Untersuchung potentieller Zielgene des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von

Susanne Gessert

aus Ulm

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

1	1 Einleitung	7
	1.1 Xenopus laevis als Modellorga	nismus der Entwicklungsbiologie7
	1.2 Wnt-Signalwege	8
	1.2.1 Der kanonische Wnt-Sign	alweg
	1.2.2 Nicht-kanonische Wnt-Sig	nalwege 11
	1.3 Potentielle Zielgene des nicht-	kanonischen Wnt-Signalwegs
	1.3.1 Pescadillo und seine Rolle	e in der Entwicklung 14
	1.3.2 RGM A und seine Bedeut	ung in der Entwicklung 15
	1.3.3 DM-GRASP und seine Ro	Ile in der Entwicklung 20
	1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	
2	2 Material	
	2.1 Organismen	
	2.1.1 Versuchstiere	
	2.1.2 Bakterienstämme	
	2.2 Nukleinsäuren	
	2.2.1 Vektoren	
	2.2.2 cDNA-Klone	
	2.2.3 Oligonukleotide und Morp	nolino-Oligonukleotide
	2.3 Enzyme	
	2.4 Antikorper	
	2.5 Nahrmedien und Zusatze	
	2.6 Losungen und Puffer	
	2.9 Kits	
	2.10 Gerale	
~		
3	3 Methoden	
	3.1 Arbeiten mit Xenopus laevis	
	3.1.1 Haltung der Versuchstiere	
	3.1.2 Stimulation von Xenopus	aevis vveibchen zur Elablage
	3.1.3 IN-VITO Berruchtung von A	enopus laevis Elern
	3.1.4 Entremen der Gallertnulle	
	3.2 IVIIKIUIIJEKIIUI	
	3.2.1 Herstellung von Injektions	12000111
	3.2.2 Die Wiktolijekuon	Morpholipo Oligopkulootido 43
	3.2.3 Entwerter entes antisense	stologische Methoden
	3.3.1 Eiviorung von Embryonon	
	3.3.2 Whole mount in-situ Hybri	disierung M
	333 Doppel-whole mount in-si	uisierung
	334 Brdl LMarkierung von Ver	onus laevis Embruonen /1
	335 TUNEL-Markierung von Xer	enonus laevis Embryonen 50
	3.3.6 Bleichen von Embryonen	52

Transparenzbhandlung von Embryonen	52
Vibratomschnitte	53
Knorpelfärbung (Alcianblaufärbung)	53
Antikörperfärbung am ganzen Embryo	53
eiten in der Zellkultur	54
Kultivieren von HEK-293 Zellen	54
Transfektion von HEK-293 Zellen	54
DAPI-Färbung	54
Antikörperfärbung	54
lekularbiologische Methoden	55
Arbeiten mit RNA	55
Herstellung von RNA-Sonden für die whole mount in-situ	
Hybridisierung	55
<i>In-vitro</i> Transkription und Aufreinigung von mRNA für die	
Mikroinjektion	56
RNA-Präparation aus embryonalem Gewebe	56
cDNA-Synthese	57
PCR	57
Herstellung chemokompetenter Bakterien	59
Herstellung elektrokompetenter Bakterien	59
Chemotransformation kompetenter Bakterien	59
Elektroporation kompetenter Bakterien	60
Kolonie-PCR	60
Anlegen von Gefrierkulturen transformierter Bakterien	61
Plasmidpräparation	61
Sequenzierung	61
Ethanol-Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	62
Agarose-Gelelektrophorese	63
Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	63
Klonieren von DNA-Fragmenten	63
Restriktionsspaltung von DNA	64
Ligation von DNA-Fragmenten	64
Ligation von PCR-Fragmenten in den pCR ^R 4Blunt-TOPO Vektor	65
Blau-Weiß-Selektion	65
Herstellung von Deletionskonstrukten mit Hilfe des STRATAGENE	
Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit	65
In-vitro Transkription/Translation (TNT-Kit)	66
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
nisse	69
scadillo	69
Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von Pescadillo in	
Xenopus laevis	69
Pescadillo als potentielles Wnt-4 Zielgen	70
Beschreibung des Phänotyps nach Funktionsverlust von Pescadill	0
	71
Einfluss der Inhibition von Pescadillo auf die Zellproliferation und	
Zellapoptose	77
	Transparenzbhandlung von Embryonen

	4.1.5	Analyse wichtiger Augenmarkergene bei Funktionsverlust von	
		Pescadillo	80
	4.1.6	Die Funktion von Pescadillo in der Neuralleistenentwicklung	81
	4.1.7	Überexpression von Pescadillo	85
	4.2 RG	GM A	85
	4.2.1	Identifizierung des Klons E12F als RGM A	85
	4.2.2	Isolierung und Klonierung der vollständigen RGM A Sequenz au	IS
		Xenopus laevis	86
	4.2.3	Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von RGM A in	
		Xenopus laevis	89
	4.2.4	Beschreibung des Phänotyps nach Funktionsverlust von RGM A	in
	·	Xenopus laevis	91
	4.2.5	Analyse des Phanotyps nach der RGM A Überexpression	. 103
	4.3 DN		108
	4.3.1	Kionierung zweier Pseudoallele von DM-GRASP	. 108
	4.3.Z	Zeitliches und raumliches Expressionsprofil von Divi-GRASP in	110
	400	Einhindung von DM CDACD in den nicht kongnischen Wet	110
	4.3.3	Signalwag	116
	121	Analyza das Phänatyps nach Euriktionsvarlust von DM GRASP	. 110
	4.3.4	Intersuchung von Herzmarkergenen nach Verlust der DM-GRA	
	4.0.0	Funktion	121
	436	Finbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Herzgen	e 124
_			400
5		SSION	130
5	5 1 Die F	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der	.130
5	5.1 Die F	ssion unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung.	.130
5	5.1 Die F anter 5.1.1	ssion unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig	. 130 130 130
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren	. 1 30 130 130
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	. 130 130 130 134
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung	. 130 130 130 134 137
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.3 5.1.4	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von Xenopus laevis Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven	. 130 130 130 134 137 139
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.3 5.1.4 5.1.5	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung	. 130 130 130 134 137 139 140
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge	. 130 130 134 137 139 140 ene
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die	SION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge Rolle von DM-GRASP in der Herzentwicklung M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142 144
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2	 SSION Junktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge ROILE von DM-GRASP in der Herzentwicklung M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge 	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142 144 ene
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung. Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig. RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> . Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung. RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven. DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge Rolle von DM-GRASP in der Herzentwicklung M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142 144 ene 145
5	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan	SSION. Tunktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung. Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig. RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> . Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung. RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven. DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142 ene 145 148
5 67	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan Sumn	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge Rolle von DM-GRASP in der Herzentwicklung M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge mmenfassung	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142 144 ene 145 145 .148 150
5 677	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan Sumn Litera	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge nmenfassung http:	. 130 130 130 134 137 139 140 ene 141 142 144 ene 145 .148 .150 .151
5 6778	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan Sumn Litera Anhar	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung. Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig. RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> . Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung. RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven. DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung . Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge Rolle von DM-GRASP in der Herzentwicklung M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge mmenfassung. Mary	. 130 130 130 134 137 139 139 140 ene 141 142 144 ene 145 .148 .150 .151 .165
5 6778	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan Sumn Litera Anhar 8.1 Ab	SSION unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung. Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig. RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> . Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung. RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven. DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge nmenfassung . Nary. Kürzungsvereichnis	. 130 130 130 134 137 139 139 140 ene 141 142 144 ene 145 .148 .150 .151 .165 165
5 6778	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan Sumn Litera Anhar 8.1 Ab 8.2 Vo	SSION. Unktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der ioren Neuralentwicklung. Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig. RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von <i>Xenopus laevis</i> . Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung. RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven. DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielge Rolle von DM-GRASP in der Herzentwicklung M-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markerge nmenfassung Nary. tur Iständige Nukleotidsequenz der Pescadillo mRNA.	. 130 130 130 134 137 139 139 139 139 140 ene 141 142 144 ene 145 . 148 . 150 . 165 165
5 6778	DISKU 5.1 Die F anter 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.2 Die 5.2.1 D 5.2.2 Zusan Sumn Litera Anhar 8.1 Ab 8.2 Vo 8.3 Vo	SSION	. 130 130 130 134 137 139 139 139 140 ene 141 142 144 ene 145 . 145 . 150 . 165 168 169

8.5	Voll	ständige Nukleotidsequenz der RGM A2 mRNA	173
8.3	Vek	torkarten	175
8.3.	1	pCS2+ Vektorkarte	175
8.3.	2	pCR ^R 4-TOPO	176
8.3.	3	pCR ^R 4Blunt-TOPO	177
8.3.	4	pCR ^R -TOPO	178

1 Einleitung

1.1 Xenopus laevis als Modellorganismus der Entwicklungsbiologie

Der südafrikanische Krallenfrosch Xenopus laevis ist einer der wichtigsten Modellorganismen zur Untersuchung der Embryogenese von Wirbeltieren. Er weist viele Vorteile auf. Durch eine einfache Hormoninjektion kann in Xenopus laevis Weibchen die Eiablage induziert werden. Die Befruchtung der Eier wie auch die weitere Embryonalentwicklung verlaufen außerhalb des Körpers, wodurch die Entwicklung der Embryonen unter dem Binokular verfolgt werden kann. Da die Eier relativ groß sind, lässt sich die Embryonalentwicklung der Xenopus laevis Embryonen sehr leicht durch Mikromanipulation und Mikroinjektion mechanische verschiedener Substanzen beeinflussen. Durch die Mikroinjektion sequenzspezifischer antisense Morpholino-Oligonukleotide kann die Translation der korrespendierenden endogenen mRNA unterdrückt werden. Mit Hilfe der Mikroinjektion von mRNA lassen sich Überexpressionsstudien durchführen. Die unterschiedliche Größe und Pigmentierung der einzelnen Blastomere ermöglichen die spezifische Mikroinjektion in bestimmte Blastomere. Dadurch können gewünschte Gewebe beeinflußt werden, da dass Schicksal der einzelnen Blastomere schon zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung festgelegt ist (Moody, 1987). Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Entwicklung der Embryonen innerhalb weniger Tage vom Einzeller zur ausgewachsenen Kaulquappe (Abb. 1), was eine schnelle Auswertung der Experimente erlaubt.

Die Hauptnachteile von *Xenopus laevis* als Modellorganismus sind die lange Generationszeit (1-2 Jahre) und die Pseudotetraploidität (Sive *et al.*, 2000). Der *Xenopus (Silurana) tropicalis* besitzt diese Nachteile hingegen nicht. Sofern genetische Fragestellungen untersucht werden sollen, stellt der *Xenopus (Silurana) tropicalis* eine Alternative zu *Xenopus laevis* dar, da er hat eine Generationszeit von fünf oder weniger Monaten besitzt und diploid ist.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* von der Befruchtung des Eies bis zum adulten Tier bei 25 °C. Das Blastulastadium ist schon ca. 5-6 Stunden nach der Befruchtung erreicht. Nach ca. 13 Stunden beginnt die Gastrulation und ca. 7 Stunden später wird das Neurulastadium erreicht; anschließend beginnt die Organogenese. 4 Tage nach der Befruchtung hat sich der Embryo schon zu einer freischwimmenden Kaulquappe (Stadium 45) entwickelt und nach ca. 60 Tage und einer Metamorphose entsteht zuletzt der adulte Frosch (Quelle: http://cda.mrs.umn.edu/~myersp/Conv1/xenopus.html).

1.2 Wnt-Signalwege

Mitglieder der Wnt-Familie stellen extrazelluläre Glykoproteine dar, die eine Vielzahl von wichtigen Funktionen während der Embryogenese besitzen. Der Name Wnt setzt sich als Chimäre aus den Bezeichnungen für die Gene <u>Wingless</u> (Drosophila) und Int-1 (Maus) zusammen (Cabrera *et al.*, 1987; Rijsewijk *et al.*, 1987). Die Bezeichung *Wingless* stammt aus Beobachtungen bei der Fruchtfliege *Drosophila melangonaster*, bei der Mutationen im *Wingless*-Gen zu flügellosen Organismen führen (Sharma und Chopra, 1979). Das *Int*-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression durch die

Integration des *Mouse Mammary Tumorvirus* (MMTV) in der Nähe des Int1-Gens (heute Wnt-1) aktiviert wird (Nusse und Varmus, 1982). In Vertebraten sind 19 Mitglieder dieser Famile bekannt. Die Wnt-Faktoren zeichnen sich durch ein Signalpeptid und 23-24 konservierte Cysteinreste in der Aminosäuresequenz aus. Die Proteinlänge beträgt ca. 350-360 Aminosäuren (Abb. 2). In folgende Prozesse sind Wnt-Faktoren beispielsweise involviert: Kardiogenese (Wnt-11, Pandur *et al.*, 2002), Nephrogenese (Wnt-4; Stark *et al.*, 1994), Chondrogenese (Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-4b; Hartmann und Tabin, 2000), Extremitätenenwichklung (Wnt-3a, Wnt-5a; Church und Francis-West, 2002) und Karzinogenese (Polakis, 2006). Wnt-Faktoren aktivieren verschiedene Signalwege, zum einen den kanonischen, zum anderen den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, die beide im Folgenden beschrieben werden.





Wnt-Faktoren zeichnen durch das Vorhandensein eines Signalpeptids (blau, S) und 23-25 konservierte Cysteinreste aus. Frizzled-Rezeptoren bestehen aus einem Signalpeptid (blau, S), einer extrazellulären cysteinreichen Domäne (CDR), sieben Transmembrandomänen und einem cytoplasmatischen Schwanz. <u>Dish</u>evelled (Dsh)-Faktoren beinhalten eine DIX (<u>dishevelled und axin;</u> rot)-, PDZ (<u>post synaptic density</u>, orange)- und DEP (<u>dsh-EGL10-Pleckstein</u>; grün)-Domäne. Zudem beinhaltet es eine basische Domäne (schwarz, b).

1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg kontrolliert die Expression seiner Zielgene durch die Regulation der Menge an zytoplasmatischem β -Catenin (Abb. 3). In Abwesenheit von Wnt-Proteinen wird der zytoplasmatische, lösliche Faktor β -Catenin von der GSK3 β (<u>Glycogen-Sythetasekinase-3 β </u>) phosphoryliert und somit im 26S Proteasom abgebaut. Im Falle einer Wnt-Aktivierung bindet der Faktor Wnt zum einen an einen Rezeptor der Frizzled-Familie als auch an den Korezeptor LRP (low-density-lipoprotein receptor-Frizzled-Rezeptoren bestehen Signalpeptid, related protein). aus einem einer extrazellulären cysteinreichen Domäne, einem hydrophilen sieben Linker, Transmembranhelices und einem cytoplasmatischen Schwanz (Abb. 2,3). Im Gegensatz zu den Frizzled-Rezeptoren beinhalten die LRP-Rezeptoren nur eine Transmembrandomäne, zwei Frizzled-Motife, extrazellulär fünf EGF (epidermal growth factor)-Repeats und drei LDL-Rezeptorrepeats des Typ A (Pandur und Kühl, 2001). Aufgrund der Bindung von das zytoplasmatische Protein Dsh (dishevelled) aktiviert (Abb. 2,3). In Wnt wird Drosophila wurde gezeigt, dass die DIX (dishevelled und axin)-Domäne für die Weiterleitung des Wnt/β-catenin Signals notwendig ist (Yanagawa et al., 1995), während der Verlust der DEP (dsh-EGL10-Pleckstein)-Domäne keinen Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg ausübt (Boutros et al., 1998). Dies wiederum führt zu einer Inhibition der GSK3 β und einer Akkumulation von nicht-phosphoryliertem β -Catenin im Zytoplasma der Zelle.
ß-Catenin wird nachfolgend in den Zellkern eingeschleußt und assoziert dort mit den HMG (high mobility group)-Box-Transkriptionsfaktoren der TCF (*T-cell factor*)-LEF (*lymphocyte enhancer factor*)-Familie. β-Catenin/TCF-LEF aktivieren kanonische Wnt-Zielgene wie Siamois und Xnr-3 (xenpous nodal-related 3).

Die Aktivierung des kanonische Wnt-Signalwegs führt in *X. laevis* Emryonen zur Ausbildung einer zweiten Körperachse (McMahon und Moon, 1989). Die Bildung von Doppelachsen kann nicht nur von Wnt-Faktoren wie Wnt-1, Wnt-2 und Wnt-3a ausgelöst werden (Wodarz und Nusse, 1998), auch die Überexpression von anderen Komponenten des kanonischen Signalweges wie Dsh und β -Catenin führen zur Induktion einer 2. Körperachse (Dominguez *et al.*, 1995, Guger und Gumbiner, 1995, He *et al.*, 1995, Sokol *et al.*, 1995). Im Gewebekultursystem bewirkt die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs die Transformation von C57mg-Zellen mit hoher Frequenz (Wong *et al.*, 1994). Des Weiteren ist der kanonische Wnt-Signalweg an der Ausbildung der dorsoventralen Achse, der Posteriorisierung von Neuralgewebe und der Neuralleisteninduktion beteiligt (Logan und Nusse, 2004)



Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Wnt-Signalwege.

A. Kanonischer Wnt-Signalweg. Der Wnt-Faktor bindet gleichzeitig an den Frizzled-Rezeptor und den Korezeptor LRP (*low-density-lipoprotein receptor-<u>r</u>elated protein*). Dies führt zur Aktivierung von Dsh (*dishevelled*). Dsh inhibiert die Aktivität der GSK-3β (<u>G</u>lycogen-<u>S</u>ythase<u>k</u>inase-3β), welche ansonsten β-Catenin phosphoryliert und für die Degradation markiert. Die Inhibition von GSK-3β resultiert in der Kernlokalisation von β-Catenin in den Zellkern, wo β-Catenin mit den DNA-bindenden TCF/LEF-Faktoren interagiert und Wnt/β-Catenin-Zielgene aktiviert. B. PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg. Das Wnt-Signal wird von Dsh an die GTPasen Rho, Rac und cdc42 weitergeleitet. Wahrscheinlich erfolgt die Dsh-abhängige Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*) und ROK (<u>Rho</u>-abhängige Kinase) von den GTPasen der Rho-Familie. C. Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Das Wnt-Signal wird über den Frizzled-Rezeptor in die Zelle geleitet, wo Ca²⁺ freigesetzt wird. Die Ca²⁺-Freisetzung führt zur Aktivierung der Calmodulinkinase II (CamKII) und der Proteinkinase (PKC). Die Ca²⁺-Freisetzung wird durch Dsh, PLCβ (<u>Phospholipase Cβ</u>) und IP₃ (Inositolphosphat) vermittelt. Die Aktivierung von PKC geschieht über PLC und DAG (<u>Diacylglycerin</u>).

1.2.2 Nicht-kanonische Wnt-Signalwege

1993 beobachteten Moon *et al.*, dass nicht alle Wnt-Signale durch β -Catenin vermittelt werden. Es wurde deutlich, dass nicht alle Wnt-Faktoren, wie zB. Wnt-4, -5a und -11, die Fähigkeit besitzten, eine zweite Körperachse in *Xenopus* Embryonen zu induzieren (Du *et*

al., 1995) oder C75mg-Zellen zu transformieren (Wong *et al.*, 1994). Dennoch sind diese Faktoren biologisch aktiv, da sie bei Überexpression Zellbewegungen verändern (Moon *et al.*, 1993) und die Zelladhäsion herabsetzen können (Torres *et al.*, 1996). Im nichtkanonischen Signalweg wird das Wnt-Signal nicht durch β -Catenin, sondern durch andere Faktoren wie JNK (*c-Jun <u>N</u>-terminale <u>K</u>inase)*, CamKII (*Ca²⁺/<u>Calm</u>odulin-dependent <u>k</u>inase II) oder PKC (<u>P</u>roteinkinase <u>C</u>) vermittelt. Nicht-kanonisches Wnt-Signal konnte mit einigen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden, wie z.B. den Gastrulationsbewegungen (Heisenberg <i>et al.*, 2000), der Augenentwicklung (Cavodeassi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Maurus *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2001) oder der Neuralleistenwanderung (De Calisto *et al.*, 2005).

Der PCP (planar cell polarity)-Signalweg

Viele Epithelien in *Drosophila* weisen eine planar in der Epithelfläche verlaufene Polarität auf. In den Flügeln bildet jedes Haar apikal einen feinen Fortsatz (Trichom) aus. Dieser Fortsatz zeigt im Flügelepithel nach distal. Es wurde gezeigt, dass Frizzled an der korrekten Orientierung der Trichome in den Flügeln von *Drosophila* beteiligt ist (Wong und Adler, 1993; Strutt, 2003). Studien in *Drosophila* zeigten, dass der sogenannte PCP/JNK-Signalweg an der korrekten Polarität dieser Epithelien beteiligt ist. Im tierischen Organismus gibt es viel Stellen, wo die Polärität von Zellen oder Haaren eine wichtige Rolle für die Funktion einzelner Organe spielt. Haare oder Federn auf der Haut zeigen in eine bestimmte Richtung, Cilien des Epitheliums schlagen in eine gezielte Richtung und die sensorischen Härchen im Ohr besitzen eine Polarität (Eaton, 1997; Strutt, 2003).

In Vertebraten wurde gezeigt, dass im PCP-Signalweg ein Wnt-Faktor an einen Frizzled-Rezeptor bindet, der wiederum sein Signal über Dishevelled an das Zellinnere weitergibt (Abb. 3). Für diese Weiterleitung des nicht-kanonischen PCP-Signals wurde gezeigt, dass die DEP-Domäne des Dishevelled-Proteins eine entscheidende Rolle spielt (Boutros *et al.*, 1998). Für die folgende Signaltransduktion gibt es unterschiedliche Berichte. In einem Bericht in *Drosophila* erfogt diese über die kleine GTPase Rho (Strutt *et al.*, 1997), die wiederum die Rho-abhängige Kinase (ROK) (Winter *et al.*, 2001) aktiviert. Habas *et al.*, 2003). In ihrem Bericht zeigten sie, dass die Aktivierung von JNK mittels Rac und unabhängig von Rho geschieht. Andere Daten jedoch weisen darauf hin, dass für die JNK- Aktivierung Rac und Cdc42 benötigt wird (Moriguchi *et al.*, 2003). Durch die Aktivierung des JNK-Signalweges kommt es zur Regulation bestimmter Gene wie z.B. Inturned (Park *et al.*, 1996), Fuzzy (Collier und Gubb, 1997), Notch oder Delta (Tomlinson und Struhl, 1999).

Der Wnt/Ca²⁺Signalweg

Nicht-kanonisches Wnt-Signal kann auch am intrazellulärem Ca²⁺-Austoß beteiligt sein (Abb. 3; Veeman *et al.*, 2003). Im Blastulastadium des Zebrafisches bewirkt die Überexpression von Wnt-5a oder Frizzled-2 einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom in die Zellen (Slusarski *et al.*, 1997a; Slusarski *et al.* 1997b). In *Xenopus* Embryonen führt die Überexpression von Wnt-5a oder Wnt-11 zur Aktivierung der Ca²⁺-sensitiven Proteinkinase C (PKC; Sheldahl *et al.*, 1999) und der CamKII (Kühl *et al.*, 2000a). Dieser Signalweg wurde als der Wnt/Ca²⁺-Signalweg benannt, um ihn vom Wnt/β-Catenin-Signalweg zu unterscheiden (Kühl *et al.*, 2000b). Auch in diesem Signalweg erweist sich Dishevelled als wichtiger Mediator (Sheldahl *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde gezeigt, dass das Deletionskonstukt Dsh Δ DIX, dass sich im Wnt/β-Catenin Signalweg als inaktiv erwiesen hat, ausreichend ist, um den Wnt/Ca²⁺-Signalweg zu aktivieren. Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass der Wnt/Ca²⁺Signalweg an der Genregulation beteiligt ist.

1.3 Potentielle Zielgene des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs

In dieser Arbeit wurden drei potentielle Zielgene des nicht-kanonischen Signalwegs in *Xenopus laevis* untersucht. Hierbei handelt es sich um die Gene Pescadillo, RGM A (*repulsive guidance molecule A*) und DM-GRASP (GRASP = *immunoglobulin-like restricted axonal surface protein;* DM = *that is expressed in the dorsal funiculus and ventral midline of the chick spinal cord*). Pescadillo und RGM A wurden aus Neuralgewebe von *Xenopus laevis* isoliert (Maurus *et al.*, 2005), während DM-GRASP als nicht-kanonisches Wnt-Zielgen in C57mg-Zellen identifiziert wurde (Prieve und Moon, 2003). In den folgenden Kapiteln wird näher auf die einzelnen Gene eingegangen.

1.3.1 Pescadillo und seine Rolle in der Entwicklung

Das Pescadillo-Gen ist evolutionär stark konserviert. Seine Sequenz weist zwischen verschiedenen Spezies, wie z.B. Hefe (Saccharomyces cerevisiae), Zebrafisch (Danio rerio), Maus (Mus musculus), Krallenfrosch (Xenopus laevis) und Mensch (Homo sapiens), eine hohe Homologie auf (Kinoskita et al., 2001). Die Pescadillo-Proteinsequenz von Zebrafisch, des Menschens und des Krallenfrosches weist eine Identität von 79-84 % auf. Das Protein besitzt eine Länge, die, je nach Spezies, zwischen 582 und 605 Aminosäuren liegt (Allende et al., 1996). Innerhalb von Pescadillo gibt es verschiedene Domänen (Lerch-Gaggl et al., 2002). Eine wichtige Domäne ist die BRCT (BRCA1 carboxyl-terminal)-Domäne. Diese Domäne wurde in dem BRCA1 (breast cancerassociated)-Protein entdeckt, das bei der Entstehung von Brustkrebs eine Rolle spielt (Bork et al., 1997). Diese Domäne besitzt die Fähigkeit, mit Proteinen zu interagieren, welche einen Einfluss auf die Tumorunterdrückung, die DNA-Reparatur, den Zellzyklus und die Transkriptionsregulation haben (Callebaut et al., 1996; Bork et al., 1997; Williams et al., 2001). Des Weiteren enthält Pescadillo eine SUMO (small ubiquitin modification)-Domäne, eine Bindungsstelle für SUMO-1. SUMO-1 kann durch eine posttranslationale Modifikation an die SUMO Domäne von Pescadillo angefügt werden, wobei die Proteingröße von Pescadillo von 72 kDa auf 94 kDa zunimmt. Wahrscheinlich ist SUMO-1 für Protein-Protein-Interaktionen essentiell, was für das Überleben des Organismuses erforderlich ist (Lerch-Gaggl et al., 2002). Zusätzlich weist Pescadillo zwei Abschnitte aus sauren Aminosäuren (Glutamin- und Aspartatsäure), eine Domäne für die Kernlokalisation (NLS (nuclear localisation signale)-Domäne) und mehrere Thyrosin/Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen auf (Abb. 4).



Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Xenopus laevis* Pescadillo-Proteins mit seinen verschiedenen Domänen. Die Länge des *Xenopus laevis* Pescadillo beträgt 574 Aminosäuren. Die einzelnen Domänen sind farbig gekennzeichnet (rot= BRCT (<u>BRCA1 carboxyl-terminal</u>)-Domäme, orange= SUMO (<u>small ubiquitin modification</u>)-Domäne, gelb= NLS (<u>nuclear localisation signal</u>)-Domäne).

Ursprünglich wurde Pescadillo im Rahmen eines Mutagenesescreens im Zebrafisch identifiziert (Allende *et al.*, 1996). Während der Embryonalentwicklung des Fisches ist Pescadillo im Auge, im Vorderhirn, im Tectum, in den Somiten, den Branchialbögen, Brustflossen, Leber- und Pankreasvorläufern sowie im Darm exprimiert. Im weiblichen Adult ist Pescadillo auch in den Ovarien zu beobachten. Mutationen im Pescadillo-Gen haben beim Zebrafisch-Embryo eine reduzierte Größe der Augen, des Gehirns, des Unterkiefers, des Knorpels und den pectoralen Flossen zur Folge. Nach drei Tagen kommt das Wachstum des Darms zum Erliegen, die Muskulatur wird abgebaut und letztendlich tritt der Tod des Embryos ein (Allende *et al.*, 1996). Pescadillo defiziente Mausembryonen verweilen im Präimplantationsstadium der Entwicklung (Lerch-Gaggl *et al.*, 2002).

Studien in Zellkultursystemen der Hefe oder eukaryotischen Organismen deuten darauf hin, dass Pescadillo eine wichtige Aufgabe in der ribosomalen Biogenese, der Zellproliferation, der DNA-Replikation und der Regulation der Gentranskription besitzt (Adams *et al.*, 2002; Du und Stillman, 2002; Grimm *et al.*, 2006; Lapik *et al.*, 2004; Lerch-Gaggl *et al.*, 2002; Oeffinger *et al.*, 2002; Sikorski *et al.*, 2006). Eine Fehlregulation von Pescadillo kann zu Krebs und chromosomaler Instabilität führen (Killian *et al.*, 2004; Kinoshita *et al.*, 2001; Maiorana *et al.*, 2004; Prisco *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Pescadillo mit den Faktoren Bop1 und WDR12 interagiert, die beide für die prä-RNA Verarbeitung während des Zusammenbaus der 60S rRNA erforderlich sind (Holzel *et al.*, 2005; Lapik *et al.*, 2004). Als weiterer Bindungspartner von Pescadillo stellte sich das IRS-1 (*insulin receptor gubstrate-1*) heraus, ein wichtiger Faktor des Insulin-Signalweges (Maiorana *et al.*, 2004). Der Faktor IRS-1 ist in verschiedenen Vorgängen wie Zelldifferenzierung und -migration eingebunden (Reiss *et al.*, 2000). Neueste Daten haben zudem gezeigt, dass Pescadillo mit Mtap 1b (*microtuble associated protein 1b*) interagiert (Lerch-Gaggl *et al.*, 2007).

1.3.2 RGM A und seine Bedeutung in der Entwicklung

RGM (*repulsive guidance molecule*) ist ein membrangebundenes Glykoprotein, welches zuerst im Hühnchen identifiziert wurde (Stahl *et al.*, 1990). Dort zeigte es abstoßende Eigenschaften auf wachsende Axone der Retina, woher sein Name rührt. Folglich wurde

das Molekül aus dem Tectum des Hühnchens isoliert (Monnier *et al.*, 2002). RGM ist ein Glykoprotein mit einem GPI (*glycosylphosphatidylinositol*)-Anker, das keinerlei signifikante Homologien zu anderen bekannten "Axon-wegleitenden" Moleküle aufweist (Matsunaga und Chédothal, 2004). RGM beinhaltet ein Signalpeptid am N-Terminus, eine RGD (Argingin, Glycin, Asparagin)-Sequenz, eine von Willebrand Faktor Typ D (vWF-Typ D) Domäne, eine hydrophobe Domäne und eine Anheftungsstelle für einen GPI-Anker am C-Terminus (Abb. 5; Yamashita *et al.*, 2007).



Abbildung 5: Schematische Darstellung von RGM A aus *Xenopus laevis*. *Xenopus laevis* RGM A beinhaltet verschiedene Domänen: ein Signalpeptid (dunkelrot), eine RGD (Argingin, Glycin, Asparagin)-Sequenzstelle (hellrot), eine von Willebrand Faktor Typ D (vWF) Domäne (orange), eine hydrophobe Region (gelb) und Anheftungsstelle für einen GPI-Anker (grün).

Die Funktion des N-terminalen Signalpeptids besteht darin, dass RGM in das Endoplasmatische Retikulum zu führen. Es wurde gezeigt, dass Proteine mit einer RGD-Sequenz ein wichtiges Erkennungsystem für Zelladhäsion darstellen (Ruoslahti, 2004). Aufgrunddessen ist anzunehmen, dass diese Sequenz im RGM-Protein eine Rolle in Zell-Zell-Interaktionen spielt (Matsunaga *et al.*, 2004). In der vWF-Typ D Domäne sind die wichtigsten Aminosäuren des von Willebrand Faktors zu finden (Monnier *et al.*, 2002). Der von Willebrand Faktor ist ein Glykoprotein im Blut, der für die normal Hämostase notwendig ist (Sadler, 1998). Innerhalb dieser Domäne befindet sich eine putative Schnittstelle, doch die genaue Aufgabe dieser Domäne ist noch nicht beschrieben.

In der Maus sind drei Homologe von RGM bekannt: RGM A, B (auch bekannt als Dragon) und C (auch bekannt als hemojuvelin oder HJV) (Niederkofler *et al.*, 2004; Oldekamp *et al.*, 2004; Schmidtmer und Engelkam, 2004). In *Xenopus* sind bisher nur RGM A und B beschrieben, während im Hühnchen ausschließlich ein RGM studiert wurde, welches im Sequenzvergleich die größte Homologie mit dem RGM A der Maus aufweist (Schmidtmer und Engelkamp, 2004; Yamashita *et al.*, 2007).

17

In der Maus wurden die Expressionsprofile der drei RGM Homologe sehr detailliert untersucht (Oldekamp et al., 2004; Schmidtmer und Engelkamp, 2004). RGM A und B sind während der ganzen Entwicklung hauptsächlich im ZNS (zentralen Nervensystem) exprimiert, während RGM C ausschließlich in der gestreiften Muskulatur und der Herzmuskulatur zu finden ist. Am Embryonaltag 9,5 wurde RGM A im Telencephalon, Diencephalon, Mittel- und Hinterhirn und Rückenmark detektiert, was sich während der gesamten Embryogenese fortsetzt. Die Grenzen zwischen Vorder- und Mittelhirn und Mittel- und Hinterhirn zeigen keine RGM A Expression (Schmidtmer und Engelkamp, 2004). Zusätzlich ist RGM A im Epithelium der Cochlea, in den Lungenvorläufern und schwach in den hinteren Extremitäten exprimiert (Oldekamp et al., 2004). Schnitte durch das Neuralrohr der Maus am Embryonaltag 10,5 zeigen eine graduelle RGM A Expression. Die stärkste RGM A Färbung wurde in der Bodenplatte und im medialen Bereich des Neuralrohrs detektiert. Das dorsale Neuralrohr und der Bereich der Motoneuronen sind frei von RGM A (Schmidtmer und Engelkamp, 2004). Am Embryonaltag 13 ist RGM A im sich entwickelten Auge im perioptischen Mesenchym zu finden (Schmidtmer und Engelkamp, 2004). Im Hühnchen wurde gezeigt, dass RGM während der Embryogenese im Tectum exprimiert ist (Monnier et al., 2002). Dort zeigt es eine graduelle Expression mit höher werdender Konzentration zum posterioren Ende hin. In Xenopus laevis borealis wurde RGM A in Stadium 31 im gesamten Gehirn, dem Rückenmark, den Somiten und den Branchialbögen detektiert (Wilson und Key, 2006).

Erste funktionelle Studien zeigten, dass RGM eine abstoßende Wirkung auf wachsende Nervenzellen hat (Stahl et al., 1990). Im Hühnchen hat RGM eine abstoßende Funktion auf Axone der Retina, was in in-vitro Experimenten dargestellt wurde (Monnier et al., 2002). In Mausembryonen konnte dieser Effekt hingegen nicht beobachtet werden (Niederkofler et al., 2004). Die Ursache für diese unterschiedlichen Funktionen von RGM in Hühnchen und Maus ist noch nicht geklärt. In der Maus ist RGM B in den retinalen Ganglien exprimiert. Dies könnte ein Hinweis sein, dass in diesem Organismus RGM B an der Projektion Nervenzellen (Yamashita al.. 2007). dieser beteiligt ist et Funktionsverluststudien von RGM A in der Maus machten deutlich, dass dieses Protein eine essentielle Funktion in der Neuralrohrentwicklung hat. Die Mausembryonen zeigten Störungen in der Schließung des Neuralrohrs, woraus in adulten Mäusen eine Exencephalie und morphologische Veränderungen des dorsalen Gehirns entstanden (Niederkofler *et al.*, 2004). 2006 konnte die abstoßende Wirkung von RGM A auf Nervenzellen erstmals in *invivo* Studien bestätigt werden (Matsunaga *et al.*, 2006; Wilson und Key, 2006). Im Hühnchen hat die Störung der RGM A Expression eine Störung der retinotectalen Projektion zur Folge (Matsunaga *et al.*, 2006). In *Xenopus* Embryonen führt der Verlust von RGM A zu einem gestörten axonalen Gerüst im Vorderhirn (Wilson und Key, 2006). Auch in der Maus erwies sich RGM A als wichtiges Wegweisermolekül für Axone im Gehirn, speziell im Hippocampus (Brinks *et al.*, 2004). Dort ist RGM A an der Bildung der afferenten Verbindungen im *Gyrus dentatus* beteiligt. Weitere Studien belegen, dass RGM A eine negative Wirkung auf die Heilung verletzten Gewebes ausübt. In Ratten wird RGM A nach einer Verletzung des Rückenmarks an der verletzten Stelle hochreguliert (Schwab *et al.*, 2005). Weierhin weist RGM A eine hemmende Funktion auf die Heilung verletzten Gewebes des ZNS auf und verhindert die Regeneration der Axone an der Wunde (Hata *et al.*, 2006).

Rajagopalan et al. erbrachten 2004 in Hühnchen den Beweis, dass Neogenin ein Rezeptor für RGM ist (Abb. 6). Ursprünglich wurde Neogenin als Rezeptor für Netrin-1 charakterisiert (Livesey, 1999). Neogenin besitzt vier Ig-Domänen, sechs Fibronektin-Einheiten, eine Transmembran- und eine intrazelluläre Domäne. Die Interaktion mit RGM erfolgt wahrscheinlich über die Fibronektin-Domäne (Matsunaga und Chedotal, 2004). Neogenin wurde urprünglich als Homolog von DCC (deleted in colorectal cancer) beschrieben (Vielmetter et al., 1994) und ist in viele Prozessen der Entwicklung, wie der Bildung des Neuralrohrs und der Milchdrüse, der Myogenese und der Angiogenese, involviert (Cole et al., 2006). Die Überexpression von Neogenin führt zu einer erhöhten Zellapoptose, während die Co-Überexpression von RGM diese herunterreguliert; auch ein Deletionskonstrukt von RGM, in welchem der GPI-Anker fehlt, führt zu diesem Effekt (Matsunaga und Chedotal, 2004). Analog zu verwandten Lenkmolekülen, wie z. B. den Ephrinen, konnten erste Mitglieder des RhoA/Rho Kinase-Signalwegs als Effektoren von RGM A identifiziert werden (Hata et al., 2006). Von den Rho GTPasen ist bekannt, dass sie das intrazelluläre Aktinzytoskelett verändern und somit auch das axonale Auswachsen (Hall, 1998).



Abbildung 6: Mögliche Transduktionswege von RGM A.

A. Im konventionellen BMP-Signalweg bindet ein BMP (bone morphogenetic protein)-Faktor an die Serin/Threonin Kinase Rezeptoren BMPRI und BMPRII. In Folge dessen wird der BMP-Rezeptor I phosphoryliert. Dieser wiederum aktiviert einen Smad-Faktor im Inneren der Zelle durch Phosphorylation, woraufhin BMP-Zielgene reguliert werden (Liu und Niswander, 2005). Netrin-1 interagiert mit dem Rezeptor Neogenin bzw. DCC (deleted in colorectal cancer). Für die Signalweiterleitung gibt es verschiedene Hinweise. Zum einen wurde beschrieben, dass DCC mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor A2b interagiert und die Bindung von Netrin-1 an beide Rezeptoren zur Akkumulation von cAMP führt (Corset et al., 2000). Zum anderen kann DCC das MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signal aktivieren (Forcet et al., 2002). B. Für die RGM A Signalweiterleitung sind zwei verschiedene Signaltransduktionen beschrieben. Zum einen kann RGM A sein Signal über den BMP-Weg vermitteln, indem es gleichzeitig an den BMP Rezeptor II (BMPRII) und den Activin RII (Rezeptor Typ IIA) bindet. Dies bewirkt eine Phosphorylierung von BMPRI und darauffolgend die Aktivierung eines Smad-Faktors (Xia et al., 2007). Dadurch kommt es zur Aktivierung von Id1 (inhibitor of differentiation; Babitt et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit der RGM A Transduktion kann Neogenin-vermittelt geschehen. Hierbei interagiert RGM A mit dem Neogenin-Rezeptor. Die Signalweiterleitung kann entweder über PKC oder GTPase RhoA und ROK (Rho-ahängige Kinase) geschehen (Conrad et al., 2007). Funktionen der einzelnen Signalwege sind in die Darstellung integriert.

Neueste Studien konnten bestätigen, dass RhoA, PKC oder die Rho Kinase wichtige Elemente des RGM A-vermittelten Neogenin Signaltransduktionsweges für die axonale Wegfindung sind (Conrad *et al.*, 2007).

Unabhängig von Neogenin können RGM A, B sowie C auch als BMP-Korezeptoren fungieren, indem sie BMP-2 und BMP-4 binden (Abb.6; Babitt *et al.*, 2005; Samad *et al.*, 2005; Babitt et al., 2006; Xia et al., 2007). BMPs (*bone morphogenetic proteins*) sind Mitglieder der TGF- β (*transforming growth factor*) Familie, welche an der Regulation von z.B. der Zellproliferation, -apoptose, -differenzierung und Chemotaxis beteiligt sind. Gleichzeitig können sie mit ihrer extrazellulären Domäne an den BMP Typ-I Rezeptor binden. Nach der Aktivierung von RGM A kommt es zur Aktivierung von Faktoren der BMP-Signalkaskade wie Smad1, 5, 8 und Id1 (*inhibitor of differentiation*) (Babitt *et al.*, 2005).

1.3.3 DM-GRASP und seine Rolle in der Entwicklung

Die Immunglobulin-Superfamilie

DM-GRASP ist ein Mitglied der Familie neuronaler Zelladhäsionsmoleküle, die durch die Existenz von Immunglobulindomänen (Ig) charakterisiert sind (Burns *et al.*, 1991; Williams und Barclay, 1988; Crossin und Krushel, 2000). Diese Ig-Domänen weisen eine charakteristische Faltblattstruktur auf, die durch eine Serie von nichtparallelen β -Strängen gekennzeichnet ist. Bei den Ig-Domänen unterscheidet man zwischen V (*variable*)- und C (*constant*)-Domänen; V- und V-ähnliche Domänen besitzen eine Länge von 65-75 Aminosäuren. Im Gegensatz hierzu weisen die C-Domänen eine Länge von 55-65 Aminosäureresten auf (Abb. 7; Williams und Barclay, 1988).

Aufgrund steigender Zahl identifizierter Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie ergaben sich neue Subtypen der Ig-Domänen. So wird die C-Domäne weiter in einen C1und einen C2 -Typ (Williams und Barclay, 1988) oder einen H-Typ (Hunkapiller und Hood, 1989) aufgeteilt. Den C1-Typ findet man in den Immunglobulinen, den T-Zellrezeptoren und den MHC (<u>major histocompatibility complex</u>)-Molekülen, wohingegen der C2- (oder H-) Typ bei Nicht-Immunglobulin-verwandten Molekülen, wie den



Zelladhäsionsmolekülen, Zelloberflächenmolekülen und den Muskelproteinen, auftritt (Smith und Xue, 1997).

Abbildung 7: Faltmuster der V- und C-Domänen.

β-Stränge der Ig-Domänen bilden ein kompaktes "Sandwich" aus 2 β-Faltblättern (Amzel und Poljak, 1979). Die einzelnen Ig-Domänen werden durch zwei stark konservierte Cysteinreste eingegrenzt, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden und so die Seiten der β-Faltblatt-Sandwiches zusammenhalten. Anstelle der Cysteinteste können auch andere hydrophobe Aminosäuren stehen, wie Leucin, Valin, Tyrosin oder Methionin (Williams und Barclay, 1988). Zwischen den einzelnen β-Strängen liegen Schleifensequenzen, die eine starke Variabilität aufweisen können. Die
ß-Stränge der beiden
ß-Faltblätter weisen eine charakteristische Aneinanderreihung auf: ABCDEFG (jeder Buchstabe kennzeichnet einen Strang in der Reihenfolge seines Erscheinens in der Sequenz). Ein β -Faltblatt besteht im Kern aus ABC, das andere aus GFC. Bei den Ig-Domänen unterscheidet man zwischen V (variable)- und C (constant)-Domänen; Vund V-ähnliche Domänen besitzen eine Länge von 65-75 Aminosäuren mit fogenden β -Strängen: ABC'C"CDEFG. Im Gegensatz hierzu weisen die C-Domänen eine Länge von 55-65 Aminosäureresten auf und zeigen die Stränge in folgender Gliederung: ABCDEFG (Williams und Barclay, 1988). Der größte strukturelle Unterschied zwischen den V- und C-Domänen ist die Extraschleife in der V-Domäne zwischen den Strängen C und D. Verändert nach Williams und Barclay, 1988.

Das Ligandenspekturm der Ig-Domänen reicht von kleinen Molekülen (Antigene, Chromophore) über Hormone (Wachstumsfaktoren) bis zu Makromolekülen (Muskelproteine). Die Interaktion zwischen Ligand und Ig-Domäne kann homophil (N-CAM) als auch heterophil sein. Neuronale Adhäsionsmoleküle dieser Ig-Superfamilie zeichnen sich durch ihre enorme Vielfalt an Funktionen in zellulären Prozessen aus wie z. B. Zelladhäsion, -migration, - proliferation und -differenzierung (Crossin and Krushel, 2000). Des Weiteren sind Moleküle der Ig-Familie an verschiedenen Prozessen der Gehirnentwicklung beteiligt wie z.B. der neuronalen Migration, der Wegfindung und Zielerkennung von Axonen und der Synapsenbildung. In adulten Organismen dienen sie der Aufrechterhaltung und Funktion neuronaler Netzwerke (Rougon und Hobert, 2003).

DM-GRASP: Struktur und Funktion

DM-GRASP wurde 1991 als ein 95 kDa Zelloberflächenprotein im Hühnchen identifiziert, das den Namen DM-GRASP (GRASP = *immunglobulin-like restricted axonal surface protein; DM* = *that is expressed in the dorsal funiculus and ventral midline of the chick spinal cord*) erhielt (Burns *et al.*, 1991). Strukturell beinhaltet DM-GRASP eine lange extrazelluläre Domäne bestehend aus einem Signalpeptid, fünf Ig-Domänen, einer kurzen hydrophoben Transmembrandomäne und einer ebenfalls kurzen, hydrophilen zytopasmatischen Domäne; unter den fünf Ig-Domänen sind zwei des V- und drei des C2-Typs (Bowen *et al.*, 1995; Abb. 8). In der letzten Ig-Domäne des C2-Typs befindet sich an der Position 441 ein Tyrosinrest, der mit seinem Sauerstoffatom eine kovalente Bindung mit dem Schwefelatom des Cystenrestes an Position 476 eingeht.



Abbildung 8: Schematische Strukturdarstellung von DM-GRASP. DM-GRASP zeichnet sich durch das Vorhandensein eines Signalpeptids, fünf Ig-Domänen und einer Transmembrandomäne aus. Von den fünf Ig-Domänen gehören zwei dem Typ V, und drei dem Typ C2 an.

Im Hühnchen wird DM-GRASP auch als BEN (*bursal epithelium and <u>n</u>eurons*; Pourquié *et al.*, 1992) oder JC7 (El-Deeb *et al.*, 1992) bezeichnet. Die Homologe im Menschen wurden ALCAM (*activated leukocyte-cell adhesion molecule*; Bowen *et al.*, 1995) oder memD (*melanoma metastasis clone D*; Degen *et al.*, 1998) genannt. Auch in der Maus gibt

es zwei Bezeichnungen für DM-GRASP: MuSC (*murine <u>SC</u>1-related protein*, Sekine-Aizawa *et al.*, 1998) und CD166 (Bowen *et al.*, 1997). In der Ratte besitzt das Protein den Namen KG-CAM (Peduzzi *et al.*, 1994) und das Zebrafisch als auch das Goldfisch DM-GRASP wurden als Neurolin (Laessing *et al.*, 1994; Paschke *et al.*, 1992) bezeichnet. Das Drosophila-Homolog von DM-GRASP erhielt den Namen irreC-rst (*irregular chiasm <u>C</u>roughest*; Ramos *et al.*, 1993).

Die Expression von DM-GRASP wurde in Zebrafisch (Fashena und Westerfield, 1999), Goldfisch (Paschke *et al.*, 1992), Hühnchen (Burns *et al.*, 1991) und Maus (Fraboulet *et al.*, 2000) beschrieben. Alle Organismen weisen eine Expression in den Motoneuronen des Neuralrohrs auf. Ausschließlich im Zebrafisch und im Hühnchen ist DM-GRASP in den dorsalen Wurzelganglien exprimiert. In der Maus als auch im Hühnchen konnte eine Expression von DM-GRASP in der Bodenplatte beobachtet werden. Schilling *et al.* zeigten, dass DM-GRASP während der Zebrafischentwicklung in den endodermalen Vorläuferzellen der Leber, als auch im Atrium und Ventrikel des Herzens exprimiert ist (Schilling *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde in Maus und Hühnchen die DM-GRASP Expression in den kranialen Plakoden festgestellt. In der Maus konnte DM-GRASP in der Plakode des *Nervus trigeminus* (V) und des *Nervus vestibulocochlearis* (VIII) (Fraboulet *et al.*, 2000; Sekine-Aizawa *et al.*, 1998) visualisiert werden. Goodyear *et al.* zeigten 2001, dass DM-GRASP schon früh in der Ohrplakode des Hühnchens erscheint.

