

**Die Funktion des Wnt Antagonisten XsFRP5 während
der frühembryonalen Musterbildung des Entoderms in
*Xenopus laevis***

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

vorgelegt von
Katharina Damianitsch
aus Wien, Österreich

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Tomas Pieler

Korreferent: Prof. Ernst Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung:

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts in <i>Xenopus laevis</i>	3
1.1.1 Entoderm-Entwicklung in <i>Xenopus</i> Embryonen	3
1.1.2 Leberentwicklung	4
1.1.3 Pankreasentwicklung	5
1.2 Wnt Signaltransduktion	7
1.2.1 Der kanonische Zweig der Wnt Signaltransduktion	8
1.2.2 Der nicht-kanonische Zweig der Wnt Signaltransduktion	10
1.2.3 Möglichkeit einer Synergie zwischen $\Delta Np63\alpha$ und kanonischer Wnt Signaltransduktion	12
1.2.4 Extrazelluläre Antagonisten der Wnt Signaltransduktion	14
1.2.4.1 Die Dickkopf Klasse	14
1.2.4.2 Die sFRP Klasse	16
1.2.4.3 sFRP5 Orthologe	17
1.3 Die Rolle der Wnt Signaltransduktion bei der entodermalen Musterbildung in Vertebraten	18
1.3.1 Dorso-ventrale Achsenspezifikation in <i>Xenopus</i> Embryonen	18

1.3.2	Die Bedeutung der Wnt Signaltransduktion bei der Differenzierung des Gastrointestinaltrakts	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material	22
2.1	Organismen	22
2.1.1	<i>Xenopus laevis</i>	22
2.1.2	<i>Escherichia coli</i>	22
2.2	Chemikalien	22
2.3	Gebrauchswaren und Geräte	22
2.4	Computer-Software	22
2.5	Enzyme	23
2.6	Molekulargewichtsstandards	23
2.6.1	DNA Marker	23
2.6.2	Protein Marker	23
2.7	Reaktionssysteme (Kits)	24
2.7.1	DNA	24
2.7.2	RNA	24
2.7.3	Proteine	24
2.8	Vektoren und Konstrukte	24
2.8.1	pGEM-T und Derivate	24
2.8.2	pCS2+ und Derivate	25
2.8.3	Überexpressionskonstrukte und Konstrukte für whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierungssonden	25

2.8.3.1	<i>Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten oder generiert wurden</i>	26
2.8.3.2	<i>Konstrukte zur Herstellung von CapRNA oder markierter „antisense“ Sonden aus dem Laborbestand</i>	32
2.9	Oligonukleotide	32
2.9.1	RT-PCR Oligonukleotide	32
2.9.2	Sequenzierungsoligonukleotide	33
2.9.3	Morpholino Oligonukleotide	34
2.10	Antikörper	34
2.10.1	Primäre Antikörper	34
2.10.2	Sekundäre Antikörper	35
2.11	Medien und Stammlösungen	35
3	Methoden	36
3.1	Arbeiten mit Bakterien	36
3.1.1	Anzuchtbedingungen	36
3.1.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	36
3.1.3	Chemische Transformation von Bakterienzellen	36
3.1.4	Anlegen von Glycerol-Stammkulturen	36
3.2	Arbeiten mit DNA	37
3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA im analytischen und präparativen Maßstab	37
3.2.1.1	<i>TELT-Präparation</i>	37
3.2.1.2	<i>Mini-Präparation</i>	37

3.2.1.3	<i>Midi-Präparation</i>	37
3.2.1.4	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	38
3.2.2	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
3.2.4	Aufreinigung von PCR Fragmenten und Restriktionsansätzen	38
3.2.5	Restriktionsendonukleolytische Spaltung von DNA	39
3.2.5.1	<i>Spaltung von PCR-Termini</i>	39
3.2.5.2	<i>Spaltung von Vektoren und Plasmiden</i>	39
3.2.5.3	<i>Linearisierung von „sense“ und „antisense“ Matrizen für die RNA-Synthese</i>	39
3.2.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	39
3.2.7	Oligomerisierung kurzer DNA-Fragmente	39
3.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.2.9.1	<i>Analytischer Maßstab</i>	41
3.2.9.2	<i>Präparativer Maßstab</i>	41
3.2.10	Sequenzierung	41
3.3	Arbeiten mit RNA	41
3.3.1	<i>in vitro</i> Synthese von RNA	41
3.3.1.1	<i>in vitro</i> Transkription von Monomethylguanosin-Cap-RNA zur Mikroinjektion in <i>Xenopus</i> Embryonen	41
3.3.1.2	<i>in vitro</i> Transkription Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	42
3.3.2	Aufreinigung von RNA	42
3.3.3	Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung	42

3.3.3.1	<i>Fixierung von Xenopus Embryonen und Explantaten</i>	43
3.3.3.2	<i>β-Galaktosidase Färbung von Embryonen</i>	44
3.3.3.3	<i>Whole-mount in situ Hybridisierung</i>	44
3.3.3.4	<i>Reduktion der Hintergrundfärbung sowie Bleichung pigmentierter Embryonen und Explantate</i>	46
3.3.3.5	<i>Vibratomschnitte</i>	46
3.3.4	Präparation von DNA-freier Gesamt-RNA	47
3.3.4.1	<i>aus verschiedenen Embryonalstadien</i>	47
3.3.4.2	<i>aus adulten Geweben und Organen</i>	48
3.3.4.3	<i>aus animalen Kappen-Explantaten</i>	48
3.3.5	Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	48
3.4	Arbeiten mit Proteinen	48
3.4.1	<i>in vitro</i> Transkription und Translation („TnT“)	48
3.4.2	Ko-Immunopräzipitation	49
3.4.3	Western Blot	49
3.5	Manipulierung von Xenopus Embryonen	50
3.5.1	Stimulation der Eiablage	50
3.5.2	Präparation von <i>Xenopus</i> Testes	51
3.5.3	Mikroinjektion	51
3.5.3.1	<i>Achsenduplikations-Assay</i>	51
3.5.3.2	<i>Entoderm-Injektion</i>	51
3.5.4	Animale Kappenexplantate	52
3.5.5	Gastrointestinale Explantate	52

