

**Identifikation und funktionelle Analyse von *Xdach1*
und *Xeya3* als morphogenetische Faktoren der
Kopfentwicklung von *Xenopus laevis***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Martin Kriebel
aus Jane-Furse-Hospital/Südafrika

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. Tomas Pieler

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Die Bildung neuralen Ektoderms am Beispiel der frühen Embryonalentwicklung des südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	1
1.1.1 Neurale Induktion als Folge der Inhibition des <i>Bmp4</i> -vermittelten Signalweges	1
1.1.2 Anterior-posteriore Musterbildung innerhalb des neuralen Ektoderms	3
1.2 Frühe Augenentwicklung als Spezifikation von Bereichen anterioren neuralen Ektoderms	5
1.3 Vertebraten-Homologe der <i>Drosophila</i> Gene <i>Eyes absent (eya)</i> und <i>Dachshund (dac)</i>	7
1.3.1 Die <i>Eyes absent</i> Familie von Proteinen	7
1.3.2 Die <i>Dachshund</i> Familie von Proteinen	9
1.4 Organogenese und Aufbau des Linsenauges der Vertebraten	10
1.5 Musterbildung im Hinterhirn und Neuralrohr von <i>Xenopus laevis</i>	11
1.6 Ziel der Arbeit	14
2. Material	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Bakterienstämme	15
2.3 Genbanken	15
2.4 Medien und Lösungen	15
2.4.1 Nährmedien	16
2.4.2 Antibiotika	16
2.4.3 Puffer und (Stamm-)Lösungen	16
2.5 Antikörper und Chemikalien	17
2.6 Enzyme und Reaktionssysteme	18
2.6.1 Enzyme	18
2.6.2 Reaktionssysteme	18

2.7 Oligonukleotide	19
2.8 Vektoren und cDNA-Klone	20
2.8.1 Vektoren	20
2.8.2 cDNA-Klone	21
2.9 Geräte	27
3. Methoden	31
3.1 Präparation von <i>Xenopus laevis</i> Embryonalstadien	31
3.1.1 Präparation einer Spermien suspension aus <i>Xenopus laevis</i> Testis	31
3.1.2 Stimulation der Eiablage	31
3.1.3 <i>In vitro</i> Fertilisation	31
3.1.4 Entfernen der Gallerte, Vitalfärbung und Entwicklung	31
3.1.5 Fixierung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	32
3.2 Mikromanipulation von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	32
3.2.1 Mikroinjektion von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	32
3.2.2 Hydroxyurea-/Aphidicolin-(„HUA“) Behandlung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	33
3.2.3 Präparation und Kultivierung von animalen Gewebeexplantaten (animal caps)	33
3.3 RNA Methoden	33
3.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Xenopus laevis</i>	33
3.3.1.1 Embryonalstadien	34
3.3.1.2 Adulte Gewebe und Organe	34
3.3.1.3 Animale Gewebeexplantate (animal caps)	34
3.3.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	35
3.3.3 5′-/3′-RACE (<u>R</u> apid <u>A</u> mplifikation of <u>c</u> DNA <u>E</u> nds) PCR	36
3.3.3.1 Herstellen von 5′-/3′-RACE-Ready cDNA	36
3.3.3.2 Amplifikation von 5′-/3′-cDNA Enden (RACE-PCR)	37
3.3.4 <i>In vitro</i> Synthese von Cap-mRNA für Mikroinjektionen	38
3.3.5 <i>In vitro</i> Synthese markierter RNA-Sonden	39
3.3.6 Aufreinigung synthetisch hergestellter RNA	39
3.4 DNA Methoden	40
3.4.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterien-Flüssigkulturen	40
3.4.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die chemische Transformation	40
3.4.3 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die elektrische Transformation	40
3.4.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen	41
3.4.5 Elektrische Transformation kompetenter Bakterienzellen	41
3.4.6 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab	42

3.4.7 Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab	42
3.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.4.9 PCR-vermittelte <i>in vitro</i> -Mutagenese	43
3.4.10 Nachweis der Integration klonierter DNA-Fragmente	43
3.4.10.1 PCR auf Flüssigkultur-Aliquots („Colony-PCR“)	43
3.4.10.2 Restriktionsanalyse	44
3.4.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	44
3.4.12 Plasmidlinearisierung	45
3.4.13 Restriktionsspaltung von Vektor-DNA und DNA-Fragmenten	46
3.4.14 Agarosegelelektrophorese	46
3.4.15 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	47
3.4.15.1 Aufreinigung von PCR-Produkten und linearisierten Plasmiden	47
3.4.15.2 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	47
3.4.16 Ligation von DNA-Fragmenten	47
3.4.17 Durchmustern einer cDNA-Bank	48
3.4.17.1 Identifikation positiver Phagenfraktionen	48
3.4.17.2 Phagenplattierung	49
3.4.17.3 Amplifikation spezifischer 5'-Fragmente	49
3.5 Protein Methoden	50
3.5.1 <i>In vitro</i> Translation	50
3.5.2 Nachweis von Fusionsproteinen <i>in vivo</i>	50
3.5.2.1 Immunpräzipitation	50
3.5.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.5.2.3 Western Blot	52
3.5.3 Nachweis der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen	53
3.5.3.1 „Whole mount“ Immunfärbung	53
3.5.3.2 Immunfärbung an Paraffinschnitten	53
3.5.4 Nachweis von proliferierenden oder apoptotischen Zellen	54
3.5.4.1 Nachweis von proliferierenden Zellen durch Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (<i>pH3</i>)	54
3.5.4.2 Nachweis von proliferierenden Zellen durch Inkorporation von BrdU	54
3.5.4.3 Nachweis von apoptotischen Zellen durch TUNEL-Analyse	55
3.6 „Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	56
3.6.1 Rehydrieren der Embryonen	56
3.6.2 Proteinase-K Behandlung	56
3.6.3 Acetylierung und Refixierung	57
3.6.4 Hybridisierung	57

3.6.5 Waschen	57
3.6.6 Antikörper-Inkubation	58
3.6.7 Farbentwicklung	59
3.6.7.1 NBT/BCIP-Färbung	59
3.6.7.2 FAST RED-Färbung	59
3.6.8 Abstoppen der Färbung und Auswertung	60
3.6.9 Doppelfärbungen	60
3.7 Anfertigung von Gewebeschnitten	61
3.7.1 Vibratomschnitte	61
3.7.2 Kunststoffschnitte	62
3.7.3 Paraffinschnitte	63
4. Experimente und Ergebnisse	65
4.1 Die Klonierung des <i>Eyes absent</i> Homologs 3 aus <i>Xenopus laevis</i> (<i>Xeya3</i>)	65
4.2 Das <i>Xenopus Eya</i> -Homolog <i>Xeya3</i> ist in eine C-terminale „PST“- und eine N-terminale <i>Eya</i> -Domäne gegliedert	68
4.3 <i>Xeya3</i> besitzt eine Phosphatase-Aktivität im Bereich der <i>Eya</i> -Domäne	69
4.4 <i>Xeya3</i> wird in anterioren neuralen Strukturen exprimiert	72
4.5 Das <i>Xeya3</i> -Protein ist ausschließlich nukleär lokalisiert	75
4.6 Ein <i>Xeya3</i> -Funktionsverlust verursacht massiven Verlust anterioren neuralen Gewebes	76
4.7 Ein <i>Xeya3</i> -Funktionsverlust führt anterior zur Suppression neuraler Markergene	78
4.8 Ein <i>Xeya3</i> -Funktionsverlust führt zur Apoptose von neuralen Vorläuferzellen	79
4.9 Eine <i>Xeya3</i> -Überexpression führt zu Neoplasie anterioren neuralen Gewebes	81
4.10 Eine <i>Xeya3</i> -Überexpression verursacht eine Expansion der vorderen Neuralplatte	83
4.11 Zellen einer durch <i>Xeya3</i> -Überexpression vergrößerten Retina durchlaufen den Differenzierungsprozess	84
4.12 Die Überexpression von <i>Xeya3</i> bewirkt eine Expansion dorsaler Hirnbereiche sowie die Ausweitung von Zentren der Neurogenese	86
4.13 Eine <i>Xeya3</i> -Überexpression stimuliert die Zellproliferation innerhalb neuralen Gewebes	88
4.14 Ein Verlust der Phosphatase-Aktivität von <i>Xeya3</i> führt zu einer gesteigerten Aktivität des <i>Xeya3</i> -Proteins	90
4.15 Die Klonierung des <i>dachshund</i> Homologs 1 aus <i>Xenopus laevis</i> (<i>Xdach1</i>)	92

4.16	<i>Xdach1</i> -A und <i>Xdach1</i> -B besitzen zwei konservierte „Dachshund-Domänen“ und zeigen Sequenzverwandtschaft zu den Proto-Onkogenen <i>Ski</i> und <i>Sno</i>	95
4.17	<i>Xdach1</i> wird in neuralen und mesodermalen Geweben exprimiert	101
4.18	Das <i>Xdach1</i> -B-Protein ist im Zellkern lokalisiert	103
4.19	Ein <i>Xdach1</i> -Funktionsverlust führt zu Defekten in der embryonalen Augenentwicklung	104
4.20	Ein Funktionsverlust von <i>Xdach1</i> hat Defekte der Musterbildung während der Augenentwicklung zur Folge	106
4.21	Ein <i>Xdach1</i> -Funktionsverlust verhindert Neurogenese in Bereichen des zentralen Nervensystems	108
4.22	Eine Überexpression von <i>Xdach1</i> -B führt zur Vergrößerung von Derivaten neuralen Ektoderms	109
4.23	Die Überexpression von <i>Xdach1</i> -B hat einen stark neuralisierenden Effekt	110
4.24	<i>Xdach1</i> -B inhibiert den <i>Xbmp4</i> -Signaltransduktionsweg	112
4.25	Eine Ko-Injektion von <i>Xdach1</i> -B und <i>Msix6</i> führt zu positiven synergistischen Effekten bezüglich retinalen Wachstums	114
5.	Diskussion	117
5.1	<i>Xeya3</i> als Mitglied der <i>Eyes absent</i> -Familie von Proteinen	117
5.2	<i>Xeya3</i> als trophischer Faktor der Spezifikation und Determination anterioren neuralen Gewebes	119
5.3	Das <i>Xeya3</i> -Protein besitzt möglicherweise zusätzlich eine transdeterminierende Funktion	120
5.4	Die Phosphatase-Aktivität des <i>Xeya3</i> -Proteins hat möglicherweise autoregulatorische Funktion	121
5.5	Die Zellkernlokalisierung des <i>Xeya3</i> -Proteins	122
5.6	<i>Xdach1</i> als Mitglied der <i>Dachshund</i> -Familie von Proteinen	124
5.7	<i>Xdach1</i> in Morphogenese und Musterbildung des Amphibienauges	126
5.8	<i>Xdach1</i> in Entwicklung und Differenzierung von Hirngewebe	128
5.9	Die Zellkernlokalisierung des <i>Xdach1</i> -Proteins	129
5.10	Der Synergismus zwischen <i>Xdach1</i> -B und <i>Msix6</i>	129
5.11	<i>Xdach1</i> als Inhibitor der <i>Xbmp4</i> induzierten Signaltransduktion	131
5.12	Ausblick	136
6.	Zusammenfassung	141

7. Literaturverzeichnis **143**

Danksagungen

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Lebenszyklus des südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	2
Abbildung 1.2:	Modell der Funktion des Spemann-Organisators und anterior-posteriore Musterbildung innerhalb des Neuroektoderms	4
Abbildung 1.3:	Die Entwicklung der Augen als Strukturen des Vorderhirns	5
Abbildung 1.4:	Das genetische Netzwerk der Komplexaugendifferenzierung in <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Abbildung 1.5:	Organogenese des Linsen Auges der Vertebraten	10
Abbildung 1.6:	Anatomie des Vertebratenauges	11
Abbildung 1.7:	Musterbildung und sekundäre Neurogenese im Neuralrohr von <i>Xenopus laevis</i>	12
Abbildung 2.1:	Der Klonierungsvektor <i>pGEM-T</i>	21
Abbildung 2.2:	Der Expressionsvektor <i>pCS2+</i>	22
Abbildung 2.3:	Der Expressionsvektor <i>pCS2+ MT</i>	23
Abbildung 4.1:	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von <i>Xeya3</i>	67
Abbildung 4.2:	<i>Xeya3</i> als Mitglied der <i>Eya3</i> -Subklasse innerhalb der <i>Eyes absent</i> -Familie von Proteinen	68
Abbildung 4.3:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xeya3</i> und <i>Eya3</i> -Proteinen anderer Vertebraten	71
Abbildung 4.4:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xeya3</i> und <i>Eyes absent</i> aus <i>Drosophila melanogaster</i>	72
Abbildung 4.5:	Räumliche und zeitliche Expression von <i>Xeya3</i> während der Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	73
Abbildung 4.6:	Expressions-Niveau von <i>Xeya3</i> in Embryonalstadien und adulten Geweben von <i>Xenopus laevis</i>	74
Abbildung 4.7:	Subzelluläre Lokalisation von <i>Xeya3</i>	75
Abbildung 4.8:	Reduktion neuralen Gewebes durch Funktionsverlust von <i>Xeya3</i>	77
Abbildung 4.9:	Suppression neuraler Markergene durch Funktionsverlust von <i>Xeya3</i>	79
Abbildung 4.10:	Apoptose neuraler Vorläuferzellen nach Funktionsverlust von <i>Xeya3</i>	80
Abbildung 4.11:	Translation von <i>Xeya3-myc in vivo</i>	81
Abbildung 4.12:	Neoplasie anterioren neuralen Gewebes als Folge einer Überexpression von <i>Xeya3</i>	82
Abbildung 4.13:	Expansion der vorderen Neuralplatte unter dem Einfluss einer Überexpression von <i>Xeya3</i>	83

Abbildung 4.14:	Retinaler Größenzuwachs und atypisches retinales Differenzierungsmuster nach Überexpression von <i>Xeya3</i>	85
Abbildung 4.15:	Veränderung des Expressionsmusters von Markergenen des zentralen Nervensystems nach einer Überexpression von <i>Xeya3</i>	87
Abbildung 4.16:	Stimulation der Zellproliferation durch <i>Xeya3</i> -Überexpression	89
Abbildung 4.17:	Repression der durch <i>Xeya3</i> -Überexpression induzierten Phänotypen durch „HUA“-Behandlung	90
Abbildung 4.18:	Aktivitätssteigerung von <i>Xeya3</i> nach Inaktivierung seiner Phosphatase-Aktivität	91
Abbildung 4.19:	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von <i>Xdach1-B</i>	95
Abbildung 4.20:	<i>Xdach1-A/-B</i> als Mitglied der <i>Dach1</i> -Subklasse innerhalb der <i>Dachshund</i> -Familie von Proteinen	96
Abbildung 4.21:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xdach1-B</i> und <i>Xdach1-A</i> mit denen von <i>Dach1</i> -Proteinen anderer Vertebraten	99
Abbildung 4.22:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Xdach1-B</i> und <i>Xdach1-A</i> mit der des <i>Dachshund (dac)</i> Proteins aus <i>Drosophila melanogaster</i>	101
Abbildung 4.23:	Räumliche und zeitliche Expression von <i>Xdach1</i> während der Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	102
Abbildung 4.24:	Expressions-Niveau von <i>Xdach1-A</i> und <i>Xdach1-B</i> in Embryonalstadien und adulten Geweben von <i>Xenopus laevis</i>	103
Abbildung 4.25:	Subzelluläre Lokalisation von <i>Xdach1-B</i>	104
Abbildung 4.26:	Defekte der Augenentwicklung nach Funktionsverlust von <i>Xdach1</i>	105
Abbildung 4.27:	Fehlerhafte Musterbildung im Zuge der Augenentwicklung nach Funktionsverlust von <i>Xdach1</i>	107
Abbildung 4.28:	Gestörte Neurogenese nach Funktionsverlust von <i>Xdach1</i>	108
Abbildung 4.29:	Translation von <i>Xdach1-B-myc</i> <i>in vivo</i>	109
Abbildung 4.30:	Ausdehnung von Hirngewebe nach Überexpression von <i>Xdach1-B</i>	110
Abbildung 4.31:	Transdeterminierung nicht-neuralen in neurales Gewebes nach Überexpression von <i>Xdach1-B</i>	111
Abbildung 4.32:	<i>Xdach1-B</i> als Inhibitor der <i>Xbmp4</i> -Signaltransduktion	113
Abbildung 4.33:	Synergismus zwischen <i>Xdach1-B</i> und <i>Msix6</i>	114
Abbildung 5.1:	Räumliches Expressionsmuster von <i>Eyes absent</i> -Homologen außerhalb <i>Drosophila melanogaster</i>	118

Abbildung 5.2:	Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-vermittelte, <i>RAS/MAPK</i> -abhängige Signaltransduktion und transaktivierende Funktion von <i>Xeya3</i>	123
Abbildung 5.3:	Räumliches Expressionsmuster von <i>Dachshund</i> -Homologen außerhalb <i>Drosophila melanogaster</i>	125
Abbildung 5.4:	<i>TGF-β</i> Signaltransduktion	131
Abbildung 5.5:	Modell der Wirkungsweise von <i>Xdach1</i> als Antagonist der <i>Bmp</i> -Signaltransduktion	134

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren:

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

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	Auffüllen
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
cDNA	„complementary“ = komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosin 5' triphosphat
dCTP	Desoxycytidin 5' triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin 5' triphosphat

dH ₂ O	destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin 5' triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
et al.	et altera
Fab	Antigen bindendes Fragment
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunden
Hepes	N-(2-Hydroxymethyl)piperazin,N'-3-propansulfonsäure
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
λ	Lambda
M	Molar
μ	Mikro
m	Meter, Milli
min	Minute
n	Gesamtanzahl (hier: Embryonen), Nano
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salinenlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ph	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RACE	<u>R</u> apid <u>A</u> mplifikation of <u>c</u> DNA <u>E</u> nds = Schnelle Vermehrung/Amplifikation von cDNA Enden
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
T	Thymin
tet	Tetracyclin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

XII *Abkürzungsverzeichnis*

U	Einheiten (Units) der Enzymaktivität
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

1. Einleitung

Das Spektrum neuraler Systeme innerhalb des Tierreichs erstreckt sich vom einfachen, dezentralisierten Netzwerk früher Wirbelloser bis hin zum hochkomplexen, cranial lokalisierten Gehirn der Vertebraten. Erst durch die Entwicklung zentralisierter Nervensysteme mit klar erkennbarer Hierarchie und spezialisierten Sinnesorganen ist im Verlauf der Evolution die Aufnahme und Verarbeitung einer Vielzahl von Sinnesreizen sowie die hochkomplexe Steuerung darauf fein abgestimmter Verhaltensweisen möglich geworden. Das Verständnis der Entstehung dieser neuralen Strukturen im Zuge der Ontogenese stellt eine der zentralen Fragestellungen der modernen Entwicklungsbiologie dar und kann als Modell dabei helfen, allgemeingültige Prinzipien der Organogenese zu erkennen.

1.1 Die Bildung neuralen Ektoderms am Beispiel der frühen Embryonalentwicklung des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Voraussetzung für die Entwicklung neuraler Organe ist die Bildung des Neuroektoderms als Teil des ektodermalen Keimblattes. Durch anschließende Musterbildung entlang seiner anterior-posterioren Achse entstehen definierte Bereiche, die sich im weiteren Verlauf der Embryogenese zu Bestandteilen des zentralen Nervensystems und davon abgeleiteten Sinnesorganen wie den Augen entwickeln. Die zugrunde liegenden molekularen Prozesse der Entstehung des Neuroektoderms und dessen Regionalisierung sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

1.1.1 Neurale Induktion als Folge der Inhibition des *Bmp4*-vermittelten Signalweges

Die primäre Neurogenese in *Xenopus laevis* ist das Ergebnis der Inhibition einer durch das Morphogen *Bmp4* (*Bone Morphogenetic Protein 4*) vermittelten Induktion des Ektoderms in Richtung eines epidermalen Schicksals. In Abwesenheit der *Bmp4*-Aktivität entsteht aus Zellen des Ektoderms neuroektodermales Gewebe. In diesem Zusammenhang besagt das sogenannte „default model of neural induction“, dass für Zellen des Ektoderms ein neurales Entwicklungsschicksal vorgegeben ist und die Bildung weiterer ektodermaler Derivate, wie beispielsweise der Epidermis, erst durch induktive Vorgänge, wie z.B. durch *Bmp4* vermittelt, ermöglicht wird (Munoz-Sanjuan und Brivanlou, 2002; Weinstein und Hemmati-Brivanlou, 1999; Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995).

Zu Beginn der Gastrulationsbewegungen (NF Stadium 10; Abb. 1.1), der Bildung und Ausrichtung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, kommt es in der prospektiven dorsalen Region des Embryos zur Ausbildung der dorsalen Urmundlippe, des sogenannten Spemann-Organisators (Harland und Gerhart, 1997; Spemann und Mangold, 2001).

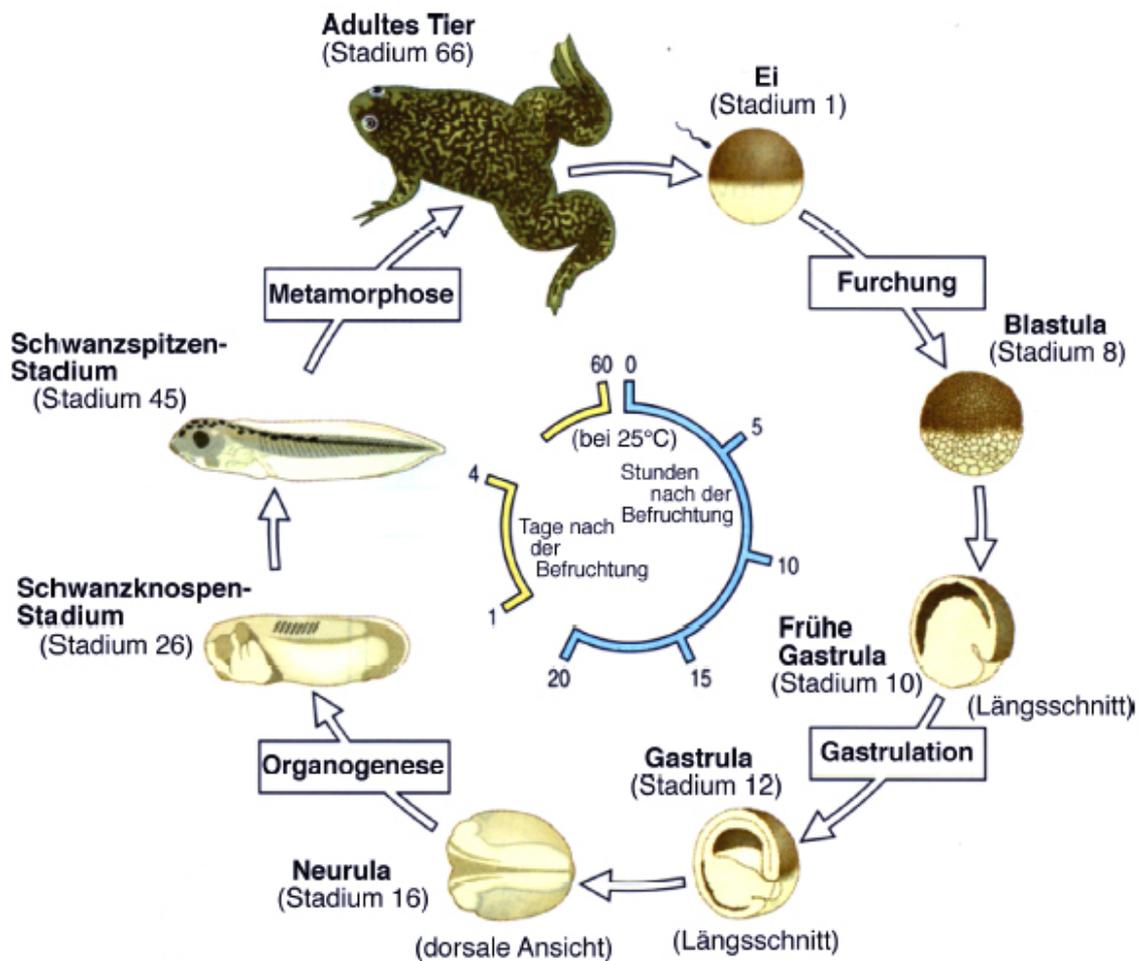


Abb. 1.1: Lebenszyklus des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Nach der Fertilisation des Eies folgen Furchungsteilungen, die zur Bildung einer vielzelligen Blastula und der Entstehung der primären Leibeshöhle führen (NF Stadium 8). Zu diesem Zeitpunkt setzt die zygotische Transkription ein („Mid Blastula Transition“). Während der anschließenden Gastrulationsbewegungen kommt es zur Invagination präsumptiven Meso- und Endoderms, der Spezifikation neuralen Ektoderms und der Ausbildung der sekundären Leibeshöhle (NF Stadium 10, 12). Im Verlauf der Neurulation entwickelt sich aus der offenen Neuralplatte durch dorsalen Schluss das Neuralrohr des Embryos (NF Stadium 16). Mit Abschluss der Neurulation beginnt der Embryo zu elongieren und die Organogenese setzt ein. Durch Schlupf aus der Befruchtungsmembran (NF Stadium 26) und Auswachsen des Schwanzes entwickelt sich eine freischwimmende Larve (NF Stadium 45). Während der Metamorphose werden larvale Strukturen wie Kiemen und Schwanz zurück- und Lunge und Extremitäten des adulten Tieres ausgebildet (NF Stadium 66). Bis zur Geschlechtsreife des Tieres vergeht anschließend noch etwa ein Jahr. Die Zuordnung der verschiedenen Entwicklungsstufen zu Stadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967). Nach Wolpert, 1998.

Dieser ist Quelle sezernierter Moleküle wie *Chordin*, *Noggin* und *Follistatin* (Fainsod et al., 1997; Knecht et al., 1995; Lamb et al., 1993; Piccolo et al., 1996; Sasai et al., 1995; Zimmerman et al., 1996). Alle verhindern die Bindung des *Xbmp4*-Proteins an seinen Zelloberflächenrezeptor und somit die Aktivierung der Transkription von *Xbmp4*-Zielgenen durch die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade (Abb. 1.2). Im weiteren Verlauf der Gastrulation wandert dorsales Mesoderm über die Urmundlippe ins Innere des Embryos ein und kommt unterhalb des Ektoderms zu liegen (NF Stadium 12; Abb. 1.1). Durch die Wirkung der genannten *Xbmp4*-Antagonisten, die vom so gebildeten Notochord, einem axialen Derivat dorsalen Mesoderms des Spemann Organisators, in das darüberliegende Ektoderm sezerniert werden, kommt es zur Ausbildung der Neuralplatte des Embryos. Die Zellen der Neuralplatte unterliegen keiner *Xbmp4*-Aktivität mehr und schlagen das vorgegebene neurale Entwicklungsschicksal ein. Dies ist durch den Beginn der Expression von panneuralen Markergenen wie etwa *Xsox3* gekennzeichnet (Penzel et al., 1997).

1.1.2 Anterior-posteriore Musterbildung innerhalb des neuralen Ektoderms

Die Bildung neuraler Strukturen des späteren Kopfbereiches wie Gehirn und Augen im Verlauf der Organogenese (NF Stadium 26; Abb. 1.1) erfordert neben einer Inhibition von *Bmp4*-Signalen zusätzliche Antagonisten der kanonischen *Wnt*-Signaltransduktionskaskade, welche β -*Catenin* zur intrazellulären Signalweiterleitung verwendet (Behrens et al., 1996; Cadigan und Nusse, 1997). Zu den in *Xenopus laevis* bekannten *Wnt*-Antagonisten zählen die Moleküle *Cerberus* und *Dickkopf1*, beides extrazelluläre Inhibitoren von sowohl *Xbmp4* und *Xwnt8*, und *Frzb*, das eine lösliche Form des *Wnt*-Membranrezeptors *Frizzled* darstellt und somit *Wnt*-Moleküle an der Bindung an ihren Rezeptor hindern kann (Glinka et al., 1998; Glinka et al., 1997; Leyns et al., 1997; Piccolo et al., 1999). Die alleinige Inhibition von *Bmp4*-Signalen durch Einsatz eines dominant-negativen *Bmp4*-Rezeptormoleküls (*tBR*) erzeugte zwar eine zweite Körperachse, diese wies jedoch keine Kopfstrukturen auf (Glinka et al., 1997). Erst die gemeinsame Überexpression von *tBR* und *Dickkopf1* führte zur Bildung eines zweiten Kopfes als Teil der duplizierten Körperachse (Glinka et al., 1998). Die *Wnt*-Inhibitoren werden vom sogenannten Mesendoderm sezerniert, das sich bereits vor Beginn der Gastrulation an der Grenze zwischen Mesoderm und Endoderm befindet. Im Zuge der Invagination von Gewebe während der Gastrulationsbewegungen gelangen Zellen des Mesendoderms ans anteriore Ende des Embryos und kommen unterhalb prospektiven anterioren Neuroektoderms zu liegen, welches in der weiteren Entwicklung Kopfstrukturen ausbildet.

Die Funktion der *Wnt*-Signaltransduktionskaskade im Zusammenhang mit anterioposteriörem Musterbildung des Neuroektoderms konnte auch in Experimenten gezeigt werden, in denen es durch Überexpression von Mitgliedern der *Wnt*-Familie, *Xwnt3a* bzw. *Xwnt8*, zur verstärkten Ausbildung posteriorer Zellidentitäten auf Kosten anteriorer Zellidentitäten des

Neuroektoderms kam (Kiecker und Niehrs, 2001; McGrew et al., 1995). Die Blockierung des *Wnt*-Signalwegs durch Verwendung einer dominant negativen Form von *Xwnt8* (*dnWnt8*) führte im Gegensatz dazu zur Anteriorisierung des Neuroektoderms, analog zur weiter oben beschriebenen Wirkungsweise der *Wnt*-Inhibitoren (McGrew et al., 1995).

Einen weiteren, neurales Ektoderm posteriorisierenden Faktor stellt der embryonale *Fgf* (*eFgf*; *Fibroblast Growth Factor*) aus *Xenopus laevis* dar, der bei Überexpression in Explantaten der anterioren Neuralplatte die Expression von Markergenen des Hinterhirns induziert (Cox und Hemmati-Brivanlou, 1995; Lamb und Harland, 1995). Damit im Einklang steht, dass es bei Inhibition des *Fgf*-Signalwegs durch Überexpression des dominant-negativen *Fgf*-Rezeptors-1 (*XFD*) zur Repression von Markergenen des posterioren Neuroektoderms kommt (Holowacz und Sokol, 1999).

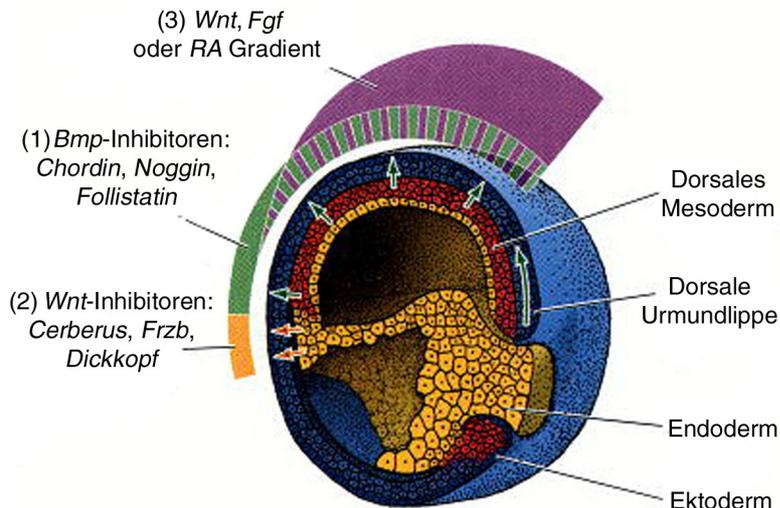


Abb. 1.2: Modell der Funktion des Spemann-Organisators und anterior-posteriore Musterbildung innerhalb des Neuroektoderms. (1) *Bmp*-Inhibitoren des dorsalen Mesoderms verhindern die Bildung von Epidermis im darüberliegenden Ektoderm (grüne Pfeile). (2) *Wnt*-Inhibitoren des anterior lokalisierten Mesendoderms erlauben die Entwicklung von Kopfstrukturen wie Augen und Vorderhirn (orange Pfeile). (3) Durch einen Gradienten posteriorisierender Faktoren wie *Wnt*, *Fgf* und *RA* erfolgt die Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse. Nach Gilbert, 2000.

Ebenso kommt es bei Behandlung von *Xenopus laevis* Neurulae mit *Retinsäure* (*RA*) zum Verlust bzw. zu Entwicklungsdefekten des Vorder- und Mittelhirns, was ihr posteriorisierendes Potential zeigt (Papalopulu et al., 1991). *RA* liegt während der Gastrulation innerhalb des Mesoderms in einem posterior-anterioren Gradienten vor, der durch die komplementäre

Aktivität des *RA*-produzierenden Enzyms *Raldh2* und des *RA*-metabolisierenden Enzyms *Cyp26* gebildet wird (Chen et al., 2001; Hollemann et al., 1998; Niederreither et al., 1997). *RA* ist sowohl innerhalb des Ektoderms als auch Mesoderms aktiv, da weder mit *RA* behandeltes anteriores dorsales Mesoderm die Induktion anterioren neuralen Gewebes induzieren (Ruiz i Altaba und Jessell, 1991a; Ruiz i Altaba und Jessell, 1991b), noch mit *RA* behandeltes anteriores neurales Ektoderm auf Induktionsvorgänge ausgehend vom anterioren dorsalen Mesoderm reagieren kann (Sive et al., 1990). Die Vorgänge während der Induktion und anterior-posterioren Musterbildung des neuralen Ektoderms in *Xenopus laevis* sind in Abb. 1.2 zusammengefasst.

1.2 Frühe Augenentwicklung als Spezifikation von Bereichen anterioren neuralen Ektoderms

Im Zuge der Regionalisierung des Neuroektoderms entlang der anterioren-posterioren Achse entsteht am vorderen Ende der Neuralplatte ein Bereich, aus dem im Verlauf der weiteren Embryonalentwicklung anteriore neurale Strukturen wie Vorderhirn und Augen, als Evagination des Diencephalons, entstehen (s. Abb. 1.3).

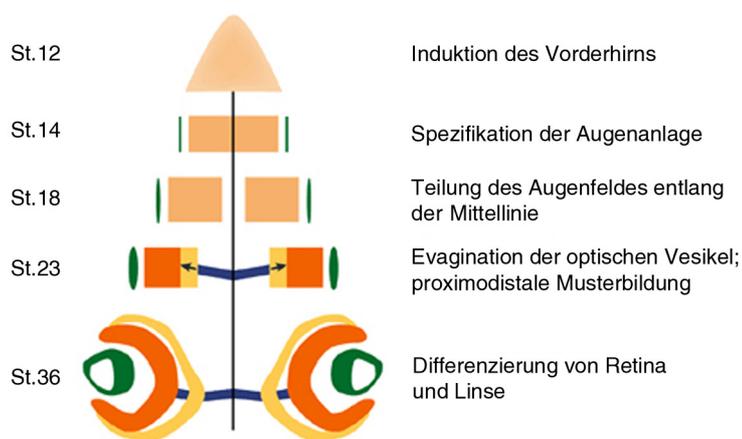


Abb. 1.3: Die Entwicklung der Augen als Strukturen des Vorderhirns. Nach Spezifikation der Augenanlage als Teil des prospektiven Vorderhirns kommt es durch Teilung entlang der Mittellinie zur Bildung der zwei retinalen Primordien. Mit Evagination der optischen Vesikel erfolgt

eine erste Musterbildung entlang der proximodistalen Achse. In der weiteren Entwicklung entstehen optischer Becher und Linsenvesikel, und es kommt zur Differenzierung von optischem Nerv (blau), Retinalem Pigmentepithel (gelb), neuraler Retina (orange) und Linsenfasern (grün). Nach Wittbrodt et al., 2002.

Molekular ist die anteriore Neuralplatte in späten Gastrulastadien u.a durch die Expression des Homöodomänen-Transkriptionsfaktors *Xotx2* (Pannese et al., 1995) gekennzeichnet. Dessen Deletion führt in der Maus zur Reduktion des Kopfes (Acampora et al., 1995). Innerhalb des Bereiches der *Xotx2*-Domäne wird die Augenanlage induziert, die durch die Expression weiterer

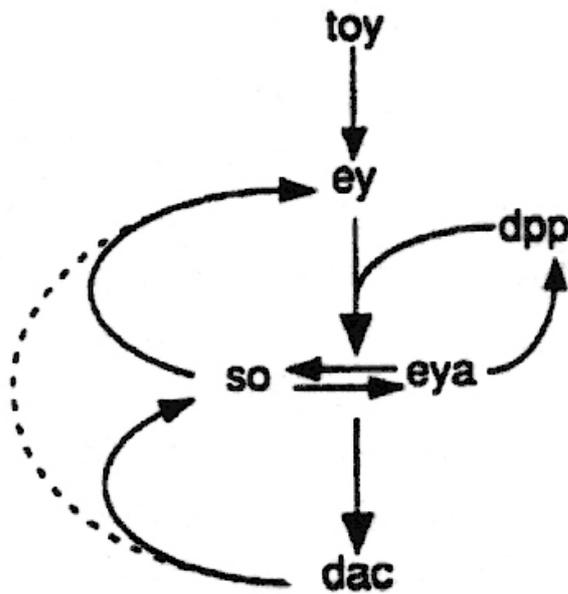


Abb. 1.4: Das genetische Netzwerk der Komplexaugendifferenzierung in *Drosophila melanogaster*. *Twin of eyeless (Toy)* induziert die Expression von *eyeless (ey)*, *Ey* bewirkt zusammen mit *Decapentaplegic (Dpp)* die Expression von *sine oculis (so)* und *eyes absent (eya)*. *Eya* und *So* interagieren auf Proteinbasis und bewirken eine Expression von *dac*. *Eya* stabilisiert zusätzlich die Expression von *dpp* innerhalb der Augen-Imaginalscheibe. Bis auf *dpp* stehen alle genannten Gene in einer positiven Rückkopplungsschleife mit *ey*, so dass sich ein regulatorisches Netzwerk ergibt. Nach Wawersik und Maas, 2000.

Transkriptionsfaktoren wie *Xpax6*, *Xsix3*, *Xsix6 (Xoptx2)* und *Xrx1* gekennzeichnet ist. Ihre Funktionen haben sich als essentiell für die Entwicklung der Augen herausgestellt und treiben die Spezifikation retinalen Vorläufergewebes weiter voran. Analog dazu existieren in *Drosophila melanogaster* Homologe zu *Pax6* [*Twin of eyeless (Toy)*, *Eyeless (Ey)*], *Six3*, *Six6* [*Sine oculis (So)*] und *Rx1 (Drx)* mit einer Funktion bezüglich der Entwicklung der Komplexaugen bzw. Strukturen des Kopfes. *Eyeless* und *sine oculis* sind zudem Teil eines regulatorischen Netzwerkes, das im Zuge der Differenzierung der Ommatidien des Komplexauges eine zentrale Rolle einnimmt (s. Abb. 1.4; Wawersik und Maas, 2000). Mutationen innerhalb des *Pax6*-Gens der Maus verursachen den *small-eye* Phänotyp (*sey*), der bei Homozygotie zum vollständigen Verlust der Augen führt (Hill et al., 1991; Hogan et al., 1988). Im Menschen ist eine Haploinsuffizienz bezüglich *PAX6* Ursache der Aniridie, einer Hypoplasie der Iris sowie der Fovea. Homozygote Genotypen sind lethal (Glaser et al., 1994; Glaser et al., 1992). Durch eine Überexpression von *Pax6* in *Xenopus laevis* konnte zudem die ektopische Bildung von Retina und Linsengewebe innerhalb prospektiver Hirnregionen induziert werden (Altmann et al., 1997; Chow et al., 1999). Wie oben erwähnt, finden sich Homologe von *Pax6* auch außerhalb der Vertebraten, wie z.B. in der Taufliege *Drosophila melanogaster* in Form des *ey*-Gens. Das hier eine Konservierung im Verlauf der Evolution nicht nur auf Ebene der Primärstruktur besteht, zeigt die Tatsache, dass etwa die Überexpression von *Pax6* der Maus wie auch von *Eyeless* aus *Drosophila melanogaster* die Bildung ektopischer Komplexaugen aus Derivaten der Imaginalscheiben der Taufliege verursacht (Halder et al., 1995). Die Reduzierung des Augen-induzierenden Potentials auf bestimmte Gewebe weist dabei auf die Notwendigkeit einer Kompetenz des transdeterminierten Gewebes hin, wie sie z.B. durch das innerhalb der anterioren Neuralplatte exprimierte *Xotx2* bereitgestellt wird.

Die Überexpression von *Rx1* in *Xenopus laevis* induziert die Bildung ektopischen Retinalen Pigmentepithels sowie eine durch Hyperproliferation der Vorläuferzellen vergrößerte neurale Retina (Mathers et al., 1997). In *Rx1*-Nullmutanten (*Rx1*^{-/-}) der Maus kommt es zur fehlerhaften Ausbildung der Augeneskel als Folge einer gestörten Entwicklung retinaler Vorläuferzellen (Zhang et al., 2000).

Die Funktionen der Homöobox-Gene *Six3* und *Six6* im Zusammenhang mit der embryonalen Augenentwicklung werden durch bei Überexpression in *Xenopus laevis* stark vergrößerte neurale Retinae deutlich. Ursache ist zum einen die Konvertierung von Hirn- zu Retinagewebe, zum anderen eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate retinaler Vorläuferzellen (Bernier et al., 2000; Zuber et al., 1999). Im Fall von *Six6* konnte gezeigt werden, dass letzteres die Folge einer aktiven transkriptionellen Repression von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen ist, was ein Voranschreiten des Zellzyklus ermöglicht. Diese Repression erfolgt durch einen multimeren Transkriptionsfaktor-Komplex unter Beteiligung von *Six6* (Li et al., 2002).

1.3 Vertebraten-Homologe der *Drosophila* Gene *Eyes absent (eya)* und *Dachshund (dac)*

Neben *Eyeless* und *Sine oculis* sind die Transkriptionsfaktoren *Eyes absent (Eya)* (Bonini et al., 1993) und *Dachshund (Dac)* (Mardon et al., 1994) Bestandteile des regulatorischen Netzwerkes, das die Differenzierung des Komplexauges von *Drosophila melanogaster* vorantreibt (Abb. 1.3). Analog zu den bereits angesprochenen Transkriptionsfaktoren mit einer Rolle bezüglich der Augenentwicklung sowohl im Insekt als auch im Wirbeltier finden sich auch hinsichtlich *Eya* und *Dac* Homologe innerhalb der Vertebraten. Über eine Funktion im Zusammenhang mit der Entwicklung des Linsenauges der Vertebraten ist bis heute jedoch nur wenig bekannt.

1.3.1 Die *Eyes absent* Familie von Proteinen

Zu *Eyes absent* aus *Drosophila melanogaster* existieren in Vertebraten vier Homologe, *Eya1-4* (Abdelhak et al., 1997; Duncan et al., 1997; Mishima und Tomarev, 1998; Vincent et al., 1997; Zimmerman et al., 1997) (Borsani et al., 1999; David et al., 2001; Sahly et al., 1999; Wayne et al., 2001; Xu et al., 1997). Die enge Verwandtschaft zeigt sich durch einen zwischen den Mitgliedern der Protein-Familie hochkonservierten Sequenzabschnitt im Bereich des C-Terminus, der als *Eya*-Dömane bezeichnet wird. *Eyes absent* aus *Drosophila melanogaster* ist als Teil des in Abbildung 1.3 dargestellten regulatorischen Netzwerkes im Zuge der Differenzierung der Komplexaugen unerlässlich. Fliegen mit einem Funktionsverlust von *Eya* entwickeln keine Augen und es kommt zu einer erhöhten Apoptoserate von Zellen der Augenimaginalscheibe, die die Vorläufer differenzierter, ommatidialer Zellen darstellen (Bonini et al., 1993). Eine Überexpression von *Eya* in anderen Imaginalscheiben führt hingegen zur Bildung ektopischen Komplexaugengewebes (Bonini et al., 1997).

Die verschiedenen *Eya*-Homologe der Vertebraten zeigen Expression innerhalb von Augenstrukturen wie Linse und Retina, Bereichen des Gehirns, ektodermalen Plakoden, Derivaten der cranialen Neuralleiste, der Nierenanlage sowie innerhalb myogenen Mesoderms der Somiten. Dabei kommt es zu Überschneidungen der Expressionsmuster innerhalb sowie zwischen den verschiedenen Spezies. Die bis heute bekannten *Eya*-Homologe aus *Xenopus laevis*, *Xeya1* und *Xeya2*, werden allerdings, im Gegensatz zu anderen bekannten *Eya1* oder *Eya2* Homologen (Mishima und Tomarev, 1998; Zimmerman et al., 1997), zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung in Retina- oder Linsengewebe exprimiert (David et al., 2001) (Kriebel, Diplomarbeit 2001). Ein Verlust der *Eya1*-Funktion in *Eya1^{-/-}*-Mäusen führt im Verlauf der Embryogenese zum Verlust der Niere sowie der Ohren, beides Organe mit einer Expression von *Eya1*. Als Ursache wurde, analog zu den Verhältnissen bei einem Funktionsverlust von *Eya* in *Drosophila melanogaster*, eine erhöhte Apoptoserate der Zellen des betroffenen Gewebes festgestellt. Defekte in der Augenentwicklung wurden hingegen nicht beobachtet (Xu et al., 1999). Ähnliche Phänotypen ergeben sich in Patienten mit der sogenannten Branchio-Oto-(BO) oder Branchio-Oto-Renalen-Dysplasie (BOR), die durch eine Kombination branchialer, renaler und otischer Anomalien gekennzeichnet ist, und durch Mutationen innerhalb des humanen *EYAI* ausgelöst wird (Vincent et al., 1997). Mutationen des *EYAI*-Gens sind daneben zusätzlich Ursache für die Ausbildung kongenitaler Katarakte, Trübungen der Linse (Azuma et al., 2000).

Im Bereich der *Eya*-Domäne wurde eine Phosphatase-Aktivität mit Zugehörigkeit zur Familie der Haloacid-Dehalogenase ähnlichen Phosphohydrolasen (HAD) beschrieben (Li et al., 2003; Rayapureddi et al., 2003; Tootle et al., 2003). Mutationen im katalytischen Motiv der Hydrolase beeinträchtigten in Zellkultur die Funktion von murinem *Eya3* im Hinblick auf eine positive Regulation der Zellproliferation von Muskelvorläuferzellen (Li et al., 2003). Ebenso war das Potential von *Eya* aus *Drosophila melanogaster* in Rescue-Experimenten sowie im Zuge von Überexpressionsstudien stark reduziert, war die Phosphatase-Aktivität durch Mutationen innerhalb des aktiven Zentrums der Hydrolase-Domäne herabgesetzt (Tootle et al., 2003).

In *Drosophila melanogaster* kommt es zwischen *Eya* und *So* sowie zwischen *Eya* und *Dac* zu direkten Protein-Protein Wechselwirkungen, die über die konservierte *Eya*-Domäne vermittelt werden (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997). Im Einklang damit hat die gemeinsame Überexpression von *Eya* und *So* bzw. *Eya* und *Dac* synergistische Effekte bezüglich der Bildung ektopischer Komplexaugen zur Folge. Ein ähnliches Zusammenspiel ist im Hühnerembryo beschrieben worden, wo *Six1*, *Eya2* und *Dach2* (*Dac*-Homolog; s.u.) einen multimeren Transkriptionsfaktor-Komplex ausbilden und die Muskelentwicklung regulieren (Heanue et al., 1999). Somit erstreckt sich die evolutionäre Konservierung nicht nur auf die jeweiligen Gene sondern auch auf die zwischen den Genprodukten bestehenden Interaktionen und Wechselwirkungen.

1.3.2 Die *Dachshund* Familie von Proteinen

Zu *Dachshund* aus *Drosophila melanogaster* sind drei Homologe in Vertebraten, *Dach1*, *Dach2* und *DachB* bekannt, wobei letzteres bis jetzt nur im Zebrafisch isoliert wurde (Caubit et al., 1999; Davis et al., 1999; Davis et al., 2001b; Hammond et al., 1998; Hammond et al., 2002; Hammond et al., 1999; Heanue et al., 1999; Kida et al., 2004; Kozmik et al., 1999). Alle *Dachshund*-Proteine sind durch zwei evolutionär konservierte Domänen gekennzeichnet: Die *Dachshund Domäne 1 (DD1)* im N-terminalen Bereich und die *Dachshund Domäne 2 (DD2)* im C-terminalen Bereich des Proteins (Wawersik und Maas, 2000). Zusätzlich existiert ein Sequenzabschnitt mit Homologie zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno*, der grösstenteils mit der *DD1* überlappt (Hammond et al., 1998). Eine funktionelle Analyse von möglichen *Dachshund*-Homologen aus *Xenopus laevis* hat bis heute nicht stattgefunden. Wie auch im Fall von *Ey*, *So* und *Eya* aus *Drosophila melanogaster* kommt es bei einem Funktionsverlust des *Dac*-Proteins zu einem vollständigen Verlust der Komplexaugen der Imago (Mardon et al., 1994). Eine Überexpression löst hingegen die Bildung ektopischer Augen im Kopf- und Thorax-Bereich sowie an den Beinen aus (Shen und Mardon, 1997). Dabei kommt es durch positive Rückkopplungsschleifen zur ektopischen Etablierung des durch *Ey* initiierten regulatorischen Netzwerkes (Abb. 1.3; Shen und Mardon, 1997).

Expression von *Dach1* bzw. *Dach2* findet sich in Vertebraten innerhalb des Auges in Linse und Retina, in Vorder-, Mittel-, und Hinterhirnbereichen, im Rückenmark, innerhalb neurogener cranialer Plakoden, in der Niere sowie in myogenem Mesoderm. Damit ähnelt das räumliche Expressionsmuster dem der *Eya*-Familie, und es kommt, wie bereits weiter oben angeführt, zu Interaktionen und Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern der *Dach*- und *Eya*-Familie im Kontext der Muskelentwicklung des Hühnerembryos (Heanue et al., 1999). Eine Funktionsverluststudie in der Maus (*Dach1^{-/-}*) führte zur postnatalen Lethalität der neugeborenen Tiere, u.a. ausgelöst durch eine schwere Zyanose (Davis et al., 2001a). Zugrunde liegende Entwicklungsdefekte konnten allerdings nicht festgestellt werden. Möglicherweise besteht in der Maus eine Redundanz zwischen *Dach1* und *Dach2*, so dass der *Dach1*-Verlust während der Embryogenese zum Teil durch *Dach2* ausgeglichen werden kann.

Im Zusammenhang mit der durch *Six6* gesteuerten Zellproliferation retinaler Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass *Dach1* und *Six6* einen nukleären Repressorkomplex ausbilden, wobei *Dach1* für die Rekrutierung von Ko-Repressoren zum multimeren Komplex verantwortlich ist (Li et al., 2002). Eine ähnliche Funktion des *Dach1*-Proteins besteht auch im Zusammenhang mit *TGF- β* (*Transforming Growth Factor- β*)-vermittelter Signaltransduktion, wo *Dach1* als intrazellulärer Inhibitor der Transkription von *TGF- β* -Zielgenen auftritt. Als Ursache für die beobachtete transkriptionelle Repression konnte eine Bindung an Mitglieder der *Smad*-Familie von Transkriptionsfaktoren und die Rekrutierung von Ko-Repressoren zum ansonsten transkriptionell aktivierend wirkenden nukleären Komplex ermittelt werden (Wu et

al., 2003). Dies trifft auch auf Zielgene des *Bone Morphogenetic Protein 4 (Bmp4)* zu, das zur *TGF- β* Familie gehört. In Experimenten zur Extremitätenentwicklung im Hühnerembryo konnte gezeigt werden, das *Dach1* als Antagonist des *Bmp*-vermittelten Signalwegs so u.a. zur Musterbildung entlang der proximodistalen Achse beiträgt (Kida et al., 2004).

1.4 Organogenese und Aufbau des Linsenauges der Vertebraten

Morphologisch wird die Organogenese des Linsenauges der Vertebraten mit der Evagination der optischen Vesikel sichtbar (Abb. 1.5A). Diese entwickeln sich aus den beiden retinalen Primordien, die sich während der Neurulation des Embryos durch Signale des median liegenden Notochords aus dem frühen Augenfeld der anterioren Neuralplatte gebildet haben (vgl. Abb. 1.3).

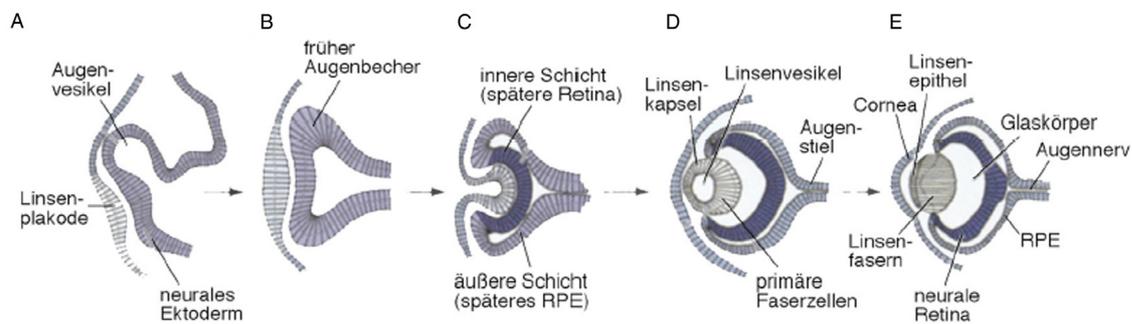


Abb. 1.5: Organogenese des Linsenauges der Vertebraten. (A) Der Augenvesikel tritt in Kontakt zu nicht-neuralem Ektoderm, das daraufhin zur Linsenplakode verdickt. (B) Beginn der Ausbildung des Augenbechers aus Gewebe des optischen Vesikels. (C) Invagination des Linsenektoderms. Der optische Becher hat seine konkave Form angenommen und es sind zwei retinale Schichten erkennbar; RPE, Retinales Pigmentepithel. (D) Entstehung des Linsenvesikels. (E) Reifung der Linse und Ausdifferenzierung der Retina zu den Zellschichten der neuralen Retina und zum Retinalen Pigmentepithel. Proximal entsteht aus dem Augensiel der Augennerv. Nach Gilbert, 2000.

Durch Wechselwirkungen des neuralen Gewebes der optischen Vesikel mit distal liegendem nicht-neuralem Kopfektoderm kommt es zur Bildung der Linsenplakode, einer subepidermalen, ektodermalen Verdickung. Dabei bedarf es einer Kompetenz des Kopfektoderms, auf die vom optischen Vesikel ausgehenden Signale reagieren zu können, wobei diesbezüglich dem Homöoprotein *Pax6* eine wichtige Rolle zugesprochen wird (Fujiwara et al., 1994; Hirsch und Harris, 1997). In der weiteren Entwicklung entsteht aus dem Augenvesikel der konkav geformte optische Becher, der die invaginierende Linsenplakode aufnimmt. Dadurch entstehen bereits

zwei retinale Schichten, distal die prospektive neurale Retina, proximal das zukünftige Retinale Pigmentepithel (Abb. 1.5B, C). Das invaginierte Linsenektoderm bildet den Linsenvesikel aus, auf den distal das Ektoderm der späteren Cornea folgt (Abb. 1.5D). Über die Elongation primärer Faserzellen der Linse in Richtung des Zentrums des Linsenvesikels sowie durch die Bildung sekundärer Linsenfasern durch die Proliferation von Zellen des Linsenepithels reift die Linse heran. Die beiden retinalen Schichten differenzieren zu den verschiedenen Zelltypen der Retina aus (Abb. 1.5E). Dabei entsteht ein charakteristisches Muster, das die Anordnung der verschiedenen Zelltypen und ihrer Fortsätze widerspiegelt (Abb. 1.6).

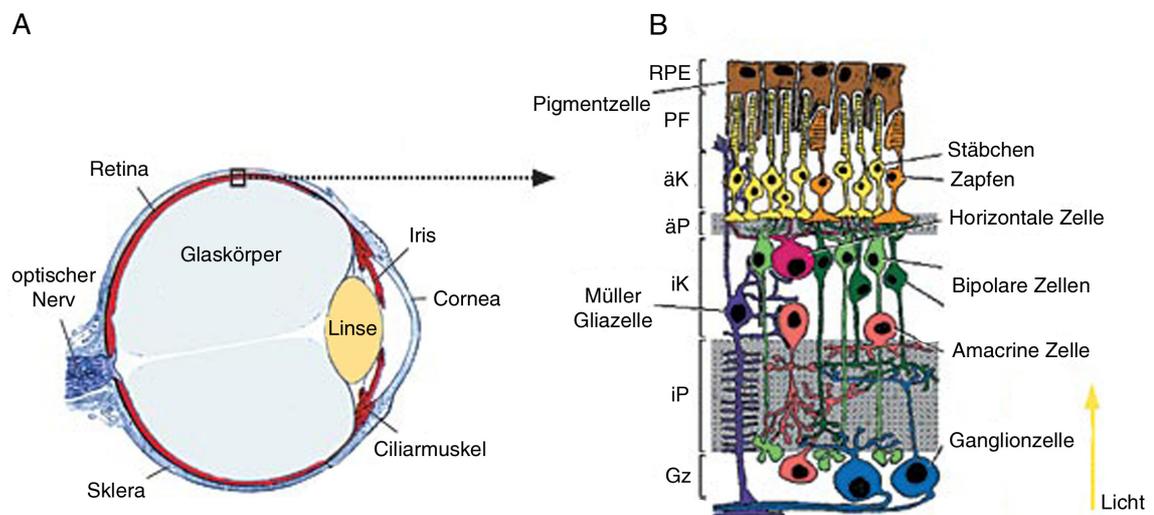


Abb. 1.6: Anatomie des Vertebratenauges. (A) Schematischer Längsschnitt durch das Linsenauge eines Vertebraten. (B) Vergrößerung des in (A) gekennzeichneten Bereiches der Retina. Lichtreize treffen von der Seite der Ganglionzellen auf die Retina; äK, äussere Körnerschicht; äP, äussere plexiforme Schicht; Gz, Ganglionzellenschicht; iK, innere Körnerschicht; iP, innere plexiforme Schicht; PF, Zellfortsätze der Photorezeptoren; RPE, Retinales Pigmentepithel. Nach Ashery-Padan et al., 2001.