Burns *et al.* zeigten 1991, dass DM-GRASP die Verlängerung von Neuriten im Hühnchen unterstützt. Des Weiteren scheint DM-GRASP eine entscheidenden Rolle bei der Zellmigration im zentralen Nervensystem (Heffron and Golden, 2000), der Neuriten- und Axonverlängerung (DeBernardo und Chang, 1995, Pollerberg und Mack, 1994) und der axonalen Wegfindung (Boschert *et al.*, 1993; Kanki *et al.*, 1994; Ott *et al.*, 1998; Avci *et al.*, 2004; Weiner *et al.*, 2004) zu besitzen. Im nicht-neuralen Kontext ist DM-GRASP an der Entwicklung von B-Lymphozyten (Zhang *et al.*, 1995), der Tumorgenese (Weichert *et al.*, 2005), der Hämatopoese und der Gefäßbildung (Ohneda *et al.*, 2001) beteiligt. In *invitro* Studien wurde gezeigt, dass die Interaktion von DM-GRASP mit Liganden entweder homophil (Corbel *et al.*, 1996), oder auch heterophil mit Ng-CAM (*neuronglia cell adhesion molecule*; De Bernardo und Chang, 1996) sein kann.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten die potentiellen Zielgene Pescadillo, RGM A und DM-GRASP des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges während der Embryonegense von *Xenopus laevis* untersucht werden. Zunächst sollte das Expressionsprofil dieser Gene mit Hilfe der *whole mount in-situ* Hybridisierung erfasst werden. Um die Funktionen von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP in *Xenopus laevis* zu beschreiben, sollten die Gene über spezifische *antisense* Morpholino-Oligonukleotide *in-vivo* ausgeschaltet und die jeweiligen Phänotypen charakterisiert werden. Zur weiteren Analyse sollten nach Funktionsverlust von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP Markergenstudien durchgeführt werden. Weiterhin wurden Überexpressionstudien gemacht. Die erhaltenen Phänotypen von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP sollten mit bekannten Funktionen nicht-kanonischer Wnt-Signale in Bezug gesetzt und diskutiert werden

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Versuchstiere

Es werden Xenopus laevis Frösche verwendet, die von der Firma Nasco, Wisconsin, USA stammen.

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia	<i>v coli</i> ElektroMax DH10B (Invitrogen)
Genotyp:	$F mrcA \Delta(mrr-hdsRMS-mcrBC)$
	Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 end A1 ara D139
	$\Delta(ara$ -leu)7697 gal/U gal/K λ ⁻ rpsl nupG

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Vektoren

pCS2+	(Rupp et al., 1994)
pBluescript II KS	(Stratagene)
pCR ^R 4Blunt-TOPO	(Invitrogen)
pCR ^R -Blunt	(Invitrogen)
pCR ^R 4-TOPO	(Invitrogen)

2.2.2 cDNA-Klone

Klon	Bezug	Restriktionsenzym/Polymerase
Cardiac-α Actin (pCS2+)	Dr. P. Krieg,	antisense: Pvu I/SP6
	Tuscon, AZ, USA	
5'UTR DM-GRASP II	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
(pCS2+)	entstanden.	antisense: BamH1/ T7
Δ5'UTR DM-GRASP II	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
(pCS2+)	entstanden.	antisense: BamH1/ T7
Xemx1 (pGEM-T)	Dr. T. Pieler, Universität	antisense: Hind III/ T7
	Göttingen	
Xen2 (pBst-KS)	Dr A. H. Brivanlou	antisense: Xba I/ T3
XfoxD3 (pBS)	Dr. Dr. W. Knöchel,	antisense: EcoRI/ T7
	Ulm, Deutschland	

GFP (pCS2+) Dr. Dr. W. Knöchel, Ulm Deutschland		sense: Not I/ T7
Xisl-1 (pBst-SK)	Dr. D. Melton, Cameridge,	antisense: EcoRI/ T7
V D(D0)	MA, USA	
XmyoD (pBS)	Dr. R. Rupp	antisense: Sal I/ 1 /
XKox20 (pGEM-1)	Dr. I. Pieler,	antisense: EcoRI/ 1 /
NI2.5 (= CEM27)	Dr. D. Kriss	and a second start HI / T7
NKX2.5 (pGEMI5Z)	Dr. P. Krieg,	anusense: Hind III/ 17
1-NI2.5 (T7T8)	Tucson; AZ, USA	$\mathbf{F} = \mathbf{D} \mathbf{I} / \mathbf{T} \mathbf{T}$
dninkx2.5 (1715)	Dr. P. Krieg,	sense: Ecoki/ 17
Votv2 (pDat VS)	Dr. T. Dialar	ontigonas, Not I/T7
AOIX2 (pBSI-KS)	DI. I. Flelel,	antisense. Not 1/17
Vrout (rCEM T)	Dr. T. Dialar	ontigonas, Not I/T7
Apaxo (pGEM-1)	DI. I. Pleler, Universität Gättingen	antisense: Not 1/17
	Universität Gottingen	
5'UTR Pescadillo (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	
Pescadillo_Mut (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	
Pescadillo Δ BRCT (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	
Pescadillo Δ BRCT (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	
Pescadillo Δ BRCT (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	
5'UTR RGM A2 (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	antisense: BamH1/17
$\Delta 5'$ UTR RGM A2 (pCS2+)	Aus dieser Arbeit	sense: Not I/ SP6
	entstanden.	antisense: BamH1/T7
Xrx (pGEM-T)	Dr. T. Pieler,	antisense: Xho I/ SP6
	Universität Göttingen	
Xslug (pCS2+)	Dr. M. G. Sargent, Mill,	antisense: Cla I/ SP6
	London	
Xsix1 (pGEM-T Easy)	Dr. HC. Seo,	antisense: Nco I/ SP6
	ETH-Hönggerberg, Zürich	
Xsix2 (pBSKII)	Dr. H. Ghambari,	antisense: Apa I/ T3
	ETH-Hönggerberg, Zürich	
Tbx20 (pGEM T-Easy)	Dr. F. Conlon,	antisense: Nco I/ SP6
	Chapel Hill, NC, USA	
TnIc (pBSKII)	Dr. P. Krieg,	antisense: Not I/ T7
	Tucson, AZ, USA	
Xtwist (pBS)	Dr. M. G. Sargent,	antisense: Xba I/ T7
	Mill Hill, London	
Xwnt-4 (pSP64T)	Dr. R. T. Moon,	antisense: Nhe I/ T7
	Seattle, USA	sense: Sac I/ SP6
XdnWnt-11 (pSP64T)	Dr. M. Tada und Dr. J.	sense: BamH I/ SP6

	Smith, NIRM, Mill Hill		l Hill	
XWnt11-R	Aus	dieser	Arbeit	antisense: Spe I/ T7
(pCR ⁴ Blunt- TOPO)	entstande	en.		
ХМНСα	Aus	dieser	Arbeit	antisense: Spe I/ T7
(pCR ^R 4Blunt-TOPO)	entstande	en.		

2.2.3 Oligonukleotide und Morpholino-Oligonukleotide

Primer für Sequenzierungen

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert.

xpes_seq240	5' - GTT AAT TCA GAG AGT ACA -3'
xpes_seq500	5' - GTG GAA TTC CTC AAC TAT -3'
xpes_seq770	5' - GTT GAT CTT AAG TCA GAT - 3'
xpes_seq950	5' - AGG CAA CTG CAG GAG GAG -3'
RGMA_seq465	5' - GAG AAG TCG GAC AGC CCT - 3'
RGMA_seq780	5' - GCT TTC ATT GAT GGT TCG - 3'
RGMA_seq1000	5' - CAC GGT TGC CCT CAA AAC - 3'
DM1_seq360	5' - TAG GTG TAG GTT GCC CAG - 3'
DM1_seq720	5' - GCC GTA ATA GAT GAT GAG - 3'
DM1_seq1100	5' - TAC TAC CCA ACA GAG AAG - 3'
DM1_seq1500	5' - GTC ATG TTT ATG AAA GAC - 3'
DM1_seq1800	5' - AAC AGA CTG GGA AAA GAA - 3'
DM2_seq360	5' - AGC AAG TGC AAG GAT TTC - 3'
DM2_seq720	5' - AGC AGT AGT CAA AGT GTT - 3'
DM2_seq1100	5' - CAT CAC TCT CCA ATG TAG - 3'
DM2_seq1500	5' - AGG TGT TTA CGA ATG GTT - 3'
DM2_seq1800	5' - AGA TGA GCG TAA TGA TAG -3'
SP6	5' - CCC AAG CTT GAT TTA GGT GAC -3'
Τ7	5' - CTA CGT AAT ACG ACT CAC TAT A -3'
M13_F	5' - GTA AAA CGA CGG CCA G -3'
M13_R	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'

Primer für die RT-PCR

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert.

5' - CCG GAT AAC ATT CAG GGT ATC ATC- 3'
5' - ATCCAT GGC GGT AAC TGT CTT CCT- 3'
5' - CTC TCG TTT CCC TGC AAC TC - 3'
5' - CAT GCC AAG CAG TCA CTT GT - 3'
5' - TGC CTA CCA CAT AAC CGA CA - 3'
5' - TAC CGG AGC AGG ACA CTT CT - 3'
5' - GGT TCG AAA AAT GGT GGA GA - 3'
5' - AGG AGG TCA AAG ACG CAA GA - 3'

Primer für Klonierungexperimente

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die Primer, die mit einem "**p**" gekennzeichnet sind, wurden am 5' - Ende phosphoryliert.

5´UTR_xpes_L	5'- GGG CTC GAG GCG CGG AGA TGG GTG GTC -3`
xpes_ORF_R	5'- GGG TCT AGA TTA GTG CTT CTT AGC CTT -3`
xpes_ORF_L	5'- GGG CTC GAG ATG GGT GGT CTG GAG AAA -3`
3Mutpes_1	5' - GCG CGG AAT GGG TGG CTT AGA GAA AAA
	AAA GTA T - 3'
3Mutpes_r	5' - ATA CTT TTT TTT CTC TAA GCC ACC CAT TCC
	GCG C - 3'
5'BglII_Mut_pes_l	5' - CCG CGG ACG CGT GGG AGA TCT ATG GGT GGC
	TTA GAG - 3'
5'BglII_Mut_pes_r	5' - CTC TAA GCC ACC CAT AGA TCT CCC ACG CGT
	CCG CGG - 3'
5'UTR_GFP_1	5'- GAT CCG CGG AGA TGG GTG GTC TGG AGA AAA
	AT - 3'
5'UTR_GFP_r	5' - CGA TTT TTC TCC AGA CCA CCC ATC TCC GCG -
	3'
BglII_GFP_l	5' - GAT CCG ATC TAT GGG TGG CTT AGA GAA AAA
	T - 3'
BglII_GFP_r	5' - CGA TTT TTC TCT AAG CCA CCC ATA GAT CG - 3'
pes_∆BRCT p _1	5' - pCCT GGG GTG CTT CTG CCC - 3'
pes_∆BRCT p _r	5' - p ATG TTT TTC CTC CTC CTG - 3'
pes_∆SUMO p _l	5' - pCGT CTA GCA AATGAT G - 3'
pes_∆SUMO p _r	5' - pAAC CTT GCC T TGT TAC - 3'
$pes_\Delta NLSp_1$	5' - pTAA TCT AGA ACT ATA GTG - 3'
pes $\Delta NLSp$ r	5' - pCAT CAT CAT AAT TGC TAG - 3'
5'UTRRGMA1 1	5' - CGC GGA TCC AGA AGC TGC TTC TTA GTA CAA
	GTT - 3'
5'UTRRGMA1 r	5' - GGG GAA TTC CTA TGG CCT TTC AAA CAA ATG
—	GCA - 3'
Δ5'RGMA1 l	5' - GGG GAA TCC ATG GGT ATG GGG AGA GGG
_	GCA - 5'
5'UTR RGMA2 1	5' - CAC TGA CCC CCG TGT GAG CGC TGG GCT GGA
—	- 3'
5'UTR RGMA2 r	5' - GTT GGG AAT TTA CAC AGT AAA CAT AGA - 3'
Δ5'RGM2 1	5' - TTT AAA ATG CAG CCG ATA AGG GCG AAG GTT
—	- 3'
Δ5'UTRRGM2 r	5' - TTA CAG CAA CAT TGC ACA GCA CTG - 3'
DM1 WM 1	5' - ATA TAT GGC AAC AAA GGA GGA CAT - 3'
DM1 WM r	5' - GTG ACA AAG GTT TCC ATT TAT TTT G - 3'
5'UTR DM1 1	5' - GAC AGT CAG TCA CAG CGA CCA GCG - 3'
5'UTR DM1 r	5' - TTC GGC ATC GGA CTT GTG GTT ATT - 3'
5'UTR DM2 1	5' - CTG AGT GCT CCA GAG CAA ACA TCC - 3'
5'UTR DM2 r	5' - TTA GGC TTC TGA CTT GTG GTT ATT - 3'

$\Delta 5'$ UTR_ DM2_1	5' - CCG CCG GAA TTC ATG GAA GCA AGT GCA AGG
	ATT TCC - 3'
$\Delta 5'$ UTR_ DM2_r	5' - GGC GGC CTT AAG TTA GGC TTC TGA CTT GTG
	GTT ATT - 3'
5'UTRWnt11R_1	5' - GCA CGA GCA GAG AGT CAA GGC AGC - 3'
5'UTRWnt11R_r	5' - TCA TTT GCA CAC ATA CCG CTC CAC -3'
MHCprobe_l	5' - AAA GAA CGT CTG GAG GCT CA - 3'
MHCprobe_r	5' - GGA GGC GAC TGT GAC TTC TC -3'

Antisense Morpholino-Oligonukleotide

Die Morpholino-Antisense Oligonukleotide wurden lyophilisiert von der Firma Gene Tools, LLC, Philomath, USA bezogen. Die Morpholino-Oligonukleotide wurden in 300 μ l autoklaviertem H₂O gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Control MO	5´ - CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A -3`
Pes MO	5´ - TTC TCC AGA CCA CCC ATC TCC GC -3´
Wnt-4 MO	5' - GTA CTC TGG GGT CAT CCT GCT GCT G- 3'
Frizzled-3 MO	5' - CGCAAAGCCACATGCCACCTCTTGAA - 3'
p53 MO	5' - CCA TGC CGG TCT CAG AGG AAG GTT C- 3'
RGM A1 MO	5' - CAT CCA TCC AGC TTG GGC TTT AAC C- 3'
RGM A2 MO	5' - TTA TCG GCT GCA TGA GCC CCT TCC C- 3'
DM-GRASP MO	5' - CAC TTG CTT CCA TAF CCC ACG ATC C- 3'
Isl-1 MO	5' - GGT CTC CCA TAT CTC CCA TAG CTG T- 3'
Tbx20 MO1	5' - AAT CCA CTT CCA AGG GCA GTT GCT T - 3'
Tbx20 MO2	5' - GTT TGG GAG AAG GAG TGT ATT GGA T- 3'
Wnt11-R MO	5' - AAT CAT CTT CAA ACC CAA TAA CAA - 3'

2.3 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden bei Invitrogen, Roche, MBI Fermentas, USB, Promega und Stratagene bestellt.

2.4 Antikörper

Anti-Fluorescein Fab-Fragment (Roche) Anti-Dioxygenin-Antikörper (Roche) Anti-BrdU Antikörperlösung (Boehringer Kit) Anti-Maus-IgG-AP (Boehringer Kit) Monoclonal Anti-human/mouse/chicken RGM-A Antibody (R+D Systems) Cy2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) 3A10 Antibody (DSHB)

2.5 Nährmedien und Zusätze

LB-Medium (Luria-Bertani Broth, fertiges Pulver):

LB Broth (Inv	vitrogen):	20 g/	1
LB Agar (Inv	itrogen):	32 g/	1

Antibiotika:

Ampicillin (Serva)	50 mg/ml H ₂ O Steril filtrieren und bei -20 °C lagern.
Kanamycin (Roth)	10 mg/ml H ₂ O Steril filtrieren und bei -20 °C lagern.
Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)	10.000 μg/ml, Steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium)-Wachstumsmedium (Zellkultur):

von Invitrogen: 1 x DMEM + 4,5 g/l Glucose + GlutaMAXTM-I + Pyruvat. Mit 7,5 % Sodium Bicarbonat, 10 % FBS und 10 μ g Pen/Strep versetzt. Steril filtrieren und bei 4 °C lagern, nach Farbumschlag Medium verwerfen.

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranosid)

100 mg X-Gal in 2 ml N,N' -dimethylformamid, bei -20 °C lagern.

2.6 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders aufgeführt, werden alle Lösungen und Puffer in H₂O gelöst.

Alcianblau-Lösung

1 g	Alcianblau
0,5 ml	Eisessig
99,5 ml	H ₂ O

• Alkaline Phosphatase Puffer (AP-Puffer)

1 ml	1 M Tris pH 9,5
500 µl	1 M MgCl
200 µl	5 M NaCl
100 µl	10% Tween
	\Rightarrow auf 10 ml mit DEPC-H ₂ O auffüllen

• Auftragspuffer (für DNA-Gele)

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanlol
30 %	Glycerin
20 mM	Tris/HCl pH 8

• Blocking Solution

1 ml	5x MAB/10% BMB
25 µl	10% Tween
600 µl	Horse Serum
	\Rightarrow mir DEPC-H ₂ O auf 5 ml auffüllen

• 10% Chaps

Chaps \Rightarrow mit DEPC-H₂O auf 10 ml auffüllen, 1ml Aliquots bei -20 °C lagern

• DAPI (4'6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)-Lösung

Stammlösung: 1 mg DAPI in 1 ml H₂O \Rightarrow Lagerung bei -20 °C für mehrere Jahre Arbeitslösung: 1:1000 Verdünnung mit PBS \Rightarrow Lagerung bei 4 °C für 6 Monate

• Deionisiertes Formamid

Formamid (fertig) mit Ionentauscher 1 Stunde rühren, abfiltrieren, in 50 ml Aliquots bei -20 °C lagern

• 50x Denhardts

1 g	BSA
1 g	Polyvinylpyrrolidon
1 g	Ficoll
2-3 ml	DEPC-H ₂ O zugeben, unter Rühren auf 50 ml mit DEPC-H ₂ O auffüllen
	1,2 ml Aliquots bei -20 °C lagern

• DNase I-Puffer (pH 5)

100 mM	Natriumacetat
5 mM	MgSO ₄

¹ g

• DEPC-H₂O

1 ml DEPC (nur mit Handschuhen!) in 1 l H2O über Nacht rühren, autoklavieren

• 0,5 M EDTA

9,3 g EDTA \rightarrow mit DEPC-H₂O auf 30 ml auffüllen \rightarrow mit 10 N NaOH auf pH 8,0 einstellen \Rightarrow auf 50 ml DEPC-H₂O auffüllen

• 3% Ficoll/1x MBSH

15 g	Ficoll 400
500 ml	1x MBSH
	steril filtrieren, bei 4 °C lagern

• Gelatinelösung zum Einbetten

2,2 g	Sigma-Gelatine in 450 ml PBS unter Rühren und Erwärmen lösen
134 g	Albumin (Bovine) hinzufügen
90 g	Saccharose zufügen
	\rightarrow 15 ml Aliquots bei -20 °C

• Heparin

100 mg/ml	DEPC-H ₂ O
	100 µl Aliquots bei -20 °C lagern

Horse Serum

fertig gekauft, 30 Min. bei 60 °C inaktivieren, Lagerung bei -20 °C

• Hybridisierungpuffer

25 ml	deionisiertes Formamid (-20 °C)
12,5 ml	20x SSC
1 ml	Torula RNA (50 mg/ml)
1 ml	50x Denhardts
50 µl	Heparin (100 mg/ml)
500 µl	10% Tween
500 µl	10% Chaps
500 µl	0,5 M EDTA pH 8,0
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 50 ml auffüllen, bei -20 °C lagern

• Incubation buffer

Boeringer Kit 1299964

• Lösung A

38 %	Acrylamid
2%	Bisacrylamid

• 5x MAB

29,02 g 21 90 g	Maleinsäure NaCl
21,90 g	in 400 ml DEPC-H ₂ O lösen,
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen \Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 500 ml auffüllen

• 5x MAB/10% BMP

5 g	Boehringer Blocking Agent (-20 °C)
	\Rightarrow mit 5x MAB auf 50 ml auffüllen, autoklavieren, 5 ml Aliquots bei
	-20 °C lagern

• **5x MEM**

104,65 g	MOPS (0,5 M)
3,8 g	EDTA (10 mM)
1,23 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O (5mM)
•	in 800 ml DEPC-H ₂ O lösen, pH auf 7,4 einstellen
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 1 l auffüllen

• MEMFA

10 ml	MEM
5 ml	37% Formaldeyd
	\Rightarrow mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen

• 1x MEMFA + 0,1% Tween

10 ml	5x MEM
5 ml	37% Formaldehyd
0,5 ml	10% Tween
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 50 ml auffüllen

• MEMPFA (4% Paraformaldehyd)

1 ml	5x MEM
2 ml	10 % Paraformaldehyd
2 ml	H_2O

• 1 M MgCl₂

20,33 g	MgCl ₂
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 100 ml auffüllen

• 5 M NaCl

21,32 g	NaCl
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 100 ml auffüllen

• 3 M Natriumacetat pH 5,2 (100 ml)

24,6 g	Natriumacetatanhydrat
90 ml	H_2O
10 ml	100% Essigsäure

• 10 N NaOH

40 g	NaOH-Plätzchen
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 100 ml auffüllen

• NBT (Nitroblautetrazolium)

Boeringer Kit 1299964

• OCM-Medium

15 mM HEPES pH 7,8 1 mM Glutamin 50µg/ml Gentamycin 0,4 µg/ml BSA 50 U/ml Nystatin 50 % Leibovitz´s L15 Medium 10 % FBS ⇒ pH 7,8 mit NaOH einstellen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern

• 10 % Paraformaldehyd

40 g Paraformaldehy in 320 ml H_2O bei 60-65 °C unter Rühren lösen (unter Abzug), pH auf 7,3 einstellen (Säure/Base stark verdünnen, da sich der pH-Wert sehr schnell ändert), dann auf 400 ml mit H_2O auffüllen.

• 10x PBS

20 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	$Na_2HPO_4 \ge 2H_2O$
2,4 g	$NaH_2PO_4 \times H_2O$
	auf pH 7 einstellen, autoklavieren

• 1x PBST

100 ml	10x PBS
10 ml	10% Tween
\Rightarrow mit H ₂ C	auf 11 auffüllen

• 5x SDS-Elektrophoresepuffer

125 mM	Tris
960 mM	Glycin

• 1x SDS-Elektrophoresepuffer

200 ml	5x SDS-Elektrophoresepuffer
10 ml	10% SDS
	⇒ auf 1 l auffüllen

• SDS-Probenpuffer

0,5 M	Tris-HCl pH 6,8
0,025%	Bromphenolblau
10%	SDS
20% (v/v)	Glycerin
25%	β-Mercaptoenthanol
0,025% 10% 20% (v/v) 25%	Bromphenolblau SDS Glycerin β-Mercaptoenthanc

• 20x SSC

175,3 g	NaCl
88,2 g	Na ₃ Citrat
	in 800 ml DEPC-H ₂ O lösen, mit konz. HCl auf pH 7 einstellen \Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 1 l auffüllen

• 2x SSC

100 ml	20x SSC
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 1 l auffüllen

• 0,2x SSC

100 ml	2x SSC
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 1 l auffüllen

• 10x TBS

80 g	NaCl
2 g	KCl
30 g	Tris base
	in 800 ml DEPC-H ₂ O lösen, mit konz. HCl auf pH 7,4 einstellen
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 1 l auffüllen

• 1x TBST

100 ml	10x TBS
10 ml	10% Tween
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 1 l auffüllen

• 1 M Tris pH 9,5

12,11 g	Tris
	in 70 ml DEPC-H ₂ O lösen, mit konz. HCl auf pH 9,5 einstellen
	\Rightarrow mit DEPC-H ₂ O auf 100 ml auffüllen

• **Trypsin** (Invitrogen)

0,5 % Trypsin-EDTA (1 x) Steril aliquotieren und bei -20 °C lagern.

• TE (pH 7,5)

10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
1 mM	EDTA (pH 8)

• Tfb 1

1,5 ml	1 M Kaliumacetat
0,5 ml	1 M CaCl ₂
8,75 ml	Glycerin
0,61 g	RbCl
0,25 g	MnCl ₂
\Rightarrow der pH-W	ert wird mit Essigsäure/KOH auf 5,8 eingestellt und auf 50 ml mit
bidest. H ₂ O at	ıfgefüllt
bidest. H_2O at	ifgefüllt

• Tfb 2

1 ml 10 mM MOPS
1,25 ml
 1 M CaCl₂

 8,75 ml
 Glycerin

 0,06 g
 RbCl

 \Rightarrow der pH-Wert wird mit HCl/KOH auf 6,5 eingestellt und auf 50 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

 \Rightarrow Tfb 1+2 werden nicht autoklaviert, Aliquots sollten sterilfiltriert werden; Lagerung bei 4 °C

• Tris/HCl (pH 8,5)

10 mM Tris in H₂O

pH mit 37% HCl einstellen (spezielle Tris-Elektrode oder pH-Papier)

• 10% Tween 20

50 ml Tween 20 \Rightarrow mit DEPC-H₂O auf 500 ml auffüllen

• Torula RNA

50 mg/ml in DEPC-H₂O lösen, in 1 ml Aliquots bei -20 °C lagern

• X-Phosphat

Boeringer Kit 1299964

2.7 Chemikalien

Acetanhydrid	Sigma
Aceton	Baker
Acrylamid, Gel 40	
38% Acrylamid/2% Bisacrylamid	Roth
Agarose	Invitrogen
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Benzylalkohol	Merck
Benzylbenzoat	Merck
Boehringer Blocking Agent	Roche
Blocking reagent	Roche
BM purple	Roche
Borsäure	Applichem
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Caciumnirat Tetrahydrat	Merck
Calciumchlorid Tetrahydrat	Merck
Citronensäure Monohydrat	Merck

Chaps	Roth
Chloroform	Merck
DAPI	Fluka
(4'6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
dNTPs	Invitrogen
Dithioreitol (DTT)	Sigma
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanlol absolut	Riedel-deHaen
Ethanol vergällt	Apotheke
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
bFGF (rekombinant, human)	Promega
Ficoll 400	Sigma
Formaldehyd 37%	JT Baker
Formamid	Merck
Gelatine	Baker
Gonadodropin (chorionic)	Sigma
Glutharaldehyd	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Applichem
Harnstoff	Roth
Hepes	Applichem
Heparin Natriumsalz	Sigma
Horse Serum	Invitrogen
Isoamylalkohol	Merck
Isobutanol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
LB Agar	Gibco
LB Broth	Gibco
Magnesiumacetat Tetrahydrat	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Maleinsäure	Merck
Methanol	Merck
MOPS	Sigma
Natriumacetat Trihydrat	Merck
Natriumcitrat	Baker
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)2H ₂ O	Applichem

Natriumdihydrogenphoshat ((NaH ₂ PO ₄)	Fluka
Paraformaldehyd	Merck
Phenol (Rotiphenol)	Roth
Phosphorsäure 85%	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Proteinase K	Sigma
RNase A	Sigma
RNase T1	Sigma
RNA Torula Typ IV	Sigma
Saccharose	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Streptomycin	Invitrogen
TEMED	Sigma
Tween 20 (Polyethylensorbitanmonolaureat)	Sigma
Triethanolamin	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB
Triton X-100	Merck
UHU Sekundenkleber	UHU
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
X-Gal	BioTech Trade
Xylencyanol	Roth

2.8 Radiochemikalien

[³⁵S]-Methionin

Amersham (Braunschweig)

2.9 Kits

Microspin G-50 Columns	Amersham
5-Bromo-2`-deoxy-uridine Labeling	
and Detection Kit II	Roche
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham
mMessage machine SP6	Ambion
mMessage machine T3	Ambion
mMessage machine T7	Ambion
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for	
Sequencing	Invitrogen
Zero Blunt PCR Cloning Kit	Invitrogen
MasterAmp PCR Core Kit	Epicentre Technologies
Miniprep Wizard Plus SV	Promega
Qiagen Gel Extraction	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
Purescript RNA Isolation Kit	Gentra Systems
TNT Quik Coopled Transcription/Translation	
System (T7)	Promega
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech

Qiagen Plasmid Midi Kit Qiagen DIG RNA Labeling Mix 10x Roche Fluo RNA Labeling Mix 10x Roche 2.10 Geräte **Bildschirm** (Trinitron) Sony Binokular Saur Binokular (MVX10) Olympus **Binokular** (SZH10) Olympus **Binokular** (SZX12) Olympus CO₂-Inkubator MCO-17 ALC Sanvo Brutschränke (WB22K) Mytron Digitalkamera (C-3030) Olympus Olympus Digitalkamera (DP 11) Eismaschine (AF-10) Scotman Elektroporationsmaschine (Gene pulser) Biorad Gefriertruhe (-20 °C) Liebherr Gefriertruhe (-80 °C; VX490E) Jovan Gelelektrophoresekammer Werkstadt der Uni Göttingen Geltrockner (Pherotemp40) **Biotech Fischer** Heizblock (HBT130) HLC Heizrührer (MR3000) Heidoplph Injektionsanlage (Pneumatic Picopump) World Precisions Instr., USA Inkubationsschrank (37°, 80°C) Memmert Kaltlichtquelle (EK-1) Euromex Kapillaren (Borosilicatglas mit Filament 0,1 mm) H. Saur Laborbedarf Liebherr Kühlschränke Kühlzentrifuge (Biofuge primoR) Heraeus Megafuge (1.OR) Heraeus Mikroskop (Axiovert 25) Zeiss Mikroskop (BH-2) Olympus Mikroskop (BX60) Olympus Mikrowelle (Micromat) AEG Netzgerät (P25) **Biometra** PCR-Gerät (T3 Thermocycler) **Biometra** pH-Meter (CG837) Schott Phospho-Imager (Fujix BAS 1000) Fuii Photometer (SmartSpec 3000) **Biorad** Pipetten Gilson Puller (Herstellung der Injektionsnadeln;PN-30) Narishige, Japan Schüttler (rotatierend; Rocky) Fröbel Labortechnik Roller (horizontal) ILD GmbH Sequenziergerät (ABI PRISM 377) Perkin-Elmer Corporation Sicherheitswerkbank (BDK-SK 150) Luft- und Raumfahrttechnik GMBH Screen (Phosphoimager; Fuji BAS IIIS) Fuji Tischzentrifuge (Biofuge pico) Heraeus

UV-Transilluminator 312 nm Schüttler (S2-Labor; Certomat) Vibratom (Serie 1000) Vortexer (Vortex Genie 2) Waage (PE360) Wasserbäder

2.11 Sonstiges

Alufolie Einwegspritzen Elektroporationsküvetten Falcongefäße Whatmanpapier Glasmaterialien (Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.) Haushaltsfolie Kanülen Kunstoff-Einwegmaterialien (Spritzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Petrischalen usw.) Quarzküvetten 6-well Platten 24-well Platten Parafilm **PCR-Tubes Dumont Pinzetten**

Bachofer B.Braun Technical Products Internat. Scientific Mettler Köttermann Labortechnik

Gut & Billig HeukeSassWolf GmbH Biorad Corning Schleicher & Schuell

Brand, Schott Gut & Billig Braun

Eppendorf, Brand, Greiner, Sarstedt Hellma Greiner Pechiney Biozym Merck

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Xenopus laevis

3.1.1 Haltung der Versuchstiere

Die *Xenopus laevis* Weibchen und Männchen werden in Aquarien, die mit auf 19 °C temperiertem und gefiltertem Wasser gefüllt sind, gehalten. Sie werden mit Trockenfischfutter und klein geschnittenem Fleisch gefüttert. Die Weibchen pausieren zwischen jeder Hormonbehandlung für mindestens 3 Monate.

3.1.2 Stimulation von *Xenopus laevis* Weibchen zur Eiablage

Am Vortag des Ablaichens wird dem *Xenopus laevis* Weibchen das humane Hormon Chorion Gonadotropin (hCG) in die laterale Rückenregion unter die Haut gespritzt. Dieses Hormon wird aus dem Urin schwangerer Frauen gewonnen. Es wird steril in einer 0,5 % NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 3000 U/ml gelöst, von welcher ca. 700-900 U dem Weibchen gespritzt werden. Am folgenden Tag wird das Weibchen durch vorsichtiges Massieren an Bauch und Rücken zum Ablaichen angeregt. Die Eier werden in eine Petrischale abgelegt.

3.1.3 In-vitro Befruchtung von Xenopus laevis Eiern

Für die *in-vitro* Befruchtung muss ein Männchen getötet werden, aus welchem der Hoden entnommen wird. Dieser wird in 1x MBSH gewaschen und in OCM-Medium bei 4 °C gelagert. Um die Eier befruchten zu können, wird ein kleines Stück Hoden abgeschnitten, in ca. 100 μ l 1x MBSH mazeriert und mit 900 μ l H₂O verdünnt. Das H₂O bewirkt eine Erniedrigung der Salzkonzentration, so dass sich die Spermien bewegen können. Die verdünnten Spermien werden nun mit den Eier in einer Petrischale vermischt. Nach ca. einer halben Stunde sollten sich die Eier durch die Befruchtung gedreht haben. Sie werden mit 0,1% MBSH aufgegossen und bei 14 °C inkubiert.

3.1.4 Entfernen der Gallerthülle von Xenopus laevis Eiern

Um die für die folgende Injektion störende Gallerthülle von den Eiern zu entfernen, werden sie 1,5-2 Stunden nach der Befruchtung mit einer 2% Cysteinhydrochlorid-Lösung in einem Erlenmeyerkolben 3-5 Minuten geschwenkt. Die Gallerthülle hat sich ganz von den Eiern gelöst, wenn diese eng aneinander liegen und die dichtest möglichste Kugelpackung angenommen haben. Anschließend wird 5x mit 0,1 MBSH gewaschen und in 0,1 MBSH bei 14 °C inkubiert.

3.2 Mikroinjektion

3.2.1 Herstellung von Injektionsnadeln

Die Injektionsnadeln werden mit Hilfe des PN-30 Micropipette Pullers der Firma Narishige hergestellt. Eine Glaskapillare wird in die Vorrichtung eingespannt; sie wird in

der Mitte erhitzt und dabei ausgezogen. Auf diese Weise entstehen 2 Injektionsnadeln. Für die Injektion muss die Spitze abgebrochen werden, damit Flüssigkeit aufgezogen werden kann.

3.2.2 Die Mikroinjektion

Für die Injektion werden die *in-vitro* transkribierte mRNA oder Morpholino-Oligonukleotide mit autoklaviertem Wasser verdünnt.

Die Embryonen von *Xenopus laevis* lassen sich relativ leicht manipulieren, da die einzelnen Bastomere sehr gut erkenn- und unterscheidbar sind. Mit der feinen Injektionsnadel entstehen nur kleine Verletzungen an den Embryonen, die während der Entwicklung heilen.

Die Injektion wird mit dem *Pneumatic Picopump*-Gerät von World Precisions Instr. durchgeführt. In der Glaskapillare wird ein Vakuum erzeugt, durch welches die Flüssigkeit in diese aufgezogen wird. Stickstoffgas ermöglicht einen Druckaufbau, mit dessen Hilfe die Injektion stattfinden kann. Alle Vorgänge wie Aufsaugen der Flüssigkeit und Injektion der Embryonen werden unter einem Binokular verfolgt. Die Glasnadel kann mit einem Mikromanipulator gezielt bewegt werden. Die Embryonen werden zur Injektion in eine kleine Petrischale, deren Boden zur Fixierung der Embryonen mit einem Netz ausgelegt ist, in 3% Ficoll/ 1xMBSH überführt. Das Ficoll besitzt eine hohe Viskosität, wodurch beim Herausziehen der Nadel aus dem Embryo ein Austreten der injizierten Flüssigkeit oder des Dotters aus der Verletzungsstelle verhindert wird. Die hohe Salzkonzentration des 1x MBSH unterstützt diesen Effekt. Nach der Injektion bleiben die Embryonen über Nacht in dieser Ficoll/MBSH-Lösung und werden am folgenden Morgen in 0,1x MBSH überführt, um spätere Gastrulationsprobleme, die durch die hohe Salzkonzentration in 1x MBSH entstehen, zu vermeiden. Die gewünschten Embryonalstadien werden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

3.2.3 Entwerfen eines antisense Morpholino-Oligonkuleotids

Um den Einfluss von Genen auf die Entwicklung von *X. laevis* zu untersuchen, werden häufig Funktionsverluststudien durchgeführt. Hierzu bedient man sich sequenzspezifischer *antisense* Morpholino-Oligonukleotide (MO; Heasman *et al.*, 2000; Nasevicius und Ekker, 2000). Diese Morpholino-Oligonukleotide binden spezifisch an die umliegende Sequenz des AUG Translationsstart der zu inhibierenden RNA und hemmen so die Expression des spezifischen Gens (Heasman *et al.*, 2000; Nasevicius und Ekker, 2000). Morpholino-Oligonukleotide sind einzelsträngig und besitzen statt einem Zucker-Phosphat-Rückgrad ein künstlich synthetisiertes Morpholino-Phosphat-Rückgrad (Summerton, 1999). Durch dieses künstliche Rückgrad ist das Morpholino-Oligonukleotid vor der Aktivität der RNasen geschützt und kann durch diese nicht abgebaut werden. Die Sequenzspezifität des *antisense* Morpholino-Oligonucleotids ist sehr wichtig, um eine Inhibierende Wirkung des Morpholino-Oligonukleotids aufheben (Saulnier *et al.*, 2002).

Beim Entwerfen der MO-Sequenz muss folgendes beachtet werden:

- 1. Die Länge des MO sollte zwischen 22-25 Nukleotide liegen.
- 2. Die Sequenz sollte über dem ATG-Codon des zu inhibierenden Gens liegen.

- 3. Die Sequenz muss revers-komplementär zur Zielsequenz sein.
- Das Morpholino-Oligonukleotid sollte nur die Translation des gewünschten Gens 4. inhibieren. Hierzu kann die Sequenz mit allen im Internet veröffentlichten Xenopus Sequenzen verglichen werden (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).
- Mindestens 8 bp der Sequenz sollten im 5'UTR liegen, damit mit Hilfe eines 5. Δ5'UTR-Konstrukts "*Rescue*"-Experimente durchgeführt werden können.
- Der GC-Gehalt sollte möglichst > 50 % sein. 6.
- 7. Die freie Reaktionsenthalpie ΔG sollte > 0 sein, damit sich innerhalb der Morpholino-Oligonkuleotidsequenz keine Bindungen bilden. Die verschiedenen Faltungsmöglichkeiten des MO können mit einem RNA-Faltungprogramm unter folgender Internetadresse erstellt werden:

http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi.

Nach Wahl der Sequenz kann das Morpholino-Oligonukleotid bei der Firma Gene Tools, LLC bestellt werden.

3.3 Immunohistochemische und histologische Methoden

3.3.1 Fixierung von Embryonen

Zur Fixierung von Embryonen werden die Embryonen in MEMFA bzw. MEMPFA (für Antikörperfärbungen) gebracht und für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die fixierten Embryonen können in 100 % MeOH bei -20 °C gelagert werden.

3.3.2 Whole mount in-situ Hybridisierung

Mit dieser Methode kann man eine spezifische mRNA eines Gens, welche in einem bestimmten Gewebsteil eines Embryos exprimiert ist, detektieren (Wilkinson und Nieto, 1993).

Die Embryonen werden hierfür in dem gewünschten Stadium mit MEMFA fixiert und anschließend mit einer genspezifischen RNA-antisense Sonde, welche mit Digoxygenin oder Fluorescein markiert wurde, hybridisiert. Die genspezifische RNA-antisense Sonde bindet ausschließlich an komplementäre mRNAs. Im folgenden Schritt werden die Antikörpern behandelt, die spezifisch Digoxygenin oder Fluorescein Embryonen mit erkennen. An den Antikörper ist eine Alkalische Phosphatase gekoppelt, ein Enzym, das eine Farbreaktion katalysiert. Durch diese Farbreaktion wird die spezifische, räumliche Expression eines Gens zu einem Zeitpunkt der Entwicklung eines Embryos nachgewiesen.

Der ganze Versuch wird in Glasröhrchen durchgeführt.

1. Tag

Rehydrieren der Embryonen:

- 5 Minuten 100% Methanol
- 5 Minuten 50% MeOH 50% H₂O

- 5 Minuten 25% MeOH/ 75% H₂O
- 3x 5 Minuten TBST

Proteinase K Behandlung:

10 Sekunden (St. 12-20) bzw. 15-25 Sekunden (St. 20-30) Proteinase K in TBST (3,6 µl Proteinase K (Stock 14 mg/ml) in 5 ml TBST) ⇒ NICHT rollen

Waschen:

- 2x 5 Minuten 0,1 M Triethanolamin (750 μl Triethanolamin + 100 μl 32% HCl auf 50 ml H₂O)
- 5 Minuten 5 ml 0,1 M Triethanolamin + 12,5 μ l Acetanhydrid \Rightarrow NICHT rollen
- Zugabe von weiteren 10 μ l Acetanhydrid \Rightarrow NICHT rollen
- 2x Minuten TBST

Fixieren:

- 60 Minuten MEMFA + 0,1% Tween \Rightarrow NICHT rollen
- 5x 5 Minuten TBST

Vorhybridisierung:

- Überstand bis auf einen kleinen Rest abnehmen, 500 µl Hybridisierungpuffer hinzugeben, warten, bis sich Embryonen abgesetzt haben
- Überstand vollständig abnehmen, 500 μl Hybridisierungspuffer hinzugeben, 4 Stunden bei 60 °C (Wasserbad)

Hybridisierung:

- Sonde (ca. 1 μ g RNA) in 0,5 1,5 ml Hybridisierungpuffer 5 Minuten bei 95 °C erhitzen
- Überstand von Embryonen abnehmen, 0,5 ml Sonde zugeben, Inkubation über Nacht bei 60 $^{\circ}\mathrm{C}$

2. Tag

• Sonde abnehmen und bei -20 °C lagern

Waschen:

- 20 Minuten mit 1 ml Hybridisierungpuffer bei 60 °C inkubieren (Hybridisierungspuffer vorher auf 60 °C erhitzen)
- 2x 20 Minuten 2xSSC bei 60 °C
- 2x 20 Minuten 2x SSC + 0,05% Tween + 20 $\mu g/ml$ RNase A + 10 U/ml RNase T1 bei 37 °C
- 3x 20 Minuten 2xSSC + 0.05% Tween bei 60 °C

• 2x 10 Minuten TBST

Blockieren:

- Embryonen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1 ml Blocking Solution inkubieren ⇒ leicht schwenken
- parallel: Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking Solution inkubieren (500 μl + 1:10.000 verdünnter Antikörper)
- Blocking Solution abnehmen, blockierten Antikörper auf Embryonen geben, Inkubation 2,5 Stunden bei Raumtemperatur ⇒ leicht schwenken

Waschen:

- 3x 5 Minuten 1x TBST
- über Nacht 1x TBST

<u>3. Tag</u>

Waschen:

- 5x 30 Minuten 1x TBST
- 2x 5 Minuten AP-Puffer

Färbung:

4 verschiedene Farben:

- 1. **Blau-violett:** 1 ml BM Purple AP Substrat, im Dunkeln bei Raumtemperatur, Färbung kontrollieren.
- 2. **Blau-violett:** 1 ml AP-Puffer + 4,5 µl NBT + 3,5 µl BCIP, im Dunkeln bei Raumtemperatur, Färbung kontrollieren.
- 3. **Türkis:** 1 ml AP-Puffer + 3,5 µl BCIP, im Dunkeln bei Raumtemperatur, Färbung kontrollieren.
- 4. **Rot:** 3 x 10 Minuten in 0,1 M Tris/HCl (pH 8,2), 1 Tablette in 2 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 8,2) im Dunkeln lösen, Färbung im Dunkeln bei 4 °C und kontrollieren.

Abstoppen der Färbung:

- 2x 5 Minuten TBST
- Fixieren mit MEMFA + 0,1% Tween 1-2 Stunden bei Raumtemperatur

Reduktion des Hintergrundes:

• Inkubation in 100 % Methanol (nicht bei BM Purple AP Substrat!)

3.3.3 Doppel-whole mount in-situ Hybridisierung

Mit Hilfe der Doppel-whole mount in-situ Hybridisierung können zwei verschiedene mRNAs in einem Embryo detektiert werden. Hierzu werden die Embryonen parallel mit zwei genspezifischen RNA-antisense Sonden inkubiert. Eine der beiden Sonden wird mit Digoxygenin, die andere mit Fluorescein markiert. Im ersten Schritt werden die Embryonen mit einem Antikörper, z.B. mit dem Anti-Digoxygenin-Antikörper, behandelt und die Farbreaktion mit BCIP oder Fast Red durchgeführt. Nach Fixierung und Inaktivierung der ersten Färbung folgt in einem zweiten Schritt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, z.B. dem Anti-Fluorescein-Antikörper. Anschließend werden die Embryonen mit NBT/BCIP gefärbt.

Tag 1-3 siehe whole mount in-situ Hybidisierung (bis Färbung).

<u>Änderungen:</u>

- 1. Inkubation mit Sonde: parallel mit beiden Sonden, eine Sonde DIG-, andere Fluomarkiert.
- 2. Antikörper: erst DIG, dann Fluo-Antikörper (oder andersherum)
- 3. 1. Färbung:

Türkis: 1 ml AP-Puffer + 3,5 μ l BCIP, im Dunkeln bei Raumtemperatur, Färbung kontrollieren oder

Rot: 3 x 10 Minuten in 0,1 M Tris/HCl (pH 8,2), 1 Tablette Fast Red in 2 ml 0,1 M Tris/HCl, im Dunkeln lösen, Färbung im Dunkeln bei 4 °C und kontrollieren.

nach ausreichender ersten Färbung:

- 5 Minuten TBST
- 15 Minuten TBST bei 65 °C (Inaktivierungsschritt)
- 60 Minuten 1x MEMFA +0,1 % Tween + 0,2 % Glutaraldehyd

<u>4. Tag</u>

- 5 Minuten TBST
- 10 Minuten TBST

Blockieren:

- Embryonen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1 ml Blocking Solution inkubieren ⇒ leicht schwenken
- parallel: Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking Solution inkubieren (500 μ l + 1:10.000 verdünnter Antikörper)
- Blocking Solution abnehmen, blockiertern Antikörper auf Embryonen geben, Inkubation 2,5 Stunden bei Raumtemperatur ⇒ leicht schwenken

Waschen:

- 3x 5 Minuten 1x TBST
- über Nacht 1x TBST

<u>5. Tag</u>

Waschen:

- 5x 30 Minuten 1x TBST
- 2x 5 Minuten AP-Puffer

2. Färbung:

Blau-violett: 1 ml AP-Puffer + 4,5 μ l NBT + 3,5 μ l BCIP, im Dunkeln bei Raumtemperatur, Färbung kontrollieren.

Abstoppen der Färbung:

• 2x 5 Minuten TBST Fixieren mit MEMFA + 0,1% Tween 1-2 Stunden bei Raumtemperatur

3.3.4 BrdU-Markierung von Xenopus laevis Embryonen

(nach Hardcastle and Papalopulu, 2000 und Dr. D. Maurus)

Bei dieser Methode können proliferierende Zellen mit Hilfe von künstlich appliziertem 5-Bromo-2`-deoxy-Uridin (BrdU) markiert werden. Das BrdU wird von der DNA-Polymerase bei der DNA-Replikation während der Zellteilung als Thymidin-Analog eingebaut. Nach anschließender Fixierung der Embryonen weist man das BrdU mittels eines BrdU-Antikörpers nach. Ein Unterschied in der Proliferationsrate der Zellen läßt sich durch verschieden starke Färbung im Vergleich zum gefärbten Kontrollgewebe nachweisen.

Alle verwendeten Chemikalien stammen aus dem 5-Bromo-2⁻-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Roche).

Durchführung:

Die Embryonen werden im 8-Zellstadium unilateral mit dem jeweiligen MO injiziert. Sobald sie Stadium 23 erreicht haben, werden 10 nl BrdU (Labeling reagent, 1000x conc.) zweiseitig neben den Augenanlagen injiziert. Im Stadium 24 wurden die Embryonen fixiert und in Methanol überführt (Lagerung bei -20 °C in Methanol möglich).

<u>1. Tag</u>

Alle Reaktionen bei Raumtemperatur, wenn nicht anders vorgeschrieben. Alle Reaktionen finden in Glasrörchen statt.

Rehydrieren der Embryonen:

- 5 Minuten 100% Ethanol
- 5 Minuten 50% EtOH 50% PBS
- 5 Minuten 25% EtOH/ 75% PBS
- 5x 5 Minuten PBS

Proteinase K Behandlung:

10 Sekunden (St. 12-20) bzw. 15-25 Sekunden (St. 20-30) Proteinase K in TBST (3,6 µl Proteinase K (Stock 14 mg/ml) in 5 ml TBST) ⇒ NICHT rollen

Waschen:

• 2x 5 Minuten mit PBS

HCl-Behandlung:

• 60 Minuten 2N HCl

Waschen:

- 5x 5 Minuten mit PBST
- 2x 30 Minuten in PBS + 0,3% Triton X-100 waschen

Blockieren:

- 60 Minuten in PBS + 3% Horse Serum
- 15 Minuten in 200 µl Incubation Buffer (Boehringer Kit 1299964) äquilibrieren

Hybridisierung:

• 4 Stunden bei 37 °C mit 200 μ l Anti-BrdU Antikörperlösung (AK 1:10 in Incubation Buffer) inkubieren

Waschen:

- 3x 15-30 Minuten mit PBST
- über Nacht bei 4 °C in PBST

2. Tag

Waschen:

• 5x 5 Minuten mit PBS + 0,1% Tween-20 waschen

Blockieren:

• 60 Minuten mit PBS + 20% Horse Serum

Inkubation mit sekundärem Antikörper:

• 2,5 Stunden mit PBS + 20% Horse Serum + Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:10), leicht schwenken

Waschen:

- 3x 15-30 Minuten mit PBS + 0,1% Tween
- über Nacht bei 4 °C in PBS + 0,1% Tween

<u>3. Tag</u>

Waschen:

- 2x 5 Minuten mit PBS + 0,1% Tween
- 2x 5 Minuten in AP-Puffer

Färbung:

- von außen: 5-30 Minuten bei 4 °C mit Färbelösung (3 ml AP-Puffer + 13 μl NBT + 10 μl X-Phosphat) inkubieren
- für Schnitte: 20-24 Stunden bei 4 °C (3 ml AP-Puffer + 13 μ l NBT + 10 μ l X-Phosphat) inkubieren
- •

Abstoppen der Färbung:

- 2x 5 Minuten PBST
- Fixieren mit MEMFA + 0,1% Tween 1-2 Stunden bei Raumtemperatur

3.3.5 TUNEL-Markierung von Xenopus laevis Embryonen

(nach Hensey und Gautier, 1999).