3.5.6	Behandlung der Embryonen oder animalen Kappenexplantate mit Chemikalien	52
3.5.6.1	<i>Retinsäure und Retinsäure-Antagonist BMS453-Behandlung</i>	52
3.5.6.2	<i>Dexamethason-Behandlung</i>	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Biochemische und funktionale Charakterisierung des sekretierten Wnt Antagonisten <i>Xenopus</i> sFRP5	54
4.1.1	XsFRP5 zeigt während der Embryonalentwicklung ein sehr dynamisches Expressionsmuster	54
4.1.2	Biochemische Interaktionsstudien von XsFRP5 mit verschiedenen <i>Xenopus</i> Wnt Proteinen	56
4.1.2.1	<i>Ko-Injektion von XsFRP5 inhibiert die Wnt-vermittelte dorsale Achsenduplikation</i>	56
4.1.2.2	<i>Ko-Immunopräzipitation von XsFRP5 und unterschiedlicher Xwnt Proteine</i>	59
4.1.2.3	<i>Überexpression von XsFRP5 in ganzen Embryonen führt zu Defekten der anterior-posterioren Körperachse</i>	64
4.1.3	Funktionelle Charakterisierung von XsFRP5 während der Organogenese	66
4.1.3.1	<i>Der Funktionsverlust von XsFRP5 nach Injektion von „antisense“ Morpholino Oligonukleotiden führt zu einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage und zu einer Vergrößerung des Magens</i>	66
4.1.3.2	<i>Die intrazelluläre Stimulation kanonischer Wnt Signaltransduktion bewirkt eine Reduktion der ventralen und einen Verlust der dorsalen Pankreasanlage</i>	73
4.1.3.3	<i>Expressionsanalyse von XsFRP5 und verschiedenen Xwnt Proteinen</i>	78
4.1.4	Überexpression von XsFRP5 und VegT in animalen Kappenexplantaten induziert pankreatische Genexpression	81

4.1.4.1	<i>Die XsFRP5-vermittelte pankreatische Genexpression in VegT-injizierten Kappenexplantaten ist Retinsäure-abhängig</i>	84
4.1.4.2	<i>Die Überexpression von XsFRP2 und VegT führt nicht zur Induktion pankreatischer Markergen-Expression in animalen Kappenexplantaten</i>	86
4.1.4.3	<i>Analyse der Expression verschiedener XwnTs in VegT-injizierten Kappenexplantaten</i>	89
4.2	Analyse des Synergieeffektes von $\Delta Np63\alpha$ auf die Lef1-vermittelte Wnt Signaltransduktion	91
5	Diskussion	93
5.1	Identifizierung von Wnt Bindungspartnern für XsFRP5	94
5.2	Funktionale Charakterisierung von XsFRP5 in der entodermalen Organogenese	97
5.3	Verknüpfung von Wnt Signalen mit anderen Signalwegen	102
6	Zusammenfassung	105
	Literaturverzeichnis	106
	Danksagung	119
	Lebenslauf	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Entwicklung entodermaler Organe in <i>Xenopus laevis</i> .	4
Abb. 1.2	Entwicklung und temporäres Genexpressionsprofil des Pankreas in <i>Xenopus</i> Embryonen (Pieler und Chen, 2006).	6
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der kanonischen Wnt Signaltransduktion (Fuerer <i>et al.</i> , 2008).	8
Abb. 1.4	Schematische Darstellung der beiden primären nicht-kanonischen Wnt Signalwege [modifiziert nach (Semenov <i>et al.</i> , 2007)].	11
Abb. 1.5	Schematische Darstellung der funktionalen Domänen von p53 und p63 Proteinen (Barbieri und Pietenpol, 2006).	13
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der Funktionsweise von Dkk Proteinen [modifiziert nach (Kawano und Kypta, 2003)]	15
Abb. 1.7	Vergleich der Domänenstruktur von sFRP und Frizzled-Rezeptor Proteinen.	16
Abb. 1.8	Schematische Darstellung der Funktionsweise von „secreted Frizzled-related“ Proteinen [modifiziert nach (Kawano und Kypta, 2003)].	17
Abb. 1.9	Schematische Darstellung der dorso-ventralen Achseninduktion in <i>Xenopus laevis</i> (Tao <i>et al.</i> , 2005).	19
Abb. 4.1	XsFRP5 zeigt ein ausgeprägt dynamisches Expressionsverhalten in <i>Xenopus</i> Embryonen.	54
Abb. 4.2	Die Expression von XsFRP5 beginnt während der Gastrulation und bleibt in späten Embryonalstadien wie auch in vielen adulten Geweben erhalten.	55
Abb. 4.3	XsFRP5 ist in der Lage, Xwnt-vermittelte dorsale Achsenduplikation zu unterdrücken.	58
Abb. 4.4	XsFRP5 ko-präzipitiert mit allen untersuchten Xwnt Proteinen, zeigt jedoch eine unterschiedliche Präferenz einzelner Proteinbanden.	62

Abb. 4.5	Frühe Überexpression von XsFRP5 verlangsamt die Gastrulationsbewegungen und induziert Defekte in der konvergenten Extension.	65
Abb. 4.6	Verschiedene „antisense“ Morpholino Oligonukleotide wurden komplementär zu XsFRP5 und seinem Pseudoallel gewählt.	67
Abb. 4.7	Mehrere „antisense“ Morpholino-Oligonukleotide komplementär zur XsFRP5 kodierenden Regione (CDS) können die Translation effizient unterdrücken.	68
Abb. 4.8	Der Funktionsverlust von XsFRP5 im Entoderm führt zu einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage sowie zu einer Vergrößerung des Magens unter Verlust duodenaler Strukturen.	72
Abb. 4.9	Domänenstruktur verschiedener Lef1- bzw. β -Catenin basierter Hormon-induzierbarer Fusionskonstrukte.	74
Abb. 4.10	Bei Injektion in frühe Teilungsstadien induzieren konstitutiv aktiv wirkende Konstrukte nach Dexamethason-Behandlung dorsale Achsenduplikation, während dominant-negative Konstrukte zu einer Ventralisierung der Embryonen führen.	76
Abb. 4.11	Die Aktivierung von Lef1-GR zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung resultiert in einem Verlust der dorsalen und einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage [entnommen aus (Melchert, Diplomarbeit 2007)].	77
Abb. 4.12	Mehrere Xwns zeigen komplementäre oder überlappende Expressionsmuster zu XsFRP5 im Stadium 35.	79
Abb. 4.13	Mehrere Xwns zeigen komplementäre oder überlappende Expressionsmuster zu XsFRP5 in gastrointestinalen Explantaten des Stadiums 40.	80
Abb. 4.14	Die Überexpression von XsFRP5 in VegT-injizierten animalen Kappenexplantaten induziert die robuste Expression pankreatischer Markergene.	83
Abb. 4.15	Durch Behandlung der Kappenexplantate mit dem Retinsäure-Antagonisten BMS453 wird die XsFRP5-vermittelte Induktion pankreatischer Markergene unterdrückt.	85

