**Größenregulation der Augenanlage von *Xenopus laevis* durch Inhibition
von Hedgehog-, Fgf- und Wnt-Signalen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Yvonne Cornesse

aus Gerolstein

Göttingen 2003

Referent: Prof. Dr. Tomas Pieler

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2003

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	VII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Auge von <i>Xenopus laevis</i>: Anatomie und Entwicklung	1
1.1.1 Anatomie des Auges	1
1.1.2 Augenentwicklung	2
1.2 Grundlage der Augenentwicklung: Musterbildungsprozesse in der offenen Neuralplatte	4
1.2.1 Entstehung des neuralen Ektoderms	4
1.2.2 Regionalisierung der anterioren Neuralplatte und Induktion des frühen Augenfeldes	7
1.3 Die Rolle von Hedgehog, Fgf, Wnt und Retinsäure bei der Induktion und Regionalisierung des neuralen Ektoderms	9
1.3.1 Hedgehog	9
1.3.2 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fgf)	12
1.3.3 Wnt	15
1.3.4 Retinsäure	19
1.3.5 Interaktionen zwischen dem Hedgehog-, Fgf-, Wnt- und Retinsäure-Signalweg	20
1.4 Kontrolle des Hedgehog-Signalwegs: Hedgehog-interagierendes Protein	21
1.5 Ziel der Arbeit	22
2. MATERIAL	24
2.1 Versuchstiere	24
2.2 Bakterienstamm und Genbank	24
2.3 Vektoren und Oligonukleotide	24
2.4 Antikörper, Enzyme und Reaktionssysteme (Kits)	28
2.5 Medien und Lösungen	29
2.6 Chemikalien	30
2.7 Geräte	30

3.	METHODEN	32
3.1	DNA-Methoden	32
3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA	32
3.1.1.1	Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab	32
3.1.1.2	Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab	32
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.1.3	Restriktionsspaltung von DNA	33
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.6	PCR-vermittelte <i>in vitro</i> -Mutagenese	34
3.1.7	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	35
3.1.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	35
3.1.8.1	PCR Purification Kit (Quiagen)	35
3.1.8.2	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	36
3.1.9	Subklonierung von DNA-Fragmenten	36
3.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.1.11	Klonierung von PCR-Produkten	37
3.1.12	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen	37
3.1.13	Elektrotransformation kompetenter Bakterienzellen	37
3.1.14	Nachweis der Integration klonierter DNA-Fragmente	38
3.2	RNA-Methoden	38
3.2.1	Isolierung von DNA-freier Gesamt-RNA aus <i>Xenopus laevis</i>	39
3.2.1.1	Embryonalstadien	39
3.2.1.2	Adulte Gewebe und Organe	39
3.2.1.3	Animale Gewebeexplantate	40
3.2.2	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
3.2.2.1	Semiquantitative RT-PCR	40
3.2.3	cDNA-Synthese und RT-PCR mit der RACE ("rapid amplification of cDNA ends") Technik	41
3.2.3.1	SMART-RACE cDNA-Synthese	41
3.2.3.2	SMART-RACE RT-PCR	41
3.2.3	<i>In vitro</i> Synthese von RNA	42
3.2.3.1	<i>In vitro</i> Synthese markierter RNA-Sonden	42
3.2.3.2	<i>In vitro</i> Synthese von Cap-RNA für Mikroinjektionen	42
3.2.3.3	Aufreinigung synthetischer RNA	42
3.3	Durchmusterung einer cDNA Bank	43
3.3.1	Bestimmung des Phagentiters	43
3.3.2	Phagenplattierung	43
3.3.2.1	Phagenplattierung auf NZY-Agar-Platten	43
3.3.2.2	Phagenplattierung in Mikrotiterplatten	44

3.3.3	Anreicherung eines Kandidaten-Phagen	44
3.3.4	Isolation eines spezifischen Phagen	44
3.3.5	Zirkularisierung (Exzision) des Phagen-Inserts	45
3.4	Präparation von <i>Xenopus</i>-Embryonalstadien	45
3.4.1	Präparation von <i>Xenopus</i> -Testis	45
3.4.2	Stimulation der Eiablage	46
3.4.3	Befruchtung und Entwicklung	46
3.5	Mikromanipulation von <i>Xenopus</i>-Embryonen	46
3.5.1	Mikroinjektionen	46
3.5.2	Inhibition der mitotischen Aktivität durch Behandlung mit Hydroxyurea/Aphidicolin (HUA)	47
3.5.3	Markierung von Zellgruppen mit Fluoreszenzfarbstoffen	47
3.6	Präparation und Kultivierung von animalen Gewebeexplantaten („animal caps“)	48
3.7	<i>In situ</i> Hybridisierung und Histologie	48
3.7.1	Fixierung von <i>Xenopus</i> -Embryonen	48
3.7.2	β -Galactosidase-Färbung	49
3.7.3	“Whole mount” <i>in situ</i> Hybridisierung an Embryonen	49
3.7.3.1	Rehydrieren der Embryonen	49
3.7.3.2	Proteinase K-Behandlung	49
3.7.3.3	Refixierung	50
3.7.3.4	Waschen	50
3.7.3.5	Antikörper-Inkubation	50
3.7.3.6	Farbentwicklung	51
3.7.3.7	Abstoppen der Färbung und Auswertung	51
3.7.4	<i>In Situ</i> Hybridisierung an animalen Kappen	52
3.7.4.1	Rehydrierung	52
3.7.4.2	Acetylierung und Refixierung	52
3.7.5	Anfertigen von Gewebeschnitten	53
3.7.5.1	Vibratomeschnitte	53
3.7.5.2	Kunststoffschnitte	53
3.7.5.3	Paraffinschnitte	54
3.8	Histochemie	54
3.9	Nachweis von proliferierenden oder apoptotischen Zellen	55
3.9.1	Nachweis von proliferierenden Zellen durch Inkorporation von BrdU	55
3.9.2	Nachweis von apoptotischen Zellen durch TUNEL-Analyse	56

3.10	Immunfärbung an ganzen Embryonen	56
3.10.1	Nachweis von proliferierenden Zellen durch Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (pH3)	56
3.10.2	Nachweis von MAPK und phosphoMAPK	57
3.11	Protein-Methoden	58
3.11.1	<i>In vitro</i> -Translation	58
3.11.2	Ko-Immunopräzipitation <i>in vitro</i> -translatierter Proteinen	58
3.11.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; nach Laemmli, 1970)	59
3.11.4	Western Blot	59
4.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	61
4.1	Isolierung und Charakterisierung des <i>Hip</i>-Homologs aus <i>Xenopus laevis</i>	61
4.1.1	Klonierung von <i>Xhip</i>	61
4.1.2	Konservierung putativer funktioneller Domänen von <i>Xhip</i> im Vergleich mit anderen <i>Hip</i> -Homologen	61
4.2	Expression von <i>Xhip</i> in <i>Xenopus laevis</i>	65
4.2.1	RT-PCR Analyse der <i>Xhip</i> Expression	66
4.2.2	<i>In situ</i> Hybridisierung mit <i>Xhip</i> in unterschiedlichen Embryonalstadien von <i>Xenopus laevis</i>	66
4.3	Regulation der <i>Xhip</i>-Expression	66
4.3.1	Überexpression von <i>Shh</i> führt zur Induktion der <i>Xhip</i> -Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen	66
4.3.2	Regulation der <i>Xhip</i> -Expression durch verschiedene Signalmoleküle in Explantaten der animalen Kappe	68
4.4	<i>Hip</i> als multifunktionaler Antagonist des Shh-, Fgf- und Wnt8-Signalwegs	70
4.4.1	<i>Hip</i> inhibiert den Shh- und den Fgf-Signalweg in animalen Gewebeexplantaten	70
4.4.2	Interaktion zwischen <i>Hip</i> und <i>Fgf</i>	73
4.4.3	<i>Hip</i> inhibiert spezifisch den Wnt8-Signalweg	75
4.4.4	<i>Hip</i> , <i>Shh</i> , <i>Fgf8</i> und <i>Wnt8</i> werden in benachbarten Regionen in <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen exprimiert	76
4.5	Komplementäre Auswirkungen der Überexpression von <i>Hip</i> und <i>Hedgehog</i>	78
4.5.1	Phänotypische Effekte der Überexpression von <i>Hip</i> und <i>Bhh</i>	78
4.5.2	Einfluß der Überexpression von <i>Hip</i> und <i>Shh</i> auf die Entwicklung des visuellen Systems	80

4.5.3 Einfluß der Überexpression von <i>Hip</i> und <i>Shh</i> auf die Musterbildung im embryonalen Gehirn	81
4.5.4 Ektopische Photorezeptorzellen in der Retina nach Überexpression von <i>Hip</i>	82
4.6 Verstärkte Aktivität eines sezernierten <i>Hip</i>-Konstruktes (<i>mHip</i>Δ<i>TM</i>)	83
4.7 Vergleich der Überexpression von <i>Hip</i> mit der Inhibition des Shh-, Fgf- und Wnt8-Signalwegs	86
4.8 Nachweis des retinalen Primordiums durch Zellmarkierung	87
4.9 Einfluß der Überexpression von <i>Hip</i> und <i>Shh</i> auf die Musterbildungsprozesse in frühen Embryonen	88
4.10 Die Vergrößerung des Auges nach Überexpression von <i>Hip</i> wird nicht durch Proliferation oder verminderte Apoptose verursacht	89
4.10.1 Überexpression von <i>Hip</i> bewirkt keine Verminderung der Apoptoserate im Auge	90
4.10.2 Die Expansion des frühen Augenfeldes nach Überexpression von <i>Hip</i> wird nicht durch eine erhöhte Proliferationsrate bewirkt	91
4.10.3 Die von <i>Hip</i> ausgelöste Expansion des frühen Augenfeldes wird durch Inhibition von Mitose nicht verhindert	92
4.11 <i>mHip</i> und <i>Xhip</i> haben die gleiche Aktivität in <i>Xenopus laevis</i>-Embryonen	93
5. DISKUSSION	95
5.1 Konservierte Domänen im putativen <i>Xhip</i>-Protein	95
5.2 Expression und Regulation von <i>Xhip</i>	96
5.3 <i>Hip</i> ist ein multifunktioneller Antagonist von Shh-, Fgf- und Wnt-Signalen	100
5.3.1 <i>Hip</i> kontrolliert den Shh-, Fgf- und Wnt-Signalweg in animalen Gewebeexplantaten und im ganzen Embryo	100
5.3.2 <i>Hip</i> , <i>Shh</i> , <i>Fgf8</i> und <i>Wnt8</i> werden in <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen komplementär exprimiert	103
5.4 Die Überexpression von <i>Hip</i> beeinflußt die Musterbildung innerhalb der sich entwickelnden Augen	104
5.4.1 Die Auswirkungen der Überexpression von <i>Hip</i> verdeutlichen den Einfluß von <i>Shh</i> auf die proximo-distale Gliederung des Auges	104

5.4.2	Die vergrößerten Augen nach Überexpression von <i>Hip</i> enthalten ektopische Photorezeptorzellen	109
5.5	Der Effekt der Überexpression von <i>Hip</i> auf die Augenentwicklung wird durch die Inhibition sowohl des Shh- als auch des Fgf- und Wnt-Signalwegs veranschaulicht	110
5.6	Hip beeinflusst die Anzahl der Vorläuferzellen in der anterioren Neuralplatte durch Änderung des Zellschicksals	112
5.7	Modell der Spezifikation des frühen Augenfeldes durch die Einwirkung von Shh-, Fgf- und Wnt-Signalen	115
5.8	Funktion von Hip in <i>Xenopus laevis</i>: Verteidiger des Zellschicksals gegen den Einfluß von Shh, Fgf und Wnt	117
5.9	Ausblick	118
6.	ZUSAMMENFASSUNG	120
7.	LITERATURVERZEICHNIS	121

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

äK	äußere Körnerschicht
äP	äußere plexiforme Schicht
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxpdisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bt	<i>Bos taurus</i> (Rind)
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dr	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
gg	<i>Gallus gallus</i> , Huhn
Gz	Ganglien-Zellschicht
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
hs	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
iK	innere Körnerschicht
iP	innere plexiforme Schicht
is	injizierte Seite
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Medium)
min	Minute
mm	<i>Mus musculus</i> (Maus)
mRNA	massenger RNA
N	Nukleotid

ni	nicht injiziert
nis	nicht-injizierte Seite
OD	Optische Dichte
ol	<i>Oryzias latipes</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“ (zufällige Amplifikation von cDNA Enden)
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	„sodium dedecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
Sol	„Solution“ (Lösung)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA (Elektrophoresepuffer)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydromethyl)aminoethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UTR	„untranslated region“ (untranslatierte Region)
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis von Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
xl	<i>Xenopus laevis</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Das Auge von <i>Xenopus laevis</i>	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Augenentwicklung am Beispiel der Maus	3
Abb. 1.3	Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	5
Abb. 1.4	Neurale Induktion	6
Abb. 1.5	Der Hedghog-Signalweg in <i>Drosophila</i>	10
Abb. 1.6	Der eFgf-Signalweg	13
Abb. 1.7	Der kanonische Wnt-Signalweg	17
Abb. 1.8	Schematische Darstellung des murinen Hip	22
Abb. 4.1	Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Xhip</i>	63
Abb. 4.2	Vergleich der Aminosäuresequenz von <i>Xhip</i> mit anderen Hip-Homologen	64
Abb. 4.3	RT-PCR Analyse der Expression von <i>Xhip</i> in <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (a) und adulten Organen und Geweben (b)	65
Abb. 4.4	Expression von <i>Xhip</i> in verschiedenen Embryonalstadien von <i>Xenopus laevis</i>	67
Abb. 4.5	Regulation der <i>Xhip</i> -Transkription	69
Abb. 4.6	<i>Hip</i> inhibiert den Shh- und Fgf-Signalweg in animalen Kappen	71
Abb. 4.7	Inhibition der Fgf Signalkaskade durch <i>Hip</i>	73
Abb. 4.8	Hip und Fgf8 interagieren nicht direkt miteinander	74
Abb. 4.9	Hip inhibiert spezifisch den Wnt8 Signalweg	76
Abb. 4.10	Vergleich der Expression von <i>Shh</i> , <i>Hip</i> , <i>Fgf8</i> und <i>Wnt8</i>	77
Abb. 4.11	Phänotypische Effekte der Überexpression von <i>mHip</i> und <i>Xbhh</i>	79
Abb. 4.12	Komplementäre Effekte auf die Augenentwicklung nach Überexpression von <i>Hip</i> oder <i>Shh</i>	80
Abb. 4.13	Komplementäre Effekte auf die Musterbildung im Gehirn durch Überexpression von <i>Hip</i> oder <i>Shh</i>	81

Abb. 4.14	Gestörte Stratifizierung der Retina nach Überexpression von <i>Hip</i>	83
Abb. 4.15	Schematische Darstellung von mHip und mHip Δ TM	84
Abb. 4.16	Auswirkung der Überexpression von <i>mHipΔTM</i> auf die Augenentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	85
Abb. 4.17	Einfluß der Shh, Fgf und Wnt8 Signalwege auf die Augenentwicklung	86
Abb. 4.18	Nachweis des retinalen Primordiums durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff	87
Abb. 4.19	Auswirkung der Überexpression von <i>Hip</i> oder <i>Shh</i> auf die Ausbildung des frühen Augenfeldes und der anterioren Neuralplatte in <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen	89
Abb. 4.20	Analyse der Apoptoserate nach Überexpression von <i>Hip</i> oder <i>Shh</i>	90
Abb. 4.21	Überexpression von <i>Hip</i> resultiert nicht in einer Erhöhung der Proliferationsrate	91
Abb. 4.22	Mitotische Inhibitoren haben keine Einfluß auf die Expansion des frühen Augenfeldes nach Überexpression von <i>Hip</i>	93
Abb. 4.23	Vergrößerung der Retina nach Überexpression von <i>Xhip</i>	94
Abb. 5.1	Spaltung des frühen Augenfeldes unter der Einwirkung von Hedgehog-Signalen aus dem axialen Mesoderm	106
Abb. 5.2	Modell der Inhibition von Shh durch Hip im Neuralrohr	108
Abb. 5.3	Modell der Regionalisierung des frühen Augenfeldes in <i>Xenopus laevis</i> -Embryonen durch Shh-, Fgf- und Wnt-Signale	116
Tab. 5.1	Komplementäre Auswirkungen der Überexpression von <i>Hip</i> oder <i>Shh</i>	105

1. Einleitung

Die visuelle Wahrnehmung der Umgebung ist eine herausragende Sinnesleistung, die für Orientierung, Feindeserkennung, Partnerwahl und viele andere Verhaltensweisen von großer Bedeutung ist. Spezialisierte Augenformen gibt es in verschiedensten Tierarten, wie zum Beispiel das Komplexauge der Insekten, das everse Auge der Tintenfische und das Auge der Vertebraten.

Die vorliegende Arbeit thematisiert die Entstehung der Augen während der Embryonalentwicklung des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Dabei sollen im Besonderen die frühen Ereignisse betrachtet werden, die für die Ausbildung der unterschiedlichen Anteile des Auges grundlegend sind. Das Studium der Augenentwicklung soll darüberhinaus als Modellsystem dazu beitragen, auch die Entstehung anderer Organe besser zu verstehen.

1.1 Das Auge von *Xenopus laevis*: Anatomie und Entwicklung

1.1.1 Anatomie des Auges

Das Auge eines adulten Frosches zeigt den typischen Aufbau eines Wirbeltierauges (Abb. 1.1). Es wird umgeben von einer Lederhaut (Sklera), die über der Linse die Hornhaut (Cornea) bildet. Die Versorgung des Auges wird durch Blutgefäße in der Aderhaut (Chorioidea) sichergestellt. Die Linse besteht aus Linsenfaserzellen und einem äußeren Linsenepithel, sie ist durch Linsenbänder am Ciliarkörper der Aderhaut angeheftet. Das Auge des Frosches ist wie alle Wirbeltieraugen invers, d.h. die Photorezeptorzellen in der Retina sind dem Licht abgewandt. Die Nervenfasern der Retina bündeln sich im Sehnerv, der über den Augenstiel mit dem Zwischenhirn verbunden ist. Die Retina besteht aus dem retinalen Pigmentepithel und der eigentlichen neuralen Retina, deren Stratifikation durch die räumlich geordnete Abfolge der einzelnen Zelltypen hervorgerufen wird (Abb. 1.1, b). Angrenzend an das Pigmentepithel findet man die äußeren Segmente der Photorezeptorzellen, die äußere Körnerschicht wird von den Zellkörpern der Photorezeptoren gebildet. Deren Axone sowie die Zellfortsätze der Horizontal- und Bipolaren Zellen bilden die äußere Plexiforme Schicht. In der darauffolgenden inneren Körnerschicht sind die Zellkörper von Horizontalzellen, Amakrinen und Bipolaren Zellen angeordnet. Die innere Plexiforme Schicht wird von den Axonen der Amakrinen und Bipolaren Zellen sowie den Zellfortsätzen der Ganglienzellen gebildet. Die Zellkörper der Ganglienzellen bilden wiederum die Ganglien-Zellschicht. Die Axone der Ganglienzellen laufen schließlich im Sehnerv zusammen. Die Stratifikation der neuralen Retina läßt sich in einem Transversalschnitt durch das Auge eines *Xenopus*-Embryos des späten Schwanzspitzenstadiums (Stadium 45) nachvollziehen (Abb. 1.1, c; Abb. 1.3). Zur Bestimmung der Embryonalstadien wird in der vorliegenden Arbeit die Klassifizierung nach Nieuwkoop und Faber (1967) verwendet.

Abb. 1.1: Das Auge von *Xenopus laevis*. a, Schematische Darstellung eines Wirbeltierauges. b, Stratifikation der Retina. Quelle: <http://www.egbeck.de>. c, Transversalschnitt des Auges eines *Xenopus*-Embryos im Stadium 45. äK: äußere Körnerschicht; äP: äußere Plexiforme Schicht; Gz: Ganglien-Zellschicht; iK: innere Körnerschicht; iP: innere Plexiforme Schicht; Ph: Photorezeptoren; RPE: retinales Pigmentepithel.

1.1.2 Augenentwicklung

Expressionsanalysen von spezifischen retinalen Genen haben gezeigt, daß die Augenentwicklung in *Xenopus laevis*-Embryonen schon im frühen Neurulastadium (Stadium 12,5) beginnt, wobei die Vorläuferzellen von Retina und Linse innerhalb der anterioren Neuralplatte ein Primordium bilden, welches im Verlauf der Embryonalentwicklung durch den Einfluß des axialen Mesoderms gespalten wird (s. u.) (Li et al., 1997; Mangold 1931). Die Neuralplatte besteht aus neuronalen, ektodermalen Zellen, die während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* im dorsalen Bereich vom nicht-neuralen Ektoderm, der Epidermis, abgegrenzt werden.

Im Verlauf der Neurulation werden die anterio-lateralen Ränder der offenen Neuralplatte zu den Neuralfalten verdickt. Durch die Absenkung der Mittellinie zur Neuralrinne und dem dorsalen Zusammenrücken der Neuralfalten wird schließlich das Neuralrohr gebildet. Während dieses Prozesses wird auch das erste morphologische Anzeichen der Augenentwicklung sichtbar, die Entstehung der Augenbläschen, die nach lateral von dem sich bildenden Neuralrohr evaginieren (Abb. 1.2). Geraten die Augenvesikel in Kontakt mit der äußeren Hülle des Embryos im Schwanzknospenstadium, kommt es zu einer Verdickung des darüberliegenden sensorischen Ektoderms zu den Linsenplakoden. Gleichzeitig werden auch die ventral-lateralen Bereiche der Augenbläschen verdickt, durch deren anschließende Invagination die Augenbecher gebildet werden, die über den Augenstiel mit dem Vorderhirn verbunden sind (Abb. 1.2, a,b). Die Linsenplakoden sinken

im weiteren Verlauf in die Augenbecher ein und lösen sich schließlich ganz vom äußeren Ektoderm. Die innere Zellschicht des Linsenvesikels wird verdickt und bildet erste Faserzellen aus. Im Augenbecher wird die innere, verdickte Schicht zur neuralen Retina, während die äußere Schicht einlagig bleibt und das spätere retinalen Pigmentepithel bildet (Abb. 1.2, c,d). Nachdem diese ersten morphologischen Veränderungen abgeschlossen sind, kommt es zur zellulären Differenzierung des Auges. Eines der Anzeichen dafür ist die Bildung des Melanin-Pigments durch die Zellen des retinalen Pigmentepithels. In der neuralen Retina entstehen die oben beschriebenen fünf verschiedenen Zelltypen, die Axone der Ganglienzellen werden im Augennerv gebündelt. In der Linse wird der noch verbliebene Hohlraum reduziert und die äußere Zellschicht zum Linsenepithel abgeflacht, während nach Degeneration der Zellkerne in den Faserzellen die Linsenfaser entstehen (Abb. 1.2, e). Durch Fusion der ektodermalen Schicht über der Linse mit dem darunterliegenden Mesenchym entsteht die Cornea.

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Augenentwicklung am Beispiel der Maus. a) der Augenvesikel tritt in Kontakt zum Ektoderm, das daraufhin zur Linsenplakode verdickt. b) Entstehung des frühen Augenbechers mit engerem Kontakt zum Linsenektoderm. c) Invagination des Linsenektoderms und Ausbildung der zwei Schichten der Retina. d) Entstehung des Linsenvesikels mit primären Faserzellen. e) Differenzierung der Linse mit Linsenepithel und Linsenfaser, Entstehung der verschiedenen Zelltypen der Retina, Ausbildung der Axone der Ganglienzellen und Ausdehnung der Nervenfasern in den Augennerv. RPE: retinales Pigmentepithel. Nach Gilbert, 2000.

Die Entstehung des Auges ist ein klassisches Beispiel für induktive Prozesse während der Embryonalentwicklung. Als Induktion bezeichnet man eine Interaktion zwischen zwei Geweben, durch die das Zellschicksal innerhalb des responsiven Gewebes determiniert wird (Gurdon, 1987; Mangold, 1933; Spemann, 1918). Der Kontakt des Augenvesikels mit dem darüberliegenden sensorischen Ektoderm induziert die Ausbildung der Linsenplakode; wird der Augenvesikel eines Embryos entfernt, bildet sich auch keine Linse aus. Durch Transplantationsexperimente hat man allerdings herausgefunden, dass nicht jeder Bereich des Ektoderms auf die Signale des Augenvesikels antworten kann. Die Linseninduktion setzt vielmehr eine Kompetenz des entsprechenden ektodermalen Bereiches voraus, die nur in einem bestimmten Zeitabschnitt der Entwicklung vorhanden ist (Grainger et al., 1992; Saha et al., 1989). Induktive Vorgänge sind meist wechselseitig. So wird umgekehrt der Augenvesikel durch Signale aus der Linse dazu angeregt, den

Augenbecher zu bilden und zu differenzieren. Neuere Studien haben gezeigt, daß die Linse für die Ausbildung und Differenzierung der Retina unerlässlich ist (Ashery-Padan et al., 2000; Zygar et al., 1998).

1.2 Grundlage der Augenentwicklung: Musterbildungsprozesse in der offenen Neuralplatte

Voraussetzung für die Entwicklung und Differenzierung der Augen ist die Ausbildung der anterioren Neuralplatte, die die frühen Augenanlagen beinhaltet. Im Folgenden werden die molekularen Prozesse beschrieben, die zur Entstehung und Regionalisierung des neuralen Ektoderms im *Xenopus laevis*-Embryo führen.

1.2.1 Entstehung des neuralen Ektoderms

Die neurale Induktion im *Xenopus laevis*-Embryo wird durch das sogenannte “*default model of neural induction*” beschrieben (Munoz-Sanjuan und Hemmati-Brivanlou, 2002; Weinstein und Hemmati-Brivanlou, 1999 und Referenzen darin). Dieses Modell besagt, daß das eigentliche Entwicklungsschicksal des Ektoderms neural ist. Tatsächlich entwickeln sich naive, dissoziierte ektodermale Zellen ohne Einfluss von induktiven Signalen zu neuralem Gewebe. Kultiviert man isoliertes Ektoderm allerdings im Gewebeverband, so entsteht daraus Epidermis. Die epidermale Induktion unterliegt dabei der Aktivität von BMP (“*Bone morphogenic protein*”)-Signalen, insbesondere BMP4 (Köster et al., 1991; Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995). BMPs sind Mitglieder der TGF β -(„*Transforming Growth Factor- β* ”)-Familie sezernierter Signalmoleküle, die eine ventralisierende Wirkung bei der Entstehung des Mesoderms ausüben (Dale et al., 1992; Fainsod et al., 1994; Jones et al., 1996). Erst durch die Blockierung des BMP-Signalwegs wird die Neuralisation wieder möglich. Diese Inhibition wird durch sezernierte BMP-Inhibitoren aus dem sogenannten Spemann-Organisator (s.u.) geleistet (Abb. 1.4, Stadium 10). Dazu gehören Chordin, Noggin und Follistatin (Hemmati-Brinvalou et al., 1994; Piccolo et al., 1996; Sasai et al., 1994; Smith und Harland, 1992; Smith et al., 1995).

Das neurale Ektoderm entsteht im dorso-anterioren Bereich des Embryos. Die Spezifikation von Dorsal und Ventral wird schon unmittelbar nach der Befruchtung der Eizelle durch die kortikale Rotation festgelegt, bei der äußere Bestandteile des Zytoplasmas, der Kortex, gegenüber dem inneren Endoplasma rotieren. Auf der Seite der Spermien-Eintrittsstelle entwickelt sich der ventrale, auf der gegenüberliegenden Seite der dorsale Bereich (Abb. 1.3). Als molekulare Grundlage wird dabei die dorsale nukleäre Akkumulation von β -Catenin angesehen, einer Komponente des Wnt-Signalwegs (Larabell et al., 1997). Die Blockierung von β -Catenin in *Xenopus laevis*-Embryonen inhibierte die Ausbildung von dorsalen Strukturen, wohingegen die Überexpression von β -Catenin-mRNA zur Entstehung einer sekundären embryonalen Körperachse führte (Funayama et al., 1995; Guger und Gumbiner, 1995; Heasman et al., 1994).

Die Überexpression synthetischer mRNA ist eine oft angewandte Methode zum Studium der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Der Umstand, daß bei der ersten Furchungsteilung schon die rechte und linke Körperhälfte des Embryos festgelegt wird, ermöglicht es, durch Injektion von mRNA in eine der beiden resultierenden Zellen nur eine Körperhälfte des Embryos zu beeinträchtigen, während die andere als Kontrollseite dienen kann.

Abb. 1.3: Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Nach der Befruchtung des Eis (Stadium 1) erfolgt die Furchung und Entstehung der primären Leibeshöhle in der Blastula (Stadium 8). Bei der anschließenden Gastrulation (Stadium 10-12) werden Endoderm und Mesoderm durch Zellbewegungen innerhalb des Mesoderms ins Innere des Embryos verschoben. Während der Neurulation entsteht aus der offenen Neuralplatte das Neuralrohr (Stadium 16). Die Organogenese erfolgt während der Entwicklung zum Schwanzknospenstadium (Stadium 26). Der Embryo befreit sich anschließend aus der ihn umhüllenden Vitellinmembran, schwimmt frei umher und kann Nahrung von außen aufnehmen (Schwanzspitzenstadium; Stadium 45). Während der Metamorphose werden die Extremitäten ausgebildet, Schwanz und Kiemen reduziert und der Organismus auf Lungenatmung umgestellt. Die Entwicklung von der befruchteten Eizelle zum adulten Tier dauert in etwa 60 Tage. Nach Wolpert, 1988.

Bei der Entstehung des neuralen Ektoderms spielt das dorsale Mesoderm eine entscheidende Rolle. Das Mesoderm bildet sich im Blastula-Stadium äquatorial zwischen den animalen, pigmentierten und den vegetalen, unpigmentierten und dotterreichen Zellen des Embryos (Abb. 1.3). Es wird durch Signale aus dem sogenannten Nieuwkoop-Zentrum induziert, das sich genau da ausbildet, wo vegetaler und dorsaler Bereich überlappen (Nieuwkoop, 1969) (Abb. 1.4, Stadium 8). Die Verfügbarkeit von β -Catenin führt dort zur Aktivierung spezifischer Gene wie z.B. *Siamois* (Lemaire et al., 1995). Durch die Translation maternalen mRNA liegt im vegetalen Bereich außerdem ein hohes Niveau des

Transkriptionsfaktors VegT sowie eines Moleküles der TGF β -Familie, Vg1, vor. Durch das Zusammenwirken von β -Catenin und VegT/Vg1 im dorsal-vegetalen Bereich wird ein Gradient von Vertretern der “Nodal-related”-Familie (Xnr1, Xnr2, Xnr4) induziert (Agius et al., 2000) (Abb. 1.4, Stadium 9). Dieser Gradient spezifiziert das Mesoderm: im Bereich niedriger Xnr-Aktivität entsteht ventrales Mesoderm, mittlere Aktivität führt zur Entstehung des lateralen Mesoderms und eine hohe Xnr-Aktivität induziert schließlich zusammen mit Siamois die Expression von spezifischen Genen des dorsalen Mesoderms wie *Gooseoid* (Laurent et al., 1997).

Die induktiven Eigenschaften des dorsalen Mesoderms werden am besten durch ein wegweisendes Experiment von Hilde Mangold und Hans Spemann verdeutlicht, bei dem die Blastoporen-Lippe eines Amphibien-Embryos in den ventralen Bereich eines Empfängerembryos transplantiert wurde (Spemann und Mangold, 1924). Das Ergebnis war die Entstehung eines vollständigen zweiten Embryos, wobei in den ventralen Zellen des Empfängerembryos durch das Transplantat die Ausbildung dorsaler Strukturen wie Neuralrohr oder Somiten induziert wurde. Das mesodermale Gewebe der dorsalen Blastoporenlippe wird deshalb auch als Spemann-Organisator bezeichnet (s.o.; Abb. 1.4, Stadium 10).

Abb. 1.4: Neurale Induktion. Im späten Blastulastadium (Stadium 8) überlappen dorsal-vegetal die Aktivitäten von β -Catenin und VegT/Vg1 im Bereich des Nieuwkoop-Zentrums. Gemeinsam induzieren sie die Expression von Genen der “nodal-related”-Familie (*Xnr*), wodurch ein Xnr-Gradient von dorsal nach ventral entsteht (Stadium 9). Hohe Xnr-Aktivität induziert zusammen mit dem durch β -Catenin aktivierten Siamois das dorsale Mesoderm. Die dort sezernierten Moleküle Chordin, Noggin oder Follistatin inhibieren die ventralisierende Aktivität von BMP4 und spezifizieren so den Spemann-Organisator. Das darüberliegende Ektoderm wird daraufhin neuralisiert (Stadium 10). Nach Gilbert, 2000.

Neuere Erkenntnisse lassen daran zweifeln, daß die Repression der BMP-Aktivität für die Induktion von neuralem Gewebe ausreicht. So kann beispielsweise durch ektopische Expression von *Chordin* und/oder *Noggin* in nicht-neuralem Ektoderm von Hühnerembryonen kein neurales Ektoderm induziert werden (Streit et al., 1998). Es ist daher denkbar, daß noch andere Signalmoleküle für die neurale Induktion verantwortlich

sind, die möglicherweise der Inhibition von BMP-Signalen vorausgehen. Beispiele dafür sind Mitglieder der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF), die in isoliertem *Xenopus laevis*-Ektoderm eine direkte neuralisierende Wirkung hatten, während die Überexpression einer dominant-negativen Form des IGF-Rezeptors die Inhibition der BMP-Aktivität durch Noggin blockierte (Pera et al., 2001). Der IGF-Signalweg scheint also wichtig zu sein, um die Funktion der Moleküle des Spemann-Organisators zu ermöglichen. Andere für die neurale Induktion wichtige Signalmoleküle sind Mitglieder der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren- sowie der Wnt-Familie. Die Funktion dieser Moleküle wird weiter unten näher erläutert (vgl. 1.3).

1.2.2 Regionalisierung der anterioren Neuralplatte und Induktion des frühen Augenfeldes

Nach der Induktion des dorsalen Ektoderms im *Xenopus laevis*-Embryo durch die Aktivität der sezernierten Moleküle aus dem Spemann-Organisator kommt es während der Gastrulation zur Ausbildung der offenen Neuralplatte, deren antero-posteriore Achse in zwei Schritten festgelegt wird (Eyal-Giladi, 1954; Mangold, 1933; Toivonen und Saxen, 1955). Zunächst wird das anteriore Ektoderm spezifiziert, indem das an der Grenze zwischen Endoderm und Mesoderm im Bereich der dorsalen Urmundlippe entstandene Mesendoderm durch die Gastrulationsbewegungen ans innere, anteriore Ende des Embryos gelangt. Das Mesendoderm induziert Neuroektoderm anterioren Charakters wie das zentrale Nervensystem oder die sensorischen Plakoden. Zwei wichtige Faktoren für die Induktion der anterioren neuralen Strukturen sind die Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren *Lim1* und *Otx2*, deren Deletion in Mäusen zur Reduktion des Kopfes führte (Acampora et al., 1995; Shawlot und Behringer, 1995). Im *Xenopus laevis*-Embryo werden *Lim1* und *Otx2* zunächst im Spemann-Organisator und später im einwandernden Mesoderm exprimiert (Blitz und Cho, 1995; Rebbert und Dawid, 1997). Je nachdem, wie weit das Mesoderm dabei in die Blastula eingewandert ist, wird *Otx2* in unterschiedlichen Bereichen des darüberliegenden neuralen Ektoderms induziert und wieder inaktiviert, bis die Expression ausschließlich im prechordalen Mesoderm und der darüberliegenden anterioren Neuralplatte zu finden ist.

Nach der Induktion des anterioren Bereiches erfolgt die Posteriorisierung des neuralen Ektoderms. Eine wichtige Funktion haben dabei Retinsäure, Fgf- und Wnt-Signale (s.u.). Die dorso-ventrale Achse innerhalb des sich bildenden Neuralrohrs wird unter dem Einfluß des axialen Mesoderms festgelegt, wobei die Aktivität von Hedgehog-Molekülen eine entscheidende Rolle spielt (vgl. 1.3.1).

Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Spezifikation der Neuralplatte ist die Abgrenzung des neuralen vom nicht-neuralen Ektoderm, die durch verschiedene Grenzkonzentrationen von BMP-Signalen vermittelt wird. Im Bereich hoher BMP-Konzentration entsteht Epidermis, während eine mittlere Konzentration die Entstehung der Neuralfalten und neuralen Kammzellen erlaubt, den Vorläufern von unter anderem Ganglien- oder Pigmentzellen. Die Neuralplatte wird schließlich in Abwesenheit von BMP gebildet (Marchant et al., 1998).

Die Entstehung des frühen Augenfeldes ist durch die Aktivität von Genen bestimmt, die sowohl in der anterioren Neuralplatte als auch in den späteren Augen exprimiert werden. Dazu gehören neben *Otx2* auch *Pax6*, *Rx* und *Six3* (Hirsch und Harris, 1997; Mathers et al., 1997; Zhou et al., 2000). Transkripte der zuletzt genannten Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren lassen sich im *Xenopus laevis*-Embryo im Retina- und teilweise im Linsen-Primordium nachweisen. Obwohl auch *Otx2* im späteren Auge exprimiert wird, bleiben retinale Vorläuferzellen innerhalb der Expressionsdomäne von *Otx2* in der anterioren Neuralplatte ausgespart (Andreazzoli et al., 1999). Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, daß *Otx2* nicht für die Induktion, sondern für die Aufrechterhaltung der Expression der frühen Augengene wie *Six3* verantwortlich ist (Rhinn et al., 1998).

Ein Schlüsselmolekül für die Augenentwicklung ist der Homeodomänen-Transkriptionsfaktor *Pax6*, dessen Mutation bei Mäusen den vollständigen Verlust der Augen verursachte (Hill et al., 1991; Hirsch und Harris, 1997; Ton et al., 1991; Walther und Gruss, 1991). In homozygoten *Pax6*^{-/-} Mäusen wurde zunächst ein Augenbecher gebildet, im mutierten Ektoderm konnte aber keine Linse induziert werden. Der Verlust der Linsenplakode führte schließlich zur Degenerierung des Augenbeckers (Hogan et al., 1986). Beim Menschen bewirkt eine Mutation im *Pax6*-Gen die Entstehung von Aniridia, einer erblich bedingten Fehlbildung des Auges (Jordan et al., 1992; Ton et al., 1991). Die Überexpression der *Pax6*-Homologe von Askidie, *Drosophila*, Maus oder Tintenfisch induzierte die Entstehung von Augen in Bein- oder Antennen-Imaginalscheiben von *Drosophila*-Embryonen, was auf eine hohe funktionelle Konservierung des *Pax6*-Gens im Laufe der Evolution schließen lässt (Gladon et al., 1997; Halder et al., 1995; Tomarev et al., 1997). Die Überexpression von *Pax6* in *Xenopus laevis*-Embryonen bewirkte die Ausbildung ektoptischer Linsen und Retinae, allerdings nur dann, wenn *Pax6*-mRNA in dorsale, animale Zellen injiziert wurde, die später zu neuralem Ektoderm werden (Altmann et al., 1997; Chow et al., 1999). Dies läßt darauf schließen, daß noch andere Faktoren zur Induktion der Augenentwicklung in Kombination mit *Pax6* nötig sind.

Die Überexpression von *Rx*-mRNA in *Xenopus laevis*-Embryonen führte zur Entstehung von ektoptischem RPE und Hyperproliferation der neuralen Retina, im Zebrafisch bewirkte sie eine Expansion der Retina in das Vorderhirn (Chuang und Raymond, 2001; Mathers et al., 1997). In *Rx*^{-/-}-Mäusen ist dagegen die Ausbildung der Augenvesikel gestört (Zhang et al., 2000).

Eine weitere Gruppe für die Augenentwicklung wichtiger Moleküle sind die Mitglieder der Six-Familie, Homologe des *Drosophila*-Gens *Sine oculis*. Im Gegensatz zu *Six3* wird *Six6/Optx2* allerdings nicht im frühen Augenfeld, sondern erst in späteren Neuralstadien von *Xenopus laevis* in der anterioren Neuralfalte exprimiert (Zuber et al., 1999). Die Überexpression von *Six3*- sowie von *Optx2*-mRNA führt in *Xenopus laevis*-Embryonen zur Vergrößerung der Retina (Bernier et al., 2000). Diese Größenänderung ist gekennzeichnet durch die Konvertierung von nicht-retinalen, neuroektodermalen Zellen zu Retina, begleitet von einer gesteigerten Proliferationsrate.

Pax6, *Rx*, *Six3* und *Optx2* bilden während der Spezifikation der Augen ein selbst-regulierendes Netzwerk, in dem die Transkriptionsfaktoren sich gegenseitig induzieren (Andreazzoli et al., 1999; Bernier et al., 2000; Chow et al., 1999; Loosli et al., 1999; Zuber

et al., 1999; Zuber et al., 2003). Die genauen Mechanismen, die der initialen Expression dieser Gene zugrunde liegen, sind jedoch noch unklar.

1.3 Die Rolle von Hedgehog, Fgf, Wnt und Retinsäure bei der Induktion und Regionalisierung des neuralen Ektoderms

Die Musterbildung innerhalb der Neuralplatte von *Xenopus laevis* wird durch Moleküle eingeleitet, die aus bestimmten Signalzentren des Embryos sezerniert werden. Nachdem die grundlegenden Ereignisse in den oberen Abschnitten beschrieben worden sind, soll im Folgenden auf die besondere Rolle des Hedgehog-, Fgf-, Wnt- und Retinsäure-Signalwegs bei der Regionalisierung des neuralen Ektoderms eingegangen werden.

1.3.1 Hedgehog

Das *Hedgehog*-Gen wurde ursprünglich in *Drosophila* bei der Suche nach Mutanten entdeckt, die eine Störung der larvalen Segmentierung aufwiesen (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). In der *Hedgehog*-Mutante ist die posteriore, unbehaarte Hälfte der Segmente reduziert und durch eine spiegelbildliche Duplikation der anterioren, behaarten Hälfte ersetzt, was dem Embryo ein igelartiges Aussehen verlieh ("*Hedgehog*"= engl. Igel). Eine molekulare Grundlage dieses Phänotyps liegt darin, daß Hedgehog im posterioren Teil des Segments die Expression von Zielgenen wie *wingless* (*wg*) aktiviert und aufrechterhält (Ingham, 1993). Diese Aktivierung erfolgt nicht Zell-autonom, sondern in einigem Abstand von den *Hedgehog*-exprimierenden Zellen. Dies legte den Schluß nahe, daß Hedgehog sezerniert wird, was tatsächlich durch die Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden konnte (Tabata und Kornberg, 1994; Taylor et al., 1993). Die durch Hedgehog vermittelte Musterbildung innerhalb der Segmente ist darüberhinaus konzentrationsabhängig, was Hedgehog als ein Morphogen auszeichnet (Heemskerk und DiNardo, 1994).

Hedgehog-Homologe sind in vielen Vertebraten konserviert, darunter Maus, Huhn, Ratte, Fisch, Frosch und Mensch (Chang et al., 1994; Echelard et al., 1993; Ekker et al., 1995; Krauss et al., 1993; Riddle et al., 1993; Roelink et al., 1994). In der Maus besteht die Hedgehog-Familie aus drei Mitgliedern, *Sonic Hedgehog* (*Shh*), *Indian Hedgehog* (*Ihh*) und *Desert Hedgehog* (*Dhh*) (Echelard et al., 1993). In *Xenopus laevis* wurde neben *Sonic Hedgehog* ein *Ihh*-Homolog (*Banded Hedgehog*, *Bhh*) und ein Homolog zu *Dhh* (*Cephalic Hedgehog*, *Chh*) beschrieben (Ekker et al., 1995). *Shh* ist das am besten untersuchte Hedgehog-Molekül und wird weiter unten näher betrachtet.

In der Hedgehog-sendenden Zelle wird zunächst ein Vorläuferprotein gebildet (Abb. 1.5). In einem autoproteolytischen Prozess wird anschließend durch die katalytische Aktivität des C-Terminus ein N-terminaler Teil von 19 kDa abgespalten und dabei kovalent mit einem Cholesterolest verbunden (Lee et al., 1994; Porter et al., 1996). Diese Modifizierung dient wahrscheinlich dazu, die Sekretion von Hedgehog zu kontrollieren (Lewis et al., 2001; Rietveld et al., 1999; Zeng et al., 2001). Am amino-terminalen Ende

wird Hedgehog außerdem palmitoyliert, was zur Steigerung der Signalaktivität führt (Kohtz et al., 2001; Pepinsky et al., 1998). Über den sekretorischen Weg wird das so aktivierte Hedgehog-Molekül zur Zellmembran geleitet und unter Mithilfe des Membranproteins Dispatched freigesetzt (Burke et al., 1999; Kawakami et al., 2002; Tabata und Kornberg, 1994).

Abb. 1.5: Der Hedgehog-Signalweg in *Drosophila*. In der Hedgehog (Hh)-sendenden Zelle wird ein Hh-Vorläufer durch die Aktivität der C-terminalen Domäne autokatalytisch gespalten und das entstandene N-terminale Fragment mit einem Cholesterolrest versehen. Das aktive Hh-Molekül wird unter Beteiligung des Membranproteins Dispatched freigesetzt und bindet in der Empfängerzelle an Patched, wodurch die Inhibition von Smoothened aufgehoben wird. Die Transduktion des Hh-Signals wird durch den Cubitus-interruptus (Ci)-Komplex vermittelt und führt zur Aktivierung von Zielgenen wie *Patched* (*ptc*) in einer autoregulatorischen Schleife. In Abwesenheit von Hh wirkt der Ci-Komplex als Repressor des Hh-Gens (*hh*). Nach McMahon, 2000.

In der Empfängerzelle sind zwei Transmembranproteine, Smoothened und Patched, an der Umsetzung der Hedgehog-Signalwirkung beteiligt (Abb. 1.5). In Abwesenheit von Hedgehog wird das konstitutiv aktive Smoothened von Patched gehemmt (Alcedo et al., 1996; Chen und Struhl, 1996; Hooper und Scott, 1989; Nakano et al., 1989). In *Drosophila* bewirkt diese Hemmung intrazellulär die Spaltung des Proteins Cubitus interruptus (Ci), einem Mitglied der Gli-Typ Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren (Kinzler et al., 1987; Orenic et al., 1990). Die verkürzte Form von Ci wirkt als transkriptioneller Repressor von Hedgehog-Zielgenen wie dem *Hedgehog*-Gen selbst (Aza-Blanc et al., 1997).

Durch die Bindung des Hedgehog-Moleküls an Patched wird die Inhibition von Smoothened aufgehoben. Neuere Studien lassen dabei auf einen indirekten Mechanismus schließen, wonach Hedgehog die Internalisierung von Patched und die Akkumulation von Smoothened an der Zelloberfläche fördert (Denef et al., 2000). Durch eine Kaskade intrazellulärer Vorgänge wird die Spaltung von Ci verhindert, woraufhin die unprozessierte

Form in einem mikrotubulin-gebundenen Komplex mit Fused und Costal-2 als Transkriptions-Aktivator Zielgene des Hedgehog-Signalwegs wie *Patched*, *Hedgehog* oder *Wingless* aktiviert (Aza-Blanc et al., 1997; Robbins et al., 1997; Monnier et al., 1998; Tabata und Kornberg, 1994; Von Ohlen und Hooper, 1997). In Vertebraten erfolgt die Signaltransduktion über die Gli-Proteine Gli1-3 (Koebernick und Pieler, 2002; Ruiz i Altaba, 1998).

Hedgehog-Signale haben entscheidenden Einfluß auf die Regionalisierung der Neuralplatte. *Sonic Hedgehog* wird im *Xenopus laevis*-Embryo im späten Gastrulastadium im Bereich des Spemann-Organisators exprimiert (Ekker et al., 1995). Über die Regulation der Expression ist wenig bekannt, es gibt allerdings Hinweise darauf, daß *Shh* unter dem Einfluß von „*nodal-related*“-Signalen in Kombination mit Noggin und Follistatin induziert wird (Ito et al., 2001) (vgl. 1.2.1). *Shh*-Transkripte lassen sich im Verlauf der Neurulation im axialen Mesoderm und späteren Notochord nachweisen. In einer positiven Rückkopplung induzieren dabei sezernierte Shh-Moleküle aus dem Notochord die eigene Expression im ventralen Bereich des embryonalen Gehirns sowie in der Bodenplatte des Neuralrohrs (Echelard et al., 1993). Die Neuronen sind im Neuralrohr in einer dorso-ventralen Abfolge organisiert, die durch einen Gradienten aktiver Shh-Moleküle spezifiziert wird. Die höchste Shh-Konzentration in unmittelbarer Nähe der Bodenplatte führt zur Entstehung von Motoneuronen, während in Abwesenheit von Shh im dorsalen Bereich des Neuralrohrs sensorische Neuronen gebildet werden (Chiang et al., 1996; Echelard et al., 1993; Pringle et al., 1996; Roelink et al., 1994). Die Umsetzung des Shh-Gradienten erfolgt dabei durch spezifische Transkriptionsfaktoren. Diese werden entweder durch Shh aktiviert, wie die Homeobox-Faktoren der *Nkx*-Familie, die zur Ausbildung der Motoneuronen wichtig sind, oder sie werden reprimiert, wie *Pax6*, *Dbx2* oder *Irx3*, deren Aktivität zur Entstehung sensorischer Neuronen führt (Briscoe et al., 2000).

Die Rolle des Shh-Signalwegs bei der Augenentwicklung wurde besonders deutlich nach der gezielten Ausschaltung des *Shh*-Gens in Mäusen (Chiang et al., 1996). Neben einer Reduktion von Gesichtsstrukturen und Extremitätenanlagen war die augenscheinlichste Störung der Embryonen die Zyklopie. Es entstand ein einzelner optischer Vesikel in der Mitte des Kopfes, der ohne die Ausbildung eines Augenstiels direkt mit dem Mittelhirn verbunden war. Im Gehirn war die Bodenplatte nicht ausgebildet, Motoneuronen fehlten und die normalerweise bilateralen Loben des Di- und Telencephalons waren fusioniert. Diese Beobachtungen legten den Schluß nahe, daß die ventralisierende Wirkung von Shh für die Spaltung des frühen Augenfeldes, die zur Entstehung der bilateralen Augenstrukturen führt, von entscheidender Bedeutung ist. Unterstützt wird diese Annahme durch Studien an der Zebrafisch-Mutante *Cyclops*, die durch die Abwesenheit von Shh-Signalen in frühen Entwicklungsstadien verursacht wird (Barth und Wilson, 1995). Sowohl in *Xenopus laevis*- als auch in Zebrafisch-Embryonen resultierte die Überexpression von *Hedgehog* in einer starken Expansion von Markergenen des Augenstiels wie *Pax2*, während die Expression von *Pax6* in der Retina inhibiert wurde (Hallonet et al., 1999; Macdonald et al., 1995; Perron et al., 2003). Die proximo-distale Gliederung der Augen (vgl. 1.1.1) wird also entscheidend durch Hedgehog-Signale beeinflusst.

Auch für die späteren Prozesse der Augenentwicklung sind Hedgehog-Signale wichtig. In Mäuse- und *Xenopus laevis*-Embryonen wird *Shh* im retinalen Pigmentepithel exprimiert und ist dort an der Zelldifferenzierung beteiligt, während *Shh* in der Ganglien-Zellschicht der neuralen Retina die Proliferation retinaler Vorläuferzellen stimuliert (Jensen und Wallace, 1997; Perron et al., 2003). In Zebrafisch-Embryonen konnte nachgewiesen werden, daß *Shh* genau wie in *Drosophila* für die fortschreitende Neurogenese in der sich entwickelnden Ganglion-Zellschicht notwendig ist (Heberlein et al., 1995; Neumann und Nüsslein-Volhard, 2000). Diese funktionelle Konservierung läßt trotz der großen morphologischen Unterschiede auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung des Auges von Vertebraten und Invertebraten schließen.

1.3.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fgf)

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren („*Fibroblast growth factor*“, Fgf) sind kleine, sezernierte Polypeptide mit einer molekularen Masse zwischen 17 und 34 kDa. Fgf-Moleküle sind vom Nematoden bis zum Menschen konserviert und allein innerhalb der Vertebraten mit 22 Mitgliedern vertreten (Überblick in Ornitz und Itoh, 2001).

Die Weiterleitung des Fgf-Signals wird durch die Bindung an spezifische Tyrosin-Kinase-Rezeptoren vermittelt, von denen es vier Typen mit unterschiedlicher Affinität zu bestimmten Fgf-Molekülen gibt (Überblick in Johnson und Williams, 1993) (Abb. 1.6). In der Empfängerzelle führt die Autophosphorylierung des Fgf-Rezeptors zunächst zur Aktivierung der GTPase Ras (p21^{Ras}) (Cai et al., 1990; Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992). Ras bindet daraufhin die zytosolische Kinase Raf-1 und rekrutiert diese zur Zellmembran, wo sie unter Mitwirkung verschiedener Kinasen wie Pak-1 („p21 activated kinase-1“) aktiviert wird (Dent et al., 1992; Howe et al., 1992; Zang et al., 2002). Raf-1 wiederum phosphoryliert eine andere Kinase, MEK (MAPK/Erk-Kinase). Über mehrere Phosphorylierungsschritte kommt es schließlich zur Aktivierung der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), auch bekannt als Erk („*extracellular signal-regulated kinase*“) (Dent et al., 1992; Howe et al., 1992). Die aktivierte MAPK wird in den Nukleus transportiert und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, einem Mitglied der Ets-Familie (Adachi et al., 1999; Aplin et al., 2001; Rao et al., 1989; Reiser et al., 1999). Elk-1 interagiert mit SRF („*serum response factor*“-)Proteinen zu einem trimeren Komplex, durch den die Transkription von Zielgenen wie *c-fos* oder, in *Xenopus laevis*, *Brachyury* (*Xbra*) induziert wird (Cunliffe und Smith, 1992; LaBonne et al., 1995; Latinkic et al., 1997; Shore und Sharrocks, 1994).