Die TUNEL (<u>*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*</u>)-Färbung ist eine Standardmethode, um Zellen in der Apoptose darzustellen. Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod, bei welchem die DNA fragmentiert wird und freie 3'-OH Enden entstehen. Diese freien 3'-OH Enden können mit Hilfe des Enzyms TdT (terminal <u>nukleotidyl transferase</u>) mit modifizierten Nukleotiden markiert werden, die von einem spezifischen Antikörper, an den ein Enzym zur Umsetzung eines chromogen Substrats gekoppelt ist, erkannt werden. Dadurch können die apoptotischen Zellen durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Die Embryonen werden im gewünschten Stadium mit MEMFA zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 100 % MeOH dehydriert.

<u>1. Tag</u>

Alle Reaktionen bei Raumtemperatur, wenn nicht anders vorgeschrieben. Alle Reaktionen finden in Glasröhrchen statt.

Rehydrieren der Embryonen:

- 5 Minuten 100% MeOH
- 5 Minuten 50% MeOH 50% PBS
- 5 Minuten 25% MeOH/ 75% PBS
- 3x 5 Minuten PBST

Proteinase K Behandlung:

• 20 Sekunden (St. 23-25) Proteinase K in PBST (3,6 µl Proteinase K (Stock 14 mg/ml) in 5 ml TBST) ⇒ NICHT rollen

Waschen:

- 2x 5 Minuten 0,1 M Triethanolamin (750 μl Triethanolamin + 100 μl 32% HCl auf 50 ml H₂O)
- 5 Minuten 5 ml 0,1 M Triethanolamin + 12,5 μ l Acetanhydrid \Rightarrow NICHT rollen
- Zugabe von weiteren 10 μ l Acetanhydrid \Rightarrow NICHT rollen
- 2x 5 Minuten PBST

Fixieren:

- 60 Minuten MEMFA + 0,1% Tween \Rightarrow NICHT rollen
- 3x 15 Minuten und 3x 5 Minuten PBST

Enzymreaktion:

- 60 Minuten in 1x TdT-Puffer
- über Nacht Inkubation mit 0,5 μM dioxygenin-d'UTP und 150 U/ml TdT in 1x TdT-Puffer

<u>2. Tag</u>

Abstoppen der Enyzymreaktion:

- 2x 30 Minuten in 1 mM EDTA/PBS bei 65 °C
- 4x 60 Minuten in PBST

Blockieren:

- Embryonen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1 ml Blocking Solution inkubieren ⇒ leicht schwenken
- parallel: Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking Solution inkubieren (500 μl + 1:10.000 verdünnter Antikörper)
- Blocking Solution abnehmen, blockiertern Antikörper auf Embryonen geben, Inkubation 2,5 Stunden bei Raumtemperatur ⇒ leicht schwenken

Waschen:

- 3x 5 Minuten 1x PBST
- über Nacht 1x PBST

<u>3. Tag</u>

Waschen:

- 5x 30 Minuten 1x PBST
- 2x 5 Minuten AP-Puffer

Färbung:

- 1 ml BM Purple AP Substrat, im Dunkeln bei Raumtemperatur, Färbung kontrollieren
- ٠

Abstoppen der Färbung:

- 2x 5 Minuten TBST
- Fixieren mit MEMFA + 0,1% Tween 1-2 Stunden bei Raumtemperatur

3.3.6 Bleichen von Embryonen

Um die Färbung von pigmentierten Embryonen nach der WMISH, BrdU- oder TUNEL-Markierung besser zu erkennen, kann man sie zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 30% H_2O_2 inkubieren. So wird die störende Pigmentierung zur besseren Analyse ausgebleicht. Am nächsten Tag wird das Wasserstoffperoxid durch 2maliges 5minütiges Waschen mit TBST/PBST entfernt.

3.3.7 Transparenzbhandlung von Embryonen

Um eine Färbung auch im Inneren des Embryos von außen sichtbar zu machen, können diese transparent gemacht werden. Dadür werden die Embryonen für 5 Minuten in 100 % MeOH inkubiert und anschließend in Benzylbenzoat/Benzylalkohol (2:1) überführt (in Glasschälchen, da diese Lösung Plastik angreift). Nach ca. 5 Minuten werden die Embryonen durchsichtig, so dass Färbungen im Inneren des Embryos sichtbar werden. Nach Beobachtung/Dokumentation können die Embryonen wieder über MeOH in den

ursprünglichen Puffer gebracht werden. Die Benzylbenzoat/Benzylalkohol-Lösung kann für die Wiederverwendung bei RT gelagert werden.

3.3.8 Vibratomschnitte

Um Querschnitte von Embryonen zu erhalten, werden Vibratomschnitte gemacht. Die Embryonen später Stadien (ab Stadium 40) werden über eine Glycerinreihe (25%, 50%, 75%, 100% Glycerin) mehrere Tage an die Gelatinelösung äquilibriert. Im ersten Schritt wird in einer Gußform ein Podest aus gegossener Gelatinelösung, die mit Glutaraldehyd erhärtet wurde, vorbereitet (1 ml Gelatinelösung + 70 μ l Glutaraldehyd schnell mischen und eingießen). Anschließend wird der äquilibrierte Embryo auf das Podest gelegt, ausgerichtet, mit einem Papiertuch gut getrocknet und mit Gelatine eingebettet (1 ml Gelatinelösung + 70 μ l Glutaraldehyd schnell mischen und eingießen). Nachdem der Block erstarrt ist, wird die Gußform entfernt, der Block getrimmt und mit UHU-Kleber auf einen Metallträger geklebt. Im Anschluß daran können von dem eingebetteten Embryo mit Hilfe des Vibratoms Querschnitte gemacht werden. Die Schnittdicke kann zwischen 10 und 30 μ m variieren.

3.3.9 Knorpelfärbung (Alcianblaufärbung)

Durch die Alcianblaufärbung können Knorpelstrukuren im Embryo angefärbt werden. Gewünschte Embryonen werden in Stadium 47-48 mit MEMFA fixiert und folgende Durchführung vorgenommen:

- 95 Minuten Färbung der Embryonen in 1 % Alcianblau (0,5 ml Eisessig + 99,5 ml H_2O)
- über Nacht 80 % EtOH/20 % Eisessig
- 3 Stunden in 30 % H_2O_2
- waschen mit PBST, Hintergrund verbessert sich nach längerer Lagerung bei 4 ° C
- Entfernen der Haut mit Hilfe von feinen Pinzetten

3.3.10 Antikörperfärbung am ganzen Embryo

Mit Hilfe des Antikörpers 3A10 können Neurofilamente im Embryo sichtbar gemacht werden. Hierzu wird nach folgendem Protokoll verfahren:

- Fixierung mit MEMPFA (4 % Paraformaldeyd)
- 5x 5 Minuten waschen mit PBS
- Permeabilisieren der Embryonen: 0,3 % Triton X-100 in PBS, 2x 30 Minuten
- Blockieren: 3 % Horse Serum in PBS, 1-4 Stunden
- Inkubation mit primären Antikörper: 3A10 (1:100-Verdünnung), über Nacht
- 6x 30 Minuten waschen mit PBS
- Blockieren: 20 % Horse Serum in PBS, 1 Stunde
- Inkubation mit sekundärem Antikörper: Mouse IgG (1:250-Verdünnung), 5-6 Stunden
- 3x 30 Minuten waschen mit PBS

3.4 Arbeiten in der Zellkultur

3.4.1 Kultivieren von HEK-293 Zellen

Um die Lokalisation von des RGM A Proteins innerhalb einer Zelle zu untersuchen, wurden HEK-293 Zellen kultiviert. Damit die HEK-293 Zellen nicht überwachsen, werden diese jeden 3.-4. Tag gesplittet. Hierzu wird das DMEM-Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml Trypsin vom Boden abgelöst und mit weiteren 2,5 ml Wachstumsmedium bei 1.000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, wohingegen die Zellen in 2-3 ml Wachstumsmedium resupendiert werden. Im Anschluss daran werden 0,5-1 ml Zellen in eine neue Schale pipettiert und diese mit neuem Wachstumsmedium auf 10 ml aufgefüllt. Das Wachstum der HEK-293 Zellen erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

3.4.2 Transfektion von HEK-293 Zellen

Am ersten Tag der Prozedur werden die Zellen in einer 24-well Platte mit Wachstumsmedium ohne Antibiotika ausplattiert, so dass die Zelldichte am Folgetag zwischen 50-80 % liegt. Anschließend wird die Transfektionslösung hergestellt. Die zu transfizierende DNA (0,3 μ g DNA) wird mit Lipofectamin (2 μ l Lipofectamin auf 25 μ l DMEM) vermengt. Es folgt eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wird die Transfektionslösung 1:4 mit Wachstumsmedium verdünnt und davon werden 200 μ l auf die Zellen gegeben, so dass diese von der Lösung bedeckt sind. Es folgt eine 6-stündige Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator. Anschließend wird die Transfektionslösung durch Wachsumsmedium ersetzt und die Zellen nach 24 bzw. 36 Stunden mit MEMPFA fixiert.

3.4.3 DAPI-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'6-<u>Dia</u>midin-2'-<u>p</u>henyl<u>i</u>ndol-dihydrochlorid) bindet selekitv an DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. DAPI wird sehr schnell von den Zellen aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Für die Färbung wird die DAPI-Stammlösung (1 mg/ml H₂O) 1:1000 in 1x PBS verdünnt. Die Zellen werden 10 Minuten in der DAPI-Lösung inkubiert (dunkel halten!) und anschließend 5x 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Zellen auf Deckgläschen können mit Glycerin eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3.4.4 Antikörperfärbung

Um die Lokalisation des RGM A Proteins innerhalb einer Zelle aufzuklären, wurde eine Antikörperfärbung mit dem monoklonalen *anti-human/mouse/chicken* RGM A Antikörper durchgeführt. Hierzu werden RGM A-transfizierte Zellen auf Deckgläschen, die sich in 6-Well Platten befinden, ausplattiert. Zuvor werden die Deckgläschen kurz in 100% EtOH eingetaucht und abgeflammt. Wenn sich genügend Zellen auf dem Deckgläschen befinden (ca. 1-2 Tage), können die Zellen in MEMPFA für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert werden. Im Anschluss daran folgt die Antikörperfärbung:

Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt:

- 3x mit 2 ml 1x PBS waschen
- Permeabilisieren der Zellen mit 0,1 % Triton X-100, 2 Minuten
- 3x mit 2 ml 1x PBS waschen
- blockieren mit 3 % Horse Serum in 1x PBS für 1 Stunde
- Vorbereitung der feuchten Kammer: Petrischale am Rand mit 2 feuchten Zewa-Papieren bestücken, die Mitte der Petrischale mit einem Stück Parafilm bedecken
- Inkubation mit primären Antiköper (Monoklonaler anti-human/mouse/chicken RGM A Antikörper):
 50 ul dog primären Antikörperg (1:100 Verdünnung in 2 % Horse Serum) suf

50 µl des primären Antikörpers (1:100 Verdünnung in 3 % Horse Serum) auf Parafilm geben und Deckgläschen mit Zellseite nach unten von der Seite auf den Tropfen legen, Petrischalen zudeckeln und Inkubation für 1 Stunde

- 3x mit 2 ml 1x PBS waschen (Deckgläschen mit Zellseite nach oben)
- blockieren mit 20 % Horse Serum in 1x PBS für 1 Stunde
- Inkubation mit sekundärem Antiköper (Cy³-conjugated AffiniPure Goat Ant-Rat IgG-Antikörper):
 - Prozedur siehe oben, Antikörper-Verdünnung: 1:200
- 3x mit 2 ml 1x PBS waschen
- mit Glycerin eindeckeln
- Auswertung und Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Arbeiten mit RNA

Während der Arbeit mit RNA ist diese der Aktivität von RNasen ausgesetzt, die überall zu finden sind und RNA-Moleküle schnell degradieren. Aufgrund dieser Tatsache sollten einige Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, wie z.B. das Arbeiten mit Handschuhen und die Verwendung von autoklavierten Spitzen und sterilverpackten Plastikgefäßen und - pipetten. Für das Ansetzen von Lösungen und Puffern wird ausschließlich DEPC-H₂O verwendet und diese anschließend autoklaviert. Die Arbeitsfläche wird vor dem Arbeiten mit Ethanol gereinigt.

3.5.2Herstellung von RNA-Sonden für die *whole mount in-situ* Hybridisierung

Die einzelsträngigen RNA-Sonden mit definierter Länge werden über eine *in-vitro* Transkription synthetisiert und mit DIG (oder Fluo) markiert. DIG-11-UTP (bzw. Fluo-11-UTP) wird von einer RNA-Polymerase (SP6 oder T7) an jede 20. bis 25. Position des Transkripts in die RNA-Sonde eigebaut.

Als Matrize können linearisierte Plasmide oder PCR-Fragmente, bei welchen der benötigte Promotor mit Hilfe der Primer eingebaut wird, eingesetzt werden.

Ansatz:

x µl	lin. Plasmid (1 µg) oder PCR-Produkt (100-200 ng)
2 µl	DIG (oder Fluo) RNA labelling mix 10 x (Roche)
2 µl	10x Transkriptionspuffer
1 µl	RNase out
1 µl	RNA-Polymerase
xμl	RNase-freies H ₂ O

 \Rightarrow V_{end} = 20 µl

Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden. Anschließend werden 2 µl DNase I (RNase-frei) zugefügt mit anschließender Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten. Die Reinigung der RNA geschieht über G50 Spin columns (Amersham). Zuletzt werden Qualität und Reinheit über eine Agarosegelelektrophorese bestimmt. Die RNA-Sonden können nun in *whole mount in-situ* Hybridisierungspuffer bei -20 °C gelagert werden.

3.5.3 *In-vitro* Transkription und Aufreinigung von mRNA für die Mikroinjektion

Für die *in-vitro* Transkription wird der mMESSAGE MACHINE Kit von der Firma Ambion verwendet. Dieser Kit synthetisiert große mRNA Mengen, die eine *Cap*-Struktur aufweisen, welche bei den meisten eukaryotischen mRNAs am 5'-Ende als 7-Methyl-Guanosin auftaucht. Die mRNAs, die mit Hilfe dieses Kits entstehen, enthalten in der ersten Position eine (m⁷G(5')ppp(5')G) Struktur. Da für die *in-vitro* Transkription als Standardvektor das Plasmid pCS2+ eingesetzt wird, schließt sich aufgrund des SV40 Polyadenylierungssignals ein Poly-A-Schwanz am 3'-Ende an.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

10 µl	2xNTP/Cap-Lösung
2 µl	10x Reaction Buffer
1 µg	lineare DNA (Matrize)
x µl	H_2O
2 µl	Enzym (SP6, T7 oder T3)

$$\Rightarrow$$
 V_{end}= 20 µl

Es folgt erst eine 2stündige Inkubation bei 37 °C und anschließend eine 15minütige Inkubation mit 1 μ l DNase I ebenfalls bei 37 °C. Die RNA wird mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von QIAGEN aufgereinigt und bei -80 °C gelagert.

3.5.4 RNA-Präparation aus embryonalem Gewebe

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Kappen und Embryonen wird der Purescript RNA Isolation Kit verwendet. Hierzu werden ca. 4 Embryonen für 5 Minuten bei -80 °C in einem Eppendorfgefäß tiefgefroren. Im Anschluss daran werden die Embryonen in 450 µl Cell Lysis Solution mit einem Plastikpistill sehr gut homogenisiert, 150 μ l Protein-DNA Precipitation Solution hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Ausgefallene DNA und Proteine werden 3 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Den Überstand gibt man in ein neues Eppendorfgefäß, wiederholt den vorherigen Schritt und überführt den klaren Überstand nochmals in ein neues Eppendorfgefäß. Dem klaren Überstand werden 450 μ l Isopropanol zugegeben, vorsichig gemischt und die ausgefallene RNA 3 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert; die RNA ist als Pellet sichtbar. Der Überstand wird verworfen, das RNA-Pellet mit 300 μ l 70% Ethanol bedeckt und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wird vorsichtig abgenommen und das Pellet auf Zellstoff für ca. 10 Minuten an Luft getrocknet. Anschließend wird die RNA in 6 μ l RNA Hydration Solution 10 Minuten auf Eis gelöst, mit 6 μ l Dnase I-Puffer versetzt und mit 1 μ l DNase I 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Agarosegelelektrophorese wird die Integrität der RNA überprüft.

3.5.5 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese werden ca. 2 µg RNA eingesetzt. Der allgemeine Ansatz lautet:

x μl	RNA (2 μg)
хμ	H_2O
1 µl	Random Primer (50-250 ng)
\Rightarrow V _{ges} = 12	μl

Die Denaturierung der RNA erfolgt für 10 Minuten bei 70 °C. Der Ansatz wird kurz abzentrifugiert und für 2 Minuten auf Eis inkubiert.

Zugabe von:

4 µl	1st strand buffer
1 µl	10 mM dNTP Mix
2 µl	0,1 M DTT
$\Rightarrow V_{ges} = 1$	19 µl

Der Ansatz wird für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend 1 µl (200 U) Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) (\Rightarrow V_{ges}= 20 µl) hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation bei 42 °C für 50 Minuten mit anschließender Inaktivierung bei 70 °C für 15 Minuten.

3.5.6 PCR

Mit Hilfe der PCR (<u>*Polymerase Chain Reaction*</u> = Polymerasekettenreaktion; Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1986; Mullis *et al.*, 1986) kann man DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 5-6 kbp *in vitro* vervielfältigen, sofern die Sequenzen beider Enden des zu amplifizierenden Stückes bekannt sind.

Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Hitze von 95 °C in Einzelstränge denaturiert. Zwei synthetische Oligonukleotide, die zu den 3`-Enden beider Stränge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitt komplementär sind, werden in großem Überschuss zu der denaturierten DNA gegeben und die Temperatur auf 50 bis 60 °C gesenkt. Dabei bleibt die Matrize denaturiert, da die komplementären Stränge in einer zu geringen Konzentration vorliegen, um während der Inkubationsdauer aufeinander zu treffen. Die spezifischen Oligonucleotide jedoch, die in sehr hoher Konzentration vorliegen, hybridisieren mit den zu ihnen komplementären Sequenzen in der Matrize ("Annealing"). Hierbei dienen die Oligonucleotide als Primer für die Synthese des DNA-Strangs, die anschließend mit Hilfe einer temperaturresistenten DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72 °C beginnt ("Elongation"); die Polymerase stammt beispielsweise aus Thermus aquaticus (einem Bakterium, das in heißen Quellen vorkommt). Dieses Enzym kann die Primer bei Temperaturen bis zu 72 °C verlängern, die enzymatische Aktivität bleibt während der Denaturierungsphase erhalten. Nach Abschluss der Synthese wird das gesamte Gemisch auf 95 °C erhitzt, um die gerade gebildeten Doppelstränge wieder zu schmelzen. Nun kann sich ein neuer Zyklus anschließen. In wiederholten Zyklen wird die gewünschte Sequenz schnell amplifiziert. In jeder Runde verdoppelt sich annähernd die Anzahl der Kopien, es findet eine exponentielle Vermehrung des Fragmentes statt.

Beispielansatz:

2,5 µl	10x Puffer
1,5 µl	25 mM MgCl ₂
2 µl	dNTPs (je 10 mM)
1 μl	Primer 1 (10 μM)
1 μl	Primer 2 (10 μ M)
50-1000 ng	DNA-Matrize
0,25 µl	Taq-Polymerase
x μl	H_2O

 \Rightarrow V_{ges}= 25 µl

Die PCR wird in einem T3 Thermocycler mit Deckelheitzung durchgeführt.

Standardprogramm:

1. Schritt:	94 °C	1 Minute
2. Schritt:	94 °C	30 Sekunden
3. Schritt:	55 °C	30 Sekunden
4. Schritt:	72 °C	2 Minuten
Die Schritte 2	-4 30m	al wiederholen

5. Schritt:	72 °C	10 Minuten
6. Schritt:	4 °C	Temperatur halten

3.5.7 Herstellung chemokompetenter Bakterien

5 ml LB-Medium werden mit *Escherichia coli* One Shot TOP-10 Bakterien überimpft, die über Nacht bei 37 °C wachsen. Am folgenden Tag beimpft man 100 ml LB mit 1-3 ml dieser Vorkultur und lässt diese bei 37 °C wachsen, bis sie eine O.D. zwischen 0,5 und 0,7 erreicht haben, schütteln. Anschließend werden die Zellen auf Eis abgekühlt und in 2 vorgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen werden bei 4 °C und 2800 rpm für 4 Minuten abzentrifugiert. Das Medium wird abgeschüttet, das Pelett kurz getrocknet und im Anschluß in 2/5 Volumen Tfb 1 resuspensiert. Es folgen eine 5-minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation bei 2400 rpm und 4 °C für 4 Minuten. Die Lösung wird abgeschüttet, das Pelett in 1/25 Volumen resuspensiert. Die resuspensierten Zellen inkubieren nochmals für 15 Minuten auf Eis bevor 80 μ l Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren werden. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

3.5.8 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

5 ml LB-Medium werden mit *Escherichia coli* ElektroMax DH10B Bakterien überimpft, die über Nacht bei 37 °C wachsen. Am folgenden Tag beimpft man 100 ml LB mit 1-3 ml dieser Vorkultur und lässt diese bei 37 °C, bis sie eine O.D. zwischen 0,5 und 0,7 erreicht haben, schütteln. Anschließend werden die Zellen auf Eis abgekühlt und in 2 vorgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen werden bei 4 °C und 2800 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Medium wird abgeschüttet, das Pelett kurz getrocknet und in 20 ml eigekühltem H₂O vorsichtig resuspendiert. Anschließend wird erneut für 10 Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 10 ml eisgekühltem H₂O gewaschen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten und 2800 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Bakterien in 6 ml einer eisgekühlten 10 %igen Glycerin-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 2800 rpm). Anschließend werden die abzentrifugierten Bakterien in 1-1,5 ml einer 10 %iger Glycerin-Lösung aufgenommen. Die elektrokompetenten Bakterien werden in 50 μ l Aliqouts in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.9 Chemotransformation kompetenter Bakterien

Im Fall der Chemotransformation erfahren die Bakterien einen kurzen Hitzeschock, durch welchen ihre Membran durchlässiger wird. Dadurch sind sie in der Lage, ein Plasmid aufzunehmen.

30 µl chemisch kompetenter Bakterien werden in einem Eppendorfgefäß aufgetaut. Anschließend fügt man 2-3 µl einer Ligation hinzu und mischt vorsichtig. Die Mischung aus Bakterien und DNA wird 40 Minuten auf Eis inkubiert. Den anschließenden Hitzeschock erfahren die Bakterien eine Minute bei 42 °C. Danach wird das Eppendorfgefäß mit den Bakterien sofort auf Eis gestellt. Nun kann man auf zwei verschiedene Arten weiter verfahren:

a. Es werden 300 µl LB-Medium zugegeben und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgt eine Zentrifugation 1 Minute bei 13.000 rpm. Vom Überstand werden bis auf 100 µl abgenommen, die abzentrifugierten Bakterinen mit dem restlichen 100 μ l LB-Medium vermengt und auf Selektivplatten (LB + Ampicillin) ausplattiert. Inkubation über Nacht bei 37 °C.

 b. Den Bakterien werden 150 μl LB-Medium zugegeben und ebenfalls 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend werde je 75 μl LB/Bakterienmischung auf 2 Selektivplatten ausplattiert. Inkubation über Nacht bei 37 °C.

Am folgenden Tag folgt eine Kolonie-PCR.

3.5.10 Elektroporation kompetenter Bakterien

Eine weitere Methode, DNA in Bakterien einzuschleusen, stellt die Elektroporation dar. Bei diesem Verfahren vermischt man Zellen mit DNA und setzt beide einem kurzen Hochspannungsimpuls aus. Dies führt zur vorübergehenden Porenbildung in der Membran der Bakterien (Calvin und Hanawalt, 1988). So lassen sich DNA-Moleküle von bis zu 300 kbp mit ausreichender Häufigkeit in *E. coli*-Zellen einbringen. Die Poren entstehen wahrscheinlich dadurch, dass sich die Phospholipide der Membran in dem elektrischen Feld wie Dipole verhalten und so die Struktur der Membran verändert wird (Neumann *et al,* 1982).

Ablauf der Elektroporation:

- kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut
- Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand vorkühlen
- 20 µl kompetente Zellen mit DNA (40 pg-100 ng) mischen (wichtig: der Salzgehalt des Ansatzes sollte sehr gering sein, damit die Lösung nicht während des elektrischen Spannungsimpuls explosionsartig verdampft.)
- Mischung in die Elektroporationsküvette überführen
- Geräteeinstellungen kontrollieren:
 - $c = 25 \ \mu F$
 - V = 1,8 kV

 $R = 200 \Omega$

- Küvette in Elektroporationsvorrichtung stellen
- Auslösen des Impulses \rightarrow Zeitkonstante $\tau = RC$ sollte zwischen 4,0-4,7 liegen
- 500 µl LB- oder Solmedium zu den Bakterien in der Küvette
- Überführen der Bakterien in Eppendorfgefäß
- Inkubation bei 37 °C für 20-30 Minuten
- abzentrifugieren und bis auf 100 μl Medium abnehmen, Bakterien in diesen 100 μl Medium resupendieren und auf einer Platte mit Selektivmedium ausplattieren
- über Nacht bei 37 °C
- am nächsten Tag Kolonie-PCR

3.5.11 Kolonie-PCR

Mit Hilfe einer Kolonie-PCR kann man schnell viele Klone auf das gewünschte Insert hin untersuchen.

Dabei wird die Kolonie auf der Agar-Platte mit einer grauen Spitze angestochen, diese anschließend in einen Standard-PCR Reaktionsansatz (ohne DNA-Matrize, siehe Kapitel 3.5.6) eingetaucht und gut gerührt, so dass Bakterien in Lösung gehen.

3.5.12 Anlegen von Gefrierkulturen transformierter Bakterien

700 μ l einer dicht bewachsenen Kultur wird mit 300 μ l Glycerin versetzt, gut durchmischt und anschließend bei -80 °C tiefgefroren.

3.5.13 Plasmidpräparation

Minipräparation

In dieser Methode werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgebrochen (Birnboim und Doly, 1997). Es werden über Nacht gewachsene Bakterien verwendet und durch Zugabe eines alkalischen Lysepuffers werden die Zellen aufgeschlossen (erkennbar am der zähen Konsistenz der Lösung). Daran anschließend wird eine Kalliumacetat enthaltene Lösung zugegeben. Der niedrige pH-Wert und das Detergenz bewirken eine Denaturierung der chroMOomalen, Plasmid-DNA und den Proteinen. Dann wird die Lösung neutralisiert, worauf sich die Plasmid-DNA renaturiert. Die hochmolekulare chroMOomale DNA und die großen Proteine werden in einem Komplex mit Kalium und SDS ausgefällt und abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA kann nun durch Zugabe von Ethanol mit anschließendem Abzentrifugieren gefällt werden.

Um Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus Bakterien zu isolieren, wird der Promega Miniprep Wizard Plus SV Kit verwendet. Im ersten Schritt werden 5-10 ml dicht über Nacht bei 37 °C gewachsene Flüssigkultur abzentrifugiert und die Bakterien in Resuspensionslösung resuspensiert. Mit diesem Verfahren können die Plasmide sehr schnell, mit sehr guter Reinheit und großen Ausbeuten präparieren. Bei diesem Verfahren wird eine Affinitätsäule (Promega) eingesetzt, an die die Plasmid-DNA selektiv bindet. Während der Durchführung der Plasmidpräparation wird das Centrifugation Protocol (www.promega.com) genau eingehalten. Die DNA wird in 50 μ l Nuclease-Free Water eluiert.

Midipräparation

Diese Plasmidisolation wird mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit durchgeführt. Auch hier handelt es sich um eine alkalische Lyse der Bakterien wie im Beispiel des Promega Miniprep Wizard Plus SV Kits. In der Regel werden 50 ml einer über Nacht bei 37 °C geschüttelten Flüssigkultur eingesetzt. Das Herstellerprotokoll (www.qiagen.de) wird genau eingehalten.

3.5.14 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz eines DNA-Moleküls wird nach der von dem britischen Wissenschaftler Frederick Sanger (Sanger und Coulson, 1975; Sanger und Coulson 1978) entwickelten Methode verfahren. Diese Methode beruht auf der *in-vitro* Synthese eines Komplementärstranges zu einem der beiden Einzelstränge der DNA, die

man sequenzieren möchte. Das Verfahren basiert auf dem zufälligen Einbau modifizierter Nukleotide (*Di*desoxyribonukleotide, denen *zwei* Sauerstoffatome fehlen), wodurch eine weitere DNA-Synthese unterbunden wird. An einem Primer wird eine Serie von DNA-Fragmenten synthetisiert, die jeweils dann enden, wenn ein Didesoxyribonucleotid eingebaut wurde. Da dies aus statistischen Gründen an jeder beliebigen Position des DNA-Moleküls passiert, entsteht ein vollständiger Satz von Fragmenten, die um jeweils ein Nukleotid verkürzt sind; das Gemisch repräsentiert die gesamte zu sequenzierende DNA. Früher wurden zur Markierung der Fragmente radioaktive Primer benutzt, während heute fluoreszierende Substanzen, die an die zugefügten DNA-Nukleotide gebunden sind, verwendet, wobei jedes der Nukleotide durch eine unterschiedliche Farbe gekennzeichnet ist. Dies ermöglicht die Durchführung aller vier Reaktionen in einem Ansatz; die Didesoxy-Enden der fluoreszenzmarkierten DNA können durch ihren Farbcode unterschieden werden.

Die Fragmente unterschiedlicher Länge werden in einem hochprozentigen, extrem dünnen Polyacrylamid-Gel getrennt, das DNA-Moleküle auftrennen kann, die sich in ihrer Länge nur um ein Nucleotid unterscheiden. Die Sequenz des neusynthetisierten Stranges kann direkt von dem Bandenmuster des Gels abgelesen werden. Man kann daraus die Sequenz des Matrizenstrangs ableiten.

Allgemeiner Ansatz:

 μ l Mini μ l Premix μ l Primer μ l H₂O \Rightarrow V_{end}= 10 μ l

Sequenzierungs-PCR-Programm:

1. Schritt:	94 °C	2 Minuten
2. Schritt:	94 °C	2 Sekunden
3. Schritt:	50 °C	15 Sekunden
4. Schritt:	60 °C	1 Minute

 \rightarrow die Schritte 2-4 werden 24mal wiederholt

5. Schritt: 4 °C Pause

Es folgt eine Ethanol-Fällung. Im Anschluss daran wird das Pelett in Formamid-Auftragspuffer gelöst und auf das Sequenziergel aufgetragen.

3.5.15 Ethanol-Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Um die Konzentration von DNA zu erhöhen, kann man diese mit Alkohol fällen (Geiduschek und Gray, 1956). Man versetzt die Nukleisäure-Lösung mit einfach geladenem Salz und fügt Alkohol hinzu. Dadurch bewirken die Kationen des Salzes eine

Neutralisation der negativen Ladung des DNA-Moleküls, so dass die DNA kollabiert und eine kompakte, stäbchenformige Struktur bildet (Eickbush und Mondriakis, 1978).

Es werden 1/10 des Ausgangsvolumens an 3M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Volumen des Ausgangsvolumens an 100% Ethanol hinzugegeben. Anschließend wird stark gevortext und 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Die DNA wird 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals zweimal mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen. Getrocknet wird die DNA bei Raumtemperatur und im Anschluss in H₂O aufgenommen.

3.5.16 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente von 500 bp bis 25 kbp voneinader zu trennen. Zieht man zum Vergleich ein Bandenmuster von Molekülen bekannter Größe heran, kann man auch Molekülgrößen von unbekannter DNA bestimmen.

Man kocht Agarose in TBE-Puffer auf und gießt den homogenen Agarosepuffer in eine horizontale Gelkammer, die einen Kamm enthält, und läßt das Gel auspolymerisieren. Nach ihrer Auftrennung in dem Gel macht man DNA-Moleküle über den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sichtbar. Hierzu wird das Gel entweder mit Ethidiumbromid inkubiert oder der Farbstoff wird direkt nach dem Aufkochen in die flüssige Agaroselösung gegeben. Dieses planare Molekül bindet sich an DNA, indem es sich zwischen die Basenpaare schiebt (interkaliert). Durch diese Bindung wird Ethidiumbromid in der DNA konzentriert und die Eigenfluoreszenz verstärkt. Bei Bestrahlung des Gels mit ultraviolettem Licht fluoreszieren die DNA-haltigen Gelbereiche viel stärker als die Bereiche ohne DNA.

3.5.17 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente können mit Hilfe des QIAGEN Gel Extraction Kit aus Agarosegelen isoliert werden. Das Prinzip basiert auf der Auflösung der Agarose in einem Puffer mit chaotrophen Salzes (Vogelstein und Gillespie, 1978) und nachfolgender Aufreinigung der DNA über eine DNA-Affinitätssäule.Das DNA-Gemisch wird auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Anschließend wird die gewünschte Bande schnell auf dem UV-Tisch mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Dann wird genau nach Anleitung (www.qiagen.de) verfahren.

3.5.18 Klonieren von DNA-Fragmenten

Die Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht. Seit der Einführung der PCR kommt man prinzipiell auch ohne die Klonierung aus, doch als Klon ist die DNA sehr stabil, so dass man sie kaum verlieren kann. Durch den Vektor kann man dem Fragment noch weitere Eigenschaften aneignen, die die Anwendungsmöglichkeiten erweitern. So erlauben RNA-Polymerase-Promotoren im Vektor die problemlose *in-vitro* Transkription von RNA, während die viralen Promotoren im Konstrukt eine Expression in Säugetierzellen erlauben. Man kann auf diese Weise auch Banken von genomischer DNA oder cDNA aus verschiedenen Organismen und Geweben herstellen. Das Prinzip der Klonierung ist

folgendermaßen: man verdaut Vektor und DNA-Fragment, reinigt sie, ligiert sie miteinander und transformiert die Ligation in Bakterien.

3.5.19 Restriktionsspaltung von DNA

Die DNA kann über Restriktionsenzymen an den Phosphodiester-Bindungen gespalten werden. Restriktionsenzymen sind bakterielle Enzyme, die spezifisch vier bis acht Basenpaar lange Sequenzen, die Restriktionsschnittstellen, erkennen und beide Stränge an dieser Stelle schneiden. Da diese Enzyme die DNA innerhalb des Stranges schneiden, werden sie auch Restriktionsendonucleasen genannt. Viele Restriktionsschnittstellen, wie beispielsweise die EcoRI-Schnittstelle, sind kurze invertierte Sequenzwiederholungen (inverted repeats); das bedeutet, dass die Sequenz der Restriktionsschnittstelle in $5 \rightarrow 3^{-1}$ Richtung gelesen auf beiden DNA-Strängen identisch ist (Palindrom). Je nach Enzym entstehen glatte DNA-Enden ("blunt ends") oder 5`- bzw. 3`-überhängende Enden ("sticky ends"). Die Reaktion findet in einem ionischen Puffer mit einem definiertem pH-Wert statt. Es sollte ein Puffer gewählt werden, in welchem das Enzym eine ausreichende Aktivität besitzt (>75 %). Es wird eine Enzymaktivität von etwa 1U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt (Definition: eine "Unit" eines Restriktionsenzyms spaltet ein Mikrogramm DNA in einem Volumen von 50 µl in einer Stunde). Bei einem Doppelverdau sollte darauf geachtet werden, das ein Puffer verwendet wird, in welchem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität besitzen. Findet sich keiner, verdaut man erst mit dem Enzym, das die geringere Salzkonzentration benötigt, und stockt dann anschließend den Ansatz mit Puffer auf, bis man die optimale Konzentration für das zweite Enzym erreicht hat.

Allgemeiner Ansatz:

0,2-1 μg	DNA
2 μl	10x Puffer
1 U	Enzym
x μl	H_2O

 \Rightarrow V_{end}= 20 µl

Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C.

3.5.20 Ligation von DNA-Fragmenten

Hierzu wird das Enzym Ligate-IT T4 DNA Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'OH-Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe am Ende des anderen Stranges (Weiss *et al.*, 1968). Diese Reaktion ist endergonisch, weshalb ATP erforderlich ist. Mit der Verwendung dieses Enzyms lassen sich bei der Restriktion entstandenen DNA-Fragmente in einen Vektor einbringen; die Produkte einer Ligation werden in *E. coli* Bakterien transformiert und so vermehrt. Bei einer Ligation sollte das molare Verhältnis von Vektor zu Insert zwischen 1:3 bis 1:10 liegen.

Allgemeiner Reaktionsansatz ("sticky ends"):

4 μl	5x Ligate-IT Reaction Buffer
3-10 molare Anteile	Insert-DNA
1 molarer Anteil	gespaltener DNA-Vektor
1 μl	Ligate-IT T4 DNA Ligase
x μl	H_2O

 \Rightarrow V_{end} = 20 µl H₂O

Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde.

3.5.21 Ligation von PCR-Fragmenten in den pCR^R 4Blunt-TOPO Vektor

Die Ligation von PCR-Fragmente in einen pCR^R 4Blunt-TOPO Vektor wird durch folgenden Mechanismus erleichtert. Der pCR^R 4Blunt-TOPO Vektor der Firma Invitrogen liegt in linearisierter Form vor, an dessen 3'Enden eine Topoisomerase I des Vaccinina Virus kovalent an den geöffneten Vektor gebunden ist; dieses Enzym katalysiert die Ligation und wird anschließend freigesetzt (Shuman, 1994).

Reaktionsansatz:

0,5-4 μl	PCR-Produkt
1 μl	TOPO-Vektor
1 µl	Salzlösung (300 mM NACl, 15 mM MgCl)

Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und anschließende chemische Transformation mit 2 μ l des Reaktionsansatzes.

3.5.22 Blau-Weiß-Selektion

Durch die Blau-Weiß-Selektion wird die Suche nach positiven Klonen auf einer Agar-Platte erheblich erleichtert. Dieses Verfahren beruht auf der α -Komplementation der β -Galactosidase. Wird die DNA-Sequenz, die für das α -Peptid codiert, durch den Einbau von fremder DNA unterbrochen, bleiben die Bakterienklone weiß. Bakterienklone, die religierten Vektor aufgenommen haben, färben sich durch die Synthese des α -Peptids, welches X-Gal umsetzt, blau. Bakterien, die keinen Vektor aufgenommen haben, wachsen durch das Vorhandensein eines Antibiotikums erst gar nicht. Selektiv-Platten, die für eine Blau-Weiß-Selektion verwendet werden, werden eine halbe Stunde vor dem Ausplattieren mit 20 μ l 50 mg/ml X-Gal bestrichen. Das Austreichen von IPTG ist bei diesem verwendeten Stamm nicht nötig.

3.5.23 Herstellung von Deletionskonstrukten mit Hilfe des STRATAGENE Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit

Für nähere Analysen eines Gens ist es häufig notwendig, gezielt Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in einen Sequenzabschnitt einzubringen. In dieser Arbeit

wurden Punktmutationen in die Pescadillosequenz eingefügt, um die MO-Bindestelle so zu verändern, dass keine Bindung des MO mehr möglich ist. Hierzu wurde der Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit von der Firma Stratagene verwendet. Es wurde genau nach Herstellerangaben verfahren (http://www.stratagene.com/manuals/200514.pdf). Mit Hilfe Stratagene entworfenen einer von Internetseite (http://www.stratagene.com/gcprimerdesign) können spezifische, 34-36 bp lange Primer designt werden, welche die gewünschten Punktmutationen enthalten. Diese Primer werden in einer anschließenden PCR eingesetzt. Die Amplifikation geschieht mit der sogenannten "PfuUltra High Fidelity" DNA-Polymerase, die auch lange DNA-Fragmente (> 10 kb) nahezu fehlerfrei vervielfältigen kann. Im Anschluss an die PCR wird mit der Endopeptidase DpnI verdaut, die das von den Bakterien metylierte Ausgangsplasmid abbaut; die neu amplifizierten, mutierten DNA-Fragmente bleiben erhalten. Daran folgt eine Transformation in Bakterien.

3.5.24 In-vitro Transkription/Translation (TNT-Kit)

Für die *in-vitro* Transkription/Translation wird der T7 "TNT Quick Coupled Transcription/Translation System" Kit der Firma Promega verwendet. Bei der Durchführung wird sich genau an die Angaben des Herstellers gehalten (www.promega.com). Während der Translation wird zufällig [³⁵S]-Methionin eingebaut, welches man dem Ansatz hinzufügt.

Allgemeiner Ansatz:

40 µl	TNT-Mix
2 µl	$[^{35}S]$ -Methionin (200 μ Ci/20 μ l)
1 μg	Plasmid
25 µg	МО
x μl	H ₂ O

 \Rightarrow V_{ges}= 50 µl

Die folgende Reaktion verläuft 60-90 Minuten bei 30 °C. Anschließend werden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteinprobe wird im Verhältnis 5:1 (Protein:Puffer) mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 80 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

3.5.25 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Herstellung von SDS-PAGE (Michov, 1996) polymerisiert man Acrylamid in einer wässrigen, gepufferten Lösung zwischen zwei Glasplatten. Durch die Zugabe von Vernetzermolekülen Ouervernetzung kommt es zu einer der entstehenden Polyacrylamidketten. Das Verhältnis von Acrylamid zu Vernetzermolekülen bestimmt die Porengröße des Gels, die in einem weiten Bereich variieren kann. Durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) sind die Proteine bereits vor und auch während der Elektrophorese SDS ausgesetzt. SDS denaturiert Proteine, verursacht die Dissoziation multimerer Komplexe in ihre Untereinheiten und zwingt alle Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation mit gleichem Ladungs-Masse-Verhältnis. SDS beseitigt demnach alle Effekte, die auf Unterschieden in der Form beruhen, so dass die Kettenlänge, die der Masse entspricht, die alleinige Determinante für die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in einer SDS-PAGE ist. Mit dieser Methode werden sogar Ketten, die sich nur um 10% Molekulargewicht unterscheiden, aufgetrennt. Man kann auch das ungefähre Molekulargewicht der Proteine abschätzen, indem man einen Proteinmarker mitaufträgt. Hier wird eine SDS-PAGE durchgeführt, die aus einem Sammel- und einem Trenngel besteht. Erst wird das Trenngel, anschließend das Sammelgel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Der Kamm wird in das obere Ende des Sammelgels eingebracht. Nach Auspolymerisierung des Acrylamids werden die Proben aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt. Durch die negative Ladung der Proteine wandern sie zur positiven Elektrode. Kleinere Proteine können leichter und daher schneller durch die Poren des Gels wandern als als große, schwere Proteine. Während der Wanderung werden die Proteine daher nach ihrem Molekulargewicht in Banden aufgetrennt, die sich entweder durch einen speziellen Farbstoffe oder eine radioaktive Markierung der Proteine sichtbar machen lassen.

Ansatz für zwei kleine Proteingele (Biorad):

Sammelgel (4,5%):

1,1 ml	Lösung A
100 µl	10% SDS
2,5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
6,4 ml	H ₂ O
50 µl	10% APS, frich ansetzen
30 µl	TEMED

Trenngel (10%):

4 ml	Lösung A
3,7 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
150 µl	10% SDS
7,2 ml	H_2O
50 µl	10% APS, frisch angesetzt
25 µl	TEMED

Die Elektrophorese wird mit SDS-Elektrophoresepuffer durchgeführt, der Einlauf in das Sammelgel erfolgt bei 80 V, die Trennung im Trenngel bei 120 V.

Im Anschluß an den Gellauf wird das Gel folgendermaßen fixiert: 2mal 30 Minuten schütteln auf dem Horizontalschüttler mit Fixierlösung 1 und 1x mit Fixierlösung 2.

Dann wird das Gel auf dem Geltrockner mindestens für 2 Stunden bei 60-80 °C getrocknet, bevor der Screen aufgelegt wird. Der Screen inkubiert über Nacht und am nächsten Tag folgt die Auswertung am PhosphorImager.

Prinzip des PhosphorImagers (Mülhardt, 2002):

Der Screen ist mit BaFBr:Eu-Kristallen beschichtet; Elektronen in dessen Kristallen können durch ionische Energie in einen angeregten, aber stabilen Zustand versetzt werden. Nach erfolgreicher Exposition mit der hybridisierten Membran werden die Kristalle von einem Laserstrahl abgetastet und dabei nochmals angeregt, diesmal aber in einen instabilen Zustand, woraufhin die Elektronen in ihren Grundzustand zurückfallen; dabei wird die frei werdende Energie in Form von Licht abgegeben, welches gemessen wird. Diese Methode ist für radioaktive Isotope (β - und γ -Strahler wie ¹⁴C, ³⁵S, ³²P, ³³P, ¹²⁵I, ¹³¹I) und UV-Licht geeignet.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die potentiellen Zielgene Pescadillo, RGM A und DM-GRASP nicht-kanonischer Wnt-Siganlwege funktionell zu untersuchen. Diese werden im Folgenden der Reihe nach beschrieben.

4.1 Pescadillo

Teile dieses Projekts wurden in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Gessert, 2004) begonnen, in dieser Arbeit genauer erarbeitet und zu Ende gebracht.

4.1.1 Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von Pescadillo in Xenopus laevis

Durch eine semi-quantitative RT-PCR mit RNA aus verschiedenen Stadien wurde das zeitliche Expressionsmuster von Pescadillo erfasst. Dies geschah im Rahmen der Diplomarbeit. Daraus ergab sich, das Pescadillo schon maternal vorhanden ist und während der gesamten Embryogense exprimiert wird (Gessert, 2004).

Das örtliche Expressionsprofil wurde mit Hilfe der *whole mount in-situ* Hybridisierung erstellt. Hierzu wurde eine Pescadillo-spezifische revers-komplemtäre RNA-Sonde synthetisiert und eine *whole mount in-situ* Hybridisierung mit *X. laevis* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt. Das spezifische Expressionsmuster von Pescadillo beginnt in Stadium 18 in der anterioren Neuralplate (Abb. 9A). In den Stadien 23 und 26 zeigt sich die Pescadilloexpression im Auge und in den nach ventral wandernden Neuralleistenzellen (Abb. 9B,C). Ein Querschnitt verdeutlicht die Expression von Pescadillo in der äußeren Augenschicht und in der Mittelhirn-Hinterhirngrenze, dem Isthmus (Abb. 9G). In Stadium 31 ist Pescadillo im Auge, speziell im periokularen Mesenchym (Abb. 9F,I), im Isthmus (Abb. 9D), den Branchialbögen (Abb. 9F,H) und dem Pronephros (Abb. 9E) exprimiert.



Abbildung 9: Epressionsmuster von Pescadillo.

A. In Stadium 18 ist Pescadillo spezifisch in der anterioren Neuralplatte exprimiert (Pfeil). B. Pescadillo wurde in Stadium 23 im Auge (Pfeilspitze) und den auswandernden Neurallleistenzellen (Pfeil) detektiert. C. Embryonen in Stadium 26 zeigen eine Pescadillo Expression im Auge und den Neuralleistenzellen. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die Schnittebene des Querschnitts in G. D. Dorsale Ansicht eine Embryos in Stadium 31. Pescadillo ist in der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze, dem Isthmus, exprimiert (Pfeil). E. In Stadium 31 ist Pescadillo im Auge, den Neuralleistenzellen und im Pronephros (Pfeil) exprimiert. Die weiß gestrichelte Linie zeigt die Schnittebende des Horizontalschnitts in I, die schwarz gestrichelte die des horizontalen Schnitts in H an. F. Vergrößterte Aufnahme eines Embryos in Stadium 31. Pecadillo ist im periokularen Mesechym exprimiert (Pfeil). G. Querschnitt eines Embryos in Stadium 26. Pescadillo zeigt eine Expression im Isthmus (Pfeilspitzte) und am äußeren Rand des Auges (Pfeil). H Horizontalschnitt eines Embryos in Stadium 31. Pescadillo ist in den Kiementaschen exprimiert. I. Horizontalschnitt eines Embryos in Stadium 31. Mauge ist Pescadillo im periokluaren Mesenchym exprimiert. Teilbilder A und D wurden der Diplomarbeit entnommen.

4.1.2 Pescadillo als potentielles Wnt-4 Zielgen

Pescadillo wurde als potentielles Zielgen von Wnt-4 in einem Überexpressionsscreen identifiziert (Maurus, 2004). Um diese Daten zu verifizieren, wurde untersucht, ob der Funktionsverlust von Wnt-4 einen Einfluss auf die Expression von Pescadillo hat. Dazu

wurden 15 ng des Wnt-4 MO (Saulnier *et al.*, 2002) in eine animal-dorsale Blastomere eines Embryos im 8-Zell Stadium injiziert. Der Funktionsverlust von Wnt-4 führte zu einer Inhibierung der Pescadillo Expression auf der injizierten Seite, während die Injektion eines Control MO keinen Effekt auf Pescadillo ausübte (Abb.10 A). Frizzled-3, ein putativer Rezeptor für Wnt-4, ist ebenfalls im Augenfeld exprimiert (Shi *et al.*, 1998, Rasmussen *et al.*, 2001). Um den Effekt von Frizzled-3 auf die Pescadilloexpression zu untersuchen, wurden 10 ng des Frizzled-3 MO wie oben beschrieben injiziert. Die Inhibierung von Frizzled-3 führte zu einer Reduktion der endogenen Pescadillo Expression (Abb.10 B). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten des Überexpressionsscreens von Wnt-4 (Maurus, 2004), dass Pescadillo ein potentielles Zielgen von Wnt-4 und seines putativen Rezeptors Frizzled-3 ist.