Abb. 4.16	Ein Aminosäure-Sequenzvergleich zeigt ähnliche Wnt-bindende Domänen in XsFRP2 und XsFRP5.	86
Abb. 4.17	XsFRP2 zeigt ein dynamisches, aber deutlich unterschiedliches Expressionsmuster zu XsFRP5.	87
Abb. 4.18	XsFRP2 induziert keine pankreatische Markergen-Expression in VegT-injizierten Kappenexplantaten.	88
Abb. 4.19	Eine Vielzahl unterschiedlicher XwnTs wird in VegT-injizierten Kappenexplantaten verschiedener Entwicklungsstadien exprimiert.	90
Abb. 4.20	$\Delta Np63\alpha$ wirkt synergistisch auf die Lef1-GR-vermittelte Achsenduplikation in <i>Xenopus</i> Embryonen.	92
Abb. 5.1	Schematische Darstellung einer möglichen Korrelation zwischen den Wnt Expressionsmustern und den nach XsFRP5-„Knock-down“ erzielten Effekten auf verschiedene Markergene.	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Konstruktliste zur <i>in vitro</i> Transkription von CapRNA (sense) und Digoxigenin-markierten Sonden (antisense)	32
Tabelle 2.2	Liste aller in dieser Arbeit zur Anwendung gekommener Oligonukleotide für die RT-PCR Analyse	32
Tabelle 2.3	Liste der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Sequenzierungsoligonukleotide	34
Tabelle 2.4	Liste der verwendeten antisense Morpholino Oligonukleotide	34
Tabelle 2.5	Aufstellung der zur Anwendung gebrachten primären Antikörper	34
Tabelle 2.6	Aufstellung der zur Anwendung gebrachten sekundären Antikörper	35
Tabelle 3.1	Inkubationszeiten für den Proteinase K-Verdau	45
Tabelle 4.1	Zusammenfassung der erhaltenen Daten aus den Interaktionsstudien von XsFRP5 mit verschiedenen Xwnt Proteinen	63

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BMB	„Boehringer Mannheim Blocking“ Reagenz
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
CapRNA	Monomethylguanosin-Cap-RNA
Da	Dalton
DEX	Dexamethason
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribunuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N`-tetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FA	Formaldehyd
g	Gramm
h	Stunde
HCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	n-(2-Hydroxymethyl)piperazin,N-3-propansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
k	Kilo
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m	Meter, milli
M	Molar
MAB	Maleinsäurepuffer
MEM	MOPS-EGTA-MgSO ₄ -Puffer

MEMFA	MOPS-EGTA-MgSO ₄ -Formaldehyd-Puffer
mRNA	Messenger-RNA
μ	Mikro
n	nano
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
OD	optische Dichte
p	pico
PBS	Phosphat-gepufferte Salinenlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SSC	Standard Saline Citrat Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit „Unit“ der Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettlicht
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
WMISH	whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Bevölkerung der Industrieländer leidet in steigendem Maß unter sogenannten Zivilisationskrankheiten. Ein Beispiel dafür ist der starke Anstieg von Erkrankungen wie Diabetes Typ I und II (Mellitus). Eine allgemeine Arbeitshypothese der regenerativen Medizin besagt, dass man durch ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen der Embryonalentwicklung Protokolle zur Erzeugung organspezifischer Zellen mit der entsprechenden Stoffwechselleistung terminal differenzierter Zellen aus embryonalen oder adulten Stammzellen ableiten kann. Solche *in vitro* erzeugten, spezialisierten Zellen könnten dann im Rahmen von zelltherapeutischen Strategien zur Behandlung degenerativer Krankheiten wie Diabetes Mellitus eingesetzt werden. Eine *in vitro* Differenzierung Insulinproduzierender β -Zellen aus embryonalen Stammzellen konnte bereits in verschiedenen Laboren erzielt werden (Blyszczuk *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008). Diese *in vitro* differenzierten β -Zellen führten nach Transplantation in hyperglykämische Mäuse jedoch nicht zu einem Absinken der Blutglukosekonzentration (Chen *et al.*, 2008). Auch Versuche, murine und humane Fibroblasten *in vitro* zu de-differenzieren und sie einen embryonalen Stammzell-ähnlichen Charakter annehmen zu lassen, konnten bisher nur partielle Erfolge erzielen (Wernig *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Technische Limitationen dieser experimentellen Strategie ergeben sich durch die Verwendung retroviraler Vektoren, um die terminal differenzierten Zellen zu transformieren. Da diese Vektoren unspezifisch ins Genom der Zellen integrieren, kann die Tumor-Induzierende Wirkung dieser *in vitro* reprogrammierten Zellen nach einer möglichen Re-Implantation nicht ausgeschlossen werden.

Alternativ könnte die Regenerationsfähigkeit adulter Organe genutzt werden. Im Rahmen solcher Prozesse kommt es entweder zur Aktivierung fakultativer Stammzellen, welche bei der Regeneration die organspezifischen Differenzierungsschritte der Embryonalentwicklung zu rekapitulieren scheinen, oder aber zu einem Wiedereintritt terminal differenzierter Zellen in den mitotischen Zellzyklus. An diesen Prozessen kommt unter anderem den FGF („Fibroblast Growth Factor“) und Wnt Signalwegen eine Schlüsselrolle zu [zur Übersicht siehe (Stoick-

Cooper *et al.*, 2007)]. Die Leber ist das Organ mit der höchsten Regenerationskapazität in Säugetieren. Nach partieller Hepatektomie, der Resektion von bis zu 70% der Lebermasse, treten Hepatozyten wieder in den Zellzyklus ein und bilden durch kompensatorisches Wachstum das ursprüngliche Lebervolumen aus. Darüber hinaus konnten auch fakultative Stammzellen der Leber, die sogenannten „oval cells“, identifiziert werden, die nach einer Intoxikation aktiviert werden [zur Übersicht siehe (Taub, 2004)].