Der Fgf-Signalweg dient außerdem dazu, die Expression von Zielgenen wie *Brachyury* nach deren Induktion durch TGFβ-Moleküle wie Aktivin oder BMP4 aufrecht zu erhalten (Abb. 1.6). Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß *Xbra* direkt die Expression von *Fgf* induziert und so in einer autoregulatorischen positiven Rückkopplung zusätzlich zur Aufrechterhaltung der eigenen Expression beiträgt (Isaacs et al., 1994; Schulte-Merker und Smith, 1995; Tada et al., 1997).

In neueren Studien wurden zwei endogene Inhibitoren des Fgf-Signalwegs beschrieben, Sef-1 und Sprouty. Sef-1 („*similar expression to fgf genes*“) ist ein Transmembranprotein,

das mit seiner intrazellulären Domäne mit dem Fgf-Rezeptor interagiert und so dessen Autophosphorylierung verhindert (Kovalenko et al., 2003; Lin et al., 2002; Tsang et al., 2002). Sprouty dagegen ist ein intrazelluläres Protein, das nach Bindung des Fgf-Liganden an den Rezeptor zur Plasmamembran transportiert wird (Chambers et al., 1998; Hacohen et al., 1998). Durch Interaktion mit verschiedenen Komponenten des Ras-Signalwegs blockiert Sprouty die Weiterleitung des Fgf-Signals durch Ras (Casci et al., 1999).

Abb. 1.6: Der eFgf-Signalweg. Nach Bindung des eFgf-Moleküls an den Tyrosin-Kinase-Rezeptor (FGF-R) und dessen Autophosphorylierung erfolgt die Aktivierung der GTPase Ras. Diese phosphoryliert und aktiviert Raf, wodurch nach mehreren Phosphorylierungsschritten über verschiedene Kinasen die Aktivierung der MAP-Kinase (MAPK) induziert wird. Die phosphorylierte MAPK wird in den Nukleus transportiert, wo sie Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie wie Elk-1 phosphoryliert. Elk-1 bildet daraufhin einen Komplex mit “serum response factors” (SRF), der die Transkription von eFgf Zielgenen wie *Xbra* reguliert. In einer autoregulatorischen Schleife wird die Transkription von *eFgf* durch *Xbra* aktiviert. Die eFgf-Signalwirkung führt zudem zur Aufrechterhaltung der durch *Aktin* oder *BMP4* induzierten Transkription von *Xbra*. Endogene Fgf-Inhibitoren sind das Transmembranprotein Sef-1, das die Autophosphorylierung des Fgf-Rezeptors verhindert, und das intrazelluläre Protein Sprouty, das den Ras-Signalweg blockiert. Nach Panitz et al., 1998.

Die Funktion von Fgf bei der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* wurde erstmals in Gewebeexplantaten des animalen Ektoderms deutlich, die durch die Zugabe von gereinigtem Säuger-Fgf zur Bildung von Mesoderm stimuliert wurden (Kimelman und Kirschner, 1987; Slack et al., 1987). Hauptverantwortlich für die Induktion des Mesoderms in *Xenopus laevis*-Embryonen ist der embryonale Fgf (eFgf), ein Homolog des basischen Fgf (bFgf oder Fgf-2) (Isaacs et al., 1992). *eFgf*-mRNA wird bereits maternal exprimiert

und ist während der Gastrulation im frühen Mesoderm als Ring um den Blastoporus nachzuweisen. Studien, in denen der Fgf-Signalweg durch die Überexpression des dominant-negativen Fgf-Rezeptors-1 (*XFD*) blockiert wurde, zeigten, daß Fgf für die Induktion des Mesoderms essentiell ist (Amaya et al., 1991; Amaya et al., 1993; Cornell und Kimelman, 1994).

Neben der mesodermalen Induktion hat der Fgf-Signalweg eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung der antero-posterioren Körperachse des Embryos, was an der Expression von Fgf-Transkripten in zwei wichtigen Signalzentren deutlich wird, der anterioren Neuralfalte („*anterior neural ridge*“, ANR) sowie der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn („*midbrain-hindbrain boundary*“, MHB) (Christen und Slack, 1997; Isaacs et al., 1994; Ohkubo et al., 2002). Die Überexpression von *eFgf*-mRNA in *Xenopus laevis*-Embryonen führte zur Unterdrückung von anterioren und Vergrößerung von posterioren Strukturen (Isaacs et al., 1994, Pownall et al., 1996). *eFgf* ist nicht nur für die Posteriorisierung des Mesoderms, sondern auch des Ektoderms unerlässlich. So können Explantate der anterioren Neuralplatte von *Xenopus laevis* durch die Applikation von bFgf-Protein zur Expression von Markergenen des Hinterhirns angeregt werden (Cox und Hemmati-Brivanlou, 1995). Darüberhinaus bewirkt die Blockierung der Fgf-Signalwirkung durch Überexpression von *XFD* eine Repression von Markergenen des posterioren Neuroektoderms (Holowacz und Sokol, 1999).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob Fgf-Moleküle nicht nur bei der Regionalisierung des neuralen Gewebes eine Rolle spielen, sondern ob sie auch direkt an der neuralen Induktion beteiligt sind. In ektodermalen Gewebeexplantaten von *Xenopus laevis*-Embryonen wurde nach Überexpression von *XFD* sowohl die Induktion neuralen Gewebes durch Noggin als auch die autonome Neuralisation von dissoziierten ektodermalen Zellen verhindert (Hongo et al., 1999; Launay et al., 1996). Gegensätzliche Ergebnisse lieferten Studien, in denen die Inhibierung des Fgf-Signalwegs ausschließlich die Ausbildung posterioren, nicht aber anterioren neuralen Ektoderms verhinderte (Holowacz und Sokol, 1999; Kroll und Amaya, 1996). Ein Grund dafür könnte sein, daß für die Neuralisierung im ganzen Embryo Fgf-Liganden zuständig sind, die an einen anderen Rezeptortyp binden. Zum Zeitpunkt der neuralen Induktion gegen Ende der Gastrulation wird in *Xenopus laevis*-Embryonen besonders stark der Fgf-Rezeptor-4a (*XFGFR-4a*) exprimiert, dessen Ligand Fgf8 bei der Regionalisierung der Neuralplatte eine große Rolle spielt (Eagleson und Dempewolf, 2001; Ohkubo et al., 2002; Ornitz et al., 1996). Die Überexpression von *Fgf8* in *Xenopus laevis*-Embryonen bewirkte die Induktion von Genen, die für die neuronale Differenzierung wichtig sind, wie *Tubulin-N* oder *Neurogenin*, wohingegen die Überexpression einer dominant-negativen Variante des Fgf-Rezeptors-4a zur Unterdrückung der Expression antero-neuraler Gene und zur Verringerung der Anzahl von Neuronen führte (Chalmers et al., 2002; Hardcastle et al., 2000; Hongo et al., 1999). Einen weiteren wichtigen Hinweis für die Rolle des Fgf-Signalwegs bei der neuralen Induktion ergab eine Studie an Hühnerembryonen, in der ein durch neurale Induktion aktiviertes Gen beschrieben wurde, dessen Expression durch frühe Fgf8-Signale aus dem Organisator (Homolog zum Spemann-Organisator im Frosch) induziert wurde (Streit et al., 2000). Die Autoren schlußfolgerten daraus, daß die neurale

Induktion schon vor Beginn der Gastrulation durch Fgf-Moleküle aus dem Organisator eingeleitet wird.

Durch die posteriorisierenden Eigenschaften der Fgf-Moleküle wird auch die Augenentwicklung in starkem Maße beeinflusst. Die Überexpression von *Fgf8*- oder *eFgf*-mRNA in *Xenopus laevis*-Embryonen führte zu einem vollständigen Verlust anteriorer Strukturen und somit auch der Augen (Christen und Slack, 1997; Isaacs et al., 1994, Pownall et al., 1996; s.o.). Dies macht deutlich, daß die frühe Unterdrückung von Fgf-Signalen im anterioren Bereich des Embryos für die Ausbildung der Augen Voraussetzung ist.

In späteren Embryonalstadien haben Fgf-Moleküle eine wichtige Funktion bei der Differenzierung der Retina, was durch die Expression sowohl von Fgf-Molekülen als auch ihrer Rezeptoren im sich entwickelnden Auge vieler Vertebraten, einschließlich *Xenopus laevis*, deutlich wird (Consigli et al., 1993; Friesel und Brown, 1992; Gao und Hollyfield, 1995; Patstone et al., 1993; Song und Slack, 1994; Shiozaki et al., 1995). Die Applikation von Fgf-Protein in den Bereich der sich entwickelnden Retina von Hühnerembryonen bewirkte eine gesteigerte Differenzierung von Photorezeptorzellen, während die Inhibierung des Fgf-Signalwegs durch Überexpression von *XFD* oder durch transgene Expression eines dominant-negativen Fgf-Rezeptor-4a in *Xenopus laevis*-Embryonen zum Verlust von Photorezeptoren führte (McFarlane et al., 1998; Tcheng et al., 1994; Zhang et al., 2003). Auch die Differenzierung von Ganglien- und Linsenzellen wird durch Fgf-Signale positiv beeinflusst (Fischer et al., 2002; Lovicu und McAvoy, 2001).

Die Stimulation von Differenzierungsprozessen durch Fgf-Moleküle ist nicht nur an der Entwicklung, sondern auch an der Regeneration des Auges beteiligt, die bei *Xenopus laevis* zeitlebens möglich ist. Obwohl die Regenerationsfähigkeit in den meisten anderen Vertebraten im adulten Zustand verlorenght, kann in frühen Entwicklungsstadien neurale Retina aus Zellen des retinalen Pigmentepithels regeneriert werden. In Hühnerembryonen konnte gezeigt werden, daß diese Transdifferenzierung durch Fgf-Moleküle vermittelt wird (Park und Hollenberg, 1989, 1991; Pittack et al., 1991).

1.3.3 Wnt

Die Mitglieder der Wnt-Familie sind Cystein-reiche, sezernierte Glykoproteine, deren Vertreter in vielen Vertebraten konserviert sind (Überblick in Miller, 2002). Der Name ist eine Kombination aus dem Segment-Polaritätsgen *Wingless* aus *Drosophila* und einem Vertebraten-Homolog namens *Integrated* (Nusse und Varmus, 1982; Rijsewijk et al., 1989; van Ooyen und Nusse, 1984). Die Wnt-Familie ist in drei funktionelle Klassen unterteilt, die sich durch ihre Funktion und durch die Art ihres Signalwegs unterscheiden.

Die erste Gruppe der Wnt-Moleküle übt ihre Funktionen über den „klassischen“, sogenannten kanonischen Wnt-Signalweg aus. Sie umfasst die meisten der *Xenopus laevis* Wnt-Moleküle, darunter Wnt1, Wnt3a und Wnt8 (Christian et al., 1991; Nusse und Varmus, 1982; Wolda et al., 1993). Der kanonische Wnt-Signalweg wird durch die Aktivität von β -Catenin vermittelt. In Abwesenheit des Wnt-Liganden wird β -Catenin

durch die zytosolische Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) phosphoryliert und in einem Komplex mit APC (Adenomatosis Polyposis Coli-Protein) und Axin dem Abbau im Ubiquitin-abhängigen Proteasom zugeführt (Ikeda et al., 1998; Itoh et al., 1998; Munemitsu et al., 1995; Rubinfeld et al., 1996) (Abb. 1.7). Wnt-Rezeptor ist das Transmembranprotein Frizzled, von dem in *Xenopus laevis* fünf verschiedene Isoformen bekannt sind, deren Spezifität zu den einzelnen Wnts aber noch unklar ist. (Bhanot et al., 1996; Hsieh et al., 1999; Yang-Snyder et al., 1996). Nach Bindung eines Wnt-Moleküls an Frizzled wird über einen bisher unbekannten Mechanismus das zytosolische Phosphoprotein Dishevelled aktiviert, welches in einem weiteren Schritt die GSK3 β inhibiert (Dominguez et al., 1995; Itoh et al., 1998; Klingensmith et al., 1994; Sokol et al., 1995) (Abb. 1.7). Diese Inhibition bewirkt die Stabilisierung von β -Catenin, welches daraufhin in den Nukleus transportiert wird (Schneider et al., 1996). Die Unterdrückung von GSK3 β im dorsalen Bereich der befruchteten Eizelle nach der kortikalen Rotation ist auch der Grund für die dorsale Akkumulation von β -Catenin (Dominguez und Green, 2000) (vgl. 1.2.1). Im Nukleus aktiviert β -Catenin in einem Komplex mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie Wnt-Zielgene wie *Siamois* oder *Xnr3* (Carnac et al., 1996; Huber et al., 1996; Lemaire et al., 1995; Molenaar et al., 1996; Smith et al., 1995).

Die zweite Klasse der Wnt-Proteine verursacht nach Bindung an den Rezeptor eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium und eine anschließende Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-Kaskade, deren Zielgene allerdings bisher nicht bekannt sind (Überblick in Kühl et al., 2000; Miller, 2002). Mitglieder dieser Gruppe sind unter anderem Wnt5a und Wnt11, Rezeptoren für diesen Signalweg sind unter anderem Frizzled-2 und -3 (Christian et al., 1991; Christiansen, 1995; Ku und Melton, 1993; Kühl et al., 2000; Sheldahl et al., 1999; Slusarski et al., 1997).

In einem dritten durch Wnt vermittelten Signalweg führt die Bindung des Wnt-Liganden an Frizzled über die Aktivierung von Dishevelled und der GTPase RhoA zur Einleitung der JNK- (Jun N-terminale Kinase-)Kaskade (Boutros et al., 1998; Li et al., 1999; Überblick in Miller, 2002). Untersuchungen in Zebrafisch- und *Xenopus laevis*-Embryonen deuten an, daß Wnt11 diesen Signalweg aktiviert und so an der Regulation von Zellbewegungen während der Gastrulation beteiligt ist (Heisenberg et al., 2000; Tada und Smith, 2000).

Den ersten Hinweis auf die Funktion der Wnt-Moleküle während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* lieferte die Beobachtung, daß die Überexpression von mRNA der kanonischen Wnt-Moleküle in ventralen Blastomeren die Entstehung einer zweiten Körperachse verursachte (McMahon und Moon, 1989). In einer anderen Studie wurde *Xwnt8*-DNA unter der Kontrolle eines starken ubiquitären Promotors in den dorsalen Bereich eines *Xenopus laevis*-Embryos injiziert, so daß die DNA erst nach dem Start der zygotischen Transkription transkribiert wurde. Dies bewirkte eine Ventralisierung der Embryonen einhergehend mit der Inhibition von dorsalem Mesoderm und dem Verlust von Vorderhirn und Notochord und reflektiert die eigentliche Funktion der Wnt-Signale (Christian und Moon, 1993). *Wnt8* wird in *Xenopus laevis*-Embryonen des Blastula-Stadiums im äquatorialen Mesoderm exprimiert, wobei die

Region, die zur späteren dorsalen Urmundlippe wird, ausgespart bleibt. Sezernierte Wnt8-Moleküle bilden ebenso wie BMP4 einen ventral-dorsalen Gradienten innerhalb des Mesoderms aus und werden durch spezifische sezernierte Inhibitoren reguliert. Dazu gehören Cerberus, das Wnt8, Xnr3 und BMP4 inhibieren kann, Dickkopf-1, welches Wnt- und BMP-Signale antagonisiert, und Frzb (Bouwmeester et al., 1996; Glinka et al., 1997; Glinka et al., 1998; Leyns et al., 1997; Piccolo et al., 1999; Wang et al., 1997a) (Abb. 1.7).

Abb. 1.7: Der kanonische Wnt-Signalweg. Die Bindung des Wnt-Liganden an den Transmembranrezeptor Frizzled führt zur Aktivierung des Phosphoproteins Dishevelled (Dsh). Dsh inhibiert die Aktivität der Glutamin-Synthase-Kinase-3β (GSK3β), woraufhin die Phosphorylierung von β-Catenin durch die GSK3β aufgehoben wird. β-Catenin akkumuliert und tritt in den Nukleus ein, wo es mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie einen Komplex eingeht der Zielgene wie *Siamois* aktiviert. Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiv, wird phosphoryliertes β-Catenin durch Bindung an APC (Adenomatosis Polyposis Coli-Protein) und Axin komplexiert. Anschließend erfolgt der Abbau von β-Catenin im Proteasom. Cerberus, Dickkopf-1, Frzb und Wif-1 binden Wnt-Moleküle und inhibieren so deren Signalwirkung. Nach Moon et al., 2002.

Die simultane Inhibition von Wnt- und BMP-Signalen ist Voraussetzung für die Induktion des Kopfes. Die duplizierte Körperachse, die nach alleiniger Inhibition von BMP-Signalen durch die Überexpression eines dominant-negativen BMP-Rezeptors (*tBR*) in *Xenopus laevis*-Embryonen entstand, wies keine erkennbaren Kopfstrukturen auf (Glinka et al., 1997). Erst die Ko-Injektion von *tBR*- und *Dickkopf-1*-mRNA oder die Überexpression von *Cerberus* bewirkte in der duplizierten embryonalen Körperachse die Ausbildung eines vollständigen zweiten Kopfes (Bouwmeester et al., 1996; Glinka et al., 1998; Piccolo et al., 1999). Die Wnt- werden im Gegensatz zu den BMP-Inhibitoren während der Gastrulation nicht nur im dorsalen Mesoderm des Spemann-Organisators, sondern auch, wie *Cerberus*,

im Mesendoderm gebildet (Bouwmeester et al., 1996; vgl. 1.2.2). Dieser Bereich wird daher auch als Kopf-Organisator bezeichnet (Niehrs, 1999).

Im Unterschied zu den übrigen Wnt-Inhibitoren wird der Wnt-inhibierende Faktor-1 (*Wif-1*) erst zu Beginn der Neurulation im Notochord sowie im präsomitischen Mesoderm exprimiert, wo er wahrscheinlich die Segmentierung der späteren Somiten kontrolliert (Hsieh et al., 1999).

Wnts gehören neben Retinsäure und Fgf-Molekülen zu den posteriorisierenden Signalen, die die Ausbildung der antero-posterioren Achse innerhalb des Neuroektoderms bestimmen (vgl. 1.2.2; 1.3.2). In ektodermalen Gewebeexplantaten von *Xenopus laevis*-Embryonen, die durch Injektion von *Noggin*-mRNA neuralisiert waren, bewirkte die zusätzliche Injektion von *Wnt3a*- oder *Wnt8*-mRNA eine Induktion von posterioren neuronalen Markergenen (Kiecker und Niehrs, 2001; McGrew et al., 1995). Die Inhibierung des Wnt-Signalwegs durch die Überexpression einer dominant-negativen Variante von Wnt8 (*dnWnt8*) verhinderte dagegen sowohl in Zebrafisch- als auch in *Xenopus laevis*-Embryonen die Ausbildung posterioren Ektoderms (Bang et al., 1999; Fekany-Lee et al., 2000; McGrew et al., 1997). In *Xenopus laevis* wurde außerdem nachgewiesen, daß das posteriore neurale Gen *Engrailed-2* ein direktes Zielgen von Wnt3a ist, was über die Posteriorisierung hinaus eine Rolle von Wnt-Signalen bei der neuronalen Induktion impliziert (McGrew et al., 1999). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß frühe Wnt/ β -Catenin-Signale in *Xenopus laevis* die Expression von *BMP4* im dorsalen Bereich des Embryos inhibieren sowie ein Zielgen des BMP-Signalwegs, *Xiro1*, reprimieren (Baker et al., 1999; Gomez-Skarmeta et al., 2001; Wessely et al., 2001). Aufgrund dieser Resultate wurde postuliert, daß diese frühe dorsale Repression von BMP4 durch Wnt dazu dient, das Ektoderm für die BMP-Antagonisten aus dem Spemann-Organisator zu sensibilisieren.

Die Inhibierung der posteriorisierenden Wnt-Signale ist für die Ausbildung der Augen von entscheidender Bedeutung. In *Xenopus laevis* wurde gezeigt, daß Six3, ein Transkriptionsfaktor, der die Entstehung des frühen Augenfeldes in der anterioren Neuralplatte induziert (vgl. 1.2.2), den Wnt-Signalweg negativ reguliert (Lagutin et al., 2003). In Übereinstimmung dazu bewirkte die ektopische Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Überexpression einer dominant-negativen Variante der GSK3 β in Zebrafisch-Embryonen die Reduzierung der optischen Vesikel und des Telencephalons und kopierte damit phänotypisch die „*masterblind*“-Mutation (Van de Water et al., 2001). Auf der anderen Seite bewirkte die Überexpression des nicht kanonischen Wnt-Rezeptors *Frizzled-3* in *Xenopus laevis*-Embryonen die Entstehung ektopischer Augen, während umgekehrt nach Überexpression einer dominant-negativen Form von *Frizzled-3* die Ausbildung der Augen ausblieb (Rasmussen et al., 2001). Dies deutet auf eine gegensätzliche Rolle des kanonischen und des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs bei der Augenentwicklung hin.

In älteren Embryonalstadien sind Wnt-Signale an der Aufrechterhaltung der Proliferation von retinalen Vorläuferzellen während der Augenentwicklung beteiligt. *Wnt2b* wird im Hühnerembryo in der ziliären Marginalzone („*ciliary marginal zone*“, CMZ) exprimiert, dem Teil der Retina, der die Linse umgibt und aus dem proliferierende retinale

Vorläuferzellen zu Größenwachstum und Regeneration der neuralen Retina rekrutiert werden (Fischer und Reh, 2000; Kubo et al., 2003; Perron und Harris, 2000). Die ektopische Expression von *Wnt2b* in der frühen Augenanlage induzierte die Expression CMZ-spezifischer Gene und führte zu einer erhöhten Proliferationsrate von kultivierten retinalen Vorläuferzellen, während die Inhibierung der Wnt-Signalwirkung durch Überexpression einer dominant-negativen LEF1-Variante die Proliferation inhibierte und eine verfrühte Differenzierung dieser Zellen verursachte (Kubo et al., 2003). Die Expression von verschiedenen Wnt-Rezeptoren wie Frizzled-2, -3, -5 und -7 im Auge macht eine Rolle von Wnt-Signalen während der Augenentwicklung auch bei *Xenopus laevis* sehr wahrscheinlich, wenn auch noch unbekannt ist, welche Wnt-Moleküle dabei eine Rolle spielen (Deardorff und Klein, 1999; Sumanas und Ekker, 2001; Wheeler und Hoppler, 1999).

1.3.4 Retinsäure

Retinsäure („*retinoic acid*“, RA) ist ein Derivat des Vitamin A, welches während der Gastrulation im Mesoderm von *Xenopus laevis*-Embryonen in einem posterior-anterioren Gradienten gebildet wird, der durch die komplementäre Expression des RA-produzierenden Enzyms, *RalDH2*, und des RA-metabolisierenden Enzyms, *Cyp26*, entsteht (Chen et al., 2001; Swindell et al., 1999). *Cyp26*, die RA-Hydroxylase, ist ein Mitglied der Cytochrom P450-Familie Häm-bindender Monooxygenasen und wird sowohl in *Xenopus laevis* als auch in anderen Vertebraten in späteren Gastrulastadien im anterioren Mesoderm und Ektoderm gebildet (Holleman et al., 1998; Kudoh et al., 2002; White et al., 1997). Die Retinal-Dehydrogenase *RalDH2* wird dagegen im posterior-lateralen Mesoderm exprimiert (Chen et al., 2001; Niederreither et al., 1997).

Retinsäure und ihre Metaboliten, die Retinoide, binden in der Zelle an nukleäre Zink-Finger Rezeptoren, die direkt als Transkriptionsfaktoren agieren (Kliwer et al., 1992; Leid et al., 1992). Retinsäure-Rezeptor (RAR) und Retinoid-Rezeptor (RXR) treten in Vertebraten in verschiedenen Isoformen auf, die während der Embryogenese unterschiedlich exprimiert werden und deren Aktivität durch Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren moduliert wird (Überblick in Beato et al., 1995; Kastner et al., 1997). Bisher sind nur wenige direkte Zielgene des Retinsäure-Signalwegs bekannt, darunter *Gbx2* oder *HoxD1*, die beide in *Xenopus laevis*-Embryonen im dorsolateralen Ektoderm und späteren Hinterhirn exprimiert werden (von Bubnoff et al., 1995; Kolm und Sive, 1995; Kolm et al., 1997).

Der posteriorisierende Einfluß von Retinsäure bei der Musterbildung innerhalb des neuralen Ektoderms wurde nach Inkubation von *Xenopus laevis*-Embryonen in RA-haltigem Medium deutlich, was einen Verlust anteriorer Bereiche des Gehirns und eine Expansion des posterioren Hinterhirns verursachte (Sive et al., 1990; Papalopulu et al., 1991). Die Posteriorisierung des Ektoderms durch RA konnte in *Xenopus laevis*-Embryonen durch die ektopische Aktivierung der *RalDH2* bewirkt werden, während die Überexpression von *Cyp26* eine Anteriorisierung bewirkte (Chen et al., 2001; Holleman

et al., 1998). Diese Ergebnisse bestätigten einen Einfluß der endogenen Retinsäure auf die Regionalisierung der Neuralplatte während der Embryonalentwicklung.

Ein Derivat der Retinsäure, das *11-cis*-Retinal, ist als prosthetische Gruppe des Sehpigments Rhodopsin in den Photorezeptorzellen direkt am Sehvorgang beteiligt. Die durch Licht bewirkte reversible Umwandlung von *11-cis*-Retinal in *all-trans*-Retinal ist der Initialschritt für die Weiterleitung des Lichtsignals, die in einem elektrischen Impuls von den Photorezeptorzellen zu den nachgeschalteten Bipolarzellen mündet (vgl. 1.1).

Ein Teil des nach Lichteinfall freiwerdenden *all-trans*-Retinals wird durch den Einfluß der *Raldh* in Retinsäure umgewandelt, wodurch das Auge insgesamt eine hohe Retinsäure-Konzentration aufweist (Dräger et al., 1998; Saari et al., 1994). Die differentielle Expression von *Raldh*, *Cyp26* und RA-Rezeptoren im Auge weist allerdings auf eine asymmetrische Verteilung von Retinsäure mit hohen Niveaus im dorsalen und ventralen Bereich der Retina hin, was eine Funktion von Retinsäure bei der Festlegung der dorso-ventralen Achse innerhalb der Retina nahelegt (Chen et al., 2001; Hollemann et al., 1998; Li et al., 2000; McCaffery et al., 1999). Untersuchungen in Ratte und Zebrafisch zeigten darüberhinaus, daß Retinsäure stimulierend auf die Differenzierung von Photorezeptorzellen wirkt (Hyatt et al., 1996; Kelley et al., 1994; Kelley et al., 1999).

Der Einfluß von Retinsäure auf die frühe Augenentwicklung von *Xenopus laevis* wurde nach Applikation von RA deutlich, wobei eine geringe Dosis zur Entstehung von Zyklopie führte, während eine höhere RA-Menge den vollständigen Verlust der Augen verursachte (Durstun et al., 1989; Sive et al., 1990). Es wird diskutiert, daß die Unterdrückung von Retinsäure-Signalen im prechordalen Mesoderm und anterioren Neuroektoderm eine Voraussetzung für die Spaltung des frühen Augenfeldes ist, was durch die Expression des RA-metabolisierenden Enzyms *Cyp26* in den benannten Bereichen während der Gastrulation reflektiert wird. Nach der Separation des Augenfeldes während der Neurulation wird schließlich die Expression von *Raldh* in den sich entwickelnden Augen induziert, wo Retinsäure die oben beschriebenen Funktionen bei Regionalisierung und Differenzierung der Retina ausübt (Chen et al., 2001; Hollemann et al., 1998).

1.3.5 Interaktionen zwischen dem Hedgehog-, Fgf-, Wnt- und Retinsäure-Signalweg

Bei den komplexen Ereignissen der Embryonalentwicklung kommt es immer wieder zur Integration von verschiedenen Signalwegen. Studien in unterschiedlichen Organismen haben gezeigt, daß Komponenten des Hedgehog-, Fgf-, Wnt- und Retinsäure-Signalwegs miteinander interagieren. So wurde beispielsweise nachgewiesen, daß *Gli2*, ein Mediator des Hedgehog-Signalwegs (vgl. 1.3.1) die Expression von *Wnt8* induzierte, während umgekehrt die Expression von *Gli2* durch Wnt sowie Fgf aktiviert wurde (Borycki et al., 2000; Brewster et al., 2000; Mullor et al., 2001). Während der Entstehung der telencephalischen und optischen Vesikel im Hühnerembryo wurde eine positive Interaktion von Shh und Fgf8 nachgewiesen, wobei Shh wahrscheinlich dazu dient, die Expression von *Fgf8* aufrecht zu erhalten (Ohkubo et al., 2002). Eine Interaktion zwischen Wnt und Fgf wurde dadurch gezeigt, daß Fgf in ektodermalen Gewebeexplantaten nur in

Kombination mit Wnt8 dorsales Mesoderm induziert (Christian et al., 1992). Umgekehrt wurde nach Überexpression von β -Catenin in *Xenopus laevis*-Embryonen ein gesteigertes Vorkommen von phosphorylierter MAPK nachgewiesen, während die Blockierung des Fgf-Signalwegs durch Überexpression von *XFD* die Induktion posteriorer neuraler Markergene durch β -Catenin verhinderte (Domingos et al., 2001; Schohl und Fagotto, 2002). In Hühnerembryonen wurde eine negative Interaktion zwischen Fgf und Wnt festgestellt, als die frühe neurale Induktion durch Fgf-Signale nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs inhibiert wurde (Streit et al., 2000; Wilson et al., 2001). Die Integration von Fgf-, Wnt- und Retinsäure-Signalen wurde in Zebrafisch-Embryonen nachgewiesen, in denen die Inhibierung des RA-Signalwegs durch Überexpression von *Cyp26* (vgl. 1.3.4) die Induktion posteriorer Gene durch Fgf und Wnt verhinderte (Kudoh et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Wirkung eines Signalmoleküls auf einen bestimmten Prozess der Embryonalentwicklung oft erst in Kombination mit anderen Signalwegen vollständig möglich ist.

1.4 Kontrolle des Hedgehog-Signalwegs: Hedgehog-interagierendes Protein

Zur Koordination der verschiedenen Signalwege, die während der Embryonalentwicklung aktiv sind, ist es wichtig, daß die einzelnen Signalmoleküle sowohl räumlich als auch zeitlich einer strengen Kontrolle unterliegen. In Mäusen wurde in einer biochemischen Suche nach Faktoren, die Sonic Hedgehog binden können, ein Hedgehog-interagierendes Protein (Hip) identifiziert (Chuang und McMahon, 1999). Die isolierte *mHip*-cDNA umfasst 2669 bp und kodiert für ein Protein aus 700 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 78,4 kD. Die ersten 15 Aminosäuren des putativen Hip-Proteins kodieren für ein hydrophobes Signalpeptid, die letzten 22 Aminosäuren für eine Transmembrandomäne, was Hip als ein peripheres Membranprotein des Typ 1 kennzeichnet (Matlack et al., 1998). Tatsächlich führte die Deletion der Transmembrandomäne im Zellversuch zur Sekretion des Proteins. Hip beinhaltet außerdem vier potentielle Glykosilierungsstellen sowie zwei Domänen, die dem epidermalen Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“, EGF) ähnlich sind (Abb. 1.9).

Chuang und McMahon konnten zeigen, daß die Expression von *Hip*-mRNA durch Hedgehog induziert wird. Die Expressionsdomänen von Maus *Hip* im ventralen Bereich des Neuralrohrs und der Somiten liegen in direkter Nachbarschaft zu *Shh* exprimierenden Zellen. Im Zellversuch wurde nachgewiesen, daß Hip alle drei Vertreter der Säugetier Hedgehog-Familie bindet und sie so an der Zellmembran zurückhält. Die Überexpression von *Hip* im sich entwickelnden endochondrialen Skelett führte zu phänotypischen Effekten, die denen von *Ihh*^{-/-} Mäusen entsprechen. Hip kann also effektiv den Hedgehog-Signalweg inhibieren. Die gezielte Deletion von *Hip* in Mäusen führte zu Defekten in der Lungenentwicklung (Chuang et al., 2003). Der Grund hierfür war die verminderte Expression von *Fgf-10* als Folge einer gesteigerten *Shh*-Expression im frühen Lungenmesenchym. Diese Resultate ließen den Schluß zu, daß die Interaktion von Fgf- und Shh-Signalen während der Lungenentwicklung durch Hip reguliert wird. In *Xenopus laevis*-Embryonen führte die Überexpression der *mHip*-mRNA zur Repression des Shh-

Signalwegs, was an dem Verlust der Expression von *Patched* nachgewiesen wurde (Koebernick et al., 2003).

Neben dem murinen *Hip* wurde bisher ein menschliches *Hip*-Homolog im Chromosom 4 identifiziert, das 91 kb umfasst und 13 Exons beinhaltet (Bak et al., 2001). Außerdem lassen sich in der Datenbank EST-Klone von Rind, Huhn, Reiskärpfling und Zebrafisch finden, während in *Drosophila* kein *Hip*-Homolog nachgewiesen werden konnte. Über die Existenz eines *Hip*-Homologs in *Xenopus laevis* war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

Abb. 1.8: Schematische Darstellung des murinen Hip. Nacheinander gekennzeichnet sind das Signalpeptid (AS 1-15), vier potentielle Glycosilierungsstellen (AS 99-101; 416-418; 447-449; 459-461), zwei EGF-ähnliche Domänen (zusammenhängend dargestellt, AS 608-667) sowie die Transmembrandomäne (TM, AS 679-700). Die Ziffern kennzeichnen jeweils die erste und die letzte Aminosäure des Proteins. Nach Chuang und McMahon, 1999.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die Musterbildungsprozesse während der Augenentwicklung von *Xenopus laevis* untersucht werden, wobei ein besonderes Interesse dem Einfluß des Hedgehog-Signalwegs galt.

Um die Aktivität freier Hedgehog-Moleküle zu reduzieren, sollte das Hedgehog-interagierende Protein *Hip* in *Xenopus laevis* überexprimiert und einer Erhöhung der Hedgehog-Konzentration nach Überexpression von *Shh* gegenübergestellt werden. Die Auswirkungen der Modulation der Hedgehog-Aktivität sollte zunächst in älteren Embryonen betrachtet werden. Durch die Untersuchung von Embryonen des frühen Neurulastadiums sollten anschließend mögliche Veränderungen im frühen Augenfeld von *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Dabei sollten die Expressionsmuster von Genen des Auges und des embryonalen Gehirns sowie Proliferation und Apoptose durch spezifische Nachweisverfahren untersucht werden.

Wie oben erwähnt, waren einige Auswirkungen der ektopischen Aktivierung von *Shh* auf die Entstehung des Auges in *Xenopus laevis* bereits bekannt (Hallonet et al., 1999; Macdonald et al., 1995; Perron et al., 2003; vgl. 1.3.1). Im Unterschied dazu sollte die

Inhibierung des Shh-Signalwegs nach Überexpression von *Hip* deutlich machen, für welche Anteile des Auges Shh-Signale benötigt werden.

Um die Bedeutung der Blockierung des Shh-Signalwegs durch *Hip* näher zu untersuchen, sollte das *Xenopus laevis* *Hip*-Homolog kloniert und dessen Expression und Regulation während der Embryonalentwicklung untersucht werden. Durch den Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenz von *Xhip* mit anderen *Hip*-Homologen sollte eine mögliche strukturelle Konservierung untersucht werden.

Die Untersuchung des Signalmoleküls Shh und seines Inhibitors *Hip* sollte darüberhinaus die generelle Bedeutung der Regulation von Signalwegen bei der Embryonalentwicklung deutlich machen.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Der Afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gehört zu den zungenlosen Froschlurchen (*Pipidae*) der Gruppe *Anura*. Pigmentierte und Albino-Frösche wurden von Dipl.-Ing. Horst Kähler (Hamburg) und den Firmen Xenopus I (Ann Arbor, USA) und Nasco (Ft. Atkinson, USA) erworben. Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber (1967).

2.2 Bakterienstamm und Genbank

Bakterien:

Es wurden *E. coli*-Stämme des folgenden Genotyps verwendet (Stratagene GmbH, Heidelberg, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus):

XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI^qZAM15, Tn10(Tet^r)]^c. (Bullock *et al.*, 1987)

cDNA-Bank:

Zur Isolation von cDNA-Sequenzen stand eine λ -Zap Express cDNA-Bank (Stratagene GmbH, Heidelberg) zur Verfügung. Sie wurde von T. Hollemann erstellt und enthielt cDNA aus präparierten Köpfen von *Xenopus*-Embryonen (Stadium 28-31, Hollemann *et al.*, 1996). Die Erststrang-Synthese der cDNAs erfolgte mit Hilfe von „random“ (zufällig zusammengesetzten) oder „oligo-dT“ hexameren Oligonukleotiden. Die Einzelfractionen der cDNA-Bank enthielten näherungsweise jeweils 50.000 unabhängige Phagen.

2.3 Vektoren und Oligonukleotide

Konstrukte, welche nicht im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, sind mit entsprechenden Referenzen gekennzeichnet.

Vektoren

Für Überexpressionsstudien wurden cDNAs in den pCS2+ Vektor (Rupp *et al.*, 1994, Turner und Weintraub, 1994) bzw. dessen Derivate kloniert. Der pCS2+ Vektor besitzt einen starken eukaryotischen Promotor (sCMV IE94), gefolgt von einem prokaryotischen SP6-Promotor, der die *in vitro* Synthese der RNA erlaubt. Es folgt eine Polyadenylierungssequenz des SV40-Virus, die von zwei Polylinkern umgeben ist. In SP6-transkribierter 'CAP'-mRNA war dieses Polyadenylierungssignal am 3'-Ende enthalten. Um zu vermeiden, daß mögliche regulatorische Sequenzen der 5' oder 3' untranslatierten Region (UTR) die Translation der synthetischen mRNA beeinträchtigten, wurde nur der

offene Leserahmen der cDNA subkloniert. Plasmide, die aus anderen Laboren bezogen wurden, sind durch Angabe der Erstveröffentlichung gekennzeichnet.

Für die Herstellung von antisense-RNA wurden cDNAs in den pGEM-T Vektor kloniert (Promega, Mannheim). pGEM-T enthält 3'-terminale Thymidin-Reste an beiden Enden. Die überhängenden 3'-Thymidine verhindern die Rezirkulierung des Vektors. Außerdem erleichtern sie die Klonierung von PCR-Produkten, da durch die Aktivität der Taq-DNA-Polymerase ein deoxy-Adenosinrest an das 3'-Ende der PCR-Produkte angehängt wird. Die multiple Klonierungsstelle von pGEM-T liegt innerhalb der kodierenden Region für α -Galaktosidase. Durch Klonierung eines PCR-Produktes wird die Transkription der α -Galaktosidase verhindert, was eine Blau-Weiß-Selektion positiver Klone erlaubt. Die multiple Klonierungsstelle wird von einem T7- bzw. Sp6-RNA-Polymerase-Promotor flankiert, der die *in vitro* Synthese der antisense-RNA erlaubt.

Konstrukte für die Überexpression im *Xenopus* Embryo

mHip

pCS²⁺-mHip: enthält den 5'*Bam*HI/3'*Xho*I-klonierten offenen Leserahmen von mHip (2103 bp) (Chuang und McMahon, 1999). Zur Synthese von sense-RNA wurde mit *Not*I linearisiert und mit Sp6 transkribiert.

pCS²⁺-mHip-Flag: enthält den 5'*Bam*HI/3'*Xho*I-klonierten offenen Leserahmen von mHip (2103 bp), in den durch Mutagenese ein Flag-Epitop (24 bp) zwischen bp 96 und 97 eingefügt wurde. Zur Synthese von sense-RNA wurde mit *Not*I linearisiert und mit Sp6 transkribiert.

pCS²⁺-mHip Δ TM: enthält ein 5'*Bam*HI/3'*Xho*I-kloniertes Fragment von mHip, bei dem die putative Transmembrandomäne deletiert wurde (2016 bp). Das Fragment besteht aus dem offenen Leserahmen bis einschließlich Position bp 2013 und einem anschließenden Stop-Codon. Zur Synthese von sense-RNA wurde mit *Not*I linearisiert und mit Sp6 transkribiert.

Xhip

pCS²⁺-Xhip: enthält den 5'*Bam*HI/3'*Xho*I-klonierten offenen Leserahmen von Xhip (2091 bp). Zur Synthese von sense-RNA wurde mit *Not*I linearisiert und mit Sp6 transkribiert.

mFgf8

pCS²⁺-mFgf8: enthält den 5'*Bam*HI/3'*Xho*I-klonierten offenen Leserahmen von mFGF8 mit flankierenden Sequenzen (693 bp) (MacArthur *et al.*, 1995). Zur Synthese von sense-RNA wurde mit *Not*I linearisiert und mit Sp6 transkribiert.

Andere Expressionskonstrukte:

ActivinBB	lin. <i>Xba</i> I, transkr. Sp6	Wittbrodt und Rosa, 1994
Xbhh	lin. <i>Bam</i> HI, transkr. T7	Ekker <i>et al.</i> , 1995
BMP-4	lin. <i>Bam</i> HI, transkr. Sp6	Köster <i>et al.</i> , 1991
Cerberus	lin. <i>Not</i> I, transkr. Sp6	Bouwmeester <i>et al.</i> , 1996
Chordin	lin. <i>Sfi</i> I, transkr. T3	Sasai <i>et al.</i> , 1994
eFgf	lin. <i>Acc</i> I, transkr. Sp6	Isaacs <i>et al.</i> , 1994
hElk1	lin. <i>Asp</i> 718, transkr. Sp6	Panitz <i>et al.</i> , 1998
NLSβgalactosidase	lin. <i>Not</i> I, transkr. Sp6	Chitnis <i>et al.</i> , 1995
Noggin	lin. <i>Not</i> I, transkr. Sp6	Smith und Harland, 1992
PtcΔloop2	lin. <i>Not</i> I, transkr. Sp6	Briscoe <i>et al.</i> , 2001
Xshh	lin. <i>Bam</i> HI, transkr. T7	Ekker <i>et al.</i> , 1995
Xwnt8	lin. <i>Asp</i> 718, transkr. Sp6	Christian <i>et al.</i> , 1991
Xwnt3a	lin. <i>Eco</i> RI, transkr. Sp6	Wolda <i>et al.</i> , 1993
dnWnt8	lin. <i>Asp</i> 718, transkr. Sp6	Hoppler <i>et al.</i> , 1996
XFD	lin. <i>Eco</i> RI, transkr. Sp6	Amaya <i>et al.</i> , 1991

Markerkonstrukte zur Synthese von „antisense“ RNA für Hybridisierungen

Xbra	lin. <i>Bgl</i> II, transkr. T7	Cunliffe und Smith, 1992
XCrystallin α	lin. <i>Nco</i> I, transkr. Sp6	Mizuno <i>et al.</i> , 1999
XDlx3	lin. <i>Eco</i> RI, transkr. T7	Papalopulu und Kintner, 1993
XFgf8	lin. <i>Xba</i> I, transkr. T3	Christen und Slack, 1997
Xgsh-1	lin. <i>Apa</i> I, transkr. Sp6	eigenes Labor
Xhip	lin. <i>Nco</i> I, transkr. Sp6	eigenes Labor
XNkx2.1	lin. <i>Not</i> I, transkr. T7	Hollemann und Pieler, 2000
Xotx2	lin. <i>Not</i> I, transkr. T7	Pannese <i>et al.</i> , 1995
Xpax6	lin. <i>Pst</i> I, transkr. T7	Hirsch und Harris, 1997
Xpitx1	lin. <i>Nco</i> I, transkr. Sp6	Hollemann und Pieler, 1999
Xpitx3	lin. <i>Eco</i> RI, transkr. T7	Pommereit <i>et al.</i> , 2001
Xptc1	lin. <i>Bam</i> HI, transkr. T3	Koebernick <i>et al.</i> , 2001
Rhodopsin	lin. <i>Not</i> I, transkr. T7	Saha und Grainger, 1993
XRx	lin. <i>Xho</i> I, transkr. Sp6	Mathers <i>et al.</i> , 1997
Xshh	lin. <i>Xba</i> I, transkr. T3	Ekker <i>et al.</i> , 1995
Xsix3:	lin. <i>Not</i> I, transkr. T7	Zhou X <i>et al.</i> , 2000
Xsox3	lin. <i>Eco</i> RI, transkr. T7	Penzel <i>et al.</i> , 1997
XN-Tubulin	lin. <i>Bam</i> HI, transkr. T3	Oschwald <i>et al.</i> , 1991
Xwnt8	lin. <i>Bam</i> HI, transkr. T3	Christian <i>et al.</i> , 1991
Xvax1	lin. <i>Eco</i> RI, transkr. Sp6	Hallonet <i>et al.</i> , 1998

Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und NAPS (Göttingen) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'→3' Richtung wiedergegeben.

mFgf8

mFGF8-F1	AGA	ATT	CAG	TGG	GAC	GGC	GTG	ACC	
mFGF8-R1	GAG	GAG	CTG	GGC	GAG	CGC	CTA	T	
mFGF8-BamHI-F1	GGA	TCC	AGA	ATT	CAG	TGG	GAC	GGC	GTG A
mFGF8-XhoI-R1	CTC	GAG	AGG	AGC	TGG	GCG	AGC	GCC	TAT

mHip

mHip-BamHI-1F	GTA	GGA	TCC	ATG	CTG	AAG	ATG	CTC	TCG	TTT	
mHip-2034-XhoI-St-R	CCG	CTC	GAG	CTA	CCT	GGT	CAC	TCT	GCG	GAC	GTT
mHip-Flag-direkt-s	AGC	GAG	GGG	AGC	GAC	TAC	AAG	GAC	GAC	GAT	GAC AAG GGA GCG
	AGA	AG									
mHip-Flag-direkt-as	CTT	CTC	GCT	CCC	TTG	TCA	TCG	TCG	TCC	TTG	TAG TCG CTC CCC
	TCG	CT									

Xhip

Xhip-RACE-R3	CTA	TAC	AAT	GTA	GCT	GGT	CAG	ATC	CAG	CAA	GTA	TG
Xhip-BamHI-Start	GTA	GGA	TCC	ATG	AAC	AAG	TTC	CTG	T			
Xhip-Start	ATG	AAC	AAG	TTC	CTG	TTG	GTG	CAG	T			
Xhip-Stop	CTA	TAC	AAT	GTA	GCT	GGT	CAG	ATC	C			
Xhip-XhoI-Stop	CCG	CTC	GAG	CTA	TAC	AAT	GTA	GCT				
Xhip-RT-F	AGC	GGA	CCT	CAC	GAC	CAC	ATT	CTT				
Xhip-RT-R	TCA	CTT	AGC	CCA	TCC	ATC	TCC	TCC	AT			
Xhip-477-F	GAG	GGG	TGC	AGG	GGT	CTT	TAT	C				
Xhip-746-R	TAT	CTG	GCC	TCG	GCA	TGT	GTA	GTA				
Xhip_deg.F	GGA	GAY	GAA	AGR	GGM	YTG	CTA	AGC	C			
Xhip_deg.R	CCT	GTG	AAR	TCA	CTY	ARM	CCA	TCC	AT			
HIP5'newF	GAA	GGA	GAT	CTG	ATA	AAG	GAA	CC				
HIP5'newR	GGT	TCC	TTT	ATC	AGA	TCT	CCT	TC				

Xshh

Xshh-F	GGT	TGA	CCG	CGG	CCC	ATC	TAC		
Xshh-R	AGG	CGC	ATA	AGC	TCC	AGT	GTC	C	
Xshh-UTR-F1	CTC	ATT	TGC	CCA	TAA	TTA	CTG		
Xshh-UTR-R1	CTC	GTC	CGA	GCG	AAG	CCA	ATT	A	

Marker Oligonukleotide für RT-PCR

H4-F	CGG	GAT	AAC	ATT	CAG	GGT	ATC	ACT	
H4-R	ATC	CAT	GGC	GGT	AAC	TGT	CTT	CCT	
Xchh-F	TCC	CCA	ACT	ACA	ACC	CAG	ACA	TCA	
Xchh-R	AGA	CCG	GAC	ACC	CAG	GGA	GTT	ATC	
Xptc-2F	CTA	AAG	CGC	ACA	GGA	GCA	AGC		
Xptc-4R	CAG	GCT	GTA	GCG	TGT	ATT	GTC		
Siamois-F	AAA	CCA	CTG	ATT	CAG	GCA	GAG	G	
Siamois-R	GTA	GGG	CTG	TGT	ATT	TGA	AGG	G	
Xnr3-F1	ATG	GCA	TTT	CTG	AAC	CTG	TTC	TTC	
Xnr3-R1	AGG	TGG	AAC	GGT	GCT	CAC	ATG	GAT	

Sonstige Oligonukleotide

T7	TAA	TAC	GAC	TCA	CTA	TAG	GG
T7 (pCS2+)	ATA	CGA	CTC	ACT	ATA	GG	
T3	ATT	AAC	CCT	CAC	TAA	AGG	GA
SP6	GAT	TTA	GGT	GAC	ACT	ATA	G

2.4 Antikörper, Enzyme und Reaktionssysteme (Kits)**Antikörper:**

Primärantikörper:

Kaninchen-anti-MAPK	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Kaninchen-anti-phosphoMAPK	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Kaninchen-anti-pH3	Biomol GmbH, Hamburg
Ziege-anti-Fgf8b	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-Digoxigenin/AP	Roche, Mannheim
Maus-anti-FLAG M2	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Sekundärantikörper:

Kaninchen-anti-Ziege-HRP	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ziege-anti-Kaninchen-AP	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ziege-anti-Maus-HRP	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK

Enzyme:

alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
RNasin (40U/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
RNase T1	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
SP6 RNA-Polymerase (50 U/μl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
Superscript TM II RT	Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, USA
T7 RNA-Polymerase (50 U/μl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Pfu turbo DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
T4 DNA-Ligase (1 U/μl)	Gibco BRL, Eggenstein
Terminale Deoxynucleotidyl Transferase	Gibco BRL, Eggenstein

Kits:

pGEM-T Kit	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
PCR purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAEX Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
RNA Transcription Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNase free DNase Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RT-PCR Kit	Perkin-Elmer, Weiterstadt
SP6 mMESSAGE mMACHINE Kit	Ambion Inc., Austin, USA
SMART-Race-Kit	Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, USA
TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Wizard <i>Plus</i> SV Minipreps	Promega Deutschland GmbH, Mannheim

2.5 Medien und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Medien und Pufferlösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 110-120°C sterilisiert.

Hitzelabile Substanzen wurden durch Membranfilter (Porendurchmesser 0,2 µm, Sartorius) sterilfiltriert. Nährmedien wurden nach dem Autoklavieren bis auf ca. 50°C abgekühlt und mit den entsprechenden Selektivantibiotika versetzt.

Nährmedien:

LB-Agar: 1,5% (w/v) Agar (DIFCO) in LB-Flüssigmedium

Luria-Bertani (LB)-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton (DIFCO), 0,5% (w/v) Hefeextrakt (DIFCO), 1% (w/v) NaCl, pH 7,5

NZY-Agar: 1,5% (w/v) Agar in NZY-Flüssigmedium

NZY-Medium: 1% (w/v) NZ-Amin (Casein Hydrolysat); 0,5% (w/v) Hefeextrakt (DIFCO); 0,5% (w/v) NaCl; 8,1 mM MgSO₄ · 7 H₂O, pH 7,5

NZY-Top-Agar: 0,7% (w/v) Agar in NZY-Flüssigmedium

Antibiotika:

Antibiotika-Stammlösungen wurden aliquotiert und in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen bei -20°C aufbewahrt.