Abbildung 10: Pescadillo als potenitelles Zielgen von Wnt-4 und Frizzled-3.

Xenopus laevis Embryonen wurde unilateral im 8-Zell Stadium mit dem Wnt-4 (A), Frizzled-3 (B) oder Control MO (A,B) injiziert. In Stadium 25 wurden die Pescadilloexpression über eine *whole mount in-situ* Hybridisierung detektiert. A. Die Injektion des Wnt-4 MO bewirkt einen Verlust der Pescadilloexpression sowohl im Auge (weißer Pfeil), als auch in den Neuralleistenzellen (schwarzer Pfeil). B. Durch den Frizzled-3 Verlust kommt es zur Reduktion der Pescadilloexpression.

4.1.3 Beschreibung des Phänotyps nach Funktionsverlust von Pescadillo

Um die Wirkungsweise einzelner Gene von Xenopus laevis zu analysieren, kann man sich der schnellen und effektiven Methode der Injektion von antisense Morpholino-

Oligonukleotiden bedienen. Um diese Technik anzuwenden, wurde ein 23 Basenpaar langes Morpholino-Oligonukleotid hergestellt, welches revers-komplementär zur Sequenz von Pescadillo ist. Um die Spezifität und Funktionalität des verwendeten Pescadillo antisense Morpholino-Oligonukleotids (Pescadillo MO) zu überprüfen, wurde einerseits ein gekoppelter in-vitro Transkriptions- und Translationstest (TNT) und andererseits ein Spezifitätstest in-vivo durchgeführt (Abb. 11). Hiermit wird die Fähigkeit des Morpholino-Oligonukleotids getestet, die Translation der spezifischen mRNA zu unterdrücken. Die Anwesenheit des Pescadillo MO bewirkte eine Inhibierung der Translation des Pescadillo Proteins (Abb. 11B), während das Control MO keinerlei Auswirkung auf die Translation von Pescadillo aufwies. Des Weiteren wurde die Bindungsfähigkeit des Pescadillo MO an Pescadillokonstrukt (Pescadillo Mut) 9 ein mutiertes getestet, welches Basenpaaraustausche zeigt (Abb. 11A). Wie aus Abb. 11C deutlich hervorgeht, hatte das Pescadillo MO keinen Einfluss auf die Translation von Pescadillo_Mut. Somit konnte dieses Konstrukt für kommende "Rescue"-Experimente verwendet werden. Als weiteren Morpholino-Oligonukleotid Spezifiätstest wurde ein Test in-vivo gemacht. Hierzu wurden sowohl die Pescadillo MO als auch die die Pescadillo_Mut Sequenz (Abb. 11A) in einen GFP (green fluorescence protein) exprimierenden Vektor vor die GFP Sequenz kloniert, so dass der Leserahmen erhalten blieb. Anschließend wurden die entsprechenden mRNAs mit Hilfe des SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion) synthetisiert und in X. laevis Embryonen im 2-Zell Stadium injiziert. Nach Koinjektion der Pescadillo-GFP mRNA mit dem Control MO zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop die GFP Expression (Abb. 11C). Bei Ersetzen des Control MO durch das Pescadillo MO wurde die GFP Expression inhibiert (Abb. 11C). Durch die Koinjektion von Pescadillo_Mut-GFP mit dem Pescadillo MO kam es zum Leuchten (Abb. 11C). Diese beiden Tests verdeutlichen die Spezifität und Funktionalität des Pescadillo MO und zeigen, dass das Pescadillo_Mut Konstrukt die Bindungspezifität des Pescadillo MO verloren hat.


Abbildung 11: Spezifiät- und Funktionalitätstest des Pescadillo MO.

A. Bindesstelle des Pescadillo MO innerhalb der Pescadillo Sequenz. Das ATG-Startcodon ist hervorgehoben. Die mutierten Basen in der Pescadillo_Mut Sequenz sind rot dargestellt. B. *Invitro* Transkriptions- und Translationstest. Plasmide, die die Pescadillo oder die Pescadille_Mut Sequenz enthalten, wurden wie bezeichnet verwendet. Das Pescadillo oder Control MO wurden wie beschrieben hinzugegeben. Das Pescadillo MO interferiert mit der Translation von Pescadillo, wohingegen das Control MO diese Eigenschaft nicht zeigt. Das Pescadillo MO blockiert die Translation von Pescadillo_Mut nicht. C. Effizienztest des Pescadillo MO *in-vivo*. Die Oligonukleotide, die in A dargestellt sind, wurden vor und im Leserahmen von GFP kloniert. Die mRNA, die für das jeweiligen Konstrukt (Pescadillo oder Pescadillo_Mut) kodiert, wurde zusammen mit entweder dem Control oder Pescadillo MO injiziert. Das Pescadillo MO unterdrückt die Translation von Pescadillo, jedoch nicht die von Pescadillo_Mut. Das Control MO hat keinen Einfluss auf die Translation von Pescadillo.

Da Pescadillo eine starke Expression in neuralem Gewebe wie Auge und Neuralleistenzellen aufweist, wurde die Funktion von Pescadillo in der Neuralentwicklung untersucht. Hierzu wurde das sequenzspezifische Pescadillo *antisense* Morpholino-Oligonukleotid (Pescadillo MO) in *Xenopus laevis* Embryonen injiziert, wodurch die Funktion von Pescadillo unterbunden wird. Um die optimale Dosis des verwendeten Morpholino-Oligonukleotids zu finden, wurden 2, 4, 6 und 10 ng des Pescadillo MO unilateral in eine animal-dorsale Blastomere im 8-Zell Stadium injiziert. Der Großteil des Nervensystems geht aus diesen Blastomeren hervor (Moody, 1987). Durch die unilaterale Injektion wird nur eine Körperhälfte beeinflusst, so dass die andere Körperhälfte als interne Kontrolle dient. In allen weiteren Experimenten zu diesem Kapitel wurde auf diese Weise injiziert, bei Änderungen der Injektionsdurchführung wird im jeweiligen Versuch darauf eingegangen. Als weitere Kontrolle wurde ein Kontroll Morpholino-Oligonukleotid (Control MO) auf gleiche Weise injiziert, welches mit keiner der bekannten *X. laevis* mRNAs eine Hybridisierung eingeht.

Zur Analsye des Augenphänotyps wurden die Embryonen in Stadium 42 fixiert und ausgewertet. Embryonen mit einem Augendefekt von stark deformiert bis fehlend wurden 12A-D), wohingegen Embryonen, deren Augen als Phänotyp bezeichnet (Abb. unwesentlich kleiner oder normal erschienen, als normal eingestuft wurden (Abb. 12E,F). Aus Abb. 12P ist ersichtlich, dass der Augenphänotyp, der durch das Pescadillo MO hervorgerufen wurde, mit ansteigender Morpholino-Oligonukleotid-Dosis ebenfalls anstieg. Zur näheren Beschreibung des Augenphänotyps wurden histologische Schnitte angefertigt. Die mit Control MO injizierten Embryonen zeigten zwei morphologisch normal entwickelte Augen mit all ihren spezifischen Strukturen, wie z.B. Linse und Retina (Abb. 12I). Das deformierte Auge zeigt eine Einstülpung der Linse ins Innere des Embryos (Abb. 12H; Pfeil). An den Embryonen, an denen das Auge auf der mit Pescadillo MO injizierten Körperseite fehlte, konnte man auch im histologischen Schnitt keinerlei Augenstrukturen erkennen (Abb. 12G). Um die Spezifität des Augenphänotys zu kontrollieren, wurde das Pescadillo MO mit der Pescadillo_Mut mRNA koinjiziert. Es zeigte sich, dass die Pescadillo Mut RNA den Effekt des Pescadillo MO auf den Augenphänotyp von 64 % (Pescadillo+GFP) auf 31 % revertieren kann (Abb. 13C).

In weiteren Experimenten wurde der Funktionsverlust von Pescadillo auf die kraniale Knorpelentwicklung untersucht. Dafür wurden *X. laevis* Embryonen wie oben beschrieben injiziert und in Stadium 48 fixiert. Anschließend folgte eine Knorpelfärbung mit Alcianblau und die Freipräparation des kranialen Knorpels (Kapitel 3.3.9). Die Embryonen, die mit dem Pescadillo MO injiziert wurden, zeigten einen Defekt in der kranialen Knorpelausbildung; der Effekt erstreckte sich vom kleineren bis zum deformierten Knorpel (Abb. 12J-M). Control MO injizierte Embryonen wiesen einen normal entwicklten Knorpel auf (Abb. 12N,O).



Abbildung 12: Der Verlust der Pescadillofunktion resultiert in Defekten der Auge- und kranialen Knorpelbildung.

A. Die unilaterale Injektion des Pescadillo MO führt zu einem Augenphänotyp von deformiert bis fehlend, während das Control MO die Augenentwicklung nicht beeinträchtigt. Die hisologische Untersuchung bestätigt diese Beobachtungen. B. Unilateral injizierte Embryonen wurden in Stadium 48 fixiert. Mit Hilfe der Alcianblaufärbung wurden die Knorpelstrukturen visualisiert. Der Funktionsverlust von Pescadillo führt zur Reduktion des kranialen Knorpels, die mit dem beobachtet Augenphänotyp korreliert. C. Statistische Auswertung des Augenphänotyps, der mit ansteigender Pescadillo MO Dosis stärker wird. Folgende Abbildungsteile wurden der Diplomarbeit entnommen: A, B, E, F, G, I. ba: Branchialbögen; ic = infrarostral cartilage; MK: Meckel's Knorpel; ta = tectum anterius; Abbildungen A, E, G, I wurden der Diplomarbeit entnommen; n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Um die Funktionen der verschiedenen Domänen BRCT, SUMO und NLS im Pescadilloprotein zu überprüfen, sollten im folgenden Experiment Deletionskonstrukte von Pescadillo untersucht werden,. Es wurden drei verschiedene Konstrukte hergestellt, denen jeweils eine Domäne fehlte: Pescadillo Δ BRCT, Pescadillo Δ SUMO und Pescadillo Δ NLS (Abb. 13A). Die Mutagenese aller 3 Deletionskostrukte basierte auf dem Pescadillo_Mut Konstrukt, um die Bindung des Pescadillo MO an die Deletionskonstrukte und somit deren Inhibierung zu vermeiden. Anschließend wurde das Pescadillo MO mit je einem der drei Deletionskonstrukte koinjiziert und untersucht, welches Konstrukt in der Lage ist, den Augenphänotyp zu retten.



Abbildung 13: Funktionelle Domänenanalyse von Pescadillo.

A. Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte von Pescadillo. B. Die mRNAs, die für Pescadillo_Mut, Pescadillo Δ BRCT und Pescadillo Δ SUMO kodieren, sind in der Lage, den vom Pescadillo MO ausgelösten Augenphänotyp zu revertieren. Im Gegensatz dazu kann Pescadillo Δ NLS den Augenphänotyps nicht retten. Repräsentative Embryonen sind dargestellt. C Statistische Auswertung des beobachteten Phänotyps. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Abbildung 13 verdeutlicht, dass ausschließlich das Pescadillo Δ NLS Konstrukt nicht in der Lage war, den Augenphänotyp zu retten. Durch die Koinjektion von Pescadillo MO mit Pescadillo Δ BRCT oder Pescadillo Δ SUMO hingegen kam es zu einer Reduktion des Augenphänotyps.

4.1.4 Einfluss der Inhibition von Pescadillo auf die Zellproliferation und Zellapoptose

Im Folgenden wurde die molekulare Basis des beobachteten Phänotyps analysiert. Aus der vorangegangenen Diplomarbeit (Gessert, 2004) gab es erste Hinweise, dass Pescadillo eine wichtige Funktion in der Zellproliferation besitzt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit dieser Effekt näher untersucht. Es wurden TUNEL (Kapitel 3.3.5)- und BrdU (Kapitel 3.3.4)-Experimente durchgeführt, um die Apoptose als auch die Proliferation von Zellen nachzuweisen. Zur Analyse der Zellapoptose wurde das Pescadillo MO zusammen mit dem Control MO unilateral im 8-Zell Stadium injiziert, die Embryonen in Stadium 25 fixiert und eine TUNEL-Färbung duchgeführt. Durch die Inhibierung von Pescadillo kam es zur vermehrten Zellapoptose in der Augenanlage auf der injizierten Seite, während die uninjizierten Embryonen nur vereinzelt Zellen in der Apoptose aufwiesen (Abb.14 A). In einem weiteren Experiment wurde die Zellproliferation mit Hilfe eines BrdU-Protokolls analysiert. Hierzu wurden 8-Zell Embryonen wie oben beschrieben injizert, in Stadium 23 mit der BrdU-Lösung nahe der Augenanlage injiziert und nach 2-stündiger Inkubation fixiert. Die Koinjektion des Pescadillo MO mit dem Control MO resultierte in einer Reduktion der Zellproliferation in der Augenanlage auf der injizierten Seite (Abb. 14B). Die uninjizierten Embryonen zeigten eine gleichmäßigen Zellproliferation im Bereich beider Augenanlagen.

In einem nächsten Schritt wurden diese Experimente in Kombination mit einem MO gegen p53 durchgeführt. Das Tumorsurpressorgen p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. In Zellultursystemen wurde gezeigt, dass der Verlust von p53 zu einem Anstieg der Pescadillo Expression führt. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass der Funktionsverlust von Pescadillo eine Inhibierung der Ribosomenbiogenese zu Folge hat (Kinoshita *et al.*, 2001). Eine Misregulation der Ribosomenanordnung wiederum resuliert in einer Akkumulation von p53 (Dai *et al.*, 2004). Dadurch kann es zu einer verminderten Zellproliferation und einer erhöhten Zellapoptose kommen. Aufgrund dieser Daten sollte versucht werden, den Proliferations- und Apoptosephänotyp, der durch das Pescadillo MO ausgelöst wird, mit Hilfe eines p53 MO (Cordenonsi *et al.*, 2003) zu revertieren. Durch die Koinjektion des

Pescadillo MO mit dem p53 MO kam es zur Verrringerung der durch das Pescadillo MO ausgelösten Zellapoptose (Abb. 14A). Auch die durch den Funktionsverlust von Pescadillo verminderte Zellproliferation konnte durch Injektion des p53 MO gerettet werden (Ab. 14B). An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob das p53 MO auch zur Revertierung des vom Pescadillo MO ausgelösten Augenphänotyps befähigt ist. Zur Lösung dieser Frage wurde das Pescadillo MO mit dem p53 MO im 8-Zell Stadium in eine animal-dorsale Blastomere injizert. Abbildung 14C macht deutlich, dass die Inhibierung von p53 nicht genügt, um den Augenphänotyp zu retten.

Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, welchen Einfluss die verschiedenen Domänen von Pescadillo auf die Zellproliferation ausüben. Somit wurde das Pescadillo MO mit je einem Deletionskonstrukt koinjiziert. Die Injektion des Pescadillo MO mit der GFPmRNA führte zu einer Reduktion der Zellproliferation auf der injizierten Seite, während es durch die Injektion des Control MO zu keiner Verminderung der Proliferation kam. Die Koinjektionen des Pescadillo MO mit der Pescadillo Mut oder der PescadilloASUMO mRNA Wiederherstellung der führten zu Zellproliferation, wohingegen die PescadilloABRCT und PescadilloANLS Konstrukte den vom Pescadillo MO ausgelösten Proliferationsphänotyp nicht retten konnten (Abb. 14D).



Abbildung 14: Pescadillo reguliert die Zellapoptose und -proliferation über p53.

Embryonen wurden im 8-Zell Stadium mit dem Pescadillo MO (6 ng) zusammen mit dem Control oder p53 MO (10-20 ng) injiziert. A. TUNEL-Färbung und die statistische Auswertung der Zellapoptose in Stadium26. Die Koinjektion des p53 MO (10 ng) mit dem Pescadillo MO (6 ng) reduziert die Anzahl der Emryonen mit erhöhter Zellapoptose. B. BrdU-gefärbte Embryonen und statistische Auswertung der Zellproliferation. Die Koinjektion des p53 MO (10 ng) mit dem Pescadillo MO (10 ng) verringert die Anzahl der Embryonen mit erniedrigter Zellproliferation. C. Die Koinjektion des p53 MO (10-20 ng) und Pescadillo MO (6 ng) kann den vom Pescadillo ausgelösten Phänotyp nicht revertieren. D. Das Pescadillo MO wurde zusammen mit mRNAs, die für GFP, Pescadillo_Mut, PescadilloΔBRCT, PescadilloΔSUMO und PescadilloΔNLS kodieren, injiziert. Nur die Konstrukte Pescadillo_Mut und PescadilloΔSUMO können die vom Pescadillo MO ausgelöste Reduktion der Zellproliferation revertieren. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

4.1.5 Analyse wichtiger Augenmarkergene bei Funktionsverlust von Pescadillo

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Gessert, 2004) wurde der Effekt von Pescadillo auf die spezifischen Augenmarkergene Pax-6, Rx und Otx-2 beschrieben.



Abbildung 15: Pescadillo MO-Injektion führt zu einer Reduktion der Expression notwendiger Augenmarkergene Pax-6, Rx und Otx-2 in Stadium 23. A. Durch die unilaterale Injektion des Pescadillo, doch nicht des Control MO, werden die augenspezifischen Markergene Pax-6, Rx und Otx-2 unterdrückt, wohingegen der muskelspezifische Marker MyoD nicht reduziert ist. B. Statistische Auswertung der Rx-Reduktion. Die Koinjektion des Pescadillo MO (6 ng) zusammen mit den mRNA-Konstrukten Pescadillo_Mut, Pescadillo Δ BRCT und Pescadillo Δ SUMO (je 1 ng) führte zur Revertierung des Rx Verlustes. GFP und Pescadillo Δ NLS besitzen nicht diese Fähigkeit. Teile der Abbildung A wurden der Diplomarbeit entnommen. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler. Der Funktionsverlust von Pescadillo führte zu einer Reduktion aller drei genannten Augenmarkergene auf der Pescadillo MO injizierten Seite in Stadium 23 (Abb. 15A). Der Muskelmarker MyoD, ein Mesodermarker, war nicht betroffen (Abb. 15A). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die oben beschriebenen Deletionskonstrukte von Pescadillo die vom Pescadillo MO ausgelöste Reduktion des Augenmarkers Rx revertieren können. Hierzu wurden Koinjektionen des Pescadillo MO mit den Deletionskonstrukten durchgeführt. Wie in Abbildung 15B gezeigt, ist das Konstrukt Pescadillo_Mut in der Lage, die Reduktion von Rx zu retten. Auch die Deletionskonstrukte PescadilloΔBRCT und PescadilloΔSUMO zeigten diese Eigenschaft. Ausschließlich das PescadilloΔNLS Konstrukt konnte die Reduktion von Rx nicht revertieren.

4.1.6 Die Funktion von Pescadillo in der Neuralleistenentwicklung

Weitere Expressionsdomänen von Pescadillo in X. laevis sind die auswandernden Neuralleistenzellen (Abb. 9B). Auch diese Expression lässt sich duch die Injektion von Wnt-4 und Frizzled-3 MO negativ beeinträchtigen (Abb. 10A,B). Aus den Neuralleistenzellen ensteht u.a. der kraniale Knorpel (Gilbert, 2006), der durch den Funktionsverlust von Pescadillo geschädigt wird (Abb. 12J-M). Aus früheren Veröffentlichungen ist bekannt, dass Faktoren aus dem kanonischen Signalweg, wie z.B. Frizzled-3 und Dishevelled, einen Einfluss auf die Neuralleisteninduktion ausüben, während Faktoren aus dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, wie z.B. Wnt-11, die Wanderung der Neuralleisten beeinflussen (Deardorff et al., 2001; De Calisto et al., 2005). Aus Abbildung 16A ist ersichtlich, dass die Expressionen von Wnt-4 und Frizzled-3 im Neuralrohr überlappen und die Wnt-4 Expressionsdomäne an die von Slug, einem frühen Neuralleistenmarker, angrenzt. Im Folgenden sollte die Funktion von Pescadillo im Vergleich zu Frizzled-3 und Wnt-4 in der Neuralleistenentwicklung auf molekularer Ebene untersucht werden. Hierzu wurden Embryonen im 8-Zell Stadium mit den antisense Morpholino-Oligonukleotiden gegen Frizzled-3, Wnt-4 und Pescadillo injiziert und in Stadium 17, in welchem die Induktion der Neuralleistenzellen abgeschlossen ist, fixiert. Anschließend wurde whole eine mount in-situ Hybridisierung mit den Neuralleistenzellmarkern Slug und FoxD3, beide neuralleistenspezifische Markergene, durchgeführt.



Abbildung 16: Pescadillo beeinflusst die Migration der Neuralleistenzellen.

A. Eine *whole mount in-situ* Hybridisierung zeigt, dass Frizzled-3 im Neuralrohr und im anterioren Neuralgewebe in unterschiedlicher Stärke exprimiert ist. Wnt-4 und Slug zeigen eine teilweise überlappende Expression. B. Die Injektion des Frizzled-3 MO interferiert mit der Induktion von Slug in Stadium 17. Weder das Wnt-4 noch das Pescadillo MO beeinflussen die Slug Expression in Stadium 17. Durch die Pescadillo MO Injektion wird die FoxD3 Expression in Stadium 17 nicht beeinträchtigt. C. Die unilaterale Injektion des Wnt-4 und Pescadillo MO führt zu einem Defekt in der Wanderung der Neuralleistenzellen, was durch die Marker Slug (Stadium 20) und Krox20 (Stadium23/24) dargestellt ist. Für Pescadillo wurde zusätzlich der Marker FoxD3 in Stadium 20 getestet. Statistische Auswertung der beschriebenen Phänotypen. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Aus Abbildung 16B geht hervor, dass der Funktionsverlust von Frizzled-3 zu einer Reduktion von Slug auf der injizierten Seite führte. Die Injektion von Wnt-4, Pescadillo und Control MO dagegen hatte keine Auswirkung auf die Expression von Slug (Abb. 16B). Zur näheren Analyse des Pescadillophänotyps wurde ein zweiter neuralleistenspezifischer Marker, FoxD3, betrachtet. Auch die Expression dieses Markers wurde durch den Funktionsverlust von Pescadillo nicht beeinträchtigt (Abb. 16B).

Nachdem Wnt-4 und Pescadillo keinen Einfluss auf die frühen Neuralleistenmarker ausübten, wurde im Folgenden der Effekt von beiden auf die Nerualleistenwanderung zu einem späteren Entwicklungsstadium überprüft. Dazu wurden sowohl das Wnt-4 als auch das Pescadillo MO unilateral im 8-Zell Stadium injiziert und deren Einfluss auf die in den wandernden Neuralleisten exprimierten Markergene Slug, FoxD3 und Krox 20 untersucht. Zum einen wurden die zu analysierenden Embryonen in Stadium 20 (Beginn der Neuralleistenmigration) als auch in Stadium 23 (während der Migration) fixiert. Wie aus Abb. 16C zu erkennen ist, haben sowohl Wnt-4 als auch Pescadillo eine inhibierenden Wirkung auf die Expression der in den wanderenden Neuralleistenzellen exprimierten Marker Slug und Krox 20. Wie im Fall der FoxD3-Färbung in Stadium 20 zu erkennen ist, schien der Verlust von Pescadillo eine Akkumulation der Neuralleistenzellen auf der dorsalen Seite hervorzurufen (Abb. 16C). Im nächsten Versuch wurde der Funktionsverlust von Wnt-4 und Pescadillo auf einen Branchialbogenmarker, Sox-3, gestestet. Horizontale Schnitte zeigen, dass Sox-3 im endodermalen Teil der Pharynxtaschen exprimiert ist (Abb. 17A). Im Vergleich dazu konnte Pescadillo in dem Teil der Kiemenbögen visualisiert werden, in den die Neuralleistenzellen einwandern (Abb. 17A). Die unilaterale Injektion des Wnt-4 als auch des Pescadillo MO führte zu einer Reduktion der Sox-3 Expression auf der injizierten Seite (Abb. 17B). Zusätzlich zeigten die Embryonen eine Krümmung zur injizierten Seite hin. Um die Spezifität dieses Effekts nachzuweisen, wurden das Pescadillo MO mit der Pescadillo_Mut RNA koinjiziert, was eine Rettung der Sox-3 Expression zur Folge hatte (Abb. 17C). Somit konnten die veröffentlichte Daten verifiziert werden; eine Störung des kanonischen Wnt-Signalwegs, gezeigt durch die Frizzled-3 Inhibierung, führt zur Hemmung der Neuralleisteninduktion, wohingegen der Funktionsverlust von Faktoren nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs, wie Wnt-4 und Pescadillo, die des Neuralleistenzellwanderung beeinflusst.



Abbildung 17: Pescadillo beeinträchtigt die Expression von Sox-3.

A. Pescadillo ist in den Taschen der Kiemenbögen lokalisiert, wohingegen Sox-3 im endodermalen Teil der Kiemenbögen, der die ektodermale Schicht berührt, exprimiert ist. Weiterhin besitzt Sox-3 zwei dorsal gelegene Expressionsdomänen sowohl in der Ohr-, als auch in der Seitenlinienplakode. B. Unilateral Wnt-4 oder Pescadillo MO injizierte Embryonen zeigen einen Verlust der Sox-3 Expression in den Kiemenbögen, wohigegen die Expression von Emx1 und MyoD nicht betroffen ist. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

4.1.7 Überexpression von Pescadillo

Um den Einfluss von Pescadillo bei Überexpression zu untersuchen, wurden 1-2 ng der Wildtyp-Pescadillo mRNA unilateral in eine animal-dorsale Blastomere in 8-Zell Embryonen injiziert. Als Kontrolle dienten Embryonen, die mit 1-2 ng GFP (*green fluoroscence protein*) mRNA injiziert wurden. Die mit der Wildtyp-Pescadillo mRNA injizierten Embryonen zeigten keinerlei äußerliche Veränderungen in Stadium 42 im Vergleich zu den GFP mRNA-injizierten Embryonen.

4.2 RGM A

4.2.1 Identifizierung des Klons E12F als RGM A

Im Rahmen eines Screens für potentielle Wnt-4 Zielgene wurde ein Klon namens E12F identifiziert (Maurus, 2004). Da ein Sequenzvergleich in der Datenbank erfolglos blieb, wurde über das RACE (*rapid amplification of 5' complementary DNA ends*)-Verfahren versucht, die Sequenz in 5' Richtung des E12F Klons zu analysieren. Nach mehreren RACE-Schritten wurde eine Exonsequenz ermittelt, die im Datenbankvergleich eine hohe Ähnlichkeit mit der veröffentlichten *X. laevis* RGM A (*repulsive guidance molecule A*) Sequenz aufwies. Nach weiterer Suche in der Sequenzdatenbank stellte sich heraus, dass die Sequenz von E12F in einem Intron zwischen Exon 3 und 4 von RGM A liegen muss. Um dies zu unterstützen, wurde eine Test-PCR mit spezifischen Primern aus der E12F und der RGM A Sequenz auf genomischer DNA aus Stadium 45 von *X. laevis* durchgeführt (Abb. 18). Die Kombination der Primer RGM A_ex3 und E12F_RT_1 führte zu einem PCR-Produkt, was ein Beweis dafür ist, dass es sich bei dem Klon E12F um RGM A handelt.



Abbildung 18: Der Klon E12F ist RGM A.

Aus *Xenopus laevis* Embryonen wurde genomische DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde als Positivkontrolle ein Sequenzabschnitt aus Exon 4 von RGM A mit den Primern RGM A_RT_l und RGM A_RT _r amplifiziert. Im zweiten Ansatz wurde ein Primerpaar, welches an E12F bindet, getestet. Im dritten Ansatz wurde ein Primerpaar eingesetzt, von welchem ein Primer an einen Sequenzabschnitt aus Exon 3 der RGM A Sequenz (RGM A_ex3), der andere an eine Sequenz aus dem E12F-Bereich (E12F_RT_l) bindet. Es resultiert ein Ampilfikationsprodukt, was den entgültigen Beweis erbringt, dass der isoliert Klon E12F dem publizierten RGM A entspricht. Die Negativkontrolle mit den Primern RGM A_ex3 und E12F_RT_r erweist sich als negativ.

4.2.2 Isolierung und Klonierung der vollständigen RGM A Sequenz aus Xenopus laevis

Zur genaueren Analyse von RGM A wurde ein Sequenzvergleich aller bekannten RGM A Sequenzen auf Proteinebene durchgeführt. Es wurden die Aminosäuresequenzen aus *X. laevis* (hier als **RGM A1** bezeichnet; Acc. No.: BC045008) und *tropicalis* (Acc. No.: NM_203725), *Homo sapiens* (Acc. No.: AK074966), *Mus musculus* (Acc. No.: AJ557513), *Gallus gallus* (Acc. No.: NM_204537) und *Danio rerio* (Acc. No.: NM_001001726) verglichen.

xenopus xenopus homo mus gallus danio	II I trop.	MQPIRAKVAVKAQAGWMGMGRGAGPKALGFFKILTVFLCTFHTVSSSCKILKCTADYLQA 	60 44 60 44 44 42 44
xenopus xenopus xenopus homo mus gallus danio	II I trop	TSNPHHHTGAEDTVEICTALRTYAHCSRRTARTCRGDLAYHSTVHGIDDLMSHHNCSKDG TSNPHHHTGAEDTVEICTALRTYAHCSRRTARTCRGLLAYHSTVHGIDDLMSHHNCSKDG TSNPHHAGPEDTVEICTALRTYAHCSRRTARTCRGDLAYHSTVHGIDDLMSHNCSKDG TS-GSHAPASDDTPEFCAALRSYALCTRRTARTCRGDLAYHSAVHGIEDLMSQHNCSKDG TSSGSHAPASDDVPEFCAALRYALCTRRTARTCRGDLAYHSAVHGIEDLMSQHNCSKDG TS-GSHHLGAEETPEFCTALRAYAHCTRRTARTCRGDLAYHSAVHGIEDLMSQHNCSKDG TSNSGPEEEFCTALRAYAHCTRRTARTCRGDLAYHSAVHGIEDLMSQHNCSKEG ** * **** * * ***********************	120 104 120 103 104 101 98
xenopus xenopus homo mus gallus Danio	II I trop.	PTSQPRVRILPPGDSQERSDSPEICHYEKSFHRPSALPNYTHCGLFGDPHLRT PTSQPRVRILPPGDSQERSDSPEICHYEKSFHRPSALPNYTHCGLFGDPHLRT PTSQPRIRILPPGDSQERSDSPEICHYEKSFHRPSALPNYTHCGLFGDPHLRT PTSQPRVRTLPPAGDSQERSDSPEICHYEKSFHKHSAPNYTHCGLFGDPHLRT PTSQPRVRTLPPAGDSQERSDSPEICHYEKSFHKHSAAPNYTHCGLFGDPHLRT PTSQPRURTLPPGDSQERSDSPEICHYEKSFHKHSAAPNYTHCGLFGDPHLRT PTQPRARTVPPPVLSPPQTDIHIPSDEPEVCHYERSLPRNAAPPNYTHCGFFGDPHLRT ** *** * ** ** ** ** ******	173 157 173 157 158 154 158
xenopus xenopus homo mus gallus Danio	II I trop.	FSDTFQTCKIQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSTATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FSDTFQTCKIQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSTATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FSDTFQTCKIQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSIATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FTDRFQTCKVQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSAATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FTDHFQTCKVQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSAATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FTDFQTCKVQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSAATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FTDFQTCKVQGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSAATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FNDDFQTCKVGGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSAATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ FNDDFQTCKVGGAWPLIDNNYLNVQVTNTPVLPGSAATATSKLTIIFKNFQECVDQKVYQ	233 217 233 217 218 214 218
xenopus xenopus homo mus gallus Danio	II I trop.	AEMDELPAAFIDGSKNGGDKSGANSLRIIEKVSGQHIEIQAKYIGTTIVVRQVGHYLTFA AEMDELPAAFIDGSKNGGDKSGANSLRIIEKVSGQHIEIQAKYIGTTIVVRQVGHYLTFA AEMDELPAAFVDGSKNGGDKSGANSLRIIEKVSGQHIEIQAKYIGTTIVVRQVGRYLTFA AEMDELPAAFVDGSKNGGDKHGANSLKITEKVSGQHVEIQAKYIGTTIVVRQVGRYLTFA AEMDELPAAFADGSKNGGDKHGANSLKITEKVSGQHVEIQAKYIGTTIVVRQVGRYLTFA AEMDELPAAFADGSKNGGDKHGANSLKITEKVSGQHIEIQAKYIGTTIVVRQVGRYLTFA AETEDLPAAFDGSKNGGEGHGANTLRVVEKVPGQHVEIQARYIGTTIVVRVGHYLTFA ** ** ** *******	293 277 293 277 278 274 278
xenopus xenopus homo mus gallus Danio	II I trop.	VRMPEEVVNAVEDKDNQGLYLCLHGCPQNQQIDFRNFHLQAPETGLKRLTS-ASSAA VRMPEEVVNAVEDKDNQGLYLCLHGCPQNQQIDFRNFHLQAPETGLKRLTS-ASSAA VRMPEEVVNAVEDKDNQGLYLCLHGCPQNQQIDFRTFHSQAPETGLKRLTSAASSAA VRMPEEVVNAVEDWDSQGLYLCLRGCPLNQQIDFQAFH-TNAEGTGARRLAASPAPTAP VRMPEEVVNAVEDRDSQGLYLCLRGCPLNQQIDFQAFR-ANAESPRRPAAASPSPVVP VRMPEEVVNAVEDRDSQGLYLCLRGCPLNQQIDFQTFRLAQAAEGRARRKGPSLPAPP VRMPEEVVNAVEDQDNQDLYLCLHGCPANQRIDFRTFKARAAESHGVGRGRPGNPSY ********* *** * * ***** *** *** **	349 333 350 336 335 332 335
xenopus xenopus homo mus gallus Danio	II I trop.	-SFTPQTAEAKCKEKLPVKDLYFQSCVFDLLTTGDVNFTLAAYYAFEDVKLLHSNKNKVH -SFTPQTAEAKCKEKLPVKDLYFQSCVFDLLTTGDVNFTLAAYYAFEDVKLLHSNKNKVH -SFTPQTAEAKCKEKLPVEDLYFQSCVFDLLTTGDVNFTLAAYYAFEDVKLLHSNKNKVH ETFPYETAVAKCKEKLPVEDLYYQACVFDLLTTGDVNFTLAAYYAFEDVKLHSNKDKLH ETFPYETAVAKCKEKLPVEDLYFQSCVFDLLTTGDVNFTLAAYYAFEDVKMLHSNKDKLH -GFTYQSAMAKCKERLPVEDLYFQSCVFDLLTTGDVNFTLAAYYAFEDVKMLHSNKDKLH -GFTYQSAMAKCKERLPVEDLYFQSCVFDLLSSGDINFTLAAYYAFEDVKMLHSNKNKYH * **** * **** *** *** ****	408 392 409 396 395 392 394
xenopus xenopus homo mus gallus Danio	II I trop.	LFERTIDLGPPNTAPRAG-MDIPKLLVAFVCLILQCCAMLL 448 LFERP	

Abbildung 19: Vergleich der RGM A Aminosäuresequenzen.

Das Sequenzalignment zeigt, dass die RGM A Sequenz innerhalb der Vertebraten hoch konserviert ist. Die Sterne kennzeichnen die vollkommene Übereinstimmung der Aminosäuren innerhalb der aufgeführten Organismen. Farbig gekennzeichnete Sequenzen markieren die einzelnen Domänen: rot = Signalpeptid; grün = RGD-Domäne; blau = vWF-Domäne; gelb = hydrophobe Domäne; violett = Anheftungsstelle für GPI-Anker.

Die RGM A Sequenz enthält fogende Domänen: ein N-terminales Signalpeptid, eine RGD-Domäne, eine von Willebrandfaktor Typ D Domäne und eine hydrophobe Domäne. Des Weiteren konnte für alle Organismen mit Ausnahme von X. laevis eine GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Ankersequenz am C-Terminus der Sequenz festgestellt werden. Daraufhin wurden die veröffentlichten Sequenzen von X. laevis und tropicalis auf Nukleotidebene näher analysiert und es zeigte sich, dass in der veröffentlichten RGM A Sequenz von X. laevis an Postion 1293 eine Base (Adenin) im Vergleich zur X. tropicalis Sequenz fehlte, was zu einer Rahmenverschiebung und einem Stopcodon an Position 1297 in der X. laevis Sequenz führen würde. Um diese mögliche Mutation zu überprüfen, wurde ein Primer gegen einen Sequenzabschnitt entworfen, der strangabwärts des Stopcodons innerhalb der X. tropicalis Sequenz liegt und mit der X. laevis Sequenz vollkommen übereinstimmt (RGM_hyp_r). Der RGM A Sequenzvergleich zwischen X. laevis und tropicalis ergab zudem, dass auch die Sequenzen im 5' Bereich sehr unterschiedlich waren. Im Fall der X. tropicalis Sequenz lag das Startcodon 16 Basen weiter in Richtung des 5' Endes; im Vergleich mit den RGM A Sequenzen aus Homo sapiens, Gallus gallus und Danio rerio jedoch liegt das Startcodon der veröffentlichten X. laevis Sequenz an ähnlicher Position. Dennoch wurde die 5' Region der X. laevis RGM A Sequenz näher betrachtet. Hierzu wurde mit Hilfe des X. tropicalis Nukleotidsequenz ein Sequenzalignment durchgeführt und eine EST (expressed sequence tag)-Sequenz (Acc. No.: DR730445) von X. laevis gefunden, die der X. tropicalis Sequenz im 5' Bereich ähnlich ist. Somit wurde ein weiterer Primer am 5' Ende vor dem Startcodon von X. tropicalis entworfen (RGM_hyp_l). Im Anschluss dessen wurde mit Hilfe dieser neuen Primer RGM hyp I und RGM hyp r ein sogenanntes hypothetisches RGM A (hier RGM A2 genannt) aus cDNA von X. laevis Embryonen in Stadium 30 amplifiziert und verifiziert. Die nachfolgende Sequenzierung ergab, dass in der hypothetischen RGM A Sequenz an Position 1293 ein zusätzliches Adenin wie in der X. tropicalis RGM A Sequenz eingebaut ist. Es zeigte sich zudem, dass sich am 5' Ende 16 Basen vor dem schon bekannten Startcodon ein weiteres ATG-Codon befindet.

4.2.3 Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von RGM A in Xenopus laevis

Um die Funktion von RGM A in *X. laevis* zu untersuchen, ist die Kenntnis wichtig, in welchen Organen oder Geweben und Stadien dieses Gen exprimiert wird.

Zur Ermittlung der zeitlichen Expression von RGM A während der Embryogenese wurde eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Dies geschah mit RNA aus Embryonen vom Einzeller bis zu Stadium 45. RGM A ist während der gesamten Embryogenese von *X. laevis* exprimiert (Daten nicht gezeigt). Zudem wurden verschiedene adulte Geweben auf RGM A hin untersucht (Abb. 20). RGM A konnte in folgenden Geweben nachgewiesen werden: ZNS (<u>z</u>entrales <u>N</u>erven<u>s</u>ystem), Hoden, Auge, Herz, Lunge, Darm und Leber.



Abbildung 20: Adultes Expressionsprofil von RGM A.

Die Aufklärung des örtlichen Expressionsmusters von RGM A geschah mit Hilfe der *whole mount in-situ* Hybridisierung (siehe Kapitel 3.3.2). Hierzu wurde eine RNA-Sonde spezifisch und revers-komplementär zur RGM A-Sequenz synthetisiert und mit dieser eine *whole mount in-situ* Hybridisierung mit *Xenopus* Embryonen ausgewählter Stadien durchgeführt (Abb. 21). Ab Stadium 13 beginnt die spezifische Expression von RGM A in der anterioren Neuralplatte (Abb. 21A). Ein transversaler Schnitt durch einen Embryo in Stadium 13 verdeutlicht, dass RGM A ausschließlich in der sensorischen Schicht des Neuroektoderms exprimiert ist (Abb. 21H). In Embryonen des Stadiums 18 erkennt man eine starke Expression von RGM A im Vorderhirn, eine schwächere im restlichen Gehirn und im Neuralrohr (Abb. 21B), was sich in Stadium 22 nicht ändert (Abb. 21C). In

RGM A ist in ZNS (zentrales <u>Nervensystem</u>), Hoden, Auge, Herz, Lunge, Darm und Leber vom aulten *Xenopus laevis* exprimiert.



Stadium 31 ist RGM A sehr stark im Hinterhirn und in den Branchialbögen (Abb. 21E) exprimiert.

Abbildung 21: Embryonales Expressionsmuster von RGM A.

In Stadium 38 hat sich die Expression von RGM A in den Branchialbögen verstärkt (Abb. 21F,G). Die Hinterhirnexpression bleibt weiterhin bestehen. Abb. 21I und J zeigen Transversalschnitte eines Embryos in Stadium 28. Aus Abbildung 21I geht hervor, dass RGM A im ventralen und medialen Teil des Mittelhirns und in den Branchialbögen exprimiert wird. Ein weiter posterior gelegener Schnitt zeigt eine starke RGM A Expression im ventralen und medialen Teil des Neuralrohrs (Abb. 21J).

4.2.4 Beschreibung des Phänotyps nach Funktionsverlust von RGM A in Xenopus laevis

Untersuchung der Augenentwicklung nach Inhibition von RGM A

Da RGM A ab Stadium 13 eine spezifische Expression in der anterioren Neuralplatte aufweist (Abb. 21A), sollte zunächst eine mögliche Funktion von RGM A auf die Neuralentwicklung in X. laevis analysiert werden. Hierzu wurde der Funktionsverlust von RGM A mit Hilfe eines spezifischen Morpholino-Oligonukleotids (Kapitel 2.2.3) untersucht. In Kapitel 4.2.2 wurde gezeigt, dass die RGM A Sequenz zwei mögliche Startcodons aufweist, woraufhin je ein spezifisches Morpholino-Oligonukleotid pro Startcodon entworfen wurde (RGM A1 MO und RGM A2 MO). Um die Spezifität der Morpholino-Oligonukleotide zu überprüfen, wurde eine in-vitro Translation- und Transkriptionsanalyse (TNT) durchgeführt (Kapitel 3.5.25). Zur Überprüfung des RGM A1 MO wurde die veröffentlichte RGM A Sequenz (RGM A1; Acc. No.: BC045008) mit (5'UTR RGM A1) als auch ohne den 5'UTR (Δ 5'UTR RGM A1) in den pCS2+-Vektor kloniert. Das 5'UTR RGM A1 Konstrukt weist die vollständige RGM A1 MO-Bindesequenz auf (Abb. 22A), während das Δ5'UTR RGM A1 Konstrukt 12 Mutationen in diesem Sequenzabschnitt besitzt (rote Sternchen, Abb. 22B). Abbildung 22B stellt dar, dass die Expression des 5'UTR RGM A1 Konstrukts durch das RGM A1 MO unterdrückt wird, wohingegen das Control MO keinen Einfluss auf dessen Expresssion ausübt. Des Weiteren wird gezeigt, dass die Expression des $\Delta 5$ 'UTR RGM A1 Konstrukts nicht durch das RGM A1 MO blockiert wird.

Im nächsten Schritt sollte die Spezifität des RGM A2 MO überprüft werden. Hierzu wurde das hypothetische RGM A (**RGM A2**, siehe Kapitel 4.2.2) mit (5'UTR RGM A2) wie auch

ohne 5'UTR (Δ 5'UTR RGM A2) in den pCS2+-Vektor kloniert. Das 5'UTR RGM A2 Konstrukt beinhaltet die vollständige Bindesequenz für das RGM A2 MO. Im Gegensatz hierzu zeigt das Δ 5'UTR RGM A2 Kontrukt 10 Basenaustausche in dieser Region (Abb.22 C).



Abbildung 22: Spezifitätsanalyse der RGM A Morpholino-Oligonukleotide.

A. Vergleich der dem Startcodon umgebenen Sequenz von RGM A1 und RGM A2. Erstes ATG-Startcodon ist grün, zweites rot gekennzeichnet. Die Sequenz des RGM A2 Morpholino-Oligonukleotids ist blau, die von RGM A1 violett eingekästelt. B. Bindestellen des RGM A1 MO (rote Sternchen kennzeichnen die veränderten Basen im Δ 5'UTR RGM A1 Konstrukt) und das Gelbild des TNT-Kits. Durch Zugabe des 5'UTR RGM A1 Plasmids wird das RGM A1-Protein translatiert. Zugabe des RGM A1 MO zu der Reaktion führt zur Inhibierung der Translation. Das Control MO beeinflusst die Translation von RGM A1 nicht. Die Translation des Δ 5'UTR RGM A1 wird durch das RGM A1 MO nicht blockiert. C. Gleicher Aufbau und Ergebnis wie in Abbildungsteil B. Anstelle von RGM A1 wird das RGM A2-Konstrukt verwendet. D. Das RGM A1 MO besitzt die Fähigkeit, die Translation von RGM A2 zu hemmen.

Abbildung 22 C verdeutlicht, dass das RGM A2 MO die Translation von 5'UTR RGM A2 inhibiert, wohingegen die des Δ 5'UTR RGM A2 Kontruktes nicht beeinflusst wird. Die Anwesenheit des Control MO hat keinen Einfluss auf die Translation von RGM A2. Des

Weiteren sollte untersucht werden, ob das RGM A1 MO auch in der Lage ist, die Translation des RGM A2 Konstruktes zu hemmen. Aus Abbildung 22 D geht hervor, dass das RGM A1 MO die RGM A2 Translation leicht inhibiert. Für die folgenden *in-vivo* Experimente wurden daher beide RGM A MO injiziert.

Im Folgenden sollte der Einfluss des Funktionsverlustes von RGM A *in-vivo* untersucht werden. Zunächst wurden 20-30 ng des RGM A1 MO in eine animal-dorsale Blastomere inm 8-Zell Stadium injiziert und die Embryonen in Stadium 42 fixiert. Es zeigte sich, dass die Inhibition von RGM A1 einen starken Einfluss auf die Augenentwicklung der Embryonen ausübt (Abb. 23). 21 % der RGM A1 MO injizierten Embryonen hatten ein kleineres und 50 % ein kleines bis deformiertes Auge auf der injizierten Seite. In 1 % der Embryonen fehlte das Auge vollständig. Die Injektion eines Control MO hatte keine Auswirkung auf die Augenentwicklung der *X. laevis* Embryonen.



Abbildung 23: Der Verlust der RGM A1 Funktion führt zu einem Augendefekt.

A. Unilaterale Injektion des RGM A1 MO resultiert in deformierten und fehlenden Augen (Pfeile), während die des Control MO keinen Effekt auf die Augenentwicklung ausübt. B. Quantifizierung des beobachteten Augenphänotyps. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Im nächsten Schritt wurde das RGM A2 MO auf gleiche Weise injiziert. Zunächst wurde die optimale MO-Dosis austitriert, wobei 10-30 ng des MO injiziert wurden. Auch die Injektion dieses MO führte zu einer Veränderung in der Augenentwicklung von *X. laevis*. Aus Abbildung 24 wird deutlich, dass sich dieser Effekt dosisabhängig auf die Embryonen auswirkt. Mit steigender MO-Dosis steigt auch der Prozentsatz des starken Augenphänotyps wie deformiertes und fehlendes Auge.



Abbildung 24: Inaktivierung von RGM A2 führt zu einer Störung der Augenentwicklung. A. Die Injektion verschiedener RGM A2 MO Konzentrationen hemmt die Augenentwicklung mit dosisabhängiger Wirkung. Repräsentative Embryonen sind dargestellt. B. Quantitative Auswertung des Augenphänotyps. Mit ansteigender MO-Dosis erhöht sich der Prozentsatz an deformierten und fehlenden Augen. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Da sich die Injektion von 30 ng RGM A2 MO am stärktsten auf die Augenentwicklung auswirkte, wurde in den folgenden Experimenten mit dieser Dosis gearbeitet. Nur 20 % der injizierten Embryonen zeigten ein normal enwickeltes Auge, 23 % hatten ein kleineres, 50 % ein deformiertes Auge und 7 % der Embryonen besaßen keinerlei Augenstrukturen (Abb. 24B).

Untersuchung von Neuralmarkergenen nach Inhibition von RGM A

Da RGM A schon früh in der anterioren Neuralplatte exprimiert ist (Abb. 21A) und einen Augenphänotyp aufweist (Abb. 23,24), sollte in diesem Kapitel der Einfluss dieses Gens auf verschiedene Neuralmaker wie Rx (Augenmarkergen), Emx1 (Markergen für Vorderhirn), En2 (Marker für Miteelhirn-Hinterhirngrenze) und Krox20 (Marker für Teile des Hinterhirns) überprüft werden. Hierzu wurden 30 ng des RGM A1, als auch 30 ng des RGM A2 MO unilateral in eine animal-dorsale Blastomere in Embryonen des 8-Zell Stadiums injiziert. In Stadium 23 wurden die Embryonen fixiert und einer *whole mount insitu* Hybridisierung mit den neuralspezifische Markern unterzogen. Die Injektion beider RGM A MO, aber nicht des Control MO, resultierten in einer Reduktion aller getesteten Markergene (Abb. 25).



Abbildung 25: Inhibierung von RGM A führt zu einem Verlust der Expression molekularer anteriorer Neuralmarker.

A. Unilaterale Injektion von 30 ng RGM A1 MO in eine animal-dorsale Blastomere reprimiert die Expression von Rx, Emx1, En2 und Krox20 auf der injizierten Seite, wohingegen das Control MO keinen Einfluss auf die Expression besagter Markergene ausübt. Die statistische Auswertung ist dargestellt. B. Bei der Injektion von 30 ng RGM A2 MO läßt sich eine vergleichbare Repression der anterioren Markergene beobachten. Die Quantifizierung des beobachteten Phänotyps ist dargestellt. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Es zeigte sich, dass das RGM A2 MO einen stärkeren Einfluss auf die Expression der Neuralmarker als das RGM A1 MO ausübt (Abb. 25). Rx, ein augenspezifischer Marker, und Emx1, welches im Vorderhirn exprimiert ist, waren am stärksten vom Funktionverlust von RGM A betroffen. Im Vergleich dazu wiesen En2, ein Marker für die Mittelhirn-Hinterhirngrenze, und Krox20, spezifisch für Teile des Hinterhirns, nur eine geringe Reduktion auf. Die Injektion des Control MO hatte keinen Einfluss auf die Expression der Neuralmarker.