Der Pankreas zeichnet sich demgegenüber durch eine geringere Fähigkeit zur Regeneration aus. Im Fokus der regenerativen Medizin befinden sich insbesondere die Insulin-produzierenden β -Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass adulte β -Zellen nach partieller Pankreatektomie durch einen Wiedereintritt in den mitotischen Zellzyklus die Zellmasse wiederherstellen können (Dor *et al.*, 2004). Demgegenüber belegt eine neuere Studie, dass in einem Pankreatitis-Mausmodell β -Zellen aus fakultativen adulten Stammzellen regeneriert werden (Xu *et al.*, 2008). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Leber und Pankreas Zellregeneration sowohl durch kompensatorisches Wachstum als auch durch die Aktivierung fakultativer Stammzellen stattfinden kann.

Vor diesem Hintergrund soll in der hier vorgelegten Arbeit die Funktion der Wnt-abhängigen Signalkaskaden im Zusammenhang mit Leber- und Pankreasentwicklung in *Xenopus laevis* untersucht werden. *Xenopus laevis* bietet als Modellorganismus im Vergleich zur Maus verschiedene Vorteile, welche die Untersuchung der eben genannten Aspekte erleichtern. Neben der mit 1 bis 2mm vorteilhaften Größe der frühen Embryonen, sowie der raschen extraembryonalen Entwicklung bis zur freischwimmenden Kaulquappe in nur vier Tagen, haben Explantations- und Transplantationsexperimente in *Xenopus* eine lange Tradition (Spemann, 1938). Anhand isolierter, multipotenter Vorläuferzellpopulationen können zur Induktion einzelner Zelltypen benötigte Stimuli und Wachstumsfaktoren gezielt analysiert werden.

1.1 Die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts in *Xenopus laevis*

1.1.1 Entoderm-Entwicklung in *Xenopus* Embryonen

Die Bildung der drei Keimblätter beruht in *Xenopus* Embryonen auf der asymmetrischen Verteilung maternaler Komponenten entlang der animal-vegetalen Achse der Oocyte. Die mRNAs von VegT und Vg1 sind am vegetalen Kortex der Oocyte verankert und werden im Zuge der Furchungsteilungen in den vegetalen Zellen angereichert, welche das Entoderm bilden. Das Ektoderm bildet sich aus den animalen Zellen und das Mesoderm entsteht im äquatorialen Bereich des Embryos. Embryonen ohne maternales VegT zeichnen sich durch den Verlust des entodermalen Keimblattes aus (Zhang *et al.*, 1998), der Verlust von Vg1 resultiert im Fehlen von Entoderm und dorsalem Mesoderm (Joseph und Melton, 1998). Im Zuge der Gastrulationsbewegungen gelangen die entodermalen Zellen in das Innere des Embryos, wo sie das Archenteron, den Urdarm, bilden.

Aus dem Archenteron, einer Röhrenförmigen, von entodermalen Epithelzellen ausgekleideten Struktur entwickelt sich in *Xenopus laevis*, ähnlich wie in anderen Vertebraten, der intestinale Trakt. Im Laufe der Entwicklung differenzieren sich von anterior nach posterior das ösophagial-trachiale System, der Magen, das Duodenum mit den anliegenden Organen Leber, Pankreas und Gallenblase, sowie der Dünn- und der Dickdarm. Erste Differenzierungsschritte lassen sich in *Xenopus laevis* bereits am zweiten Entwicklungstag durch die Analyse von Markergenen veranschaulichen. Wie in Abb. 1.1 A schematisch dargestellt, können schon während der Gastrulation einzelne Vorläuferzellpopulationen im Entoderm lokalisiert werden. In Stadium 40/41 (Abb. 1.1 B) haben sich bereits einzelne Organe, wie die Leber (rot dargestellt) und der Pankreas (grün dargestellt) differenziert, während das Darmrohr erst in späteren Stadien (Abb. 1.1 C) die charakteristischen Schlingen ausbildet.

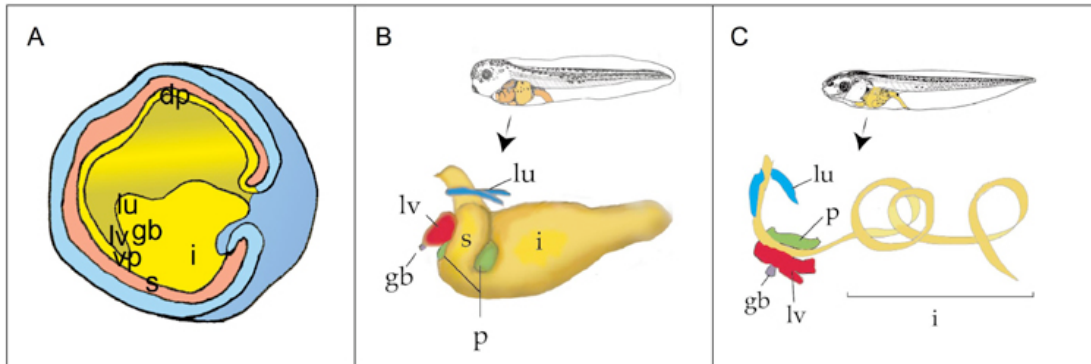


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Entwicklung entodermaler Organe in *Xenopus laevis*. (A) Sagittaler Schnitt durch einen Embryo im Stadium 11 (Gastrula) mit anterior nach links. Das Ektoderm ist blau, das Mesoderm rot und das Entoderm gelb dargestellt. Einzelne Vorläuferzellpopulationen sind markiert. (B) Laterale Ansicht eines Embryos in Stadium 41/42 mit anterior nach links, das Entoderm ist farblich hervorgehoben (Zorn und Mason, 2001). (C) Laterale Ansicht eines Embryos in Stadium 46/47 mit anterior nach links. Der Gastrointestinaltrakt ist vergrößert dargestellt (Zorn und Mason, 2001). dp = dorsaler Pankreas, gb = Gallenblase, i = Darm, lu = Lunge, lv = Leber, s = Magen, vp = ventraler Pankreas.

1.1.2 Leberentwicklung

In *Xenopus* Embryonen bildet sich das Leberdiverticulum im Stadium 13,5 aus, im Stadium 22 umschließt die Leberanlage einen kleinen Hohlraum. Im Stadium 25 vergrößert sich die Leberanlage zu einer charakteristischen, Bogenförmigen Struktur. Das früheste hepatische Vorläufermarkergen ist *hex*, ein Homöobox Transkriptionsfaktor der *Antennapedia* Familie (Crompton *et al.*, 1992). Verschiedene Differenzierungsmarker, wie beispielsweise Fibrinogen, werden in *Xenopus* Embryonen zwischen den Stadien 34 und 44 sowohl in der Leber als auch im Darm exprimiert (Chen *et al.*, 2003).