1.5 Musterbildung im Hinterhirn und Neuralrohr von *Xenopus laevis*

Bereiche des Neuroektoderms der Neuralplatte, die während der frühen Embryogenese unter dem Einfluss posteriorisierender Faktoren wie *eFGF* oder *RA* gestanden haben (s. 1.1.2 und Abb. 1.2), bilden in der weiteren Entwicklung Hinterhirn und Neuralrohr des Tieres aus. Schon während der primären Neurogenese in Neuralplatten-Stadien kommt es in *Xenopus laevis* zur Ausbildung eines charakteristischen Musters der Anordnung differenzierter Neurone, die durch die Expression von *N-Tubulin*, das spezifisch in differenzierten Nervenzellen exprimiert wird,

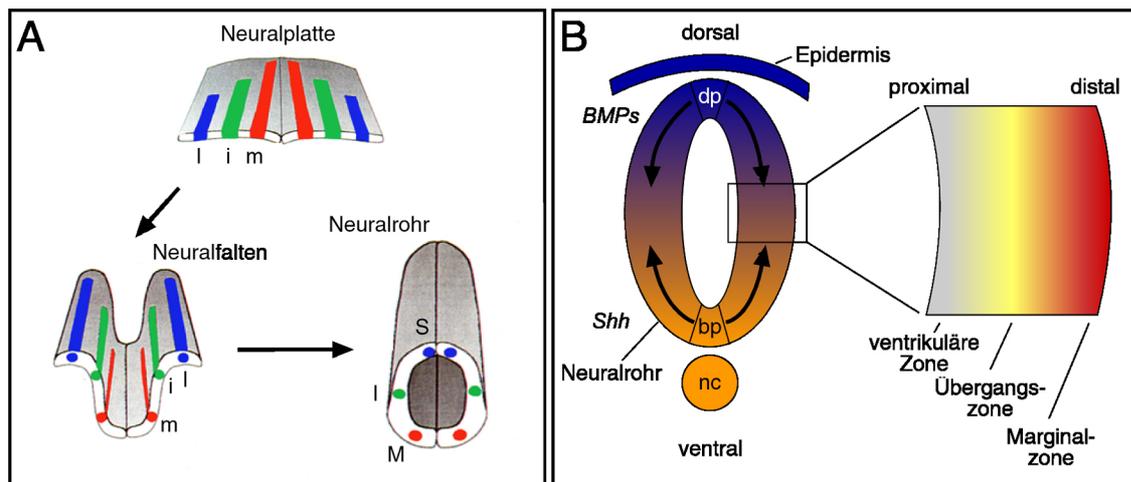


Abb. 1.7: Musterbildung und sekundäre Neurogenese im Neuralrohr von *Xenopus laevis*. (A) Bildung des Neuralrohrs aus der offenen Neuralplatte im Zuge der Neurulation in *Xenopus laevis*. Bereits im Stadium der offenen Neuralplatte entstehen primäre Neurone in einem charakteristischen Muster, das die Orientierung der verschiedenen Nervenzelltypen im späteren Neuralrohr widerspiegelt; i, intermediärer Streifen; l, lateraler Streifen; m, medialer Streifen; I, Interneurone; M, Motorneurone; S, sensorische Neurone. Nach Chitnis und Kintner, 1996. (B) Dorsoventrale und proximodistale Musterbildung im Hinterhirn und Neuralrohr von *Xenopus laevis*. Durch Expression der sezernierten Morphogene *Bmp4*, *Bmp7* und *Sonic Hedgehog (Shh)* in der Dach- (dp) bzw. Bodenplatte (bp) des Neuralrohrs entstehen dorsoventrale bzw. ventrodorsale Gradienten der Proteine, die zur Ausbildung spezifischer Zelltypen in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration an Morphogenen führen. Innerhalb des Neuralrohrs besteht ausserdem eine proximodistale Organisation in Form der ventrikulären-, Übergangs- und Marginalzone. Neuroblasten der ventrikulären Zone bilden durch Teilung determinierte Zellen neuralen Schicksals der Übergangszone, die in ihrer weiteren Entwicklung zu distal lokalisierten Neuronen ausdifferenzieren; nc, Notochord.

gekennzeichnet sind (Oswald et al., 1991). So sind zukünftige sensorische-, Inter- und Motorneurone innerhalb der Neuralplatte beidseitig der Mittellinie in drei longitudinalen Streifen angeordnet, die bereits die dorsoventrale Orientierung der verschiedenen Neurone im späteren Neuralrohr widerspiegeln (Abb. 1.7A; Chitnis und Kintner, 1996). Grundlage für die Etablierung dieses Musters sind Wechselwirkungen zwischen Faktoren, die die Entwicklung von Nervenzellen hemmen, z.B. *Zic-2* (Brewster et al., 1998), bzw. vorantreibenden, wie etwa *X-Ngnr-1* (Ma et al., 1996). Der Prozess der lateralen Inhibition, vermittelt durch die Membranproteine *X-Delta1* und *X-Notch1*, entscheidet zudem innerhalb der erwähnten Streifen der primären Neurogenese über ein Entwicklungsschicksal hin zur Glia- oder Nervenzelle (Chitnis und Kintner, 1996). Im Verlauf der Neurulation kommt es zur Einsenkung der Neuralplatte entlang der Mittellinie und ihrem dorsalen Schluss durch Verschmelzung zuvor

lateral gelegener Bereiche (NF Stadium 16, Abb.1.1; Abb. 1.7A). Dadurch entstehen Strukturen wie Hinterhirn und Neuralrohr, die im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung ein spezifisches Muster neuraler Zelltypen sowohl entlang der dorsoventralen als auch proximodistalen Achse erkennen lassen (Abb. 1.7). Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Faktor ist das Morphogen *Sonic Hedgehog (Shh)* (Egger et al., 1995), das zunächst vom Notochord sezerniert wird und die Ausbildung der Bodenplatte induziert. Diese exprimiert und sezerniert in der Folge selbst *Shh*, was zur Ausbildung eines ventrodorsalen Konzentrations-Gradienten von *Shh* im Neuralrohr führt (Briscoe und Ericson, 1999; Roelink et al., 1995). Verschiedene Konzentrationen an *Shh* haben dabei die Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren innerhalb der betroffenen Zellen zur Folge, die die Differenzierung zu bestimmten neuronalen Subtypen, etwa verschiedenen Klassen von Motor- bzw. Interneuronen, auslösen (Briscoe und Ericson, 1999). Mit *Bmp4* und *Bmp7* konnten im Gegensatz dazu dorsalisierende Faktoren identifiziert werden (Liem et al., 1997; Liem et al., 1995). Nach Ausbildung des Neuralrohres kommt es durch darüberliegendes epidermales Gewebe, das *Bmp4* und *Bmp7* sezerniert, zur Ausbildung der Dachplatte, die ihrerseits beginnt, *Bmp4* zu exprimieren. Der dorsoventrale Gradient von *Bmp4*, mit höchster Konzentration innerhalb der Dachplatte, führt, analog zu den für *Shh* beschriebenen Beobachtungen, zur Induktion der Expression unterschiedlicher Zielgene in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration an Morphogen. Dabei werden u.a. auch Mitglieder der *TGF- β* -Familie wie *Bmp7* und *Activin* aktiviert, die ihrerseits einen Konzentrationsgradienten aufbauen und zur Musterbildung entlang der dorsoventralen Achse beitragen.

Auch in proximodistaler Orientierung lässt sich eine Organisation des Neuralrohres und Hinterhirns von *Xenopus laevis* erkennen, die in diesem Fall die verschiedenen Stadien sekundärer Neurogenese widerspiegelt (Bellefroid et al., 1996). So finden sich proximal in Nähe des Hirnventrikels, innerhalb der sogenannten ventrikulären Zone, neurale Vorläuferzellen, die aktiv proliferieren und so zur Entstehung determinierter neuraler Zellen der in Richtung distal lokalisierten Übergangzone beitragen (Abb. 1.7B). Neuronale Zellen der Übergangzone durchlaufen den Differenzierungsprozess weiter und bilden als ausdifferenzierte Neurone die distal gelegene Marginalzone. Die angesprochenen Zonen sind dabei durch die Expression molekularer Marker charakterisiert. So exprimieren Zellen der ventrikulären Zone das auch früh während der primären Neurogenese detektierbare *X-Ngnr1* (Ma et al., 1996), Zellen der Übergangzone das mit Prozessen der neuronalen Differenzierung in Verbindung gebrachte *X-Myt1* (Bellefroid et al., 1996) und differenzierte Neurone der Marginalzone den Differenzierungsmarker *N-Tubulin* (Oschwald et al., 1991).

1.6 Ziel der Arbeit

Bezüglich einer Funktion von Homologen der *Eya*- und *Dac*-Proteine aus *Drosophila melanogaster* ist im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems und der Augen in Vertebraten bis heute nur wenig bekannt. Mit dem südafrikanischen Krallenfrosch als Modellorganismus soll zunächst versucht werden, Homologe von *Eya* und *Dac* zu klonieren, die eine Genexpression innerhalb der embryonalen Augen- und Hirnanlagen zeigen. Durch Mikroinjektion synthetischer mRNA in *Xenopus laevis* Embryonalstadien können anschließend Funktionsgewinnstudien im Sinne einer Überexpression der entsprechenden Gene durchgeführt werden. Die Verfügbarkeit von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (Morpholinos) erlaubt zudem die Durchführung von Funktionsverluststudien durch eine spezifische Inhibition der Translation endogener mRNAs. Mit Hilfe der in *Xenopus laevis* etablierten Methode der „whole mount“ *in situ* Hybridisierung können weiter die Auswirkungen eines Funktionsgewinns bzw. Funktionsverlustes der untersuchten Proteine auf die Expression von Markergenen getestet werden, um Hinweise auf Veränderungen molekularer Natur während der Embryonalentwicklung zu erhalten. Mit Hilfe der gewonnenen Daten soll eine Einordnung der neu identifizierten Faktoren in Prozesse der Entwicklung von Gehirn und Auge versucht werden.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Der afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gehört zur Familie der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*) der Ordnung *Anura*. Pigmentierte- und Albino-Frösche wurden von Dipl.-Ing. Horst Kähler (Hamburg) sowie 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 Bakterienstämme

XL1-Blue
(Stratagene GmbH, Heidelberg) *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)]^c*; (Bullock et al., 1987)

XL1-Blue MRF'
(Stratagene GmbH, Heidelberg) *D(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac[F' proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)]^c*

2.3 Genbanken

λ-Zap Express cDNA-Bank
(Stratagene GmbH, Heidelberg) Erstellt von T. Hollemann (1995); enthaltene cDNA repräsentiert Transkriptom aus präparierten Köpfen der *Xenopus laevis* NF Stadien 28-31

2.4 Medien und Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Medien und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wurden durch Membranfilter (0,2 µm Porendurchmesser; Sartorius AG, Göttingen) in zuvor autoklavierte Flaschen steriltfiltriert.

2.4.1 Nährmedien

Luria-Bertani (LB)-Medium: 2% (w/v) LB Broth Base (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

LB-Agar: 3,2% (w/v) LB Agar (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

NZY-Medium: 1% (w/v) NZ-Amin (Casein Hydrolysat); 0,5% (w/v) Hefeextrakt (DIFCO); 0,5% (w/v) NaCl; 8,1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,5

2.4.2 Antibiotika

Ampicillin: 100 mg/ml in dH_2O , Lagerung bei -20°C ; verwendete Endkonzentration (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Tetracyclin: 5 mg/ml in 100% Ethanol (p.A.), Lagerung bei -20°C ; verwendete Endkonzentration 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.4.3 Puffer und (Stamm-)Lösungen

Tris-HCl (pH 7,5 bzw. 9,5)	1 M Tris-HCl; pH 7,5 bzw. 9,5
TE (10 x, pH 7,5)	100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA
MgCl_2	1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
MgSO_4	1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
NaCl	5 M NaCl
EDTA	0,5 M EDTA; pH 8,0
EGTA	0,2 M EGTA; pH 8,0
PBS (10 x, pH 7,3)	1,75 M NaCl; 18 mM NaH_2PO_4 ; 75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; pH 7,3
Natrium-Acetat	3 M NaCH_3COO ; pH 5,2
Triethanolamin	0,1 M Triethanolamin; pH 7,5
TBE (10 x)	0,9 M Tris Base; 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA
Maltose	20% (w/v) Maltose; sterilfiltriert
Denhardt's (100 x)	2% (w/v) BSA; 2% (w/v) PVP; 2% (w/v) Ficoll
Ethidiumbromid	10 mg/ml Ethidiumbromid
SDS-Lösung	10% (w/v) Natriumdodecylsulfat

2.5 Antikörper und Chemikalien

anti-Digoxigenin/AP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim): Fab-Fragmente von Digoxigenin-spezifischen, polyklonalen Antikörpern (aus Ziege), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

anti-Fluoreszein/AP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim): Fab-Fragmente von Fluoreszein-spezifischen, polyklonalen Antikörpern (aus Ziege), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

anti-Flag (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen): Flag-Epitop spezifischer, polyklonaler Primär-Antikörper (aus Kaninchen)

anti-*c-myc* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen): *c-Myc*-Epitop spezifischer, monoklonaler Primär-Antikörper (aus Maus)

anti-phosphorylated-Histon 3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg): Phosphoryliertes Histon 3 spezifischer, polyklonaler Primär-Antikörper (aus Kaninchen)

anti-rabbit/AP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen): Kaninchen spezifischer, polyklonaler Sekundär-Antikörper (aus Ziege), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase

anti-rabbit/Fitc (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen): Kaninchen spezifischer, polyklonaler Sekundär-Antikörper (aus Ziege), konjugiert mit Fluoreszeinthiocyanat (Fitc)

anti-mouse/Cy3 (Dianova GmbH, Hamburg): Maus spezifischer, polyklonaler Sekundär-Antikörper (aus Ziege), konjugiert mit Cy3

anti-rabbit/HRP (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg): Kaninchen spezifischer, polyklonaler Sekundär-Antikörper (aus Ziege), konjugiert mit Horseradish-Peroxidase

anti-mouse/HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg): Maus spezifischer, polyklonaler Sekundär-Antikörper (aus Schaf), konjugiert mit Horseradish-Peroxidase

Biochemische Feinchemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics, Fluka, Sigma-Aldrich und Serva bezogen. Alle anderen Chemikalien stammten von den Firmen Fluka, Baker, Gibco, Roth oder Merck und wiesen den höchsten Reinheitsgrad (p.A.) auf.

2.6 Enzyme und Reaktionssysteme

2.6.1 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TdT (15 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
RNase T1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
<i>T4</i> DNA-Ligase (3 U/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
SP6 RNA-Polymerase (50 U/μl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
T3 RNA-Polymerase (50 U/μl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
T7 RNA-Polymerase (50 U/μl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)	Qbiogene, Heidelberg

2.6.2 Reaktionssysteme

mMESSAGE mMACHINE™ SP6	Ambion Ltd., Huntingdon (UK)
Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Gene Amp RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
ECL+ plus Western Blotting Detection System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Nucleobond AX	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
TnT®-Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Wizard Plus SV-Minipreps	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAEX® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
BrdU-Labeling and Detection Kit II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg

2.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie Sigma-Genosys (Steinheim), Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (Morpholinos) von der Firma Gene Tools (Philomath, USA) bezogen. Die Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung wiedergegeben.

Xdach

<i>Xdach</i> -part-3'-Race	GGCATGGGCAACCTCTACCTCCTGGCTACCCATCTCC
<i>Xdach</i> -part-5'-Race	GTCTTCGACCCTCTTCAAGAGATGGAGCAGGAGAAGGAC
<i>Xdach</i> -F.b.	CCCATTTATGATGATGCCCCACCC
<i>Xdach</i> -R	GTCCTTTCAGCATCTGTTCTGGCC
<i>Xdach</i> -141	CTCCATTGTCAGAATCAGCTCCATGCTGGTTATTGCC
<i>Xdach</i> -cds-F	ATGGCTGTGCCAGCCGCTTTGATC
<i>Xdach</i> -R2	GTTGTAGCTTGTGCTCCATCAATAC
<i>Xdach</i> -F-Cla1	GCGATCGATATGGCTGTGCCAGCCGCTTTGATC
<i>Xdach</i> -R-Xho1	GCGCTCGAGTCAATACATCACACTGGTTTTT
<i>Xdach</i> -F-Stu1	GGAGGCCTATGGCTGTGCCAGCCGCTTTG
<i>Xdach</i> -Flag-R-Xho1	CCTCGAGTCACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTGGATA CATCACACTG
<i>Xdach</i> -Splice-F	GGAGCTGATTCTGACAATGGAG
<i>Xdach</i> -Splice-R	GATGGACAGGAATTCTGTCTGAGG
<i>Xdach</i> -Morpholino	CATGGTCGCATACGACTGCCTCCCC

Xeya3

<i>Xeya3</i> -3'-Race	CACCATCTTCACCTGTTGTGCTAACATCATCAGGAGTT ACC
<i>Xeya3</i> -cds-F2	ATGGAGAACGGACAGGATTTAG
<i>Xeya3</i> -cds-R	TCACAAGAAGTCCAGTTCAG
<i>Xeya3</i> -F-Cla1	GCGATCGATATGGAGAACGGACAGGATTTAG
<i>Xeya3</i> -R-Xho1	GCGCTCGAGTCACAAGAAGTCCAGTTCAG
<i>Xeya3</i> -F-Stu1	GGAGGCCTATGGAGAACGGACAGGATTTAG
<i>Xeya3</i> -Flag-R-Xho1	CCTCGAGTCACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTGGCAA GAAGTCCAGT
<i>Xeya3</i> -wob-F-1 st	ATCGATATGGAGAATGGACAAGATTTGGCAGAGCAG
<i>Xeya3</i> -wob-F-fin	ATCGATATGGAAAATGGGCAAGACTTGGCGGAGCAG
<i>Xeya3</i> -mut1-F	CGTGTGTTTTTGTGGCCTTGGATGAGACCATTATCATC
<i>Xeya3</i> -mut1-R	GATGATAATGGTCTCATCCAAGGCCACAAAAACACACG
<i>Xeya3</i> -mut2-F	CGTGTGTTTTTGTGGACTTGGCTGAGACCATTATCATC

<i>Xeya3</i> -mut2-R	GATGATAATGGTCTCAGCCAAGTCCCACAAAAACACACG
<i>Xeya3</i> -mut3-F	CGTGTGTTTTTGTGGGCCTTGGCTGAGACCATTATCATC
<i>Xeya3</i> -mut3-R	GATGATAATGGTCTCAGCCAAGGCCACAAAAACACACG
<i>Xeya3</i> -RT-F	CATCAGGAGTTACCAGCAGCC
<i>Xeya3</i> -RT-R1	GATTCCACCACCAATGTAGGGTC
<i>Xeya3</i> -Morpholino	CTGCTAAATCCTGTCCGTTCTCCAT

Sonstige Oligonukleotide

<i>CMV</i> -F	CGCGCCTGCAGGTCGACACTA
<i>H4</i> -F	CGGGATAACATTCAGGGTATCACT
<i>H4</i> -R	ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT
<i>Xmsx1</i> -F	GCTAAAAATGGCTGCTAA
<i>Xmsx1</i> -R	AGGTGGGCTGTGTAAAGT
<i>Xsox3</i> -RT-F	GCGCACATGAACGGCTGGACTA
<i>Xsox3</i> -RT-R	GTGTGGGAGGTGATGGCTGGAG
<i>SP6</i> -Seq	TTTAGGTGACACTATAGAATAC
<i>T7</i> -Seq (<i>pGEM-T</i>)	TAATACGACTCACTATAGGGCGA
<i>T7</i> -Seq (<i>pCS2+</i>)	TCTACGTAATACGACTCACTATAG
<i>T3</i> -Seq	ATTAACCCTCACTAAAGGGA

2.8 Vektoren und cDNA-Klone

2.8.1 Vektoren

pGEM-T (Abb. 2.1): Zur direkten, ungerichteten Klonierung von durch PCR erhaltenen DNA-Fragmenten und zur Herstellung markierter RNA-Sonden für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde der Vektor *pGEM-T* (Promega) verwendet. Durch einzelne, überhängende Thymidinreste wird die Effizienz der Insertion von durch *Taq*-Polymerase erzeugten PCR-Produkten, welche zu ca. 50% einzelne, überhängende Adeninreste tragen, erhöht.

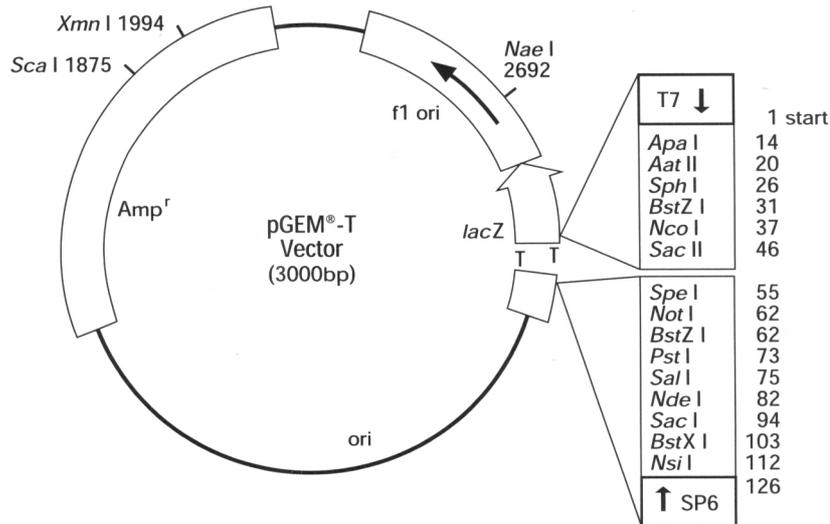


Abb. 2.1: Der Klonierungsvektor *pGEM-T* (Promega Deutschland GmbH, Mannheim). Der Vektor liegt als lineares Molekül vor. Zur einfachen Insertion von durch *Taq*-Polymerase erzeugten PCR-Produkten befinden sich an den 3'-Enden einzelne, überhängende Thymidinreste.

pCS2+ (Abb. 2.2): Zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten und einer nachfolgenden *in vitro* Synthese synthetischer mRNAs wurde das *pBluescript II KS+*-Derivat *pCS2+* verwendet. Mit Hilfe des *SP6*-Promotors und der 3' des Polylinker 1 gelegenen *SV40*-Polyadenylierungsstelle lassen sich translatierbare mRNAs für die *in vitro*- oder *in vivo* Proteinsynthese herstellen.

pCS2+ MT (Abb. 2.3): Zur Herstellung von für *c-myc*-Fusionsproteine codierenden mRNAs wurde das *pCS2+*-Derivat *pCS2+ MT* verwendet. Dieser Vektor trägt sechs Kopien des *c-myc*-Epitops 3' des *SP6*-Promotors innerhalb des Polylinker 1. Durch die Wahl geeigneter Restriktionsschnittstellen bei der Insertion lassen sich so Konstrukte erzeugen, die sechs *c-myc*-Epitope 5' oder 3' des eingefügten DNA-Fragmentes tragen.

2.8.2 cDNA-Klone

Xeya3/pGEM-T: Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA ligiert in *pGEM-T*. Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit *SphI* linearisiert und mit *SP6*-RNA-Polymerase transkribiert.

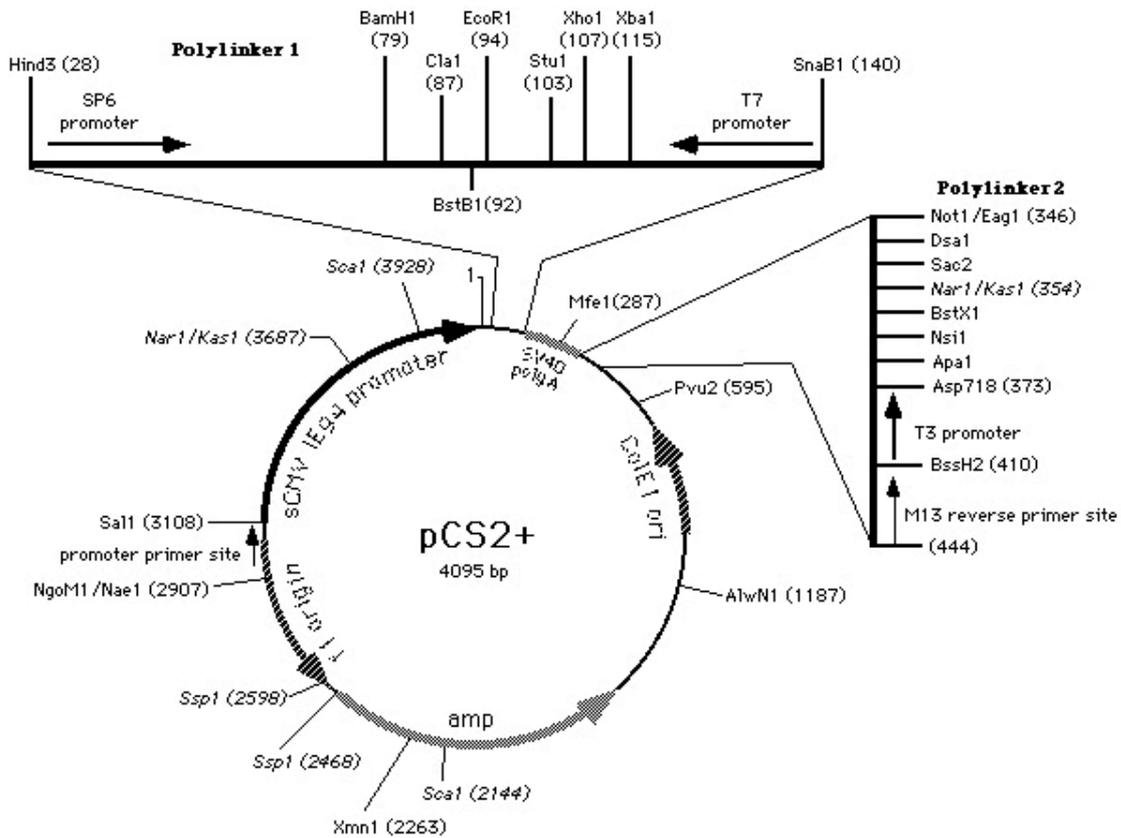


Abb. 2.2: Der Expressionsvektor *pCS2+*. Der zur Herstellung von Konstrukten für die *in vitro* Transkription verwendete Polylinker 1 ist vergrößert dargestellt. Nach Turner und Weintraub, 1994.

***Xeya3/pCS2+*:** Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

***Xeya3-Flag/pCS2+*:** Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA ergänzt durch die DNA-Sequenz für ein Flag-Epitop (27bp) am ihrem 3'-Ende. Die Insertion in *pCS2+* erfolgte unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

***Xeya3-myc/pCS2+*:** Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA ligiert in *pCS2+ MT* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für StuI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert. Die resultierende

mRNA kodiert für ein *c-myc/Xeya3*-Fusionsprotein mit sechs *c-myc*-Epitopen an seinem N-Terminus.

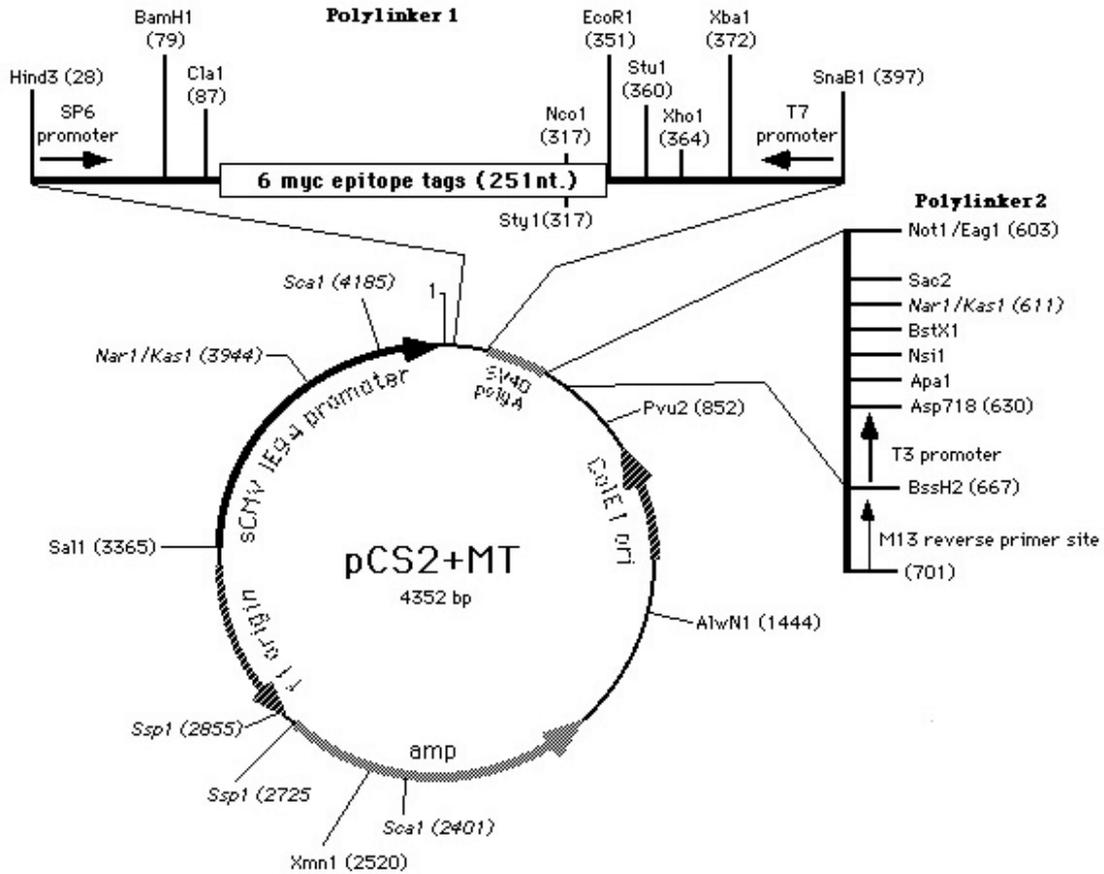


Abb. 2.3: Der Expressionsvektor *pCS2+ MT*. Der zur Herstellung von Konstrukten für die *in vitro* Transkription verwendete Polylinker 1 (inklusive der sechs *c-myc*-Epitope) ist vergrößert dargestellt. Nach Turner und Weintraub, 1994.

Xeya3-wob/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Zur Verwendung als Rescue-Konstrukt in Morpholino-Antisense-Oligonukleotid-Experimenten sind im Bereich der ersten 25bp des *Xeya3* ORF sieben „stille“ (ohne Einfluss auf die Protein-Primärstruktur) Basenaustausche vorgenommen worden. Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xeya3-mut1/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA mit einer Punktmutation an Position 902 (A → C, Asp → Ala) ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xeya3-mut2/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA mit einer Punktmutation an Position 908 (A → C, Asp → Ala) ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xeya3-mut3/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (1698bp) der *Xeya3*-cDNA mit zwei Punktmutationen an Position 902 (A → C, Asp → Ala) sowie 908 (A → C, Asp → Ala) ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xdach1-part/pGEM-T: Enthält ein 414bp Fragment innerhalb des offenen Leserahmens der *Xdach1*-cDNA ligiert in *pGEM-T*.

Xdach1-900/pGEM-T: Enthält ein Fragment (939bp) des offenen Leserahmens der *Xdach1*-cDNA ligiert in *pGEM-T*. Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit NcoI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert.

Xdach1-A/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (2088bp) der *Xdach1-A*-cDNA ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xdach1-B/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (2250bp) der *Xdach1-B*-cDNA ligiert in *pCS2+* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xdach1-B-UTR/pCS2+ (erhalten von E. Amaya, Cambridge): Enthält die vollständige *Xdach1-B*-cDNA ligiert in *pCS2+*.

Xdach1-B-Flag/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (2250bp) der *Xdach1-B*-cDNA ergänzt durch die DNA-Sequenz für ein Flag-Epitop (27bp) am ihrem 3'-Ende. Die Insertion in *pCS2+* erfolgte unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für ClaI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Xdach1-B-myc/pCS2+: Enthält den offenen Leserahmen (2250bp) der *Xdach1-B*-cDNA ligiert in *pCS2+ MT* unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für StuI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende). Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit NotI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert. Die resultierende mRNA kodiert für ein *c-myc/Xdach1-B*-Fusionsprotein mit sechs *c-myc*-Epitopen an seinem N-Terminus.

Weitere Expressionskonstrukte

Xbmp4 (Koster et al., 1991): Für die *in vitro* Synthese von synthetischer mRNA wurde mit BamHI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine, Ambion Ltd.) transkribiert.

Weitere Konstrukte zur *in vitro* Synthese von Antisense-RNA

Xdlx3 (Papalopulu und Kintner, 1993): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit EcoRI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xk81 (Jonas et al., 1985): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit EcoRI linearisiert und mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert.

XmyT1 (Bellefroid et al., 1996): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit ClaI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

N-Tubulin (Oswald et al., 1991): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit BamHI linearisiert und mit T3-RNA-Polymerase transkribiert.

Xotx2 (Pannese et al., 1995): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit NotI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xpax3 (Davidson und Keller, 1999): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit BglII linearisiert und mit Sp6-RNA-Polymerase transkribiert.

Xpax6 (Hirsch und Harris, 1997): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit NotI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xpitz3 (Pommereit et al., 2001): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit EcoRI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xrhodopsin (Saha und Grainger, 1993): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit NotI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xrx1 (Casarosa et al., 1997): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit XhoI linearisiert und mit Sp6-RNA-Polymerase transkribiert.

Xshh (Ekker et al., 1995): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit XbaI linearisiert und mit T3-RNA-Polymerase transkribiert.

Xsix3 (Zhou et al., 2000): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit NotI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xsox3 (Penzel et al., 1997): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit EcoRI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Xvax2 (Liu et al., 2001): Für die *in vitro* Synthese von Antisense-RNA für „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen wurde mit NotI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

2.9 Geräte

Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf AG (Hamburg), BD Falcon (Heidelberg), Qiagen GmbH (Hilden), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen), Ratiolab® GmbH (Dreieich-Buchschlag), Schott AG (Mainz), Biometra GmbH i.L. (Göttingen), Corning GmbH - Corning International (Wiesbaden).

Mikroliterpipetten

Pipetman P10	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pipetman P20	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pipetman P200	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pipetman P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld

PCR-Cycler

UNO II	Biometra GmbH i.L., Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra GmbH i.L., Göttingen

Zentrifugen

Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Heraeus Labofuge 400R	
Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products GmbH,
Sorvall RC-5B	Langenselbold
Sorvall RC5B Plus	

Elektroporator

<i>E. coli</i> Pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsküvetten	Eurogentec s.a., Seraing (Belgien)

Inkubatoren/Schüttler/Wasserbäder

Brutschrank BM400	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach
Brutschrank B6	Kendro GmbH, Langenselbold
Brutschrank WB 22 K	Mytron GmbH, Heilbad Heiligenstadt

Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttler Unitron	Infors GmbH, Einsbach
Wasserbad GFL1002	GFL GmbH, Burgwedel
Schüttelwasserbad GFL1092	GFL GmbH, Burgwedel

Histologie

Vibratom Leica VT1000 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Mikrotom Leica RM2065	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Gastromaster Mikrodissektionsgerät	Xenotek Engineering, Belleville (USA)

Elektrophorese

Netzteil E443	Consort nv, Turnhout (Belgien)
Netzteil E143	Consort nv, Turnhout (Belgien)
Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fastblot B 34	Biometra GmbH i.L., Göttingen

Mikroinjektion

Mikroinjektor PV820	Harry Fein World Precision Instruments, Berlin
Nadelzieher PN-30	Science Products, Hofheim

Optik

Videodokumentationssystem Chemidoc	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch NU-72 KL	Konrad Benda, Wiesloch
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Stereomikroskop MZ FLIII	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Stereomikroskop SZX12	Olympus Microscopy, Hamburg
Stereomikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Stereomikroskop SV6	Carl Zeiss AG, Oberkochen
DXC-950P Color Video Camera	Sony Deutschland GmbH, Köln
C4742-95 Digital Camera	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee
Evolution™MP Digital Camera	Media Cybernetics, Gleichen
KY-F58 3CCD Imaging Camera	JVC Deutschland GmbH, Friedberg
Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte Schröder OHG, Wiesloch

Variable Mode Imager Typhoon 9400	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Photometer Ultrospec 2000	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Abi Prism® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Computer (Hardware)

Personal Computer	Avitos GmbH, Linden
Power Macintosh G3/G4	Apple, Cupertino (USA)

Computer (Software)

Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim
Freehand 9/10	Macromedia Central Europe, München
Lasergene	GATC Biotech AG, Konstanz
MacMolly® Tetra	Mologen AG, Berlin
BLAST Suchsystem für Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Altschul et al., 1997)
Microsoft® Word 2000/XP	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft® Excel 2000	Unterschleißheim

3. Methoden

3.1 Präparation von *Xenopus laevis* Embryonalstadien

3.1.1 Präparation einer Spermiesuspension aus *Xenopus laevis* Testis

Zur Herstellung einer Spermiesuspension für die *in vitro* Fertilisation von *Xenopus laevis* Eiern wurde ein *Xenopus laevis* Männchen nach Betäubung mit Tricaine dekapitiert und ventral aufgeschnitten. Die weißlichen, ovalen Hoden wurden in eiskalten 1 x MBS-Puffer überführt und ca. 1/5 eines Hodens mit einer Mikroschere in 1000 µl 1 x MBS mazeriert.

5 x MBS: 50 mM HEPES, pH 7,4; 440 mM NaCl; 5 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 4,1 mM MgSO₄; 2,05 mM CaCl₂; 3,3 mM KNO₃; pH 7,4; sterilfiltrieren

3.1.2 Stimulation der Eiablage

Um die Eiablage für den folgenden Morgen zu stimulieren, wurden einem *Xenopus laevis* Weibchen gegen 20 Uhr 800 U humanes Gonadotropin (2000 U/ml) mittels einer 1 ml-Spritze mit G27-Kanüle in den dorsalen Lymphsack injiziert und das Tier ü.N. bei 16°C gehalten. War ein späterer Beginn der Eiablage erwünscht, wurde die Hormoninjektion dementsprechend zeitlich verschoben. Zur meist spontanen Eiablage wurden die Weibchen über eine leere Petrischale gehalten.

3.1.3 *In vitro* Fertilisation

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die in 1 x MBS vorliegende Spermiesuspension mit dH₂O 1/10 verdünnt und über die Gelege verteilt. Durch die so erreichte Verringerung der Ionenkonzentration erlangten die Spermien ihre volle Beweglichkeit. Nach dem Ausbreiten der Gelege zu einer Einzelschicht wurden sie 2 min zur Befruchtung inkubiert und dann mit 0,1 x MBS überschichtet.

3.1.4 Entfernen der Gallerte, Vitalfärbung und Entwicklung

30-40 min nach der Befruchtung wurden die aus *in vitro* Befruchtung erhaltenen Embryonen durch 3-5 minütige Inkubation in 2% Cystein (pH 8,0) unter Schwenken von ihrer Gallerthülle befreit und anschließend gründlich mit 0,1 x MBS gewaschen. Um Feinstrukturen von Albino-Embryonen besser erkennen zu können, wurden diese mit dem Vitalfarbstoff Nile-Blue angefärbt.

2% Cystein-HCl: 2% (w/v) L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat; pH 8

Nile-Blue: 0,01% (w/v) Nile-Blue; 50 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O; 50 mM NaH₂PO₄ · H₂O; pH 7,8; mit Faltenfilter filtrieren

3.1.5 Fixierung von *Xenopus laevis* Embryonen

Hatten die Embryonen das gewünschte NF Embryonalstadium erreicht, wurden sie in 5 ml Schraubdeckelglasröhrchen (Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) auf einer Wippe für 1,5 h in 1 x MEMFA fixiert und anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe (25%EtOH/75% 1 x MEM, 50%EtOH, 75% EtOH, 100% EtOH) dehydriert. Embryonalstadien vor dem Schlüpfen aus der Vitellinmembran wurden vor der Fixierung möglichst von dieser befreit. Die Lagerung erfolgte in 100% EtOH (p.A.) bei -20°C.

10 x MEM: 1 M Mops; 20 mM EGTA; 10 mM MgSO₄; pH 7,4; sterilfiltrieren

MEMFA: 1 x MEM; 3,7% Formaldehydlösung

3.2 Mikromanipulation von *Xenopus laevis* Embryonen

3.2.1 Mikroinjektion von *Xenopus laevis* Embryonen

Zum Transfer von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (Morpholinos) oder zur Überexpression von Proteinen in *Xenopus laevis* Embryonen wurden Morpholino-Antisense-Oligonukleotide bzw. synthetische mRNA in einzelne Blastomere von *Xenopus laevis* Embryonen des Zwei- bis 36-Zell-Stadiums injiziert. Mit einem Nadelziehgerät (PN-30) wurden Glaskapillaren (GC100F-10, Harvard Apparatus Ltd., Edenbridge (UK)) dünn ausgezogen. Die Morpholino-/mRNA-Lösung wurde in eine präparierte Glaskapillare pipettiert, die Nadel in eine luftdruckregulierte Mikromanipulationsapparatur (Mikroinjektor PV820) eingespannt und die Spitze mit einer Uhrmacherpinzette unter Beobachtung abgebrochen und somit geöffnet. Um mit einem geringen Durchmesser der Nadelspitze arbeiten zu können, wurde der Injektionsdruck möglichst hoch (~2000 hPa) gehalten. Durch Variation der Injektionszeit (0,1-0,3 s) wurde das zu injizierende Volumen auf ca. 5 nl eingestellt indem der Tropfendurchmesser (d) anhand einer Mess-Skala bestimmt wurde (d = 0,2 mm ≈ 4,2 nl; d = 0,25 mm ≈ 8,2 nl). Zur Injektion wurden die Embryonen in 1 x MBS inkubiert und auf Glas-Objektträger überführt. Nach ca. 1 h Inkubation in Plastik Kulturschalen wurden die Embryonen in 0,5 x MBS umgepuffert, nach ca. 2 h wurde gegen 0,1 x MBS ausgetauscht.

3.2.2 Hydroxyurea-/Aphidicolin-(„HUA“) Behandlung von *Xenopus laevis* Embryonen

Durch Verwendung von Hydroxyurea und Aphidicolin als mitotische Inhibitoren kann die Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* in Abwesenheit von Zellproliferation untersucht werden (Harris und Hartenstein, 1991; Ikegami et al., 1978). Die Vitellinmembran von *Xenopus laevis* Embryonen im Gastrulastadium (NF Stadium 10,5) wurde für ca. 2 min mit Proteinase K (10 µg/ml in 0,1 x MBS) angedaut, um ihre Permeabilität zu erhöhen. Anschließend wurden sie in 0,1 x MBS überführt, das 20 mM Hydroxyurea und 150 µM Aphidicolin enthielt. Die Embryonen wurden in diesem Medium bis zum frühen Neurulastadium (NF Stadium 12,5-13) inkubiert und in MEMFA fixiert.

3.2.3 Präparation und Kultivierung von animalen Gewebeexplantaten (animal caps)

Synthetische mRNA wurde in den animalen Pol beider Blastomere von *Xenopus laevis* Embryonen im Zweizell-Stadium injiziert. Nach dem Erreichen des Blastula-Stadiums (NF Stadium 9-9,5) wurden die injizierten Embryonen sowie nicht-injizierte Kontrollembryonen in 0,8 x MBS (animal caps) überführt und mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten von der Vitellinmembran befreit. Aus dem am animalen Pol befindlichen Dach des Blastocoels wurde mit Hilfe eines Mikrodissektionsgeräts (Gastromaster) ein Explantat mit einem Durchmesser von ca. 400 µm herausgeschnitten und in Plastik Kulturschalen mit einer Beschichtung aus 1% Agarose in 0,8 x MBS (animal caps) überführt. Die animalen Gewebeexplantate wurden so lange kultiviert, bis unbehandelte Kontrollembryonen das gewünschte NF Stadium erreicht hatten.

5 x MBS (animal caps): 50 mM HEPES, pH 7,4; 440 mM NaCl; 5 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 4,1 mM MgSO₄; 2,05 mM CaCl₂; 1,65 mM Ca(NO₃)₂; pH 7,4; sterilfiltrieren

3.3 RNA Methoden

Zur Inaktivierung von RNasen wurden die zum Arbeiten mit RNA bestimmten Gefäße und Lösungen autoklaviert (30 min, 121°C). Hitzelabile Substanzen wurden in DEPC-dH₂O gelöst. Beim Arbeiten mit RNA wurden Latex-Einmalhandschuhe getragen.

DEPC-dH₂O: 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in dH₂O, Inkubation für 4-12 h bei 37°C und anschließendes Autoklavieren für 30 min bei 121°C

3.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *Xenopus laevis*

Gesamt-RNA aus *Xenopus laevis* wurde für RT-PCR-Analysen und 5'-/3'-RACE-PCR im Zuge von cDNA-Klonierungen verwendet.

3.3.1.1 Embryonalstadien

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus *Xenopus laevis* Embryonalstadien wurden zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Embryonen mit Hilfe einer 1 ml Spritze (0,4 mm Kanüledurchmesser) in TRIzol[®]Reagent (Invitrogen GmbH; 1 ml TRIzol[®]Reagent/100 mg Gewebe) homogenisiert. Nach Inkubation für 5 min bei RT wurde Chloroform (0,2 ml Chloroform/1 ml TRIzol[®]Reagent) zugesetzt, der Ansatz für 15 sec von Hand geschüttelt, 3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min zentrifugiert (12000 x g, 4°C). Die entstandene obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Isopropanol versetzt (0,5 ml Isopropanol/1 ml zu Beginn eingesetztem Trizol[®]Reagent). Nach 10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz 10 min zentrifugiert (12000 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das entstandene RNA-Pellet wurde einmal mit 75% Ethanol gewaschen (1 ml 75% Ethanol/ 1 ml zu Beginn eingesetztem Trizol[®]Reagent; Zentrifugation 5 min, 7500 x g, 4°C), luftgetrocknet und in 40 µl DEPC-dH₂O gelöst. Um kontaminierende genomische DNA zu degradieren, wurde die RNA-Lösung nach Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase (20 U/µl, Roche), 5 µl 10 x DNase-Puffer, 2 µl 20 mM Dithiothreitol und 1 µl RNaseOUT (40 U/µl, Invitrogen) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

10 x DNase-Puffer: 400 mM Tris-HCl (pH 8,0); 60 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂ in DEPC-dH₂O

3.3.1.2 Adulte Gewebe und Organe

Nach der Präparation von Hoden aus *Xenopus laevis* Männchen wurden diesem Gewebe und Organe entnommen und mit 1 x MBS blutfrei gewaschen. Die zur RNA-Extraktion bestimmten Gewebe und Organe wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren 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 -80°C gelagert. Die RNA-Extraktion wurde wie unter 3.3.1.1 beschrieben durchgeführt.

3.3.1.3 Animale Gewebeexplantate (animal caps)

Die Gesamt-RNA Präparation aus animalen Gewebeexplantaten von *Xenopus laevis* erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen). Dazu wurden jeweils 20-30 „animal caps“ in 200 µl RLT-Puffer (incl. 10 µl/ml β-Mercaptoethanol) durch Auf- und Abpipettieren (Pipetman P200) homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 300 µl RLT-Puffer (incl. β-Mercaptoethanol) wurde 3 min bei 16000 x g zentrifugiert (Eppendorf 5415 D) und der Überstand mit 500 µl 70% Ethanol (p.A.) versetzt. Der Ansatz wurde in zwei Schritten á 500 µl auf eine RNeasy-Säule pipettiert und jeweils 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 400 µl

RW1-Puffer auf die Säule gegeben, 5min bei RT inkubiert und 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Zum Entfernen genomischer DNA wurde das RNase-Free DNase Set (Qiagen) verwendet. Dazu wurden je Ansatz 12,5 µl DNaseI und 87,5 µl Puffer RDD gemischt und direkt auf die Säule pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 30°C wurden 400 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, für 10 min bei RT inkubiert und der Durchfluss durch Zentrifugation für 15 sec bei 8000 x g gesammelt. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation für 15 sec bzw. 2 min bei 8000 x g wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, die RNA mit 25 µl RNase freiem H₂O (Qiagen) eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

3.3.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Zur Klonierung von cDNA-Fragmenten, zur Verifizierung von durch andere Methoden erhaltener Sequenzinformation und im Zuge von „animal cap Assays“ wurden RT-Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. Dabei wurde zunächst mRNA revers transkribiert und die erhaltene cDNA in der anschließenden PCR als Matrize eingesetzt.

Die reverse Transkription der RNA erfolgte mittels folgendem Ansatz:

- 1 µl MgCl₂-Lösung (25 mM; Applied Biosystems GmbH)
- 0,5 µl 10 x PCR-Puffer II (Applied Biosystems GmbH)
- 0,5 µl dGTP (10 mM; Applied Biosystems GmbH)
- 0,5 µl dATP (10 mM; Applied Biosystems GmbH)
- 0,5 µl dTTP (10 mM; Applied Biosystems GmbH)
- 0,5 µl dCTP (10 mM; Applied Biosystems GmbH)
- 0,1 µl RNase Out (20 U/µl; Invitrogen)
- 0,25 µl Random Hexamers (50 ng/µl; Invitrogen)
- 0,2 µl MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl, Applied Biosystems GmbH)
- bis zu 0,95 µl (bzw. 1 µg) total RNA
- RNase freies dH₂O ad 10 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet (T3 Thermocycler):

- 10 min: 22°C (Anlagerung der Oligonukleotide)
- 15 min: 42°C (Reverse Transkription)
- 5 min : 99°C (Denaturierung)
- 5 min : 5°C (Kühlung)

Die so erhaltene cDNA wurde vollständig in einer PCR eingesetzt, der folgendes Pipettierschema zugrunde lag:

- 0,5 µl MgCl₂-Lösung (25 mM; Applied Biosystems GmbH)
- 2 µl 10x PCR Puffer II (Applied Biosystems GmbH)
- 0,5 µl genspezifisches Oligonukleotid (forward)
- 0,5 µl genspezifisches Oligonukleotid (reverse)
- 0,125 µl AmpliTaq[®] DNA Polymerase (5 U/µl; Applied Biosystems GmbH)
- 5 µl cDNA
- 16,375 µl dH₂O

Folgendes PCR-Programm (T3 Thermocycler) wurde verwendet, wobei die Zyklenzahl abhängig von der Häufigkeit der betreffenden cDNA, die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide abhängig von deren Spezifität und Schmelztemperatur und die Elongationszeit abhängig von der Länge des zu amplifizierenden cDNA-Fragmentes variiert wurde:

- 2 min: 95°C (Denaturierung)
- 25-38x

{	• 45 sec: 95°C (Schmelzen)
	• 45 sec: 48-68°C (Anlagerung der Primer; je nach Spezifität und Schmelzpunkt)
	• 1-3 min: 72°C (Elongation)
- 10 min: 72°C (Finale Elongation)

Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 µl des Reaktionsgemisches durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

3.3.3 5′-/3′-RACE (**R**apid **A**mplifikation of **c**DNA **E**nds) PCR

Zum Erhalt zusätzlicher cDNA-Sequenzinformation in 5′- bzw. 3′-Richtung wurden 5′-/3′-RACE Polymerase-Ketten-Reaktionen mit Hilfe des SMART[™] RACE cDNA Amplifikation Kit (BD Biosciences Clontech) durchgeführt.

3.3.3.1 Herstellen von 5′-/3′-RACE-Ready cDNA

Zur Herstellung von 5′-/3′-RACE-Ready cDNA, die in der anschließenden RACE-PCR als Matrize verwendet wurde, wurde wie folgt in zwei verschiedenen Ansätzen vorgegangen:

- 1-3 µl total RNA (bis zu 1 µg)
- 1 µl 5′-cDNA-Synthesis-Primer
- 1 µl SMART II Oligo (nur für 5′-RACE-Ready cDNA)

- dH₂O ad 5 µl

Nach Mischen der Reaktionsgemische wurden diese für 2 min bei 70°C, anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden folgende Komponenten zu jedem der Ansätze hinzugefügt:

- 2 µl 5 x First-Strand Puffer
- 1 µl DTT (20 mM)
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl PowerScript Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Nach vorsichtigem Mischen der Proben erfolgte eine Inkubation bei 42°C für die Dauer von 1,5 h. Anschließend wurden den Reaktionsansätzen je nach eingesetzter RNA-Menge 20 µl (< 200 ng total RNA) oder 100 µl (> 200 ng total RNA) Tricine-EDTA-Puffer hinzugefügt. Nach einer Inkubation bei 72°C für 7 min konnte die so erhaltene 5'- bzw. 3'-RACE-Ready cDNA bei -20°C bis zu einer Dauer von 3 Monaten gelagert werden.

3.3.3.2 Amplifikation von 5'-/3'-cDNA Enden (RACE-PCR)

Für die Amplifikation von 5'- bzw. 3'-cDNA-Enden wurde wie folgt vorgegangen:

- 31 µl PCR-Grade H₂O
- 5 µl 10 x Advantage 2 PCR Puffer
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl 50 x Advantage 2 Polymerase Mix

Der Ansatz wurde gemischt und 5'-RACE- bzw. 3'-RACE-spezifisch die angegebenen Komponenten hinzugefügt:

5'-RACE-PCR

- 5 µl 5'-RACE-Ready cDNA
- 5 µl 10 x UPM (Universal Primer Mix)
- 1 µl GSP1 (Gen spezifischer Primer 1; 10 µM)

3'-RACE-PCR

- 5 µl 3'-RACE-Ready cDNA
- 5 µl 10 x UPM
- 1 µl GSP2 (10 µM)

Folgendes PCR-Programm („Touchdown PCR“; Don et al., 1991; Roux, 1995) wurde verwendet (T3 Thermocycler):

- 5 sec: 94°C
 - 3 min: 72°C
 - 5 sec: 94°C
 - 10 sec: 70°C
 - 3 min: 72°C
 - 5 sec: 94°C
 - 10 sec: 68°C
 - 3 min: 72°C
- } 5x
- } 5x
- } 30 - 40x

Nach Beendigung von 30 Zyklen im letzten Abschnitt der PCR wurden 5 µl des Reaktionsgemisches mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Zeigten sich keine oder nur schwache Banden, so wurden die Ansätze bis zu 10 weiteren Zyklen unterzogen.

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

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

- 10 µl 2 x NTP/Cap
- 2 µl 10 x Reaction Buffer
- 1 µg lineare DNA-Matrize
- 2 µl Enzyme Mix

Nach Inkubation für 1,5 h bei 37°C wurde 1 µl RNase-freie DNaseI (Ambion) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 15 min bei 37°C inkubiert, um die DNA-Matrize abzubauen. Beinhaltete das verwendete Plasmid anstatt eines SP6- einen T7- oder T3-RNA-Polymerase Promoter, so wurde für die RNA-Synthese die entsprechende Polymerase verwendet. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transkription wurde 1 µl des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.3.5 *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- oder Fluoreszein markiertem rUTP durchgeführt.

- 5 µl 5 x Transkriptionspuffer (Stratagene)
- 1 µl DTT (0,75 M)
- 1 µl Rnase Out (20 U/µl; Invitrogen)
- 3 µl Digoxigenin-/Fluoreszein-Mix
- 1,5 µl RNA Polymerase (50 U/µl)
- 1 µg lineare DNA-Matrize
- RNase freies dH₂O ad 25 µl

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA-Matrize nach Zugabe von 1 µl RNase-freier DNaseI (Ambion) 15 min bei 37°C verdaut. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transkription wurde 1 µl des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Digoxigenin-Mix: 10 µl rATP (10 mM); 10 µl rCTP (10 mM); 10 µl rGTP (10 mM); 6,5 µl rUTP (10 mM); 3,5 µl Dig-rUTP (10 mM, Roche)

Fluoreszein-Mix: 10 µl rATP (10 mM); 10 µl rCTP (10 mM); 10 µl rGTP (10 mM); 6,5 µl rUTP (10 mM); 3,5 µl Flu-rUTP (10 mM, Roche)

3.3.6 Aufreinigung synthetisch hergestellter RNA

Um synthetische RNA von Salzen, Enzymen und Nukleotiden abzutrennen, wurden die Reaktionsansätze mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Probe wurde dazu mit RNase-freiem dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und 350 µl Puffer RLT sowie 250 µl Ethanol hinzu pipettiert. Nach dem Mischen wurde die Lösung auf eine RNeasy-Säule übertragen und 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert (Eppendorf 5415 D). Es wurde zweimal durch Zugabe von 500 µl Puffer RPE und anschließendes Zentrifugieren bei 8000 x g für 15 sec gewaschen und die Säule danach durch Zentrifugation bei 8000 x g für 2 min getrocknet. Die RNA wurde anschließend mit 20 µl RNase-freiem dH₂O und 1 minütiger Zentrifugation bei 8000 x g in ein Eppendorfgefäß eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.4 DNA Methoden

3.4.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterien-Flüssigkulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur konnte durch Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm im Extinktionsbereich von 0 - 0,5 gegen einen Leerwert mit unbeimpftem Nährmedium verfolgt werden. Dazu wurden Einmal-Halbküvetten (1 ml) mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000) verwendet.

3.4.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die chemische Transformation

Zunächst wurden 5 ml LB Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie beimpft. Nach Wachstum ü.N. bei 37°C im Schüttelinkubator (Unitron) wurden mit dieser Vorkultur 300 ml LB-Medium in einem 2 l Kolben beimpft. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bis zu einer OD_{600} von 0,3. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,5 bei 18°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in 50 ml Falconröhrchen aliquotiert und 5min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellett in 15 ml vorgekühltem Transformationspuffer resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Suspensionen von jeweils drei Röhrchen vereinigt, wieder 5 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert und das Zellpellett erneut in 15 ml Transformationpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 525 µl DMSO unter leichtem Schütteln, 5 min Inkubation auf Eis und wiederholter Zugabe von 525 µl DMSO und 5 minütiger Inkubation wurde die Suspension in jeweils 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Transformationspuffer: 10 mM PIPES (pH 6,7 mit KOH einstellen), 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$ ($MnCl_2$ erst nach dem Autoklavieren dazugeben)

3.4.3 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für die elektrische Transformation

Zur Anzucht von Bakterien, die kompetent für die elektrische Transformation mit Plasmid-DNA waren, wurde zunächst ein Einzelkolonieausstrich des gewünschten Bakterienstammes auf LB-Agar-Platten (z.B. *E. coli* XL1-Blue mit 12,5 µg/ml Tetracyclin) angefertigt und 20 ml LB-Flüssigmedium mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert. Nach Inkubation über Nacht unter Schütteln bei 37°C (Unitron) 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 und

8000 x g (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zunächst im Ausgangsvolumen mit 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.

3.4.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zum Transfer von Plasmiden in *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurde ein 200 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, bis zu 20 µl Ligationsprodukt hinzugegeben und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Hitzeschock bei 42°C, 90 sec und Inkubation für 3 min auf Eis wurde das Plasmid in die Zellen aufgenommen. Dem Ansatz wurden 800 µl LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien für 45 min bei 37°C unter leichtem Schütteln (Thermomixer compact) angezogen. 200 µl der Bakteriensuspension wurden mittels steriler Glaskügelchen auf zuvor bei 37°C angewärmte LB-Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank (BM400) inkubiert.