Ampicillin: 100 mg/ml in dH₂O, Verdünnung 1:1.000 (Endkonzentration: 100 µg/ml)

Penicillin/Streptomycin: 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (Sigma), Verdünnung 1:1.000 – 1:10.000

Puffer und Stammlösungen:

Denhardt's (100 x): 2% (w/v) BSA, 2% (w/v) PVP, 2% (w/v) Ficoll

Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung: 1M Na₂HPO₄ · 2 H₂O

EDTA: 0,5 M EDTA, pH 8,0

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid

Ficoll: 10% (w/v) Ficoll, sterilfiltriert

KCl-Lösung: 1 M KCl

LiCl-Lösung: 4 M LiCl

MgCl₂-Lösung: 1 M MgCl₂ · 6 H₂O

MgSO₄-Lösung: 1M MgSO₄ · 7 H₂O

NaCl-Lösung: 5 M NaCl

Natrium-Acetat-Lösung: 3 M NaCH₃COO

Natriumdihydrogenphosphat-Lösung: 1 M NaH₂PO₄ · 1 H₂O

PBS (10 x): 8% (w/v) NaCl; 2% (w/v) KCl; 65 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 18 mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4

SDS-Lösung: 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat

SSC (20 x): 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 7,2-7,4

SSPE (20 x): 3 M NaCl; 0,2 M Na₂HPO₄ · 2 H₂O; 20 mM EDTA, pH 7,4

TBE (10 x): 0,9 M Tris Base; 0,9 M Borsäure; 0,02 M EDTA

TBS (10x): 0,5 M Tris; 1,5 M NaCl, pH 7,6

Tris-HCl-Puffer (pH 7,5 oder 9,5): 1 M Tris-HCl, pH 7,5 bzw. 9,5

Triton-X100-Lösung: 25% (v/v)

Tween-20-Lösung: 20% (v/v)

2.6 Chemikalien

Biochemische Feinchemikalien wurden von den Firmen Roche Mannheim, Fluka, Roth, Serva und Biomol bezogen. Alle anderen Chemikalien stammten von den Firmen Fluka, Baker oder Merck und wiesen den höchsten Reinheitsgrad (p.A.) auf. Die komplexen Medienbestandteile wurden von DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA) bezogen.

Cyclopamin (Toronto Research Chemicals, North York, Canada). Stammkonzentration: 10mM.

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol; Roche, Mannheim) Stammkonzentration: 1mg/ml.

DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes inc., Eugene, Oregon, USA). Stammkonzentration: 40 mg/ml.

WgA (Wheat germ agglutinin; Molecular Probes inc., Eugene, Oregon, USA), Tetramethylrhodamin-gekoppelt. Stammkonzentration: 1mg/ml.

2.7 Geräte

Gebrauchswaren und Geräte wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen: Abimed (Hannover), Costar (Bodenheim), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Schütt (Göttingen), Greiner (Frickenhäusen), Kranich (Göttingen), Qiagen (Hilden), Sarstedt (Langenhagen), Siemens (Hannover)

Mikroinjektion

Microinjector 5242

Nadelzieher

Eppendorf, Hamburg

Leitz, Wetzlar; Science Products,
Hofheim

PCR

UNOII Thermoblock

Biometra, Göttingen

TRIO Thermoblock

Biometra, Göttingen

T3 Thermocycler

Biometra, Göttingen

Optik

Stereomikroskope

Stemi SV6, Stemi DV4,
Stemi 2000; Zeiss, Oberkochen

Kameraaufsatz

MC80; Zeiss, Oberkochen

Fotomikroskop

Axioskop; Zeiss, Oberkochen

Fotomikroskop

MZ FL; Leica, Wetzlar

Fotomikroskop

SZX 12; Olympus, Hamburg

Fluoreszenzmikroskop

Axioplan 2; Zeiss, Oberkochen

Computer**Hardware**

Power Macintosh 7500/100

Power Macintosh G3

Software

Bild/Grafikverarbeitung

Adobe Photoshop Version 4.0 (Adobe Systems
Europe Ltd., Edinburgh, Schottland)Freehand Version 7.0 – 9.0 (Macromedia Inc.,
San Francisco, USA)

DNA/Protein-Sequenzverarbeitung

EditSeq, MegAlign, SeqMan (DNASTAR
Inc., Madison, USA)MacMolly Tetra, Version 1.2 (Soft Gene
GmbH, Berlin)Blast-Suchsystem für Datenbanken (Altschul
et al., 1990)

Textverarbeitung

Microsoft Word Version X für Power
Macintosh und Microsoft Excel X
(Microsoft Corporation GmbH,
Unterschleißheim)**Datenbanken**

XMMR (Xenopus Molecular Marker Resource)

<http://cbrmed.ucalgary.ca/pvize/html/WWW/Welcome.html>Blast-Suchsystem für Datenbanken (Altschul *et al.*, 1990)SMART (www.embl.de)**Histologie**

Vibratom

Typ 1000; Pelco International, Redding,
California, USA und VT 1000S; Leica,
Wetzlar

Microtom

Jung RM 2065; Leica, Wetzlar

Gastromaster Mikrodisektionsgerät

Xenotek Engineering, Belleville, Illinois, USA

3. Methoden

Wenn nicht anders angeführt, wurden alle Methoden nach Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989) durchgeführt.

3.1 DNA-Methoden

3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

3.1.1.1 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab (Miniprep)

Zur schnellen Präparation geringer Mengen von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen, Sequenzierungen oder Subklonierungen wurde das DNA-Reinigungssystem „Wizard Plus SV Minipreps“ (Promega) eingesetzt. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Säulen. Dazu wurden von 3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß zweimal 1,5 ml für 5 min bei 14.000 Upm in der Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 C) sedimentiert und das Bakterienpellet mit 250 µl Resuspensionslösung gelöst. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer und viermaligem Mischen durch Invertierung der Reaktionsgefäße wurde das Lysat für 5 min bei Raumtemperatur mit 10 µl Alkalischer Protease inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 350 µl Neutralisationslösung versetzt, gemischt und für 10 min in der Tischzentrifuge bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in eine Säule überführt und für 1 min bei 14.000 UPM zentrifugiert. Die Säule mit der enthaltenen DNA wurde einmal mit 750 µl, einmal mit 250 µl Waschlösung gewaschen. Schließlich wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt und für 1 min bei 14.000 Upm eluiert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei –20°C gelagert.

3.1.1.2 Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab

Zur Präparation größerer Mengen reiner Plasmid-DNA für Klonierungen oder präparative Restriktionsverdaus wurde das Reaktionssystem „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) eingesetzt. Am Vortag wurden 50 µl einer Bakterien-Flüssigkultur oder eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektivantibiotikum überimpft und über Nacht unter Schütteln (200 Upm) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml-Falcon-Röhrchen für 10 min bei 4.000 Upm abzentrifugiert (Sorvall RC-5B) und das Pellet in 4 ml Puffer P1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde 2 min geschwenkt und anschließend 4 ml Puffer P3 zugegeben. Nach erneutem Schwenken wurde das Bakterienlysat in 12 ml-PPN-Röhrchen überführt und für 5 min in einem SS34-Rotor bei 10.000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine mit 3 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule geladen und die Säule mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml Puffer QC in frische PPN-Röhrchen eluiert. Zur DNA-Fällung wurde 0,7 x Vol. (3,5 ml) Isopropanol zugegeben, gut gemischt und für 15 min im SS34-Rotor (10.000 Upm, 4°C) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1,0 ml

70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50-100 µl Puffer TE aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäure-Konzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Pharmacia Biotech) bei 260 nm gegen einen Leerwert bestimmt. Die Konzentration wurde aus der OD_{260nm} wie folgt errechnet:

- $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg dsDNA
- $OD_{260} = 1$ entspricht 40 µg RNA
- $OD_{260} = 1$ entspricht 33 µg Oligonukleotid

Um die Reinheit (Proteinfreiheit) eines Nukleinsäure-Präparats abzuschätzen, wurde außerdem die OD bei 280 nm gemessen. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} beträgt bei proteinfreier DNA bzw. RNA 1,8-2,0.

3.1.3 Restriktionsspaltung von DNA

Zur analytischen und präparativen Spaltung von Plasmid-DNA wurde diese mit 2 bis 10 U einer Restriktionsendonuklease pro 1 µg DNA bis zu 24 Stunden bei 37°C im entsprechenden Restriktionspuffer inkubiert. Um unspezifische Enzymaktivität („star activity“) zu vermeiden, wurden nicht mehr als 10% Enzymvolumen im Gesamtansatz verwendet.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA/RNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden sie in einer Agarosematrix einem horizontalen elektrischen Feld ausgesetzt. Je nach Größe der DNA/RNA-Fragmente wurden Gele aus 0,8-1,5% (w/v) Agarose in TBE-Puffer verwendet, denen zum Nachweis der DNA/RNA-Banden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben wurde. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA/RNA-Proben mit 1 Vol. DNA- bzw. RNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophoresen wurden bei 80-150 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer (hauseigene Werkstatt) in TBE-Laufpuffer durchgeführt.

Anschließend wurden die DNA/RNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch (Herolab) sichtbar gemacht und mittels eines Videodokumentationssystems (EASY View) dokumentiert. Durch paralleles Auftrennen einer Molekulargewichtsstandardlösung („One kb Ladder“, Gibco) konnte die Größe der DNA/RNA-Fragmente bestimmt werden.

DNA-Probenpuffer (2 x): 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol; 30% (v/v) Glycerin

RNA-Probenpuffer (1-2 x): 95% Formamid; 0,025% Xylencyanol; 0,025% Bromphenolblau; 18 mM EDTA; 0,025% SDS (mMessage mMachine-Kit; Ambion Inc., Austin, USA)

DNA-Molekulargewichtsstandard „One kb Ladder“: 1 x DNA-Probenpuffer; 1/20 Vol. Boehringer Puffer H (10 x); 0,4 Vol. TE; 50 ng/μl „One kb Ladder“ (Gibco, 1 μg/μl); 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol; 30% (v/v) Glycerin

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation definierter DNA-Segmente. Hierzu wurden Oligonukleotide einer Länge von 18-30 Nukleotiden aus geeigneten flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz ausgewählt und von verschiedenen Herstellern (NAPS, MWG-Biotech) synthetisiert. Als Matrize („template“) dienten gereinigte Plasmid-DNA oder Flüssigkultur-Aliquots von Bakterien.

Ein Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt: 1 x PCR-Puffer (Perkin-Elmer), je 0,2 mM dNTPs, je 0,15 - 1,5 μM *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid, 0,5-1 U/20 μl *Taq*-Polymerase (Perkin-Elmer) und 1-100 ng DNA-Matrize. Das Reaktionsvolumen betrug 20-100 μl. Zum Schutz vor Verdunstung während der Temperaturzyklen wurde der Ansatz beim Verwenden des TRIO-Thermoblocks (Biometra) mit Mineralöl überschichtet. Im UNO II-Thermoblock und T3-Thermocycler (Biometra) war dies nicht erforderlich, da der Heizdeckel des Gerätes Kondensation verhinderte. Die Abfolge der einzelnen Schritte der PCR wurde durch Variation der Inkubationstemperatur im PCR-Gerät gesteuert; das Denaturieren der DNA-Matrize erfolgte bei 95 °C, das Anlagern der Oligonukleotide je nach Spezifität und Schmelzpunkt der Oligonukleotide bei 50-60°C und der Elongationsschritt bei 72°C. Ein Standardprotokoll für die Synthese eines bis zu 1.000 bp großen DNA-Segmentes bestand aus 30-40 Zyklen von je 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Anlagerung der Oligonukleotide bei 50-60°C und 1 min Polymerisierung pro kb bei 72 °C. Diesem Programm wurde ein Denaturierungsschritt von 2-3 min bei 95°C vorgeschaltet und nach Beendigung der Zyklen ein finaler Elongationsschritt von 10 min bei 72°C angehängt.

Nukleotid-Mischung: (dNTPs, Biomol, Hamburg) dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 100 mM wurden zu gleichen Anteilen vermischt (Endkonzentration jeweils 25 mM)

3.1.6 PCR-vermittelte *in vitro*-Mutagenese

Zur gezielten Veränderung von DNA-Sequenzen wie z. B. dem Einbringen von „Flag“-Epitop-Sequenzen wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) eingesetzt. Hierbei wurden in einer PCR-Amplifikation des gesamten Matrizenplasmids mit *Pfu*-Polymerase zwei komplementäre Oligonukleotide, welche die gewünschte

Mutation enthielten, direkt eingebaut und zu zwei zirkulären, nicht verknüpften DNA-Strängen elongiert. Die methylierte Matrizen-DNA wurde anschließend mit dem methylierungsabhängigen Restriktionsenzym Dpn I degradiert, während das mutierte, unmethylierte Syntheseprodukt erhalten blieb. Nach Transformation von *E. coli*-XL1 Blue Zellen wurden die Strangbrüche im Vektor durch bakterielle Reparaturenzyme repariert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung und *in vitro*-Translation von Plasmid-DNA aus einzelnen Bakterienkolonien überprüft.

3.1.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit dem „Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems). Das Verfahren basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977). Im Ansatz sind Didesoxyanaloga (ddNTPs) der vier verschiedenen dNTPs enthalten, welche je nach Base mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und in die neusynthetisierten DNA-Stränge eingebaut werden. Aufgrund des Fehlens der 3'-Hydroxylgruppe bei der Didesoxyribose kommt es zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen, wodurch ein DNA-Einzelstrang-Gemisch unterschiedlicher Kettenlängen erzeugt wird. Nach der Auftrennung dieses Gemisches in einem denaturierenden 7% Polyacrylamidgel können die jeweils 3'-terminalen Nukleotide der unterschiedlich langen DNA-Polymere mittels eines Lasers detektiert werden. Die Sequenzreaktionen wurden in 0,5 ml-Eppendorfgefäßen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 4 µl „Dye Terminator Ready Mix“, 10 pmol Oligonukleotid, 0,75 -1 µg ds DNA-„template“, dH₂O ad 20 µl.

Im Thermocycler (Perkin-Elmer) durchliefen die Ansätze das folgende Programm: 30 s 96°C, 15 sec 50°C, 4 min 60°C (26 Zyklen).

Zur Aufreinigung wurde der von Mineralöl befreite Sequenzansatz mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und mit 0,1 x Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 2,5 x Vol. Ethanol versetzt. Die Ansätze wurden 15-20 min bei RT und 14.000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) präzipitiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und in bei RT getrocknet. Nach dem Resuspendieren in 2,8 µl Formamid/10 mM EDTA wurde das Pellet bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 2 min bei 95 °C denaturiert.

Die Sequenzreaktionen wurden im hauseigenen Sequenzierlabor (A. Nolte) aufgetrennt und dokumentiert. Computergestützte Sequenzanalysen konnten mit Hilfe der Programme Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, USA) und MacMolly Tetra, Version 1.2 (Soft Gene GmbH, Berlin) durchgeführt werden.

3.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.1.8.1 PCR Purification Kit (Qiagen)

Um Produkte aus präparativen PCR-Ansätzen oder linearisierte Vektor-DNA aufzureinigen, wurde das „PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet. Dazu wurde 1

Volumen des Ansatzes wurde mit 5 Volumina Puffer PB gemischt und auf eine QIAquick Säule mit DNA-bindender Silicagel-Membran überführt. Nach Zentrifugation bei 14.000 Upm für 1 min wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen und zum Trocknen der Membran zweimal bei 14.000 für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt, mit 20-30 µl dH₂O versetzt, für 2 min bei 80°C inkubiert und durch Zentrifugation eluiert.

3.1.8.2 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Isolation einzelner DNA-Fragmente aus Restriktionsspaltungen wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Leuchttisch bei 366 nm mit einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten. Das isolierte Agarosestück wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Zur DNA-Extraktion wurde das „QIAEX Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet. Dazu wurde das Gelstück mit einem dreifachen Volumen Puffer QG1 versetzt und 10 min bei 50°C im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) vollständig aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine QIAquick-Säule geladen und 1 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert (8.000 Upm). Die Säule wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen, in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt, mit 20-30 µl dH₂O versetzt, für 2 min bei 80°C inkubiert und durch Zentrifugation eluiert.

3.1.9 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten (Inserts) in Vektoren wurden möglichst zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen gewählt, die inkompatible überhängende DNA-Enden generierten. Der Vektor und das Insert wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen über Nacht verdaut (vgl. 3.1.3). Anschließend folgte eine gelelektrophoretische Aufreinigung (vgl. 3.1.8.2) und die Ligation von geschnittenem Vektor und Insert (vgl. 3.1.10). Beim Fehlen geeigneter Restriktionsschnittstellen in den zu klonierenden DNA-Segmenten konnten diese in der PCR angefügt werden, indem Oligonukleotide verwendet wurden, die an ihrem 5'-Ende um das entsprechende Restriktionsmotiv sowie 3 zusätzliche Nukleotide verlängert waren.

3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA wurden diese mit 1 U T4-DNA-Ligase (Gibco) im vom Hersteller mitgelieferten Puffer (5 x T4-Ligase Puffer, Gibco) bei 18°C über Nacht in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert. Dabei wurden in der Regel 100 ng Vektor-DNA und Insert-DNA in einem bis zu dreifachen molaren Überschuß eingesetzt.

3.1.11 Klonierung von PCR-Produkten

Die aus einer mit *Taq*-Polymerase durchgeführten PCR hervorgehenden DNA-Fragmente besitzen zu etwa 50% einzelne Adenin-Überhänge an ihren 3'-Enden, die von der *Taq*-Polymerase angefügt wurden. Dieser Umstand wurde ausgenutzt, um die PCR-Produkte direkt und ungerichtet in Vektoren zu ligieren, welche stumpfe („blunt“) Enden besaßen und an ihren 5'-DNA-Enden mit entsprechenden Thymidin-Überhängen versehen wurden. Aufgereinigte PCR-Produkte konnten in Ligationen mit dem so präparierten Vektor pGEM-T (Promega) eingesetzt werden (vgl. 2.3). Ein Ligationsansatz des „pGEM-T Kits“ (Promega) war wie folgt zusammengesetzt: 1 µl T4-Ligase Puffer (10 x) oder 5 µl „Rapid ligation buffer“ (2 x), 1 µl pGEM-T Vektor (50 ng/ µl), x µl PCR-Produkt (in dH₂O), 1 µl T4-Ligase, dH₂O ad 10 µl.

3.1.12 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Zur Anzucht von Bakterien, die kompetent für die Elektrottransformation mit Plasmid-DNA waren, wurde zunächst ein Einzelkoloniausstrich des gewünschten Bakterienstammes auf LB-Agar-Platten (z.B. *E. coli* XL1-Blue mit 12,5 µg/ml Tetracyclin) angefertigt und eine einzelne Bakterienkolonie in 20 ml LB-Flüssigmedium überimpft. Nach Inkubation über Nacht unter Schütteln (200 Upm) bei 37°C wurden am folgenden Tag 2 l LB-Flüssigmedium mit der Übernachtskultur inokuliert. Bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien ($OD_{600} = 0,6-0,8$) wurde erneut bei 200 Upm und 37°C inkubiert und die Bakterienkultur anschließend im Eisbad gekühlt. Alle folgenden Schritte wurden mit auf 4°C vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 min in einer Sorvall-CL6B-Kühlzentrifuge (7.000 Upm; GSA-Rotor) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zunächst im Ausgangsvolumen an sterilem dH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die folgenden Waschschrte durchgeführt: 1 x 1 Vol. 10% (v/v) Glycerin in dH₂O, 1 x 0,5 x Vol. 10% (v/v) Glycerin in dH₂O, 1 x 1/20 Vol. 10% (v/v) Glycerin in dH₂O. Das Zellpellet wurde in maximal 2 ml 10% (v/v) Glycerin in dH₂O resuspendiert. Aliquots von je 40 µl der Zellsuspension wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.1.13 Elektrottransformation kompetenter Bakterienzellen

Die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA aus Ligationsansätzen wurde elektrisch durchgeführt. Dazu wurde das Elektroporationsgerät „*E. coli* Pulser“ der Firma Biorad verwendet. Vor der Pulsgebung wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Ein Aliquot mit 40 µl kompetenten Bakterien in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl DNA-Lösung (Ligationsansatz, vgl. 3.1.10) vermischt. Der Transformationsansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (d = 0,1 cm) überführt und luftblasenfrei an den Boden der Küvette geklopft. Die Küvette wurde einem elektrischen Puls von 1,8 kV und 25 µF ausgesetzt. Sofort nach der Pulsgebung wurden 0,5 ml LB-

Medium in die Küvette pipettiert und gut mit der Bakteriensuspension vermischt. Verschiedene Volumina (z. B. 20, 200 µl) der Suspension wurden mittels steriler Glaskugeln auf bei 37 °C vorgewärmten LB-Agar-Platten verteilt, die ein der Plasmidresistenz entsprechendes Selektivantibiotikum enthielten. Bei Pulszeiten von 3,9-4,5 s wurde eine gute Transformationseffizienz erzielt. Konnte zur Kontrolle der Insertion eine Blau/Weiß-Selektion durchgeführt werden, wurden vor dem Ausplattieren der Zellen auf jede Platte 40 µl IPTG-Lösung und 40 µl X-Gal-Lösung aufgebracht. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht invertiert im Brutschrank inkubiert und konnten anschließend bei 4 °C gelagert werden.

IPTG (Isopropylthiogalactosid): 100 mM IPTG in dH₂O

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid): 20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

3.1.14 Nachweis der Integration klonierter DNA-Fragmente

Um Bakterienklone zu identifizieren, die das gewünschte Insertionsfragment enthielten, wurde eine PCR mit Flüssigkultur-Aliquots („culture-PCR“) der Bakterienkolonien oder direkt mit Koloniematerial durchgeführt („colony-PCR“). Alternativ wurden von einigen Bakterienkolonien Plasmidpräparationen im analytischen Maßstab durchgeführt, welche im Anschluss in Restriktionsverdaus analysiert werden konnten. In die PCR-Reaktionen wurde eine Kombination von zwei gegenläufigen Oligonukleotiden eingesetzt, die spezifisch für das Insert waren (vgl. 3.1.5). Die Insertion von DNA-Fragmenten, deren Sequenz nicht bekannt war, konnte durch Verwendung zweier gegenläufiger vektorspezifischer Oligonukleotide überprüft werden, wobei an der Produktgröße der Integrationserfolg zu erkennen war.

In einem Ansatz der „colony-PCR“ (22,5 µl Gesamtvolumen) wurden 2,5 µl Flüssigkultur eingesetzt. Von „positiven“ Bakterienkolonien konnten Flüssigkulturen zur präparativen Plasmidisolation angeimpft werden (vgl. 3.1.1.2).

3.2 RNA-Methoden

Zur Inaktivierung von RNasen wurden die zum Arbeiten mit RNA bestimmten Gefäße gründlich mit Desinfektionsmittel gereinigt und mit dH₂O gespült. Kunststoffgefäße wurden fabrikneu und unbehandelt verwendet. Hitzelabile Substanzen wurden in DEPC-dH₂O gelöst. Bei der Arbeit mit RNA wurden Latex-Einmalhandschuhe getragen und filtergestopfte Pipettenspitzen verwendet.

DEPC-dH₂O: 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in dH₂O, Inkubation für 4-12 h bei 37°C und anschließendes Autoklavieren für 20 min bei 121°C.

3.2.1 Isolierung von DNA-freier Gesamt-RNA aus *Xenopus laevis*

Isolierte DNA-freie Gesamt-RNA aus *Xenopus* wurde in der RT-PCR zu Expressionsstudien und für cDNA-Klonierungen verwendet. Zur Analyse von Induktionsprozessen wurde RNA aus manipulierten animalen Gewebeexplantaten („animal caps“) extrahiert und in quantitative RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

3.2.1.1 Embryonalstadien

Um große Mengen Gesamt-RNA aus *Xenopus*-Embryonen zu extrahieren, wurden Embryonen (100-400mg) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder sofort oder nach Lagerung bei -70°C verwendet. Die Embryonen wurden unaufgetaut in einen Homogenisator überführt und mit 1 ml Trizol/100 mg Embryonen versetzt. Die Embryonen wurden solange homogenisiert, bis keine Spuren des Gewebes mehr zu erkennen waren. Der Ansatz wurde in ein 12 ml-PPN-Röhrchen überführt und für 10 min bei 10.000 Upm bei 4°C im SS34-Rotor (Sorvall-RC-5B) zentrifugiert. Der entstandende Überstand wurde in ein neues PPN-Röhrchen überführt und mit 200 µl Chloroform/ml Überstand versetzt, durch Schütteln gemischt und erneut für 10 min bei 10.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues PPN-Röhrchen überführt und 1:1 mit Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert. Danach wurde die Oberphase 1:1 mit Isopropanol gemischt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 75% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA wurde anschließend mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Dazu wurde die RNA mit 50 µl DEPC-H₂O aufgefüllt und mit 350 µl Puffer RLT gemischt, danach mit 250 µl 100% Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Säule gegeben. Nach 15 sec Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 10.000 Upm wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt, mit 350 µl Puffer RW1 versetzt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 80 µl DNase-Lösung (10 µl DNaseI und 70 µl Puffer RDD, RNase free DNase Set, Qiagen) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Säule zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Zur Elution der RNA wurde die Säule zweimal mit 25 µl DEPC-H₂O versetzt, für 2 min bei 80°C inkubiert und für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert, so daß ein Gesamtvolumen von 50 µl entstand. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -70°C gelagert. Kleine Mengen Gesamt-RNA aus Embryonen wurde wie aus animalen Gewebeexplantaten mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) isoliert (vgl. 3.2.1.3).

3.2.1.2 Adulte Gewebe und Organe

Aus *Xenopus* Weibchen oder Männchen (möglichst nach der Präparation von Hoden) wurden Gewebe und Organe entnommen und mit 1 x MBSH gewaschen. Die zur RNA-Extraktion bestimmten Gewebe und Organe wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und mit einem in Flüssigstickstoff gekühlten Mörser pulverisiert. Das Pulver wurde in vorgekühlten 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und bis zur

Extraktion bei -70°C gelagert. Die RNA-Extraktion wurde wie unter 3.2.1.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.1.3 Animale Gewebeexplantate

Um RNA aus kultivierten animalen Explantaten (animalen Kappen) oder kleine Mengen Gesamt-RNA aus Embryonen zu extrahieren, wurden diese im gewünschten Stadium in einem möglichst geringen Puffervolumen in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und entweder sofort verwendet oder bei -70°C gelagert. Zur RNA-Extraktion wurde das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) verwendet. Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Flüssigstickstoff/aus dem -70°C Gefrierschrank wurde der Probe 350 µl Puffer RLT mit 1% (v/v) β-Mercaptoethanol zugegeben. Die animalen Kappen/Embryonen wurden durch 10-20maliges Auf-und Absaugen in einer 200 ml Pipettenspitze homogenisiert und 1 Vol. 70% Ethanol zugefügt. Nach Mischen durch Pipettieren wurden die Probe auf eine RNeasy Säule pipettiert und 15 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen und für 30 min bei 37°C mit 80 µl DNase-Lösung (10 µl DNaseI und 70 µl Puffer RDD, RNase free DNase Set, Qiagen) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 350 µl Puffer RW1 wurde die Säule zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Zur Elution der RNA wurde die Säule mit 35 µl DEPC-H₂O versetzt, für 2 min bei 80°C inkubiert und für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -70°C gelagert.

3.2.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Analyse der Expression von Genen in Embryonalstadien, adulten Geweben oder Organen oder zur Klonierung von cDNAs wurde mRNA revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde in einer anschließenden PCR unter Verwendung von spezifischen, gegenläufigen Oligonukleotiden amplifiziert. Hierbei wurde mit dem „RT-PCR Kit“ (Perkin-Elmer) gearbeitet.

3.2.2.1 Semiquantitative RT-PCR

Die reverse Transkription von RNA wurde in einem Ansatz des RT-PCR Kits (Perkin Elmer) durchgeführt, der wie folgt zusammengesetzt war: 2 µl 10 x PCR-Puffer II, 4 µl 25 mM MgCl₂, je 2 µl dATP; dCTP; dGTP; dTTP-Lösung (10 mM), 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl), 1 µl Random Hexamers (50 µM), 1 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl), bis zu 3 µl DNA-freie Gesamt-RNA (bis zu 1 µg), RNase-freies dH₂O ad 20 µl. Der Ansatz wurde gemischt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Transkription erfolgte in einem PCR-Gerät (Trio, Biometra) mit dem folgenden Temperaturprofil: 10 min 22 °C (Anlagerung der Oligonukleotide), 30 min 42°C (reverse Transkription), 5 min 99°C (Inaktivierung der reversen Transkriptase), Abkühlen auf 4°C.

Die so erhaltene cDNA wurde anschließend in eine PCR-Reaktion eingesetzt, indem jedem Ansatz folgende Komponenten hinzugefügt wurden: 8 µl 10 x PCR-Puffer II, 2 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM), 1 µl je 15 µM *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid-

Lösung, 0,5 µl *Taq*-Polymerase (5U/µl, Perkin-Elmer), dH₂O ad 80 µl (Gesamtvolumen der Reaktion: 100 µl).

Formamid-TBE-Farbstoff-Mix: 1 x TBE; 50% (v/v) Formamid (deionisiert); 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol in dH₂O

3.2.3 cDNA-Synthese und RT-PCR mit der RACE („rapid amplification of cDNA ends“) Technik

Zur Synthese von 5'-Enden bestimmter Transkripte wurde das „SMART- („switching mechanism at 5' end of RNA transcript“) RACE Kit“ (Clontech) verwendet. Dabei wird während der cDNA-Synthese an das 5'-Ende der RNA-Moleküle unspezifisch ein Oligonucleotid angehängt, das in der späteren RT-PCR Reaktion von einem passenden Primer erkannt wird. In Kombination mit einem genspezifischen Primer kann so ein cDNA-Abschnitt eines Gens mit dem vollständigen 5'-Ende erhalten werden.

3.2.3.1 SMART-RACE cDNA Synthese

Die reverse Transkription der RNA erfolgte unter Verwendung der „Superscript TM II RT“ (Clontech). Diese Reverse Transkriptase hängt an das 3'-Ende des „First Strand“ cDNA Stranges 3-5 Nukleotidreste (vorwiegend C-Reste) an. Das SMART II Oligonukleotid hybridisiert an diesen dC-Resten und dient erneut als Startermolekül für die Reverse Transkriptase. Als Matrize wurde total RNA von Embryonen verwendet.

Zunächst wurde je 1 µg RNA mit 1 µl 5'-CDS Primer (100 µM) und 1 µl SMART II Oligonukleotid (10 µM) versetzt und mit DEPC-H₂O auf 5 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 2 min bei 70°C inkubiert und für 2 min auf Eis abgekühlt, wodurch Sekundärstrukturen innerhalb der RNA denaturiert werden sollten. Anschließend wurden 5 µl eines cDNA Synthese Mix hinzugegeben und der gesamte Ansatz für 90 min bei 42°C inkubiert. Der cDNA Ansatz wurde anschließend mit 100 µl Tris-EDTA-Puffer verdünnt und für 7 min bei 72°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

cDNA Synthese Mix: 1 µl 5x Reaktionspuffer („First Strand“ Puffer), 1 µl 20 mM DTT, 1 µl dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl Superscript TM II RT (200U/µl)

3.2.3.2 SMART-RACE RT-PCR

Ausgehend von 5 µl cDNA wurde eine RT-PCR mit einem genspezifischen Primer (GSP) und einem im Kit enthaltenen universellen Primer (UPM) durchgeführt. Dazu wurden folgende Bedingungen gewählt: Strangtrennung für 30 sec bei 94°C, Annealing für 30 sec bei 68°C, Amplifikation für 90 sec bei 72°C (35 Zyklen). Vor Beginn des ersten Zyklus wurde der Denaturierungsschritt auf 3 min verlängert. Die Amplifikation wurde nach dem letzten Zyklus um 10 min verlängert, um die Synthese unvollständig replizierter DNA-Stränge abzuschließen. Das entstandene PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel überprüft und mit dem „PCR purification Kit“ (Quiagen) aufgereinigt.

SMART-RACE RT-PCR Ansatz: 5 µl cDNA; 5 µl PCR-Puffer; 2,5 µl dNTPs; 0,8 µl Polymerase-Mix; 1 µl genspezifischer Primer (10 µM); 5 µl universeller Primer; ddH₂O ad 50 µl

3.2.3 *In vitro*-Synthese von RNA

3.2.3.1 *In vitro*-Synthese markierter RNA-Sonden

Zur Synthese von markierten Antisense-RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen wurden *in vitro* Transkriptionen in Anwesenheit von Digoxigenin-markiertem rUTP durchgeführt. Als „template“ für die RNA-Polymerase diente linearisierte Plasmid-DNA, die mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt worden war (vgl. 3.1.8.1).

Ein Transkriptionsansatz (RNA Transkriptions-Kit, Stratagene) setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 5 µl 5 x Transkriptionspuffer, je 1 µl 10 mM rATP, rCTP, rGTP; 0,65 µl 10 mM rUTP; 0,35 µl 10 mM Digoxigenin-rUTP (Boehringer); 1 µl 0,75 M DTT; 1 µl RNasin (40 U/µl); 1-13 µl linearisierte „template“-DNA (Endkonzentration 1 µg); 1,5 µl T3, T7 oder SP6-RNA-Polymerase (10 U/µl); RNase-freies dH₂O ad 25,5 µl.

Der Ansatz wurde 2,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA-Matrize durch Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase I (Roche) 15 min bei 37°C verdaut. Die RNA-Sonde wurde mit Hilfe des Reaktionssystems „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 3.2.1.1).

3.2.3.2 *In vitro*-Synthese von Cap-mRNA für Mikroinjektionen

Synthetische mRNA für Mikroinjektionen wurde mit Hilfe des „SP6 mMESSAGE mMACHINE Kits“ (Ambion) hergestellt. Dabei wird der RNA während der *in vitro* Synthese am 5'-Ende der Transkripte eine 7-Methylguanosin-„Kappe“ angefügt.

Ein Ansatz des „SP6 mMESSAGE mMACHINE Kits“ enthielt: 2 µl 10 x SP6 Reaktionspuffer, 10 µl 2 x rNTP/CAP Mix, 5 µl DNA-Matrize (0,2 µg/µl in RNase-freiem dH₂O), 2 µl SP6-Enzym Mix, RNase-freies dH₂O ad 20 µl. Nach 2-3 h Inkubation bei 37°C wurde dem Ansatz zur Degradation der DNA-Matrize 1 µl RNase-freie DNase I zugegeben und 15 min bei 37°C verdaut. Lag die zu transkribierende cDNA in einem Plasmid hinter einem T7-Promotor, so wurde statt Sp6- eine T7-Polymerase (Stratagene) eingesetzt.

3.2.3.3 Aufreinigung synthetischer RNA

Um synthetische RNA von Salzen, Enzymen und Nukleotiden abzutrennen, wurden die Ansätze mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) aufgereinigt (vgl. 3.2.1.1). Der Reaktionsansatz wurde dazu mit RNase-freiem dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und 350 µl Puffer RLT sowie 250 µl Ethanol zupipettiert. Nach dem Mischen wurde die Lösung auf eine RNeasy-Säule übertragen und 15 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Es wurde zweimal mit je 500 µl Puffer RPE gewaschen, die Säule trocken zentrifugiert und bei 37 °C für 10 min getrocknet. Die RNA wurde mit 25 µl RNase-freiem dH₂O in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß eluiert.

3.3 Durchmustern einer cDNA Bank

Um einen Phagen aus einer Phagenbank zu isolieren, der die gesuchte cDNA enthielt, wurde eine fraktionierte *Xenopus* λ -Zap Express (Stratagene) cDNA-Phagenbibliothek mit Hilfe der PCR unter Verwendung degenerierter oder spezifischer Oligonukleotide durchmustert. Die cDNAs lagen in den Phagen im pBK-CMV Plasmid mit Kanamycin-Resistenz vor. Durch wiederholte Verdünnung und Vermehrung der Phagen aus positiven Fraktionen wurde der gesuchte Phage in Flüssigkultur angereichert, bis ein reiner Phagenklon durch Ausplattieren isoliert werden konnte. Aus dem isolierten Einzelphage wurde schließlich mittels eines Helferphagen ein zirkuläres Phagemid isoliert, das im weiteren als Plasmid in Bakterien vermehrt werden konnte.

3.3.1 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung des Titers einer Phagensuspension wurde in SM-Puffer eine Verdünnungsreihe der Phagen erstellt (10^{-1} - 10^{-10}). Diese wurde auf NZY-Agarplatten wie unten beschrieben ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die entstandenen Plaques („plaque forming units“ = pfu) wurden ausgezählt und auf die unverdünnte Phagensuspension hochgerechnet (pfu/ml).

SM-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 8 mM MgSO₄; 100 mM NaCl; 0,01% Gelatine, sterilfiltriert (0,45 μ m)

3.3.2 Phagenplattierung

Ein Einzelkolonieausstrich des Bakterienstammes *E. coli* XL1-Blue MRF' wurde auf tetracyclinhaltigen LB-Agarplatten angefertigt. Mit einer MRF'-Einzelkolonie wurde eine Tagkultur in 50 ml LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin, 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose angeimpft. Nach ca. 5 h Wachstum wurden die Zellen bei 4.000 Upm für 10 min in einem GSA-Rotor pelletiert und in 10 mM MgSO₄ zu einer OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert. Zur Infektion mit Phagen wurden 600 μ l der Bakteriensuspension zusammen mit 2,5 μ l der jeweiligen Phagenverdünnung 20 min bei 37°C für die Präadsorption geschwenkt. Dies erfolgte zu analytischen Zwecken in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen oder, zu präparativen Zwecken, in 12 ml-PPN-Röhrchen.

3.3.2.1 Phagenplattierung auf NZY-Agar-Platten

Das Präadsorptionsgemisch aus Bakterien und Phagen wurde zu 3 ml flüssigem, auf exakt 48°C vorgewärmten, NZY-Top-Agar gegeben, zügig gemischt und der Inhalt auf vorgewärmten NZY-Agarplatten (d=9,5 cm) gleichmäßig verteilt. Nach 1 h Inkubation bei RT zum vollständigen Erstarren des Top-Agars wurden die Platten invertiert bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.3.2.2 Phagenplattierung in Mikrotiterplatten

Sollten die Phagen in Titerplatten amplifiziert werden, wurden 6,4 ml NZY-Flüssigmedium zu dem Gemisch aus Bakterien und Phagen in das 12 ml-PPN-Röhrchen pipettiert und jeweils in Aliquots zu 100 µl auf 8 x 8 Vertiefungen einer 96-Loch-Titerplatte verteilt. Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 37°C und 250 Upm geschüttelt. Eine gute Amplifikation der Phagen war am folgenden Tag an einem klaren Phagenüberstand und Sedimenten aus Bakterienzelltrümmern zu erkennen.

3.3.3 Anreicherung eines Kandidaten-Phagen

Um positive Phagenfraktionen zu identifizieren, wurden Aliquots einzelner Fraktionen einer cDNA-Bank in einer PCR mit degenerierten oder spezifischen Oligonukleotiden durchmustert, wobei wie in der „colony“-PCR vorgegangen wurde. Verschiedene Verdünnungen (von unverdünnt bis 10^{-5}) der positiven Phagen-Einzelfraktionen wurden in 8 x 8 Aliquots à 100 µl in Mikrotiterplatten plattiert und diese nach der Amplifikation erneut in der PCR analysiert. Um die Anzahl der zu untersuchenden Fraktionen zu reduzieren, wurden jeweils 8 µl der horizontalen Reihen A (1-8) bis H (1-8) der Platte zu einem Gemisch (Pool) vereint und in der PCR getestet. Zeigte eine Reihe ein positives Signal, konnte die positive Fraktion in dieser Reihe durch eine zweite PCR auf Aliquots der Einzelfraktionen lokalisiert werden. Positive Fraktionen wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und nach Zugabe von zwei Tropfen Chloroform zur Konservierung der Phagen bei 4°C aufbewahrt. Es wurde jeweils mit den positiven Fraktionen weitergearbeitet, welche aus der höchsten Verdünnungsstufe hervorgingen. Die Verdünnungs- und Amplifikationsrunden wurden mehrfach wiederholt, bis der gesuchte Phage in der Fraktion gegenüber anderen Phagen möglichst stark angereichert war.

3.3.4 Isolation eines spezifischen Phagen

Um einen reinen Klon des gesuchten Phagen zu isolieren, wurde die angereicherte Fraktion auf NZY-Agar-Platten ausplattiert. Einzelne Phagen-Plaques von ca. 1 mm Durchmesser wurden mit dem schmalen Ende einer Pasteurpipette ausgestochen und in je 100 µl SM-Puffer überführt. Aliquots der Plaque-Suspensionen wurden in der PCR getestet. Positive Einzelplaques konnten nach Zugabe von zwei Tropfen Chloroform bei 4°C in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen gelagert werden. Um die Reinheit des Phagen sicherzustellen, wurden Aliquots der positiven Einzelphagensuspension erneut ausplattiert und 8-12 Plaques ausgestochen. Waren sämtliche der ausgestochenen Phagenplaques in der PCR erneut positiv, konnte davon ausgegangen werden, dass ein reiner Klon vorlag.

3.3.5 Zirkularisierung (Exzision) des Phagen-Inserts

Zur Exzision des Phagemids aus dem reinen Phagenklon musste zunächst eine hochkonzentrierte („high titer“) Phagensuspension erzeugt werden. Dazu wurde der reine Phage auf Agarplatten zu konfluentem Wachstum ausplattiert. Die Phagen wurden durch Zugabe von 2-3 ml SM-Puffer zur Agar-Platte für ca. 3 h bei RT durch Inkubation auf einer Wippe vom Agar abgeschwemmt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 75 µl Chloroform wurde gemischt, 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Der konzentrierte Phagenüberstand wurde nach Zugabe von 0.3%-Vol. Chloroform bei 4°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Exzision wurden Über-Nacht-Kulturen der *E. coli* Stämme XL1-Blue MRF' und XL0LR angeimpft, aus welchen Tagkulturen inokuliert wurden. Die XL0LR-Zellen wurden bis zum Erreichen einer $OD_{600}=1,0$ kultiviert und bei 4 °C zwischengelagert. Die OD_{600} der MRF'-Zellen wurde in 10 mM $MgSO_4$ auf 1,0 eingestellt. In einem 12 ml-PPN-Röhrchen wurden 200 µl der MRF'-Zellsuspension zusammen mit 250 µl der hochkonzentrierten Einzelphagensuspension und 1 µl ExAssist-Helferphage 15 min bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Flüssigmedium wurde 2,5 h bei 37°C geschüttelt. Hierbei wurde ein definierter Bereich des Phagen, welcher die inserierte cDNA enthielt, vom Helferphagen einzelsträngig amplifiziert, zirkularisiert und als Phagemid verpackt aus dem Wirtsbakterium ausgeschleust. Zum Abtöten des Wirtsbakteriums wurde anschließend der Ansatz für 15 min auf 70°C erhitzt, die Bakterien abzentrifugiert und der Phagemid-Überstand in ein neues 12 ml-PPN-Röhrchen überführt. Um den *E. coli* Stamm XL0LR mit dem Phagemid zu infizieren, wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen je 10 µl oder 100 µl Phagemid-Überstand mit 200 µl frischen XL0LR-Zellen ($OD_{600}=1,0$) 15 min bei 37°C geschwenkt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurde für weiter 45 min unter Schwenken bei 37°C inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 2 x 200 µl auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den entstandenen Bakterien-Einzelkolonien konnten im Anschluss Flüssigkulturen angeimpft und das isolierte Plasmid mit der gesuchten cDNA amplifiziert werden.

3.4 Präparation von *Xenopus*-Embryonalstadien

3.4.1 Präparation von *Xenopus*-Testis

Zur Befruchtung der Gelege musste vor Beginn der Eiablage Testis aus *Xenopus* Männchen isoliert werden. Dazu wurde ein Männchen dekapitiert und ventral aufgeschnitten. Die weißlichen, ovalen Hoden wurden entnommen und in eiskalten 1x MBSH-Puffer überführt. Unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin konnten sie bei 4°C bis zu einer Woche gelagert werden.

MBSH (1x): 10 mM HEPES, pH 7,4; 88 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM $NaHCO_3$; 0,82 mM $MgSO_4$; 0,41 mM $CaCl_2$; 0,66 mM KNO_3

3.4.2 Stimulation der Eiablage

Um die Eiablage für den folgenden Morgen zu stimulieren, wurden einem Weibchen gegen 18 Uhr 50U humanes Gonadotropin (HCG, 500 U/ml) mittels einer 1 ml-Spritze mit G27-Kanüle in den dorsalen Lymphsack injiziert. Gegen 23 Uhr desselben Tages erfolgte eine weitere Injektion von 500-800U HCG. Die Weibchen wurden über Nacht bei ca. 18 °C gehalten. Zur meist spontanen Eiablage wurden die Weibchen über eine leere Petrischale gehalten.

3.4.3 Befruchtung und Entwicklung

Die Gelege wurden mit Spermien aus präparierten Hoden befruchtet. Um die Spermien freizusetzen, wurde ca. 1/5 eines Hodens mit einer Mikroschere in ca. 700 µl 1 x MBSH mazeriert. Die freigesetzten, aber inaktiven Spermien wurden auf Eis bis zum Gebrauch gelagert. Nach Eiablage wurden 100 µl der Spermien entnommen, auf die Eier gebracht und zur Aktivierung mit 900 µl H₂O verdünnt. Durch die Verringerung der Ionenkonzentration erlangten die Spermien ihre volle Beweglichkeit. Die Eier wurden vorsichtig mit den Spermien vermischt und zu einer Einzelschicht auseinandergezogen. Nach ca. 5 min wurde mit 0,1 x MBSH überschichtet. Eine Stunde nach der Befruchtung wurden die Embryonen durch 3 minütige Inkubation in 2 % Cystein (pH 7,9-8,1) unter Schwenken von ihrer Gallerthülle befreit und dreimal mit 0,1 x MBSH gespült. Die Embryonen wurden auf einer Temperierplatte bei 13-16°C bis zu den gewünschten Stadien inkubiert. Um die Feinstrukturen von Albinoembryonen besser zu erkennen, konnten diese mit dem Vitalfarbstoff Nilblau angefärbt werden.

2% Cystein-HCl: 2% (w/v) L-Cystein-HCl, pH mit NaOH einstellen

Nilblau-Färbelösung: 0,01% (w/v) Nilblau in 50 mM Na₂HPO₄; 50 mM NaH₂PO₄; vor Gebrauch filtrieren

3.5 Mikromanipulation von *Xenopus*-Embryonen

3.5.1 Mikroinjektionen

Proteine wurden im *Xenopus* Embryo überexprimiert, indem ihre synthetische Cap mRNA in einzelne Blastomere von *Xenopus* Embryonen des 2- bis 4-Zell-Stadiums injiziert wurden. Mit einem Nadelziehgerät (Leitz bzw. Narishige) wurden Glaskapillaren (GC100F-16, Clark Electromedical Instruments, Reading, England) dünn ausgezogen. Die mRNA-Lösung wurde in eine präparierte Glaskapillare gefüllt, die Nadel in eine luftdruckregulierte Mikromanipulationsapparatur (Mikroinjektor 5242, Eppendorf) eingespannt und die Spitze mit einer Uhrmacherpinzette unter Beobachtung abgebrochen. Um zu gewährleisten, dass die Spitze der Nadel fein genug war, wurde der Injektionsdruck möglichst hoch (1.500-2.000 hPa) gehalten. Durch Variation der Injektionszeit (0,1-0,3 s)

wurde das zu injizierende Volumen auf 5 nl näherungsweise eingestellt, indem der Tropfendurchmesser (d) anhand einer Mess-Skala bestimmt wurde ($d=0,2\text{ mm} \approx 4,2\text{ nl}$; $d=0,25\text{ mm} \approx 8,2\text{ nl}$). Zur Injektion wurden die Embryonen in Injektionspuffer inkubiert und auf Objektträger aufgebracht, die mit Homogenat aus unbefruchteten *Xenopus*-Eiern beschichtet waren. Nach ca. 1 h Inkubation in Plastik Kulturschalen (Greiner) wurden die Embryonen in Post-Injektionspuffer umgepuffert, der nach ca. 2 h gegen 0,1 x MBSH ausgetauscht werden konnte. Bei längeren Kulturzeiten wurde dem Puffer Penicillin/Streptomycin zugefügt. Zur Fixierung wurden die Embryonen bei RT 1 h in 1 x MEMFA inkubiert, danach in 100% Ethanol überführt und bei -20°C gelagert.

Die fotografische Dokumentation von phänotypischen Effekten der Injektion auf die Embryonalentwicklung erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops mit digitaler Kamera (MZ FL, Leica).

Injektionspuffer: 1% Ficoll; 1 x MBSH

Post-Injektionspuffer: 0,5% Ficoll; 0,1 x MBSH

1x MEMFA: 1x MEM; 4% Formaldehyd

3.5.2 Inhibition der mitotischen Aktivität durch Behandlung mit Hydroxyurea/Aphidicolin (HUA)

Viele morphoregulatorische Prozesse während der Embryonalentwicklung sind von der Neuentstehung von Zellen abhängig, andere nicht. Unter Benutzung von Hydroxyurea und Aphidicolin als mitotische Inhibitoren kann die Entwicklung von *Xenopus laevis* in Abwesenheit von Zellproliferation untersucht werden. Hydroxyurea dient dabei als Inhibitor der Ribonukleosiddiphosphat-Reduktase, einem Enzym, das die Umwandlung von Ribonukleotiden in Desoxyribonukleotide katalysiert (Gilman et al., 1980). Aphidicolin inhibiert die eukaryotische DNA-Polymerase α (Ikegami et al., 1978). In Zellkultur-Experimenten wurde nachgewiesen, daß beide Substanzen die DNA-Replikation inhibieren, ohne einen negativen Einfluß auf Zellwachstum oder Differenzierung der Zellen auszuüben (Jensen, 1987). *Xenopus laevis*-Embryonen wurden im Gastrulastadium (Stadium 10,5) manuell von der Vitellinmembran befreit. Anschließend wurden sie in 0,1 x MBS überführt, daß 20 mM Hydroxyurea und 150 μM Aphidicolin enthielt (Harris und Hartenstein, 1991). Die Embryonen wurden in diesem Medium bis zum frühen Neurulastadium (Stadium 12,5) inkubiert, eine Stunde in MEMFA fixiert (vgl. 3.5.1), in 100% Ethanol überführt und bei -20°C gelagert.

3.5.3 Markierung von Zellgruppen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Ein wesentlicher Bestandteil der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* ist die Umordnung von Zellgruppen. Dabei können Zellen entweder aktiv, gesteuert durch morphoregulatorische Prozesse, innerhalb des Embryos zu ihrem Bestimmungsort wandern, oder Zellgruppen werden durch die Bewegung von benachbarten Zellen zu ihrem

Bestimmungsort rekrutiert. Das Schicksal bestimmter Zellen kann durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden.

Embryonen des späten Gastrulastadiums (NF Stadium 12,5) wurden in 1 x MBSH-Puffer in eine Petrischale überführt, die mit Knetmasse gefüllt war. Nachdem die Vitellinmembran des Embryos mittels Uhrmacherpinzetten entfernt worden war, wurde der Embryo in der Knetmasse vorsichtig fixiert, so daß die Manipulationsstelle frei lag. Mit einer sehr feinen Uhrmacherpinzette wurde nun ein kleines Stück (etwa 0,1 mm) der äußeren Ektodermis des Embryos entfernt. Der Fluoreszenzfarbstoff DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes inc., Eugene, Oregon, USA) wurde zunächst auf eine Konzentration von 0,8 mg/ml in 200mM Sucrose verdünnt. Ein kleiner Tropfen (ca. 0,5 nl) des verdünnten Farbstoffes wurde mittels einer Mikromanipulations-Apparatur (s.o.) auf die freigelegte Stelle des Embryos gebracht. Der Embryo wurde vorsichtig aus der Fixierung gelöst, mit einer Glaspipette mit erweiterter Spitze in 0,1 x MBSH in eine Gewebekulturplatte (24 Well) überführt und darin bis zum gewünschten Zeitpunkt kultiviert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops (MZ FL, Leica) unter Verwendung der UV-Lampe bei 485 nm.

3.6 Präparation und Kultivierung von animalen Gewebeexplantaten („animal caps“)

Synthetische mRNA wurde in den animalen Pol beider Blastomere von Embryonen im 2-Zell-Stadium injiziert. Nach dem Erreichen des Blastula-Stadiums (NF Stadium 9-9,5) wurden die injizierten Embryonen sowie nicht-manipulierte Kontrollembryonen in 0,5 x MBSH-Puffer überführt und mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten von der Vitellinmembran befreit. Aus dem am animalen Pol befindlichen Dach des Blastocoels wurde mit Hilfe eines „Gastromaster“-Mikrodissektionsgeräts (Xenotek Engineering, USA) ein Explantat mit einem Durchmesser von ca. 400 µm herausgeschnitten und die animalen Kappen vorsichtig mit Glaspipetten in Plastik-Kulturschalen mit einer Beschichtung aus 1% Agarose in 0,5 x MBSH mit Penicillin/Streptomycin überführt. Die animalen Kappen wurden solange auf einer Kühlplatte bei 15°C kultiviert, bis unbehandelte Kontrollembryonen das gewünschte Stadium erreicht hatten.

3.7 *In situ* Hybridisierung und Histologie

3.7.1 Fixierung von *Xenopus* Embryonen

Waren die Embryonen oder animalen Kappen für eine „whole mount“ *in situ* Hybridisierung bestimmt, wurden sie in 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen auf einer Wippe für eine Stunde in 1 x MEMFA fixiert und anschließend in 100 % Ethanol bei -20°C gelagert. Embryonen, deren Phänotyp bestimmt werden sollte, wurden in 1 x MEMFA fixiert und darin bei 4°C gelagert.

MEM (10 x): 1 M MOPS; 20 mM EGTA; 10 mM MgSO₄

MEMFA (1 x): 1 x MEM; 3,7 % Formaldehydlösung

3.7.2 β -Galactosidase-Färbung

Zur Analyse der Verteilung injizierter mRNA in *Xenopus* Embryonen wurde β -Galactosidase mRNA koinjiziert und die Embryonen nach der Fixierung in 1 x MEMFA 2-3mal 5 Minuten mit PBS gespült. Anschließend wurden die Embryonen in β -Galactosidase-Färbelösung bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Embryonen einmal mit 1 x PBS gewaschen, erneut eine Stunde in 1 x MEMFA fixiert und in 100% Ethanol bei -20°C gelagert.