Die Lebervorläuferzellen entspringen in Vertebraten einer gemeinsamen Zellpopulation mit den Vorläuferzellen des ventralen Pankreas (Deutsch *et al.*, 2001). Diese Zellpopulation kann bereits während der Gastrulation im anterioren Entomesoderm von Maus Embryonen durch die Expression von *hex* identifiziert werden (Thomas *et al.*, 1998). In der Maus konnte auch gezeigt werden, dass frühe BMP Sekretion des Septum transversum Mesenchyms im angrenzenden ventralen Vorderdarm die Expression von FoxA und Gata Transkriptionsfaktoren induziert (Rossi *et al.*, 2001). Daraufhin gewinnt das Entoderm die Kompetenz, auf spätere FGF Signale aus der Herzanlage zu reagieren und Leber-spezifische Markergene zu

exprimieren (Jung *et al.*, 1999). Der Anteil der hepato-pankreatischen Zellpopulation, welcher durch das Septum transversum Mesenchym von der Herzanlage abgegrenzt wird und daher keine FGF Signale empfängt, entwickelt sich zum ventralen Pankreas. Diese Positionierung der ventralen Pankreasanlage ist abhängig von der Expression des Transkriptionsfaktors Hex (Bort *et al.*, 2004).

1.1.3 Pankreasentwicklung

Das Pankreas entwickelt sich aus dem anterioren Darmepithel, aus einer dorsalen und zwei ventralen Anlagen. Die dorsale Pankreasknospe bildet sich in *Xenopus* im Stadium 35/36 aus, die ventralen Anlagen im Stadium 37/38. Eine der ventralen Anlagen bildet sich zurück, während sich die andere weiterentwickelt. Im Zuge der Darmrotation kommt die dorsale Anlage in Kontakt mit der verbliebenen ventralen Anlage, was die Fusion dieser Organlagen zur Folge hat [Abb. 1.2; (Afelik *et al.*, 2004; Kelly und Melton, 2000)]. Die ventrale Anlage besteht ausschließlich aus exokrinen Zellen, frühe Insulin-produzierende Zellen werden in *Xenopus* nur in der dorsalen Pankreasanlage gebildet (Kelly und Melton, 2000).

Wichtige pankreatische Vorläufermarker sind der bHLH-Transkriptionsfaktor Ptf1a/p48 und der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Xihbox8. Ptf1a/p48 wird in *Xenopus* ab Stadium 30 in allen pankreatischen Vorläuferzellen, sowie in der Retina und im Hinterhirn exprimiert (Afelik *et al.*, 2006). Xihbox8 wird ebenfalls ab Stadium 30 in allen pankreatischen Vorläuferzellen, sowie dem Duodenum und im posterioren Magen exprimiert (Wright *et al.*, 1989). Der erste endokrine Differenzierungsmarker ist Insulin, welches ab Stadium 32 ausschließlich im dorsalen Pankreas exprimiert wird. Der erste exokrine Differenzierungsmarker ist die Proteindisulfisomerase XPDip, welche ab Stadium 39 detektiert werden kann (Afelik *et al.*, 2004). Ab Stadium 42 folgt eine zweite Welle der Differenzierung, welche durch die Expression weiterer exokriner und endokriner Differenzierungsmarker wie Trypsinogen und Glucagon gekennzeichnet ist (Afelik *et al.*, 2004; Kelly und Melton, 2000).