3.4.5 Elektrische Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Elektrottransformation wurde das Elektroporationsgerät „*E. coli* Pulser“ verwendet. Vor der Pulsgabe wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Ein Aliquot mit 40 µl elektrokompenten Bakterien in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl Ligationsprodukt vermischt. Der Transformationsansatz wurde anschließend vollständig in eine Elektroporationsküvette (Eurogentec; d = 0,1 cm) überführt und luftblasenfrei an den Boden der Küvette geklopft. Die Elektroporation wurde mit einem Puls von 2,4 kV durchgeführt. Sofort nach der Pulsgabe wurden 0,5 ml LB-Medium in die Küvette pipettiert und gut mit der Bakteriensuspension vermischt. 200 µl dieses Ansatzes wurden mittels steriler Glaskügelchen auf zuvor bei 37°C angewärmte LB-Agarplatten ausplattiert, die ein der Plasmidresistenz entsprechendes Selektivantibiotikum sowie, bei Verwendung des *pGEM-T*-Plasmids, je 60 µl IPTG und X-Gal, welche eine spätere „Blau-Weiß-Selektion“ zur Kontrolle einer erfolgreichen Insertion ermöglichen, enthielten. Die mit Bakteriensuspension benetzten Kügelchen wurden außerdem zusätzlich auf eine zweite LB-Agarplatte mit gleichen Zusätzen wie oben gegeben, um einen weniger dichten Koloniewuchs zu erzielen. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C im Brutschrank (BM400) inkubiert.

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

3.4.6 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab

Für die Plasmidpräparation im analytischen Maßstab wurde das QIAprep[®] Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurden 3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß durch zweimalige Zentrifugation bei 16000 x g für 5 min (Eppendorf 5415 D) sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 250 μ l Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 250 μ l Puffer P2 und viermaligem Invertieren lysiert. Zum Abtrennen von Protein- und Zellwandbestandteilen wurden 350 μ l Puffer N3 dazugegeben, der Ansatz gemischt und bei 16000 x g für 10 min zentrifugiert. Der so entstandene klare Überstand wurde durch Dekantieren auf eine QIAprep-Säule überführt und bei 16000 x g für 1 min zentrifugiert. Nach Waschen der Säule mit 750 μ l Puffer und Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g wurde dieselbige durch 1 minütiges Zentrifugieren bei 16000 x g getrocknet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß durch 1 minütiges Zentrifugieren mit 50 μ l 1 x TE-Puffer. Das Eluat wurde bei -20°C gelagert.

3.4.7 Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab

Für die Plasmidpräparation im präparativen Maßstab wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurden 50 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in einem 50 ml Falconröhrchen durch Zentrifugieren für 15 min bei 6000 x g und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und die Zellsuspension in ein 12 ml PPN-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2, viermaligem Invertieren und fünfminütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen lysiert. Nach Hinzufügen von 4 ml kaltem Puffer P3 und viermaligem Invertieren fand eine Inkubation auf Eis für 10 min statt. Zum Abtrennen von Protein- und Zellwandbestandteilen erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation des Röhrchens bei 20000 x g und 4°C (Sorvall RC-5B Plus). Währenddessen wurde eine QIAGEN-tip 100-Säule durch Beschicken mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Zum Binden der Plasmid-DNA wurde die Säule mit dem durch Zentrifugation gewonnenen Überstand beschickt und anschließend mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 12 ml PPN-Röhrchen mittels 5 ml Puffer QF. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol, Mischen und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 15000 x g und 4°C wurde die DNA präzipitiert. Das entstandene Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in 50 μ l 1 x TE-Puffer aufgenommen und gelöst. Die Lagerung erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei -20°C oder 4°C.

3.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäure-Konzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000) 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

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

3.4.9 PCR-vermittelte *in vitro*-Mutagenese

Zur gezielten Veränderung von DNA-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 DpnI degradiert, während das mutierte, unmethylierte PCR-Syntheseprodukt erhalten blieb. Nach Transformation (s. 3.4.7) von XL1-Blue Zellen wurden die Strangbrüche im Vektor durch bakterielle Reparaturenzyme repariert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.4.10 Nachweis der Integration klonierter DNA-Fragmente

Die Integration klonierter DNA-Fragmente in einen Vektor wurde durch PCR auf Flüssigkultur-Aliquots oder Restriktionsanalyse überprüft.

3.4.10.1 PCR auf Flüssigkultur-Aliquots (Colony-PCR)

Es wurden einzelne Bakterien-Kolonien in jeweils 100 μl Flüssigselektivmedium für 3-4 h im Schüttler (Innova 4230) bei 37°C angezogen. Ein Reaktionsansatz der Colony PCR folgte folgendem Schema:

- 2,5 μl PCR-Puffer II (incl. 25 mM MgCl_2 ; Qbiogene)
- 1 μl Bakterien-Kultur
- 0,5 μl Oligonukleotid (10 μM ; forward)
- 0,5 μl Oligonukleotid (10 μM ; reverse)
- 0,2 μl dNTPs (25 mM; Biomol)

- 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl; Qbiogene)
- dH₂O ad 25 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet (T3 Thermocycler):

- 2 min: 95°C
 - 45 min: 95°C
 - 45 sec: 56°C
 - 1-3 min: 72°C
 - 10 min: 72°C
- } 30-35x

Die Analyse der Reaktionsansätze erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 100 mM wurden zu gleichen Anteilen vermischt (Endkonzentration jeweils 25 mM)

3.4.10.2 Restriktionsanalyse

Eine Überprüfung der Integration gewünschter DNA-Fragmente in den verwendeten Vektor konnte auch nach Plasmidpräparation mit Hilfe von Restriktionsenzymen erfolgen. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

- 100-200 ng Plasmid-DNA
- 1 µl 10 x Restriktionspuffer (New England Biolabs GmbH; Fermentas GmbH)
- 1 µl Restriktionsendonukleasen (1:1; je 50 U/µl; New England Biolabs GmbH, Fermentas GmbH)
- dH₂O ad 10 µl

Nach 1,5-2 h Inkubationszeit wurde der komplette Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.4.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit dem "Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems). Das angewendete Verfahren basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Im Ansatz sind Didesoxyanaloga der vier verschiedenen dNTPs (ddNTPs) 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 Gemisch unterschiedlicher Kettenlängen erzeugt wird. Nach der Auftrennung dieses Gemisches über mit Polymer gefüllte Kapillaren (Abi Prism® 3100 Genetic Analyzer) können die jeweils 3'-terminalen Nukleotide der unterschiedlich langen DNA-Moleküle mittels eines Lasers detektiert werden.

- 200 ng DNA-Matrize
- 1 µl Oligonukleotid (10 µM)
- 1 µl „Seq-Mix“
- 2 µl 5 x „Seq-Puffer“
- dH₂O ad 10 µl

Die PCR folgte folgendem Programm (UNO II Thermoblock, Biometra):

- 2 min: 96°C
 - 30 sec: 96°C
 - 20 sec: 50°C
 - 4 min: 60°C
- } 26x

Zur Aufreinigung wurden 1 µl EDTA (125 mM), 1 µl NaAc (3 M) sowie 50 µl 100% Ethanol zugesetzt, der Ansatz 5 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 16000 x g (Eppendorf 5415 D) zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde einmal mit 70 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Nach vollständigem Trocknen des DNA-Pellets (Concentrator 5301) wurde dieses in 30 µl dH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Alle weiteren Schritte (Auftrennung der Proben und Dokumentation) wurden im hauseigenen Sequenzierlabor durchgeführt.

Computergestützte Sequenzanalysen konnten mit Hilfe der Programme Lasergene, MacMolly® Tetra und des BLAST-Suchsystems für Datenbanken durchgeführt werden.

3.4.12 Plasmidlinearisierung

Zur Linearisierung von DNA-Plasmiden für eine anschließende *in vitro* RNA-Synthese wurde wie folgt vorgegangen:

- 10 µg Plasmid
- 5 µl 10 x Restriktionspuffer (New England Biolabs GmbH; Fermentas GmbH)
- 1 µl Restriktionsendonuklease (50 U/µl; New England Biolabs GmbH, Fermentas GmbH)
- dH₂O ad 50 µl

Das Reaktionsgemisch wurde ü.N. bei 37°C (BM400) inkubiert und ein 1 µl Aliquot durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Linearisierte DNA zeigt ein gegenüber zirkulärer DNA deutlich verändertes Laufverhalten im Agarosegel. Eine erfolgreiche Linearisierung ist deshalb durch den Vergleich beider Formen einfach festzustellen.

3.4.13 Restriktionsspaltung von Vektor-DNA und DNA-Fragmenten

Zur Vorbereitung auf eine Ligation von DNA-Fragmenten mit dem *pCS2+*-Vektor wurden selbige mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut, um für die Ligation notwendige komplementäre 5'- und 3'-Enden zu erhalten.

- 0,5-5 µg DNA
- 5 µl 10 x Restriktionspuffer (New England Biolabs GmbH; Fermentas GmbH)
- 1 µl Restriktionsendonukleasen (1:1; je 50 U/µl; New England Biolabs GmbH, Fermentas GmbH)
- dH₂O ad 50 µl

Das Reaktionsgemisch wurde ü.N. bei 37°C (BM400) inkubiert und anschließend mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (s. 3.4.15.2) aufgereinigt.

3.4.14 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, wurden diese in einer Agarosematrix einem horizontalen elektrischen Feld ausgesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele aus 0,8-2,2% (w/v) Agarose in TBE-Puffer verwendet, denen zum Nachweis der DNA-Banden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben wurde. Vor dem Auftragen der DNA-Proben in die Geltaschen wurden diese mit 1 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophoresen wurden bei 250 mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer (hauseigene Werkstatt) in TBE-Laufpuffer durchgeführt.

Anschließend wurden die DNA-Banden mittels eines Videodokumentationssystems (Chemidoc) dokumentiert. Durch paralleles Auftrennen einer Molekulargewichtsstandardlösung konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

2 x DNA-Probenpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 1 mM EDTA; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol; 30% (v/v) Glycerin

DNA-Molekulargewichtsstandard One kb Ladder: 1 x DNA-Probenpuffer; 1/20 Vol. 10 x Boehringer Puffer H; 0,4 Vol. 1 x TE; 50 ng/µl One kb Ladder (1 µg/µl, Invitrogen)

3.4.15 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.4.15.1 Aufreinigung von PCR-Produkten und linearisierten Plasmiden

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie von linearisierten Plasmiden erfolgte mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen). Dazu wurden die Reaktionsansätze in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt und der gesamte Ansatz nach Zugabe von 500 µl Puffer-PB auf eine Säule mit DNA-bindender Silicagel-Membran gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 16000 x g (Eppendorf 5415 D) wurde die Säule durch Zugabe von 750 µl Puffer-PE und Zentrifugation für 1 min gewaschen. Eine Trocknung der Membran erfolgte durch erneutes, einminütiges Zentrifugieren der Säule bei 16000 x g. Anschließend wurde die gebundene DNA mit 20 µl RNase-freiem H₂O (linearisierte Plasmide) oder 20 µl dH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eluiert. Die aufgereinigten Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.4.15.2 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Wurden durch PCR Produkte verschiedener Längen erhalten, so erfolgte die Isolation eines oder mehrerer Fragmente durch Gelextraktion mit Hilfe des QIAEX[®] Gel Extraction Kit (Qiagen). Dazu wurden die betreffenden Banden nach Auftrennung des gesamten Reaktionsansatzes in einem 1-1,5%igen Agarosegel über einem UV-Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 366 nm ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgenommen. Nach Zugabe von 3 Vol. QX1-Puffer (100 mg Gel ≈ 100 µl) wurden die Gelstücke durch zehninütiges Inkubieren im Wasserbad bei 50°C unter gelegentlichem Vortexen vollständig gelöst. Nach Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol wurde der gesamte Ansatz auf eine Säule mit DNA-bindender Silicagel-Membran gegeben und für 1 min bei 16000 x g (Eppendorf 5415 D) zentrifugiert. Zum Waschen wurden 750 µl Puffer-PE auf die Säule gegeben und diese für 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Nach Trocknen der Säule durch erneutes einminütiges Zentrifugieren wurde die gebundene DNA mittels 30 µl dH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 16000 x g eluiert. Die Lagerung des Eluats erfolgte bei -20°C.

3.4.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur direkten Verknüpfung von mittels *Taq*-Polymerase erzeugten PCR-Produkten mit *pGEM-T*-Vektor-DNA bzw. von mittels Restriktionspaltung vorbereiteter DNA-Fragmente und *pCS2+*-Vektor-DNA wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

- 50-100 ng DNA-Fragment
- 1 µl 10 x T4-Ligase-Puffer (Promega)
- 1 µl *pGEM-T*/*pCS2+*- Vektor-DNA (50-100 ng/µl)

- 1 µl T4-DNA-Ligase (3 U/µl, Promega)
- dH₂O ad 10 µl

Die Ligation erfolgte ü.N. bei 4°C.

3.4.17 Durchmustern einer cDNA-Bank

Zum Erhalt zusätzlicher Sequenzinformation in 5'-Richtung wurde eine fraktionierte λ-ZAP Express cDNA-Phagenbibliothek (Stratagene) aus Köpfen von Stadium 28-31 *Xenopus laevis* Embryonen mit Hilfe der PCR unter Verwendung cDNA-spezifischer Oligonukleotide durchmustert. Dabei wurde der gesuchte Phage, der die gewünschte cDNA enthielt, durch wiederholte Verdünnung und Amplifikation positiver Fraktionen angereichert und anschließend einer PCR mit Hilfe eines phagenspezifischen und eines cDNA-spezifischen Oligonukleotids unterzogen. Da der in dieser Phagenbank verwendete Vektor (ZAP Express[®] Vector) gerichtetes Klonieren von cDNA erlaubt, ist so die gezielte Amplifikation von 5'-cDNA-Fragmenten möglich.

3.4.17.1 Identifikation positiver Phagenfraktionen

Zum Test der einzelnen Phagenfraktionen auf Vorhandensein der gesuchten cDNA, wurden Aliquots der jeweiligen Überstände einer PCR mit für diese cDNA spezifischen Oligonukleotiden unterzogen:

- 2 µl Phagenüberstand
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer II (incl. 25 mM MgCl₂, Roche)
- 0,5 µl spezifisches Oligonukleotid (10 µM; forward)
- 0,5 µl spezifisches Oligonukleotid (10 µM; reverse)
- 0,2 µl dNTPs (25 mM, Biomol)
- 0,5 µl Ampli[®]Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, Roche)
- dH₂O ad 25 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet (T3 Thermocycler):

- 2 min: 95°C
 - 1 min: 95°C
 - 45 sec: 60°C
 - 1 min: 72°C
 - 15 min: 72°C
- } 38x

Zur Analyse wurden 5 µl des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.4.17.2 Phagenplattierung

Wurden durch PCR innerhalb der Phagenbank positive Fraktionen bestimmt, so wurden diese durch Ausplattieren auf 96-Loch-Mikrotiterplatten zunächst ausverdünnt und die „Subfraktionen“ anschließend angereichert. Dazu wurde zunächst ein Einzelkolonieausstrich des Bakterienstammes *E. coli* XL1-Blue MRF^c auf tetracyclinhaltigen LB-Agarplatten angefertigt. Eine Einzelkolonie wurde dann in 50 ml LB-Flüssigmedium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-1,0 herangezogen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 500 x g und 4°C (Sorvall RC-5B) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ zu einer OD_{600nm} von 0,5 resuspendiert. Zum Adherieren der Phagen an die Wirtszellen wurden 200 µl der Bakteriensuspension zusammen mit 10 bzw. 2 µl Phagenüberstand (zuzüglich 8 µl SM-Puffer, um gleiche Gesamtvolumina zu erhalten) aus den positiven Fraktionen in 12 ml PPN-Röhrchen für 15 min bei 60 Upm und 37°C geschwenkt (Innova 4230). Zum Ausplattieren wurden die Ansätze in je 6,4 ml NZY-Medium aufgenommen und in 100 µl Aliquots auf 8 x 8 Matrizen in 96-Loch Mikrotiterplatten verteilt. Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen und ü.N. bei 37°C im Schüttler (Innova 4230) inkubiert. Zum Test der so herangezogenen „Subfraktionen“ auf die gesuchte cDNA wurden die einzelnen Ansätze der Mikrotiterplatte zunächst zu acht Gruppen zusammengefaßt. Dabei wurden je 10 µl der Vertiefungen der horizontalen Reihen A (1-8) bis H (1-8) verwendet. Aus den gebildeten Gruppen (A bis H) wurden dann 2 µl der in 3.4.17.1 beschriebenen PCR unterzogen. Wurden positive Gruppen ermittelt, so wurden die zugehörigen acht Einzelfraktionen einzeln mittels PCR getestet. Positive Einzelfraktionen wurden erneut ausplattiert und die Prozedur wiederholt.

3.4.17.3 Amplifikation spezifischer 5'-Fragmente

Wurde der Phage, der die gewünschte cDNA enthielt, durch obige Verfahren angereichert, wurde mit der ihn enthaltenen Fraktion eine PCR mit vektorspezifischen, strangaufwärts der Klonierungsstelle liegenden Oligonukleotiden (*CMV-F*) sowie dem bereits verwendeten rückwärtsgerichteten, cDNA spezifischen Oligonukleotid durchgeführt. Produkte, die möglicherweise zusätzliche 5'-Sequenzinformation enthielten, wurden aufgereinigt, in *pGEM-T* ligiert und sequenziert.

3.5 Protein Methoden

3.5.1 *In vitro* Translation

Für die *in vitro* Translation von Proteinen wurde das TnT[®]-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) verwendet, das eine Kopplung von Transkription und Translation und so die Proteinsynthese mit einem Expressionsvektor als Ausgangsmaterial ermöglicht.

- 6,25 µl TnT[®] Rabbit Reticulocyte Lysate
- 0,5 µl TnT[®] Reaction Buffer
- 0,25 µl TnT[®] SP6 RNA Polymerase
- 0,25 µl Amino Acid Mixture, Minus Methionine (1 mM)
- 0,5 µl [³⁵S]Methionine (> 1000 Ci/mmol at 10 mCi/ml)
- 0,25 µl RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)
- 0,5 µl DNA DNA-Matrize (0,5 µg/µl)
- 1 µl Morpholino-Antisense-Oligonukleotid (1 mM; optional)
- dH₂O ad 12,5 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C für 90 min inkubiert (Thermomixer compact) und anschließend durch SDS-PAGE (3.5.2.2) aufgetrennt. Zur Darstellung der radioaktiv markierten Translationsprodukte wurde das Gel anschließend für 1,5 h bei 70°C getrocknet (Model 583 Gel Dryer) und mit Hilfe des Variable Mode Imager Typhoon 9400 analysiert.

3.5.2 Nachweis von Fusionsproteinen *in vivo*

Zum Nachweis der Translation von Fusionsproteinen *in vivo* wurden diese durch Immunpräzipitation (3.5.2.1) isoliert und mittels Western Blotting (3.5.2.3) detektiert.

3.5.2.1 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von *in vivo* translatierten Fusionsproteinen wurden die entsprechenden synthetischen mRNAs in beide Zellen eines Zweizell-Stadiums injiziert und die Embryonen nach Erreichen des NF Stadiums 9 mit Hilfe einer 1 ml-Spritze mit G27-Kanüle in IP-Puffer auf Eis homogenisiert (240 µl IP-Puffer/12 Embryonen). Nach Zentrifugation für 15 min bei 16000 x g und 4°C (Eppendorf 5415 D) wurde der Überstand abgenommen und mit IP-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Zum Binden an das Fusionsprotein wurde der jeweilige Antikörper hinzugegeben (anti-Flag, anti-*c-myc*; 1:500; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und der Ansatz 2 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Kopplung des Antikörpers an Protein-G-Sepharose wurden 20 µl zuvor mit IP-Puffer gewaschener GammaBind[™] Plus Sepharose[™] (Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben und der Ansatz erneut für 2 h bei 4°C auf einem Drehrad

inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 20 sec bei 10000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Sepharose-Antikörper-Fusionsprotein-Komplexe wurden dreimal mit jeweils 1 ml IP-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte in 60 µl 1 x SDS-Probenpuffer bei -20°C. Zur Auftrennung mittels SDS-PAGE (3.5.2.2) wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert (GFL1002) und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

IP-Puffer: 40 mM Tris-HCL pH 7,8; 100 mM NaCl; 0,5% (v/v) Nonidet P40; 1 mM PMSF; eine Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche); sterilfiltrieren

1 x SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris-HCL pH 6,8; 100 mM Dithiothreitol; 2% SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 10% (v/v) Glycerol

3.5.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden gemäß ihres Molekulargewichts in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zur Fokussierung der Proben wurde dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet. Ein Trenngel (10% Acrylamid) setzte sich wie folgt zusammen:

- 10% (v/v) 30% Acrylamid Mix (Rotiphorese[®] Gel 30; Carl Roth GmbH + Co. KG)
- 375 mM Tris (pH 8,8)
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,04% (v/v) TEMED

Das Sammelgel (5%) enthielt folgende Komponenten:

- 5% (v/v) 30% Acrylamid Mix (Rotiphorese[®] Gel 30; Carl Roth GmbH + Co. KG)
- 125 mM Tris (pH 6,8)
- 0,1% (w/v) SDS
- 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1% (v/v) TEMED

Zum Gießen eines Gels der Maße 110 x 140 x 0,5 mm wurden 20 ml Trenngel-Lösung und 4 ml Sammelgel-Lösung verwendet. In etwa 1/8 des Gelvolumens wurde vom Sammelgel eingenommen. Die Auftrennung der jeweiligen Proteingemische erfolgte für ca. 3 h bei 35 mA in einer Gelkammer (Werkstatt des Instituts) in 1 x Elektrodenpuffer.

5 x Elektrodenpuffer: 125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5% SDS; pH 8,3

3.5.2.3 Western Blot

Zum Elektrotransfer von durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemischen auf Nitrocellulosemembranen und der nachfolgenden Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde eine mit dH₂O befeuchtete Nitrocellulosemembran (0,45 µm, BA85; Schleicher & Schuell) auf 3 Lagen mit Semi-Dry-Blot-Puffer befeuchtetem Filterpapier (Whatman) gelegt, darauf das Gel plaziert und mit 3 weiteren Lagen in Semi-Dry-Blot-Puffer getränktem Filterpapier luftblasenfrei bedeckt. Dieser „Sandwich“ wurde zwischen die angefeuchteten Flächenelektroden eines Elektrobplotgeräts (Fastblot B 34) plaziert. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² Nitrocellulosemembran über einen Zeitraum von 1,5 h. Nach kurzem Waschen in 1 x PBST wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen ü.N. in Blockierungspuffer bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und mit 10 ml in Blockierungspuffer verdünntem Erstantikörper (anti-Flag 1:10000; anti-c-myc 1:10000; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 2 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x PBST für jeweils 10 min wurde die Membran erneut eingeschweißt und in Blockierungspuffer mit verdünntem Zweitantikörper (anti-rabbit/HRP 1:15.000; Santa Cruz Biotechnology; anti-mouse/HRP 1:15000; Amersham Pharmacia Biotech) für 2 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in 1 x PBST für jeweils 10 min entfernt. Die Detektion der Peroxidase-Aktivität des Sekundäantikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL+ plus Western Blotting Detection Systems (Amersham Pharmacia Biotech). Dazu wurden die Detektions-Lösungen A und B in einem Verhältnis von 40:1 gemischt (100 µl Gesamtvolumen/cm² Membran), auf die Membran gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Zum Nachweis der Chemilumineszenz-Signale wurde die in Folie eingeschlagene Membran für 30 sec bis 10 min in einer Filmkassette gegen Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) exponiert und der Film entwickelt (Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR).

1 x Semi-Dry-Blot-Puffer: 48 mM Tris Base; 3 mM Glycin; 0,037% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol; pH 9,2; Lagerung bei 4°C

1 x PBST: 1 x PBS; 0,05% Tween-20

Blockierungspuffer: 20 mM Tris/HCl (pH 6,8); 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20; 5% Milchpulver

3.5.3 Nachweis der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen

Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen wurden Immunfärbungen an ganzen Embryonen (3.5.3.1) oder Paraffinschnitten (3.5.3.2) durchgeführt.

3.5.3.1 „Whole mount“ Immunfärbung

Nach Mikroinjektion (3.2.1) der für das betreffende Fusionsprotein kodierenden mRNA in Zweizell-Stadien von *Xenopus laevis* wurden die Embryonen nach Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums 1 h in MEMFA fixiert und zur Permeabilisierung der Zellen bei -20°C ü.N. in Dents gelagert. Durch eine absteigende Methanolreihe (75% Methanol/H₂O, 50% Methanol/H₂O, 25% Methanol/1 x PBS) und dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in 1 x PBS wurden die Embryonen rehydriert und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch eine fünfstündige Inkubation in 20% (v/v) Pferde-Serum/1 xPBS abgesättigt. Die Bindung des Primärantikörpers (anti-Flag 1:500; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; anti-*pH3* 1:500; Santa Cruz Biotechnology) erfolgte in 20% (v/v) Pferde-Serum/5% (v/v) DMSO/1 x PBS für 5 h bei RT. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für 2 h bei RT in PBS-TB, zweistündiges Waschen bei RT in PBS-TBN, dreimaliges Waschen für 5 min bei RT in PBS-TB und Waschen ü.N. bei 4°C in PBS-TB entfernt. Die Inkubation der Embryonen mit dem Sekundärantikörper (anti-rabbit/AP 1:1000; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) erfolgte in 20% (v/v) Pferde-Serum/5% (v/v) DMSO/1 x PBS für 5 h bei RT. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit PBS-TB (zweimal 30min), PBS-TBN (30min) und PBS-TB (ü.N., 4°C) entfernt. Die Farbreaktion zur Darstellung vorhandener Alkalischer-Phosphatase-Aktivität wurde wie in 3.6.7.1 durchgeführt. Zur „Klärung“ wurden die Embryonen nach Beendigung der Farbreaktion in 100% Methanol dehydriert und in Benzylbenzoat/Benzylalkohol (Volumenverhältnis 2:1) aufgenommen.

1 x PBS-TB: 1 x PBS; 0,05% (v/v) Tween-20; 0,2% (w/v) Boehringer Mannheim Blocking Reagenz (Roche Diagnostics GmbH); pH 7,4

1 x PBS-TBN: 1 x PBS-TB; 0,3 M NaCl; pH 7,4

3.5.3.2 Immunfärbung an Paraffinschnitten

Von Embryonen, die das betreffende Fusionsprotein enthielten, wurden Paraffin-Mikrotomschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden durch zweimaliges Waschen in Xylol für jeweils 10 min entwacht und anschließend durch eine absteigende Ethanolreihe (jeweils 2 min 100% Ethanol, 80% Ethanol, 50% Ethanol) und dreimaliges Waschen in 1 x PBS rehydriert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation in 0,25% (v/v) Triton-X-100/1 x PBS sowie, zum Blockieren unspezifischer Bindungen, eine 20 minütige

Inkubation in Blockierungspuffer 1. Zum Binden des Primärantikörpers wurden die Objektträger ü.N. in Blockierungspuffer 1 inklusive des verdünnten Antikörpers (anti-Flag 1:200; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; anti-*c-myc* 1:200; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) überschichtet und bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in 1% (v/v) Pferde-Serum/1 x PBS entfernt. Die Bindung des Sekundärantikörpers (anti-rabbit/Fitc 1:1000; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; anti-mouse/Cy3 1:1000; Dianova GmbH) erfolgte in Blockierungspuffer 1 für 1,5 h bei RT. Überschüssiger Antikörper wurde wiederum durch Waschen in 1% (v/v) Pferde-Serum/1 x PBS entfernt und die Objektträger mit DAPI Einbettungsmedium (Vectashield; Linaris Biologische GmbH, Wertheim) eingedeckelt.

Blockierungspuffer 1: 1 x PBS; 10% (v/v) Pferde-Serum; 4% (w/v) Boehringer Mannheim Blocking Reagenz (Roche Diagnostics GmbH); 0,25% (v/v) Triton-X-100; pH 7,4

3.5.4 Nachweis von proliferierenden oder apoptotischen Zellen

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

Eine Methode zur Untersuchung von Zellproliferation beruht auf dem Vorkommen von phosphoryliertem Histon 3 während der späten G2-Phase bis zur Telophase im Zellzyklus (Henzel et al., 1997; Paulson und Taylor, 1982). Unter Benutzung eines spezifischen Antikörpers gegen die phosphorylierte Form des Histon (*pH3*) können proliferierende Zellen nachgewiesen werden (Saka und Smith, 2001). Zum Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 wurde wie in 3.5.3.1 verfahren.

3.5.4.2 Nachweis von proliferierenden Zellen durch Inkorporation von BrdU

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises proliferierender Zellen besteht in der Verwendung des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU), welches in mitotischen Zellen im Zuge der DNA-Neusynthese eingebaut und anschließend mit Hilfe eines Antikörpers detektiert werden kann. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des BrdU-Labeling and Detection Kits II (Roche Diagnostics GmbH) nach Hardcastle und Papalopulu, 2000.

Um Zellproliferation in *Xenopus laevis* Embryonen nachweisen zu können, wurden nach Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums 0,5 (NF Stadium 32, Injektion in das anteriore Endoderm) bis 7 nl (NF Stadium 18, Injektion in die sekundäre Leibeshöhle) BrdU injiziert, die Embryonen für 2,5 h kultiviert und für 1 h in MEMFA fixiert. Alle Embryonen wurden in 100% Ethanol überführt und bei -20°C gelagert. 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 ein fünfmaliges Waschen für jeweils 5 min in 1 x PBS und eine Inkubation für 1 h in 2 N 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 eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Nach 30 min Äquilibriumierung 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 fünfmaliges Waschen für jeweils 5 min in 1 x PBS/0,1% Tween-20, 1 h Inkubation in 1 x PBS/20% Pferde-Serum und 5 h Inkubation in 1 x PBS/20% Pferdeserum/anti-mouse Ig-AP (1:10). Danach wurde dreimal für 15 min und ü.N. 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). Eventuell entstandene Hintergrundfärbung wurde durch Waschen mit 100% Methanol reduziert, die Embryonen anschließend in MEMFA fixiert und gelagert.

PBT: 1 x PBS; 2% Boehringer Mannheim Blocking Reagenz; 0,1% Triton-X-100; pH 7,4

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

3.5.4.3 Nachweis von apoptotischen Zellen durch TUNEL-Analyse

Während des programmierten Zelltodes (Apoptose) kommt es zur Fragmentierung von DNA, wodurch sogenannte „nick-ends“, freie Enden von DNA-Abbruchfragmenten entstehen. In der TUNEL-Analyse („Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-Nick-End-Labeling“) wird an diese Enden durch die Aktivität einer Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Digoxigenin-markiertes dUTP angehängt, welches durch spezifische Antikörper detektiert werden kann. Die TUNEL-Analyse in *Xenopus laevis* 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 (Invitrogen, 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/1 mM 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 sechsmal für 1 h und über Nacht in PBT gewaschen. Für die Farbreaktion wurden die Embryonen zweimal für 5 min in

Substratpuffer inkubiert und bis zum Erreichen einer ausreichend starken Färbung in Substratpuffer mit NBT (3,5 µl/ml, Roche) und BCIP (3,5 µl/ml, Roche) gefärbt. Durch eine absteigende Methanolreihe konnte eine mögliche Hintergrundfärbung reduziert werden.

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

3.6 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung

Um die räumliche und zeitliche Expression von Genen zu analysieren, wurde die endogene mRNA von *Xenopus laevis* Embryonen *in situ* mit komplementären, Digoxigenin- oder Fluoreszein-markierten antisense-RNA Sonden (3.3.5) hybridisiert und in einer Färbereaktion detektiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde markierte sense-RNA eingesetzt.

3.6.1 Rehydrieren der Embryonen

Soweit nicht anders erwähnt, wurde bei jedem Schritt 5 ml Lösung verwendet. Pro 5 ml Schraubdeckelröhrchen (Schütt Labortechnik GmbH) wurden nicht mehr als 30 Embryonen gleichzeitig behandelt.

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

- = Wippe

3.6.2 Proteinase-K Behandlung

Um die Embryonen durchlässiger für die RNA-Hybridisierungssonden zu machen, wurden sie bis zu 30 min bei RT in PTw-Puffer inkubiert, dem 2,5 µl Proteinase-K Lösung (Merck, 20 mg/ml) zugesetzt worden waren (Endkonzentration 10 µg/ml). Zeigten sich leichte Schäden an den Embryonen, wurde die Behandlung sofort abgebrochen.

3.6.3 Acetylierung und Refixierung

Die Embryonen wurden in 0,1 M Triethanolamin (pH 7,5) umgepuffert, durch zweimalige Zugabe von Acetanhydrid acetyliert und anschließend in PTw + 4% Formaldehyd (FA) refixiert.

	Puffer	Zugabe von	Dauer (min)	Anzahl
1.	Triethanolamin		5	2x -
2.	Triethanolamin	12,5 µl Acetanhydrid	5	1x ~
3.		12,5 µl Acetanhydrid	5	1x ~
4.	PTw 100%		5	2x -
5.	PTw + 4% FA		20	1x -
6.	PTw 100%		5	5x -

~ = Drehrad

3.6.4 Hybridisierung

Der PTw-Puffer wurde bis auf ca. 1 ml entfernt und 250 µl Hybridisierungslösung hinzugegeben. Nach dem Absinken der Embryonen in die Hybridisierungslösung wurde das Puffergemisch durch 2 ml Hybridisierungslösung ersetzt und die Röhrchen für 10 min bei leichtem Schwenken in der Dampfphase über einem Wasserbad (68°C) inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und die Embryonen für die Dauer von 6 h unter Schwenken in der Dampfphase prähybridisiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes und Zugabe der RNA-Sonde (Endkonzentration je 1 µg/ml) in 2 ml Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung in der beschriebenen Dampfphase unter leichtem Schwenken über Nacht. Bei Doppelfärbungen wurden beide RNA-Sonden in der angegebenen Konzentration zugegeben.

3.6.5 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	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Anzahl
1.	Hybridisierungs- Lösung	10	60	1x ≈
2.	2 x SSC	20	60	3x ≈
3.	2 x SSC mit RNAsen	30	37	2x ≡
4.	2 x SSC	10	RT	1x -
5.	0,2 x SSC	30	60	2x ≈

≈ = Dampfphase über Wasserbad (68°C)

≡ = Brutschrank; gelegentlich von Hand schwenken

3.6.6 Antikörper-Inkubation

Die Hybride aus Digoxigenin- bzw. Fluoreszein-markierter Sonden-RNA und endogener mRNA konnten mit Hilfe eines Digoxigenin- bzw. Fluoreszein-spezifischen Antikörpers, an den alkalische Phosphatase gekoppelt war, nachgewiesen werden (anti-Digoxigenin/AP; anti-Fluoreszein/AP; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Embryonen vor Zugabe des Detektions-Antikörpers in 2% Boehringer Mannheim Blocking Reagenz und 20% hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Biochrom KG, Berlin) inkubiert.

	Puffer	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Anzahl
1.	MAB	15	RT	2x -
2.	MAB + 2%BMB	30	RT	1x -
3.	MAB + 2% BMB + 20% Serum	60	RT	1x -
4.	MAB + 2% BMB +20% Serum +AK (1:5000)	240	RT	1x -

5.	MAB	30	RT	2x -
6.	MAB	ü.N.	4	1x -

3.6.7 Farbentwicklung

Je nach Art der gewünschten Färbung konnten die Embryonen in NBT/BCIP- oder FAST RED- (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) Lösung inkubiert werden. Alkalische Phosphatase setzt die Substrate NBT/BCIP zu einem dunkelvioletten, FAST RED zu einem rötlichen Farbstoff um.

3.6.7.1 NBT/BCIP-Färbung

	Puffer	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Anzahl
1.	MAB	5	RT	2x -
2.	APB	5	4	2x -
3.	APB + NBT/BCIP	30 min - 3 Tage	4°C in Alufolie	1x -

3.6.7.2 FAST RED-Färbung

	Puffer	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Anzahl
1.	MAB	60	RT	1x -
2.	dH ₂ O	2	RT	1x -
3	0,1 M Tris-HCL pH 8,2	15	4	2x -

4.	1 Stück FAST RED-Tabletten/ 2 ml 0,1 M Tris- HCL pH 8,2	30 min-1 Tag	RT	1x -
----	--	--------------	----	------

3.6.8 Abstoppen der Färbung und Auswertung

Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Färbereaktion durch Inkubation in 100% Methanol gestoppt und eine eventuelle Hintergrundfärbung unter optischer Kontrolle reduziert. Anschließend wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert und in 1 x MEMFA fixiert. In 1 x MEMFA-Puffer konnten sie bei 4°C gelagert werden.

	Lösung	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Anzahl
1.	Methanol 100%	1-5	RT	1x -
2.	Methanol 75%	1	RT	1x -
3.	Methanol 50%	1	RT	1x -
4.	Methanol 25%	1	RT	1x -
5.	MEMFA	15	RT	1x -
6.	MEMFA	ü.N.	RT	1x -

Mit Hilfe eines Stereomikroskops (SZX12) mit Kameraaufsatz (Evolution™MP Digital Camera) und eines Computers wurden die Ergebnisse dokumentiert. Eine nachträgliche Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der Bildbearbeitungssoftware Photoshop 7.0 (Adobe Systems GmbH).

3.6.9 Doppelfärbungen

Für Doppelfärbungen (NBT/BCIP + FAST RED) wurde zunächst die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde der Färbung mittels anti-Digoxigenin-AP und FAST RED unterzogen. Nach Erreichen der gewünschten Intensität der Färbung wurde die Phosphatase-Aktivität des Antikörpers durch 15-30 minütige Inkubation in 1 x MAB/100 mM EDTA bei 65°C im Wasserbad inaktiviert und das Protokoll ab 3.6.6 für den Fluoreszein-Antikörper und die Färbung mittels NBT/BCIP wiederholt.

1 x PTw: 1 x PBS; 0,1% (v/v) Tween-20; pH 7,4

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

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

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

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

10% BMB: 1 x MAB wurde mit 10% (w/v) BMB (Boehringer Mannheim Blocking Reagenz) zum Lösen erhitzt, autoklaviert und in Aliquots á 50 ml eingefroren.

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

Färbelösung NBT/BCIP: Pro ml APB wurden 3,5 µl NBT (100 mg/ml in 70% Dimethylformamid; Roche Diagnostics GmbH) und 3,5 µl BCIP (50 mg/ml in 100% Dimethylformamid; Roche Diagnostics GmbH) eingesetzt.

3.7 Anfertigung von Gewebeschnitten

3.7.1 Vibratomschnitte

Die Anfertigung von 30 µm Gewebeschnitten erfolgte mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT1000S). Dazu wurden 1,5 ml Gelatine/Albumin-Einbettungsmedium in einem Wägeschälchen auf Eis mit 105 µl 25% Glutardialdehyd-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) vermischt und luftblasenfrei in eine Kunststoffform (Peel-A-Way[®], Polysciences Inc.) gegossen. Die ausgewählten Embryonen wurden für ca. 10 min in Einbettungsmedium äquilibriert und auf den in der Zwischenzeit verfestigten Sockel gebettet. Überschüssiges Medium wurde entfernt und der Embryo mit 1,5 ml Einbettungsmedium, vermischt mit 105 µl 25% Glutardialdehyd-Lösung, überschichtet. War der so entstandene Block verfestigt, wurde er aus der Kunststoffform herausgelöst und mit Hilfe einer Rasierklinge zurechtgeschnitten. Das Objekt wurde anschließend mit Sekundenkleber so auf einen Metallträger aufgeklebt, so dass der Embryo in der richtigen Orientierung ausgerichtet war. Der Träger wurde in das Vibratom

eingespannt und es wurden submers in dH₂O 30 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Hilfe einer Kanüle auf mit Seife gespülte Objektträger überführt wurden. Nach kurzem Antrocknen wurden die Schnitte mit Moviol-Lösung eingebettet, mit einem Phasenkontrastmikroskop mit Nomarski-Optik (Axioskop) und Kameraaufsatz (DXC-950P Color Video Camera) ausgewertet, in einen Computer eingelesen und bearbeitet.

Gelatine/Albumin Einbettungsmedium: 1 x PBS; 4,88 mg/ml Gelatine; 0,3 g/ml Albumin; 0,2 mg/ml Sucrose. Die Gelatine wurde durch Erhitzen auf ca. 60°C gelöst, nach dem Abkühlen Albumin und Sucrose zugefügt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Moviol-Lösung: 9,6 g Moviol in 19,35 ml 100% Glycerin lösen, 1 h Rühren. Zugabe von 24 ml dH₂O, 2 h Rühren. Zugabe von 48 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8.5), 10 min Erhitzen auf 50°C, 15 min bei 5000 Upm abzentrifugieren. Überstand aliquotiert bei -20°C lagern.

3.7.2 Kunststoffschnitte

Zur Anfertigung von Kunststoffschnitten wurden die Embryos in ein Epoxidharz (Technovit 7100, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG) 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 5 min, 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 Sockel ausgerichtet. Die Embryonen wurden mit 1,5 ml Einbettmedium überschichtet und die Formen mit den Präparaten mit Parafilm luftdicht verschlossen. Die Blöcke wurden über Nacht bei 37°C ausgehärtet und anschließend aus den Formen gehobelt. Nach dem Trimmen mit einer Säge wurden die Präparate mit Sekundenkleber auf einen Plastik-Objektträger aufgeklebt und in ein Microtom (Leica RM2065) eingespannt. Es wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt, die zur Glättung mit einer Pinzette auf einen mit dH₂O beschichteten Objektträger aufgelegt wurden. Die Präparate wurden auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet. Die Einbettung erfolgte in ENTELLAN-Lösung (Merck). Die Dokumentation erfolgte wie unter 3.7.1 beschrieben.

Präinfiltrationsmedium: 50% Technovit 7100; 50% Ethanol

Infiltrationsmedium: 100 mg Härter I in 10 ml Technovit 7100 lösen und sterilfiltrieren

Einbettmedium: 1 ml Härter II in 15 ml Infiltrationsmedium

3.7.3 Paraffinschnitte

Die Dehydrierung der Embryonen erfolgte zweimal für 20 min in 100% Ethanol und einmal für 20 min in 100% Xylol. Das Paraffin (PolyFin, Polysciences Inc.) wurde bei 60°C verflüssigt und die Embryonen in einem Heizblock zweimal für 1 h und anschließend über Nacht mit Flüssig-Paraffin infiltriert. Zur Einbettung wurde etwas Flüssig-Paraffin in einer Kunststoffform (Peel-A-Way[®], Polyscience Inc.) vorgelegt, die sich auf einer eiskalten Metallplatte befand. Unmittelbar danach wurde der äquilibrierte Embryo hinzugegeben 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 getrimmt, durch kurzes Anschmelzen der Unterseite auf einen hölzernen Objekthalter aufgeklebt und in ein Mikrotom (Leica RM2065) eingespannt. Die Schnittserien von 5 µm Dicke wurden mit Hilfe von Pinzetten auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel GmbH & Co KG) übertragen, die mit 75% Ethanol benetzt worden waren, und auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet. Die Paraffinschnitte wurden in Immunfärbungen (s. 3.5.3.2) eingesetzt.

4. Experimente und Ergebnisse

4.1 Die Klonierung des *Eyes absent* Homologs 3 aus *Xenopus laevis* (*Xeya3*)

Bis heute sind in *Vertebraten* vier Homologe des *Drosophila eyes absent* (*eya*) Gens bekannt. Untersuchungen an einer *Eya1*^{-/-}-Mutante der Maus (Xu et al., 1999) sowie das Auftreten des Branchio-Oto- bzw. des Branchio-Oto-Renalen-Syndroms bei Menschen mit Mutationen im *EYAI*-Locus (Abdelhak et al., 1997) weisen diesem Mitglied der *Eya*-Familie essentielle Funktionen während der Entwicklung der betroffenen Organe wie z.B. Ohr und Niere zu. Bezüglich einer Beteiligung von Mitgliedern der *Eya*-Familie im Rahmen der Embryonalentwicklung des Vertebratenauges ist wenig bekannt, jedoch scheint ein Zusammenhang zwischen *EYAI*-Mutationen und dem Auftreten von angeborenen Katarakten zu bestehen (Azuma et al., 2000).

In *Xenopus laevis* wurden bisher zwei *eyes absent* Homologe, *Xeya1 α/β* (David et al., 2001) und *Xeya2* (Kriebel, 2001 (Diplomarbeit)), isoliert. Diese werden insbesondere innerhalb cranialer Plakoden stark exprimiert, im Bereich der Augenanlagen sind jedoch zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung Transkripte nachweisbar.

Zur Klonierung weiterer *eyes absent* homologer cDNAs aus *Xenopus laevis* wurde mit Hilfe der cDNA-Sequenz des humanen *eyes absent* Homologs 3 (*EYA3*) ein Abgleich mit einer *Xenopus*-EST Datenbank durchgeführt (*Xenopus* EST Blast Server; http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/x_tropicalis). Der Sequenzabgleich eines so erhaltenen EST-Klons (Acc.-No.: AW643370) mit einer Proteinsequenzdatenbank (blastx, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul et al., 1997) zeigte das Vorhandensein der putativen *Xeya3*-Translations-Initiationsstelle innerhalb der EST-Sequenz. Zum Erhalt der vollständigen Sequenz einer *Xeya3*-cDNA wurde eine RACE-PCR in 3'-Richtung durchgeführt (Oligonukleotid: *Xeya3*-3'-Race), die den vollständigen Leserahmen lieferte (s. Abb. 4.1). Durch einen Vergleich der daraus abgeleiteten, putativen Aminosäuresequenz mit bekannten *Vertebraten Eya*-Homologen (blastx; MegAlign, Lasergene) konnte die Zugehörigkeit der erhaltenen cDNA zur *Eya3*-Subklasse eindeutig bestimmt werden (s. auch Abb. 4.2, 4.3). Die proteinkodierende Region der *Xeya3*-cDNA wurde mittels RT-PCR aus *Xenopus laevis* NF-Stadium 36 total RNA-Präparationen amplifiziert (Oligonukleotide: *Xeya3*-cfs-F2, *Xeya3*-cfs-R) und in den Vektor *pGEM-T* kloniert. Anschließend wurde der offene Leserahmen (ORF) der *Xeya3*-cDNA zu Überexpressionszwecken in den Vektor *pCS2+* subkloniert (s. 2.8.2; Oligonukleotide: *Xeya3*-F-Cla1, *Xeya3*-R-Xho1). Zur Herstellung *c-myc*-(MEQKLISEEDLNE) bzw. Flag-(PDYKDDDDK) Epitop tragender *Xeya3*-Fusionsproteine wurde der ORF der *Xeya3*-cDNA in *pCS2+ MT* bzw. *pCS2+*, nach Hinzufügen des Flag-Epitops über das rückwärtsgerichtete Oligonukleotid mittels PCR, subkloniert (s. 2.8.2; Oligonukleotide: *Xeya3*-F-Stu1, *Xeya3*-R-Xho1; *Xeya3*-F-Cla1, *Xeya3*-Flag-R-Xho1).

AS: M E N G Q D L A E Q P V K K P K M Q
 N: ATG GAG AAC GGA CAG GAT TTA GCA GAG CAG CCG GTA AAG AAA CCC AAA ATG CAG
 Pos.: 9 18 27 36 45 54

D S G E E G L S Q V G N N E S S D R K A
 GAT TCT GGA GAG GAG GGT TTA AGT CAA GTG GGC AAC AAT GAA AGC AGT GAT AGA AAA GCA
 63 72 81 90 99 108

E P S S N M S S N Q T M P S E I L P C A
 GAG CCA TCT TCA AAT ATG TCA TCA AAC CAA ACT ATG CCC AGT GAA ATT CTA CCC TGT GCC
 123 132 141 150 159 168

D Y I L R A N D Y A S Q I Y P A K S Y T
 GAT TAC ATT CTA CGT GCA AAT GAC TAT GCT TCA CAG ATC TAT CCT GCA AAA TCA TAT ACC
 183 192 201 210 219 228

H I L S V P V A E T V A T Y T G Q T Q Y
 CAC ATC CTC TCG GTA CCA GTA GCA GAA ACT GTG GCA ACA TAT ACT GGG CAA ACA CAG TAT
 243 252 261 270 279 288

Q T L Q P S Q P Y T V Y P K A S P T Y G
 CAA ACT TTG CAG CCA TCT CAG CCA TAC ACC GTT TAC CCT AAG GCT TCA CCA ACA TAT GGT
 303 312 321 330 339 348

L P A F G A L W P G I K S G S G F I Q T
 CTA CCT GCC TTT GGA GCC TTA TGG CCA GGT ATC AAA TCT GGA AGT GGA TTT ATT CAG ACA
 363 372 381 390 399 408

P S S P V V L T S S G V T S S Q V Q S C
 CCA TCT TCA CCT GTT GTG CTA ACA TCA TCA GGA GTT ACC AGC AGC CAG GTC CAG TCC TGT
 423 432 441 450 459 468

V S T H I L C K L H L H N A S A I S S P
 GTC TCT ACT CAT ATC CTG TGC AAG CTT CAT CTA CAC AAT GCC AGT GCT ATA TCT AGC CCT
 483 492 501 510 519 528

T T I A N I S I P T V T S I S N Q E Y P
 ACA ACC ATT GCA AAT ATT TCA ATC CCA ACA GTT ACC AGC ATC TCA AAC CAG GAG TAC CCA
 543 552 561 570 579 588

T Y T I L G Q N Q Y P Q C Y P N Q G F P
 ACA TAC ACA ATT CTT GGG CAA AAT CAG TAT CCA CAG TGT TAC CCA AAT CAA GGT TTC CCA
 603 612 621 630 639 648

P S A S S S N A E A N S V P Q S F A V D
 CCA TCA GCA TCC TCC AGT AAT GCA GAG GCC AAC TCT GTT CCA CAA TCT TTT GCG GTG GAT
 663 672 681 690 699 708

K A E N T V P T Q A S Q Q P L T D N A R
 AAA GCA GAA AAC ACA GTA CCA ACA CAG GCA TCT CAG CAG CCA CTA ACT GAC AAT GCA AGA
 723 732 741 750 759 768

A M G S K E T E E Q N K K T A P V K N R
 GCA ATG GGC AGC AAG GAG ACT GAA GAG CAA AAT AAG AAA ACT GCG CCT GTA AAG AAC AGA
 783 792 801 810 819 828

G K S K K A D A S S P Q H S D L E R V F
 GGG AAG AGT AAG AAA GCA GAT GCC TCC TCG CCA CAA CAC AGT GAT CTT GAG CGT GTG TTT
 843 852 861 870 879 888

L	W	D	L	D	E	T	I	I	I	F	H	S	L	L	T	G	S	Y	A
TTG	TGG	GAC	TTG	GAT	GAG	ACC	ATT	ATC	ATC	TTT	CAC	TCT	CTG	CTC	ACC	GGG	TCA	TAT	GCA
	903			912				921			930			939			948		
Q	K	Y	G	K	D	P	T	L	V	V	E	S	G	L	A	M	E	E	M
CAA	AAG	TAT	GGA	AAG	GAC	CCT	ACA	TTG	GTG	GTG	GAA	TCA	GGT	TTG	GCC	ATG	GAA	GAA	ATG
	963			972				981			990			999			1008		
I	F	E	V	A	D	T	H	L	F	F	N	D	L	E	E	C	D	Q	V
ATC	TTT	GAA	GTA	GCA	GAC	ACA	CAT	TTG	TTT	TTC	AAT	GAC	TTG	GAA	GAG	TGT	GAT	CAG	GTT
	1023			1032				1041			1050			1059			1068		
H	V	E	D	V	A	S	D	D	N	G	Q	D	L	S	N	Y	S	F	T
CAT	GTG	GAA	GAT	GTA	GCT	TCT	GAC	GAC	AAT	GGT	CAG	GAT	TTA	AGT	AAC	TAC	AGC	TTC	ACA
	1083			1092				1101			1110			1119			1128		
T	D	G	F	N	G	T	A	G	G	R	N	H	S	T	N	A	G	V	Q
ACG	GAT	GGT	TTT	AAT	GGT	ACA	GCA	GGC	GGT	AGG	AAT	CAC	TCG	ACA	AAT	GCT	GGA	GTG	CAG
	1143			1152				1161			1170			1179			1188		
G	G	M	D	W	M	R	K	L	A	F	R	Y	R	K	V	I	E	V	Y
GGA	GGC	ATG	GAC	TGG	ATG	AGA	AAG	CTG	GCT	TTC	CGA	TAT	CGA	AAA	GTT	ATA	GAG	GTG	TAT
	1203			1212				1221			1230			1239			1248		
E	K	Y	K	N	N	V	S	G	L	L	S	L	Q	R	R	D	S	L	Q
GAA	AAA	TAC	AAG	AAC	AAT	GTT	AGT	GGC	CTT	TTA	AGC	CTG	CAG	CGG	CGT	GAT	TCT	CTC	CAG
	1263			1272				1281			1290			1299			1308		
R	L	R	A	N	I	E	A	L	T	D	G	W	L	G	T	A	L	K	C
AGG	TTG	AGA	GCT	AAT	ATA	GAG	GCC	CTG	ACA	GAT	GGC	TGG	TTA	GGG	ACT	GCT	CTA	AAA	TGT
	1323			1332				1341			1350			1359			1368		
L	L	L	I	Q	S	R	R	N	C	V	N	V	L	I	T	T	T	Q	L
TTA	CTG	CTT	ATA	CAG	TCC	AGA	AGG	AAT	TGT	GTG	AAT	GTT	CTT	ATA	ACA	ACA	ACA	CAG	TTG
	1383			1392				1401			1410			1419			1428		
V	P	A	L	A	K	V	L	L	Y	G	L	G	E	V	F	P	I	D	N
GTC	CCT	GCA	CTG	GCT	AAA	GTT	CTG	CTC	TAT	GGT	TTG	GGT	GAA	GTG	TTT	CCT	ATC	GAC	AAT
	1443			1452				1461			1470			1479			1488		
I	Y	S	A	T	K	I	G	K	E	S	C	F	E	R	I	V	T	R	F
ATC	TAC	AGT	GCC	ACA	AAA	ATA	GGA	AAA	GAA	AGT	TGC	TTT	GAA	AGA	ATA	GTG	ACA	AGA	TTT
	1503			1512				1521			1530			1539			1548		
R	K	K	V	T	Y	V	V	I	G	D	G	R	D	E	E	M	A	A	K
AGG	AAA	AAA	GTT	ACT	TAT	GTG	GTA	ATT	OGA	GAC	OGA	AGA	GAT	GAA	GAG	ATG	GCA	GCA	AAA
	1563			1572				1581			1590			1599			1608		
Q	H	N	M	P	F	W	R	I	T	N	H	N	D	L	I	S	L	H	Q
CAG	CAC	AAT	ATG	CCC	TTC	TGG	AGA	ATA	ACA	AAC	CAT	AAT	GAC	CTC	ATC	TCA	CTA	CAC	CAA
	1623			1632				1641			1650			1659			1668		
A	L	E	L	D	F	L	-												
GCT	CTG	GAA	CTG	GAC	TTC	TTG	TGA												
	1683			1692		1698													

Abb. 4.1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von *Xeya3*. Die aus der Nukleotidsequenz (N) der *Xeya3*-cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz (AS) ist jeweils oberhalb dieser dargestellt. Die Zahlen geben die Position (Pos.) des jeweils letzten Nukleotids des betreffenden Triplets

an, das Stopkodon ist durch einen Strich markiert. Die C-terminale *Eya*-Domäne ist grau hinterlegt, die beiden konservierten Motive der Phosphatase-Aktivität sind eingerahmt.

4.2 Das *Xenopus Eya*-Homolog *Xeya3* ist in eine C-terminale „PST“- und eine N-terminale *Eya*-Domäne gegliedert

Die Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens des *Xeya3*-Gens kodiert für ein Protein einer Länge von 565 Aminosäuren mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 62226,89 Dalton. Wie alle Mitglieder der *Eya*-Familie lässt sich auch *Xeya3* in eine N-terminale Prolin-, Serin- und Threonin reiche „PST“- (Aminosäurepositionen 1 bis 294) sowie eine C-terminal gelegene *Eya*-Domäne (Aminosäurepositionen 295 bis 565) untergliedern (Abb. 4.1, 4.2).

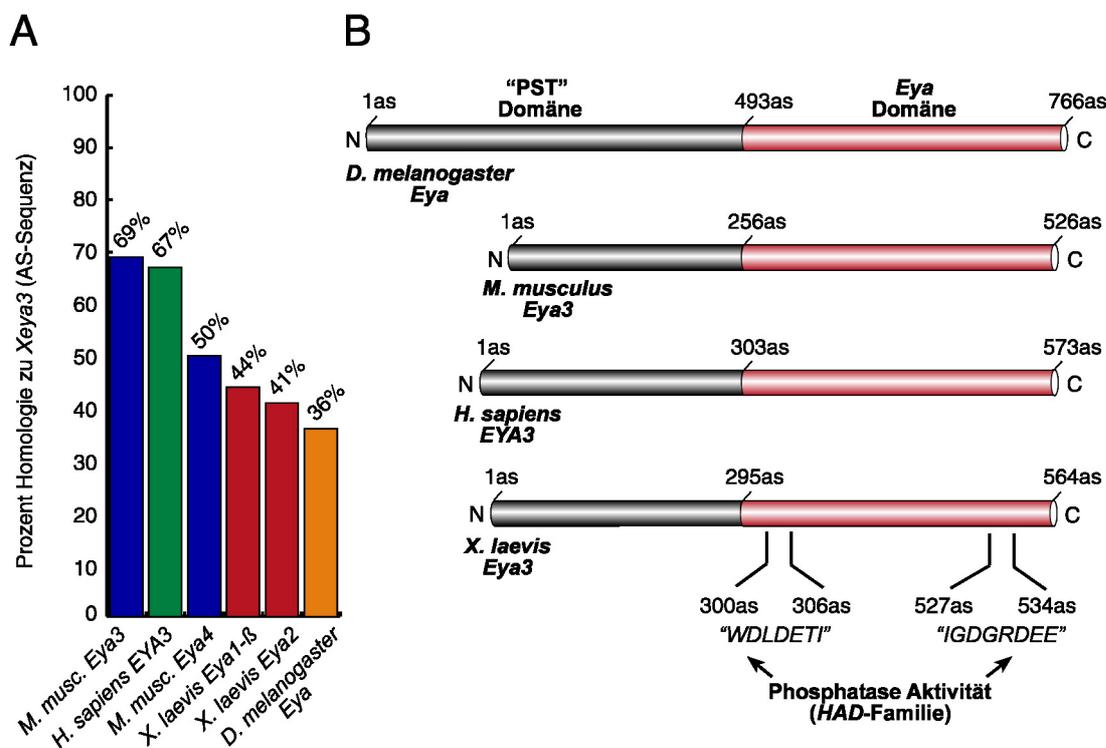


Abb. 4.2: *Xeya3* als Mitglied der *Eya3*-Subklasse innerhalb der *Eyes absent*-Familie von Proteinen.

