachgewiesen werden konnten (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7: Fluoreszenz-markierte nicht-kanonische Wnt-Moleküle sind *in vitro* aktiv**

(A) xWnt5a-eGFP und xWnt11-eGFP aktivieren den ATF2 Luziferase Reporter vergleichbar mit xWnt5a beziehungsweise xWnt11. (B) Expressionsnachweis von xWnt5a-eGFP und xWnt11-eGFP in Stadium 11 Embryonen, als Kontrolle dienten uninjizierte Embryonen, als Ladekontrolle wurde α-Tubulin detektiert. (n= Anzahl unabhängiger Transfektionen; Student'scher t-Test: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

Die Funktionalität von xWnt5a-eGFP wurde *in vivo* mittels Rekonstitutionsexperimenten im Elongationsassay verifiziert. Wie schon gezeigt (Schambony and Wedlich, 2007) war die Konstriktion der Explantate der dorsalen Marginalzone in xWnt5a Morphanten gestört. Koinjizierte xWnt5a-eGFP mRNA hob diesen Effekt vollständig auf. Somit kann xWnt5a-eGFP das endogene xWnt5a Protein ersetzen und bildet daher ein aktives Protein (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8: xWnt5a-eGFP kann endogenes xWnt5a ersetzen**

(A) Ein Knockdown von xWnt5a resultiert in einem Konstriktionsphänotyp, der durch Koinjektion von xWnt5a-eGFP gerettet werden kann. (B) Die Elongation wird weder durch Wnt5aMO noch die Rekonstitutionsexperimente beeinflusst (D) Der xWnt5aMO Konstriktionsphänotyp kann spezifisch durch Koinjektion von xWnt5a-eGFP gerettet werden. (Injektionsmenge: 0.5 pmol xWnt5aMO; N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Explantate; exakter Test nach Fisher \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )

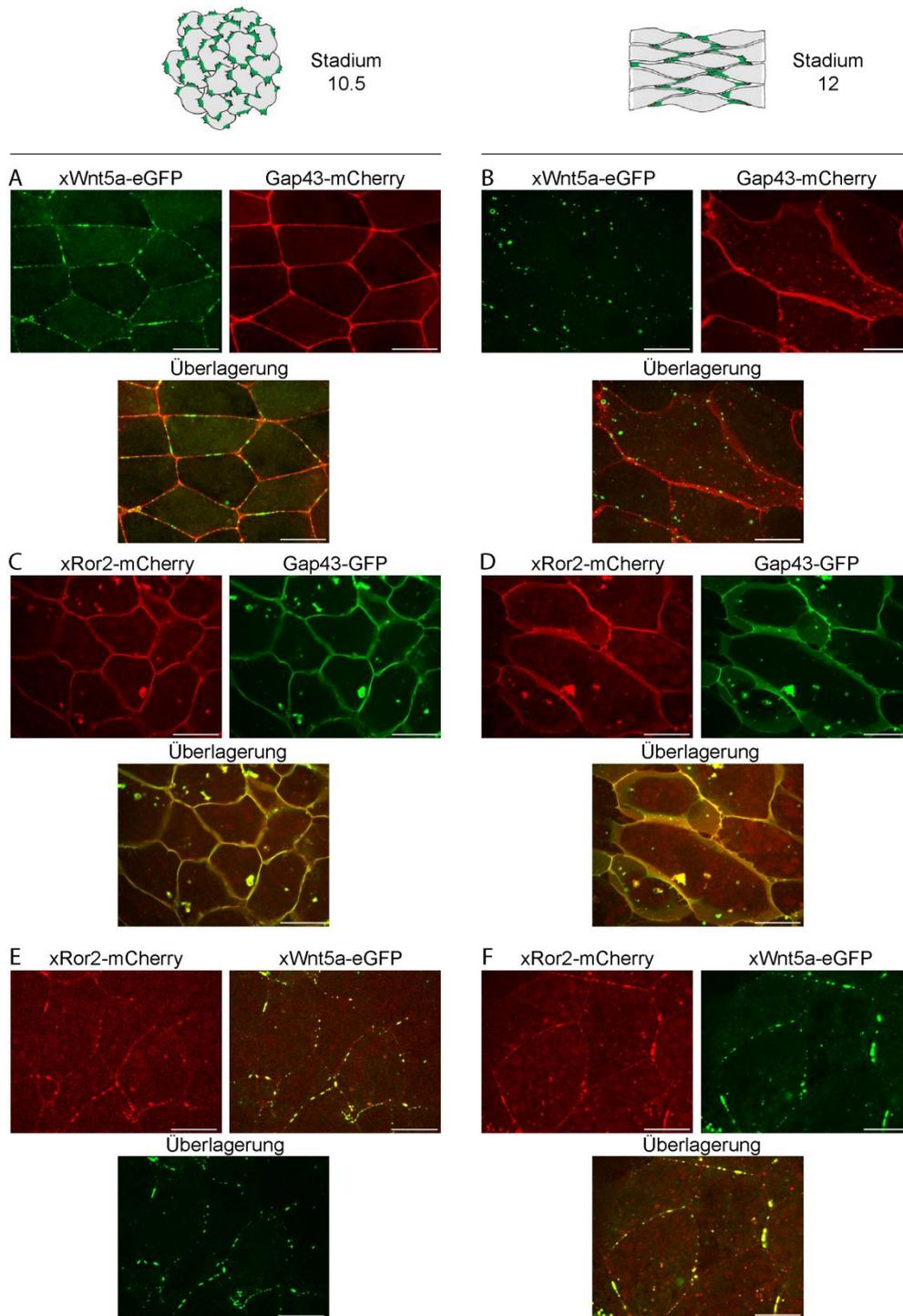
### 5.2.2 xWnt5a-eGFP und xRor2-mCherry diffundieren gemeinsam in der Membran

Mit dem Fluoreszenz-markierten xWnt5a-eGFP gelang es erstmals mittels Lebendzellaufnahmen ein aktives nicht-kanonisches Wnt-Molekül an der Zelloberfläche nachzuweisen. Dabei fiel auf, dass xWnt5a-eGFP in distinkten Fokussen an der Plasmamembran akkumuliert war. Diese Akkumulation war bereits in multipolaren Zellen des dorsalen Mesoderms im Stadium 10.5 zu beobachten. Dies wurde ebenfalls zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt in den bipolaren Zellen des dorsalen Mesoderms beobachtet (Abbildung 5.9). Darüber hinaus war zwischen den Agglomeraten ebenfalls eine schwache Fluoreszenz zu detektieren. Der fluoreszenz-markierte Korezeptor von xWnt5a, xRor2-mCherry, war dagegen homogen über die Membran verteilt, unabhängig vom Fortschritt der Gastrulation (Abbildung 5.9).

Werden Ligand und Rezeptor gemeinsam überexprimiert, veränderte sich die Lokalisation des Rezeptors. Der Rezeptor xRor2-mCherry erscheint nun in den xWnt5a-eGFP positiven Agglomeraten. Dies konnte in der frühen, als auch späten Gastrulation beobachtet werden. Damit rekrutierte xWnt5a-eGFP den Korezeptor xRor2-mCherry in membranständige Cluster und es wurde erstmals mittels Lebendzellaufnahmen gezeigt, dass xWnt5a und xRor2 *in vivo* clustern (Abbildung 5.9). Dabei ist allerdings noch unklar, ob Ligand und Rezeptor *in vivo* tatsächlich im gleichen Komplex vorliegen, oder ob distinkte Komplexe clustern.

Die Komplexierung zwischen xRor2-mCherry und xWnt5a-eGFP wurde mit Hilfe modernster Mikroskopietechnik im dorsalen Mesoderm untersucht. Dieses Projekt wurde in Kollaboration mit René Dörlich vom Institut für Angewandte Physik (KIT) durchgeführt. Die Kollaboration wurde durch die Feasability Studies of Young Scientists des KITs gefördert. Um die Rezeptor Ligand Bindung an der Membran messen zu können, etablierte René Dörlich die dual-color dual-focus line-scanning fluorescence correlation spectroscopy (2c2f IsFCS) Methode (René Dörlich, Dissertation in Vorbereitung). Mit dieser Methode konnte die Ligand/Rezeptor Bindung in den Membranbereichen geringerer Fluoreszenz bestimmt werden, folglich zwischen den Hotspots.

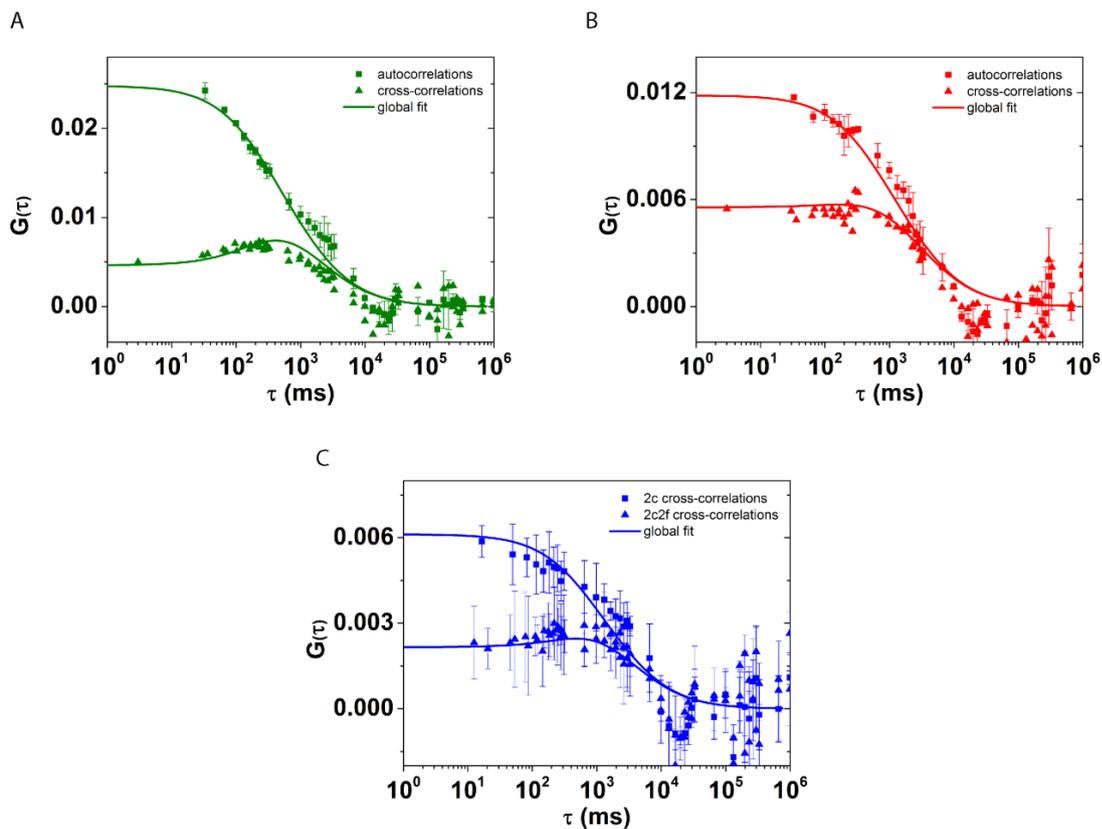
FCS ist eine Methode zur statistischen Auswertung von Intensitätsfluktuationen in einem definierten konfokalen Volumen. Die Intensitätsfluktuation enthält Informationen über den Diffusionskoeffizienten und die Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen (Machan and Wohland, 2014). Durch das alternierende Scannen der Membran in zwei spektralen Kanälen (dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy), konnte sowohl eine Autokorrelationskurve, als auch eine Kreuzkorrelationskurve für beide spektrale Kanäle berechnet werden (Ries et al., 2009).



**Abbildung 5.9: xWnt5a rekrutiert xRor2 in membranständige Cluster**

(A, B) xWnt5a-eGFP ist in Clustern an der Membran lokalisiert, (C, D) wobei xRor2-mCherry gleichmäßig in der Membran lokalisiert ist. (E, F) Bei gemeinsamer Überexpression von xWnt5a-eGFP und xRor2-mCherry wird xRor2-mCherry in die xWnt5a-eGFP Cluster rekrutiert. (A-F) Es kann kein Unterschied in der Lokalisation zwischen multipolaren und bipolaren dorsalen Mesodermzellen beobachtet werden. (Injektionsmenge pro Blastomere: 150 pg xWnt5a-eGFP mRNA, 40 pg xRor2-mCherry mRNA, 125 pg Gap43-mCherry mRNA, 50 pg Gap43-GFP mRNA; Maßstab: 20 µm).

Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion ist umgekehrt proportional zur Anzahl an Fluorophoren im Detektionsvolumen. Der Wendepunkt der Korrelationskurve gibt die mittlere Verweildauer und damit den Diffusionskoeffizienten wieder. Sowohl die Messungen, als auch die Berechnungen wurden von René Dörlich durchgeführt. Bei einer Konzentration  $C_R = 23 \pm 12 \mu\text{m}^{-2}$  von xRor2-mCherry und  $C_G = 23 \pm 5 \mu\text{m}^{-2}$  von xWnt5a-eGFP war der Diffusionskoeffizient für xRor2-mCherry  $D_R = 0,14 \pm 0,06 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  und für xWnt5a-eGFP  $D_G = 0,14 \pm 0,03 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . xWnt5a-eGFP, als auch xRor2-mCherry lagen damit in ähnlicher Konzentration in der Membran vor und hatten einen nahezu identischen Diffusionskoeffizienten.



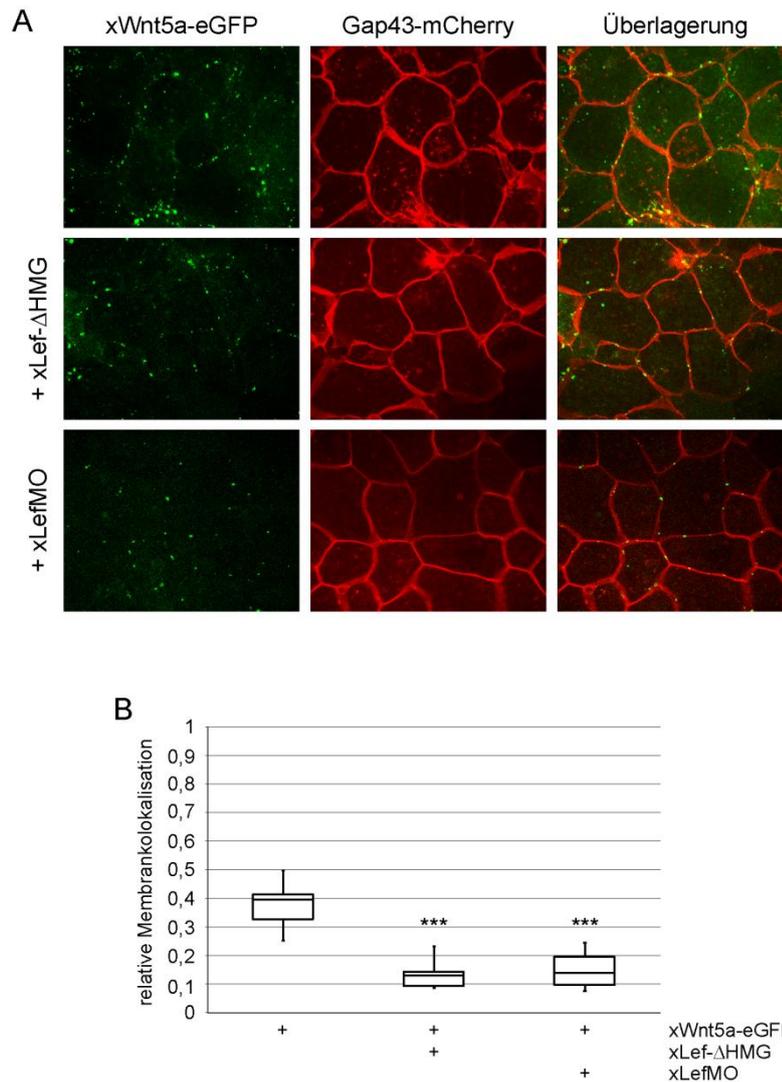
**Abbildung 5.10: xWnt5a-eGFP bindet xRor2-mCherry an der Membran**

(A) Autokorrelations- und Kreuzkorrelationskurve im grünen Kanal zeigt die Membrandiffusion von xWnt5a-eGFP. (B) Autokorrelations- und Kreuzkorrelationskurve im roten Kanal zeigt die Membrandiffusion von xRor2-mCherry. (C) Die Kreuzkorrelationskurven des grünen und roten Kanals zeigt die gemeinsame Diffusion und daher eine Bindung von xWnt5a-eGFP an xRor2-mCherry. (Injektionsmenge pro Blastomere: 150 pg xWnt5a-eGFP mRNA; 40 pg xRor2-mCherry mRNA).

Liegen beide Moleküle in einem Komplex vor, so bewegen sie sich gemeinsam lateral in der Membran. Ausschließlich in diesem Fall ergibt eine Kreuzkorrelation der Intensitätsfluktuationen von xWnt5a-eGFP mit den Intensitätsfluktuationen von xRor2-mCherry eine typische Korrelationskurve (Abbildung 5.10). Sowohl in der Kreuzkorrelation innerhalb eines Fokus (2c cross correlation), als auch über beide Fokusse (2c2f cross correlation) ergaben die Berechnungen eine Kreuzkorrelationskurve. Somit diffundieren xRor2-mCherry und xWnt5a-eGFP gemeinsam durch die Membran. Damit gelang erstmals der Nachweis, dass xRor2 und xWnt5a *in vivo* miteinander interagieren. Die Konzentration des Ligand/Rezeptor Komplexes war  $C_{RG} = 15 \pm 3 \mu\text{m}^2$ , folglich lagen nur etwa die Hälfte der membranassoziierten Moleküle im Komplex vor. Der Diffusionskoeffizient des Komplexes  $D_{RG} = 0,07 \pm 0,02 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  war deutlich geringer als der Diffusionskoeffizient von Ligand und Rezeptor alleine. Damit waren komplexgebundene Liganden und Rezeptoren erwartungsgemäß weniger mobil als die freien Molekülen.

### 5.2.3 Die xWnt5a Membranlokalisierung ist Lef-abhängig

Die auffällige Lokalisation von xWnt5a-eGFP in Clustern wirft die Fragen auf, welche Mechanismen oder Membranstrukturen an der Etablierung dieser Lokalisation beteiligt sein könnten. Offensichtlich war die Lokalisation von xWnt5a-eGFP unabhängig vom Mikrotubulicytoskelett (Abbildung 5.18). In transfizierten MDCK Zellen konnte gezeigt werden, dass Wnt5a-eGFP mit Caveolin, nicht aber mit Clathrin kolokalisiert (persönliche Mitteilung Dietmar Gradl). Unter den xLef-abhängigen Zielgenen waren mit caveolin1, caveolin3 und cavin1 drei Bestandteile der Caveolae vertreten (siehe Anhang). Daraufhin wurde analysiert ob die xWnt5a-eGFP Cluster an der Membran Lef-abhängig gebildet werden. Der Knockdown von xLef sowie die Überexpression des dominant negativen Konstruktes xLef-ΔHMG resultierte in einer hochsignifikanten Reduktion der Membranlokalisierung von xWnt5a-eGFP (Abbildung 5.11). Zur quantitativen Auswertung wurde der Manders Koeffizient 2 bestimmt, dieser gibt die Kolokalisation von xWnt5a-eGFP mit der Membranfärbung Gap43-mCherry wieder (Manders et al., 1993).



### Abbildung 5.11: xLef beeinflusst Membranlokalisierung von xWnt5a-eGFP

(A) In Lef defizienten und Lef-ΔHMG überexprimierenden Zellen können weniger xWnt5a-eGFP Cluster an der Membran detektiert werden. (B) Statistische Auswertung der relativen Membranlokalisierung von xWnt5a-eGFP mit dem Manders Koeffizienten. (Student'scher t-Test: \*\*\*  $p < 0.001$ ; Injektionsmenge pro Blastomere: 150 pg xWnt5a-eGFP mRNA, 500 pg xLef-ΔHMG mRNA, 125 pg Gap43-mCherry mRNA, 0,5 pmol LefMO1, 0,5 pmol LefMo2; Maßstab: 20  $\mu$ m).

### 5.3. Zellbiologische Analyse von xWnt5a und xWnt11

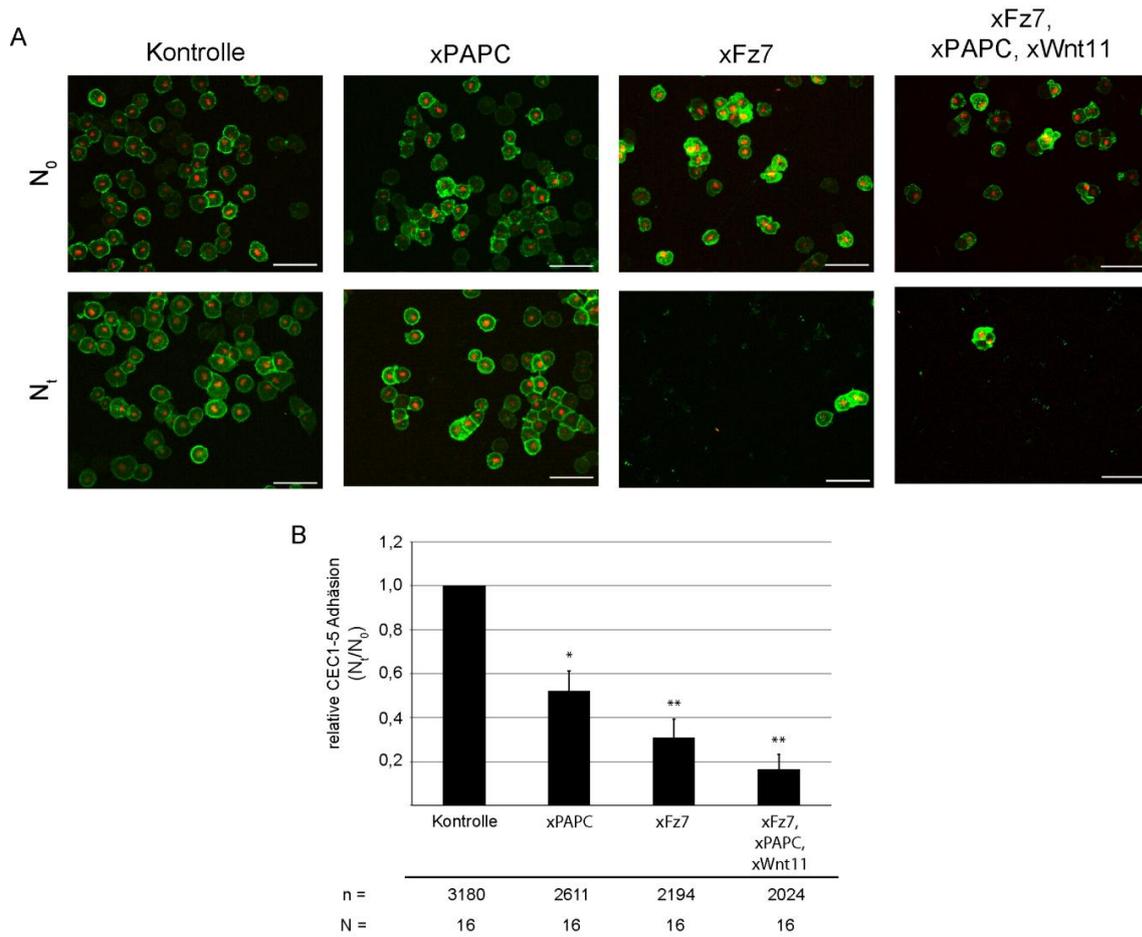
Die zellbiologische Analyse von Blastula und Gastrula Embryonen zeigte, dass C-Cadherin das dominierende Zelladhäsionsmolekül ist. In der Gastrula wird es in allen drei Keimblättern gleichermaßen exprimiert (Lee and Gumbiner, 1995; Muller et al., 1994). Die Voraussetzung für die Zellmigration während der konvergenten Extension ist die Modulation der C-Cadherin vermittelten Adhäsion. Diese kann sowohl durch PAPC, als auch Fz7 vermindert werden (Chen and Gumbiner, 2006; Medina et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PAPC mit Fz7 und der Wnt11/PCP wichtig für die Gewebetrennung während der Gastrulation sind (Medina et al.,

2004; Winklbauer et al., 2001). Somit stellt sich die Frage, ob ein Zusammenspiel von PAPC und dem Wnt11/PCP Signalweg ebenfalls an der dynamischen Modulation der Adhäsion während der konvergenten Extension beteiligt ist.

### **5.3.1 xPAPC, xFz7 und xWnt11 vermindern die C-Cadherin vermittelte Zelladhäsion**

Der Einfluss des Wnt11/PCP Signalweges auf die C-Cadherin vermittelte Adhäsion wurde in einem Adhäsionsassay untersucht. Dabei wurde die Adhäsion der Blastomeren der animalen Kappe an die extrazelluläre Domäne 1-5 (CEC1-5) von C-Cadherin analysiert. Freundlicherweise wurde aufgereinigtes Fc-gekoppeltes CEC1-5 (Niessen and Gumbiner, 2002) von Carien Niessen zur Verfügung gestellt. Parallel dazu wurde auch CEC1-5\_His aufgereinigt (siehe Anhang). Die Veränderung der Adhäsion wurde bewusst in der animalen Kappe analysiert, da in diesem Gewebe keine konvergente Extension stattfindet und der Wnt11/PCP Signalweg nicht aktiv ist. In der animalen Kappe wird C-Cadherin und wenig Fz7 exprimiert, wohingegen kein PAPC und Wnt11 vorhanden ist (Abu-Elmagd et al., 2006; Schambony and Wedlich, 2007).

Die Anzahl der auf der C-Cadherin Oberfläche befindlichen Blastomeren wurden vor ( $N_0$ ) und nach dem Assay ausgezählt ( $N_t$ ), um daraus den relativen Anteil der adhärenen Zellen bestimmen zu können ( $N_0/N_t$ ). Zum Auszählen wurde als Tracer für die Zellmembran und den Zellkern Gap43-GFP und H2B-mCherry injiziert. Von den Kontrollblastomeren adhärirten über 80% (nicht gezeigt) an die C-Cadherin beschichtete Oberfläche. Dieser Wert wurde für die weitere Analyse als 1 definiert und die restlichen Werte dazu in Bezug gesetzt. Wie erwartet verminderte eine zusätzliche Überexpression des Protocadherins xPAPC die Adhäsion an die extrazelluläre Domäne von xC-Cadherin. Der Anteil der adhärenen Zellen sank auf die Hälfte. Bei xFz7 überexprimierenden Blastomeren sank der Anteil adhärenen Blastomeren auf ein Drittel, bei Koinjektion von xPAPC, xFz7 und xWnt11 auf weniger als ein Fünftel (Abbildung 5.12). Damit sind xPAPC, xFz7 und xWnt11 an der Regulation der C-Cadherin vermittelten Zelladhäsion beteiligt. Wie wird diese Reduktion der Zelladhäsion auf zellulärer Ebene realisiert, durch die vermehrte Internalisierung von C-Cadherin oder werden weniger *cis* Dimere an der Membran gebildet?

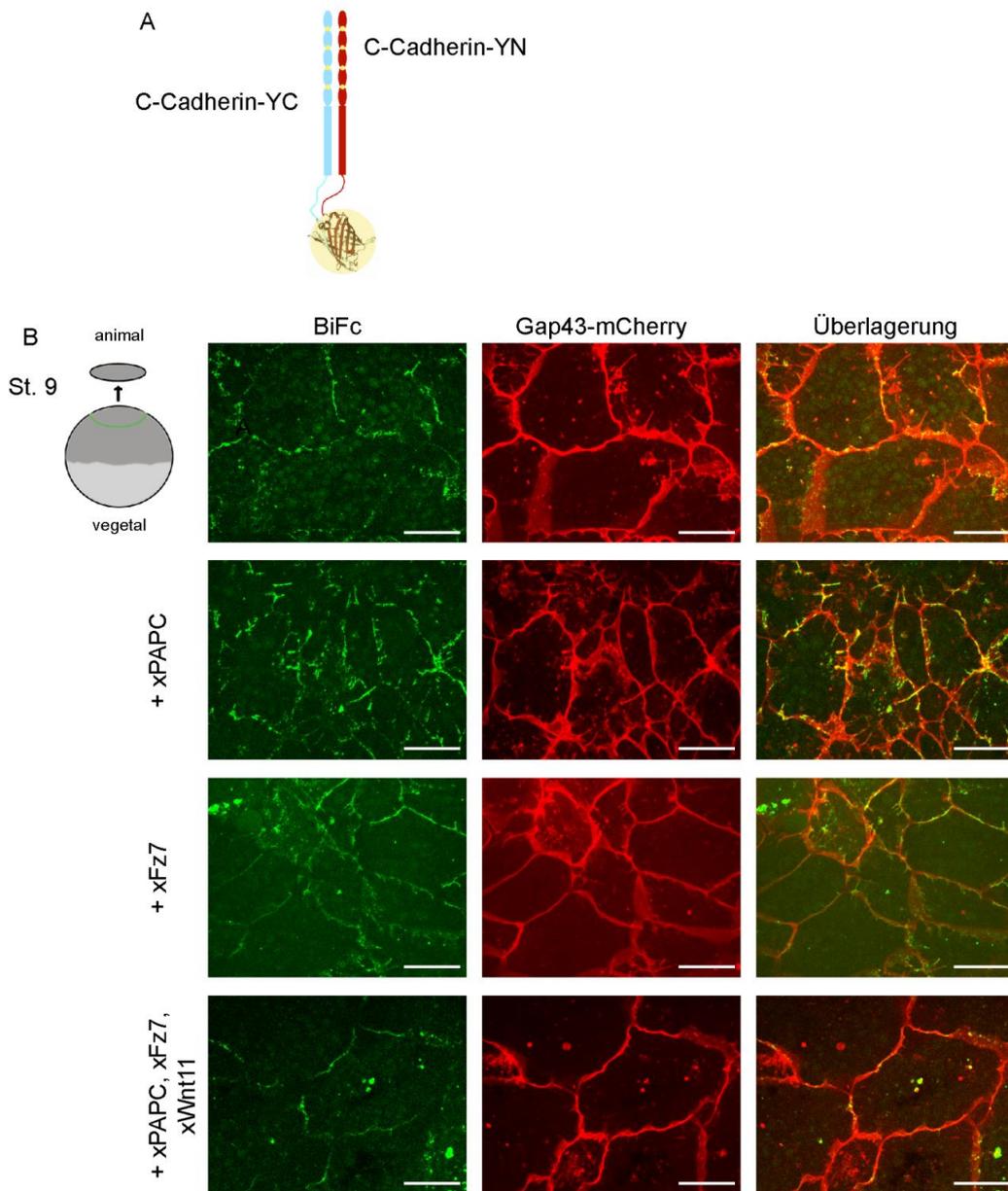


### Abbildung 5.12: xPAPC, xFz7 und xWnt11 reduzieren die C-Cadherin vermittelte Zelladhäsion

(A) Bei Überexpression von xPAPC oder xFz7 war die Adhäsion an C-Cadherin vermindert. Dieser Effekt verstärkte sich bei Überexpression von xFz7, xPAPC und xWnt11. (B) Statistische Auswertung durch Bestimmung der relativen Adhäsion: Anzahl adhärenter Zellen nach dem Assay ( $N_t$ ) / Anzahl adhärenter Zellen vor dem Assay  $N_0$ . ( $N$ = Anzahl Experimente;  $n$ = Anzahl ausgezählter Blastomere; Injektionsmenge pro Blastomere: 250 pg xPAPC mRNA, 250 pg xFz7 mRNA, 10 pg xWnt11 mRNA, 50 pg Gap43-GFP mRNA, 250 pg H2B-mCherry mRNA; Student'scher t-Test \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; Maßstab: 100  $\mu$ m) (Entnommen aus (Kraft et al., 2012))

### 5.3.2 Reduktion der C-Cadherin *cis*-Dimerbildung

Die Bildung von C-Cadherin *cis* Dimeren wurde mit Hilfe von Split-YFP Konstrukten untersucht. Dazu wurden C-Cadherin Fusionskonstrukte benutzt, bei denen C-Cadherin mit dem C-Terminalen Teil des YFPs beziehungsweise dem N-Terminalen Teil des YFPs fusioniert waren. Kommen die YFP-Fragmente, aufgrund der C-Cadherin *cis* Dimerbildung, in räumliche Nähe zueinander, bildet sich ein fluoreszierendes YFP-Molekül (Kerppola, 2008). Durch die Koexpression von xPAPC, xFz7 und xWnt11 wurde deren Einfluss auf die Bildung von C-Cadherin *cis* Dimeren untersucht. Dieser Assay wurde in Zusammenarbeit mit Bianca Kraft durchgeführt (Kraft et al., 2012).