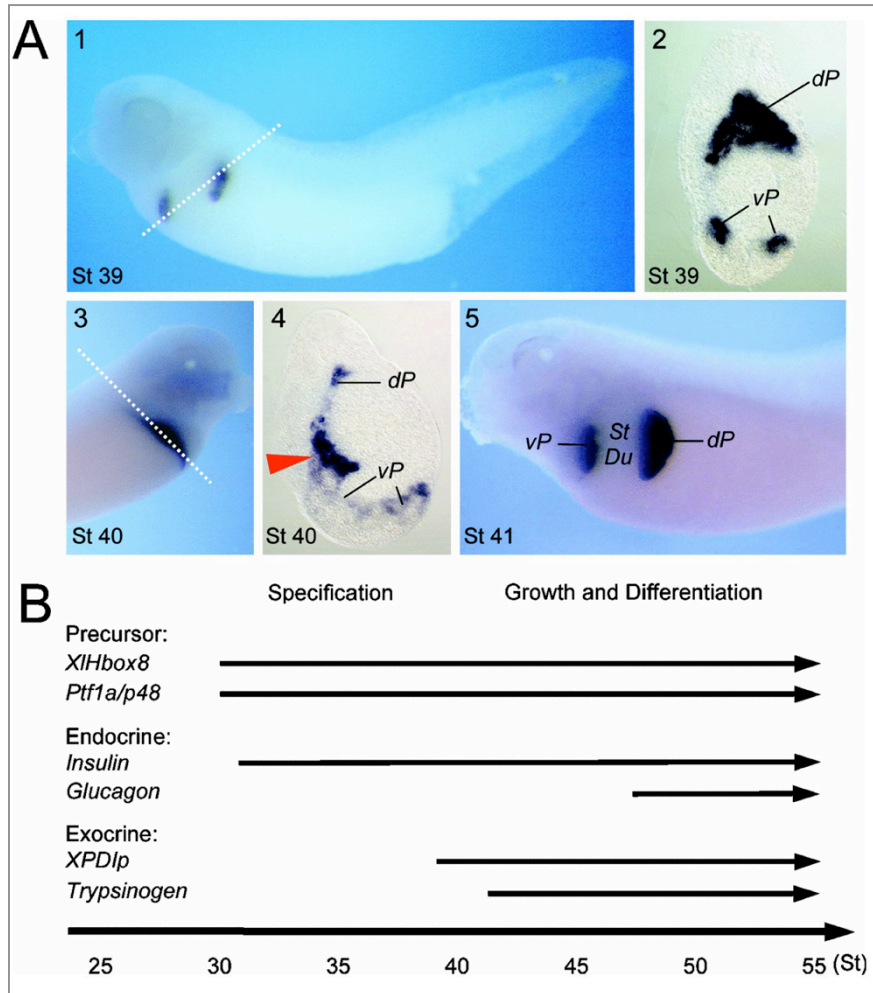


Abb. 1.2: Entwicklung und temporäres Genexpressionsprofil des Pankreas in *Xenopus* Embryonen (Pieler und Chen, 2006). (A) Darstellung des Fusionsprozess der Pankreasanlagen anhand der XPDlp Expression. (1) In Stadium 39 wird XPDlp ausschließlich in der dorsalen und den beiden ventralen Pankreasanlagen exprimiert. (2) Transversalschnitt des Embryos in (1) mit deutlicher Färbung der Pankreasanlagen. (3) In Stadium 40 fusionieren die dorsalen und ventralen Anlagen auf der rechten Seite des Embryos. (4) Transversalschnitt durch den Embryo in (3), die rote Pfeilspitze zeigt auf die Fusionsstelle. (5) Das reife Pankreas kommt im Zuge der Darmrotation hinter dem Magen und dem Duodenum zu liegen. Dp = dorsale Pankreasanlage, Du = Duodenum, St = Magen, vP = ventrale Pankreasanlagen. (B) Schematische Darstellung des Genexpressionsprofils pankreatischer Gene in *Xenopus laevis*. *Ptf1a/p48* und *XIHbox8* werden schon ab Stadium 30 in allen pankreatischen Vorläuferzellen exprimiert. Die frühesten Differenzierungsmarker sind *Insulin* und *XPDlp*, während andere Differenzierungsmarker erst ab Stadium 42 in der Wachstums- und Differenzierungsphase des Pankreas exprimiert werden.

Die Entwicklung des Pankreas hängt von der Sekretion verschiedener Signalmoleküle aus den umgebenden Geweben ab. So konnte Retinsäure (RA) als bereits während der Gastrulation wirkendes Signalmolekül in der Spezifizierung der dorsalen Pankreasvorläuferzellpopulation identifiziert werden, wobei eine RA

Signalwirkung sowohl über das Entoderm als auch über das Mesoderm beschrieben wurde (Chen *et al.*, 2004a; Pan *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RA die Expression von Sonic Hedgehog (Shh), einem in verschiedenen Modellorganismen beschriebenen Inhibitor pankreatischer Genexpression [zur Übersicht siehe (Hebrok *et al.*, 1998)], hemmt (Chen *et al.*, 2004a). In der Maus wurden auch spätere Signale der an das pankreatische Epithel angrenzenden Blutgefäße, wie der dorsalen Aorta, als essentiell für die Entwicklung der Pankreasanlage beschrieben, wobei die Identität dieser Signale noch nicht bekannt ist (Lammert *et al.*, 2001).

1.2 Wnt Signaltransduktion

Bei Wnts handelt es sich um sekretierte Glykoproteine mit morphogenetischer Aktivität. Sie besitzen eine N-terminale Cystein-reiche Domäne, wobei ein konserviertes Cystein einen für die Funktion der Wnt Proteine essentiellen Palmitoylrest trägt (Willert *et al.*, 2003). Der Name Wnt ist eine Kombination aus Wg (wingless) und Int. *Wg* wurde als Segmentpolaritätsgen in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). *Int* Gene wurden in Vertebraten als Gene identifiziert, die in der Nähe verschiedener „Mouse Mammary Tumor Virus“ (MMTV) Integrationsstellen liegen (Nusse und Varmus, 1982). Als erkannt wurde, dass es sich bei Wg und Int-1 um Homologe handelte, wurde der Namen Wnt geprägt. Mittlerweile kennt man 7 *wg* Gene in *Drosophila* und 19 Vertebraten-Homologe *Wnt* Gene [zur Übersicht siehe (The Wnt Homepage)]. Die Beobachtung, dass Wnt Proteine nach Mikroinjektion in *Xenopus* Embryonen unterschiedliche Effekte auf die Ausprägung der dorso-ventralen Achse haben, führte zu der Annahme, dass mehr als ein Wnt Signaltransduktionsweg existiert. So zeigen einige Wnt Proteine, wie Wnt1 oder Wnt8, die Fähigkeit, eine dorsale Achsenduplikation zu induzieren, wohingegen Wnt5a oder Wnt11 diese Fähigkeit nicht besitzen, sondern Gastrulationsdefekte ohne Zellidentitätsänderungen hervorrufen (Glinka *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1993; Sokol *et al.*, 1991; Tada und Smith, 2000).

1.2.1 Der kanonische Zweig der Wnt Signaltransduktion

Kanonische Wnt Signaltransduktion spielt eine wesentliche Rolle in der Spezifizierung der Zellidentität, sowie bei Zellproliferation und Differenzierung, aber auch in der Achsendetermination in allen Metazoen. Eine Fehlregulation des kanonischen Wnt Signalweges wird mit der Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren in Zusammenhang gebracht [zur Übersicht siehe (Logan und Nusse, 2004)].