(A) Höchste Sequenzverwandtschaft von *Xeya3* zu *Eya3*-Homologen aus Maus und Mensch. Gegenüber anderen Homologen der *Eyes absent* Proteinfamilie besteht geringere Sequenzhomologie (Angabe in Prozent identische Aminosäuren (AS)). (B) Übersicht über Mitglieder der *Eya3*-Subfamilie von Proteinen sowie *Eyes absent* aus *Drosophila melanogaster*. Charakteristisch für alle *Eya*-Proteine ist ein variabler N-terminaler Bereich, der reich an den hydrophilen Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin ist („PST“-Domäne), sowie die hochkonservierte *Eya*-Domäne am C-Terminus des Proteins. Letztere beinhaltet zwei Motive des aktiven Zentrums einer Phosphohydrolase, die *Eyes absent* Proteinen eine Phosphatase-

Aktivität verleihen. Abkürzungen: M. musc., *Mus musculus*; N, N-Terminus; C, C-Terminus; as, Aminosäureposition.

Erstere ist durch das vermehrte Vorkommen der hydrophilen Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin (P: 9,2%; S: 14,3%; T: 8,2%; $\Sigma = 32\%$) gekennzeichnet und ist als Bereich transaktivierender Aktivität beschrieben worden (Silver et al., 2003). Die Einteilung der Vertebraten *Eya*-Familie in die vier Subklassen *Eya1* bis *Eya4* beruht zum größten Teil auf Sequenzverwandschaften/-Homologien innerhalb der „PST“-Domäne. Die C-terminale *Eya*-Domäne findet sich mit einem hohen Grad an Konservierung der Aminosäuresequenz in allen Mitgliedern der *Eya*-Familie (Duncan et al., 1997). So sind etwa die Primärstrukturen der *Eya*-Domänen des Vertebraten *Xeya3* und des *Drosophila Eya* zu 60% identisch, bei nur 36% Homologie über die gesamte Aminosäuresequenz (Abb. 4.2, 4.4).

4.3 *Xeya3* besitzt eine Phosphatase-Aktivität im Bereich der *Eya*-Domäne

Kürzlich wurde für das humane *Eyes absent 3* eine Serin-/Thyrosin-Phosphatase-Aktivität im Bereich der *Eya*-Domäne beschrieben (Li et al., 2003). Eine Datenbanksuche unter Verwendung der *Xeya3*-Aminosäuresequenz (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan (Falquet et al., 2002)) ergab ebenfalls eine signifikante Homologie zur Familie der Haloacid Dehalogenase-ähnlichen Hydrolasen innerhalb der *Eya*-Domäne (Position 295-550). Diese Familie umfasst neben L-2-Haloacid Dehalogenasen und Epoxid Hydrolasen eine große Gruppe von Phosphatasen (Hisano et al., 1996). Wie für *EYA3* beschrieben finden sich innerhalb der *Eya*-Domäne von *Xeya3*, murinem *Eya3* sowie *Drosophila melanogaster Eya* zwei konservierte Motive, die das Protein als Phosphatase kennzeichnen (Position 300-306, 527-534; Abb. 4.2, 4.3, 4.4). Dabei besitzt das am N-Terminus der *Eya*-Domäne gelegene Motiv mit der Consensus-Sequenz $\Psi\text{DXDXT}\Psi$ katalytische Aktivität, das C-terminal gelegene Motiv mit der Consensus-Sequenz $\Psi\text{GDGXX(D/E)X}$ ist für die Bindung von Mg^{2+} -Ionen im Zuge einer Dephosphorylierungs-Reaktion verantwortlich (Wang et al., 2002).

<i>X. laevis Eya3</i>	MENQDLAEQPVKKPKMQDSGEEGLSQVGNNESSDRKAEPSSNMSSNQTMPSEILPCADY	60
<i>H. sapiens EYA3</i>	--EE---P-----A---E---QTI---S-PDV--Q-P-T--.LA--LP-SE--MT-T--	59
<i>M. musculus Eya3</i>	--EE---P-----A---EPR-QT----N-PDA--E-P-T--.LA--LS-SE--MT-T--	59
<i>G. gallus Eya3</i> EST	0

<i>X. laevis Eya3</i>	ILRAN-DYASQIYPAKSYTHILSVPVAETVATYTGQTQYQTLQPSQPYTVYPKASPTYGL	119
<i>H. sapiens EYA3</i>	-P-SSN--T--M-S--P-A-----S--..A-P-----QT---A---Q-TQ----	117
<i>M. musculus Eya3</i>	-P-SSN--T--M-S--P-A-----S--..-P-----Q---A---Q-TQ----	117
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	0
<i>X. laevis Eya3</i>	PAFGALWPGIKSGSGFIQTPSSP..VVLTSSTGVTSSQVQSCVSTHILCKLHLHNASAISS	177
<i>H. sapiens EYA3</i>	-P-----M-PE--L-----PSQHS---CTTGLTTSQP-PAHYSYPIQASST---L--T	177
<i>M. musculus Eya3</i>	-P-.....ASST---L-PT	131
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	0
<i>X. laevis Eya3</i>	PTTIANISIPTVTSISNQEYPTYTILGQNQYPQCYPNQGFPPS.ASSSNAEANSVPQS.F	235
<i>H. sapiens EYA3</i>	SS-----PAAA-A-----D-----QA---SSS-GVTGQTN-D--STTLAATTY	237
<i>M. musculus Eya3</i>	SSA-----PAAA-A-----D-----QA---SSS-GVTGQTN-D--TTTLAATTY	191
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	0
<i>X. laevis Eya3</i>	AVDKAENTVPTQASQQPLT.DN.....ARAMGSKETEEQNKKTAPVKNRGKSKKADASS	288
<i>H. sapiens EYA3</i>	QSE-PSVMA-AP-A-RLSSG-PSTSPSLSQTTP--D-DD-SR-NMTS-----R----T-	296
<i>M. musculus Eya3</i>	QTE-PSAM--AP-T-RLPS--SSASPPLSQTTPN-DADD-AR-NMT-----R-----	249
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	0
<i>X. laevis Eya3</i>	PQHSDLERVFILWDLDETLIIIFHSLLTGSYAQKYGKDPTLVVESGLAMEEMI FEVADTHLF	348
<i>H. sapiens EYA3</i>	S-D-E-----V-IG--T-----	356
<i>M. musculus Eya3</i>	S-D-E-----V-IG--T-----	309
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	0
<i>X. laevis Eya3</i>	FNDLEECDQVHVVEDVASDDNGQDLSNYSFTTDGFGNGTAGGRNHSTNAGVQGMDWMRCLA	408
<i>H. sapiens EYA3</i>	-----S---S-SG-SGS-GSSV---V-----	416
<i>M. musculus Eya3</i>	-----S---S-SG-SGS-GSSV---V-----	369
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	4
<i>X. laevis Eya3</i>	FRYRKVIEVYEKYKNNVSGLLSLQRDLSLQRRLRANIEALTDGWLGTALKCLLLIQSRRNC	468
<i>H. sapiens EYA3</i>	-----R-I-D-H-S--G---P--KEA-----E--V--S-----S-----K--	476
<i>M. musculus Eya3</i>	-----R-I-D-H-S--G---P--KEA-----E--V--S-----S-----K--	429
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	-----R-I-D--T--G---P--KREA-----TD--V--S--E--S-----K--	64
<i>X. laevis Eya3</i>	VNVLITTTQLVPALAKVLLYGLGEVFPIDNIYSATKIGKESC FERIVTRFRKKVTVVIG	528
<i>H. sapiens EYA3</i>	-----I--E-----S--G-----	536
<i>M. musculus Eya3</i>	A-----I--E-----S--G-----	489
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	--I-----E-----S--G-----	119

<i>X. laevis Eya3</i>	DGRDEE	MAAKQHNPFWRITNH	NDLISLHQALELDFL*	565
<i>H. sapiens EYA3</i>	-----I-----	-----V-----	-----*	573
<i>M. musculus Eya3</i>	-----I-----	-----S-----	-----V-----*	526
<i>G. gallus Eya3 EST</i>	119

Abb. 4.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xeya3* und *Eya3*-Proteinen anderer Vertebraten. Rechts sind die Positionen der Aminosäuren am Ende der jeweiligen Zeile angegeben. Identische Aminosäuren sind durch horizontale Striche, fehlende Aminosäuren durch Punkte, die Terminations-Kodons durch Sternchen markiert. Konservierte Aminosäure-Austausche sind rot hinterlegt. Als konservierte Aminosäure-Austausche gelten: A/G, V/I/L/M, F/Y, D/E/N/Q, S/T, K/R (George et al., 1990). Die zwischen den Spezies stark konservierte *Eya*-Domäne ist eingerahmt, der Bereich der Hydrolase gelb hinterlegt. Die für eine Phosphatase-Aktivität essentiellen Motive (Katalyse, Consensus-Sequenz: Ψ DXDXT Ψ ; Mg^{2+} -Bindung, Consensus-Sequenz: Ψ GDGXX(D/E)X; Ψ =Hydrophobe AS) sind grün eingefärbt.

<i>X. laevis Eya3</i>	M....ENG.....QDLAEQPVKKPKMQDSGEEGLSQVGNNESSDRKAEPSSNMSSN	43
<i>D. melanogaster eye</i>	MVTL-PYNYAAPRCGLIDKMI-PK--R--TDHTD THERNRLC-LSQQQQQQ-QQQQTHQ	60
<i>X. laevis Eya3</i>	Q....TMPSEILPCADYILRANDYASQ.....IYPAKSYTHILSVP..	84
<i>D. melanogaster eye</i>	-QQQQQQQ-HQQSHSSTV-AS-GPS-AGAGMGVGVGGGGGGGGVGGGVGQCSP-GL-PQ	120
<i>X. laevis Eya3</i>VAETVATYTGQTQYQTLQP.....SQPYTVYPKASPTYG.	118
<i>D. melanogaster eye</i>	SQPLQPTIGSL-SLS-HYSNGNAN-NVNSSCSLATASSFAQSAGSSFST-QQ-GG-S-G	180
<i>X. laevis Eya3</i>	LPAFGALWPGIKSGSGFIQTPS-SPVLTSSGVTSSQVQSCVSTHILCKLHLHNASAISS	177
<i>D. melanogaster eye</i>	VSGEDGVVG-ATVM-HWTHDGTG-SAAVK-ESRSPG--HASLDNGSVAGSN-YGC-SA-N	240
<i>X. laevis Eya3</i>	PTTIANISI.....	186
<i>D. melanogaster eye</i>	-LDGGAVAVNSSAVAAAAAVYDGKHDYYYNSMQQYTPPPFYSGYGPYAAATAARQAK	300
<i>X. laevis Eya3</i>PTVTSISNQE.....YPTYTILGQN.....QYPQCYPNQGF	217
<i>D. melanogaster eye</i>	MEPGAAAAAAYLT-SYAASG-NNSQLYSSP-AG-NNF--QDYGGYNE--GNY-SPANY	360
<i>X. laevis Eya3</i>	PPSASSNAEANSVPQSFVVDKAEN.....TVPTQASQQ.....PLTDN..	256
<i>D. melanogaster eye</i>	S-Y-V--PSSA-HGHG-H-AASS-LSESPTDTHS-T-VHQTTHSPHSPLPIS-S-GSGI	420

<i>X. laevis Eya3</i>ARAMGSKETEEQ.....NKKTAPVKNRGKSK.....KADA	286
<i>D. melanogaster eya</i>	GPLGNVSAAAA-A-LN-SGGSSVGTAGSGGVATS--T-TGKT-RARGRRHQQPSPTRST-	480
<i>X. laevis Eya3</i>	SSPQHS...DI ERVFIWDLDETI IIFHSLLTGSYAQKYGKDPTLVVESGLAMEEMIFEV	342
<i>D. melanogaster eya</i>	-DTGN-EAVKPF -----V-----I-----T-S-----NR-T--HSSLMTIAFR-----V-NM	540
<i>X. laevis Eya3</i>	ADTHLFFNDLEECDQVHVEDVASDDNGQLSNYSFTTDGFNG.TAGGR..NHSTNAGVQG	399
<i>D. melanogaster eya</i>	----F--EI-----ID--S-----A-N-A---HTN-PP-APP-LCLPT--R-	600
<i>X. laevis Eya3</i>	GMDWMRKLAFRYRKVIEVYEKYKNNVSGLLSLQRRDSLQRLRANTEALTDGWLGTALKCL	459
<i>D. melanogaster eya</i>	-V-----IKDI-NS-RG--GT--GPGK-EAWLQI-SE--VA--N-ATL-----	660
<i>X. laevis Eya3</i>	LLIQSRRNCVNVLITTTQLVLPALAKVLLYLGEVFPIDNIYSATKIGKESCFERIVTRFR	519
<i>D. melanogaster eya</i>	SM-SQ-E-----V-S---A-----F--GI-N-E-----H---H-T-Y-----G	720
<i>X. laevis Eya3</i>	KKVTYVVIGDGRDEE MAAKQHNPFWRITNHN DLISLHQALELDFL*	565
<i>D. melanogaster eya</i>	R-S-----NE--T---AM-F-----SA-S-IRA-YT--DMG--*	766

Abb. 4.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xeya3* und *Eyes absent* aus *Drosophila melanogaster* (Legende siehe Abb. 4.3).

4.4 *Xeya3* wird in anterioren neuronalen Strukturen exprimiert

Zur Darstellung der räumlichen wie zeitlichen Expression von *Xeya3* wurden „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen („*WMISH*“) an *Xenopus laevis* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt.

Xeya3 ist bereits während der Eireifung als maternale Komponente detektierbar, wobei sich die Transkripte mit zunehmendem Reifestadium der Oozyten im animalen Pol anreichern (Abb. 4.5A, B). Diese Verteilung bleibt auch nach der Fertilisation bis in Blastula-Stadien bestehen (Abb. 4.5C). Nach Abschluss der Gastrulation und dem Beginn der Neurulation ist *Xeya3*-Expression innerhalb der offenen Neuralplatte im Bereich prospektiver Hirnregionen sowie, weiter anterior, im Bereich des Augenfeldes sichtbar. Die Mittellinie der Neurula bleibt dabei frei von *Xeya3*-Transkripten (Abb. 4.5D). Gegen Ende der Neurulation in NF Stadium 20 sind die *Xeya3*-Expressionsdomänen innerhalb der optischen Vesikel sowie Mittel- und Hinterhirnregionen klar erkennbar. Zusätzlich finden sich zu diesem Zeitpunkt Transkripte in Zellen der ektodermalen Linsenplakode und im Areal von prä migratorischen Neuralleistenzellen (Abb. 4.5E). Im Zuge der Elongation des Embryos und fortschreitender Organentwicklung zeigen vor allem die evaginierten optischen Vesikel, die otischen Vesikel des

sich entwickelnden auditorischen Systems, die mittlerweile nach ventral ausgewanderten Neuralleistenzellen sowie Bereiche von Vorder-, Mittel- und Hinterhirn Expression von *Xeya3* (Abb. 4.5F, F'). Der Transversalschnitt durch einen NF Stadium 27 Embryo zeigt, dass bezüglich der Genexpression innerhalb des Diencephalons nahezu ausschließlich dorsale Abschnitte betroffen sind. Zellen des sich formenden optischen Bechers transkribieren nach wie vor *Xeya3* (Abb. 4.5G, G'). Im frühen Kaulquappenstadium zeigen vor allem die weiter nach ventral ausgewanderten Derivate der Neuralleistenzellen und, innerhalb der reifenden Linse, primäre Linsenfasern *Xeya3*-Expression. Die in früheren Entwicklungsstadien deutliche Genexpression innerhalb der prospektiven Hirnregionen ist erkennbar zurückgegangen und besteht nur noch in wenigen Bereichen. Vollständig frei von *Xeya3*-Transkripten ist mit Erreichen dieses Entwicklungsstadiums die neurale Retina (Abb. 4.5H, H').

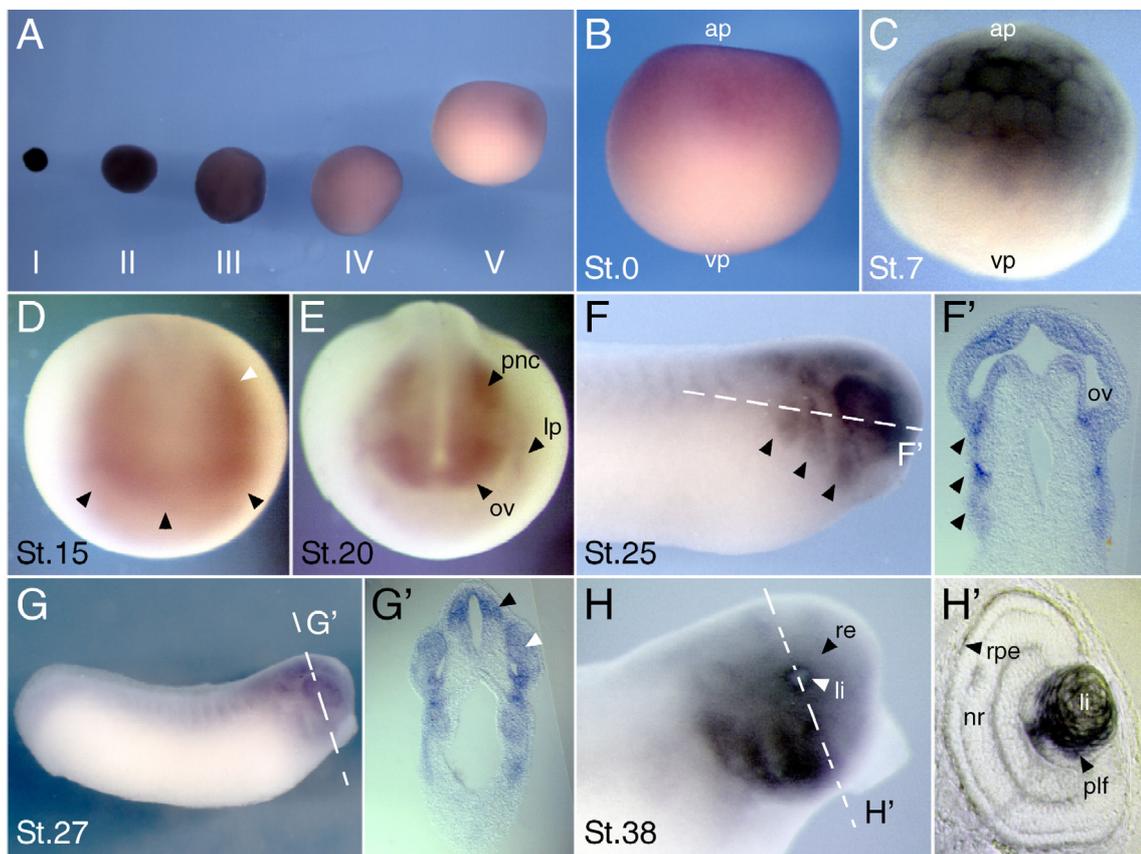


Abb. 4.5: Räumliche und zeitliche Expression von *Xeya3* während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. (A) Oozytenstadien I-V. (B) Reife Oozyte; ap, animaler Pol; vp, vegetaler Pol. (C) NF Stadium 7 Blastula. (D) NF Stadium 15 Neurula, frontale Ansicht; weißer Pfeil, prospektive Hirnregionen; schwarze Pfeile, vorderer Rand der Neuralplatte/Augenfeld. (E) NF Stadium 20 Neurula; lp, Linsenplakode; ov, optischer Vesikel; pnc, prä migratorische Neuralleistenzellen. (F) NF Stadium 25 Embryo, laterale Ansicht; schwarze Pfeile, migratorische Neuralleistenzellen. (F') Horizontalschnitt

durch den Kopfbereich des Embryos aus (F) in Höhe der optischen Vesikel. (G) NF Stadium 25 Embryo, laterale Ansicht. (G') Transversalschnitt durch den Embryo aus (G) im Bereich der optischen Becher und des Diencephalons; schwarzer Pfeil, dorsales Diencephalon; weißer Pfeil, optischer Becher. (H) NF Stadium 38 Embryo (Kopfbereich, laterale Ansicht); li, Linse; re, Retina. (H') Transversalschnitt durch ein Auge des Embryos aus (H); nr, neurale Retina; plf, primäre Linsenfasern; rpe, Retinales Pigmentepithel.

Der Vergleich der durch „*WMISH*“ gewonnenen Daten mit den Ergebnissen einer RT-PCR auf total RNA-Präparationen aus *Xenopus laevis* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (Abb. 4.6A) bestätigt das Vorhandensein maternaler Transkripte von *Xeya3* in NF Stadien vor Beginn der zygotischen Genexpression, der „Mid Blastula Transition“ in NF Stadium 8/9. Des Weiteren können auch durch RT-PCR *Xeya3* Transkripte bis in Kaulquappenstadien nachgewiesen werden, wobei die Gesamtmenge an mRNA im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung relativ konstant bleibt.

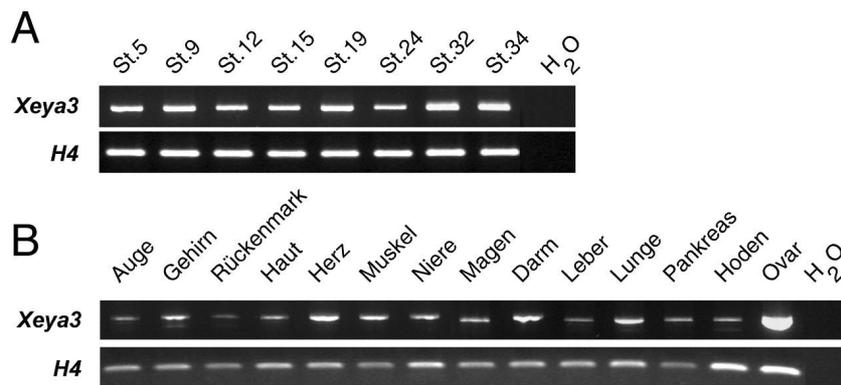


Abb. 4.6: Expressions-Niveau von *Xeya3* in Embryonalstadien und adulten Geweben von *Xenopus laevis*. (A) RT-PCR auf total RNA verschiedener *X. laevis* Embryonalstadien. (B) RT-PCR auf total RNA

adulten Gewebe von *X. laevis*. Zur Kontrolle der eingesetzten Menge an RNA-Matrize wurde im Zuge der RT-PCR zusätzlich Histone 4 (*H4*) amplifiziert. Verwendete Oligonukleotide: *Xeya3*-RT-F, *Xeya3*-RT-R1; *H4*-F, *H4*-R.

Mit *Xeya3* als maternaler Komponente zeigt sich bezüglich der Genexpression in adulten Geweben besonders innerhalb der Ovarien als Ort der Eireifung ein hohes Expressions-Niveau (Abb. 4.6B). Daneben findet in allen hier getesteten Geweben und Organen Transkription des *Xeya3*-Gens statt. Eine erhöhte Rate kann jedoch innerhalb des Gehirns, des Herz- und Skelettmuskels sowie des Darms und der Lunge beobachtet werden. Damit besteht ein Unterschied zum Expressionsmuster während der Embryogenese (Abb. 4.5), wo z.B. endodermale Bereiche frei von *Xeya3*-Expression sind.

4.5 Das *Xeya3*-Protein ist ausschließlich nukleär lokalisiert

Zur Darstellung der subzellulären Lokalisation des *Xeya3*-Proteins wurden *Xeya3*-Flag-Fusionsproteine verwendet (Abb. 4.7C), welche nach Injektion der entsprechenden mRNA in eine Blastomere von *Xenopus laevis* Zweizell-Stadien durch „whole mount“ Immunfärbung (Abb. 4.7A, A') bzw. durch Immunfärbung an Paraffinschnitten mit Hilfe eines Flag-Epitop-spezifischen Antikörpers (Abb. 4.7B, B', B'', B''') nachgewiesen werden konnten.

Dabei zeigt sich, dass *Xeya3* ausschließlich nukleär lokalisiert ist. Phänotypische Effekte wie etwa eine Vergrößerung von Bereichen des zentralen Nervensystems, die durch die Überexpression des Proteins während der frühen Embryogenese hervorgerufen werden (s. Kapitel 4.9), treten zudem exakt in jenen Bereichen auf, in denen das Fusionsprotein detektiert werden kann.

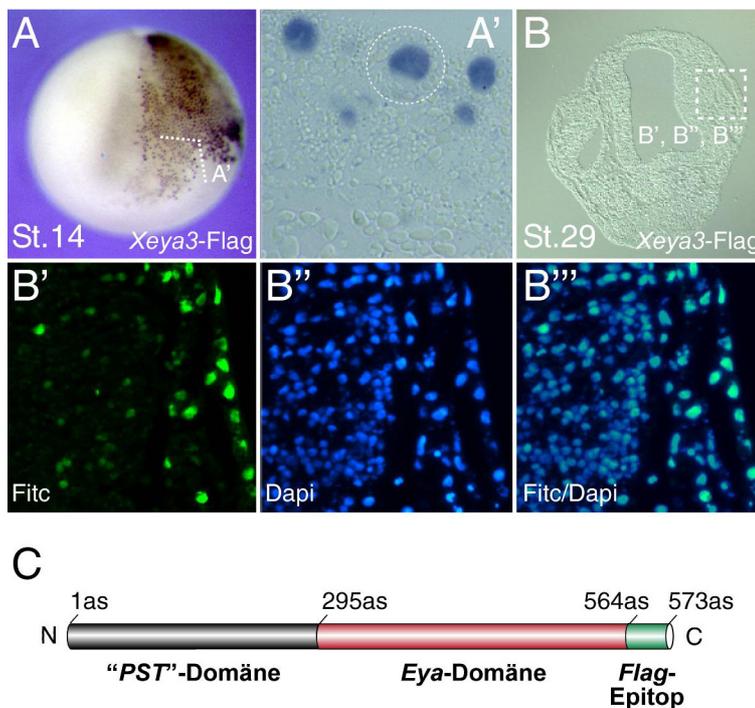


Abb. 4.7: Subzelluläre Lokalisation von *Xeya3*. (A) „Whole mount“ Immunfärbung an NF Stadium 14 Albino-Embryonen nach Mikroinjektion von 400pg *Xeya3*-Flag-mRNA in eine Blastomere eines *Xenopus laevis* Zweizell-Stadiums, frontale Ansicht. (A') Transversalschnitt durch den in (A) gekennzeichneten Bereich. Nur Nuklei zeigen Detektions-Signale. Der vollständige Durchmesser einer Zelle ist eingekreist. (B) Transversalschnitt durch einen NF Stadium 29 Embryo nach Mikroinjektion von 800pg *Xeya3*-Flag-mRNA in eine Blastomere eines *Xenopus laevis* Zweizell-Stadiums. (B', B'', B''') Jeweils identischer Ausschnitt des Transversalschnittes aus (B). Nukleär lokalisiertes Protein ist innerhalb vergrößerter Vorderhirnregionen sichtbar. (C) Übersicht über das verwendete *Xeya3*-Flag-Fusionsprotein. Das Flag-Epitop liegt C-terminal des *Xeya3*-ORF.

Die Lokalisation des Proteins im Zellkern ist unabhängig von in diesem Zusammenhang untersuchten Bereichen oder Geweben des Embryos, was eine Translokation des Proteins in den Nukleus unabhängig von regional vorhandenen Faktoren nahelegt.

4.6 Ein *Xeya3*-Funktionsverlust verursacht massiven Verlust anterioren neuralen Gewebes

Eine Möglichkeit der Analyse von Protein-Funktionen *in vivo* bietet die Durchführung von Funktionsverluststudien. Neben dominant-negativen Formen des zu untersuchenden Faktors hat sich in *Xenopus* die Anwendung von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (Morpholinos) als besonders effizient herausgestellt. Dabei handelt es sich um kurze Oligonukleotid-Analogs, die sich durch ihre Morpholino-Gruppen von herkömmlichen Nukleotidketten unterscheiden. Als zum Bereich der Translationsinitiationsstelle komplementäre Sequenz bilden sie zusammen mit der jeweiligen mRNA ein doppelsträngiges Hybrid aus. Eine Translation der mRNA an den Ribosomen wird so sterisch blockiert, es findet keine Proteinsynthese statt.

Die Verringerung der endogenen *Xeya3*-Proteinkonzentration durch Injektion geringer Mengen an *Xeya3*-Morpholino (0,3-0,4pmol) in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums von *Xenopus laevis* führt von einer deutlichen Verkleinerung des Auges zu in schweren Fällen massivem Verlust anterioren neuralen Gewebes (Abb. 4.8A-C'). So zeigt etwa die betroffene Seite des sich entwickelnden Diencephalons einen stark hypoplastischen Phänotyp, Augenstrukturen sind bis auf Rudimente eines Retinalen Pigmentepithels nicht mehr ausgebildet (Abb. 4.8C, C'). Die nicht injizierte Seite (Kontrollseite) des Embryos entwickelt sich hingegen normal. Die beobachteten Effekte nach Injektion des Morpholinos beschränken sich dabei ausschließlich auf anteriore neurale Derivate, nach caudal bis in Bereiche des Rhombencephalons. Andere Bereiche des Embryos zeigen keinerlei phänotypische Veränderungen. Ein Vergleich der betroffenen Gewebe mit dem Expressionsmuster von *Xeya3* (s. Abb. 4.5) macht deutlich, dass es sich hierbei ohne Ausnahme um solche Regionen handelt, die aus Bereichen endogener *Xeya3*-Expression, wie etwa aus Zellen der anterioren Neuralplatte mitsamt der Anlage der Augen, hervorgehen.

Zum weiteren Nachweis der *Xeya3*-Spezifität des eingesetzten Morpholinos wurde dieser in einem *in vitro* Translationssystem (TnT[®]-Coupled Reticulocyte Lysate System) getestet (Abb. 4.8D). Wie erwartet kommt es bei Einsatz des Morpholinos zu einer vollständigen Inhibition der *Xeya3*-Proteinsynthese. Eine an der jeweils dritten Basen-Position der Morpholino-Bindungssequenz mutierte *Xeya3*-mRNA (*Xeya3*-wob, „wobbled“) wird hingegen auch in Anwesenheit des *Xeya3*-Morpholinos translatiert. Die hierbei etwas geringere Ausbeute an Protein lässt sich durch eine nach wie vor schwache Bindung des Morpholinos an seine nunmehr unvollständige, komplementäre Sequenz erklären.

Mit Hilfe des *Xeya3*-wob-Konstruktes wurden zusätzlich Rescue-Experimente mit dem Ziel durchgeführt, die durch die Injektion von *Xeya3*-Morpholino inhibierte Proteinsynthese endogener *Xeya3*-mRNA zu ersetzen und so die Ausprägung von Funktionsverlust-Phänotypen zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kombinationen von *Xeya3*-Morpholino und *Xeya3*-wob-mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums ko-injiziert und die

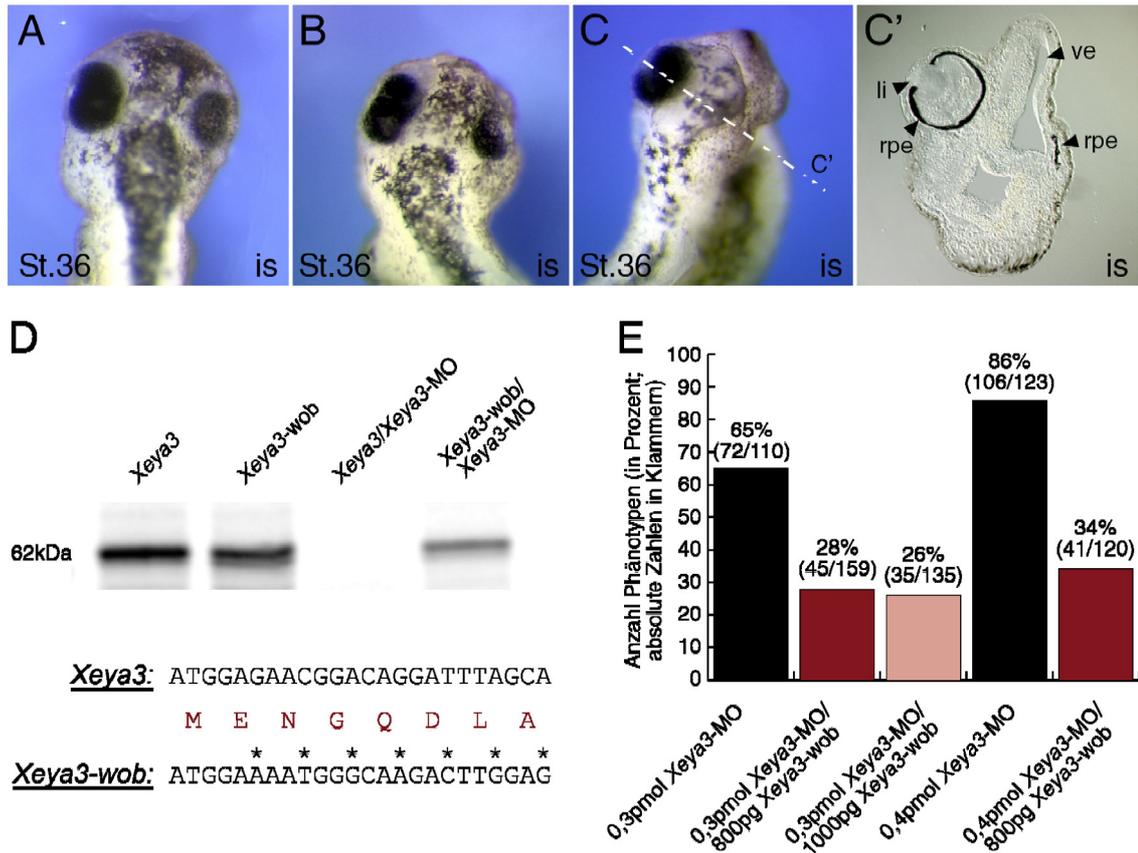


Abb. 4.8: Reduktion neuralen Gewebes durch Funktionsverlust von *Xeya3*. (A-C) NF Stadium 36 *Xenopus laevis* Embryonen nach Mikroinjektion von 0,4pmol *Xeya3*-Morpholino-Antisense-Oligonukleotid (MO) in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums, dorsale Ansicht des Kopfbereiches. Die injizierte Seite (is) des Embryos befindet sich jeweils rechts. Die erhaltenen Phänotypen reichen von Reduktion (A, B) bis nahezu vollständiger Abwesenheit neuraler Strukturen wie Auge und Gehirn (C). (C') Transversalschnitt durch den in (C) gekennzeichneten Bereich, injizierte Seite rechts. Die rechte Hälfte des Diencephalons ist stark hypoplastisch, bis auf rudimentäre Reste von Retinalem Pigmentepithel sind keine Augenstrukturen ausgebildet; li, Linse; rpe, Retinales Pigmentepithel; ve, Ventrikel des Diencephalons. (D) Test auf Spezifität des eingesetzten MO. *Xeya3*-MO blockiert spezifisch die Translation von *Xeya3*-mRNA im *in vitro* System (TnT[®]-Coupled Reticulocyte Lysate System), eine im Bereich der MO-Bindungssequenz mutierte *Xeya3*-mRNA (*Xeya3-wob*, Basenaustausche sind durch Sternchen markiert) wird auch in Gegenwart des MO translatiert. (E) Rescue-Experiment unter Verwendung von *Xeya3-wob*. Durch Ko-Injektion von *Xeya3*-MO und *Xeya3-wob*-mRNA kann der Prozentsatz an Embryonen mit neuraler Hypoplasie erheblich gesenkt werden.

Ausprägung des Funktionsverlust-Phänotyps quantitativ beobachtet (Abb. 4.8E). Es zeigt sich, dass die Anzahl an Embryonen mit neuraler Hypoplasie bei Einsatz der *Xeya3-wob*-RNA um mehr als 50% gesenkt werden kann. Dies unterstreicht die Spezifität des eingesetzten

Morpholinos für endogene *Xeya3*-mRNA, deren Funktion durch *Xeya3*-wob-mRNA ersetzt werden kann.

4.7 Ein *Xeya3*-Funktionsverlust führt anterior zur Suppression neuraler Markergene

Zur weiteren Charakterisierung der in Kapitel 4.6 beschriebenen Effekte auf molekularer Ebene sowie zur Klärung der Frage, zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung die beschriebenen Phänotypen angelegt werden, wurden *Xenopus laevis* Albino-Embryonen nach Injektion von 0,4pmol *Xeya3*-Morpholino in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums einer „*WMISH*“ in Neurula- bzw. frühen Kaulquappenstadien unterzogen. Dabei wurden antisense-RNA Sonden von Genen verwendet, deren Expressionsmuster Bereiche und Gewebe endogener *Xeya3*-Expression und deren Derivate, wie etwa das Areal der anterioren Neuralplatte, Linsengewebe und Hirnbereiche, kennzeichnen (Abb. 4.9).

Bezüglich früher Neurula-Stadien lässt sich eine starke Reduktion der Expression aller getesteten Gene im Bereich endogener *Xeya3* Expression beobachten (Abb. 4.9A-D). So fällt im Fall von *Xotx2* die Repression der Expression innerhalb prospektiver Hirnregionen auf der injizierten Seite des Embryos auf, wobei die Expressionsdomäne im Bereich der Zementdrüsenanlage anteroventral der Neuralplatte von dieser Reduktion nicht betroffen ist (76%, n=25; Abb. 4.9A). Dabei ist zu beachten, dass letzteres Areal zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung Teil der Expressionsdomäne von *Xeya3* ist. Wie für *Xotx2* kann auch bezüglich des panneural exprimierten Gens *Xsox3* eine starke Herabregulation innerhalb der vorderen Neuralplatte beobachtet werden (80%, n=30). Daneben fällt zusätzlich auf, dass Zellen des plakodalen Linsenektoderms, einer weiteren Expressionsdomäne von *Xsox3*, keine *Xsox3*-Expression mehr zeigen (Abb. 4.9B). Der Trend der negativen Regulation anteriorer Expressionsdomänen neuraler Markergene setzt sich auch bei Betrachtung der im Bereich des Augenfeldes (im Areal der anterioren Neuralplatte) exprimierten Gene *Xpax6* (64%, n=25) und *Xrx1* (40%, n=30) fort. Im Fall von *Xpax6* tritt zusätzlich eine deutlich schwächere Transkription innerhalb zukünftiger Hinterhirnbereiche auf (Abb. 4.9C, D).

Durch einen Funktionsverlust von *Xeya3* kommt es zu massivem Verlust anterioren neuralen Gewebes wie Hirn und Retina (s. Kapitel 4.6). *Xeya3* wird zusätzlich von Zellen des plakodalen Linsenektoderms transkribiert (s. Abb. 4.5E). Zum Test auf Verbleib von Linsengewebe nach Funktionsverlust von *Xeya3* durch Morpholino-Injektion wurden frühe Kaulquappenstadien einer „*WMISH*“ mit *Xpitx3*-antisense-RNA-Sonden unterzogen (Abb. 4.9E, E'). Diese Embryonen zeigen eine deutliche Reduktion, in schweren Fällen den vollständigen Verlust von *Xpitx3*-Expression (69%, n=26). Mit Blick auf den bezüglich des Linsenektoderms beschriebenen Effekt für *Xsox3* legt dies nahe, dass die Entwicklung prospektiven Linsengewebes schon früh gestört ist, eine Reifung der Linsenplakode nicht mehr stattfindet.

Die bei *Xeya3*-Funktionsverlust auftretende Hypoplasie anterioren neuralen Gewebes (s. Abb. 4.8C') stellt die Frage nach dem Charakter verbleibender Zellen des betroffenen Gewebes. Eine „*WMISH*“ an frühen Kaulquappenstadien unter Verwendung des neuralen Differenzierungs-Markergens *N-Tubulin* (Abb. 4.9F, F', F'') zeigt, dass in milderer Phänotypen etwa rudimentär verbleibendes Gehirn- oder Retina-Gewebe nach wie vor ausdifferenzierte Neuronen, positiv für die Expression von *N-Tubulin*, beinhaltet (Abb. 4.9F''; 20/28). Im Zusammenhang mit der beobachteten Reduktion neuraler Expressionsdomänen in Neurula-Stadien ist dies ein möglicher Hinweis auf eine verringerte Anzahl an neuralen Vorläuferzellen, die im Verlauf der Entwicklung diese Organe ausbilden.

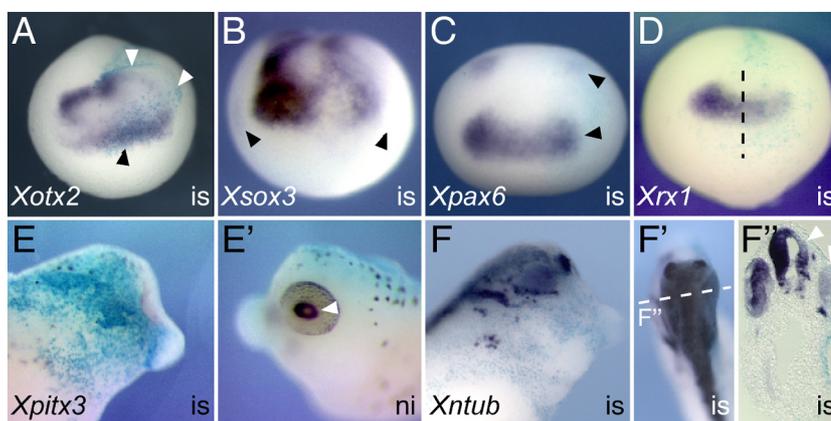


Abb. 4.9: Suppression neuraler Markergene durch Funktionsverlust von *Xeya3*. Injektion von 0,4pmol *Xeya3*-MO in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und nachfolgende „*WMISH*“; zur Darstellung der injizierten Seite des

Embryos wurde synthetische mRNA für β -Galaktosidase ko-injiziert und β -Galaktosidase vor der „*WMISH*“ durch eine Färbereaktion nachgewiesen; A-D, NF Stadium 13/14, frontale Ansicht; E-F'', NF Stadium 36. (A) Suppression der *Xotx2*-Expression im Bereich prospektiver Hirnregionen (weiße Pfeile), die Expressionsdomäne innerhalb der Zementdrüsenanlage (schwarzer Pfeil) ist nicht betroffen (is, injizierte Seite). (B) Suppression der *Xsox3*-Expression im Bereich der anterioren Neuralplatte sowie der Linsenplakode (schwarze Pfeile). (C) Suppression der *Xpax6*-Expression im Augenfeld und in prospektiven Hinterhirnregionen (schwarze Pfeile). (D) Suppression des retinalen Markergens *Xrx1* innerhalb des Augenfeldes (gestrichelte Linie, Mittellinie des Embryos). (E, E') Abwesenheit des Linsenmarkergens *Xpitx3* auf der injizierten Seite des Embryos (schwarzer Pfeil in E'; ni, nicht injizierte Seite; laterale Ansicht). (F, F', F'') Starke Reduktion des neuralen Differenzierungsmarkergens *N-Tubulin* im Bereich neuraler Hypoplasie (weiße Pfeile in F''; F, laterale Ansicht; F', dorsale Ansicht; F'', Transversalschnitt durch den in (F') gekennzeichneten Bereich).

4.8 Ein *Xeya3*-Funktionsverlust führt zur Apoptose von neuralen Vorläuferzellen

Als Ursache für die beobachtete neurale Hypoplasie (Abb. 4.8) sowie die Reduktion anteriorer neuraler Markergene (Abb. 4.9) kommen prinzipiell drei Möglichkeiten in Betracht. Denkbar ist zum Einen eine Transdetermination neuraler Vorläuferzellen unter dem Einfluss eines

Funktionsverlustes von *Xeya3*. Da es in letzterem Fall jedoch zu einem massiven Verlust an Gewebe kommt und keine Vergrößerung von Derivaten der beiden anderen Keimblätter beobachtet werden kann, ist dies eher unwahrscheinlich. Weiter könnte eine verminderte Proliferationsrate der einzelnen neuralen Vorläuferzellen zu den beschriebenen Phänotypen führen. Die in Neurula-Stadien erhaltenen Hybridisierungsmuster der verwendeten molekularen Marker, wie etwa die „ausgedünnte“ anteriore Expressionsdomäne von *Xsox3*, sind so allerdings nicht zu erklären. Die verminderte Ausbildung neuraler Strukturen wie Gehirn oder Auge kann drittens Folge einer erhöhten Apoptose-Rate neuraler Vorläuferzellen sein. Tatsächlich lässt sich in mit *Xeya3*-Morpholino injizierten Embryonen auf der Seite der Injektion eine vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen der anterioren Neuralplatte detektieren (Abb. 4.10A, A', A''; 66%, n=29). Der Transversalschnitt (Abb. 4.10A'') zeigt, dass es sich dabei ausschließlich um Zellen innerhalb der sensorischen Schicht des Neuroektoderms handelt. Als Folge der verringerten Anzahl neuraler Progenitorzellen kommt es während der weiteren Entwicklung zu einer absolut verringerten Zellproliferation als sekundärem Effekt (Abb. 4.10B-C; 44%, n=25).

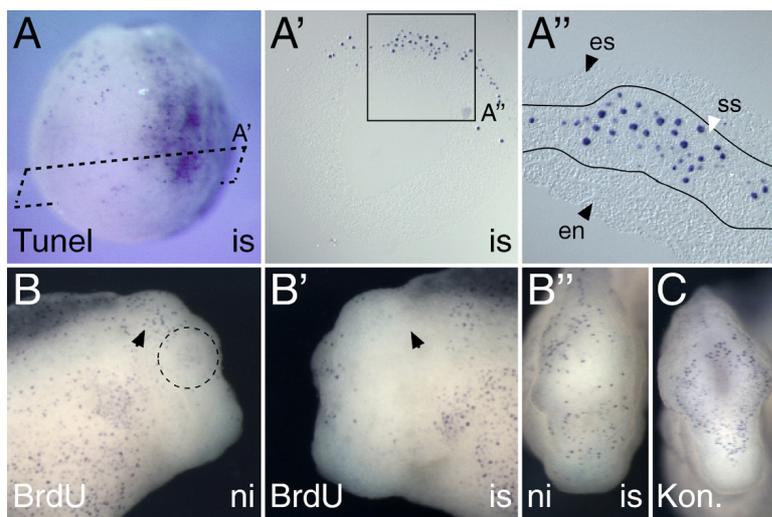


Abb. 4.10: Apoptose neuraler Vorläuferzellen nach Funktionsverlust von *Xeya3*. (A) TUNEL-Färbung in NF Stadium 13 nach Injektion von 0,8pmol *Xeya3*-Morpholino in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums, frontale Ansicht, injizierte Seite (is) rechts. Es sind vermehrt apoptotische Zellen im Bereich der

anterioren Neuralplatte detektierbar. (A', A'') 5µm Transversalschnitt durch den in (A) gekennzeichneten Bereich. Apoptotische Zellen finden sich ausschließlich innerhalb der sensorischen Schicht des Neuroektoderms, welche neurale Vorläuferzellen beinhaltet; en, Endoderm; es, epitheliale Schicht des Neuroektoderms; ss, sensorische Schicht des Neuroektoderms. (B, B', B'') BrdU-Färbung in NF Stadium 32 nach Injektion von 0,4pmol *Xeya3*-Morpholino in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums, laterale und frontale Ansicht. Aufgrund der verringerten Anzahl an Vorläuferzellen kommt es während der Organogenese anteriorer neuraler Gewebe in späteren Entwicklungsstadien zu absolut verringerter Zellproliferation (prospektive Hirnregionen sind durch schwarze Pfeile markiert, das Auge der nicht injizierten Seite (ni) ist eingekreist). (C) Kontrollembryo, frontale Ansicht.

4.9 Eine *Xeya3*-Überexpression führt zu Neoplasie anterioren neuralen Gewebes

Zur Untersuchung möglicher entwicklungsrelevanter Funktionen des *Xeya3*-Proteins wurde dieses weiter durch Mikroinjektion von synthetischer *Xeya3*-mRNA in *Xenopus laevis* Embryonen überexprimiert und entstehende Phänotypen dokumentiert. Zum Nachweis einer erfolgreichen Translation der injizierten mRNA wurde zunächst für ein c-myc-*Xeya3*-

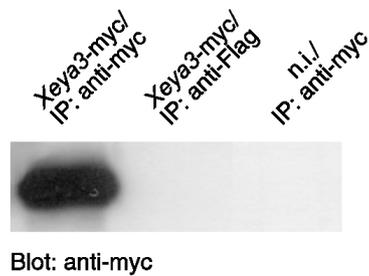


Abb. 4.11: Translation von *Xeya3*-myc *in vivo*.

Fusionsprotein kodierende mRNA (2ng) injiziert, das gebildete Protein mittels Immunpräzipitation isoliert und durch Western-Blot detektiert (Abb. 4.11).

Die Mikroinjektion geringer Mengen (250pg; Injektion in eine dorsale Blastomere eines Vierzell-Stadiums) an synthetischer *Xeya3*-mRNA führt außer zu einer geringen Vergrößerung des Auges auf der Seite der Injektion (24%, n=51) zu keinen auffälligen phänotypischen Veränderungen in frühen Kaulquappenstadien (Abb. 4.12A, A'). Bei Erhöhung der Menge an injizierter RNA (800pg; Injektion in eine dorsale Blastomere eines Vierzell- Stadiums) tritt die Vergrößerung des Auges deutlicher hervor und es kommt zusätzlich zu einer leichten Expansion neuralen Gewebes im Bereich des sich entwickelnden Gehirns sowie in einigen Fällen zu tumorösen Auswüchsen im Bereich von Derivaten der cranialen Neuralleiste (57%, n=47; Abb. 4.12B, B', B''). Eine weitere Steigerung der *Xeya3*-Proteinkonzentration (1000pg, Injektion in eine dorsale Blastomere eines 16-Zell-Stadiums) resultiert in einer schweren Neoplasie des Gehirns und des Auges (100%, n=25), welches im Zuge der Neoplasie ein Kolobom, einen Defekt bezüglich des ventralen Schlusses des optischen Bechers und Nervs, ausbildet. Strukturen des Rumpfes zeigen keine Reaktion auf die *Xeya3*-Überexpression (Abb. 4.12C, D, D', E, E'). Der Transversalschnitt durch das betroffene Auge lässt eine abnormale Einfaltung der neuralen Retina von proximal her erkennen (Abb. 4.12D'). Dies ist möglicherweise eine Folge des Größenzuwachses des Auges innerhalb eines durch umgebendes Gewebe, wie auch des dorsal stark vergrößerten Diencephalons, begrenzten Raumes. Neben einem enormen Gewebezuwachs zeigt der Transversalschnitt in Höhe der otischen Vesikel die Bildung eines zusätzlichen, sekundären Hirn-Ventrikels innerhalb der betroffenen Gehirnhälfte (Abb. 4.12E, E'). Zellen der ventrikulären Zone des heranwachsenden Gehirns tragen durch Proliferation zur Genese neuer Neurone bei. So ist hier die Bildung eines weiteren Zentrums der Proliferation neuraler Vorläuferzellen denkbar. Das Rückenmark entwickelt sich bei *Xeya3*-Überexpression normal (Abb. F, F').

Der Vergleich der durch *Xeya3*-Überexpression induzierten Phänotypen mit dem Expressionsmuster von *Xeya3* (Abb. 4.5) macht deutlich, dass es sich bei den hier betroffenen Geweben nur um solche handelt, die auch im Verlauf der Embryonalentwicklung durch eine endogene Expression von *Xeya3* gekennzeichnet sind. Ist dies bezüglich der beschriebenen

räumlichen Auswirkungen eines Funktionsverlustes von *Xeya3* (s. 4.6) zu erwarten, so muss

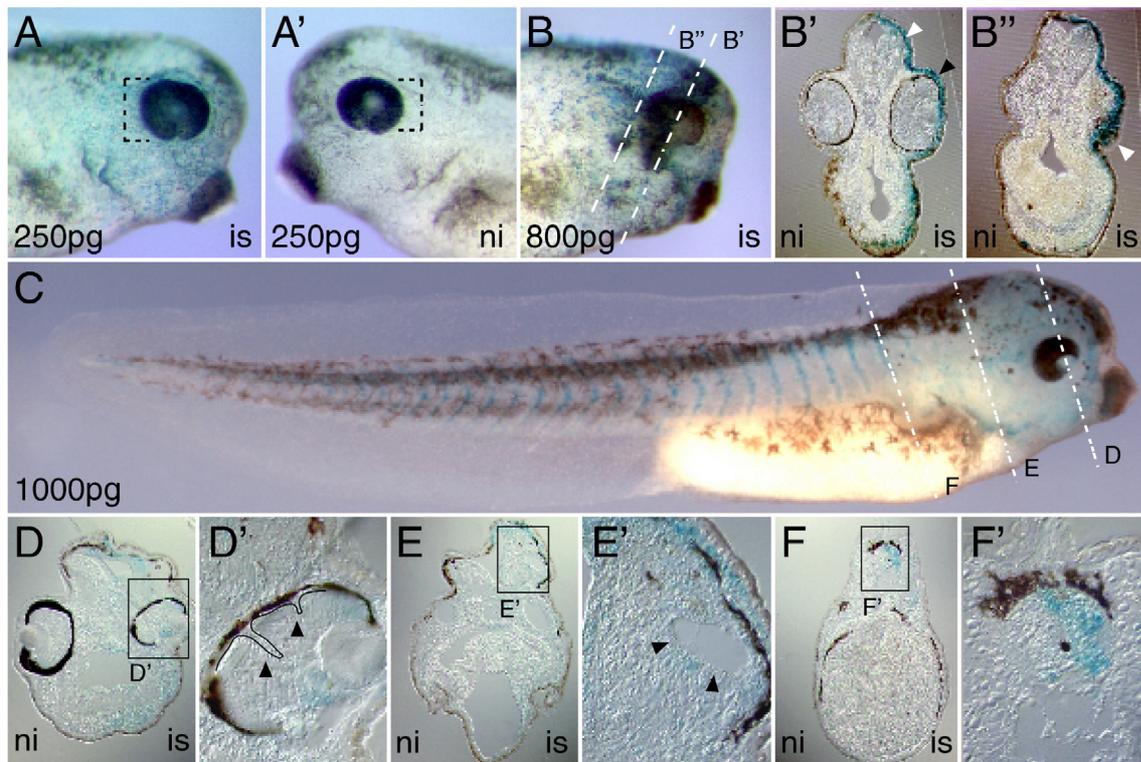


Abb. 4.12: Neoplasie anterioren neuralen Gewebes als Folge einer Überexpression von *Xeya3*. (A, A') NF Stadium 38 *Xenopus laevis* Embryo nach Mikroinjektion von 250pg *Xeya3*-mRNA in eine dorsale Blastomere eines Vierzell-Stadiums, laterale Ansicht. Es kommt zu einer leichten Vergrößerung des Auges auf der injizierten Seite; is, injizierte Seite; ni, nicht injizierte Seite. (B, B', B'') NF Stadium 38 *Xenopus laevis* Embryo nach Mikroinjektion von 800pg *Xeya3*-mRNA in eine dorsale Blastomere eines Vierzell-Stadiums, laterale Ansicht und Transversalschnitte. Durch Erhöhung der injizierten mRNA-Menge kommt es zu einer weiteren Vergrößerung retinaler Strukturen und zur Vergrößerung der betroffenen Hirnhälfte (B', schwarzer bzw. weißer Pfeil) sowie vereinzelt zu tumorähnlichen Auswüchsen im Bereich von Derivaten der cranialen Neuralleiste (B'', weißer Pfeil). (C-F') NF Stadium 40 *Xenopus laevis* Embryo nach Mikroinjektion von 1000pg *Xeya3*-mRNA in eine dorsale Blastomere eines 16-Zell-Stadiums, laterale Ansicht und Transversalschnitte. Die so erhaltenen phänotypischen Veränderungen beschränken sich auf anteriore neurale Gewebe, die Entwicklung von Rumpfstrukturen ist nicht betroffen. (C-E') Unter dem Einfluss hoher Konzentrationen an *Xeya3*-Protein zeigt sich ein Defekt bezüglich des ventralen Schlusses des optischen Bechers (Kolobom), eine atypische Faltung der neuralen Retina (D', schwarze Pfeile; der Verlauf der Einfaltung im Bereich des Transversalschnittes ist durch eine schwarze Linie verdeutlicht) sowie eine starke Neoplasie von Hirngewebe (E, E'). Dabei kommt es morphologisch zur Bildung sekundärer Ventrikel (schwarze Pfeile). (F, F') Neurales Gewebe des Rückenmarks caudal des Hinterhirns zeigt keinerlei Veränderung.

dies im Kontext der Überexpression bedeuten, dass exogen zugeführtes *Xeya3*-Protein nur bei Vorhandensein bestimmter, innerhalb seiner Expressionsdomäne vorliegender Faktoren agieren kann.