**Abbildung 5.13: xPAPC, xFz7 und xWnt11 reduzieren C-Cadherin *cis* Dimerbildung an der Membran**

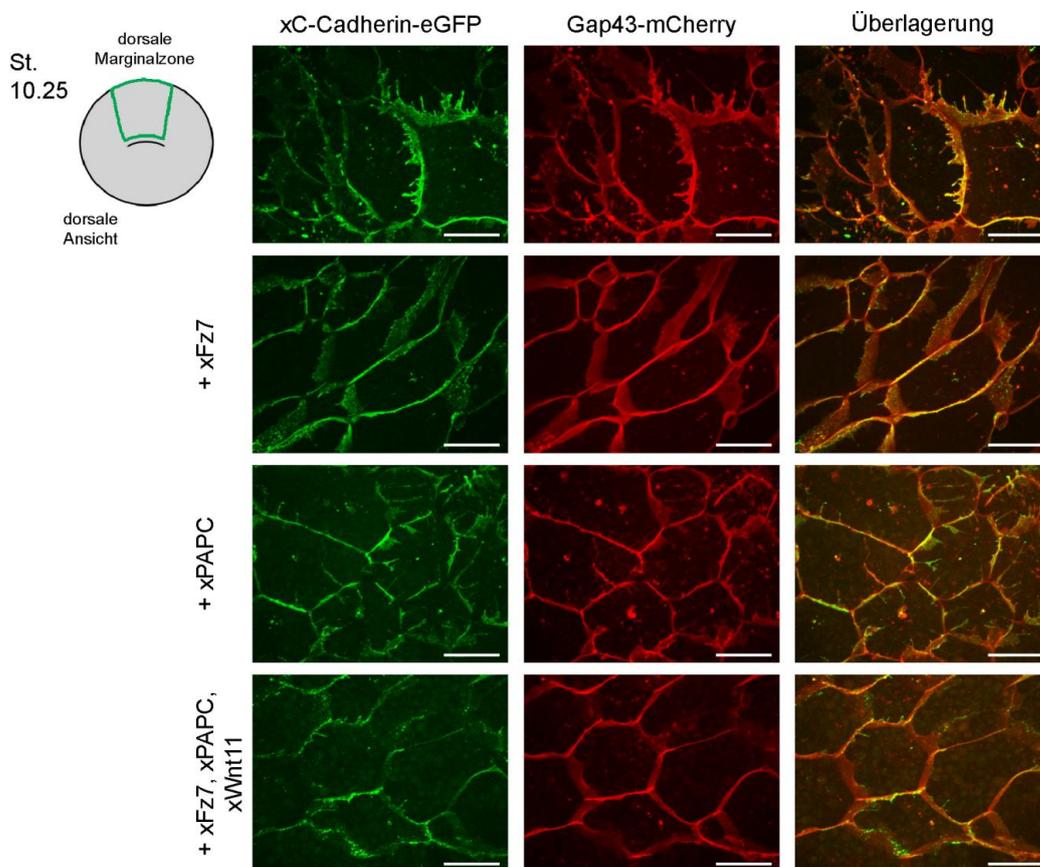
(A) Die Bildung von C-Cadherin *cis* Dimeren wurde in der animalen Kappe mit Split-YFP Konstrukten untersucht, kommen die mit YFP-YN oder YFP-YC fusionierten C-Cadherin Moleküle in räumliche Nähe zueinander, rekonstituiert sich das YFP. (B) Die Überexpression von xPAPC mRNA und xFz7 mRNA hat keinen Einfluss auf die *cis* Dimerisierung, bei gemeinsamer Überexpression von xPAPC mRNA, xFz7 mRNA und xWnt11 mRNA werden deutlich weniger *cis* Dimere an der Membran gebildet. (Injektionsmenge pro Blastomere: 500 pg C-Cadherin-SplitYN mRNA, 500 pg C-Cadherin-SplitYC mRNA, 250 pg xPAPC mRNA, 250 pg xFz7 mRNA, 10 pg xWnt11 mRNA, 125 pg Gap43-mCherry mRNA; Maßstab: 20  $\mu$ m) (Mit Änderungen entnommen aus (Kraft et al., 2012))

Wird C-Cadherin-YN mRNA zusammen mit C-Cadherin-YC mRNA überexprimiert, bilden sich über die ganze Membran verteilt C-Cadherin *cis* Dimere. Eine zusätzliche Überexpression von xPAPC oder xFz7 hatte keinen Einfluss auf die C-Cadherin *cis* Dimerbildung. Wohingegen eine gemeinsame Überexpression von xPAPC und xFz7

zusammen mit xWnt11 zu einer deutlichen Reduktion der Bildung von C-Cadherin *cis* Dimeren führte (Abbildung 5.13). Die gleiche Beobachtung konnte auch in Kellerexplantaten gemacht werden (Kraft et al., 2012).

### 5.3.3 xC-Cadherin wird während der konvergenten Extension nicht internalisiert

Die beobachtete Reduktion von C-Cadherin *cis* Dimeren kann durch Internalisierung von C-Cadherin verursacht sein. Um dies zu analysieren wurde xC-Cadherin-eGFP zusammen mit den Komponenten des Wnt11/PCP Signalweges koexprimiert. Als Membranmarker wurde jeweils Gap43-mCherry koinjiziert.



#### Abbildung 5.14: xC-Cadherin wird während der konvergenten Extension nicht internalisiert

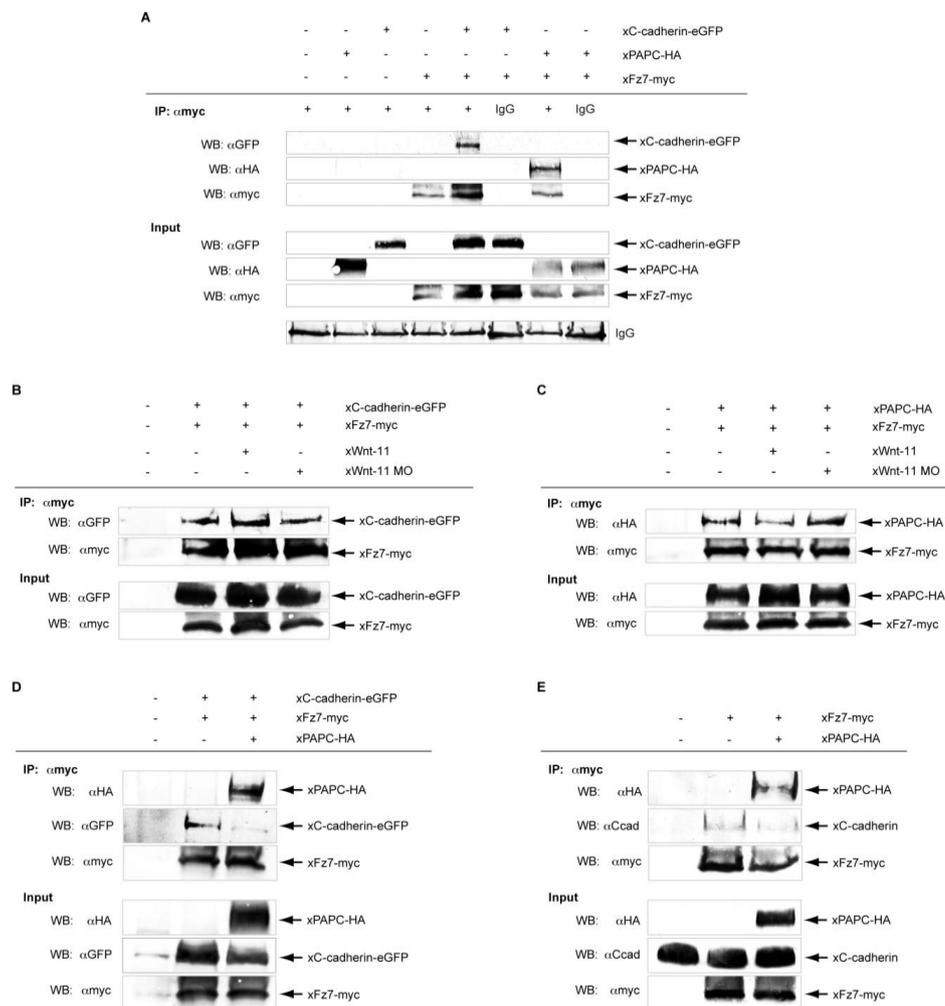
Die zusätzliche Überexpression von xFz7, xPAPC und xWnt11 hatte keinen Einfluss auf die Membranlokalisation von C-Cadherin-eGFP in Explantaten der dorsalen Marginalzone. (Injektionsmenge pro Blastomere: 250 pg C-Cadherin-eGFP mRNA, 250 pg xPAPC mRNA, 250 pg xFz7 mRNA, 10 pg xWnt11 mRNA, 125 pg Gap43-mCherry mRNA; Maßstab: 20  $\mu$ m) (Mit Änderungen entnommen aus (Kraft et al., 2012))

Die Membranlokalisation und die Menge an xC-Cadherin änderte sich nicht bei zusätzlicher Überexpression von xPAPC oder xFz7. Auch nach gemeinsamer Überexpression von xPAPC, xFz7 und xWnt11 war die C-Cadherin Membranlokalisation

unverändert (Abbildung 5.14). Daher werden die beobachteten Effekte nicht durch eine Degradation oder Internalisierung von xC-Cadherin realisiert.

### 5.3.4 xFz7 bildet sowohl einen Komplex mit xC-Cadherin, als auch mit xPAPC

Eine alternative Erklärung zur Abnahme der xC-Cadherin *cis* Dimere könnte die Bildung anderer Proteinkomplexe sein. Dies wurde mittels Koimmunopräzipitationsstudien an Explantaten der dorsalen Marginalzone untersucht. Dieses Experiment wurde ebenfalls gemeinsam mit Bianca Kraft durchgeführt (Kraft et al., 2012).



**Abbildung 5.15: xFz7 interagiert sowohl mit xC-Cadherin, als auch xPAPC**

(A) xFz7 kann xPAPC und xC-Cadherin koimmunopräzipitieren. (B,C) xWnt11 hat keinen Einfluss auf die Komplexbildung zwischen xPAPC und xFz7 sowie xC-Cadherin und xFz7. (D, E) Koimmunopräzipitation von xC-Cadherin mit xFz7 in Anwesenheit von xPAPC. xPAPC konkurriert mit (D) exogenem und (E) endogenem xC-Cadherin um xFz7. (Injektionsmenge pro Blastomere: 500 pg xC-Cadherin-eGFP mRNA, 500 pg xPAPC-HA mRNA, 500 pg xFz7-myc mRNA, 20 pg xWnt11 RNA, 0.5 pmol xWnt11MO) (Abbildung aus Kraft et al. (2012) entnommen).

Die Präzipitation von xFz7 zeigte, dass xFz7 sowohl mit xPAPC, als auch xC-Cadherin interagieren kann (Abbildung 5.15A). Wobei bei gleichzeitiger Überexpression von xPAPC, xC-Cadherin mit xFz7 zu einem geringeren Anteil präzipitiert wurde (Abbildung 5.15D). Somit bilden xC-Cadherin, xPAPC und xFz7 nicht einen Komplex, sondern zwei unabhängige Adhäsionsmodulationskomplexe (AMC). Dabei interagiert xFz7 sowohl mit xPAPC (AMCP) als auch mit xC-Cadherin (AMCC). Die Adhäsionskomplexe ließen sich in xWnt11 überexprimierenden Embryonen und in xWnt11 Morphanten nachweisen (Abbildung 5.15B,C).

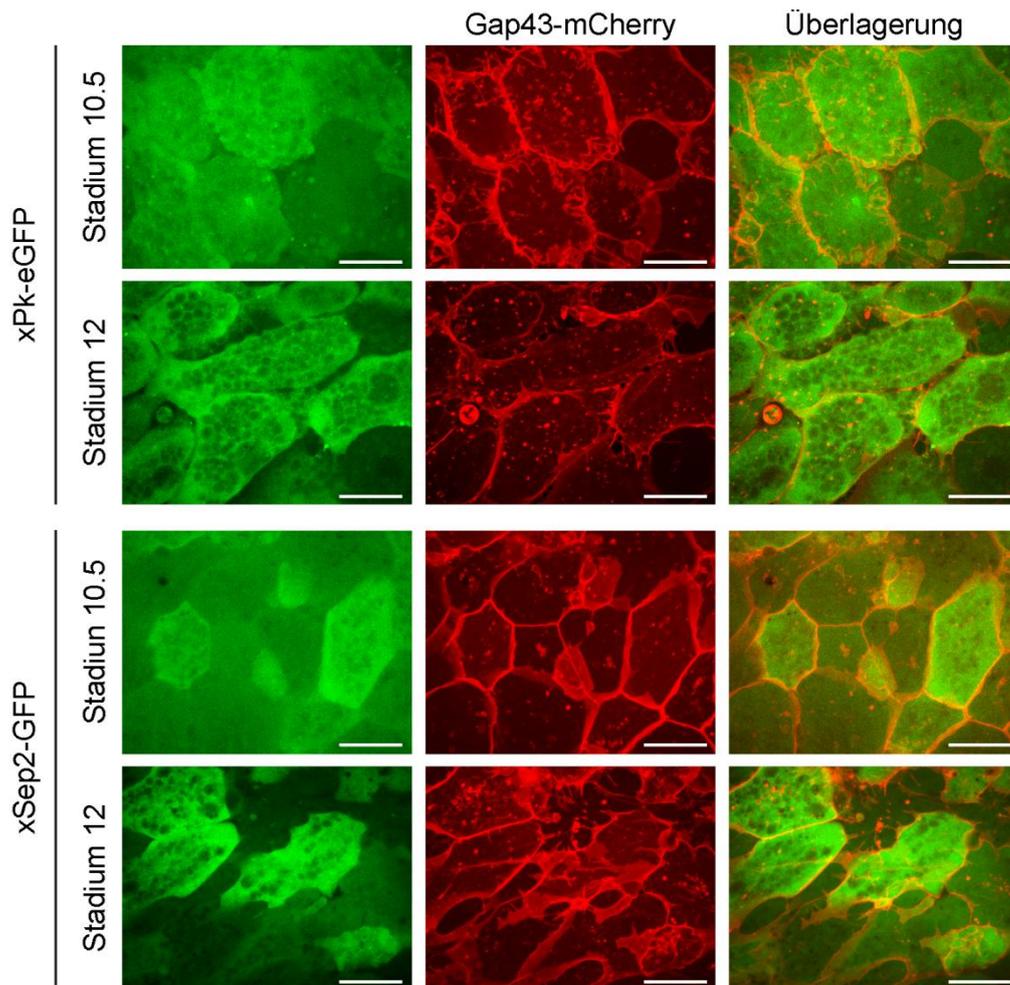
Da C-Cadherin während der Gastrulation ubiquitär exprimiert wird (Lee and Gumbiner, 1995; Muller et al., 1994), konnte die Interaktion von xFz7 und xC-Cadherin ebenfalls mit dem endogenen xC-Cadherin nachgewiesen werden. Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass kein trimärer Komplex gebildet wird (Abbildung 5.15E).

Somit konnte gezeigt werden, dass xFz7, xPAPC und xWnt11 die xC-Cadherin vermittelte Zelladhäsion durch die Bildung von AMCs modulieren, dies wird unterstützt durch die Daten in Kraft et al. (2012).

### **5.3.5 Wnt/PCP Signalmoleküle zeigten keine polare Lokalisation während der konvergenten Extension**

Darüber hinaus ist xWnt11 an der Etablierung der bipolaren Zellmorphologie beteiligt, im Inneren der Zelle spiegelt dies die xWnt11 abhängige bipolare Ausrichtung des Mikrotubulicytoskeletts wider (Rigo-Watermeier et al., 2012). Um zu analysieren, ob Moleküle des Wnt11/PCP Signalweges über das Mikrotubulicytoskelett zu den polaren Enden der Zelle transportiert werden, wurden diese in der dorsalen Marginalzone überexprimiert und ihre Lokalisation im Verlauf der Gastrulation dokumentiert, hier ist exemplarisch xSep2-GFP und xPk-GFP gezeigt (Abbildung 5.16). Darüber hinaus wurden zum Beispiel die Lokalisation von xFritz-GFP und xLfc-GFP untersucht (nicht gezeigt). Auch überexprimiertes xWnt5a-eGFP war nicht polar lokalisiert (Abbildung 5.10). Keines der untersuchten Moleküle wies eine polare Lokalisation auf, weder in den multipolaren Zellen noch in den bipolaren Zellen des dorsalen Mesoderms.

Um einen Mikrotubuli abhängigen Transport detektieren zu können, wurde das Mikrotubulicytoskelett depolymerisiert und daraufhin die Membranlokalisation bestimmt.



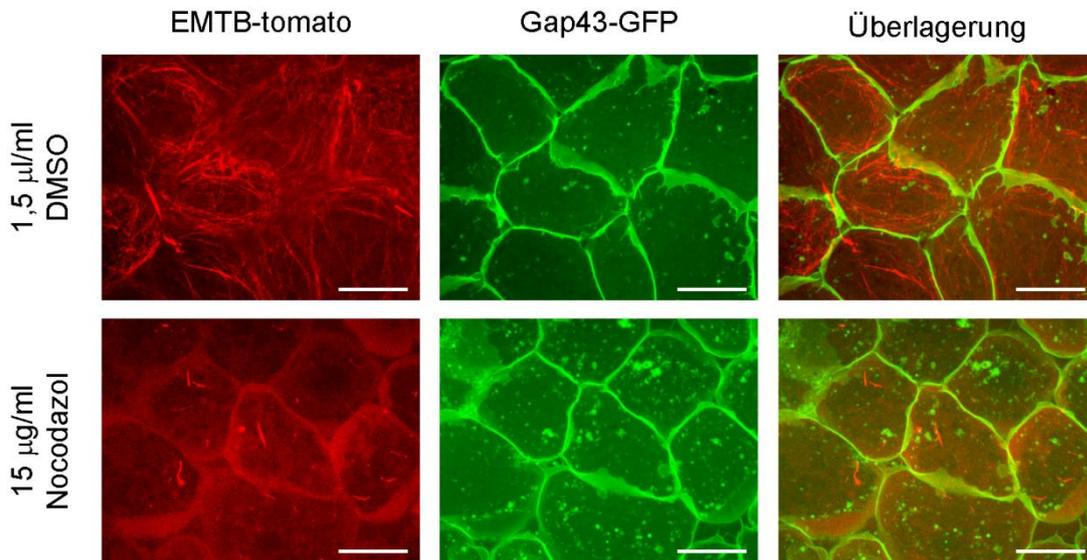
**Abbildung 5.16: xPk und xSep2 sind während der konvergenten Extension nicht polar lokalisiert**

xPk und xSep2 waren weder während der frühen Gastrulation (Stadium 10.5), noch der späten Gastrulation (Stadium 12) polar im dorsalen Mesoderm lokalisiert (Injektionsmenge pro Blastomere: 250 pg xPk-eGFP RNA, 20 pg xSep2-GFP mRNA, 250 pg xFz7 mRNA, 10 pg xWnt11 mRNA, 125 pg Gap43-mCherry mRNA; Maßstab: 20  $\mu$ m)

### 5.3.6 Wnt/PCP Komponenten werden nicht Mikrotubuli abhängig transportiert

Eine Destabilisierung des Mikrotubulicytoskeletts durch Nocodazol führt ausschließlich während der ersten 30 min der Gastrulation zu einer Hemmung der konvergenten Extension (Lane and Keller, 1997). In späteren Studien wurde gezeigt, dass dies tatsächlich auf das zerstörte Mikrotubulicytoskelett zurückzuführen ist (Kwan and Kirschner, 2005). Da Nocodazol in DMSO gelöst war, wurde eine Vergleichskontrolle mit 1,5  $\mu$ l/ml DMSO mitgeführt. Im Elongationsassay hatten 1,5  $\mu$ l/ml DMSO keinen Einfluss auf die konvergente Extension, im Gegensatz zu denen in 15  $\mu$ g/ml kultivierten Explantaten (nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde die Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts durch die Überexpression der Mikrotubuli bindenden Domäne von

Encosin, konjugiert mit einer Fluorophore, EMTB-tomato (Encosin microtubule binding domain) überprüft. Die in 1,5  $\mu\text{l/ml}$  DMSO kultivierten dorsalen Marginalzonen zeigten ein intaktes Mikrotubulicytoskelett, wobei die Kultivierung in 15  $\mu\text{g/ml}$  Nocodazol die Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts auslöste (Abbildung 5.17).

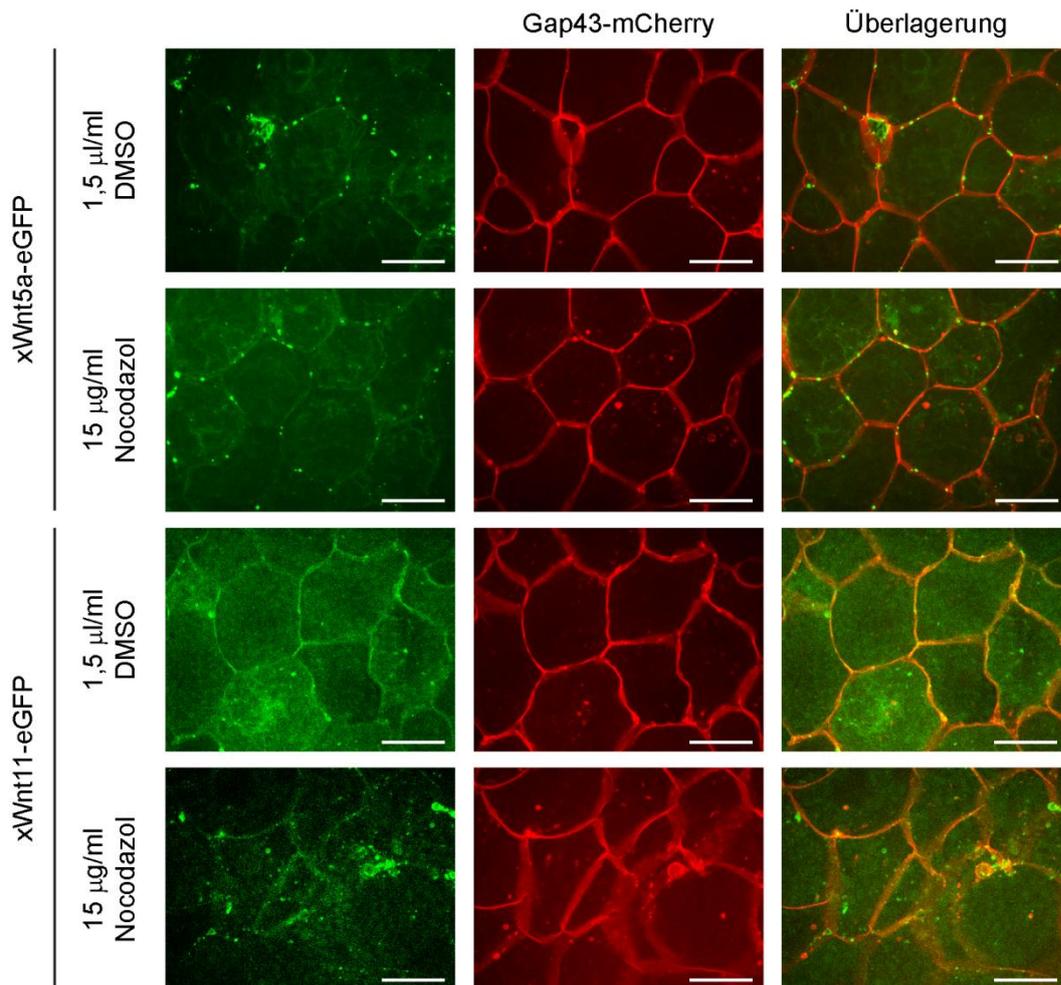


**Abbildung 5.17 Nocodazol depolymerisiert das Mikrotubulicytoskelett**

(A) Das Mikrotubulicytoskelett der Explantate depolymerisiert bei Inkubation dieser in 15  $\mu\text{g/ml}$  Nocodazol. (Injektionsmenge pro Blastomere: 50 pg Gap43-GFP mRNA, 100 pg EMTB-tomato mRNA; Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ ).

Nach Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts war kein Unterschied in den xWnt5a-eGFP Clustern an der Membran im Vergleich zur DMSO Kontrolle fest zu stellen. Auch die Membranlokalisierung von xWnt11-eGFP war nicht beeinflusst (Abbildung 5.18). Darüber hinaus war die Membranlokalisierung der beiden Vertreter der Cadherine xC-Cadherin-eGFP und xPAPC-mCherry unverändert aufgrund der Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts (nicht gezeigt).

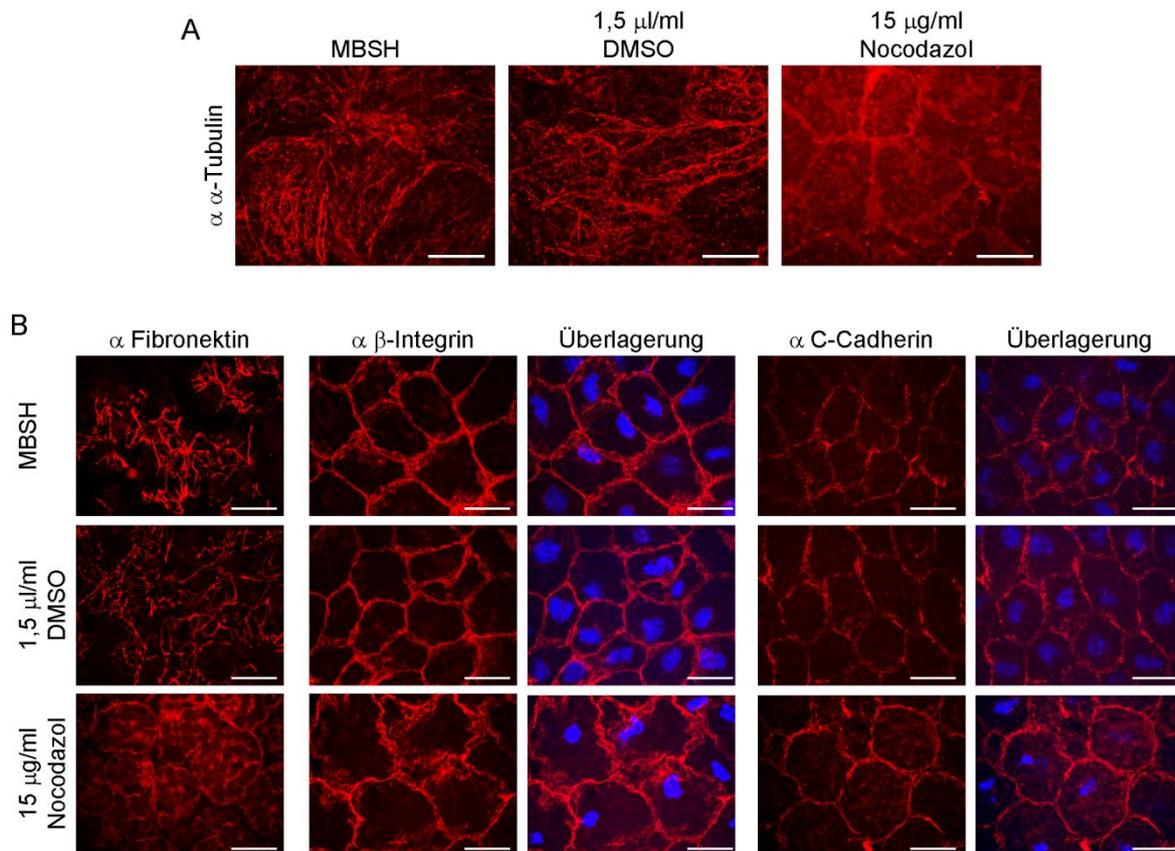
Somit werden weder die beiden nicht-kanonischen Wnt Moleküle xWnt5a-eGFP und xWnt11-eGFP noch die Vertreter der Cadherinfamilie xC-Cadherin und xPAPC während der Gastrulation über das Mikrotubulicytoskelett an die Membran transportiert. In diesem Kontext wurden die Proteine in einer nicht-physiologischen Konzentration überexprimiert, aus diesem Grund wurden zusätzlich Immunfärbungen durchgeführt.



**Abbildung 5.18: xWnt5a und xWnt11 werden während der konvergenten Extension nicht über das Mikrotubulicytoskelett transportiert**

Sowohl xWnt5a-eGFP, als auch xWnt11-eGFP werden während der frühen Gastrulation trotz Nocodazol Behandlung an die Membran transportiert. (Injektionsmenge pro Blastomere: 125 pg Gap43-mCherry mRNA, 150 pg xWnt5a-eGFP mRNA, 250 pg xWnt11-eGFP mRNA; Maßstab: 20 µm).

In Abbildung 5.19 wurde die Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts, durch dessen Färbung mit einem  $\alpha$ -Tubulin Antikörper, überprüft (Abbildung 5.19). Dabei konnte gezeigt werden, dass es keinen Unterschied zwischen einer Inkubation der dorsalen Marginalzonen in MBSH und einer Inkubation in 1,5 µl/ml DMSO gab. Wohingegen die Inkubation in 15 µg/ml Nocodazol zu einer Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts führte.



**Abbildung 5.19: Mikrotubulicytoskelett hat Einfluss auf Fibronektinpolymerisation im extrazellulären Raum**

(A) Das Mikrotubulicytoskelett der dorsalen Marginalzonen wurde durch die Inkubation in 15 µg/ml depolymerisiert. (B) Fibronektin wurde im extrazellulären Raum nicht mehr polymerisiert. Die Membranlokalisation von  $\alpha\beta$ -Integrin und  $\alpha$ C-Cadherin wurde durch die Inkubation der Explantate in 15 µg/ml Nocodazol nicht verändert. (Maßstab: 20 µm)

Von allen untersuchten Proteinen, war ausschließlich Fibronektin von der Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts beeinflusst. Im Gegensatz zur DMSO Kontrolle konnte kein Fibronektinnetz im extrazellulären Raum mehr identifiziert werden. Stattdessen konnte Fibronektin ausschließlich an der Zellperipherie detektiert werden. Die Membranlokalisation des Fibronektin Rezeptors  $\alpha\beta$ -Integrin, wie auch von  $\alpha$ C-Cadherin und  $\alpha\beta$ -Catenin wurde durch eine Inkubation der dorsalen Marginalzonen mit 15 µg/ml Nocodazol dagegen nicht verändert (Abbildung 5.19). Für  $\alpha$ C-Cadherin bestätigte dies die Ergebnisse aus der Überexpression. Darüber hinaus wurden die dorsalen Marginalzonen mit Cytochalasin D inkubiert, welches das Aktincytoskelett depolymerisiert, auch hier konnte kein Einfluss auf die Membranlokalisation von  $\alpha\beta$ -Integrin,  $\alpha$ C-Cadherin und  $\alpha\beta$ -Catenin beobachtet werden (nicht gezeigt).