β -Galactosidase-Färbelösung: 1 x PBS; 1 mg/ml X-Gal; 5 mM K₃Fe(CN)₆; 5 mM K₄Fe(CN)₆; 2 mM MgCl₂

Stammlösungen: 500 mM K₃Fe(CN)₆, 500 mM K₄Fe(CN)₆, 40 mg/ml X-Gal in Dimethylsulfoxid

3.7.3 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung an Embryonen

Um die räumliche und zeitliche Expression von Genen zu analysieren, wurde die endogene mRNA von *Xenopus*-Embryonen *in situ* mit komplementären, Digoxigenin-markierten *antisense*-RNA Sonden hybridisiert und in einer immunologischen Färbereaktion detektiert.

3.7.3.1 Rehydrieren der Embryonen

Soweit nicht anders erwähnt, wurde bei jedem Schritt 5 ml Lösung verwendet. Die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte stets auf einer Wippe.

	Ethanol (%)	Puffer (%)	Dauer (min)	Anzahl
1.	Ethanol 100 %		5	1 x
2.	Ethanol 75 %	dH ₂ O 25%	5	1 x
3.	Ethanol 50%	dH ₂ O 50%	5	1 x
4.	Ethanol 25 %	PTw 75 %	5	1 x
5.		PTw 100%	5	4 x

3.7.3.2 Proteinase K-Behandlung

Um Embryonen durchlässiger für die RNA-Hybridisierungssonden zu machen, wurden diese bis zu 30 min bei RT in 1 ml PTw-Puffer inkubiert, dem 0,5 μ l Proteinase K-Lösung (Merck, 20 mg/ml) zugegeben wurde (Endkonzentration 10 μ g/ml). Dabei wurden die Embryonen optisch kontrolliert; zeigten sich leichte Schäden an einem Embryo, wurde die Behandlung sofort abgebrochen.

3.7.3.3 Refixierung

Die durch Proteinase K-Behandlung fragilen Embryonen wurden durch Acetylierung und Inkubation in PTw/Formaldehydlösung refixiert. Die Embryonen wurden in 0,1 M Triethanolamin-Lösung (pH 7,5) umgepuffert, durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert und anschließend in PTw + 4 % FA refixiert.

	Puffer	Zugabe von	Dauer (min)	Anzahl
1.	0,1 M Triethanolamin		5	2 x
2.	0,1 M Triethanolamin	12,5 µl Acetanhydrid	5	1 x
3.		12,5 µl Acetanhydrid	5	1 x
4.	PTw		5	2 x
5.	PTw + 4% FA		20	1 x
6.	PTw		5	5 x

Anschließend wurde der PTw-Puffer bis auf 500 µl entfernt und 500 µl Hybridisierungslösung zugegeben. Nach dem Absinken der Embryonen in die Hybridisierungslösung wurde der Überstand abgenommen, durch 1,5 ml Hybridisierungslösung ersetzt und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde erneut ausgetauscht und die Embryonen für mindestens 6 h bei 65°C prähybridisiert. Nach dem Abnehmen des Überstands und Zugabe der RNA-Sonde (Endkonzentration 1 µg/ml) in 1,5 ml Hybridisierungslösung wurde über Nacht unter leichtem Schütteln bei 65°C hybridisiert.

3.7.3.4 Waschen

Um unspezifisch gebundene, einzelsträngig vorliegende Sonden-RNA zu entfernen, wurden die Embryonen unter stringenten Bedingungen gewaschen und mit 10 µg/ml RNase A und 10 U/ml RNase T1 verdaut. Die Sonden-RNA konnte bei -20°C gelagert und mehrfach verwendet werden.

	Puffer	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	Hybridisierungspuffer	60	10	1 x
2.	2 x SSC	60	20	3 x
3.	2 x SSC mit RNasen	37	30	2 x
4.	2 x SSC	RT	10	1 x
5.	0,2 x SSC	60	30	2 x
6.	MAB	RT	15	2 x

3.7.3.5 Antikörper-Inkubation

Die Hybride aus Digoxigenin-markierter Sonden-RNA und endogener mRNA konnten mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper, an den alkalische Phosphatase gekoppelt war, nachgewiesen werden. Zur Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Embryonen vor Zugabe des Detektions-Antikörpers in 2% Boehringer Mannheim Blockierungs-Reagenz und 20% hitzeinaktiviertem Pferdeserum (HS, Gibco BRL, Karlsruhe) inkubiert.

	Puffer	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	MAB + 2% BMB	RT	30	1 x
2.	MAB + 2% BMB + 20% HS	RT	60	1 x
3.	MAB + 2% BMB + 20% HS			
	+ anti-DIG AP, 1:5000	RT	240	1 x
4.	MAB (Waschen)	RT	30	2 x
5.	MAB (Waschen)	4	über Nacht	1 x

3.7.3.6 Farbentwicklung

Alkalische Phosphatase setzt die Substrate 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) (Roche, Mannheim) zu einem dunkelvioletten Farbstoff um. Die Färbereaktion wurde im Dunkeln durchgeführt.

	Puffer	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	MAB	RT	5	2 x
2.	APB	RT	5	2 x
3.	APB + NBT/BCIP	RT	1 - 24 h	1 x

3.7.3.7 Abstoppen der Färbung und Auswertung

Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde durch Inkubation in Methanol die Hintergrundfärbung unter optischer Kontrolle reduziert. Anschließend wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert und in 1 x MEMFA fixiert. Sie konnten in 1 x MEMFA bei 4°C gelagert werden.

	Lösung	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl
1.	Methanol 100%	RT	1-10	1 x
2.	Methanol 75%	RT	1	1 x
3.	Methanol 50%	RT	1	1 x
4.	Methanol 25%	RT	1	1 x
5.	MEMFA	RT	über Nacht	1 x

Um die Färbung im Inneren eines Embryo sichtbar zu machen, konnte er in einer 2:1 Mischung von Benzylbenzoat und Benzylalkohol inkubiert und zügig fotografiert werden. Mit einem Fotomikroskop (MZ FL; Leica, Wetzlar, oder SZX 12; Olympus, Hamburg) wurden die Ergebnisse dokumentiert.

PTw (1 x): 1 x PBS; 0,1% Tween-20

Hybridierungs-Lösung: 50% Formamid (deionisiert); 5 x SSC; 1 mg/ml Torula-RNA; 10 µg/ml Heparin; 1 x Denhardt's; 0,1% Tween-20; 0,1% CHAPS; 10 mM EDTA; RNase freies dH₂O

RNasen: 20 µg/ml RNase A, 10 U/ml RNase T1

MAB (5 x): 500 mM Maleinsäure; 750 mM NaCl, pH 7,5

BMB (10%): 1 x MAB mit 10% (w/v) BMB (Boehringer Mannheim Blocking Reagent, Nr. 1096 176) wurde zum Lösen erhitzt, autoklaviert und in Aliquots eingefroren.

Alkaline Phosphatase Buffer (APB): 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20

Färbelösung NBT/BCIP: Pro ml APB wurden 1,75 µl NBT (Boehringer, 100 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 3,5 µl BCIP (Boehringer, 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid) eingesetzt.

3.7.4 *In Situ* Hybridisierung an animalen Kappen

Um Induktion von Genen in animalen Gewebeexplantaten zu analysieren, wurde die endogene mRNA der Explantate *in situ* mit komplementären, Digoxigenin-markierten *antisense*-RNA Sonden hybridisiert und in einer Färbereaktion detektiert. Die *In Situ* Hybridisierung an animalen Kappen entspricht in den meisten Punkten der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung (vgl. 1.7.3). Abweichungen sind im Folgenden angegeben.

3.7.4.1 Rehydrierung

Die Rehydrierung der animalen Kappen erfolgt in Glas-Schraubdeckelgläsern, erst anschließend werden die Kappen in 24- well plates überführt.

Aufgrund der Fragilität und der geringen Größe der animalen Kappen kann auf eine Behandlung mit Proteinase K verzichtet werden.

3.7.4.2. Acetylierung und Refixierung

	Puffer	Dauer (min)	Anzahl
1.	0,1 M Triethanolamin	5	2 x
2.	0,1 M Triethanolamin + Acetanhydrid*	10	1 x
3.	PTw	5	3 x
4.	PTw + 4% FA	20	1 x
5.	PTw	5	5 x

*: pro ml Triethanolamin wurden 2,5µl Acetanhydrid (Sigma A-6404) in einem Premix durch Vortexen gut gelöst und anschließend auf die animalen Kappen gegeben.

Anschließend wurde der PTw-Puffer bis auf ca. 500 µl entfernt und 500 µl Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Nach dem Absinken der animalen Kappen in die Hybridisierungslösung wurde der Überstand abgenommen, durch 1,5 ml Hybridisierungslösung ersetzt und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert (die Platte mit den animalen Kappen wurde nicht direkt ins Wasser, sondern in eine Plastikschaale gestellt). Die Hybridisierungslösung wurde erneut ausgetauscht und die Kappen für 6 h bei 65°C prähybridisiert. Nach dem Abnehmen des Überstands und Zugabe der RNA-Sonde in Hybridisierungslösung wurde über Nacht unter leichtem Schütteln bei 65°C hybridisiert.

Waschen, Antikörper-Inkubation, Farbentwicklung und das Abstoppen der Färbung erfolgte wie unter 3.7.3 beschrieben.

3.7.5 Anfertigen von Gewebeschnitten

3.7.5.1 Vibratomschnitte

Der Embryo wurde zunächst in Gelatine/Albumin eingebettet. Dazu wurde in ein Wägeschälchen auf Eis 1,5 ml Gelatine/Albumin-Lösung gegeben, mit 105 µl Glutaraldehyd (25 %) vermischt und sofort möglichst luftblasenfrei als Sockel in eine Einbettungsform („Peel-Away Molds T12“, Polyscience Inc.) gegossen. Der Embryo wurde ca. 10 min in Gelatine/Albumin äquilibriert und auf dem verfestigten Sockel positioniert. Erneut wurden 1,5 ml Gelatine/Albumin und 105 µl Glutaraldehyd gemischt und der Embryo mit dieser Mischung überschichtet. Der so eingebettete Embryo wurde über Nacht oder bis zu einer Woche in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt. Zum Schneiden wurde der Block aus der Form gelöst und mit einer Rasierklinge getrimmt. Das Objekt wurde mit Sekundenkleber in entsprechender Orientierung auf einen Metallblock geklebt. Der Objekthalter mit dem Präparat wurde in ein Vibratom (Typ 1000; Pelco International, oder VT 1000S; Leica Instruments) eingespannt. Es wurden 30 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Hilfe eines feinen Pinsels auf einen mit Seife überschichteten Objektträger aufgebracht wurden. Nach kurzem Trocknen wurden die Schnitte mit Moviol-Lösung eingebettet.

Gelatine/Albumin: 1x PBS, 4,88 mg/ml Gelatine, 0,3 g/ml Bovines Serum Albumin, 0,2 mg/ml Sucrose. Zunächst wurde die Gelatine durch Erhitzen auf ca. 60°C gelöst und nach dem Abkühlen Albumin und Sucrose zugegeben. Die Lösung wurde filtriert (0,45 µm) und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Moviol-Lösung: 9,6 g Moviol wurden in 19,35 ml 100% Glycerin gelöst. Nach Zugabe von 24 ml dH₂O wurde die Mischung 1h gerührt. Nach Zugabe von 48 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) wurde die Mischung für 10 min auf 50°C erhitzt und für 15 min bei 5.000 Upm zur Abtrennung ungelöster Bestandteile zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.7.5.2 Kunststoffschnitte

Zur Anfertigung von Kunststoffschnitten wurden die Embryos in ein Epoxidharz (Technovit 7100, Kulzer) eingebettet. Zunächst wurden die Embryos in einer aufsteigenden Ethanolreihe wie folgt dehydriert: je 5 min in 75% MEM/25% Ethanol, 50% MEM/50% Ethanol und 25% MEM/75% Ethanol, zweimal in 100% Ethanol (insgesamt 5 min), einmal für 10 min in 100% Ethanol. Die Präparate wurden mit dem Kunstharz infiltriert, indem sie zunächst für 5min, dann für 30 min in Präinfiltrationsmedium inkubiert wurden. Abschließend erfolgte eine Inkubation zweimal für 5 min und einmal für 15 min in Infiltrationsmedium. 1,5 ml Einbettmedium wurden in Teflonformen vorgelegt und die äquilibrierten Embryonen auf diesem Socken ausgerichtet. Die Embryonen wurden mit 1,5 ml Einbettmedium überschichtet und die Formen mit den Präparaten mit Parafilm

luftdicht verschlossen. Die Blöcke wurden 1h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 37°C ausgehärtet und anschließend aus den Formen gehoben. Nach dem Trimmen mit einer Säge wurden die Präparate auf einen Plastik-Objektträger aufgeklebt und in ein Microtom (Leica) eingespannt. Es wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt, die zur Glättung mit einer Pinzette auf einen mit entgastem dH₂O beschichteten Objektträger aufgelegt wurden. Die Schnittpräparate wurden auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet. Die Einbettung erfolgte in ENTELLAN-Lösung (Merck).

Präinfiltrationsmedium: 50% Technovit 7100, 50% Ethanol

Infiltrationsmedium: 100 mg Härter I in 10 ml Technovit 7100 lösen und filtrieren (0,2 µm)

Einbettmedium: 1 ml Härter II in 15 ml Infiltrationsmedium

3.7.5.3 Paraffinschnitte

Die Dehydrierung der Embryonen erfolgte zweimal für 20 min in 100% Ethanol und einmal für 20 min in 100% Xylol. Das Paraffin (PolyFin, Polyscience Inc.) wurde bei 60°C verflüssigt und die Embryonen im Heizblock zweimal für 1h und anschließend über Nacht mit Flüssig-Paraffin infiltriert. Zur Einbettung wurde etwas Flüssig-Paraffin in eine Kunststoffform („Peel-Away Molds T12“, Polyscience Inc.) vorgelegt, die sich auf einer eiskalten Metallplatte befand. Unmittelbar danach wurde der äquilibrierte Embryo hinzugegossen und mit Hilfe einer auf 60°C vorgewärmten Glasnadel, an deren Ende eine Haarschleife befestigt war, zügig ausgerichtet und kurz gewartet, bis der Boden des Paraffins durch die Kühlung von unten auszuhärten begann. Der Block wurde bei Raumtemperatur ausgehärtet und bei 4°C gelagert. Zum Schneiden wurde der Paraffinblock mit einer Rasierklinge trapezförmig getrimmt, durch kurzes Anschmelzen der Unterseite auf einen hölzernen Objekthalter aufgeklebt und in ein Mikrotom (Leica Instruments) eingespannt. Die gebänderten Schnittserien von 5 µm Dicke wurden mit Hilfe von Pinzetten auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel Gläser) übertragen, die mit 50% entgastem Ethanol benetzt worden waren, und auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet. Die Paraffinschnitte wurden in die Histochemie eingesetzt.

3.8 Histochemie

Die Methode der Histochemie wurde eingesetzt, um die Stratifikation der Retina (die Reihenfolge verschiedener Zellagen) von *Xenopus* Embryonen nachzuweisen. Dabei wurde Tetraarhodamin-gekoppeltes „Wheat germ agglutinin“ verwendet, das spezifisch die äußeren Segmente der Photorezeptorzellen und die innere und äußere plexiforme Schicht anfärbt. Die Zellkerne in den nukleären Schichten wurden mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol; Roche, Mannheim) sichtbar gemacht. Zunächst wurden 5 µm dünne Paraffinschnitte zunächst zweimal für 10 min in 100% Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung für jeweils 2 min in 100%, 80% und 50% Ethanol. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in 1 x PBS wurden die Schnitte über Nacht in 0,2% Triton-X-100/10% Pferdeserum/4% BMB/0,02% Natriumazid in 1 x PBS inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit Blockierungspuffer (1% Pferdeserum/0,02% Natriumazid in 1 x PBS) behandelt. Die Schnitte wurden danach für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert, der 10 µg/ml WgA enthielt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in Blockierungspuffer wurden die Schnitte mit DAPI-Einbettungsmedium eingedeckelt und die Fluoreszenzsignale mikroskopisch analysiert.

DAPI-Einbettungsmedium: 1 mg/ml o-Phenylenediamine; 1 µg/ml 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI); 90% Glycerin in 1 x PBS. Das Einbettungsmedium wurde in Alufolie eingewickelt, um es vor Licht zu schützen, und bei -20°C aufbewahrt.

3.9 Nachweis von proliferierenden oder apoptotischen Zellen

3.9.1 Nachweis von proliferierenden Zellen durch Inkorporation von BrdU

Dieser Methode liegt zugrunde, dass bei der DNA-Neusynthese während der Zellproliferation BrdU (5-Bromo-2'-deoxy-Uridin) anstelle von Thymidin in DNA eingebaut werden kann. Zellen, die BrdU inkorporiert haben, können durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte mit dem „5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II“ (Roche) nach Hardcastle und Papalopulu, 2000.

Um Zellproliferation in *Xenopus* Embryonen nachweisen zu können, wurden diese wie folgt mit BrdU (Roche) injiziert: Embryonen im Blastula-Stadium (st 9) wurden mit 14 nl BrdU in das Blastocoel injiziert, kultiviert bis zum Stadium 12,5 und für 1 h in MEMFA fixiert. Embryonen des Stadiums 33/34 wurden narkotisiert, indem ihr Medium mit einigen Tropfen 0,2% 3-Aminobenzoesäure-ethylester versetzt wurde. Anschließend wurden zweimal 0,5 nl BrdU in das anteriore Endoderm injiziert, die Embryonen in frisches 0,1 x MBSH überführt, 3,5 h kultiviert und für 1 h in MEMFA fixiert. Alle Embryonen wurden in 100% Ethanol überführt und bei -20°C gelagert. In einigen Fällen wurde vor der BrdU-Detektion eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt, allerdings ohne Proteinase K Behandlung und Acetylierung (vgl. 3.7.3). Zur Detektion von BrdU wurden die Embryonen für jeweils 5 min in 100%, 75%, 50% Ethanol und 25% Ethanol/75% 1 x PBS rehydriert. Es folgte 5 x 5 min Waschen in 1 x PBS und Inkubation für 1 h in 2N HCl. Die Embryonen wurden zweimal für 10 min in 1 x PBS/0,3% Triton-X-100 gewaschen und für 1 h in 1 x PBS/3% Pferdeserum inkubiert, um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Nach 30 min Äquilibration in Inkubationspuffer folgte die Inkubation in anti-BrdU (1:10 in Inkubationspuffer) für 3 h bei 37°C. Anschließend wurde dreimal für 15 min und über Nacht in 1 x PBS gewaschen. Es folgte 5 x 5 min Waschen in 1 x PBS/0,1% Tween-20, 1 h Inkubation in 1 x PBS/20% Pferdeserum und 5 h Inkubation in 1 x PBS/20% Pferdeserum/anti-mouse Ig AP (1:10). Danach wurde dreimal für 15 min und über Nacht in 1 x PBS/0,1% Tween-20 gewaschen. Am nächsten Tag wurde erneut zweimal für 5 min in 1 x PBS/0,1% Tween-20 gewaschen und zweimal für 5 min in Substratpuffer äquilibriert. Die Färbung erfolgte für 30-60 min bei Raumtemperatur in Substratpuffer mit NBT (4,3 µl/ml) und X-Phosphat (3,3 µl/ml). Anschließend wurden die Embryonen in MEMFA fixiert.

Substratpuffer: 100 mM Tris /HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂

3.9.2 Nachweis von apoptotischen Zellen durch TUNEL-Analyse

Während des programmierten Zelltods (Apoptose) kommt es zur Fragmentierung von DNA, wodurch sogenannte „nick-ends“, also freie Enden von DNA-Abbruchfragmenten entstehen. In der TUNEL-Analyse („terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP digoxigenin nick end labeling“) wird an diese Enden durch die Aktivität einer Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Digoxigenin-markiertes dUTP angelagert, welches durch spezifische Antikörper detektiert werden kann. Die TUNEL-Analyse in *Xenopus* Embryonen erfolgte nach Hensey und Gautier, 1998. Dazu wurden die Embryonen für 1 h in MEMFA fixiert, in 100% Ethanol überführt und bei –20°C gelagert. Zu Beginn der Analyse wurden die Embryonen für 5 min in 1 x PBS, zweimal für 15 min in 1 x PBS/0,2% Tween-20 und zweimal für 15 min in 1 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h in 1 x TdT-Puffer (Gibco, in 1 x PBS). Die Embryonen wurden in 1 x PBS mit 1 x TdT-Puffer, 0,5 µM Digoxigenin-dUTP und 150 U/ml TdT überführt und über Nacht bei Raumtemperatur horizontal geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal für 1 h in 1 x PBS/1mM EDTA bei 65°C und viermal für 1 h in 1 x PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten Inkubationen für 15 min in 1 x PBT, für 1 h in 1 x PBT/20% Pferdeserum und über Nacht in anti-Digoxigenin-AP (1:2000) in 1 x PBT/20% Pferdeserum bei 4°C. Danach wurde 6 x für 1 h und über Nacht in PBT gewaschen. Für die Farbreaktion wurden die Embryonen zweimal für 5 min in Substratpuffer inkubiert und etwa 4 h in Substratpuffer mit NBT (1,75 µl/ml, Roche) und BCIP (3,5 µl/ml, Roche) gefärbt. Anschließend wurden die Embryonen in MEMFA fixiert.

PBT: 1 x PBS; 2% Boehringer Mannheim Blocking Reagenz; 0,1% Triton-X-100

Substratpuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20

3.10 Immunfärbung an ganzen Embryonen

3.10.1 Nachweis von proliferierenden Zellen durch Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (pH3)

Eine andere Methode zur Untersuchung von Zellproliferation beruht auf dem Vorkommen von phosphoryliertem Histon 3 während der späten G2-Phase bis zur Telophase im Zellzyklus (Hendzel et al., 1997; Paulson und Taylor, 1982). Unter Benutzung eines spezifischen Antikörpers gegen die phosphorylierte Form des Histon (pH3) können so proliferierende Zellen nachgewiesen werden (Saka und Smith, 2001). Dazu wurden *Xenopus* Embryonen für 1 h in MEMFA fixiert und in 100% Ethanol überführt. Um die Embryonen zu permeabilisieren, wurden sie über Nacht in DENTs (20% DMSO/80% Methanol) bei –20°C gelagert. Nach Rehydrierung für jeweils 10 min in 90%, 70%, 50%

Methanol/H₂O und 30% Methanol/1 x PBS erfolgte eine Inkubation für 2 h in 1 x PBS/20% Pferdeserum. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht mit Kaninchen-anti-pH3 (1:200; Biomol, Hamburg) in 1 x PBS/20% Pferdeserum bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten folgende Waschschrte: zweimal 2 h in PBS-TB, einmal 2 h in PBS-TBN, einmal kurz in PBS-TB und über Nacht in PBS-TB. Die Inkubation mit anti-Kaninchen-AP (1:1000; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) als Zweitantikörper erfolgte für 5 h in 1 x PBS/20% Pferdeserum bei RT. Anschließend wurden die Embryonen zweimal für 30 min in PBS-TB gewaschen. Die Detektion erfolgte in Substratpuffer mit NBT (1,75 µl/ml; Roche) und BCIP (3,5 µl/ml; Roche) für 30-60 min bei 4°C. Teilweise wurde an die Immunfärbung eine *in situ* Hybridisierung angeschlossen. Dazu wurde der Antikörper in APB/100mM EDTA für 30 min bei 65°C inaktiviert und die Embryonen in Ptw überführt (vgl. 3.6.3). Beim restlichen Teil der Embryonen wurde durch Inkubation in einer absteigenden Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 20%) die Hintergrundfärbung reduziert und die Embryonen anschließend in MEMFA fixiert.

3.10.2 Nachweis von MAPK und phosphoMAPK

Die Aktivität des FGF-Signalwegs ist durch das Vorhandensein der phosphorylierten Form der MAP-Kinase (MAPK) gekennzeichnet. Durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern kann sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form in *Xenopus laevis* Embryonen nachgewiesen werden (Curran und Grainger, 2000). Hierzu wurden die Embryonen für 1 h in MEMFA fixiert und in 100% Ethanol überführt. Um die Embryonen zu permeabilisieren, wurden sie über Nacht in DENTs (20% DMSO/80% Methanol) bei -20°C gelagert. Nach Rehydrierung für jeweils 10 min in 90%, 70%, 50% Methanol/H₂O und 30% Methanol/1 x TBS und dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte eine Inkubation für 2 h in TBS-T/5% BSA. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht mit Kaninchen-anti-MAPK bzw. -phosphoMAPK (1:400; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) in TBS-T/5% BSA bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag und der folgenden Nacht wurde mehrmals in PBS-TB gewaschen. Die Inkubation mit anti-Kaninchen-AP (1:1000) als Zweitantikörper erfolgte für 5 h in TBS-T/5% BSA bei RT. Anschließend wurden die Embryonen zweimal für 30 min in 1 x TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte in Substratpuffer mit NBT (1,75 µl/ml; Roche) und BCIP (3,5 µl/ml; Roche) für 30-60 min bei 4°C. Teilweise wurde an die Immunfärbung eine *in situ* Hybridisierung angeschlossen. Dazu wurde der Antikörper in APB/100mM EDTA für 30 min bei 65°C inaktiviert und die Embryonen in Ptw überführt (vgl. 3.6.3). Beim restlichen Teil der Embryonen wurde durch Inkubation in einer absteigenden Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 20%) die Hintergrundfärbung reduziert und die Embryonen anschließend in MEMFA fixiert.

PBS-TB: 1 x PBS; 0,05% Tween-20; 0,2% Boehringer Mannheim Blocking Reagenz (BMB)

PBS-TBN: 1 x PBS; 0,05% Tween-20; 0,2% BMB; 0,3M NaCl

Substratpuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20

TBS-T: 1 x TBS; 0,1% Triton-X-100

3.11 Protein-Methoden

3.11.1 *In vitro*-Translation

Mit dem TNT-gekoppelten Retikulozytenlysat-System (Promega) war es möglich, ausgehend von cDNA im entsprechenden Expressionsvektor Proteine in einem einzigen Ansatz durch Kopplung von Transkription mit Translation *in vitro* zu synthetisieren. Folgende Komponenten wurden möglichst luftblasenfrei zusammenpipettiert: 25 µl Reticulozyten-Lysat, 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl Aminosäuren (1 mM), 1 µl RNasin (40 U/µl), 1 µl Sp6 RNA-Polymerase (10 U/µl), 1,5 µg Plasmid-DNA. Wenn zwei Plasmide in Kombination translatiert wurden, wurde von jedem 1,5 µg eingesetzt. Die Ansätze wurden mit RNase-freiem dH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Durch Pipettieren wurden die Ansätze durchmischt und 90 min bei 30°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurden die *in vitro*-translatierten Proteine zur Ko-Immunopräzipitation eingesetzt.

3.11.2 Ko-Immunopräzipitation *in vitro*-translatierter Proteine

Um die Komplexbildung zweier Proteine nachzuweisen, wurde jeweils eines der Proteine zunächst über entsprechende Antikörper an γ-Sepharose (Amersham) gekoppelt. Dazu wurden 150 µl γ-Sepharose dreimal für 5 min in 2 ml Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1% NP-40) gewaschen und mit dem Antikörper für 2 h über Kopf schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose erneut dreimal für 5 min gewaschen und jeweils 200 µl in Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Diese wurden kurz bei 3.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, so daß die Sepharose noch von etwas Flüssigkeit bedeckt war, und die so entstandenen Pellets bei 4°C gelagert.

Die mit dem TNT-gekoppelten Retikulozytenlysat-System (Promega) hergestellten Proteine wurden entweder einzeln oder in Kombination auf die Pellets gegeben und mit 500 µl Homogenisierungspuffer versetzt. Die Kopplung erfolgte über Kopf schüttelnd über Nacht im Kühlraum. Jeweils 40 µl der Überstände wurden zur Kontrolle abgenommen und mit 40 µl Protein-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Pellets dreimal kurz in Homogenisierungspuffer gewaschen. Die gewaschenen Pellets mit den daran gekoppelten Proteinen wurden in jeweils 15 µl Protein-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Protein-Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 100 mM DTT; 2% SDS; 0,1% Bromphenolblau; 10% Glycerol

Homogenisierungspuffer: 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1,5 mM CaCl₂; 1,5 mM MgCl₂; 5% Glycerol; 0,1% BSA; 0,1 M PMSF; 1ng/ml Aprotinin; 1ng/ml Leupeptin; CompleteTM Protease-Inhibitoren (Boehringer)

3.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; nach Laemmli, 1970)

Proteine wurden nach dem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zur Fokussierung der Proben wurde dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet. Das Trenngel war je nach der Größe der aufzutrennenden Proteine aus 8 oder 15 % Acrylamid, 0,4 Vol. Sol B, 0,1% SDS in dH₂O zusammengesetzt. Das Sammelgel enthielt 0,5 Vol. Sol A, 0,4 Vol. Sol D, 0,1% SDS und 0,1% Thiodiglykol in dH₂O. Zum Gießen eines Gels der Maße 110 x 140 x 0,5 mm wurden 25 ml Trenngel-Lösung und 5 ml Sammelgel-Lösung angesetzt und zur Polymerisation je 5 µl/ml 10% APS und 2,5 µl/ml TEMED zugegeben. 1/8 des Gelvolumens wurde vom Sammelgel eingenommen. Das Gelvolumen eines Mini-Gels (Biometra) betrug 86 x 77 x 1 mm³. Die Auftrennung erfolgte für ca. 3 h (Minigele: 1 h) bei 35 mA in einer Gelkammer (Werkstatt des Instituts) mit 1 x Elektrodenpuffer.

Sol A: 30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid

Sol B: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 3 mM EDTA (filtriert, autoklaviert)

Sol D: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 4 mM EDTA (filtriert, autoklaviert)

5 x Elektrodenpuffer: 125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5% SDS

10% APS: 1 g/10 ml in dH₂O, aliquotiert bei -20°C lagern

3.11.4 Western Blot

Durch Elektrotransfer konnten Proteingemische nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf Nitrocellulosemembranen übertragen und die immobilisierten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Zum Elektrotransfer wurde ein „Fastblot“-Gerät (Semitrocken-Verfahren) der Firma Biometra (Göttingen) verwendet. Auf 3 Lagen befeuchtetes Filterpapier (Whatman) wurde eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm, BA85; Schleicher & Schuell) gebettet, darauf das Gel plziert und mit 3 Lagen in Elektrotransferpuffer getränktem Filterpapier luftblasenfrei bedeckt. Dieser „Sandwich“ wurde zwischen die angefeuchteten Flächenelektroden des Elektroblotgeräts plziert. Der Transfer erfolgte bei 400 mA über einen Zeitraum von 1 h. Der Erfolg des Proteintransfers konnte anhand des „Broad Range Prestained“ Proteinstandards (NEB) verfolgt werden, dessen Banden auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurden. Nach kurzem Waschen in 1 x PBS/0,05% Tween-20 (PBST) wurde der Blot zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in Blockierungspuffer I bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und mit 8 ml in Blockierungspuffer I verdünntem Erstantikörper (anti-FLAG 1:10.000; anti-Fgf8b 1:800) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen in 1 x PBST (1 x kurz, 2 x 5 min, 2 x 15 min, RT) wurde die Membran erneut eingeschweißt und in Blockierungspuffer II mit verdünntem Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt,

1:15.000; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK, oder Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper, 1:50.000; Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen (s.o.) entfernt. Durch Zugabe des „ECL Plus“ Substrates (Amersham) wurde die ECL-Reaktion gestartet. Dazu wurden pro Blot 2 ml Lösung A und 40 µl Lösung B in einem 15 ml-Falcon Röhrchen gemischt, der Inhalt auf die Membran gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert das Substrat Luminol zu einem lumineszierenden Produkt. Zum Nachweis der Chemilumineszenz-Signale wurde die in Folie eingeschlagene Membran für 10 min (anti-Fgf8b Blot) bzw. 5 min (anti-Flag Blot) in einer Filmkassette gegen „Hyperfilm“ (Amersham) exponiert und der Film entwickelt.

Elektrotransferpuffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% Methanol

Blockierungspuffer I: 20 mM Tris/HCl (pH6,8), 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 5% Milchpulver, 0,02% Natriumazid

Blockierungspuffer II: 20 mM Tris/HCl (pH6,8), 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 5% Milchpulver

4. Experimente und Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung des *Hip*-Homologs aus *Xenopus laevis*

4.1.1 Klonierung von *Xhip*

Um ein Homolog des *Hedgehog*-interagierenden Proteins aus *Xenopus laevis* zu isolieren, wurden von der bekannten Maus *Hip*-Sequenz degenerierte Primer abgeleitet. Als Matrize für die nachfolgende RT-PCR diente cDNA, die aus gesamt-RNA von *Xenopus laevis*-Embryonen des NF Stadiums 26 isoliert worden war. Ausgehend von der Sequenz des entstandenen cDNA Fragments wurden die Primer *HIP5'**newF* und *HIP5'**newR* abgeleitet und zur nachfolgenden Durchmusterung einer λ -ZAP-Express cDNA-Bank aus isolierten Köpfen von *Xenopus laevis*-Embryonen des Stadiums 32 benutzt. Ein positiver Klon wurde ausplattiert und mittels nicht-radioaktiver Filterhybridisierung unter Verwendung eines Digoxigenin-markierten PCR-Produkts durchsucht. Ein Plasmid, das ein *Xhip*-cDNA Fragment enthielt, konnte aus dem Phagen isoliert und durch Sequenzierung bestätigt werden.

Zur Isolierung einer cDNA, die den gesamten translatierten Bereich von *Xhip* repräsentiert, wurde mit dem genspezifischen Primer *Xhip-RACE-R3* eine RACE-PCR durchgeführt. Eine 2375 bp umfassende *Xhip*-cDNA konnte isoliert werden, die den offenen Leserahmen von 2091 bp enthielt. Die isolierte *Xhip*-cDNA sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von 696 Aminosäuren ist in Abb. 4.1 wiedergegeben.

4.1.2 Konservierung putativer funktioneller Domänen von *Xhip* im Vergleich mit anderen *Hip*-Homologen

Um die Homologie des abgeleiteten *Xhip*-Proteins mit anderen bekannten *Hip*-Homologen zu bestimmen, wurde die Aminosäuresequenz von *Xhip* mit dem humanen und dem murinen *Hip* (h*Hip* bzw. m*Hip*) sowie mit EST ("expressed sequence tags")-Klonen von Reiskörpfling, Rind, Huhn und Zebrafisch verglichen (Abb. 4.2). Es konnte eine Aminosäureidentität von 76% zwischen *Xhip* und h*Hip* und von 75% zwischen *Xhip* und m*Hip* festgestellt werden. Das putative *Xhip*-Protein beinhaltet ein N-terminales Signalpeptid, das die Lokalisation des Proteins in das endoplasmatische Retikulum ermöglicht, sowie eine zweite hydrophobe Domäne am C-Terminus, die für die Verankerung des Proteins in der Zellmembran notwendig ist und *Xhip* somit als Membranprotein des Typ 1 charakterisiert (Chuang und McMahon, 1999). *Xhip* enthält außerdem vier potentielle Glykosylierungsstellen und zwei EGF-ähnliche Domänen. Eine computergestützte Analyse in der SMART Datenbank zeigte das Vorhandensein einer zusätzlichen konservierten Domäne im extrazellulären Teil des *Xhip* Proteins, ein sogenanntes "six 4-stranded beta-sheet motif", welches Proteininteraktionen ermöglicht (Oubrie et al., 1999).

N	AC	AGG	CAG	CAG	CGG	TAC	AGG	AGG	GTG	AGA	CAT	CCC	AGA	GCG	GTG	CCA	ATA	50
	ACC	TCA	GCA	GCA	ACA	AGT	GGC	TTC	CAG	CGC	CCT	CCA	GCC	TCA	CCT	GAG	CTA	101
	CTG	GCC	CTT	CCC	ACG	CGT	CTC	ACC	TTA	ACA	ACT	GTG	TGG	GGC	ATC	CCA	TTT	152
	CCC	TCG	GGA	TAG	GGG	AGT	ATT	AGA	AGT	TTC	TTT	GCT	GTT	TGT	GTG	GAC	TTT	203
AS									M	N	K	F	L	L	V	Q	W	M
N	GTG	GGA	CGG	TGT	TTT	GCA	GCA	ATG	AAC	AAG	TTC	CTG	TTG	GTG	CAG	TGG	ATG	254
	L	L	C	A	I	A	L	L	I	M	Q	S	D	A	K	F	G	
	CTA	CTT	TGC	GCG	ATA	GCT	CTG	CTT	ATT	ATG	CAA	AGT	GAC	GCT	AAG	TTT	GGG	305
	E	K	S	E	T	G	A	R	R	R	R	C	L	N	G	S	S	
	GAG	AAG	AGT	GAG	ACT	GGC	GCA	AGG	AGA	AGA	AGG	TGC	CTC	AAT	GGC	AGC	TCC	356
	P	R	R	V	K	K	R	H	R	K	L	Q	T	L	D	L	G	
	CCG	AGG	CGT	GTA	AAA	AAG	CGA	CAT	AGA	AAG	TTA	CAG	ACT	TTG	GAT	CTG	GGG	407
	G	A	G	E	G	C	R	G	L	Y	P	R	L	S	C	C	P	
	GGA	GCT	GGA	GAG	GGG	TGC	AGG	GGT	CTT	TAT	CCC	CGA	CTC	TCG	TGT	TGC	CCC	458
	K	T	D	I	P	G	M	P	M	D	S	K	I	L	S	V	A	
	AAA	ACT	GAC	ATC	CCT	GGA	ATG	CCA	ATG	GAC	AGT	AAG	ATC	TTG	TCT	GTC	GCC	509
	N	N	T	E	C	A	K	L	V	E	E	I	R	C	A	H	C	
	AAC	AAC	ACA	GAA	TGT	GCA	AAG	CTT	GTG	GAA	GAA	ATC	CGG	TGT	GCC	CAC	TGC	560
	S	P	H	A	Q	N	L	F	H	A	S	E	R	S	E	T	S	
	TCG	CCG	CAT	GCT	CAG	AAT	CTT	TTC	CAT	GCA	AGT	GAG	AGA	TCA	GAA	ACA	TCA	611
	E	R	Q	L	F	L	P	V	L	C	K	D	Y	C	K	E	F	
	GAA	AGG	CAA	CTC	TTC	CTT	CCT	GTC	CTG	TGC	AAG	GAC	TAT	TGC	AAA	GAA	TTC	662
	Y	Y	T	C	R	G	Q	I	P	G	L	L	Q	T	S	A	D	
	TAC	TAC	ACA	TGC	CGA	GGC	CAG	ATA	CCA	GGC	TTA	CTT	CAA	ACC	TCA	GCA	GAT	713
	E	F	F	C	Y	H	G	M	R	D	S	G	L	C	F	P	D	
	GAA	TTT	TGC	TTT	TAC	CAC	GGC	ATG	AGA	GAC	AGT	GGA	TTG	TGC	TTC	CCA	GAC	764
	F	P	R	K	Q	M	R	G	P	A	S	N	Y	L	D	Q	M	
	TTT	CCA	AGG	AAG	CAG	ATG	CGC	GGG	CCA	GCG	TCA	AAC	TAC	TTG	GAT	CAG	ATG	815
	E	D	Y	D	K	V	E	E	I	S	R	K	H	K	H	N	C	
	GAA	GAT	TAT	GAC	AAA	GTG	GAA	GAG	ATC	AGC	AGG	AAA	CAT	AAG	CAC	AAT	TGC	866
	Y	C	I	Q	E	V	V	R	G	L	R	Q	P	V	G	A	M	
	TAC	TGT	ATT	CAG	GAG	GTT	GTG	AGA	GGC	TTA	AGA	CAA	CCA	GTT	GGT	GCA	ATG	917
	H	S	G	D	G	S	Q	R	L	F	I	L	E	K	E	G	Y	
	CAT	AGT	GGA	GAT	GGG	TCA	CAA	CGA	CTA	TTC	ATA	CTG	GAG	AAG	GAA	GGC	TAC	968
	I	K	I	L	T	P	E	G	D	L	I	K	E	P	F	L	D	
	ATA	AAG	ATT	CTT	ACA	CCT	GAA	GGA	GAT	CTG	ATA	AAG	GAA	CCT	TTC	TTG	GAT	1019
	V	H	K	V	V	Q	S	G	I	K	G	G	D	E	R	G	L	
	GTA	CAT	AAA	GTG	GTC	CAA	AGT	GGA	ATC	AAG	GGA	GGA	GAT	GAA	AGA	GGG	CTG	1070
	L	G	L	A	F	H	P	N	Y	K	K	N	G	K	L	Y	V	
	CTA	GGC	CTT	GCA	TTC	CAT	CCC	AAT	TAT	AAG	AAA	AAT	GGA	AAG	CTG	TAT	GTG	1121
	S	Y	T	T	N	Q	E	R	W	A	S	G	P	H	D	H	I	
	TCG	TAC	ACC	ACC	AAC	CAA	GAG	AGA	TGG	GCT	AGC	GGA	CCT	CAC	GAC	CAC	ATT	1172
	L	R	V	V	E	Y	T	V	S	R	K	N	P	S	Q	V	D	
	CTT	CGA	GTC	GTG	GAA	TAC	ACA	GTA	TCT	AGG	AAA	AAC	CCA	AGC	CAG	GTT	GAT	1223

```

  I  R  T  E  R  V  F  L  E  V  A  E  L  H  R  K  H
ATA AGA ACA GAG AGA GTT TTC CTA GAG GTA GCA GAG CTT CAC AGA AAG CAC 1274

  L  G  G  Q  L  L  F  G  P  D  G  F  L  Y  I  F  L
CTG GGA GGA CAA CTC TTG TTT GGT CCA GAT GGC TTC TTG TAT ATT TTC CTT 1325

  G  D  G  M  I  T  I  D  D  M  E  E  M  D  G  L  S
GGA GAT GGA ATG ATA ACT ATT GAT GAT ATG GAG GAR ATG GAT GGG YTA AGT 1376

  D  F  T  G  S  V  L  R  V  D  V  D  I  D  G  C  S
GAC TTT ACA GGC TCA GTA CTT CGA GTG GAT GTA GAC ATT GAT GGG TGC AGT 1427

  S  L  Y  S  I  P  R  S  N  P  H  F  N  S  T  N  Q
TCT CTT TAT TCA ATA CCA AGA AGT AAT CCT CAT TTC AAT AGT ACT AAT CAA 1478

  P  P  E  I  F  A  H  G  L  H  S  P  G  R  C  T  V
CCC CCT GAA ATC TTT GCA CAT GGT CTT CAC AGC CCA GGC AGA TGT ACT GTT 1529

  D  H  H  S  K  D  M  N  L  T  I  L  C  S  D  S  S
GAT CAT CAC TCA AAA GAC ATG AAT CTG ACT ATT CTT TGT TCA GAT TCA AGC 1580

  A  K  N  R  S  A  A  R  I  L  Q  I  V  K  G  K  D
GCT AAA AAC AGA TCA GCT GCA AGA ATT TTA CAG ATT GTC AAA GGG AAA GAT 1631

  Y  E  N  D  P  P  L  L  E  F  K  P  L  S  S  G  H
TAT GAA AAT GAT CCT CCC CTT TTG GAA TTT AAA CCA TTG AGC AGT GGA CAC 1682

  M  V  G  G  F  V  Y  R  G  C  Q  S  E  R  L  Y  G
ATG GTT GGG GGA TTT GTA TAT AGA GGT TGT CAG TCA GAG AGG CTG TAT GGA 1733

  S  Y  V  F  G  D  R  Y  G  N  F  I  T  L  H  Q  N
AGC TAC GTG TTT GGA GAT CGC TAT GGG AAT TTT ATA ACA CTT CAT CAG AAC 1784

  P  V  T  K  H  W  Q  E  K  P  L  C  L  G  S  G  S
CCA GTT ACA AAG CAT TGG CAG GAG AAA CCC CTC TGT CTC GGC AGT GGA TCT 1835

  S  C  R  A  P  F  T  G  H  I  L  G  F  G  E  D  E
TCC TGC AGA GCC CCT TTT ACA GGA CAC ATA CTG GGG TTT GGA GAA GAC GAA 1886

  L  G  E  V  Y  I  L  S  S  S  K  S  M  T  Q  S  H
TTA GGT GAA GTT TAC ATT TTG TCA AGC AGT AAA AGC ATG ACC CAG TCA CAC 1937

  S  G  K  I  Y  K  I  I  D  P  K  R  P  T  V  P  E
AGT GGG AAA ATC TAC AAA ATT ATT GAT CCA AAA AGA CCA ACA GTT CCA GAA 1988

  E  C  K  R  P  L  M  P  A  Q  P  L  A  S  E  C  S
GAA TGC AAA CGT CCG CTA ATG CCT GCA CAG CCA CTT GCC TCT GAG TGC TCC 2039

  R  H  C  R  N  G  H  C  T  P  T  G  K  C  C  C  A
CGT CAC TGC CGA AAT GGA CAC TGC ACT CCA ACA GGG AAA TGC TGC TGC GCT 2090

  Q  G  W  E  G  E  F  C  R  I  A  K  C  E  P  E  C
CAA GGA TGG GAA GGA GAG TTC TGC AGA ATT GCA AAA TGT GAA CCA GAG TGT 2141

  R  H  G  G  V  C  V  R  P  N  K  C  L  C  K  K  G
CGG CAT GGA GGC GTC TGC GTG AGA CCA AAC AAG TGT TTA TGT AAA AAA GGA 2192

  Y  L  G  P  Q  C  E  Q  M  D  R  N  V  R  R  V  A
TAC TTG GGC CCA CAG TGT GAG CAA ATG GAT AGA AAC GTC CGG AGA GTG GCC 2243

  R  A  G  I  L  D  Q  I  I  D  V  T  S  Y  L  L  D
AGG GCA GGT ATT CTT GAT CAG ATC ATT GAC GTG ACG TCA TAC TTG CTG GAT 2294

  L  T  S  Y  I  V  .
CTG ACC AGC TAC ATT GTA TAG 2315

```

Abb. 4.1: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz von *Xhip*. Nukleotid-Positionen sind rechts angegeben. N: Nukleotid, AS: Aminosäure.

xl	1	MNKFLLVQWMLLCALIMQSDAKFGEKSE	EGARRRRCLNGSSPRRVKRRHKL..QTLDLGAGEGC	67
hs	1	-L-M-SFKLL--.-V--GFFEG-----RN-	GS-----NP-K-L-R-D-RMMS-LEL-S-GEML-	69
mm	1	-L-M-SFKLL--.-V--GFFEG-----R-	GS-----NP-K-L-R-D-RMMS-LEL-S-GEIL-	69
ol	1		-A-L-	5
xl	68	RGLYPRLSCCPKTDIPG..M.PMDSKILSVAN	NTECAKLVEEIRCAHCSPHAQNLFHASERSETSERQLF	134
hs	70	G-F-----LRS-S--..LGRLEN--F--T---	G--L--K--L--S--S--SP-.R-VL--D-V	136
mm	70	G-F---V---LQS-S--..LGRLEN--F-AT--S-	SR-L---Q--P---S-S--YTP-.RDVLDGD-A	136
bt	1	-LRS-S--..LGRLEN--F--T---	G--L--K--V--S--S--YSP-.R-AL--D-V	58
gg	1		--K-----SP-KRGKLLKRTN	29
dr	1		F-.T---SR-L---K-----N-M---SPKLEKAPH-EQD	43
ol	6	HM--S-V---TRRAAYQILHR--AR-F-.T---	-H-LD--K--R--N--V---SLDIDRQPH-EPD	74
xl	135	LPVLCKDYCKEFYYTCRGQIPGLLQTSADFCFYHGM	RSDGLCFDPDFPRKQMRGPASNYLDQMEDYDKVE	204
hs	137	--L-----F-----H---F---T-----	YARK-G-----V-----E-----	206
mm	137	--L-----F-----H---F---T-----	YARK-A-----V-----E-----G	206
bt	59	--L-----T--F-----H---T-----	YARK-G-----I-----H-QE-----	128
gg	30	SSL-VQRL-----HL--F--T-----	YARK-G-V-----V-----S--H--E--E--	99
dr	44	--R--H---Q-----HV-E-F-ADV---Q-Y-RM-G	-----H--L-.RD....E-T-	108
ol	75	--R--L-F-RK-----H--E-F-ADV---Q-Y-R-GA	-----Q-R-LL-QD---ED....E-ID	140
xl	205	EISRKHKHNCYCIQEVVRGLRQPVGAMHSGDGSQRL	FILEKEGYIKILTPEGDLIKEPFLDVHKVVQSGI	274
hs	207	-----F-----S-----L-----V-----	EIF--Y--I--L-----	276
mm	207	-----L-V---MS-----S-V-----H-----	V-----E-F--Y--I--L-----	276
bt	129	-----F-----S-----S-LQ---H---M---VH---		179
gg	100	-----F-----MS-----V-C---H-----V--FS---	M-----I--L-----	169
dr	109	A-N-----A--IHS--Q---VV-C-----R--CVW---	HDME-L-----I--L-----L	179
ol	141	GLNR-R-----A---LS--K---AVV-C-----V--R--IVR---	H	191
xl	275	KGGDERGLGLAFHPNYKNGKLYVSYTTNQRERWASG	PHDHILRVVEYTVSRKNPSQVDIRTERVFLEVA	344
hs	277	-----S-----I-----H--L--A-----		346
mm	277	-----S-----I-----H--L--A-----		346
gg	170	-----S-----I-----R		212
dr	180	-----S-----TI-----N--T--P--LM---		249
xl	345	ELHRKHLGGQLLFGPDGFLYIFLGDGMTITDDMEEMD	GLSDFTGSVLRVDVDDIGCSSLYSIPRNP	414
hs	347	-----I-----L-----L--T-M-NVP-----		416
mm	347	-----I-----L-----L--T-M-NVP-----		416
dr	250	-----L-H-----L-N-----T		302
xl	415	STNQPPPEIFAHGLHSPGRCTVDHHSKDM..NLTILCSD	SSAKNRSAAARILQIVKGKDYENDPPLLEFKPL	482
hs	417	-----V-----D---A--R-PT-I-IN---	-----NG-----S-----I-----SE-S-----F	486
mm	417	-----V-----D---A--R-PT-I-IN---	-----NG-----S-----I-----R---SE-S-----F	486
xl	483	SSGHMVGGFVYRGCSERLYGSYVFGDRYGNFITLHQN	PNVTKHWEKPLCLGSGSSCRAPFTGHILGFE	552
hs	487	-N-PL-----N--L--Q-S--Q-----TSG---	GY-S-----	556
mm	487	-N-PL-----N--L--Q-S--Q-----AS---	GY-S-----	556
gg	1		-L--Q--A--Q-----NSG---GF-S-PV-----	39
dr	1		-----KN---I-QRPLEDRL-----TS---GSSLV-----	51
xl	553	DELGEVYILSSSKSMTQSHSGKIYKIIDPKRPTVPEE	CKRPLMPAQPLASECSRHCRNGHCTPTGKCCCA	622
hs	557	-----T-N--L--V---LM---RATVQ---T-T---	-----L---Y-----S	626
mm	557	-----T-N--L--V---LM---RVTVQ---T-D---	-----L---YY-----S	626
gg	40	-----I-----T-N--L-----L-----TARS--I-T---		109
dr	52	-----V---TAKQSH---LV---Q--K--R--VEDPEML	STA---E-K-----N	121
xl	623	QGWEGEFCAIAKCEPECRHGGVCRPNKCLCKKGYLGP	QCEQMDRNV.RVARAGILDQIIDVTSYLLDL	691
hs	627	P---D---T---A-----V---I-.--T-----M-----		695
mm	627	P---D---A-----V-----T-----M-----		695
gg	110	-----T---D-A-----V---I-.--T-P-----L-----FAGS		179
dr	122	A---P--LR---LA--N---E-----E-FS-N--SKGE-GTKGDGEKDS	--EH-----T-----	191
xl	692	TSYIV		696
hs	696	-----		700
mm	696	-----		700
gg	180	NQLY-		185
dr	192	-----		196

Abb. 4.2: Vergleich der Aminosäuresequenz von Xhip mit anderen Hip-Homologen. Gezeigt ist der Vergleich von *Xenopus*-Hip, humanem und murinem Hip. Außerdem wurden EST-Klone von *Medaka* (ol, Acc:AU170600), Rind (bt, Acc:CB433643), Huhn (gg, BU132134, BU214137) sowie Zebrafisch (dr, Acc:AW344287, AI878265, AW165324) eingeschlossen. Identitäten sind durch Bindestriche, Lücken durch Punkte wiedergegeben. Die putativen funktionellen Domänen sind wie folgt gekennzeichnet: putatives Signalpeptid am N-Terminus (rot), vier potentielle Glykosylierungsstellen (blau), EGF-ähnliche Domänen (gelb) und hydrophober Membrananker am C-Terminus (hellblau). Das potentielle "six 4-stranded beta-sheet motif" ist in grün dargestellt. bt: *bos taurus*; dr, *danio rerio*; gg, *gallus gallus*; hs, *homo sapiens*; mm, *mus musculus*; ol, *oryzias latipes*; xl, *xenopus laevis*.