4.10 Eine *Xeya3*-Überexpression verursacht eine Expansion der vorderen Neuralplatte

Die temporäre wie räumliche Anlage der in Kapitel 4.9 beschriebenen Phänotypen nach Überexpression des *Xeya3*-Proteins wurde mit Hilfe von „*WMISH*“ an *Xenopus laevis* Embryonalstadien nach Mikroinjektion von *Xeya3*-mRNA weitergehend untersucht. Bezüglich früher Neurula-Stadien zeigt sich dabei, dass es zu einer Expansion von Zellschicksalen der

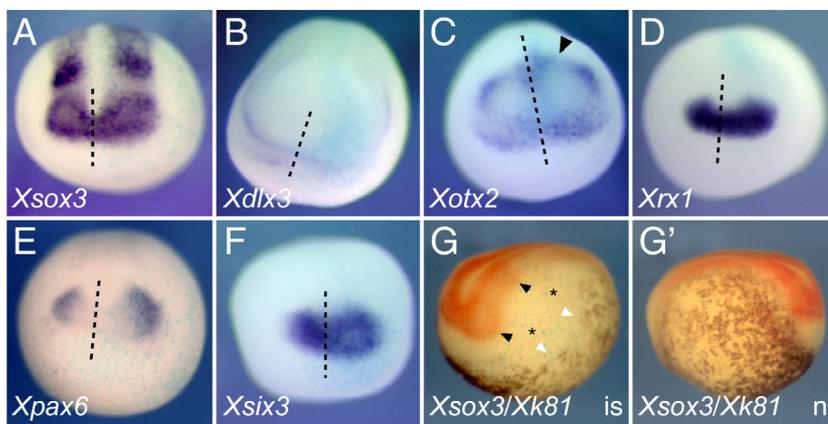


Abb. 4.13: Expansion der vorderen Neuralplatte unter dem Einfluss einer Überexpression von *Xeya3*. „*WMISH*“ an NF Stadium 14/15 Embryonen nach Injektion von 800pg synthetischer *Xeya3*-

mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums; zur Darstellung der injizierten Seite des Embryos wurde synthetische mRNA für β -Galaktosidase ko-injiziert und β -Galaktosidase vor der „*WMISH*“ durch eine Färbereaktion nachgewiesen. A-F, frontale Ansicht, injizierte Seite rechts, die Mittellinie des Embryos ist durch eine gestrichelte Linie kenntlich gemacht. (A) Expansion der anterioren Expressionsdomäne des panneuralen Markergens *Xsox3* nach lateral auf der injizierten Seite. (B) Verschiebung nach anteriolateral und leichte Reduktion des Expressionsbereiches von *Xdlx3*. (C) Vergrößerung des durch *Xotx2* gekennzeichneten Bereiches innerhalb der Neuralplatte. Die posteriore Expressionsdomäne ist leicht nach caudal verschoben (schwarzer Pfeil). (D, E, F) Vergrößerung der Expressionsdomänen der Augenanlage von *Xrx1*, *Xpax6* und *Xsix3* nach (anterio-)lateral. (G, G') Doppelfärbung von *Xsox3* sowie dem nicht-neuralen epidermalen Markergen *Xk81*; is, injizierte Seite; ni, nicht injizierte Seite. Neben einer *Xsox3*-Expansion (schwarze Pfeile) kommt es zu starker Repression von *Xk81* (weiße Pfeile) und einer Ausdehnung der sowohl für *Xsox3*- als auch *Xk81*-Expression negativen Region (Sternchen).

anterioren Neuralplatte kommt (Abb. 4.13). So ergibt sich für das innerhalb des Bereiches der offenen Neuralplatte exprimierte panneurale Markergen *Xsox3* eine Vergrößerung nach lateral (50%, n=20; Abb. 4.13A). Mit dieser Beobachtung korrespondiert eine Verschiebung der Expressionsdomäne von *Xdlx3*, das von Zellen der Grenze von neuralem zu nicht-neuralem

Ektoderm exprimiert wird, in Richtung anteriolateral. Neben dieser räumlichen Auswirkung der *Xeya3*-Überexpression ist zusätzlich eine leichte Repression der *Xdlx3*-Expression anterior zu beobachten (53%, n=30; Abb. 4.13B). Die *Xotx2*-Expression spart in diesem Entwicklungsstadium das durch retinale Markergene wie *Xrx1* definierte Augenfeld aus. Im Zusammenhang mit einer nach lateral expandierten Expressionsdomäne von *Xrx1* (50%, n=30) ist auch die Expression von *Xotx2* in diese Richtung verschoben (40%, n=30; Abb. 4.13C, D). Weitere gut charakterisierte retinale Markergene wie *Xpax6* (80%, n=15) und *Xsix3* (34%, n=29) folgen unter dem Einfluss einer Überexpression von *Xeya3* in ihrem Expressionsmuster dem Trend zur Expansion im Zusammenhang mit einer Vergrößerung vorderer Bereiche der Neuralplatte (Abb. 4.13E, F). Eine Doppelhybridisierung mit RNA-Sonden für *Xsox3* sowie für das nicht-neurale, epidermale Markergen *Xk81* (epidermales Keratin) zeigt neben der bereits beschriebenen Expansion anteriorer Expressionsbereiche von *Xsox3* eine starke Repression der *Xk81*-Expression. Dadurch entsteht ein Bereich, der sowohl für eine Expression von *Xsox3* als auch *Xk81* negativ ist (84%, n=25; Abb. 4.13G, G'). Die Identität dieses Gewebeabschnittes kann nicht eindeutiger geklärt werden. Eine Repression der *Xk81*-Expression tritt indes auch auf, wenn exogenes Protein durch Mikroinjektion in ventrale Bereiche des Embryos eingeführt wird. Da es nach *Xeya3*-Überexpression in ventralen Bereichen späterer Entwicklungsstadien zu keinen offensichtlichen morphologischen Veränderungen kommt, handelt es sich hierbei um einen transienten Effekt im Zuge der Überexpression von *Xeya3*.

4.11 Zellen einer durch *Xeya3*-Überexpression vergrößerten Retina durchlaufen den Differenzierungsprozess

Eine weitere „*WMISH*“-Analyse in späteren Entwicklungsstadien zeigt in Übereinstimmung mit den in Kapitel 4.9 beschriebenen Beobachtungen eine Expansion retinal exprimierter Gene wie *Xrx1* (80%, n=15), *Xsix3* (87%, n=15) und *Xoptx2* (53%, n=15) im Zuge einer durch *Xeya3*-Überexpression induzierten moderaten retinalen Neoplasie (Abb. 4.14A-C'). Dabei kommt es im Schnitt zu um ca. 30% vergrößertes retinales Gewebe (gestrichelte Linien in Abb. 4.14A', B', C'). In einigen Fällen, wie hier durch die Detektion endogener *Xoptx2*-mRNA gezeigt, nimmt das Gewebe des ansonsten konkav geformten optischen Bechers aufgrund des Größenwachses der prospektiven Retina eine konvexe Form an (Abb. 4.14C').

Betrachtet man die Morphologie des in Abb. 4.12D' gezeigten Auges (insbesondere die auftretenden Einfaltungen der neuralen Retina), so stellt sich die Frage nach der unter diesen Bedingungen vorliegenden Schichtung retinaler Zelltypen. Zur Klärung wurden „*WMISH*“ an *Xeya3*-injizierten Embryonen im NF Stadium 40 unter Verwendung von RNA-Sonden des photorezeptorspezifisch exprimierten Gens *Xrhodopsin* durchgeführt. In diesem Entwicklungsstadium hat die Genese der verschiedenen differenzierten retinalen Zelltypen bereits begonnen. In schweren Phänotypen zeigt sich dabei eine atypische Verteilung

Xrhodopsin positiver Zellen, welche in normal entwickelten Retinae ausschließlich proximal, in nächster Nähe des Retinalen Pigmentepithels zu finden sind (Abb. 4.14D, D', D''). Diese Beobachtung kann zum Teil durch eine abnormale Faltung des optischen Bechers sowohl entlang einer proximodistalen als auch anterioposterioren Achse erklärt werden, welche dazu führt, dass als Photorezeptoren determinierte Vorläuferzellen in für sie untypischen Bereichen der neuralen Retina zu liegen kommen. In weniger starken Phänotypen, in denen keine atypische Faltung der Retina beobachtet wird, ist die Schicht der Photorezeptoren normal lokalisiert. Als Folge der retinalen Neoplasie ist sie allerdings wie auch restliches retinales Gewebe erheblich vergrößert (Abb. 4.14E-E'').

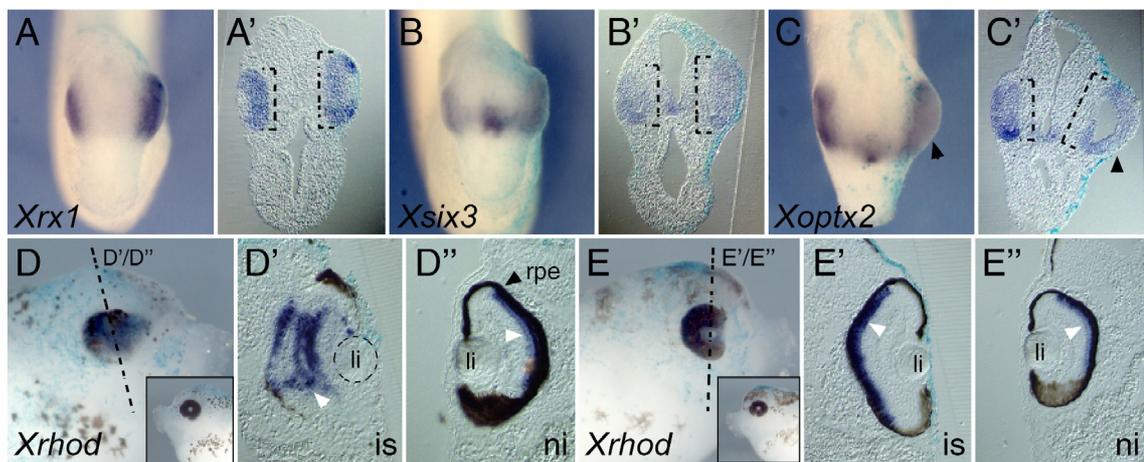


Abb. 4.14: Retinaler Größenwuchs und atypisches retinales Differenzierungsmuster nach Überexpression von *Xeya3*. „*WMISH*“ an NF Stadium 31 (A-C'; frontale Ansicht und Transversalschnitte) bzw. NF Stadium 40 Embryonen (D-E''; laterale Ansicht und Transversalschnitte) nach Injektion von 800pg synthetischer *Xeya3*-mRNA sowie 100pg synthetischer mRNA für β -Galaktosidase in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und anschließender Färbung gegen β -Galaktosidase. (A-C') Die induzierte Vergrößerung von Augenstrukturen führt zu einer Expansion der Expression retinaler Markergene wie *Xrx1* (A, A'), *Xsix3* (B, B') und *Xoptx2* (C, C'). In einigen Fällen kommt es durch die bestehende retinale Neoplasie zu Defekten in der Ausbildung eines optischen Bechers (schwarze Pfeile in C, C'). (D, D', D'') Schwere Phänotypen zeigen ein atypisches Differenzierungsmuster bezüglich des photorezeptorspezifisch exprimierten Gens *Xrhodopsin* (weiße Pfeile; is, injizierte Seite; li, Linse; ni, nicht injizierte Seite; rpe, Retinales Pigmentepithel; die nicht injizierte Seite des Embryos ist verkleinert in D dargestellt). (E, E', E'') Leichter Phänotyp mit deutlichem Größenwuchs an retinalem Gewebe. Die korrekte räumliche Organisation von Zellen mit *Xrhodopsin*-Expression (weiße Pfeile) bleibt jedoch erhalten (die nicht injizierte Seite des Embryos ist verkleinert in E dargestellt).

4.12 Die Überexpression von *Xeya3* bewirkt eine Expansion dorsaler Hirnbereiche sowie die Ausweitung von Zentren der Neurogenese

In Kapitel 4.9 ist neben einer retinalen Neoplasie auch eine massive Vergrößerung von Hirngewebe nach Überexpression von *Xeya3* beschrieben. Damit einher geht das sporadische Auftreten von sekundären Ventrikeln innerhalb vergrößerter Hirnregionen (Abb. 4.12E, E'). Die Analyse von Markergenen des zentralen Nervensystems durch „*WMISH*“ in Kombination mit der Anfertigung von Gewebeschnitten unterstreicht diese Beobachtung (Abb. 4.15). Zellen des expandierten Gewebes exprimieren sowohl Markergene der neuralen Zelldifferenzierung wie *N-Tubulin* (100%, n=15; Abb. 4.15A-A'') und proneurale Gene wie *XmyT1* (74%, n=19; Abb. 4.15B, B'), als auch Faktoren, die im Zusammenhang mit der Genese von Neuronen im Bereich der ventrikulären Zone stehen, beispielsweise *Xpax3* (47%, n=17; Abb. 4.15C-D'). Wichtig dabei ist, dass sich die Größenzunahme vorwiegend auf dorsale Bereiche des Gehirns beschränkt (s. Abb. 4.15A''). Dies zeigt zum einen die deutliche Expansion der Expressionsdomäne des dorsal exprimierten Gens *Xpax3* (Abb. 4.15C') als auch die Tatsache, dass es bezüglich der Expression des ventral exprimierten *Xshh* (*sonic hedgehog*) bei erheblicher Ausdehnung neuralen Gewebes zu praktisch keiner Veränderung seines Expressionsmusters in proximodistaler oder ventrodorsaler Orientierung kommt (Abb. 4.15E). Zusätzlich ist innerhalb des Metencephalons die Bildung eines weiteren, bezüglich der Expression von *N-Tubulin* negativen Bereiches distal der *N-Tubulin*-Expressionsdomäne zu beobachten (Abb. 4.15A''). Innerhalb dieses Areals kann eine zweite, distal lokalisierte Domäne erhöhter Expression von *XmyT1* detektiert werden (Abb. 4.15B'). So sind differenzierte Neurone, gekennzeichnet durch eine Expression von *N-Tubulin*, proximal wie distal von Zellen umgeben, die den neuralen Determinierungsmarker *XmyT1* exprimieren. Für den dorsalen Hirnmarker *Xpax3* kann im Transversalschnitt nicht nur eine zusammenhängende Expansion der Expressionsdomäne nach distal sondern auch das Auftreten von vom ursprünglichen Expressionsbereich abgetrennten Zellgruppen beobachtet werden, in denen die Bildung eines sekundären Ventrikels stattfinden kann (Abb. C', C'', D'). Berücksichtigt man die normalerweise vorwiegend ventrikulär lokalisierte *Xpax3*-Expression sowie die für *N-Tubulin* und *XmyT1* beschriebenen Phänomene, legt dies nahe, dass es unter dem Einfluss einer *Xeya3*-Überexpression zur Bildung weiterer Zentren der Neurogenese innerhalb vergrößerter Gehirnbereiche kommt. In extremen Fällen sind diese durch die Ausbildung sekundärer Gehirn-Ventrikel gekennzeichnet.

Da es bezüglich der untersuchten Markergene wie *Xpax3* und *Xshh* zu keiner Ausdehnung der Expressionsbereiche in dorsoventraler bzw. ventrodorsaler Orientierung kommt, sind Auswirkungen des *Xeya3*-Funktionsgewinns auf die dorsoventrale Musterbildung innerhalb des sich entwickelnden zentralen Nervensystems eher auszuschließen (Abb. C'-E).

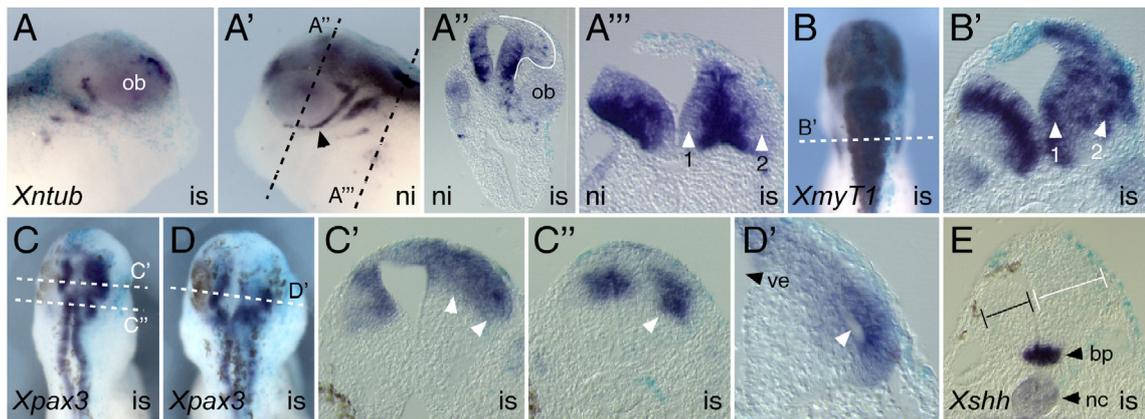


Abb. 4.15: Veränderung des Expressionsmusters von Markergenen des zentralen Nervensystems nach einer Überexpression von *Xeya3*. „*WMISH*“ an NF Stadium 30 (A-B'; laterale, dorsale Ansicht und Transversalschnitte) bzw. NF Stadium 35 Embryonen (C-E; dorsale Ansicht und Transversalschnitte) nach Injektion von 800pg synthetischer *Xeya3*-mRNA und 100pg synthetischer mRNA für β -Galaktosidase in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und anschließender Färbung gegen β -Galaktosidase. (A-A''') Expression des neuronalen Differenzierungsmarkers *N-Tubulin*. (A, A'; laterale Ansicht) Es kommt zu einer starken Reduktion cranialer Nerven wie dem trigeminalen Nerv (schwarzer Pfeil in A'); is, injizierte Seite; ni, nicht injizierte Seite; ob, optischer Becher. (A'') Im Zuge der Expansion dorsalen Diencephalon-Gewebes (weiße Markierung in A'') exprimieren vereinzelte Zellen *N-Tubulin*. (A''') In Höhe des Metencephalons entsteht durch *Xeya3*-Überexpression ein weiterer, bezüglich einer Expression von *N-Tubulin* negativer Bereich distal der *N-Tubulin*-Expressionsdomäne („2“, weiße Pfeile). (B, B'; dorsale Ansicht und Transversalschnitt) Expansion der Expression von *XmyT1*, einem in determinierten neuronalen Vorläuferzellen exprimierten Gen, in vergrößerte Metencephalonbereiche. Es besteht eine zweite Domäne erhöhter Expression in distalen Bereichen („2“, weiße Pfeile in B'). (C-D') Ausdehnung der Expression (C') und Bildung sekundärer, abgetrennter Expressionsdomänen (C'', D') des dorsal und ventrikulär innerhalb des zentralen Nervensystems exprimierten Gens *Xpax3* (weiße Pfeile). Vereinzelt auftretende sekundäre Ventrikel sind von Zellen mit *Xpax3*-Expression umgeben (weißer Pfeil in c'; ve, primärer Ventrikel). (E) Die ventral im Bereich der Bodenplatte (bp) lokalisierte Expressionsdomäne von *Sonic hedgehog* (*Xshh*) zeigt keine Veränderung in ventrodorsaler Orientierung nach durch Überexpression von *Xeya3* verursachter Vergrößerung des Hinterhirns (weißer und schwarzer Balken; nc, Notochord).

Bei Überexpression von *Xeya3* kommt es außerdem zur Reduktion cranialer Nerven als Derivate anteriorer ektodermaler Plakoden. Dies zeigt sich durch eine Repression der Expression von *N-Tubulin* (Abb. 4.15A, A') beispielsweise im Bereich des trigeminalen Nervs. In Kapitel 4.10 ist eine Reduktion des plakodalen Markergens *Xdlx3* in Neurula-Stadien nach *Xeya3*-Überexpression beschrieben worden (Abb. 4.13B). Damit ist die Entwicklung cranialer Nerven wie des trigeminalen Nervs unter einer *Xeya3*-Überexpression schon zu diesem

Zeitpunkt der Entwicklung gestört, so dass sich in frühen Schwanzknospen-Stadien der beschriebene Effekt zeigt.

4.13 Eine *Xeya3*-Überexpression stimuliert die Zellproliferation innerhalb neuralen Gewebes

Durch Überexpression von *Xeya3* in *Xenopus laevis* kommt es zu massiven Vergrößerungen neuraler Derivate wie Gehirn und Retina. Da dies bis auf den beschriebenen Verlust von Strukturen wie cranialen Nerven, die sich aus plakodalem Ektoderm ableiten, ohne die Reduktion nicht neuralen Gewebes geschieht, ist eine Beteiligung von Zellproliferationseffekten naheliegend.

Tatsächlich kommt es nach Injektion synthetischer *Xeya3*-mRNA zu einer erheblichen Zunahme der Proliferationsrate von Zellen innerhalb des Bereiches der Neuralplatte in NF Stadium 14 Embryonen (53%, n=30; Abbildung 4.16B). Zur detaillierteren Analyse dieser Beobachtung wurden am Beispiel zweier Embryonen des beschriebenen Phänotyps nach „Clearing“ derselben in Benzylbenzoat/Benzylalkohol (2:1) jeweils für *pH3* positive Zellen ausgezählt. Dabei wurden Bereiche gleicher Pixelanzahl sowohl auf der injizierten als auch auf der nicht injizierten Seite ausgewählt (Abb. 4.16A). Hierbei ergibt sich nahezu eine Verdoppelung der Zahl an mitotisch aktiven Zellen bei Vergleich der injizierten- zur nicht injizierten Seite des Embryos (95 zu 55, n=2).

In vorangegangenen Abschnitten wurde die Expansion dorsaler Hirnbereiche, die Bildung sekundärer Hirnventrikel sowie die ektopische Expression von Markergenen der ventrikulären Zone, wie etwa *Xpax3*, beschrieben. Durch Detektion des Mitosemarkers *pH3* in NF Stadium 28 Embryonen finden sich nach einer Überexpression von *Xeya3* zusätzlich zum Areal der ventrikulären Zone aktiv proliferierende Zellen auch in distalen Hirnbereichen (Abb. 4.16C). Mit der ventrikulären Zone als Ort der Proliferation von neuralen Vorläuferzellen und der Genese neuraler Zelltypen unterstützt diese Beobachtung die zuvor gemachte Vermutung nach Bildung zusätzlicher Zentren der Neurogenese innerhalb anteriorer Abschnitte des zentralen Nervensystems (s. auch Kapitel 4.9, 4.12).

Die Wirkung von *Xeya3* als Mitogen zeigt sich auch im „5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU)“-Assay, der die Beobachtung von Zellproliferation innerhalb eines Zeitfensters erlaubt. So ergeben sich eindeutige und vielzählige Signale innerhalb expandierter Hirnregionen sowie im Bereich eines entstandenen sekundären Hirn-Ventrikels (Abb. 4.16D, D'). Wie mittels „TUNEL“-Assay gezeigt, kommt es als Reaktion der Zellen auf die durch *Xeya3*-Überexpression induzierte Hyperproliferation innerhalb betroffenen Gewebes vermehrt zum programmierten Zelltod, der Apoptose (Abb. 4.16E, E'). Die Ausführung des apoptotischen Programmes dient u.a. der Elimination von Zellen, in denen durch endogene Kontrollmechanismen ein fehlerhaftes Fortschreiten des Zellzyklus angezeigt ist. Übermäßige

Zellproliferation kann so kontrolliert und verhindert werden. Der beobachtete Anstieg der Apoptoserate nach Überexpression von *Xeya3* kann somit als Folge der induzierten Hyperproliferation angesehen werden und stellt eine endogene Reaktion auf die Steigerung der Proliferationsrate dar.

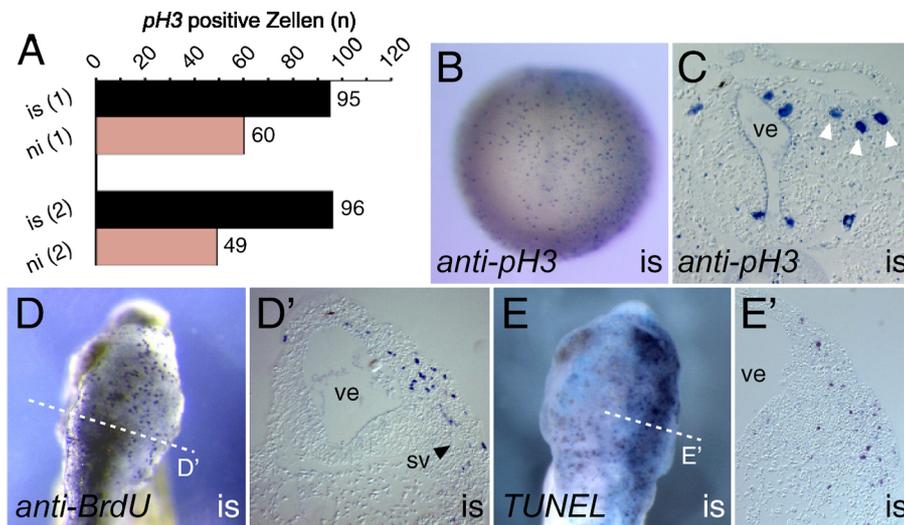


Abb. 4.16:
Stimulation der Zellproliferation durch *Xeya3*-Überexpression.

Detektion von phosphoryliertem Histon 3, „BrdU“- bzw. „TUNEL“-Assay nach Injektion von 800pg

synthetischer *Xeya3*-mRNA und 100pg synthetischer mRNA für β -Galaktosidase in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und anschließender Färbung gegen β -Galaktosidase. (A-C) Detektion von phosphoryliertem Histon 3. (A, B) Durch Überexpression von *Xeya3* kommt es zu einem erheblichen Anstieg der Zellproliferationsrate in Bereichen der Neuralplatte auf der injizierten Seite des Embryos; (1), Embryo 1; (2), Embryo 2; is, injizierte Seite; ni, nicht injizierte Seite. (B) NF Stadium 14, frontale Ansicht. (C) Transversalschnitt im Bereich des Hinterhirns eines NF Stadium 28 Embryos. Es finden sich mitotische Zellen besonders in dorsodistalen Bereichen des reifenden Gehirns (weiße Pfeile; ve, Ventrikel). (D, D') Dorsale Ansicht eines NF Stadium 32 Embryos und Transversalschnitt in Höhe des Hinterhirns. Proliferierende Zellen innerhalb neoplastischer Hirnbereiche werden ebenso mittels „BrdU“-Assay detektiert (sv, sekundärer Ventrikel). (E, E') Dorsale Ansicht eines NF Stadium 32 Embryos und Transversalschnitt in Höhe des Metencephalons. Als Reaktion auf hyperproliferierendes Gewebe kommt es zur Induktion von Apoptose.

Eine Behandlung von mit synthetischer *Xeya3*-mRNA injizierten Embryonen mit den Mitoseinhibitoren Hydroxyurea und Aphidicolin („HUA“) in Gastrulastadien führt des Weiteren zu weitaus geringeren Effekten bezüglich einer Expansion des panneuralen Markergens *Xsox3* (Abb. 4.17), wie es für einen durch vermehrte Zellproliferation ausgelösten Phänotyp zu erwarten ist. Zu beobachten ist jedoch nach wie vor eine Reduktion plakodaler Expression (Abb. 4.17A; s. auch Abb. 4.13B (*Xdlx3*)), welche somit das Ergebnis einer aktiven Repression seitens des *Xeya3*-Proteins darstellt.

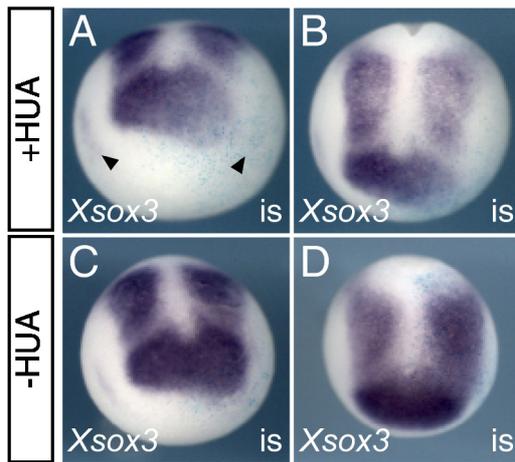


Abb. 4.17: Repression der durch *Xeya3*-Überexpression induzierten Phänotypen durch „HUA“-Behandlung. „*WMISH*“ an NF Stadium 14 Embryonen nach Injektion von 800pg synthetischer *Xeya3*-mRNA und 100pg synthetischer mRNA für β -Galaktosidase in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums, „HUA“-Behandlung in NF Stadium 9,5 und anschließender Färbung gegen β -Galaktosidase; (A, C) frontale Ansicht; (B, D), anteriodorsale Ansicht. Durch „HUA“-Behandlung kommt es zur Repression der Expansion der *Xsox3*-Expressionsdomäne nach anterior wie lateral. Die Reduktion plakodaler Expression bleibt jedoch erhalten (schwarze Pfeile in (A); is, injizierte Seite).

4.14 Ein Verlust der Phosphatase-Aktivität von *Xeya3* führt zu einer gesteigerten Aktivität des *Xeya3*-Proteins

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die intrinsische Phosphatase-Aktivität des *Eya3*-Proteins der Maus unerlässlich für dessen korrekte Funktion innerhalb eines multimeren Komplexes von Transkriptionsfaktoren ist (Li et al., 2003). Zur Untersuchung einer möglichen Funktion der Phosphatase-Aktivität des *Eya3*-Proteins aus *Xenopus laevis* *in vivo* wurden im Bereich des katalytischen Motivs der Phosphohydrolase-Domäne Punktmutationen eingeführt, welche zu einem Verlust der Phosphatase-Aktivität führen (Li et al., 2003; Abb. 4.18A). Die korrespondierenden synthetischen mRNAs für *Xeya3*-mut1, *Xeya3*-mut2 und *Xeya3*-mut3 wurden im Vergleich mit synthetischer mRNA für *Xeya3* durch Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Embryonen auf ihre Phänotyp-induzierende Wirkung hin getestet (Abb. 4.18B-D'). Dabei zeigt sich, dass ein Verlust der *Xeya3*-Phosphatase-Aktivität zu einer quantitativen (Abb. 4.18B) wie auch qualitativen (Abb. 4.18C-D') Steigerung der Phänotyp-auslösenden Aktivität des *Xeya3*-Proteins führt. So ist die Anzahl an Embryonen, welche einen für *Xeya3* typischen Phänotyp (Vergrößerung des Auges, leicht ausgeprägtes Kolobom, Neoplasie in Bereichen des Gehirns; s. auch Kapitel 4.9) ausprägen, nach Injektion der für Phosphatase-defiziente Proteine kodierenden, synthetischen mRNAs im Durchschnitt um den Faktor vier erhöht. Die qualitative Steigerung der Phänotyp-induzierenden Aktivität äußert sich am Beispiel von 400pg injizierter synthetischer mRNA in einer massiven Neoplasie und daraus folgender Einfaltung der neuralen Retina, was weiter zur Bildung multipler Linsen führt (Abb. 4.18C, C'). Bei diesen Mengen an injizierter synthetischer mRNA kommt es im Falle von Wildtyp-*Xeya3* zu allenfalls leicht vergrößerten Augenstrukturen, derart schwere Fehlbildungen, wie für *Xeya3*-mut1 beschrieben, konnten zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Abb. 4.18D, D').

Dies zeigt, dass die intrinsische Phosphatase-Aktivität des *Xeya3*-Proteins im Zusammenhang mit einer Induktion der beschriebenen Funktionsgewinn-Phänotypen unerlässlich ist und es im

Gegenteil zu einer Verstärkung der durch Funktionen des Proteins ausgelösten neoplastischen phänotypischen Äußerungen kommt.

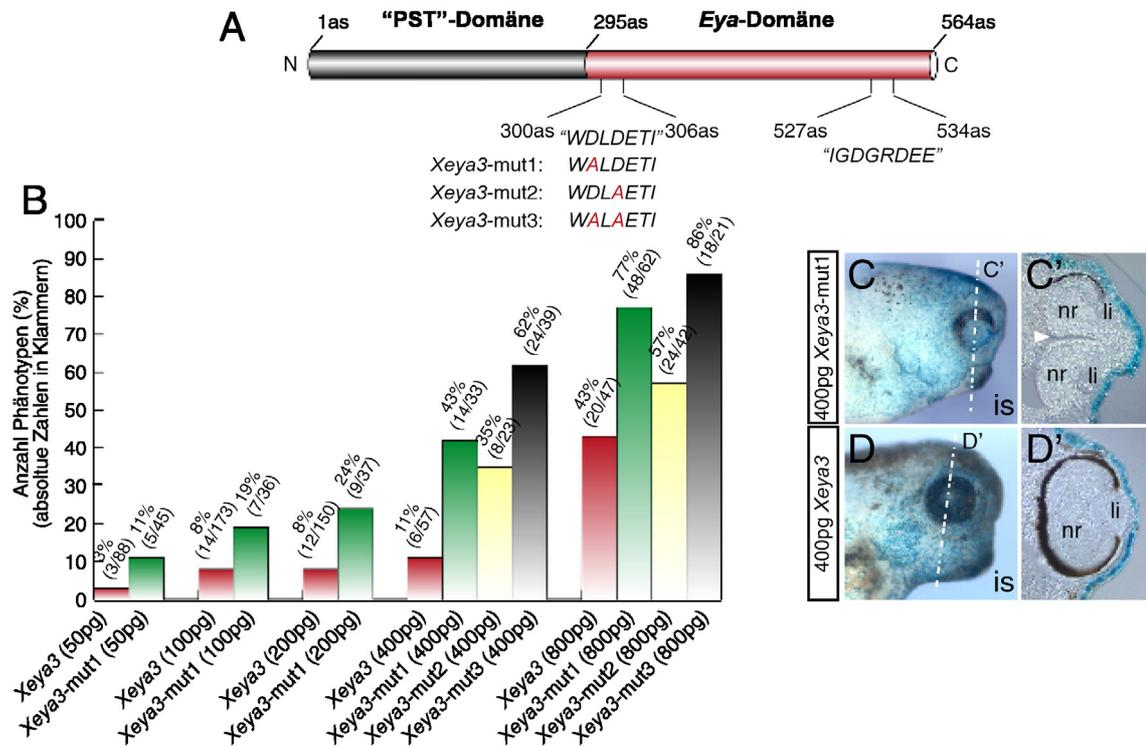


Abb. 4.18: Aktivitätssteigerung von *Xeya3* nach Inaktivierung seiner Phosphatase-Aktivität. (A) Übersicht über die eingeführten Missense-Mutationen im Bereich des katalytischen Motivs der Phosphatase-Domäne von *Xeya3* (as, Aminosäureposition; C, C-Terminus; N, N-Terminus). (B) Die Mikroinjektion synthetischer mRNA der *Xeya3*-Phosphatase-Mutanten (*Xeya3*-mut1-3) in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums führt im Vergleich mit synthetischer *Xeya3*-mRNA zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl an Embryonen mit Phänotypen, wie sie für einen Funktionsgewinn von *Xeya3* beschrieben worden sind. (C-D'; laterale Ansicht und Transversalschnitte im Bereich des Auges) NF Stadium 38 nach Mikroinjektion von 400pg synthetischer mRNA für *Xeya3*-mut1 bzw. *Xeya3* in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums. Es wird zusätzlich eine Steigerung der *Xeya3*-Aktivität in qualitativer Hinsicht beobachtet. Bezüglich *Xeya3*-mut1 zeigt sich eine massive Einfaltung der neuralen Retina (nr; weißer Pfeil in C') und die Bildung zweier Linsen (li).

4.15 Die Klonierung des *Dachshund* Homologs 1 aus *Xenopus laevis* (*Xdach1*)

Zum Transkriptionsfaktor *Dachshund* aus *Drosophila melanogaster* sind in Vertebraten drei Homologe, *Dachshund1*, *Dachshund2* und *DachshundB* bekannt (Davis et al., 1999; Davis et al., 2001b; Hammond et al., 2002). Untersuchungen zur Muskelentwicklung in Hühnerembryonen haben eine Beteiligung von *Dachshund2* als Teil eines multimeren Transkriptionsfaktor-Komplexes, weiter bestehend aus Mitgliedern der *Eyes absent*- und *Six*-Proteinfamilie, gezeigt (Heanue et al., 1999). Bezüglich einer Funktion eines *Dachshund*-Proteins im Zusammenhang mit der Entwicklung des Wirbeltierauges ist bislang nichts bekannt. Zwar existiert eine *Dachshund1*^{-/-}-Maus, Nachkommen sterben jedoch kurz nach der Geburt ohne offensichtliche Entwicklungsdefekte zu zeigen (Davis et al., 2001a).

Zur Klonierung einer *Dachshund1* homologen cDNA aus *Xenopus laevis* wurde zunächst ein 414bp großes Fragment durch RT-PCR aus NF Stadium 28 total RNA-Präparationen mittels aus Sequenzinformation anderer Vertebraten Homologe abgeleiteter degenerierter Primer amplifiziert (Oligonukleotide: *Xdsh*-deg-F2, *Xdsh*-deg-R1). Eine anschließende 3'-RACE-PCR lieferte den vollständigen Leserahmen in 3'-Richtung. Durch 5'-RACE-PCR konnte, bei Sequenzvergleich mit anderen *Dachshund*-Homologen, nur eine partielle Sequenz erhalten werden (Oligonukleotide: *Xdach*-part-3'-Race, *Xdach*-part-5'-Race). Zur Gewinnung der vollständigen Sequenzinformation in 5'-Richtung wurde eine fraktionierte Phagen-cDNA-Bank, welche das Transkriptom aus NF Stadium 29-31 *Xenopus laevis* Köpfen repräsentierte, durch PCR unter Verwendung *Dachshund*-spezifischer Oligonukleotide durchmustert (Oligonukleotide: *Xdach*-F.b., *Xdach*-R). Positive Fraktionen wurden als Matrize in einer nachfolgenden PCR mit Phagenvektor-spezifischen sowie *Dachshund*-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (Oligonukleotide: *CMV*-F, *Xdach*-R), welche zusätzliche 5'-Sequenzinformation lieferte. Der vollständige Leserahmen in 5'-Orientierung wurde durch eine weitere 5'-RACE-PCR erhalten (Oligonukleotid: *Xdach*-141). Nach Amplifikation des ORF (2088bp) einer *Xdach*-cDNA durch PCR mit einer vorher positiv identifizierten Fraktion der Phagen-cDNA-Bank als Matrize wurde dieser in *pGEM-T* kloniert (Oligonukleotide: *Xdach*-cds-F, *Xdach*-R2) und anschließend in den Expressionsvektor *pCS2+* subkloniert (*Xdach1*-F-Cla1, *Xdach1.2*-R-Xho1). Der Sequenzabgleich mit *Dachshund*-Homologen anderer Vertebraten zeigte die Zugehörigkeit der erhaltenen cDNA zur *Dachshund1*-Subklasse („blastx“, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul et al., 1997; MegAlign, Lasergene). Eine weitere *Xdach*-cDNA (*Xdach-B*, 2250bp) wurde durch Dr. E. Amaya (Cambridge, U.K.) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung *c-myc*-(MEQKLISEEDLNE) bzw. Flag-(PDYKDDDDK) Epitop tragender *Xdach*-Fusionsproteine wurde die proteinkodierende Region der jeweiligen *Xdach*-cDNA in *pCS2+ MT* bzw. *pCS2+*, nach Hinzufügen des Flag-Epitops über das rückwärtsgerichtete Oligonukleotid mittels PCR, subkloniert (s. 2.8.2; Oligonukleotide: *Xdach*-F-Stu1, *Xdach1.2*-R-Xho1; *Xdach*-F-Cla1, *Xdach*-Flag-R-Xho1).

AS:	M	A	V	P	A	A	L	I	P	P	T	Q	L	V	T	P	Q	A
N:	ATG	GCT	GTG	CCA	GCC	GCT	TTG	ATC	CCC	CCG	ACT	CAG	CTG	GTG	ACT	CCT	CAG	GCA
Pos.:			9				18			27			36			45		54

A	I	S	S	S	A	S	S	S	S	S	S	S	A	N	S	T	S	S	A
GCG	ATC	TCT	TCC	TCT	GCG	TCT	TCC	TCG	TCC	TCC	TCC	TCT	GCC	AAC	TCG	ACT	TCT	TCG	GCC
		63			72			81			90			99			108		

N	N	S	P	S	P	S	V	A	P	S	S	S	G	Q	S	L	Y	R	P
AAT	AAT	TCT	CCT	TCG	CCT	TCA	GTC	GCC	CCT	TCC	TCG	TCC	GGG	CAG	AGT	TTG	TAC	CGA	CCA
		123			132			141			150			159			168		

E	P	L	A	A	T	T	V	T	P	S	S	L	S	G	P	T	P	N	L
GAG	CCG	CTC	GCT	GCC	ACC	ACA	GTT	ACT	CCC	AGC	AGC	CTC	AGC	GGC	CCG	ACT	CCC	AAC	CTC
		183			192			201			210			219			228		

T	A	S	S	G	S	N	S	Q	G	S	G	A	A	A	G	T	G	G	V
ACG	GCC	AGC	AGC	GGC	AGC	AAC	AGC	CAA	GGG	TCC	GGG	GCA	GCG	GCG	GGG	ACT	GGG	GGA	GTT
		243			252			261			270			279			288		

G	G	G	G	G	G	S	N	G	I	L	S	N	C	N	S	P	S	T	T
GGA	GGA	GGA	GGA	GGA	GGC	AGC	AAT	GGG	ATC	CTG	AGC	AAC	TGC	AAC	AGC	CCC	AGC	ACC	ACC
		303			312			321			330			339			348		

N	S	S	N	S	S	H	H	N	N	N	N	L	I	I	P	G	S	T	S
AAT	AGC	AGC	AAC	AGC	AGC	CAC	CAT	AAT	AAT	AAT	AAC	CTT	ATT	ATC	CCA	GGC	AGC	ACC	TCA
		363			372			381			390			399			408		

A	T	S	S	S	T	T	S	T	S	S	S	N	N	T	P	T	S	N	L
GCC	ACA	TCC	AGC	AGC	ACC	ACA	TCC	ACC	AGC	AGC	AGC	AAC	AAC	ACT	CCC	ACC	TCC	AAC	CTG
		423			432			441			450			459			468		

P	G	K	P	V	Y	S	T	P	S	P	V	E	N	I	P	Q	N	N	E
CCC	GGG	AAG	CCC	GTC	TAC	TCC	ACT	CCG	TCC	CCC	GTG	GAG	AAC	ATC	CCC	CAG	AAC	AAT	GAG
		483			492			501			510			519			528		

C	R	M	V	E	L	R	G	A	K	V	A	S	F	T	V	E	T	C	E
TGC	AGG	ATG	GTG	GAG	CTA	AGA	GGG	GCC	AAG	GTG	GCT	TCA	TTC	ACG	GTA	GAG	ACC	TGC	GAG
		543			552			561			570			579			588		

L	I	C	L	P	Q	A	F	D	L	F	L	K	H	L	V	G	G	L	H
CTC	ATC	TGC	CTC	CCC	CAA	GCT	TTT	GAT	CTT	TTT	TTG	AAG	CAT	TTA	GTT	GGG	GGG	CTG	CAC
		603			612			621			630			639			648		

T	V	Y	T	K	L	K	R	L	E	I	S	P	V	V	C	N	V	E	Q
ACA	GTC	TAC	ACC	AAA	CTC	AAG	AGA	CTG	GAG	ATC	AGC	CCA	GTG	GTG	TCT	AAC	GTG	GAG	CAG
		663			672			681			690			699			708		

V	R	I	L	R	G	L	G	A	I	Q	P	G	V	N	R	C	K	L	I
GTG	CGG	ATC	TTG	AGA	GCC	TTG	GGG	GCC	ATC	CAG	CCT	GGG	GTC	AAC	CGC	TGC	AAA	CTC	ATT
		723			732			741			750			759			768		

S	R	K	D	F	E	T	L	Y	N	D	C	T	N	A	S	S	R	P	G
TCC	AGG	AAG	GAT	TTT	GAA	ACC	TTG	TAC	AAT	GAC	TGC	ACC	AAT	GCC	AGT	TCC	AGA	CCA	GGA
		783			792			801			810			819			828		

R	P	P	K	R	T	Q	S	V	T	S	S	D	N	P	H	I	M	P	H
AGA	CCC	CCT	AAA	AGA	ACG	CAG	AGT	GTT	ACC	TCA	TCA	GAC	AAT	CCA	CAT	ATC	ATG	CCA	CAT
		843			852			861			870			879			888		

T	V	P	G	L	M	S	P	G	M	I	S	P	T	G	L	T	A	A	A
ACG	GTT	CCT	GGT	CTC	ATG	TCT	CCT	GGG	ATG	ATC	TCT	CCA	ACA	GGT	TTG	ACT	GCA	GCA	GCC
		903			912			921			930			939			948		

A A A A A A T N A A I A E A M K V K K I
 GCA GCA GCA GCA GCT GCA ACT AAT GCA GCA ATA GCG GAA GCA ATG AAG GTG AAA AAA ATC
 963 972 981 990 999 1008

K L E A M T N Y H G S N N Q H G A D S D
 AAG TTG GAA GCT ATG ACC AAC TAT CAT GGC AGC AAT AAC CAG CAT GGA GCT GAT TCT GAC
 1023 1032 1041 1050 1059 1068

N G D F S S S V G N S D G S W D K E K L
 AAT GGA GAT TTC AGT TCA AGT GTT GGG AAC AGT GAT GGT TCT TGG GAT AAA GAA AAA CTA
 1083 1092 1101 1110 1119 1128

Q S L P T Q G S Q T S L S H P N L P G Q
 CAA TCT CTC CCT ACC CAA GGA TCA CAA ACC TCT CTT AGC CAT CCC AAC TTG CCT GCA CAG
 1143 1152 1161 1170 1179 1188

H N L S V T H S L N S L Q Q N H L L P N
 CAT AAC CTT TCA GTT ACT CAT TCT CTC AAC TCT CTT CAA CAG AAT CAC CTC CTG CCA AAT
 1203 1212 1221 1230 1239 1248

G L E L P F M M M P H P L I P V S L P H
 GGC CTG GAA CTC CCA TTT ATG ATG ATG CCC CAC CCA CTA ATT CCA GTA AGT CTA CCT CAT
 1263 1272 1281 1290 1299 1308

A S V T M A M S Q M N H L S T I A N M A
 GCA TCT GTT ACC ATG GCG ATG AGC CAG ATG AAC CAT CTC AGT ACC ATT GCA AAC ATG GCA
 1323 1332 1341 1350 1359 1368

A A A Q V Q S T P S R M E T S V I K E R
 GCA GCA GCA CAA GTA CAA AGC ACT CCC TCC AGA ATG GAA ACA TCA GTA ATT AAG GAA CGT
 1383 1392 1401 1410 1419 1428

V P D S P S P A P S L E D G R R P V S H
 GTT CCA GAC AGT CCC TCC CCT GCT CCA TCT CTA GAA GAT GGT CGA AGG CCG GTC AGT CAT
 1443 1452 1461 1470 1479 1488

P S S H R S S S V S S P P A R T E S S S
 CCA TCA TCA CAC AGA AGC AGC AGC GTC TCT AGT CCT CCA GCA AGA ACT GAA AGT TCC TCA
 1503 1512 1521 1530 1539 1548

D R I P V H Q N G I S I N Q M L M G L S
 GAC AGA ATT CCT GTC CAT CAA AAT GGC ATT TCA ATT AAT CAA ATG TTA ATG GGT CTG TCA
 1563 1572 1581 1590 1599 1608

P N I I P G P K E G D L A G H E V G H E
 CCT AAC ATC ATA CCT GGA CCA AAA GAA GGT GAT CTT GCT GGT CAT GAA GTG GGA CAT GAG
 1623 1632 1641 1650 1659 1668

T K R M H L E K D E T L L S T P T A R D
 ACA AAA AGA ATG CAC TTG GAG AAA GAT GAG ACC CTG CTC TCA ACA CCA ACT GCG AGA GAC
 1683 1692 1701 1710 1719 1728

S F D K L S L C G H G Q P L P P G Y P S
 AGC TTT GAC AAA CTT TCC CTG TGT GGG CAT GGG CAA CCT CTA CCT CCT GGC TAC CCG TCT
 1743 1752 1761 1770 1779 1788

P F L F P D G L S S I E T L L T N I Q G
 CCT TTT CTA TTT CCT GAT GGA TTG TCT TCC ATA GAG ACA CTT TTA ACT AAC ATC CAG GGC
 1803 1812 1821 1830 1839 1848

L	L	K	V	A	I	D	N	A	R	A	Q	E	K	Q	V	Q	M	E	K
TTA	TTG	AAG	GTT	GCC	ATA	GAC	AAT	GCA	AGA	GCT	CAA	GAG	AAA	CAG	GTA	CAA	ATG	GAA	AAG
	1863			1872				1881			1890			1899			1908		
T	E	L	K	M	E	L	F	R	E	R	E	L	R	E	A	I	E	K	Q
ACA	GAA	CTG	AAG	ATG	GAA	CTG	TTC	AGG	GAA	CGA	GAA	CTG	AGG	GAA	GCC	ATT	GAA	AAA	CAA
	1923			1932				1941			1950			1959			1968		
F	A	V	E	Q	K	N	R	A	I	I	Q	K	R	L	K	K	E	K	K
TTT	GCA	GTA	GAA	CAA	AAG	AAC	AGA	GCA	ATA	ATT	CAA	AAA	AGG	CTC	AAG	AAA	GAA	AAA	AAG
	1983			1992				2001			2010			2019			2028		
A	K	R	K	L	Q	E	A	L	E	F	E	T	K	R	R	E	Q	A	E
GCA	AAG	AGG	AAA	TTA	CAG	GAA	GCC	CTA	GAA	TTT	GAG	ACA	AAA	AGA	AGA	GAG	CAA	GCA	GAG
	2043			2052				2061			2070			2079			2088		
Q	A	L	K	Q	A	A	S	S	E	G	L	R	V	L	N	E	S	M	T
CAA	GCA	CTG	AAA	CAA	GCA	GCA	TCA	TCA	GAA	GGT	CTC	AGA	GTC	CTT	AAT	GAA	TCT	ATG	ACA
	2103			2112				2121			2130			2139			2148		
P	D	L	E	T	D	R	N	G	A	R	T	D	A	E	R	T	I	Q	D
CCG	GAC	TTA	GAA	ACT	GAC	CGT	AAT	GGA	GCC	AGA	ACA	GAT	GCT	GAA	AGG	ACA	ATA	CAA	GAT
	2163			2172				2181			2190			2199			2208		
G	R	L	Y	L	K	T	S	V	M	Y	-								
GGA	AGA	CTT	TAT	TTA	AAA	ACC	AGT	GTG	ATG	TAC	TGA								
	2223			2232				2241			2250								

Abb. 4.19: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens von *Xdach1-B*. Die aus der Nukleotidsequenz (N) der *Xdach1-B*-cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz (AS) ist jeweils oberhalb dieser dargestellt. Die Zahlen geben die Position (Pos.) des jeweils letzten Nukleotids des betreffenden Triplets an, das Stopkodon ist durch einen Strich markiert. Die N-terminale *Dachshund*-Domäne1 (*DD1*) sowie die C-terminale *Dachshund*-Domäne2 (*DD2*) sind grau hinterlegt. Der zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno* homologe Bereich ist eingerahmt. Der im Vergleich mit *Xdach1-A* zusätzlich vorhandene Sequenzabschnitt ist durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht.

4.16 *Xdach1-A* und *Xdach1-B* besitzen zwei konservierte *Dachshund*-Domänen und zeigen Sequenzverwandtschaft zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno*

Die Nukleotidsequenzen der *Dachshund* homologen cDNAs aus *Xenopus laevis* *Xdach1-A* (2088bp) und *Xdach1-B* (2250bp) kodieren für Proteine einer Länge von 695 bzw. 749 Aminosäuren mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 73718,2 bzw. 79519,41 Dalton. Wie auch andere *Dachshund*-Proteine besitzen *Xdach1-A* und *Xdach1-B* zwei innerhalb der Proteinfamilie konservierte Domänen (Abb. 4.20B), die *Dachshund*-Domäne1 am N-Terminus sowie die *Dachshund*-Domäne2 im Bereich des C-Terminus der Polypeptidkette (Tavsanlı et al., 2004). Der Größenunterschied zwischen *Xdach1-A* und *Xdach1-B* begründet sich im Wesentlichen auf einen zusätzlichen Sequenzabschnitt im Fall von *Xdach1-B* im Bereich zwischen den beiden *Dachshund*-Domänen (Aminosäure-Positionen 368-419; Abb. 4.19, 4.21).

Eine Suche nach konservierten Motiven innerhalb der Primärstruktur von *Xdach1-A* und *Xdach1-B* sowie anderer Vertebraten Homologe von *Dachshund* ergibt zudem eine Sequenzverwandtschaft mit den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno* (PROSITE, MotifScan; http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). Der damit in Zusammenhang stehende konservierte Sequenzabschnitt überlappt dabei partiell mit der *Dachshund* Domäne 1 (Abb. 4.19, 4.20).

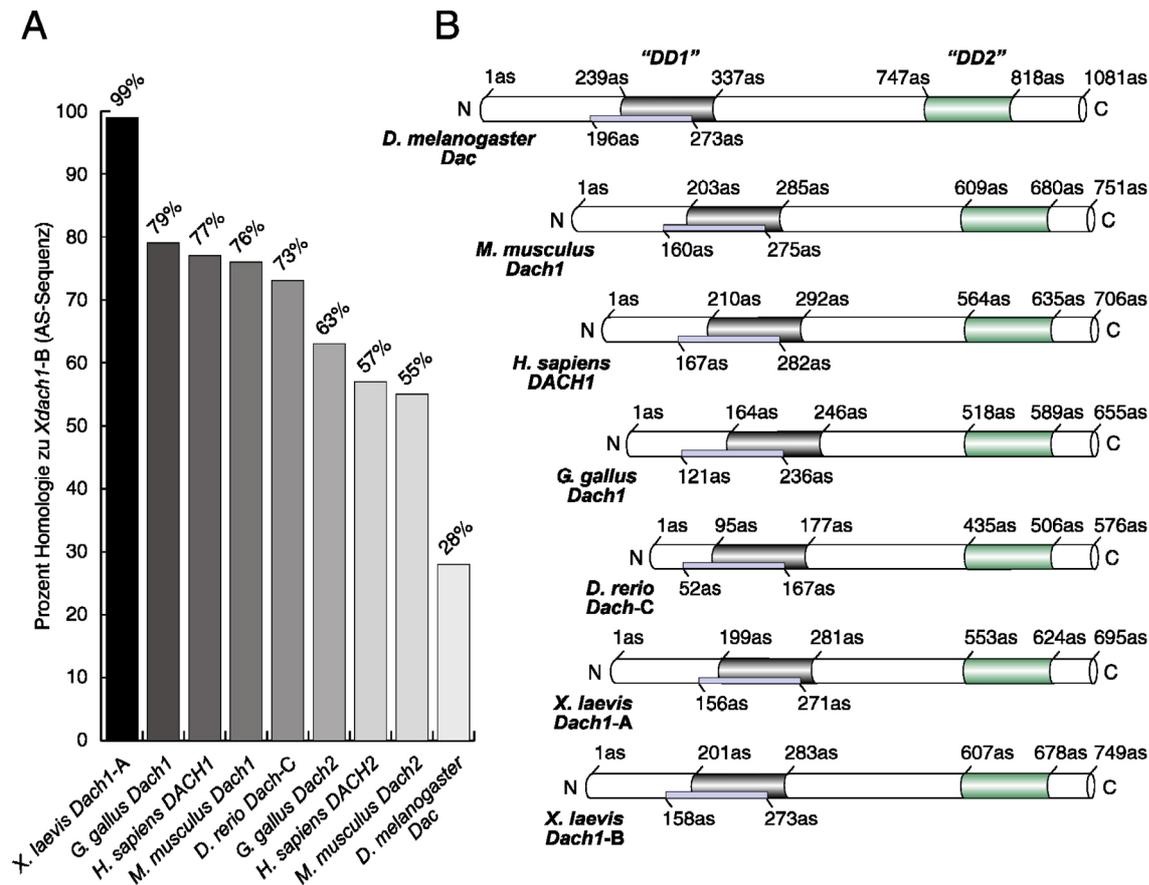


Abb. 4.20: *Xdach1-A/-B* als Mitglied der *Dach1*-Subklasse innerhalb der *Dachshund*-Familie von Proteinen. (A) Höchste Sequenzverwandtschaft von *Xdach1-B* zu *Xdach1-A*, *Dachshund1* aus Huhn, Mensch und Maus sowie zu *DachshundC* aus Zebrafisch. Gegenüber anderen Homologen der *Dachshund* Proteinfamilie besteht geringere Sequenzhomologie (Angabe in Prozent identische Aminosäuren (AS)). (B) Übersicht über Mitglieder der *Dachshund1*-Subfamilie von Proteinen sowie *Dachshund* aus *Drosophila melanogaster*. Der Bereich der *Dachshund* Domäne 1 (*DD1*) ist jeweils grau, der der *Dachshund* Domäne 2 (*DD2*) grün hinterlegt. Der Sequenzabschnitt mit Homologie zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno* ist durch einen hellblauen Balken angezeigt. Abkürzungen: N, N-Terminus; C, C-Terminus; as, Aminoäureposition.