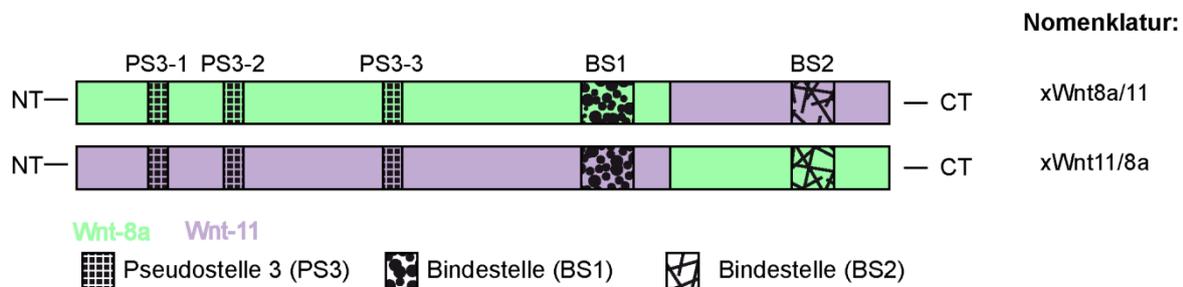
Ausschließlich die Fibronektinpolymerisation im extrazellulären Raum scheint von der Depolymerisation des Mikrotubulicytoskeletts beeinflusst zu werden.

## 5.4. Analyse funktionaler Bereiche innerhalb der Wnt-Proteine

Durch die Entschlüsselung der Kristallstruktur wurden Bereiche in den Wnt-Molekülen definiert, die funktional zum Beispiel für die Bindung an Fz benötigt werden. In einer früheren Publikation wurde bereits eine Chimäre zwischen xWnt5a und xWnt8a untersucht, es wurde gezeigt, dass der C-Terminus über die Aktivierung des jeweiligen Signalweges bestimmt (Du et al., 1995).

### 5.4.1 Der C-Terminus in xWnt8a realisiert die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade

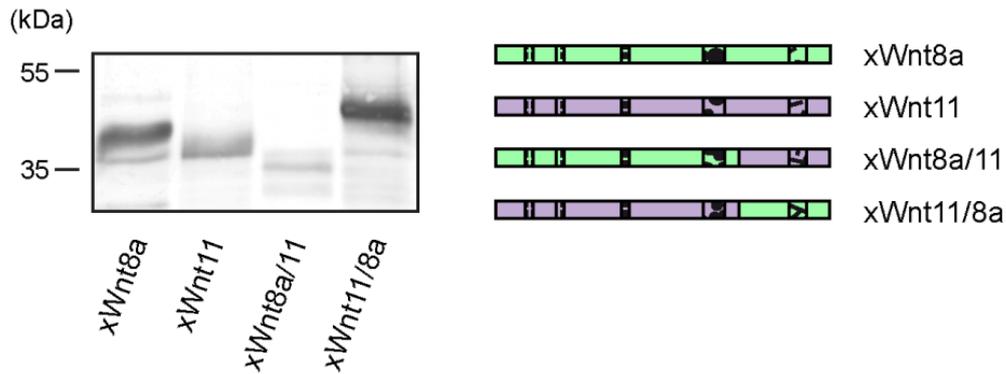
Alle Chimären wurden mittels Fusions-PCR konstruiert. xWnt8a und xWnt11 wurden in einem hoch konservierten Bereich zwischen der Bindestelle 1 (BS1) und Bindestelle 2 (BS2) miteinander fusioniert (Abbildung 5.20).



#### Abbildung 5.20: Chimäre aus xWnt8a und xWnt11

xWnt8a und xWnt11 wurden in einem hoch konservierten Bereich zwischen der Fz Bindungsstelle 1 und 2 miteinander fusioniert. Sowohl mit xWnt8a N-Terminus, als auch C-Terminus. (CT = C-Terminus, NT = N-Terminus).

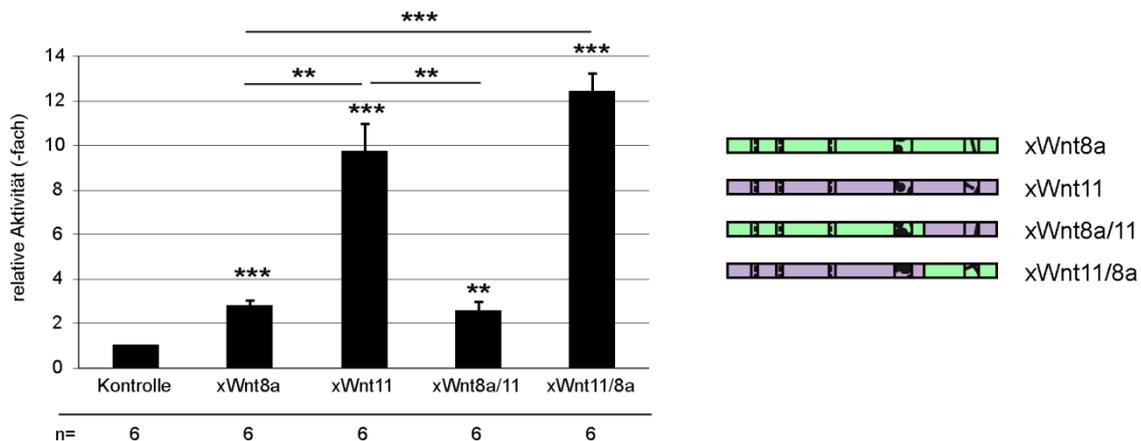
Um Funktionsbeeinträchtigungen durch zusätzliche Aminosäuren zu vermeiden, wurde bei der Erstellung der Chimären auf das Einbringen einer Markierung verzichtet. Der Translationsnachweis erfolgte demnach über eine kombinierte *in vitro* Transkription und Translation. Während der Proteintranslation wurde die Biotin markierte Aminosäure Lysin eingebaut, die über einen alkalischen Phosphatase konjugierten Streptavidin Antikörper nachgewiesen werden kann. Beide Chimären wurden in ein Protein der erwarteten Größe translatiert (Abbildung 5.21). Dabei zeigten die Wnt-Proteine im Immunoblot wie erwartet mehrere Banden, die vermutlich aufgrund der posttranslationalen Modifikationen in der SDS-PAGE unterschiedlich migrieren (Willert and Nüsse, 2012).



**Abbildung 5.21: xWnt8a und xWnt11 Chimärenpaar wird in Protein der erwarteten Größe translatiert**

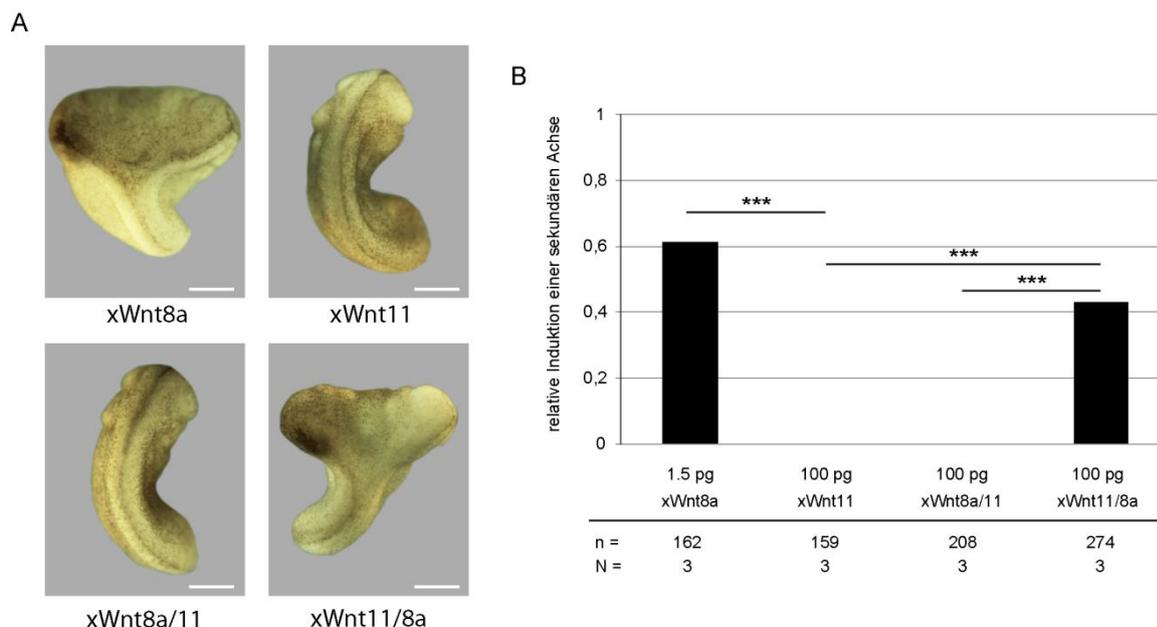
Mittels einer *in vitro* gekoppelten Transkription und Translation wird xWnt8a/11 und xWnt11/8a in ein Protein der erwarteten Größe translatiert.

Im ATF2-Luziferase Assay zeigte die Chimäre xWnt8a/11 die gleiche Aktivierung wie xWnt8a, wohingegen xWnt11/8a sich vergleichbar mit xWnt11 verhielt (Abbildung 5.22). Somit war der N-Terminus von xWnt11 entscheidend für die Aktivierung des ATF2-Luziferase Reporters.



**Abbildung 5.22: xWnt11/8a aktiviert den ATF2-Luziferase Reporter**

xWnt8a/11 aktiviert den ATF2-Luziferase Reporter vergleichbar mit xWnt8a und xWnt11/8a vergleichbar mit xWnt11. (n= Anzahl unabhängiger Transfektionen; Student'scher t-Test: \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)



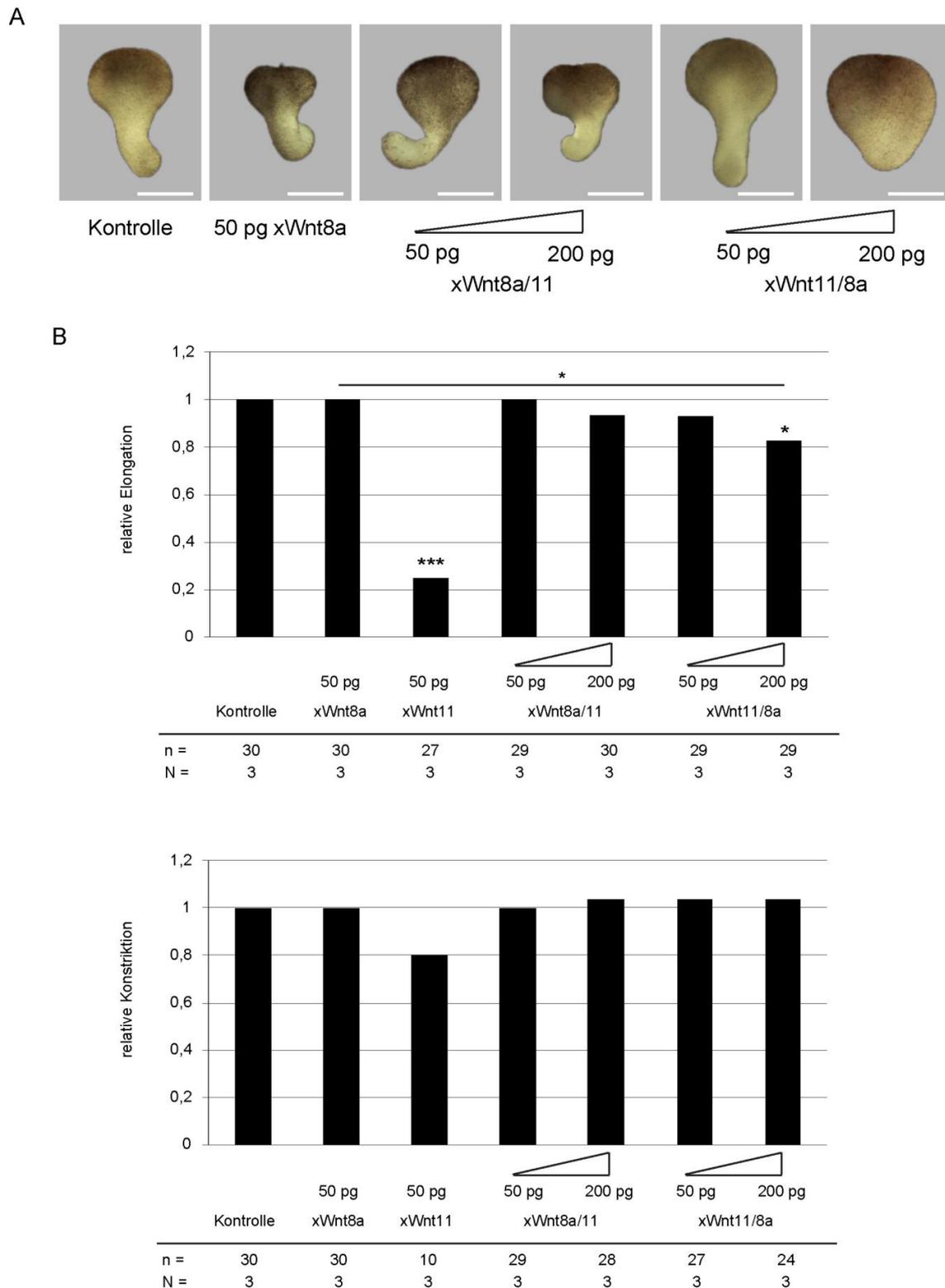
### Abbildung 5.23: xWnt11/8a induziert Doppelachsen

(A) Die ventrale Injektion von xWnt8a und xWnt11/8a führt zur Induktion einer sekundären Achse. xWnt11 und xWnt8a/11 induzieren keine sekundäre Achse. (B) Statistische Auswertung der relativen Induktion einer sekundären Achse. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen; exakter Test nach Fisher \*\*\*  $p < 0.001$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ )

Die Chimären wurden sowohl in dem für kanonische Wnts typischen Doppelachsenassay, als auch dem für nicht-kanonische Wnts typischen Elongationsassay analysiert. Bei ventraler Injektion von 1.5 pg xWnt8a mRNA bildeten 60% der Embryonen eine sekundäre Achse aus. Wohingegen die Injektion von 100 pg xWnt11 mRNA erwartungsgemäß keine Induktion bedingte (Du et al., 1995). xWnt8a/11 mRNA injizierte Embryonen zeigten ausschließlich eine, die endogene, Achse. Wohingegen die Überexpression von 100 pg xWnt11/8a in über 40% der Embryonen zur Induktion einer sekundären Achse führte (Abbildung 5.23).

Im Elongationsassay unterdrückte xWnt11, nicht aber xWnt8a die Elongation. Die Chimären dagegen waren hier deutlich weniger aktiv. Einzig die Überexpression von 200 pg xWnt11/8a hatte eine signifikante Hemmung der Elongation zur Folge (Abbildung 5.24). Wie erwartet zeigten weder xWnt8a und xWnt11 noch die chimären Konstrukte einen Einfluss auf die Konstriktion.

Insgesamt scheint der C-Terminus für die kanonische und der N-Terminus für die nicht-kanonische Signaltransduktion verantwortlich zu sein.

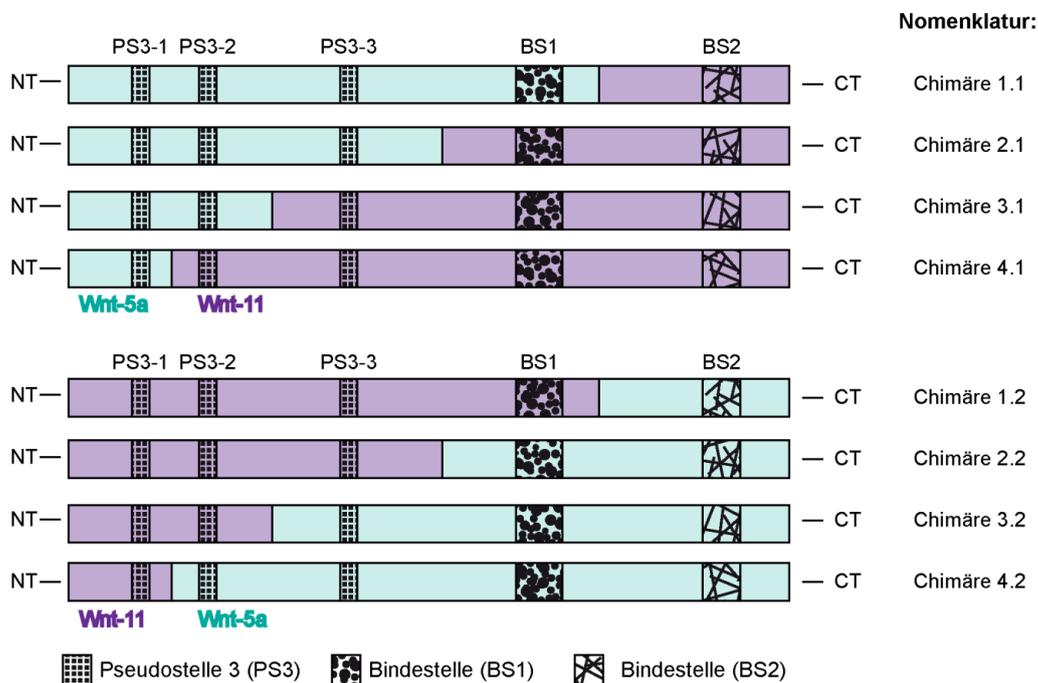


### Abbildung 5.24: xWnt11/8a hemmt die Elongation

(A) xWnt8a und xWnt8a/11 haben keinerlei Einfluss auf die konvergente Extension. Die Überexpression von xWnt11/8a führt zur Hemmung der Elongation. (B) Ausschließlich 200 pg xWnt11/8a zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Elongation. (C) Keines der überexprimierten Konstrukte hat einen Einfluss auf die Konstriktion. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Explantate; exakter Test nach Fisher \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )

### 5.4.2 Chimäre Konstrukte aus xWnt5a und xWnt11 sind funktionale nicht-kanonische Wnt-Moleküle

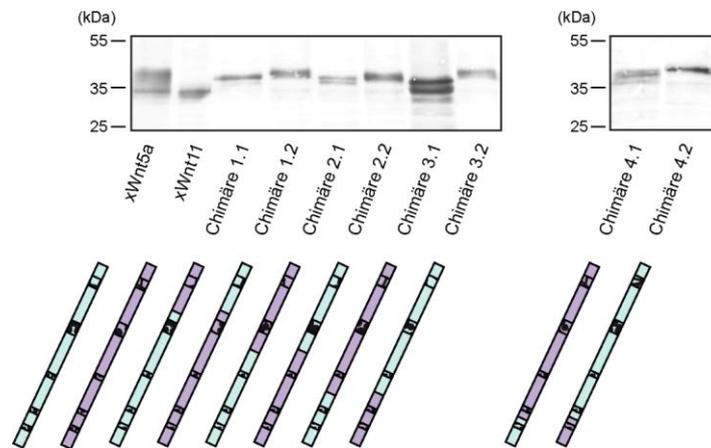
Um den Einfluss des N-Terminus bezüglich der Spezifizierung der nicht-kanonischen Signaltransduktion zu untersuchen, wurden chimäre Konstrukte aus xWnt5a und xWnt11 konstruiert. Ausschlaggebend für die Bereiche, die fusioniert wurden, war die Klärung der Kristallstruktur von xWnt8 mit der Ligandenbindungsdomäne und damit der Identifizierung der Fz Bindestelle 1 (BS1) und Bindestelle 2 (BS2) sowie der putativen Oligomerisierungsstelle Pseudostelle 3 (PS3) (Janda et al., 2012). Dabei wurden alle Chimären sowohl N-Terminal mit xWnt5a, als auch xWnt11 hergestellt, somit sind insgesamt acht unterschiedliche Chimäre entstanden (Abbildung 5.25). Zur Vereinfachung wurden die Fusionsstellen der Reihe nach durchnummeriert (1-4), wobei N-Terminal xWnt5a den Zusatz 1 (zum Beispiel 1.1) bekam und N-Terminal xWnt11 den Zusatz 2 (zum Beispiel 1.2). Bei allen durch die Überexpression der jeweiligen Chimären gemachten Beobachtungen, kann dies aber nicht automatisch auf die konservierten Domänen BS1 oder BS2 bezogen werden, sondern der nicht konservierte Bereich, kann ebenfalls einen Effekt ausüben.



**Abbildung 5.25: Chimären aus xWnt5a und xWnt11**

xWnt5a und xWnt11 wurden mittels Fusions-PCR in hoch konservierten Regionen miteinander verbunden. Dabei wurde die Bindestelle 2 ausgetauscht, darüber hinaus die Fz Bindestelle 1 und 2. Und xWnt5a und xWnt11 wurden zwischen den unterschiedlichen Domänen der Pseudostelle 3 fusioniert; jeweils mit N-Terminus xWnt5a und xWnt11. (NT: N-Terminus, CT: C-Terminus).

Um auch hier sicherzustellen, dass die Fusionen zu Proteinen der errechneten Größe führen, wurde eine kombinierte *in vitro* Transkription und Translation durchgeführt. Alle chimären Konstrukte wurden in ein Protein der berechneten Größe translatiert (Abbildung 5.26).



**Abbildung 5.26: Alle nicht-kanonischen Chimärenpaare werden in ein Protein der erwarteten Größe translatiert**

Mittels einer *in vitro* gekoppelten Transkription und Translation wird von allen Chimärenpaare ein Protein der erwarteten Größe translatiert.

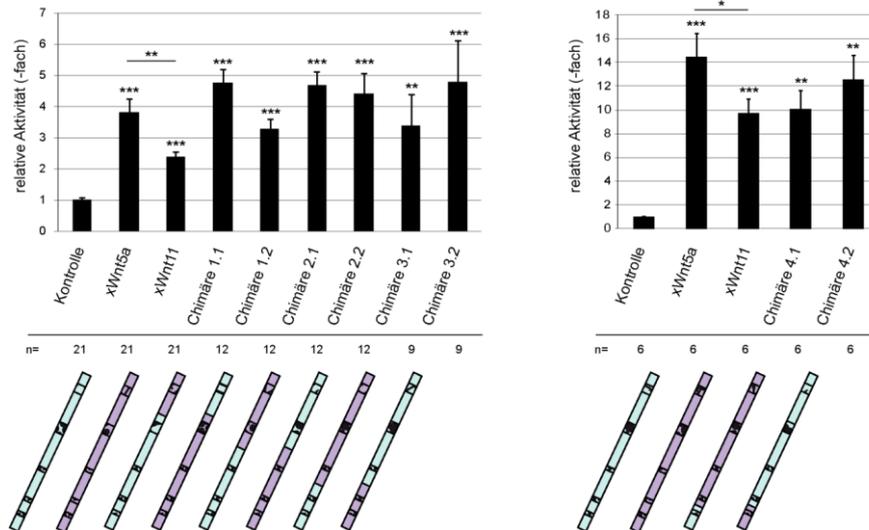
Die xWnt5a Kotransfektion führte zu einer stärkeren Aktivierung des ATF2-Luziferase Reporters im Vergleich zu xWnt11. Die Analyse der Konstrukte erfolgte in zwei unterschiedlichen HEK293 Zellchargen, wobei sich die relative Aktivierung des Reporters zwischen den Chargen unterschied. Aus diesem Grund wurde zum Vergleich jeweils xWnt5a und xWnt11 gezeigt (Abbildung 5.27).

Alle Chimären konnten den ATF2-Luziferase Reporter aktivieren, waren somit in diesem Assay aktive nicht-kanonische Wnt-Proteine. Durch den deutlichen Unterschied in der Aktivierung zwischen xWnt5a beziehungsweise xWnt11, lassen sich die Chimären aufgrund der Aktivierung entweder eher xWnt5a oder xWnt11 zuordnen.

Das Chimärenpaar 1, also nach dem Austausch der BS2, aktivierte den ATF2-Luziferase Reporter entsprechend ihrem größeren N-Terminus. Die Chimäre 1.1 aktivierte den ATF2-Luziferase Reporter vergleichbar mit xWnt5a und die Chimäre 1.2 vergleichbar mit xWnt11. Das Chimärenpaar 2, also nach dem Austausch von BS1 und BS2, zeigte keinen Unterschied bezüglich der Aktivierung des ATF2-Luziferase Reporter. Beide aktivierten ähnlich stark wie xWnt5a. Die Chimärenpaare 3 und 4 dagegen aktivierten den ATF2-Luziferase Reporter, entsprechend ihres größeren C-Terminus (Abbildung 5.27).

Letztendlich gibt der ATF2-Luziferase Reporter ausschließlich einen ersten Anhaltspunkt, wie sich die Domänen verhalten, aber eine verlässliche Analyse kann ausschließlich *in vivo* erfolgen.

Die chimären Konstrukte sind alle *in vitro*, als auch *in vivo* funktional, dies wurde anhand der Verzögerung des Blastoporuschlusses und der nicht vollständigen Streckung des Notochords gezeigt (siehe Anhang).



**Abbildung 5.27: Alle nicht-kanonischen Chimärenpaare sind *in vitro* funktional**

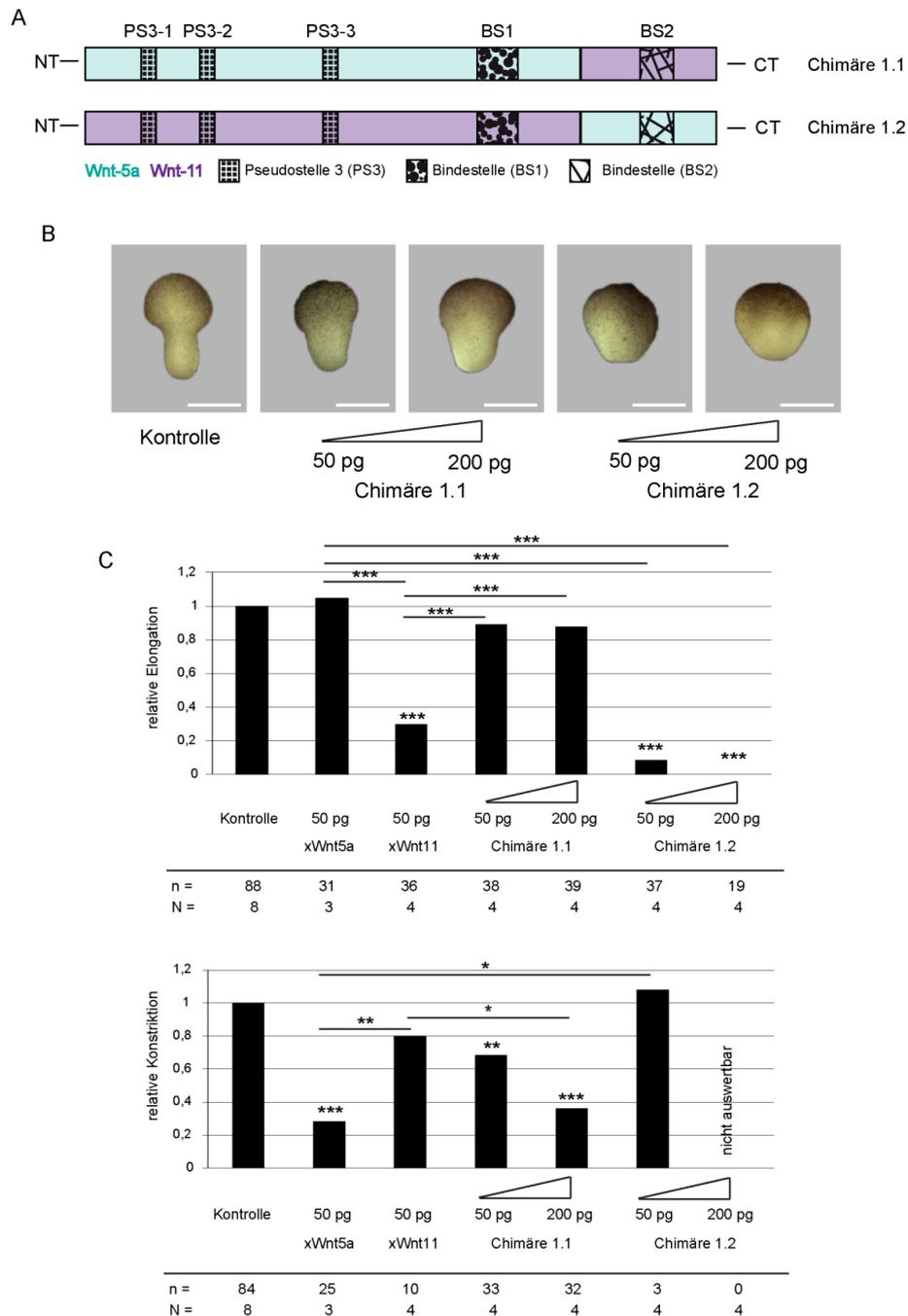
Das Chimärenpaar 1 aktiviert den ATF2-Luziferase Reporter entsprechend ihrem größeren N-Terminus. Das Chimärenpaar 2, zeigt keinen Unterschied bezüglich der Aktivierung des ATF2-Luziferase Reporters. Beide aktivierten ähnlich stark wie xWnt5a. Die Chimärenpaare 3 und 4 dagegen aktivieren den ATF2-Luziferase Reporter, entsprechend ihres größeren C-Terminus.

### 5.4.3 Die Entscheidung der nicht-kanonischen Signalwegaktivierung wird vom N-Terminus in xWnt5a und xWnt11 getroffen

Bei der Analyse der Chimären wurden grundsätzlich 50 pg mRNA der chimären Konstrukte überexprimiert, da bei dieser Konzentration der Elongations- und Konstriktionsphänotyp gut voneinander unterschieden werden konnte. Zusätzlich dazu wurden 200 pg mRNA überexprimiert, so ließen sich aufgrund der Fusionskonstrukte schwächere Effekte detektieren.