4.2 Expression von *Xhip* in *Xenopus laevis*

In der Maus beginnt die Expression von *Hip* 8.75 dpc (*“days post coitum”*) in der Bodenplatte des Neuralrohrs und in den ventralen medialen Somiten. Im Verlauf der Entwicklung (ab 10.5 dpc) geht die Expression in der Bodenplatte verloren und *Hip* wird daran angrenzend im ventralen Bereich des Neuralrohrs und in den Somiten exprimiert. Außerdem finden sich *Hip*-Transkripte im Mesenchym, welches den Darm und die Extremitätenanlage umgibt.

Um die räumliche und zeitliche Expression von *Xhip* zu untersuchen, wurden RT-PCR Analysen von Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien sowie verschiedener adulter Gewebe und eine *“Whole mount” in situ* Hybridisierung durchgeführt.

Abb. 4.3: RT-PCR Analyse der Expression von *Xhip* in *Xenopus laevis*-Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (a) und adulten Organen und Geweben (b). Die RT-PCR wurde unter Verwendung der Primer *Xhip*-477-F und *Xhip*-746-R mit einer Anlagerungstemperatur von 56°C in 32 Zyklen durchgeführt. a, Die zunächst geringe *Xhip*-Expression in Gastrula- und frühen Neurulastadien (St. 12-17) steigt zum Ende der Neurulation an (St. 19) und wird bis zum Schwanzspitzenstadium (St. 34) aufrechterhalten. b, *Xhip* wird in allen untersuchten Organen außer dem Skelettmuskel exprimiert. Die stärkste Expression konnte in Hoden, Lunge und Leber nachgewiesen werden. H4 dient als Beladungskontrolle.

4.2.1 RT-PCR Analyse der *Xhip*-Expression

Die zeitliche und räumliche Expression von *Xenopus-Hip* wurde zunächst durch RT-PCR mit total-RNA aus Präparationen ganzer Embryonen und adulten Organen analysiert (Abb. 4.3). Geringe Mengen zygotischer *Xhip*-Transkripte konnten in Embryonen des Gastrulastadiums (St. 12) nachgewiesen werden (Abb. 4.3, a). Während der Neurulation (St. 19) stieg die *Xhip*-Expression an und blieb bis zum letzten untersuchten Stadium (St. 34) stark. Im adulten Frosch wurde die stärkste *Xhip*-Expression in Lunge, Leber und Hoden gefunden, während andere Organe wie Herz, Auge und Gehirn eine geringere Menge an *Xhip*-mRNA aufwiesen. Im Skelettmuskel konnte keine *Xhip*-Expression detektiert werden (Abb. 4.3, b).

4.2.2 *In situ* Hybridisierung mit *Xhip* in unterschiedlichen Embryonalstadien von *Xenopus laevis*

Die früheste spezifische Expression von *Xhip* ließ sich im Stadium 18 innerhalb des anterioren Bereichs der Neuralplatte in der präplakodalen Region und in zwei Streifen bilateral der antero-posterioren Mittellinie der offenen Neuralplatte detektieren (Abb. 4.4, a). Während der Neurulation (St. 20) kondensierte die *Xhip*-Expression im Bereich der Plakoden (Abb. 4.4, b) und fand sich in späteren Embryonen in der anterodorsalen und anteroventralen Seitenlinienplakode (Abb. 4.4, e). Weiter kaudal ließen sich disperse *Xhip*-positive Zellen im lateralen Mesoderm nachweisen (Abb. 4.4, c, c'), die ebenfalls im Verlauf der Entwicklung kondensierten und im Schwanzknospenstadium (St. 24) als posteriore epibranchiale Plakoden wiederzufinden waren. In einem Transversalschnitt des Stadium 20 wurde außerdem deutlich, daß *Xhip* in diesem Entwicklungsstadium im Notochord exprimiert wird (Abb. 4.4, c'). Diese Expression war allerdings transient und konnte im Stadium 28 nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.4, f). Im Stadium 28 ließen sich *Xhip*-Transkripte zudem angrenzend an die Bodenplatte und im dorsalen Teil des Neuralrohrs nachweisen, wobei letzteres auf den Bereich des Mittelhirns beschränkt war. Im Schwanzspitzenstadium (St. 34) wurde *Xhip* in den Derivaten des plakodalen Bereichs exprimiert, in der Hypophysenanlage, den bilateralen Plakoden des olfaktorischen Systems, in kranialen Nerven sowie in der Pinealdrüse (Abb. 4.4, g, h). Außer im Notochord in frühen Stadium konnte also nur in der Hypophyse eine Koexpression von *Shh* und *Xhip* festgestellt werden (Echelard et al., 1993). Außerdem ließen sich *Xhip*-Transkripte in den Branchialbögen und in zwei symmetrischen Domänen im ventralen Bereich des Neuralrohrs nachweisen, die wahrscheinlich Vorläuferzellen von Oligodendrozyten repräsentieren (Abb. 4.4, f, h; Zhou und Anderson, 2002).

Abb. 4.4 : Expression von *Xhip* in verschiedenen Embryonalstadien von *Xenopus laevis*. Gezeigt sind Embryonen nach *in situ* Hybridisierung mit *Xhip*. a, *Xenopus laevis*-Embryo im späten Neuralstadium (St. 18) in anteriorer Ansicht. *Xhip* wird im preplakodalen Ektoderm (Pfeil) und in zwei dorsalen Streifen innerhalb des sich schließenden Neuralrohrs exprimiert (Pfeilspitze). b, Frontalansicht eines *Xenopus laevis*-Embryos im frühen Schwanzknospenstadium (St. 20) zeigt *Xhip*-Transkripte im Bereich der mutmaßlichen späteren Seitenlinienplakode (Pfeil). c, Derselbe Embryo in Dorsalansicht (Anterior links) weist *Xhip*-positive Zellen im lateralen Mesoderm (Pfeil) und im Neuralrohr (Pfeilspitze) auf. c', Transversalschnitt des in c gezeigten Embryos. *Xhip* wird im Notochord (Pfeilspitze) und im lateralen Mesoderm (Pfeil) exprimiert. d, *Xenopus laevis*-Embryo im Stadium 24 in Frontalansicht zeigt *Xhip*-Expression im dorsalen Diencephalon (Pfeil) und im Neuralrohr (Pfeilspitze). e, Derselbe Embryo in Lateralansicht (Anterior links). *Xhip*-Transkripte konnten in den posterioren epibranchialen Plakoden (Pfeil) sowie in kranialen Nerven (Pfeilspitze) nachgewiesen werden. e', Transversalschnitt zu e, und f, Transversalschnitt durch den Bereich des Mittelhirns im Stadium 28 zeigen *Xhip*-Expression im Notochord im Stadium 24 (e', Pfeil), aber nicht im Stadium 28 (f, Pfeil). Im Stadium 28 wird *Xhip* zusätzlich im Dach des Neuralrohrs (f, schwarze Pfeilspitze) sowie in einer Domäne dorsal zur Bodenplatte im ventralen Bereich des Neuralrohrs exprimiert (f, weiße Pfeilspitze). g, Frontalansicht eines *Xenopus laevis*-Embryos im Stadium 34 zeigt Expression von *Xhip* in der Pinealdrüse (schwarzer Pfeil), der Hypophyse (weißer Pfeil), den olfaktorischen Plakoden (schwarze Pfeilspitze) sowie kranialen Nerven (weiße Pfeilspitze). h, Laterale Ansicht desselben Embryos (Anterior links). *Xhip*-Transkripte ließen sich in den Branchialbögen, kranialen Nerven (weiße Pfeilspitzen), olfaktorischen Plakoden (schwarze Pfeilspitze) und der Pinealdrüse (Pfeil) nachweisen.

4.3 Regulation der *Xhip*-Expression

4.3.1 Überexpression von *Shh* führt zur Induktion der *Xhip*-Expression in *Xenopus laevis*-Embryonen

In transgenen Mäusen, die ektopisch *Shh* innerhalb des sich entwickelnden endochondrialen Skeletts exprimierten, konnte die Expression von *Hip* in direkter Nachbarschaft zu den *Shh* exprimierenden Zellen induziert werden (Chuang und McMahon, 1999). Um zu testen, ob die Induktion von *Hip* nach Überexpression von *Shh* auch in *Xenopus*-Embryonen nachgewiesen werden kann, wurde die Expression von *Xhip* durch *in situ* Hybridisierung in *Shh*-injizierten Embryonen untersucht. Die Injektion von *Shh*-mRNA führte zu einer starken Aktivierung der *Xhip*-Expression in frühen Kaulquappenstadien (Abb. 4.5, A). Die verstärkte Expression ließ sich aber nur in den Zellen, die auch normalerweise *Xhip* exprimieren, oder in Zellen direkt angrenzend an die normalen *Xhip*-Expressionsdomänen nachweisen.

4.3.2 Regulation der *Xhip*-Expression durch verschiedene Signalmoleküle in Explantaten der animalen Kappe

Um genauer zu untersuchen, welche Signalmoleküle die Expression von *Xhip* induzieren können, wurden ektodermale animale Explantate aus *Xenopus laevis*-Embryonen des Blastulastadium benutzt, sogenannte animale Kappen. Das Ektoderm im animalen Bereich eines *Xenopus laevis*-Embryos im Blastulastadium besteht aus multipotenten Vorläuferzellen, die während und nach der Gastrulation im Embryo normalerweise den endogenen Induktionsprozessen unterliegen. Isoliert man diese animalen Kappen und kultiviert sie, so entsteht daraus untypisches Ektoderm. Die Injektion synthetischer mRNA in Zellen eines Embryos des Zweizellstadiums führt dazu, daß diese Vorläuferzellen schon zum Zeitpunkt der Isolation im späten Blastulastadium durch die Aktivität der injizierten mRNA determiniert sind. Die Induktionsvorgänge können durch Analyse der Expression von entsprechenden Zielgenen in den animalen Kappen sichtbar gemacht werden. Zur Analyse der Induktion von *Xhip* wurde jeweils mRNA, die für verschiedene morphogene Proteine kodiert, in *Xenopus laevis* Zwei-Zell-Stadien injiziert und die Expression von *Xhip* mittels RT-PCR in animalen Kappen äquivalent zum Embryonalstadium 19 untersucht.

In unbehandelten animalen Gewebeexplantaten ließ sich ein geringes Vorhandensein von *Xhip*-Transkripten nachweisen (Kontrolle, Abb. 4.5, B). Weder durch die Wachstumsfaktoren *BMP4* und *eFgf*, noch durch das sezernierte Signalmolekül *Shh* oder durch *BMP*-Inhibitoren wie *Chordin* und *Cerberus* konnte eine Induktion von *Xhip* über das Grundniveau hinaus erreicht werden. *Xhip* wurde durch die Injektion von *Wnt8*-mRNA alleine leicht induziert. Eine starke Aktivierung der *Xhip*-Expression wurde dagegen durch *Aktivin* hervorgerufen. Von Arbeiten an einer Molchart ist bekannt, daß *Aktivin* die Expression von *Shh* induzieren kann (Takabatake et al., 1996). Tatsächlich führte die Injektion von *Aktivin*-mRNA in den Gewebeexplantaten zu einer starken Induktion von

Shh, was auf einen indirekten Mechanismus der *Xhip*-Aktivierung durch *Aktivin* hindeutet (Abb. 4.5, B). Als nächstes sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Signalmoleküle *Xhip* induzieren können, wenn die animalen Kappen durch *Chordin* neutralisiert sind. Dazu wurden die entsprechenden mRNAs in unterschiedlichen Kombinationen injiziert. Eine starke Induktion von *Xhip* wurde durch eine Kombination von *Chordin* und *Shh* sowie *Chordin* und *Wnt8* erreicht, wohingegen *Chordin* zusammen mit *eFgf* nicht zu einer Aktivierung der *Xhip*-Expression führte. Durch die Ko-Injektion von *Chordin*, *Shh* und *Wnt8* oder *Chordin*, *Shh* und *eFgf* konnte keine verstärkte *Xhip*-Induktion im Vergleich zu *Chordin* und *Shh* alleine nachgewiesen werden. Die Induktion der *Xhip*-Expression durch *Chordin* und *Wnt8* erfolgte ohne Aktivierung von *Shh*. Die Induktion der *Shh*-Expression durch *Chordin* und *Shh* war im Gegenteil nach Koinjektion von *Wnt8*-mRNA sogar leicht reduziert (Abb. 4.5, B).

Abb. 4.5: Regulation der *Xhip*-Transkription. Legende s. S. 70.

Abb. 4.5: Regulation der *Xhip*-Transkription. **A**, *in situ* Hybridisierung mit *Xhip*. *Xshh*-mRNA (500 pg) wurde in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert und die Embryonen bis zum Stadium 34 kultiviert. Ko-injizierte β -Gal-mRNA (blaue Färbung in c) zeigt die injizierte Seite. a, uninjizierte, und b, injizierte Seite desselben Embryos. c, Transversalschnitt eines weiteren Embryos. *Shh* induziert die Expression von *Xhip* (b, c, Pfeilspitzen). **B**, RT-PCR Analyse von animale Kappenektoderm. Embryonen wurden in beide Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums mit folgenden mRNAs injiziert: *Chordin* (*Chd*, 50 pg), *Shh* (500 pg), *eFgf* (10 pg), *Wnt8* (50 pg), *Activin* (1 pg), *BMP4* (1 ng), *Noggin* (50 pg) oder *Cerberus* (200 pg), allein oder in den entsprechenden Kombinationen wie angegeben. β -Gal-mRNA wurde zur Stabilisierung den Ansätzen so zugegeben, daß stets gleiche mRNA-Gesamt mengen enthalten waren. RT-PCR wurde mit total-RNA-Präparationen von isolierten Explantaten animaler Kappen äquivalent zum Embryonalstadium 19 unter Verwendung von spezifischen Primern für *Xhip* (*Xhip*-477-F und *Xhip*-746-R) und *Shh* (*Shh*-UTR-F1 und *Shh*-UTR-R1) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren: Anlagerungstemperatur 56°C, 32 Zyklen (*Xhip*) bzw. 58°C, 32 Zyklen (*Shh*). Histon *H4* dient als RNA-Beladungskontrolle. *Wnt8* alleine führte zu einer leichten Steigerung der *Xhip*-Expression. Eine etwas deutlichere Aktivierung wurde nach Injektion von *Chordin* zusammen mit *Wnt8*, von *Chordin*, *Shh* und *Wnt8* sowie von *Chordin*, *Shh* und *eFgf* erreicht. Am stärksten wurde die Expression von *Xhip* durch die Kombination von *Chordin* und *Shh* sowie durch *Activin* induziert. Die Expression von *Shh* wurde durch *Chordin* zusammen mit *Shh* oder *eFgf* induziert. Die Ko-Injektion von *Chordin*, *Shh* und *eFgf* verstärkte diese Induktion. *Shh* wurde ebenfalls stark durch *Activin* induziert. Als Kontrolle dienten animale Gewebeexplantate nicht-injizierter Embryonen. is: injizierte Seite; nis: nicht injizierte Seite.

4.4 *Hip* als multifunktionaler Antagonist des *Shh*-, *Fgf*- und *Wnt8*-Signalwegs

4.4.1 *Hip* inhibiert den *Shh*- und den *Fgf*-Signalweg in animalen Gewebeexplantaten

Um die inhibitorische Aktivität von *Hip* auf den Hedgehog-Signalweg zu untersuchen, wurde erneut das System der animalen Gewebeexplantate genutzt. Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen mit *Patched* (*Ptc*), einem bekannten Hedgehog-Zielgen, durchgeführt (Bitgood et al., 1996; Goodrich et al., 1996; Ingham und Fietz, 1995; Koebernick et al., 2001; vgl. 1.3.1) (Abb. 4.6). In Kontroll-explantaten sowie in Explantaten, die durch den BMP-Antagonisten *Chordin* neutralisiert worden waren, konnte keine Expression von *Ptc1* beobachtet werden (Abb. 4.6, a, b). Erst die Ko-Injektion von *Shh* und *Chordin* induzierte die Expression von *Ptc* (Abb. 4.6, c). Diese Induktion konnte durch die zusätzliche Injektion von *Hip*-mRNA blockiert werden (Abb. 4.6, d).

Um zu überprüfen, ob *Hip* ein spezifischer Inhibitor des Hedgehog-Signalwegs ist, wurde *Hip* mit der mRNA anderer sezernierter Signalmoleküle koinjiziert. Untersucht wurden *Activin*, ein Mitglied der TGF β -Familie mit dorsalisierender Wirkung, *BMP4*, ein TGF β -Molekül mit ventralisierender Wirkung, sowie *eFgf*. In animalen Kappen induzieren diese Signalmoleküle die Expression von *Brachyury* (*Xbra*), einem mesodermalen Markergen (Northrop et al., 1995; Schulte-Merker und Smith, 1995; Smith et al., 1991). In frühen Explantaten (äquivalent zum Embryonalstadium 10,5) wurde weder der *Activin*- noch der *BMP4*-Signalweg durch *Hip* inhibiert (Abb. 4.6, A, i-l). In späteren Explantaten (äquivalent zum Embryonalstadium 17) konnte die Ko-Injektion von *Hip*-mRNA die durch

A **B** Abb. 4.6: *Hip* inhibiert den Shh- und Egf-Signalweg in animalen Kappen. Legende s. S. 72

Abb. 4.6: *Hip* inhibiert den Shh- und Fgf-Signalweg in animalen Kappen. **A:** a-d, Explantate im Neuralstadium nach *in situ* Hybridisierung mit *Ptc1* als Markergen für den aktiven Shh-Signalweg. a, Kontroll-Explantate. b, Keine Induktion von *Ptc1* durch *Chordin*-mRNA (50 pg). c, Ko-Injektion von *Chordin* und *Shh*-mRNA (500 pg) induziert *Ptc1*. d, *mHip*-mRNA (1 ng) unterdrückt die durch *Chordin* und *Shh* induzierte *Ptc1*-Expression. e-l, Explantate äquivalent zum Embryonalstadium 10,5 nach *in situ* Hybridisierung mit dem mesodermalen Markergen *Xbra*. Keine Expression von *Xbra* in Kontroll-Explantaten (e) und animalen Kappen nach Injektion von *mHip*-mRNA (f). g, Induktion von *Xbra* durch *eFgf*-mRNA (10 pg). h, Ko-Injektion von *mHip*-mRNA inhibiert die Induktion von *Xbra* durch *eFgf*. i, In frühen Explantaten wird die Expression von *Xbra* nach Injektion von *BMP4*-mRNA (1 ng) oder k, nach Injektion von *Aktivin*-mRNA (5 pg) durch Ko-Injektion von *mHip*-mRNA nicht inhibiert (j,l). m-u, Explantate im Neuralstadium nach *in situ* Hybridisierung mit *Xbra*. In Kontroll-Explantaten (m) oder animalen Kappen nach Injektion von *mHip*-mRNA (n) wird *Xbra* nicht exprimiert. o, Induktion von *Xbra* durch *eFgf*. p, Inhibition der durch *eFgf* aktivierten *Xbra*-Expression durch *Hip*. q, Die Induktion von *Xbra* kann durch zusätzliche Injektion von *Elk*-mRNA (300 pg) wiedererlangt werden. r,t, Durch *BMP4* und *Aktivin* induzierte Expression von *Xbra* in späten Explantaten. s,u, Die *Xbra*-Expression ist nach Ko-Injektion von *mHip*-mRNA reduziert. v-x, Animale Kappen im Neuralstadium nach *in situ* Hybridisierung mit dem neuralen Markergen *Sox3*. v, Kontroll-Explantate zeigen keine Induktion von *Sox3*. w, *Sox3*-Expression induziert durch Injektion von *Noggin*-mRNA (25 pg). x, Keine Induktion der *Sox3*-Expression nach Injektion von *mHip*-mRNA. **B:** RT-PCR Analyse mit RNA aus isoliertem Ektoderm animaler Kappen. Durch Inkubation mit Retinsäure (RS) wird die Expression von *Chh* induziert (ni, +RS). Diese Induktion wird nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in zwei Blastomeren des Zwei-Zell-Stadiums nicht unterdrückt (*Hip*, +RS). Histon *H4* dient als Beladungskontrolle. ni: nicht injiziert.

Aktivin bzw. *BMP4* induzierte *Xbra*-Expression verringern (Abb. 4.6, A, r-u). *Hip* allein konnte allerdings animale Kappen nicht neuralisieren (Abb. 4.6, 4.6, x), was auf einen direkten direkten *BMP*-Antagonismus hindeuten würde. Überraschenderweise konnte sowohl in frühen als auch in späten Explantaten eine Inhibition der durch *eFgf* induzierten Expression von *Xbra* durch *Hip* nachgewiesen werden (Abb. 4.6, A, g, h, o, p). Diese Inhibition konnte durch Ko-Injektion von *Elk* teilweise aufgehoben werden, was auf eine direkte Wirkung von *Hip* auf den Fgf-Signalweg schließen läßt (Abb. 4.6, A, q). *Elk* ist eine intrazelluläre Komponente der Fgf-Signalkaskade und wird nach Bindung von *Fgf* an den Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert. Diese Aktivierung von *Elk* ist bei Überexpression nicht notwendig (Panitz et al., 1998). Die vorliegenden Ergebnisse lassen erkennen, daß *Hip* als bifunktionaler Inhibitor des Hedgehog- sowie des Fgf-Signalwegs wirken kann.

Abschließend sollte die Wirkung von *Hip* auf die morphogene Aktivität von Retinsäure untersucht werden. Retinsäure kontrolliert während der Embryonalentwicklung die Ausbildung der antero-posterioren Körperachse und wirkt dabei posteriorisierend (Durstun et al., 1989; Hollemann et al., 1998; Sive et al., 1990). Es war bekannt, daß Retinsäure *Cephalic hedgehog* (*Chh*) induzieren kann (Hollemann, persönliche Mitteilung). In animalen Gewebeeplantaten konnte durch Behandlung mit Retinsäure eine Expression von *Chh* induziert werden. Diese Induktion wurde nicht abgeschwächt, wenn die Embryonen zuvor mit *mHip*-mRNA injiziert worden waren (Abb. 4.6, B).

4.4.2 Interaktion zwischen *Hip* und *Fgf*

Durch *in situ* Hybridisierung an Explantaten animalen Ektoderms konnte festgestellt werden, daß *Hip* den Fgf-Signalweg inhibiert (vgl. 4.4.1). Es ist bekannt, daß *Gli2*, ein Mediator des Hedgehog-Signalwegs, durch *eFgf* aktiviert werden und die Expression von *Xbra* induzieren kann (Brewster et al., 2000; Ruiz i Altaba, 1998). Im Folgenden sollte deshalb ausgeschlossen werden, daß *Hip* eine regulatorische Schleife inhibiert, in der *Xbra* durch die Aktivität von *Shh* induziert wird. Um die Aktivität von *Fgf* in der Abwesenheit von *Shh* nachzuweisen, wurde die Expression von *Xbra* und das Vorhandensein von phosphorylierter MAPK als Indikator für die Aktivität des Fgf-Signalwegs in *Xenopus laevis*-Embryonen des frühen Gastrulastadiums (St. 10) untersucht (Curran und Grainger, 2000; Isaacs et al., 1994; vgl. 1.3.2) (Abb. 4.7). In diesem Stadium wird *Shh* nur sehr

Abb. 4.7: Inhibition der Fgf Signalkaskade durch *Hip*. a-d, Embryonen im frühen Gastrulastadium (St. 10) in vegetaler Ansicht nach *in situ* Hybridisierung mit *Xbra* (a,b) und Immunofärbung mit einem Antikörper gegen phosphorylierte MAPK (MAPK-P; c,d). a,c, Kontrollembryonen zeigen *Xbra*-Transkripte und MAPK-P in einem Ring um den Blastoporus. Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium inhibiert die Expression von *Xbra* (b,b'; 72%, n=25) und die Phosphorylierung von MAPK (d,d'; 47%, n=79). e, Expression von *Xshh* im dorsalen Mesoderm im Embryonalstadium 11,5 (Pfeil). Blaue Färbung nach Ko-Injektion von β -*Gal*-mRNA zeigt die injizierte Seite (b,b').

schwach exprimiert; eine deutliche Expression von *Shh* läßt sich erst im Embryonalstadium 11,5 im dorsalen Mesoderm im Bereich der Urmundlippe nachweisen (Ekker et al., 1995) (Abb. 4.7, e). Die Expression von *Xptc1*, einem *Shh*-Zielgen, beginnt ebenfalls erst in frühen Neurulastadien (Stadium 14), der *Shh*-Signalweg ist also erst zu diesem Zeitpunkt aktiv (Koebernick et al., 2001). Nach *in situ* Hybridisierung bzw. Immunofärbung ließen sich *Xbra*-Transkripte und phosphorylierte MAPK in einem Ring um den Blastoporus nachweisen (Abb. 4.7, a,c). Die Injektion von *mHip*-mRNA führte zu einer vollständigen Inhibition der *Xbra*-Expression sowie der MAPK-Phosphorylierung (Abb. 4.7, b, b', d d'). *Hip* scheint also direkt, ohne einen Umweg über die *Shh*-Signalkaskade, in den *Fgf*-Signalweg einzugreifen.

Um zu überprüfen, ob der funktionelle Zusammenhang zwischen *Hip* und *Fgf* mit einer direkten Interaktion der Proteine einhergeht, wurde eine Ko-Immunopräzipitation mit *in vitro*-translatierten Proteinen durchgeführt. Dabei wurden mHip, das mit einem Flag-Epitop versehen worden war, (mHip-Flag) und das murine Fgf8 (mFgf8; MacArthur et al., 1995) verwendet. Als Vertreter der "Fibroblast Growth Factor"-Familie wurde *Fgf8* ausgewählt, weil bekannt war, daß dieser Faktor in der Regionalisierung des Vorderhirns während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* eine wichtige Rolle spielt und mit *Shh* während der Musterbildung innerhalb der Augenvesikel kooperiert (Eagleson et al., 2002; Ohkubo et al., 2002). mHip-Flag war aus dem vorhandenen Plasmid *pCS2⁺-mHip* in einer sequenzspezifischen Mutagenese mit den Primern *mHip-Flag-direkt-s* und *mHip-Flag-direkt-as* generiert worden. mFgf8 war zuvor unter Verwendung der Primer *mFGF8-*

Abb. 4.8: Hip und Fgf8 interagieren nicht direkt miteinander. Western-Blot Analyse. Die Proteine (Maus-Fgf8, 47,5 kD, und mHip-Flag, 83 kD) wurden einzeln oder zusammen *in vitro* translatiert und an Sepharose gebunden, die vorher mit einem der entsprechenden Antikörper (anti-Fgf8b bzw. anti-Flag) gekoppelt worden war. Im Falle der einzeln translatierten Proteine wurde anschließend mit dem jeweils anderen Protein inkubiert. HK: Hip-Kontrolle, mHip-Flag Protein (10 µl des TNT-Ansatzes) inkubiert mit anti-Flag-Sepharose; FK: Fgf-Kontrolle, mFgf8 (10 µl) inkubiert mit anti-Fgf8b-Sepharose; Fgf8r: rekombinantes Fgf8-Protein (75 ng); P1: Probe 1, mHip-Flag+mFgf8 (getrennt translatiert, je 20 µl) auf anti-Fgf8b-Sepharose; P2: Probe 2, mHip-Flag+mFgf8 (getrennt translatiert, je 20 µl) auf anti-Flag-Sepharose; P3: Probe 3, mHip-Flag+mFgf8 (zusammen translatiert, 25 µl) auf anti-Flag-Sepharose; P4: Probe 4, mHip-Flag+mFgf8 (zusammen translatiert, 25 µl) auf anti-Fgf8b-Sepharose. Es konnte keine direkte Interaktion zwischen mHip-Flag und mFgf8 nachgewiesen werden. Ü1-Ü4: Überstände von P1-P4.

F1 und *mFgf8-R1* aus Maus-cDNA (13,5 dpc) isoliert und nach PCR mit den Primern *mFgf8-BamHI-F1* und *mFgf8-XhoI-R1* in den pCS²⁺-Vektor umklontiert worden. Die Proteine wurden in einem TNT-gekoppelten Retikulozyten-System (Promega) einzeln oder in Kombination translatiert. Anschließend erfolgte die Ko-Immunopräzipitation mit Sepharose, an die zuvor anti-Flag- (Sigma) oder anti-Fgf8b-Antikörper (R&D systems) gekoppelt worden war. In einem anschließenden Western-Blot konnte keine direkte Protein-Interaktion zwischen mFgf8 und mHip-Flag festgestellt werden (Abb. 4.8).

4.4.3 *Hip* inhibiert spezifisch den Wnt8-Signalweg

Andere sezernierte Signalmoleküle mit musterbildenden Funktionen während der Embryonalentwicklung, die in den bisher gezeigten Experimenten noch nicht berücksichtigt wurden, sind Vertreter der *Wnt*-Familie. Es wurde gezeigt, daß *Wnt*-Signale einen starken Einfluß auf die Regionalisierung der Neuralplatte einschließlich des visuellen Systems haben (Ikeya et al., 1997; Lagutin et al., 2003; Pera and De Robertis, 2000; Rasmussen et al., 2001; vgl. 1.3.3). Die Fähigkeit von *Hip*, die Aktivität der *Wnt*-Moleküle zu modulieren, wurde anhand der Entstehung einer zweiten Körperachse nach Überexpression von *Wnt*-mRNA untersucht (Christian et al., 1991; Sokol et al., 1991; Wolda et al., 1993) (Abb. 4.9, a-f). Durch die Injektion von *Wnt3a*- oder *Wnt8*-mRNA in eine ventrale, vegetale Blastomere des 8-Zell-Stadiums konnte in ca. 75% aller Embryonen eine zweite embryonale Achse induziert werden. Nach Ko-Injektion von *Wnt3a* und *Hip* wurde weder eine Verstärkung noch eine Unterdrückung der Formierung einer zweiten Körperachse festgestellt; dagegen konnte die Ko-Injektion von *mHip*-mRNA die Entstehung einer zweiten Achse durch *Wnt8* stark unterdrücken. Um diese spezifische Interaktion zwischen *Hip* und *Wnt8* zu bestätigen, wurde eine RT-PCR Analyse mit animale Kappen-Ektoderm durchgeführt. Durch Injektion von *Wnt3a*-mRNA sowie von *Wnt8*-mRNA konnte in animalen Kappen die Expression der Zielgene *Xnr3* und *Siamois* induziert werden (Bell et al., 2003; Lemaire et al., 1995; Smith et al., 1995). Die Ko-Injektion von *mHip*-mRNA bewirkte die Unterdrückung der Induktion beider Zielgene durch *Wnt8*, nicht aber durch *Wnt3a* (Abb. 4.9, g, h).

Abb. 4.9: *Hip* inhibiert spezifisch den Wnt8 Signalweg. a-f, Die Ausbildung einer zweiten Körperachse nach Injektion von *Wnt8*, aber nicht von *Wnt3a*, wird von *Hip* inhibiert. *Wnt8*-mRNA (5 pg; a) oder *Wnt3a*-mRNA (0,5 pg; b) wurde in eine ventral-vegetale Zelle im 8-Zell-Stadium von *Xenopus laevis*-Embryonen injiziert. Die erste sowie die zweite Körperachse ist gekennzeichnet (1° bzw. 2°). Ko-Injektion von *mHip*-mRNA (600 pg) zeigte keinen Einfluß auf die Aktivität von *Wnt3a* (c,e), während die Bildung einer zweiten Achse durch *Wnt8* stark inhibiert wurde (d,f). g,h, RT-PCR Analyse von RNA animalen Kappen-Ektoderms nach Injektion von *Wnt8*-mRNA (50 pg) oder *Wnt3a*-mRNA (0,5 pg) allein oder in Kombination mit *mHip*-mRNA (1 ng) wie angegeben. Die Induktion von *Xnr3* und *Siamois* durch *Wnt8* wurde nach Ko-Injektion von *mHip*-mRNA unterdrückt (g), wohingegen die Induktion beider Gene durch *Wnt3a* nicht beeinflusst wurde (h). Animale Kappen-Explantate sind äquivalent dem Embryonalstadium 10,5. Histon *H4* dient als Beladungskontrolle.

Abb. 4.9: Hip inhibiert spezifisch den Wnt8 Signalweg. Legende s. S. 75.

4.4.4 *Hip*, *Shh*, *Fgf8* und *Wnt8* werden in benachbarten Regionen in *Xenopus laevis*-Embryonen exprimiert

Der funktionelle Zusammenhang zwischen *Hip* und *Shh* wird in der Maus durch die benachbarte und komplementäre Expression der entsprechenden Transkripte reflektiert. (Chuang und McMahon, 1999). Da *Hip* sowohl den *Shh*- als auch den *Fgf*- und *Wnt8*-Signalweg inhibiert (vgl. 4.4.1-4.4.3), sollte die räumliche Beziehung der Expressionsdomänen von *Hip*, *Shh*, *Fgf* und *Wnt8* in *Xenopus laevis* untersucht werden. Auch in diesem Fall wird als Vertreter der *Fgf*-Familie *Fgf8* betrachtet (vgl. 4.4.2). In Embryonen des Schwanzspitzenstadiums wird *Shh* in der inneren neuralen Schicht des ventralen Diencephalons bis zur Höhe des Sulcus limitans exprimiert, wohingegen *Xhip*-Transkripte genau oberhalb dieser Domäne detektiert wurden (Abb. 4.10, a', b'). *Shh*-positive Zellen wurden außerdem in der Bodenplatte des Neuralrohrs nachgewiesen, während *Xhip* in zwei Bereichen dorsal zur Bodenplatte exprimiert wird (Abb. 4.10, a'', b''). In Horizontalschnitten auf der Ebene des Vorderdarms konnte darüberhinaus eine sich ausschließende Expression von *Xhip*, *Shh* und *Fgf8* nachgewiesen werden. *Shh*-positive

Zellen wurden im Endoderm des Vorderdarms sowie im posterioren Endothel der viszerale Taschen nachgewiesen, wohingegen *Fgf8* im anterioren Epithel exprimiert wird (Abb. 4.10, a''', c'). *Xhip*-Transkripte konnten im benachbarten Mesenchym der Branchialbögen detektiert werden (Abb. 4.10, b'''). Während der Neurulation wird *Xhip* in der präplakodalen Region exprimiert, welche lateral von *Fgf8* exprimierenden Zellen begrenzt wird (Abb. 4.10, e, f). Weiter rostral sind diese Zellen Bestandteile der anterioren Neuralfalte. Kaudal dazu wird *Fgf8* in einem schmalen Streifen exprimiert, der die Übergangszone zwischen plakodaler Region und ventrolateralem, nicht-neuralem Ektoderm beschreibt. *Wnt8* exprimierende Zellen wurden im späteren Neuralstadium an den kaudalen Enden beider *Fgf8*-positiver Streifen detektiert (Abb. 4.10, h). Die räumliche Nachbarschaft von *Shh* sowie *Fgf8* und *Wnt8* zu *Xhip*-positiven Zellen verdeutlicht die regulatorische Funktion von *Hip* auf die entsprechenden Signalwege.

Abb. 4.10: Vergleich der Expression von *Shh*, *Hip*, *Fgf8* und *Wnt8*. Legende s. S. 78.

Abb. 4.10: Vergleich der Expression von *Shh*, *Hip*, *Fgf8* und *Wnt8*. a,b,c, Expression von *Shh*, *Hip* oder *Fgf8* in *Xenopus laevis*-Embryonen des Stadium 34. Seitenansicht, Anterior links. a',b', Transversalschnitte. *Shh* wird in der ventrikulären Schicht des ventralen Diencephalons exprimiert (a', Pfeil), während *Xhip*-Transkripte im Sulcus limitans detektiert wurden, einer begrenzenden Region zwischen ventralem und dorsalem Diencephalon (b', Pfeil). a'',b'', Transversalschnitte zeigen *Shh*-Transkripte im Notochord (a'', rote Pfeilspitze) sowie in der Bodenplatte (a'', weiße Pfeilspitze), wohingegen *Xhip* in einer benachbarten Domäne dorsal zur Bodenplatte exprimiert wird (b'', schwarze Pfeilspitze). a''',b''',c', Horizontalschnitte, Anterior oben. *Shh* positive Zellen im Endoderm des Vorderdarms (a''', weißer Pfeil) und dem posterioren Endothel der endodermalen "Viszeraltaschen" (a''', schwarzer Pfeil). *Fgf8* wird hingegen im posterioren Endothel exprimiert (c', Pfeil). d,e,f, anteriore Ansicht von *Xenopus laevis*-Embryonen im frühen Neuralstadium. d, Embryo nach Behandlung mit Benylbenzoat/Benzylalkohol (2:1). *Shh* wird im Notochord (weißer Pfeil) sowie in der Prächordalplatte exprimiert (schwarzer Pfeil). e,f, *Xhip*-Transkripte in der präplakodalen Region (e, weiße Pfeilspitze) werden von *Fgf8*-positiven Zellen in der anterioren Neuralfalte (f, schwarze Pfeilspitze) und in einer halbmondförmigen Domäne außerhalb der Neuralplatte umgeben (f, rote Pfeilspitze). g,h, Frontalansichten von Embryonen des frühen Schwanzknospenstadiums. *Xhip*-Transkripte in den lateralen Plakoden (g, roter Pfeil) sind benachbart von *Wnt8*-positiven Zellen (h, Pfeil, Pfeilspitze).

4.5 Komplementäre Auswirkungen der Überexpression von *Hip* und *Hedgehog*

Die Musterbildung entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohrs wird im frühen *Xenopus laevis*-Embryo wesentlich durch die Aktivität von *Hedgehog* reguliert. Dabei bewirkt das *Shh*-Signal aus dem axialen Mesoderm die Ventralisierung des darüberliegenden Neuralplattengewebes (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994; Ericson et al., 1995; Lee et al., 1997; vgl. 1.3.1). Die frühen Augenanlagen liegen als Teil der anterioren Neuralplatte im Embryo bei beginnender Neurulation ebenfalls unter dem Einfluß der ventralisierenden *Shh*-Signale. Dabei werden die Entstehung des Augenstiels als ventraler (proximaler) Teil des visuellen Systems sowie Retina und Linse als dorsaler (distaler) Teil induziert. Die Auswirkungen der Überexpression von *Hip* als Antagonist des *Shh*-, *Fgf*- sowie *Wnt8*-Signalwegs wurden im Folgenden analysiert und der Überexpression von *Hedgehog* gegenübergestellt. Die Tatsache, daß alle Mitglieder der *Xenopus laevis* *Hedgehog*-Familie die gleiche Signalaktivität in animaletem Kappen-Ektoderm aufweisen (Ekker et al., 1995), erlaubte es, sowohl *Banded-* (*Bhh*) als auch *Sonic-Hedgehog* zu betrachten. Zunächst wurden die phänotypischen Auswirkungen der Überexpression von *Bhh* analysiert. In allen folgenden Studien wurde dann das besser bekannte *Shh* verwendet.

4.5.1 Phänotypische Effekte der Überexpression von *Hip* und *Bhh*

Um die Auswirkungen der Überexpression von *Hip* oder *Bhh* auf die Embryonalentwicklung bei *Xenopus laevis* zu untersuchen, wurde die entsprechende mRNA in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert. Die Überexpression von *mHip* bewirkte eine leichte Vergrößerung des Auges (Abb. 4.11, c-d'), wobei eine veränderte Morphologie der Retina deutlich wurde. Das retinale Pigmentepithel (RPE), das

normalerweise die neurale Retina umgibt (vgl. 1.1.1), wies stellenweise Reduktionen auf. Im Transversalschnitt wurde deutlich, daß das RPE distal, im Bereich der Linse, reduziert war, während es proximal normal ausgebildet zu sein schien. Die Symmetrie des Augenbeckers war aufgehoben und die normalerweise zentrale Linse nach ventral verschoben (Abb. 4.11, d'). Außer den Veränderungen im Auge konnte nach Injektion von *mHip*-mRNA eine Störung der Schleifenbildung des embryonalen Darms beobachtet werden (Abb. 4.11, e, e'). Darüberhinaus ließen die injizierten Embryonen jedoch keine morphologischen Schäden erkennen. Im Gegensatz zu *mHip* bewirkte die Injektion von *Bhh*-mRNA eine vollständige Reduktion des Auges (Abb. 4.11, f-i'). Der embryonale Darm zeigte keine Störung und wies die normale Schleifenbildung auf (Abb. 4.11, j, j'). Auch andere Fehlbildungen des Embryos waren nach Überexpression von *Bhh* nicht erkennbar.

Abb. 4.11: Phänotypische Effekte der Überexpression von *mHip* und *Xbhh*. a-j, *Xenopus laevis*-Embryonen des Stadium 45 nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium. a-b, laterale Ansicht. Die Überexpression von *mHip* führt zu einer leichten Vergrößerung des Auges, einhergehend mit stellenweisen Reduktionen des retinalen Pigmentepithels (b, Pfeil, 52,2%, n=152). c, dorsale Ansicht desselben Embryos zeigt phänotypische Veränderungen im Augenbecher im Vergleich zur nicht-injizierten Seite. d,d', Transversalschnitt. Das retinale Pigmentepithel ist in der Nähe der Linse reduziert (d', schwarze Pfeile). Die Linse selbst ist nach ventral verschoben (d', weißer Pfeil). e, e', laterale Ansicht. Der Embryo weist eine Störung in der Schleifenbildung des Darms auf (e', Pfeil). Blaue Färbung nach Ko-Injektion von β -Gal-mRNA deutet die injizierte Seite an. f-j, *Xenopus laevis*-Embryonen des Stadium 45 nach Injektion von *Xbhh*-mRNA (500 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium. f,g, laterale Ansicht. Die Überexpression von *Xbhh* bewirkt eine Reduktion des Augenbeckers (g, 68,6%, n=437). h, derselbe Embryo in dorsaler Ansicht zeigt das reduzierte Auge im Vergleich zur nicht-injizierten Seite. i,i', Transversalschnitt zeigt den Verlust von neuraler Retina sowie vom retinalen Pigmentepithel nach Überexpression von *Xbhh*. j, j', laterale Ansicht. Der Embryo läßt außer der Reduktion des Auges keine morphologischen Störungen erkennen. Die Schleifenbildung im embryonalen Darm ist normal ausgebildet (j', Pfeil). is: injizierte Seite; nis: nicht-injizierte Seite.

4.5.2 Einfluß der Überexpression von *Hip* und *Shh* auf die Entwicklung des visuellen Systems

Um die beschriebenen phänotypischen Effekte der Überexpression von *Hedgehog* und *Hip* auf das visuelle System molekular zu charakterisieren, wurden *in situ* Hybridisierungen mit Markergenen für die verschiedenen Bereiche des Auges (Linse, Retina, Augenstiel) durchgeführt. Die Überexpression von *mHip*-mRNA führte zu einer Induktion des retinalen Markergens *Rx*, einhergehend mit einer starken, ca. 2-fachen Vergrößerung des gesamten Augenbechers (Abb. 4.12, b). Der Transversalschnitt ließ erkennen, daß auch Zellen des Mittelhirns *Rx*-positiv waren (Abb. 4.12, b'). Das Vorhandensein von dispersen *Rhodopsin*-positiven Photorezeptorzellen machte deutlich, daß in dem vergrößerten Auge noch eine gewisse Stratifikation der Retina vorhanden war, die Photorezeptoren jedoch nicht vollständig in einer Lage angeordnet waren (Abb. 4.12, d,d'). Die Expression von *Vax1* im Augenstiel war reduziert (Abb. 4.12, c, c'). Die Linse war ebenso wie die Retina vergrößert, wobei die Expression von *Crystallin α* abnormal war (Abb. 4.12, a, a'). Im Gegensatz zur Überexpression von *Hip* führte die Injektion von *Xshh*-mRNA zu einer Repression der Linsenentwicklung, was an der fehlenden Expression von *Crystallin α* zu erkennen ist (Abb. 4.12, e, e'). Die Expressionsdomäne von *Rx* war deutlich reduziert, wohingegen die Expression von *Vax1* stark expandiert war und den Bereich umfasste, der normalerweise von der Retina eingenommen wird (Abb. 4.12, f-g).

Abb. 4.12: Komplementäre Effekte auf die Augenentwicklung nach Überexpression von *Hip* oder *Shh*. Legende s. S. 81.

Abb. 4.12: Komplementäre Effekte auf die Augenentwicklung nach Überexpression von *Hip* oder *Shh*. Gezeigt sind *Xenopus laevis*-Embryonen im Stadium 34 nach *in situ* Hybridisierung. a-d: Embryonen nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums, laterale (a,b,d) bzw. frontale Ansicht (c); a'-d': Transversalschnitte. a,a', Abnormale Morphologie der Linse (Expression von *Crystallin α* , 50%, n=12). b,b', Starke Vergrößerung der Retina, wobei *Rx*-positive Zellen zusätzlich im Mittelhirn zu erkennen sind (b', Pfeil, 66,7%, n=18). c,c', Reduktion der *Vax1*-Expression im Augenstiel (62,5%, n=8). d,d', Disperse *Rhodopsin*-positive Photorezeptorzellen im vergrößerten Auge (76,2%, n=21). e-h: Embryonen nach Injektion von *Xshh*-mRNA (500 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium, laterale Ansicht; e'-h': Transversalschnitte. e,e', Verlust der Expression von *Crystallin α* in der Linse (57%, n=14). f,f', Reduktion von Retina (Expression von *Rx*, braun) und Linse (Expression von *Pitx3*, dunkelrot, 50%, n=10). g,g', Expansion des Augenstiel-Markergens *Vax1* in den Bereich, der normalerweise von der Retina eingenommen wird (Pfeil, g', 61,5%, n=13). h,h', Reduktion von *Rhodopsin*-positiven Photorezeptorzellen (83,3%, n=6). Blaue Färbung nach Ko-Injektion von β -*Gal*-mRNA verweist auf die injizierte Seite (c',d,d'). is: injizierte Seite, nis: nicht-injizierte Seite.

4.5.3 Einfluß der Überexpression von *Hip* und *Shh* auf die Musterbildung im embryonalen Gehirn

Sonic hedgehog wird im frühen *Xenopus laevis*-Embryo im axialen Mesoderm exprimiert und induziert im darüberliegenden Neuroektoderm die Entstehung ventraler Strukturen wie die ventrale Neuralröhre, die Hypophyse oder den Augenstiel (Chiang et al., 1996; Echelard et al., 1993; Ekker et al., 1995; Koebernick et al., 2001; Treier et al., 2001; vgl. 1.3.1). In der späteren Neuralröhre beschränkt sich die Expression von *Xshh* auf die Bodenplatte (vgl. 4.3.2), wobei ein von ventral nach dorsal reichender Gradient des

Abb. 4.13: Komplementäre Effekte auf die Musterbildung im Gehirn durch Überexpression von *Hip* oder *Shh*. Legende s. S. 82.

Abb. 4.13: Komplementäre Effekte auf die Musterbildung im Gehirn durch Überexpression von *Hip* oder *Shh*. Gezeigt sind *Xenopus laevis*-Embryonen im Stadium 34 nach *in situ* Hybridisierung. a,b: Embryonen nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium. a: frontale Ansicht, b: dorsale Ansicht, Anterior links. a',b': Transversalschnitte. a,a', Repression der dorsalen Grenze der Expressionsdomäne von *Nkx-2.1* (a', Pfeile, 54,4%, n=11) b,b', Vergrößerung der *Gsh-1* Expressionsdomäne in Richtung des ventralen Bereichs des Neuralrohrs (Pfeil, b, 37,5%, n=8). c,d: Embryonen nach Injektion von *Xshh*-mRNA (500 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium. c: frontale Ansicht, d: dorsale Ansicht, Anterior links. c',d': Transversalschnitte. c,c', Expansion der Expressionsdomäne von *Nkx-2.1* im ventralen Teil des Neuralrohrs (56,3%, n=16). d,d', Reduktion der Expression von *Gsh-1* im intermediären Bereich des Neuralrohrs (Pfeil, d, 41,7%, n=12). Blaue Färbung nach Ko-Injektion von β -Gal-mRNA verweist auf die injizierte Seite (a',b,b',c'). is: injizierte Seite, nis: nicht-injizierte Seite.

sezernierten Moleküls für die Ausbildung der verschiedenen Neuronen von entscheidender Bedeutung ist (Roelink et al., 1995). Durch *in situ* Hybridisierung mit spezifischen Markergenen für die unterschiedlichen Bereiche des embryonalen Gehirns sollte herausgefunden werden, ob die Überexpression von *Shh* oder *Hip* einen Einfluß auf die dorsoventrale Musterbildung innerhalb des Neuralrohrs hat. Die Injektion von *Hip*-mRNA führte zur Repression von *Nkx-2.1*, einem Gen, das normalerweise im ventralen Teil des Vorderhirns exprimiert wird (Holleman und Pieler, 2000) (Abb. 4.13, a, a'). Dahingegen ist die Expression von *Gsh-1*, einem Gen, das spezifisch im dorso-intermediären Bereich des Gehirns exprimiert wird, nach ventral expandiert (Abb. 4.13, b, b'). Der umgekehrte Fall, die dorsale Expansion von *Nkx-2.1* und die Repression von *Gsh-1*, ließ sich nach Injektion von *Shh*-mRNA beobachten (Abb. 4.13, d-e).

4.5.4 Ektopische Photorezeptorzellen in der Retina nach Überexpression von *Hip*

Durch *in situ* Hybridisierung mit *Rhodopsin* konnten in der Retina von *Xenopus laevis*-Embryonen nach Injektion von *mHip*-mRNA dispers verteilte Photorezeptorzellen nachgewiesen werden (vgl. 4.5.2). Um die Stratifizierung der Retina nach Überexpression von *Hip* näher zu charakterisieren, wurde eine histochemische Analyse durchgeführt (Abb. 4.14). In Paraffinschnitten wurden dabei die äußeren Segmente der Photorezeptorzellen sowie die innere und äußere Plexiforme Schicht mit Tetrarhodamin-gekoppeltem WgA ("Wheat germ agglutinin"; Molecular Probes inc., Eugene, Oregon, USA) angefärbt. Die Zellkerne der Ganglion-Zellschicht sowie die der inneren und äußeren Körnerschicht wurden mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol; Roche, Mannheim) sichtbar gemacht. Die Injektion von *mHip*-mRNA führte zur Entstehung von unregelmäßigen Arealen in der Retina (Abb. 4.14, d'), innerhalb derer sich WgA-positive Zellen nachweisen ließen (Abb. 4.14, e', f'). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Photorezeptorzellen (Abb. 4.14, b',e') ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, daß es sich bei diesen Zellen um Photorezeptorzellen handelt.

Abb. 4.14: Gestörte Stratifizierung der Retina nach Überexpression von *Hip*. Paraffinschnitte (5 μ m) nach histochemischer Anfärbung mit DAPI (1 μ g/ml) und WgA (10 μ g/ml). a-c, Auge eines Kontrollembryos. a,a', Anfärbung mit DAPI zeigt die Stratifikation der Retina mit Ganglion-Zellschicht (Gz), inneren Plexiformen Schicht (iP), inneren Körnerschicht (iK), äußeren Plexiformen Schicht (äP) und äußeren Körnerschicht. b,b', innere und äußere Plexiforme Schicht (b', Pfeilspitzen) sowie äußere Segmente der Photorezeptorzellen (b', Pfeil) nach Anfärbung mit WgA. c,c', Überlappende Aufnahme, WgA-positive Photorezeptorzellen sind deutlich zu erkennen (c', Pfeil). d-f, Auge eines Embryos nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg). d,d',d'', Markierung der Zellkerne mit DAPI zeigt Vorhandensein von unregelmäßigen Lücken in der Retina (d'', Pfeile). e,e',e'', WgA-positive Zellen in der inneren Plexiformen Schicht (e, Pfeil) und den Photorezeptorzellen (e', Pfeil). Zusätzliche WgA-positive Zellen in ektopischen Bereichen innerhalb der Retina (e'', Pfeile). f,f,f'', Überlappende Aufnahme. WgA-positive Zellen innerhalb der Lücken in der Retina (f'', Pfeile) ähneln Photorezeptorzellen (f', Pfeil). a-c, d-f: Vergrößerung 160-fach. a'-c', d'-f', d''-f'', Vergrößerung 400-fach.

4.6 Verstärkte Aktivität eines sezernierten *Hip*-Konstruktes (*mHip* Δ TM)

Membranproteine vom Typ I besitzen eine hydrophobe, endständige Transmembrandomäne, die die Verankerung in der Membran möglich macht (Matlack et al., 1998). Im abgeleiteten Maus-Hip (mHip)-Protein konnte eine solche putative hydrophobe Transmembrandomäne ausgemacht werden, die aus den letzten 22 Aminosäuren besteht. Die Ablation dieser Sequenz führte in einem Zellkulturversuch zum Verlust der Membranverankerung und somit zur Sekretion des Proteins in das Kulturmedium (Chuang und McMahon, 1999). Um die Auswirkungen des Verlustes der Membranverankerung in Bezug auf die Aktivität von mHip in *Xenopus laevis* zu untersuchen, wurde durch PCR

unter Verwendung der Primer *mHip-BamHI-1F* und *mHip-2034-XhoI-St-R* die kodierende Sequenz für Transmembrandomäne aus der vorhandenen *mHip*-cDNA deletiert. Das entstandene putative mHip-Protein (mHip Δ TM) ist schematisch in Abb. 4.15 dargestellt.