<i>X. laevis</i> Dach1-B	MAVPAALIPPTQLVTPQAAISSSSASSSSSSANSTSSANNSPSPSVA..PSSSGQSLYRPE	59
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----P-----	59
<i>H. sapiens</i> DACH1	-----P--PP--T-----G..TTT-----TS--A--IG.P-A---PT-F---	58
<i>M. musculus</i> Dach1	-----P--PP--T-----G..TTT-----TS--A--IG.P-A---PT-F---	58
<i>G. gallus</i> Dach1	-----AP--P--PPV-T--ACTTT.TTT-SAA-TS--A-AI-PP-PA--TN-F---	60
<i>D. rerio</i> Dach-C	-.....AHAPPM-I--VVN.....STP-TL-----...PA-P--F-T-	38
<i>X. laevis</i> Dach1-B	PLAATTVPSSLSGPTPNLTASSGSNSQSGAAAGTGGVGGGGGNGILSNCSNPSTNS	120
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	118
<i>H. sapiens</i> DACH1	-I-SAAAAATVT.....STGG-GGGG---GGG-SS-N----.GG-GG---PNLAAA-	112
<i>M. musculus</i> Dach1	-I-SSASSSAAAT.....VT.P.GGGGG--GGG-S--N---.....GG---PSLAAG-	107
<i>G. gallus</i> Dach1	-I--PAAAAATVT.....STATTTTGTG--GGG-S--G--S.....PSLGSST	103
<i>D. rerio</i> Dach-C	L-SS..AS-.....-IPIGS.....	51
<i>X. laevis</i> Dach1-B	SNS.....SHHNNNNLIIPGSTSATSSTSTSSNNTPSTN.....LPGK	161
<i>X. laevis</i> Dach1-A	---.....	159
<i>H. sapiens</i> DACH1	NG-GGGGGISAGGGVASSTPINAST--S-SS--SS-S--SSSS-SSS...CGP	170
<i>M. musculus</i> Dach1	-G.....GGVSAGGGASSTPITAST--SSSS--SS-S--SSSS-SSSSSSCGP	163
<i>G. gallus</i> Dach1	GG.....-TSGTSTPNAGAAG.-.....	124
<i>D. rerio</i> Dach-C-H-	55
<i>X. laevis</i> Dach1-B	PVYSTPSPVENI PQNNECRMVELRGAKVASFTVETCELI CLPQAFDLFLKHLVGLHTVYT	222
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	220
<i>H. sapiens</i> DACH1	-----T-----K-D-----G-----	231
<i>M. musculus</i> Dach1	-----T-----K-D-----G-----	224
<i>G. gallus</i> Dach1	-----T-----K-D-----G-----	185
<i>D. rerio</i> Dach-C	-----T-----K--V-----NGN--L-----	116
<i>X. laevis</i> Dach1-B	KLKRLEISPVVCNVEQVRILRGLGAIQPGVNRCKLISRKDFETLYNDCTNASSRPGRPK	283
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	281
<i>H. sapiens</i> DACH1	-----T-----	292
<i>M. musculus</i> Dach1	-----T-----	285
<i>G. gallus</i> Dach1	-----T-----	246
<i>D. rerio</i> Dach-C	-----T-----V-----	177
<i>X. laevis</i> Dach1-B	TQSVTSSDNPHIMPHTVPGLMSPGMISPTGLTAAAAAAAATNAAIAEAMKVKKIKLEAMT	344
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	342
<i>H. sapiens</i> DACH1	-----PE-S-----S-----I-P-----S	353
<i>M. musculus</i> Dach1	-----PE-S-----S-----I-P-----S	346
<i>G. gallus</i> Dach1	-----PE-S-----S-----I-P-----S	307
<i>D. rerio</i> Dach-C	-----P-S--VL--S-S--S-LM-H---.....-AT..L-----V-N	227

<i>X. laevis</i> Dach1-B	NYHGSNNQHGADSDNGDFSSSSVGNSDGSDWKEKQLQSLPTQGSQTSLSHPNLPQGHNLSVTH	405
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	365
<i>H. sapiens</i> DACH1	---A-----E---MN-----	376
<i>M. musculus</i> Dach1	---A-----E---MN---S-G-----T-H-P-S---APVA-ARM-AAFS-P-S-	407
<i>G. gallus</i> Dach1	---A-----E---LN-----	330
<i>D. rerio</i> Dach-C	S---N---S---E---IT---M-----	249
<i>X. laevis</i> Dach1-B	SLNSLQQNHLPLNGLELFPMMMPHPLIPVSLPHASVTMAMSQMNHLSTIANMAAAAQVQST	466
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	412
<i>H. sapiens</i> DACH1	-----P-----	423
<i>M. musculus</i> Dach1	P--H--HS--P-----P-----P-----	468
<i>G. gallus</i> Dach1	-----P-----P-----	377
<i>D. rerio</i> Dach-C	-----P-----N-----S-----V	296
<i>X. laevis</i> Dach1-B	PSRMETSVIKERVDPSPSPAPSLEDGRRPVSHPSHRSSSVSSPPARTESSSDRI PVHQNG	527
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----S-----	473
<i>H. sapiens</i> DACH1	---V-----E---G-----S-----	484
<i>M. musculus</i> Dach1	---V-----E---G-----S-----	529
<i>G. gallus</i> Dach1	---V-----E---G-----S-----	438
<i>D. rerio</i> Dach-C	---V-----V--D---SC--L--RQ---S--H-----PHL---	357
<i>X. laevis</i> Dach1-B	ISINQMLMGLSPNIIIPGPKEGDLAGHEVGHETKRMHLEKDETLTPTARDSDFKLSLCGH	588
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----G-----P-----	534
<i>H. sapiens</i> DACH1	L-M-----VL-----DM--S--I---P-----L---T--	545
<i>M. musculus</i> Dach1	L-M-----VL-----DM--S--I-I---P-----I---T--	590
<i>G. gallus</i> Dach1	L-M-----VL-----DM--S--I-I---P-----L---T--	499
<i>D. rerio</i> Dach-C	L-LGHA-L---SAP-----T-DTV---AST--E-NV-C---S--TYER--HS..	416
<i>X. laevis</i> Dach1-B	GQPLPPGYSPFLFPDGLSS IETLLTNIQGLLKV AIDNARAQEKQVQMEKTELKME LFRER	649
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	595
<i>H. sapiens</i> DACH1	-----F-----DFL---	606
<i>M. musculus</i> Dach1	-----F-----L---DFL---	651
<i>G. gallus</i> Dach1	-----F-----L---	560
<i>D. rerio</i> Dach-C	-PT---F-A-L---E-----L-R---Y---	477
<i>X. laevis</i> Dach1-B	ELREAIEKQFAVEQKNRAIIQKRLKKEKKA KRKLQEALEFETKRREQAEQALKQAASSEGL	710
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	656
<i>H. sapiens</i> DACH1	---TL--L-M-----V-----T-----TDS-	667
<i>M. musculus</i> Dach1	---TL--L-M-----V-----T-----ADS-	712
<i>G. gallus</i> Dach1	---TL--L-----T-----TDS-	621
<i>D. rerio</i> Dach-C	---TL-R-LC-----L-----T-----V-S---DLH--T-QRTT-C-R-	538

<i>X. laevis</i> Dach1-B	RVLNESMTPDLETDRNGARTDAERTIQDGRLYLKTSVMY*	749
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----*	695
<i>H. sapiens</i> DACH1	---D-L--EI-A--S-G-----T---*	706
<i>M. musculus</i> Dach1	---D-L--EI-A--S-G-A-----T---*	751
<i>G. gallus</i> Dach1	---D-L--EI-A--S-G-----GS...-DAYA..*	655
<i>D. rerio</i> Dach-C	PIH-D-QQ-E---ILITSK--T-G-----F--STM--*	576

Abb. 4.21: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xdach1-B* und *Xdach1-A* mit denen von *Dach1*-Proteinen anderer Vertebraten. Rechts sind die Positionen der Aminosäuren am Ende der jeweiligen Zeile angegeben. Identische Aminosäuren sind durch horizontale Striche, fehlende Aminosäuren durch Punkte, die Terminations-Kodons durch Sternchen markiert. Konservierte Aminosäure-Austausche sind rot hinterlegt. Als konservierte Aminosäure-Austausche gelten: A/G, V/I/L/M, F/Y, D/E/N/Q, S/T, K/R (George et al., 1990). Die *Dachshund*-Domäne 1 ist grau, die *Dachshund*-Domäne 2 grün hinterlegt. Der Sequenzabschnitt mit Homologie zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno* ist durch Pfeile markiert.

<i>X. laevis</i> Dach1-B	M.....AVPAALIPPTQLVTPQAAISSASSSS	28
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-.....	28
<i>D. melanogaster</i> dac	-DSVTSEQSENNNNKAGAINNNINSGIERAAGNMNTT-M-MHHQ-QQQAA--AAAA-AQQQ	61
<i>X. laevis</i> Dach1-B	SSSANSTSSANNSPSPSVAPSSSQSLYRPEPLAATVTPSSLSGPTPNLTASSGSNSQGS	89
<i>X. laevis</i> Dach1-A	P-----	89
<i>D. melanogaster</i> dac	QQQH-GRDGS-S-RGANEDRPNGRS-HTGRGSSCSPASS--RHPSAVSPVSSLNH-MM-QM	122
<i>X. laevis</i> Dach1-B	GAAAGTGGVGGGGGNGILSN..CNSPSTTNSNSSHHNNNNLIIPGSTSATSSSTTSTS	148
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----..-----	146
<i>D. melanogaster</i> dac	QQQQQQQQQQQQ.QHHQ--PPPHGM--GNGLPTGLPPRMPHLP-H-LGLLN-LQMMHH	182
<i>X. laevis</i> Dach1-B	SS...NNTPTSNLPGKPVYSTPSPVENIPQNNECRMVELRGAKVASFTVETCELI	205
<i>X. laevis</i> Dach1-A	---...-----	203
<i>D. melanogaster</i> dac	A-PLELMAAAHHHV-PRSYN-P-PISTSD-SA---KL--Y--Q---A-IISNETML	243
<i>X. laevis</i> Dach1-B	FDFLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEISPVVCNVEQVRILRGLGAIQPGVNRCKLISRKDFETL	266
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	264
<i>D. melanogaster</i> dac	-E-----D-V-L-----LCC---DI-	304
<i>X. laevis</i> Dach1-B	YNDCTNA.....SSRPGRPPKR.....TQSVTSSDNPHIMPHTVPG...	302
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----	300
<i>D. melanogaster</i> dac	-R---T-RCLSIKPPESNSLQFR-----GPVGLSLPPTHLP-QH-QLKK-RLDNGDY	365

<i>X. laevis</i> Dach1-BLMSFGMISPTGLTA.....	316
<i>X. laevis</i> Dach1-A	314
<i>D. melanogaster</i> dac	AYENGHISDMKSPLLANGYNPPPINHMAFMQMNAAHHPGAAA-----P.-H--H-RPESQM	425
<i>X. laevis</i> Dach1-B	.AAAAAATNAATAEAMKVKKIKLEAMTNYHGSNNQHG...ADSDNGDFSSSVGNSDGS	372
<i>X. laevis</i> Dach1-A	365
<i>D. melanogaster</i> dac	LK---QN-GMS--NMD-LARSG-WENCRAA-EDIVKHLERLREERT-ERQQAMG--G..AV	484
<i>X. laevis</i> Dach1-B	WDKEKLQSLPTQGSQTSLSHPNLPQGHNLVTHSLNSLQNHLLPNGLELPFMMMPHPLIP	433
<i>X. laevis</i> Dach1-A	379
<i>D. melanogaster</i> dac	V-RVGNVMVAEHKPRDLS--RNCS--TRQSPV LNL-KSGGNTD-GGS-CDAGSERSDC-SVAG	545
<i>X. laevis</i> Dach1-B	VSLPHASVTMAMSQMNHLS.TIANMAAAQVQSTPSRMETSVIKERVDPDSPAPSLEDGR	493
<i>X. laevis</i> Dach1-A	439
<i>D. melanogaster</i> dac	SPARGG-RSLDEGSRSGVGGGV-SHVGGGIIGVEDDEE-EENLSDEN.Q-EVDERC-AKDD	605
<i>X. laevis</i> Dach1-B	RPVSHPSHRSSSVSSPPARTESSSDRIPVHQNGISINQMLMGLSPN.IIPGPKEGDLAGH	553
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----S-----	499
<i>D. melanogaster</i> dac	EDL-DTERDNL-TG-AAA-AAAAAAAHQL--HAA-HHHQTV---HLGVV-PHQR-SPSSA	666
<i>X. laevis</i> Dach1-B	EVGHETKRMHLEKDETLTSTPTARDSFDKLS.....LCGHGQPLPP.....	594
<i>X. laevis</i> Dach1-A	-----G-----P-----	540
<i>D. melanogaster</i> dac	-AAAAALQHQRALNYSQ-AAAAAVANGAAVGGGAVANGPT-G-GA-T-NEALLAANDAAAL	727
<i>X. laevis</i> Dach1-B	..GYSPFLFPDG.....ISSIETLLTNIQGLLKVADNARAQEKQVQMEKTELKMFRE	648
<i>X. laevis</i> Dach1-A	594
<i>D. melanogaster</i> dac	AG-LALGP-GI-AHAAVPA--T---R---S---A---Q--R- ISY --A-- DVL --	788
<i>X. laevis</i> Dach1-B	RELREAIEKQFAVEQKNRAIQKRLKKEKAKRKLQEAL.....	687
<i>X. laevis</i> Dach1-A	633
<i>D. melanogaster</i> dac	--VKDSL-R-LVD-R-L-VLY---FRR-R-IRIRY-QQ-GGGSGAVKGS PNANGSGGGGSG	849
<i>X. laevis</i> Dach1-BEFETKR.....	693
<i>X. laevis</i> Dach1-A	639
<i>D. melanogaster</i> dac	SACSESEACGGGGDAKCNNNNNNNNNNNSNSSSHGGDV--MKENDAGSEKSDKSLASNS	910
<i>X. laevis</i> Dach1-BRE.....	695
<i>X. laevis</i> Dach1-A	641
<i>D. melanogaster</i> dac	SCDVTAGHSAGSVSGSISAGLNCPSPTHFK--PSSDHEGSVERQPRSSAASLAHDEDNT	971
<i>X. laevis</i> Dach1-BQAEQALKQAASSEG.....	709
<i>X. laevis</i> Dach1-A	655
<i>D. melanogaster</i> dac	KRCGSRDRDERPPSGSAASVAAEGSLAAAA-AA-AAA--A-N-KGPWSYPGIDLMTGAF	1032

<i>X. laevis Dach1-B</i>	LRVLNESMTPDLETDRNGARTDAERTIQD.....GRLYLKTSVMY*	749
<i>X. laevis Dach1-A</i>	-----,-----*	695
<i>D. melanogaster dac</i>	WQNY--LAQE--ME-KSRAAN---DVKSPLSERPTA-Y-N--LFGSAN*	1081

Abb. 4.22: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xdach1-B* und *Xdach1-A* mit der des Dachshund (*dac*) Proteins aus *Drosophila melanogaster*. Rechts sind die Positionen der Aminosäuren am Ende der jeweiligen Zeile angegeben. Identische Aminosäuren sind durch horizontale Striche, fehlende Aminosäuren durch Punkte, die Terminations-Kodons durch Sternchen markiert. Konservierte Aminosäure-Austausche sind rot hinterlegt. Als konservierte Aminosäure-Austausche gelten: A/G, V/I/L/M, F/Y, D/E/N/Q, S/T, K/R (George et al., 1990). Die *Dachshund*-Domäne 1 ist grau, die *Dachshund*-Domäne 2 grün hinterlegt. Der Sequenzabschnitt mit Homologie zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno* ist durch Pfeile markiert.

4.17 *Xdach1* wird in neuralen und mesodermalen Geweben exprimiert

Zur Darstellung der räumlichen wie zeitlichen Expression von *Xdach1* wurden „*WMISH*“ an *Xenopus laevis* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt. Dabei wurde eine antisense RNA-Sonde verwendet, die zu *Xdach1-A* und *Xdach1-B* komplementär ist (Basenpositionen 1266-2205, s. Abb. 4.19, 4.21).

Eine erste Expression von *Xdach1* lässt sich nach Abschluss der Neurulation in NF Stadium 21 in Bereichen des prospektiven Hinterhirns sowie innerhalb der frühen optischen Vesikel erkennen (Abb. 4.23A). In NF Stadium 25 Embryonen ist die Transkriptionsrate von *Xdach1* innerhalb dieser Areale stark angestiegen. Zusätzlich finden sich jetzt auch Transkripte in der Anlage des trigeminalen Nervs. Der Transversalschnitt in Höhe der optischen Vesikel und des zukünftigen Hinterhirns zeigt, dass sich die Expression von *Xdach1* auf distale Bereiche der Augenvesikel sowie dorsale Abschnitte des Metencephalons beschränkt (Abb. 4.23B, B'). Die *Xdach1*-Expression innerhalb präsumtiver distaler Retina und dorsaler Hirnbereiche bleibt nach Bildung des optischen Bechers und Invagination von Linsenktoderm bestehen und wird mit dem Erreichen von NF Stadium 32 durch eine zusätzliche Expression innerhalb ventrolateraler Hirnbereiche, innerhalb des prospektiven Nierenkanals sowie hypaxialer Muskelvorläuferzellen ergänzt (Abb. 4.23C, D, D'). Dieses *Xdach1*-Expressionsmuster wird auch in frühen Kaulquappenstadien beobachtet, wobei jetzt Zellen weiterer cranialer Plakoden wie der mittleren Seitenlinienplakode und epibranchialer Plakoden *Xdach1* transkribieren (Abb. 4.23E). Der Transversalschnitt durch das Auge eines NF Stadium 38 Embryos zeigt eine im Bereich der sich formenden, distal gelegenen Ganglionzellschicht sowie Teilen des Retinalen Pigmentepithels verbleibende Expression von *Xdach1*. Im Hinterhirn findet vor allem in dorsalen Abschnitten, daneben aber auch innerhalb der ventrikulären Zone und in ventral

gelegenen Arealen, ausgenommen der Bodenplatte, *Xdach1*-Transkription statt (Abb. 4.23E', E'').

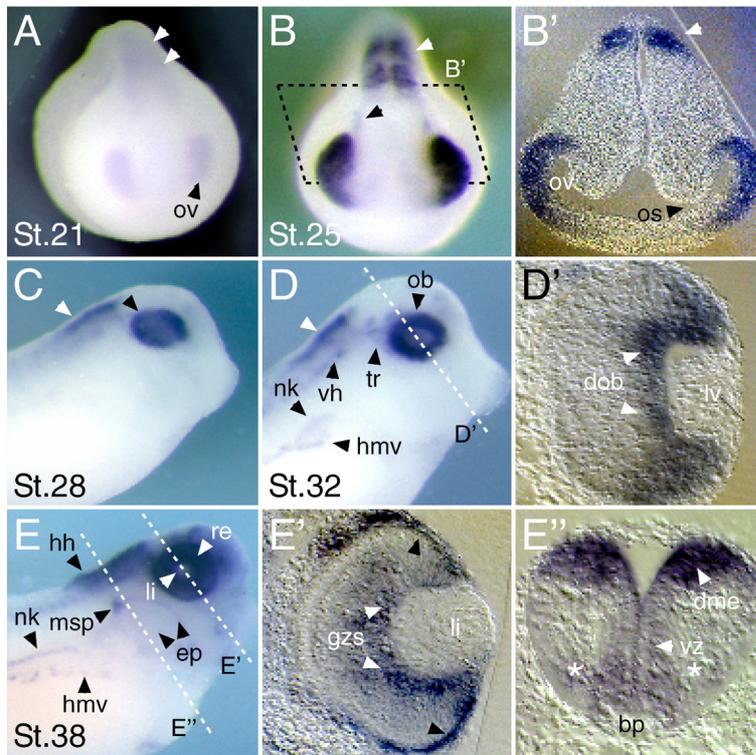


Abb. 4.23: Räumliche und zeitliche Expression von *Xdach1* während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. (A) NF Stadium 21, frontale Ansicht; weiße Pfeile, prospektive Hinterhirnregionen; ov, optischer Vesikel. (B) NF Stadium 25, frontale Ansicht; weißer Pfeil, prospektive Hinterhirnregionen; schwarzer Pfeil, Anlage des trigeminalen Nervs. (B') Transversalschnitt in Höhe der optischen Vesikel und des Hinterhirns; weißer Pfeil, prospektives dorsales

Hinterhirn; os, optischer Stiel. (C) NF Stadium 28, laterale Ansicht, anterior rechts; weißer Pfeil, dorsales Hinterhirn; schwarzer Pfeil, optischer Becher. (D) NF Stadium 32, laterale Ansicht, anterior rechts; weißer Pfeil, dorsales Hinterhirn; hmv, hypaxiale Muskelvorläuferzellen; nk, prospektiver Nierenkanal; ob, optischer Becher; tr, trigeminaler Nerv; vh, ventrales Hinterhirn. (D') Transversalschnitt durch einen NF Stadium 32 optischen Becher; dob, distaler optischer Becher; lv, Linsenvesikel. (E) NF Stadium 38, laterale Ansicht, anterior rechts; ep, epibranchiale Plakoden; hh, Hinterhirn; li, Linse; msp, mittlere Seitenlinienplakode; re, Retina. (E') Transversalschnitt durch ein NF Stadium 38 Auge; gzs, Ganglionzellschicht; schwarze Pfeile, Retinales Pigmentepithel. (E'') Transversalschnitt durch ein NF Stadium 38 Metencephalon; Sternchen, ventrolaterale Bereiche des Metencephalons; bp, Bodenplatte; dme, dorsales Metencephalon; vz, ventrikuläre Zone.

Im Zuge der Analyse des Expressions-Niveaus von *Xdach1* in einer RT-PCR auf Präparationen von total RNA aus *Xenopus laevis* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien sowie adulten Geweben konnten aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den *Xdach1*-Formen, *Xdach1-A* und *Xdach1-B*, beide gleichzeitig mit Hilfe eines einzigen Oligonukleotidpaares amplifiziert werden (Abb. 4.24; Oligonukleotide: *Xdach*-Splice-F, *Xdach*-Splice-R).

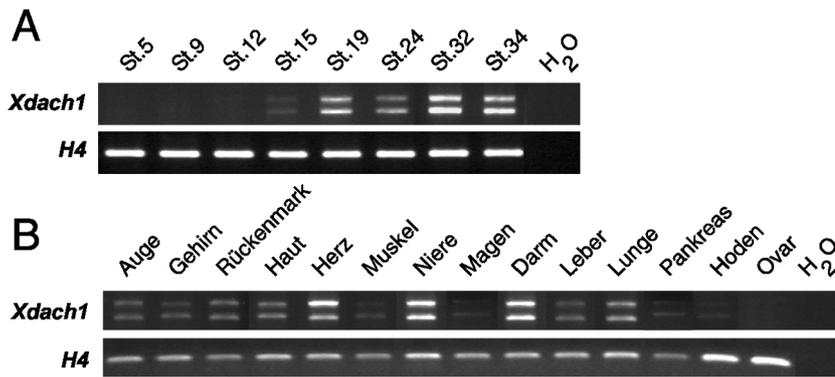


Abb. 4.24: Expressions-Niveau von *Xdach1*-A und *Xdach1*-B in Embryonalstadien und adulten Geweben von *Xenopus laevis*. (A) RT-PCR auf total RNA verschiedener *X. laevis* Embryonalstadien. (B)

RT-PCR auf total RNA adulter Gewebe von *X. laevis*. Zur Kontrolle der eingesetzten Menge an RNA-Matrize wurde im Zuge der RT-PCR zusätzlich Histon 4 (*H4*) amplifiziert. Verwendete Oligonukleotide: *Xdach*-Splice-F, *Xdach*-Splice-R; *H4*-F, *H4*-R.

Beide Formen zeige keine Unterschiede hinsichtlich ihres Transkriptionsbeginns im Verlauf der Embryogenese sowie ihrer Expression in Geweben adulter Frösche. So können durch RT-PCR bereits in NF Stadium 15 Neurulae erste Transkripte beider Formen detektiert werden, zum Ende der Neurulation in NF Stadium 19 hat die Expression erheblich zugenommen und bleibt in allen weiter getesteten Entwicklungsstadien auf vergleichbar hohem Niveau. Damit kann ein im Vergleich mit der „*WMISH*“-Analyse früherer Zeitpunkt der *Xdach1*-Transkription ermittelt werden (Abb. 4.24A; s. auch Abb. 4.23).

Bezüglich der Expression in adulten Geweben fallen vor allem die Ergebnisse für total RNA aus dem Herz, der Niere, dem Darm und, mit im Vergleich dazu etwas niedrigerem Expressionsniveau, der Lunge auf. Besonders geringe bis hin zu nicht detektierbare Mengen an *Xdach1*-mRNA finden sich in Zellen des Skelettmuskels, des Magens, des Pankreas sowie im Hoden und Ovar. Organe neuraler Herkunft wie Auge, Gehirn und Rückenmark zeigen eine vergleichbar starke Transkription beider *Xdach1*-Formen (Abb. 4.24B).

Somit ergeben sich bei Vergleich mit den durch „*WMISH*“ gewonnenen Expressionsdaten im Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung zumindest bezüglich des Darmes und der Lunge als endodermalen Derivate klare Unterschiede zwischen der Larvalentwicklung und den Verhältnissen im adulten Tier. Die bereits während der Embryonalentwicklung begonnene *Xdach1*-Expression innerhalb des Pronephros besteht hingegen im weiteren Verlauf des Lebenszyklus innerhalb der Niere. Ähnliches, wenn auch in abgeschwächter Form, gilt auch für die untersuchten neuroektodermalen Derivate wie Auge, Gehirn und Rückenmark.

4.18 Das *Xdach1*-B-Protein ist im Zellkern lokalisiert

Wie bereits in Kapitel 4.5 bezüglich des *Xeya3*-Proteins beschrieben, wurden zur Darstellung der subzellulären Lokalisation des *Xdach1*-B-Proteins Fusionsproteine durch Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Embryonen exprimiert und durch Immunfärbungen an ganzen Embryonen (Abb.

4.25A, A') bzw. an Paraffinschnitten (Abb. 4.25B-B''') nachgewiesen. Dabei kamen sowohl Flag-Epitop- (am C-Terminus, s. Abb. 4.7C) wie auch *c-myc*-Epitop tragende Proteine zum Einsatz (4.25C).

Xdach1-B-Protein findet sich ausschließlich innerhalb des Zellkerns (Abb. 4.24A-B'''). Die auf Bereiche zusätzlichen neuralen Gewebes beschränkte Expression des *Xdach1*-B-*c-myc* Proteins (Abb. 4.14B-B''') unterstreicht zudem die Spezifität der durch eine Überexpression des *Xdach1*-B-Proteins erzeugten Phänotypen (s. Kapitel 4.22). Wie im Falle von *Xeya3* kommt es auch bezüglich der *Xdach1*-B-Fusionsproteine zu einer vom betrachteten Gewebe unabhängigen Translokation in den Nukleus. Der Kerntransport nach erfolgter Proteinsynthese sollte somit ebenfalls unabhängig von Gewebe-spezifischen Importfaktoren sein.

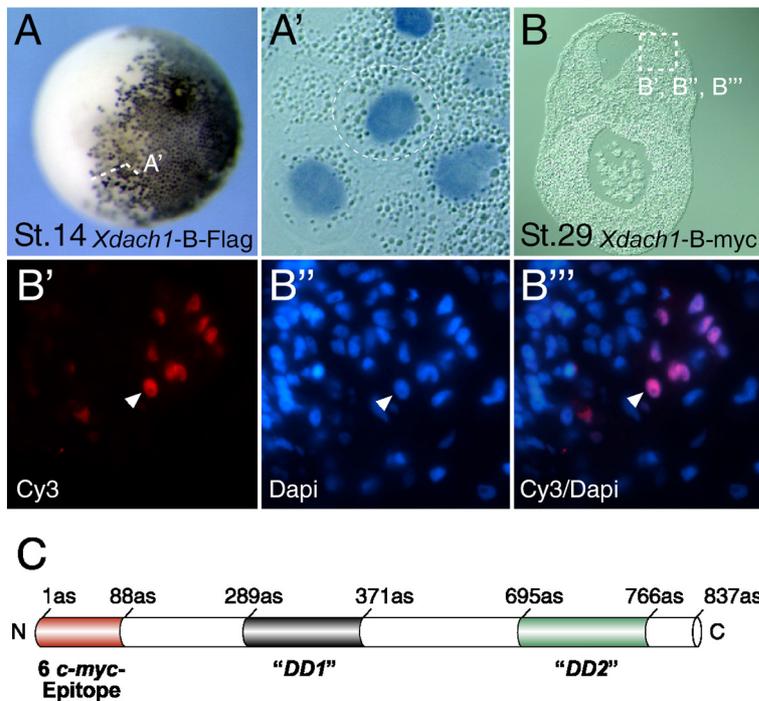


Abb. 4.25: Subzelluläre Lokalisation von *Xdach1*-B. (A) „Whole mount“ Immunfärbung an NF Stadium 14 Albino-Embryonen nach Mikroinjektion von 150pg *Xdach1*-B-*c-myc*-mRNA in eine Blastomere eines *Xenopus laevis* Zweizell-Stadiums, frontale Ansicht. (A') Transversalschnitt durch den in (A) gekennzeichneten Bereich. Nur Nuklei zeigen Detektions-Signale. Der vollständige Durchmesser einer Zelle ist eingekreist. (B) Transversalschnitt durch einen NF Stadium 29 Embryo nach Mikroinjektion von 150pg *Xdach1*-B-*c-myc*-mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums. (B', B'', B''') Jeweils identischer Ausschnitt des Transversalschnittes aus (B). Nukleär lokalisiertes Protein (weiße Pfeile) ist innerhalb zusätzlichen Hirngewebes sichtbar. (C) Übersicht über das verwendete *Xdach1*-B-*c-myc*-Fusionsprotein. Die sechs *c-myc*-Epitope befinden sich am N-Terminus des *Xdach1*-B-ORF.

Transversalschnitt durch einen NF Stadium 29 Embryo nach Mikroinjektion von 150pg *Xdach1*-B-*c-myc*-mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums. (B', B'', B''') Jeweils identischer Ausschnitt des Transversalschnittes aus (B). Nukleär lokalisiertes Protein (weiße Pfeile) ist innerhalb zusätzlichen Hirngewebes sichtbar. (C) Übersicht über das verwendete *Xdach1*-B-*c-myc*-Fusionsprotein. Die sechs *c-myc*-Epitope befinden sich am N-Terminus des *Xdach1*-B-ORF.

4.19 Ein *Xdach1*-Funktionsverlust führt zu Defekten in der embryonalen Augenentwicklung

Zur Analyse möglicher *Xdach1*-Funktionen im Verlauf der Embryogenese von *Xenopus laevis* wurden Funktionsverluststudien durch Mikroinjektion von Morpholino-Antisense-

Oligonukleotiden durchgeführt. Die Erkennungssequenz des Morpholinos findet sich aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen beiden *Xdach1*-Formen sowohl innerhalb der 5'-untranslatierten-Region (5'-UTR) von *Xdach1*-A als auch *Xdach1*-B.

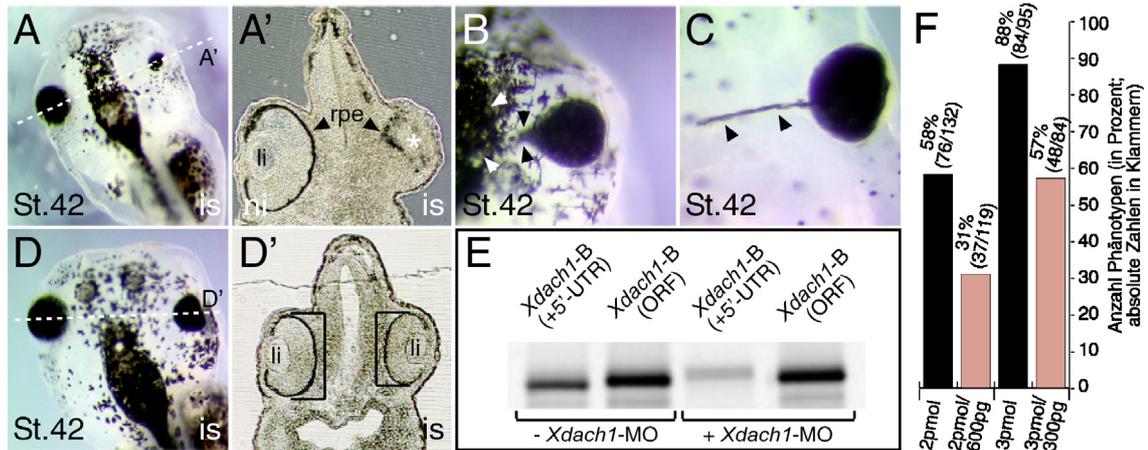


Abb. 4.26: Defekte der Augenentwicklung nach Funktionsverlust von *Xdach1*. (A-D') NF Stadium 42 *Xenopus laevis* Embryonen nach Mikroinjektion von 3pmol *Xdach1*-Morpholino-Antisense-Oligonukleotid (MO) in eine Blastomere eines Zweizellstadiums, dorsale Ansicht des Kopfbereiches, Vergrößerungen dorsaler Ansichten und Transversalschnitte. (A) Starke Verkleinerung des Auges mit einhergehender Reduktion Retinalen Pigmentepithels auf der injizierten Seite (is). (A') Es verbleiben Gewebe-Ausstülpungen mit Rudimenten von Retinalem Pigmentepithel (rpe) an Stelle des Auges (weißes Sternchen). Eine Linse wird nicht ausgebildet (li, Linse; ni, nicht injizierte Seite). (B) Expansion Retinalen Pigmentepithels (schwarze Pfeile) in Richtung des Diencephalons (weiße Pfeile). (C) Pigmentierung des optischen Nerven (schwarze Pfeile). (D, D') Verkleinerung des Auges als Folge der Reduktion retinalen Gewebes in weniger schweren Phänotypen (schwarze Klammern). Die ausgebildete Linse erscheint normal. (E) *Xdach1*-MO blockiert spezifisch die Translation von *Xdach1*-B (+5'-UTR)-mRNA im *in vitro* Translationssystem. Synthetische *Xdach1*-B (ORF)-mRNA wird auch in Gegenwart des Morpholinos translatiert. (F) Rescue-Experiment unter Verwendung von *Xdach1*-B (ORF). Durch Ko-Injektion von *Xdach1*-MO und *Xdach1*-B (ORF)-mRNA kann der Prozentsatz an Embryonen mit den beschriebenen Phänotypen signifikant gesenkt werden.

Im Zuge eines *Xdach1*-Funktionsverlustes durch Mikroinjektion des *Xdach1*-Morpholinos in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums von *Xenopus laevis* kommt es zu einer deutlichen Verkleinerung von Retina-Gewebe bis hin zum nahezu vollständigen Verlust von Augenstrukturen inklusive der Linse. Dies zeigt sich äußerlich vor allem durch eine Reduktion von Zellen des Retinalen Pigmentepithels (Abb. 4.26A, A', D, D'). Dass dies nicht, wie etwa im Falle eines Funktionsverlustes von *Xeya3* (s. Kapitel 4.6), die Folge eines massiven absoluten

Verlustes von Gewebe ist, zeigt ein Transversalschnitt in Höhe der Augen eines betroffenen Embryos (Abb. 4.26A'). So besteht an Stelle des Auges eine Gewebe-Ausstülpung, in der sich Rudimente eines Pigmentepithels erkennen lassen. Ein weiterer Aspekt im Zusammenhang mit einem *Xdach1*-Funktionsverlust ist die Ausdehnung Retinalen Pigmentepithels (und möglicherweise darunter gelegenen neuralem Gewebe der Retina) bis in Bereiche des Diencephalons (Abb. 4.26B) bzw. die Pigmentierung des optischen Nervs (Abb. 4.26C).

Neben den beschriebenen Defekten der Augenentwicklung in *Xdach1*-Morpholino-injizierten Embryonen fällt eine Veränderung der Zellmorphologie innerhalb der betroffenen Hälfte des Mittel- und Hinterhirns auf, welche normalerweise eine grobe Einteilung in proximale und distale Bereiche erlaubt. Dies ist nach einem *Xdach1*-Funktionsverlust nicht mehr möglich.

Die Spezifität des eingesetzten Morpholinos wurde im *in vitro* Translationssystem (TnT[®]-Coupled Reticulocyte Lysate System) sowie im Zuge eines Rescue-Experiments überprüft. Da die Erkennungssequenz des Morpholinos im Bereich der 5'-UTR von *Xdach1* liegt, wird die Translation einer synthetischen mRNA, die lediglich den offenen Leserahmen (ORF) von *Xdach1*-B enthält, nicht inhibiert. Die Proteinsynthese mit einer *Xdach1*-B-mRNA voller Länge als Matrize wird hingegen deutlich unterdrückt (Abb. 4.26E). Des Weiteren kann durch Ko-Injektion des Morpholinos sowie synthetischer *Xdach1*-B-mRNA in Rescue-Experimenten die Ausbildung der beschriebenen Phänotypen zum Teil qualitativ wie quantitativ verhindert werden (Abb. 4.26F).

4.20 Ein Funktionsverlust von *Xdach1* hat Defekte der Musterbildung während der Augenentwicklung zur Folge

Mit Hilfe der „*WMISH*“ wurden die in Kapitel 4.19 beschriebenen Defekte der Augenentwicklung nach Funktionsverlust von *Xdach1* weiter untersucht. Dabei können, in Übereinstimmung mit dem zeitlichen Expressionsmuster von *Xdach1*, in frühen Neurulae der NF Stadien 13-15 keine Veränderungen hinsichtlich des Expressionsverhaltens der untersuchten Markergene des retinalen Primordiums wie *Xpax6* und *Xrx1* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Erst zum Ende der Neurulation ab NF Stadium 18 zeigt sich eine Reaktion auf die Abwesenheit bzw. die ungenügende Konzentration einer oder beider *Xdach1*-Proteine (Abb. 4.27A-C). Bezüglich *Xpax6* kommt es dabei zu unterschiedlichen Veränderungen innerhalb der anterior gelegenen und der Expressionsdomäne im Bereich der Rhombomere drei und vier des prospektiven Hinterhirns (100%, n=26; Abb. 4.27A). So erscheint erstere als wenig strukturierter Bereich im Vergleich mit der Kontroll-Seite des Embryos, wobei es nicht zu quantitativen Effekten kommt. Im Areal des zukünftigen Hinterhirns zeigt sich hingegen eine starke Repression der *Xpax6*-Expression. Ebenso lässt sich im Fall von *Xrx1* weniger eine Herabregulation der Expression als vielmehr eine verminderte Expansion von *Xrx1* exprimierenden Zellen nach lateral im Zuge der Separation des Augenfeldes beobachten (100%,

n=15; Abb. 4.27B). Im Gegensatz zu den für *Xpax6* und *Xrx1* beschriebenen Effekten innerhalb der Augenanlagen führt ein *Xdach1*-Funktionsverlust zu einer erheblichen Reduktion der Expression von *Xoptx2* (*Xsix6*). Eventuell restliche, *Xoptx2* exprimierende Zellen verbleiben analog zu den für *Xrx1* beschriebenen Beobachtungen in proximalen Bereichen, in nächster Nähe der Mittellinie (94%, n=17; Abb. 4.27C).

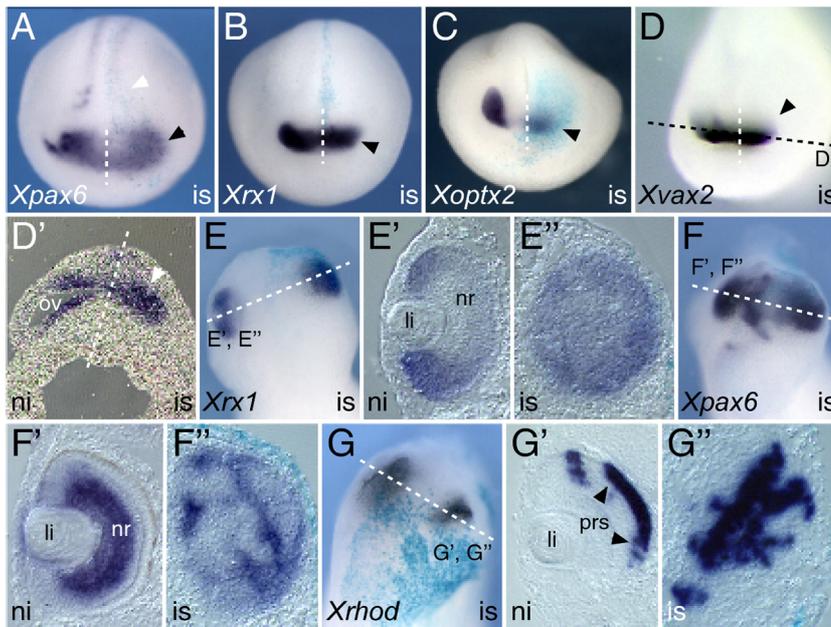


Abb. 4.27: Fehlerhafte Musterbildung im Zuge der Augenentwicklung nach Funktionsverlust von *Xdach1*. Injektion von 3pmol *Xdach1*-MO in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und nachfolgende „*WMISH*“; zur Darstellung der injizierten Seite des Embryos wurde synthetische mRNA für β -Galaktosidase ko-

injiziert und β -Galaktosidase vor der „*WMISH*“ durch eine Farbreaktion nachgewiesen; A-C, NF Stadium 18/19, frontale Ansicht; D-D', NF Stadium 25, frontale Ansicht und Horizontalschnitt; E-G'', NF Stadium 36, dorsale Ansicht und Transversalschnitte. (A) Desorganisation der anterioren (schwarzer Pfeil) und Repression der Hinterhirn-Expressionsdomäne (weißer Pfeil) von *Xpax6* nach *Xdach1*-Morpholino Mikroinjektion (gestrichelte Linie, Mittellinie des Embryos; is, injizierte Seite). (B) Verminderte Expansion des retinalen Markergens *Xrx1* nach lateral (schwarzer Pfeil). (C) Deutliche Repression der *Xoptx2*-Transkription (schwarzer Pfeil). (D) Verminderte Expansion des im optischen Stiel exprimierten *Xvax2* nach distal (schwarzer Pfeil). (D') Im Horizontalschnitt wird der fehlende optische Vesikel (weißer Pfeil) auf der injizierten Seite des Embryos sichtbar (ni, nicht injizierte Seite; ov, optischer Vesikel). (E, E', E'') Desorganisation der *Xrx1*-Expression im frühen Kaulquappenstadium. Ein optischer Becher sowie eine Linse werden nicht ausgebildet (E''), eine spezifische Lokalisation von *Xrx1* transkribierenden Zellen (s. E') ist nicht erkennbar (li, Linse; nr, neurale Retina des optischen Bechers). (F, F', F'') Desorganisation der *Xpax6*-Expression im frühen Kaulquappenstadium. (G, G', G'') Zellen des betroffenen Gewebes exprimieren den Differenzierungsmarker *Xrhodopsin* (G''), nehmen jedoch nicht die typische räumliche Organisation an (s. G').

Ähnliches zeigt sich auch in NF Stadium 25 bei Betrachtung der Expression von *Xvax2*, einem im ventralen Diencephalon, dem optischen Stiel sowie dem ventralen optischen Vesikel

exprimierten Gen (80%, n=15; Abb. 4.27D). Im Horizontalschnitt wird deutlich, dass es zu keiner Ausbildung eines optischen Vesikels auf der Seite der Injektion des Morpholinos gekommen ist und lediglich ein Bereich an *Xvax2* exprimierenden Zellen verbleibt (Abb. 4.27D').

Für späte Entwicklungsstadien wurde in Kapitel 4.19 bezüglich schwerer Phänotypen der Verbleib einer Gewebe-Ausstülpung anstelle des Auges sowie ein Fehlen von Linsenstrukturen beschrieben. Die „*WMISH*“-Analyse in frühen Kaulquappenstadien zeigt, dass es innerhalb dieses Gewebes nach wie vor zur Expression retinaler Markergene wie *Xrx1* und *Xpax6* kommt (57%, n=30; 44%, n=25; Abb. 4.27E-F''). Eine klare räumliche Organisation von *Xrx1*- bzw. *Xpax6* exprimierenden Zellen (Abb. 4.27E', F') ist allerdings nicht zu erkennen, eine in diesem Entwicklungsstadium beginnende, an Hand der Zellmorphologie erkennbare Schichtung der Retina hat nicht stattgefunden (Abb. 4.27E'', F''), eine dorsoventrale als auch proximodistale Achse innerhalb der Retina besteht nicht. Das es innerhalb dieses desorganisierten Gewebes trotzdem zu Zelldifferenzierungsprozessen kommt, zeigt das Vorhandensein von Photorezeptorzellen, gekennzeichnet durch die Expression von *Xrhodopsin* (100%, n=45; Abb. 4.27G-G'').

4.21 Ein *Xdach1*-Funktionsverlust verhindert Neurogenese in Bereichen des zentralen Nervensystems

Neben Defekten der Musterbildung während der Augenentwicklung sind bei *Xdach1*-Funktionsverlust Anomalien der Zellmorphologie in Bereichen des Mittel- und Hinterhirns beschrieben worden, die möglicherweise Ausdruck einer gestörten Neurogenese sind (s. Kapitel 4.19). Eine „*WMISH*“-Analyse unter Verwendung von Markergenen für differenzierte Neurone (*N-Tubulin*) sowie Zellen innerhalb von Bereichen der dorsalen ventrikulären Zone des Gehirns (*Xpax3*, *Xpax6*) unterstreicht die weiter oben gemachten Beobachtungen. So kommt es zu einem

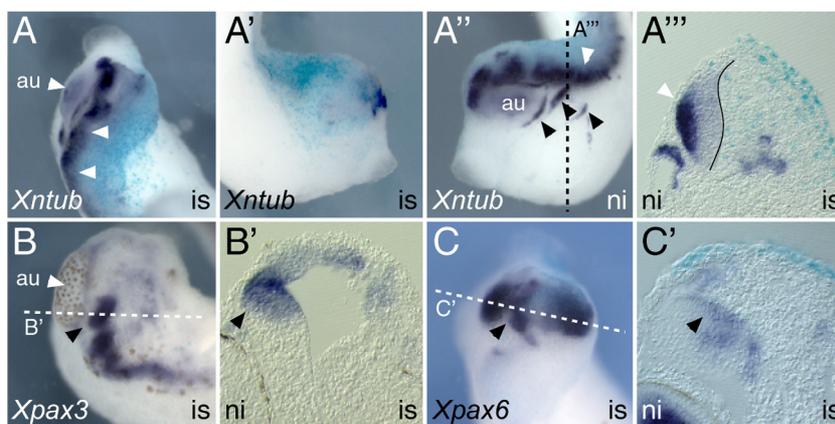


Abb. 4.28: Gestörte Neurogenese nach Funktionsverlust von *Xdach1*. Injektion von 3pmol *Xdach1*-MO in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und nachfolgende „*WMISH*“; zur Darstellung der injizierten Seite des

Embryos wurde synthetische mRNA für β -Galaktosidase ko-injiziert und β -Galaktosidase vor der „*WMISH*“ durch eine Farbreaktion nachgewiesen. (A-A''') Verlust der Expression des neuralen

Differenzierungsmarkers *N-Tubulin* auf der durch *Xdach1*-Funktionsverlust betroffenen Seite des Embryos. Neben Hirnstrukturen (weiße Pfeile) sind auch craniale Nerven (schwarze Pfeile) betroffen (A, dorsale Ansicht; A', A'', laterale Ansicht; A''', Transversalschnitt; die Grenze zwischen den Gehirnhälften ist durch eine schwarze Linie markiert; au, Auge; is, injizierte Seite; ni, nicht injizierte Seite). (B, B') Verlust der *Xpax3*-Expression (schwarze Pfeile) auf der injizierten Seite (B, dorsale Ansicht; B', Transversalschnitt). (C, C') Verlust der *Xpax6*-Expressionsdomäne innerhalb des Diencephalons (schwarze Pfeile; C, dorsale Ansicht; C', Transversalschnitt).

nahezu vollständigen Verlust der Expression der angesprochenen Gene im Bereich der betroffenen Gehirnhälfte (Abb. 4.28), im Fall von *N-Tubulin* ist zusätzlich ein Verlust der Expression in cranialen Nerven, wie etwa dem trigeminalen Nerv, zu beobachten (Abb. 4.28A, A', A''). Unter einem Funktionsverlust von *Xdach1* ist somit die Ausbildung oder auch Erhaltung verschiedener Zellidentitäten innerhalb des Gehirns, im Gegensatz zu den Verhältnissen während der Retinogenese, gestört. Eine proximodistale bzw. auch dorsoventrale Musterbildung ist nicht zu erkennen.

4.22 Eine Überexpression von *Xdach1-B* führt zur Vergrößerung von Derivaten neuralen Ektoderms

Zur Überexpression des *Xdach1-B*-Proteins wurde synthetische *Xdach1-B*-mRNA in *Xenopus laevis* Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien mikroinjiziert. Der Nachweis einer erfolgreichen *Xdach1-B*-mRNA Translation *in vivo* erfolgte durch Injektion einer *c-myc-Xdach1-B*-mRNA, die anschließende Immunpräzipitation des korrespondierenden Proteins und dessen Detektion mittels Western Blot (Abb. 4.29). Überexpressionsstudien mit dem verkürzten

Dachshund-Homolog *Xdach1-A* wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

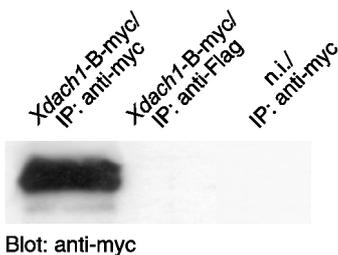


Abb. 4.29: Translation von *Xdach1-B-myc* *in vivo*.

Bezüglich Kopfstrukturen kommt es unter einer *Xdach1-B*-Überexpression zu einer deutlichen Ausdehnung von Gewebe im Bereich des Gehirns auf der injizierten Seite sowie zur Bildung eines massiven Koloboms (50pg: 24%, n=75; 300pg: 89%, n=123; Injektion in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums; 150pg: 100%, n=20; Injektion in eine dorsale Blastomere eines 16-Zell-Stadiums; Abb. 4.30A-A'''). Dabei ist in anterior gelegenen Arealen eine Trennung zwischen retinalem Gewebe und putativem Hirngewebe nur schwer möglich (Abb. 4.30A', A''), weiter posterior erscheint der gebildete optische Becher aufgrund des Defektes bezüglich seines ventralen Schlusses in seiner Lage verändert (Abb. 4.30A''', A'''). In beiden Fällen ist Retinales Pigmentepithel sichtbar, Linsenstrukturen als Derivate plakodalen Ektoderms sind jedoch nicht ausgebildet

(bestätigt mittels „*WMISH*“ durch eine vollständige Abwesenheit des Linsenmarkergens *Xpitx3*, nicht gezeigt). Vereinzelt kommt es darüberhinaus zur Entstehung von z.T. stark pigmentierten Gewebeauswüchsen an Orten hoher *Xdach1-B*-Konzentration (Abb. 4.30B). Eine Abhängigkeit der Bildung dieser Strukturen von bestimmten Regionen des Embryos ist dabei nicht zu erkennen.

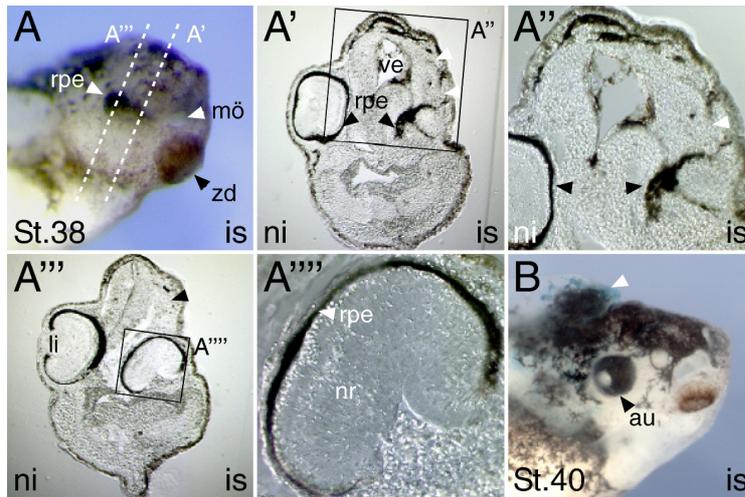


Abb. 4.30: Ausdehnung von Hirngewebe nach Überexpression von *Xdach1-B*. (A-A''''') NF Stadium 38 *Xenopus laevis* Embryo nach Mikroinjektion von 300pg synthetischer *Xdach1-B*-mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums, laterale Ansicht und Transversalschnitte. (A, A', A'') Es kommt zu einer

starken Ausdehnung von Gehirngewebe nach distal (weiße Pfeile in A', A'') und Defekten der Augenmorphologie; mö, Mundöffnung; rpe, Retinales Pigmentepithel; ve, Hirnventrikel; zd, Zementdrüse. (A, A''', A''''') Als Folge des Größenwachses von Hirngewebe (schwarzer Pfeil in A''') wird eine Dislokation des optischen Bechers beobachtet. Eine Linse wird nicht ausgebildet (li, Linse; nr, neurale Retina). (B) NF Stadium 40 *Xenopus laevis* Embryo nach Mikroinjektion von 150pg synthetischer *Xdach1-B*-mRNA in eine dorsale Blastomere eines 16-Zell-Stadiums, laterale Ansicht. Es bilden sich pigmentierte Auswüchse (weißer Pfeil) an Orten hoher *Xdach1-B*-Konzentration (Färbung für β -Galaktosidase; au, Auge).

4.23 Die Überexpression von *Xdach1-B* hat einen stark neuralisierenden Effekt

Die in Kapitel 4.22 beschriebenen Phänotypen werden schon früh in der Embryonalentwicklung durch einen stark neuralisierenden Effekt von *Xdach1-B* nach Überexpression angelegt. So kommt es in Neurula-Stadien zur starken Expansion der Expressionsdomäne des panneuralen Markergens *Xsox3* nach lateral (Abb. 4.31A, B). Gleichzeitig kann eine starke Repression der Expression des epidermalen Markergens *Xk81* im Areal der injizierten mRNA beobachtet werden (Abb. 4.31C). Eine Doppelhybridisierung mit RNA-Sonden für *Xsox3* und *Xk81* zeigt ein komplementäres Hybridisierungsmuster bezüglich beider Transkripte (Abb. 4.31D, D'; vergl. auch Abb. 4.13G, G'). Zellen, nach Überexpression von *Xdach1-B* negativ für *Xk81*, transkribieren nun also das von frühen, neuralen Vorläufern exprimierte *Xsox3*. Einen weiteren Hinweis auf eine Transdetermination nicht-neuralen Gewebes als Ursache des neuralisierenden

Effektes der *Xdach1*-B-Überexpression gibt das Ausbleiben von Proliferationseffekten auf Seite der Injektion (Abb. 4.31E). So ergibt sich nach Detektion des Proliferationsmarkers *pH3* weder eine signifikante Zu- noch Abnahme der Anzahl an proliferierenden Zellen bei Vergleich injizierter zu nicht injizierter Seite des Embryos (93% der Embryonen ohne Differenzen zwischen injizierter Seite/nicht injizierter Seite, n=30). Des Weiteren bleiben die bezüglich *Xsox3* und *Xk81* weiter oben beschriebenen Effekte nach *Xdach1*-B-Überexpression auch nach Behandlung der Embryonen mit Hydroxyurea/Aphidicolin („HUA“, s. auch Kapitel 4.13) bestehen (nicht gezeigt). Die Zunahme von Gewebe neuralen Schicksals geht somit auf Kosten nicht-neuralen Gewebes und ist nicht die Folge erhöhter Proliferationsraten neuraler Vorläuferzellen.

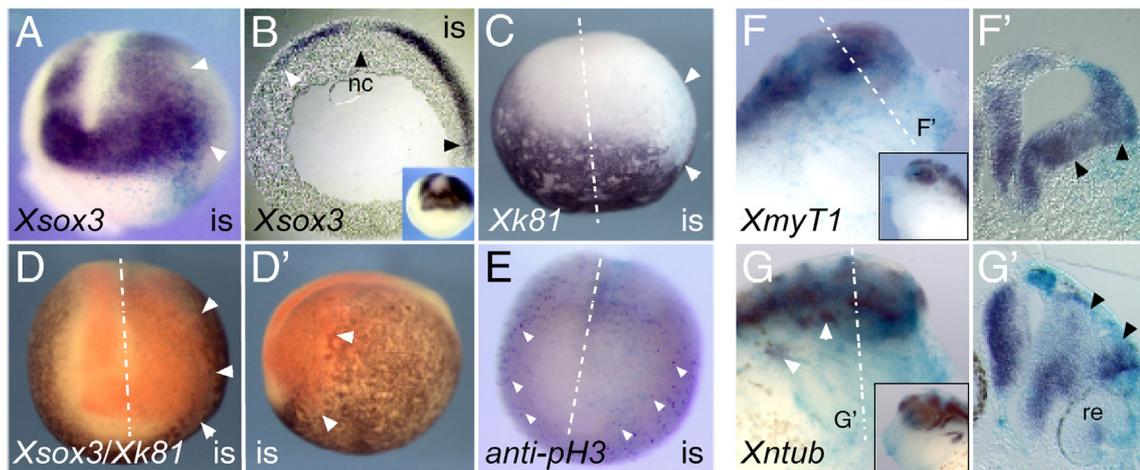


Abb. 4.31: Transdetermination nicht-neuralen in neurales Gewebes nach Überexpression von *Xdach1*-B. Injektion von 150pg synthetischer *Xdach1*-B-mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums und nachfolgende „*WMISH*“ bzw. Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (*pH3*); zur Darstellung der injizierten Seite des Embryos wurde synthetische mRNA für β -Galaktosidase ko-injiziert und β -Galaktosidase durch eine Farbreaktion nachgewiesen. (A, B) Expansion der Expressionsdomäne des panneuralen Markergens *Xsox3* in NF Stadium 14 Neurulae (frontale Ansicht und Transversalschnitt; is, injizierte Seite; nc, Notochord). (C) Repression des epidermalen Markergens *Xk81* (epidermales Keratin) im NF Stadium 14 nach Mikroinjektion von *Xdach1*-B-mRNA (frontale Ansicht; gestrichelte Linie, Mittellinie des Embryos). (D, D') Doppelfärbung von *Xsox3* und *Xk81* in NF Stadium 15. Es zeigt sich ein komplementäres Expressionsmuster bezüglich der beiden Gene (frontale und laterale Ansicht; gestrichelte Linie, Mittellinie des Embryos). (E) Detektion von phosphoryliertem Histon 3 in NF Stadium 14 nach Überexpression von *Xdach1*-B. Es kommt zu keiner Veränderung der Proliferationsrate (frontale Ansicht; gestrichelte Linie, Mittellinie des Embryos; einige *pH3*-positive Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet). (F, F') Laterale Ansicht und Transversalschnitt eines NF Stadium 34 Embryos. Zellen des vergrößerten Hirngewebes exprimieren *XmyT1* (schwarze Pfeile in F'; die nicht injizierte Seite ist

verkleinert in F dargestellt). (G, G') Laterale Ansicht und Transversalschnitt eines NF Stadium 34 Embryos. Zellen des vergrößerten Hirngewebes exprimieren den Differenzierungsmarker *N-Tubulin* (schwarze Pfeile in G'). Neurale Derivate cranialer Plakoden sind stark reduziert (weiße Pfeile in G; re, Retina; die nicht injizierte Seite ist verkleinert in G dargestellt).

Die Expression von neuralen Markergenen wie *Xmyt1* (Abb. 4.31F, F') und dem Differenzierungsmarker *N-Tubulin* (Abb. 4.31 G, G') innerhalb des in Kapitel 4.22 beschriebenen vergrößerten Areals im Bereich des Gehirns zeigt, dass es zur Bildung zusätzlichen neuralen Gewebes kommt, welches zudem Differenzierungsprozesse durchläuft. Im Fall von *N-Tubulin* ist außerdem eine starke Repression der Expression in Derivaten cranialen plakodalen Ektoderms, wie etwa dem trigeminalen Nerv, zu beobachten (Abb. 4.30G). Haben diese Strukturen auch nach Durchlaufen ihres Differenzierungsprozesses neuralen Charakter, so fallen doch ihre nicht-neuralen, ektodermalen Vorläufer, wie im übrigen auch Zellen plakodalen Linsenektooderms (s. Kapitel 4.22, *Xpitx3*), der induzierten Neuralisierung zum Opfer.

4.24 *Xdach1-B* inhibiert den *Xbmp4*-Signaltransduktionsweg

In Kapitel 4.22 und 4.23 ist eine Neuralisierung durch *Xdach1-B*-Überexpression als Folge der Transdeterminierung nicht-neuraler Areale beschrieben worden. Ein akzeptiertes Modell beschreibt die Entstehung neuralen Gewebes als Resultat der Inhibition von Signaltransduktionskaskaden, welche durch sezernierte Moleküle der *TGF- β* -Familie aktiviert werden (Munoz-Sanjuan und Brivanlou, 2002; Weinstein und Hemmati-Brivanlou, 1999). Ein Beispiel für einen solchen Antagonisten ist der sezernierte Faktor *Chordin*, der direkt *Bmp4*, ein Mitglied der *TGF- β* -Proteinfamilie, bindet und so eine Interaktion mit seinem Zellmembranrezeptor verhindert (Piccolo et al., 1996). *Xdach1* besitzt einen zu den Protoonkogenen *Ski* und *Sno* homologen Bereich (s. Abb. 4.19, 4.20, 4.21). Es konnte gezeigt werden, dass *Ski* und *Sno* als negative Regulatoren der *TGF- β* -vermittelten Signaltransduktion wirken (Luo, 2004).