Analyse der Zellapoptose nach Funktionsverlust von RGM A

In einer vorangegangenen Studie im Hühnchen (Matsunaga und Chédotal, 2004) wurde gezeigt, dass die Inhibition von RGM A zu einem Anstieg der Zellapoptose führt. Um die

Funktion von RGM A in der Zellapoptose von *X. laevis* zu klären, wurden 30 ng RGM A2 MO unilateral in eine animal-dorsale Blastomere von Embryonen im 8-Zell Stadium injiziert. Um sicherzustellen, dass die Morpholino-Oliogonukleotide am richtigen Ort ihre Wirkung ausüben, wurde eine Koinjektion von GFP (*green fluorescence protein*) mRNA vorgenommen. Mit Hife von UV-Licht lässt sich die Verteilung des gebildeten GFP Proteins *in-vivo* nachweisen. Die Embryonen, bei welchen insgesamt keine GFP-Fluoreszenz auftrat oder diejenigen, bei denen die GFP-Fluoreszenz in Stadium 13 im Neuralgewebe ausblieb, wurden aussortiert und nicht in die Wertung miteinbezogen. Diejenigen Embryonen, bei welchen das GFP ausschließlich oder hauptsächlich in der anterioren Neuralplatte zu sehen war, wurden in Stadium 23 fixiert. Im Anschluss folgte ein TUNEL-Assay zum Nachweis von apoptotischen Zellen (Kapitel 3.3.5). Die Auswertung ergab, dass in 23 % der RGM A2 MO injizierten Embryonen die Zellapoptose im anterioren Neuralgewebe erhöht ist (Abb. 26). Im Gegensatz dazu zeigten nur 5 % der Control MO injizierten Embryonen eine stärkere Zellapoptose.



Abbildung 26: Der RGM A2 Funktionsverlust hat einen geringen Effekt auf die Zellapoptose in anterioren Neuralbereich. A. Die unilaterale Injektion des RGM A2 MO führt zu einer ansteigenden Anzahl apoptotischer Zellen auf der injizierten Seite (Pfeile). Die Control MO-Injektion beeinträchtigt die Zellapoptose nicht. B. Statistische Auswertung der Zellapoptose. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Einfluss von RGM A auf die Zellproliferation in X. laevis

Niederkofler *et al.* (2004) zeigten, dass RGM A weder einen Einfluss auf die Zellproliferation, noch auf die -apoptose im Gehirn der Maus besitzt. Die beschriebenen TUNEL-Daten jedoch zeigten einen geringen Effekt von RGM A auf die Zellapoptose in *X. laevis.* Im Folgenden sollte der Einfluss von RGM A auf die Zellproliferation in *X. laevis* getestet werden. Hierzu wurden 30 ng des RGM A2 MO einseitig in eine animaldorsale Blastomere von 8-Zell Embryonen injiziert. Um die Injektion zu überprüfen, wurden 0,5 ng GFP koinjiziert. In Stadium 21 wurden 10 nl der BrdU-Lösung bilateral neben den Augenanlagen injiziert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Embryonen fixiert und der BrdU-Assay durchgeführt (Kapitel 3.3.4). Der Funktionsverlust von RGM A2 führte zu einer Reduktion der Zellproliferation von 49 % auf der injizierten Seite, während die Injektion eines Control MO nur einen Effekt von 6 % auf die Proliferation ausübte (Abb. 27).



Abbildung 27: RGM A2 Funktionsverlust führt zu einem Absinken der Zellproliferation im anterioren Neuralbereich.

A. Unilateral RGM A2 MO injizierte Embryonen zeigen eine Reduktion in der Zellproliferation auf der injizierten Seite (Pfeile), wohingegen in Control MO-injizierte Embryonen keine Veränderung in der Proliferation zu beobachten ist. B. Quantifizierung der Zellproliferation. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Beschreibung des RGM A Funktionverlusts in der Neuralleistenentwicklung von Xenopus laevis

In Kapitel 4.1.6 wurde die Funktion von Wnt-4 und dessen Zielgen Pescadillo auf die Neuralleistenentwicklung dargestellt (Abb. 16). Die beiden Genen zeigten einen Effekt auf die Neuralleistenmarker Slug und FoxD3 in Stadium 20 und Krox20 in Stadium 23, während die Expression von Slug und FoxD3 in Stadium 17 nicht beeinträchtig war. Wie Pescadillo wurde auch RGM A als ein potentielles Zielgen von Wnt-4 beschrieben (Maurus, 2004). Im Folgenden sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob auch RGM A einen Einfluss auf die Neuralleistenentwicklung besitzt. Es wurden 30 ng RGM A2 MO und 0,5 ng GFP in eine animal-dorsale Blastomere von Embryonen im 8-Zell Stadium koinjiziert. Ausschließlich die Embryonen, die in Stadium 13 in der anterioren Neuralplatte eine Grünfluoreszenz zeigten, wurden in einer darauffolgende *whole mount in-situ* Hybridisierung bearbeitet. Ein Drittel der Embryonen im Stadium 23 fixiert. Folgende Neuralleistenmarker wurden getestet: Slug und FoxD3 in Stadium 17 und 20, Krox20 und Twist in Stadium 23.



Abbildung 28: Der RGM A2 Funktionsverlsut hat keine Auswirkung auf die Spezifizierung der Neuralleistenzellen. A. Weder die Injektion des RGM A2 MO, noch die des Control MO beeinträchtigt die Expression der neuralleistenspezifischen Markergene Slug und FoxD3 in Stadium 17. B. Statistische Auswertung der Experimente aus A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

In Stadium 17 ist die Induktion der Neuralleistenzellen abgeschlossen, während in Stadium 20 die Wanderung der Neuralleisten zur ventralen Seite des Embryos beginnt und sich in

Stadium 23 fortsetzt. Aus Abbildung 28 ist zu entnehmen, dass die Hemmung von RGM A2 die Expression von Slug und FoxD3 in Stadium 17 nicht beeinflusst.

In Stadium 20 dagegen führte die Reduktion von RGM A2 zu einer verminderten Neuralleistenwanderung, was durch die Marker Slug und FoxD3 veranschaulicht wird (Abb. 29). In Control MO inizierten Embryonen hingegen konnte keine Reduktion der Neuralleistenmigration beobachtet werden.



Abbildung 29: Inaktivierung von RGM A2 führt zu einer Hemmung der Neuralleistenzellwanderung.

A. Eine *whole mount in-situ* Hybridisierung zeigt, dass die Inhibierung von RGM A2 eine Reduktion der Neuralleistenzellmigration in Stadium 20 zur Folge hat. Die neuralleistenspezifischen Marker Slug und FoxD3 wurden analysiert. Die Pfeile markieren die injizierte Seite. B. Quantitative Auswertung des beobachteten Wanderungsdefekts. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

In einem weiteren Experiment wurden in Stadium 23 die Marker Krox20 und Twist getestet, die in den wandernden Neuralleistenzellen exprimiert sind. Auch hier führte der Verlust von RGM A2 zu einer Inhibition der Neuralleistenwanderung (Abb. 30).



Abbildung 30: Inhibierung von RGM A2 führt zu einer Reduktion der Neuralleistenzellwanderung.

A. Die unilaterale Injektion des RGM A2 MO, aber nicht die eines Control MO, resultiert in einer Störung der Neuralleistenzellmigration auf der injizierten Seite, was durch eine *whole mount in-situ* Hybridisierung mit den Markern Krox20 und Twist in Stadium 23 veranschaulicht ist. Die injizierte Seite ist durch Pfeile gekennzeichnet. B. Statistische Auswertung der analysierten Phänotypen. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Die Neuralleistenzellen wandern u.a. in die Branchialbögen ein, die sich im Laufe der Entwicklung wiederum zu den Kiemenbögen entwickeln (Sadaghiani und Thiébaud, 1987). Um den Einfluss von RGM A auf die Entwicklung der Kiemenbögen näher zu untersuchen, wurde der für die Branchialbögen spezifische Marker Sox-3 getestet. Hierzu wurden 30 ng RGM A2 MO unilateral in eine animal-dorsale Blastomere von Embryonen im 8-Zell Stadium injiziert. Daran schloss sich eine *whole mount in-situ* Hybridisierung in Stadium 32 an. Aus Abbildung 31 geht hervor, dass die Injektion des RGM A2 MO zu einer Reduktion der Sox-3 Expression in den Branchialbögen führte. Im Vergleich dazu hatte die Injektion eines Control MO keinen Einfluss auf die Expression von Sox-3 auf der injizierten Seite des Embryos (Abb. 31A,B).



Abbildung 31: RGM A beeinflusst die Expression von Sox-3.

A. Durch die unilaterale Injektion des RGM A2 MO kommt es zur Repression der Sox-3 Expression in den Branchialbögen (Pfeil), wohingegen die Expression in der Ohr- und Seitenlienenplakode (Pfeilspitze) nicht betroffen ist. Im Kontrast hierzu führt die Control MO-Injektion nicht zu einer Reduktion der Sox-3 Expression. B. Quantifizierung des Phänotyps. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen.



Untersuchung der kranialen Nerven nach Funktionsverlust von RGM A

Abbildung 32: Beschreibung der kranialen Nerven mit Hilfe einer Antikörperfärbung mit dem neurofilamentspezifischen Antikörper 3A10.

Dorsale (A) und ventral (B) Ansicht eines Embryos in Stadium 42. Die Hirnnerven sind markiert und bezeichnet.

Ein weiterer Zelltyp, zu dem die Neuralleistenzellen beitragen, sind die kranialen Nerven (Gilbert, 2006). Um eine mögliche Funktion von RGM A auf die Entwicklung der kranialen Nerven zu untersuchen, wurden 20-30 ng des RGM A1 MO unilateral in eine animal-dorsale Blastomere im 8-Zell Stadium injiziert. In Stadium 45 erfolgte die Fixierung der Embryonen und einen anschließenden Antikörperfärbung mit dem monoklonalen, neurofilamentspezifischen Antikörper 3A10 (siehe Kapitel 3.3.10). Durch die 3A10 Antikörperfärbung können alle kranialen Neuronen I-XII in *X. laevis* sichtbar gemacht werden (Abb. 32).



Abbildung 33: Der RGM A1 Funktionsverlust führt zu einer Störung der kranialen Nerven.

A. In RGM A1 MO-injizierte Embryonen konnte eine Störung der Verzweigung des Nervus trigeminus (V) beobachtet werden (dorsale Ansicht, Pfeile). Die ventrale Ansicht veranschaulicht die Reduktion bzw. den Verlust des Nervus hypoglossus (XII; Pfeile) aufgrund der Translationshemmung von RGM A1. Die Injektion eines Control MO hat keine Auswirkung auf die Ausbildung der Hirnnerven. B. Statistische Auswertung des beobachteten Phänotyps, der anhand der Reduktion des Nervus hypoglossus ausgewertet wurde. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Die Inhibiton von RGM A hatte zur Folge, dass Zweige des kranialen Nervs V (Nervus trigeminus) weniger komplex ausgebildet sind bzw. verschwinden (Abb. 33A). Bei Betrachtung der ventralen Seite der RGM A1 MO injizierten Embryonen fällt auf, dass der kraniale Nerv XII (Nervus hypoglossus) in 53 % der Embryonen nicht ausgebildet ist (Abb. 33B).

4.2.5 Analyse des Phänotyps nach der RGM A Überexpression

Untersuchung des Augenphänotyps bei Überexpression von RGM A

In diesem Kapitel sollte der Einfluss der Überexpression der RGM A2 mRNA analysiert werden. Hierzu wurde die 5'UTR RGM A2 mRNA in *X. laevis* Embryonen injiziert. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, besitzt das RGM A Protein einen GPI-Anker, der dafür verantwortlich ist, dass das RGM A Protein in der Zellmembran verankert werden kann. Um sicherzustellen, dass dies auch mit RGM A2 der Fall ist, wurden in einem Vorversuch Experimente in der Zellkultur mit HEK-293 Zellen durchgeführt. HEK-293 Zellen wurden zunächst mit dem Plasmid RGM A2 in pCS2+ transfiziert und nach 24- bzw. 36-stündiger Expression bei 37 °C fixiert. Im Anschluss daran wurde eine Antikörperfärbung mit einem RGM A Antikörper durchgeführt (Kapitel 3.4.4).



Abbildung 34: Aufnahme von HEK-293 Zellen nach der Transfektion von RGM A2 und einer Antikörperfärbung mit dem RGM A Antikörper.

A. Nach der 24-stündigen Expression von RGM A2 ist das RGM A2-Protein nicht in der Zellmambran lokalisiert (Pfeile). B. Nach 36 Stunden Expression wurde RGM A2 in der Zellmembran detektiert (Pfeile). Durch die DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-. dihydrochlorid)-Färbung wird der Zellkern sichtbar gemacht.

In Abbildung 34A sind beispielhaft jene HEK-Zellen abgebildet, die eine RGM A Antikörperfärbung nach 24-stündiger Expression erfuhren; RGM A2 konnte nicht in der Zellmambran detektiert werden, wohingegen nach 36 Stunden eine Translokation von RGM A in die Membran der transfizierten Zellen zu erkennen ist (Abb. 34B).

Nachdem in den vorangegangenen Zellkulturexperimenten gezeigt werden konnte, dass das RGM A2 Konstrukt in die Zellmembran transportiert wird, wurde der Einfluss der Überexpression von RGM A2 auf die Entwicklung von *X. laevis* untersucht. Hierzu wurden 2 ng der 5'UTR RGM A2 mRNA einseitig in eine animal-dorsale Blastomere in 8-Zell Embryonen injiziert. Kontrollembryonen wurden mit 2 ng GFP mRNA auf gleiche Weise injiziert. Zur Analyse des Augenphänotyps wurden die Embryonen in Stadium 42 fixiert und ausgewertet. Die Injektion der 5'UTR RGM A2 mRNA ergab eine Störung der Augenentwicklung (Abb. 35A) mit ähnlichen Prozentanteilen wie bei der Injektion des RGM A2 MO (Abb. 24). Nur 19 % der injizierten Embryonen zeigten ein normal entwickeltes Auge, 12 % hatten kleinere, 64 % klein-deformierte Augen und bei 5 % der Emryonen fehlte das Auge vollständig auf der injizierten Seite (Abb. 35B).



Abbildung 35: Die Überexpression von RGM A2 löst eine Störung in der Augenentwicklung aus. A. Die Injektion einer RGM A2 mRNA führt zu einem Defekt in Entwicklung des Auges, während nicht-injizierte Embryonen normal entwickelte Augen aufweisen. B. Statistische Auswertung der Überexpressionsdaten. WT= Wildtyp-Embryonen. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Die Injektion von 1-2 ng der Wildtyp RGM A1 RNA ergab keinen Augenphänotyp (Daten nicht gezeigt).

Analyse einiger Neuralmarker nach Überexpression von RGM A

In einem weiteren Experiment wurden die Neuralmarker Rx, Emx1, En2 und Krox20 nach der Überexpression von RGM A2 untersucht. Die Injektion der 5'UTR RGM A2 mRNA geschah wie oben beschrieben. Im Anschluss daran folgte eine *whole mount in-situ* Hybridisierung in Stadium 23. Laut Abbildung 35 löst der Funktiongewinn von RGM A2 eine Reduktion von Rx, Emx1, En2 und Krox20 aus; im Fall von Krox20 ist sowohl die Expressionsdomäne in den Rhombomeren, als auch die in den wandernden Neuralleistenzellen beeinträchtigt (Abb. 36A).



Abbildung 36: Überexpression von RGM A2 hemmt die Expression anteriorer Markergene. A. Die Injektion der RGM A2 mRNA bewirkt eine Reduktion von Rx, Emx1, En2 und Krox20 (Pfeile). Wildtyp- oder GFP-injizierte Embryonen führen nicht zur Inhibierung der genannten Markergene. B. Statistische Auswertung des Phänotyps. WT= Wildtyp-Embryonen; GFP= grün fluoreszierendes Protein; n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Beschreibung Neuralleistenzell-spezifischer Markergene bei Überexpression von RGM A

Zur Analyse der Neuralleistenentwicklung bei Überexpression von RGM A wurde die 5'UTR RGM A2 mRNA wie oben beschrieben injiziert. Zunächst wurde die Neuralleisteninduktion betrachtet, wofür die Embryonen in Stadium 17 fixiert und die frühen Neuralleistenmarker Slug und FoxD3 untersucht wurden. Die Überexpression von RGM A2 führte zu einer verbreiterten und ektopischen Expression von FoxD3 auf der injizierten Seite (Abb.37A). Auch im Falle von Slug ergab die RGM A2 Überexpression ektopische Expressionsdomänen. 19 % der injizierten Embryonen zeigten zusätzlich eine reduzierte endogene Slug Expression (Abb. 37B).



Abbildung 37: RGM A2 Überexpression beeinträchtigt die Spezifizierung der Neuralleistenzellen. A. Die Injektion der RGM A2 RNA resultiert in ektopischen Expressionsdomänen von Slug und FoxD3 in Stadium 17. Des Weiteren zeigt ein geringer Prozentsatz dieser Embryonen eine reduzierte endogene Expressionsdomäne (die Pfeile markieren die injizierte Seite). In GFPinjizierte Embryonen kann keine Veränderung der Slug- und FoxD3-Expression beobachtet werden. B. Quantifizierung des analysierten Phänotyps. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Die Kontrollembryonen, die mit GFP mRNA injiziert wurden, wiesen eine normal Expression von FoxD3 und Slug auf (Abb. 37A,B). Des Weiteren wurde der Einfluss der RGM A2 Überexpression auf die Neuralleistenwanderung analysiert, wobei folgende neuralleistenspezifische Markergene betrachtet wurden: Slug und FoxD3 in Stadium 20, Twist und Krox20 in Stadium 23-24. Abbildung 38 zeigt die Embryonen in Stadium 20. Die Überexpression von RGM A2 führte in diesem Stadium einerseits zu einer Hemmung der FoxD3 und Slug Expression in den wanderenden Neuralleisten und andererseits zu ektopischen Expressiondomänen von sowohl FoxD3 als auch Slug am posterioren Ende des Embryos (Abb. 38).



Abbildung 38: Überexpression von RGM A2 führt zu Defekten in der Neuralleistenentwicklung in Stadium 20.

A. Unilaterale Injektion von RGM A2 mRNA führt einerseits zur Störung in der Neuralleistenzellmigration (Pfeilspitzen) und andererseits zu ektopischen Expressiondomänen (Pfeile) der Neuralleistenzell-spezifischen Markergenen FoxD3 und Slug auf der injizierten Seite. Die GFP-Injektion besitzt keinen Einfluss auf die Expression von FoxD3 und Slug. B. Statistische Auswertung des beobachteten Phänotyps. Reduziert steht für den Verlust der Neuralleistenzellwanderung. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Abbildung 39 stellt die Untersuchung der späten Neuralleistenmarker dar. In Stadium 23 ist Krox20 in den wandernden Neuralleisten exprimiert, die aus Rhombomere 5 in den dritten Viszeralbogen einwandern (Bradley *et al.*, 1992). Die RGM A2 Überxpression führte zu einer Reduktion der Krox20 Expression (Abb. 39A); zusätzlich kam es zu einer posterior gelegenen ektopischen Expressiondomäne nahe der endogenen Expression (Abb. 39A). Im Gegensatz zu Krox20 ist Twist in allen wandernden Neuralleistenzellen

exprimiert. In RGM A2 mRNA injizierten Embryonen konnte eine Abschwächung der Expression von Twist in den posterior wandernden Neuralleistenzellen festgestellt werden (Abb. 39A). Zudem kam es zur ektopischen Expression neben der endogenen Domäne (Abb. 39A).



Abbildung 39: Injektion von RGM A2 beeinträchtigt die Expression später Neuralleistezellspezifischer Markergene.

A. Die Überexpression von RGM A2 resultiert in Defekten der Expression von Krox20 und Twist auf der injizierten Seite. Einerseits ist die Migration der Neuralleistezellen betroffen (Pfeilspitze), andererseits sind ektopische bzw. unstrukturierte Expressionsdomänen von Slug und Twist zu beobachten (Pfeile). B. Quantitative Analyse des Phänotyps. Reduziert steht für Defekte in der Zellmigration. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

4.3 DM-GRASP

DM-GRASP wurde in einem Screen als ein potentielles Zielgen des nicht-kanonisches Wnt-Signalwegs identifiziert (Prieve und Moon, 2003). In dieser Arbeit sollte die Funktion von DM-GRASP während der embryonalen Entwicklung von *X. laevis* untersucht werden, was im Folgenden beschrieben wird.

4.3.1 Klonierung zweier Pseudoallele von DM-GRASP

Im folgenden Experiment sollte DM-GRASP für weitere Studien kloniert werden.
			URA ANDRE THROUT AS A READ AND A DRAMATING AND THE DRAME THROUT A DRAMATING AND A	60
A	DM-GRASP	1	MEASARTLLVVCVLCAATLRTGFGLHTVNAVYGETIMIPCGHEIVDDLLFASWKYETPDG	60
	DM-GRASP	11	MEASARISLVVCVLCAATLRTGIGLQTVNAVFGETIIIPCGREIVEDLLFASWRIETPDG	60
	DM-GRASP	I	TAVFLASRSAVKNKITYGDAVEYKTRLELSENYTLSISNAVIDDEKRFVCMLVTADNVFE	120
	DM-GRASP	II	IAVFLASRSAVKNKINYGDAPEYKNRLELSENYTLSIANAVIDDEKRFVCMLVTVDNVFE	120
			*************** **** *** **************	
	DM-GRASP	I	EPTVVRVFKPPSKPEILEOPKIMETGKINRVGVCVAKDSYPDGNITWYRNGMILLPVDGA	180
	DM-GRASP	II	EPAVVKVFKPPSKPEILEOPKIMETGKINRVGVCVAKDSYPDGNITWFRNGKMLLPVDRA	180
			•• •• ••••••••••••••••	
	DM-GRASP	т	VI LEWNREENSSSCLY SMOSSLOYMATKED TRAFFECTUTY FMPNGOVSAESDTASEDTY	240
	DM-GRASP	TT	VI IVWHKEKNSSSGLYSTHSSLOVLTTKEDIRAFFSCTVTYFMPNGOVSAESDTASFDIY	240
	Dir Giulor		*** * ********* ***** *****************	240
	DM-GRASP	т	YPTEKVTIOTOPSKKYIKEGDNITTOCKGNGNPPPOEFLYYLPGORGTVSSSAYHITDI	300
	DM-GRASP	TT	YPTEKUTIOIOPSKKYIKEGDNITIOCRGNGNPPPOEFLYYL PGOEOGVUSSSAVHITDI	300
			***************************************	500
	DM-CRASP	т	KENATOOVECSI. SDENMMASATUTUHVI.DI. SI. TPSCEUTEOI COTESUI. CUPEA SENUSU	360
	DM-GRASP	TT	KRNATGDYKCSLSDKNMASTTVTVHYLDLSLTPSGEITKOIGDSFSVLCVPFASKNVSV	360

	DM-GRASP	I	MFMKDSKILTALPFKNLOYRDSGVYECLANLEEEGLOSRKTFKLTVEGKPKLKLTKNTSS	420
	DM-GRASP	II	LFMKDSKILTAIPSKNLOYRDSGVYECLANLEEEGLOSRKTFKLTVEGKPKLKLIKNPFS	420
			•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	
	DM-GRASP	т	DGKTKTISYEVEGEPKPEVSCSGTGNLNKTEETVISNIRYSAKIIISPEENTTVICV	477
	DM-GRASP	TT	DGKTKTI SYEVEGEPRPEVYCSSAGOLVHLNKTEETVI SNIRYSAKI II SPEENTTI SCV	480
		0.5.5	***************	1772
	DM-GRASP	т	AENRLGKEVRSLNVSATSIPETDEPNDRSDDSSDHAKLIVGIVVGLLLAALIAGASYCIY	537
	DM-GRASP	II	AENRLGREVRSLNVSAISIPEKDERNDSSDDSSDHAKLTVGIVVGLLLAALVAGIAYCLY	540
			****** ********************************	
	DM-GRASP	т	SRKSSSATKHVGKELGNTEENKKLEENNHKSDA 570	
	DM-GRASP	II	IRKSGAGTKHVGKELGNKEENKKLEENNHKSEA 573	
	orator		*** ******** ******* *	
В		1-24	40-110 154-217 257-310 350-387 441-476 515-537 570	

S	Signal- Deptid	IG 1 V-Typ	U-Ty	p C	IG 3 2-Typ	IG 4 C2-Typ	C2-Typ	Trans- membran domäne	
Homologie [%]	Vollständ Sequenz	ige SP	IG 1	IG 2	IG 3	IG 4	IG 5	Transmembran- domäne	Cytoplasmatische Domäne
Homo sapiens	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mus musculus	92	74	95	81	97	100	98	100	100
Gallus gallus	73	48	84	53	79	76	78	91	87
Xenopus laevis 1	58	41	60	53	75	44	56	78	71
Xenopus laevis 1	57	45	60	53	70	44	49	86	71
Danio rerio	39	45	36	34	43	48	40	62	50
Carassius auratus	39	50	35	31	43	51	40	62	50

С



Abbildung 40: Strukturanalyse von DM-GRASP.

A. Die beiden Pseudoallele von DM-GRASP in *Xenopus laevis* sind untereinander hoch konserviert. Die Sterne markieren übereinstimmende Aminosäuren. Die DM-GRASP Sequenz beinhaltet ein Signalpeptid (rot), fünf Ig-Domänen (orange) und eine Transmembrandomäne (grün). B. Schematische Darstellung des DM-GRASP-Proteins. Die Proteinsequenz von DM-GRASP ist innerhalb der Vertebraten hoch konserviert. C. DM-GRASP-Proteine der verschiedenen Organismen liegen evolutionär nah beeinander. SP = Signalpeptid; Ig = Immunglobulin.

Die Suche **DM-GRASP** in der digitalen nach Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ergab zwei sehr ähnliche Sequenzen mit folgenden Acc. No.: DM-GRASP I: BC074313 und DM-GRASP II: BC073670. Um diese Sequenzen zu überprüfen, wurden DM-GRASP I und II kloniert und sequenziert (Abb. 40). Die DM-GRASP II Sequenz zeigte keine Unterschiede zur veröffentlichten Sequenz, während in der DM-GRASP I Sequenz eine Aminosäureaustausch an Position 533 von Alanin zu Serin gefunden wurde. Die DM-GRASP I und II Proteine besitzen eine Länge von 570 und 573 Aminosäuren und ein errechnetes Molekulargewicht von 62,5 und 63 kDa. Ein Vergleich der Amionosäuresequenzen zeigt, dass die beiden Sequenzen eine Homologie von 89 % zueinander aufweisen. Eine detailierte Sequenzanalyse weist das Vorhandensein verschiedener Domänen, wie die eines Signalpeptids, fünf Ig-Domänen und einer Transmembrandomäne, auf (Abb. 40A). Diese verschiedenen Domänstrukturen findet man auch in den DM-GRASP Sequenzen anderer Organismen (Abb. 40B). Eine phylogenetische Analyse der DM-GRASP Sequenzen verschiedener Organismen ergab, dass die DM-GRASP Proteine evolutionär nahe beeinander stehen (Abb. 40C).

4.3.2 Zeitliches und räumliches Expressionsprofil von DM-GRASP in Xenopus laevis

Mit Hilfe eine semi-quantitativen RT-PCR wurde das zeitliche Expressionsmuster von DM-GRASP in *X. laevis* aufgenommen. Die Primer wurden so gewählt, dass beide Pseudoallele erfasst wurden. Aus Abbildung 41A wird ersichtlich, dass die DM-GRASP Expression ab Stadium 11 beginnt und in Stadium 12,5 stärker wird. Eine weitere Zunahme der Tanskriptmenge konnte in keinem der analysierten Stadien beobachtet werden. Zudem wurden verschiedene adulte Geweben auf die Expression von DM-GRASP hin untersucht (Abb. 41B). Dabei konnte DM-GRASP in folgenden Geweben nachgewiesen werden: ZNS, PNS (peripheres <u>N</u>erven<u>s</u>ystem), Hoden, Auge, Herz, Lunge, Haut und Darm.



Abbildung 41: Expressionprofil von DM-GRASP.

RNA aus verschiedenen Stadien bzw. verschiedenen Organen wurde isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt. Im Anschluss daran folgte eine RT-PCR. Positivkontrolle = H4, Negativkontrolle = -RT. A. Zeitliches Expressionmuster von DM-GRASP. Ab Stadium 11 beginnt die DM-GRASP Expression, die in Stadium 12,5 ansteigt und bis zu Stadium 46 konstant bleibt. B. Adultes Expressionprolfil von DM-GRASP. DM-GRASP ist in folgenden Organen vorhanden: ZNS, PNS, Hoden, Auge, Herz, Lunge Haut undDarm. Blut, Muskel, Fett und Leber sind frei von DM-GRASP. H4 =Histon-4; RT = Reverse Transkriptase; PNS = peripheres Nervensystem; ZNS = zentrales Nervensystem.

Im nächsten Schritt wurde die örtliche Expression von DM-GRASP I und II während der Embryogenese in *X. laevis* über eine *whole mount in-situ* Hybridisierung (Kapitel. 3.3.2) erfasst. Hierzu wurden zwei verschiedene RNA-Sonden verwendet, um das Expresssionsprofil beider DM-GRASP Pseudoallele aufzunehmen.

Expressionsmuster von DM-GRASP I

Die spezifische Expression von DM-GRASP I beginnt in Stadium 15 in anterioren Neuralgewebe (Abb. 42A).



Abbildung 42: Räumliches Expressionsmuster von DM-GRASP I.

A. Anteriore Ansicht. Ab Stadium 15 ist DM-GRASP in der anterioren Neuralplatte und im Neuralrohr (Pfeil) lokalisiert. B. Anteriore Ansicht. In Stadium 19 beschränkt sich die Expression von DM-GRASP auf die Vorläuferzellen der ektodermalen Plakoden (Pfeil) und das Neuralrohr. C. Laterale Ansicht eines Embryos im Stadium 23. DM-GRASP konnte in der anterodorsalen Seitenlinienplakode (pAD) und der Trigeminus Plakode (pPrV) visualisiert werden. D. In Stadium 28 ist DM-GRASP zusätzlich im Pronephros (Pfeil) exprimiert. E. Lateralansicht eines Embryos in Stadium 32. DM-GRASP Expression in den kranialen Ganglien, der Stomodeumanlage (schwarze Pfeilspitze), dem Herz (Pfeil) und im Neuralrohr (weißer Pfeil). Gestrichelte Linien stellen die Schnittebenen aus Abbildung 42 dar. F. Lateralansicht eines Embryos in Stadium 40. DM-GRASP ist in den kranialen Genglien und in der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (Pfeil) lokalisiert. G. Nahaufnahme des Embryos aus Abbildungsteil E. DM-GRASP Expression in folgenden kranialen Ganglien: Profundalganglion (gPr), Trigeminusganglion (gV), anterodorsales Seitenlinienganglion (gAD), mittleres (gM) und posteriores Seitenlinienganglion (gP), epibranchiale Ganglien egVII, egIX und egXI und in den Zellen, die zum vagalen und posterioren Seitenlinienganglion gehören (gVPL). Gestrichelte Linien stellen die Schnittebenen aus Abbildung 42 dar. H. Kopfansicht des Embryos aus Abbildungsteil F. DM-GRASP ist im anterodorsalen Seitenlinienganglion (gAD), in der Anlage des auswandernden dorsalen Seitenlienenganglions (d), im mittleren (m) und posterioren Seitenlinienganglion (gP) und in den Epibrachnialganglien egVII, IX und 2/3 zu beobachten. Abkürzungen sind nach dem Englischsprachigen benannt: egVII = facial epibranchial ganglion; egIX = glossopharyngeal epibranchial ganglion; egXI = first vagal epibranchial ganglion; egX2/3 = fused second and third vagal epibranchial ganglion; gPr = profundal ganglion; gV = trigeminal ganglion; gAD = anterodorsal lateral line ganglion; gM = middle lateral line ganglion; gP = posterior lateral line placode; gVPL = cells contributing to the vagal and posterior lateral line ganglion; pAD = anterodorsal lateral line placode; pPrV = profundal-trigeminal placodal area.

In Stadium 19 ist DM-GRASP I weiterhin in den Neuralfalten zu erkennen, wobei die Expression in der anterioren Neuralplatte abnimmt. Stattdessen ist DM-GRASP I im Bereich der ektodermalen Plakoden zu detektieren (Abb. 42B). Zu einem späteren Entwicklungsstadium, Stadium 23, befindet sich DM-GRASP I spezifisch in den beiden neurogenen Plakoden, der anterodorsale Seitenlinienplakode (pAD) und der Trigeminus Plakode (pPrV). Die Expression im Neuralrohr bleibt weiterhin bestehen (Abb. 42C). In Stadium 28 ist DM-GRASP I in den beiden Plakoden, im Neuralrohr und im Pronephros exprimiert (Abb. 42D). Ein Querschnitt durch diesen Embryo zeigt, dass DM-GRASP I an der dorsolateralen Grenze des Neuralrohrs exprimiert ist (Abb. 43C). Eine Doppelfärbung mit Isl-1 macht deutlich, dass DM-GRASP I Isl-1 positve Zellen anfärbt, die sogenannten dorsalen Interneurone 3 (dI3) (Abb. 43E; Wilson und Maden, 2005). Die Isl-1 Färbung in den ventral gelegenen Motoneuronen beginnt erst in mehr posterior gelegenen Schnitten (Brade, 2007). In mehr posterior gelegenen Schnitte bewegt sich die DM-GRASP I Färbung in den dorsalen Bereich des Nerualrohrs (Abb. 43G). Die DM-GRASP I Färbung im Neuralrohr ist in Stadium 32 noch detektierbar, in Stadium 40 verschwindet sie. In Stadium 32 ist DM-GRASP in vielen neuronalen Ganglien erkennbar (Abb. 42E; 42H,I,K): auf der ventralen Seite in den epibranchialen Ganglien egVII, egIX und egXI und in den Zellen, die aus dem vagalen und posterioren Seitenlinienganglion auswandern (gVPL); auf der dorsalen Seite des Embryos ist DM-GRASP in folgenden Ganglien exprimert: im Profundalganglion (gPr), im Trigeminusganglion (gV), im anterodorsalen Seitenlinienganglion (gAD), im mittleren (gM) und posterioren Seitenlinienganglion (gP). Nicht-neurale Expressionsdomänen von DM-GRASP I in diesem Stadium sind das Herz (Abb. 41E;42L), die Pronephros- und Stomodeumanlagen (Abb. 42E;42J). In Stadium 40 ist DM-GRASP hauptsächlich in folgenden neuronalen Ganglien exprimiert (Abb. 42F): im anterodorsalen Seitenlinienganglion (gAD), in der Anlage des auswandernden dorsalen Seitenlienenganglions (d), im mittleren (m) und posterioren Seitenlinienganglion (gP) und in den Epibranchialganglien egVII, IX und 2/3. Eine neue Expressionsdomäne ist der Isthmus, die Mittelhirn-Hinterhirngrenze.



Abbildung 43: Örtliches Expressionsprofil von DM-GRASP I.

C-G, J-L = Querschnitte, H-I = Horizontalschnitte. Schnittebenen siehe Abbildung 41. A. Lateralansicht eines transparenten Embryos in Stadium 28. DM-GRASP ist im Neuralrohr exprimiert (Pfeil). B. Dorsale Ansicht des Embryos aus A. Im anterioren Neuralrohr ist DM-GRASP in zwei lateral gelegenen Linien exprimiert (Pfeile), die posterior zusammenlaufen (Pfeilspitze). C. DM-GRASP (rot) in den dorsal gelegenen Interneuronen 3 (dI3) (Pfeile). D. Isl-1 (türkis) ist in dI3 exprimiert (Pfeil). E. Überlappende Expression von DM-GRASP (rot) und Isl-1 (türkis) in den dI3 (Pfeil). F. In Stadium 32 ist DM-GRASP im anterioren Neuralrohr in den dI3 exprimiert (Pfeile). G. Dorsale DM-GRASP Expression in Stadium 32 im posterioren Neuralrohr (Pfeil). H und I. Horizontaler Schnitt durch einen Embryo in Stadium 32. Kraniale Genglien sind bezeichnet. J. DM-GRASP ist in der Stomoduemanlage lokalisiert (Pfeil). K. DM-GRASP in den kranialen Ganglien. L. DM-GRASP ist im Myokardium exprimiert (Pfeil). Abkürzungen der kranialen Ganglien aus dem Englischsprachigen entnommen: egVII = facial epibranchialganglion; egIX = glossopharyngeal epibranchial ganglion; egXI = first vagal epibranchial ganglion; gPr = profundal ganglion; gV = trigeminal ganglion; gAD = anterodorsal lateralline ganglion; gM = middle lateral line ganglion; gP = posterior lateral line placode; gVPL= cells contributing to the vagal and posterior lateral line ganglion; pAD = anterodorsal lateral line placode; pPrV = profundal-trigeminal placodal are; nr = Neuralrohr; cd = Chorda dorsalis; ov = Ohrvesikel.

Expressionsprofil von DM-GRASP II

Die spezifische Expression von DM-GRASP II beginnt in Stadium 12,5 in der anterioren Neuralplatte (Abb. 44A). In Stadium 13 ist diese Expressionsdomäne verstärkt. Ein Schnitt durch einen Embryo in diesem Stadium gibt eine detailierte Ansicht der Expression; DM-GRASP II konnte im anterioren Teil der Neuralplatte, in der Epithelschicht und im sensorischen Teil des Neuroektoderms, jedoch nicht im mesodermalen Gewebe visualisiert werden (Abb. 44K,L). In Stadium 21 ist DM-GRASP II im Auge, den kranialen Plakoden, im Gehirn und im Neuralrohr exprimiert (Abb. 44C).



Abbildung 44: Embyonale Expression von DM-GRASP II.

A. In Stadium 12,5 beginnt die DM-GRASP Expression in der anterioren Neuralplatte (Pfeil). B. In Stadium 13 hat sich die Expression von DM-GRASP in der anterioren Neuralplatte verstärkt (Pfeil). Gestricheltet Linie zeigt die Schnittebene von K und L. C. Anteriore Ansicht eines Embryos in Stadium 21. DM-GRASP ist im Auge (schwarzer Pfeil), den kranialen Placoden (roter Pfeil), im Gehirn und um Neuralrohr zu beobachten. D. Ventralansicht eines Embryos in Stadium 25. DM-GRASP ist in kardialem Gewebe exprimiert (Pfeil). E. Lateralansicht eines Embryos in Stadium 23. DM-GRASP lässt sich in den kraniale Plakoden (bezeichnet), im Hinterhirn (Pfeil) und im Pronephros (Pfeilspitze) nachweisen. Im Auge ist DM-GRASP nur noch schwach zu visualisieren. F. Ab Stadium 25 ist DM-GRASP zusätzlich im Herz (Pfeil) exprimiert. G. Ein

Embryo in Stadium 30 veranschaulicht, dass DM-GRASP in den kranialen Ganglien, dem Isthums (roter Pfeil), dem Hinterhirn (weißer Pfeil),dem Pronephros (Pfeilspitze) und im Herzen (schwarzer Pfeil). H. In Stadium 38 verschwindet die Pronephrosfärbung; die Färbung in den kranialen Ganglien, im Isthmus (roter Pfeil) und im Herzen (schwarzer Pfeil) bleibt bestehen. I.

Pfeil). H. In Stadium 38 verschwindet die Pronephrosfärbung; die Färbung in den kranialen Ganglien, im Isthmus (roter Pfeil) und im Herzen (schwarzer Pfeil) bleibt bestehen. I. Nahaufnahme eines Embryokopfes ins Stadium 30. Die Expression in den kranialen Ganglien ist bezeichnet. J. Vergrößerte Aufnahme eines Embryokopfes in Stadium 38. K + L. Längsschnitte durch den Embryo aus B. DM-GRASP ist im anterioren Teil der Neuralplatte, in der Epithelschicht und im sensorischen Teil des Neuroektoderms, jedoch nicht im mesodermalen Gewebe exprimiert. M. Querschnitt durch einen Embryo in Stadium 36. DM-GRASP ist im posterioren Teil des Herzens im Myokardioum nachzuweisen. Die spezifische Ganglienexpression ist beschrieben. e = Epithelschicht; m = Mesoderm; np = Neuralplatte; sne = sensorisches Neuroektoderm. Abkürzungen der kranialen Plakoden und Ganglien dem Englischsprachigen entnommen: egVII = facial epibranchial ganglion; egIX = glossopharyngeal epibranchial ganglion; gAD = anterodorsal lateral line ganglion; gM = middle lateral line ganglion; gP = posterior lateral line placode; gVPL = cells contributing to the vagal and posterior lateral line ganglion; pAD = anterodorsal lateral line placode; pPrV = profundal-trigeminal placodal area;.

Die Expression im Pronephros beginnt in Stadium 23. Die erste spezifische Expression im Herzen ist im Stadium 25 detektierbar (Abb. 44D,F). Schnitte durch einen Embryo in Stadium 36 zeigen, dass DM-GRASP II im Myokardium des Herzens exprimiert wird (Abb. 44M). Wie DM-GRASP I ist auch DM-GRASP II in den oben beschriebenen kranialen Ganglien exprimiert.

4.3.3 Einbindung von DM-GRASP in den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg

DM-GRASP als potentielles Zielgen von Wnt-4

DM-GRASP wurde in einen Screen als potentielles Zielgen des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs isoliert (Prieve und Moon, 2003). Aus dem Expressionsmuster von DM-GRASP wird ersichtlich, dass es Ähnlichkeiten mit der Expression von Wnt-4 (McGrew *et al.*, 1992) gibt. Gleiche Expressionsdomänen sind das Gehirn, kraniale Plakoden und die Nierenanlage. Somit liegt die Vermutung nahe, dass DM-GRASP ein potentielles Zielgen von Wnt-4 ist. Um dies zu untersuchen, wurden 5 ng des Wnt- 4 MO in eine animaldorsale Blastomere eines 8-Zell Embryos injiziert. Um die endogene Expression von DM-GRASP zu untersuchen, folgte eine *whole mount in-situ* Hybridisierung in Stadium 13. Der Funktionsverlust von Wnt-4 führte zu einem Verlust der endogenen DM-GRASP Expression auf der injizierten Seite, während ein Control MO diesen Effekt nicht ausübte



(Abb. 45A). Dies unterstützt die Hypothese, dass DM-GRASP ein potentielles Zielgen von Wnt-4 sein könnte.

Abbildung 45: Funktionsverlust von Wnt-4 führt zu einer Reduktion der DM-GRASP Expression in der anterioren Neuralplatte.

A. Die unilaterale Injektion von 5 ng des Wnt-4 MO resultiert in einem Verlust der DM-GRASP Expression auf der injizierte Seite (Pfeil), wohingegen die Injektion eines Control MO keinen Effekt auf die DM-GRASP Expression ausübt. B. Statistische Auswertung des beobachteten Phänotyps in A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen.

DM-GRASP und Wnt11-R als potentielle Zielgene von Wnt-11

Neben der neuronalen Expression ist DM-GRASP zudem ab Stadium 25 im Herzen von *X. laevis* exprimiert (siehe Abb. 44D,F). Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Wnt-11 wichtige Aufgaben während der Herzspezifizierung in *X. laevis* hat (Pandur *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Studien wurde analysiert, ob der Funktionsverlust von Wnt-11 die Expression von DM-GRASP oder Wnt11-R beeinträchtigt.

Um die Funktion von Wnt-11 zu inhibieren, wurde eine dominant-negative Form (dnWnt-11) des Konstrukts verwendet. Um zu untersuchen, ob Wnt-11 einen Einfluss auf die DM-GRASP Expression im Herzen von *X. laevis* hat, wurde 1 ng der dnWnt-11 mRNA in eine D2 Blastomere in Embryonen des 8-Zell Stadiums injiziert. In Stadium 28 wurden die Embryonen fixiert und die Expression von DM-GRASP und Wnt11-R mit Hilfe einer *whole mount in-situ* Hybridisierung untersucht. Um die Aktivität der verwendeten mRNA zu kontrollieren, wurde parallel eine *whole mount in-situ* Hybridisierung auf TnIc durchgeführt, da dieses Gen bei Funktionsverlust von Wnt-11 inhibiert wird (Pandur *et al.*, 2002). Durch die Injektion der dnWnt-11 RNA kam es zum Verlust der Expression von TnIc, DM-GRASP und Wnt11-R auf der injizierten Seite, während die un- oder GFP-injizierten Embryonen nicht betroffen waren (Abb. 46).



Abbildung 46: DM-GRASP als potentielles Zielgen von Wnt-11.

A. Durch die Injektion einer dominant-negativen Wnt-11 RNA kommt es zu einer Inhibierung der Expression von TnIc, DM-GRASP und Wnt11-R. Die Injektion einer GFP RNA übt keinen Einfluss auf die Expression genannter Gene aus. B. Quantifizierung des Phänotyps in A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

4.3.4 Analyse des Phänotyps nach Funktionsverlust von DM-GRASP

Aufgrund der starken Expression von DM-GRASP im kardialen Gewebe, wurde in dieser Arbeit die Funktion von DM-GRASP während der Herzentwicklung von *X. laevis* näher untersucht. Ein erster Schritt hierbei ist das Entwerfen eines MO, um spezifisch die DM-GRASP Funktion in *X. laevis* zu hemmen. Es wurde eine MO-Sequenz gewählt, welche in der Lage ist, beide Pseudoallele zu inhibieren. Um die Bindungsaffinität und -spezifität zu testen, wurde eine *in-vitro* Transkriptions- und Translationsassay (TNT) durchgeführt (Kapitel 3.5.25). Aus Abbildung 46A geht hervor, dass das DM-GRASP MO die Translation von DM-GRASP spezifisch blockiert, während das Control MO dazu nicht in der Lage ist. Für *in-vivo* Spezifitätsexperimente wurde ein Δ 5'UTR DM-GRASP-Konstrukt kloniert, welches 9 Mutationen in der MO-Bindungsstelle aufweist. Dadurch verliert das MO die Bindungaffinität zu diesem Konstrukt (Abb. 47A).

Um die Konsequenzen eines Funktionsverlustes von DM-GRASP auf die Herzentwicklung zu analysieren, wurden 8 ng des DM-GRASP MO in beide D2 Blastomere in die Marginalzone von Embryonen im 8-Zell Stadium injiziert. Schicksalskartierungsexperimente hatten gezeigt, dass diese Blastomere in der weiteren Entwicklung zu Herzgewebe beitragen (Dale und Slack, 1987; Moody, 1987). Zur Untersuchung der Herzentwicklung wurden die Embryonen nach Abschluß der Herzschleifenbildung in Stadium 42 fixiert. 78 % der analysierten Embryonen zeigten eine unvollständige Schleifenbildung des Herzens (Abb. 47C). In der weiteren Entwicklung entstanden perikardiale Ödeme an der ventralen Seite der Embryonen, was in Stadium 43 zum Tode führte. Die mit Control MO injizierten Embryonen zeigten normal entwickelte Herzen, die den Schleifenprozess abgeschlossen hatten. Für eine detailiertere Beschreibung dieses Herzphänotyps wurden Herzen aus Embryonen im Stadium 42 präpariert (Abb. 47C). In DM-GRASP MO injizierten Embryonen waren die einzelnen Komponenten wie Truncus arteriosus, Ventrikel und Atrium entwickelt, wobei das ganze Organ kleiner im Vergleich zu dem des Control MO injizierten Embryo war. Der Hauptdefekt des DM-GRASP Funktionsverlusts in der Herzentwicklung spiegelte sich in einer unvollständigen Schleifenbildung wider. Die Herzen aus mit Control MO injizierten Embryonen konnten sich normal entwickeln und hatten sich zu einer Schleife gefaltet. Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, wie sich der Funktionsverlust von DM-GRASP auf die Herzentwicklung in einem früheren Entwicklungsstadium auswirkt. Zur Klärung dessen wurden DM-GRASP MO injizierte Embryonen in Stadium 35 auf Nkx2.5 gefärbt und Vibratomschnitte angefertigt. Die Nkx2.5 Färbung erleichtert das Erkennen von Herzgewebe. In diesem Entwicklungsstadium beginnt der Loopingprozess des Herzens, was in den Control MO injizierten Embryonen zu erkennen ist (Abb. 47B). Im Vergleich dazu zeigten die Embryonen, die mit DM-GRASP MO injiziert wurden, eine Störung in der Herzentwicklung; die Schließung des Herzschlauches konnte nicht abgeschlossen werden, was sich in zwei nicht verschmolzenen Herzfeldern widerspiegelte (Abb. 47B).



Abbildung 47: DM-GRASP besitzt eine Funktion in der Herzentwicklung von Xenopus laevis. A. Bindestellen des DM-GRASP MO im 5'UTR DM-GRASP- und Δ 5'UTR DM-GRASP-Konstrukt. Im Δ 5'UTR DM-GRASP-Konstrukt sind neun Basen verändert (markiert durch rote Sternchen). Der TNT-Kit zeigt, dass das DM-GRASP MO die Translation des 5'UTR DM-GRASP-Konstrukts blockiert, während die des Δ 5'UTR DM-GRASP-Konstrukts nicht beeinträchtigt ist. B. DM-GRASP MO- und Control MO-injizierte Embryonen in Stadium 35 nach Nkx2.5 gefärbt. Gestrichelte Linien zeigen die Ebene der Schnitte, die im unteren Teil dargestellt sind. Die DM-GRASP-Injektion bewirkt, dass beiden Herzfelder nicht fusionieren, wohingegen sich das Herz des Control MO-injizierten Embryos im Looping-Prozess befindet. C. Ventrale Darstellung von Embryonen (oberer Teil) und isolierte Herzen (unterer Teil). Durch den Verlust der DM-GRASP-Funktion kommt es zur morphologischen Veränderung des Herzens. Das Herz ist unvollständig gefaltet. Im Vergleich dazu hat sich das Herz aus einem Control MO-injizierten Embryo normal entwickelt. D. Statistische Auswertung des beobachteten Herzphänotyps in C. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

4.3.5 Untersuchung von Herzmarkergenen nach Verlust der DM-GRASP Funktion

In diesem Kapitel sollte die molekulare Basis des beobachteten Herzphänotyps näher untersucht werden. In einem ersten Schritt wurde mittels *whole mount in-situ* Hybridisierung die Expression von DM-GRASP II mit der von bekannten Herzmarkergenen verglichen.