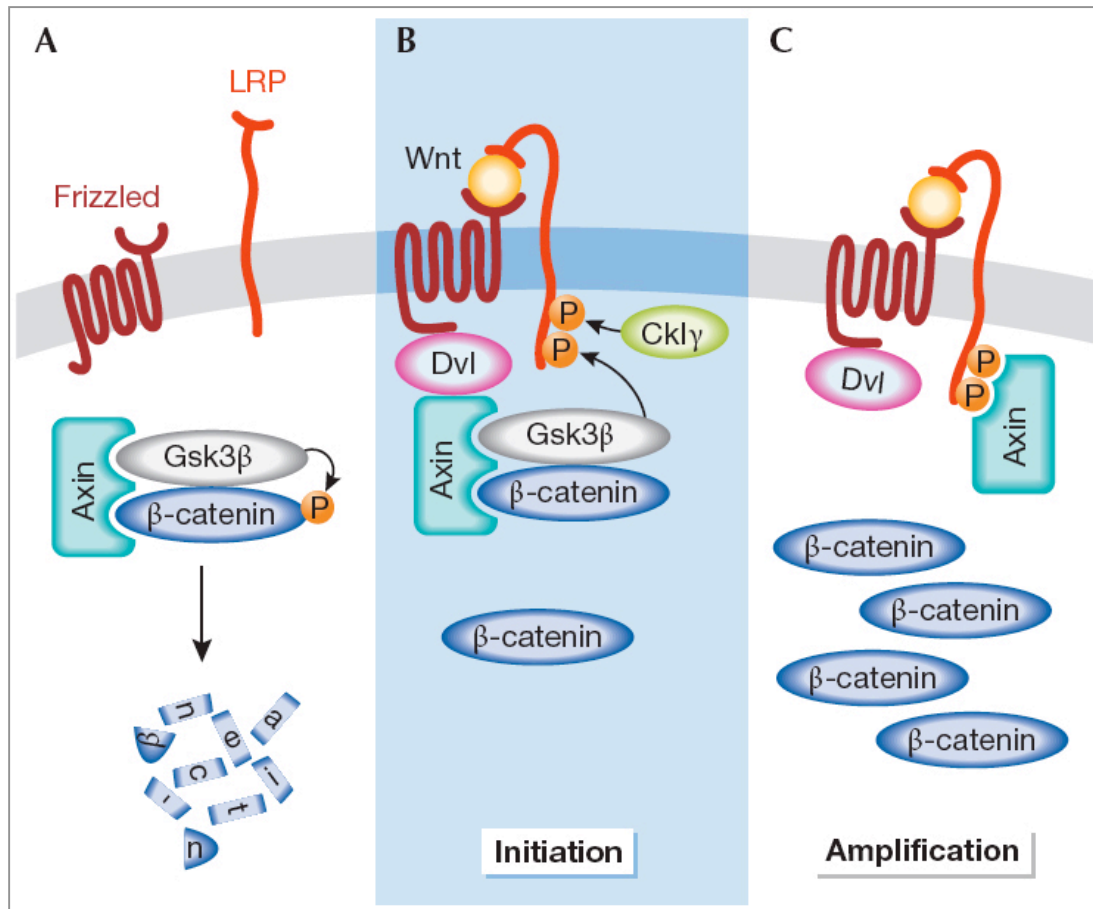


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der kanonischen Wnt Signaltransduktion (Fuerer et al., 2008) (A) Im inaktiven Zustand wird β -Catenin durch den „Destruction Complex“ phosphoryliert und der proteosomalen Degradation zugeführt. (B) Nach Bindung eines Wnt Liganden an den Frizzled Rezeptor und den LRP5/6 Ko-Rezeptor führt die Membranrekrutierung des „Destruction Complex“ durch Dishevelled (Dvl) zur Phosphorylierung von LRP5/6. β -Catenin wird dadurch cytoplasmatisch stabilisiert. (C) Axin bindet an hyperphosphoryliertes LRP5/6, wodurch der „Destruction Complex“ zerfällt und β -Catenin somit in der Zelle akkumuliert.

Ein zentrales Protein des kanonischen Wnt Signalweges ist β -Catenin (Abb. 1.3). Im inaktiven Zustand befindet sich das meiste endogene β -Catenin an der Zellmembran

mit Cadherinen assoziiert. Die Kinasen Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und Caseinkinase 1 γ (CK1 γ) sind Teil des sogenannten „Destruction Complex“, der zusätzlich aus Axin, dem „Adenomatous Poliposis Coli“ Protein (APC) und der Proteinphosphatase 2A (PP2A) besteht. Eine sequentielle Phosphorylierung von cytoplasmatischem β -Catenin führt zur Ubiquitinylierung durch die „ β -transducing repeat containing protein“ (β -TrCP) E3 Ubiquitin Ligase und der anschließenden proteolytischen Spaltung von β -Catenin (Price, 2006). Im Zellkern sind Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef Familie an die Regulatorsequenzen von Wnt Zielgenen gebunden. Ohne nukleäres β -Catenin binden Ko-Repressoren wie Groucho/TLE1 und CtBP („C-terminal Binding Protein“) an TCF/Lef und halten die Wnt Zielgene durch eine Interaktion mit Histondeacetylasen (HDACs) transkriptionell inaktiv (Cavallo *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999).

Wnt Proteine binden direkt an die N-terminale Cystein-reiche Domäne der Frizzled Transmembranrezeptoren. Zusätzlich bedarf es zu einer Stimulation der kanonischen Signaltransduktion der Anwesenheit der Ko-Rezeptoren LRP5/6 und Kremen1 und 2. Durch die Bindung der Wnt Proteine an ihre Rezeptoren wird die intrazelluläre Phosphorylierung von LRP5/6 durch GSK3 β und CK1 γ ausgelöst (Davidson *et al.*, 2005). Hyperphosphoryliertes LRP5/6 ist in der Lage, Axin mit hoher Affinität zu binden und es so aus dem „Destruction Complex“ abziehen. Durch die Membranlokalisierung von Axin wird die Phosphorylierung von β -Catenin gestoppt (Lee *et al.*, 2003). Ein weiteres wichtiges Protein ist Dishevelled (Dsh/Dvl), welches nach Wnt-Frizzled Bindung phosphoryliert wird und den „Destruction Complex“ an die Membran rekrutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Fz, Dvl, Axin und die GSK3 β an der Membran mit LRP5/6 in sogenannten „signalosomes“ kolo-kalisieren, und Fz, Dvl und Axin für die GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung von LRP5/6 notwendig sind (Bilic *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2008). Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass Dvl und Axin durch Oligomerisierung ihrer DIX-Domänen zu einer Aggregation vieler aktivierter Frizzled-Komplexe führen und somit eine Amplifizierung des kanonischen Wnt Signals ermöglichen (Schwarz-Romond *et al.*, 2007). Freies β -Catenin transloziert in den Nukleus, wo es die Ko-Repressoren von TCF/Lef verdrängt und zusammen mit den Ko-Aktivatoren Pygopus (Pyg) und Bcl9/Lgl sowie dem SWRCAP/SWR1 und dem CBP/p300 Chromatin-Remodelling

Komplex die Transkription der Wnt Zielgene aktiviert [zur Übersicht siehe (Bienz und Clevers, 2003)].

1.2.2 Der nicht-kanonische Zweig der Wnt Signaltransduktion

Als nicht-kanonische Wnt Signalwege werden die verschiedenen Zweige der Wnt Signaltransduktion bezeichnet, welche nicht über die Aktivierung von β -Catenin reguliert werden. Nicht-kanonische Wnt Signale steuern Zellpolarität und Zellbewegungen, wie zum Beispiel die Gastrulationsbewegungen, ohne die Zellidentität zu beeinflussen. Obwohl auch die nicht-kanonischen Signalwege über Wnt-Frizzled-Interaktion und Dishevelled Aktivierung verlaufen, haben sie keine Auswirkung auf die Regulation der GSK3 β oder β -Catenin.