Zum Test einer in diesem Zusammenhang möglichen antagonistischen Funktion des *Xdach1-B*-Proteins, wurden verschiedene Kombinationen des *Xdach1-B*- sowie des *Xbmp4*-Proteins in animalen Gewebeexplantaten überexprimiert und deren Transkriptom mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR auf das Vorkommen von mRNA spezifischer Zielgene hin untersucht (Abb. 4.32A). Dabei ergibt sich, analog zu den durch „*WMISH*“ erhaltenen Daten, eine deutliche Aktivierung der *Xsox3*-Transkription nach Injektion von 200pg an *Xdach1-B*-mRNA, was die Neuralisierung der Gewebeexplantate zeigt. Ebenso lässt sich die Transkription von *Xmsx1*, einem Zielgen der *Xbmp4*-Signaltransduktionskaskade, durch Überexpression von *Xbmp4* (1000pg) hochregulieren. Dieser Effekt kann durch gleichzeitige Injektion von *Xdach1-*

B-mRNA deutlich abgeschwächt werden und es kommt im Gegensatz dazu zu einem Anstieg der *Xsox3*-Transkription (1000pg *Xbmp4*/200pg *Xdach1*-B). Daraus folgt eine gegenüber der *Xbmp4*-Funktion antagonistische Wirkung des *Xdach1*-B-Proteins, die als Erklärung für die beobachteten transdeterminierenden und neutralisierenden Effekte herangezogen werden kann.

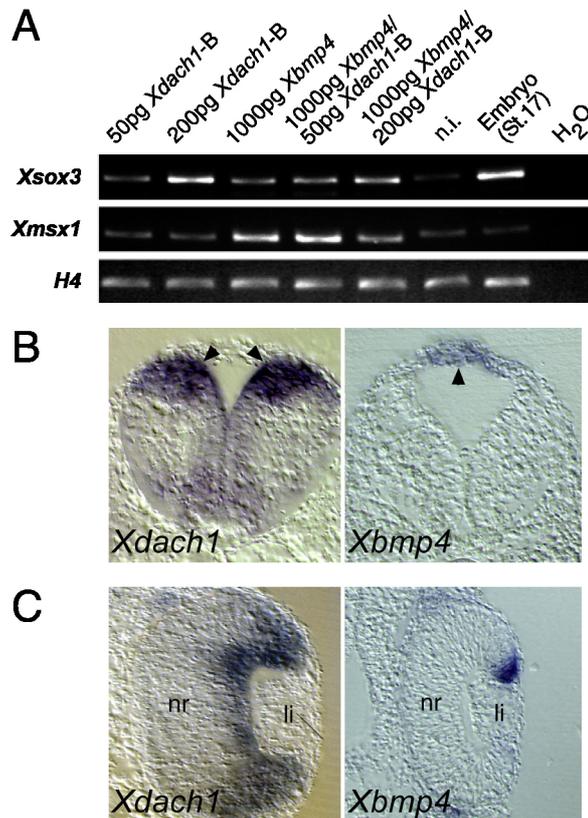


Abb. 4.32: *Xdach1*-B als Inhibitor der *Xbmp4*-Signaltransduktion. (A) RT-PCR auf total RNA aus animalen Gewebeexplantaten im korrespondierenden NF Stadium 17 aus *Xenopus laevis*. Die injizierten mRNAs sind oberhalb, die im Zuge der RT-PCR definierten Zielgene links angegeben (n.i., nicht injizierte Gewebeexplantate; Embryo (St.17), Kontrollembryo NF Stadium 17; *H4*, Histon 4). Durch Injektion von 200pg an *Xdach1*-B-mRNA kommt es zur Neutralisierung der Gewebeexplantate, erkennbar anhand der deutlichen Hochregulation der *Xsox3*-Transkription. Die Aktivierung der *Xbmp4*-Signaltransduktionskaskade durch Injektion von *Xbmp4* führt zur Transkription des Zielgens *Xmsx1* (1000pg *Xbmp4*). Eine Ko-Injektion von *Xdach1*-B-mRNA führt zur Repression der

Xmsx1-Transkription und gleichzeitig zur Aktivierung der Transkription des neuralen Markergens *Xsox3* (1000pg *Xbmp4*/200pg *Xdach1*-B). (B) Transversalschnitte im Bereich des Hinterhirns von NF Stadium 38 Embryonen. Es ergibt sich ein komplementäres Expressionsmuster von *Xdach1* und *Xbmp4*. (C) Transversalschnitte des Auges von NF Stadium 32 Embryonen. Die Expression von *Xdach1* grenzt im dorsalen optischen Becher unmittelbar an die Expressionsdomäne von *Xbmp4*.

Ein möglicher *in vivo* Zusammenhang zwischen Funktionen des *Xdach1*-B- und des *Xbmp4*-Proteins ergibt sich bei Betrachtung der korrespondierenden Expressionsmuster im Bereich des Hinterhirns in NF Stadium 38 und des optischen Bechers in NF Stadium 32 *Xenopus laevis* Embryonen (Abb. 4.32B, C). So wird *Xbmp4* im Hinterhirn und Rückenmark ausschließlich von äußerst dorsal gelegenen Zellen der Dachplatte exprimiert, ein morphogenetischer Gradient des *Xbmp4*-Proteins sollte in dorsoventraler Orientierung bestehen. Die direkt in Richtung ventral angrenzende Expressionsdomäne von *Xdach1* könnte dabei die Wirkungen der verschiedenen Konzentrationen an *Xbmp4*-Protein modifizieren und somit *Bmp*-abhängige Musterbildungsprozesse in dorsoventraler Orientierung unterstützen. Ähnliches ist im Fall des

optischen Bechers bezüglich einer Musterbildung der Retina in dorsoventraler als auch proximodistaler Orientierung denkbar, da die Expressionsdomänen beider Gene auch hier direkt aneinander grenzen (Abb. 4.32C; li, Linse; nr, neurale Retina).

4.25 Eine Ko-Injektion von *Xdach1-B* und *Msix6* führt zu positiven synergistischen Effekten bezüglich retinalen Wachstums

Der Komplexaugenentwicklung in *Drosophila melanogaster* liegt ein genetisches Netzwerk zugrunde, das auf z.T. direkten Interaktionen der beteiligten Faktoren (*ey*, *so*, *eya*, *dac*) beruht (Tavsanli et al., 2004). In der Maus ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen *Six6*, einem Homolog des *sine oculis* Gens aus *Drosophila melanogaster*, und *Dachshund1* bezüglich der Entwicklung retinaler Strukturen beschrieben worden, wo sie als direkte Interaktionspartner zusammen mit anderen Faktoren einen Repressorkomplex ausbilden und Zellproliferation stimulieren (Li et al., 2002).

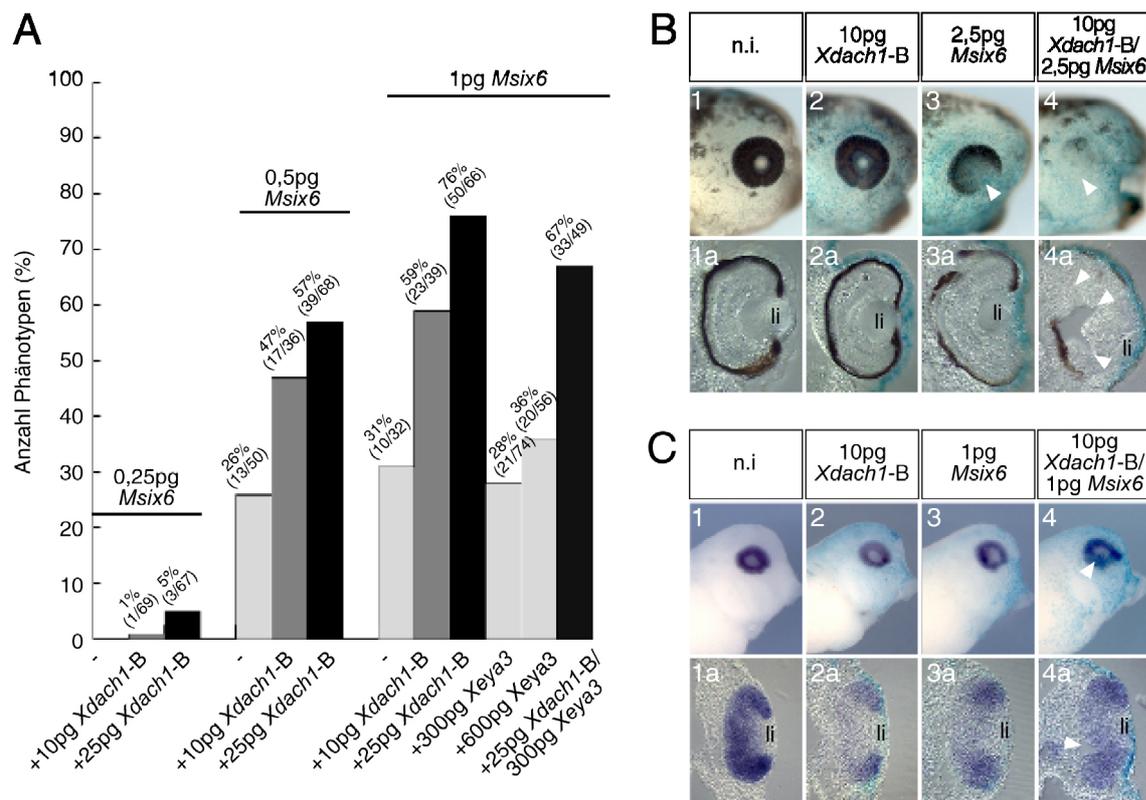


Abb. 4.33: Synergismus zwischen *Xdach1-B* und *Msix6*. (A) Ko-Injektionsexperiment unter Verwendung synthetischer mRNA kodierend für Maus *Six6* (*Msix6*) und *Xenopus laevis* *Xdach1-B* und *Eya3*. Durch Ko-Injektion geringer Mengen von *Msix6*- und *Xdach1-B*-mRNA in eine Blastomere eines Zweizell-Stadiums kann die Anzahl an Embryonen mit phänotypischen Veränderungen im Bereich des Auges deutlich gesteigert werden. Eine Ko-Injektion von *Xeya3*-mRNA kann die durch eine *Msix6*-

Überexpression hervorgerufenen Phänotypen nicht quantitativ verstärken. (B) Qualitative Veränderung der erhaltenen Phänotypen bei Ko-Injektion von *Msix6* und *Xdach1-B* im Vergleich zur *Msix6*-Überexpression. Anstatt der Ausbildung eines Koloboms (weißer Pfeil in 3) und einem leichten Größenzuwachs der Retina (3, 3a) kommt es in NF Stadium 36 zu massiver retinaler Neoplasie inklusive mehrfacher Einfaltungen (weiße Pfeile in 4a) innerhalb des neu gebildeten Retinagewebes (4, 4a). Die alleinige Injektion geringer Mengen an *Xdach1-B*-mRNA hat keinen Effekt (2, 2a; li, Linse; n.i., nicht injizierter Embryo). (C) Nachweis des retinalen Markergens *Xrx1* in NF Stadium 32 durch „*WMISH*“ (laterale Ansicht des Kopfbereiches und Transversalschnitte durch das Auge auf der injizierten Seite, gekennzeichnet durch die Färbung gegen β -Galaktosidase). Die Hybridisierung bestätigt die unter (B) gemachten Beobachtungen eines massiven Zuwachses an retinalem Gewebe mit als Folge davon auftretenden Einfaltungen bei Ko-Injektion von *Msix6*- und *Xdach1-B*-mRNA (weiße Pfeile in 4, 4a).

Zum Test auf mögliche funktionelle Wechselwirkungen zwischen *Xdach1-B*, *Xeya3* sowie dem *Six6*-Protein der Maus wurden diese durch Ko-Injektion in Zweizell-Stadien von *Xenopus laevis* auf die Ausprägung möglicher synergistischer Effekte hin untersucht. Dabei wurden mRNA Mengen verwendet, welche alleine quantitativ wie qualitativ keine oder nur geringe Auswirkung auf die Ausbildung der entsprechenden Phänotypen haben. In Übereinstimmung mit den aus der Maus bekannten Daten zeigt sich dabei ein starker Synergismus zwischen *Msix6* und *Xdach1-B*, der bei Einsatz von 25pg *Xdach1-B*-mRNA durchschnittlich zu einer Erhöhung der Anzahl an betroffenen Embryonen um den Faktor 2,4 führt (Abb. 4.33A). Neben diesen quantitativen Beobachtungen fällt bei Ko-Injektion von *Msix6* und *Xdach1-B* zudem die Ausbildung deutlich stärkerer retinaler Phänotypen auf, was sich in einer massiven Neoplasie der betroffenen Retina (Abb. 4.33B4, 4a) im Vergleich zu einer moderaten Vergrößerung inklusive der Ausbildung eines Koloboms nach Mikroinjektion von *Msix6*-mRNA (Abb. 4.33B3, 3a) äußert. Eine „*WMISH*“-Analyse unter Verwendung des retinalen Markergens *Xrx1* bestätigt die beobachteten Effekte, als dass sich eine Vergrößerung seiner Expressionsdomäne (Abb. 4.33C3, 3a) bis hin zu wachstumsbedingten Einfaltungen (Abb. 4.33C4, 4a) zeigt.

Im Gegensatz dazu hat eine Ko-Injektion von *Msix6* und *Xeya3* weder quantitative noch qualitative Auswirkungen bezüglich der Ausprägung retinaler Phänotypen (Abb. 4.33A). Eine Ko-Injektion von *Xdach1-B* und *Xeya3* zeigt ebenfalls keine Effekte (nicht gezeigt). Der starke, quantitative synergistische Effekt bei Ko-Injektion von *Msix6*, *Xdach1-B* und *Xeya3* erklärt sich durch die bereits weiter oben beschriebenen Auswirkungen einer gemeinsamen Überexpression von *Msix6* und *Xdach1-B*. Der Versuch, die beschriebenen Effekte durch Ko-Injektion eines anderen Mitgliedes der *Six*-Familie von Proteinen, *Msix3*, zu erhalten, schlägt fehl (nicht gezeigt), was auf eine Spezifität der *Xdach1-B*/*Msix6*-Wechselwirkung schließen lässt.

5. Diskussion

5.1 *Xeya3* als Mitglied der *Eyes absent*-Familie von Proteinen

Das mit dieser Arbeit vorgestellte *Eyes absent* Homolog 3 aus *Xenopus laevis* ist Teil der in Vertebraten mittlerweile vier Mitglieder umfassenden *Eya*-Familie von Proteinen (Abdelhak et al., 1997; Borsani et al., 1999; Zimmerman et al., 1997). In *Xenopus laevis* sind bislang lediglich zwei *Eya*-Homologe, *Xeya1* (David et al., 2001) und *Xeya2* (Kriebel, Diplomarbeit 2001), bekannt. Beide werden im Mesoderm hypaxialer Muskelvorläuferzellen und, im Fall von *Xeya2*, in der Pronephros-Anlage exprimiert. Abgesehen von neuronalen Derivaten plakodalen Ektoderms zeigt sich jedoch, im Gegensatz zu murinen *Eya1* und *Eya2* Homologen (Xu et al., 1997), zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung Expression innerhalb neuroektodermalen Gewebes wie etwa Gehirn oder Retina. Durch seine Expression in undifferenziertem neuronalen Gewebe wie der Neuralplatte inklusive des Augenfeldes ist *Xeya3* diesbezüglich zur Zeit das einzige *Xenopus laevis* *Eya*-Homolog und unterscheidet sich somit klar von den beiden anderen Homologen. Dabei zeigen sich beim Vergleich des *Xeya3*-Expressionsmusters mit dem von murinem *Eya3*, stärker als für die Homologe 1 und 2, deutliche Ähnlichkeiten (s. Abb. 5.1; Xu et al., 1997).

Das Auftreten von kongenitalen Katarakten ist beim Menschen mit Mutationen innerhalb des *EYAI*-Gens in Verbindung gebracht worden. Neben der branchiootischen- (BO) bzw. branchiootorenenalen Dysplasie (BOR) und einem postnatal progressiven Hörverlust (DFNA10), deren Auftreten mit einer Haploinsuffizienz von *EYAI* sowie *EYA4* korrelieren (Abdelhak et al., 1997; Vincent et al., 1997; Zhang et al., 2004), ist dies ein weiterer Entwicklungsdefekt bezüglich einer ursächlichen Beteiligung der *Eya*-Familie (Azuma et al., 2000). Weder das *Xenopus Eya1*- (David et al., 2001) noch das *Eya2*-Homolog (Kriebel, Diplomarbeit 2001) werden im Verlauf der Embryonalentwicklung von Zellen des Linsenektoderms oder innerhalb der aus der Neuralleiste abgeleiteten embryonalen Branchialbögen transkribiert. Für *Xeya3* konnte in der vorliegenden Arbeit eine Expression innerhalb der Linsenplakode zum Ende der Neurulation, innerhalb primärer Linsenfasern nach Invagination des Linsenvesikels und im Bereich der Branchialbögen gezeigt werden (s. Kapitel 4.4). Des Weiteren zeigen beide Strukturen, Linse wie Kiemenbögen, phänotypische Veränderungen als Folge einer Verminderung bzw. Erhöhung der *Xeya3*-Proteinkonzentration während der Embryonalentwicklung (s. Kapitel 4.6, 4.9). Besteht auch eine, auf Sequenzhomologien zwischen den verschiedenen Vertebraten-*Eya*-Homologen beruhende Einteilung in die vier Subklassen, so ist es doch im Verlauf der Evolution zu einer Veränderung der Spezifitäten auf Ebene der transkriptionellen Regulation der *Eya*-Mitglieder wie auch hinsichtlich ihrer Funktionen während der Entwicklung gekommen. Die weiter oben

beschriebenen humanen Entwicklungsdefekte erscheinen so als eine Kombination der aus *Xenopus laevis* bekannten Charakteristika der verschiedenen *Eya*-Homologe.

	Linse	Retina	Hirngewebe	craniales Mesenchym	craniale Plakoden	myogenes Mesoderm	Nierenanlage	Neuralleisten-Derivate
<i>Xeya1</i>	—	—	—	●	●	●	—	—
<i>Xeya2</i>	—	—	—	●	●	●	●	—
<i>Xeya3</i>	●	●	●	●	—	—	—	●
<i>MmEya1</i>	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>MmEya2</i>	—	●	●	●	●	●	—	●
<i>MmEya3</i>	●	●	●	●	—	—	—	●
<i>MmEya4</i>	—	—	—	●	—	●	—	—
<i>DrEya1</i>	—	—	—	—	●	●	—	●
<i>GdEya1</i>	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	●	n.g.	n.g.	n.g.
<i>GdEya2</i>	●	●	—	—	●	●	—	●
<i>(DjEya</i>	—	●	—	—	—	—	—	—)

Abb. 5.1: Räumliches Expressionsmuster von *Eyes absent* Homologen außerhalb *Drosophila melanogaster*. Abkürzungen: *Dj*, *Dugesia japonica* (als Invertebrat in Klammern; „Retina“ bezieht sich in diesem Fall auf die ausgebildeten Becherzellen); *Dr*, *Danio rerio*; *Gd*, *Gallus domesticus*; *Mm*, *Mus musculus*; n.g., nicht getestet; *X*, *Xenopus laevis*.

5.2 *Xeya3* als trophischer Faktor der Spezifikation und Determination anterioren neuralen Gewebes

Transkripte des maternal exprimierten Gens *Xeya3* finden sich vor Beginn der Gastrulation in der gesamten animalen Hemisphäre der *Xenopus laevis* Blastula. Zum Zeitpunkt früher Neurula-Stadien kommt es zur Eingrenzung der *Xeya3*-Expression auf vordere Abschnitte der entstandenen Neuralplatte (s. Kapitel 4.4). Dieses Areal beinhaltet Zellen des prospektiven Gehirns wie auch der Augenanlagen. Möglicherweise wird die *Xeya3*-Transkription dabei negativ von caudalisierend wirkenden Morphogenen (z.B. *Retinsäure*, *Fgf*, *Wnt*) reguliert, welche innerhalb dorsalen Mesoderms in einem Gradienten mit posterior – anteriorer Orientierung vorliegen und im Zusammenhang mit anterioposterioren Musterbildungsprozessen stehen (Papalopulu et al., 1991; Sive et al., 1990).

Die durch Funktionsverlust- bzw. Funktionsgewinnstudien bezüglich *Xeya3* erhaltenen Daten unterstreichen seine essentielle Funktion während der Spezifikation und weiteren Entwicklung anterioren neuralen Gewebes. Dabei ist die Induktion des apoptotischen Programmes und die daraus folgende Reduktion der betroffenen Gewebe/Organe im Zuge eines Funktionsverlustes (s. Kapitel 4.6, 4.7, 4.8) auch für *Eya*-Homologe anderer Spezies beschrieben worden. So kommt es vergleichbar in *Eya1/Eya1*-Mäusen zum Zelltod von Zellen der auditorischen sowie der renalen Anlage, beides Gewebe mit endogener Expression von *Eya1*. In heterozygoten Fällen zeigen sich mildere Effekte, die den Phänotypen in Patienten mit dem BOR-Syndrom entsprechen (Xu et al., 1999). Ebenso verhindern Mutationen im *eya*-Locus von *Drosophila melanogaster* die Differenzierung von Zellen zu funktionellen Einheiten, den Ommatidien, im Verlauf der Entwicklung des Komplexauges. Analog zu den in Vertebraten beschriebenen Verhältnissen kommt es vielmehr zum vermehrten Zelltod von Vorläuferzellen anterior der Morphogenetischen Furche. In diesem Zusammenhang wurde eine *Eya*-Funktion hinsichtlich der Kontrolle der Anzahl an Progenitor- und, daraus abgeleitet, differenzierenden Zellen vorgeschlagen (Bonini et al., 1993). Damit im Einklang steht der in *Xenopus laevis* beobachtete positive Proliferationseffekt bei Überexpression des *Xeya3*-Proteins, der zu einer deutlichen Vergrößerung neuraler Gewebe wie Gehirn und Auge als Folge einer erhöhten Anzahl neuraler Vorläuferzellen führt (s. Kapitel 4.9, 4.11, 4.12, 4.13). Die Ausprägung der beschriebenen Funktionsverlust- und Funktionsgewinn-Phänotypen ist, wie durch die Analyse molekularer Marker gezeigt, schon früh in der Embryonalentwicklung angelegt (s. Kapitel 4.7, 4.10). Damit besitzt *Xeya3* eine Funktion in anterioren neuralen Vorläuferzellen schon zu Beginn der primären Neurogenese noch vor bekannten Faktoren mit Expression innerhalb der anterioren Neuralplatte wie beispielsweise *Xotx2* (Pannese et al., 1995). Eine Notwendigkeit der *Xeya3*-Expression in Zellen der animalen Hemisphäre in Blastula-Stadien kann des Weiteren nicht ausgeschlossen werden, da es schon bei nur geringfügiger Erhöhung der Menge an injiziertem Morpholino zu einem starken Anstieg der Letalitätsrate der Embryonen kommt.

Mit beginnender Differenzierung geht die *Xeya3*-Expression innerhalb anterioren neuralen Gewebes stark zurück. So lassen sich in Kaulquappenstadien innerhalb von Zellen der neuralen Retina wie auch innerhalb von Hirnregionen, bis auf wenige Ausnahmen, keine *Xeya3*-Transkripte mehr nachweisen (s. Kapitel 4.4). Eine Funktion von *Xeya3* im Zusammenhang mit der primären Spezifikation und Determination neuraler Progenitorzellen steht damit im Einklang.

Eine Überexpression des *Xeya3*-Proteins führt lediglich in Bereichen endogener *Xeya3*-Expression zu phänotypischen Veränderungen, die in „*WMISH*“ eingesetzten Markergene wurden nicht ektopisch, d.h. räumlich getrennt von ihrer im Wildtyp vorzufindenden Expressionsdomäne, exprimiert (s. Kapitel 4.10, 4.11, 4.12). Dies legt nahe, dass das Protein nur in Anwesenheit spezifischer Faktoren funktionell aktiv sein kann, die selbst, alleine oder in Kombination, innerhalb der endogenen *Xeya3*-Expressionsdomäne vorzufinden sind. Oder bzw. und durch Mikroinjektion synthetischer mRNA exogen zugeführtes *Xeya3*-Protein wird, ähnlich wie schon weiter oben vorgeschlagen, durch morphogenetische Gradienten oder komplementär zu *Xeya3* exprimierte Faktoren in seiner Funktion blockiert.

Neben starker Hypoplasie neuralen Gewebes fällt im Zusammenhang mit einem *Xeya3*-Funktionsverlust ebenso das Fehlen von Linsenstrukturen auf. Eine Expression von *Xeya3* innerhalb plakodalen Linsenektoderms kann zum Ende der Neurulation beobachtet werden (s. Kapitel 4.4), einem Zeitpunkt, der die beginnende Spezifizierung des Linsenektoderms durch Wechselwirkungen mit dem darunterliegenden neuralen Gewebe der optischen Vesikel markiert (Henry und Grainger, 1990). Der beobachtete Defekt der Linsenbildung ist so möglicherweise sowohl eine primäre (wegen des Fehlens von *Xeya3* innerhalb des heranreifenden Linsenvesikels) als auch eine sekundäre Folge des *Xeya3*-Funktionsverlustes (aufgrund des Zelltodes neuraler Vorläufer des optischen Vesikels und der damit ausbleibenden Interaktion zwischen neuralem und nicht-neuralem Gewebe), der hier neurales wie auch nicht-neurales Ektoderm betrifft.

5.3 Das *Xeya3*-Protein besitzt möglicherweise zusätzlich eine transdeterminierende Funktion

In Zuge der *Xeya3*-Überexpression konnte eine Repression der Expression von Markergenen plakodalen (*Xdlx3*, *Xsox3*) sowie epidermalen Ektoderms (*Xk81*) lateral der offenen Neuralplatte beobachtet werden (s. Kapitel 4.10). Die Identität der betroffenen Zellen konnte nicht abschliessend geklärt werden. Denkbar ist jedoch die Bildung zusätzlichen cranialen Neuralleistengewebes, das während der späteren Entwicklung an der Bildung der Branchialbögen beteiligt ist, da es zu Defekten in der Ausbildung cranialer Nerven (s. Kapitel 4.12) sowie, in einigen Fällen, zur Bildung aktiv proliferierender tumoröser Auswüchse im Bereich der Branchialbögen kommt (s. Kapitel 4.9). Eine transdeterminierende Funktion ist

auch für *Eyes absent* aus *Drosophila melanogaster* beschrieben worden, das bei ektoptischer Überexpression innerhalb der Antennen-Imaginalscheibe die Bildung ektoptischen Augengewebes verursacht (Bonini et al., 1997; Chen et al., 1997).

Als eine Folge der *Xeya3*-Überexpression konnte eine Repression der *Xk81*-Expression auch in ventralen Regionen des *Xenopus laevis* Embryos beobachtet werden, die jedoch zu keinen offensichtlichen morphologischen Veränderungen in späteren Entwicklungsstadien führte. Dies legt die Vermutung nahe, dass transdeterminierende Effekte des *Xeya3*-Proteins, analog zu den weiter oben beschriebenen Beobachtungen mit Ursache in einer Steigerung der Zellproliferationsrate, abhängig von räumlich und eventuell auch zeitlich begrenzt vorliegenden Kofaktoren sind.

5.4 Die Phosphatase-Aktivität des *Xeya3*-Proteins hat möglicherweise autoregulatorische Funktion

Für humanes *EYA3* sowie für *Eyes absent* aus *Drosophila melanogaster* ist eine Phosphatase-Aktivität im Bereich der konservierten, C-terminalen *Eya*-Domäne beschrieben worden (Li et al., 2003; Tootle et al., 2003). Auch im *Xenopus laevis* Homolog *Xeya3* findet sich ein Sequenzabschnitt, der das Protein als Mitglied der Haloacid Dehalogenase-ähnlichen Phosphohydrolasen kennzeichnet (s. Kapitel 4.3).

In Zellkulturexperimenten mit murinen *Eya3*-Mutanten bezüglich des katalytischen Motivs der Phosphatase-Domäne wurde gezeigt, dass die Phosphatase-Aktivität des Proteins für eine Änderung der regulatorischen Funktion eines Transkriptionsfaktor-Komplexes, bestehend aus *Six1* und *Dach1*, von einer Repression zu einer Aktivierung der Transkription von Zielgenen unerlässlich ist (Li et al., 2003). Gleichfalls führte die Expression von Phosphatase-Mutanten von *Eya* in *eya*^{-/-}-Tieren von *Drosophila melanogaster* zu einer, im Vergleich zum Wildtyp-Protein, stark verminderten Aktivität bezüglich der Ausbildung von Ommatidien. Das Potential der Ausbildung ektoptischen Augengewebes bei Überexpression mutierten Proteins war ebenfalls erheblich gesenkt. Die Aktivität des *Eya*-Proteins als Ko-Aktivatoren im Zusammenspiel mit *Sine oculis* wurde durch die Mutationen innerhalb der Phosphatase-Domäne jedoch nicht verringert (Tootle et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Phosphatase-Aktivität des *Xeya3*-Proteins zu keiner Verringerung der weiter oben beschriebenen Effekte eines *Xeya3*-Funktionsgewinns führt. Im Gegenteil konnte eine sowohl quantitative als auch qualitative Aktivitätssteigerung bei Mikroinjektion der entsprechenden synthetischen mRNAs beobachtet werden (s. Kapitel 4.14). Dies steht im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen aus anderen Spezies.

Durch Deletion der *Eya*-Domäne konnte die innerhalb der „PST“-Domäne lokalisierte transaktivierende Aktivität des *Eya*-Proteins aus *Drosophila melanogaster* im Zellkultursystem erheblich gesteigert werden. Des Weiteren zeigt sich ein ebenfalls positiver Effekt bei

Aktivierung der *RAS/MAPK*-Signaltransduktion mittels konstitutiv aktivem *Ras*^{V12}, was zur Phosphorylierung des Proteins über *MAPK*-Phosphorylierungsstellen im Bereich der „PST“-Domäne führt (Hsiao et al., 2001). Durch Verwendung der Deletions-Konstrukte bezüglich der *Eya*-Domäne konnte letzterer Effekt zusätzlich gesteigert werden (Silver et al., 2003). In Anbetracht der Tatsache, dass Phosphohydrolase- und *Eya*-Domäne nahezu vollständig überlappen, weist dies stark auf eine mögliche autoregulatorische Funktion der Phosphatase-Aktivität bezüglich des Phosphorylierungsstatus und somit der potentiellen Aktivität des *Eya*-Proteins hin. Analog dazu könnte es bei Verlust dieser intrinsischen Kontrollinstanz im Fall der Phosphatase-Mutanten von *Xeya3* zu einer länger anhaltenden Hyperphosphorylierung des Proteins kommen, die Ursache für die im Zusammenhang mit Funktionsgewinnstudien gemachten Beobachtungen der quantitativen wie qualitativen Aktivitätssteigerung ist. Dafür nötige potentielle Phosphorylierungsstellen finden sich nach Analyse der *Xeya3*-Primärstruktur (Serine der Positionen 20, 34, 193, 292; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (Blom et al., 1999); http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan (Falquet et al., 2002)). Da es zwischen *Eya*-Proteinen in *Drosophila melanogaster* zu einer über die „PST“-Domäne vermittelten Homodimerisierung kommt (Silver et al., 2003) und *in vivo* Experimente zeigen konnten, dass *Eya* selbst ein Substrat der Phosphatase-Aktivität innerhalb der *Eya*-Domäne sein kann (Tootle et al., 2003), ist zusätzlich die gegenseitige Kontrolle einer über den Phosphorylierungsgrad gesteuerten, transaktivierenden Aktivität denkbar. Die bei Überexpression der mutierten Formen beobachtete Aktivitätssteigerung des *Xeya3*-Proteins (s. Kapitel 4.14) ist so möglicherweise auch das Ergebnis eines dominant negativen Effektes, der durch Dimerisierungen zwischen endogenem Wildtyp-Protein und mutiertem, exogen zugeführtem Protein entsteht. Durch ausbleibende oder verringerte Dephosphorylierung des *Xeya3*-Proteins vom Wildtyp durch die Phosphatase-defiziente Form ist so eventuell auch ersteres in seiner Aktivität gesteigert und trägt zur verstärkten Ausbildung der für einen *Xeya3*-Funktionsgewinn beschriebenen Phänotypen bei.

5.5 Die Zellkernlokalisierung des *Xeya3*-Proteins

Bezüglich *Xeya3* wurde eine Lokalisation ausschließlich innerhalb des Zellkerns beobachtet. Dabei zeigten sich bei Überexpression des Proteins weder im zeitlichen Verlauf für unterschiedliche Entwicklungsstadien noch hinsichtlich der räumlichen Verteilung innerhalb des Embryos Unterschiede.

Im Zusammenhang mit möglichen Protein – Protein Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern der *Eya*- und *Six*-Proteinfamilie in Vertebraten wurde am Beispiel der Maus eine Kern-Translokation der *Eya*-Proteine 1-3 durch die *Six*-Proteine 2, 4 und 5 beschrieben. Allein in Zellen transfiziertes *Eya*-Protein zeigte hingegen eine im wesentlichen zytoplasmatische

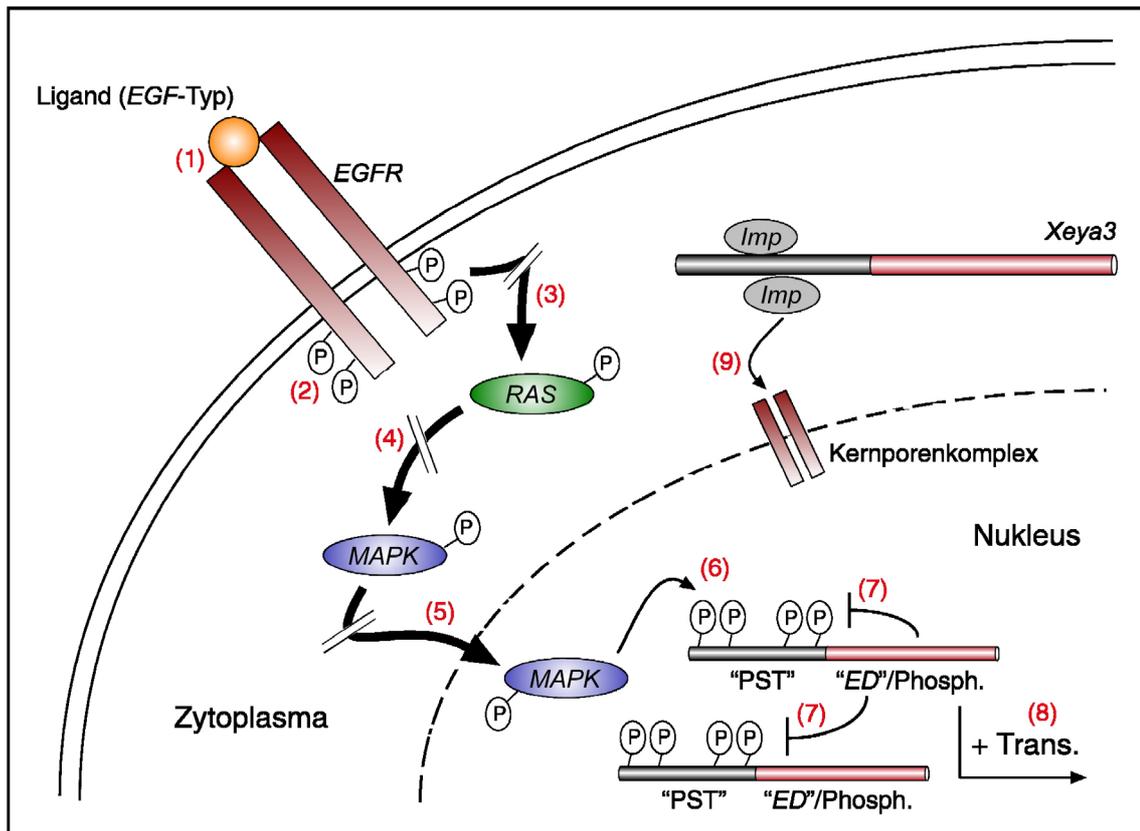


Abb. 5.2: Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-vermittelte, RAS/MAPK-abhängige Signaltransduktion und transaktivierende Funktion von Xeya3. Durch Bindung des Liganden vom EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor)-Typ (1) kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung (P) des zytoplasmamembranständigen Rezeptors (2). Die Initialisierung der Signaltransduktionskaskade führt zur Phosphorylierung des G-Proteins RAS (3) und in der Folge zur Phosphorylierung der zytoplasmatisch lokalisierten MAPK (*M*itogen *A*ctivated *P*rotein *K*inase) (4). Phosphorylierte MAPK tritt in den Zellkern ein (5). Über Phosphorylierungsstellen im Bereich der „PST“-Domäne erfolgt eine MAPK-abhängige Phosphorylierung des Xeya3-Proteins (6). Durch die intrinsische Phosphatase-Aktivität innerhalb der „Eya“-Domäne (ED) kommt es zur Feinjustierung des Aktivitätsgrades bzw. zum Aktivitätsverlust des Transkriptionsfaktors bei ausbleibender RTK-Signaltransduktion aufgrund einer Dephosphorylierung. Dabei sind sowohl Autodephosphorylierung als auch die Dephosphorylierung durch andere Xeya3-Moleküle denkbar (7). Die Aktivierung des Xeya3-Transkriptionsfaktors hat positiven Einfluss auf die Transkription (Trans.) von Zielgenen, welche die Proliferation neuraler Vorläuferzellen steuern (8). In Phosphatase-Mutanten des Xeya3-Proteins fehlt eine intrinsische, negative Kontrollinstanz, was zur Aktivität auch nach Ausbleiben eines RTK-vermittelten Signals führt und sich in einer generellen Aktivitätssteigerung des Proteins bei Überexpression äußert. Die Translokation von Xeya3 in den Zellkern ist über ubiquitär vorhandene Importfaktoren (Imp) denkbar (9).

Verteilung (Ohto et al., 1999). Schon ein zeitlicher wie auch räumlicher Vergleich der Expressionsdomänen von in *Xenopus laevis* bekannten Six-Proteinen mit der des Xeya3-Proteins

schließt die *Six*-Proteinfamilie als hauptsächliche Faktoren des nukleären Transports des *Xeya3*-Proteins aus. So ist bis zum heutigen Zeitpunkt kein *so*-Homolog in *Xenopus laevis* mit einem Expressionsmuster vergleichbar dem zu Beginn der Neurulation bestehenden *Xeya3*-Expressionsmuster bekannt. Es kommt zwar zu Überschneidungen wie etwa im Bereich der Augenanlagen im Fall von *Xsix3*, *Xsix6* und *Xeya3*, *Xeya3*-Expressionsbereiche wie z.B. präsumtives Hinterhirn zeigen jedoch zu keinem Zeitpunkt der frühen Embryonalentwicklung Expression von Genen der *Six*-Familie (Ghanbari et al., 2001). Für die beiden anderen Mitglieder der *Eya*-Familie aus *Xenopus laevis* sind die in der Maus beschriebenen, den Kerntransport betreffenden *Six-Eya*-Interaktionen eher denkbar, treten hier doch weitaus stärkere Überschneidungen der Expressionsdomänen wie etwa im Bereich von cranialen Plakoden und mesodermalem Gewebe wie der Nierenanlage und Muskelvorläuferzellen auf (David et al., 2001; Ghanbari et al., 2001; Heanue et al., 1999). Bezüglich *Xeya3* ist somit ein Kerntransport über ubiquitär vorhandene Importfaktoren/-Rezeptoren naheliegend, der abhängig von nukleären Lokalisationssignalen innerhalb der Primärstruktur des *Xeya3*-Proteins ist. Bislang konnten hier jedoch noch keine diesbezüglich konservierten Motive identifiziert werden. Ein Modell der *Xeya3* Integration in Aspekte von Signaltransduktion, Autoregulation sowie Zellkerntransport ist in Abb. 5.2 dargestellt.

5.6 *Xdach1* als Mitglied der *Dachshund*-Familie von Proteinen

In dieser Arbeit ist die Klonierung, Expressionsanalyse und funktionelle Charakterisierung einer *Dachshund* homologen cDNA aus *Xenopus laevis* (*Xdach1*) beschrieben worden. Dabei wurden zwei Formen, *Xdach1*-A und *Xdach1*-B, isoliert, die sich hinsichtlich der Primärstruktur des jeweils enkodierten Proteins vorwiegend durch zusätzliche Sequenzinformation im Fall von *Xdach1*-B unterscheiden (s. Kapitel 4.15, 4.16). Für beide Formen zeigt sich beim Vergleich mit den in Vertebraten vorhandenen Familienmitgliedern *Dachshund1* (*Dach1*), *Dachshund2* (*Dach2*) und *Dachshund B* (*DachB*, aus Zebrafisch) eine deutliche Sequenzverwandschaft mit *Dach1*. Die Analyse der Expression der beiden Formen mittels RT-PCR auf total RNA-Präparationen aus *Xenopus laevis* Embryonalstadien sowie adulten Geweben zeigte ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der temporären und räumlichen Verteilung der beiden *Xdach1*-Formen. Im Menschen finden sich ähnlich den Verhältnissen in *Xenopus laevis* durch ihrer Länge unterscheidbare Formen von *DACHI*. Zwei davon stellen exakt das Vorhandensein bzw. den Verlust des für *Xdach1* angesprochenen Sequenzabschnittes dar (Acc.-No.: Q9UI36, NP542937) und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit das Ergebnis alternativen Splicings. Dies ist auch für die *Xenopus laevis* Homologe *Xdach1*-A und *Xdach1*-B anzunehmen und scheint somit einen evolutionär konservierten Prozess darzustellen.

	Linse	Retina	Vorder-/Mittel-/ Hinterhirn	Rückenmark	neurogene, craniale Plakoden	Nierenanlage	myogenes Mesoderm
<i>Xdach1</i>	—	●	●	●	●	●	●
<i>MmDach1</i>	●	●	●	●	●	—	●
<i>MmDach2</i>	—	●	●	●	●	n.g.	●
<i>DrDachA</i>	●	●	●	●	●	—	●
<i>DrDachB</i>	—	—	●	●	●	—	—
<i>DrDachC</i>	—	—	●	●	●	●	—
<i>GdDach1</i>	—	●	●	●	●	—	●
<i>GdDach2</i>	—	—	—	●	—	●	●
<i>OlDach1</i>	●	●	●	●	●	—	●

Abb. 5.3: Räumliches Expressionsmuster von *Dachshund* Homologen außerhalb *Drosophila melanogaster*. Abkürzungen: *Dr*, *Danio rerio*; *Gd*, *Gallus domesticus*; *Mm*, *Mus musculus*; n.g., nicht getestet; *Ol*, *Oryzas latipes*; *X*, *Xenopus laevis*.

Neben der betrachteten Sequenzhomologie zwischen *Xdach1* und insbesondere den *Dachshund1* Homologen aus anderen Vertebraten zeigen sich auch bei Betrachtung der jeweiligen embryonalen räumlichen wie zeitlichen Expressionsmuster deutliche Ähnlichkeiten (s. Kapitel 4.17; Abb. 5.3). So ergibt sich analog zu den in *Xenopus laevis* gemachten Beobachtungen ein Start der Transkription von *Dachshund* homologen mRNAs erst zu Beginn der Organentwicklung und beschränkt sich dabei auf Gewebe ektodermaler wie mesodermaler Herkunft (Davis et al., 1999; Hammond et al., 2002; Heanue et al., 2002; Heanue et al., 1999; Loosli et al., 2002). Dabei stimmen die Expressionsmuster z.T. auch im Detail überein. So beschränkt sich eine etwaige *Dach*-Expression innerhalb des zentralen Nervensystems stets auf

dorsale Abschnitte, wobei in einigen Fällen auch die für *Xdach1* beschriebene, schwächer ausgeprägte Expression in Nähe der Bodenplatte des Hinterhirns bzw. des Rückenmarks rekapituliert wird (Davis et al., 1999). Im Fall des *DachshundA*-Homologs des Zebrafisches kommt es in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien, wie für *Xdach1* aus *Xenopus laevis* beschrieben, zu einer Konzentration retinaler Genexpression im Bereich der Ganglionzellschicht (Hammond et al., 2002). Weitere, evolutionär konservierte Expressionsdomänen sind der trigeminale Nerv, der sich dorsocaudal des Auges als Teil neurogener, cranialer Plakoden entwickelt, sowie mesodermale Muskelvorläuferzellen. Im Gegensatz dazu lässt sich in *Xenopus laevis* zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung *Xdach1*-Expression innerhalb von Linsengewebe nachweisen, wie es für Homologe der Maus (Davis et al., 1999), des Zebra- (Hammond et al., 2002) sowie des Kugelfisches (Loosli et al., 2002) beschrieben wurde. Möglicherweise ist es, wie schon weiter oben im Zusammenhang mit Homologen von *Eyes absent* beschrieben, zu Veränderungen bezüglich der transkriptionellen Regulation von Mitgliedern der *Dachshund*-Familie gekommen. Das Vorkommen von mindestens zwei *Dachshund*-Homologen im Menschen (Davis et al., 2001b; Kozmik et al., 1999), in der Maus (Davis et al., 1999; Davis et al., 2001b), im Zebrafisch (Hammond et al., 2002) und im Huhn (Heanue et al., 2002; Heanue et al., 1999) lassen auch in *Xenopus laevis* die Existenz eines weiteren *Dachshund*-Homologs vermuten.

Die in adulten Geweben/Organen von *Xenopus laevis* beobachtete Verteilung der Genexpression von *Xdach1* mit prominenter Expression innerhalb des Herzens, der Niere, des Darms und der Lunge ergibt sich interessanterweise auch bezüglich humaner bzw. muriner adulter Gewebe mit entsprechender Herkunft (Kozmik et al., 1999). Dies zeigt, dass eine evolutionäre Konservierung der Regulation und einer damit einhergehenden möglichen Funktion von *Dachshund*-Homologen nicht nur auf die Embryogenese beschränkt sind, sondern sich auch auf den Rest des Lebenszyklus ausdehnen.

5.7 *Xdach1* in Morphogenese und Musterbildung des Amphibienauges

Durch weitergehende Analyse mit Hilfe von Funktionsverluststudien konnten dem *Xdach1*-Protein aus *Xenopus laevis* essentielle Funktionen bezüglich der Morphogenese und Musterbildung innerhalb des sich entwickelnden Auges zugewiesen werden. So verhindert die Mikroinjektion von *Xdach1*-spezifischen Morpholino-Oligonukleotiden die korrekte Evagination des optischen Vesikels am Ende der Neurulation was in der weiteren Entwicklung morphologisch durch das Fehlen eines optischen Bechers sowie eines davon proximal gelegenen optischen Stiels führt (s. Kapitel 4.19, 4.20). Zu beachten ist dabei, dass es dennoch zu Differenzierungsprozessen, gezeigt anhand des Photorezeptor-spezifisch exprimierten Gens *Xrhodopsin*, kommt. Wie auch die Expressionsmuster von anderen in der neuralen Retina exprimierten Genen zeigen, fehlt es der betroffenen Retina jedoch an einer klaren Schichtung,

wie sie für retinales Gewebe typisch ist. Ob es dennoch zur Genese aller retinalen Zelltypen kommt, kann nicht abschließend beantwortet werden.

In einigen Fällen eines Funktionsverlustes von *Xdach1* wurde außerdem das Fehlen einer Linse beobachtet, was mit einer extrem proximalen Lokalisation des präsumtiven Retina-Gewebes einherging. Da es während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu keinem Zeitpunkt zur Expression von *Xdach1* in Bereichen prospektiven oder reifenden Linsengewebes kommt, stellt diese Beobachtung sehr wahrscheinlich einen sekundären Effekt des Funktionverlustes dar, der die Notwendigkeit einer direkten Interaktion zwischen Retina- und Linsengewebe unterstreicht (Henry und Grainger, 1990). Fehlende Induktionsvorgänge des Linsengewebes als Ursache für die fehlerhafte Musterbildung innerhalb des betroffenen retinalen Primordiums können indes ebensowenig ausgeschlossen werden.

Außer *Xoptx2*, dessen zeitlicher Expressionsbeginn mit dem des *Xdach1*-Gens vergleichbar ist (Ghanbari et al., 2001; Zuber et al., 1999), zeigen die in späten Neurula-Stadien untersuchten molekularen Marker des anterioren Neuroektoderms keinen quantitativen Rückgang ihrer Expression. Vielmehr deuten die beobachteten Expressionsmuster bereits auf die in späteren Entwicklungsstadien erkennbaren phänotypischen Veränderungen wie die fehlerhafte Evagination und Musterbildung innerhalb des optischen Vesikels hin (s. Kapitel 4.20). Dies schließt aber aus, dass die Expression der betroffenen Gene in späteren Stadien der Augenentwicklung von *Xdach1* abhängig ist bzw. durch *Xdach1* stabilisiert wird. Studien in der Maus konnten zeigen, dass dies im Fall von *Pax6* auch in umgekehrter Hinsicht gilt, da es im genetischen Hintergrund der *Pax6*-Nullmutante „*small eyes*“ (*sey*) nach wie vor zur Expression von *Dach1* im Bereich der verkleinerten optischen Vesikel kommt (Heanue et al., 2002). Zwischen *Xdach1* und *Xoptx2* als Mitglied der *Six*-Familie von Proteinen besteht hingegen ein engerer Zusammenhang, auf den weiter unten detailliert eingegangen werden soll.

Nullmutanten des *Dachshund* Gens (*dac*) von *Drosophila melanogaster* zeigen neben einer Verkürzung der Extremitäten einen Verlust von Ommatidien, den funktionellen Einheiten des Komplexauges von Insekten. Grund dafür ist eine unterbleibende Ausbildung der Morphogenetischen Furche am posterioren Rand der Augen-Imaginalscheibe des Puppenstadiums (Mardon et al., 1994). Die in *Xenopus laevis* beschriebene, zu Beginn der Bildung des optischen Vesikels angelegte fehlerhafte Morphogenese und Musterbildung des Auges nach *Xdach1*-Funktionsverlust stellt ein vergleichbares Ereignis dar, wenn auch zwischen der Augenentwicklung der Insekten und Wirbeltiere erhebliche morphologische Unterschiede bestehen. Kommt es in *Dac*-Mutanten von *Drosophila melanogaster* zu vereinzelter Bildung von Ommatidien, so sind diese durch eine fehlerhafte Anordnung bzw. Anzahl der verschiedenen ommatidialen Zelltypen gekennzeichnet (Mardon et al., 1994). Auch in Embryonen von *Xenopus laevis* wurde eine Differenzierung retinaler Zelltypen vor dem Hintergrund eines *Xdach1*-Funktionsverlustes beobachtet aber ihre Anordnung folgt, scheinbar

analog zu den in *Drosophila melanogaster* beobachteten Verhältnissen, keinem erkennbaren Muster (s. Kapitel 4.20).

In der Maus wurde durch Erzeugung von *Dach1*-Nullmutanten (*Dach1*^{-/-}) versucht, das entsprechende Protein funktionell zu charakterisieren (Davis et al., 2001a). Defekte innerhalb von Organen mit embryonaler *Dach1*-Expression sowie Ursachen für die durch Atemnot und Zyanose ausgelöste postnatale Lethalität der neugeborenen Tiere konnten allerdings trotz einer Vielzahl von Analysen nicht gefunden werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass es sich dabei um Auswirkungen handelt, die mit *Dach1*-Funktionen im adulten Tier verknüpft sind. So könnte der Verlust der in der adulten Lunge bestehenden Expression von *Dach1* eine Ursache für die beobachtete Atemnot und die sehr wahrscheinlich daraus resultierende Zyanose darstellen. Auch in *Xenopus laevis* und im Menschen exprimieren Zellen der adulten Lunge *Dach1*, eine in diesem Zusammenhang über Speziesgrenzen hinweg konservierte Funktion des Proteins ist deshalb denkbar.

5.8 *Xdach1* in Entwicklung und Differenzierung von Hirngewebe

In schweren phänotypischen Äußerungen nach *Xdach1*-Funktionsverlust kommt es morphologisch zu einer nahezu vollständigen Verschmelzung von präsumtivem Hirn- und Retinagewebe. Die Analyse der Expression von Markergenen zeigt jedoch Unterschiede in der Reaktion der beiden neuralen Gewebe auf einen Verlust des *Xdach1*-Proteins. Transkribieren Zellen der betroffenen Retina nach wie vor eine Vielzahl an auch in unbehandeltem Gewebe exprimierten Faktoren, so kommt es im Bereich der untersuchten Hirngewebe zum Verlust aller getesteten Markergene (s. Kapitel 4.20, 4.21). Im Fall von *Xpax6* findet diese Repression schon zum Ende der Neurulation, dem Startpunkt der *Xdach1*-Transkription, in Bereichen des zukünftigen Rhombencephalons statt. Dies deutet im Gegensatz zu den Verhältnissen während der Augenentwicklung auf eine Abhängigkeit der *Xpax6*-Transkription von *Xdach1* im Zusammenhang mit der Entwicklung von Gehirnstrukturen hin. Neben dem Verlust der Expression der untersuchten Gene konnte eine deutliche Veränderung der Morphologie der Zellen der betroffenen Hirnhälfte beobachtet werden. Zusammen mit den beobachteten Defekten hinsichtlich der Genexpression legt dies eine ausbleibende Neurogenese innerhalb des zentralen Nervensystems nahe.

Auch innerhalb von Strukturen des Gehirns von *Drosophila melanogaster*, dem sogenannten Pilzkörper, zeigen sich bei Verlust des *Dac*-Proteins Veränderungen, die im Zusammenhang mit Differenzierungsdefekten neuraler Zellen stehen und bereits während Puppenstadien angelegt werden (Martini et al., 2000). Wie schon bezüglich der Augenentwicklung ergeben sich somit Analogien zwischen Insekt und Wirbeltier, die eine Konservierung des *Dachshund*-Proteins nicht nur auf Ebene seiner Primärstruktur sondern auch hinsichtlich funktioneller Aspekte zeigen.

5.9 Die Zellkernlokalisierung des *Xdach1*-Proteins

Durch Verwendung Epitop-tragender Versionen konnte eine ausschließliche Lokalisation des *Xdach1*-B-Proteins im Zellkern festgestellt werden. Auch *Dac* aus *Drosophila melanogaster* ist ohne Ausnahme im Nukleus lokalisiert (Mardon et al., 1994; Tavsanlı et al., 2004). Dabei wurden bei Analyse der Primärstruktur des *Drosophila*-Proteins zwei Motive gefunden, die eine selbstständige Translokation über Rezeptorvermittelten Kerntransport ermöglichen könnten. Ein bipartites Kern-Lokalisations-Signal (NLS) findet sich am Ende der *DD2* und zeigt einen erkennbaren Grad an Konservierung zwischen verschiedenen Spezies. Eine weitergehende Analyse dieses Motivs lies jedoch erkennen, dass es weder ausreichend noch notwendig für eine Lokalisation des *Dac*-Proteins ist (Tavsanlı et al., 2004). Vielmehr scheint insbesondere der *DD1*, innerhalb der kein entsprechendes Motiv gefunden werden konnte, eine besondere Funktion bezüglich der subzellulären Lokalisation des Proteins zuzukommen. Bei Deletion dieser Domäne kommt es zu einer verstärkten Lokalisation von *Dac* im Zytoplasma (Tavsanlı et al., 2004). Die Suche nach NLS innerhalb von *Xdach1*-B ergibt ein mögliches bipartites NLS C-terminal der *DD2* (Pos. 680 – 697), das zwischen Vertebraten hoch konserviert ist, in *Drosophila melanogaster* jedoch nicht existiert (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan; Falquet et al., 2002). Da für *Dac* bzw. *Dach1* Wechselwirkungen mit anderen nukleären Proteinen wie *Eyes absent* (Chen et al., 1997) und einer Reihe von Ko-Repressoren beschrieben worden sind (Li et al., 2002), ist eine Kernlokalisierung des *Dachshund*-Proteins auch durch eine Bindung an kernlokalisierte Interaktionspartner denkbar.

5.10 Der Synergismus zwischen *Xdach1*-B und *Msix6*

Durch Ko-Injektion geringer Mengen synthetischer mRNA von *Xdach1*-B bzw. *Msix6*, die alleine injiziert keine oder nur geringe phänotypische Äußerungen zur Folge haben, konnte in *Xenopus laevis* eine synergistische Wirkungsweise der daraus translatierten Proteine beobachtet werden (s. Kapitel 4.25). So zeigte sich in quantitativer Hinsicht bei alleiniger Injektion kleiner Mengen von *Msix6*-mRNA eine geringe Penetranz der für eine *Six6*-Überexpression bekannten phänotypischen Äußerungen wie u.a. retinale Neoplasie durch Hyperproliferation von Vorläuferzellen (Bernier et al., 2000; Zuber et al., 1999). Die gleichzeitige Mikroinjektion von kleinen Mengen an *Xdach1*-B-mRNA, welche in dieser Größenordnung alleine keine Entwicklungsdefekte auslösen, führte zum deutlichen Anstieg der Anzahl an Embryonen mit vergrößertem retinalen Gewebe. Ein Synergismus der beiden Proteine zeigte sich auch auf qualitativer Ebene, wobei es beginnend mit einer einfachen Vergrößerung des betroffenen Auges zu massivem Gewebewuchs und in der Folge abnormen Einfaltungen der Retina kam. Dass es sich dabei um spezifische Effekte bezüglich einer Wechselwirkung zwischen *Xdach1*-B und *Msix6* handelt, wurde durch die Ko-Injektion von synthetischer mRNA für *Msix3* oder *Xeya3* gezeigt, was in beiden Fällen keine synergistischen Auswirkungen zur Folge hatte.

In der Maus sind hinsichtlich kooperativer Effekte zwischen *Six6* und *Dach1* analoge Beobachtungen gemacht worden. Es konnte die Bildung eines transkriptionellen Repressorkomplexes mit durch *Six6* bereitgestellter DNA-Bindung und durch *Dach1* vermittelter Rekrutierung von nukleären Ko-Repressoren nachgewiesen werden, der zur negativen Regulation von Inhibitoren des Zell-Zyklus führt (Li et al., 2002). Somit ist eine gewebespezifische Steuerung der Proliferation von Vorläuferzellen möglich, in diesem Fall innerhalb der Augen- und Hypophysenanlage. Bezüglich der Augenentwicklung kommt es in *Six6*^{-/-}-Mäusen zum verfrühten Austritt von Vorläuferzellen der präsumtiven Ganglionzellschicht aus dem Zellzyklus, was einem Stop der Zellproliferation entspricht (Li et al., 2002). Nimmt man ähnliche Verhältnisse auch für die Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* an, so ist neben den weiter oben beschriebenen synergistischen Effekten der Ko-Injektion zu beachten, dass für *Xdach1* aus *Xenopus laevis* sowie für *DachA* aus *Danio rerio* eine im Bereich der präsumtiven Ganglionzellschicht angereicherte Genexpression beschrieben worden ist (Hammond et al., 2002). Die unter einem Funktionsverlust von *Xdach1* innerhalb betroffenen retinalen Gewebes nahezu ubiquitär verbreitete Genexpression von z.B. *Xrx1*, das ansonsten vorwiegend in distalen Bereichen der Retina exprimiert wird (s. Kapitel 4.20), ist ein weiterer Hinweis auf einen negativen Effekt des *Xdach1*-Funktionsverlustes hinsichtlich der Entwicklung der Ganglionzellschicht der Retina. In letzterem Zusammenhang ist eine Notwendigkeit der *Xdach1*-Funktion innerhalb eines auch in *Xenopus laevis* möglicherweise vorhandenen *Six6/Xdach1*-Komplexes denkbar, zumal es im Verlauf der Retinogenese zu Überschneidungen der Expressionsdomänen von *Xdach1* und *Xsix6* kommt.