Abbildung 48: Kardiale Expression von DM-GRASP II im Vergleich zur Expression bekannter Herzmarker. A. Isl-1, Nkx2.5 und Tbx20 sind in Stadium 20 in den fusionierten Herzprimordien lokalisiert. DM-GRASP kann in diesem Stadium nicht in kardialem Gewebe visualisiert werden. B. In Stadium 29 sind Nkw2.5, Tbx20, DM-GRASP und TnIc im primären Herzfeld exprimiert. Im Vergleich dazu kann die Expression von Isl-1 im sekundären Herzfeld beobachtet werden (Pfeilspitze).

In Stadium 20 sind Isl-2, Nkx2.5 und Tbx20 im fusionierten Herzprimordium lokalisiert (Abb. 48A). In Stadium 29 zeichnet sich ab, dass DM-GRASP, wie auch Nkx2.5, Tbx20 und TnIc in den beiden Herzfeldern, die den linearen Herzschlauch bilden, exprimiert sind (primäres Herzfeld; Abb. 48B). Im Kontrast dazu ist die Isl-1 Expression zusätzlich weiter anterior zu beobachten, dem sogennanten sekundären Herzfeld (Abb. 48B; Brade, 2007). Da die spezifische Expression von DM-GRASP erst ab Stadium 25 beginnt, wurde zunächst der Einfluss des Funktionsverlustes von DM-GRASP auf die späten Herzmarkergene untersucht.



Abbildung 49: Funktionsverlust von DM-GRASP resultiert in einer Reduktion später kardialer Marker.

A. DM-GRASP MO-injizierte Embryonen zeigen einen Verlust der Herzmarkergene Tbx20, TnIc, cActin und Wnt11-R in Stadium 28, während Isl-1 und Nkx2.5 nur gering beeinflusst sind. Das Control MO hat keinen Einfluss auf die Expression der genannten Markergene. B. Statistische Auswertung der Ergebnisse aus A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Hierzu wurden 10 ng des DM-GRASP MO unilateral in den dorsalen Marginalbereich einer D2 Blastomere von Embryonen im 8-Zell Stadium injiziert. Die uninjizierte Seite diente als interne Kontrolle. Auf gleiche Weise erfolgte die Kontrollinjektion mit dem Control MO. In Stadium 28, in welchem die zwei Herzfelder noch getrennt vorliegen, wurden die Embryonen fixiert und mit Hilfe der *whole mount in-situ* Hybridisierung (Kapitel 3.3.2) herzspezifische Markergenen wie Isl-1 (Islet-1), Nkx2.5, Tbx20, TnIc, cActin und Wnt-11R visualisiert. Wie in Abbildung 49 gezeigt, führte der Funktionsverlust von DM-GRASP zum Hemmung der Expression von Tbx20, TnIc, cActin und Wnt11-R auf der injizierten Seite. Im Gegensatz dazu hatte das Control MO keinen Effekt auf die Expression dieser Herzmarkergene. 37 % der Nkx2.5 gefärbten Embryonen zeigten auf der mit DM-GRASP MO injizierten Seite eine Reduktion der Expression, jedoch keinen

Tbx20 Tnlc cActin Α DM-GRASP MO DM-GRASP MO В 80 Tbx20 Tnlc cActin Reduzierte Markergenexpression [%] 70 60 50 40 30 20 10 0 3 75 3 76 6 179 3 72 3 74 5 142 2 43 6 168 n= N=

kompletten Verlust (Abb. 49A,B). Die Isl-1 Expression war durch den Verlust von DM-GRASP nicht betroffen (Abb. 49A,B).

Abbildung 50: In-vivo Spezifitätstest des DM-GRASP MO.

A. Die Koinjektion des DM-GRASP MO zusammen mit der GFP mRNA hat den Verlust der Markerexpression von Tbx20, TnIc und cActin in Stadium 28 zur Folge (die Pfeile markieren die injizierte Seite). Durch das Ersetzen der GFP mRNA mit der DM-GRASP mRNA (Δ 5'UTR DM-GRASP) wir die vom DM-GRASP MO ausgelösten Reduktion der besagten Herzmarker revertiert. B. Quantifizierung der Ergebnisse in A. Die Rettung des Markerverlusts durch die DM-GRASP mRNA (Δ 5'UTR DM-GRASP) geschieht dosisabhängig. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Um die Spezifität des DM-GRASP MO Effekts *in-vivo* zu untersuchen, wurden 10 ng des DM-GRASP MO zusammen mit 1 und 2 ng der 5'UTR DM-GRASP RNA unilateral in eine D2 Blastonmere injiziert. Die Embryonen wurden in Stadium 28 fixiert und auf Tx20, TnIc und cActin gefärbt (Abb. 50). Durch die Koinjektion des 5'UTR DM-GRASP Konstrukts kam es zur Rettung der Expression von Tbx20, TnIc und cActin, was die Spezifität des verwendendeten DM-GRASP MO belegt. Mit ansteigender Konzentration der 5'UTR DM-GRASP mRNA konnte sich dieser Effekt noch verstärkt werden (Abb. 50B). Des Weiteren wurde der Einfluss von DM-GRASP auf die Expression früher Herzmarkergene untersucht. Hierzu wurden 10 ng des DM-GRASP MO unilateral in eine

D2 Blastomere im 8-Zell Stadium injiziert, die nachfolgend im Stadium 20 fixiert wurden. Anschließend wurde eine *whole mount in-situ* Hybridisierung mit den frühen Herzmarkern Tbx20, Isl-1 und Nkx2.5 durchgeführt. Aus Abbildung 51 wird deutlich, dass der Funktionsverlust von DM-GRASP keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Herzmarker in Stadium 20 ausübte (Abb. 51), was im Einklang mit der DM-GRASP Expression im Herzen steht.



Abbildung 51: Die Spezifizierung des Herzens ist nicht durch den DM-GRASP Funktionsverlust beeinträchtigt.

A. Der Funktionsverlust von DM-GRASP hat keine Inhibierung der frühen Herzmarker Tbx20, Isl-1 und Nkx2.5 in Stadium 20 zur Folge. Die Injektion des Control MO bewirkt keinen Effekt auf die Expression genannter Gene. B. Statistik des Phänotyps in A. CoMO = Control MO; n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

4.3.6 Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Herzgene

Im folgenden Experiment sollte der Einfluß von Wnt11-R auf die Expression verschiedener Herzmarkergene untersucht werden. Folgende Marker wurden analysiert: Nkx2.5, Isl-1 und Tbx20 als frühe Spezifizierungsmarker und DM-GRASP, TnIc, cActin und MHC α (*myosin heavy chain \alpha*) zur Untersuchung der Differenzierung des Herzens.



Abbildung 52: Einfluss von Wnt11-R auf verschiedene Herzmarkergene.

A. Die Inhibierung der Wnt11-R Translation bewirkt eine Reduktion der späten Herzmarker TnIc, cActin und MHC α in Stadium 28; die Expression von DM-GRASP ist nur gering beeinträchtigt (Pfeile zeigen die injizierte Seite). Die frühen Marker wie Nkw2.5, Isl-1 und Tbx20 werden durch den Funktionsverlust von Wnt11-R nicht beeinflusst. Das Control MO zeigt keinen Einfluss auf die Expression der getesteten Herzmarker. B. Quantitative Auswertung der Ergebnisse in A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Abbildung 52 zeigt, dass Wnt11-R keinen Einfluss auf die Expression der frühen Herzmarker hat, wohingegen die späten Herzmarker TnIc, cActin und MHCα stark betroffen sind. Auf die DM-GRASP Expression hat der Funktionsverlust von Wnt11-R nur einen geringen Effekt von 28 % (Abb. 52B).

Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Expression von DM-GRASP

Es ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren Isl-1 (Yuan und Schoenwolf, 2000; Cai *et al.*, 2003; Dodou *et al.*, 2004; Laugwitz *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2006; Brade, 2007), Tbx20 (Brown *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Shelton *et al.*, 2007) und Nkx2.5 (Cleaver *et al.*, 1996; Grow und Krieg, 1998) einen wichtigen Beitrag an der Herzentwicklung haben.



Abbildung 53: Isl-1 reguliert die Expression von DM-GRASP und Wnt11-R.

A. Die unilaterale Injektion des Isl-1 MO führt zu einem Verlust der Expression von DM-GRASP und Wnt11-R (Pfeile), wohingegen die Control MO-injizierten Embryonen keine Reduktion der genannten Marker aufweisen. B. Statistische Auswertung von A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Um den Einfluss von Isl-1 auf Wnt11-R und DM-GRASP zu analysieren, wurden 10 ng des Isl-1 MO (Brade, 2007) unilateral in die Marginalzone einer D2 Blastomere injiziert. Anschließend wurden die Embryonen in Stadium 28 fixiert und einer *whole mount in-situ* Hybridisierung mit den RNA-Sonde gegen Wnt11-R und DM-GRASP unterzogen. Der Funktionsverlust von Isl-1 führte zur einer Inhibierung sowohl von DM-GRASP als auch von Wnt11-R (Abb. 53), wohingegen die Injektion des Control MO keinen Einfluss auf die Expression von DM-GRASP und Wnt11-R zeigte. Im nächsten Schritt wurde die Wirkung



von Tbx20 auf mehrere herzspezifische Markergene untersucht. Hierzu wurden 40 ng zweier Tbx20 MO (Brown *et al.*, 2005) in eine D2 Blastomere im 8-Zell Stadium injiziert.

Abbildung 54: Tbx20 beeinflusst die Expression verschiedener Herzmarkergene. A. Der Funktionsverlust von Tbx20 resultiert in einer Hemmung der Expression von Nkx2.5, DM-GRASP, TnIc, cActin und Wnt11-R, während die Isl-1 Expression nur in wenigen Embryonen reduziert ist. Control MO-injizierte Embryonen weisen keine Reduktion der getesteten Marker auf. B. Quantitative Auswertung der Ergebnisse aus A. n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Die Fixierung erfolgte in Stadium 28 und im Anschluss daran wurde die Expression der Herzmarkergene Nkx2.5, Isl-1, DM-GRASP, TnIc, cActin und Wnt11-R mittels einer *whole mount in-situ* Hybridisierung visualisiert. In diesem Stadium bewirkte der Funktionsverlust von Tbx20 eine starke Genrepression von Nkx2.5, DM-GRASP, TnIc, cActin und Wnt11-R (Abb. 54A,B), während im Falle von Isl-1 nur bei 19 % der injizierten Embryonen eine Reduktion zu erkennen war (Abb. 54A,B). Im Gegensatz



hierzu zeigten die Control MO-injizierten Embryonen keine Veränderung der Markergenexpressionen.

Abbildung 55: Nkx2.5 reguliert die Expression von Herzmarkergenen.

A. Die Inhibierung von Nkx2.5 führt zur Reduktion der Expression von DM-GRASP, Tbx20 und cActin (Pfeile markieren die injizierte Seite). Uninjizierte Wildtyp-Embryonen zeigen keine Hemmung dieser Marker. B. Statistische Auswertung der Ergebnisse aus A. Der Prozentsatz an Embryonen mit einem Phänotyp steigt mit höher werdender Nkx2.5LP mRNA Dosis. ng = nanogramm; n= Anzahl der unabhängigen Experimente; N= Anzahl der ausgezählten Embryonen; Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler.

Anschließend wurde der Einfluss des Tranksriptionsfaktors Nkx2.5 auf die Expression von Tbx20, TnIc, cActin und DM-GRASP analysiert (Abb. 55). Für den Verlust der Nkx2.5 Funktion wurde ein dominant-negatives Konstrukt (Nkx2.5LP; Grow und Krieg, 1998) verwendet. Dieses Konstrukt enthält ein Prolin- statt eines Leucinrestes zwischen Helix II und III der Homeodomäne, wodurch dessen Fähigkeit, DNA zu binden, gestört wird, während die Fähigkeit zu Protein-Protein Interaktionen aufrecht erhalten bleibt. Durch die

Überexpression des Nkx2.5LP Konstrukts werden wichtige Partnerproteine des endogenen Nkx2.5 zu Komplexen niedriger DNA-Bindungsfähigkeit gebunden und so die Funktion des endogenen Nkx2.5 Proteins gehemmt. Zur Inhibierung der Nkx2.5 Funktion wurden 0,25-1 ng der *in-vitro* synthetisierten Nkx2.5LP mRNA in eine D2 Blastomere von Embryonen im 8-Zell Stadium injiziert. Es zeigte sich, dass die Funktion von Nkx2.5 nötig ist, damit die Gene Tbx20, TnIc, cActin und DM-GRASP exprimiert werden konnten (Abb. 55A); zudem war eine Dosis-abhängige Reduktion der Expressionen zu erkennen (Abb. 55B).

5 Diskussion

Im Gegensatz zum kanonischen Wnt-Signal, welches über β -Catenin vermittelt wird, geschieht die Signaltransduktion im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg unabhängig von β -Catenin. Bekannte nicht-kanonische Signalwege sind der PCP- und der Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Nicht-kanonische Wnt-Signale sind an vielen embryonalen Entwicklungsvorgängen beteiligt (siehe Einleitung). In den folgenden Kapiteln sollen die potentiellen Zielgene Pescadillo, RGM A und DM-GRASP des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs funktionell in Bezug zu bekannten Funktionen des nicht-kanonischen Signalwegs, wie der Augenentwicklung (Cavodeassi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Maurus *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2001), der Neuralleistenwanderung (De Calisto et al., 2005; Garriock und Krieg, 2007) und der Herzentwicklung (Pandur *et al.*, 2002; Garriock *et al.*, 2005), gesetzt werden.

5.1 Die Funktion von Pescadillo, RGM A und DM-GRASP während der anterioren Neuralentwicklung

5.1.1 Pescadillo ist für die Augenentwicklung notwendig

Pescadillo wird ab Stadium 18 in der anterioren Neuralplatte von *Xenopus laevis* exprimiert (siehe Abb. 9). Um die Funktion von Pescadillo während der Entwicklung von *Xenopus laevis* zu ermitteln, wurde daher die Translation von Pescadillo *in-vivo* durch Injektion eines Pescadillo *antisense* Morpholino-Oligonukleotids (Pescadillo MO) inhibiert. Die injizierten Embryonen wiesen einen starken Augendefekt auf der injizierten Seite auf. Die Spezifität des aufgetretenen Phänotyps konnte einerseits durch die Injektion eines Control MO, was nicht zu einem Augendefekt führte, und andererseits durch die Koinjektion eines Pescadillo Konstruktes, was die Revertierung des Augenphänotyps zur Folge hatte, bestätigt werden. Ein weiterer Hinweis für die Spezifität des vom Pescadilloverlust auftretenen Augendefekts zeigte die Markergenanalyse mit Rx, Pax-6 und Otx-2. Rx und Pax-6 sind schon ab Stadium 12-12,5 im anterior gelegenen Augefeld exprimiert und für die frühe Differenzierung der Augenanlage notwendig (Mathers *et al.*,

1997; Hill et al., 1991; Callaerts et al., Chow et al., 1999). Otx-2 hingegen ist erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Entwicklung im Auge exprimiert. Da Pescadillo erst ab Stadium 18 eine spezifische Expression in der anterioren Neuralplatte aufweist, wurde in Stadium 23 die Expression der augenspezifischen Markergene Rx, Pax-6 und Otx-2 nach Funktionsverlust von Pescadillo untersucht. Die Hemmung der Expression von Pescadillo rief eine Reduktion der Expression aller drei Augenmarkergene hervor. Bei den untersuchten Kontrollmarkergenen MyoD (muskelspezifischer Marker) und Emx-1 (Marker für das Vorderhirn) hingegen konnte keine Verminderung der Expression festgestellt werden. Die erzielten Ergebnisse weisen auf eine spezifische Funktion von Pescadillo bei der Augenentwicklung hin. Doch es bleibt weiterhin ungeklärt, ob die Regulation der Augenmarkergene direkt oder indirekt geschieht. Sikorski et al. (2006) zeigten, dass Pescadillo direkt mit der menschlichen Hämoxygenase-1 interagiert, indem Pescadillo an an das Cadmium Response Element innerhalb des Hämoxygenase-1 Promotors bindet. Diese Ergebnisse liefern den ersten Hinweis, dass Pescadillo auch als Transkriptionsfaktor agieren kann. Bei einer erste Überprüfung der -3 kb Region von Rx konnte solch ein Bindemotiv jedoch nicht gefunden werden.

Ein weiterer Beleg für die Spezifität des Phänotyps stellt die evolutionäre Konservierung des Augenphänotyps innerhalb der Vertebraten dar. Auch in *Danio rerio* konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Pescadillofunktion eine Störung in der Augenentwicklung zur Folge hat (Allende *et al.*, 1996).

Zur näheren Analyse des Pescadilloproteins und seinen Domänen während der Augenentwicklung wurden Deletionskonstrukte von Pescadillo angefertigt. Um die Funktion der einzelnen Domänen zu untersuchen, wurden Koinjektionen von Pescadillo MO mit je einem Deletionskonstrukt vorgenommen und der Augenphänotyp ausgewertet. Es zeigte sich, dass das Pescadillo Δ NLS Konstrukt nicht in der Lage ist, den Augenphänotyp zu revertieren, während die Konstrukte Pescadillo Δ SUMO und Pescadillo Δ BRCT den Augenphänotyp retten können. Um diese Beobachtung zu unterlegen, wurden diese koinjizierten Embryonen auf den Augenmarker Rx hin untersucht. Auch auf molekularer Ebene besaßen ausschließlich die Konstrukte Pescadillo Δ SUMO und Pescadillo Δ BRCT die Fähigkeit, die vom Pescadilloverlust ausgelöste Reduktion von Rx zu retten. Somit wurde gezeigt, dass die Lokalisation von Pescadillo im Zellkern von wichtiger Bedeutung für die molekulare und morphologische Entwicklung des Auges in *Xenopus laevis* ist. Experimente in Hefe und anderen Zellkultursystemen veranschaulichten, dass Pescadillo auch in diesen Zellen im Zellkern lokalisiert ist. Dort besitzt Pescadillo wichtige Aufgaben in der Ribosomenbiogenese, der Kontrolle der Zellproliferation, der DNA-Replikation und der Genregulation (Adams *et al.*, 2002; Du and Stillman, 2002; Grimm *et al.*, 2006; Lapik *et al.*, 2004; Lerch-Gaggl *et al.*, 2002; Oeffinger *et al.*, 2002; Sikorski *et al.*, 2006).

Des Weiteren stellte sich Pescadillo als ein wichtiger Zellzyklusregulator heraus (Du und Stillman, 2002; Grimm et al., 2006; Haque et al., 2000; Killian et al., 2004; Kinoshita et al., 2001; Lerch-Gaggl et al., 2002; Maiorana et al., 2004; Oeffinger et al., 2002; Prisco et al., 2004). Um diesen Aspekt in Xenopus laevis während der Augenentwicklung zu analysieren, wurden BrdU- und TUNEL-Experimente gemacht. In unilateral Pescadillo MO injizierten Embryonen, die in Stadium 25 fixiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Proliferation unterdrückt und die Apoptose erhöht wurde. Die Kontrollinjektionen (Control MO) hingegen zeigen diesen Effekt nicht. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Pescadillo an der Verarbeitung der prä-RNA beteiligt ist (Holzel et al., 2005; Lapik et al., 2004). Ein Defekt dieses Prozesses hat eine Störung in der Anordnung der 60S rRNA Untereinheiten zur Folge. Es kommt zur Anhäufung von freien Ribosomen, zur Inhibierung der E3 Ubiquitinligase Mdm2 und schlussendlich zur Akkumulation und Aktivierung von p53 (Dai et al., 2004; Rubbi und Milner, 2003). Die Koinjektion des Pescadillo MO mit dem p53 MO führte zur Revertierung des vom Pescadilloverlust ausgelösten Proliferations- und Apoptosephänotyps. Im Gegensatz hierzu konnte der morphologische Phänotyp durch den p53-Verlust nicht revertiert werden. Dies weist darauf hin, dass der beobachtete Augenphänotyp nach dem Verlust der Pescadillofunktion nicht hauptsächlich auf einer Störung der Proliferation/Apoptose zurückzuführen ist. Auch die "Rescue"-Daten des Proliferationsassays mit den verschiedenen Deletionskonstrukte unterstreichen diese These, da das PescadilloABRCT Konstrukt zwar den molekularen und morphologischen Augenphänotyp, aber nicht den Proliferationsdefekt revertieren kann. Zusammenfassend kann man sagen, dass die BRCT-Domäne von Pescadillo essentiell für die Zellproliferation in Xenopus laevis ist. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die BRCT-Domäne erforderlich für die Funktion von Pescadillo ist. Mutationen in der BRCT-Domäne führen zur Verzögerung im Zellzyklus und ein Fehlen dieser Domäne resultiert in einer Störung der richtigen Lokalisation von Pescadillo innerhalb des Zellkerns (Kinoshita *et al.*, 2001; Lerch-Gaggl *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die BRCT-Domäne für Interaktionen mit Proteinen, die im Zellzyklus eine wichtige Funktion einnehmen, notwendig ist (Sakumoto *et al.*, 2001; Lerch-Gaggl *et al.*, 2007).

Die verschiedenen "Rescue"-Experimente zeigten, dass das PescadilloASUMO-Konstrukt zur Rettung aller untersuchten Phänotypen (Augen-, Rx- und Zellproliferationsphänotyp) befähigt ist. Demnach scheint diese Domäne für die Funktion von Pescadillo in den in dieser Arbeit untersuchten Prozessen bedeutungslos zu sein. Die SUMO-Domäne ist eine Bindungsstelle für SUMO-1. SUMO-1 kann durch eine posttranslationale Modifikation an die SUMO-Domäne von Pescadillo angefügt werden, wobei die Proteingröße von Pescadillo von 72 kDa auf 94 kDa zunimmt (Kinoshita et al., 2001). Die Konsequenzen der Modifikation von Pescadillo durch SUMO-1 sind noch nicht geklärt. Aus vorangegangenen Studien über die Proteinmodifikation durch SUMO-1 ist bekannt, dass Prozesse, wie DNA-Replikation, Transkription, Proteindadurch verschiedene stabilisierung, Protein-Protein-Interaktionen und Transportvporgänge im Zellkern, regulieren werden können (Verger et al., 2002; Johnson, 2004; Hay, 2005). Um aufzuklären, welche Funktion die SUMO-Domäne von Pescadillo hat, ist weitere Forschungarbeit notwendig.

Bei Mäusen führt der Funktionsverlust Pescadillo Tod im von zum Präimplantationsstadium (Lerch-Gaggl et al., 2002). Für diese unterschiedlichen Auswirkungen kann es mehrere Gründe geben. Ein Grund kann darin bestehen, dass im frühen Xenopus laevis und Danio rerio Embryo ein maternaler Depot an Proteinen, Fetten und Ribosomen vorhanden ist, auf die diese Organismen in frühen Embryonalstadien zurückgreifen können, wohingegen dies in der Maus nicht der Fall ist. Zudem handelt es bei der Injektion eines Morpholino-Oligonukleotids um eine "Knock-down"-Studie, d.h., es kommt nicht zu einem völligen Verlust der Genfunktion, sondern ausschließlich zu einer Inhibierung von dieser. So kann durch Injektion verschiedener Konzentrationen die optimale Morpholino-Dosis ermittelt werden, so dass die Embryonen zwar einen Phänotyp aufweisen, jedoch nicht sterben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Xenopus* Pescadillo eine entscheidene Rolle während der Augenenwicklung spielt. Diese Daten unterstützen publizierte Studien, die besagen, dass nicht-kanonische Wnt-Signalwege in der Augenentwicklung eine wichtige Funktion ausüben (Cavodeassi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Maurus *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2001).

5.1.2 RGM A als essentieller Faktor während der anterioren Neuralwicklung von *Xenopus laevis*

Die Expressionsstudie von RGM A zeigte, dass RGM A ab Stadium 12,5-13 in der anterioren Neuralplatte exprimiert ist. Diese Expression zieht sich ab Stadium 14 auf den Bereich des Neuralrohrs zurück.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RGM A für die Augenentwicklung notwendig ist. Die Hemmung der Translation von RGM A durch spezifische antisense Morpholino-Oligonukleotide führt zu einem starken Augendefekt bis hin zum vollständigen Verlust des Auges. Auf molekularer Ebene läßt sich dieser Phänotyp durch den Verlust des Augenmarkergens Rx in Stadium 23 nachweisen. In Stadium 13 war keine Reduktion von Rx zu beobachten. Zudem sind die Gehirnmarker Emx1 (Vorderhirn), En-2 (Mittelhirn-Hinterhin Grenze) und Krox20 (Hinterhirn) in Stadium 23 aufgrund des RGM A Verlustes reduziert. Der Hemmung der RGM A Funktion wirkte sich am stärksten auf die anterior gelegenen Markergene Rx und Emx1 aus, während die Marker En-2 und Krox20 nur mit einem geringen Prozentsatz beeinflusst waren. Dies weist auf die Spezifität des beobachteten Phänotyps hin, da dass Expressionslevel von RGM A im Vorderhirn am stärksten ist. Der morphologische und molekulare Phänotyp konnte durch Injektion zweier verschiedener Morpholino-Oligonukleotide, die an zwei verschiedene ATG-Condons im Abstand von 16 bp binden, nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die Spezifität der verwendeten RGM A Morpholino Oligonukleotide in-vitro (TNT-Experiment) gezeigt werden. Der in-vivo Spezifitätsnachweis durch "Rescue"-Injektionen erwies sich als schwer. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Überexpression von RGM A ebenso zum Augenverlust führte wie der Funktionsverlust von RGM A. Durch das Austitrieren verschiedener Konzentrationen für das RGM A MO als auch der RGM A mRNA konnte der Augendefekt nicht revertiert werden. Zellkulturexperimente zeigten, dass das RGM A2 Protein erst 48 Stunden nach der Transfektion in der Zellmembran eingebaut ist. Möglicherweise liegt der Grund für die fehlgeschlagenen "*Rescue*"-Experimente in der Dauer dieses Einbaus von RGM A2 in die Zellmembran. Insbesondere in frühen Entwicklungsstadien erfolgen die Zellteilungen in *Xenopus* Embryonen sehr rasch (ca. 40 Minuten bei 14 °C), so dass im Falle einer 48-stündigen Sekretionsdauer das RGM A2 Protein nicht rechtzeitig in die Zellmembran gelangen kann, um dort seine Funktion auszuüben. "*Knock-out*"-Studien in der Maus zeigten Defekte in der Schließung des Neuralrohrs und in dorsalen Gehirnstrukuren (Niederkofler *et al.*, 2004), wohingegen jedoch Störungen in der Augenentwicklung nicht beschrieben wurden.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass RGM A verschiedene Funktionen auf die Zellproliferation und -apoptose hat. Im Hühnchen führt die Inhibition von RGM A zum Anstieg der Zellapoptose (Matsunaga und Chédotal, 2004). In der Maus hingegen konnte für den RGM A Funktionsverlust keine Veränderung weder in der Zellproliferation, noch in der -apoptose festgestellt werden (Niederkofler et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Injektion des RGM A Morpholino-Oligonukleotids eine Reduktion auf die Zellproliferation ausübt. Die Zellapoptose ist durch den RGM A Funktionsverlust nur geringfügig beeinträchtigt. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Funtkionen von RGM A in verschiedenen Studien könnte sein, dass das RGM A Signal in verschiedenen Organismen, Geweben und/oder Vorgängen über verschiedene Signalwege vermittelt wird. Zum einen wirkt RGM A als Korezeptor für BMP2 und BMP4, wodurch der bekannte BMP-Signalweg aktiviert wird (Babitt et al., 2005; Xia et al., 2007). Für den BMP-Signalweg wurde gezeigt, dass dieser in neuralem Gewebe, wie Neuralrohr und Vorderhirn, einen Einfluss auf die Zellproliferation und -apoptose ausübt (Liu und Niswander, 2005). Jedoch konnte der BMP-Signalweg bisher noch nicht mit der Funktion von RGM A in der Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. Zum anderen verfügt RGM A über die Fähigkeit, an den Neogeninrezeptor zu binden und so sein Signal an RhoA, Rho-Kinase und PKC und zu übermitteln (Wilson und Key, 2006; Conrad et al., Diese Signalkaskade konnte mit der RGM A Eigenschaft, Axone in ihrer 2007). Wegfindung zu beeinflussen, in Verbindung gebracht werden. Für den Neogeninrezeptor wurde gezeigt, dass die Überexpression von Neogenin Zellapoptose auslöst (Matsunaga und Chédotal, 2004), während die Ko-Überexpression von Neogenin und RGM A eine Reduktion dieser beobachteten Zellapoptose hervorruft. Der Funktionsverlust von RGM A

zeigt zudem einen Anstieg in der Zellapoptose, wohingegen der Verlust von RGM A und Neogenin diese Apoptose blockiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Neogenin als Rezeptor von der RGM A Funktion abhängig ist. Aufgrund dieser komplexen Eigenschaften von RGM A ist weitere Forschungsarbeit nötig, um seine Funktion im Zellzyklus zu klären.

Durch welchen Signalweg wird das RGM A-Signal in Bezug auf die anteriore Neuralentwicklung vermittelt? Zur Aufklärung dieser Frage wurden erste Experimente durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die Expressionsmuster von Neogenin, BMP2 und BMP4 während der Entwicklung von Xenopus laevis aufgenommen (Daten nicht gezeigt; Knöchel et al., 2001). Es zeigte sich, dass Neogenin spezifisch im Auge und Neuralrohr exprimiert ist. BMP-4 wurde ab Stadium 25 im dorsalen Bereich des Auges detektiert, wohingegen BMP-2 keine spezifische Expression im Auge aufwies. Weder für BMP-4, noch für BMP-2 konnte eine Expression im Neuralrohr während der Entwicklung von Xenopus laevis beobachtet werden. Aufgrund der spezifischen Expression von Neogenin im Auge und Neuralrohr wurden "Knock-down"-Studien mit Hilfe eines antisense Morpholino-Oligonukleotids für Neogenin (Wilson und Key, 2006) durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Neogeninverlust eine Störung der Augenentwicklung hervorruft, ebenso wie eine Reduktion der anterioren Neuralmarker Rx, Emx1, En2 und Krox20 (Daten nicht gezeigt). Die Ähnlichkeit der beobachteten Phänotypen für den Neogenin und RGM A Funktionsverlust deuten darauf hin, dass RGM A im anterioren Neuralgewebe sein Signal über den Neogeninrezeptor vermittelt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass RGM A in der anterioren Neuralenwicklung als BMP-Korezeptor wirkt, da insbesondere in der Augenenwicklung das BMP-Signal essentiell ist. Vorangeganene Studien konnten zeigen, dass Faktoren des BMP-Signalwegs an Prozessen wie der Induktion der Linse, der dorso-ventralen Musterung des Auges und der retinotektalen Projektion entscheidend sind (Lang, 2004; Lupo et al., 2006; Behesti et al., 2006; Hocking und McFarlane, 2007).

Wie Pescadillo ist auch RGM A an der Augenentwicklung von *Xenopus laevis* beteiligt und der beobachtete Phänotyp kann mit den bekannten Aufgaben des nicht-kanonischen Wnt-Siganwegs in Bezug gebracht werden.

5.1.3 Pescadillo und RGM A in der Neuralleistenwanderung

Durch Expressionsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Pescadillo ab Stadium 18 in der anterioren Neuralleiste und in Stadium 23 in den wandernden Neuralleistenzellen exprimiert ist. RGM A hingegen konnte ab Stadium 15 ausschließlich im Neurallrohr und ab Stadium 30 in den Branchialbögen visualisiert werden. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Wnt-4 und seine potentiellen Zielgene Pescadillo und RGM A wichtige Faktoren für die Wanderung der kranialen Neuralleistenzellen sind. Im Falle des Funktionsverlusts von Pescadillo spiegelt sich dieser Zellwanderungsdefekt in einer Störung der kranialen Knorpelbildung wider. Erste Beobachtungen weisen darauf hin, dass sowohl die Wnt-4-, als auch die RGM A-defizienten Embryonen einen Defekt in der kranialen Knorpelentwicklung aufweisen (Daten nicht gezeigt). Markerstudien machten deutlich, dass die Inhibierung von Wnt-4, Pescadillo und RGM A keine Auswirkung auf die Induktion der Neuralleisten hat. Ab Stadium 20 (Beginn der Migration der Neuralleistenzellen) bewirkt der Funktionsverlust von Wnt-4, Pescadillo und RGM A eine Störung der Zellmigration, was in späteren Stadien (Stadium 23) ebenso bestätigt werden konnte. Die Neuralleistenzellen akkumulieren an der dorsalen Seite der injizierten Embryonen. Die Ergebnisse für den Verlust von Pescadillo ausschließlich auf die Neuralleistenwanderung passen sehr gut zum örtlichen Expressionmuster von Pescadillo. Zum Zeitpunkt der Neuralleisteninduktion (Stadium 11) ist Pescadillo nicht spezifisch in diesem Gewebe lokalisiert. Kurz vor Beginn der Neuralleistenwanderung in Stadium 18 jedoch kann eine spezifische Expression von Pescadillo im anterioren Nerualgewebe, welches die Neuralleiste einschließt, beobachtet werden. Im Vergleich zu Pescadillo zeigt die Wnt-4 Expression in Stadium 18/19, dass diese direkt neben der Slug Expressionsdomäne angrenzt. Da Wnt-4 ein extrazelluläres Glykoprotein ist, kann es sein Signal als diffusibles Molekül an Nachbarzellen weiterleiten und so die Neuralleistenwanderung beeinflussen. RGM A ist im Zeitraum von Stadium 15 bis 30 ausschließlich im Neurallrohr exprimiert, also ebenso wie Wnt-4 nicht in den Neuralleistenzellen. Doch im Vergleich zu Wnt-4 ist RGM A durch seinen GPI-Anker in der Zellmembran verankert, kann also nicht diffundieren. Die Neuralleisten wandern aus dem dorsalen Neuralrohr in ventrale Richtung u.a. in die Branchialbögen ein (Gilber, 2006). Da Neogenin sowohl im Neuralrohr, als auch in den wandernden Neuralleisten exprimiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass RGM A sein Signal für die Auswanderung der Neuralleistenzellen über Neogenin übermittelt. Eine Inhibierung von RGM A würde diese Signaltransduktion unterbrechen und zu einer Störung der Neuralleistenwanderung führen. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte in Erfahrung gebracht werden, ob auch Neogenin an der Neuralleistenmigration beteiligt ist. Erste Beobachtungen zeigten, dass die Hemmung von Neogenin eine Störung in der kranialen Knorpelbildung zur Folge hat, was auf eine Beeinträchtigung der Neuralleistenentwicklung hindeutet. Doch zur Klärung der genauen Funktion von Neogenin in diesem Prozess sollten weitere Studien gemacht werden, z.B. könnten über eine whole mount in-situ Hybridisierung verschiedene Neuralleistenmarker in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht werden. Auch Überexpressionsstudien von RGM A belegen, dass bei einer Störung der RGM A Funktion die Neuralleistenentwicklung beeinträchigt ist. Die Injektion von einer RGM A mRNA führte zur einer ektopischen Expression von den neuralleistenzellspezifschen Markergenen Slug, FoxD3 in Stadium 17 und 20 und Twist und Krox20 in Stadium 23. Gleichzeitig konnte eine Störung in der Neuralleistenzellmigration auf der injizierten Seite beobachtet werden. Da noch keine Daten über die Folgen einer Überexpression von Neogenin vorliegen, kann dieser Phänotyp noch nicht mit Neogenin als Rezeptor in Verbindung gebracht werden. Studien über den BMP-Signalweg zeigten, dass auch das BMP-Signal notwendig für die Neuralleistenentwicklung ist (Wawersik et el., 2005). Samad et al. (2005) konnten zeigen, dass DRAGON (RGM B) als BMP-Korezeptor fungiert. Die Überexpression von DRAGON zusammen mit Smad1 wirkt verstärkend auf die Expression von endodermalen und mesodermalen Markern. Des Weiteren beobachteten sie, dass die Überexpression von DRAGON in Xenopus laevis Embryonen zum einen Defekt in der Migration der Neuralleistenzellen und zum anderen ektopische Expressionsdomänen von N-Tubulin, einem panneuralen Marker, hervorruft. Dennoch konnten diese beobachteten Phänotypen nicht mit dem BMP-Signalweg in Verbindung gebracht werden. Um die Signalvermittlung von RGM A in der Neuralleistenentwicklung aufzuklären, sind weitere Untersuchungen in der Zukunft notwendig.

Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnten die publizierten Daten verifiziert werden; eine Störung des kanonischen Wnt-Signalwegs, gezeigt durch die Inhibition von Frizzled-3, führt zur Hemmung der Neuralleisteninduktion (Chang und Hemmati-Brevanlou, 1998; Deardorff *et al.*, 2001), während der Funktionsverlust von Faktoren des

nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs, wie Wnt-4, Pescadillo und RGM A, die Wanderung von Neuralleistenzellen beeinträchtigt (De Calisto *et al.*, 2005; Garriock und Krieg, 2007).

5.1.4 RGM A ist notwendig für die Wegfindung von kranialen Nerven

Für Faktoren des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs wurde beschrieben, dass diese an der axonalen Wegfindung und Migration beteiligt sind (Lyuksyutova et al., 2003; Song et al., 2006). Studien in verschiedenen Systemen belegen, dass RGM A eine abstoßende Wirkung auf das Wachstum bzw. auf die Wegfindung neuronaler Zellen besitzt (Brinks et al., 2004; Matsunaga et al., 2006; Monnier et al., 2002; Stahl et al., 1990; Wilson und Key, 2006). Da RGM A die Wanderung der Neuralleistenzellen beeinflusst und die kranialen Nerven u.a. aus Neuralleistenzellen enstehen (Gilbert, 2006; Barlow, 2002), wurde der Einfluss von RGM A auf die Entwicklung der kranialen Nerven untersucht. Hierzu wurden Funktionsverluststudien mit Hilfe des RGM A Morpholino-Oligonukleotids gemacht und die kranialen Nerven über den neurofilamentspezifischen Antikörper 3A10 visualisiert. Die Antikörperfärbung zeigte deutlich, dass der Funktionsverlust von RGM A eine Reduktion des Netzwerks des Nervus trigeminus (kranialer Nerv V) und einen Verlust des Nervus hypoglossus (kranialer Nerv XII) herbeiführt. Erste in-vivo Experimente bewiesen, dass RGM A in Xenopus laevis borealis eine wichtige Funktion in der Wegfindung des supraoptischen Trakts im Vorderhirn besitzt (Wilson und Key, 2006). Im Hühnchen hat die Störung der RGM A Expression eine Störung der retinotectalen Projektion zur Folge (Matsunaga et al., 2006). Die Funktion für RGM A in der Wegfindung der kranialen Nerven anderer Organismen wurde bisher noch nicht beschrieben. Für die Reduktion der Zweige des Nervus trigeminus und Nervus hypoglossus aufgrund des RGM A Verlustes kann es mehrere Gründe geben. Zum einen kann die Störung der Neuralleistenzellwanderung eine mögliche Erklärung dafür sein. Da die kranialen Nerven teilweise aus Neuralleistenzellen gebildet werden, kann eine Beeinträchtigung der Migration der Neuralleistenzellen an den Zielort zu Defekten in der Ausbildung der kranialen Nerven führen. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Expression von RGM A im Gehirn, da die Nuklei der verschiedenen Hirnnerven im Gehirn lokalisiert sind (McDiarmid und Altig, 1999). Ein Verlust der RGM A Funktion könnte eine Störung der Bildung dieser Nuklei zur Folge haben, was sich wiederum auf die Bildung der kranialen Nerven auswirkt.

Weiterhin kann der Effekt von RGM A auf die Hirnnerven auch indirekt geschehen. Die Missbildung der durch die kranialen Nerven innerviete Strukturen wie Auge und kranialer Knorpel kann die Reduktion der Zweige zur Folge haben. Der Nervus hypoglossus innerviert die Zunge (in *Xenopus laevis* nicht vorhanden) und den unteren Kieferknochen. Die Zweige des Nervus trigeminus, Nervus mandibularis (unterer Kieferknochen), Nervus maxilliaris (oberer Kieferknochen) und Nervus ophtalmicus (Auge, Linse), innervieren den Kiefer und das Auge. Da es durch den Funktionsverlust von RGM A zur Störung der Augen- und Knorpelausbildung kommt, kann die Reduktion der kranialen Nerven eine indirekte Folge dessen sein. Da die genaue Auswirkung von RGM A auf die kraniale Knorpelbildung von *Xenopus laevis* noch nicht beschrieben ist, sind Experimente zur Unteruchung der Knorpelstrukturen in Folge des Funktionsverlustes von RGM A notwendig, um die missgebildeten Knorpel mit den innervierenden kranialen Nerven in Verbindung bringen zu können.

5.1.5 DM-GRASP in der anterioren Neuralentwicklung

Die räumliche Expressionsstudie der beiden Pseudoallele von DM-GRASP ergab, dass DM-GRASP I überwiegend in den kranialen Plakoden/Ganglien exprimiert ist, wohingegen DM-GRASP II verstärkt im Auge, Herz und der Nierenanlage detektiert werden konnte. Ob diese unterschiedlichen Expressionmuster von DM-GRASP I und II real oder ob sie auf die unterschiedliche Qualität der verschiedenen *antisense* RNA-Sonden zurückzuführen sind, ist nicht geklärt.

DM-GRASP II zeigt eine spezifische Expression ab Stadium 13 in der anterioren Neuralplatte von *Xenopus laevis*. Aufgrund dieser Expression wurde ein spezifisches *antisense* Morpholino-Oligonukleotid zur Hemmung der DM-GRASP Translation in *Xenopus laevis* Embryonen injiziert und die Entwicklung kranialer Strukturen beobachtet. Der Funktionsverlust von DM-GRASP führte zu einer Störung der Augen- und kranialen Knorpelbildung (Daten nicht gezeigt). Auf molekularer Ebene konnte die Reduktion der augenspezifischer Markergene Rx und Pax-6 weder in Stadium 13, noch in Stadium 23 beobachtet werden. Erste Untersuchungen in der Neuralleistenentwicklung zeigen, dass DM-GRASP keinen Einfluss auf die Induktion, doch eventuell einen Effekt auf die Neuralleistenwanderung ausübt (Daten nicht gezeigt). Um diese Ergebnisse zu

untermauern, sind weitere Experimente erforderlich. In der Literatur wurde für DM-GRASP eine Funktion in der Morphogenese des Auges oder kranialen Knorpels noch nicht beschrieben. Doch es gibt Daten, die belegen, dass DM-GRASP ein essentieller Faktor im Prozess der axonalen Wegfindung ist (Boschert *et al.*, 1993; Kanki *et al.*, 1994; Ott *et al.*, 1998; Avci *et al.*, 2004; Weiner *et al.*, 2004). Ob DM-GRASP auch in *Xenopus laevis* solch eine Funktion erfüllt, sollte in der Zukunft analysiert werden.

Eine weitere Expressionsdomäne von DM-GRASP stellen die kranialen Plakoden und Ganglien dar. Aufgrund dieser spezifischen Expression wurde der Einfluss des DM-GRASP Funkionsverlusts auf die Expression verschiedener plakodenspezifischer Markergene über eine *whole mount in-situ* Hybridisierung getestet. Erste Daten zeigten, dass die Injektion des DM-GRASP Morpholino-Oligonukleotids keine Einfluss auf die Expression der Plakodenmarker Six1 und Six2 besitzt (Daten nicht gezeigt). Um eine mögliche Funktion von DM-GRASP auf die Entwicklung der kranialen Plakoden näher zu analysieren, sind weitere Experimente erforderlich.

5.1.6 Pescadillo, RGM A und DM-GRASP als potentielle Wnt-4 Zielgene

Pescadillo und RGM A wurden als potentielle Wnt-4 Zielgene identifiziert (Maurus *et al.*, 2005). Die Daten dieser Arbeit unterstützen diese Beobachtung, da der Funktionsverlust von Wnt-4, als auch der von Frizzled-3, eine Reduktion der Pescadilloexpression sowohl im Auge, als auch in den auswandernden Neuralleistenzellen in Stadium 23 hervorruft. Für RGM A konnte dies in Stadium 13 bislang nicht gezeigt werden. Da der Funktionsverlust von Wnt-4 zu einer Reduktion des RGM A Expressionsniveau (RT-PCR) in *Xenopus laevis* Embryonen in Stadium 20 bewirkt (Maurus, 2004), sollte dieses Experiment zu einem späteren Entwicklungsstadium wiederholt werden. Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten für Pescadillo und DM-GRASP in Bezug auf die Augen- und Neuralleisten-entwicklung stehen im Einklang mit den veröffentlichten Beobachtungen. Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, bewirkt eine Hemmung des nicht-kanonischen Wnt-Signals eine Störung der Augenentwicklung (Cavodeassi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Maurus *et al.*, 2005; Garriock und Krieg, 2007).

DM-GRASP wurde als nicht-kanonisches Wnt-Zielgen identifiziert (Prieve und Moon, 2003). Doch ist DM-GRASP auch ein Zielgen von Wnt-4? Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein spezifisches Wnt-4 Morpholino-Oligonukleotid in *Xenopus laevis* Embryonen injiziert und eine *whole mount in-situ* Hybridisierung gegen DM-GRASP gemacht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Wnt-4 Translation zu einem Verlust der DM-GRASP Expression in der anterioren Neuralplatte in Stadium 13 führt. Ob es sich hierbei um einen direkten oder indirekten Einfluss handelt, ist noch nicht geklärt, doch die Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass DM-GRASP von der Wnt-4 Funktion abhängig ist.

Ob diese drei untersuchten Gene direkte oder indirekte Zielgene des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs sind, bleibt weiterhin ungeklärt. Im Falle der direkten Regulation würde der jeweilige Wnt-Faktor einen der bekannten, nicht-kanonischen Signalwege aktivieren, wodurch es zur Transkription des Zielgens käme. Bei der indirekten Regulation könnten weitere Faktoren/Signalwege zwischengeschaltet sein. Um dies aufzuklären, sind weitere Experimente nötig.

5.2 Die Rolle von DM-GRASP in der Herzentwicklung

DM-GRASP Da verstärkt im kardialen Gewebe exprimiert wurden ist, Funktionsverluststudien durchgeführt. Diese Experimente zeigen, dass DM-GRASP notwendig für die normale Herzentwicklung in Xenopus laevis ist. Die Injektion des DM-GRASP antisense Morpholino-Oligonukleotids führte zu einem morphologischen Herzphänotyp. Insbesondere der Prozess der Schleifenbildung konnte nicht abgeschlossen werden. Ob die Aufgabe von DM-GRASP in der Herzentwicklung innerhalb verschiedener Organismen konserviert ist, ist noch unbekannt. Aus Studien in Danio rerio ist bekannt, dass DM-GRASP in den Kompartimenten Atrium und Ventrikel des Herzens exprimiert ist (Schilling et al., 1999). Experimente, in denen die Funktion von DM-GRASP während der Herzentwicklung untersucht wurde, sind noch nicht bekannt. In anderen Organismen, wie Maus und Hühnchen, wurde bisher weder die Expression, noch eine mögliche Aufgabe von DM-GRASP während der kardialen Entwicklung beschrieben. Erste Beobachtungen in der Maus zeigten jedoch, dass DM-GRASP ab dem Embryonaltag 9,5 in kardialen Gewebe

143

lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Somit ist eine mögliche Funktion von DM-GRASP in der Herzentwicklung der Maus nicht ausgeschlossen.