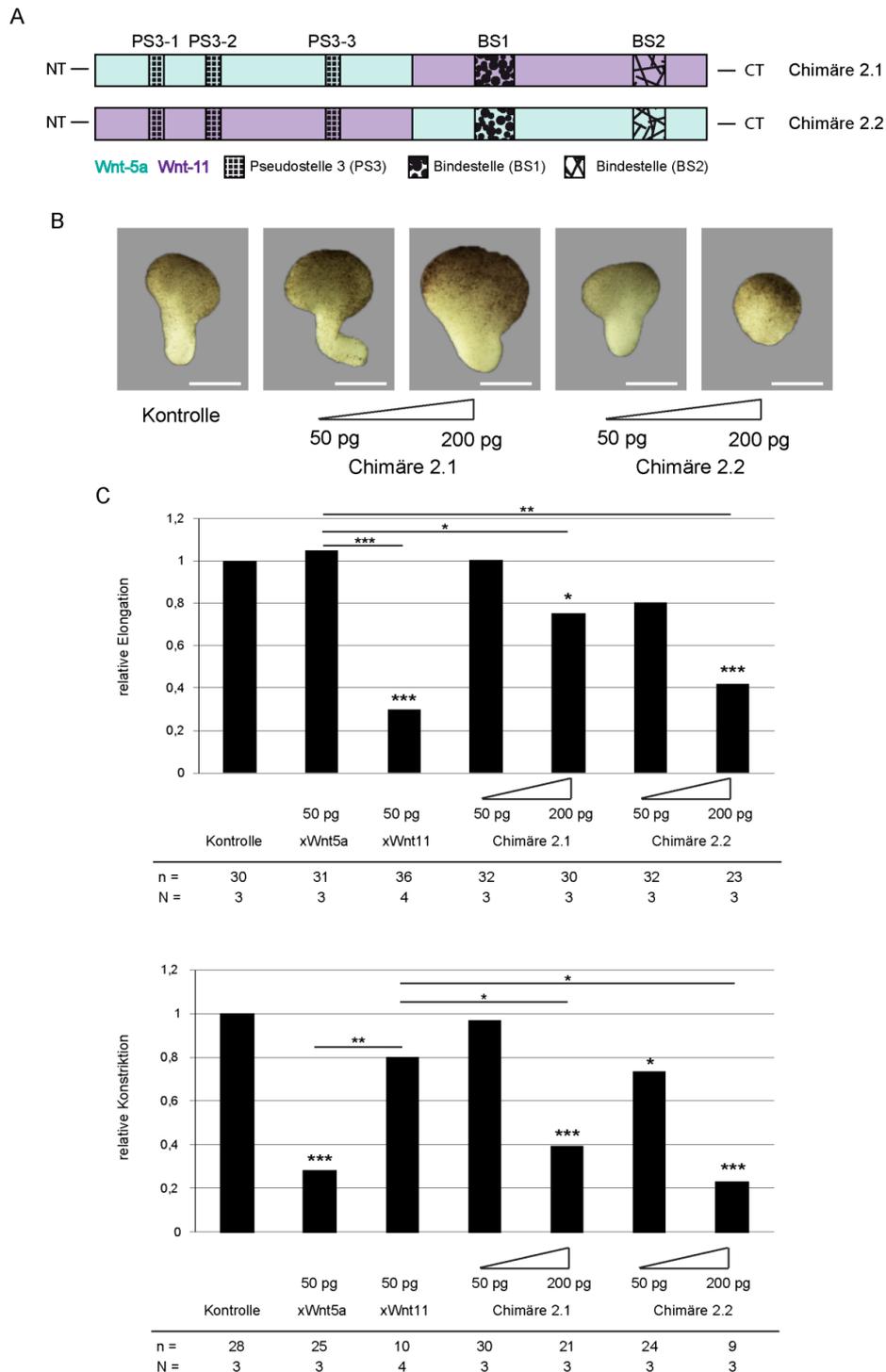
Die Überexpression der Chimäre 1.1 (xWnt5a mit der BS2 von xWnt11) hatte keinen Einfluss auf die Elongation, jedoch konnte eine signifikante Hemmung der Konstriktion beobachtet werden. Die Chimäre 1.2 (xWnt11 mit der BS2 von xWnt5a) zeigte einen hoch signifikanten Elongationsphänotyp, wobei die wenigen elongierten Explantate keinen Einfluss auf die Konstriktion zeigten (Abbildung 5.28). Somit konnte die Tendenz aus dem ATF2-Luziferase Reporterassay bestätigt werden. Der N-Terminus bestimmt welche Zweige des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges aktiviert werden, der C-Terminus hatte keinen Einfluss auf diese Entscheidung. Um genauer eingrenzen zu können welche

Domäne des N-Terminus für die Spezifizierung der nicht-kanonischen Wnt-Liganden verantwortlich ist, wurde dieser verkleinert.



**Abbildung 5.28: N-Terminus spezifiziert nicht-kanonische Wnt-Moleküle**

(A) Das Chimärenpaar 1 wurde durch eine Fusion zwischen der BS1 und der BS2 gebildet. (B) Chimäre 1.1 hemmt die Konstriktion, wobei Chimäre 1.2 die Elongation hemmt. (C) Die Chimäre 1.2 hat einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Elongation. Wobei die Chimäre 1.1 einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Konstriktion hat. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n= Anzahl ausgewerteter Explantate; exakter Test nach Fisher \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )



**Abbildung 5.29: Sowohl der N-Terminus, als auch der C-Terminus können eine Phänotyp ausbilden**

(A) Das Chimärenpaar 2 wurde durch eine Fusion zwischen der PS3-3 und der BS1 gebildet. (B) Chimäre 2.1 und Chimäre 2.2 beeinflussen die Elongation und Konstriktion. (C) Chimäre 2.1 inhibiert die Konstriktion bei Überexpression von 200 pg mRNA, Chimäre 2.2 zeigt schon bei 50 pg mRNA einen Konstriktionsphänotyp. Beide zeigen bei 200 pg mRNA einen Elongationsphänotyp. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n= Anzahl ausgewerteter Explantate; exakter Test nach Fisher \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )

#### **5.4.4 Sowohl die N-Terminale Pseudostelle 3, als auch die C-Terminale Bindestellen 1 sind an der Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalnetzwerkes beteiligt**

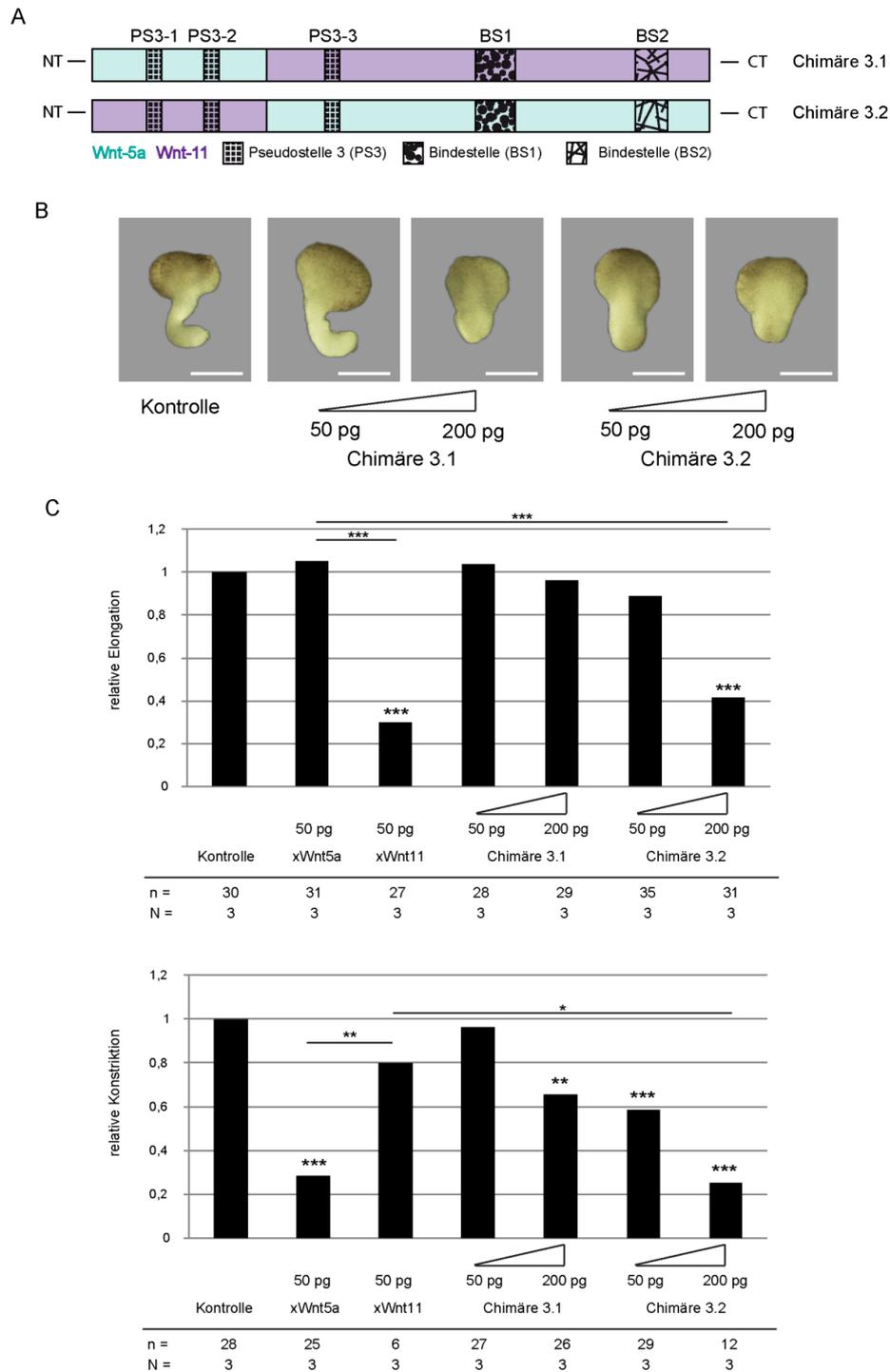
Im Chimärenpaar 2 wurden die beiden Fz Bindestellen, BS1 und BS2, von xWnt5a und xWnt11 gegeneinander ausgetauscht.

Beide Konstrukte dieses Chimärenpaares inhibierten bei 200 pg mRNA sowohl signifikant die Elongation, als auch die Konstriktion (Abbildung 5.29). Somit ging die Spezifität durch diese Fusion verloren, die beiden Phänotypen wurden vermischt. Daher ist davon auszugehen, dass zum einen die Domäne um die Bindungsstelle 1, als auch die Pseudostelle 3 an der Spezifizierung beteiligt ist. Um zu untersuchen welchen Einfluss die einzelnen Domänen der Pseudostelle 3 auf die Spezifität ausüben, wurde die Pseudostelle 3 zusätzlich in ihre einzelnen Domänen unterteilt.

#### **5.4.5 PS3-3 ist beteiligt an der xWnt5a Spezifizierung**

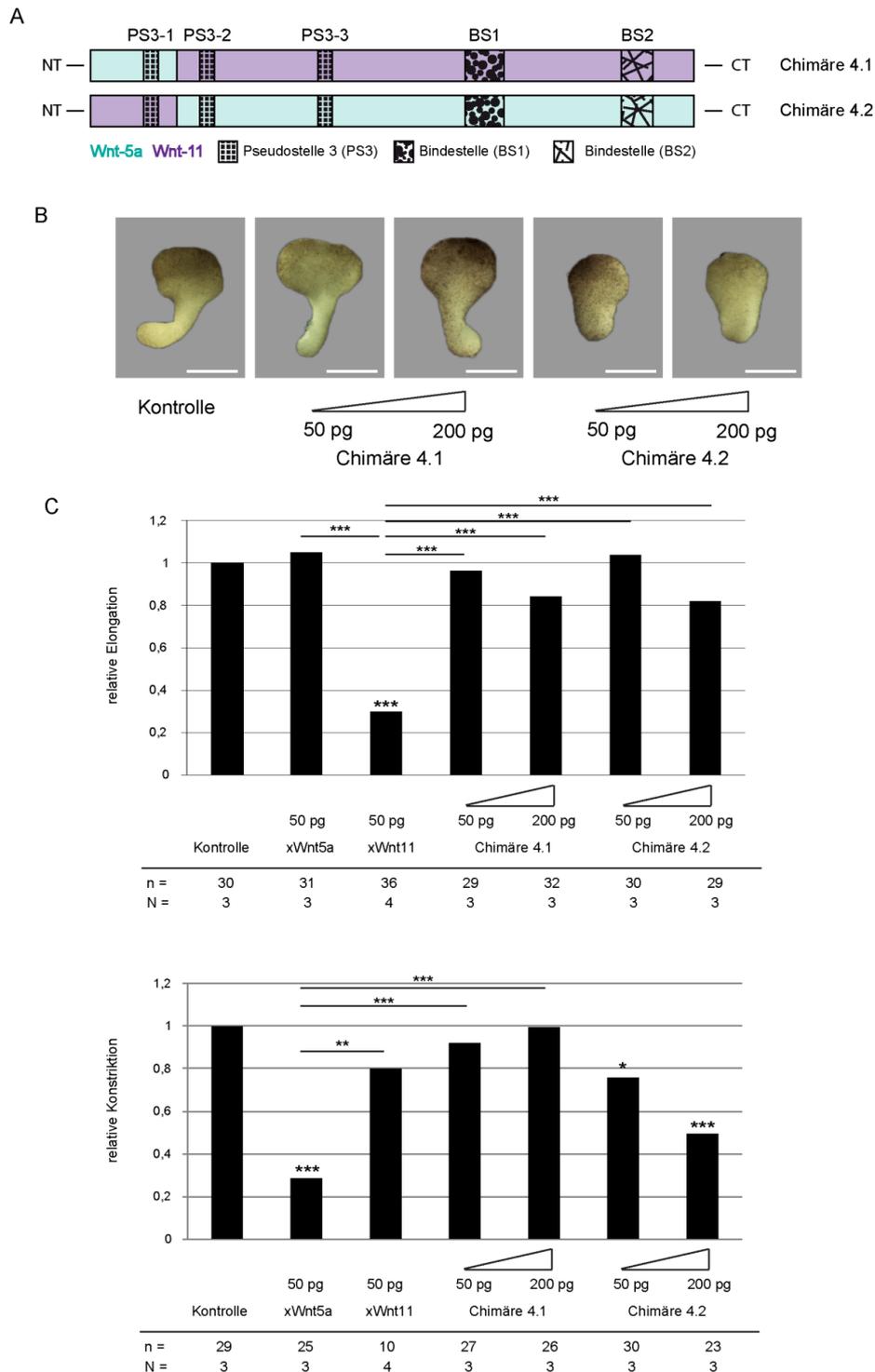
Zur Erstellung des Chimärenpaares 3 wurden xWnt5a und xWnt11 zwischen Domäne 2 und 3 der PS3 fusioniert. Die Chimäre 3.1 ( PS3-1 und PS3-2 von xWnt5a und der Rest von xWnt11) hatte keinerlei Einfluss auf die Elongation. Darüber hinaus war die Konstriktion signifikant verglichen mit der Kontrolle beeinträchtigt, aber nicht signifikant unterschiedlich zu xWnt11. Somit konnte ein schwacher xWnt5a, aber kein xWnt11 spezifischer Phänotyp ausgebildet werden. Wohingegen die Chimäre 3.2 (PS3-1 und PS3-2 von xWnt11 und der Rest von xWnt5a) beide Phänotypen zeigte, die Elongation war gehemmt, darüber hinaus zeigten die elongierten Explantate eine signifikant reduzierte Konstriktion (Abbildung 5.30).

Daraus kann geschlossen werden, dass zur effizienten Aktivierung des nicht-kanonischen xWnt5a Zweiges, der Bereich PS3-3 benötigt wird (Abbildung 5.30). Zur Aktivierung des xWnt11 Zweiges dagegen sind die Bereiche PS3-2 und PS3-1 nötig.



### Abbildung 5.30: PS3-3 spezifiziert xWnt5a

(A) Das Chimärenpaar 3 wurde durch eine Fusion zwischen der PS2-3 und der PS3-3 gebildet. (B) Chimäre 3.1 inhibiert die Konstriktion, wobei Chimäre 3.2 die Elongation und Konstriktion beeinflusst. (C) Chimäre 3.1 hat einen Einfluss auf die Konstriktion verglichen mit der Kontrolle, aber nicht verglichen mit xWnt11, die Chimäre 3.2 hat einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Konstriktion und die Elongation. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n= Anzahl ausgewerteter Explantate; exakter Test nach Fisher \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )



### Abbildung 5.31: PS3-1 und PS3-2 sind wichtig für xWnt11 Spezifität

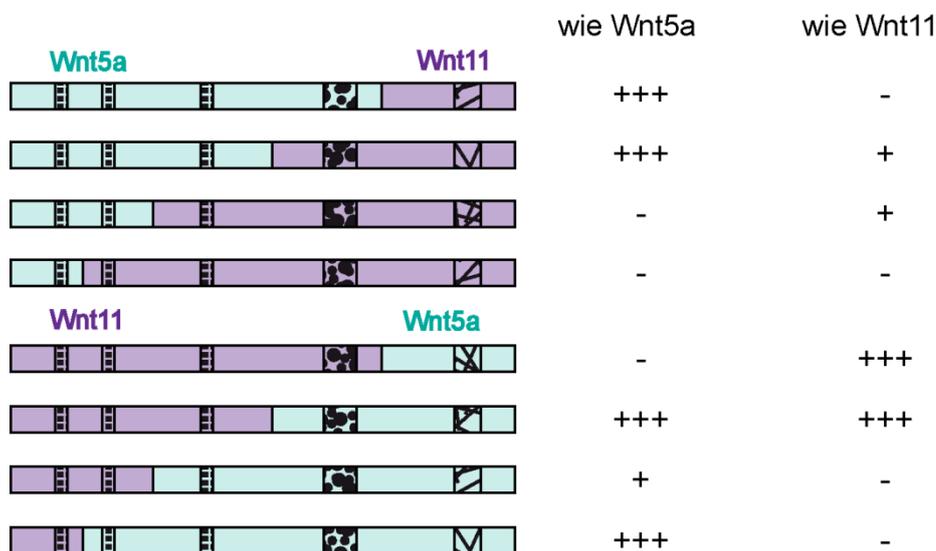
(A) Das Chimärenpaar 4 wurde durch eine Fusion zwischen der PS3-1 und der PS3-2 gebildet. (B) Chimäre 4.1 zeigt keine Beeinträchtigung der konvergenten Extension, wobei Chimäre 4.2 die Konstriktion inhibiert. (C) Das Chimärenpaar 4 hat keinen Einfluss auf die Elongation. Chimäre 4.1 beeinträchtigt die Konstriktion nicht, wobei Chimäre 4.2 einen konzentrationsabhängigen Konstriktionsphänotyp zeigte. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Explantate; exakter Test nach Fisher \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ; Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ )

#### 5.4.5.1 PS3-1 und PS3-2 vermitteln die Spezifität von xWnt11

Durch weitere Auftrennung der PS3, konnte der Einfluss der PS3-1 auf den xWnt11 Phänotyp untersucht werden. In dieser Chimäre wurde jeweils nur der kleine N-Terminale Anteil um die PS3-1 ausgetauscht.

Die Chimäre 4.1 (PS3-1 von xWnt5a, Rest von xWnt11) verursachte keine Veränderungen in der konvergenten Extension der Explantate. Die Explantate sahen phänotypisch aus wie die uninjizierten Kontrollexplantate. Dies war insofern erstaunlich, als Reporteranalysen gezeigt hatten, dass dieses Konstrukt prinzipiell nicht-kanonische Wnt-Signalwege aktivieren kann. Die Chimäre 4.2 (PS3-1 von xWnt11, Rest von xWnt5a) zeigte dagegen einen signifikanten konzentrationsabhängigen Konstriktionsphänotyp (Abbildung 5.31). Somit verhielt sich dieses Konstrukt wie xWnt5a und die Domäne um die PS3-1 ist nicht wichtig für die Spezifität von xWnt5a. Im Umkehrschluss ist die PS3-1 wichtig für die Ausbildung eines xWnt11 spezifischen Phänotyps, dies kann aber nur in Kombination mit der PS3-2 realisiert werden.

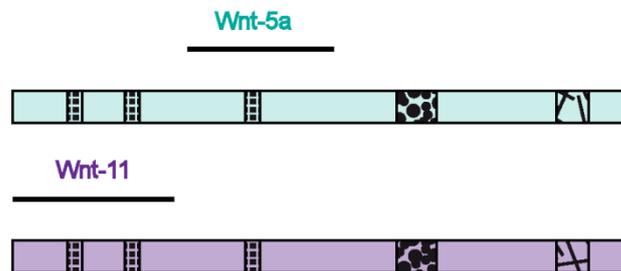
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die BS2 keinen Einfluss auf die Spezifität hat. Wobei es scheint, dass die selektive Aktivierung distinkter nicht-kanonischer Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes sowohl in der BS, als auch in unterschiedlichen Domänen der nicht konservierten PS3 stattfindet. In Abbildung 5.32 ist zusammenfassend aufgeführt, ob sich die chimären Konstrukte bei Überexpression verhalten wie xWnt5a oder xWnt11.



**Abbildung 5.32: Phänotypische Ausprägung der chimären Konstrukte**

In der Abbildung ist zusammengefasst wie sich die chimären Konstrukte bei Überexpression verhalten, ob sie einen xWnt5a oder xWnt11 Phänotyp ausbilden (+++ deutlicher Phänotyp, + schwacher Phänotyp, - kein Phänotyp).

In Abbildung 5.33 ist nochmal zusammenfassend dargestellt welche Bereiche in der PS3 für die Spezifizierung xWnt5a und xWnt11 verantwortlich sind.



**Abbildung 5.33: Spezifität in der PS3**

Für die Spezifizierung von xWnt5a ist die PS3-3 verantwortlich, wohingegen die PS3-2 und PS3-1 für die Spezifizierung von xWnt11 verantwortlich sind.

### 5.5. Spezifität durch Punktmutationen zu entschlüsseln ist schwer realisierbar

Ein weiterer Ansatz war die Analyse von xWnt5a und xWnt11 Mutanten, um spezifische Aminosäuren zu identifizieren, die für die jeweilige Spezifität verantwortlich sind. Deshalb wurden konservierte xWnt5a-typische Aminosäuren in xWnt11-typische Aminosäuren umgewandelt und umgekehrt. Basis für diese Punktmutationen war ein Sequenzvergleich der nicht-kanonischen Wnts aus *Xenopus* mit denen aus *Nematostella* und die Beobachtung, dass die heterologe Expression der nicht-kanonischer NvWnts in *Xenopus* zeigte, dass NvWnt5 die Funktion von xWnt11 übernehmen kann und NvWnt11 die von xWnt5a (Rigo-Watermeier et al., 2012). Darüber hinaus diente ein Modell, das die Bindung zwischen Wnt und Fz modellierte, von Suat Özbek (Centre for Organismal Studies Heidelberg) als Grundlage, um die Aminosäuren zu bestimmen. Nachdem die Kristallstruktur (Janda et al., 2012) veröffentlicht wurde, stellte sich dieses Modell als nicht zutreffend heraus.

Die zur Analyse bestimmten Aminosäuren lagen im C-Terminus der Wnt-Moleküle, wobei mittlerweile mit den Chimären gezeigt werden konnte, dass der C-Terminus nicht wichtig für die Spezifizierung des nicht-kanonischen Wnt-Signals ist.

### 5.6. Analyse der xWnt5a und xWnt11 regulierten differentiellen Genexpression

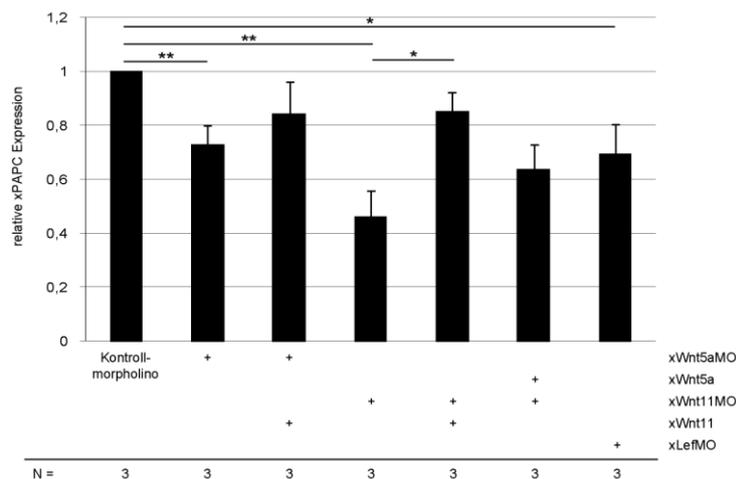
Inwieweit die Regulation der konvergenten Extension durch xWnt5a und xWnt11, auch über eine Wnt abhängige Regulation der Transkription erfolgt, ist derzeit noch unklar. Um die globale Änderung der Transkription, durch die beiden nicht-kanonischen Wnt-Liganden zu erfassen, wurde die Gesamt-RNA dorsaler Marginalzonen im Stadium 12

isoliert und im Microarray analysiert. Zur Identifizierung xWnt5a und xWnt11 spezifischer Zielgene wurde ein Knockdown des endogenen Proteins durchgeführt. Zusätzlich wurden xWnt11 spezifische Zielgene mittels der Überexpression von xWnt11 mRNA identifiziert. Darüber hinaus wurden Explantate analysiert, die für den Transkriptionsfaktor xLef defizient waren. Die xLef defizienten Explantate dienten hier als Vergleichsprobe.

### 5.6.1 Qualitätsprüfung der Gesamt-RNA vor der Microarray Analyse

Die Microarray Analyse wurde bei dem Unternehmen ATLAS Biolabs GmbH in Auftrag gegeben. Vor der Microarray Analyse wurde die aus dorsalen Marginalzonen isolierte Gesamt-RNA hinsichtlich ihrer Qualität überprüft.

Die Stabilität der RNA wurde am Bioanalyzer bestimmt, dieser misst den RNA Integrity Wert (RIN-Wert). Dieser ist ein Indikator für die Stabilität und die Qualität der RNA. Ausschließlich Proben mit einem RIN Wert über acht wurden für die weitere Analyse verwendet. Der Erfolg des Knockdowns wurde durch die Analyse der Veränderung der xPAPC Expression verifiziert. Von Schambony and Wedlich (2007) wurde gezeigt, dass der Knockdown von xWnt5a zu einer Reduktion der xPAPC Expression im ganzen Embryo führt. Darüber hinaus konnte in animalen Kappen durch eine Überexpression von xWnt11 die xPAPC Expression induziert werden (Rigo-Watermeier, 2010). xLef beeinflusst ebenfalls die xPAPC Expression, dominant negatives Lef1-EnR vermindert die Expression von xPAPC (Lou et al., 2008). Somit kann die xPAPC Expression als Analysesystem für alle drei Knockdowns verwendet werden.



**Abbildung 5.34: xWnt5a, xWnt11 und xLef beeinflussen die xPAPC Expression**

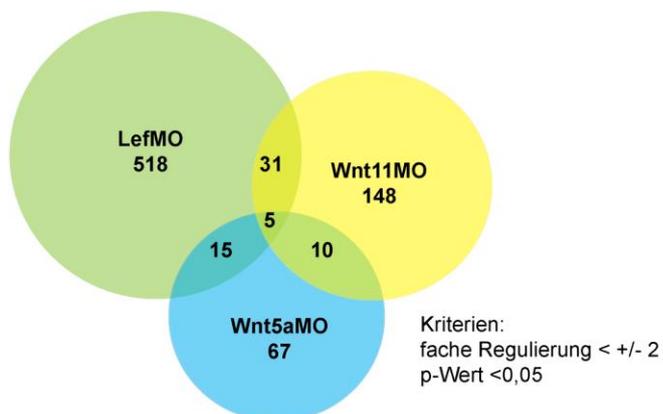
Ein Knockdown von xWnt5a, xWnt11 und xLef führt zu einer signifikanten Reduktion der xPAPC Expression. Wobei die durch xWnt11MO reduzierte xPAPC Expression signifikant durch Koinjektion von xWnt11 mRNA gerettet werden kann. (Injektionsmengen: 0.5 pmol CoMO, 0.8 pmol Wnt5aMO, 0.5 pmol Wnt11MO, 0.5 pmol LefMO1, 0.5 pmol LefMO2, 20 pg xWnt11 mRNA, 100 pg xWnt5a mRNA; N = Anzahl unabhängiger Experimente; Student'scher t-Test: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01)

Abbildung 5.34 zeigt die xPAPC Expression, der zur Microarray Analyse verwendeten Proben. Sowohl der xWnt5a, xWnt11, als auch xLef Knockdown führte zu einer signifikanten Reduktion der xPAPC Expression. Der Knockdown von xWnt11 konnte spezifisch durch die Koinjektion von xWnt11 mRNA gerettet werden, aber nicht durch eine Koinjektion von xWnt5a mRNA. Die Verminderung der xPAPC Expression durch xWnt5a Knockdown konnte mittels xWnt11 mRNA nicht gerettet werden.

### 5.6.2 Identifikation xWnt-abhängiger Zielgene

Die Transkriptomanalyse ergab, dass bei einem Ausschlusskriterium von 2-facher Expressionsveränderung mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  sich zahlreiche Kandidatengene identifizieren lassen, deren Expression von endogenem xWnt11, xWnt5a und xLef abhängt. Keines der im Knockdown identifizierten xWnt11 Kandidatengene war bei koinjizierter xWnt11 mRNA bei einem Signifikanzniveau  $p < 0.05$  mehr als 2-fach reguliert. Nur wenige Kandidatengene wurden durch mehr als ein Morpholino reguliert. In der Grafik ist die Gesamtanzahl der regulierten Gene aufgezeigt und in Bereichen der Überschneidung, die Anzahl derer, die in mehr als einer Situation reguliert waren (Abbildung 5.35).

Die Regulation der xPAPC Expression durch xWnt5a, xWnt11 und xLef konnte im Microarray nicht bestätigt werden, es konnte keinerlei signifikante Regulation detektiert werden.



**Abbildung 5.35: Anzahl regulierter Zielgene während der konvergenten Extension**

Ein Knockdown von xLef führt zur veränderten Expression von 518 Genen, wohingegen der Knockdown von xWnt5a die Expression von 67 Genen beeinflusst und der von xWnt11 von 148 Genen. In den Überlappungen ist die Anzahl der Gene dargestellt, die in mehreren Ansätzen reguliert sind. (Komplette Liste im Anhang).

Aus der Analyse von insgesamt 43698 Spots auf dem Chip verblieben als spezifisch regulierte Kandidatengene bei LefMO 1.18%, bei Wnt11MO 0.33% und bei Wnt5aMO 0.15%. Wie erwartet, bewirkte der Knockdown des Transkriptionsfaktors Lef stärkere transkriptionelle Veränderungen verglichen mit dem Knockdown nicht-kanonischer Wnt Liganden.

Tabelle 5.1 zeigt eine selektive Auswahl der xWnt11 spezifischen Kandidatengene, die entweder an der Zellmigration beteiligt sind, einen Bezug zur Entstehung von Krebs haben, oder bekanntermaßen mit dem Wnt-Signalnetzwerk interagieren. Die für xWnt11 ausgewählten Gene wurden nicht durch xWnt5a reguliert.

Gen	Gen-ID-Nr.	Probe-ID	fache Veränderung	p-Wert
teratocarcinoma-derived growth factor 1, member 1 (tdgf1.1)	NM_001095666	A_10_P146058	+ 3,16	0,027
		A_10_P034476	+ 1,18	0,131
RAB11 family interacting protein 5 (rab11fip5)	NM_001091439	A_10_P004528	+ 2,50	0,046
hairy and enhancer of split 7, gene 1 (hes 7.1)	NM_001088706	A_10_P000114	+ 2,21	0,047

**Tabelle 5.1: Putative xWnt11 abhängige Zielgene**

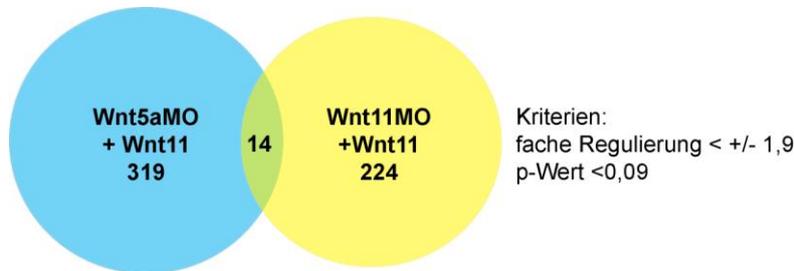
Unter den xWnt5a spezifischen Kandidatengenen konnten mit der PDZ binding kinase (pbk), speckle type POZ protein (spop-b) und shisa ausschließlich drei Kandidatengene identifiziert werden, die mit Migration, Tumorgenese oder Wnt-Signalnetzwerk in Verbindung stehen (Tabelle 5.2). Die hier ausgewählten Zielgene waren für die xWnt5a vermittelte Signaltransduktion spezifisch, da sie nicht durch xWnt11 reguliert wurden.