Im Zuge des *Xdach1*-Funktionsverlustes ist im Gegensatz zu anderen, durch „WMISH“ analysierten Genen mit Funktion in der frühen Augenentwicklung eine deutliche Repression der *Xsix6* (*Xoptx2*) Expression beobachtet worden. Zeitlich gesehen beginnt die Transkription von *Xsix6* kurz vor der erstmalig zum Ende der Neurulation nachgewiesenen *Xdach1*-Expression. So stellt sich *Six6* nicht nur als möglicher Interaktionspartner von *Xdach1* im Zuge der Steuerung der Proliferation u.a. retinalen Vorläufergewebes dar, sondern ist daneben auch hinsichtlich der Stabilisierung seiner Transkription von *Xdach1* abhängig.

Ein Vergleich der oben gemachten Beobachtungen mit den bis heute bekannten Daten aus *Drosophila melanogaster* läßt insofern Differenzen erkennen, als dass eine direkte Interaktion zwischen *Dachshund* (*Dac*) und *Sine oculis* (*so*), dem *Six*-Homolog, in der Fliege bislang nicht beschrieben worden ist. Vielmehr bestehen physikalische Interaktionen zwischen *So* und *Eya* (Pignoni et al., 1997) bzw. *Eya* und *Dac* (Chen et al., 1997), so dass es zu einem möglichen trimeren Transkriptionsfaktor-Komplex *So – Eya – Dac* kommen kann, wie er auch im Zusammenhang mit der Muskelentwicklung im Hühnerembryo beschrieben worden ist (Heanue et al., 1999). Die Interaktion mit Mitgliedern der *Eya*-Familie von Proteinen bedarf dabei der

konservierten *DD2* (Heanue et al., 1999). Für die bislang nur in Vertebraten beschriebene Komplexbildung zwischen *Dach1* und *Six6* ist dagegen die *DD1* unerlässlich (Li et al., 2002).

5.11 *Xdach1* als Inhibitor der *Xbmp4* induzierten Signaltransduktion

Nach Überexpression des *Xdach1*-B-Proteins in *Xenopus laevis* Embryonen wurde eine starke Neuralisierung nicht-neuralen Gewebes beobachtet. In der weiteren Entwicklung führte dies zu einer massiven Vergrößerung von Hirnstrukturen sowie dem Verlust ektodermaler Derivate wie Linse und cranialen Nerven, die sich aus nicht-neuralen, ektodermalen Plakoden ableiten (s. Kapitel 4.22, 4.23). In Experimenten mit animalen Gewebeexplantaten wurde gezeigt, dass dies Folge einer Inhibition der *Xbmp4* induzierten Signaltransduktion ist, die an Prozessen der epidermalen Induktion und neuralen Inhibition beteiligt ist (s. Kapitel 4.24; Harland, 2000; Suzuki et al., 1997).

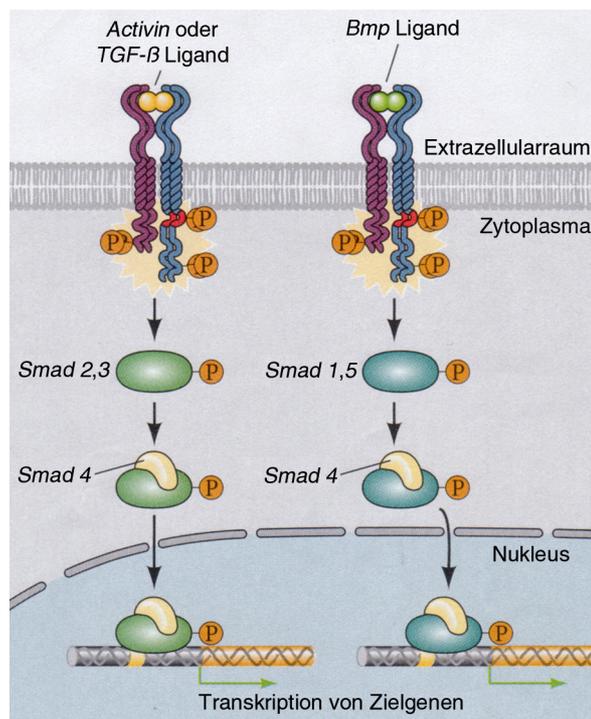


Abb. 5.4: TGF- β Signaltransduktion. Die Bindung des *Activin*-, *TGF- β* - oder *Bmp* Liganden an den Rezeptor vom Typ II (violett) löst die Dimerisierung mit dem Rezeptor vom Typ I (blau), dessen Phosphorylierung und somit Aktivierung aus. Der Typ I Rezeptor phosphoryliert die zyttoplasmatisch lokalisierten *Smad*-Proteine. Rezeptoren, die *Activin* oder *TGF- β* Moleküle binden, phosphorylieren die *Smads* 2 und 3, Rezeptoren, die *Bmp* Moleküle binden, phosphorylieren die *Smads* 1 und 5. Die phosphorylierten *Smad*-Proteine binden *Smad4* und bilden einen Transkriptionsfaktorkomplex, der in den Nukleus eintritt und die Transkription der jeweiligen Zielgene steuert. Nach Gilbert, 2000.

Im Bereich der *DD1* des *Xdach1*-Proteins besteht Sequenzhomologie zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno*, die beide als Inhibitoren von Signaltransduktionskaskaden charakterisiert worden sind, die durch Mitglieder der *TGF- β* -Familie von Signalmolekülen induziert werden (Amaravadi et al., 1997; Luo, 2004). Bei Überexpression von *Xski*, dem *Ski*-Homolog aus *Xenopus laevis*, in animalen Gewebeexplantaten kommt es analog zu den Beobachtungen für *Xdach1*-B zur Neuralisierung des Gewebes und andererseits zur Repression von Markergenen epidermaler Differenzierungsprozesse (Wang et al., 2000). Als Ursache wurden eine direkte

Interaktion des *Ski*-Proteins mit Mitgliedern der *Smad*-Familie von Transkriptionsfaktoren, die Teil des *TGF- β* -Signaltransduktionsapparates sind (s. Abb. 5.4), und die Rekrutierung von Ko-Repressoren wie *N-CoR* zum so gebildeten nukleären Komplex ermittelt (Luo et al., 1999; Wang et al., 2000). Neben *Smad1* und *Smad5*, die im Zuge einer *Bmp* induzierten Signaltransduktionskaskade phosphoryliert und somit aktiviert werden, werden auch *Smad2* sowie *Smad3*, Teil einer *Activin* oder *TGF- β* induzierten Signaltransduktion, und das sogenannte *Ko-Smad*, *Smad4*, durch *Ski* gebunden und die Aktivierung von Zielgenen durch die Bildung eines Repressorkomplexes unter Ausschluss von Ko-Aktivatoren wie *p300* verhindert (Akiyoshi et al., 1999; Sun et al., 1999).

Tatsächlich konnte auch für *Dach1* eine inhibitorische Funktion der *TGF- β* induzierten Signaltransduktionskaskade nachgewiesen werden (Wu et al., 2003). Durch eine Expression von *Dach1* kam es, vergleichbar mit den hier in animalen Gewebeexplantaten von *Xenopus laevis* gemachten Beobachtungen, zur Repression einer *TGF- β* -vermittelten Aktivierung von geeigneten Reporterkonstrukten. Dabei ist der Bereich des Proteins mit Homologie zu den Proto-Onkogenen *Ski* und *Sno*, die *DD1*, essentiell. Ein ebenso negativer regulatorischer Effekt des *Dach1*-Proteins ergibt sich bei Aktivierung von *TGF- β* Reporterkonstrukten durch Mitglieder der *Smad*-Proteinfamilie (*Smad2*, *Smad3*, *Smad4*). Wiederum ist die *DD1* in diesem Zusammenhang unerlässlich. In Übereinstimmung damit konnte weiter gezeigt werden, dass es, analog zu den bezüglich *Ski* erhaltenen Ergebnissen, zur direkten Interaktion von *Dach1* mit *Smad*-Proteinen sowie einer *Dach1*-vermittelten Rekrutierung von Ko-Repressoren wie *N-CoR* über die *DD1* und *Sin3A* über die *DD2* zum neu gebildeten Komplex kommt. Dies hat die Repression von Zielgenen der *TGF- β* -Signaltransduktionskaskade anstelle einer Aktivierung zur Folge. Dabei werden sowohl hinsichtlich des eingesetzten Morphogens spezifische *Smads* (*Smad2* und *Smad3* sind Teil der durch *TGF- β* und *Activin* induzierten Signaltransduktion) als auch das *Ko-Smad*, *Smad4*, durch *Dach1* gebunden. *Smad4* ist für die Ausbildung des beschriebenen Repressorkomplexes unerlässlich, da die Repression der Reporter-Gen-Aktivität in Abwesenheit von *Smad4* fehlschlägt (Wu et al., 2003).

Auch das im Zuge einer *Bmp*-vermittelten Signaltransduktion phosphorylierte *Smad1* wird von *Dach1* gebunden und so Teil eines multimeren Repressorkomplexes aus u.a. *Smad4* und dem Ko-Repressor *Sin3A*. Verantwortlich dafür, wie auch für die Bindung von *Smad4* und *Sin3A*, ist die *DD2* von *Dach1* (Wu et al., 2003), die auch mit Protein-Wechselwirkungen zwischen *Dachshund*- und *Eyes absent*-Proteinen in Verbindung gebracht worden ist (Chen et al., 1997; Heanue et al., 1999). Wie schon weiter oben als Ursache des zwischen *Msix6* und *Xdach1* beobachteten Synergismus beschrieben, ergibt sich für das *Dachshund*-Protein somit auch im Zusammenhang mit der *TGF- β* -Signaltransduktion eine Repressor-Funktion. Diese ist in der Rekrutierung von Ko-Repressormolekülen und der Bildung von multimeren Kernkomplexen begründet, die die Transkription von Zielgenen, hier des *Xbmp4*-Zielgens *Xmsx1*, verhindern.

Neben der durch Überexpression des *Xdach1*-Proteins hervorgerufenen Neuralisierung des *Xenopus laevis* Embryos als Folge der Inhibition der durch *Xbmp4* induzierten Signaltransduktion führt ein Funktionsverlust durch Morpholino-Injektion u.a. zu Defekten in der Musterbildung und Organogenese des Auges (s. Kapitel 4.20). Die dabei gemachten Beobachtungen sind denen einer gezielten Überexpression des Morphogens *Xbmp4* in Zellen des Augenprimordiums ähnlich (Sasagawa et al., 2002). *Xbmp4* wird innerhalb der Retina spezifisch von Zellen des distal gelegenen, dorsalen Augenbecherrands exprimiert, *Xdach1* kann innerhalb des distalen optischen Vesikels und später im Bereich der Ganglionzellschicht der neuralen Retina detektiert werden (s. Kapitel 4.17, 4.24).

Ein Verlust der Funktion des *Xdach1*-Proteins resultiert in einem Verlust proximalen retinalen Gewebes. Dies ist durch eine Reduktion bzw. das Fehlen eines optischen Stiels, mit einhergehender Reduktion entsprechender Markergene wie *Xvax2*, und ausgedehnte Expression von Markergenen distalen retinalen Gewebes wie *Xpax6* und insbesondere *Xrx1* gekennzeichnet (s. Kapitel 4.20). Vergleichbares, nämlich eine Reduktion der *Xvax2*- und eine Verstärkung bzw. Ausdehnung der *Xpax6*-Expression, tritt als Folge der *Xbmp4*-Überexpression innerhalb retinalen Gewebes auf (Sasagawa et al., 2002). Die fehlerhafte Verbindung zwischen Diencephalon und Retina ist in Fällen des *Xdach1*-Funktionsverlustes und der *Xbmp4*-Überexpression zusätzlich durch eine Ausdehnung Retinalen Pigmentepithels nach proximal gekennzeichnet, was den distalen Charakter der beobachteten retinalen Phänotypen unterstreicht. Dass es bei starker Ausprägung von Phänotypen des *Xdach1*-Funktionsverlustes zur Reduktion von Linsengewebe kommt, kann durch das Ausbleiben der Interaktion zwischen Linsenektoderm und dem in diesem Fall sich abnormal entwickelnden optischen Vesikel erklärt werden. Wechselwirkungen zwischen prospektivem retinalen- und Linsengewebe sind für die Entwicklung und Musterbildung beider Strukturen unerlässlich (Henry und Grainger, 1990). Die beobachteten Defekte in der Musterbildung retinalen Gewebes nach Funktionsverlust von *Xdach1* können so zum Teil auch das Resultat dieser unterbliebenen Wechselwirkung, als Resultat der fehlerhaften Evagination des optischen Vesikels, darstellen. Auswirkungen des *Xdach1*-Funktionsverlustes auf die dorsoventrale Musterbildung der Retina sind, wiederum vergleichbar mit Effekten einer *Xbmp4*-Überexpression, ebenso denkbar. So kommt es zum Verlust der innerhalb des optischen Vesikels ventral lokalisierten *Xvax2*-Expression. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um einen sekundären Effekt als Auswirkung der fehlerhaften Evagination des optischen Vesikels handelt.

Bezüglich der Augenentwicklung von *Xenopus laevis* legt dies nahe, dass *Xdach1* in diesem *in vivo* Kontext durch Inhibition bzw. Modifikation der von *Xbmp4* vermittelten Signaltransduktion zur Musterbildung in proximodistaler und eventuell auch dorsoventraler Orientierung beiträgt.

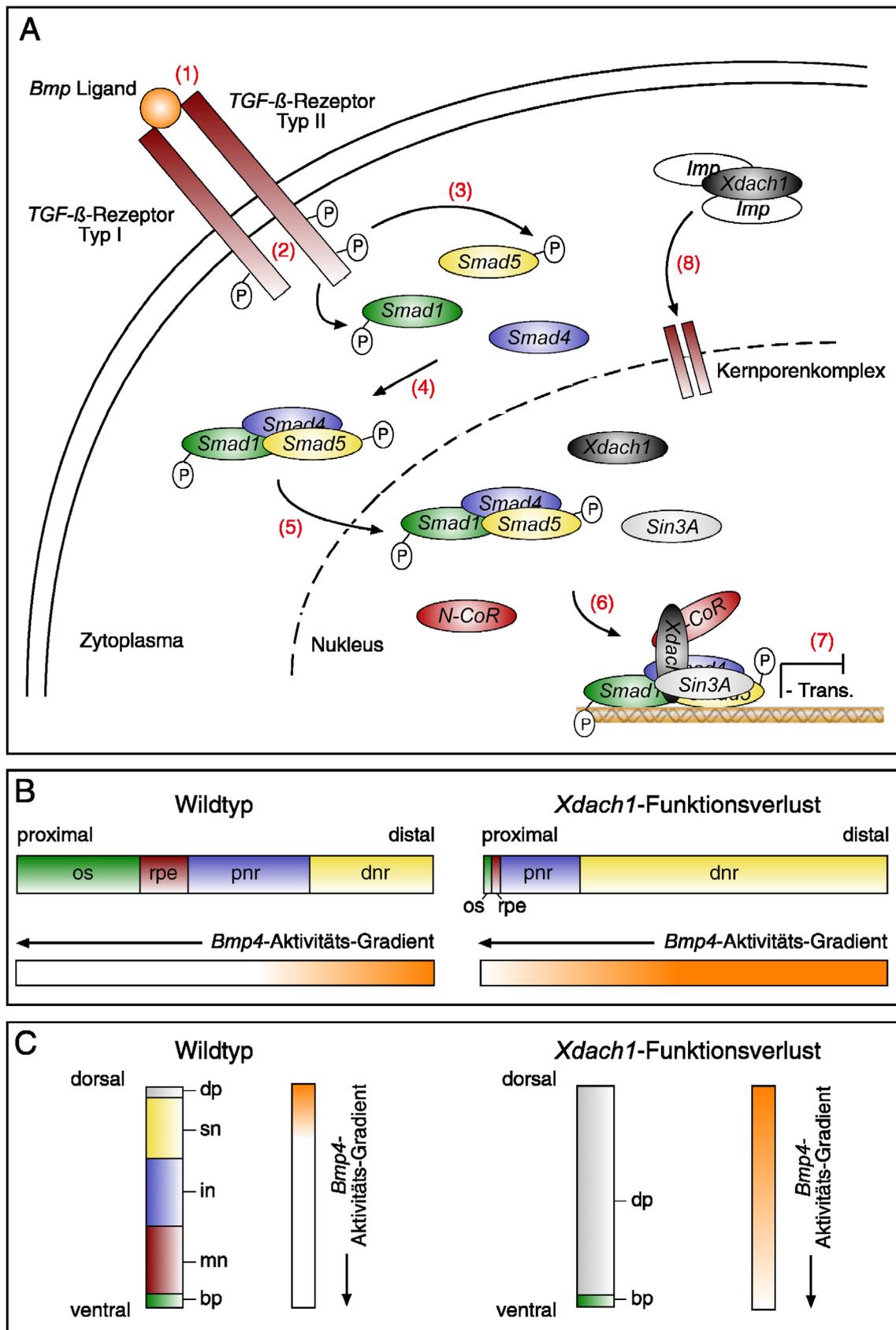


Abb. 5.5: Modell der Wirkungsweise von *Xdach1* als Antagonist der *Bmp*-Signaltransduktion. (A) Repression von Zielgenen der *Bmp*-Signaltransduktion durch *Xdach1*-vermittelte Rekrutierung von Ko-Repressormolekülen. Durch Bindung des *Bmp* Liganden an den *TGF-β*-Rezeptor vom Typ I (1) kommt es

zur Dimerisierung mit dem *TGF- β* -Rezeptor Typ II und dessen Phosphorylierung durch den *TGF- β* -Rezeptor Typ I (2). Der *TGF- β* -Rezeptor Typ II phosphoryliert seinerseits die zytoplasmatischen *Smads 1* und *5* (3), die nach ihrer Aktivierung durch Phosphorylierung zusammen mit *Smad4* einen Komplex bilden (4) und in den Zellkern eintreten (5). Ist nukleär lokalisiertes *Xdach1* vorhanden, kommt es durch *Xdach1*-vermittelte Rekrutierung von Ko-Repressormolekülen wie *N-CoR* und *Sin3A* zum *Smad*-Komplex zur Bildung eines multimeren transkriptionellen Repressorkomplexes (6). Dieser unterdrückt die Transkription (-Trans.) von *Bmp*-Zielgenen (7). In Abwesenheit des *Xdach1*-Proteins werden diese durch die *Bmp*-induzierte Signaltransduktion in ihrer Transkription aktiviert (s. Abb. 5.4). (8) Die Translokation des *Xdach1*-Proteins in den Nukleus erfolgt sehr wahrscheinlich über einen Kernrezeptor-vermittelten Transport unter Verwendung ubiquitär vorhandener Importfaktoren (Imp). **(B)** Proximodistale Musterbildung während der Augenentwicklung unter Funktionsverlust von *Xdach1*. Die bezüglich der Augenentwicklung gemachten Beobachtungen des Verlustes proximaler Strukturen wie optischem Stiel (os) und Retinalem Pigmentepithel (rpe) können Folge einer räumlich ausgedehnten *Bmp4*-Aktivität sein, die die Ausbildung distaler Strukturen propagiert; dnr, distale neurale Retina; pnr, proximale neurale Retina. **(C)** Inhibition neuraler Differenzierung und dorsoventrale Musterbildung im Hinterhirn unter Funktionsverlust von *Xdach1*. Die durch *Xdach1*-Funktionsverlust möglicherweise nach ventral ausgedehnte *Bmp4*-Aktivität stimuliert die Differenzierung ektodermaler, epidermaler Zellen der Dachplatte (dp) auf Kosten neuraler Differenzierung; bp, Bodenplatte; in, Interneurone; mn, Motorneurone; sn, sensorische Neurone.

Im Unterschied zu den Verhältnissen während der Augenentwicklung, wo es trotz fehlerhafter Musterbildung zu Zelldifferenzierungsprozessen kommt, bleiben neurale Differenzierungsprozesse innerhalb des zentralen Nervensystems nach Funktionsverlust von *Xdach1* aus. Dies zeigt sich zum einen durch den Verlust der Expression von Markergenen mit Expression in Vorläuferzellen (*Xpax3*) sowie differenzierten Neuronen (*N-Tubulin*), zum anderen durch eine bei Vergleich mit neuronalen Zellen der nicht betroffenen Hirnhälfte deutlich veränderte Zellmorphologie, die ein anderes Zellschicksal vermuten lässt (s. Kapitel 4.21). Ähnlich dem Augenesikel wird *Xbmp4* auch innerhalb des Hinterhirns bzw. des Neuralrohres räumlich begrenzt exprimiert, in diesem Fall dorsal von Zellen der Dachplatte (s. Kapitel 4.24). Ventral davon gelegen schließt sich die Expressionsdomäne von *Xdach1* im dorsalen Hinterhirn bzw. Neuralrohr an.

In Experimenten im Hühnerembryo konnte gezeigt werden, dass eine Verstärkung der *Bmp*-vermittelten Signaltransduktion innerhalb des Hinterhirns durch konstitutiv aktive *Bmp*-Zellmembranrezeptoren oder die Überexpression des *Bmp*-Zielgens *Msx1* eine Differenzierung neuraler Zelltypen des Hinterhirns verhindert (Liu et al., 2004). Als eine Ursache dafür konnte die Repression von Genen identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Regulation neuraler Differenzierungsprozesse stehen. Dies ist in der vorliegenden Arbeit auch im Hinterhirn von *Xenopus laevis* nach Funktionsverlust von *Xdach1* beobachtet worden (s. Kapitel

4.21). Des Weiteren wurde im Hühnerembyro eine Ausbreitung der Expression von Markergenen spezifisch für Zellen der Dachplatte, wie z.B. *Bmp4* selbst, in ventrale Bereiche des Hinterhirns beobachtet. Unter dem Einfluss einer funktionellen Überexpression von *Bmp* nehmen somit putative Neurone ein nicht-neurales, ektodermales Schicksal an. Durch Wegnahme der *Xbmp4*-antagonistischen Funktion von *Xdach1* im Zuge der hier durchgeführten Funktionsverlustanalysen kommt es in *Xenopus laevis* möglicherweise zu einem vergleichbaren Prozess, da das parakrin sezernierte Morphogen *Xbmp4* einen der Antagonisten seiner Signaltransduktionskaskade verliert. Funktionell entspricht dies einer Steigerung seiner Aktivität innerhalb seines räumlichen Wirkungsspektrums. Die Tatsache, dass für *Xbmp4* die Möglichkeit einer positiven Autoregulation über durch seine Signaltransduktionskaskade induzierte Faktoren besteht (Schuler-Metz et al., 2000), lässt vermuten, dass der Verlust des vor allem dorsal agierenden Antagonisten *Xdach1* dies neben einer Aktivierung von *Xbmp4*-Zielgenen weiter unterstützt. Somit könnte die beobachtete Inhibition neuraler Differenzierung innerhalb des Hinterhirns von *Xenopus laevis* neben der Aktivierung von *Xbmp4*-Zielgenen, wie etwa *Xmsx1*, zusätzlich durch eine Verstärkung des *Xbmp4*-Signals im Zuge seiner Autoregulation begründet sein. Dies würde zu einer Ausbreitung von *Xbmp4*-sezernierenden Zellen über die dorsoventrale Achse des Hinterhirns und in der Folge zur Inhibition von Prozessen der sekundären Neurogenese führen.

Ein Aspekt der *Xdach1*-Funktion ist somit die Inhibition oder Modifizierung von durch *Xbmp4* vermittelten Signalen, was sowohl im Zusammenhang mit der Augenentwicklung als auch der Bildung von Bereichen des zentralen Nervensystems wesentlich zur Musterbildung der entsprechenden Organe beiträgt. Für *Dachshund1* sind Interaktionen mit einer Vielzahl von Mitgliedern der *Smad*-Familie von Transkriptionsfaktoren als Teil der *TGF- β* induzierten Signaltransduktion nachgewiesen worden (Kida et al., 2004; Wu et al., 2003). Da bezüglich der im Verlauf der Signaltransduktion rekrutierten *Smads* zwischen den Mitgliedern der *TGF- β* -Familie definierte Unterschiede bestehen, ergeben sich somit bezüglich des *Dachshund1*-Proteins sehr wahrscheinlich eine Vielzahl an Funktionen, die sich z.B. auch auf mesodermale Entwicklungsprozesse, z.T. durch die Aktivität des Morphogens *Activin* gesteuert, ausdehnen. Ein Modell der Wirkungsweise von *Xdach1* als Antagonist der *Bmp*-Signaltransduktion sowie der Auswirkungen eines *Xdach1*-Funktionsverlustes auf die Entwicklung des Auges und Hinterhirns sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

5.12 Ausblick

Für die Zukunft ergeben sich aus der vorgestellten Arbeit eine Reihe weiterer Experimente. Um mögliche Interaktionspartner von *Xeya3* zu identifizieren, sind zunächst zwei experimentelle Ansätze denkbar. (1) Durch einen Yeast-Two-Hybrid-Screen unter Verwendung des vollständigen *Xeya3*-Proteins und einer entsprechenden Yeast-Two-Hybrid-Bibliothek wäre es

möglich, direkte Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu untersuchen. (2) In einem Expressionsscreen in *Xenopus laevis* könnten zudem Proteine identifiziert werden, die zusammen mit *Xeya3* synergistisch wirken. Nach (1) und (2) identifizierte Klone könnten anschließend mit der jeweils anderen Strategie auf eine tatsächliche direkte physikalische Interaktion bzw. auf die Ausbildung synergistischer Effekte getestet werden. Außerdem sollte versucht werden, im Hefe-System beobachtete physikalische Interaktionen auch in *Xenopus laevis* mit Hilfe von Ko-Immünpräzipitationen darzustellen. Dazu werden synthetische mRNAs für Flag- bzw. *c-myc*-Epitop tragende Proteine in *Xenopus laevis* Embryonen ko-injiziert, der mögliche Komplex mit Hilfe eines Flag- oder *c-myc*-spezifischen Antikörpers extrahiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Ein diesbezüglich weiterführender Ansatz wäre die statistische Immünpräzipitation von Proteinen, die mit *Xeya3* interagieren, und deren Identifikation mittels 2-D Gelelektrophorese und massenspektroskopischer Analyse (MALDI-TOF).

Die durch den Yeast-Two-Hybrid- und Expressionsscreen bzw. durch Ko-Immünpräzipitationen erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich Wechselwirkungen zwischen *Xeya3* und anderen Proteinen sollten dann mit Blick auf die *Xeya3*-Primärstruktur weitergehend untersucht werden. So können zunächst *Xeya3*-Deletionskonstrukte bezüglich der „Eya“- oder „PST“-Domäne hergestellt werden und in den oben beschriebenen Experimenten getestet werden. Bestehende physikalische Interaktionen mitsamt einer möglichen Funktion *in vivo* könnten so bestimmten Abschnitten des *Xeya3*-Proteins zugeordnet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Phosphatase-Mutanten können ebenso in der beschriebenen Art und Weise getestet werden, um zu erkennen, ob die Phosphatase-Aktivität die Identität der Interaktionspartner beeinflusst.

Weitergehende Fragestellungen ergeben sich auch im Hinblick auf die Regulation der *Xeya3*-Expression. Mit Hilfe des in naher Zukunft vollständig sequenzierten Genoms des nahe verwandten *Xenopus tropicalis* werden Promoterbereiche des *Eya3*-Gens zugänglich sein. Durch Vergleich der potentiellen Promotersequenzen von *Xeya3* mit denen anderer Spezies wie Mensch, Maus und Zebrafisch können möglicherweise evolutionär konservierte Bereiche kartiert werden. Durch Herstellung von Reporterkonstrukten, bestehend aus dem *Xeya3*-Promoter als cis-regulatorischem Element und dem offenen Leserahmen des Green-Fluorescent-Protein (GFP), könnten entsprechend transgene Tiere erzeugt werden. Durch den Einsatz von Deletionskonstrukten hinsichtlich konservierter Promoterbereiche bei der Erzeugung transgener Tiere können so bestimmte Promoterregionen, die für die räumliche wie auch zeitliche Steuerung der *Xeya3*-Expression unerlässlich sind, identifiziert werden. Weiterhin kann durch computergestützte Analysen versucht werden, dem gesamten bzw. Abschnitten des *Xeya3*-Promoters bekannte trans-regulatorische Faktoren zuzuordnen. Mittels ChIP (Chromatin Immunpräzipitation) können so erhaltene Kandidaten auf eine tatsächliche Interaktion mit der Promotersequenz des *Xeya3*-Gens getestet werden.

Mit Hilfe des Systems der animalen Gewebeexplantate aus *Xenopus laevis* Embryonen und einer nachgeschalteten Transkriptom-Analyse durch Microarrays könnten potentielle Zielgene von *Xeya3* identifiziert werden. Durch Einsatz verschiedener *Xeya3*-Mutanten könnten hierbei wiederum funktionsrelevante Bereiche des Proteins bestimmt werden.

Wie beschrieben induziert *Xeya3* eine Neoplasie neuralen Gewebes bzw. aktiviert das apoptotische Programm bei Funktionsverlust. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu erfahren, ob *Eya3* oder Mitglieder der *Eya*-Familie auch an der Entstehung neuro-ektodermaler Tumore beteiligt sind. Eine Veränderung der *Eya3*-Aktivität könnte sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch auf Proteinebene erfolgen. Zu diesem Zweck könnten entsprechende Gewebeproben zunächst mit Hilfe der quantitativen RT-PCR auf eine Veränderung der *Eya3*-Transkription hin untersucht werden. Werden hier Unterschiede zu gesundem Gewebe festgestellt, könnte versucht werden, eventuelle Mutationen innerhalb cis-regulatorischer Promoterelemente des jeweiligen *Eya3*-Gens zu bestimmen. Außerdem könnte *Eya3* auf Veränderungen seiner Primärstruktur als Ursache für die Bildung von Tumoren untersucht werden. Besonderer Augenmerk sollte dabei auf den Bereich der Phosphatase-Domäne gelegt werden, da diese, wie in dieser Arbeit gezeigt, mit einer Kontrolle der Aktivität des Proteins in Verbindung steht. Mutationen, die möglicherweise eine Verringerung oder den Verlust der Phosphatase-Aktivität zur Folge haben, können nach Klonierung des entsprechenden Allels im *in vitro* Test unter Verwendung des Substrates p-Nitrophenylphosphat (pNPP) auf ihre Phosphatase-Aktivität hin untersucht werden.

Durch eine weitergehende „*WMISH*“-Analyse der Funktionsverlust-Phänotypen von *Xdach1* sollen detailliertere Ergebnisse hinsichtlich des Charakters der Zellen innerhalb der betroffenen neuralen Gewebe wie Gehirn und Retina erhalten werden. Bezüglich des Gehirns könnten hierbei vor allem Markergene einer aktiven *TGF- β* -Signaltransduktion, wie beispielsweise *Xmsx1* und weitere bekannte *TGF- β* -Zielgene, zum Einsatz kommen, um die Expansion der *Bmp*-Aktivität nach ventral zu verifizieren. In retinalem Gewebe können neben einer „*WMISH*“- mit weiteren, in spezifischen Bereichen exprimierten Markergenen außerdem Immunfärbungen an Paraffinschnitten mit zelltypspezifischen Antikörpern durchgeführt werden, um Aussagen über den Verlust oder auch eine besondere Anhäufung bestimmter retinaler Zelltypen zu treffen. In diesem Zusammenhang sollen zusätzlich Lipofektionen sowohl des *Xdach1*-Morpholinos als auch von synthetischer *Xdach1*-mRNA in retinale Vorläuferzellen der optischen Vesikel zum Zeitpunkt verschiedener Entwicklungsstadien des Auges durchgeführt werden. In Kombination mit der „*WMISH*“- und proteinchemischen-Analyse könnte so untersucht werden, welchen Einfluss *Xdach1* auf das Differenzierungsverhalten retinaler Vorläuferzellen hat.

Zur Umgehung der durch eine Mikroinjektion synthetischer mRNA hervorgerufenen starken Neuralisierung zu Zeitpunkten, an denen noch keine endogene Expression von *Xdach1* besteht, kann neben dem angesprochenen Verfahren der Lipofektion synthetische mRNA für

Glucocorticoid-Rezeptor-Konstrukte von *Xdach1* in Mikroinjektionsexperimenten verwendet werden. Deren Translationsbeginn lässt sich durch eine Zugabe von Dexamethason in das Kulturmedium zum gewünschten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung steuern. Im Fall von *Xdach1* wäre dies zum Ende der Neurulation. So können möglicherweise Phänotypen eines Funktionsgewinns von *Xdach1* erhalten werden, die im Falle der hier durchgeführten Überexpressionsstudien durch die starke Neuralisierung im Zuge der Inhibition der *Xbmp4*-vermittelten Signaltransduktion überlagert werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch die Signalwege anderer Mitglieder der *Bmp*- bzw. *TGF-β*-Familie durch eine Überexpression von *Xdach1 in vivo* betroffen sind. Dazu werden Experimente in animalen Gewebeexplantaten aus *Xenopus laevis* unter Verwendung von *Xdach1* und Faktoren wie beispielsweise *Activin* oder *TGF-β* und entsprechend ausgewählten, spezifischen Zielgenen durchgeführt. Durch Ko-Injektion von *Xdach1* und Mitgliedern der *TGF-β*-Familie sowie die anschließende Analyse der Transkription der angesprochenen Zielgene im Zuge einer RT-PCR können so, wie hier im Falle von *Xbmp4* gezeigt, eventuelle negative Effekte von *Xdach1* herausgearbeitet werden.

Zur Identifikation möglicher Interaktionspartner von *Xdach1* soll wie für *Xeya3* weiter oben beschrieben verfahren werden (Yeast-Two-Hybrid- und Expressionsscreen, Ko-Immunpräzipitationen). Im Zusammenhang damit werden auch Deletionskonstrukte bezüglich der beiden konservierten *Dachshund*-Domänen getestet. Dadurch soll versucht werden, die einzelnen Bereiche des Proteins z.B. mit Hinblick auf ihren Beitrag zur Bindung möglicher Interaktionspartner genauer zu charakterisieren.

6. Zusammenfassung

Xeya3 aus *Xenopus laevis* ist als Mitglied der *Eya*-Familie von Proteinen durch eine hochkonservierte C-terminal gelegene „*Eya*“-Domäne und eine im Vergleich mit anderen Familienmitgliedern in ihrer Primärstruktur variable, Prolin-, Serin und Threonin reiche, N-terminale „PST“-Domäne gekennzeichnet. Transkripte von *Xeya3* können bereits während der Oogenese detektiert werden. Im reifen Ei und in Blastulastadien ist die *Xeya3*-mRNA in der animalen Hemisphäre lokalisiert. Nach Beginn der zygotischen Transkription beschränkt sich die *Xeya3*-Expression auf Gewebe anterioren neuralen Charakters wie Hirn- und Augenanlage und bleibt dort bis zum Beginn von Zelldifferenzierungsprozessen bestehen. Zellen der Linsenplakode, primäre Linsenfasern und Zellen der cranialen Neuralleiste exprimieren ebenfalls *Xeya3*. Ein Funktionsverlust von *Xeya3* führt zum vollständigen Verlust des Auges inklusive der Linse sowie der betroffenen Hirnhälfte. Ursache dafür sind die Apoptose neuraler Vorläuferzellen sowie Defekte in der Ausbildung präsumtiven Linsengewebes. Komplementär dazu hat die Überexpression von *Xeya3* eine starke Neoplasie anterioren neuralen Gewebes wie Gehirn und Retina zur Folge. Neben einer Hyperproliferation neuraler Vorläuferzellen trägt die Ausbildung weiterer Zentren sekundärer Neurogenese in Form zusätzlicher Gehirnventrikel zum beobachteten Phänotyp bei. Durch Überexpression von *Xeya3* kommt es zudem zur Vergrößerung von Gewebe im Bereich cranialen Neuralleistengewebes. Die Inaktivierung einer im Bereich der „*Eya*“-Domäne lokalisierten Phosphatase-Aktivität führt zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des *Xeya3*-Proteins. Möglicherweise besitzt die Phosphatase-Aktivität des *Xeya3*-Proteins autoregulatorische Funktionen.

Xdach1 aus *Xenopus laevis* besitzt als Mitglied der *Dachshund*-Familie zwei konservierte Domänen, die *Dachshund* Domäne 1 (*DD1*) und 2 (*DD2*). Gegen Ende der Neurulation wird *Xdach1* von Zellen des optischen Vesikels sowie des zukünftigen dorsalen Hinterhirns exprimiert. In frühen Kaulquappenstadien zeigen neben neuraler Retina und Bereichen des Gehirns auch mesodermale Derivate wie die Nierenanlage und Muskelvorläuferzellen Expression von *Xdach1*. Die Überexpression von *Xdach1* hat stark neuralisierende Effekte, die eine Folge der Inhibition der durch *Xbmp4* vermittelten Signaltransduktion sind. Ein Funktionsverlust von *Xdach1* führt zur fehlerhaften Musterbildung retinalen Gewebes in proximodistaler Orientierung, die durch das Fehlen eines optischen Stiels sowie die Expansion distal exprimierter Markergene nach proximal gekennzeichnet ist. In Bereichen des zukünftigen Gehirns verhindert der *Xdach1*-Funktionsverlust den Prozess der Neurogenese. Als Grund für die beobachteten Funktionsverlust-Phänotypen kann eine Ausdehnung des Einflussbereiches des Morphogens *Xbmp4* samt seiner nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade angeführt werden. *Xdach1* und *Six6* steuern im Verlauf der Embryogenese von *Xenopus laevis* die

Entwicklung retinalen Gewebes. Gemeinsam zugeführte, geringe Mengen an Protein führen zu positiven synergistischen Effekten im Sinne eines starken Größenzuwachses der Retina.

7. Literaturverzeichnis

- Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud, C., Sahly, I., Leibovici, M., Bitner-Glindzicz, M., Francis, M., Lacombe, D., Vigneron, J., Charachon, R., Boven, K., Bedbeder, P., Van Regemorter, N., Weissenbach, J. und Petit, C. (1997) A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet*, **15**, 157-164.
- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, 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.
- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K. und Kawabata, M. (1999) c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem*, **274**, 35269-35277.
- 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.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Amaravadi, L.S., Neff, A.W., Sleeman, J.P. und Smith, R.C. (1997) Autonomous neural axis formation by ectopic expression of the protooncogene c-ski. *Dev Biol*, **192**, 392-404.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Andrejewski, N. und Gruss, P. (2001) Unraveling the multiple functions of Pax6 in eye development by conditional mutagenesis. *MPIbpc News*, **7**, 1-6.
- Azuma, N., Hirakiyama, A., Inoue, T., Asaka, A. und Yamada, M. (2000) Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (*EYA1*) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum Mol Genet*, **9**, 363-366.
- 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.
- Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C. und Pieler, T. (1996) X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell*, **87**, 1191-1202.

- 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.
- Blom, N., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, **294**, 1351-1362.
- Bonini, N.M., Bui, Q.T., Gray-Board, G.L. und Warrick, J.M. (1997) The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development*, **124**, 4819-4826.
- Bonini, N.M., Leiserson, W.M. und Benzer, S. (1993) The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell*, **72**, 379-395.
- Borsani, G., DeGrandi, A., Ballabio, A., Bulfone, A., Bernard, L., Banfi, S., Gattuso, C., Mariani, M., Dixon, M., Donnai, D., Metcalfe, K., Winter, R., Robertson, M., Axton, R., Brown, A., van Heyningen, V. und Hanson, I. (1999) EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. *Hum Mol Genet*, **8**, 11-23.
- 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.
- Briscoe, J. und Ericson, J. (1999) The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 353-362.
- Bullock W.O., Fernandez J.M. und Short J.M. (1987) *Biotechniques*, **5**, 376-379.
- Cadigan, K.M. und Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**, 3286-3305.
- Casarosa, S., Andreazzoli, M., Simeone, A. und Barsacchi, G. (1997) Xrx1, a novel *Xenopus* homeobox gene expressed during eye and pineal gland development. *Mech Dev*, **61**, 187-198.
- Caubit, X., Thangarajah, R., Theil, T., Wirth, J., Nothwang, H.G., Ruther, U. und Krauss, S. (1999) Mouse Dac, a novel nuclear factor with homology to *Drosophila* dachshund shows a dynamic expression in the neural crest, the eye, the neocortex, and the limb bud. *Dev Dyn*, **214**, 66-80.
- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z. und Mardon, G. (1997) Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell*, **91**, 893-903.
- 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.
- Chitnis, A. und Kintner, C. (1996) Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development*, **122**, 2295-2301.

- 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.
- Cox, W.G. und Hemmati-Brivanlou, A. (1995) Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development*, **121**, 4349-4358.
- David, R., Ahrens, K., Wedlich, D. und Schlosser, G. (2001) *Xenopus* Eya1 demarcates all neurogenic placodes as well as migrating hypaxial muscle precursors. *Mech Dev*, **103**, 189-192.
- Davidson, L.A. und Keller, R.E. (1999) Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development*, **126**, 4547-4556.
- Davis, R.J., Shen, W., Heanue, T.A. und Mardon, G. (1999) Mouse Dach, a homologue of *Drosophila dachshund*, is expressed in the developing retina, brain and limbs. *Dev Genes Evol*, **209**, 526-536.
- Davis, R.J., Shen, W., Sandler, Y.I., Amoui, M., Purcell, P., Maas, R., Ou, C.N., Vogel, H., Beaudet, A.L. und Mardon, G. (2001a) Dach1 mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb, and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol Cell Biol*, **21**, 1484-1490.
- Davis, R.J., Shen, W., Sandler, Y.I., Heanue, T.A. und Mardon, G. (2001b) Characterization of mouse Dach2, a homologue of *Drosophila dachshund*. *Mech Dev*, **102**, 169-179.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4008.
- Duncan, M.K., Kos, L., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. und Tomarev, S.I. (1997) Eyes absent: a gene family found in several metazoan phyla. *Mamm Genome*, **8**, 479-485.
- Ekker, S.C., Ungar, A.R., Greenstein, P., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Moon, R.T. und Beachy, P.A. (1995) Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol*, **5**, 944-955.
- Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H. und Blum, M. (1997) The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev*, **63**, 39-50.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K. und Bairoch, A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res*, **30**, 235-238.
- Fujiwara, M., Uchida, T., Osumi-Yamashita, N. und Eto, K. (1994) Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation*, **57**, 31-38.
- George, D.G., Barker, W.C. und Hunt, L.T. (1990) Mutation data matrix and its uses. *Methods Enzymol*, **183**, 333-351.

- Ghanbari, H., Seo, H.C., Fjose, A. und Brandli, A.W. (2001) Molecular cloning and embryonic expression of Xenopus Six homeobox genes. *Mech Dev*, **101**, 271-277.
- Gilbert, S. (2000) *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J.G., Young, S.R., Favor, J. und Maas, R.L. (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet*, **7**, 463-471.
- Glaser, T., Walton, D.S. und Maas, R.L. (1992) Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet*, **2**, 232-239.
- 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.
- 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.
- Hammond, K.L., Hanson, I.M., Brown, A.G., Lettice, L.A. und Hill, R.E. (1998) Mammalian and Drosophila dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech Dev*, **74**, 121-131.
- Hammond, K.L., Hill, R.E., Whitfield, T.T. und Currie, P.D. (2002) Isolation of three zebrafish dachshund homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mech Dev*, **112**, 183-189.
- Hammond, K.L., Lettice, L.A., Hill, R.E., Lee, M., Boyle, S. und Hanson, I.M. (1999) Human (DACH) and mouse (Dach) homologues of Drosophila dachshund map to chromosomes 13q22 and 14E3, respectively. *Genomics*, **55**, 252-253.
- 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.
- Harland, R. (2000) Neural induction. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 357-362.
- Harland, R. und Gerhart, J. (1997) Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 611-667.
- Harris, W.A. und Hartenstein, V. (1991) Neuronal determination without cell division in Xenopus embryos. *Neuron*, **6**, 499-515.
- Heanue, T.A., Davis, R.J., Rowitch, D.H., Kispert, A., McMahon, A.P., Mardon, G. und Tabin, C.J. (2002) Dach1, a vertebrate homologue of Drosophila dachshund, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of Pax and Eya genes. *Mech Dev*, **111**, 75-87.

- Heanue, T.A., Reshef, R., Davis, R.J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A.B. und Tabin, C.J. (1999) Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev*, **13**, 3231-3243.
- 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.
- Henry, J.J. und Grainger, R.M. (1990) Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, **141**, 149-163.
- Hensey, C. und Gautier, J. (1998) Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Dev Biol*, **203**, 36-48.
- 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.
- Hisano, T., Hata, Y., Fujii, T., Liu, J.Q., Kurihara, T., Esaki, N. und Soda, K. (1996) Crystal structure of L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. An alpha/beta hydrolase structure that is different from the alpha/beta hydrolase fold. *J Biol Chem*, **271**, 20322-20330.
- Hogan, B.L., Hirst, E.M., Horsburgh, G. und Hetherington, C.M. (1988) Small eye (Sey): a mouse model for the genetic analysis of craniofacial abnormalities. *Development*, **103 Suppl**, 115-119.
- Holleman, T., Chen, Y., Grunz, H. und Pieler, T. (1998) Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling. *Embo J*, **17**, 7361-7372.
- Holowacz, T. und Sokol, S. (1999) FGF is required for posterior neural patterning but not for neural induction. *Dev Biol*, **205**, 296-308.
- Hsiao, F.C., Williams, A., Davies, E.L. und Rebay, I. (2001) Eyes absent mediates cross-talk between retinal determination genes and the receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Dev Cell*, **1**, 51-61.
- 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-alpha. *Nature*, **275**, 458-460.
- Jonas, E., Sargent, T.D. und Dawid, I.B. (1985) Epidermal keratin gene expressed in embryos of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5413-5417.

- Kida, Y., Maeda, Y., Shiraishi, T., Suzuki, T. und Ogura, T. (2004) Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development*, **131**, 4179-4187.
- Kiecker, C. und Niehrs, C. (2001) A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development*, **128**, 4189-4201.
- Knecht, A.K., Good, P.J., Dawid, I.B. und Harland, R.M. (1995) Dorsal-ventral patterning and differentiation of noggin-induced neural tissue in the absence of mesoderm. *Development*, **121**, 1927-1935.
- 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.
- Kozmik, Z., Pfeffer, P., Kralova, J., Paces, J., Paces, V., Kalousova, A. und Cvekl, A. (1999) Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the *Drosophila* dachshund gene. *Dev Genes Evol*, **209**, 537-545.
- Lamb, T.M. und Harland, R.M. (1995) Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development*, **121**, 3627-3636.
- Lamb, T.M., Knecht, A.K., Smith, W.C., Stachel, S.E., Economides, A.N., Stahl, N., Yancopolous, G.D. und Harland, R.M. (1993) Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science*, **262**, 713-718.
- 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, X., Oghi, K.A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K.T., Glass, C.K., Nigam, S.K., Aggarwal, A.K., Maas, R., Rose, D.W. und Rosenfeld, M.G. (2003) Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature*, **426**, 247-254.
- Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D.W. und Rosenfeld, M.G. (2002) Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science*, **297**, 1180-1183.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G. und Jessell, T.M. (1997) A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell*, **91**, 127-138.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. und Jessell, T.M. (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*, **82**, 969-979.

- Liu, Y., Helms, A.W. und Johnson, J.E. (2004) Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development. *Development*, **131**, 1017-1028.
- Liu, Y., Lupo, G., Marchitello, A., Gestri, G., He, R.Q., Banfi, S. und Barsacchi, G. (2001) Expression of the Xvax2 gene demarcates presumptive ventral telencephalon and specific visual structures in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, **100**, 115-118.
- Loosli, F., Mardon, G. und Wittbrodt, J. (2002) Cloning and expression of medaka Dachshund. *Mech Dev*, **112**, 203-206.
- Luo, K. (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 65-70.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. und Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev*, **13**, 2196-2206.
- Ma, Q., Kintner, C. und Anderson, D.J. (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell*, **87**, 43-52.
- Mardon, G., Solomon, N.M. und Rubin, G.M. (1994) dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development*, **120**, 3473-3486.
- Martini, S.R., Roman, G., Meuser, S., Mardon, G. und Davis, R.L. (2000) The retinal determination gene, dachshund, is required for mushroom body cell differentiation. *Development*, **127**, 2663-2672.
- 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.
- 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.
- Mishima, N. und Tomarev, S. (1998) Chicken Eyes absent 2 gene: isolation and expression pattern during development. *Int J Dev Biol*, **42**, 1109-1115.
- Munoz-Sanjuan, I. und Brivanlou, A.H. (2002) Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 271-280.
- 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.
- Nieuwkoop P.D., Faber P. (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2. Auflage, North-Holland Publ. Co., Amsterdam.

- Ohto, H., Kamada, S., Tago, K., Tominaga, S.I., Ozaki, H., Sato, S. und Kawakami, K. (1999) Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Mol Cell Biol*, **19**, 6815-6824.
- Oschwald, R., Richter, K. und Grunz, H. (1991) Localization of a nervous system-specific class II beta-tubulin gene in *Xenopus laevis* embryos by whole-mount in situ hybridization. *Int J Dev Biol*, **35**, 399-405.
- Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G. und Boncinelli, E. (1995) The *Xenopus* homologue of Otx2 is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development*, **121**, 707-720.
- 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.
- Papalopulu, N. und Kintner, C. (1993) *Xenopus* Distal-less related homeobox genes are expressed in the developing forebrain and are induced by planar signals. *Development*, **117**, 961-975.
- 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.
- Penzel, R., Oschwald, R., Chen, Y., Tacke, L. und Grunz, H. (1997) Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol*, **41**, 667-677.
- 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.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K.H., Xiao, J., Garrity, P.A. und Zipursky, S.L. (1997) The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell*, **91**, 881-891.
- Pommereit, D., Pieler, T. und Hollemann, T. (2001) Xpitx3: a member of the Rieg/Pitx gene family expressed during pituitary and lens formation in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, **102**, 255-257.
- Rayapureddi, J.P., Kattamuri, C., Steinmetz, B.D., Frankfort, B.J., Ostrin, E.J., Mardon, G. und Hegde, R.S. (2003) Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature*, **426**, 295-298.

- 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.
- Roux, K.H. (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl*, **4**, S185-194.
- Ruiz i Altaba, A. und Jessell, T. (1991a) Retinoic acid modifies mesodermal patterning in early *Xenopus* embryos. *Genes Dev*, **5**, 175-187.
- Ruiz i Altaba, A. und Jessell, T.M. (1991b) Retinoic acid modifies the pattern of cell differentiation in the central nervous system of neurula stage *Xenopus* embryos. *Development*, **112**, 945-958.
- 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.
- Sahly, I., Andermann, P. und Petit, C. (1999) The zebrafish *eyal* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Dev Genes Evol*, **209**, 399-410.
- Saka, Y. und Smith, J.C. (2001) Spatial and temporal patterns of cell division during early *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol*, **229**, 307-318.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sasagawa, S., Takabatake, T., Takabatake, Y., Muramatsu, T. und Takeshima, K. (2002) Axes establishment during eye morphogenesis in *Xenopus* by coordinate and antagonistic actions of BMP4, Shh, and RA. *Genesis*, **33**, 86-96.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. und De Robertis, E.M. (1995) Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature*, **376**, 333-336.
- Schuler-Metz, A., Knochel, S., Kaufmann, E. und Knochel, W. (2000) The homeodomain transcription factor *Xvent-2* mediates autocatalytic regulation of BMP-4 expression in *Xenopus* embryos. *J Biol Chem*, **275**, 34365-34374.
- Shen, W. und Mardon, G. (1997) Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed *dachshund* expression. *Development*, **124**, 45-52.
- Silver, S.J., Davies, E.L., Doyon, L. und Rebay, I. (2003) Functional dissection of eyes absent reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network. *Mol Cell Biol*, **23**, 5989-5999.
- 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.
- Spemann, H. und Mangold, H. (2001) Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol*, **45**, 13-38.

- Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F. und Weinberg, R.A. (1999) Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell*, **4**, 499-509.
- Suzuki, A., Ueno, N. und Hemmati-Brivanlou, A. (1997) Xenopus msx1 mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4. *Development*, **124**, 3037-3044.
- Tavsanlı, B.C., Ostrin, E.J., Burgess, H.K., Middlebrooks, B.W., Pham, T.A. und Mardon, G. (2004) Structure-function analysis of the Drosophila retinal determination protein Dachshund. *Dev Biol*, **272**, 231-247.
- Tootle, T.L., Silver, S.J., Davies, E.L., Newman, V., Latek, R.R., Mills, I.A., Selengut, J.D., Parlikar, B.E. und Rebay, I. (2003) The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature*, **426**, 299-302.
- Turner, D.L. und Weintraub, H. (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in Xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev*, **8**, 1434-1447.
- Vincent, C., Kalatzis, V., Abdelhak, S., Chaib, H., Compain, S., Helias, J., Vaneecloo, F.M. und Petit, C. (1997) BOR and BO syndromes are allelic defects of EYA1. *Eur J Hum Genet*, **5**, 242-246.
- Wang, W., Cho, H.S., Kim, R., Jancarik, J., Yokota, H., Nguyen, H.H., Grigoriev, I.V., Wemmer, D.E. und Kim, S.H. (2002) Structural characterization of the reaction pathway in phosphoserine phosphatase: crystallographic "snapshots" of intermediate states. *J Mol Biol*, **319**, 421-431.
- Wang, W., Mariani, F.V., Harland, R.M. und Luo, K. (2000) Ski represses bone morphogenic protein signaling in Xenopus and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14394-14399.
- Wawersik, S. und Maas, R.L. (2000) Vertebrate eye development as modeled in Drosophila. *Hum Mol Genet*, **9**, 917-925.
- Wayne, S., Robertson, N.G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjerg, L., Morton, C.C., Ryan, A.F., Van Camp, G. und Smith, R.J. (2001) Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet*, **10**, 195-200.
- Weinstein, D.C. und Hemmati-Brivanlou, A. (1999) Neural induction. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 411-433.
- Wilson, P.A. und Hemmati-Brivanlou, A. (1995) Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, **376**, 331-333.
- Wittbrodt, J., Shima, A. und Schartl, M. (2002) Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet*, **3**, 53-64.
- Wolpert, L. (1998) *Principles of development*. Oxford University Press, New York.
- Wu, K., Yang, Y., Wang, C., Davoli, M.A., D'Amico, M., Li, A., Cveklova, K., Kozmik, Z., Lisanti, M.P., Russell, R.G., Cvekl, A. und Pestell, R.G. (2003) DACH1 inhibits

- transforming growth factor-beta signaling through binding Smad4. *J Biol Chem*, **278**, 51673-51684.
- Xu, P.X., Adams, J., Peters, H., Brown, M.C., Heaney, S. und Maas, R. (1999) Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet*, **23**, 113-117.
- Xu, P.X., Woo, I., Her, H., Beier, D.R. und Maas, R.L. (1997) Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development*, **124**, 219-231.
- 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, Y., Knosp, B.M., Maconochie, M., Friedman, R.A. und Smith, R.J. (2004) A comparative study of Eya1 and Eya4 protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10. *J Assoc Res Otolaryngol*, **5**, 295-304.
- 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, J.E., Bui, Q.T., Steingrimsson, E., Nagle, D.L., Fu, W., Genin, A., Spinner, N.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bucan, M. und Bonini, N.M. (1997) Cloning and characterization of two vertebrate homologs of the Drosophila eyes absent gene. *Genome Res*, **7**, 128-141.
- 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., Perron, M., Philpott, A., Bang, A. und Harris, W.A. (1999) Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell*, **98**, 341-352.

Danksagungen

Für die gute Betreuung während der Promotionsarbeit möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Thomas Hollemann bedanken. Seine Anregungen und konstruktive Kritik in den letzten drei Jahren waren jederzeit eine große Hilfe.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tomas Pieler für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

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

Ein Dankeschön an die gesamte Abteilung Entwicklungsbiochemie für ein freundliches und kollegiales Arbeitsumfeld.

Bei Yvonne Cornesse, Marco Winkler, Emmanuel Tadjuidje und Andreas Nolte bedanke ich mich ganz besonders für eine mehr als nur gute, tägliche Zusammenarbeit.

Danke an Katrin, Tiemo und Christine für's Korrekturlesen der Arbeit und die Unterstützung im Kampf mit der deutschen Rechtschreibung.

An die ganze Familie Kriebel in Cuxhaven, Bremen und Trier: DANKESCHÖN EUCH VIER!

Lebenslauf

Name: Martin Kriebel
Geburtsdatum: 20.08.1975
Geburtsort: Jane-Furse-Hospital/Südafrika
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Stumpfe Eiche 1
37077 Göttingen

Ausbildung:

1981-1985 Grundsule Cuxhaven-Altenbruch
1985-1987 Orientierungsstufe Cuxhaven-Altenbruch
1987-1994 Amandus-Abendroth-Gymnasium Cuxhaven;
Abschluß: Abitur
1994-1995 Zivildienst; Seehospital Sahlenburg der Nordheim-Stiftung
1995-1996 Justus-Liebig-Universität Gießen
1996-1998 Georg-August-Universität Göttingen;
Grundstudium im Fach Biologie
1998: Vordiplom im Fach Biologie am 16.10.1998
1998-2001: Georg-August-Universität Göttingen;
Hauptstudium im Fach Biologie; Hauptfach Entwicklungsbiologie,
Nebenfächer Zoologie und Humangenetik
2000-2001: Diplomarbeit im Fach Biologie, Schwerpunkt Entwicklungsbiologie,
Abteilung Prof. Dr. T. Pieler
Thema: „Vergleichende Expressionsanalyse von Regulatoren der
Augenentwicklung in *Xenopus laevis*“
2001: Hauptdiplom im Fach Biologie am 24.10.2001
seit 11.2001: Georg-August-Universität Göttingen;
Promotionsarbeit im Fach Biologie, Schwerpunkt
Entwicklungsbiologie, Abteilung Prof. Dr. T. Pieler
2002-2004: Förderung durch die DFG

Göttingen, den 13.12.2004