In weiteren Experimenten wurde analysiert, worin die Ursache des morphologischen Herzphänotyps des DM-GRASP Funktionsverlusts liegt. Zunächst wurde der Einfluss von DM-GRASP auf molekularer Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass DM-GRASP die herzspezifischen Marker Tbx20, TnIc, cActin und Wnt11-R in Stadium 28 reguliert, wohingegen die Expression von Tbx20, Nkx2.5 und Isl-1 in Stadium 20 durch den Funktionsverlust von DM-GRASP nicht beeinträchtigt wird. Diese Daten passen zum Expressionsmuster von DM-GRASP II, da DM-GRASP erst ab Stadium 25-27 im kardialen Gewebe visualisiert werden konnte. Die Spezifität des beobachteten Markerphänotyps konnte durch "Rescue"-Experimente bestätigt werden. Wie diese Regulation der Herzmarkergene vonstatten geht, ist noch ungeklärt. DM-GRASP gehört der Familie neuronaler Zelladhäsionsmoleküle an. Neben ihrer adhäsiven Eigenschaften kann die Bindung von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen auch die Weiterleitung von intrazllulären Signalen bewirken. Es ist bekannt, dass sie auch an Entwicklungsprozesse wie Zellmigration, -proliferartion und -differenzierung beteiligt sind (Crossin und Krushel, 2000). Die Bindung von N-CAM (neural cell adhesion molecule) an Zellen führt zur Aktivierung zahlreicher Signalwege, von denen einige in der Regulation von Genen enden. Ob dies auf den Einfluss von DM-GRASP auf die Regulation später Herzmarkergene zutrifft, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Der Funktionsverlust von DM-GRASP resultiert in einem Verlust der Wnt11-R Expression in Stadium 28. Eine Studie über das Xenopus Wnt11-R veranschaulichte, dass Wnt11-R an der Morphogenese der Herzens beteiligt ist (Garriock et al., 2005). Dieser Effekt beruhte nicht auf einer Veränderung der Expression herzspezifischer Markergene, sondern auf dem Verlust der Adhäsion myokardialer Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von JNK eine dem Wnt11-R ähnliche Funktion auf die Herzentwicklung ausübt und Wnt11-R die Aktivierung von JNK unterstützt. Vorangegangene Studien erbrachten den Hinweis, dass Zelladhäsionsmoleküle wichtige Aufgaben in der Herzentwicklung besitzen. Für einige Zelloberflächenproteine wurde gezeigt, dass sie für die Struktur und Kommunikation der Zellen verantwortlich sind (Li et al., 2006). Eines dieser Faktoren ist N-Cadherin, ein Ca²⁺-abhängiges Transmembran-Adhäsionsprotein, welches den Zellkontakt von Kardiomyozyten vermittelt (Zuppinger et al., 2000). Damit Kardiomyozyten ihre Aufgaben erfüllen können, ist die Kommunikation zwischen den Zellen unerlässlich. Dies wird u.a. über *Gap Junction* (Zell-Zell-Kanäle) und Desmosmen vermittelt (Li *et al.*, 2006). Untersuchungen erbrachten, dass der Funktionsverlust von N-Cadherin zu einer Inhibierung der Connexinexpression führt, was eine Störung der Stabilisation von *Gap Junctions* mit sich bringt (Li et al., 2000). Toyofuku *et al.* (2000) beobachteten, dass auch Wnt-Faktoren an der Adhäsion myokardialer Zellen beteiligt sind. Sie zeigten, dass der Wnt-Frizzled-2-Signalweg an der morphologischen Anordnung von Kardiomyozyten beteiligt ist, indem Cadherin- β -Catenin-Komplexe stabilisiert werden. Ob DM-GRASP ebenso an der Aufrechterhaltung der Zelladhäsion myokardialer Zellen beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

5.2.1 DM-GRASP in Bezug auf nicht-kanonische Wnt-Signalwege

Da DM-GRASP als potentielles Zielgen des nicht-kanonische Wnt-Signalwegs isoliert wurde (Prieve und Moon, 2003), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die DM-GRASP Expression durch den Funktionsverlust von Wnt-11 oder Wnt11-R beeinträchtigt ist. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Wnt-11 und Wnt11-R wichtige Aufgaben während der Herzentwicklung von Xenopus laevis haben. Während Wnt-11 eine essentielle Funktion in der Herzspezifizierung und -morphogenese hat (Pandur et al., 2002), beeinträchtigt Wnt11-R ausschließlich die Morphogenese des Herzens (Garriock et al., 2005). Unilateral dnWnt-11 mRNA injizierte Embryonen zeigten eine Reduktion der Expression von sowohl DM-GRASP als auch Wnt11-R auf der injizierten Seite. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Wnt-11 in der Abfolge von Signalen zeitlich früher als DM-GRASP und Wnt11-R aktiv ist und diese, ob direkt oder indirekt, reguliert. Die Hemmung der Wnt11-R Translation führte nur zu einem geringen Verlust der DM-GRASP Expression (28%), während der Funktionsverlust von DM-GRASP zu einer massiven Inhibierung der Wnt11-R Expression führte (65%). Somit scheint DM-GRASP im kardialen Netzwerk von Signalmolekülen zeitlich vor Wnt11-R angeschaltet zu sein. Zur Beantwortung der Frage, ob diese Regulationen direkt oder indirekt geschehen, muss mit Hilfe weiterer Experimente in Erfahrung gebracht werden.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, in welchen nicht-kanonischen Wnt-Signalweg DM-GRASP in seiner Funktion, die Herzentwichlung zu beeinflussen, involviert ist. Während

der Herzentwicklung wird das nicht-kanonische Wnt-Signal zum Teil durch den JNK (Jun-N-terminal kinase)-Signalweg vermittelt (Pandur et al., 2002; Tada et al., 2002, Garriock et al., 2005). Pandur et al. (2002) zeigten, dass Wnt-11 in der Lage ist, das β-Catenin Signal zu hemmen, während der PCP/JNK-Signalweg aktiviert wird. Andere Arbeiten zeigten (Garriock et al., 2005), dass Wnt11-R in der Lage ist, JNK zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. In dieser Arbeit wurde zudem die JNK-Funktion während der Herzentwicklung von X. laevis dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass JNK im Myokardium exprimiert wird und der Verlust dieses Faktors zu einer Störung der Zelladhäsion im Myokardium führt. Da die DM-GRASP Expression von der Wnt-11 Aktivität abhängt und DM-GRASP für die Wnt11-R Expression nötig ist, wurde in dieser Arbeit analysiert, ob die Aktivität von JNK für die DM-GRASP Expression notwendig ist. Um die Aktivität von JNK zu hemmen, wurde der chemische Inhibitor SP600125 verwendet (Bennet et al., 2001). Die Inhibierung von JNK jedoch führte nicht zum Verlust der DM-GRASP Expression, was den Schluss zulässt, dass DM-GRASP nicht von JNK reguliert wird. Da in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden konnte, an welchem nichtkanonischen Wnt-Signalweg DM-GRASP beteiligt ist, müssen zur Aufklärung dieser Frage weitere Experimente durchgeführt werden.

5.2.2 Einbindung von DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markergene

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, DM-GRASP in das Netzwerk kardialer Markergene einzubringen. Hierzu wurden Funktionsverluststudien in Stadium 28 durchgeführt, um zu analysieren, wie die Herzmarkergene sich untereinander regulieren. Hierzu wurden zunächst die Expressionsprofile wichtiger Herzmarkergene während der Embryonalentwicklung von Xenopus laevis mit der Expression von DM-GRASP verglichen. Durch Zellschicksalskartierungen konnte gezeigt werden, dass kardiale Progenitorzellen aus der dorsalen Marginalzone des frühen Xenopus Embryos hervorgehen (Moody, 1987). Zu Beginn der Neurulation befinden ich die beiden primären Herzfelder im anterioren Mesoderm an den Rändern der Neuralplatte. Während der Neurulation wandern diese in Richtung ventraler Mittellinie, wo sie in Stadium 16-19 fusionieren (Kolker et al., 2000; Mohun et al., 2003). Markergene, die in Stadium 20 in diesen fusionierten Herzprimordien exprimiert sind, sind u.a. Nkx2.5, Tbx20 und Isl-1; DM- GRASP ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht im kardialen Gewebe zu beobachten (Abb. 56). Ab Stadium 28 beginnt die Bildung des linearen Herzschlauchs, welche in Stadium 32/33 abgeschlossen ist. Zu diesem Stadium beginnt der Prozess der Schleifenbildung, der in Stadium 36 vollzogen ist. Die kardialen Vorläuferzellen, die den linearen Herzschlauch bilden, stammen urprünglich aus der kardialen Leiste, dem sogenannten primären Herzfeld. Um das reife Herz zu formen, muss der lineare Herzschlauch durch Zellteilung und -verdickung expandieren. Im Hühnchen und der Maus konnte gezeigt werden, dass nach der Bildung des linearen Herzschlauches zusätzliche Zellen in das Herz eingebracht werden (Buckingham et al., 2005; Kelly, 2005; Moorman et al., 2007). Diese Zellen stammen aus dem sogenannten sekundären Herzfeld. Der LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktor Isl-1 wurde vor wenigen Jahren als ein Markergen für dieses sekundäre Herzfeld beschrieben (Yuan und Schoenwolf, 2000; Kelly et al., 2001; Cai et al., 2003; Brade, 2007). Isl-1 wird auch als pankardialer Markergen betrachtet (Prall et al., 2007), doch dies ist noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. In Stadium 29 zeichnet sich ab, dass DM-GRASP, wie auch Nkx2.5, Tbx20 und TnIc in den beiden Herzfeldern, die den linearen Herzschlauch bilden, exprimiert sind (primäres Herzfeld; Abb. 56). Im Vergleich dazu ist die Isl-1 Expression zusätzlich weiter anterior zu beobachten, dem sogennanten sekundären Herzfeld (Abb. 55; Brade, 2007). Die Analyse Herzmarkergene nach Funktionsverlust von DM-GRASP in Stadium 28 der veranschaulicht, dass DM-GRASP, passend zu seiner Expression im primären Herzfeld, ausschließlich jene Herzmarker reguliert, die in diesem Herfeld exprimiert sind. Die Isl-1 Expression hingegen wurde durch den DM-GRASP Funktionsverlust nicht beeinträchtigt. In Stadium 20 hat der DM-GRASP Funktionsverlust keinen Einfluss auf die Expression von Nkx2.5, Isl-1 und Tbx20. DM-GRASP ist demnach an der Aufrechterhaltung der kardialen Identität im primären Herzfeld notwendig.

Die weitere Auswertung ergab, dass der Funktionsverlust der früh exprimierten Herzmarker wie Isl-1, Tbx20 und Nkx2.5 die Expression der sowohl frühen, als auch späten Herzmarker inhibiert (Brade, 2007; Grow und Krieg, 1998). Demzufolge sind diese Gene an der Regulation früher Spezifizierungsmarker beteiligt. Die Tbx20 MO injizierten Embryonen zeigten keine Reduktion der Isl-1 Expression, was vielleicht mit der Expression beider Gene zusammenhängt.



Abbildung 56: Schematische Darstellung der Expression verschiedener Herzmarkergene. In Stadium 20 sind Isl-1, Nkx2.5 und Tbx20 in den kardialen Progenitorzellen exprimiert (lila). In Stadium 28 kann Isl-1 im sekundären Herzfeld (rot) visualisiert werden; Nkx2.5, Tbx20, TnIc, Wnt11-R und DM-GRASP sind im primären Herzfeld zu beobachten.

In Stadium 29 ist Tbx20 ausschließlich im primären Herzfeld exprimiert und hat demzufolge keinen Effekt auf die Isl-1 Expression, da Isl-1 im sekundären Herzfeld exprimiert ist. Die Hemmung von Wnt11-R, welches erst ab Stadium 27 im Herzen exprimiert ist, führte zur Inhibierung von spät exprimierten Herzmarkergenen, von welchen DM-GRASP jedoch am schwächsten betroffen war. Wie DM-GRASP ist Wnt11-R somit an der Aufrechterhaltung der Expression kardialer Marker beteiligt.

Abschließend kann man sagen, dass DM-GRASP als potentielles Zielgen des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs ein essentieller Faktor für die Herzentwicklung von *Xenopus laevis* ist und dass diese Funktion zu den schon bekannten Aufgaben des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs in der Herzentwicklung passt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die potentiellen Zielgene Pescadillo, RGM A und DM-GRASP des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs während der Embryogenese von *Xenopus laevis* untersucht und deren Funktion in Bezug zu bekannten Aufgaben des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs gesetzt.

Die gewebsspezifische Expression von Pescadillo beginnt in Stadium 18. Ab diesem Zeitpunkt beschränkt sich das Expressionsmuster auf die anteriore Neuralplatte; in Stadium 25 beschränkt sich die Expression von Pescadillo auf Auge und wandernde Neuralleistenzellen. Bei Funktionsverlust von Pescadillo durch Injektion eines sequenzspezifischen *antisense* Morpholino-Oligonukleotids kommt es zur Störung der Augenentwicklung und kranialen Knorpelbildung auf der injizierten Körperseite. Des Weiteren führt die Injektion des Pescadillo Morpholino-Oligonukleotids zu einer spezifischen Repression von Augenmarkergenen und zur Inhibition der Neuralleistenwanderung. TUNEL- und BrdU-Experimente zeigten, dass Pescadillo im Zusammenspiel mit p53 an der Regulation der Zellproliferation und -apoptose beteiligt ist.

Die RGM A Expression beginnt ab Stadium 12,5/13 in der anterioren Neuralplatte von *Xenopus laevis.* Sowohl Funktionsverlust-, als auch Überexpressionsstudien zeigen, dass RGM A an der Augenentwicklung und Neuralleistenwanderung beteiligt ist. Auf molekularer Ebene führt sowohl der Funktionsverlust-, als auch die Überexpression von RGM A zu einer Inhibibierung von anterioren Neuralmarkern auf der injizierten Seite. Zudem kann in RGM A Morpholino-Oligonukleotid- bzw. RGM A mRNA-injizierten Embryonen eine Störung der Neuralleistenwanderung festgestellt werden. Die Überexpression von RGM A resultiert zusätzlich in einer ektopischen Expression von neuralleistenspezifischen Markern. Die beobachteten Funktionen von Pescadillo und RGM A während der embryonalen Entwicklung stimmen mit den bekannten Aufgaben des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs während der Augenentwicklung und Neuralleistenzell-wanderung überein.

DM-GRASP kann ab Stadium 25 im kardialen Gewebe von *Xenopus laevis* visualisiert werden. Die Funktion von DM-GRASP wurde mittels Injektion eines sequenzspezifischen *antisense* Morpholino-Oligonukleotids untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass der Verlust der DM-GRASP Funktion zu einem morphologischen Herzphänotyp führt. Auf

molekularer Ebene kann eine Repression später herzspezifischer Markergene beobachtet werden. Aus weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass DM-GRASP Teil des komplexen Netzwerks an Regulatoren ist, die für die normale Herzentwicklung notwendig sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der schon bekannten Aufgabe des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs in der Herzentwicklung.

7 Summary

This work describes the investigation of the potential target genes Pescadillo, RGM A and DM-GRASP of non-canonical Wnt-signaling pathway during embryogenesis of *Xenopus laevis*.

The gene Pescadillo is expressed in the anterior nerual plate at stage 18. At stage 23 Pescadillo is visualized in the eye and migrating neural crest cells. Knock-down of pescadillo function by a specific antisense morpholino moligonucleotide results in an eye and cartilage phenotype. Injection of the Pescadillo morpholino leads to a repression of eye specific marker genes and to impaired expression of neural crest cell markers. BrdU incorporation and TUNEL assays indicate that a loss of pescadillo function affects proliferation and triggers apoptosis through a p53 mediated mechanism.

The specific RGM A expression starts at stage 12.5/13 in the anterior neural plate. The downregulation as well as the overexpression of RGM A results in defects of eye and neural crest cell development. Loss and gain of RGM A function also leads to a repression of anterior neural maker genes. Loss and gain of function analysis suggest that RGM A is involved in neural crest cell migration. Overexpression of RGM A mRNA additional leads to an ectopic expression of neural crest cell marker genes. These data are in full agreement with previous observations that non-canonical Wnt signaling is required for proper eye development as well as neural crest migration.

At stage 25 DM-GRASP starts to express in the cardiac tissue of *Xenopus laevis*. Repression of DM-GRASP expression by injection of a DM-GRASP specific antisense morpholino oligonucleotide results in a morphological heart phenotype. Whole mount insitu hybridization exhibits the requirement of DM-GRASP function for the expression of late cardiac marker genes. Further experiments show that DM-GRASP is part of the regulatory network which is essential for the normal development. These results fit to the known function of the non-canonical Wnt-signal in heart development.

7 Literatur

Adams CC, Jakovljevic J, Roman J, Harnpicharnchai P, Woolford JL Jr: Saccharomyces cerevisiae nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. RNA 2002; 8:150-65.

Allende M, Amsterdam A, Becker T, Kawakami K, Gaiano N, Hopkins N: Insertional mutagenesis in zebrafish identifies tow novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. Genes & Development. 1996; 10: 3141-3155.

Amzel LM, Poljak RJ: Three-dimensional structure of immunglobulins. Ann. Rev. Biochem. 1997; 48:961-97.

Avic HX, Zelina P, Thelen K, Pollerberg GE: Role of cell adhesion molecule DM-GRASP in growth and orientation of retinal ganglion cell axons. Dev. Biol. 2004; 291:291-305.

Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, Schneyer AL, Woolff CJ, Lin HY: Repulsive guidance molecule (RGMa), a Dragon homologue, is a bone morphogenetic protein coreceptor. J. Biol. Chem. 2005; 280:29820-27.

Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolff CJ, Andrews NC, Lin HY: Bone morphogenetic protein signalling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. Nat. Genet. 2006; 38:531-39.

Barlow LA: Cranial Nerve Development: Placodal Neurons Ride the Crest. Curr. Biol. 2002; 12:R171-73.

Behesti H, Holt JK, Sowden LC: The level of BMP4 signaling is critical for the regulation of distinct T-box gene expression domains and growth along the dorso-ventral axis of the optic cup. BMC Dev. Biol. 2006; 15:6-62.

Bennet BL, Sasaki DT, Murray BW, O`Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW: SP600125, an antrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98:13681-86.

Birnboim H, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. 1979; 7:1513-23.

Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M: Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathway in planar polarity and wingless siganling. Cell 1998; 94:109-18.

Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV: A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell-cycle checkpoint proteins. FASEB J. 1997:11: 68-76.

Boschert U, RaMO RG, Tix S, Technau GM, Fischbach KF: Genetic and developmental analysis of irreC, a genetic function required for optic chiasm formation in Drosophila. J. Neurogenet. 1990; 6:263.

Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U, Haynes BF, Aruffo A: Cloning, mapping, and characterizatin of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. J. Exp. Med. 1995; 181:2213-2220.

Bowen MA, Bajorath J, D'Egidio M, Whitney GS, Palmer D, Kobarg J, Starling GC, Siadak AW, Aruffo A: Characterization of mouse ALCAM (CD166): the CD6-binding domain is conserved in different homologs and mediates cross-species binding. Eur. J. Immunol. 1997; 27:1469-78.

Brade T:

Untersuchung zur Bedeutung von Xenopus Islet-1 während der kardiovaskulären Entwicklung von Xenopus laevis. Dissertation 2007, Universität Ulm.

Bradley LC, Snape A, Bhatt S, Wilkinson DG: The structure and expression of the Xenopus Krox-20 gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. Mech. Dev. 1993; 40:73-84.

Brinks H, Conrad S, Vogt J, Oldekamp J, Sierra A, Deitinghoff L, Bechmann I, Alvarez-Bolado G, Heimrich B, Monnier PP, Mueller BK, Skutella T: The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus. J. Neurosci. 2004; 24:3862-69.

Brown DD, Binder O, Pagratis M, Parr BA, Conlon FL: Developmental expression of the Xenopus laevis Tbx20 orthologue. Dev. Genes Evol. 2003; 212:604-07.

Brown DD, Martz SN, Binder O, Goetz SC, Price BM, Smith JC, Conlon FL: Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. Development 2005, 132:553-63.

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S: Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nat. Rev. Genet. 2005; 6:826-35.

Burns FR, von Kannen S, Guy L, Raper JA, Kamholz J, Chang S: DM-GRASP, a novel immunglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. Neuron 1991; 7:209-20.

Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, Phillips RG, Lawrence PA: Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. Cell. 1987; 50:659-63.

Cai CL, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S: Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentation and contributes a majority of cells to the heart. Dev. Cell 2003; 5:877-89.

Cavodeassi F, Carreira-Barbosa F, Young RM, Concha ML, Allende ML, Houart C, Tada M, Wilson SW: Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway. Neuron 2005; 47:43-56.

Callaerts P, Halder G, Gehring WJ: Pax-6 in development and evolution. Annu Rev Neurosci. 1997; 20: 483-532.

Callebaut I, Mornon JP: From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closly associated with DNA repair. FEBS Lett. 1997; 400: 25-30

Calvin NM, Hanawalt PC: High-effficiency transformation of bacterial cells by electroporation. J. Bacteriol. 1988; 170: 2796-801.

Cleaver OB, Patterson KD, Krieg PA: Overexpression of tinman-*related* genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in *Xenopus* embryos results in myocaridal hyperplasia. Development 1996; 122:3549-56.

Chang C, Hemmati-Brivanlou A: Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. Dev. Biol. 1998; 194:129-34.

Chow RL, Altmann CR, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A: Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. Develpoment. 1999; 126: 4213-22.

Church VL, Francis-West P: Wnt signalling during limb development. Int. J. Dec. Biol. 2002; 46:927-36.

Cole SJ, Bradford D, Cooper HM: Neogenin: A multi-functional receptor regulating diverse developmental processes. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2006.

Collier S, Gubb D: *Drosophila* tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the *fuzzy* gene, which encodes a novel transmembrane protein. Development 1997; 124: 4029-37.

Conrad S, Genth H, Hofmann F, Just I, Skutella T: Neogenin-RGMa signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-idependent and involves Rho, ROCK, and PKC. J. Biol. Chem. 2007; 282:16423-33.

Corbel C, Pourquié O, Cormier F, Vaigot P, Le Douarin NM: BEN/SC1/DM-GRASP, a homophilic adhesion molecule, is required for *in vitro* myeloid colony formation by avian hemopoietic progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93:2844-49.

Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Insinga A, Imbriano C, Piccolo S: Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. Cell 2003; 113:301-314.

Corset V, Nguyen-Ba-Carvet KT, Forcet C, Moyse E, Cédothal A, Mehlen P: Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. Nature 2000; 407:747-50.

Crossin KL, Krushel LA: Cellular Signaling by Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily. Dev. Dyn. 2000; 218:260-79.

Dai MS, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L, Lu H: Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. Mol. Cell Biol. 2004; 24:7654-68.

Dale L, Slack JM: Fate map for the 32-cell stage of Xenopus laevis. Development 1987; 527-51.

Deardorff MA, Tan C, Saint-Jeannet JP, Klein PS: A role for frizzled 3 in neural crest development. Development 2001; 128:3655-63.

De Bernardo AP, Chang S: Native and recombinant DM-GRASP selectively support neurite extension from neurons that express GRASP. Dev. Biol. 1995; 169:65-75.

De Bernardo AP, Chang S: Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. J. Cell Biol. 1996; 133:657-66.

De Calisto J, Araya C, Marchant, L., Riaz, C. F., and Mayor, R.: Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. Development 2005; 132:2587-2597.

Degen WG, van Kempen LC, Gijzen EG, van Groningen JJ, van Kooyk Y, Bloemers HP, Swart GW: MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leucocyte cell adhesion molecule). Am. J. Pathol. 1998; 152:805-813.

Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL: Mef2 is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. Development 2004; 131:3931-42.

Dominguez I, Itoh K, Sokol SY: Role gycogen synthase kinase 3 beta as na negative regulator of dosro-ventral axis formation in *Xenopus* embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995; USA 92:8498-502.

Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT: Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. Mol Cell Biol., 1995; 15:2625-34.

Du YC, Stillman B: Yph1p, an ORC-interacting protein: potential link between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. Cell. 2002; 109: 835-48.

Eaton S: Planar polarization of Drosophila and vertebrate epithelia. Curr. Opin. Cell Biol., 1997; 9:860-66.

Eickbush TH, Moudrianaki N: The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. Cell 1978; 13: 295-306.

El-Deeb, Thompson SC, Covault J: Characterization of a cell surface adhesion molecule expressed by a subset of developing chick neurons. Dev. Biol. 1992; 149(1):213-27.

Fashena D, Westerflield M: Secondary motoneuron axons localize DM-GRASP on their fasciculated segments. J. Comp. Neurol. 1999; 406:415-424.

Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P: Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. Nature 2002; 417:443-47.

Fraboulet S, Schmidt-Petrib T, Dhouaillya D, Pourquie O: Expression of DM-GRASP/BEN in the developing mouse spinal cord and various epithelia. Mech. Dev. 2000; 95:221-24.

Geiduschek EP, Gray I: Non-aqueous solution of sodium deoxyribose-nucleate. J. Am. Chem. Soc. 1956; 78: 879-80.

Garriock RJ, D'Agostino SL, Pilcher KC, Krieg P.A.: Wnt11-R, a protein closlely related to mammalian Wnt11, is required for heart morphogenesis. Dev. Biol. 2005; 279:179-92.

Garriock RJ, Krieg P.A.: Wnt11-R signaling regulates a calcium sensitive EMT event essential for dorsal fin development of Xenopus. Dev. Biol. 2007; 304:127-40.

Gessert S: Isolierung und Charakterisierung von *Xenopus laevis* Pescadillo. Diplomarbeit 2004, Universität Ulm.

Gilbert SF: Development Biology.6. Auflage. 2006. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Goodyear DJ, Kwan T, Oh SH, Raphael Y, Richardson GP: The cell adhesion molecule BEN defines a prosensory patch in the developing avian otocyst. J. Com. Neurol.2001; 434(3):275-88.

Grimm T, Holzel M, RohrMOer M, Harasim T, Malamoussi A, Gruber-Eber A, Kremmer E, Eick D: Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. Nucleic Acids Res. 2006; 34:3030-43.

Grow MW, Krieg PA: Tinman function is essential for vertebrate heart development: elimination of cardiac differentiation by dominant inhibitory mutants of the tinman-related genes, XNkx2-3 and XNkx2-5. Dev. Biol. 1998;204:187-96.

Guger KA, Gumbiner BM: beta-Catenin has a Wnt-like activity and mimics the Niewkoop siganling center in *Xenopus* dorsal-ventrak patterning. Dev. Biol. 1995; 172:115-25.

Habas R, Dawid IB, He X: Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. Genes Dev. 2003; 17:295-309.

Hall A: Rho GTPases and the actin cytosceleton. Science 1998; 279:509-15.

Haque J, Boger S, Li J, Duncan SA: The murine Pes1 gene encodes a nuclear protein containing a BRCT domain. Genomics 2000; 70:201-10.

Hardcastle Z, Papalopulu N: Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate. Development. 2000; 127: 1303-14.

Hartmann C, Tabin CJ: Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. Development 2000; 127:3141-59.

Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, Doya H, Saito T, Yamabishi S, Mueller BK, Yamashita T: RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. J. Cell Biol. 2006; 173:47-58.

Hay RT: SUMO: a history of modification. Mol. Cell 2005; 18:1-12.

He X, Saint JJ, Woodgett JR, Varmus HE, Dawid IB: Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in Xenopus embryos. Nature 1995; 374:617-22

Heasmann J: Morpholino oligos: making sense of antisense? Dev Biol. 2000; 243: 209-14.

Heffron DS, Golden JA: DM-GRASP is necessary for nonradial cell migration during chick diencephalic development. J. Neurosci. 2000; 20:2287-94.

Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW: Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. Nature 2000; 405:76-81.

Hensey C, Gautier J: Developmental regulation of induced and programmed cell death in Xenopus embryos. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999; 887:105-119.

Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V: Mouse small eye results from mutations in a paired-like homebox-containing gene. Nature. 1991; 354: 522-5.

Hocking JC, McFarlane S: Expression of Bmp ligands and receptors in the developing Xenopus retina. Int. J. Dev. Biol. 2007; 51:161-5.

Holzel M, RohrMOer M, Schlee M, Grimm T, Harasim T, Malamoussi A, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hiddemann W, Bornkamm GW, Eick D Mammalian: WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. J. Cell Biol. 2005; 170:367-78.

Hunkapiller T, Hood, L: Diversity of the immunoglobulins through evolution. Adv. Immunol. 1989; 44:1-63.

Johnson ES: Protein modification by SUMO. Annu. Rev. Biochem. 2004; 73:355-82.

Kanki JP, Chang S, Kuwada JY: The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse. PMID 1994; 25: 831-45.

Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME: The aterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. Dev. Biol. 2001; 1:435-40.

Kelly RG: Molecular inroads into the anterior heart field. Trends Cardiovasc. Med. 2005; 15:51-56.

Killian A, Le Meur N, Sesboue R, Bourguignon J, Bougeard G, Gautherot J, Bastard C, Frebourg T, Flaman JM: Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chroMOomal instability. Oncogene 2004; 23:8597-8602.

Kinoshita Y, Jarell AD, Flaman JM, Foltz G, Schuster J, Sopher BL, Irvin DK, Kanning K, Kornblum HI, Nelson PS, Hieter P, Morrison RS: Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells. J Biol Chem. 2001; 276; 6656-65.

Knöchel S, Dillinger K, Koster M, Knöchel W: Structure and expression of Xenopus tropicalis BMP-2 and BMP-4 genes. Mech. Dev. 2001; 109:79-82.

Kolker SJ, Taichman T, Weeks DL: Confocal imaging of early heart development in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 2000; 218:64-73.

Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in Xenopus. J. Biol. Chem. 2000a; 275:12701-11.

Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT: The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signalling pathway takes shape. Trend Genet. 2000b; 16:279-83.

Laessing U, Giordano S, Stecher B, Lottspeich F, Stuermer CAO: Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. Differentiation 1994; 56:21-29.

Lapik YR, Fernandes CJ, Lau LF, Pestov DG: Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis. Mol. Cell 2004; 15:17-29.

Lang RA: Pathways regulating lens induction in the mouse. Int J Dev Biol. 2004; 48:783-91.

Lapik YR, Fernandes CJ, Lau LF, Pestov DG: Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis. Mol. Cell 2004; 15:17-29.

Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M et al.: Postnatal isl⁺ cardiobasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature 2005; 433: 647-53.

Lee HS, Bong YS, Moore KB, Soria K, Moody SA, Daar IO: Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. Nat. Cell. Biol. 2006; 8:55-63.

Lerch-Gaggl A, Haque J, Li J, Ning G, Traktman P, Duncan SA: Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. J Biol Chem. 2002; 277: 45347-55.

Lerch-Gaggl AF, Sun K, Duncan SA: Light chain 1 of microtubule associated protein 1B can negatively regulate the action of PES1. J. Biol. Chem. 2007; 282(15):11308-16.

Li J, Patel VV, Radice GL: Dysregulation of cell adhesion proteins and cardiac arrhythmogenesis. Clinic. Med. and Res. 2005; 4:42-52.

Lin L, Bu L, Cai CL, Zhang X, Evans S: Isl1 is upstream of sonic hedgehog in a pathway required for cardiac mophogenesis. Dev. Biol. 2006; 295:756-63.

Liu A, Niswander LA: Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. Neuroscience 2005; 6:954-54.

Livesey FJ: Netrins and netrin receptors. Cell. Mol. Life Sci. 1999; 56:62-8.

Logan YL, Nusse R: The wnt signalling pathway in development and disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2004; 20:781-810.

Lupo G, Harris WA, Lewis KE: Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. Nat. Rev. Neurosci. 2006; 7:103-14.

Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y: Anterior-posterior guidance of commissural Wnt-Frizzled signaling. Science 2003; 302:1984-88.

Maiorana A, Tu X, Cheng G, Baserga R: Role of pescadillo in the transformation and immortalization of mammalian cells. Oncogene 2004; 23:7116-24.

Mathers PH, Grinberg A, Mathon KA, Jamrich M: The Rx homebox gene is essential for vertebrate eye development. Nature. 1997; 387: 603-7.

Matsunaga E, Chédotal A: Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. Develop. Growth Differ. 2004; 46:481-86.

Matsunaga E, Nakamura H, Chédotal A: Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. J. Neurosci. 2006; 26(4):6082-88.

Maurus D: Die Rolle von Wnt-4 bei der Neuralentwicklung von *Xenopus laevis*. Dissertation, 2004, Universität Ulm.

Maurus D, Heligon C, Burger-Schwarzler A, Brandli AW, Kuhl M: Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in Xenopus laevis. Embo J. 2005: 24;1181-1191.

McGrew, Ottie AP, Moon RT: Analysis of Wnt-4 in embryos of Xenopus laevis: A Wnt member expressed in the brain and floor plate. Development 1992; 115:463-73.

McDiarmid RW, Altig R: Tadpoles. The Biology of anuran larvae. Seite 157. The University of Chicago Press 1999.

McMahoon AP, Moon RT: Ectopic expressio of the proto-oncogene int-1 in Xnopus embryos leads to duplication of the emryonic axis. Cell 1989; 58:1075-84.

Mohun T, Orford R, Shang C: The origins of cardiac tissue in the amphibian, *Xenopus laevis*. Trends Cardiovasc. Med. 2003; 13:244-48.

Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK: RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. Nature 2002; 419:392-95.

Moody SA: Fates of the blastomeres of the 16-cell stage of *Xenopus* embryos. Dev. Biol. 1987; 119:560-78.

Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J, Fraser S: Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos o *Xenopus laevis*. Development. 1993; 119:97-111.

Moorman AFM, Christoffelts VM, Anderson RH, van den Hoff MJB: The heart-forming fields: one or multiple? Phil. Trans. R. Soc. B. 2007;362:1257-65.

Moriguchi T, Kawachi K, Kamakura S, Masuyama N, Yamanaka H, Matsumoto K, Kikuchi A, Nishida E: Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal

kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. J. Biol. Chem. 1999; 274:30957-62.

Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Marin-Puig S *et al.*: Multipotent embryonic isl⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversififaction. Cell 2006; 127:1151-65.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Nature. 1986;292: 635-38.

Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics, Seite 152; 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Gustav-Fischer, 2002.

Nasevicius A, Ekker SC: Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. Nat. Genet. 2000; 26: 216-20.

Neuman E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH: Gene transfer into mouse lynoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. 1982; 1: 841-45.

Niederkofler V, Salie R, Sigrist M, Arber S: Repulsive guigance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. J. of Neuros. 2004; 24(4):808-18.

Nieuwkoop PD, Faber J: Normal Table of *Xenopus* laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. Hubrecht Laboratory, Utrecht, 2003.

Nusse R, Varmus HE: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell 1982; 31:99-109.

Oeffinger M, Leung A, Lamond A, Tollervey D: Yeast Pescadillo is required for multiple activities during 60S ribosomal subunit synthesis. Rna 2002; 8:626-36.

Ohneda O, Ohneda K, Arai F, Lee J, Miyamoto T, Fukushima Y, Dowbenko D, Lasky LA, Suda T: ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. Bood 2001; 98:2134-42.

Oldekamp J, Krämer N, Alvared-Bolado G, Skutella: Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. Gene Expression Patterns 2004; 283-88.

Ott H, Bastmeyer M, Stuermer CAO: Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in axon pathfinding to the optic disk. J. Neurosci. 1998; 18:3363-72.

Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kühl M: Wnt-11 activation of an non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. Nature 2002; 418:134-41.

Pandur P, Kühl M: An arrow for wingless to take-off. BioEssays 2001; 23.3:207-10.

ParkWJ, Liu J, Sharp EJ, Adler PN: The *Drosophila* tissue polarity gene *inturned* acts cell autonomously and encodes a novel protein. Development 1996; 122: 961-69.

Paschke KA, Lottspeich F, Stuermer CAO: Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. J. Cell Biol. 1992; 117:863-75.

Peduzzi JD, Irwin MH, Geisert EE Jr: Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS. Brain Res. 1994; 640:269-307.

Polakis P: Wnt signalling and cancer. Genes and Dev. 2000; 14:1837-51.

Pollerberg GE, Mack TG: Cell adhesion molecule SC1/DMGRASP is expressed on growing axons of retina ganglion cells and is involved in mediating their extension on axons. Dev. Biol. 1994; 165:670-87.

Pourquié O, Corbel C, Le Caer JP, Rossier J, Le Douarin: BEN, a surface glycoprotein of the immunglobulin-superfamily, is expressed in a variety of developing systems. Proc. Nat. Acad. Sci., 1992; 89:5261-65.

Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, Watanable Y, Zaffran S, Bajolle F, Biben C, McBride JJ, Robertson BR, Chaulet H et al.: An Nkx2-4/Bmp2/Smad negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. Cell 2007; 128:947-59.

Prieve MG, Moon RT: Stromelysin-I and mesothelin are differentially regulated by Wnt-5a and Wnt-1 in C57mg mammary epithelial cells. BMC Dev. Biol. 2003; 3:2.

Prisco M, Maiorana A, Guerzoni C, Calin G, Calabretta B, Voit R, Grummt I, Baserga R: Role of pescadillo and upstream binding factor in the proliferation and differentiation of murine myeloid cells. Mol. Cell Biol. 2004; 24:5421-33.

Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM: Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. Nat. Cell Biol. 2004; 8:756-62.

Ramos RG, Igloi GL, Lichte B, Baumann U, Maier D, Schneider T, Brandstatter JH, Frohlich A, Fischbach KF: The irregular chiasm C-roughest locus of Drosophila, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunglobulin-like protein. Genes Dev. 1993; 7:2533-47.

Rasmussen JT, Deardorff MA, Tan C, Rao MS, Klein PS, Vetter ML: Regulation of eye development by frizzled signaling in Xenopus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2001; 98:3861-3866.

Reiss K, Wang YJ, Romano G, Furnari FB, Cavenee WK, Morinone A, Tu X, Baserga R: IGF-I receptor signaling in a prostatic cancer cell line with a PTEN mutation. Oncogene 2000; 19: 2687-94.

Rijsewijk F, Scheurmann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R: The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell. 1987; 50:649-57.

Rougon G, Hobert O: New insights into the diversity and function of neuronal immunglobulin superfamily molecules. Annu. Rev. Neurosci. 2003; 26:207-38.

Rubbi CP, Milner J: Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. EMBO J. 2003; 22:6068-77.

Ruoslahti E: The RGD story: a personal account. Matrix Biol. 2003; 22:459-65.

Sadaghiani B, Thiebaud CH: Neural crest development in the Xenopus laevis embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. Dev. Biol. 1987; 124:91-110.

Sadler JE: Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu. Rev. Biochem. 1998; 67:395-424.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985; 230:1350-54.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified β globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature. 1986; 324: 163-66.

Sakumoto N, Yamashita H, Mukai Y, Kaneko Y, Harashima S: Dual-specificity protein phosphatase Yvh1p, which is required for vegetative growth and sporulation, interacts with yeast pescadillo homolog in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 30:608-15.

Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanluo AH, Attisano L, Woolf CJ: DRAGON, a Bone Morphogenetic Co-receptor. J. Bioch. 2005; 280:14122-29.

Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Bio. 1975; 94, 441-48.

Sanger F, Coulson AR: The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. FEBS Lett. 1978; 87: 107-10.

Saulnier DME, Ghanbari H, Brändli AW: Essential function of Wnt-4 for tubulogenesis in the Xenopus pronephric kidney. Dev. Biol. 2002; 248:13-28.

Schilling TF, Concordet JP, Ingham PW: Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by shh and BMP4. Dev. Biol. 1999; 210:277-87.

Schmidtmer J, Engelkamp D: Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. Gene Expression Pattern 2004; 104-10.

Schwab JM, Conrad S, Monnier PP, Julien S, Mueller BK, Schluesener HJ: Spinal cord injuryinduced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM). Eur. J. Neurosci. 2005; 21(6):1569-76.

Sekine-Aizawa Y, Omori A, Fujita SC, 1998: MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo. Eur. J. Neurosci. 1998;10: 2810-24.

Sikorski EM, Uo T, Morrison RS, Agarwal A: Pescadillo interacts with the cadmium response element of the human heme oxygenase-1 promoter in renal epithelial cells. J. Biol. Chem. 2006; 281:24423-30.

Sive HL, Grainger RM, Harland RM: Early Development of *Xenopus laevis*; A laboratory manual, Seite 1; Gold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Habor, New York, 2000.

Slusarski DC, Corces VG, Moon RT: Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. Nature 1997a; 390:410-13.

Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT: Modulation of embryonic intrazellular Ca²⁺ signalling by Wnt-5a. Dev. Biol. 1997b; 182:114-20.

Sharma RP, Chopra VL: Effect of the *Wingless* (wg¹) Mutation on Wing and Heltere Devepolment in Drosophila melangonaster. Dev. Biol. 1976; 48:461-65.

Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT: Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein dependent manner. Curr. Biol. 1999; 9:656-98.

Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M, Moon RT: Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. J Cell Biol. 2003; 161:769-77.

Shelton EL, Yutzey KE: Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression. Dev. Biol. 2006; 302:376-88.

Shi DL, Giosset C, Boucaut JC: Expression of Xfz3, a Xenopus frizzled family member, is restricted to the early nervous sytem. Mech. Dev. 1998; 70:35-47.

Shuman S: Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J. Biol Chem. 1994; 269: 32678-84.

Smith DK, Xue H: Sequence profiles of immunglobulins and Immunglobulin-like domains. J. Mol. Biol. 1997; 274:530-45.

Sokol SY, Klingensmith J, Perrimon N, Itoh K: Dorsalizing and neutralizing properties of Xdsh, a maternally expressed Xenopus homolog of dishevelled. Development 1995; 121:1637-47.

Song MR, Shirasaki R, Cai CL, Ruiz EC, Evans SM, Lee SK, Pfaff SL: T-Box transcription factor Tbx20 regulates a genetic program for cranial motor neuron cell body migration. Development 2006; 133:4945-55.

Speman H: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung, Seite 3-8, 24-49 Verlag von Justus Springer, 1936 - Nachdruck 1968.

Stahl B, Müller B, von Boxberg Y, Cox EC, Bonhoeffer F: Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. Neuron, 1990; 5:735-43.

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. Nature 1994; 372:679-83.

Strutt D, Weber U, Mlodzik M: The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. Nature 1997; 387:292-5.

Strutt D: Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. Development 2003; 130:4501-13.

Summerton J: Morpholino antisense oligomers: the case of an RNase H-independent structural type. BBA 1999; 1489:141-58.

Tada A, Pereira E, Beitner-Johnson D, Kavanagh R, Abdel Malek ZA: Mitogen- and ultraviolet-Binduced signaling pathways in normal human melanocytes. J. Invest. Dermatol. 2002;118:316-22.

Tomlinson A, Struhl G: Decoding vectorial information from a gradient: sequential roles of the receptors Frizzled and Notch is establishing planar polarity in the *Drosophila* eye. Development 1999; 126:5725-38.

Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMairais AA, McGrew LL, Moon RT: Activities of 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., 1996; 133:1123-37.

Toyofuku T, Hong Z, Kuzuya T, Tada M, Hori M: Wnt/frizzled-2 signaling induces aggregation and adhesion among cardiac myocytes by increased cadherin- β -catenin complex. J. of Cell Biol. 2000; 150:225-41.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: A Second Canon: Functions and Mechanisms of β -Catenin-Independent Wnt Signaling. Dev. Cell 2003; 5:367-77.

Verger A, Perdomo J, Crossley M: Modification with SUMO. EMBO Rep. 2002; 4:137-42.

Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ: Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. J. Cell. Biol. 1994; 127:2009-20.

Vogelstein B, Gillespie D: Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 76: 615-19.

Wawersik S, Evola C, Whitman M: Conditional BMP inhibition in Xenopus reveals stage-specific roles for BMPs in neural and neural crest induction. Dev. Biol. 2005; 277:425-42.

Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G: ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. J. Clin. Pathol. 2005; 57:1160-64.

Weiner JA, Koo SJ, Nicolas S, Fraboulet S, Pfaff SL, Pourquie O, Sanes JR: Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. Mol. Cell Neurosci. 2004; 27:59-69.

Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fereed GC, Richardson CC: Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. The Journal of Biological Chemistry. 1968; 243: 4543-55.

Williams AF, Barclay AN: The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. Ann. Rev. Immunol. 1988; 6:381-405.

Williams RS, Green R, Glover JN: Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. Nat Struct Biol. 2001; 8: 838-42

Wilkinson DG, Nieto MA: Detection of messenger RNA by in situ hybridisation to tissue sections and whole mounts. Methods Enzymol. 1993; 225: 361-73.

Wilson NH, Key B: Neogenin interacts with RGMa und Netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. Dev. Biol. 2006; 296:485-98.

Wilson L, Maden M: The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. Dev. Biol. 2005; 282:1-13.

Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L: Drosophila Rhoassociated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. Cell 2001; 105:81-91.

Wong GT, Gavin BJ, MacMohoon AP: Differential transformation of mammary eptihelial cells by Wnt genes. Mol. Cell. Biol. 1994; 6278-86.

Wong LL und Adler PN: Tissue polarity genes of Drosophila regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cell. J. Cell Biol., 1993; 123:209-21.

Wozard A, Nusse R: Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1998; 14:59-88.

Xia Y, Yu PB, Sidis Y, Beppu H, Bloch KD, Schneyer AL, Lin HY: Repulsive giudance molecule (RGMa) alters untilization of bone morphogenetic (BMP) type II receptors by BMP2 und BMP4. JBC 2007; 282:18129-40.

Yamashita T, Mueller BK, Hata K: Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system. Curr. Op. in Neurobiol. 2007; 17:29-34.

Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz N, Klingensmith J, Nusse R: The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. Genes Dev. 1995; 9:1087-97.

Yuan S, Schoenwolf GC: Islet-1 marks the early heart rudiments and is asymmetrically expressed during early rotation of the foregut in the chick embryo. Ana.Rec. 2000; 260:204-7.

Zhang G, Slaughter C, Humphries EH: v-*rel* induces ectopic expression of an adhesion molecule, DM-GRASP, during B-Lymphoma development. Mol. Cell Biol. 1995; 15:1806-16.

Zhang H, Fang Y, Huang C, Yang X, Ye Q: Human pescadillo induces large-scale chromatin unfolding. Sci. China C. Life Sci. 2005; 48:270-76.