Gen	Gen-ID-Nr.	Probe-ID	fache Veränderung	p-Wert
PDZ binding kinase (pbk)	NM_001095491	A_10_P155823	+ 4,11	0,009
		A_10_P009349	+ 3,94	0,008
		A_10_P169778	+ 2,70	0,016
speckle-type POZ protein (spop-b)	NM_001097009	A_10_P142528	+ 3,15	0,027
		A_10_P042981	+ 3,05	0,029
shisa 3	NM_001086364	A_10_P003454	- 2,82	0,009

**Tabelle 5.2: Putative xWnt5a abhängige Zielgene**

Die Anzahl der Gene, die sowohl bezüglich des xWnt5a, als auch des xWnt11 Knockdowns interessant waren, war gering. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Gene ausgesucht, die durch eine Überexpression von xWnt11 reguliert wurden. xWnt11 wurde in einem xWnt5a und einem xWnt11 Knockdown Hintergrund überexprimiert. In beiden Fällen konnte mittels der Microarray Analyse die xWnt11 Überexpression hoch signifikant detektiert werden, wobei im xWnt5aMO Hintergrund mehr xWnt11 vorhanden war (siehe Tabelle Anhang). Entsprechend wurden im xWnt5a Knockdown Hintergrund deutlich mehr Gene reguliert. Aus diesem Grund wurden die Kandidatengene bezüglich der

Überexpression aus dem Wnt5aMO\_11 Hintergrund ausgewählt. Für die Identifizierung von Kandidatengenen wurden die Kriterien insofern gelockert als eine +/- 1.9 fache Regulierung und ein p-Wert < 0.09 angewandt wurde (Abbildung 5.36).



**Abbildung 5.36: Zielgene der xWnt11 Überexpression**

Durch xWnt11 Überexpression wurden im xWnt5aMO Hintergrund 319 Gene reguliert und im xWnt11MO Hintergrund 224 Gene, wohingegen ausschließlich 14 Gene in beiden Ansätzen reguliert wurden. (Komplette Liste im Anhang).

Überraschenderweise fanden sich ausschließlich 14 Kandidaten in beiden Überexpressionsstudien. Aus diesem Grund ist es wichtig die ausgewählten Gene in einem unabhängigen System zu verifizieren und damit sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um xWnt11 Zielgene handelt. Die hier ausgewählten Kandidaten waren spezifisch für eine xWnt11 Überexpression und wurden nicht durch xWnt5a oder xLef reguliert (Tabelle 5.3). Unter den durch überexprimiertes Wnt11 regulierten Kandidaten befanden sich mit *prickle* auch Komponenten des Wnt11/PCP Signalweges.

Gen	Gen-ID-Nr.	Probe-ID	fache Veränderung	p-Wert
cerberus 1, cysteine knot superfamily (cer1)	NM_001088331	A_10_P027316	- 6,05	0,014
nodal growth differentiation factor (nodal)	NM_001088347	A_10_P137978	- 4,60	0,039
		A_10_P027351	- 3,89	0,058
left-right determination factor (lefty-b)	NM_001088574	A_10_P046533	- 4,1	0,081
left-right determination factor (lefty-a)	NM_001085745	A_10_P000464	- 4,08	0,068
Frzb-1 protein (frzb-1)	NM_001090261	A_10_P048423	3,87	0,12
		A_10_P156891	3,86	0,19
		A_10_P031086	3,35	0,09
pinhead (pnhd)	NM_001127751	A_10_P194068	-2,95	0,079
		A_10_P228108	-2,90	0,085
		A_10_P150288	-2,78	0,088
		A_10_P033886	-2,76	0,075
brevican (bcan)	NM_001088637	A_10_P000515	+ 2,39	0,020

Gen	Gen-ID-Nr.	Probe-ID	fache Veränderung	p-Wert
syntabulin (syntaxin- interacting) (sybu)	NM_001093953	A_10_P007439	+ 2,30	0,012
sprouty homolog1, antagonist of FGF signaling (spry1-a)	NM_001137585	A_10_P149878	-2,11	0,032
		A_10_P046456	-1,64	0,061
receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ror2)	NM_001088843	A_10_P256837	-2,10	0,071
		A_10_P178233	-1,95	0,015
		A_10_P000139	-1,79	0,054
sprouty homolog 2 (spry2)	NM_001088769	A_10_P000535	-1,94	0,007
		A_10_P185393	-1,92	0,034
prickle homolog 1 (prickle1-a)	NM_001088688	A_10_P000540	-2,00	0,020
prickle homolog 1 (prickle1-b)	NM_001088700	A_10_P045941	-1,82	0,024
		A_10_P204443	-2,05	0,019

**Tabelle 5.3: Putative Zielgene der xWnt11 Überexpression**

### 5.6.3 Verifizierung der Zielgene im NanoString

Im NanoString werden die anhand der Microarray Daten ausgewählten Zielgene im xWnt5a, xWnt11 und xLef Knockdown analysiert. Darüber hinaus werden diese Zielgene auch in xWnt11 überexprimierenden dorsalen Marginalzonen analysiert.

## 6. Diskussion

Funktionale Unterschiede zwischen xWnt5a und xWnt11 lassen sich am Besten an isolierten dorsalen Marginalzonen aus *Xenopus* Gastrula Embryonen analysieren. Hier ist während der konvergenten Extension Wnt11 für die Längsstreckung des Embryos verantwortlich, während xWnt5a die Verschmälerung der anterioren-posterioren Achse vorantreibt. Aufbauend auf diesem experimentellen System wurde auf molekularer, zellulärer und transkriptioneller Ebene analysiert, worauf die funktionalen Unterschiede zwischen xWnt11 und xWnt5a beruhen und wie sie realisiert werden.

Auf molekularer Ebene wurden spezifische Regionen/Domänen eingegrenzt, die für die Wnt5a beziehungsweise die Wnt11 spezifischen Funktionen verantwortlich sind. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass Wnt5a *in vivo* einen Komplex mit Ror2 bildet und Ror2 in Membrancluster rekrutiert. Wnt11 bildet zusammen mit Fz7 und entweder PACP oder C-Cadherin, zwei unterschiedliche Adhäsionsmodulationskomplexe, wodurch die Adhäsion während der konvergenten Extension moduliert wird. Die Identifizierung putativer Zielgene legt nahe, dass xWnt11 und xWnt5a im involutierenden Mesoderm ein nicht überlappendes Set an Zielgenen reguliert.

### 6.1. Wnt5a und Wnt11 können mittels einfacher Analysesysteme nicht unterschieden werden

Die Voraussetzung, um Wnt5a und Wnt11 charakterisieren zu können, ist die Etablierung eines Analysesystems, das es erlaubt beide nicht-kanonischen Wnt-Moleküle verlässlich zu unterscheiden. Von allen untersuchten Analysesystemen war dies ausschließlich aufgrund der phänotypischen Auswertung der Explantate der dorsalen Marginalzone möglich.

Alle experimentell weniger aufwändigen Methoden, wie Reporteranalysen, Schluss des Blastoporus, Expressionsdomänen der mesodermalen Markergene *xBra* und *chordin* erlaubten keine, oder keine eindeutige Unterscheidung von Wnt5a und Wnt11 spezifischen Funktionen. Für den Einfluss auf den Blastoporusschluss war das insofern weniger überraschend als beide nicht-kanonischen Wnts, Wnt5a und Wnt11, bekanntermaßen die konvergente Extension beeinflussen (Schambony and Wedlich, 2007; Tada and Smith, 2000). Störungen der konvergenten Extension, wie zum Beispiel in der bipolaren Zellorientierung oder der mediolateralen Zellinterkalation führen zu Verzögerungen des Blastoporusschlusses. Somit ist dieser einfache experimentelle Ansatz ausschließlich dafür geeignet, Störungen der konvergenten Extension im

Allgemeinen zu erkennen, nicht aber zwischen dem der Störung zugrunde liegenden Mechanismen oder dem Störung verursachenden Mechanismus zu unterscheiden.

Dabei wirkten sowohl Wnt5a, als auch Wnt11 im gleichen Konzentrationsbereich. Verglichen mit dem Elongationsassay reagierte der Blastoporuschluss sensitiver auf die Überexpression der nicht-kanonischen Wnt-Moleküle. Daraus kann geschlossen werden, dass der Gesamtembryo sensitiver auf die Überexpression reagiert als Gewebeexplantate. Die Erklärung hierfür liegt wohl in der konvergenten Extension selbst, zum Einen treibt sie den Blastoporuschluss voran, zum Anderen auch die Involution des dorsalen Mesoderms. Darüber hinaus ist die konvergente Extension nicht auf das mesodermale Gewebe der dorsalen Marginalzone beschränkt, sondern erstreckt sich über das gesamte axiale und paraxiale Mesoderm (Keller et al., 2000). Durch die Überexpression werden eine Reihe Faktoren beeinflusst, die alle eine Auswirkung auf den Verlauf der konvergenten Extension ausüben. Im Explantat dagegen handelt es sich um eine autonome Bewegung, die durch keinerlei zusätzliche Zellbewegungen beeinflusst werden. Aus diesem Grund reagiert der Gesamtembryo sensitiver im Vergleich zum Gewebeexplantat.

Entsprechend war auch die Analyse der Expression früher mesodermaler Markergene wie *xBra* und *chordin* nicht geeignet Unterschiede zwischen Wnt5a und Wnt11 aufzuzeigen. Zwar konnte anhand der *chordin* Expressionsdomäne die Streckung des Notochords beurteilt werden, aber es konnte kein Unterschied zwischen den nicht-kanonischen Wnt-Liganden beobachtet werden. Die Expression von *xBra* war schon bei kleinsten Konzentrationen von überexprimiertem Wnt5a oder Wnt11 ausschließlich kreisrund um den Blastoporus und nicht mehr im Notochord lokalisiert. Auch dieses System reagierte sehr sensitiv. Damit waren die Auswertung des Blastoporuschlusses und die Streckung des Notochords zwei einfache Analysesysteme, um zu zeigen, dass alle Chimären *in vivo* funktional sind, also die konvergente Extension beeinflussen.

Auch der ATF2 basierte Luziferase Reporterassay eignete sich nur bedingt, um zwischen Wnt5a und Wnt11 zu differenzieren. Zwar zeigte Wnt5a im Vergleich zu Wnt11 eine signifikant höhere Aktivierung des ATF2-Luziferase Reporters. Im Embryo hingegen wurde gezeigt, dass kein Unterschied in der Aktivierung zwischen Wnt5a und Wnt11 detektiert werden kann (Ohkawara and Niehrs, 2011). Inwiefern dieser Unterschied HEK293 spezifisch ist, muss erst noch analysiert werden, da bisherige Publikationen den ATF2-Luziferase Reporter ausschließlich im Embryo verwendeten. Da beide, Wnt5a und Wnt11 die JNK aktivieren, aktivieren vermutlich beide nicht-kanonischen Wnt-Moleküle den ATF2-Transkriptionsfaktor und damit den ATF2-Luziferase Reporter (Cha et al., 2008). Im gesamten Embryo nehmen sicherlich weitere Moleküle auf die Spezifizierung

der Wnt5a und Wnt11 Signale Einfluss, die im *in vitro* System in HEK293 Zellen nicht vorhanden sind.

Überraschenderweise konnte auch das kanonische Wnt8a den ATF2-Reporter aktivieren, zwar hoch signifikant im Vergleich zur Kontrolle, aber auch signifikant geringer als die nicht-kanonischen Wnt-Moleküle. Zum Einen könnte dies an der Regulation der Expression von Wnt11 durch die kanonische Wnt Signalkaskade liegen. In Herzvorläuferzellen wird  $\beta$ -Catenin für die Expression von Wnt11 benötigt (Lin et al., 2007). Im proximalen Promotor von humanem Wnt11 konnten zwei konservierte Tcf/Lef Bindestellen identifiziert werden, was darauf hin deutet, dass die Wnt11 Expression vom kanonischen Wnt-Signalweg reguliert werden kann (Katoh and Katoh, 2009). Damit könnte die durch xWnt8a induzierte ATF2-Luziferase Aktivität ein sekundärer Effekt sein, der auf einer verstärkten Expression von Wnt11 beruht. Inwiefern aber das humane Wnt11 ebenso wie xWnt11 den ATF2-Luziferase Reporter aktivieren kann, bleibt fraglich. Alternativ könnte die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Reporters durch xWnt8a auch die Folge der Aktivierung von Rac durch den kanonischen Wnt-Signalweg sein. Rac wiederum aktiviert die JNK. Sowohl in der Zellkultur, als auch in *Drosophila* konnte nachgewiesen werden, dass Rac-GTP einen positiven Einfluss auf die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges besitzt (Ezufali and Bapat, 2004; Jones and Bejsovec, 2005). Darüber hinaus phosphoryliert das durch Rac1 aktivierte JNK  $\beta$ -Catenin, wodurch die Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern unterstützt wird (Wu et al., 2008). Somit ist JNK auch an der Signalweiterleitung des kanonischen Wnt-Signalweges beteiligt und es könnte ebenfalls über JNK zu einer Aktivierung des ATF2-Reporters kommen.

Für Wnt5a wurde in HEK293 Zellen gezeigt, dass es im entsprechenden zellulären Kontext auch den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren kann (Mikels and Nusse, 2006). Ob Wnt8a im entsprechenden zellulären Kontext auch den nicht-kanonischen Signalweg aktivieren kann, wurde bisher nicht untersucht, wahrscheinlich da ein geeignetes Reporter Konstrukt erst 2011 vorgestellt wurde (Ohkawara and Niehrs, 2011).

Der ATF2-Luziferase Reporter kann also nicht nur zur Bestätigung der Funktionalität der nicht-kanonischen Chimärenpaare heran gezogen werden, sondern auch zur ersten Einteilung der nicht-kanonischen Chimären.

Zusammengefasst kann die Schwierigkeit die nicht-kanonischen Signalwege zu unterscheiden auch darin begründet sein, dass nicht distinkte Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes selektiv aktiviert werden, sondern mehrere Zweige parallel. An der Regulation der konvergenten Extension in *Xenopus* sind nicht nur die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege beteiligt, sondern auch der kanonische Wnt-Signalweg (Kuhl et al., 2001; Schambony and Wedlich, 2007). In Zebrafisch zum Beispiel sind Wnt5a und Wnt11

teilweise redundant bezüglich der konvergenten Extension (Westfall et al., 2003), auch im Embryo von *Xenopus* können Wnt5a und Wnt11 phänotypisch nicht unterschieden werden. Umso erstaunlicher sind die deutlichen und quantitativ unterscheidbaren Effekte in den Explantaten der dorsalen Marginalzone. Dies ist nur so zu erklären, dass hier tatsächlich von Wnt11 und Wnt5a präferenziell distinkte Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes aktiviert werden. Somit kann zur aussagekräftigen Analyse ausschließlich ein *in vivo* System herangezogen werden, in diesem Fall der Elongationsassay der dorsalen Marginalzone.

## **6.2. Phänotypische Unterscheidung von Wnt5a und Wnt11 im Elongationsassay**

Durch die Etablierung dieses Assays kann quantitativ zwischen den durch Wnt5a und Wnt11 vermittelten Effekten unterschieden werden. Darüber hinaus konnte eine Konzentration identifiziert werden, bei der verlässlich zwischen dem Wnt5a Phänotyp der Konstriktion und dem Wnt11 Phänotyp der Elongation differenziert werden konnte.

Auffallend an diesem System ist, dass die Überexpression von Wnt5a zum selben Phänotyp führt wie der Knockdown. Beide zeigten eine hoch signifikante Beeinträchtigung der Konstriktion. Daran wird deutlich wie entscheidend die Konzentration der nicht-kanonischen Wnt-Liganden ist. In Rigo-Watermeier et al. (2012) konnte dies nicht nur für Wnt5a gezeigt werden, sondern ebenfalls für den durch Wnt11 verursachten Elongationsphänotyp. Ähnliches konnte auch für weitere Komponenten des Wnt/PCP Signalweges gezeigt werden, zum Beispiel PTK7 und Strabismus (Peradziryi et al., 2012). Zur Ausprägung des gleichen Phänotyps kommt es auch, wenn sich die Überexpression dominant negativ auswirkt. Damit wird ähnlich zum Knockdown das endogene Signal unterdrückt und die Ausprägung des Phänotyps der Überexpression ähnelt dem der Morphanten. So führt die Überexpression eines dominant negativen Wnt11 zu einer Inhibition der konvergenten Extension und zu einer verminderten Aktivierung von RhoA (Habas et al., 2001; Tada and Smith, 2000). Das dominant negative Wnt11 hat einen trunkierten C-Terminus. Somit ist die Fz Bindestelle 2 deletiert. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass das dominant negative Wnt11 Fz zwar noch binden kann, aber die Aktivierung des Signalweges vermindert ist. Die Spekulation, dass eine Überexpression von Wnt11 oder Wnt5a ebenfalls in einer verminderten Aktivierung des Signalweges resultiert, führt zu unterschiedlichen Erklärungsmöglichkeiten: In der Wnt-produzierenden Zelle könnten die Wnt-Moleküle nicht vollständig modifiziert und daher nicht sezerniert werden. Dass überexprimierte Wnt-Moleküle tatsächlich im Endoplasmatischen Retikulum akkumulieren wurde bereits beschrieben (Holzer et al.,

2012), wobei bisher noch nie explizit gezeigt wurde, dass dies mit der Prozessierung endogener Liganden interferiert, also dominant negative Auswirkungen hat. Zu viele Wnt-Moleküle könnten im extrazellulären Raum akkumulieren oder es sind nicht genügend Transportmöglichkeiten vorhanden, um den Morphogengradienten aufzubauen. Dadurch könnte das Wnt-Signalnetzwerk in entfernt von der Wnt-produzierenden Zelle liegenden Zellen nicht aktiviert werden. In humanen artikulären Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass die Wnt3a Konzentration bestimmt welcher Zweig des Signalnetzwerkes aktiviert wird. Niedrige Konzentration Wnt3a führt zu einer Aktivierung des Wnt/Calcium Signalweges, wobei durch hohe Konzentration Wnt3a der kanonische Wnt Signalweg aktiviert wird (Nalesso et al., 2011). Darüber hinaus könnte durch eine übermäßige Aktivierung der jeweiligen Signalkaskade, ein negativer Feedbackmechanismus aktiviert werden, der dann zu einer Inhibition der Signalkaskade führt. Ein Beispiel hierfür ist das kanonische Zielgen Axin2, welches Teil eines negativen Feedbackmechanismus ist (Jho et al., 2002; Lustig et al., 2002). Da überexprimiertes Wnt5a den ATF2-Luziferase Reporter aktivierte und den Effekt des Morpholinos nahezu vollständig aufhob, muss davon ausgegangen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte nicht dominant negativ wirken. Damit scheint tatsächlich die Konzentration des Liganden entscheidend für die Aktivierung der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege und die daraus resultierende Signaltransduktion zu sein.

### **6.3. Analyse von Wnt5a und Wnt11 auf zellulärer Ebene**

Zur Analyse der nicht-kanonischen Wnt Signalkaskade auf zellulärer Ebene mittels Lebendzellaufnahmen, wurde xWnt5a und xWnt11 mit eGFP Fluoreszenz-markiert. Da Wnt-Moleküle beim Anhängen einer Markierung häufig ihre Funktionalität verlieren, war eine Charakterisierung der Fluoreszenz-markierten Wnt-Moleküle enorm wichtig. Vor allem Cysteine in der Markierung verändern offensichtlich das Muster der Disulfidbrücken im C-Terminalen Indexfinger (BS2) und vermindern somit die Affinität zu Fz Rezeptoren deutlich (MacDonald et al., 2014).

Sowohl Wnt5a-eGFP, als auch Wnt11-eGFP aktivieren den ATF2 Luziferase Reporter vergleichbar mit dem jeweiligen nicht Fluoreszenz-markierten Wnt-Molekül. Darüber hinaus war Wnt5a-eGFP *in vivo* funktional, da es im Elongationsassay endogenes Wnt5a ersetzen konnte. Aus diesem Grund konnte es für die weitere Analyse eingesetzt werden. Der *in vivo* Funktionalitätstest für Wnt11-eGFP steht noch aus. Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals aktive Fluorophore-markierte nicht-kanonische Wnt-Moleküle vorgestellt. Damit steht neben GFP-Wnt8 (Rhinn et al., 2005) und Wnt2b-eGFP (Holzer et

al., 2012) insgesamt vier biologisch aktive Wnt-Moleküle für die Analyse des Wnt-Signalnetzwerkes zur Verfügung.

Erste Analysen der Fluoreszenz-markierten nicht-kanonischen Wnt-Moleküle zeigten, dass Wnt5a-eGFP in der Zellmembran der Zellen der dorsalen Marginalzone in Cluster lokalisiert ist, wohingegen Wnt11-eGFP homogen über die Plasmamembran verteilt vorliegt. Die Membranlokalisation und die damit verbundene Clusterbildung von Wnt5a-eGFP war Lef abhängig. Damit könnte eine der Funktionen des kanonischen Zweiges des Wnt-Signalnetzwerkes während der Gastrulation darin liegen, die subzelluläre Lokalisation des nicht-kanonischen Liganden xWnt5a zu modulieren. Im Microarray wurden Bestandteile der Caveolae als Lef abhängige Zielgene identifiziert. Darüber hinaus konnte eine Kolokalisation von Wnt5a-eGFP und Caveolin1 in Zellkultur nachgewiesen werden (Dietmar Gradl, persönliche Mitteilung). Unklar ist noch ob sich diese Kolokalisation auch in Explantaten der dorsalen Marginalzone bestätigen lässt. Kolokalisiert Wnt5a-eGFP tatsächlich mit Caveolin, könnten Caveolae eine Plattform für Wnt5a vermittelte Signaltransduktion darstellen oder eine Voraussetzung dafür sein. Dies würde auf eine Ähnlichkeit zum kanonischen Wnt-Signalweg deuten, wo die Aktivierung der Signalkaskade Caveolin abhängig ist (Yamamoto et al., 2008). Die darauffolgende Internalisierung ist Rab8B abhängig (Demir et al., 2013). Allerdings wurde gezeigt, dass Wnt5a die Clathrin abhängige Internalisierung von Ror2 steuert (O'Connell et al., 2010), wobei unklar ist, ob dies für die Aktivierung des Signalweges bedeutsam ist, oder wie die Clathrin abhängige Internalisierung von Lrp6 die Signalkaskade inhibiert (Yamamoto et al., 2008).

Während der konvergenten Extension werden Fz7 und Dsh Clathrin abhängig internalisiert (Kim et al., 2008). Dabei fungieren  $\beta$ -Arrestine als Adaptorproteine, um Rezeptoren für die Clathrin vermittelte Endocytose zu markieren (Luttrell and Lefkowitz, 2002).  $\beta$ -Arrestin 2 kooperiert mit der Rezeptor Tyrosinkinase Ryk, um die Wnt11 induzierte Endocytose von Fz7 und Dsh zu realisieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cav-1 und Cav-2 nicht mit dem internalisierten Dsh in den Zellen der dorsalen Marginalzone kolokalisiert (Kim et al., 2008). Ob die Internalisierung des gesamten Komplexes wichtig für die Signalwegaktivierung ist, bleibt spekulativ.

#### **6.4. Wnt5a bindet *in vivo* an Ror2**

Wnt5a rekrutiert Ror2 in distinkte Cluster an der Membran. Sowohl in Zebrafisch, als auch in *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Wnt11 konzentrationsabhängig zu einer Clusterbildung von Fz7 führt, in diese Cluster werden auch Dsh und Wnt11 rekrutiert (Kim et al., 2008; Witzel et al., 2006). Durch eine

eventuelle Oligomerisierung der Wnt-Liganden, könnten Cluster aus mehreren Liganden, Rezeptoren und Korezeptoren gebildet werden. In Zellkultur induziert Wnt5a die Bildung von Ror2/Fz Komplexen, die wichtig für die Dsh Polymerisierung und die Aktivierung des JNK Signalweges sind (Nishita et al., 2010). Durch die Clusterung kommt es zu einer räumlichen Konzentrierung der Signalwegkomponenten und somit zu einer punktuellen Potenzierung des Signales. Trotzdem kann dies nicht mit der beschriebenen Signalosombildung während der kanonischen Signalweiterleitung verglichen werden (Bilic et al., 2007).

Interessanterweise bildet das überexprimierte Wnt5a alleine bereits Cluster, Ror2 dagegen nicht. Ror2 bildet erst Cluster, wenn es mit xWnt5a koexprimiert wird. Dem können mehrere Ursachen zugrunde liegen. Wird angenommen, dass zur Clusterbildung ausschließlich ein Komplex von Wnt5a und Ror2 in der Lage ist, so muss Wnt5a der limitierende Faktor für die Clusterbildung sein. In diesem Fall müsste überexprimiertes Wnt5a endogenes Ror2 rekrutieren und mit diesem einen Komplex bilden. In diesem Szenario läge Ror2 entweder in großem Überschuss vor oder die Koexpression von Wnt5a und Ror2 führt zu mehr oder größeren Clustern als die Expression des Liganden alleine. Jedoch kann diese Hypothese anhand der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Aus diesem Grund ist ein anderes Szenario zu bevorzugen, bei dem Wnt5a unabhängig von Ror2 Cluster bildet und Wnt5a Ror2 in die bereits vorhandenen Cluster rekrutiert. Die Voraussetzung für eine Rekrutierung von Ror2 ist, dass Ror2 und Wnt5a unabhängig voneinander an der Zellmembran vorliegen und Wnt5a unabhängig von Ror2 Komplexe bildet. Die Membranlokalisation von Wnt5a kann über die Lipidverankerung der Palmitoleinsäure oder durch das Binden von Wnt5a an Fz Rezeptoren realisiert werden. Eine Ror2 unabhängige Clusterbildung könnte durch eine Oligomerisierung der Wnt Moleküle oder von Wnt/Fz Komplexen erreicht werden (Cha et al., 2008; Janda et al., 2012). Die potentielle Oberfläche für diese Clusterbildung von Wnt/Fz Dimeren ist die in der Kristallstruktur identifizierte Pseudostelle 3 (Janda et al., 2012).

Eine direkte Bindung zwischen Ror2 und Wnt5a konnte in den Bereichen geringerer Fluoreszenz mittels der 2c2f line-scanning FCS Methode zwischen den Cluster nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Fluorophor Dichte sind die Cluster selbst für diese Methode unzugänglich. Die Konzentration von Ligand und Rezeptor zwischen den hellen Punkten an der Membran war dagegen relativ gering. Die Komplexbildung zwischen Ligand und Rezeptor war aufgrund der Kreuzkorrelationskurve deutlich. Nicht nur die Kreuzkorrelation der Fluktuationen von Ligand und Rezeptor zeigten, dass sich die beiden Proteine gemeinsam bewegen, auch der geringere Diffusionskoeffizient zeigt an,

dass beide Moleküle, wenn sie gemeinsam diffundieren Bestandteil eines größeren Komplexes sind (Machan and Wohland, 2014). Mit dem gleichen methodischen Ansatz konnte in Zebrafisch Embryonen eine Bindung zwischen dem Ligand Fgfr1 und dem Rezeptor Fgf8 nachgewiesen werden (Ries et al., 2009).

### **6.5. Adhäsionsmodulationskomplexe modulieren die Adhäsion während der konvergenten Extension**

Die dynamische Regulation der Cadherin vermittelten Adhäsion an der Zelloberfläche ist Voraussetzung für morphologische Prozesse, wie Zellsortierung und Zellbewegungen (Gumbiner, 2005), so auch während der konvergenten Extension. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass während der konvergenten Extension die C-Cadherin vermittelte Adhäsion durch die Bildung zweier unterschiedlicher Adhäsionsmodulationskomplexe, AMCP und AMCC reduziert wird. Wobei AMCP aus Fz7 und PAPC besteht und AMCC aus Fz7 und C-Cadherin. Die Bildung eines trimären Komplexes konnte ausgeschlossen werden, da C-Cadherin zu einem geringeren Anteil präzipitiert wird, wenn PAPC ebenfalls überexprimiert wird. Die Möglichkeit für die Bildung eines trimären Komplexes jedoch würde bestehen, da PAPC an den N-Terminus von Fz7 bindet wohingegen C-Cadherin an den C-Terminus. Somit sind die beiden Interaktionsdomänen räumlich voneinander getrennt (Kraft et al., 2012).

Die Überexpression von PAPC, Fz7 und Wnt11 verminderte die C-Cadherin vermittelte Adhäsion. Bereits die alleinige Überexpression von PAPC und Fz7 reduzierte die C-Cadherin vermittelte Adhäsion. Dabei konnten frühere Publikationen bestätigt werden, die zeigten, dass sowohl PAPC, als auch Fz7, die C-Cadherin vermittelte Adhäsion im Adhäsionsassay vermindern (Chen and Gumbiner, 2006; Medina et al., 2000). Durch den Knockdown von PAPC wird die C-Cadherin vermittelte Adhäsion in der dorsalen Marginalzone erhöht, daher ist PAPC in der dorsalen Marginalzone tatsächlich für die Verminderung der C-Cadherin Adhäsion verantwortlich (Chen and Gumbiner, 2006). Somit scheint die Modulation der C-Cadherin vermittelten Adhäsion bei der Realisation der konvergenten Extension von Relevanz zu sein.

Für die Vermittlung des PAPC Effekts auf die C-Cadherin Adhäsion reicht die extrazelluläre Domäne von PAPC aus (Chen and Gumbiner, 2006), dies deutet darauf hin, dass kleine GTPasen an der Modulation der Adhäsion während der konvergenten Extension nicht beteiligt sind. Somit hat PAPC während der konvergenten Extension eine zweite unabhängige Funktion, die Aktivierung von RhoA wird benötigt für die Etablierung der bipolaren Zellmorphologie des dorsalen Mesoderms und die Gewebetrennung (Medina et al., 2004; Unterseher et al., 2004).

Chen and Gumbiner (2006) haben einen alleinigen Effekt von Fz7 auf die Verminderung der Adhäsion anhand ihrer Fz7 Knockdown Experimente im Adhäsionsassay und Zellsortierungsassay ausgeschlossen. In der animalen Kappe ist wenig Fz7 vorhanden und daher kann eine Veränderung der Adhäsion unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Darüber hinaus wurden die Experimente mit einem dominant negativen Fz7 Konstrukt durchgeführt, dem die cytoplasmatische Domäne fehlt. C-Cadherin und Fz7 interagieren aber über die cytoplasmatische Domäne von Fz7, somit können dominant negatives Fz7 und C-Cadherin keinen AMCC ausbilden (Kraft et al., 2012) und somit kann auch die C-Cadherin Adhäsion nicht moduliert werden.

Die Überexpression von PAPC, Fz7 und Wnt11 führte zu einer Zellsortierung (Kraft et al., 2012), aufgrund der Verminderung der C-Cadherin vermittelten Adhäsion. Der Zelladhäsionsassay gibt keine Auskunft darüber, ob die Wnt11 Überexpression einen zusätzlichen Effekt auf die Zelladhäsion ausübt, oder ob der beobachtete Effekt bei Überexpression von PAPC, Fz7 und Wnt11 ein additiver Effekt von PAPC und Fz7 ist. PAPC, Fz7 und Wnt11 zeigten einen stärkeren Einfluss auf die Zellsortierung im Vergleich zu einer Überexpression von PAPC und Fz7 (Kraft et al., 2012), daher ist anzunehmen, dass Wnt11 einen zusätzlichen Einfluss auf die Verminderung der C-Cadherin vermittelten Adhäsion ausübt.