Abb. 4.15: Schematische Darstellung von mHip und mHip Δ TM. Nacheinander gekennzeichnet sind das Signalpeptid (AS 1-15), vier potentielle Glycosilierungsstellen, zwei EGF-ähnliche Domänen (zusammenhängend dargestellt) sowie die Transmembrandomäne (TM, AS 679-700), die bei dem mHip Δ TM Konstrukt fehlt. Die Ziffern kennzeichnen jeweils die erste und die letzte Aminosäure des Proteins. Nach Chuang und McMahon, 1999.

Nach Überexpression der *mHip Δ TM*-mRNA in *Xenopus laevis*-Embryonen wurde der Einfluß auf die Augenentwicklung untersucht. Die Linse wies eine starke Vergrößerung auf, ohne daß jedoch eine morphologische Veränderung der *Crystallin α* -Expression beobachtet werden konnte (Abb. 4.16, a, a'). Die Vergrößerung der Linse war von einer enormen Größenzunahme der Retina begleitet (Abb. 4.16, b, b'). Vergleicht man die beobachteten Effekte mit der Überexpression von Wildtyp-*mHip* (vgl. 4.5), so lassen sich Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede feststellen. Die Retina ist in beiden Fällen stark vergrößert, wobei der Effekt nach Injektion von *mHip Δ TM* noch deutlicher wird. Die Linse wies allerdings nach Injektion von *mHip*-mRNA eine gestörte Differenzierung auf, was an der unregelmäßigen Expression von *Crystallin α* deutlich wurde. Im Gegensatz dazu war die vergrößerte Linse nach Überexpression von *mHIP Δ TM* vollständig differenziert.

Abb. 4.16: Auswirkung der Überexpression von mHip Δ TM auf die Augenentwicklung von *Xenopus laevis*. Gezeigt sind Embryonen im Stadium 34. a, b: laterale Ansicht der injizierten Seite; a', b': Transversalschnitte. Die Injektion von *mHip Δ TM*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium bewirkte eine starke Vergrößerung der Linse (Expression von *Crystallin α* , a, a'; 40,7%, n=27), sowie der Retina (Expression von *Rx*, b, b'; 35,8%, n=46). is: injizierte Seite, nis: nicht-injizierte Seite.

Abb. 4.16: Auswirkung der Überexpression von *mHipΔTM* auf die Augenentwicklung von *Xenopus laevis*. Legende s. S. 84.

4.7 Vergleich der Überexpression von *Hip* mit der Inhibition des Shh-, Fgf und Wnt8 Signalwegs

Da gezeigt werden konnte, daß *Hip* gleichzeitig den Shh-, Fgf- und Wnt8-Signalweg inhibiert (vgl. 4.4), sollte der Einfluß jedes einzelnen dieser Signalwege auf die Augenentwicklung untersucht werden. Das Steroid-Alkaloid Cyclopamin ist ein Inhibitor der Hedgehog-Signalkaskade, das direkt an Smoothed bindet und die Transduktion des Hedgehog-Signals blockiert (Chen et al., 2002). Die Inkubation von *Xenopus laevis*-Embryonen in Cyclopamin-enthaltendem Medium unterdrückte die Separation des Augenfeldes und führte so, wie für Amnioten beschrieben (Incardona et al., 1998; Keeler et al., 1970), zu Zyklopen-ähnlichen Embryonen. Verglichen mit unbehandelten Kontrollembrionen konnte allerdings keine Größenveränderung der verbliebenen Augenstrukturen beobachtet werden (Abb. 4.17, a, a*, a'). Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition des Shh-Signalwegs ist die Injektion von *PtcΔloop2*-mRNA. *PtcΔloop2* ist eine mutierte Form von Patched1, in der die zweite extrazelluläre Schleife des Transmembranproteins fehlt (Briscoe et al., 2001). Dies führt dazu, daß Hedgehog-Moleküle nicht binden können, so daß die durch Patched vermittelte Inhibition von Smoothed nicht aufgehoben werden kann (vgl. 1.3.1). Die Hedgehog-Signalkaskade ist somit blockiert. Nach Injektion von *PtcΔloop2*-mRNA konnte eine starke Vergrößerung des Auges beobachtet werden, jedoch ohne daß eine Expression von *Rx* im Bereich des Gehirns nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.17, b, b').

Abb. 4.17: Einfluß der Shh, Fgf und Wnt8 Signalwege auf die Augenentwicklung. Gezeigt sind *Xenopus laevis*-Embryonen im Schwanzspitzenstadium. a,a*, Frontalansichten von Embryonen nach Behandlung mit dem pharmakologischen *Shh*-Inhibitor Cyclopamin (200 µM). *In situ* Hybridisierung mit *Rx* macht die Tendenz zu fusionierten Augen sichtbar (a,a*, verschiedene Embryonen, a', Transversalschnitt des Embryos in a, 54,5%, n=17). b-e, Laterale Ansichten. b'-e', Transversalschnitte. b,b', Unterdrückung des Shh-Signalwegs durch Injektion von *PtcΔloop2*-mRNA (2 ng) bewirkt eine Vergrößerung des Auges (51,7%, n=29). Der Embryo zeigt Expression von *Rx* in der Retina. c,c', Überexpression von *mFgf8*-mRNA (10 pg) inhibiert die Augenentwicklung (66,3%, n=90). d,d', Embryonen nach *in situ* Hybridisierung mit *Gsh1*, *Nkx-2.1* und *Rx*. Blockade des Fgf-Signalwegs durch Injektion von *XFD*-mRNA (1,5 ng) verursacht eine leichte Vergrößerung des Auges (50%, n=18). e,e', Größenzunahme des Augendurchmessers nach Inhibition des Wnt8-Signalwegs durch Injektion von *dnWnt8*-mRNA (500 pg; 70%, n=48). is: injizierte Seite; nis: nicht-injizierte Seite.

Der Einfluß des Fgf-Signalwegs auf die Augenentwicklung wurde durch die Überexpression von *mFgf8* sowie des dominant negativen *Fgf*-Rezeptors, *XFD*, untersucht (Amaya et al., 1991; MacArthur et al., 1995; vgl. 1.3.2). *XFD* ist eine mutierte Form des Fgf-Rezeptors, dem die gesamte intrazelluläre Thyrosin-Kinase-Domäne fehlt. *XFD* interagiert mit dem Wildtyp-Rezeptor und inhibiert so die Weiterleitung des Fgf-Signals (Amaya et al., 1991). Die Injektion von geringen Dosen *mFgf8*-mRNA bewirkte eine Unterdrückung der Augenentwicklung, ohne die embryonale Achse generell morphologisch zu verändern (Abb. 4.17, c, c'). Es ist bekannt, daß höhere Dosen *mFgf8*-mRNA dagegen eine starke Reduktion von anterioren Strukturen bewirken (Christen und Slack, 1997). Nach Inhibition des Fgf Signalwegs durch Injektion von *XFD*-mRNA konnte neben der Verkürzung der posterioren embryonalen Körperachse eine leichte Vergrößerung des Auges beobachtet werden (Abb. 4.17, d, d' und Amaya et al., 1991). Der Einfluß des Wnt-Signalwegs auf die Augenentwicklung wurde durch die Überexpression von dominant-negativem *Wnt8* (*dnWnt8*) untersucht. Dieser mutierten Form fehlen C-terminal 98 Aminosäuren, was zu einem Funktionsverlust des Liganden führt. Durch Konkurrenz mit dem endogenen *Wnt8* wird der *Wnt8*-Signalweg inhibiert (Hoppler et al., 1996). Nach Unterdrückung des *Wnt8*-Signalwegs durch Injektion von *dnWnt8*-mRNA konnte eine starke Größenzunahme des Augendurchmessers beobachtet werden (Abb. 4.17, e, e').

4.9 Nachweis des retinalen Primordiums durch Zellmarkierung

Die Entwicklung des visuellen Systems von *Xenopus laevis* beginnt im frühen Neuralstadium innerhalb der offenen Neuralplatte. Durch Expressionsanalysen spezifischer Markergene konnte nachgewiesen werden, daß die retinalen Vorläuferzellen, so wie auch Linsenvorläuferzellen, als Primordium innerhalb der anterioren Neuralplatte vorliegen (Hollemann und Pieler, 1999; Kenyon et al., 1999; Li et al., 1997; Mathers et al., 1997). Dieses frühe Augenfeld wird durch den Einfluß des axialen Mesoderms im Verlauf der Neurulation gespalten. Ein sichtbares äußeres Anzeichen für diesen Vorgang ist die Verschiebung der Expressionsdomänen der retinalen Markergene nach lateral, bis schließlich die ersten Augenstrukturen zu erkennen sind (vgl. 1.1.2). Es gibt zwei mögliche Ursachen dieser Verschiebung. Die eine ist, daß Derivate der retinalen Vorläuferzellen, die im frühen Augenfeld vorhanden waren, nach lateral wandern und später zur Retina differenzieren. Eine andere Möglichkeit ist, daß in Zellen lateral angrenzend an das Primordium die Expression der retinalen Gene induziert wird, diese wiederum ihre Nachbarzellen induzieren, bis die Expression in den eigentlich augenformierenden Zellen erreicht ist. Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde auf das sensorische

Abb. 4.18: Nachweis des retinalen Primordiums durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. *Xenopus laevis*-Embryonen des späten Gastrulastadiums (Stadium 12,5) wurden von der Vitellinmembran befreit und eine Zellgruppe des sensorischen Ektoderms im medialen Bereich der anterioren Neuralplatte durch Applikation von DiI markiert. a, dorsal/laterale Ansicht eines Embryos 2 Stunden nach Markierung (Stadium 13), Anterior links. Die weiße gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der Mittellinie in der offenen Neuralplatte. Die mit DiI markierten Zellen befinden sich im Bereich des retinalen Primordiums in der anterioren Neuralplatte (Pfeil). b, laterale Ansicht desselben Embryos im Stadium 26; die mit DiI markierten Zellen lassen sich im Augenvesikel nachweisen (Pfeil). c,c',c'', Transversalschnitte desselben Embryos im Stadium 36. c, Kaltlichtaufnahme, c', Fluoreszenzbild, c'', Überlagerung. Die mit DiI markierten Zellen sind Teil der neuralen Retina des linken Auges (c'', Pfeil).

Ektoderm im medialen Bereich der anterioren Neuralplatte von *Xenopus laevis*-Embryonen ein Fluoreszenzfarbstoff (DiI) aufgebracht. Dieser Farbstoff kann Zellmembranen nicht passieren und zeigt deshalb das Schicksal der den Farbstoff enthaltenen Zellen und deren Tochterzellen im Verlauf der Embryonalentwicklung an. DiI-positive Zellen ließen sich nach Applikation im frühen Neurula-Embryo (Stadium 12,5) in der Retina späterer Stadien nachweisen (Abb. 4.18). Dies zeigt, daß die Abkömmlinge der medialen retinalen Vorläuferzellen im frühen Augenfeld des *Xenopus laevis*-Embryos tatsächlich die spätere Retina bilden.

4.9 Einfluß der Überexpression von *Hip* und *Shh* auf die Musterbildungsprozesse in frühen *Xenopus*-Embryonen

Die Überexpression von *Hip* bzw. *Shh* führte zu einer Vergrößerung bzw. Reduktion der distalen Anteile des visuellen Systems, Retina und Linse (vgl. 4.5). Diese Größenverschiebung konnte zum Einen das Ergebnis von Änderungen der Apoptose- oder Proliferationsrate sein, andererseits konnte es in der frühen Augenentwicklung auch zu einer Änderung des Zellschicksals der Retina- und Linsenvorläuferzellen gekommen sein. Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden zunächst die Expressionsdomänen spezifischer Markergene des frühen Augenfeldes und der anterioren Neuralplatte in *Xenopus laevis*-Embryonen des frühen Neurulastadiums untersucht. Anhand der Expression von *Rx* ließ sich erkennen, daß die Anzahl der retinalen Vorläuferzellen nach Injektion von *Shh*-mRNA reduziert war, während es nach Injektion von *Hip*-mRNA zu einer Expansion des frühen Retinafeldes kam (Abb. 4.19, a, b). Obwohl die Expressionsdomäne von *Rx* durch die Überexpression von *Hip* stark lateral expandiert war, wurde keine Expression von *Rx* außerhalb der ursprünglichen Domäne beobachtet. Die Injektion von *mHip*-mRNA führte außerdem zu einer Vergrößerung der anterioren Neuralplatte, was durch die Expansion der Expressionsdomänen von *Pax6*, *Otx2* und *Six3* (Abb. 4.19, c, e, g) deutlich wurde. Die Expression dieser Markergene war dagegen nach Injektion von *Xshh*-mRNA nur leicht reduziert (Abb. 4.19, d, f, h). *Pitx1*, ein Gen welches spezifisch in den frühen Linsenvorläuferzellen exprimiert wird, war durch die Injektion von *mHip*-mRNA stark nach lateral expandiert, wobei die räumliche Beziehung zur Expressionsdomäne von *Pax6* erhalten blieb (Abb. 4.19, c, Pfeil). Die Vergrößerung der anterioren Neuralplatte ging einher mit einer Verminderung des nicht-neuralen Ektoderms, was an der Reduktion und posterioren Verschiebung der Expressionsdomäne von *Dlx3* im nicht-neuralen Ektoderm deutlich wurde (Abb. 4.19, i, i', Pfeile). Nach Überexpression von *Xshh* war die Expression von *Dlx3* verstärkt (Abb. 4.19, j, j', Pfeile).

Abb. 4.19: Auswirkung der Überexpression von *Hip* oder *Shh* auf die Ausbildung des frühen Augenfeldes und der anterioren Neuralplatte in *Xenopus laevis*-Embryonen. Gezeigt sind Embryonen des frühen Neurulastadiums (Stadium 12,5). a-j, Frontale Ansicht, injizierte Seite rechts. i', j', Laterale Ansicht der injizierten Seite der Embryonen aus i und j, Anterior links. a, b, Die Expression von *Rx* im frühen Augenfeld ist nach Injektion von *Hip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium verstärkt (a) und nach Injektion von *Shh*-mRNA (500 pg) reduziert (b). c, d, Die Expression von *Pax6* in der anterioren Neuralplatte und *Pitx1* in den Linsenvorläuferzellen ist nach Überexpression von *mHip* verstärkt und nach lateral expandiert (c, Pfeil), während die Überexpression von *Xshh* zu einer geringen Reduktion beider Gene führt (d). e-h, *Six3* und *Otx2*, die beide in der anterioren Neuralplatte exprimiert werden, sind nach Injektion von *Hip*-mRNA stark expandiert (e, g) und nach Injektion von *Shh*-mRNA leicht reduziert (f, h). i, i', Die Vergrößerung der anterioren Neuralplatte durch Überexpression von *mHip* wird begleitet von der Reduktion und posterioren Verschiebung der Expressionsdomäne von *Dlx3* (Pfeile). j, j', Verstärkte Expression von *Dlx3* im nicht-neuralen Ektoderm nach Überexpression von *Shh* (Pfeile). Blaue Färbung nach Ko-Injektion von β -*Gal*-mRNA verweist auf die injizierte Seite (c, d, i, j). Gestrichelte Linie zeigt die Mittellinie des Embryos an (a, b, e, f, i, j),

4.10 Die Vergrößerung des Auges nach Überexpression von *Hip* wird nicht durch Proliferation oder verminderte Apoptose verursacht

Die Größenveränderung der verschiedenen Anteile des visuellen Systems durch die Überexpression von *Hip* und *Shh* in *Xenopus laevis*-Embryonen spiegelt sich in den modifizierten Expressionsdomänen der frühen Markergene der anterioren Neuralplatte und der Retina- und Linsenvorläuferzellen wieder. Dabei wird die Vergrößerung der Retina nach Injektion von *mHip*-mRNA durch eine erhöhte Anzahl präsumptiver Retinazellen in der anterioren Neuralplatte in Embryonen des frühen Neurulastadiums hervorgerufen (vgl. 4.9). Eine Möglichkeit, die Vermehrung der retinalen Vorläuferzellen zu erklären, ist eine erhöhte Proliferationsrate im frühen Augenfeld oder eine verminderte Apoptoserate im späteren Auge. Eine andere Möglichkeit ist die direkte Transformation von nicht-neuralem und/oder neuralem Ektoderm zu Retinazellen. Beide Mechanismen könnten dabei alleine oder in Kombination auftreten. Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde untersucht, ob die Überexpression von *mHip* einen Einfluß auf Proliferation und Apoptose ausübt.

4.10.1 Überexpression von *mHip* führt zu einer gesteigerten Apoptoserate

Eine Möglichkeit des Organismus, die Größe eines bestimmten Organs zu regulieren, liegt in der Induktion von programmiertem Zelltod unerwünschter Zellen. Deshalb sollte überprüft werden, ob eine verminderte Apoptoserate bei der Entstehung der vergrößerten Retina nach Überexpression von *mHip* eine Rolle spielt. *Xenopus laevis*-Embryonen wurden dazu nach Injektion von *mHip*- oder *Shh*-mRNA einer TUNEL-Analyse unterzogen (Hensey und Gautier, 1998). Dabei werden freie DNA-Enden, die bei der apoptotischen Fragmentierung der DNA entstehen, durch die Aktivität einer terminalen Transferase mit Digoxigenin-markiertem deoxy-UTP versehen, das durch eine Antikörperreaktion sichtbar gemacht werden kann. Die Injektion von *mHip*-mRNA führte verglichen mit einem nicht-injizierten Kontrollembryo zu einer Steigerung der Apoptoserate im Bereich des Auges in Embryonen des Schwanzspitzenstadiums (Abb. 4.20, d-f). Im Gegensatz dazu bewirkte die Injektion von *Shh*-mRNA eine geringfügige Reduktion der Apoptoserate (Abb. 4.20, g-i).

Abb. 4.20: Analyse der Apoptoserate nach Überexpression von *Hip* oder *Shh*. Legende s. S. 91.

Abb. 4.20: Analyse der Apoptoserate nach Überexpression von *Hip* oder *Shh*. Gezeigt sind *Xenopus laevis*-Embryonen im Stadium 34 nach TUNEL-Färbung. a,b, laterale Ansicht, c, frontale Ansicht von nicht-injizierten Kontrollembryonen zeigt braunefärbte, apoptotische Zellen. d,e, laterale Ansicht, f, Frontalansicht eines Embryos nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums. Die Apoptoserate ist nach Überexpression von *mHip* erhöht. g,h, laterale Ansicht, i, Frontalansicht eines Embryos nach Injektion von *Xshh*-mRNA (500 pg). Die Anzahl der apoptotischen Zellen ist in der injizierten Seite reduziert. Blaue Färbung nach Ko-Injektion von β -Gal-mRNA verweist auf die injizierte Seite (d-i). is: injizierte Seite, nis: nicht injizierte Seite.

4.10.2 Die Expansion des frühen Augenfeldes nach Überexpression von *Hip* wird nicht durch eine erhöhte Proliferationsrate bewirkt

Um zu untersuchen, ob *Hip* die Proliferationsrate im frühen Augenfeld und den späteren Augen beeinflusst, wurden *Xenopus laevis*-Embryonen mit *mHip*- bzw. *Shh*-mRNA injiziert. Es wurden zwei Methoden angewendet, um die mitotische Aktivität nach *Hip*- bzw. *Shh*-Injektion zu untersuchen. Zum einen wurden die Embryonen im späten Blastulastadium oder im Schwanzspitzenstadium mit BrdU injiziert und die anschließende Inkorporation des BrdU in die neue DNA als Zeichen stattfindender Mitose über Antikörperfärbung detektiert (Hardcastle und Papalopulu, 2000; Pujara und Whitmore, 1970). Zum anderen wurde durch spezifische Antikörper das Vorhandensein von phosphoryliertem Histon H3 (pH3) nachgewiesen (Saka und Smith, 2001; Stevely und Stocken, 1968).

Abb. 4.21: Überexpression von *Hip* resultiert nicht in einer Erhöhung der Proliferationsrate. Legende s. S. 92.

Abb. 4.21: Überexpression von *Hip* resultiert nicht in einer Erhöhung der Proliferationsrate. a-f, Inkorporation von BrdU. a-c, Frontalansicht von *Xenopus laevis*-Embryonen (St. 12,5) nach *in situ* Hybridisierung mit *Rx* im retinalen Primordium (rot, gekennzeichnet durch rote gestrichelte Linie) und BrdU-Färbung (dunkle Punkte). Die Mittellinie der Embryonen ist durch die grüne gestrichelte Linie gekennzeichnet. a, Kontrollembryo. b, Embryo nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium zeigt eine Expansion der *Rx*-Expressionsdomäne (rot). Die Anzahl BrdU-positiver Zellen ist gegenüber dem Kontrollembryo nicht verändert. c, Embryo nach Injektion von *Xshh*-mRNA (500 pg) zeigt Reduktion der *Rx*-Expression (rot). Auch hier ist keine Veränderung der Proliferationsrate zu erkennen. d-f, Transversale Plastikschnitte (5 µm) von *Xenopus laevis*-Embryonen des Stadium 34. d, Kontrollembryo. e, die Anzahl BrdU-positiver Zellen ist nach Überexpression von *Hip* reduziert. f, Überexpression von *Shh* bewirkt keine Veränderung der Proliferationsrate. g-l, Nachweis von phosphoryliertem Histon H3 (pH3). g-i, Frontalansicht von *Xenopus laevis*-Embryonen (St. 12,5). g, Kontrollembryo. h,i, Injektion von *mHip*- (h) oder *Shh*-mRNA (i) bewirkt keine deutliche Änderung der Proliferationsrate. j-l, Frontalansicht von Embryonen des Stadium 34. j',j'',k',k'',l',l'', Seitenansicht der Embryonen von j-l. j, Kontrollembryo. k, Embryo nach Injektion von *mHip*-mRNA zeigt eine Reduktion der Proliferationsrate gegenüber dem Kontrollembryo. l, Embryo nach Injektion von *Xshh*-mRNA. Die Anzahl pH3-positiver Zellen ist gegenüber dem Kontrollembryo unverändert. is: injizierte Seite, nis: nicht-injizierte Seite.

Nach Überexpression von *Hip* oder *Shh* konnte keine Veränderung der Proliferationsrate in Embryonen des frühen Neurulastadiums beobachtet werden (Abb. 4.21, a-c, g-i). In späteren Stadien (St. 34) konnte im Bereich des Auges nach Injektion von *mHip*-mRNA sogar eine leichte Reduktion BrdU- sowie pH3-positiver Zellen im Vergleich zum Kontrollembryo nachgewiesen werden (Abb. 4.21, d-f, j-l). Der Grund für das Auftreten stark vergrößerter Augen durch Überexpression von *Hip* liegt also nicht in einer erhöhten Proliferationsrate.

4.10.3 Die von *Hip* ausgelöste Expansion des frühen Augenfeldes wird durch Inhibition von Mitose nicht verhindert

Wenn *Hip* eine Transdeterminierung von ektodermalen Zellen zu Retinazellen bewirken kann, sollte dieser Prozess durch die Inhibition jeglicher mitotischer Aktivität nicht verhindert werden. Um dies zu untersuchen, wurden die Embryonen nach Injektion von *mHip*- bzw. *Shh*-mRNA mit einer Kombination aus Hydroxyurea/Aphidicolin (HUA) behandelt, die als starker Inhibitor der Mitose wirkt (Harris und Hartenstein, 1991; Jenson, 1987). Tatsächlich konnte in Embryonen des frühen Neurulastadiums die Expansion des Augenfeldes nach Überexpression von *Hip* durch die Behandlung mit HUA nicht unterdrückt werden (Abb. 4.22).

Die enorme Größenzunahme des Auges nach Überexpression von *Hip* wurde also ohne eine Inhibition der apoptotischen Aktivität sowie ohne eine Erhöhung der Proliferationsrate erreicht.

Abb. 4.22: Mitotische Inhibitoren haben keinen Einfluß auf die Expansion des frühen Augenfeldes nach Überexpression von *Hip*. Frontalansicht von *Xenopus laevis*-Embryonen im frühen Neurulastadium (St. 12,5) nach *in situ* Hybridisierung mit *Rx* (braun) und Behandlung mit Hydroxyurea (20 mM)/Aphidicolin (150 μ M) (HUA) als mitotischer Inhibitor. a, Kontrollembryo zeigt keine Veränderung der *Rx*-Expression in den retinalen Vorläuferzellen nach Behandlung mit HUA. b, HUA kann die Expansion des frühen Augenfeldes nach Injektion von *mHip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums nicht inhibieren. c, die Reduktion der Expressionsdomäne von *Rx* durch Injektion von *Xshh*-mRNA (500 pg) ist durch HUA nicht beeinflusst. is: injizierte Seite, nis: nicht-injizierte Seite.

4.11 *mHip* und *Xhip* haben die gleiche Aktivität in *Xenopus laevis*-Embryonen

Zu Beginn dieser Arbeit war das *Hip*-Homolog aus *Xenopus laevis* kloniert worden (vgl. 4.1). In allen Überexpressions-Studien wurde bislang das murine *Hip* verwendet. Um zu überprüfen, ob *Xhip* in *Xenopus laevis*-Embryonen die gleiche Aktivität wie *mHip* hat, wurde die Expression von *Rx* in der Retina nach Injektion von *Xhip*-mRNA untersucht. Die Embryonen wiesen, wie nach der Überexpression von *mHip*, eine starke Vergrößerung des Auges auf, wobei Expression von *Rx* auch im Bereich des Gehirns beobachtet werden konnte (Abb. 4.23). Die Aktivitäten von *mHip* und *Xhip* bezüglich der Auswirkungen auf die Musterbildung im Auge sind also gleichzusetzen.

Abb. 4.23: Vergrößerung der Retina nach Überexpression von *Xhip*. Embryonen nach Injektion von *Xhip*-mRNA (750 pg) in eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium und *in situ* Hybridisierung mit *Rx*. a, b, Laterale Ansicht eines Embryos im Stadium 34 zeigt starke Vergrößerung des Auges nach Überexpression von *Xhip* (b) im Vergleich zur Kontrollseite (a). c, Frontalansicht desselben Embryos macht die Größenzunahme der Retina deutlich. d, Transversalschnitt zeigt Expression von *Rx* in der Retina und Teilen des Gehirns (Pfeil). is: injizierte Seite, nis: nicht-injizierte Seite.

5. Diskussion

Die Musterbildung innerhalb der Neuralplatte einschließlich der frühen Augenanlage in *Xenopus laevis*-Embryonen unterliegt der Aktivität von verschiedenen Signalmolekülen. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß das Hedgehog-interagierende Protein Hip, welches ursprünglich als Hedgehog-Antagonist charakterisiert worden war (Chuang und McMahon, 1999), nicht nur den Hedgehog-, sondern auch den Fgf- und Wnt-Signalweg inhibiert. Die Auswirkungen dieser Inhibition auf die Entstehung des frühen Augenfeldes und die weitere Augenentwicklung in *Xenopus laevis* soll im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Konservierte Domänen im putativen Xhip-Protein

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das *Xenopus laevis*-Homolog des *Hedgehog-interagierenden Proteins* (*Xhip*) kloniert. Die aus *Xenopus laevis* erhaltene *Xhip*-cDNA hatte eine Länge von 2375 bp mit einem offenen Leserahmen von 2091 bp, aus dem ein putatives Protein von 696 Aminosäuren abgeleitet werden konnte (vgl. 4.1). Das Xhip-Protein ist somit etwas kleiner als mHip und hHip, die beide aus 700 Aminosäuren bestehen. Die Aminosäuresequenz von Xhip wies sowohl mit dem murinen als auch mit dem humanen Hip eine hohe Identität auf (75% zwischen Xhip und mHip; 76% zwischen Xhip und hHip). Da andere Hip-Homologe nicht bekannt waren, konnten zum Vergleich mit anderen Spezies nur abgeleitete Proteinsequenzen von EST-Klonen herangezogen werden. Dies machte den Vergleich konservierter Domänen möglich, Identitätsvergleiche sind aber aufgrund fehlender Aussagekraft nicht angestellt worden. In der Erstbeschreibung des Hedgehog-interagierenden Proteins in der Maus ist eine Ähnlichkeit von 21% zwischen Hip und einer Aminosäuresequenz abgeleitet vom *Xenopus laevis* *Gene5* beschrieben worden, einem Gen, das in der Thyroid-Hormon induzierten Resorption des Schwanzes während der Metamorphose beteiligt ist (Brown et al., 1996; Chuang und McMahon, 1999). Zwischen Xhip und Gene5 konnte eine Ähnlichkeit von 20% festgestellt werden.

Durch Vergleich von Xhip mit den übrigen Hip-Homologen bzw. EST-Klonen wurde das Vorhandensein konservierter Domänen deutlich, die teilweise schon im murinen Hip nachgewiesen worden waren (Chuang und McMahon, 1999; vgl. Abb. 4.2 und 1.5). So konnte im putativen Xhip-Protein N-terminal eine Sezernierungssequenz ausgemacht werden, gekennzeichnet durch den Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (Von Heijne, 1990). Die letzten 22 Aminosäuren wiesen eine hohe Ähnlichkeit zur Transmembrandomäne von mHip auf. Dies deutet darauf hin, daß Xhip ebenso wie das murine Hip ein Membranprotein des Typ 1 ist, welches durch den C-Terminus in der Membran verankert ist und dessen übriger Teil in den extrazellulären Raum ragt (Matlack et al., 1998). Ein weiterer Hinweis darauf ist das Vorhandensein von vier potentiellen Asparagin-vermittelten Glykosylierungsstellen, die Xhip als ein Glykoprotein ausweisen. Eine posttranslationale Glykolsylierung erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum und dient der Regulation des vesikulären Transports sezernierter Proteine zur Zellmembran.

Im C-terminalen Bereich des putativen Xhip-Proteins ließen sich außerdem zwei Domänen aus 29 bzw. 30 Aminosäuren nachweisen, die eine hohe Ähnlichkeit zu einem Sequenzmotiv im Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) aufwiesen. EGF-ähnliche Domänen kommen in verschiedenen Proteinen vor, die ihre Funktion über Protein-Protein-Interaktionen ausüben, zum Beispiel Wachstumsfaktoren wie TGF α , Proteinen der Extrazellulären Matix wie Laminin und andere Membranproteine wie LDL- („*low density lipoprotein*“-) Rezeptoren (Überblick in Appella et al., 1988; Engel, 1989). Im ursprünglichen EGF-Protein dienen sechs Cystein-Reste innerhalb des besagten Sequenzmotivs der Bildung von Disulfidbrücken, was auf eine Rolle bei der Bindung des Rezeptors hindeutet (Doolittle et al., 1984 und Referenzen darin). Bestätigt wurde diese Vermutung durch die Deletion der kodierenden Sequenz für die EGF-ähnlichen Domänen im Gen des LDL-Rezeptors, die zu einer starken Reduktion der Bindungskapazität führte (Yamamoto et al., 1986). EGF-ähnliche Domänen treten meist in großer Anzahl in einem Protein auf. So enthält zum Beispiel Laminin alleine 40 solcher Motive, wohingegen Xhip nur zwei EGF-ähnliche Domänen aufweist (Engel et al., 1981). Es wird diskutiert, ob EGF-ähnliche Domänen in einigen Proteinen eine eher strukturelle Funktion haben, die darin besteht, Abstand zwischen zwei funktionellen Domänen zu schaffen (Engel et al., 1989). Die Anordnung der beiden EGF-ähnlichen Domänen zwischen dem C-terminalen Membrananker und dem „*six 4-stranded beta-sheet motif*“ (s.u.) deutet auf eine solche Funktion im Xhip-Protein hin.

Durch eine computergestützte Analyse in der SMART-Datenbank wurde im putativen Xhip-Protein das Vorhandensein eines sogenannten „*six 4-stranded beta-sheet motif*“ deutlich (Oubrie et al., 1999). Dieses Motiv wurde unter anderem in Megalin und LRP5/6, Mitgliedern der Familie der LDL-Rezeptoren, sowie im Wnt-inhibitorischen Protein Wif-1 nachgewiesen und ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (YWTD-Motiv bzw. Wif-Domäne) (Brown et al., 1998; Hey et al., 1998; Hsieh et al., 1999; Saito et al., 1994; Springer, 1998). Alle genannten Proteine enthalten außerdem genau wie Hip EGF-ähnliche Domänen, ein weiterer Hinweis auf eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß Megalin mit dem N-terminalen Fragment von Shh interagiert (McCarthy und Argraves, 2003; McCarthy et al., 2002). LRP5/6 und Wif-1 binden und regulieren dagegen Wnt-Moleküle (Hsieh et al., 1999; Wehrli et al., 2000; vgl. 1.3.3). Das Vorhandensein dieses konservierten Motifs im Xhip-Protein macht es somit möglich, daß auch Hip Shh- und Wnt-Moleküle binden kann.

Die Überexpression der *mHip*-mRNA in *Xenopus laevis*-Embryonen bewirkte dieselben Auswirkungen bezüglich der Größenänderung der Augen wie die Überexpression der *Xhip*-mRNA (vgl. Abb. 4.12, 4.23). Das bedeutet, daß nicht nur das arteigene, sondern auch das artfremde Hip-Protein durch die Komponenten in der Zelle in derselben Weise transportiert, sezerniert und in der Zellmembran verankert wird. Darüberhinaus läßt sich aus den erzielten Resultaten schließen, daß das murine Hip mit Proteinen aus *Xenopus laevis* interagiert und so seine Funktion ausübt. Dies sind wichtige Hinweise auf eine hohe funktionelle Konservierung des Hip-Proteins innerhalb der Vertebraten.

5.2 Expression und Regulation von *Xhip*

Durch die Isolierung von *Xhip* war es möglich, die zeitliche und räumliche Expression der *Xhip*-mRNA in *Xenopus laevis* zu analysieren. Mittels RT-PCR wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Expression nachgewiesen. Nach einer nur schwachen Expression in späten Gastrula- und frühen Neurulastadien wurde ein Anstieg der *Xhip*-Expression während der Neurulation beobachtet (vgl. Abb. 4.3, a). Die Aktivierung eines Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt erlaubt Rückschlüsse über dessen Funktion, und so deutet auch die Aktivierung der *Xhip*-mRNA auf eine Funktion von Hip während der Neurogenese in *Xenopus laevis* hin. Durch „whole mount“ *in situ* Hybridisierung konnten die frühesten *Xhip*-Transkripte allerdings erst in Embryonen des Stadium 18 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.4). Der Grund für diese Abweichung ist, daß die RT-PCR eine wesentlich sensitivere Methode zur Expressionsanalyse ist.

Xhip wurde während der Neurulation in *Xenopus laevis*-Embryonen im dorsalen Bereich des sich schließenden Neuralrohrs sowie in der preplakodalen Region exprimiert. Auch in älteren Embryonen wurden *Xhip*-Transkripte in verschiedenen Plakoden, wie etwa den olfaktorischen Plakoden, sowie in kranialen Nerven, der Pinealdrüse und der Hypophyse detektiert, die Derivate von verschiedenen Plakoden sind. Kraniale Plakoden entwickeln sich in *Xenopus laevis*-Embryonen im Bereich der Neuralfalten an der Grenze zwischen Neuralplatte und Epidermis als Verdickungen des sensorischen Ektoderms (Überblick in Schlosser und Northcutt, 2000). Durch Expressionsanalysen des Homeobox-Gens *Six1* konnte in *Xenopus laevis* eine preplakodale Region nachgewiesen werden, aus der sich alle kranialen Plakoden außer der Linse entwickeln (Pandur und Moody, 2000). Das Vorhandensein einer preplakodalen Region kann anhand der Expression von *Xhip* nachvollzogen werden. *Xhip*-Transkripte lassen sich später allerdings weder in der Linse noch in den Ohrvesikeln nachweisen, obwohl letztere auch aus der preplakodalen Region entstehen.

Ein interessanter Befund war, daß *Xhip* transient bis zum Schwanzknospenstadium im Notochord exprimiert wurde (vgl. Abb. 4.4). In älteren Embryonen (Stadium 28) war diese Expression nicht mehr vorhanden. Stattdessen konnte *Xhip* später dorso-lateral zur Bodenplatte sowie im dorsalen Teil des Neuralrohrs im Bereich des Mittelhirns nachgewiesen werden. Die frühe Aktivierung der *Xhip*-Expression im Notochord und die spätere im Neuralrohr könnte entweder durch verschiedene oder aber durch ein einziges Molekül gewährleistet werden. Ein guter Kandidat für ein solches Molekül ist *Sonic Hedgehog* (*Shh*). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß *Xhip* sowohl im ganzen Embryo wie auch in neuralisierten Gewebeexplantaten animalen Ektoderms durch Injektion von *Shh*-mRNA aktiviert wurde (vgl. Abb. 4.5). *Shh* wird in *Xenopus laevis* im axialen Mesoderm und späteren Notochord exprimiert (Ekker et al., 1995). Aus der Maus ist bekannt, daß *Shh* seine eigene Expression in der Bodenplatte des Neuralrohrs induziert und sezernierte *Shh*-Moleküle von dort aus nach dorsal einen Gradienten ausbilden (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994; vgl. 1.3.1). Auch andere *Shh*-Zielgene werden im Notochord und im Neuralrohr überlappend oder angrenzend an die Bodenplatte aktiviert, wie *Gli1*, *Patched1* oder *HNF3 β* (Koebernick et al., 2001; Lee et al., 1997; Ruiz i Altaba et al., 1993, 1995; Sasaki und Hogan, 1993). *Shh* könnte zunächst die *Xhip*-Expression im Notochord

anschalten. Für den späteren Verlust der *Xhip*-Expression im Notochord könnte eine nachlassende Induktion durch *Shh* verantwortlich sein, möglicherweise bedingt durch die antagonistische Interaktion der sezernierten *Shh*-Moleküle mit dem membranständigen *Xhip* (s.u.). Es ist aber auch möglich, daß die Expression von *Xhip* im späteren Notochord aktiv durch ein bisher unbekanntes Molekül reprimiert wird. Nach Beginn der *Shh*-Expression in der Bodenplatte des Neuralrohrs könnten sezernierte *Shh*-Moleküle die Expression von *Xhip* in angrenzenden Bereichen aktivieren. Im dorsalen Bereich des Neuralrohrs könnte es noch einen anderen Faktor geben, der *Xhip* aktiviert (s.u.), da hier bedingt durch den ventro-dorsalen *Shh*-Gradienten keine aktiven *Shh*-Moleküle vorhanden sind.

Die Induktion der *Xhip*-Expression durch *Shh* stimmt mit den Beobachtungen in der Maus überein. In Mäusen, die *Shh* ektopisch im dorsalen Neuralrohr exprimierten, wurde sowohl die Expression von *Patched* als auch die von *Hip* aktiviert (Chuang und McMahon, 1999; Goodrich et al, 1996). Im Gegenzug führte die Mutation von *Shh* oder *Dhh* zum Verlust der *mHip*-Expression in Hedgehog-responsiven Zellen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die anderen beiden Vertreter der *Xenopus laevis* Hedgehog-Familie, Banded und Cephalic Hedgehog ebenfalls die Expression von *Xhip* aktivieren können, da sie in anderen Induktionsversuchen die gleiche Aktivität hatten (Ekker et al., 1995).

Die Tatsache, daß *Shh* seinen eigenen Antagonisten induziert, ist von *Patched* bekannt. Einerseits ist *Patched* der *Shh*-Rezeptor, nach dessen Bindung der *Shh*-Signalweg aktiviert wird, was in einem Rückkopplungsmechanismus zur Induktion der *Patched*-Expression führt (vgl. 1.3.1). Die Induktion von *Patched* durch *Shh* bewirkt andererseits einen Überschuß an *Patched*-Molekülen, die frei von *Shh*-Liganden sind, und die den *Shh*-Signalweg durch die Inhibition von *Smoothed* blockieren. Dies trägt dazu bei, die Antwort auf ein *Shh*-Signal noch feiner zu modulieren. Die antagonistische Wirkung von *Patched* auf den *Shh*-Signalweg wird zudem dadurch erreicht, daß *Patched* durch die Bindung von *Shh*-Molekülen deren Diffusion vermindert (Chen und Struhl, 1996). Auch durch die Induktion von *Hip* wäre ein solcher Mechanismus vorstellbar, da in der Maus gezeigt wurde, daß *Shh*-Moleküle durch *Hip* an der Zelloberfläche zurückgehalten werden (Chuang und McMahon, 1999; vgl. 1.4).

In animalen Gewebeexplantaten konnte eine Induktion der *Xhip*-Expression durch Injektion von *Aktivin*-mRNA beobachtet werden (vgl. Abb. 4.5, B). Diese Induktion wird aber wahrscheinlich indirekt über aktivierte *Shh*-Moleküle reguliert, da durch *Aktivin* auch die Expression von *Shh* stark aktiviert wurde. Im Gegensatz dazu wurde *Xhip* in animalen Gewebeexplantaten durch die Injektion von *Wnt8*-mRNA direkt induziert, da eine transkriptionelle Aktivierung von *Shh* durch *Wnt8* nicht beobachtet werden konnte.

Die Induktion von *Xhip* in animalen Gewebeexplantaten durch *Shh* war nur möglich, wenn die Explantate durch die Ko-Injektion von *Chordin*-mRNA neutralisiert waren, d.h., wenn der BMP-Signalweg blockiert war (vgl. 1.2.1). Damit reiht sich *Xhip* in die Reihe anderer bekannter *Shh*-Zielgene ein, die in animalen Gewebeexplantaten von *Xenopus laevis* ebenso eine vorhergehende Neutralisierung benötigen, wie *Patched* oder *Kielin* (Matsui et al., 2000; Tsuda et al., 2002). Ein Grund für die Abhängigkeit der *Shh*-Aktivität von der Inhibition der BMP-Signalwirkung wurde in einer neueren Studie deutlich, in der gezeigt

wurde, daß BMP4 in Explantaten der Neuralplatte *Gli3* induziert (Meyer und Roelink, 2003). Da *Gli3* die durch *Gli1* und *Gli2* vermittelte transkriptionelle Aktivierung von *Shh*-Zielgenen blockiert, wird so die Weiterleitung des *Shh*-Signals verhindert (Ruiz i Altaba, 1998, Sasaki et al., 1997). Dieser Antagonismus trägt auch zur Musterbildung innerhalb des Neuralrohrs bei, die durch die gegensätzliche Aktivität von ventralen *Shh*-Signalen und dorsalen BMP-Signalen bestimmt wird (Briscoe et al., 2001; Patten und Placzek, 2002; Watanabe et al., 1998). Darüberhinaus reflektiert dies die Situation im ganzen Embryo, wo *Shh* erst nach der Spezifikation des dorsalen Mesoderms oder der neuralen Induktion durch BMP-Inhibitoren wie Chordin exprimiert wird (Ekker et al., 1995; vgl. 1.3.1).

Die Überexpression von *Aktivin* bewirkte eine indirekte Induktion der *Xhip*-Expression durch *Shh*, obwohl in diesem Fall die Gewebeexplantate nicht durch Ko-Injektion von *Chordin* neuralisiert worden waren. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Signalwege der TGF β -Moleküle *Aktivin* und BMP über Smad-Proteine vermittelt werden, die zwar verschieden sind, jedoch in beiden Fällen einen Komplex mit Smad4 eingehen (Überblick in Massagué et al., 2000). Die erhöhte Nutzung von Smad4 nach Überexpression von *Aktivin* könnte eine Konkurrenzsituation schaffen, in der weniger Smad4-Moleküle für den BMP-Signalweg zur Verfügung stehen. Die ektopische Aktivierung von *Aktivin* schafft somit durch die Induktion der *Shh*-Expression ein instruktives Signal und durch die Verringerung der BMP-Signalwirkung zugleich eine permissive Umgebung für die Induktion der *Xhip*-Expression.

Das Niveau der Induktion der *Xhip*-Expression durch *Wnt8* war alleine gering und wurde durch die Ko-Injektion von *Chordin*-mRNA wesentlich verstärkt. Normalerweise ist in animalen Gewebeexplantaten zur Aktivierung anderer *Wnt8*-Zielgene wie *Xnr3* oder *Siamois* aber keine Neuralisierung nötig (Bell et al., 2003; diese Arbeit). Die Neuralisierung der Explantate durch Ko-Injektion von *Chordin*-mRNA könnte die Induktion der *Xhip*-Expression durch *Wnt8* erleichtert haben, da *Xhip* auch im ganzen Embryo im neuralen Gewebe induziert wurde.

Die Aktivierung der *Xhip*-Expression durch *Wnt8* könnte auch das Vorhandensein von *Xhip*-Transkripten im dorsalen Neuralrohr erklären (s.o.). Eine Expression im Dach des Neuralrohrs ist für verschiedenen *Wnt*-Gene in der Maus nachgewiesen worden, darunter auch *Wnt8* (Lee et al., 2000; Parr et al., 1993). In *Xenopus laevis*-Embryonen wurde zwar nicht *Wnt8*, aber unter anderem *Wnt3a* oder das nicht-kanonische *Wnt4* im dorsalen Bereich des Neuralrohrs nachgewiesen, die für eine Induktion der *Xhip*-Expression verantwortlich sein könnten (Christian et al., 1991; McGrew et al., 1992; Wolda et al., 1993).

Die Expression von *Xhip* in *Xenopus laevis* zeigt Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zur Expression von *mHip* in der Maus (Chuang und McMahon, 1999).

Die ersten *mHip*-Transkripte wurden 8,75 Tage nach der Befruchtung nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt ist im Mausembryo die Gastrulation abgeschlossen und die Expression von *Shh* hat begonnen (Echelard et al., 1993; Theiler, 1989). In Übereinstimmung zu *Xhip* wird *mHip* im Notochord exprimiert, wobei diese Expression in der Maus bis zum Schwanzknospenstadium erhalten bleibt und nur im kaudalen Bereich des Embryos zu

finden ist. *mHip* wird im Unterschied zu *Xhip* in der Maus transient in der Bodenplatte des Neuralrohrs exprimiert. Diese Expression geht allerdings im Schwanzspitzenstadium verloren, und genau wie in *Xenopus laevis* wird *mHip* dann dorso-lateral von der Bodenplatte exprimiert. Eine Expression von *mHip* im dorsalen Bereich des Neuralrohrs wurde allerdings in der Maus nicht beobachtet.

Im adulten Frosch konnten *Xhip*-Transkripte in allen Geweben außer dem Muskel nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.3, b). Am stärksten wurde *Xhip* in Hoden, Lunge, Darm und Leber exprimiert. Die Expression von *mHip* in adulten Mäusen ist nicht bekannt, allerdings wird *mHip* in späteren Embryonalstadien besonders stark unter anderem in der Lunge und im Darm exprimiert, was mit *Xhip* übereinstimmt. Die Funktion von Hip in der Lunge wurde in neugeborenen *Hip*^{-/-}-Mäusen deutlich, die aufgrund der durch die Mutation verursachten Störung der Lungenentwicklung nicht atmen konnten und schließlich starben (Chuang et al., 2003). Der Vergleich der Expression von *Xhip* mit *mHip* zeigt viele Übereinstimmungen, die auf eine konservierte Funktion von Hip innerhalb der Vertebraten schließen lassen. Ob die Unterschiede, zum Beispiel die Expression von *Xhip* im dorsalen Bereich des Neuralrohrs auf eine besondere Funktion von *Xhip* in diesem Bereich schließen lassen, bleibt offen. In Mäusen wurden nach der Deletion des *Hip*-Gens keine Auswirkungen auf neurale Strukturen beschrieben (Chuang et al., 2003).

5.3 Hip ist ein multifunktioneller Antagonist von Shh-, Fgf- und Wnt-Signalen

Die Bezeichnung von Hip als Hedgehog-interagierendes Protein in der Maus resultierte aus der Tatsache, daß *Hip* alle drei Hedgehog-Moleküle der Maus binden konnte (Chuang und McMahon, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß *Hip* in *Xenopus laevis*-Embryonen neben dem Shh- auch den Fgf- und den Wnt-Signalweg negativ beeinflusst.

5.3.1 Hip kontrolliert den Shh-, Fgf- und Wnt-Signalweg in animalen Gewebeexplantaten und im ganzen Embryo

Um zu überprüfen, ob Hip in *Xenopus laevis* ein spezifischer Inhibitor des Shh-Signalwegs ist, wurde der Einfluß von Hip auf verschiedene andere Signalmoleküle untersucht. Dazu wurden animale Gewebeexplantate nach Injektion entsprechender mRNAs isoliert und durch *in situ* Hybridisierung die Induktion spezifischer Zielgene analysiert. Zunächst wurde anhand der Repression der *Patched*-Induktion nach Ko-Injektion von *Chordin*, *Shh* und *Hip* bestätigt, daß *Hip* den Shh-Signalweg inhibiert (vgl. Abb. 4.6, A). Überraschenderweise stellte sich außerdem heraus, daß *Hip* die durch *eFgf* induzierte Expression von *Xbra* unterdrückt. Diese Repression konnte durch zusätzliche Injektion von *Elk*-mRNA zum größten Teil aufgehoben werden. *Elk* ist eine Komponente des Fgf-Signalwegs und agiert im Komplex mit SRF als Transkriptionsfaktor für Fgf-Zielgene (Rao et al., 1989; Cunliffe und Smith, 1992; Latinkic et al., 1997; Panitz et al., 1998; Shore

und Sharrocks, 1994; vgl. 1.3.2). Die Aufhebung der Inhibition der *Xbra*-Expression durch *Hip* nach Injektion von *Elk*-mRNA deutet darauf hin, daß *Hip* spezifisch auf den Fgf-induzierten MAPK-Signalweg wirkt. Außerdem ließen die Ergebnisse eine direkte Interaktion des membrangebundenen *Hip* mit den Fgf-Molekülen vermuten. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden: in einer Ko-Immunopräzipitation von *Hip* mit Fgf8 konnte keine direkte Interaktion nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.8). Es ist deshalb möglich, daß *Hip* nicht den Fgf-Liganden, sondern den Fgf-Rezeptor bindet. Eine negative Regulation des Fgf-Rezeptors wurde für den endogenen Fgf-Inhibitor Sef-1 nachgewiesen, der allerdings ein Transmembranprotein ist, welches den Fgf-Rezeptor mit seiner intrazellulären Domäne bindet (Tsang et al., 2002). *Hip* könnte dagegen als Membranprotein des Typ 1 mit der extrazellulären Domäne des Fgf-Rezeptors interagieren.

Im Weiteren wurde getestet, ob Signale der TGF β -Familie von *Hip* beeinflusst werden. In animalen Gewebeexplantaten, die äquivalent zu frühen Embryonalstadien waren, wurde weder die Aktivität von *Aktivin* noch von *BMP4* durch die Ko-Injektion von *mHip*-mRNA inhibiert (vgl. Abb. 4.6, A). Tatsächlich konnte *Hip* die Explantate auch nicht direkt neutralisieren, was auf einen einfachen BMP-Antagonismus hingedeutet hätte. In Gewebeexplantaten, die äquivalent zu älteren Embryonen waren, konnte allerdings eine Repression der durch *Aktivin* oder *BMP4* induzierten *Xbra*-Expression durch *Hip* beobachtet werden. Fgf ist für die Aufrechterhaltung der durch *Aktivin* und *BMP4* induzierten Expression von *Xbra* notwendig. Ist der Fgf-Signalweg blockiert, wird die Anzahl der *Xbra*-Transkripte nach Induktion durch *Aktivin* oder *BMP4* schnell reduziert (Isaacs et al., 1994; Schulte-Merker und Smith, 1995; Tada et al., 1997; vgl. 1.4.2). Die Repression der durch *Aktivin* oder *BMP4* induzierten *Xbra*-Expression nach Ko-Injektion von *Hip*-mRNA in älteren Explantaten kann daher durch die Inhibition des Fgf-Signalwegs durch *Hip* erklärt werden.

Um die Wirkung von *Hip* auf den Fgf-Signalweg näher zu charakterisieren, wurde die Expression von *Xbra* sowie die Phosphorylierung der MAPK in ganzen *Xenopus laevis*-Embryonen untersucht (vgl. Abb. 4.7). Die Phosphorylierung der MAP-Kinase ist ein Prozess, der durch verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit unterschiedlichen Liganden vermittelt werden kann. In *Xenopus laevis*-Embryonen ist die Aktivierung der MAPK allerdings alleine vom Fgf-Signalweg abhängig (LaBonne und Whitman, 1997). Es sollte darüberhinaus ausgeschlossen werden, daß der Fgf-Signalweg indirekt über eine verminderte Shh-Aktivität reguliert wird. Eine positive Rückkopplung zwischen Fgf und Shh ist unter anderem in Hühnerembryonen nachgewiesen worden, wo der Shh-Signalweg dazu nötig ist, die Expression von *Fgf8* aufrecht zu erhalten (Ohkubo et al., 2002). In der Theorie wäre es denkbar, daß durch *Hip* zunächst der Shh-Signalweg inhibiert wird und dieses daraufhin zur Repression des Fgf-Signalwegs führt. Um diesen Einfluß von Shh auf die Inhibition des Fgf-Signalwegs durch *Hip* auszuschließen, wurden Embryonen des frühen Gastrulastadiums analysiert, in denen noch keine Shh-Signale messbar sind (vgl. 4.4.2). Sowohl die Expression des Fgf-Zielgens *Xbra*, als auch die Phosphorylierung der MAPK wurde nach Injektion von *mHip*-mRNA unterdrückt. Eine spezifische Inhibition des Fgf-Signalwegs durch *Hip* konnte somit also bestätigt werden. Durch die

Injektion von *mHip*-mRNA wurden somit Auswirkungen erreicht, die mit der gezielten Inaktivierung des Fgf-Signalwegs vergleichbar waren. So führte auch die Überexpression des dominant-negativen Fgf-Rezeptors-1 (*XFD*) zu einer Repression der *Xbra*-Expression und MAPK-Phosphorylierung in *Xenopus laevis*-Embryonen des frühen Gastrulastadiums (Amaya et al., 1993; Curran und Grainger, 2000; Kroll und Amaya, 1996). Die MAPK-Phosphorylierung wurde ebenfalls durch Überexpression des Fgf-Inhibitors *Sef-1* in Zellkultur unterdrückt (Furthauer et al., 2002; Kovalenko et al., 2003). Die negative Regulation des MAPK-Signalwegs ist aber keine generelle eigenschaft von Fgf-Inhibitoren. So war nach Überexpression von *Sprouty2* in *Xenopus laevis*-Embryonen weder die Expression von *Xbra* noch die Phosphorylierung der MAPK beeinflusst (Nutt et al., 2001). *Sprouty2* inhibierte dagegen eine durch Fgf-Signale induzierte intrazelluläre Mobilisierung von Calcium-Ionen, also einen MAPK-unabhängigen Signalweg.