Zuppinger C, Eppenberger-Eberhardt M, Eppenberger HM: N-cadherin: Structure, function and importance in the formation or new intercalated disc-like cell contact in cardiomyocytes. Heart Failure Reviews 2000; 5:251-57.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsvereichnis

AK	Antikörper
ALCAM	activated leukocyte-cell adhesion molecule
Amp	Ampicilin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenetic protein
BRCA1	breast cancer-associated protein
BRCT	BRCA1 carboxyl-terminal domain
BrdU	5-Bromo-2 ⁻ -deoxy-uridin
BSA	Bovine serume albumin (Rinderserumalbumin)
С	constant
ca.	circa
CamKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent kinase II
cDNA	complementäre DNÅ
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DCC	deleted in colorectal cancer
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Dioxygenin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DEP	dsh-EGL10-Pleckstein
DIX	dishevelled and axin
DM-GRASP	immunoglobulin-like restricted axonal surface protein that is
	expressed in the dorsal funiculus and ventral midline
ds cDNA	double strand cDNA (doppelsträngige DNA)
Dsh	dishevelled
DTT	Dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor
egVII	facial epibranchial ganglion
egIX	glossopharyngeal epibranchial ganglion
egXI	first vagal epibranchial ganglion
egX2/3	fused second and third vagal epibranchial ganglions
Fluo	Fluorescein
Fz	Frizzled
gV	trigeminal ganglion
gAD	anterodorsal lateral line ganglion
GFP	green fluorescence protein
gM	middle lateral line ganglion
gP	posterior lateral line placode
GPI	gycosylphosphatidylinositol

gPr	profundal ganglion
GSK3β	Glycogen-Synthetase-3β
gVPL	cells contributing to the vagal and posterior lateral line
-	ganglion
h	hour (Stunde)
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
HEK-239	human embryonic kidney-239
HJV	hemojuvelin
HMG	high motility group
hyp	hypothetisch
Id1	inhibitor of differentitation
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
irreC-rst	irregular chiasm C-roughest
IRS-1	insulin receptor substrate-1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LB	Luria-Bertani
LIM	Lin11, Isl-1, Mec-3
LEF	lymphocyte enhancer factor
LRP	low-density-lipoproten receptor-related protein
Μ	Marker
MCS	multiple cloning site
memD	melanoma metastsis clone D
MeOH	Methanol
MO	antisense Morpholino-Oligonukleotid
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
Mtap 1b	microtuble associated protein 1b
MuSC	murine SC-related protein
n	Anzahl der Experimente
N	Anzahl der ausgezählten Embryonen
NBT	Nitroblautetrazolium
NDFs	nucleolus-derived foci
Nkx2.5	Homeodomänen der Transkriptionsfaktoren der Nk-Klasse
NLS	nuclear localisation signal
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORC	origin recognition complex
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
pAD	anterodorsal lateral line placode
PCP	planar cell polarity
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheres Nervensystem
pPrV	profundal-trigeminal placodal area
KACE	rapia amplification of 5' complementary DNA ends
KGM A	repulsive guidance molecule A
KNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
KUK	Kho-abhangige Kinase

RPE	retinales pigmentiertes Epithelium
rpm	rotations per minute (Umdrehungen/Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RZPD	Deutschen Resourcenzentrum
S	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
St.	Stadium
SUMO	small ubiquitin modification
Taq	Thermus aquaticus
Tbx20	<i>T-box 20</i>
TCF	T-cell factor
TGF-β	transforming growth factor- β
TnIc	Troponin Ic
TNT	transcription and translation
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region (untranslatierter Bereich)
V	variable
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Xnr-3	xenopus nodal-related 3
xpes	Xenopus Pescadillo
ZNS	Zentralnervensystem

Aminosäuren:

- A= Alanin
- C= Cystein
- D= Aspartatsäure
- E= Glutaminsäure
- F= Phenylalanin
- G= Glycin
- H= Histidin
- I= Isoleucin
- K= Lysin
- L= Leucin
- M= Methionin
- N= Asparagin
- P= Prolin
- Q= Glutamin
- R= Arginin
- S= Serin
- T= Threonin
- V= Valin
- W= Tryptophan
- Y= Thyrosin

8.2 Vollständige Nukleotidsequenz der Pescadillo mRNA

Blau markiert	=	Startcodon
Rot markiert	=	Stoppcodon

ORF:

-	atgggt	ggto	tgga	gaaa	aaaa	aagta	atgag	laga	aggt	tct	gc	tacc
	MG	G	ьε	K	K	К Ү	E E	R	G	S	A	. T.
46	aactat	atca	acaag	gaac	aaag	gcac	gaaag	aag	yttg	gcag	JCt	tagt
	N Y	IJ	ΓR	Ν	K A	A R	K	Κ	L	Q	L	S
91	ctgcct	gatt	tcag	acga	actat	tgtat	cccta	laag	gggt	atc	ta	ccca
	L P	DE	FR	R	L (C I	L	Κ	G	I	Y	P
136	catgaa	accca	aagca	caag	jaaga	aaggt	taac	aag	ggga	atco	ac	tgcc
	ΗE	P F	ΚН	K	K F	k v	Ν	K	G	S	т	А
181	cctcqc	racat	ttta	ccto	rctca	aaqqa	acato	aaa	attt	tta	act	ccat
	PR	т в	r Y	L	LF	K D	Ι	К	F	L	L	Н
226	gaacca	atro	ntagg		atte	agaga	aatac	aac	- natt		at	tcat
220	F D	T T	r c	K	F I	zgugu ⊃ F	v	.uus r	W	F	v	P
071		± \		IL of					v ~~~ +	. + aa	v ~+	~~~~~
2/1	D T		aaayo	v	.yyaa		JLYaa E	TT TT	yyaı D		UGU:	yyac D
216	к ц	r r	\ _ А	, T	G I	n R	E	w .		5.	v .	D
316	agaatt	agag	gataa	taag	JCCTI	tcata	acaaa	lCta	igat	cat	at	catt
	RI	RI) N	K.	P 5	S Y	K	Г	D	Н	T	T
361	aaggaa	aaggt	tatco	aaca	attta	attga	atgcc	gto	ccgt	gac	ct	agat
	ΚE	RY	ΥP	Т	F I	I D	A	V	R	D	L	D
406	gatgct	ctgt	cccat	gtgo	ttto	ctctt	cctct	act	ttt	cct	cg	cacg
	DA	L S	5 <u>M</u>	С	FΙ	L F	S	Т	F	Ρ	R	Т
451	ggaaag	gtgto	cacgt	tcag	Jacca	atcca	agctg	Itgo	ccgt	aga	act	gagt
	G K	C F	I V	Q	Т	ΙQ	L	С	R	R	L	S
496	qtqqaa	attco	ctcaa	ctat	gtta	ataga	attct	cgt	tca	acto	lcd	taaq
	VE	FΙ	L N	Y	v I	I D	S	R	S	L	R	к
541	atttt	ctat	caat	taaa	adaa	atcta	attac	caa	adca	agad	at	cctt
	T V F	т. 9	з т	ĸ	G -	тү	Y	0	Δ	םכ ת	Т	т.
586	aaaaaa		-+	atac	nat da		+ +++>+	ada X	11 1++ c	nt ac	-	tast
500	gggcug	jucci	Luuc	acge	jucci		Jului	-900			·cu	cguc
	C O	T T	. т	TAT	т г	г р	v	Δ	F	C	н	D
621	G Q	TI	L T	W	I I	r P	Y	A	F	S .+++	H	D
631	G Q caccct	T I	5 T gatgt	W agat	I 1 taca	r p agagt	Y tatg	A gca	F aacc	S ttt	H ac	D tgag
631	G Q caccct H P	T I acag T I	Gatgt	W agat D	I 1 taca Y F	r p agagt R V	Y tato M	A gca A	F aacc T	S ttt F	H ac T	D tgag E
631 676	G Q caccct H P ttctat	T I acag T I acta	_ T gatgt) V acgct	W agat D .gctt	I 1 taca Y H tggat	r P agagt R V tttgt	Y tato M tgaac	A gca A tto	F aaco T ccao	S ttt F ctc	H ac T ta	D tgag E ccag
631 676	G Q caccct H P ttctat F Y	T I acag T I acta T 7	Gatgt DV Cgatgt CU C C L	W .agat D .gctt L	I I taca Y H ggat G H	F P agagt R V tttgt F V	Y Lato M Lgaac N	A gca A tto F	F aaco T ccao H	S ttt F ctc L	H ac T ta Y	D tgag E ccag Q
631 676 721	G Q caccct H P ttctat F Y acttta	T I acag T I acta T T aaato	gatgt DV Acgct FL ctaca	W agat D gctt L .atac	I taca Y G G ccaa	F P agagt R V tttgt F V ccaaa	Y Itato M Igaac N agtta	A gca A ttc F igat	F aaco T ccao H tct	S F Cato L tto	H T T ta Y	D tgag E ccag Q agaa
631 676 721	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L	T I acag T I acta T T aaato N I	I T gatgt D V acgct I L ctaca I Q	W agat D gctt L .atac Y	I taca Y G C C P I	F P agagt R V tttgt F V ccaaa P K	Y Ltato M Lgaac N agtta L	A gca A tto F Igat D	F aaco T ccac H tct S	S F CCTC L F F	H ac T ta Y stc S	D tgag E ccag Q agaa E
631 676 721 766	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat	T I acag T I acta T 7 aaato N I cctta	gatgt DV Acgct L Ctaca L Q Aagtc	W agat D gctt L atac Y agat	I taca Y G C C C C C C C C C C C C C C C C C C	F P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga	Y M Igaac N agtta L acaaa	A gca A ttc F Igat D Itat	F aacc T ccac H tct S cgca	S F CCTC L CTTC F aCTS	H ac T ta Y stc S	D tgag E ccag Q agaa E gact
631 676 721 766	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D	T I cacas T I cacta T T aaato N I cctta L F	Gatgt gatgt DV acgct L Ctaca GQ agtc K	W agat D gctt L atac Y agat D	I taca Y G C C C C C C C C C C C C C C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D	Y M cgaac N agtta L acaaa K	A gca ttc F Igat D Itat	F aaco T ccac H ctct S cgca A	S F CCTC L CTTC F ACTG L	H T T Y S Jga E	D tgag E ccag Q agaa E gact T
631 676 721 766 811	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta	T I cacas T I cacta T T aaato N I cctta L F ataca	J T gatgt) V acgct F L Ctaca J Q aagtc K S atgga	W .agat D .gctt L .atac Y agat D .gaaa	I T taca Y H tggat G H tggtg G H attgg	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcago	Y M cgaac N agtta L acaaa K ctctg	A Igca Etto F Igat Itat Y agt	F aaco T ccac H stct S sgca A	S F Ecto L Etto F L L agt	H T T ta Y S ga E	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc
631 676 721 766 811	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V	T I cacag T I cacta T T aaato N I cctta L F ataca Y N	J T gatgt D V acgct F L ctaca J Q aagtc (S atgga 4 E	W agat D gctt L atac Y agat D gaaa K	I taca Y G C C C C C C C C C C C C C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A	Y M tgaac N agtta L acaaa K ctctg L	A gca F Igat D Itat Y gagt	F aaco T ccac H stct S gca A gct A	S ttt F ctc L ttc F actg L cagt	H T T ta T S gga E L	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S
631 676 721 766 811 856	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta	T I cacag T I cacta T T aaato N I cctta L F ataca Y M	J T gatgt D V acgct F L ctaca J Q aagtc C S atgga 4 E cccag	W agat D gctt L atac Y agat D gaaa K	I taca Y G C ccac P I ccac G I t t ggts G I Attgs L A accta	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcago A A aatga	Y Ltate M Lgaac N agtta L acaaa K Ctcte L atgac	A gca ttto F gat tat yagt sace	F aacc T ccac H stct S cgca A ggag	S ttt F ttc F ttc F L ttc ggta	H T T Y S S S S S S S S S S S S S S S S S	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S tgaa
631 676 721 766 811 856	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V	T I cacta T I cacta T T aaato N I cctta L F ataca Y M aatto I F	J T gatgt D V acgct L ctaca J Q aagtc (S atgga 4 E cccag P S	W agat D gctt L atac Y agat D gaaa K cgaa E	I Staca Y G G C C C C C C C C C C C C C C C C C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcago A A aatga N D	Y M tgaac N agtta L acaaa K ctctg L atgac D	A gca F gat D tat Y agt S aco T	F accord T Ccac H S Ccac H S Ccac A S G C C A S G C C C C C C C C C C C C C C C C C C	S ttt F ttc F ctc F ctc S gta V	H T T S S S S S S S S S S S S S S S S S	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S tgaa E
631 676 721 766 811 856 901	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttccct	T I cacta T I cacta T T aaato N I cctta L H ataca Y M aatto I I	J T gatgt O V acgct I L Ctaca J Q aagtc C S atgga 4 E Cccag C S gatco	W agat D gctt L atac Y agat Cgaa E gagag	I taca Y ggat G P gggt G L A CCta P I A CCta P I J A CCta P I J J J J J J J J J J J J J	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A aatga N D gctgg	Y M Cgaac N agtta L acaaa K Ctctg L atgac D gtctg	A gca A ttc F ugat y gagt cacc T ggag	F accor T Ccac H Scac S S S S C C C C C C C C C C C C C C C	S ttt F ttc F ttc F ttc S ggta V ggag	H ac T Y S J J J J J C L J J J C L	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S tgaa E aaag
631 676 721 766 811 856 901	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttccct F P	T I cacta T I cacta T T aaato N I cctta L F ataca Y N aatto I F cgcco A I	J T gatgt O V acgct C L C L C L C L C L C L C L C L	W agat D agctt L atac Y agat C gaaa K C gaaa E agag E	I Staca Y Sggat CCCA P Sggt G I Attg A CCCA P I A CCCA P I A CCCA N A CCA N A CCA N A CCA N A CCA N A CCA N A C A C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A aatga N D gctgg A G	Y M cgaac N agtta L acaaa K ctctg L atgac D gtctg L	A gCa A tto F utat Y gagt S cacc E E	F accac T Ccac H tct S gca A ggag E ggaa E	S ttt F ttc F ttc L ttc S gta V gag E	H ac T ta ta ta S ga E c L ga D ga O	D tgag E Q agaa E gact T gtcc S tgaa E aaag K
631 676 721 766 811 856 901 946	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttccct F P aqqcaa	T I cacta T I cacta T T catta L F catta Y M catta I F cgcco A I	J T gatgt Vacget L L L ctaca Q aagte C S atgga M E cccag S S gatee D P cagga	W agat D gctt L atac Y gaaa K cgaa E agag E agag	I taca y ggat G C cca P G C C G I L A C C C C C C I C C C C C C C C C C C C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcago A A aatga N D gctgo A G aaaca	Y Ltaty M Lgaac N Agtta L Atgac L L Atgac D gtctg L Atgac	A gca A ttc F ugat yagt yagt yagt E tca	F aacco T CCCC H CCCC A CCCC A CCCC A CCCC A CCCCC A CCCCC A CCCCC A CCCCCC	S tttt F ctc L ctc F ctc L ctc gta y gta y ttt ttt	H ac T ta Y tc Jga E t Jga D Jca Q	D tgag E Q agaa E gact T gtcc S tgaa E aaag K gqqq
631 676 721 766 811 856 901 946	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggcaa R O	T I cacas T I cacta T T aaato N I cctta L F ataca Y M aatto I F cgccs A I cctgc	J T gatgt Qatgt L tacac J Q aagtc S atgga C C S gatc C S gatc C S gatc C S G C C S G C C S G C C S G C C C S C C C C	W agat D gctt L atac Y agat Cgaa K Cgaa E ggag E S ggag	I Taca Y H G H CCCCC P H CCCCC G H Attgo L A ACCCC P M Gaato N A M M M M M M M M M M M M M M M M M M M	I P agagt R V tttgt F V cccaaa P K gaaga E D gcago A A gcago A A gctgg A G aaaca	Y Ltate M Lgaac N agtta L acaaa K Ctcte L atgac D gtcte L ataag K	A gca A ttc F utat y gat S c tca S	F aacc T ccac H tctt S cgca A cgct A ggag E ggaa E ggaa E	Sttt Fcctc Ltc Ltc Sgta V gag Ett F	H T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	D tgag E ccag Q agaa E gact T cc S tgaa E tgaa E gggg K gggg C
631 676 721 766 811 856 901 946 991	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggcaa R Q cteaac	T I cacas T I cacta T T aaato N I cctta L F atac Y M aatto L F actgo L C	J T gatgt D V acgct L ctaca J Q aagtc C S atgga C S gatcc D P cagga C S gatcc D P cagga C S	W agat D gctt L atac Y agat D gaaa K ggaa E ggag E ggag	I Carter Control Contr	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A gcaga A G aaaca K H	Y Laty M agaac N agtta L acaaa K Ctcty L ataag K Ctcty L ataag	A gca A ttc F utat yagt S gao E yca S cat	F aacc T ccac H ctct S cgca A cgct A ggag E ggaa E ggaa E ttc	S tttt F cctc L ttc F cctc S ggta V gggg F f f	H T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	D tgag E ccag Q agaa E gact T cc S tgaa E gggg K gggg G G
631 676 721 766 811 856 901 946 991	G Q caccct H P ttctat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttcct F P aggcaa R Q ctcacc	T I cacas T I cacta T T cacta T T cacta L F cacta T T cacta T T cacta T T cacta C T C T C T C T C T C T C T C T C T C T	J T gatgt Qatgt L ctaca Qaagto S atgga C cccag S gatco D P cagga C cagga C cccag C cccag C cccag C cccag C C cccag C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	W agat D gctt L atac Y agat D s agac E ggac E E aaat	I Correction of the second sec	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A gcaga A G gaaca K G gaaca K G gaaca	Y Laty M L Agtta L Accaaa K L L C L D G C L C L C L C L C C C C C C C C C C C C C	A gca A ttc F Ltat yagt S sace F J J S Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat Ltat	F aaccord T CCCAC H CCCAC SCCCA ACCORD ACCOR	Sttt Ftt Ltt Sgta Sgta Vaga Sttt Fcc Sgta Vaga Sttt Fcc Sgca	H ac T t t S S S S E C L S D C Q C V C C L	D tgag E Q agaa E gact T gtcc S aaag K gggg G G cc Z
631 676 721 766 811 856 901 946 991	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggcaa R Q ctcaag L K	T I cacas T I cacta T T cacta T T cacta L H catta I H cacta I H cacta C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	J T gatgt Qatgt L Ctaca Q Qatgto C S G C C C C C C C C C C C C C	W agat D gctt L atac Y agat C gaaa K c gaaa E ggag E ggag L aaat N	I Caracteria Constraints of the second secon	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A gcaga A A gcaga K G gaaca K H gaggt C V	Y Laty Agta L Accaaa K Ctcty L Atgac D gtcty L ataag K Ctcty C Ctcty C C C C C C C C C C C C C	A gca A ttc F ugat yagt yagt sacs E sc tca tca tca tca tca tca tca tc	F aaccord T cccac H ttct S cccac A C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Sttt Ftt Lttc Agt Sgta Vagag Ettt Fcc Agt Agag	H ac T ta Y tc S g E t L g a D c a Q t V c L	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S aaag ggg G cc A tgt
631 676 721 811 856 901 946 991	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V tteeet F P aggcaa R Q cteaeg L K ttat	T I acas T I acta T T acta T T acta L I actta I I conta A I actgo L C T T acta C T T C T I acta T T C C T I C C T I C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	J T gatgt J V acget L ctaca Q acget C cagga C C C C C C C C C C C C C C C C C C	W agat D gctt L atac Y agat C gaaa E ggag E ggag E aaat N tttt	I Classification of the second	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A ggcaga A A gaatga A G gaaga K G gaaga C U gcaga C V gaaga C V gaaga C V C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Y Laty Agaac N Agtta L Accaaa K Ctcty L Atgac D gtcty L ataag K caccaa P aggtg	A (gca A ttc F (gat J gagt S (cgt R (cgt C (cgt) C (cgt) (cgt	F aacc T ccac H ccac A cgct A ggag E ag E a cgct L cgat L cgat D cgat	Sttt Ftt Ltt Sttt Sttt Stagt S	H ac T ta Y tc S g E t L g a D C a Q t V c t L c C C C C C C C C C C C C C C C C C C	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S aaag K gggg G cc A ccc
631 676 721 766 811 856 901 946 991 1036	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V tteeet F P aggeaa R Q etcaag L K ttat F I	T I acas T I acta T T acta T T acta L H acta I H acta I H actgo L C J t C T I c acta T T T acta T T T acta T T T acta T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	J T gatgt J V acget L ctaca Q acget C C cagga C C C C C C C C C C C C C	W agat D gctt L atac Y agat C gaaa K c gaaa E ggag E aaaat N ttttt F	I Classification of the second	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A aatga N D gcaga A G aaaca K H gaggt E V ggtga G E	Y Laty M L A A A C L A C L A C L A C C L A C C C C C C C C C C C C C	A gca A ttc F ugat y gagt S ucgt R tct S ucgt S U Ucgt S S Ucgt S S Ucgt S Ucgt S S S Ucgt S S S Ucgt S S S S S S Ucgt S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	F aacc T ccac H ctctt S cgca A cgct A ggag E aggag E attg C gat D ccgat W	Sttt Ftt Ltt Sttt Sttt Stt Stt Stagt	H ac T tac Y tc S J J E c L J J C A J C C J C C J C C J C C J C C J C C S J C C S J C C S J C C S J C C S J C C S J C S C S	D tgag E ccag Q agaa E ggact T gtcc S tgaa E aaag K gggg G ctct S
631 676 721 811 856 901 946 991 1036	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V tteeet F P aggeaa R Q etcaag L K tttato F I gttgat	T I acas T I acta T I acta T I acta T I acta L I acta I I acta I I acta I I acta T I acta I a I a I a I a a I a I a I a I a I a	J T Jatgt J V Jacget L L L L L L L L L L L L L	W agat D gctt L atac Y agat C gaaa K C gaaa E ggag E aaaat N ttttt F caaco	I Caracteria Control C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A aatga V D gctgg A G aaaca K H gaggt E V ggtga G E aaaca	Y Laty M L A A C L A C L C L C L C L C L C L C L C L C L C L C C C C C C C C C C C C C	A gca A ttc F gat D ttat Y gagt S cgt R ftct S cgt	F aacc T Ccac H ttet S GC A GC A GC A GC A GC A C GC A C C C C	S ttt F ttc F ttc F ttc S ggta V ggcz A a a a a a a a a a a a a a	H ac T t t t S J E c L J D C Q U C L C C A t	D tgag E ccag Q agaa E gact T gtcc S tgaa E aaag K gggg G tgcc A ctct S aaag
631 676 721 766 811 856 901 946 991 1036 1081	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggeaa R Q etcaag L K tttato F I gtctgo V C	T I acas T I acta T I acta T I acta T I acta L I acta I I I acta I I I acta I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	J T Jatgt Jatgt Jacget L L L L L L L L L L L L L	W agat D gctt L atac Y agat D gaaa K cgaa E ggag E aaat N ttttt F caacc T	I Classification of the second	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A ggcaga A A G aaaca X H gaggt E V ggtga G E aacaa N S	Y Tate M Cgaac N agtta L acaaa K Ctcte L atgac D gtcte L ataag K caccaa P aggte V gcaca	A gca A ttc F gat D ttat Y gagt S cgt R tca S gac D ttca C C C C C C C C C C C C C	F T T CCAC H S S S S S S S S S S S S S S S S S S	S ttt F ttc F ttc F ttc S ggta V gggz S ggta C A ggc A ggc A ggc A S S S S S S S S S S S S S	H ac T t Y t S g E c L g D g Q g t C L g A t I G A t	D tgag E Q agaa E gact T gtcc S tgaa E aaag K gggg G tgcc A ctct S aacg T
631 676 721 811 856 901 946 991 1036 1081 1126	G Q caccet H P ttetat F Y acttta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggcaa R Q cteag L K tttato F I gttgt C C caccet	T I acas T I acta T I acta T I acta T I acta L I acta I gccs A I gccs L I gccs L I acta I gccs I f I acta T I acta I I I acta I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	J T Jatgt Jatgt Vacget L L L L L L L L L L L L L	W agat D gctt L atac Y agat D aagat E ggaa E ggaa E t tttt F cccga	I Transformation of the second	I P agagt X V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A aatga V D gctgg A G aaaca X H ggggg E V ggggg E V gggga G E aaca V S agcat	Y Laty M Lacaaa L Accaaa K Ctcty L Atgac D ytcty L accaa K Ctcty Ctcty L accaaa Ctcty C	A gca A ttc F ugat y gagt S ugat S u U U S u U U U U U U U U U U U U	F aaccorr T ccac H ttct S cgca A cgct A cgca E cgca E cgca E cgca C A cgca C C A cgca C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	S ttt F ttc F ttc F tc S gta V ggta S gta C A ggc A ggc A ggta S sttt C S S S S S S S S S S S S S	H ac T t Y t S gg E t L gg D gg Q t L gg A t L g	D tgag E Q agaa E gact T gtcc S tgaa E aaag K gggg G tgcc A ctct S aacg T ccaac
631 676 721 766 811 856 901 946 991 1036 1081 1126	G Q caccet H P ttetat F Y actta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggeaa R Q cteag L K tttato F I gtetgo V C caccet H H	T I acas T I acta T I acta T I acta T I acta I SCC T I acta I SCC T I acta I SCC T I acta I SCC T I acta T I acta C I I acta I I acta I I acta I I acta I I I acta I I I acta I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	J T Jatgt Jatgt Vacget L L L L L L L L L L L L L	W agat D gctt L atao gaaa ggaa ggaa ggaa ttF ccga R R R	I : : ttaca Y H cgat G H ccca G H ccca C C C C H ccca C C C C C H ccca C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga A A aatga V D gctgg A G aaaca K H ggtga G E Qgtga G E S I	Y Laty M Lacaaa K Lacaaa K Latyac D J Latyac D J Lacaaa R Laccaa P V gcaca T Q	A gca A ttc F utat yagt S ac yagt S cgt R tct S ac D yac T yagt T T yagt T yagt T yagt T yagt T yagt T yagt T yagt T yagt T yagt T T T T T T T T T T T T T	F aaccorr T ccac H ttct S cgca A cgct A cgca A cgca E cgca E cgca C D ccac P ccac Q	Sttt Fctc Ltt Fct Ltt Fct Lagt Sgta Vgg Ett Fcg Agg Dt C Jatt I	H ac Tay to Sign and the second secon	D tgag E ccag Q agaa E gtcc S tgaa E aaag G gg C C C S aacg T ccag C S aaag C C C C C C C C C C C C C C C C C
631 676 721 766 811 856 901 946 991 1036 1081 1126 1171	G Q caccet H P ttetat F Y actta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggcaa R Q cteag L K tttato F I gtctgo V C caccet H H agata	T I acas T I acta T I acta I I acta I I acta I I acta I I acta I I I acta I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	J T Jatgt Jatgt Vacget Laca Qatagto Laca Qatgga Lecag Jatgga Jatgga Lecag Lecag Jatgaa Lecag Lecag Jatgaa Lecag Lecag Jatgaa Lecag Lec	Wagat Dgctt Latao gaaa gaaa ggaa ggaa ggaa ggaa ttF cccga Racca Racca	I Construction of the second s	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K ggaga E D gcaga A A aatga V D gctgg A G aaaca K H ggtga G E Qgtga G E aaca S I tgggt	Y Tate M Tgaac N agtta L acaaa K Ctcts L Ctcts L Ctcts L Ctcts Ct	A gca A tto F utat yagt S ac ac yagt S ac ac ac ac ac ac ac ac ac ac	F aaccorr T ccac H ttct S ccac A C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Sttt Ftt Ltt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt S	Hac Tay SgE to LgD DC Q to L CA A I A I A A	D tgag E ccag gaa E ct ggaa E ct gg S tgaa E ct E aaag gg G cc S ccag a E ct S tgaa E ct S tgaa E ct S tgaa E ct S tag C a S tag S S tag S S tag S S tag S S tag S S tag S S tag S S tag S S tag S S S tag S S S S S S S S S S S S S S S S S S S
631 676 721 766 811 856 901 946 991 1036 1081 1126 1171	G Q caccet H P ttetat F Y actta T L gttgat V D gaagta E V cgagta R V ttecet F P aggeaa R Q cteag L K tttato F I gtetgo V C caccat H H agatat R Y	T I acas T I acta T I acta I I acta I I acta I I I acta I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	J T Jatgt Jatgt Vacget Laca Qenter Jacage Jacag	W agat D gctt L atao y agat ggaa ggaa ggaa ggaa t t F ccga R ccga R a a a C gaa t C C C C C C C C C C C C C C C C C C	I Construction of the second s	I P agagt R V tttgt F V ccaaa P K gaaga E D gcaga E D gcaga A A aatga V D gctgg A G aaaca K H ggtga G E Qgtga G E S aaca S I tgggt W V	Y Tate M Tgaac N agtta L acaaa K Ctcts L Ctcts L Ctcts L Ctcts L Ctcts C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	A gca A ttc F gat gat S ac ac ac ac ac ac ac ac ac ac	F aaccorrest T ccac H tct S ccac A ccac C ccac A C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Sttt Ftt Ltt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt Sgt S	Hac Tay SgE the Drog Q to Loo A at ta A a A A A A A A A A A A A A A A	D tgag E ccag Qagaa E gtcc gg tcc gg tcc S tgaa K gg G cc S act C S act C S act C S act C S act C S act C S C C C S C C C C C C C C C C C C C

```
R L L P V E D Y F P G V L L
1261 ccccctcatctttctccatttgtccatgagaaggaggagactac
   P P H L S P F V H E K E G D Y
1306 attcctcctgaaaaactacggctgatggcaatgcaaaaaggagag
   I P P E K L R L M A M Q K G E
1351 aatcttggactagatgaggaggatgatgatgatgatgatgatgat
   N L G L D E E D D D D D D D
E E D D D D D E E E D K K
1441 ctgagacagttagaaaataaaaagtcggacagaagaacctgaat
   L R Q L E N K K V G Q K N L N
1486 gttaaggtaacagcaggcaaggttaaggtggaagaccgcacacaa
   V K V T A G K V K V E D R T Q
1531 gttgcagagcaggagaaaaatgaggagaagcgtctagcaattatg
   V A E Q E K N E E K R L A I M
1576 \ {\tt atgatg} aagaa aagaa aagaa aatat ctgtataa caa aat {\tt catg} ttt
   M M K K E K Y L Y N K I M F
1621 ggcaaaaaacgcaaagtccgggaggccaacaaactggcattgaag
   G K K R K V R E A N K L A L K
1666 aggaaagctcatgatgaagcagtgaaagttgaacggaagaagaag
   R K A H D E A V K V E R K K K
1711 gctaagaagcactaa 1725
   АККН
```

8.3 Vollständige Nukleotidsequenz der DM-GRASP I mRNA

Blau markiert =	Startcodon
Rot markiert =	Stoppcodon

<u>5'UTR:</u>

```
1 gacagtcagt cacagegace agegaetgag gaggaaetga gtgetecaea geaaeatee
61 egeegagaea geeegeett gtgeateete eetgeaeat eaeetgeeeg gagtgetget
121 gtegetgtg gagaaettet eteeegagtg gaagttgget gegeaette agggateeet
181 eaeattgget eetgeeggt tgttetteta gteatteee etteetttgt gaateaggag
241 eageeetget gggaagggea gaetaegtge etgtttgggg agtetteeg geaeaataea
301 geggggttta etgagtggta etteattaee gggagttgee attegataet eggeeeatte
361 taggtgtagg ttgeeeagge gaggtegge ageteettg tegttgggae eggateetgg
421 get
```

ORF:

424	at	gga	agc	aag	tgc	aag	gac	ctt	gct	ggt	cgt	gtg	tgt	gct	gtgt
	М	Е	А	S	А	R	Т	L	L	V	V	С	V	L	С
469	gca	agc	cac	cct	aag	gac	agg	ctt	tgg	act	aca	tac	agt	caa	tgca
	А	А	Т	L	R	Т	G	F	G	L	Η	Т	V	Ν	A
514	gt	tta	tgg	aga	aac	gat	tat	gat	acc	atg	tgg	tca	tga	aat	agtg
	V	Y	G	Е	Т	I	М	I	Ρ	С	G	Н	Е	Ι	V
559	ga	tga	tct	tct	gtt	tgc	aag	ctg	gaa	ata	tga	aac	acc	tga	tgga
	D	D	L	L	F	А	S	W	K	Y	Е	Т	Ρ	D	G
604	ac	tgc	agt	att	tct	age	ttc	ccg	gtc	tgc	agt	gaa	aaa	caa	aatc
	Т	А	V	F	L	А	S	R	S	А	V	Κ	Ν	Κ	I
649	ac	cta	tgg	tga	cgc	tgt	aga	ata	caa	aac	tcg	act	gga	act	gtca
	Т	Y	G	D	А	V	Е	Y	K	Т	R	L	Е	L	S
694	gaa	aaa	cta	tac	att	atc	cat	ctc	aaa	tgc	cgt	aat	aga	tga	tgag
	Е	Ν	Y	Т	L	S	I	S	Ν	А	V	I	D	D	Е
739	aag	gag	att	tgt	gtg	cat	gct	tgt	aac	agc	aga	caa	tgt	ttt	tgaa
	Κ	R	F	V	С	М	L	V	Т	А	D	Ν	V	F	Е
784	gaa	acc	aac	agt	agt	cag	agt	gtt	caa	gcc	tcc	atc	gaa	acc	agaa
	Е	Ρ	Т	V	V	R	V	F	K	Ρ	Ρ	S	K	Ρ	Е
829	at	tct	aga	gca	gcc	aaa	aat	cat	gga	aac	agg	aaa	aat	aaa	tagg

I L E Q P K I M E T G K I N R 874 gttggagtctgtgttgccaaagatagctacccagatggaaacatt V G V C V A K D S Y P D G N I 919 acgtggtacagaaatggcatgattcttttgccagttgatggagct T W Y R N G M I L L P V D G A 964 gtgattatagagtggaatagagaaaaaattcttctagtggcctt V I I E W N R E K N S S S G L 1009 tatagcatgcagtcatcacttcaatatatggcaacaaaggaggac Y S M O S S L O Y M A T K E D 1054 ataagagcttttttcagatgtacagtaacctactttatgccaaat I R A F F R C T V T Y F M P N 1099 ggacaagtatcggctgaatctgacactgctagctttgatatatac G Q V S A E S D T A S F D I 1144 tacccaacagagaaggtaacaatacagatacagccatcaaaaaaa Y P T E K V T I Q I Q P S K K 1189 tatataaaggaaggtgataacatcactatccaatgtaaaggaaat YIKEGDNITIOCKGN 1234 ggaaatccgcctccgcaagaatttttgtattaccttccaggtcag G N P P P Q E F L Y Y L P G Q 1279 gaagaaggtatcgtcagctcaagtgcctaccacataaccgacata EEGIVSSSAYHITDI 1324 aaacgaaatgcaactggggattataaatgttctctttcggataaa K R N A T G D Y K C S L S D K 1369 aatatgatggcatctgcaacagtcactgtgcattatctagacctg N M A S A T V T V H Y L D L 1414 tctttaacaccaagtggagaagttacgaaacagattggagatacc S L T P S G E V T K Q I G D T 1459 ttttctgtattgtgtgttccatttgcaagtaaaaatgtatcagtc FS V L C V P F A S K N V S V 1504 atgtttatgaaagacagcaaaatattgacagcacttccttttaag M F M K D S K I L T A L P F K 1549 aacttacagtatcgtgattcaggtgtttatgaatgcttggctaac N L O Y R D S G V Y E C L A N 1594 ctggaagaagaaggtttacaaagtcgaaaaacatttaagcttact L E E G L Q S R K T F K L T 1639 gtagaaggaaaaccaaaacttaaacttactaaaaatacatcctct V E G K P K L K L T K N T S S 1684 gatggaaagactaaaacaatcagttatgaagttgaaggctttcca DGKTKTISYEVEGFP 1729 aagccagaagtgtcctgctccggtactggaaacttaaacaaaaca K P E V S C S G T G N L N K T 1774 gaagagactgtgataagtaatattaggtattctgccaaaatcatt EETVISNIRYSAKII 1819 atctcaccagaagaaaatactactgtaatctgtgttgctgaaaac I S P E E N T T V I C V A E N 1864 agactgggaaaagaagttcgatcacttaatgtttcagcaatcagc R L G K E V R S L N V S A I S 1909 atcccagagacagatgagcctaatgataggagtgatgacagtagc I P E T D E P N D R S D D S S 1954 gatcatgcaaaactcattgtgggaatagtcgttggccttctcctg D H A K L I V G I V V G L L L 1999 gcagcacttatagctggagcagcctactgtatatatagtaggaaa A A L I A G A A Y C I Y S R K 2044 tccagctcagcaacgaaacatgtaggaaaagaacttggaaacaca S S S A T K H V G K E L G N T 2089 gaagaaaacaagaagcttgaggaaaataaccacaagtccgatgcc EENKKLEENNHKSDA 2134 taa 2136

3'UTR:

gaat tgtataaata caaataactc 2161 aaggaatgct gtaaaggcct gtctaaagaa tccaagtgga ttgtaattat ggaaatgaaa

8.4 Vollständige Nukleotidsequenz der DM-GRASP II mRNA

Blau markiert =	Startcodon
Rot markiert =	Stoppcodon

5'UTR:

ORF:

35	6 at	gga	aago	caa	gtg	caa	gga	ttt	CCC	tgg	tcg	tgt	gtg	tgc	tgtgt
	М	Е	A	S	А	R	I	S	L	V	V	С	V	L	С
401	gca	gcc	acc	cta	ag	gaca	agg	ctat	tgg	gcta	acaa	aaca	agto	caa	tgca
	А	A	Т	L	R	Т	G	Y	G	L	Q	Т	V	Ν	А
446	gtt	ttt	gga	igaa	ac	gatt	cata	aata	acc	atgi	-gg	tcgi	tgaa	aata	agtg
	V	F	G	Е	Т	I	I	I	Ρ	С	G	R	Е	I	V
491	gaa	gat	cta	ctg	gtt	tgca	aag	ctg	gaa	ata	tga	aaca	acct	ga	tgga
	Ε	D	L	L	F	А	S	W	K	Y	Е	Т	Ρ	D	G
536	att	gca	gta	ittt	ct	agct	tc	ccg	gtc	tgca	agt	gaaa	aaad	caa	aatc
	I	A	V	F	L	А	S	R	S	А	V	Κ	Ν	Κ	I
581	aac	tat	ggt	gat	gc	tcca	agaa	ata	caa	aaat	cg	ttt	ggaa	act	gtca
	Ν	Y	G	D	А	Ρ	Е	Y	Κ	Ν	R	L	Е	L	S
626	gaa	aac	tat	aca	att	atco	cat	tgca	aaa	tgca	agta	aata	agat	ga	tgag
	Ε	Ν	Y	Т	L	S	I	А	Ν	А	V	I	D	D	Е
671	aag	cga	ttt	gtg	gtg	cate	gct	tgti	tac	agta	aga	caat	tgtt	tt	tgaa
	K	R	F	V	С	М	L	V	Т	V	D	Ν	V	F	Е
716	gaa	cca	gca	igta	agt	caaa	agt	gtto	caa	gcci	CCC	atca	aaaa	acca	agaa
	Ε	Ρ	A	V	V	K	V	F	K	Ρ	Ρ	S	K	Ρ	Ε
761	att	cta	gag	cag	JCC	aaaa	aat	cat	gga	aaca	agga	aaag	gata	aaa	tagg
	I	L	E	Q	Ρ	K	I	Μ	Е	Т	G	K	I	Ν	R
806	gtt	gga	gtc	tgt	gt	tgct	caa	aga	tag	cta	CCC	aga	tgga	aaa	catt
	V	G	V	C	V	A	K	D	S	Y	Р	D	G	Ν	T
851	acg	tgg	ttc	aga	aaa	tggo	caa	gate	gct	ttto	gcc:	agti	tgat -	aga	agct
005	T.	W	F.	R .	N	G .	K	Μ	Г	Ь.	Р	V	D.	R	A
896	gtg	att	ata -	igto	gtg	gcat	zaaa	agaa	aaa	aaat	tte	ttci	tagt	gg	cctt
0.4.1	V .	T	T	V	W	H	K.	E	K.	N	S	S	S	G	Ц
941	tat	agc	acg	icac	ctc	atca	acti	tcag	gta 	Ctt	gaca	aaca	aaag	gga	ggac
005	Y.	S	.т.	н	S	S	Ь	Q	Υ.	Ц	.Т.	.T.	ĸ	E	D .
986	ata -	.aga	gct	ttt		cago	ctg	taca	agt	taco	cta		tate	JCC	aaat
1001	T	R	A	Ъ.	F.	S	C	.Т.	V	т. . т.	Y	F.	M	Ρ.	N
1031	gga	.caa	gta	ITCS	Jgc.	tgaa	atc	tga(cac	tgci	cag	ככני	cgat	at	ttat
1076	G	Q	V	2	А	E	S	D	.Т.	A	5	F.	D	T	Ϋ́
10/6	сас	CCQ	aca	igac	laa	yqta	aca	aati	LCa	yata	aca	1002	atCa	aaa	aaaq

ΥΡΤΕΚΥΤΙΟΙΟΡSΚ K 1121 tacataaaggaaggtgataacatcactctccaatgtagaggaaat Y I K E G D N I T L Q C R G N 1166 ggtaatccgcctccgcaagaatttttgtattaccttccaggtcaa G N P P P Q E F L Y Y L P G Q 1211 gaacaaggtgtcgtcagttcaagtgcctaccacataaccgacata EOGVVSSSAYHIT D I 1256 aaacgaaatgcaactggggattataaatgttctctatcagataaa K R N A T G D Y K C S L S D K 1301 aacatgatggcatctacaacagtcactgtgcattatctagacctg N M A S T T V T V H Y L D L 1346 tetttaacaccaagtggagagattactaaacaaattggagattee S L T P S G E I T K Q I G D 1391 ttttctgtgttgtgtgttccatttgcaagtaaaaatgtatcagtc F S V L C V P F A S K N V S V 1436 ctgtttatgaaagacagcaaaatattgacagcaatcccttctaag L F M K D S K I L T A I P S K 1481 aacttacagtatcgtgattcaggtgtttacgaatgcttggctaac N L Q Y R D S G V Y E C L A N 1526 ctggaagaggaaggtttacaaagtcgaaaaacatttaagcttact LEEGLQSRKTFKLT 1571 gtagaaggaaaaccaaaacttaaactaataaaaaatccgttctct V E G K P K L K L I K N P F S 1616 gatggaaagactaaaacaatcagttacgaagttgaaggctttcca DGKTKTISYEVEGFP 1661 agaccagaagtgtactgctccagtgcaggacaattggtccaccta R P E V Y C S S A G Q L V H L 1706 aacaaaacagaagagacggtgataagtaatattaggtattctgct NKTEETVISNIR YS Α 1751 aaaatcattatctcaccagaagaaaatactactataagttgtgta K I I I S P E E N T T I S C V 1796 gctgaaaacaggctgggaagagagattcgatcactaaatgtttca A E N R L G R E V R S L N V S 1841 gcaatcagcatcccagagaaagatgagcgtaatgatagcagtgat A I S I P E K D E R N D S S D 1886 gacagtagtgatcatgcaaaactcattgtgggaattgtcgttggc D S S D H A K L I V G I V V G 1931 cttctcctggccgcacttgtcgctggaatagcctattgtttatac LLAALVAGIAYCLY 1976 atcaggaaatctggcgcaggaacgaaacatgtaggaaaagaactt IRKSGAGTKHVGKEL 2021 ggaaacaaagaagaaaacaagaagcttgaggaaaataaccacaag G N K E E N K K L E E N N H K 2066 tcagaagcctaa 2077 SEA

<u>3'UTR:</u>

attgttaaattgcagtaaatagtttttgccatattttttcttaacaatcaccattattggccctggacttgcaggctaggtttacatgtattcctgtgtgctcttgtctaatggttgggatatggcatatgtaagcacctttggtctgaaagtttgggttacttttgttctttaatccagagattgccacaaccaggagtctttaaatgggatgcttttatgttgtgaagcacttttgtttcacagccatgcatttcagtatatacttctcaaatggctcatattcacttgtgcttgctcttgcatccattgggtgctgttttatgtaccagttgtgcatgagcttaatttaagtgtcagtgacacctactaa agattcagatggatagttggcaccacataatcagaaaaacatcttctgctttattacagctgccagtacctagacacacattttatcag gaat catgttgttatgtttctggagtaatttcccttgtggtgactgataaactaatcttgaattattgtattttaattcttgcaaattctcaaataagttaatcttgagtcttacctaagaaattatggtcttattatagtatgggctggcagtttccagccatttaaggagtcaattgacaccacaaaaaaataataatacaggtatgggatccagaaacccattatccagaaaactcagaattatgtgatagctgtcttccataaact acattatatccaaataatcc aagtatttaa agggattctg tcatgatttt tattgtgtagtttttatttctaaattaaactgtatacaccgtatgtaattcactctagcttataaagtttcattcctaacccaataagtgtaaattagctgtaatattggtgtgtggcggccatctcaggttattatgcctggtgatgtgctttcagaaagagccagtcctgcactatggacctgetttetgacaggetattgtteeteetacteaatgtaactggagaagttgcagtgggacttggatatttaetattgagtgetgtteatatatcagggcagcagtaaagagtgactgaattttatcagagcacaagtcacatgactgaggtacctgggaaactgacaatatgtatagcc

8.5 Vollständige Nukleotidsequenz der RGM A2 mRNA

Blau markiert =	Startcodon
Rot markiert =	Stoppcodon

<u>5'UTR:</u>

cctcgggctgggaaggggctc

RGM A2 ORF:

22	at	gca	gcc	gat	aag	ggc	gaa	ggt	tgc	ggt	taa	agc	ccaa	age	tgga
	М	Q	Ρ	I	R	А	Κ	V	А	V	Κ	А	Q	А	G
67	tg	gat	ada	tat	ggg	gag	agg	ggc	agg	acc	caa	agc	cct	ggg	attc
	W	М	G	М	G	R	G	А	G	Ρ	Κ	А	L	G	F
112	tt	caa	aat	cct	cac	tgt	ctt	ctt	gtg	cac	ttt	tca	taca	agt	gagc
	F	Κ	I	L	Т	V	F	L	С	Т	F	Η	Т	V	S
157	tc	atc	gtg	caa	gat	ttt	gaa	gtg	cac	tgc	tga	cta	ctt	gca	agcg
	S	S	С	К	I	L	К	С	Т	А	D	Y	L	Q	А
202	ac	ttc	caa	CCC	gca	cca	tca	cac	agg	agc	tga	gga	cac	ggt	ggag
	Т	S	Ν	Ρ	Η	Η	Η	Т	G	А	Е	D	Т	V	Ε
247	at	ctg	cac	ggc	att	acg	cac	cta	cgc	cca	ctg	cag	ccga	acg	caca
	Ι	С	Т	А	L	R	Т	Y	А	Η	С	S	R	R	Т
292	gc	acg	cac	ttg	cag	agg	aga	cct	ggc	tta	сса	ttca	aact	tgt	ccat
	А	R	Т	С	R	G	D	L	А	Y	Η	S	Т	V	Η
337	gg	cat	cga	tga	cct	cat	gag	сса	сса	taa	ctg	ctc	caaa	aga	tggc
	G	I	D	D	L	М	S	Η	Η	Ν	С	S	K	D	G
382	CC	cac	ctc	tca	gcc	acg	tgt	gcg	cat	ctt	gcc	CCC	agga	aga	cagc
	Ρ	Т	S	Q	Ρ	R	V	R	I	L	Ρ	Ρ	G	D	S
427	са	aga	gag	gtc	gga	cag	CCC	tga	aat	atg	tca	tta	tgaa	aaaa	aagc
	Q	Е	R	S	D	S	Ρ	Ε	I	С	Η	Y	Е	K	S
472	tt	cca	cag	acc	ctc	tgc	cct	tcc	aaa	cta	cac	cca	ctg	tgg	cctc
	F	Η	R	Ρ	S	А	L	Ρ	Ν	Y	Т	Η	С	G	L
517	tt	tgg	aga	CCC	cca	tct	tag	gac	gtt	ttc	aga	cac	ttt	tca	gacc
	F	G	D	Ρ	Η	L	R	Т	F	S	D	Т	F	Q	Т
562	tg	caa	aat	cca	agg	cgc	ttg	gcc	cct	cat	aga	caa	taa	tta	cttg
	C	ĸ	T	0	G	Δ	W	P	Τ.	Т	D	N	N	Y	T.

607 aacqtqcaqqttaccaacactcctqtqcttccaqqatcaactqcc N V Q V T N T P V L P G S T A 652 acagccaccagcaagttgactatcattttcaagaacttccaggag TATSKLTIIFKNFQE 697 tgtgtagaccagaaagtgtaccaggctgagatgaacttcct C V D Q K V Y Q A E M D E L P 742 gcagctttcattgatggttcgaaaaatggtggagacaagagtgga A A F I D G S K N G G D K S G 787 gccaacagcttgagaatcattgagaaagttgccgggcagcacatt A N S L R I I E K V A G Q H I 832 gagatccaggccaagtacatcggcaccacaattgtggtccgtcag EIQAKYIGTTIVVRQ 877 gtgggtcactacttgaccttcgcagtccggatgccagaggaggtt V G H Y L T F A V R M P E E V 922 gtgaatgctgtggaggacaaggataaccagggactttacttgtgc V N A V E D K D N Q G L Y L C 967 ctccacggttgccctcaaaaccagcagattgactttcgaaacttt L H G C P Q N Q Q I D F R N F 1012 cacttgcaagccccagagactggtcttaagaggctaaccagtgcc H L Q A P E T G L K R L T S A 1057 tccagtgctgcttccttcaccccccaaacggcagaagccaagtgc S S A A S F T P Q T A E A K C 1102 aaggagaagctgccagtgaaggacctctacttccagtcttgcgtc K E K L P V K D L Y F Q S C V 1147 tttgacctcctcaccacaggggacgtgaatttcacattagctgct FDLLTTGDVNFTLAA 1192 tattacgccttcgaggatgtgaagctattacactccaacaagaac Y Y A F E D V K L L H S N K N 1237 aaagtccatttgtttgaaaggaccatagacttggggcctccgaat K V H L F E R T I D L G P P N 1282 actgctccccgagccgggatggacattcccaaactcctagtggct TAPRAGMDIPKLLVA 1327 ttcgtgtgtttgattcttcagtgctgtgcaatgttgctgtaa 1368 FVCLILQCCAMLL*

8.3 Vektorkarten

8.3.1 pCS2+ Vektorkarte



8.3.2 pCR^R4-TOPO



Quelle: www.invitrogen.com

8.3.3 pCR^R4Blunt-TOPO



177

Quelle: www.invitrogen.com

8.3.4 pCR^R-TOPO



*ccd*B lethal gene ORF: bases 580-882 Kanamycin resistance ORF: bases 1231-2025 Zeocin resistance ORF: bases 2231-2605 pUC origin: bases 2673-3386

Quelle: www.invitrogen.com

<u>Lebenslauf</u>

Persönliche Daten:

Name: Anschrift:	Susanne Julia Gessert Rechbergweg 71 89075 Ulm
Geburtsort:	Ulm
Geburtsdatum: Familienstand:	28.01.1980 ledig
<u>Schulausbildung:</u>	
1986-1999	Freie Waldorfschule in Ulm Abschluss Allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung:	
1999-2001	Universität Ulm, Grundstudium Biologie (Diplom) Abschluss Vordiplom
2001-2004	Universität Ulm, Hauptstudium Biologie (Diplom), Thema der Diplomarbeit: "Isolierung und Charakterisierung von <i>Xenopus laevis</i> Pescadillo"
2004-2007	Universität Ulm, Promotion am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie Titel der Dissertation: "Untersuchung potentieller Zielgene des nicht-kanonischen Wnt- Signalwegs".
Praktika:	
2002	4 Wochen Industriepraktikum bei MWG Biotech
2002	4 Wochen Industriepraktikum in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie an der Universität
2002	3 Wochen Industriepraktikum bei der Brauerei Gold Ochsen in Ulm
<u>Nebentätigkeiten</u>	
2003	3 Monate wissenschaftliche Hilfskraft in der
2004	3 Monate wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Biochemie an der Universität Ulm

Lehrtätigkeiten:

2005:

- > Tutor für die Veranstaltung "Integrierte Seminare" 3. Semester Medizin
- Betreuung einer Bachelorarbeit (2 Monate); Thema: "Darstellung der Expression ausgewählter Gene während der Embryonalentwicklung von Xenopus laevis" von Mariana Pfreimer
- Betreuung des Biochemiepraktikums 4.Semester Medizin

2006:

- > Integrierte Seminare 3. Semester Medizin
- Betreuung des Biochemiepraktikums 4.Semester Medizin
- Abnahme mündlicher Physikumsprüfungen im Fach Biochemie für Mediziner

2007:

- > Integrierte Seminare 3. Semester Medizin
- > Betreuung des Biochemiepraktikums 4. Semester Medizin
- Abnahme mündlicher Physikumsprüfungen im Fach Biochemie für Mediziner
- Betreuung einer Diplomarbeit; Thema: "Generierung und Expression eines Fusionsproteins zur funktionellen Untersuchung von Xenopus laevis RGM A" von Verena Bugner
Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, im Juli 2007

Susanne Gessert

Danksagung

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Kühl bedanken, welcher mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen und mir während der ganzen Zeit mit seiner fachlichen Kompetenz zur Seite stand. Darüber hinaus wertschätze ich, dass er mir die Teilnahme an internationalen Konferenzen, welche stets zum Austausch von wissenschaftlichen und gebietsübergreifenden Thematiken dienten, ermöglichte.

Im Voraus auch ein herzliches Dankeschön an die beiden Gutachter Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel und Herrn Prof. Dr. Stefan Binder, die die Aufgabe übernommen haben, meine Doktorarbeit zu bewerten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Daniel Maurus bedanken, der mir in den Anfängen meiner Labortätigkeit viele Tipps und Kniffe gezeigt und mich trotz der Distanz zwischen Cambridge und Ulm in den vergangenen zwei Jahren jederzeit sehr hilfreich mit Rat und Tat unterstützt hat.

Bei Frau Dr. Petra Pandur bedanke ich mich für fachliche Unterstützung bezüglich der Herzentwicklung in *Xenopus laevis*.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Thomas Brade und Robert Cus für die konstruktive und humorvolle Zusammenarbeit im Elba- und Froschlabor.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch Doris Weber, Petra Dietmann und Ulrike Stötzner für ihre guten Ratschläge und die kommunikative Zusammenarbeit.

Für die heiteren Momente bedanke ich mich bei den Mädels Verena, Meera, Franzi, Barbara und Tabea, wodurch mißglückte Experimente etwas erträglicher wurden.

Ein Dank auch an Isabel Burkhart und Stefanie Scherer, die mich jederzeit freundlich und zuvorkommend im Sekretariat empfangen haben.

Bei Monika Gulde bedanke ich mich für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Zudem ein Dank an Herrn Dr. Stephan Wacker und Herrn Dr. Maximilian Schuff für viele wertvolle Tipps sowie an alle Mitarbeiter der Institute für "Biochemie und Molekulare Biologie" und "Biochemie", die immer für eine gute Stimmung im Labor sorgten.

Abschließend möchte ich meiner Familie sowie meinen Freunden für ihr Interesse an meiner Doktorarbeit danken.