In dieser Arbeit konnte die Verringerung der Zelladhäsion aufgrund der Dynamin vermittelten Internalisierung von C-Cadherin (Karaulanov et al., 2009; Ogata et al., 2007) nicht bestätigt werden. Vielmehr konnten die Ergebnisse von Chen and Gumbiner (2006) nachgewiesen werden, die zeigten dass C-Cadherin nicht internalisiert wird. Darüber hinaus wird C-Cadherin während der Gastrulation nicht über das polarisierte Mikrotubuli- oder Aktincytoskelett an die Membran transportiert, um dort punktuell Adhärenzverbindungen einzugehen. Dies spricht aber nicht gegen eine punktuelle Bildung der AMCs an der Membran, um dort an distinkten Stellen die Adhäsion zu modulieren und somit die Zellmigration zu ermöglichen. Die Keimbandverlängerung von *Drosophila* wird wie die konvergente Extension im dorsalen Mesoderm von *Xenopus*, unter anderem durch die Verkürzung der vertikalen Zellkontakte realisiert (Irvine and Wieschaus, 1994; Shindo and Wallingford, 2014). Dabei akkumuliert DE-Cadherin (*Drosophila* epitheliales Cadherin) in den horizontalen Zellkontakten, wobei es aus den vertikalen Zellkontakten mittels Endozytose ausgeschlossen wird (Blankenship et al., 2006; Levayer et al., 2011). Durch die verminderte Zelladhäsion an den vertikalen Zellkontakten, wird die Verkürzung dieser Zellkontakte ermöglicht und daher die Zellinterkalation. Während der konvergenten Extension des dorsalen Mesoderms könnte die Verminderung der Adhäsion durch die Bildung der AMCs an der vertikalen Membran realisiert werden.

Die Komplexbindung wird zwar nicht durch Wnt11 induziert, trotzdem ist dieses wichtig für die Bildung der AMCs. Bei der Bildung des AMCPs sind Wnt11 und Fz7 für die Stabilisierung von P APC an der Membran verantwortlich. Somit wird eine Clathrin-vermittelte Endozytose von P APC unterbunden (Kraft et al., 2012). Durch die Stabilisierung von P APC an der Membran, wird vermutlich die Oligomerisierung von P APC erleichtert. Die Oligomerisierung von P APC ist Voraussetzung für den Einfluss von P APC auf Zellsortierung und C-Cadherin vermittelte Adhäsion (Chen et al., 2007). Die Bildung des AMCCs bewirkt, dass weniger C-Cadherin *cis* Dimere an der Membran gebildet werden und dadurch die Adhäsionsstärke verringert wird. Die *cis* Clusterung von C-Cadherin bestimmt die Adhäsionsstärke (Yap et al., 1997). Durch weniger C-Cadherin *cis* Dimere während der konvergenten Extension, wird die Adhäsion vermindert und die Zellen des dorsalen Mesoderms können migrieren.

### 6.5.1 Fibronectinpolymerisation ist Mikrotubuli abhängig

Im Gegensatz zu *Drosophila* konnte bisher in *Xenopus* keine polare Lokalisation der Proteine der planaren Zellpolarität während der konvergenten Extension gezeigt werden, auch nicht in der vorliegenden Arbeit. Kürzlich wurde eine polare Lokalisation von Rab11 in der Neuralplatte von *Xenopus* nachgewiesen. Diese polare Lokalisation wird durch den PCP Signalweg reguliert (Ossipova et al., 2014).

Ein Grund warum in *Xenopus* noch keine polare Lokalisation der PCP Proteine detektiert wurde, ist sicherlich, dass die meisten Studien auf einer Überexpression der PCP Proteine beruhen. Somit sind die PCP Proteine in nicht-physiologischen Konzentrationen vorhanden und können dadurch ihre typische polare Lokalisation nicht mehr ausbilden. Aus diesem Grund wäre es besser das endogene Protein mittels Antikörperfärbung nachzuweisen. Darüber hinaus ist die konvergente Extension ein dynamischer Prozess. Die Zellen migrieren aktiv und verändern laufend ihre Zell-Zell Kontakte. Aus diesem Grund kann es schwierig sein ein transient polar lokalisiertes Molekül in einer Momentaufnahme festzuhalten. So ist auch die Dsh Lokalisation in mesodermalen Zebrafisch Zellen variabel, da diese eine Vielzahl morphologischer Änderungen durchmachen (Yin et al., 2008).

Die Überexpression von Prickle (Pk) alleine zeigte eine gleichmäßige Verteilung über das ganze Cytoplasma. Wohingegen eine gemeinsame Überexpression mit Strabismus (Stbm) in der animalen Kappe zu einer punktförmigen Lokalisation an der Membran führte (Jenny et al., 2003). Dies zeigt, dass Pk Stbm benötigt, um an die Membran rekrutiert zu werden. Aus diesem Grund würde sich eine Analyse der Lokalisation des Komplexes aus Pk und Stbm während der Gastrulation lohnen. Da keine polar lokalisierten PCP Proteine

identifiziert werden konnten, ließ sich mit diesem Ansatz der molekulare Mechanismus wie Wnt11 die Polarität etabliert nicht weiter untersuchen.

Stattdessen wurde analysiert, inwieweit polarer Transport an Mikrotubuli der Wnt11 abhängigen Etablierung der Bipolarität zugrunde liegt, denn auch die Etablierung der Bipolarität des Mikrotubulocytoskeletts ist Wnt11 abhängig (Rigo-Watermeier et al., 2012). Im Flügel von *Drosophila* wurde Fz über das Mikrotubulocytoskelett distal in der Zelle lokalisiert (Shimada et al., 2006). In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Wnt2b in der Wnt produzierenden Zelle entlang des Mikrotubulocytoskeletts transportiert wird, was wichtig für dessen Sekretion war (Holzer et al., 2012). Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der Transport von Wnt5a und Wnt11 während der Gastrulation nicht Mikrotubuli abhängig ist. Auch  $\beta$ -Catenin und der Fibronektinrezeptor  $\beta$ 1-Integrin wurden während der Gastrulation nicht über das Mikrotubulocytoskelett an die Membran transportiert.

Aufgrund der Zerstörung des Mikrotubulocytoskeletts durch Nocodazol während der frühen Gastrulation, war die Fibrillogenese von Fibronektin im extrazellulären Raum gestört. Die Fibronektinpolymerisation ist nicht nur wichtig für die konvergente Extension, sondern auch für die Wnt/PCP Signalkaskade (Davidson et al., 2006; Munoz et al., 2006). Bei der Überexpression von dominant negativem Wnt11 war ebenfalls die Fibrillogenese von Fibronektin gestört. Dies konnte durch die Koexpression von Dsh und den kleinen GTPasen Rho und Rac gerettet werden (Dzamba et al., 2009). Somit ist nicht nur der Wnt/PCP Signalweg für die Fibrillogenese von Fibronektin wichtig, sondern auch ein intaktes Mikrotubulocytoskelett. Dieses wiederum wird durch Wnt11 polarisiert. Daraus kann geschlossen werden, dass für die Regulation der Fibronektinpolymerisation der Transport von Wnt/PCP Komponenten über das Mikrotubulocytoskelett, während der Gastrulation, benötigt werden. Darüber hinaus agiert Fibronektin oberhalb des Wnt/PCP Signalweges. Dabei unterstützt Fibronektin die Bindung von Syndekan 4 an Fz7, woraufhin Dsh an die Membran rekrutiert wird (Munoz et al., 2006). Interessanterweise war Fibronektin eines der ersten Wnt-Zielgene, von denen gezeigt wurde, dass es direkt über den kanonischen Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes reguliert wird (Gradl et al., 1999). Dies unterstreicht, wie umfassend die unterschiedlichen Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes gerade während der Gastrulation kooperieren, um die komplexen morphogenetischen Prozesse zu koordinieren.

## 6.6. Der C-Terminus von Wnt8a ist entscheidend für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges

Durch die Analyse chimärer Konstrukte konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus wichtig für die Entscheidung ist, ob der kanonische Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes aktiviert wird oder nicht. Die Entscheidung ob nicht-kanonische Zweige aktiviert werden, ist dagegen im N-Terminalen Bereich verankert. Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Domänen in den Wnt-Proteinen wurden chimäre Konstrukte bewusst Deletionsmutanten vorgezogen, da die für die Etablierung der Tertiärstruktur verantwortlichen hochkonservierten Cysteine über die gesamten Wnt Moleküle verteilt sind. Fehlt auch nur ein Teil dieser Cysteine wird die Faltung beeinträchtigt und damit auch die Funktionalität. Erst kürzlich wurde dies durch gezielte Deletionen einzelner Cysteine bestätigt (MacDonald et al., 2014). In den Fusionskonstrukten sind alle Domänen vorhanden und damit sind die Chimären theoretisch dazu in der Lage ihre Fz Rezeptoren zu binden. Die Funktionalität der chimären Konstrukte wurde *in vitro* und *in vivo* bestätigt.

Für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges reicht der C-Terminus von Wnt8a aus, um das nicht kanonische Wnt11 in eine kanonische Wnt11/8a Chimäre umzuwandeln. Allerdings werden für die Induktion einer sekundären Achse höhere Dosen benötigt als bei wildtypischem Wnt8a. Der N-Terminus von Wnt8a fusioniert mit dem C-Terminus von Wnt11 konnte dagegen keine sekundäre Achse induzieren. Somit ist der C-Terminus zwar ausschlaggebend, um den kanonischen Signalweg zu aktivieren, wird dabei aber auch von Strukturelementen im N-Terminus unterstützt. Der C-Terminus umfasst dabei die BS2 und die nicht konservierte Linkerregion von Wnt8a. Die BS2 ist in Wnt-Moleküle hoch konserviert. Wohingegen die Interaktionsstelle in der Fz CRD Domäne nicht hoch konserviert ist (Janda et al., 2012). Daher könnten an der Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges unterschiedliche Fz Subtypen beteiligt sein, womöglich aufgrund unterschiedlicher Affinitäten. Das mini Wnt8a (C-Terminale 90 Aminosäuren) hat genau wie das vollständige Wnt8a eine höhere Affinität zu Fz8 als zu Fz5 (Hsieh et al., 1999; Janda et al., 2012). Daraus kann geschlossen werden, dass die Bindungsentscheidung hauptsächlich von der BS2 abhängt und diese auch unabhängig der BS1 an Fz-CRD binden kann. Andererseits sind die einzelnen Fz Moleküle auch nicht distinkten Zweigen des Wnt-Signalnetzwerkes zuordenbar (Medina et al., 2000). Darüber hinaus beinhaltet dieser C-Terminus ebenfalls die nicht-konservierte Linkerregion. Diese Linkerregion vermittelt die Bindung der Wnt Moleküle an Lrp6 (Chu et al., 2013). Obwohl der Fz Rezeptor für die Bindung von Wnt hinreichend ist, wird für die volle Aktivierung des kanonischen Signalweges in Vertebraten der Korezeptor Lrp5 oder

Lrp6 benötigt. Dabei binden die Wnt-Liganden nicht nur an die Fz Rezeptoren, sondern auch an den N-Terminus der Lrp Korezeptoren und können damit die Bildung eines Fz-Lrp-Wnt Komplexes induzieren oder stabilisieren (Tamai et al., 2000). Inwiefern nun die Bindung eines spezifischen Fz Subtyps oder die Bindung an Lrp zur Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade beiträgt, kann mit dieser Chimäre nicht bestimmt werden. Wahrscheinlich werden beide Faktoren dazu beitragen. Es wäre interessant eine Chimäre zu erstellen, bei der ausschließlich die Linkerregion ausgetauscht wird, um den Einfluss von Lrp6 zu untersuchen. Wobei die Linkerregion nicht die einzige Bindestelle für Lrp6 sein könnte, da die Affinität der Linkerregion im Vergleich zum vollständigen Lrp6 zu Wnt3a geringer ist (Chu et al., 2013).

Der C-Terminus von Wnt11 kann die nicht-kanonische Signalkaskade nicht aktivieren. Dagegen zeigte der N-Terminus von Wnt11 eine geringe Aktivierung nicht-kanonischer Signalkaskaden, sowohl im ATF2 Luziferase Reporterassay, als auch im Elongationsassay. Dabei war der Effekt der Wnt11/8a Chimäre im Elongationsassay im Vergleich zum kompletten Wnt11 gering. Damit wurden die Ergebnisse von Du et al. (1995) in der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigt. Du et al. (1995) zeigten mit Hilfe von Chimären zwischen Wnt8a und Wnt5a, dass der C-Terminus für die Aktivierung der kanonischen, aber auch der nicht-kanonischen Signalkaskade ausreicht. Die Analyse verschiedener Chimären ergab, dass die Aktivierung der kanonischen Signalkaskade mit der Wnt8a Linkerregion effektiver war, als bei der Chimäre mit ausschließlich der BS2 von Wnt8a. Die Analyse nicht-kanonischer Signalwege beschränkte sich auf den Vergleich der Phänotypen mit denen Wnt5a injizierter Embryonen. Die Analyse der nicht-kanonischen Signalkaskade war in der vorliegenden Arbeit deutlich detaillierter, zumal der Einfluss des N-Terminus bei den Chimären der nicht-kanonischen Wnts deutlich bestätigt wurde.

### **6.7. Die Spezifität der nicht-kanonischen Wnts ist im N-Terminus verankert**

Die Analyse der nicht-kanonischen Chimären aus Wnt5a und Wnt11 hat ergeben, dass die Spezifität um die BS1 liegt und in unterschiedlichen Bereichen der PS3. In der PS3 ist die Spezifität für Wnt5a in der Region um die PS3-3 (Aminosäure 180-220) verankert und für Wnt11 in der Region um die PS3-2 und PS3-1 (Aminosäure 1-153). Dabei muss beachtet werden, dass nicht Domänen gezielt ausgetauscht wurden, sondern verschiedene Regionen, die die unterschiedlichen Domänen beinhalten, über eine Fusionen miteinander kombiniert wurden.

Dabei ist es unwahrscheinlich, dass die Spezifität durch die BS1 bestimmt wird, denn sie ist hoch konserviert und darüber hinaus die Interaktionsstelle mit einer hoch-konservierten Region in der Fz-CRD. Vielmehr scheinen die nicht konservierten Bereiche um die BS1

dafür verantwortlich zu sein. Aufgrund der Analyse des mini Wnt8 kann geschlossen werden, dass an der nicht-kanonischen Spezifizierung nicht die Bindung unterschiedlicher Fz Subtypen beteiligt ist (Janda et al., 2012). Mit Hilfe von Rekonstitutionsexperimenten sollten sich die Bereiche, die für die Spezifizierung verantwortlich sind besser eingrenzen lassen.

Die in der PS3 verankerte Spezifität kann für Wnt5a und Wnt11 auf unterschiedliche Regionen eingegrenzt werden. Dass tatsächlich in der PS3 Unterschiede zwischen Wnt5a und Wnt11 verankert sind, ist insofern weniger überraschend als es sich hier um eine nicht-konservierte Region handelt. Dass die Spezifität für Wnt5a und Wnt11 nicht in der gleichen Region verankert ist, deutet darauf hin, dass unterschiedliche Rezeptoren oder Mechanismen an der Unterscheidung beteiligt sind. Die PS3 ist eine putative Oligomerisierungsstelle (Janda et al., 2012). Daher könnten sich Wnt5a und Wnt11 bezüglich der Oligomerisierung unterscheiden. Bei der Aufreinigung von Wnt8 bildeten sich große Komplexe im Medium (Dann et al., 2001), wohingegen gezeigt wurde, dass die aktive Form von Wnt3a ein Monomer ist (Willert et al., 2003). Tatsächlich konnte eine Homodimerisierung von Wnt5a, Wnt8 und Wnt11 in *Xenopus* nachgewiesen werden. Die Wnt5a und Wnt11 Oligomere bilden wiederum über Cysteinbrückenbindungen Heterodimere (Cha et al., 2008). Die Aufklärung der Kristallstruktur bietet Zweifel an der Oligomerisierung über Disulfidbrücken, denn alle Cysteine waren an der Etablierung der Wnt Struktur beteiligt und kein freies Cystein für eine mögliche Interaktion vorhanden. Wobei die Entschlüsselung der Kristallstruktur Hinweise auf eine übergeordnete Wnt8/Fz8-CRD Struktur gab. Dabei handelte es sich nicht um ein symmetrisches Dimer, sondern um asymmetrische Wnt/Fz Dimere. Über die PS3 interagiert ein Wnt/Fz Dimer mit der WntBS1/CRD Interaktionsstelle eines anderen binären Komplexes. Wobei die Interaktionsstellen auf der Fz Seite hoch konserviert sind, sind sie in den Wnt Molekülen dagegen nicht-konserviert (Janda et al., 2012). Dies deutet auf eine übergeordnete Struktur hin, bei der vermutlich auch Korezeptoren beteiligt sind. Durch die Bildung einer übergeordneten Struktur, könnten verschiedene Fz Rezeptoren und Korezeptoren in einem Cluster sitzen und die Antwort spezifizieren. Möglicherweise bietet dies das Modell für die in der Arbeit Fluoreszenz-mikroskopisch beobachteten Cluster von Wnt5a und Ror2 an der Membran.

Momentan kann von einer Domäne in der PS3 oder BS1 nicht auf den Einfluss eines bestimmten Korezeptors zurück geschlossen werden, da ausschließlich die Bindestelle von Ror2 bekannt ist. Ror2 interagiert mit den Wnt Molekülen über seine CRD Domäne (Oishi et al., 2003) und damit über eine ähnliche Domäne wie die Fz Rezeptoren. Ryk besitzt zwar eine WIF Domäne, aber bisher ist die genaue Bindestelle im Wnt noch nicht

bekannt. Es wird spekuliert, dass die Interaktion mit dem Daumen und Zeigefinger der Wnt-Moleküle stattfindet (Banyai et al., 2012). PTK7 ist wichtig für die konvergente Extension, interagiert aber weder mit Wnt5a, noch mit Wnt11. Wohingegen die Interaktion des kanonischen Wnt8a mit PTK7 nicht direkt ist, sondern über Fz vermittelt wird (Peradziryi et al., 2011; Peradziryi et al., 2012). Durch eine mögliche Oligomerisierung, könnten Fz und die Korezeptoren in einem Komplex sitzen, da es eher unwahrscheinlich scheint, dass die Wnt-Liganden mit ihrem Daumen und Zeigefinger mehrere Rezeptoren gleichzeitig binden.

Bisher konnte weder für Ror2, Ryk, Crescent oder Glypican 4 gezeigt werden, dass diese mit einem der nicht-kanonischen Wnt-Liganden bevorzugt interagieren (Hikasa et al., 2002; Kim et al., 2008; Ohkawara et al., 2003; Shibata et al., 2005). Wobei die entsprechenden Koimmunopräzipitationen entweder in Lysaten aus ganzen Embryonen oder aus HEK293 Zellen durchgeführt wurden. Um die Kontext Abhängigkeit mit einzubeziehen, sollten die Koimmunopräzipitationen mit Lysaten dorsaler Marginalzonen durchgeführt werden. Diese Kontext Abhängigkeit spielt gerade bei den nicht-kanonischen Zweigen des Wnt-Signalnetzwerkes eine entscheidende Rolle. So wurde für Crescent gezeigt, dass es im Neuroektoderm den negativen Einfluss von Wnt11 auf die konvergente Extension aufheben kann, wohingegen es im dorsalen Mesoderm den Effekt von Wnt11 verstärkt (Shibata et al., 2005). Die Spezifität von Wnt5a und Wnt11 scheint insgesamt wohl eher nicht auf einem Rezeptor und dem dazugehörigen Korezeptor zu beruhen, sondern vielmehr Kontext abhängig in einem Set von Rezeptoren und Korezeptoren.

Darüber hinaus war es bisher aufwändig und methodisch schwierig die Affinität eines Liganden zu verschiedenen Rezeptoren zu bestimmen und dies quantitativ erfassbar zu machen. Durch die stetige Weiterentwicklung der Mikroskopietechnik scheint dies durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie jetzt möglich. In Kollaboration mit René Dörlich vom Institut für Angewandte Physik (KIT) wurde mit den ersten Messungen an der dorsalen Marginalzone ein wichtiger Schritt in diese Richtung gemacht.

Es könnte auch eine Kontextabhängigkeit dadurch geschaffen werden, dass Wnt5a und Wnt11 in unterschiedlichen Domänen während der Gastrulation exprimiert werden. Wnt5a wird in den tiefen Schichten des Ektoderms exprimiert (Schambony and Wedlich, 2007), wohingegen Wnt11 im posterioren Mesoderm während der Gastrulation exprimiert wird (Tada and Smith, 2000). Trotzdem handelt es sich bei beiden Wnts um Morphogene, die nicht an ihrem Expressionsort verbleiben. Für Wnt5a wurde gezeigt, dass es die Expression von PAPC im involutierenden Mesoderm moduliert (Schambony and Wedlich, 2007). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es während der

konvergenten Extension einen Mechanismus geben muss, der das Wnt5a und Wnt11 Signal spezifiziert.

Zur Spezifizierung werden sicherlich verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Wobei dies nicht der einzige Mechanismus sein muss. Auch eine polare Lokalisation von bestimmten Proteinen spielt sicherlich eine Rolle. Wie die polare Lokalisation und die Signalwegaktivierung in Einklang gebracht werden können, ist bislang noch unklar. In Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass lokal an den Zellkontakten Wnt11, Fz7, Dsh und das atypische Cadherin Flamingo akkumulieren und die Zelladhäsion lokal erhöhen. Dies ist unabhängig von den kleinen GTPasen RhoA und Rok2 (Witzel et al., 2006).

### **6.8. Die Analyse einzelner Mutationen zur Feststellung der Spezifität ist schwer zu realisieren**

Die Analyse der chimären Konstrukte zeigte, dass die Spezifität nicht eindeutig auf eine distinkte Region eingegrenzt werden kann. Auch die Bindung von Lrp6 an Wnt zeigte, dass die Interaktion beider nicht auf eine Domäne im Wnt beschränkt ist, sondern auf mehrere Aminosäuren in der Linkerregion (Chu et al., 2013). Darüber hinaus muss beachtet werden, dass es sich um eine komplexe Proteinfaltung handelt und vorher erst analysiert werden muss, welche Regionen in der 3D Struktur benachbart liegen. Daher wird es schwierig, Aminosäuren zu bestimmen und zu mutieren ohne vorher eine Strukturanalyse durchzuführen, wie zum Beispiel bei der Analyse der Lrp6 Bindestelle. Aus diesem Grund ist dieser Ansatz sehr schwer zu realisieren und vielleicht erst wieder überlegenswert, wenn die Domänen durch Rekonstitutionsexperimente besser eingegrenzt sind. Darüber hinaus müsste man auch bei einem Austausch sicher stellen, dass die 3D Struktur intakt bleibt.

### **6.9. Identifikation von Wnt5a, Wnt11 und Lef Zielgenen**

Während vom Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg in den letzten 15 Jahren zahlreiche direkte Zielgene beschrieben wurden (zusammengefasst auf der Wnt Homepage), ist über die Zielgenregulation durch nicht-kanonische Wnt-Moleküle bisher sehr wenig bekannt. Der Transkriptionsfaktor ATF2, wird durch die nicht-kanonische Signalkaskade aktiviert, wodurch zum Beispiel PAPC reguliert wird (Ohkawara and Niehrs, 2011; Schambony and Wedlich, 2007). Darüber hinaus konnte Pescadillo, das unter anderem an der Augenentwicklung beteiligt ist, als Zielgen von Wnt4 identifiziert werden (Gessert et al., 2007).

Die Mikroarrayanalyse der vorliegenden Arbeit bestätigte diesen Unterschied in der Zielgenregulation kanonischer/nicht-kanonischer Signalwege insofern, als auch durch Veränderungen des kanonischen Wnt-Signalweges (Knockdown des

Transkriptionsfaktors Lef) deutlich mehr Gene betroffen waren als bei Manipulation der nicht-kanonischen Signalwege. Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege sind nicht aufgrund ihrer Regulation der Genexpression bekannt, sondern vielmehr aufgrund der Modulation der Aktivität der kleinen GTPasen, was die Etablierung der Polarität, als auch die Zellmigration zur Folge hat. Wohingegen Lef als Transkriptionsfaktor des kanonischen Wnt-Signalweges verantwortlich ist für die Änderung der Transkription, um die induktiven Prozesse der kanonischen Wnt-Signalkaskade zu realisieren (Angers and Moon, 2009; van Amerongen, 2012).

Die Regulation der PAPC Expression durch nicht-kanonische Zweige des Wnt-Signalnetzwerkes konnte im Microarray nicht bestätigt werden, da weder der Knockdown von Wnt5a und Wnt11, noch die Überexpression von Wnt11 einen signifikanten Einfluss auf die PAPC Expression ausübte. Bei einer relativen Änderung kleiner zwei, nimmt die Korrelation zwischen Microarray und qRT PCR ab (Morey et al., 2006). Sowohl in der qRT PCR, als auch im Microarray ist die relative Änderung der PAPC Expression kleiner zwei, im Microarray sogar deutlich kleiner zwei. Für die Bestätigung der Microarray Zielgene wird häufig die qRT PCR eingesetzt (Hooker et al., 2012; Koster et al., 2010). Dabei sind keinerlei Kriterien definiert, wie eine bessere Reproduzierbarkeit für qRT PCR Daten im Microarray erreicht werden kann. In der Microarray Analyse des Transkriptionsfaktors pitx3 konnte ebenfalls keines der schon publizierten Zielgene verifiziert werden (Hooker et al., 2012). Über die Sensitivität der qRT PCR im Gegensatz zum Microarray kann anhand eines untersuchten Zielgens keine Aussage getroffen werden. In mehreren Fällen ist jedoch eine Diskrepanz beider Methoden bekannt (Hooker et al., 2012; Morey et al., 2006). Aus diesem Grund ist eine unabhängige Validierung der Zielgene des Microarrays erforderlich.

Überraschend war die geringe Überlappung zum Einen zwischen Wnt5a und Wnt11 regulierten Genen, zum Anderen zwischen Wnt11 Morpholino und Wnt11 mRNA betroffenen Genen. Ersteres wäre einfach damit zu erklären, dass Wnt5a und Wnt11 unterschiedliche Aufgaben in der Gastrulation übernehmen, also ein nicht-überlappendes Set an Wnt5a und Wnt11 regulierten Genen erwartet wurde. Tatsächlich könnte sich unter den Zielgenen der eine oder andere Kandidat befinden, der die Wnt Subtyp spezifische Regulation der konvergenten Extension vermittelt. Solange die putativen Gene nicht in einem unabhängigen System verifiziert sind, bleibt dies aber Spekulation. Dass sich kaum überlappende Kandidatengene in der Wnt11 Überexpression und Knockdown Situation fanden, war insofern überraschend als endogenes Wnt und überexprimiertes Wnt die selbe Auswirkung hatten, es unterstreicht dagegen, dass das überexprimierte Wnt nicht

als dominant negatives Konstrukt wirkt, denn sonst wäre eine deutlich größere Überlappung der Kandidatengene zu erwarten gewesen.

Tatsächlich bleibt es bei der Zielgenanalyse in dem vorliegenden Ansatz unklar, inwieweit es sich um direkte oder indirekte Zielgene handelt. Für Lef ist diese Problematik offensichtlich, denn hier wird auch die Transkription von Transkriptionsfaktoren wie siamois reguliert (Brannon et al., 1997). Dies soll in weiterführenden Arbeiten, zum Beispiel in der Gegenwart von Cyclohexemid untersucht werden. Cyclohexemid hemmt die Translation in Eukaryoten und unterbindet somit die Proteinbiosynthese an den Ribosomen. Aufgrund der Behandlung mit Cyclohexemid können ausschließlich direkte Auswirkungen auf die Zielgenregulation detektiert werden.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Analyse nur die am stärksten regulierten Gene betrachtet. Es ist durchaus vorstellbar, dass die relevantesten Wnt regulierten Zielgene sich unter den schwächer regulierten Genen verbergen.

Dadurch, dass der nicht-kanonische Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes JNK aktiviert, ist eine Regulation der Genexpression während der konvergenten Extension wahrscheinlich. Dies wurde prinzipiell durch die Identifizierung von putativen Zielgenen im Microarray gezeigt. Inwiefern die Regulation der Transkription dieser Zielgene an der Migration und Etablierung der Polarität beteiligt sind, kann im Elongationsassay, in Lebendzellaufnahmen und anhand der Ausrichtung des Mikrotubulocytoskelett bestimmt werden. In *Drosophila* ist an der Etablierung der planaren Zellpolarität im Auge eine Aktivierung der Transkription bestimmter Zielgene beteiligt (Fanto et al., 2000).

Bei dieser Analyse steht nun die Verifizierung der ausgewählten Zielgene an, im NanoString und mittels *in situ* Hybridisierungen. Mit der Analyse des Expressionsmusters soll bestimmt werden, ob die ausgewählten Zielgene in der dorsalen Marginalzone exprimiert werden, gegebenenfalls kann das Expressionsmuster auch mit dem von Wnt5a und Wnt11 abgeglichen werden. Als nächster Schritt kommt die Charakterisierung der Zielgene bezüglich der konvergenten Extension, zuerst bezüglich des Blastoporusschlusses und dann im Elongationsassay. Erst danach kann eine Aussage darüber getroffen werden, welche der putativen Zielgene, tatsächlich Zielgene von Wnt5a oder Wnt11 sind.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abu-Elmagd, M., Garcia-Morales, C. and Wheeler, G. N.** (2006). Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction. *Dev Biol* **298**, 285-98.
- Angers, S. and Moon, R. T.** (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 468-77.
- Arce, L., Yokoyama, N. N. and Waterman, M. L.** (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492-504.
- Axelrod, J. D.** (2001). Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev* **15**, 1182-7.
- Banyai, L., Kerekes, K. and Pathy, L.** (2012). Characterization of a Wnt-binding site of the WIF-domain of Wnt inhibitory factor-1. *FEBS Lett* **586**, 3122-6.
- Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D. and Boutros, M.** (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* **125**, 523-33.
- Bastock, R., Strutt, H. and Strutt, D.** (2003). Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning. *Development* **130**, 3007-14.
- Bazan, J. F., Janda, C. Y. and Garcia, K. C.** (2012). Structural architecture and functional evolution of Wnts. *Dev Cell* **23**, 227-32.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W.** (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- Belenkaya, T. Y., Wu, Y., Tang, X., Zhou, B., Cheng, L., Sharma, Y. V., Yan, D., Selva, E. M. and Lin, X.** (2008). The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Dev Cell* **14**, 120-31.
- Bertet, C., Sulak, L. and Lecuit, T.** (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* **429**, 667-71.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R.** (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-30.
- Bilic, J., Huang, Y. L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C. M., Bienz, M. and Niehrs, C.** (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**, 1619-22.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Bjarnadottir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R. and Schioth, H. B.** (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**, 263-73.
- Blankenship, J. T., Backovic, S. T., Sanny, J. S., Weitz, O. and Zallen, J. A.** (2006). Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis. *Dev Cell* **11**, 459-70.
- Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M. and Shapiro, L.** (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**, 1308-13.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. and Mlodzik, M.** (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-18.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T. and Kimelman, D.** (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus. *Genes Dev* **11**, 2359-70.
- Brieher, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1994). Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of Xenopus animal caps. *J Cell Biol* **126**, 519-27.