Der Einfluß von *Hip* auf den Wnt-Signalweg wurde anhand der Fähigkeit von kanonischen Wnt-Molekülen untersucht, in *Xenopus laevis*-Embryonen eine zweite Körperachse zu induzieren (vgl. 1.3.3). Dabei konnte festgestellt werden, daß die Ko-Injektion von *mHip*-mRNA die Ausbildung einer zweiten Achse durch *Wnt8* verhinderte, während *Wnt3a* durch *Hip* nicht beeinflusst war (vgl. Abb. 4.9, a-f). Die spezifische Inhibition von *Wnt8* konnte mittels RT-PCR durch die Analyse der Expression der Wnt-Zielgene *Xnr3* und *Siamois* bestätigt werden (vgl. Abb. 4.9, g, h). Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, ob *Hip* direkt *Wnt8*-Moleküle binden kann.

Wnt8 und *Wnt3a* gehören zur Klasse der kanonischen Wnt-Moleküle, die beide während der Gastrulation im ventro-lateralen Mesoderm exprimiert werden und in den meisten untersuchten Prozessen der Embryonalentwicklung dieselbe Funktion ausüben (vgl. 1.3.3). So haben beide einen posteriorisierenden Einfluß bei der Entstehung des neuralen Ektoderms (Kiecker und Niehrs, 2001; McGrew et al., 1995). Die bevorzugte Inhibition von *Wnt8* gegenüber *Wnt3a* durch *Hip* ist ein interessantes Resultat, welches einen genaueren Vergleich von *Hip* mit den bekannten Wnt-Inhibitoren ermöglicht. Es ist bislang nicht bekannt, ob *Cerberus* zwischen *Wnt8* und *Wnt3a* unterscheidet. Die bisher veröffentlichten Untersuchungen zeigten nur einen Antagonismus gegen *Wnt8* (Piccolo et al., 1999). *Dickkopf-1* inhibierte die Aktivität sowohl von *Wnt8* als auch von *Wnt3a* (Glinka et al., 1998; Kazanskaya et al., 2000). Dagegen sind *Frzb* und *Wif-1* bezüglich der Spezifität mit *Hip* vergleichbar: *Frzb* inhibiert *Wnt1* und *Wnt8*, aber nicht *Wnt3a*; *Wif-1* antagonisiert den *Wnt8*-Signalweg vollständig und den *Wnt3a*-Signalweg nur teilweise (Hsieh et al., 1999; Wang et al., 1997b). Über die funktionelle Bedeutung der bevorzugten Inhibition von *Wnt8*- gegenüber *Wnt3a*-durch *Frzb* oder *Wif-1* ist allerdings nichts bekannt.

Die bisher beschriebenen Wnt-Antagonisten *Cerberus*, *Dickkopf-1* und *Frzb* werden schon während der Gastrulation im *Xenopus laevis*-Embryo exprimiert, *Cerberus* im Endomesoderm, *Dickkopf-1* und *Frzb* im Spemann-Organisator. Allen ist gemeinsam, daß sie der ventralisierenden Wirkung der oben genannten Wnt-Signale im ventro-lateralen Mesoderm des gastrulierenden Embryos entgegensteuern (Bouwmeester et al., 1996; Glinka et al., 1997; Glinka et al., 1998; Leyns et al., 1997; Piccolo et al., 1999; Wang et al., 1997a). *Wif-1* wird dagegen genauso wie *Hip* erst zu Beginn der Neurulation

exprimiert, interessanterweise ebenso wie *Hip* im Notochord und in dem präsomitischen Mesoderm. Es wird vermutet, daß Wif-1 an der Segmentierung der Somiten während der Muskelentstehung beteiligt ist (Hsieh et al., 1999). Auch die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch *Hip* könnte eine wichtige Bedeutung bei späteren Prozessen der Embryonalentwicklung besitzen. Die Expression von *Hip* im Bereich der anterioren Neuralfalten lässt eine regulatorische Funktion während der Musterbildung der Neuralplatte vermuten (vgl. 1.2.2).

Einige Wnt-Inhibitoren sind in der Lage, verschiedene Signalwege simultan zu inhibieren. So blockiert Dickkopf-1 den Wnt- und BMP-Signalweg, während Cerberus durch direkte Interaktion neben Wnt- und BMP- auch Xnr-Signale negativ reguliert (Kazanskaya et al., 2000; Piccolo et al., 1999). Obwohl Dickkopf-1 der posteriorisierenden Wirkung von bFgf in *Xenopus laevis* entgegenwirkte, war die durch bFgf induzierte Expression von *Xbra* durch Dickkopf-1 nicht beeinträchtigt (Kazanskaya et al., 2000). *Hip* ist daher nach bisherigem Kenntnisstand der einzige Wnt-Inhibitor, der auch den Fgf-Signalweg antagonisiert. Die gleichzeitige Regulierung von Shh-, Fgf- und Wnt-Signalen ist ein neues Phänomen im immer komplexer erscheinenden Netzwerk der Signalmoleküle bei der Embryonalentwicklung.

5.3.2 *Hip*, *Shh*, *Fgf8* und *Wnt8* werden in *Xenopus laevis*-Embryonen komplementär exprimiert

Die Voraussetzung der Regulierung von Signalmolekülen ist, daß ihre Inhibitoren in unmittelbarer Nachbarschaft und komplementär zu den von ihnen antagonisierten Molekülen exprimiert werden. Das gilt zum Beispiel für *BMP4* und *Chordin*; *Fgf8*, *Sef-1* und *Sprouty2*; *Wnt8* und *Frzb*; *Shh* und *Patched* und auch für *Shh* und *mHip* (Chambers und Mason, 2000; Christen und Slack, 1997; Christian et al., 1991; Christian und Moon, 1993; Chuang und McMahon, 1999; Lin et al., 2002; Koebernick et al., 2001; Nutt et al., 2001; Piccolo et al., 1996; Smith und Harland, 1991; Wang et al., 1997a; Zimmermann et al., 1996). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob auch die Expression von *Hip*, *Shh*, *Fgf8* und *Wnt8* in *Xenopus laevis*-Embryonen komplementär ist (vgl. Abb. 4.10).

In Embryonen des Schwanzspitzenstadiums wurde *Hip* dorsal angrenzend an die Expressionsdomänen von *Shh* in der ventrikulären Zone des Zwischenhirns und in der Neuralröhre exprimiert. In diesem Stadium waren *Xhip*-Transkripte auch in der Hypophyse nachzuweisen (vgl. Abb. 4.4). Die Hypophyse und das Neuralrohr in früheren Stadien (vgl. 5.2) waren die einzigen Bereiche, in denen *Hip* und *Shh* überlappend exprimiert wurden (Echelard et al., 1993; Ekker et al., 1995). Die Expression von *Shh* und *Hip* in denselben Zellen könnte dazu beitragen, die autokrine Wirkung von Shh auf die Shh-produzierenden Zellen einzuschränken und somit eine erhöhte Bildung von Patched-Molekülen zu verhindern (vgl. 5.2). Dieser mögliche Mechanismus wird durch die Tatsache unterstützt, daß *Patched* zunächst überlappend mit Shh-sezernierenden Zellen exprimiert wird, während *Patched*-Transkripte später nur außerhalb der *Shh*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden können (Goodrich et al., 1996; Koebernick et al., 2001; Motoyama et al., 1998; Takabatake et al., 1997).

Im Bereich der Branchialbögen konnte eine benachbarte Expression von *Hip*, *Shh* und *Fgf8* nachgewiesen werden. Eine räumliche Beziehung zwischen *Hip*- und *Fgf8*-Transkripten war zudem besonders in frühen Neuralstadien augenscheinlich. Hier wurde die *Hip*-Expressionsdomäne im preplakodalen Ektoderm von *Fgf*-exprimierenden Zellen im nicht-neuralen Ektoderm und in der anterioren Neuralfalte begrenzt. Die Expressionsdomäne von *Hip* in älteren Neuralstadien war außerdem benachbart von *Wnt8*-exprimierenden Zellen.

Die enge räumliche Beziehung der Expressionsdomänen von *Hip* und *Shh*, *Fgf8* oder *Wnt8* deutet darauf hin, daß *Hip* dazu dient, Grenzen für diese Signalmoleküle zu bilden. *Hip* könnte dabei durch die Bindung der Liganden dafür sorgen, daß die Diffusion der Signalmoleküle und infolge dessen deren Aktivität lokal eingeschränkt wird. Ein solcher Mechanismus wird auch für *Shh* und *Patched* diskutiert (Chen und Struhl, 1996; vgl. 5.2). Zudem könnten die *Hip*-produzierenden Zellen auch direkt vor dem Einfluß der Signalmoleküle geschützt werden, indem die Liganden davon abgehalten werden, an ihre Rezeptoren zu binden, oder, wie im Fall von *Fgf* vermutet wurde, indem *Hip* den Rezeptor negativ reguliert.

5.4 Die Überexpression von *Hip* beeinflusst die Musterbildung innerhalb der sich entwickelnden Augen

Die Entwicklung der Augen wurde in dieser Arbeit untersucht, um den Einfluß von Signalmolekülen während der Entstehung eines bestimmten Organs in *Xenopus laevis*-Embryonen deutlich zu machen. Die Überexpression von *Hip* hatte entscheidende Auswirkungen auf die Formierung und Begrenzung der verschiedenen Anteile der Augen, auf die Abfolge der einzelnen Zellschichten innerhalb der späteren Retina sowie der dorso-ventralen Musterbildung im embryonalen Gehirn.

5.4.1 Die Auswirkungen der Überexpression von *Hip* verdeutlichen den Einfluß von *Shh* auf die proximo-distale Gliederung des Auges

Durch Überexpression von *Hip* wurde die Regionalisierung innerhalb des Auges stark beeinflusst. Während die Injektion von *Shh*-mRNA zum Verlust von Retina und Linse führte, waren diese dorsalen Anteile des Auges nach Injektion von *Hip*-mRNA stark vergrößert (vgl. Abb. 4.11).

Deutlicher wurden die Auswirkungen nach Analyse spezifischer Markergene für die einzelnen Bereiche des Auges und des embryonalen Gehirns (Tab. 5.1; vgl. Abb. 4.12). Die Überexpression von *Hip* führte zu einer starken Vergrößerung der Expressionsdomänen von *Rx* und *Crystallin α* , wohingegen die Expression von *Vax1* reduziert war. Darüberhinaus war die Expressionsdomäne von *Rx* auf große Teile des Zwischenhirns ausgedehnt. Die Überexpression von *Shh* führte dagegen zur Reduktion der Expressionsdomänen von *Rx* und *Crystallin α* , während die Expressionsdomäne von *Vax1*

stark expandiert war. Innerhalb des embryonalen Gehirns war die Ausbildung der dorso-ventralen Achse gestört, was anhand der Expression von *Nkx-2.1* und *Gsh-1* nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 4.13).

Marker gen		Überexpression von <i>Hip</i>	Überexpression von <i>Shh</i>
Auge	Augenstiel: <i>Vax1</i>	↓	↑
	Retina: <i>Rx</i> <i>Rhodopsin</i>	↑ ↑	↓ ↓
	Linse: <i>Crystallin α</i>	↑	↓
embryonales Gehirn	dorsal: <i>Gsh-1</i>	↑	↓
	ventral: <i>Nkx-2.1</i>	↓	↑

Tab. 5.1: Komplementäre Auswirkungen der Überexpression von *Hip* oder *Shh* auf die Expression von Marker genen des Auges und des embryonalen Gehirns. Pfeil nach unten: Reduktion der Expressionsdomäne; Pfeil nach oben: Erweiterung der Expressionsdomäne.

Durch Studien an Mäusen, in denen der *Shh*-Signalweg gezielt ausgeschaltet war, wurde deutlich, daß *Shh* für die Ausbildung der ventralen Anteile des Auges und des Gehirns essentiell ist (Chiang et al., 1996). Umgekehrt war in *Xenopus laevis*-Embryonen nach Überexpression von *Shh* die Expression von *Pax2* im Augenstiel gesteigert und von *Pax6* in der Retina reduziert (Hallonet et al., 1999; Perron et al., 2003). Diese Resultate wurden durch die Überexpression von *Hip* bzw. *Shh* in dieser Arbeit bestätigt. Der Verlust des Augenstiels und die Vergrößerung der Retina nach Überexpression von *Hip* veranschaulicht die ventralisierende Wirkung von *Shh*, die in einem Modell auf die Augenentwicklung von *Xenopus laevis* übertragen werden kann (Abb. 5.1). Eine frühe Funktion von *Shh* bei der Augenentwicklung liegt in der Spaltung des Augenfeldes, das Vorläuferzellen von Retina, Linse und Augenstiel beinhaltet. Zu Beginn der Neurulation wird durch *Shh*-Signale aus dem axialen Mesoderm das darüberliegende Ektoderm ventralisiert, wodurch unter anderem Augenstiel, Hypophyse und Bodenplatte des Neuralrohrs induziert werden. Die Bereiche der Retina- und Linsenanlagen, die nicht dem Einfluß des medialen *Shh*-Signals unterlagen, werden später zu Retina und Linse spezifiziert. Nach Überexpression von *Shh* werden mehr aktive *Shh*-Moleküle gebildet, die auch in die Bereiche des frühen Augenfeldes gelangen, die normalerweise frei von *Shh*-Signalen sind. Es kommt zu einer stärkeren Ventralisierung und der vermehrten Bildung von Zellen des ventralen Neuralrohrs und des Augenstiels auf Kosten der distalen Anteile Retina und Linse. Im umgekehrten Fall bewirkt die Überexpression von *Hip* eine Verminderung aktiver *Shh*-Moleküle. Das fehlende ventralisierende Signal bewirkt die vermehrte Ausbildung von Retina- und Linsenzellen sowie Zellen des dorsalen

Abb. 5.1: Spaltung des frühen Augenfeldes unter der Einwirkung von Hedgehog-Signalen aus dem axialen Mesoderm. Schematische Darstellung von *Xenopus laevis*-Embryonen unterschiedlicher Stadien in Frontalansicht bzw. transversal geschnitten (Schwanzknospenstadium). In der späten Gastrula liegen sowohl präsumptive Augenstiel- als auch Retina- und Linsenzellen in einem Primordium in der anterioren Neuralplatte vor. Die Sekretion von Shh aus dem axialen Mesoderm bewirkt die Ventralisierung des darüberliegenden Ektoderms, was zur Spaltung des frühen Augenfeldes (grün: Retina-, gelb: Linsen-Vorläuferzellen) führt. In den ventralisierten Bereichen induziert Shh die Entstehung von Hypophyse (hellblau) und Bodenplatte des Neuralrohrs (dunkelblau). Im Schwanzknospenstadium ist die Musterbildung abgeschlossen, es kommt zur Spezifikation von Linse und retinalem Augenbecher. Schließlich werden embryonales Gehirn, Retina und Linse im Schwanzspitzenstadium differenziert.

Neuralrohrs, während der Augenstiel und die Bodenplatte des Neuralrohrs reduziert ist. Neuere Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, daß auch der Fgf-Signalweg an der dorso-ventralen Musterbildung innerhalb des embryonalen Gehirns beteiligt ist. Die Applikation von Fgf8 zu Explantaten des Telencephalons bewirkte unabhängig von Shh eine Ventralisierung und den Verlust von dorso-medialen Strukturen (Kuschel et al., 2003). In derselben Studie wurde eine Interaktion von Shh und Fgf8 nachgewiesen. Die ektopische Aktivierung des Shh-Signalwegs bewirkte neben der Expression ventraler Markergene eine starke Induktion der *Fgf8*-Expression im dorsalen Teil des Telencephalons. Eine Integration von Shh- und Fgf8-Signalen ist auch in *Shh*^{-/-}-Mäusen beobachtet worden, in denen die Expression von *Fgf8* im rostralen Prosencephalon reduziert war (Ohkubo et al., 2002). Es ist wahrscheinlich, daß beide Moleküle *in vivo* an der Regulation der dorso-ventralen Achse innerhalb des embryonalen Gehirns beteiligt sind. In *Xenopus laevis* wird *Fgf8* im ventralen Teil des Neuralrohrs exprimiert, was diese Vermutung verstärkt (Christen und Slack, 1997 und eigene Beobachtung). Die Inhibition des Fgf-Signalwegs durch Hip könnte somit zusätzlich zur Blockierung des Shh-Signalwegs die Dorsalisierung des Neuralrohrs bewirken.

Die Expressionsdomäne von *Crystallin α*, einem Gen, das während der Differenzierung in Linsenfaserzellen exprimiert wird, war nach Überexpression von *Hip* nicht nur vergrößert, sondern auch morphologisch verändert (Mizuno et al., 1999) (vgl. Abb. 4.12). In *Xenopus laevis*-Embryonen des Schwanzspitzenstadiums bildet sich normalerweise nach Abschnürung der Linsenplakode vom Ektoderm der Linsenvesikel aus (vgl. 1.1.2). Ein

Transversalschnitt zeigte, daß die Linse nach Überexpression von *Hip* in einem plakodalen Zustand geblieben war, weil keine Invagination stattgefunden hatte.

Die gestörte Linsenentwicklung nach Überexpression von *Hip* kann verschiedene Gründe haben. Vorstellbar ist, daß die Linse durch die vergrößerte Retina daran gehindert wurde, in den Augenbecher zu invaginieren. Die Abhängigkeit der Linsenformierung von der Gestaltung der Retina ist mehrfach bewiesen worden (Grainger et al., 1992; Saha et al., 1989). Es könnte aber auch sein, daß *Hip* direkt auf die Linsenentstehung einwirkt. Da die presumptiven Linsenzellen Bestandteil des frühen Augenfeldes im *Xenopus laevis*-Embryo sind, ist es wahrscheinlich, daß *Hip* nicht nur die Spezifikation der Retina-, sondern auch der Linsen-Vorläuferzellen beeinflusst. Dies würde das oben beschriebene Modell bestätigen. In explantierten Linsenepithelzellen der Ratte wurde nachgewiesen, daß die Unterdrückung der Fgf-Signalwirkung durch Applikation eines synthetischen Inhibitors des MAPK-Signalwegs zu einer gestörten Linsendifferenzierung führte (Lovicu und McAvoy, 2001; vgl. 1.3.2). Dies zeigte sich darin, daß die Elongation der Linsenfaserzellen gegenüber Kontrollexplantaten stark unterdrückt war, wodurch die Verdickung des Linsengewebes ausblieb. Die durch Fgf induzierte Expression von β -Crystallin war interessanterweise nach Inhibierung des MAPK-Signalwegs in den Explantaten nicht unterdrückt, was darauf hindeutete, daß diese Aktivierung nicht durch MAPK vermittelt wird. Diese Befunde ähneln sehr stark den hier erzielten Ergebnissen nach Überexpression von *Hip*. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß die Unterdrückung des Fgf-vermittelten MAPK-Signalwegs durch *Hip* zu den beobachteten morphologischen Veränderungen der Linsenentwicklung beiträgt.

Im Gegensatz zu den *Shh*^{-/-}-Mäusen führte die Überexpression von *Hip* in *Xenopus laevis* nicht zur Entstehung von Zyklopie (Chiang et al., 1996). Dies deutet darauf hin, daß die Verminderung der Shh-Aktivität durch *Hip* nicht mit einem totalen Verlust des Hedgehog-Signals gleichzusetzen ist. Diese Annahme beruht auf der Eigenschaft von Shh-Molekülen, auf zweierlei Weise zu agieren, lokal über kurze Distanzen mit einer Wirkung im Abstand von 1-2 Zelldiametern zu Shh-produzierenden Zellen („short range effect“) und über lange Distanzen von bis zu 10 Zelldiametern („long range effect“) (Chuang und Kornberg, 2000; Ingham, 1993; Porter et al., 1995; Tabata und Kornberg, 1994). Vieles deutet darauf hin, daß diese unterschiedliche Wirkungsweise darin begründet liegt, daß Shh-Moleküle sowohl membrangebunden als ungebunden vorliegen können. So wird diskutiert, daß die Induktion der *Shh*-Expression in der Bodenplatte des Neuralrohrs, die eine hohe lokale Shh-Konzentration benötigt, durch membrangebundene Shh-Moleküle im räumlich eng benachbarten Notochord vermittelt wird (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1995). Eine Bindung an die Membran ist wegen des Lipidgehalts von Shh durch die Modifikation mit einem Cholesterol- und einem Palmityl-Rest sehr wahrscheinlich und konnte in Zellkultur nachgewiesen werden (Bumcrot et al., 1995; Porter et al., 1995, 1996). Die Induktion der Motoneuronen durch den Shh-Gradienten innerhalb des Neuralrohrs spiegelt dagegen den „long range effect“ wider, für den ursprünglich eine frei diffundible Form von Shh verantwortlich gemacht wurde (Zeng et al., 2001). Neuere Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, daß Shh über mizellenartige Strukturen oder Vesikel transportiert wird, in denen die hydrophoben Lipidmodifikationen von der Umgebung abgeschirmt sind

Entsprechend dem oben vorgeschlagenen Modell wurde untersucht, ob *Hip* einen stärkeren Einfluß auf die Augenentwicklung hat, wenn es frei sezerniert wird. Dazu wurde die kodierende Sequenz für die Transmembrandomäne in der *mHip*-cDNA deletiert. Tatsächlich wurden die durch *Hip* hervorgerufenen phenotypischen Effekte, wie die Größenzunahme der Retina, durch die Überexpression von *mHip* Δ TM noch verstärkt (vgl. Abb. 4.16). Die Linse wies im Gegensatz zur Überexpression des Wildtyp-*Hip* keine äußerliche morphologische Störung auf. Im Transversalschnitt wurde sichtbar, daß ein differenzierter Linsenvesikel ausgebildet war. Auffällig war jedoch die starke Vergrößerung des Linsenvesikels im Vergleich mit der Kontrollseite. Die durch die Sekretion hervorgerufene Verstärkung des Hip-Effektes läßt sich anhand der Funktion von Hip erklären. Hip antagonisiert die Shh-Signalwirkung dadurch, daß durch Bindung an Hip Shh-Moleküle an der Zellmembran zurückgehalten werden (Chuang und McMahon, 1999). Aus den oben dargelegten Gründen ist es wahrscheinlich, daß Hip nur nicht-membrangebundene Shh-Proteine bindet, die über lange Distanzen wirken. Es ist vorstellbar, daß das sezernierte Hip-Protein viel mehr Shh-Moleküle innerhalb des Gradienten erreichen kann und somit die morphogene, konzentrationsabhängige Aktivität von Shh stärker schwächt als das Wildtyp-Hip. Obwohl Hip Δ TM die Shh-Moleküle nicht an der Zellmembran zurückhalten kann, deuten die Versuchsergebnisse darauf hin, daß Shh nach der Bindung an das sezernierte Hip nicht an seinen Rezeptor Patched bindet und so der Shh-Signalweg blockiert wird.

5.4.2 Die vergrößerten Augen nach Überexpression von *Hip* enthalten ektopische Photorezeptorzellen

Durch *in situ* Hybridisierung in *Xenopus laevis*-Embryonen wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der Überexpression von *Hip* auf die Augenentwicklung untersucht. Dabei wurde auch die Expression von *Rhodopsin* betrachtet, das in Wildtyp-Embryonen des untersuchten Stadiums spezifisch in ausdifferenzierten Photorezeptorzellen der Retina gebildet wird (Saha und Grainger, 1993). Während es nach Überexpression von *Shh* zum Verlust der *Rhodopsin*-Expression kam, konnten nach Überexpression von *Hip* dispers verteilte *Rhodopsin*-positive Photorezeptorzellen im Bereich des Auges nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.12). Um die Stratifikation der Retina näher zu untersuchen, wurde eine histochemische Analyse an transversalen Paraffinschnitten von *Xenopus laevis*-Embryonen durchgeführt. Die Retina wies nach Überexpression von *Hip* starke morphologische Veränderungen auf (vgl. Abb. 4.14). Die Stratifikation war jedoch nicht völlig zerstört, was am Vorhandensein der inneren Plexiformen Schicht und der Photorezeptorschicht ersichtlich wurde. Besonders auffällig waren die durch *Hip* hervorgerufenen unregelmäßigen, nicht stratifizierten Bereiche innerhalb der Retina, in denen WgA-positive Zellen enthalten waren. Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Photorezeptorzellen, die sich deutlich von den Zellen der inneren und äußeren Plexiformen Schicht unterschieden, war es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei diesen Zellen um Photorezeptoren handelte.

Für die Entstehung ektopischer Photorezeptorzellen sind mehrere Gründe denkbar. So könnte einerseits die Proliferation von Photorezeptor-Vorläuferzellen gesteigert sein. Andererseits könnte auch eine vorzeitige Differenzierung der Photorezeptoren eine Rolle spielen. Eine erhöhte Proliferationsrate in der Retina nach Überexpression von *Hip* ist aber unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, daß Shh die Proliferation der retinalen Zellen steigert (Jensen und Wallace, 1997). Die Auswirkung der Überexpression von *Hip* auf die Stratifikation der Retina ist dagegen vergleichbar mit einer Studie, in der ektopische Photorezeptorzellen in *Xenopus laevis* nach der Inhibition des Shh-Signalweges durch Behandlung der Embryonen mit Cyclopamin aufgetreten sind (Perron et al., 2003). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit waren dort die ektopischen Photorezeptorzellen jedoch in einer Schicht entlang des ebenfalls ektopisch entstandenen RPEs angeordnet. Nach der Überexpression von *Hip* schien das RPE aber eher reduziert zu sein (vgl. Abb. 4.11).

Die Blockierung des Fgf-Signalwegs durch Überexpression des dominant-negativen Fgf-Rezeptor-1 (*XFD*) oder durch die transgene Expression eines dominant negativen Fgf-Rezeptor-4a in *Xenopus laevis*-Embryonen führte zum Verlust von Photorezeptorzellen (McFarlane et al., 1998; Zhang et al., 2003). Diese Resultate stimmen mit der nachgewiesenen endogenen Funktion von Fgf-Molekülen bei der Augenentwicklung überein, die in der Förderung der Differenzierung von Photorezeptoren liegt (Hicks und Courtois, 1992; Pittack et al., 1991; vgl. 1.3.2). Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß die Inhibition des Fgf-Signalwegs durch *Hip* an der Entstehung der überzähligen Photorezeptorzellen beteiligt ist.

Im Zusammenhang mit der Rolle des Wnt-Signalwegs bei der Augenentwicklung nachgewiesen werden, daß *Wnt2b* für die Aufrechterhaltung der retinalen Vorläuferzellen innerhalb der ziliären Marginalzone notwendig ist (Kubo et al., 2003; vgl. 1.3.3). Die Überexpression von *Wnt2b* in der frühen Augenanlage von Hühnerembryonen führte zu einer erhöhten Proliferation, während die Inhibition des Wnt-Signalwegs eine verfrühte Differenzierung von retinalen Vorläuferzellen verursachte. Die Inhibition der Wnt-Signalkwirkung nach Überexpression von *Hip* könnte also zu einer vorzeitigen Differenzierung von retinalen Vorläuferzellen und somit zur Ausbildung überzähliger Photorezeptorzellen beigetragen haben.

5.5 Der Effekt der Überexpression von *Hip* auf die Augenentwicklung wird durch die Inhibition sowohl des Shh- als auch des Fgf- und Wnt-Signalwegs veranschaulicht

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß *Hip* ein multifunktionaler Antagonist des Shh-, Fgf- und Wnt-Signalwegs ist. Es sollte deshalb nachgeprüft werden, ob neben Shh auch die Inhibition von Fgf- und Wnt-Signalen an den nach Überexpression von *Hip* entstandenen phänotypischen Veränderungen der Augen in *Xenopus laevis*-Embryonen beteiligt ist. Um den Anteil der einzelnen Signalwege an der Musterbildung innerhalb des Auges nachzuvollziehen, wurden spezifische Inhibitoren der oben genannten Signalmoleküle eingesetzt.

Die Inhibition des Shh-Signalwegs durch Behandlung der Embryonen mit Cyclopamin verursachte eine partielle Fusion der Augen, wohingegen die Überexpression von *PtcΔloop2* eine starke Größenzunahme der Retina verursachte (vgl. Abb. 4.17). Das Steroid-Alkaloid Cyclopamin bindet an Smoothed und verhindert so die Weiterleitung des Hedgehog-Signals (Chen et al., 2002). Die nachgewiesene Fusionstendenz der Augen deutet auf eine starke Reduzierung des Augenstiels hin, die Retinae grenzen direkt an das Zwischenhirn an. Da Cyclopamin nicht injiziert, sondern dem Inkubationsmedium zugegeben wird, ist der Effekt beidseitig. Die Blockierung des Shh-Signalwegs durch Cyclopamin hatte allerdings keine Auswirkungen auf die Größe der Augen. *PtcΔloop2* wirkt dagegen als dominant-negativer Shh-Rezeptor. *PtcΔloop2* inhibiert genau wie das Wildtyp-Patched in Abwesenheit von Shh den Signalvermittler Smoothed, jedoch mit dem Unterschied, daß Shh-Moleküle nicht an *PtcΔloop2* binden können. Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Inhibition von Smoothed auch in Anwesenheit von Shh, wodurch die Shh-Signalkwirkung unterbleibt. In Hühnerembryonen bewirkt die Inhibition des Shh-Signalwegs durch die Überexpression von *PtcΔloop2* den Verlust von ventralen Strukturen in der Neuralröhre (Briscoe et al., 2001). Die Auswirkungen des dominant-negativen Patched auf die Augenentwicklung wurden bisher noch nicht untersucht. Im Unterschied zur Überexpression von *PtcΔloop2* konnte nach Überexpression von *Hip* eine Expression des Retina-spezifischen Markergens *Rx* im Zwischenhirn nachgewiesen werden (vgl. 5.4.1), was darauf hindeutet, daß für diese Aktivierung neben Shh noch andere Signalmoleküle inhibiert werden müssen.

Die Überexpression einer geringen Dosis von *Fgf8* verursachte eine Reduktion der Augenstrukturen, wobei die embryonale Achse nicht beeinträchtigt wurde, wie es nach der Injektion von höheren Dosen der Fall ist (Christen und Slack, 1997; vgl. 1.3.2). Umgekehrt bewirkte die Blockierung des Fgf-Signalwegs durch die Überexpression von *XFD* neben der Verkürzung der posterioren embryonalen Achse eine leichte Vergrößerung der Retina. Dies macht deutlich, daß die Inhibition des Fgf-Signalwegs und die daraus resultierende Anteriorisierung der Embryonen an der Größenzunahme der Retina nach Überexpression von *Hip* einen Anteil haben könnte. Die Verkürzung der posterioren Achse nach Inhibition des Fgf-Signalwegs konnte auch durch die Überexpression des endogenen Fgf-Inhibitors *Sef-1* in Zebrafisch-Embryonen hervorgerufen werden, was die Bedeutung der Kontrolle des Fgf-Signalwegs für die Entwicklung anteriorer Strukturen verdeutlicht (Tsang et al., 2002).

Eine starke Vergrößerung der Retina konnte nach Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Überexpression von *dnWnt8* erzielt werden. *dnWnt8* ist eine verkürzte Form des Wnt8-Moleküls, welche mit dem endogenen Wnt8 um die Bindungsstelle am Rezeptor konkurriert. Da die Bindung von *dnWnt8* nicht zur Aktivierung des Rezeptors führt, wird der Wnt8-Signalweg inhibiert, was sich in *Xenopus laevis*-Embryonen in einer Vergrößerung der Kopfstrukturen auswirkt (Hoppler et al., 1996). Im Gegensatz dazu bewirkt die Überexpression von *Wnt8* nach MBT in *Xenopus laevis*-Embryonen die Reduktion des Kopfes (Christian und Moon, 1993). Eine Vergrößerung der Augen konnte interessanterweise auch nach Überexpression des Wnt8-Inhibitors *Frzb* beobachtet werden. (Pera und De Robertis, 2000). Die Repression von Wnt8-Signalen scheint also ein entscheidender Vorgang bei der Größenregulation während der Augenentwicklung zu sein.

Unterstützt wird dies auch dadurch, daß die ektoptische Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Zebrafisch-Embryonen zur Entstehung der „*masterblind*“-Mutante führt, die durch das Fehlen von Augen gekennzeichnet ist (Van de Water et al., 2001). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die gesteigerte Inhibition des Wnt8-Signalwegs nach Überexpression von *Hip* zu der beschriebenen Vergrößerung der Augen entscheidend beiträgt.

5.6 *Hip* beeinflusst die Anzahl der Vorläuferzellen in der anterioren Neuralplatte durch Änderung des Zellschicksals

Die Augenentwicklung in *Xenopus laevis* beginnt mit der Induktion des frühen Augenfeldes innerhalb der anterioren Neuralplatte (vgl. 1.1.2). Anhand der Expression spezifischer Markergene der Augenanlagen und der anterioren Neuralplatte wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, daß die Auswirkungen, die die Überexpression von *Hip* auf die Augenentwicklung hatte, auf Prozesse innerhalb des frühen Augenfeldes zurückzuführen sind.

Zunächst konnte durch Fluoreszenzmarkierung bestätigt werden, daß die Derivate der Zellen innerhalb des frühen Augenfeldes in der anterioren Neuralplatte tatsächlich später im Auge wiedergefunden werden (vgl. Abb. 4.18). Die ursprünglich in der Mitte der anterioren Neuralplatte markierten Zellen waren im Schwanzspitzenstadium in der Retina lokalisiert. Dies bestätigt auch das oben angebotene Modell der frühen Augenentwicklung in *Xenopus laevis* (vgl. 5.4.1). Allerdings war der Fluoreszenzfarbstoff nur in einem Auge zu erkennen, was wahrscheinlich daran liegt, daß die Markierung im Bereich der retinalen Vorläuferzellen nicht ganz zentral platziert worden war.

Durch *in situ* Hybridisierung in *Xenopus laevis*-Embryonen des frühen Neurulastadiums konnte festgestellt werden, daß die Überexpression von *Hip* zu einer starken Expansion der Expressionsdomänen von *Rx* und *Pitx1* führte, Markergene der Retina- bzw. Linsen-Vorläuferzellen (vgl. Abb. 4.19). Außerhalb der vergrößerten Expressionsdomänen wurden aber keine *Rx*- oder *Pitx1*-positiven Zellen nachgewiesen. Die anteriore Neuralplatte war nach Überexpression von *Hip* ebenfalls stark vergrößert, was anhand der Expression von *Pax6*, *Six3* und *Otx2* nachgewiesen werden konnte. Dies verdeutlicht, daß die Erweiterung des frühen Augenfeldes durch *Hip* von der räumlichen Beziehung zur neuralen, anterioren Umgebung abhängig ist. Wie in dem vorangegangenen Überexpressions-Experiment wurden auch hier durch *Shh* gegensätzliche Effekte hervorgerufen, was an der Reduktion der Expression von *Rx* und *Pitx1* in den präsumptiven Retina- und Linsenzellen ersichtlich war. Die Expression der Markergene innerhalb der anterioren Neuralplatte, *Otx2* und *Six3*, war allerdings nach Überexpression von *Shh* nur wenig beeinflusst. Dies macht deutlich, daß *Shh* Auswirkungen auf die Spezifikation des frühen Augenfeldes hat, nicht aber auf die Entstehung des Kompetenzbereiches in der anterioren Neuralplatte.

Die Auswirkung der Überexpression von *Hip* oder *Shh* auf die Anzahl der Zellen im frühen Augenfeld erklärt die beobachteten Veränderungen innerhalb der Augen in älteren Embryonalstadien. Die Vergrößerung der Retina und der Linse nach Überexpression von *Hip* wird durch die erhöhte Anzahl präsumptiver Retina- und Linsenzellen reflektiert. Im Gegenzug wird der Verlust von Retina und Linse nach Überexpression von *Shh* durch die

Reduktion der entsprechenden Vorläuferzellen verursacht. Die Überexpression von *Shh* führt zu einer verstärkten Ventralisierung der Neuralplatte, was in Embryonen des Schwanzspitzenstadium zur Expansion der Expressionsdomänen von *Vax1* im Augienstiel und von *Nkx-2.1* in der Bodenplatte des Neuralrohrs führte (vgl. 5.4.1). In den frühen Neurulastadien konnte dies allerdings nicht direkt nachgewiesen werden, weil die entsprechenden Markergene so früh noch nicht exprimiert werden (Hallonet et al., 1998; Hollemann und Pieler, 2000).

Der frühe Verlust von anterior-neuralen Markergenen wie *Pax6* nach Überexpression von *Shh* konnte auch in Zebrafisch-Embryonen nachgewiesen werden (Macdonald et al, 1995). In Hühnerembryonen wurde außerdem festgestellt, daß die Expression von *Pax6* im Neuralrohr nicht nur durch *Shh*, sondern auch durch *Fgf8* reprimiert wird. Die Blockierung des *Fgf*-Signalwegs durch Behandlung der Embryonen mit einem synthetischen Inhibitor des *Fgf*-Rezeptor-1 verursachte darüberhinaus eine verstärkte und zu frühe Aktivierung der *Pax6*-Expression. Dies führte zur Annahme, daß der anterior-neurale Bereich (gekennzeichnet durch *Pax6*-Transkripte) schon vor der Festlegung der dorso-ventralen Achse durch die Regulation über posteriore *Fgf*-Signale spezifiziert wird (Bertrand et al., 2000). Die frühe Expansion der Expressionsdomäne von *Pax6* nach Überexpression von *Hip* kann also durch die Inhibition des *Fgf*-Signalwegs entstanden sein. Zudem gibt es Hinweise auf eine Kooperation zwischen *Fgf*- und *Wnt*-Signalweg bei der Musterbildung innerhalb der Neuralplatte. In Zebrafisch-Embryonen wurde nachgewiesen, daß die Expressionsdomäne von *Otx2* in der anterioren Neuralplatte nach Überexpression des *Wnt*-Inhibitors *Dickkopf-1* expandiert war. Diese Induktion wurde allerdings durch Ko-Injektion von *Fgf3*-mRNA verhindert, was darauf schließen läßt, daß die Abwesenheit von *Fgf*-Signalen eine Voraussetzung für die Induktion der anterioren Neuralplatte durch Inhibition des *Wnt*-Signalwegs ist (Kudoh et al., 2002). Diese Voraussetzungen sind durch die gleichzeitige Inhibition des *Fgf*- und *Wnt*-Signalwegs durch *Hip* gegeben. Die Expansion des antero-dorsalen Bereiches der Neuralplatte könnte durch die Blockierung des *Fgf*- und *Wnt*-Signalwegs induziert worden und durch die simultane Inhibition des ventralisierenden *Shh*-Signals aufrecht erhalten worden sein.

Das neurale Ektoderm wird durch die Neuralfalten vom nicht-neuralen Ektoderm, der späteren Epidermis, abgegrenzt. Diese Abgrenzung ist abhängig von BMP-Signalen und kann durch Erhöhung oder Erniedrigung der BMP-Konzentration experimentell verschoben werden (Marchant et al., 1998; vgl. 1.2.2). Es war deshalb sehr wahrscheinlich, daß die Expansion der anterioren Neuralplatte nach Überexpression von *Hip* mit einer Reduktion des nicht-neuralen Ektoderms einherging, was tatsächlich durch die Repression der Expression von *Dlx3* nachgewiesen werden konnte. Die Reduktion der neuralen Markergene durch *Shh* war dagegen von einer verstärkten *Dlx3*-Expression begleitet.

Durch die beschriebenen Beobachtungen wurde die Frage aufgeworfen, ob die durch *Hip* induzierten zusätzlichen Retina- und Linsenvorläuferzellen aus neuralen und/oder nicht-neuralen ektodermalen Zellen rekrutiert wurden. Dies würde bedeuten, daß die Inhibition des *Shh*-, *Fgf*- und *Wnt*-Signalwegs durch *Hip* in den frühen Embryonalstadien eine Änderung des Zellschicksals bewirken kann.

Eine weitere Möglichkeit, die Expansion des frühen Augenfeldes zu erklären, ist eine verstärkte Proliferation von präsumptiven Retina- und Linsenzellen. Zusätzlich könnte eine verminderte Apoptoserate zu der Vergrößerung der distalen Augenstrukturen nach Überexpression von *Hip* beitragen. Durch Überprüfung der Apoptose- und Proliferationsrate in *Xenopus laevis*-Embryonen in dieser Arbeit konnten beide Möglichkeiten ausgeschlossen werden.

Verglichen mit unbehandelten Kontrollembryonen wurde nach Überexpression von *Hip* eine vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt (vgl. Abb. 4.20). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von *Shh* zu einer Verminderung der Apoptoserate. Weder nach Überexpression von *Hip* noch von *Shh* konnte in *Xenopus laevis*-Embryonen des frühen Neuralstadiums eine Veränderung der Proliferationsrate festgestellt werden (vgl. Abb. 4.21). Ältere Embryonen wiesen dagegen nach Überexpression von *Hip* eine verminderte Anzahl mitotischer Zellen auf, während durch *Shh* auch hier keine Veränderung hervorgerufen wurde.

Aus zahlreichen Arbeiten ist bekannt, daß Hedgehog-Moleküle stimulierend auf die Proliferation von Zellen während der Embryonalentwicklung wirken, wie zum Beispiel in Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems, Chondrozyten oder Muskelzellen (Duprez et al., 1998; Rowitch et al., 1999; St-Jacques et al., 1999; Wechsler-Reya und Scott, 1999). Die Überexpression von *Shh* in *Xenopus laevis*-Embryonen in der vorliegenden Arbeit bewirkte allerdings keinen Anstieg der Proliferationsrate, was vermuten läßt, daß dieser Prozess eine Kompetenz der Zellen voraussetzt, sich durch das Shh-Signal zur Zellteilung anregen zu lassen. Die Verminderung der Proliferationsrate durch *Hip* kann dagegen damit erklärt werden, daß die Zellen, in denen Shh normalerweise die Mitose induziert, kein Shh-Signal erhalten.

In neueren Untersuchungen wurde festgestellt, daß der Shh-Signalweg auch bei der Regulation des Zelltods eine wichtige Rolle spielt. Die Überexpression des Shh-Rezeptors *Patched* in kultivierten Zellen induzierte Apoptose, die durch die Applikation von Shh unterdrückt werden konnte. Es wurde festgestellt, daß *Patched* ein sogenannter proapoptotischer Rezeptor ist, der in der Abwesenheit des Shh-Liganden durch Kaspasen innerhalb der intrazellulären Domäne gespalten wird und somit das apoptotische Programm in den Zellen aktiviert (Thilbert et al., 2003). Die Überexpression von *Hip* verdeutlicht diesen Prozess. Die Verminderung aktiver Hedgehog-Moleküle, die durch Bindung an *Hip* hervorgerufen wird, erhöht die Anzahl der freien, nicht Shh-gebundenen *Patched*-Moleküle. Dadurch wird eine erhöhte Apoptoserate in den betroffenen *Xenopus laevis*-Embryonen hervorgerufen. Die Überexpression von Shh unterdrückt dagegen die pro-apoptotische Wirkung von *Patched*.

Eine proliferationsstimulierende Wirkung ist auch von Vertretern der Fgf- und Wnt-Familie bekannt (Überblick in Burgess und Maciag, 1989; Giles et al., 2003; Miller, 2002; Ornitz und Itoh, 2001; vgl. 1.3.2, 1.3.3). Umgekehrt ist auch eine Steigerung der Apoptoserate verschiedener Zellen nach Blockierung des Fgf- oder Wnt-Signalwegs nachgewiesen worden (Grotewold und Ruther, 2002; Monga et al., 2003; Upadhyay et al., 2003; Valesky et al., 2002). Die verminderte Proliferations- und gesteigerte Apoptoserate nach Überexpression von *Hip* kann also zusätzlich in der Inhibition des Fgf- und/oder Wnt-Signalwegs begründet sein.

Die oben beschriebenen Resultate zeigten, daß die Expansion des frühen Augenfeldes nach Überexpression von *Hip* nicht mit gesteigerter Zellproliferation oder vermindertem Zelltod zusammenhing. Um zu untersuchen, ob die Vermehrung der retinalen Vorläuferzellen in der anterioren Neuralplatte von *Xenopus laevis*-Embryonen durch *Hip* auch nach Blockierung der mitotischen Aktivität möglich ist, wurden Embryonen nach Überexpression von *Hip* oder *Shh* mit den Mitoseinhibitoren Hydroxyurea und Aphidicolin behandelt. Retinale Vorläuferzellen innerhalb des frühen Augenfeldes wurden anschließend anhand der Expression von *Rx* nachgewiesen (vgl. Abb. 4.22). Es stellte sich heraus, daß die Expansion des Augenfeldes nach Überexpression von *Hip* trotz Blockierung der mitotischen Aktivität erfolgte, was bedeutet, daß die durch *Hip* hervorgerufene Erhöhung der Anzahl präsumptiver Retina- und Linsenzellen innerhalb der anterioren Neuralplatte nicht durch eine erhöhte Proliferationsrate zu erklären ist.

Die Überexpression von *Hip* unterscheidet sich damit von anderen Studien, bei denen die Größenregulation der Augen untersucht wurde. So wurde die Vergrößerung der Retina nach Überexpression von *Six6/Optx2* in *Xenopus laevis*- oder Reiskärpfling-Embryonen durch eine Kombination von erhöhter Proliferation der retinalen Vorläuferzellen und Transdeterminierung kompetenter Zellen des Vorder- und Mittelhirns verursacht. Eine Größenänderung der anterioren Neuralplatte in früheren Stadien wurde dabei nicht beobachtet (Bernier et al., 2000; Loosli et al., 1999; Zuber et al., 1999).

Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß *Hip* durch die Inhibition des Shh-, Fgf- und Wnt-Signalwegs einen Einfluß auf das Zellschicksal hat. Vorstellbar ist, daß nach Überexpression von *Hip* sowohl neurale, posteriore Zellen als auch nicht-neurale Zellen des umliegenden Ektoderms zu Retina- und Linsenvorläuferzellen transformiert werden.

5.7 Modell der Spezifikation des frühen Augenfeldes durch die Einwirkung von Shh-, Fgf- und Wnt-Signalen

Die Überexpression von *Hip* führte zu einer Änderung der proximo-distalen Gliederung der Augen in *Xenopus laevis*-Embryonen. Dabei wurden die distalen, dorsalen Anteile des Auges, Retina und Linse, gegenüber dem proximalen, ventralen Augenstiel vergrößert. Diese Auswirkungen ließen sich auf eine Expansion der präsumptiven Retina- und Linsenzellen in der anterioren Neuralplatte zurückführen, die durch eine Transdeterminierung von Zellen außerhalb des Augenfeldes zu Retina- bzw. Linsenzellen entstand.

Die durch *Hip* inhibierten Shh-, Fgf- und Wnt-Signale spielen bei den Musterbildungsprozessen innerhalb der Neuralplatte und somit auch des frühen Augenfeldes eine große Rolle. Die Auswirkungen der Überexpression von *Hip* lassen somit Rückschlüsse auf die Integration dieser Signalwege während der Abgrenzung des Augenfeldes in der anterioren Neuralplatte zu.

Durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wird ein gemeinsames Primordium von Vorläuferzellen der Retina, der Linse und des Augenstiels innerhalb der anterioren Neuralplatte verdeutlicht. Diese Vorläuferzellen sind dadurch definiert, daß sie

Abb. 5.3: Modell der Regionalisierung des frühen Augenfeldes in *Xenopus laevis*-Embryonen durch Shh-, Fgf- und Wnt-Signale. **A, a**, Spezifikation des Ektoderms durch einen BMP-Gradienten im frühen Gastrulastadium. Die Neuralfalte wird im Bereich einer intermediären BMP-Konzentration induziert und grenzt das neurale Ektoderm (dorsal, niedrige BMP-Konzentration) von der Epidermis (ventral, hohe BMP-Konzentration) ab. **b**, Aktivität der Fgf- und Wnt-Signale aus dem ventro-lateralen Mesoderm im mittleren Gastrulastadium. Im Bereich hoher Fgf- und Wnt-Konzentration werden die lateralen Neuralfalten spezifiziert und so von der anterioren Neuralfalte abgegrenzt. Pfeil: Ausbreitungsrichtung der Neuralplatte; An: anterior; D: dorsal; V: ventral; Vg: vegetal. Nach Villanueva et al., 2002. **B**, Musterbildung innerhalb der anterioren Neuralplatte. Das frühe Augenfeld wird in dem Bereich induziert, der frei von Fgf- und Wnt-Signalen ist. Shh-Moleküle aus der prächordalen Platte induzieren die Ventralisierung des Ektoderms und Entstehung von ventralen Gehirnstrukturen und Augenstiel. In Abwesenheit von Shh-Signalen in den lateral/distalen Bereichen des Augenfeldes werden Retina und Linse induziert.

zunächst die Kompetenz zur Bildung der oben genannten Zelltypen besitzen, aber erst im während das nicht-neurale Ektoderm, die Epidermis, durch relativ hohe BMP- Laufe der Entwicklung durch die Einwirkung von Signalmolekülen spezifiziert und schließlich determiniert werden (Bernier et al., 2000; Grainger et al., 1992; Saha et al., 1989; Zygar et al., 1998). Der Umfang des Primordiums hängt zunächst von der Größe der Neuralplatte ab, die durch BMP-Signale aus dem ventralen Mesoderm limitiert wird (Abb. 5.3, A). Dabei wird in Abwesenheit von BMP-Signalen die Neuralplatte induziert, Konzentrationen spezifiziert wird. Zwischen Neuralplatte und Epidermis entstehen die Neuralfalten (Marchant et al., 1998; vgl. 1.2.2). Im Verlauf der Gastrulation wird anschließend durch Fgf- und Wnt-Moleküle aus dem ventro-lateralen Mesoderm die antero-posteriore Achse festgelegt. Durch die Aktivität des Fgf- und Wnt-Signalwegs werden dabei die lateralen Neuralfalten spezifiziert (Bang et al., 1999; Villanueva et al., 2002). Die Abwesenheit von Fgf- und Wnt-Signalen in der anterioren Neuralplatte erlaubt schließlich die Ausbildung des frühen Augenfeldes. Dieses Modell wird durch Studien unterstützt, in denen gezeigt wurde, daß der Wnt-Inhibitor *Frzb* in *Xenopus laevis* durch *Lim1*, einem Gen, das an der Induktion der anterioren Neuralplatte beteiligt ist, induziert wird (Leyns et al., 1997; vgl. 1.2.2).

In der vorliegenden Arbeit und anderen Studien konnte gezeigt werden, daß Shh für die Entstehung der ventralen Anteile der Augen und des Gehirns verantwortlich ist (Hallonet et al., 1999; Perron et al., 2003). Das Schicksal der Zellen wird durch die ventralisierende Wirkung der Shh-Signale aus dem axialen Mesoderm bestimmt (vgl. 5.4.1). Es kann ein Modell entwickelt werden, in dem ein Konzentrationsgradient von sezernierten Shh-Molekülen in der anterioren Neuralplatte vorherrscht (Abb. 5.3, B). Im Bereich höchster Shh-Konzentration bilden sich ventrales Gehirn und Augenstiel, während zur Entstehung von Retina und Linse keine Shh-Signale nötig sind. Diese durch Shh vermittelte Musterbildung ist mit der dorso-ventralen Regionalisierung des Gehirns vergleichbar (Briscoe et al., 2000; Chiang et al., 1996; Echelard et al., 1993; Pringle et al., 1996; Roelink et al., 1994; vgl. 1.4.1).

Die simultane Inhibition des Shh-, Fgf- und Wnt-Signalwegs nach Überexpression von *Hip* bewirkt die Abgrenzung der Neuralplatte von den posteriorisierenden Fgf- und Wnt-Signalen und dem ventralisierenden Shh-Signal. Dadurch werden die neuralen Vorläuferzellen in ein dorso-anteriores Schicksal rekrutiert, was schließlich zur Vergrößerung der dorso-distalen Teile des Auges führt.