- Brieher, W. M., Yap, A. S. and Gumbiner, B. M.** (1996). Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol* **135**, 487-96.
- Buechling, T., Chaudhary, V., Spirohn, K., Weiss, M. and Boutros, M.** (2011). p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands. *EMBO Rep* **12**, 1265-72.
- Cha, S. W., Tadjudje, E., Tao, Q., Wylie, C. and Heasman, J.** (2008). Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in *Xenopus* axis formation. *Development* **135**, 3719-29.
- Chen, J. Y., Oliveri, P., Gao, F., Dornbos, S. Q., Li, C. W., Bottjer, D. J. and Davidson, E. H.** (2002). Precambrian animal life: probable developmental and adult cnidarian forms from Southwest China. *Dev Biol* **248**, 182-96.
- Chen, J. Y., Oliveri, P., Li, C. W., Zhou, G. Q., Gao, F., Hagadorn, J. W., Peterson, K. J. and Davidson, E. H.** (2000). Precambrian animal diversity: putative phosphatized embryos from the Doushantuo Formation of China. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4457-62.
- Chen, W. S., Antic, D., Matis, M., Logan, C. Y., Povelones, M., Anderson, G. A., Nusse, R. and Axelrod, J. D.** (2008). Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell* **133**, 1093-105.
- Chen, X. and Gumbiner, B. M.** (2006). Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. *J Cell Biol* **174**, 301-13.
- Chen, X., Molino, C., Liu, L. and Gumbiner, B. M.** (2007). Structural elements necessary for oligomerization, trafficking, and cell sorting function of paraxial protocadherin. *J Biol Chem* **282**, 32128-37.
- Chu, M. L., Ahn, V. E., Choi, H. J., Daniels, D. L., Nusse, R. and Weis, W. I.** (2013). structural Studies of Wnts and identification of an LRP6 binding site. *Structure* **21**, 1235-42.
- Chung, H. A., Yamamoto, T. S. and Ueno, N.** (2007). ANR5, an FGF target gene product, regulates gastrulation in *Xenopus*. *Curr Biol* **17**, 932-9.
- Dann, C. E., Hsieh, J. C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J. and Leahy, D. J.** (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**, 86-90.
- Darken, R. S., Scola, A. M., Rakeman, A. S., Das, G., Mlodzik, M. and Wilson, P. A.** (2002). The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *Embo j* **21**, 976-85.
- Davidson, L. A., Marsden, M., Keller, R. and Desimone, D. W.** (2006). Integrin alpha5beta1 and fibronectin regulate polarized cell protrusions required for *Xenopus* convergence and extension. *Curr Biol* **16**, 833-44.
- Demir, K., Kirsch, N., Beretta, C. A., Erdmann, G., Ingelfinger, D., Moro, E., Argenton, F., Carl, M., Niehrs, C. and Boutros, M.** (2013). RAB8B is required for activity and caveolar endocytosis of LRP6. *Cell Rep* **4**, 1224-34.
- Djiane, A., Riou, J., Umbhauer, M., Boucaut, J. and Shi, D.** (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* **127**, 3091-100.
- Domingo, C. and Keller, R.** (1995). Induction of notochord cell intercalation behavior and differentiation by progressive signals in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Development* **121**, 3311-21.
- Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. and Moon, R. T.** (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **15**, 2625-34.
- Dzamba, B. J., Jakab, K. R., Marsden, M., Schwartz, M. A. and DeSimone, D. W.** (2009). Cadherin adhesion, tissue tension, and noncanonical Wnt signaling regulate fibronectin matrix organization. *Dev Cell* **16**, 421-32.

- Elul, T. and Keller, R.** (2000). Monopolar protrusive activity: a new morphogenic cell behavior in the neural plate dependent on vertical interactions with the mesoderm in *Xenopus*. *Dev Biol* **224**, 3-19.
- Esufali, S. and Bapat, B.** (2004). Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **23**, 8260-71.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-6.
- Faire, K., Waterman-Storer, C. M., Gruber, D., Masson, D., Salmon, E. D. and Bulinski, J. C.** (1999). E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J Cell Sci* **112** ( Pt 23), 4243-55.
- Fanto, M., Weber, U., Strutt, D. I. and Mlodzik, M.** (2000). Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Curr Biol* **10**, 979-88.
- Feigun, F., Hannus, M., Mlodzik, M. and Eaton, S.** (2001). The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell* **1**, 93-101.
- Feike, A. C., Racher, K., Gentzel, M. and Schambony, A.** (2010). Wnt5a/Ror2-induced upregulation of xPAPC requires xShcA. *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 500-6.
- Franch-Marro, X., Wendler, F., Griffith, J., Maurice, M. M. and Vincent, J. P.** (2008a). In vivo role of lipid adducts on Wingless. *J Cell Sci* **121**, 1587-92.
- Franch-Marro, X., Wendler, F., Guidato, S., Griffith, J., Baena-Lopez, A., Itasaki, N., Maurice, M. M. and Vincent, J. P.** (2008b). Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/Sprinter by the retromer complex. *Nat Cell Biol* **10**, 170-7.
- Frank, M. and Kessler, R.** (2002). Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 557-62.
- Gessert, S., Maurus, D., Rossner, A. and Kuhl, M.** (2007). Pescadillo is required for *Xenopus laevis* eye development and neural crest migration. *Dev Biol* **310**, 99-112.
- Goodrich, L. V. and Strutt, D.** (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877-92.
- Gorman, C. M., Lane, D. P. and Rigby, P. W.** (1984). High efficiency gene transfer into mammalian cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **307**, 343-6.
- Gradi, D., Kuhl, M. and Wedlich, D.** (1999). The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* **19**, 5576-87.
- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. and Boutros, M.** (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* **14**, 1036-45.
- Guder, C., Philipp, I., Lengfeld, T., Watanabe, H., Hobmayer, B. and Holstein, T. W.** (2006). The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* **25**, 7450-60.
- Gumbiner, B. M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622-34.
- Habas, R., Dawid, I. B. and He, X.** (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* **17**, 295-309.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X.** (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* **107**, 843-54.
- He, X., Saint-Jeannet, J. P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I. and Varmus, H.** (1997). A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-4.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C. Y. and Wylie, C.** (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* **79**, 791-803.

- Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. and Taira, M.** (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-39.
- Holzer, T., Liffers, K., Rahm, K., Trageser, B., Ozbek, S. and Gradl, D.** (2012). Live imaging of active fluorophore labelled Wnt proteins. *FEBS Lett* **586**, 1638-44.
- Hooker, L., Smoczer, C., KhosrowShahian, F., Wolanski, M. and Crawford, M. J.** (2012). Microarray-based identification of *Pitx3* targets during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Dyn* **241**, 1487-505.
- Hoppler, S. and Kavanagh, C. L.** (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* **120**, 385-93.
- Hsieh, J. C., Rattner, A., Smallwood, P. M. and Nathans, J.** (1999). Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3546-51.
- Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827-41.
- Janda, C. Y., Waghray, D., Levin, A. M., Thomas, C. and Garcia, K. C.** (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* **337**, 59-64.
- Jenny, A., Darken, R. S., Wilson, P. A. and Mlodzik, M.** (2003). Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. *Embo j* **22**, 4409-20.
- Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N. and Costantini, F.** (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of *Axin2*, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* **22**, 1172-83.
- Jones, W. M. and Bejsovec, A.** (2005). RacGap50C negatively regulates wingless pathway activity during *Drosophila* embryonic development. *Genetics* **169**, 2075-86.
- Jue, S. F., Bradley, R. S., Rudnicki, J. A., Varmus, H. E. and Brown, A. M.** (1992). The mouse *Wnt-1* gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **12**, 321-8.
- Kani, S., Oishi, I., Yamamoto, H., Yoda, A., Suzuki, H., Nomachi, A., Iozumi, K., Nishita, M., Kikuchi, A., Takumi, T. et al.** (2004). The receptor tyrosine kinase *Ror2* associates with and is activated by casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **279**, 50102-9.
- Karaulanov, E., Bottcher, R. T., Stannek, P., Wu, W., Rau, M., Ogata, S., Cho, K. W. and Niehrs, C.** (2009). *Unc5B* interacts with *FLRT3* and *Rnd1* to modulate cell adhesion in *Xenopus* embryos. *PLoS One* **4**, e5742.
- Katanaev, V. L., Ponzelli, R., Semeriva, M. and Tomlinson, A.** (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* **120**, 111-22.
- Katoh, M. and Katoh, M.** (2009). Integrative genomic analyses of WNT11: transcriptional mechanisms based on canonical WNT signals and GATA transcription factors signaling. *Int J Mol Med* **24**, 247-51.
- Keller, R. and Danilchik, M.** (1988). Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* **103**, 193-209.
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D. and Skoglund, P.** (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 897-922.
- Keller, R., Davidson, L. A. and Shook, D. R.** (2003). How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation* **71**, 171-205.
- Keller, R., Shih, J. and Sater, A.** (1992). The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev Dyn* **193**, 199-217.
- Keller, R. and Shook, D.** (2008). Dynamic determinations: patterning the cell behaviours that close the amphibian blastopore. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 1317-32.

- Kerppola, T. K.** (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**, 465-87.
- Kestler, H. A. and Kuhl, M.** (2008). From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 1333-47.
- Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* **128**, 4189-201.
- Kim, G. H., Her, J. H. and Han, J. K.** (2008). Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *J Cell Biol* **182**, 1073-82.
- Kim, S. H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E. and Robertis, E. M.** (1998). The role of paraxial protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* **125**, 4681-90.
- Kim, S. K., Shindo, A., Park, T. J., Oh, E. C., Ghosh, S., Gray, R. S., Lewis, R. A., Johnson, C. A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N. et al.** (2010). Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* **329**, 1337-40.
- Kimelman, D. and Xu, W.** (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**, 7482-91.
- King, N., Hittinger, C. T. and Carroll, S. B.** (2003). Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* **301**, 361-3.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKechnie, D. et al.** (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**, 661-5.
- Klein, T. J., Jenny, A., Djiane, A. and Mlodzik, M.** (2006). CKlepsilon/discs overgrown promotes both Wnt-Fz/beta-catenin and Fz/PCP signaling in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1337-43.
- Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T. and Kikuchi, A.** (2007). Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells* **12**, 521-34.
- Koster, I., Jungwirth, M. S. and Steinbeisser, H.** (2010). xGit2 and xRhoGAP 11A regulate convergent extension and tissue separation in *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* **344**, 26-35.
- Kraft, B., Berger, C. D., Wallkamm, V., Steinbeisser, H. and 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.
- Kuhl, M., Geis, K., Sheldahl, L. C., Pukrop, T., Moon, R. T. and Wedlich, D.** (2001). Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech Dev* **106**, 61-76.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C. and Moon, R. T.** (2000). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* **275**, 12701-11.
- Kurayoshi, M., Yamamoto, H., Izumi, S. and Kikuchi, A.** (2007). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J* **402**, 515-23.
- Kuroda, H., Wessely, O. and De Robertis, E. M.** (2004). Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol* **2**, E92.
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q. et al.** (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* **433**, 156-60.
- Kwan, K. M. and Kirschner, M. W.** (2005). A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of *Xenopus laevis*. *Development* **132**, 4599-610.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lane, M. C. and Keller, R.** (1997). Microtubule disruption reveals that Spemann's organizer is subdivided into two domains by the vegetal alignment zone. *Development* **124**, 895-906.
- Lee, C. H. and Gumbiner, B. M.** (1995). Disruption of gastrulation movements in *Xenopus* by a dominant-negative mutant for C-cadherin. *Dev Biol* **171**, 363-73.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A. and Lecuit, T.** (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nat Cell Biol* **13**, 529-40.
- Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A. M., McMahon, A., Sussman, D. J. and Wu, D.** (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 129-34.
- Liao, G., Tao, Q., Kofron, M., Chen, J. S., Schloemer, A., Davis, R. J., Hsieh, J. C., Wylie, C., Heasman, J. and Kuan, C. Y.** (2006). Jun NH2-terminal kinase (JNK) prevents nuclear beta-catenin accumulation and regulates axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16313-8.
- Lienkamp, S. S., Liu, K., Karner, C. M., Carroll, T. J., Ronneberger, O., Wallingford, J. B. and Walz, G.** (2012). Vertebrate kidney tubules elongate using a planar cell polarity-dependent, rosette-based mechanism of convergent extension. *Nat Genet* **44**, 1382-7.
- Lin, L., Cui, L., Zhou, W., Dufort, D., Zhang, X., Cai, C. L., Bu, L., Yang, L., Martin, J., Kemler, R. et al.** (2007). Beta-catenin directly regulates *Islet1* expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9313-8.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Lodewyckx, L. and Lories, R. J.** (2009). WNT Signaling in osteoarthritis and osteoporosis: what is the biological significance for the clinician? *Curr Rheumatol Rep* **11**, 23-30.
- Lou, X., Li, S., Wang, J. and Ding, X.** (2008). Activin/nodal signaling modulates XPAPC expression during *Xenopus* gastrulation. *Dev Dyn* **237**, 683-91.
- Lu, X., Borchers, A. G., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J. C. and Tessier-Lavigne, M.** (2004). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* **430**, 93-8.
- Luga, V., Zhang, L., Vilorio-Petit, A. M., Ogunjimi, A. A., Inanlou, M. R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A. N., Basik, M. and Wrana, J. L.** (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* **151**, 1542-56.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W. et al.** (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* **22**, 1184-93.
- Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J.** (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**, 455-65.
- Ma, L. and Wang, H. Y.** (2006). Suppression of cyclic GMP-dependent protein kinase is essential to the Wnt/cGMP/Ca<sup>2+</sup> pathway. *J Biol Chem* **281**, 30990-1001.
- MacDonald, B. T., Hien, A., Zhang, X., Iranloye, O., Virshup, D. M., Waterman, M. L. and He, X.** (2014). Disulfide Bond Requirements for Active Wnt Ligands. *J Biol Chem*.
- MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X.** (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26.

**Machan, R. and Wohland, T.** (2014). Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Lett.*

**Manders, E. M. M., Verbeek, F. J. and Aten, J. A.** (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* **169**, 375-382.

**Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D. and Solnica-Krezel, L.** (2002). Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* **12**, 876-84.

**Marsden, M. and DeSimone, D. W.** (2003). Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol* **13**, 1182-91.

**Masiakowski, P. and Yancopoulos, G. D.** (1998). The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases. *Curr Biol* **8**, R407.

**McMahon, A. P. and Moon, R. T.** (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58**, 1075-84.

**Medina, A., Reintsch, W. and Steinbeisser, H.** (2000). *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech Dev* **92**, 227-37.

**Medina, A., Swain, R. K., Kuerner, K. M. and Steinbeisser, H.** (2004). *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *Embo j* **23**, 3249-58.

**Mikels, A. J. and Nusse, R.** (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* **4**, e115.

**Minami, Y., Oishi, I., Endo, M. and Nishita, M.** (2010). Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Dev Dyn* **239**, 1-15.

**Moon, R. T., Campbell, R. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., Shih, J. and Fraser, S.** (1993). Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* **119**, 97-111.

**Morey, J. S., Ryan, J. C. and Van Dolah, F. M.** (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* **8**, 175-93.

**Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787-90.

**Muller, H. A., Kuhl, M., Finnemann, S., Schneider, S., van der Poel, S. Z., Hausen, P. and Wedlich, D.** (1994). *Xenopus* cadherins: the maternal pool comprises distinguishable members of the family. *Mech Dev* **47**, 213-23.

**Munoz, R., Moreno, M., Oliva, C., Orbenes, C. and Larrain, J.** (2006). Syndecan-4 regulates non-canonical Wnt signalling and is essential for convergent and extension movements in *Xenopus* embryos. *Nat Cell Biol* **8**, 492-500.

**Nalesso, G., Sherwood, J., Bertrand, J., Pap, T., Ramachandran, M., De Bari, C., Pitzalis, C. and Dell'accio, F.** (2011). WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *J Cell Biol* **193**, 551-64.

**Neumann, S., Coudreuse, D. Y., van der Westhuyzen, D. R., Eckhardt, E. R., Korswagen, H. C., Schmitz, G. and Sprong, H.** (2009). Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* **10**, 334-43.

**Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J. L. and Muller, U.** (2004). Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* **74**, 558-63.

**Niessen, C. M. and Gumbiner, B. M.** (2002). Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol* **156**, 389-399.

- Niessen, C. M., Leckband, D. and Yap, A. S.** (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev* **91**, 691-731.
- Nishimura, T., Honda, H. and Takeichi, M.** (2012). Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell* **149**, 1084-97.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. and Hedge, P.** (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**, 665-9.
- Nishita, M., Itsukushima, S., Nomachi, A., Endo, M., Wang, Z., Inaba, D., Qiao, S., Takada, S., Kikuchi, A. and Minami, Y.** (2010). Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol* **30**, 3610-9.
- O'Connell, M. P., Fiori, J. L., Xu, M., Carter, A. D., Frank, B. P., Camilli, T. C., French, A. D., Dissanayake, S. K., Indig, F. E., Bernier, M. et al.** (2010). The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. *Oncogene* **29**, 34-44.
- Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kolle, G., Niehrs, C., Ueno, N. and Cho, K. W.** (2007). TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes Dev* **21**, 1817-31.
- Ohkawara, B. and Niehrs, C.** (2011). An ATF2-based luciferase reporter to monitor non-canonical Wnt signaling in *Xenopus* embryos. *Dev Dyn* **240**, 188-94.
- Ohkawara, B., Yamamoto, T. S., Tada, M. and Ueno, N.** (2003). Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* **130**, 2129-38.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C. et al.** (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 645-54.
- Ossipova, O., Kim, K., Lake, B. B., Itoh, K., Ioannou, A. and Sokol, S. Y.** (2014). Role of Rab11 in planar cell polarity and apical constriction during vertebrate neural tube closure. *Nat Commun* **5**, 3734.
- Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. and Eaton, S.** (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* **435**, 58-65.
- Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L. M. and Kuhl, M.** (2002). Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* **418**, 636-41.
- Pathy, L.** (2000). The WIF module. *Trends Biochem Sci* **25**, 12-3.
- Peradziryi, H., Kaplan, N. A., Podleschny, M., Liu, X., Wehner, P., Borchers, A. and Tolwinski, N. S.** (2011). PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *Embo j* **30**, 3729-40.
- Peradziryi, H., Tolwinski, N. S. and Borchers, A.** (2012). The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch Biochem Biophys* **524**, 71-6.
- Perret, E., Leung, A., Feracci, H. and Evans, E.** (2004). Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16472-7.
- Person, A. D., Beiraghi, S., Sieben, C. M., Hermanson, S., Neumann, A. N., Robu, M. E., Schleiffarth, J. R., Billington, C. J., Jr., van Bokhoven, H., Hoogeboom, J. M. et al.** (2010). WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev Dyn* **239**, 327-37.
- Port, F. and Basler, K.** (2010). Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic* **11**, 1265-71.
- Port, F., Hausmann, G. and Basler, K.** (2011). A genome-wide RNA interference screen uncovers two p24 proteins as regulators of Wingless secretion. *EMBO Rep* **12**, 1144-52.

- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trumper, L. and Binder, C.** (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5454-9.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I. L.** (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-14.
- Rhinn, M., Lun, K., Luz, M., Werner, M. and Brand, M.** (2005). Positioning of the midbrain-hindbrain boundary organizer through global posteriorization of the neuroectoderm mediated by Wnt8 signaling. *Development* **132**, 1261-72.
- Ries, J., Yu, S. R., Burkhardt, M., Brand, M. and Schwille, P.** (2009). Modular scanning FCS quantifies receptor-ligand interactions in living multicellular organisms. *Nat Methods* **6**, 643-5.
- Rigo-Watermeier, T., Kraft, B., Ritthaler, M., Walkkamm, V., Holstein, T. and Wedlich, D.** (2012). Functional conservation of Nematostella Wnts in canonical and noncanonical Wnt-signaling. *Biol Open* **1**, 43-51.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R.** (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649-57.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. and De Robertis, E. M.** (1994). Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* **79**, 779-90.
- Schambony, A. and Wedlich, D.** (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779-92.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. and Ragg, T.** (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* **7**, 3.
- Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., Pandur, P., Miller, J. R., Kuhl, M. and Moon, R. T.** (2003). Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* **161**, 769-77.
- Shibata, M., Itoh, M., Hikasa, H., Taira, S. and Taira, M.** (2005). Role of crescent in convergent extension movements by modulating Wnt signaling in early Xenopus embryogenesis. *Mech Dev* **122**, 1322-39.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992a). Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 901-14.
- Shih, J. and Keller, R.** (1992b). Patterns of cell motility in the organizer and dorsal mesoderm of *Xenopus laevis*. *Development* **116**, 915-30.
- Shimada, Y., Yonemura, S., Ohkura, H., Strutt, D. and Uemura, T.** (2006). Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in *Drosophila* wing epithelium. *Dev Cell* **10**, 209-22.
- Shindo, A. and Wallingford, J. B.** (2014). PCP and septins compartmentalize cortical actomyosin to direct collective cell movement. *Science* **343**, 649-52.
- Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. and Moon, R. T.** (1997). Modulation of embryonic intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* **182**, 114-20.
- Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. and Melton, D. A.** (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* **67**, 741-52.
- Strutt, D. I.** (2001). Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol Cell* **7**, 367-75.
- Strutt, H., Price, M. A. and Strutt, D.** (2006). Planar polarity is positively regulated by casein kinase Iepsilon in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1329-36.

**Tada, M. and Smith, J. C.** (2000). Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* **127**, 2227-38.

**Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J. L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D. and De Robertis, E. M.** (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**, 1136-48.

**Tahinci, E. and Symes, K.** (2003). Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during Xenopus gastrulation. *Dev Biol* **259**, 318-35.

**Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T. and Takada, S.** (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* **11**, 791-801.

**Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. and He, X.** (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-5.

**Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X.** (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* **13**, 149-56.

**Tanaka, K., Okabayashi, K., Asashima, M., Perrimon, N. and Kadowaki, T.** (2000). The evolutionarily conserved porcupine gene family is involved in the processing of the Wnt family. *Eur J Biochem* **267**, 4300-11.

**Tang, X., Wu, Y., Belenkaya, T. Y., Huang, Q., Ray, L., Qu, J. and Lin, X.** (2012). Roles of N-glycosylation and lipidation in Wg secretion and signaling. *Dev Biol* **364**, 32-41.

**Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C. C., Lin, X. and Heasman, J.** (2005). Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos. *Cell* **120**, 857-71.

**Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L. and Moon, R. T.** (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development. *J Cell Biol* **133**, 1123-37.

**Tree, D. R., Shulman, J. M., Rousset, R., Scott, M. P., Gubb, D. and Axelrod, J. D.** (2002). Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* **109**, 371-81.

**Unterseher, F., Hefele, J. A., Giehl, K., De Robertis, E. M., Wedlich, D. and Schambony, A.** (2004). Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *Embo j* **23**, 3259-69.

**van Amerongen, R.** (2012). Alternative Wnt pathways and receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.

**van Venrooy, S., Fichtner, D., Kunz, M., Wedlich, D. and Gradl, D.** (2008). Cold-inducible RNA binding protein (CIRP), a novel XTcf-3 specific target gene regulates neural development in Xenopus. *BMC Dev Biol* **8**, 77.

**Wallingford, J. B., Goto, T., Keller, R. and Harland, R. M.** (2002). Cloning and expression of Xenopus Prickle, an orthologue of a Drosophila planar cell polarity gene. *Mech Dev* **116**, 183-6.

**Wallingford, J. B. and Harland, R. M.** (2001). Xenopus Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis. *Development* **128**, 2581-92.

**Wallingford, J. B., Rowing, B. A., Vogeli, K. M., Rothbacher, U., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2000). Dishevelled controls cell polarity during Xenopus gastrulation. *Nature* **405**, 81-5.

**Wang, Y., Janicki, P., Koster, I., Berger, C. D., Wenzl, C., Grosshans, J. and Steinbeisser, H.** (2008). Xenopus Paraxial Protocadherin regulates morphogenesis by antagonizing Sprouty. *Genes Dev* **22**, 878-83.

- Wang, Y. and Nathans, J.** (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* **134**, 647-58.
- Westfall, T. A., Brimeyer, R., Twedt, J., Gladon, J., Olberding, A., Furutani-Seiki, M. and Slusarski, D. C.** (2003). Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol* **162**, 889-98.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd and Nusse, R.** (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-52.
- Willert, K. and Nusse, R.** (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a007864.
- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R. K. and Steinbeisser, H.** (2001). Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **413**, 856-60.
- Witzel, S., Zimyanin, V., Carreira-Barbosa, F., Tada, M. and Heisenberg, C. P.** (2006). Wnt11 controls cell contact persistence by local accumulation of Frizzled 7 at the plasma membrane. *J Cell Biol* **175**, 791-802.
- Wong, L. L. and Adler, P. N.** (1993). Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol* **123**, 209-21.
- Wu, J. and Mlodzik, M.** (2008). The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev Cell* **15**, 462-9.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A. and Long, F.** (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* **133**, 340-53.
- Xu, Y. K. and Nusse, R.** (1998). The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Curr Biol* **8**, R405-6.
- Yamamoto, H., Sakane, H., Yamamoto, H., Michiue, T. and Kikuchi, A.** (2008). Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. *Dev Cell* **15**, 37-48.
- Yan, D. and Lin, X.** (2009). Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002493.
- Yap, A. S., Brieher, W. M., Pruschy, M. and Gumbiner, B. M.** (1997). Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* **7**, 308-15.
- Yin, C., Kiskowski, M., Pouille, P. A., Farge, E. and Solnica-Krezel, L.** (2008). Cooperation of polarized cell intercalations drives convergence and extension of presomitic mesoderm during zebrafish gastrulation. *J Cell Biol* **180**, 221-32.
- Zallen, J. A. and Wieschaus, E.** (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in *Drosophila*. *Dev Cell* **6**, 343-55.
- Zhong, Y., Brieher, W. M. and Gumbiner, B. M.** (1999). Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J Cell Biol* **144**, 351-9.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungen

(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewichts-Volumen-Verhältnis
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
BS1	Bindestelle 1
BS2	Bindestelle 2
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
CEC	C-Cadherin extrazelluläre Cadherin Domäne
CRD	Cystein reiche Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsh	Dishevelled
EC	extrazelluläre Cadherin Domäne
eGFP	enhanced green fluorescent protein, intensiv grün fluoreszierendes Protein
Fz	Frizzled
GFP	grün fluoreszierendes Protein, green fluorescent protein
JNK	c-Jun N-Terminale Kinase
Knockdown	Translationsunterdrückung
Lef	Lymphoid enhancer factor
mCherry	monomeres Cherry
MO	Morpholino <i>antisense</i> Oligonukleotid
mRNA	messenger RNA
ODC	Ornithin Decarboxylase
PAPC	Paraxiales Protocadherin
PCP	Planare Zellpolarität
PS3	Pseudostelle 3 in Wnt
x	<i>Xenopus</i>
<i>xBra</i>	<i>Xenopus Brachyury</i>
YFP	gelb fluoreszierendes Protein, yellow fluorescent protein

### 8.2. Klonierungsprimer

Name	Sequenz
xWnt5a_Xhol_fwd	5'-gtctcgagatgagaaagaatctgtggac-3'
xWnt5a_eGFP_rev	5'-cttgctcaccatcttgcacgaaactggcaac-3'
eGFP_xWnt5a_fwd	5'-gtttgatgcaagatggtgagcaagggcga-3'
eGFP_Xhol_rev	5'-gcactcgagatctgagtc-3'
eGFP_EcoRI_fwd	5'-gaattcatggtgagcaagggcgag-3'
Wnt11_eGFP_rev	5'-caccatctgcagacatacctctccac-3'
eGFP_Wnt11_fwd	5'-tgcaagatggtgagcaagggcg-3'
eGFP_Xhol_rev	5'-ctcgagactgtacagctcgtccatg-3'
EcoRI_xWnt5a_NT_fwd	5'-gaattcatgagaaagaatctgtggacatttcagt-3'
xWnt11_CT_Xhol_rev	5'-ctcgagttactgcagacatacctctcc-3'
EcoRI_xWnt11_NT_fwd	5'-gaattcatggctccgaccggt -3'
xWnt5a_CT_Xhol_rev	5'-ctcgagctactgcatgcaactggtc-3'
Wnt5aP3_1/11P3_2_NT_rev	5'-agagcagttccacctccggtg -3'
Wnt5aP3_1/11P3_2_CT_fwd	5'-tggaactgctctcagtagagaatgc-3'
Wnt11P3_1/5aP3_2_NT_rev	5'-actgcagttccagcgcagtc-3'
Wnt11P3_1/5aP3_2_CT_fwd	5'-tggaactgcagttaccgtggataaca-3'

Name	Sequenz
Wnt5aP3_2/11P3_3_NT-rev	5'-acaccgccccatagccagtc -3'
Wnt5aP3_2/11P3_3_CT-fwd	5'-tgggcggggtgtgggacaac-3'
Wnt11P3_2/5aP3_3_NT_rev	5'-acagcctccccatcggaagc-3'
Wnt11P3_2/5aP3_3_CT_fwd	5'-tggggaggctgtggcgacaac-3'
Wnt5aP3/11B1_NT_rev	5'-gttggtggagattcatcataatccttgaactctc-3'
Wnt5aP3/11B1_CT_fwd	5'-aatctccacaacaatgcagttggcag-3'
Wnt11P3/5aB1_NT_rev	5'-attgttagattcataatttagtggcctggg-3'
Wnt11P3/5aB1_CT_fwd	5'-aatctacacaataatgaggccggaagg-3'
Wnt5aB1/11B2_NT_rev	5'-ctccaacaagtttaaggctacaagaaccg-3'
Wnt5aB1/11B2_CT_fwd	5'-actgttggaggcctgcag-3'
Wnt11B1/5aB2_NT_rev	5'-aagccaacaggcttcacggagc-3'
Wnt11B1/5aB2_CT_fwd	5'-acctgttggttcagctggcg-3'
xWnt8aB1/11B2_NT_rev	5'-aagccaacaggcttcacggagc-3'
xWnt8aB1/11B2_CT_fwd	5'-acctgttggttcagctggcc-3'
xWnt8a_CT_Xhol-rev	5'-ctcgagtcactccggtggcc-3'
EcoRI-xWnt8a_NT_fwd	5'-gaattcatgcaaaacaccactttgttcatcc-3'
xWnt11B1/8aB2_NT_rev	5'-ctccagcaagttgtatgctgcaactc-3'
xWnt11B1/8aB2_CT_fwd	5'-actgtctgaaggcctgca-3'
CEC1-5_Snap_EcoRV_fwd	5'-cgatatcatggggggcacca-3'
CEC1-5_Snap_EcoRI_rev	5'-gaattcctttctggcattttattgc-3'
CEC1-5_His_Sall_rev	5'-gtcgacctttctggcattttattgc-3'
pk_fwd_BamHI	5'-ggatccatgtcggtgaaatggatc-3'
pk_rev_Clal	5'-atcgattggaataatgcagttttgcc -3'

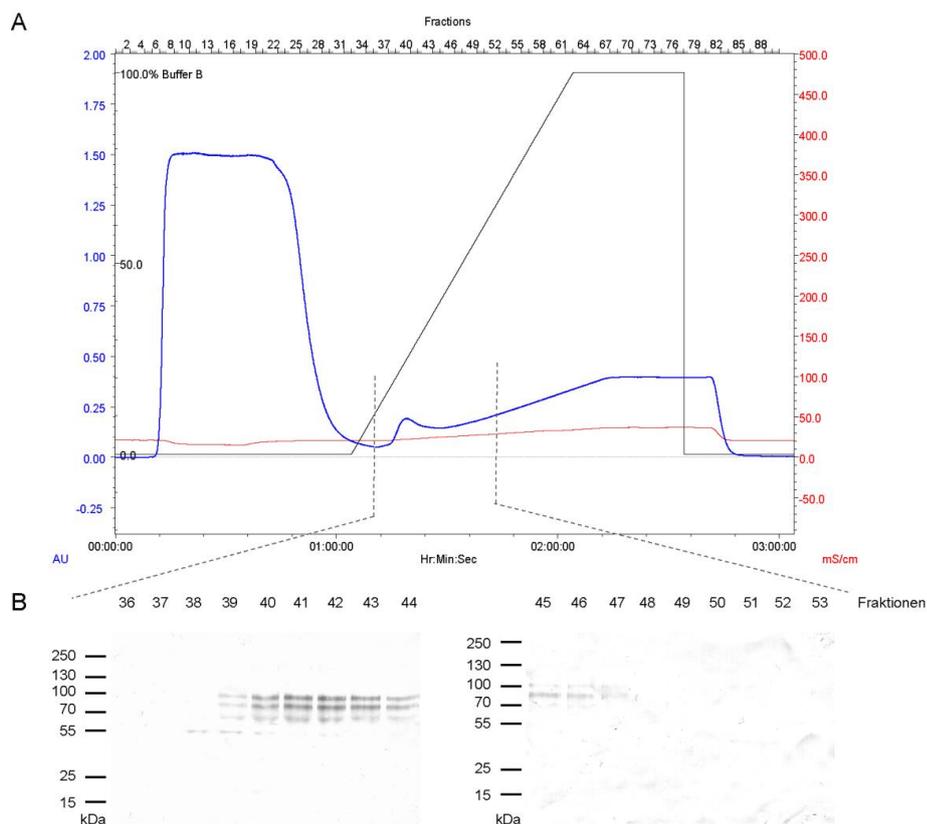
Tabelle 8.1: Klonierungsprimer

### 8.3. Proteinaufreinigung

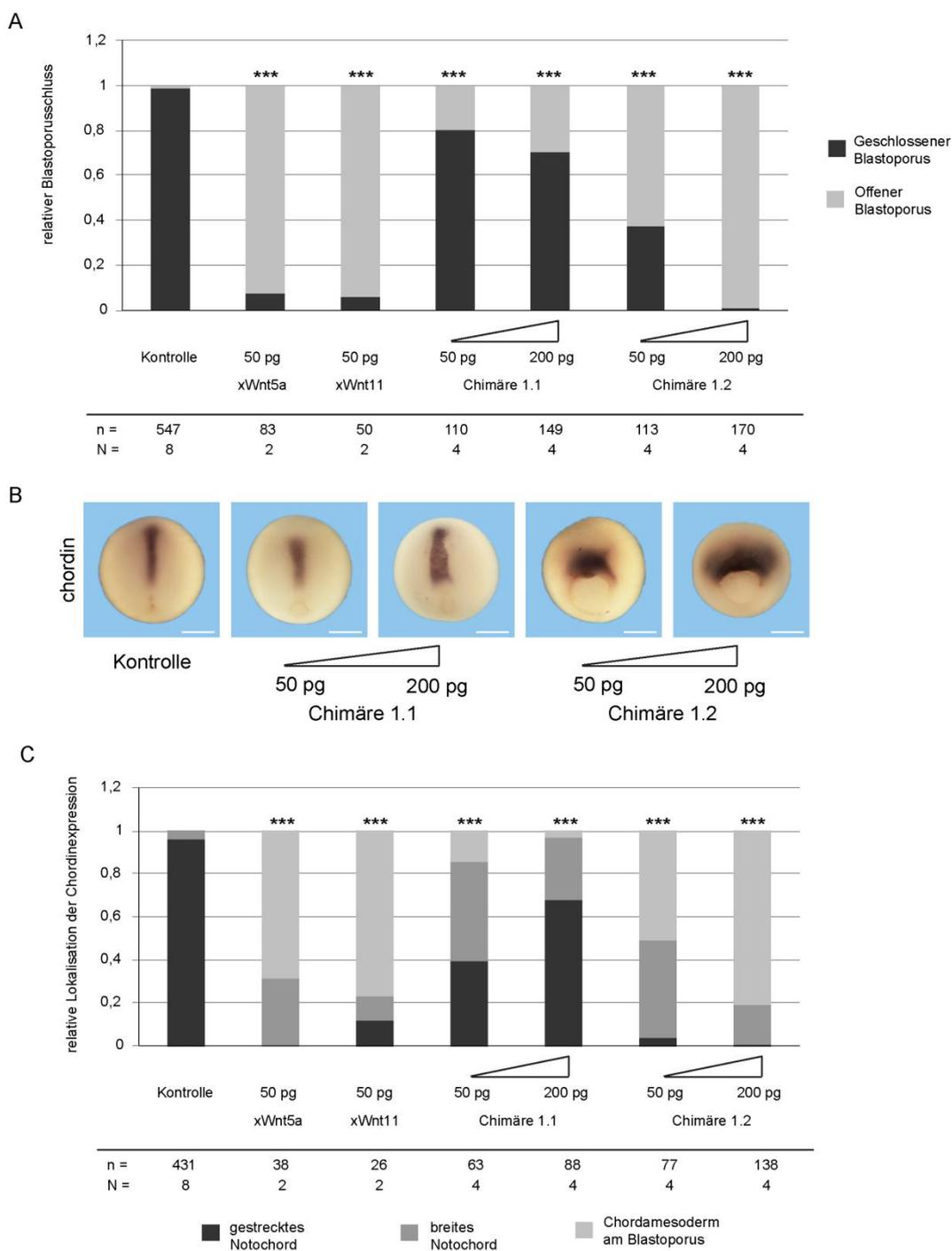
Klonierte Konstrukte zur Proteinaufreinigung:

Konstrukt	Vektor	Klonierung
xCEC1-5_12His	pSEMS 1-26m	Amplifikat CEC1-5 ORF aus CEC1-5_Fc_pEE14 (Briehner et al., 1996) wird über EcoRV und Sall in pSEMS 1-26m kloniert.
xCEC1-5_eGFP_His	pSEMS 1-26m	Amplifikat eGFP ORF wird über EcoRI und XhoI in pSEMS 1-26m kloniert. CEC1-5 wird über EcoRI und EcoRV in eGFP_pSEMS 1-26m kloniert
xCEC1-5_Snap_His	pSEMS 1-26m	Amplifikat CEC1-5 ORF aus CEC1-5_Fc_pEE14 (Briehner et al., 1996) wird über EcoRV und EcoRI in pSEMS 1-26m kloniert.

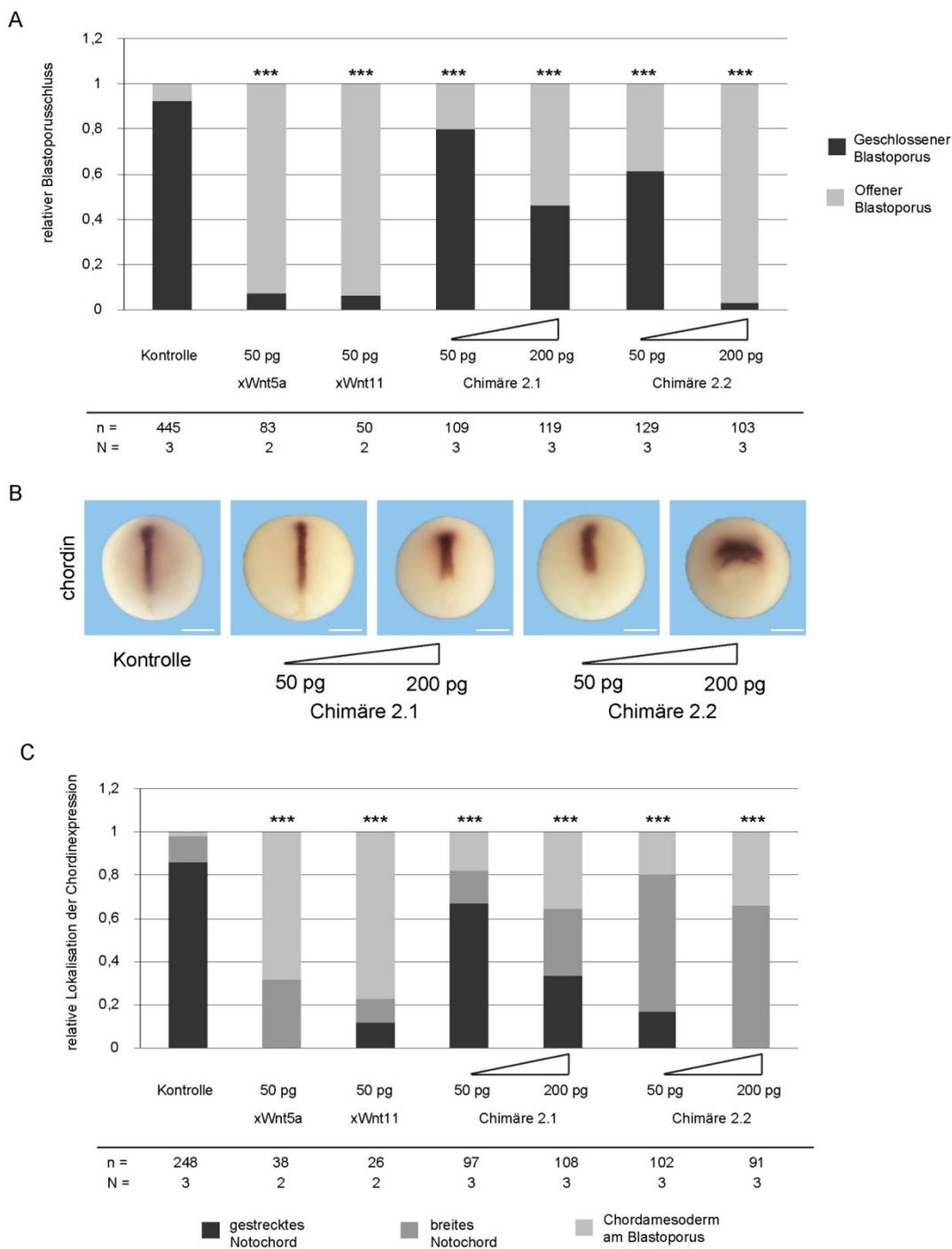
Die Proteinproduktion fand in HEK293 Zellen statt. Aus dem gesammelten Überstand wurde dass CEC1-5\_His mit Hilfe einer Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde spezifisch mittels Western Blot detektiert und die positiven Fraktionen gepoolt.



**Abbildung 8.1: CEC1-5 Proteinaufreinigung mittels NiNTA Affinitätschromatographie**  
(A) Der im Chromatogramm erscheinende Peak in der UV-Absorption korreliert (B) mit den Fraktionen, in denen CEC1-5\_His spezifisch im Western Blot detektiert werden konnte.

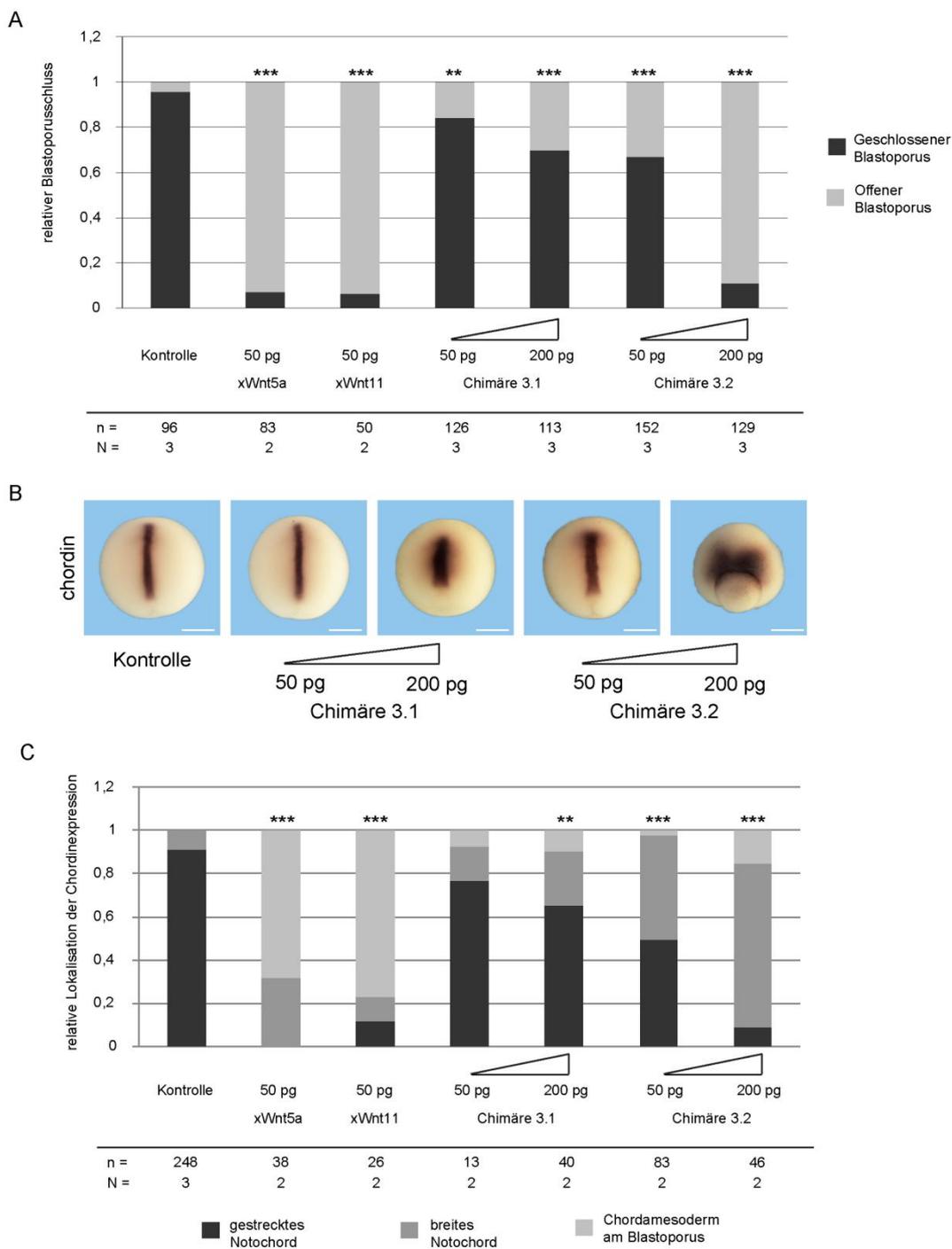
8.4. *in vivo* Funktionalität der chimären Konstrukte**Abbildung 8.2: Chimärenpaar 1 ist *in vivo* funktional**

(A) Die dorsale Überexpression des Chimärenpaares 1 resultiert in einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und (B) veränderter Lokalisation der *chordin* Expressionsdomäne. (C) Statistische Auswertung der *chordin* Phänotypen. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen;  $\chi^2$  Signifikanztest \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ )



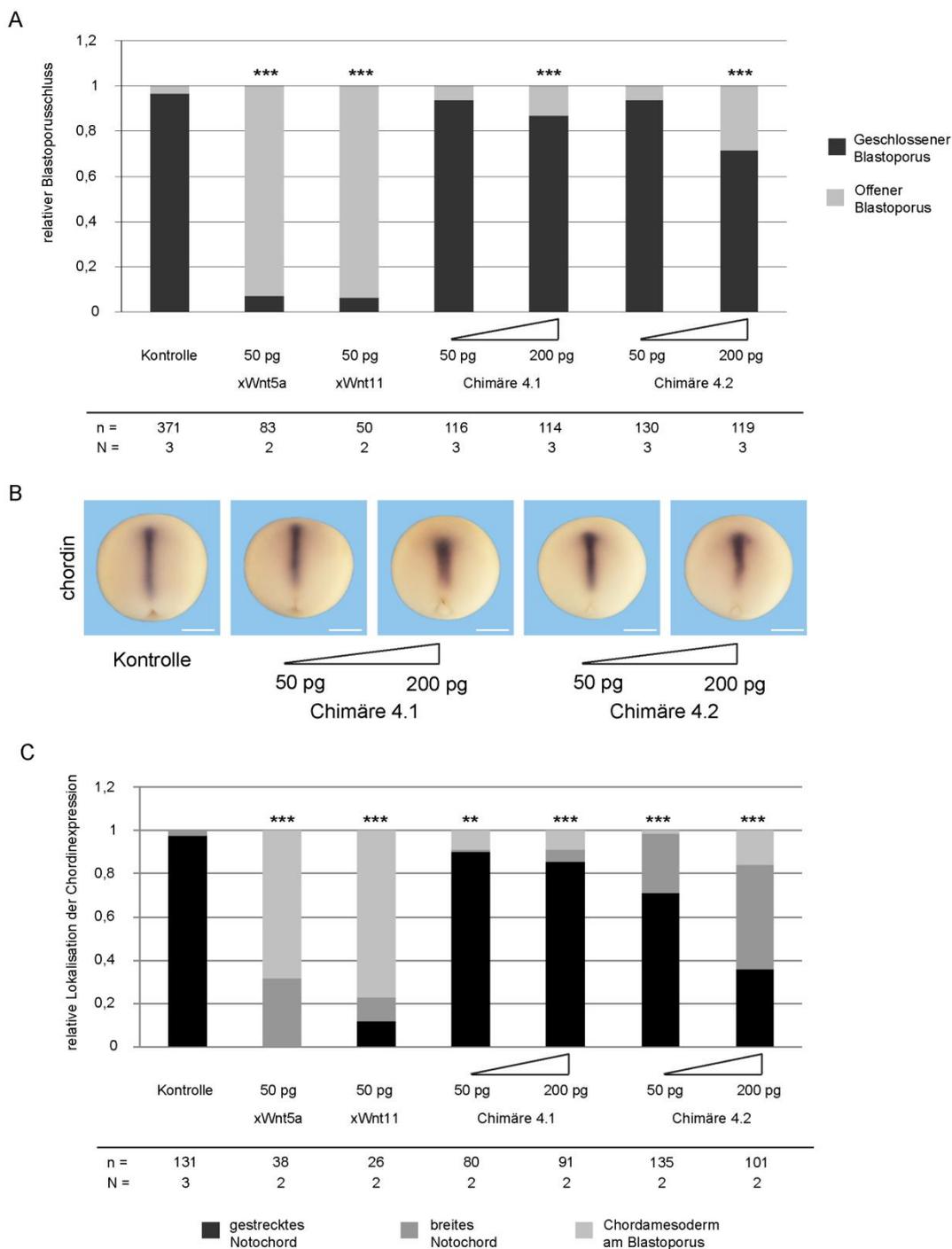
### Abbildung 8.3 Chimärenpaar 2 ist *in vivo* funktional

(A) Die dorsale Überexpression des Chimärenpaares 2 resultiert in einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und (B) veränderter Lokalisation der *chordin* Expressionsdomäne. (C) Statistische Auswertung der *chordin* Phänotypen. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n = Anzahl ausgewerteter Embryonen;  $\chi^2$  Signifikanztest \*\*\*  $p < 0,001$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ )



### Abbildung 8.4: Chimärenpaar 3 ist *in vivo* funktional

(A) Die dorsale Überexpression des Chimärenpaares 3 resultiert in einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und (B) veränderter Lokalisation der *chordin* Expressionsdomäne. (C) Statistische Auswertung der *chordin* Phänotypen. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n= Anzahl ausgewerteter Embryonen;  $\chi^2$  Signifikanztest \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*  $p < 0,01$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ )



### Abbildung 8.5: Chimärenpaar 4 ist *in vivo* funktional

(A) Die dorsale Überexpression des Chimärenpaares 4 resultiert in einer Verzögerung des Blastoporuschlusses und (B) veränderter Lokalisation der *chordin* Expressionsdomäne. (C) Statistische Auswertung der *chordin* Phänotypen. (N = Anzahl unabhängiger Experimente; n= Anzahl ausgewerteter Embryonen;  $\chi^2$  Signifikanztest \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ )

## 8.5. Vektorkarten

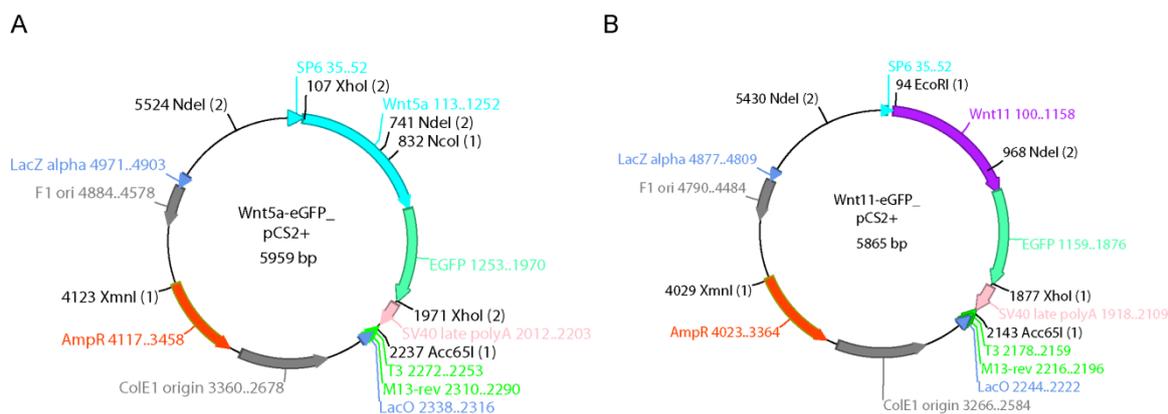


Abbildung 8.6: Plasmidkarten xWnt5a-eGFP und xWnt11-eGFP

(A) xWnt5a ORF und eGFP ORF wurden mit einer Fusions-PCR fusioniert und über XhoI in pCS2+ kloniert. (B) xWnt11 ORF und eGFP ORF wurde mit einer Fusions-PCR fusioniert und über EcoRI in XhoI in pCS2+ kloniert.

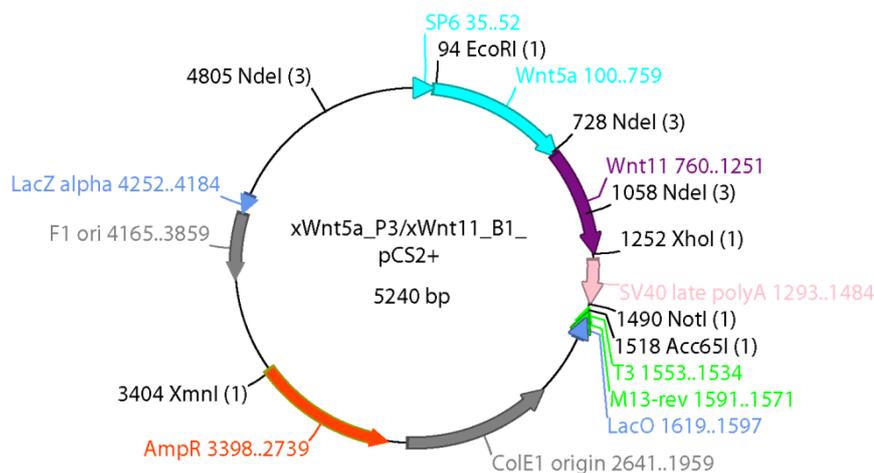
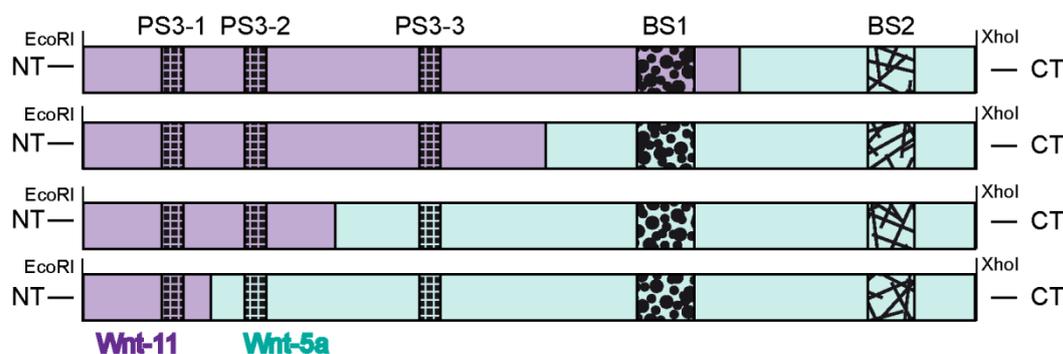
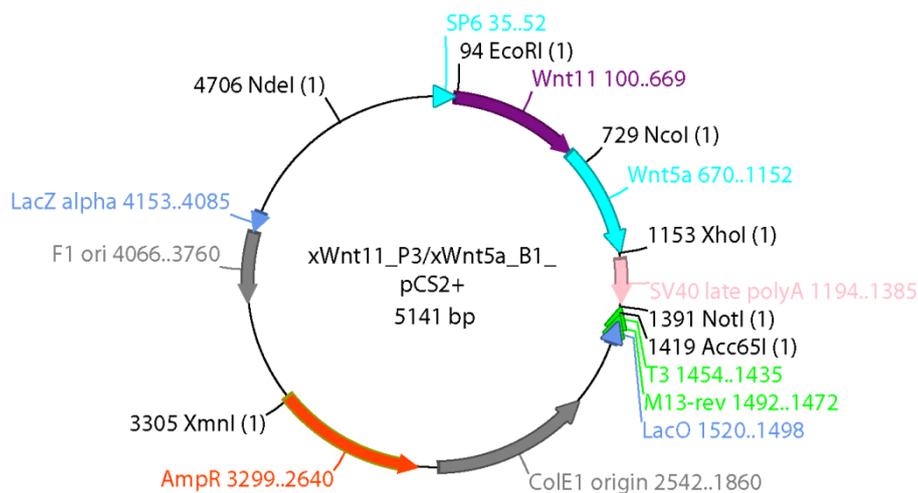


Abbildung 8.7: Klonierung Chimären N-Terminal xWnt5a

Die jeweiligen Anteile von xWnt5a und xWnt11 wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und in einer Fusions-PCR miteinander verbunden und über EcoRI und XhoI in pCS2+ kloniert.



**Abbildung 8.8: Klonierung Chimären N-Terminal xWnt11**

Die jeweiligen Anteile von xWnt11 und xWnt5a wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und in einer Fusions-PCR miteinander verbunden und über EcoRI und XhoI in pCS2+ kloniert.

## 8.6. Inhaltsverzeichnis Begleit-CD

Komplette Excellisten der Zielgene:

xWnt5aMO Zielgene: fache Veränderung: +/- 2; p-Wert <0,05

xWnt11MO Zielgene: fache Veränderung: +/- 2; p-Wert <0,05

xLefMO Zielgene: fache Veränderung: +/- 2; p-Wert <0,05

xWnt5aMO + xWnt11 Zielgene: fache Veränderung: +/- 1,9; p-Wert <0,09

xWnt11MO + xWnt11 Zielgene: fache Veränderung: +/- 1,9; p-Wert <0,09

Zeitauflösende Mikroskopieaufnahmen der Abbildung 5.9.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Doris Wedlich für ihre Förderung und Unterstützung danken und dass sie mir den Aufenthalt am Mount Sinai Hospital im Labor von Prof. Dr. Sergei Sokol ermöglicht hat.

Frau PD Dr. Véronique Orian-Rousseau danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. Dietmar Gradl für die Betreuung und Unterstützung bedanken. Darüber hinaus bei allen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts für die vielen Ratschläge und Diskussionen.

Für die Kollaboration möchte ich mich bei René Dörlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit tatkräftig unterstützt haben. Besonders möchte ich mich für die Unterstützung bei meinem Freund Christoph Tonnier bedanken, sowohl für die seelische und moralische Unterstützung, als auch bei zahlreichen Computerproblemen.

## Publikationen

### Veröffentlichungen

- Kraft, B., Berger, C. D., **Wallkamm, V.**, Steinbeisser, H. and Wedlich, D. (2012). Wnt11 and Fz7 reduce cell adhesion in convergent extension by sequestration of PAPC and C-cadherin. *J Cell Biol* **198**, 695-709.
- Kugler, S. J.; Gehring, E. M.; **Wallkamm, V.**; Krüger, V. and Nagel, A. C. (2011). The Putzig-NURF nucleosome remodeling complex is required for ecdysone receptor signaling and innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **188**, 127-139.
- Rigo-Watermeier, T., Kraft, B., Ritthaler, M., **Wallkamm, V.**, Holstein, T. and Wedlich, D. (2012). Functional conservation of Nematostella Wnts in canonical and noncanonical Wnt-signaling. *Biol Open* **1**, 43-51.
- **Wallkamm, V.**<sup>§</sup>, Dörlich, R.<sup>§</sup>, Rahm, K., Klessing, T., Nienhaus, G. U., Wedlich, D. and Gradl, D. (2014). Live imaging of xWnt5a-Ror2 complexes. Eingereicht bei PLOS ONE. (<sup>§</sup> gleichermaßen beteiligt)

### Poster

- Kraft, B., Berger, C., **Wallkamm, V.**, Steinbeisser, H. and Wedlich, D.: Wnt11 regulates cell adhesion via PAPC in *Xenopus* convergent extension movements. *Retreat FOR1036, 2011*
- Rigo-Watermeier, T., Kraft, B., Ritthaler, M., **Wallkamm, V.**, Holsterin, T. and Wedlich, D.: Functional conservation of Nematostella Wnts in noncanonical Wnt-signaling. *Retreat FOR1036, 2011*
- Rigo-Watermeier, T., Kraft, B., **Wallkamm, V.** and Wedlich, D.: Wnt11 regulates microtubules orientation in *Xenopus* convergent extension movements. *DGZ/FEBS Workshop: The Spider's Web: How microtubules organize cellular space, Potsdam 2011*
- Kraft, B., Berger, C., **Wallkamm, V.**, Steinbeisser, H. and Wedlich, D.: Wnt11 and Fz7 control cell adhesion in convergent extension by sequestration of PAPC und C-cadherin. *Begutachtung FOR1036, 2011*
- Kraft, B., **Wallkamm, V.**, Steinbeisser, H. and Wedlich, D.: Wnt11/Fz7, modulators of cell adhesion by sequestration of cadherins. *14<sup>th</sup> International Xenopus Conference, Frankreich 2012*
- **Wallkamm, V.**, Kraft, B., Rigo-Watermeier, T. and Wedlich, D.: Specific roles of Wnt5a and Wnt11 during *Xenopus* convergent extension movements. *Retreat FOR1036, 2013*
- **Wallkamm, V.**, Klessing, T. and Wedlich D.: Identification of distinct motives responsible for Wnt5a and Wnt11 specific function. *Wnt Symposium Stem Cells - Development - Disease, Heidelberg 2013*

### Vorträge

- Fz7, a new modulator of cell adhesion by sequestration of cadherins. *FOR 1036 Retreat, 2012*
- Specific roles of Wnt5a and Wnt11 during *Xenopus* convergent extension movements. *FOR 1036 Retreat, 2013*
- Specific roles of Wnt5a and Wnt11 during *Xenopus* convergent extension movements. *Seminar Sergei Sokol Group, Mount Sinai Hospital, New York*
- News from Wn5a/11 structural and functional relationship. *Seminar FOR1036, 2014*

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Veronika Wallkamm  
Geburtsdatum: 19.04.1985  
Geburtsort: Stuttgart - Bad Cannstatt  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

09/1996 - 07/2005 Burggymnasium Schorndorf

### Hochschulbildung

---

10/2005 - 11/2010 Studiengang Diplom Biologie, Universität Hohenheim  
Hauptfach: Genetik  
Nebenfächer: Physiologie und Biochemie  
Thema der Diplomarbeit: „Rolle von *putzig* bei der angeborenen Immunantwort in *Drosophila melanogaster*“ vergeben vom Institut für Genetik (Universität Hohenheim)

### Promotion

---

Seit 01/2011 Zoologisches Institut, Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
05/2012 - 05/2013 Feasibility Study of Young Scientists Grant:  
Fluoreszenzmikroskopische Verfolgung der Wnt11/5  
Signalübermittlung  
02/2014 Forschungsaufenthalt in der Gruppe von Prof. Dr. Sergei Sokol, Mount Sinai Hospital, New York