5.8 Funktion von Hip in *Xenopus laevis*: Verteidiger des Zellschicksals gegen den Einfluß von Shh, Fgf und Wnt

Die simultane Inhibition des Shh-, Fgf- und Wnt-Signalwegs nach Überexpression von *Hip* hatte starke Auswirkungen auf die Augenentwicklung. *Xhip* selbst wird aber nicht im frühen Augenfeld von *Xenopus laevis*-Embryonen exprimiert, was eine Funktion des endogenen *Hip* während der Augenentwicklung somit eher unwahrscheinlich macht. Die Deletion des *Hip*-Gens in Mäusen führte zu einer Fehlentwicklung der Lunge und des endochondrialen Skeletts, bewirkte aber darüberhinaus keine Störung in anderen

Expressionsdomänen wie zum Beispiel dem Neuralrohr (Chuang et al., 2003). Dies wirft die Frage nach der eigentlichen Funktion von *Hip* während der Embryonalentwicklung auf. Wie die komplementäre Expression von *Xhip* und *Shh*, *Fgf* oder *Wnt8* vermuten läßt, könnte *Hip* dazu dienen, räumliche Grenzen für die Aktivität dieser Signalmoleküle zu setzen. *Shh*, *Fgf* und *Wnt* wirken als Morphogene über einen Konzentrationsgradienten und vermitteln so Positionsinformation. Die Bindung dieser Moleküle an den Rezeptor und die nachfolgende Aktivierung des Signalwegs entscheidet somit über das Entwicklungsschicksal der betroffenen Zelle. Es ist daher wichtig, daß diese Prozesse einer strengen Kontrolle unterliegen. Demnach könnte *Hip* auch dazu dienen, Zellen vor fehlgeleiteten *Shh*-, *Fgf*- oder *Wnt*-Signalen zu schützen. Auch für andere Inhibitoren von Signalmolekülen, zum Beispiel Chordin, Noggin, Cyp26 oder ein Cerberus-ähnliches Molekül, wird eine solche Funktion diskutiert. Dies würde auch erklären, warum die Deletion der genannten Gene in Mäusen keine Auswirkungen auf die primären Expressionsdomänen hatte, sondern nur außerhalb dieser Bereiche Veränderungen hervorrief (Abu-Abed et al., 2001; Bachiller et al., 2000; Belo et al., 2000; McMahon et al., 1998; Sakai et al., 2001).

5.9 Ausblick

Durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse konnten einige Aspekte der Größenregulation der frühen Augenanlage veranschaulicht werden, die für die Entstehung der späteren Augen von *Xenopus laevis* relevant sind. Gleichzeitig wurden aber auch Fragen aufgeworfen, für deren Beantwortung es für die Zukunft einige vorstellbare Ansatzpunkte gibt.

Die Inhibition des *Wnt8*-Signalwegs durch *Hip* und die strukturelle Ähnlichkeit mit *Wnt*-bindenden Proteinen wie *Wif-1* und *LRP5/6* (vgl. 5.1) machen eine direkte Interaktion zwischen *Hip* und *Wnt8* sehr wahrscheinlich. Eine solche Interaktion könnte durch Ko-Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Indem zusätzlich die Bindung von *Hip* an *Wnt3a* ausgeschlossen würde, könnte auch die Spezifität von *Hip* bezüglich der unterschiedlichen *Wnt*-Moleküle bestätigt werden. Durch eine Ko-Immunopräzipitation könnte zudem untersucht werden, ob *Hip*, wie oben diskutiert (vgl. 5.3.1), mit dem *Fgf*-Rezeptor interagiert.

Es wäre außerdem interessant nachzuprüfen, ob verschiedene Anteile des *Hip*-Proteins für die Inhibition der unterschiedlichen Signalwege verantwortlich sind (vgl. 5.1). Dazu könnten die entsprechenden Abschnitte in der *mHip*-cDNA deletiert und die resultierenden mRNAs in *Xenopus laevis*-Embryonen überexprimiert werden. Es ist vorstellbar, daß die Deletion eines bestimmten Abschnitts zum Verlust der Inhibition eines oder mehrerer der Signalwege führt. Durch die Deletion des „six 4-stranded beta-sheet motif“, welches mit der Bindung von *Shh*- bzw. *Wnt*-Molekülen in Verbindung gebracht wurde, könnte überprüft werden, ob diese Domäne für die Blockierung des *Shh*- oder *Wnt*-Signalwegs durch *Hip* verantwortlich ist. Auch die Entfernung der EGF-ähnlichen Domänen wäre interessant, da dadurch nachgewiesen werden könnte, ob sie eine funktionelle Bedeutung haben.

Durch die Überexpression von *Hip* wurde die Expression verschiedener Gene aktiviert, wie zum Beispiel *Rx* oder *Otx2*, während andererseits die durch *Shh*, *Fgf* oder *Wnt* vermittelte Aktivierung von Genen wie *Patched*, *Xbra* oder *Siamois* durch *Hip* unterdrückt wurde. Ein Ziel weiterer Experimente könnte der Nachweis sein, ob diese Aktivitäten darauf beruhen, daß nach Überexpression von *Hip* neue Proteine synthetisiert werden, die schließlich die oben genannten Auswirkungen hervorrufen, oder ob *Hip* über einen direkten Mechanismus agiert, der keine Proteinneusynthese voraussetzt. Dazu könnten Embryonen oder Gewebeexplantate nach Überexpression von *Hip* oder Ko-Injektion von *Hip*-mRNA und mRNAs von *Shh*, *Fgf* oder *Wnt* mit Cycloheximid behandelt werden, einem Inhibitor der Proteinsynthese. Anschließend könnte durch *in situ* Hybridisierung oder RT-PCR überprüft werden, ob diese Behandlung Einfluß auf die durch Überexpression von *Hip* bewirkten Auswirkungen auf die Expression oben genannter Gene hat.

Abschließend wäre eine Untersuchung der eigentlichen Funktion von *Hip* während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* sinnvoll. Dies könnte durch die spezifische Inhibition der endogenen *Xhip*-Transkripte durch sogenannte Morpholino-Oligonukleotide erreicht werden, die sich nach Injektion *in vivo* an komplementäre mRNAs stabil anlagern und so die Proteintranslation verhindern (Heasman et al., 2000). Durch die Analyse der dadurch erzielten Auswirkungen könnte nachgewiesen werden, in welchen embryonalen Strukturen und zu welchem Zeitpunkt *Hip* in *Xenopus laevis* benötigt wird.

6. Zusammenfassung

Die morphogene Aktivität von Hedgehog-Molekülen ist aus dem embryonalen Neuralrohr bekannt, wo ein Sonic Hedgehog(Shh)-Gradient an der dorso-ventralen Musterbildung beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen am Modell *Xenopus laevis* die Funktion der aus dem axialen Mesoderm sezernierten Hedgehog-Moleküle bei der Entwicklung des Auges untersucht, welches als ein Teil des anterioren ZNS anzusehen ist. Zur Modulation der Hedgehog-Aktivität wurde das Hedgehog-interagierende Protein (Hip) benutzt, das in Mäusen zuvor als Hedgehog-Antagonist charakterisiert worden war.

Zunächst wurde das Hip-Homolog aus *Xenopus laevis* isoliert und als ein potentiell glykosyliertes, sezerniertes Membranprotein des Typ I charakterisiert. Das Vorhandensein von EGF-ähnlichen Domänen und eines „six 4-stranded beta-sheet motif“ machte Xhip mit den Shh- bzw. Wnt-bindenden Proteinen Megalin, LRP5/6 und Wif-1 vergleichbar. Xhip wurde in *Xenopus laevis*-Embryonen ab dem frühen Neurulastadium im neuralen Ektoderm und im Mesoderm exprimiert. Eine Induktion von Xhip durch Shh und Wnt8 konnte im ganzen Embryo und in neuralisierten animalen Gewebeexplantaten nachgewiesen werden.

Die Überexpression von Hip in *Xenopus laevis*-Embryonen verursachte eine enorme Größenzunahme des Auges. Die Ursache hierfür war die Vergrößerung der dorsal/distalen Anteile des Auges, Retina und Linse, auf Kosten des ventral/proximalen Augenstiels. Zusätzlich waren in der expandierten Retina ektopische Photorezeptorzellen entstanden.

In animalen Gewebeexplantaten konnte gezeigt werden, daß Hip die durch Shh und eFgf vermittelte Aktivierung der Genexpression inhibierte. Andere Signalmoleküle wie Aktivin, BMP4 oder Retinsäure wurden durch Hip nicht beeinflusst. Durch genauere Untersuchungen der *Xbra*-Expression und der MAPK-Phosphorylierung in ganzen Embryonen wurde nachgewiesen, daß Hip unabhängig von Shh den durch Fgf-induzierten MAPK-Signalweg negativ reguliert. Durch Betrachtung der durch Überexpression von *Wnt*-mRNAs verursachten Ausbildung einer zweiten Körperachse und der Induktion von *Siamois* und *Xnr3* konnte außerdem gezeigt werden, daß Hip neben dem Shh- und dem Fgf- auch den Wnt8-Signalweg inhibiert.

Die alleinige Blockierung des Shh-, Fgf- oder Wnt-Signalwegs durch entsprechend spezifische Inhibitoren bewirkte Störungen der Augenentwicklung, die den durch Überexpression von Hip hervorgerufenen Effekten teilweise entsprachen. Die Größenzunahme der Retina ließ sich auf eine Vergrößerung des frühen Augenfeldes durch die Inhibition des ventralisierenden Shh-Signals und der posteriorisierenden Fgf- und Wnt-Signale nach Überexpression von Hip zurückführen. Die ektopischen Retina- und Linsen-Vorläuferzellen entstanden durch Rekrutierung von neuralen und/oder nicht-neuralen ektodermalen Zellen ohne Einfluß auf Proliferation oder Apoptose.

Die komplementäre Expression von *Shh*, *Fgf*, *Wnt* und *Hip* in *Xenopus laevis*-Embryonen macht wahrscheinlich, daß Hip während der Embryonalentwicklung dazu dient, lokale Grenzen für den Einfluß von Shh-, Fgf- oder Wnt-Signalen auf bestimmte Zellen zu bilden.

- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P., und Petkovich, M. (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15, 226-240.
- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantsaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., und Brulet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279-3290.
- Adachi, M., Fukuda, M., und Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J* 18, 5347-5358.
- Agius, E., Oelgeschlager, M., Wessely, O., Kemp, C., und De Robertis, E. M. (2000). Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 127, 1173-1183.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., und Hooper, J. E. (1996). The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86, 221-232.
- Altmann, C. R., Chow, R. L., Lang, R. A., und Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Lens induction by Pax-6 in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 185, 119-123.
- Amaya, E., Musci, T. J., und Kirschner, M. W. (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66, 257-270.
- Amaya, E., Stein, P. A., Musci, T. J., und Kirschner, M. W. (1993). FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* 118, 477-487.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E., und Barsacchi, G. (1999). Role of *Xrx1* in *Xenopus* eye and anterior brain development. *Development* 126, 2451-2460.
- Aplin, A. E., Stewart, S. A., Assoian, R. K., und Juliano, R. L. (2001). Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 153, 273-282.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., und Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* 14, 2701-2711.
- Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C., und Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J. A., Anderson, R. M., May, S. R., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., Rossant, J., und De Robertis, E. M. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 403, 658-661.
- Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D., und Joyner, A. L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129, 4753-4761.
- Baker, J. C., Beddington, R. S., und Harland, R. M. (1999). Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev* 13, 3149-3159.
- Bang, A. G., Papalopulu, N., Goulding, M. D., und Kintner, C. (1999). Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm. *Dev Biol* 212, 366-380.

- Bang, A. G., Papalopulu, N., Kintner, C., und Goulding, M. D. (1997). Expression of Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by the organizer and by posterior non-axial mesoderm. *Development* 124, 2075-2085.
- Barth, K. A., und Wilson, S. W. (1995). Expression of zebrafish *nk2.2* is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. *Development* 121, 1755-1768.
- Beato, M., Herrlich, P., und Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- Bell, E., Munoz-Sanjuan, I., Altmann, C. R., Vonica, A., und Brivanlou, A. H. (2003). Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGFbeta and Wnt inhibitor. *Development* 130, 1381-1389.
- Belo, J. A., Bachiller, D., Agius, E., Kemp, C., Borges, A. C., Marques, S., Piccolo, S., und De Robertis, E. M. (2000). Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genesis* 26, 265-270.
- Bernier, G., Panitz, F., Zhou, X., Hollemann, T., Gruss, P., und Pieler, T. (2000). Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 93, 59-69.
- Bertrand, N., Medevielle, F., und Pituello, F. (2000). FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development* 127, 4837-4843.
- Bitgood, M. J., Shen, L., und McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6, 298-304.
- Blitz, I. L., und Cho, K. W. (1995). Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene *orthodenticle*. *Development* 121, 993-1004.
- Bonifas, J. M., Pennypacker, S., Chuang, P. T., McMahon, A. P., Williams, M., Rosenthal, A., De Sauvage, F. J., und Epstein, E. H., Jr. (2001). Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 116, 739-742.
- Borycki, A., Brown, A. M., und Emerson, C. P., Jr. (2000). Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development* 127, 2075-2087.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I., und Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-118.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., und De Robertis, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.
- Brewster, R., Lee, J., und Ruiz i Altaba, A. (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* 393, 579-583.
- Brewster, R., Mullor, J. L., und Ruiz i Altaba, A. (2000). Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development* 127, 4395-4405.

- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M., und Struhl, G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279-1291.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., und Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-445.
- Brown, D. D., Wang, Z., Furlow, J. D., Kanamori, A., Schwartzman, R. A., Remo, B. F., und Pinder, A. (1996). The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1924-1929.
- Brown, S. D., Twells, R. C., Hey, P. J., Cox, R. D., Levy, E. R., Soderman, A. R., Metzker, M. L., Caskey, C. T., Todd, J. A., und Hess, J. F. (1998). Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 879-888.
- Bumcrot, D. A., Takada, R., und McMahon, A. P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol* 15, 2294-2303.
- Burgess, W. H., und Maciag, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58, 575-606.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. A., Dickson, B. J., und Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803-815.
- Cai, H., Szeberenyi, J., und Cooper, G. M. (1990). Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 10, 5314-5323.
- Carnac, G., Kodjabachian, L., Gurdon, J. B., und Lemaire, P. (1996). The homeobox gene *Siamois* is a target of the Wnt dorsalisation pathway and triggers organiser activity in the absence of mesoderm. *Development* 122, 3055-3065.
- Chambers, D., und Mason, I. (2000). Expression of *sprouty2* during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mech Dev* 91, 361-364.
- Chang, D. T., Lopez, A., von Kessler, D. P., Chiang, C., Simandl, B. K., Zhao, R., Seldin, M. F., Fallon, J. F., und Beachy, P. A. (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* 120, 3339-3353.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., und Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 16, 2743-2748.
- Chen, Y., Pollet, N., Niehrs, C., und Pieler, T. (2001). Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 101, 91-103.
- Chen, Y., und Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-563.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., und Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A., und Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.

Christen, B., und Slack, J. M. (1997). FGF-8 is associated with anteroposterior patterning and limb regeneration in *Xenopus*. *Dev Biol* 192, 455-466.

Christen, B., und Slack, J. M. (1998). All limbs are not the same. *Nature* 395, 230-231.

Christen, B., und Slack, J. M. (1999). Spatial response to fibroblast growth factor signalling in *Xenopus* embryos. *Development* 126, 119-125.

Christian, J. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P., und Moon, R. T. (1991). *Xwnt-8*, a *Xenopus* Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* 111, 1045-1055.

Christian, J. L., und Moon, R. T. (1993). Interactions between *Xwnt-8* and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev* 7, 13-28.

Christian, J. L., Olson, D. J., und Moon, R. T. (1992). *Xwnt-8* modifies the character of mesoderm induced by bFGF in isolated *Xenopus* ectoderm. *Embo J* 11, 33-41.

Christiansen, J. H., Dennis, C. L., Wicking, C. A., Monkley, S. J., Wilkinson, D. G., und Wainwright, B. J. (1995). Murine Wnt-11 and Wnt-12 have temporally and spatially restricted expression patterns during embryonic development. *Mech Dev* 51, 341-350.

Chuang, P. T., Kawcak, T., und McMahon, A. P. (2003). Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* 17, 342-347.

Chuang, P. T., und Kornberg, T. B. (2000). On the range of hedgehog signaling. *Curr Opin Genet Dev* 10, 515-522.

Chuang, P. T., und McMahon, A. P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.

Chuang, P. T., und McMahon, A. P. (2003). Branching morphogenesis of the lung: new molecular insights into an old problem. *Trends Cell Biol* 13, 86-91.

Consigli, S. A., Lyser, K. M., und Joseph-Silverstein, J. (1993). The temporal and spatial expression of basic fibroblast growth factor during ocular development in the chicken. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 559-566.

Cornell, R. A., und Kimelman, D. (1994). Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* 120, 453-462.

Curran, K. L., und Grainger, R. M. (2000). Expression of activated MAP kinase in *Xenopus laevis* embryos: evaluating the roles of FGF and other signaling pathways in early induction and patterning. *Dev Biol* 228, 41-56.

Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., und Ruiz i Altaba, A. (2001). The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128, 5201-5212.

Dale, L., Howes, G., Price, B. M., und Smith, J. C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 115, 573-585.

Deardorff, M. A., und Klein, P. S. (1999). *Xenopus* frizzled-2 is expressed highly in the developing eye, otic vesicle and somites. *Mech Dev* 87, 229-233.

- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., und Cohen, S. M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-531.
- Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A., Vincent, L. A., Roberts, T. M., und Sturgill, T. W. (1992). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 257, 1404-1407.
- Domingos, P. M., Itasaki, N., Jones, C. M., Mercurio, S., Sargent, M. G., Smith, J. C., und Krumlauf, R. (2001). The Wnt/beta-catenin pathway posteriorizes neural tissue in *Xenopus* by an indirect mechanism requiring FGF signalling. *Dev Biol* 239, 148-160.
- Dominguez, I., und Green, J. B. (2000). Dorsal downregulation of GSK3beta by a non-Wnt-like mechanism is an early molecular consequence of cortical rotation in early *Xenopus* embryos. *Development* 127, 861-868.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., und Johnson, M. S. (1984). Computer-based characterization of epidermal growth factor precursor. *Nature* 307, 558-560.
- Drager, U. C., Wagner, E., und McCaffery, P. (1998). Aldehyde dehydrogenases in the generation of retinoic acid in the developing vertebrate: a central role of the eye. *J Nutr* 128, 463S-466S.
- Duprez, D., Fournier-Thibault, C., und Le Douarin, N. (1998). Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development* 125, 495-505.
- Durston, A. J., Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H. F., de Vries, N. J., Heideveld, M., und Nieuwkoop, P. D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340, 140-144.
- Eagleson, G. W., und Dempewolf, R. D. (2002). The role of the anterior neural ridge and Fgf-8 in early forebrain patterning and regionalization in *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132, 179-189.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., und McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Ekker, S. C., McGrew, L. L., Lai, C. J., Lee, J. J., von Kessler, D. P., Moon, R. T., und Beachy, P. A. (1995). Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development* 121, 2337-2347.
- Engel, J. (1989). EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett* 251, 1-7.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rohde, H., und Timpl, R. (1981). Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol* 150, 97-120.
- Entchev, E. V., und Gonzalez-Gaitan, M. A. (2002). Morphogen gradient formation and vesicular trafficking. *Traffic* 3, 98-109.
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M., und Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747-756.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H., und De Robertis, E. M. (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *Embo J* 13, 5015-5025.

Fekany-Lee, K., Gonzalez, E., Miller-Bertoglio, V., und Solnica-Krezel, L. (2000). The homeobox gene *bozozok* promotes anterior neuroectoderm formation in zebrafish through negative regulation of BMP2/4 and Wnt pathways. *Development* 127, 2333-2345.

Fischer, A. J., Dierks, B. D., und Reh, T. A. (2002). Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* 129, 2283-2291.

Fischer, A. J., und Reh, T. A. (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220, 197-210.

Friesel, R., und Dawid, I. B. (1991). cDNA cloning and developmental expression of fibroblast growth factor receptors from *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 11, 2481-2488.

Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P., und Gumbiner, B. M. (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. *J Cell Biol* 128, 959-968.

Furthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B., und Thisse, C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 170-174.

Gao, H., und Hollyfield, J. G. (1995). Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of bFGF expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. *Dev Biol* 169, 168-184.

Gilbert, S. (2000). *Developmental Biology*, sixth edn (Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.).

Giles, R. H., van Es, J. H., und Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1-24.

Glaridon, S., Callaerts, P., Halder, G., und Gehring, W. J. (1997). Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development* 124, 817-825.

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., und Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362.

Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C., und Niehrs, C. (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-519.

Gomez-Skarmeta, J., de La Calle-Mustienes, E., und Modolell, J. (2001). The Wnt-activated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4. *Development* 128, 551-560.

Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A., und Scott, M. P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 10, 301-312.

Grainger, R. M. (1992). Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet* 8, 349-355.

Grotewold, L., und Ruther, U. (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *Embo J* 21, 966-975.

Guger, K. A., und Gumbiner, B. M. (1995). beta-Catenin has Wnt-like activity and mimics the Nieuwkoop signaling center in *Xenopus* dorsal-ventral patterning. *Dev Biol* 172, 115-125.

- Gurdon, J. B. (1987). Embryonic induction--molecular prospects. *Development* 99, 285-306.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., und Krasnow, M. A. (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92, 253-263.
- Halder, G., Callaerts, P., und Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.
- Hallonet, M., Hollemann, T., Pieler, T., und Gruss, P. (1999). *Vax1*, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev* 13, 3106-3114.
- Hallonet, M., Hollemann, T., Wehr, R., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Pieler, T., und Gruss, P. (1998). *Vax1* is a novel homeobox-containing gene expressed in the developing anterior ventral forebrain. *Development* 125, 2599-2610.
- Hardcastle, Z., Chalmers, A. D., und Papalopulu, N. (2000). FGF-8 stimulates neuronal differentiation through FGFR-4a and interferes with mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *Curr Biol* 10, 1511-1514.
- Hardcastle, Z., und Papalopulu, N. (2000). Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate. *Development* 127, 1303-1314.
- Harris, W. A., und Hartenstein, V. (1991). Neuronal determination without cell division in *Xenopus* embryos. *Neuron* 6, 499-515.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C. Y., und Wylie, C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79, 791-803.
- Heasman, J., Kofron, M., und Wylie, C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol* 222, 124-134.
- Heberlein, U., Singh, C. M., Luk, A. Y., und Donohoe, T. J. (1995). Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature* 373, 709-711.
- Heemskerk, J., und DiNardo, S. (1994). *Drosophila* hedgehog acts as a morphogen in cellular patterning. *Cell* 76, 449-460.
- Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C., und Wilson, S. W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76-81.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G., und Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., und Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.
- Hensey, C., und Gautier, J. (1998). Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol* 203, 36-48.

- Hey, P. J., Twells, R. C., Phillips, M. S., Yusuke, N., Brown, S. D., Kawaguchi, Y., Cox, R., Guochun, X., Dugan, V., Hammond, H., et al. (1998). Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* 216, 103-111.
- Hicks, D., und Courtois, Y. (1992). Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. *J Neurosci* 12, 2022-2033.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D., und van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354, 522-525.
- Hirsch, N., und Harris, W. A. (1997). *Xenopus* Pax-6 and retinal development. *J Neurobiol* 32, 45-61.
- Hogan, B. L., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C. M., Fisher, G., und Lyon, M. F. (1986). Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 97, 95-110.
- Holleman, T., Chen, Y., Grunz, H., und Pieler, T. (1998). Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling. *Embo J* 17, 7361-7372.
- Holleman, T., und Pieler, T. (1999). Xpitx-1: a homeobox gene expressed during pituitary and cement gland formation of *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 88, 249-252.
- Holleman, T., und Pieler, T. (2000). Xnrx-2.1: a homeobox gene expressed during early forebrain, lung and thyroid development in *Xenopus laevis*. *Dev Genes Evol* 210, 579-581.
- Hongo, I., Kengaku, M., und Okamoto, H. (1999). FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*. *Dev Biol* 216, 561-581.
- Hooper, J. E., und Scott, M. P. (1989). The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59, 751-765.
- Hoppler, S., Brown, J. D., und Moon, R. T. (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 10, 2805-2817.
- Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielnny, S., Cohen, P., und Marshall, C. J. (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71, 335-342.
- Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B., und Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431-436.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., und Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10.
- Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Fadool, J. M., und Dowling, J. E. (1996). Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13298-13303.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., und Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17, 1371-1384.

- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., und Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* 275, 458-460.
- Ikeya, M., und Takada, S. (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development* 125, 4969-4976.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., und Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553-3562.
- Ingham, P. W. (1993). Localized hedgehog activity controls spatial limits of wingless transcription in the *Drosophila* embryo. *Nature* 366, 560-562.
- Ingham, P. W., und Fietz, M. J. (1995). Quantitative effects of hedgehog and decapentaplegic activity on the patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol* 5, 432-440.
- Ingham, P. W., Taylor, A. M., und Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353, 184-187.
- Isaacs, H. V., Pownall, M. E., und Slack, J. M. (1994). eFGF regulates Xbra expression during *Xenopus* gastrulation. *Embo J* 13, 4469-4481.
- Isaacs, H. V., Pownall, M. E., und Slack, J. M. (1995). eFGF is expressed in the dorsal midline of *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 39, 575-579.
- Isaacs, H. V., Tannahill, D., und Slack, J. M. (1992). Expression of a novel FGF in the *Xenopus* embryo. A new candidate inducing factor for mesoderm formation and anteroposterior specification. *Development* 114, 711-720.
- Itoh, K., Krupnik, V. E., und Sokol, S. Y. (1998). Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol* 8, 591-594.
- Jensen, A. M., und Wallace, V. A. (1997). Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* 124, 363-371.
- Jensen, L. M. (1987). Phenotypic differentiation of aphidicolin-selected human neuroblastoma cultures after long-term exposure to nerve growth factor. *Dev Biol* 120, 56-64.
- Johnson, D. E., und Williams, L. T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60, 1-41.
- Jones, C. M., Dale, L., Hogan, B. L., Wright, C. V., und Smith, J. C. (1996). Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* 122, 1545-1554.
- Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., und van Heyningen, V. (1992). The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1, 328-332.
- Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J. M., und Chambon, P. (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124, 313-326.

- Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y. J., Zhang, W., Hu, Y., und Chuang, P. T. (2002). Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development* 129, 5753-5765.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., und Niehrs, C. (2000). The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127, 4981-4992.
- Keeler, R. F. (1970). Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand) X. Cyclopia in rabbits produced by cyclopamine. *Teratology* 3, 175-180.
- Kelley, M. W., Turner, J. K., und Reh, T. A. (1994). Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. *Development* 120, 2091-2102.
- Kelley, M. W., Williams, R. C., Turner, J. K., Creech-Kraft, J. M., und Reh, T. A. (1999). Retinoic acid promotes rod photoreceptor differentiation in rat retina in vivo. *Neuroreport* 10, 2389-2394.
- Kenyon, K. L., Moody, S. A., und Jamrich, M. (1999). A novel fork head gene mediates early steps during *Xenopus* lens formation. *Development* 126, 5107-5116.
- Kiecker, C., und Niehrs, C. (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128, 4189-4201.
- Kimelman, D., und Kirschner, M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* 51, 869-877.
- Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Trent, J. M., Law, M. L., O'Brien, S. J., Wong, A. J., und Vogelstein, B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236, 70-73.
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., und Evans, R. M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Koebernick, K., Hollemann, T., und Pieler, T. (2001). Molecular cloning and expression analysis of the Hedgehog receptors XPTc1 and XSmo in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 100, 303-308.
- Koebernick, K., Hollemann, T., und Pieler, T. (2003). A restrictive role for Hedgehog signalling during otic specification in *Xenopus*. *Dev Biol* 260, 325-338.
- Koebernick, K., und Pieler, T. (2002). Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation* 70, 69-76.
- Kohtz, J. D., Lee, H. Y., Gaiano, N., Segal, J., Ng, E., Larson, T., Baker, D. P., Garber, E. A., Williams, K. P., und Fishell, G. (2001). N-terminal fatty-acylation of sonic hedgehog enhances the induction of rodent ventral forebrain neurons. *Development* 128, 2351-2363.
- Kolm, P. J., Apekin, V., und Sive, H. (1997). *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Dev Biol* 192, 1-16.
- Kolm, P. J., und Sive, H. L. (1995). Regulation of the *Xenopus* labial homeodomain genes, *HoxA1* and *HoxD1*: activation by retinoids and peptide growth factors. *Dev Biol* 167, 34-49.
- Koster, M., Plessow, S., Clement, J. H., Lorenz, A., Tiedemann, H., und Knochel, W. (1991). Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity. *Mech Dev* 33, 191-199.

- Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R. J., Harkins, L. K., und Friesel, R. (2003). Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* 278, 14087-14091.
- Krauss, S., Concordet, J. P., und Ingham, P. W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-1444.
- Ku, M., und Melton, D. A. (1993). *Xwnt-11*: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* 119, 1161-1173.
- Kubo, F., Takeichi, M., und Nakagawa, S. (2003). *Wnt2b* controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* 130, 587-598.
- Kudoh, T., Wilson, S. W., und Dawid, I. B. (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* 129, 4335-4346.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C., und Moon, R. T. (2000). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701-12711.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R., und Moon, R. T. (2000). The Wnt/ Ca^{2+} pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16, 279-283.
- Kuschel, S., Ruther, U., und Theil, T. (2003). A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the *Gli3* mutant telencephalon. *Dev Biol* 260, 484-495.
- LaBonne, C., Burke, B., und Whitman, M. (1995). Role of MAP kinase in mesoderm induction and axial patterning during *Xenopus* development. *Development* 121, 1475-1486.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L., und Oliver, G. (2003). *Six3* repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-379.
- Lai, C. J., Ekker, S. C., Beachy, P. A., und Moon, R. T. (1995). Patterning of the neural ectoderm of *Xenopus laevis* by the amino-terminal product of hedgehog autoproteolytic cleavage. *Development* 121, 2349-2360.
- Larabell, C. A., Torres, M., Rowning, B. A., Yost, C., Miller, J. R., Wu, M., Kimelman, D., und Moon, R. T. (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* 136, 1123-1136.
- Latinkic, B. V., Umbhauer, M., Neal, K. A., Lerchner, W., Smith, J. C., und Cunliffe, V. (1997). The *Xenopus* *Brachyury* promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. *Genes Dev* 11, 3265-3276.
- Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D. L., und Boucaut, J. C. (1996). A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development* 122, 869-880.
- Laurent, M. N., Blitz, I. L., Hashimoto, C., Rothbacher, U., und Cho, K. W. (1997). The *Xenopus* homeobox gene *twin* mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann's organizer. *Development* 124, 4905-4916.

- Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P., und Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124, 2537-2552.
- Lee, J. J., Ekker, S. C., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Sun, B. I., und Beachy, P. A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528-1537.
- Lee, S. M., Tole, S., Grove, E., und McMahon, A. P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127, 457-467.
- Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S., und et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395.
- Lemaire, P., Garrett, N., und Gurdon, J. B. (1995). Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* 81, 85-94.
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahon, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B., und McMahon, A. P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 105, 599-612.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S., und De Robertis, E. M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747-756.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y., und Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* 124, 603-615.
- Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A., und Drager, U. C. (2000). A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev* 95, 283-289.
- Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A. M., McMahon, A., Sussman, D. J., und Wu, D. (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 129-134.
- Lin, W., Furthauer, M., Thisse, B., Thisse, C., Jing, N., und Ang, S. L. (2002). Cloning of the mouse *Sef* gene and comparative analysis of its expression with *Fgf8* and *Spry2* during embryogenesis. *Mech Dev* 113, 163-168.
- Liu, A., Majumdar, A., Schauerte, H. E., Haffter, P., und Drummond, I. A. (2000). Zebrafish *wnt4b* expression in the floor plate is altered in sonic hedgehog and *gli-2* mutants. *Mech Dev* 91, 409-413.
- Loosli, F., Winkler, S., und Wittbrodt, J. (1999). Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev* 13, 649-654.
- MacArthur, C. A., Shankar, D. B., und Shackleford, G. M. (1995). Fgf-8, activated by proviral insertion, cooperates with the Wnt-1 transgene in murine mammary tumorigenesis. *J Virol* 69, 2501-2507.
- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., und Wilson, S. W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121, 3267-3278.
- Mangold, O. (1931). Das Determinationsproblem. III. Das Wirbeltierauge in der Entwicklung und Regeneration. *Ergeb Biol* 7, 193-403.

- Mangold, O. (1933). Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. *Naturwissenschaften* 21, 761-766.
- Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L., und Martin, G. R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* 126, 1189-1200.
- Massague, J., Blain, S. W., und Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A., und Jamrich, M. (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 603-607.
- Matlack, K. E., Mothes, W., und Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92, 381-390.
- Matsui, M., Mizuseki, K., Nakatani, J., Nakanishi, S., und Sasai, Y. (2000). Xenopus kielin: A dorsalizing factor containing multiple chordin-type repeats secreted from the embryonic midline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5291-5296.
- McCaffery, P., Wagner, E., O'Neil, J., Petkovich, M., und Drager, U. C. (1999). Dorsal and ventral retinoic territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mech Dev* 85, 203-214.
- McCarthy, R. A., und Argraves, W. S. (2003). Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *J Cell Sci* 116, 955-960.
- McCarthy, R. A., Barth, J. L., Chintalapudi, M. R., Knaak, C., und Argraves, W. S. (2002). Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *J Biol Chem* 277, 25660-25667.
- McFarlane, S., Zuber, M. E., und Holt, C. E. (1998). A role for the fibroblast growth factor receptor in cell fate decisions in the developing vertebrate retina. *Development* 125, 3967-3975.
- McGrew, L. L., Hoppler, S., und Moon, R. T. (1997). Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mech Dev* 69, 105-114.
- McGrew, L. L., Lai, C. J., und Moon, R. T. (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. *Dev Biol* 172, 337-342.
- McGrew, L. L., Otte, A. P., und Moon, R. T. (1992). Analysis of Xwnt-4 in embryos of *Xenopus laevis*: a Wnt family member expressed in the brain and floor plate. *Development* 115, 463-473.
- McGrew, L. L., Takemaru, K., Bates, R., und Moon, R. T. (1999). Direct regulation of the *Xenopus* engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mech Dev* 87, 21-32.
- McMahon, A. P., und Chuang, P. T. (1996). Hedgehogs in the clinic. *Nat Med* 2, 1308-1310.
- McMahon, A. P., und Moon, R. T. (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58, 1075-1084.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., und McMahon, A. P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12, 1438-1452.

- Meyer, N. P., und Roelink, H. (2003). The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev Biol* 257, 343-355.
- Miller, J. R. (2002). The Wnts. *Genome Biol* 3, REVIEWS3001.
- Mizuno, N., Mochii, M., Takahashi, T. C., Eguchi, G., und Okada, T. S. (1999). Lens regeneration in *Xenopus* is not a mere repeat of lens development, with respect to crystallin gene expression. *Differentiation* 64, 143-149.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., und Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-399.
- Monga, S. P., Monga, H. K., Tan, X., Mule, K., Pediaditakis, P., und Michalopoulos, G. K. (2003). Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* 124, 202-216.
- Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C., und Plessis, A. (1998). Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. *Curr Biol* 8, 583-586.
- Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M., Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296, 1644-1646.
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K., und Hui, C. (1998). Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet* 18, 104-106.
- Mullor, J. L., Dahmane, N., Sun, T., und Ruiz i Altaba, A. (2001). Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Curr Biol* 11, 769-773.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., und Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3046-3050.
- Munoz-Sanjuan, I., und Brivanlou, A. H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* 3, 271-280.
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J. R., und Ingham, P. W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508-513.
- Neumann, C. J., und Nusslein-Volhard, C. (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289, 2137-2139.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U. C., Chambon, P., und Dolle, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62, 67-78.
- Niehrs, C. (1999). Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet* 15, 314-319.
- Northrop, J., Woods, A., Seger, R., Suzuki, A., Ueno, N., Krebs, E., und Kimelman, D. (1995). BMP-4 regulates the dorsal-ventral differences in FGF/MAPKK-mediated mesoderm induction in *Xenopus*. *Dev Biol* 172, 242-252.

- Nusse, R., und Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.
- Nusslein-Volhard, C., und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Nutt, S. L., Dingwell, K. S., Holt, C. E., und Amaya, E. (2001). *Xenopus* Sprouty2 inhibits FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning. *Genes Dev* 15, 1152-1166.
- Ohkubo, Y., Chiang, C., und Rubenstein, J. L. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 111, 1-17.
- Orenic, T. V., Slusarski, D. C., Kroll, K. L., und Holmgren, R. A. (1990). Cloning and characterization of the segment polarity gene *cubitus interruptus* Dominant of *Drosophila*. *Genes Dev* 4, 1053-1067.
- Ornitz, D. M., und Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., und Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271, 15292-15297.
- Oubrie, A., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Duine, J. A., und Dijkstra, B. W. (1999). The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat. *J Mol Biol* 289, 319-333.
- Panitz, F., Krain, B., Hollemann, T., Nordheim, A., und Pieler, T. (1998). The Spemann organizer-expressed zinc finger gene *Xegr-1* responds to the MAP kinase/Ets-SRF signal transduction pathway. *Embo J* 17, 4414-4425.
- Papalopulu, N., Clarke, J. D., Bradley, L., Wilkinson, D., Krumlauf, R., und Holder, N. (1991). Retinoic acid causes abnormal development and segmental patterning of the anterior hindbrain in *Xenopus* embryos. *Development* 113, 1145-1158.
- Park, C. M., und Hollenberg, M. J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev Biol* 134, 201-205.
- Park, C. M., und Hollenberg, M. J. (1991). Induction of retinal regeneration in vivo by growth factors. *Dev Biol* 148, 322-333.
- Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G., und McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119, 247-261.
- Patstone, G., Pasquale, E. B., und Maher, P. A. (1993). Different members of the fibroblast growth factor receptor family are specific to distinct cell types in the developing chicken embryo. *Dev Biol* 155, 107-123.
- Patten, I., und Placzek, M. (2002). Opponent activities of Shh and BMP signaling during floor plate induction in vivo. *Curr Biol* 12, 47-52.
- Paulson, J. R., und Taylor, S. S. (1982). Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J Biol Chem* 257, 6064-6072.

- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., et al. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 273, 14037-14045.
- Pera, E. M., und De Robertis, E. M. (2000). A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1. *Mech Dev* 96, 183-195.
- Pera, E. M., Wessely, O., Li, S. Y., und De Robertis, E. M. (2001). Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Dev Cell* 1, 655-665.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T., und Harris, W. A. (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130, 1565-1577.
- Perron, M., und Harris, W. A. (2000). Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays* 22, 685-688.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., und De Robertis, E. M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., und De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.
- Pittack, C., Jones, M., und Reh, T. A. (1991). Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina in vitro. *Development* 113, 577-588.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., und Dodd, J. (1990). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* 250, 985-988.
- Porter, J. A., von Kessler, D. P., Ekker, S. C., Young, K. E., Lee, J. J., Moses, K., und Beachy, P. A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363-366.
- Porter, J. A., Young, K. E., und Beachy, P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259.
- Pringle, N. P., Yu, W. P., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A. C., und Richardson, W. D. (1996). Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* 177, 30-42.
- Pujara, C. M., und Whitmore, G. F. (1970). An experimental investigation of the division probability model for cell growth. *Cell Tissue Kinet* 3, 99-118.
- Rao, V. N., Huebner, K., Isobe, M., ar-Rushdi, A., Croce, C. M., und Reddy, E. S. (1989). *elk*, tissue-specific *ets*-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science* 244, 66-70.
- Rasmussen, J. T., Deardorff, M. A., Tan, C., Rao, M. S., Klein, P. S., und Vetter, M. L. (2001). Regulation of eye development by frizzled signaling in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3861-3866.
- Rebbert, M. L., und Dawid, I. B. (1997). Transcriptional regulation of the *Xlim-1* gene by activin is mediated by an element in intron I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9717-9722.

- Reiser, V., Ammerer, G., und Ruis, H. (1999). Nucleocytoplasmic traffic of MAP kinases. *Gene Expr* 7, 247-254.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M., und Ang, S. L. (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125, 845-856.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., und Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.
- Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., und Eaton, S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. *J Biol Chem* 274, 12049-12054.
- Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., und Eaton, S. (1999). Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. *J Biol Chem* 274, 12049-12054.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., und Nusse, R. (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50, 649-657.
- Robbins, D. J., Nybakken, K. E., Kobayashi, R., Sisson, J. C., Bishop, J. M., und Therond, P. P. (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* 90, 225-234.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., und et al. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., und Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., und Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023-1026.
- Ruiz i Altaba, A. (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125, 2203-2212.
- Ruiz i Altaba, A., Jessell, T. M., und Roelink, H. (1995). Restrictions to floor plate induction by hedgehog and winged-helix genes in the neural tube of frog embryos. *Mol Cell Neurosci* 6, 106-121.
- Ruiz i Altaba, A., Prezioso, V. R., Darnell, J. E., und Jessell, T. M. (1993). Sequential expression of HNF-3 beta and HNF-3 alpha by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate. *Mech Dev* 44, 91-108.
- Saari, J. C. (1994). Retinoids in photosensitive systems. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, M. B. Sporn, Roberts, A. B., Goodman, D. S., ed. (New York, Raven Press), pp. 351-385.
- Saha, M. S., und Grainger, R. M. (1993). Early opsin expression in Xenopus embryos precedes photoreceptor differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 17, 307-318.

Saha, M. S., Spann, C. L., und Grainger, R. M. (1989). Embryonic lens induction: more than meets the optic vesicle. *Cell Differ Dev* 28, 153-171.

Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A. K., und Farquhar, M. G. (1994). Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9725-9729.

Saka, Y., und Smith, J. C. (2001). Spatial and temporal patterns of cell division during early *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol* 229, 307-318.

Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J., und Hamada, H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15, 213-225.

Sasai, Y., und De Robertis, E. M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol* 182, 5-20.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K., und De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790.

Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., und Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313-1322.

Schlosser, G., und Northcutt, R. G. (2000). Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 418, 121-146.

Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M., und Hausen, P. (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* 57, 191-198.

Schohl, A., und Fagotto, F. (2002). Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* 129, 37-52.

Schulte-Merker, S., und Smith, J. C. (1995). Mesoderm formation in response to Brachyury requires FGF signalling. *Curr Biol* 5, 62-67.

Shawlot, W., und Behringer, R. R. (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374, 425-430.

Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C., und Moon, R. T. (1999). Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9, 695-698.

Shiozaki, C., Tashiro, K., Asano-Miyoshi, M., Saigo, K., Emori, Y., und Shiokawa, K. (1995). Cloning of cDNA and genomic DNA encoding fibroblast growth factor receptor-4 of *Xenopus laevis*. *Gene* 152, 215-219.

Shore, P., und Sharrocks, A. D. (1994). The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Mol Cell Biol* 14, 3283-3291.

Sive, H. L., Draper, B. W., Harland, R. M., und Weintraub, H. (1990). Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 4, 932-942.

- Slack, J. M., Darlington, B. G., Heath, J. K., und Godsave, S. F. (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326, 197-200.
- Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B., und Moon, R. T. (1997). Modulation of embryonic intracellular Ca^{2+} signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182, 114-120.
- Smith, J. C., Price, B. M., Green, J. B., Weigel, D., und Herrmann, B. G. (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67, 79-87.
- Smith, W. C., und Harland, R. M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-840.
- Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S., Jr., und Harland, R. M. (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell* 82, 37-46.
- Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T., und Melton, D. A. (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* 67, 741-752.
- Song, J., und Slack, J. M. (1994). Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) mRNA and protein in early *Xenopus* development. *Mech Dev* 48, 141-151.
- Spemann, H. (1918). Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo I-VI. *Roux's Arch Entw Mech* 43, 448-555.
- Spemann, H., und Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Arch Entw Mech* 100, 599-639.
- Springer, T. A. (1998). An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol* 283, 837-862.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., und McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13, 2072-2086.
- Stecca, B., und Altaba, A. (2002). The therapeutic potential of modulators of the Hedgehog-Gli signaling pathway. *J Biol* 1, 9.
- Stevely, W. S., und Stocken, L. A. (1968). Histone phosphorylation and cell division. *Biochem J* 109, 24P-25P.
- Streit, A., Lee, K. J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T. M., und Stern, C. D. (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* 125, 507-519.
- Sumanas, S., und Ekker, S. C. (2001). *Xenopus* frizzled-5: a frizzled family member expressed exclusively in the neural retina of the developing eye. *Mech Dev* 103, 133-136.
- Swindell, E. C., Thaller, C., Sockanathan, S., Petkovich, M., Jessell, T. M., und Eichele, G. (1999). Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol* 216, 282-296.
- Tabata, T., und Kornberg, T. B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.

- Tada, M., O'Reilly, M. A., und Smith, J. C. (1997). Analysis of competence and of Brachyury autoinduction by use of hormone-inducible Xbra. *Development* 124, 2225-2234.
- Tada, M., und Smith, J. C. (2000). Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* 127, 2227-2238.
- Takabatake, T., Takahashi, T. C., Inoue, K., Ogawa, M., und Takeshima, K. (1996). Activation of two Cynops genes, fork head and sonic hedgehog, in animal cap explants. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 395-401.
- Taylor, A. M., Nakano, Y., Mohler, J., und Ingham, P. W. (1993). Contrasting distributions of patched and hedgehog proteins in the Drosophila embryo. *Mech Dev* 42, 89-96.
- Tcheng, M., Oliver, L., Courtois, Y., und Jeanny, J. C. (1994). Effects of exogenous FGFs on growth, differentiation, and survival of chick neural retina cells. *Exp Cell Res* 212, 30-35.
- Thibert, C., Teillet, M. A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N. M., und Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301, 843-846.
- Thomas, S. M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S., und Brugge, J. S. (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* 68, 1031-1040.
- Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W., und Piatigorsky, J. (1997). Squid Pax-6 and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2421-2426.
- Ton, C. C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N. D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., und et al. (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67, 1059-1074.
- Treier, M., O'Connell, S., Gleiberman, A., Price, J., Szeto, D. P., Burgess, R., Chuang, P. T., McMahon, A. P., und Rosenfeld, M. G. (2001). Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 128, 377-386.
- Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T., und Dawid, I. B. (2002). Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 4, 165-169.
- Tsuda, H., Sasai, N., Matsuo-Takasaki, M., Sakuragi, M., Murakami, Y., und Sasai, Y. (2002). Dorsalization of the neural tube by Xenopus tiarin, a novel patterning factor secreted by the flanking nonneural head ectoderm. *Neuron* 33, 515-528.
- Upadhyay, D., Correa-Meyer, E., Sznajder, J. I., und Kamp, D. W. (2003). FGF-10 prevents mechanical stretch-induced alveolar epithelial cell DNA damage via MAPK activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L350-359.
- Valesky, M., Spang, A. J., Fisher, G. W., Farkas, D. L., und Becker, D. (2002). Noninvasive dynamic fluorescence imaging of human melanomas reveals that targeted inhibition of bFGF or FGFR-1 in melanoma cells blocks tumor growth by apoptosis. *Mol Med* 8, 103-112.
- van de Water, S., van de Wetering, M., Joore, J., Esseling, J., Bink, R., Clevers, H., und Zivkovic, D. (2001). Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. *Development* 128, 3877-3888.

- van den Heuvel, M., und Ingham, P. W. (1996). *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* 382, 547-551.
- van Ooyen, A., und Nusse, R. (1984). Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene *int-1*; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* 39, 233-240.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., und Mayor, R. (2002). Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev Biol* 241, 289-301.
- Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., und Iannaccone, P. M. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67, 1047-1054.
- Vincent, J. P., und Dubois, L. (2002). Morphogen transport along epithelia, an integrated trafficking problem. *Dev Cell* 3, 615-623.
- von Bubnoff, A., Schmidt, J. E., und Kimelman, D. (1996). The *Xenopus laevis* homeobox gene *Xgbx-2* is an early marker of anteroposterior patterning in the ectoderm. *Mech Dev* 54, 149-160.
- von Heijne, G. (1990). Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol* 2, 604-608.
- Von Ohlen, T., und Hooper, J. E. (1997). Hedgehog signaling regulates transcription through Gli/Ci binding sites in the wingless enhancer. *Mech Dev* 68, 149-156.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F. P., und Moos, M., Jr. (1997). *Frzb*, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757-766.
- Wang, S., Krinks, M., und Moos, M., Jr. (1997). *Frzb-1*, an antagonist of Wnt-1 and Wnt-8, does not block signaling by Wnts -3A, -5A, or -11. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 502-504.
- Watanabe, Y., Duprez, D., Monsoro-Burq, A. H., Vincent, C., und Le Douarin, N. M. (1998). Two domains in vertebral development: antagonistic regulation by SHH and BMP4 proteins. *Development* 125, 2631-2639.
- Wechsler-Reya, R. J., und Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-114.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., und DiNardo, S. (2000). *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527-530.
- Weinstein, D. C., und Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Neural induction in *Xenopus laevis*: evidence for the default model. *Curr Opin Neurobiol* 7, 7-12.
- Wessely, O., Agius, E., Oelgeschlager, M., Pera, E. M., und De Robertis, E. M. (2001). Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev Biol* 234, 161-173.
- Wheeler, G. N., und Hoppler, S. (1999). Two novel *Xenopus* frizzled genes expressed in developing heart and brain. *Mech Dev* 86, 203-207.
- White, J. A., Beckett-Jones, B., Guo, Y. D., Dilworth, F. J., Bonasoro, J., Jones, G., und Petkovich, M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* 272, 18538-18541.
- Wilson, P. A., und Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by *Bmp-4*. *Nature* 376, 331-333.

- Wilson, S. I., Rydstrom, A., Trimborn, T., Willert, K., Nusse, R., Jessell, T. M., und Edlund, T. (2001). The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature* 411, 325-330.
- Wolda, S. L., Moody, C. J., und Moon, R. T. (1993). Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 155, 46-57.
- Wolpert, L. (1998). *Principles of development*, first edn (New York, Oxford University Press).
- Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M., und Blenis, J. (1992). ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* 68, 1041-1050.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., und Jessell, T. M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647.
- Yamamoto, T., Bishop, R. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L., und Russell, D. W. (1986). Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science* 232, 1230-1237.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., und Tickle, C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124, 4393-4404.
- Yang-Snyder, J., Miller, J. R., Brown, J. D., Lai, C. J., und Moon, R. T. (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6, 1302-1306.
- Zang, M., Hayne, C., und Luo, Z. (2002). Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* 277, 4395-4405.
- Zeng, X., Goetz, J. A., Suber, L. M., Scott, W. J., Jr., Schreiner, C. M., und Robbins, D. J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716-720.
- Zhang, L., El-Hodiri, H. M., Ma, H. F., Zhang, X., Servetnick, M., Wensel, T. G., und Jamrich, M. (2003). Targeted expression of the dominant-negative FGFR4a in the eye using Xrx1A regulatory sequences interferes with normal retinal development. *Development* 130, 4177-4186.
- Zhang, L., Mathers, P. H., und Jamrich, M. (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* 28, 135-142.
- Zhang, X. M., und Yang, X. J. (2001). Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev Biol* 233, 271-290.
- Zhou, Q., und Anderson, D. J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109, 61-73.
- Zhou, X., Hollemann, T., Pieler, T., und Gruss, P. (2000). Cloning and expression of xSix3, the *Xenopus* homologue of murine Six3. *Mech Dev* 91, 327-330.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., und Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., und Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130, 5155-5167.

- Zuber, M. E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A., und Harris, W. A. (1999). Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell* 98, 341-352.
- Zygar, C. A., Cook, T. L., und Grainger, R. M., Jr. (1998). Gene activation during early stages of lens induction in *Xenopus*. *Development* 125, 3509-3519.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Hollemann für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Betreuung während meiner Promotionszeit. Die wertvollen, lehrreichen Gespräche mit ihm, seine unermüdlichen Hilfestellungen und auch seine sinnvolle Kritik waren Grundlage dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Tomas Pieler für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Abteilung, die Unterstützung und Förderung des Projektes.

Herrn Professor Dr. Rüdiger Hardeland danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Nikolai Biermann, Martin Kriebel, Andreas Nolte, Emmanuel Tadjuidje und Marco Winkler danke ich für die Zusammenarbeit und die sehr nette Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Marco Winkler, der mir durch seine technische Assistenz und auch darüberhinaus stets eine wichtige Hilfe war.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsbiochemie danke ich sehr für die große Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Ich danke meinen Eltern, Ingrid und Alois Cornesse, sowie meiner Schwester Claudia Cornesse, ohne deren langjährige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

DANKE an Kathrin, Kerstin, Natalie, Tiemo, Torsten, Ulli, Vera und Wendy für ihre Freundschaft.

LEBENS LAUF

Name: Yvonne Cornesse
Geburtsdatum: 08.05.1974
Geburtsort: Gerolstein
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Friedländer Weg 30
37085 Göttingen

Ausbildung:

1980-1984 Grundschule Gerolstein
1984-1993 St. Matthias Gymnasium Gerolstein
Abschluß: Abitur
1993-1996: Johannes-Gutenberg-Universität Mainz;
Grundstudium im Fach Biologie
1996: Vordiplom am 11.01.1996
1996-2000: Georg-August-Universität Göttingen;
Hauptstudium im Fach Biologie, Hauptfach Biochemie,
Nebenfächer Zoologie und Geologie
1998-2000 Diplomarbeit im Fach Biologie, Schwerpunkt Biochemie,
Abteilung Prof. Dr. K. Jungermann
Thema: „Klonierung, Sequenzierung und Untersuchung des
Expressionsmusters des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α aus
Xenopus laevis und des Hypoxie-induzierbaren Faktors 2 α der
Ratte“
2000: Diplom am 21.05.2000
seit 06.2000: Georg-August-Universität Göttingen;
Promotionsarbeit im Fach Biologie, Schwerpunkt
Entwicklungsbiochemie
Abteilung Prof. Dr. T. Pieler
2000-2002: Förderung durch den SFB 271

Göttingen, den 22. September 2003