Einer der nicht-kanonischen Wnt Signalwege reguliert die planare Zellpolarität (PCP), also die Ausrichtung einzelner Zellen in einem einschichtigen Zellverband. Einige Beispiele für Wnt/PCP Signalwirkung sind die Regulation der konvergenten Extensionsbewegungen, die Anordnung der Ommatidien im *Drosophila* Auge oder auch die Ausrichtung der Cilien im murinen Gehörgang [zur Übersicht (Seifert und Mlodzik, 2007)]. Auch in diesem Signalweg spielt die Aktivierung von Frizzled und Dishevelled (Dvl) eine wesentliche Rolle, jedoch kommt es im Anschluss zur Aktivierung heterotrimerer G Proteine (als G in Abb. 1.4 dargestellt). Nach der Aktivierung von Dvl bewirken multiple Signalwege eine Modulation des Aktin-Cytoskeletts und der Mikrotubuli (Abb. 1.4 A). Neben Frizzled konnten auch weitere Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) oder P APC als Mediatoren des Wnt/PCP Signalweges identifiziert werden (Keeble *et al.*, 2006; Unterseher *et al.*, 2004). Auch transmembrane Heparansulfat-Proteoglykane wie Syndecan-4, wurden mit dem Wnt/PCP Signalweg und der Regulation der konvergenten Extensionsbewegungen in Zusammenhang gebracht. So konnte gezeigt werden, dass *Xenopus* Syndecan-4 in Abhängigkeit von Fibronectin mit Frizzled7 interagiert und in Folge dieser Interaktion Dvl an die Plasmamembran transloziert (Munoz *et al.*, 2006). In Vertebraten wurde außerdem eine Ko-Rezeptorfunktion für das Zelloberflächen-Heparansulfat-Proteoglykan Glypican/Knypek nachgewiesen (Ohkawara *et al.*, 2003; Topczewski *et al.*, 2001).

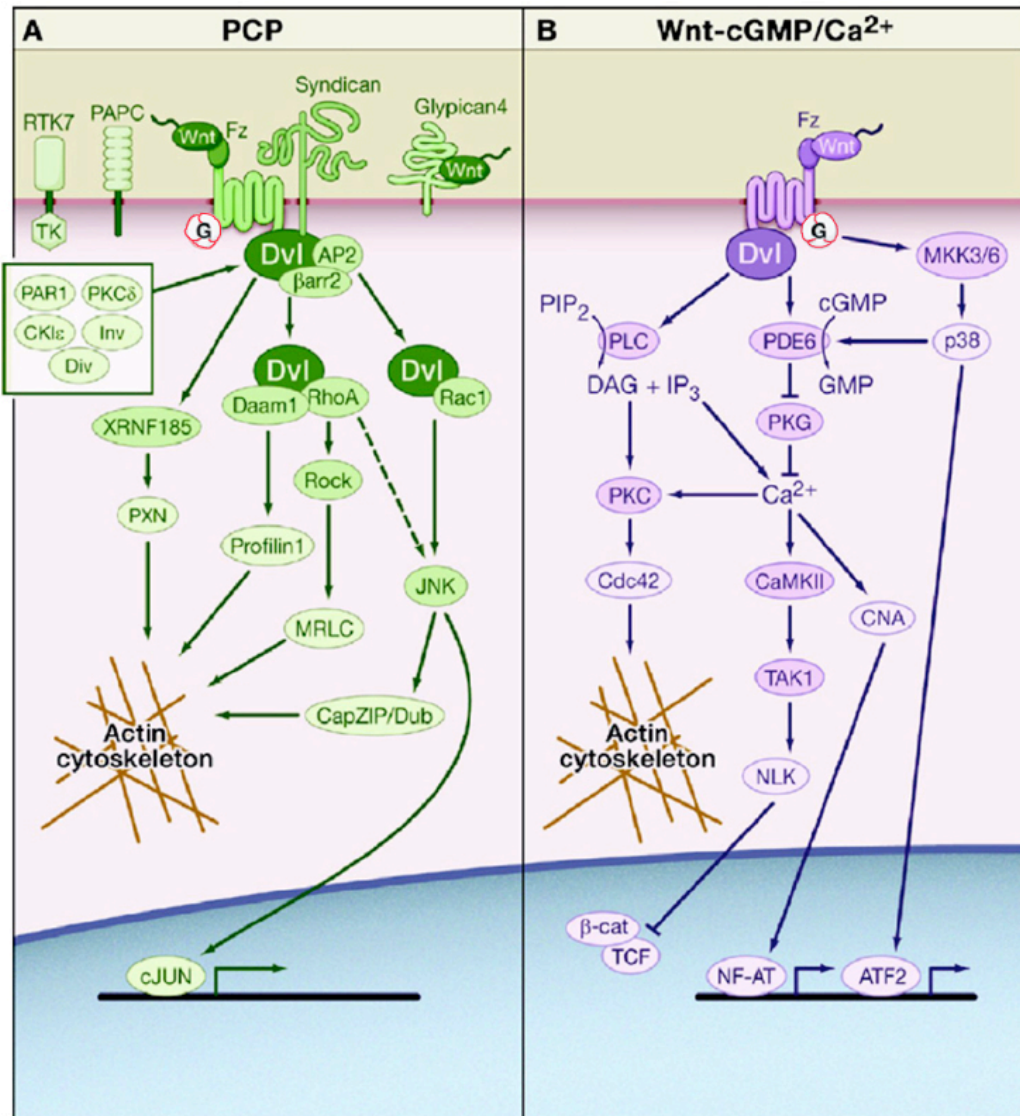


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der beiden primären nicht-kanonischen Wnt Signalwege [modifiziert nach (Semenov et al., 2007)]. (A) Der Wnt/PCP Signalweg induziert über die Aktivierung heterotrimerer G Proteine Veränderungen im Aktin Cytoskelett und die JNK-regulierte Aktivierung von Zielgenen. (B) Nach Wnt-Frizzled Interaktion kommt es beim Wnt-cGMP/Ca²⁺ Signalweg zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und einer Verringerung des cGMP Vorrats der Zelle. Enzyme wie die Proteinkinase C oder die Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamKII) werden aktiviert und bewirken neben Cytoskelettveränderungen auch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Xwnt5a oder Xwnt11 nach Injektion in *Xenopus* Oozyten zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führen (Kuhl et al., 2000). Diese Erhöhung von freiem Kalzium führt wiederum zur Aktivierung der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CamKII) und der Proteinkinase C (PKC) (Kühl et al., 2000; Sheldahl et al., 2003). Dieser Signalweg

wird als Wnt-cGMP/Ca²⁺ Weg bezeichnet, da die Umwandlung von intrazellulärem cGMP zu GMP eine Inhibition der Proteinkinase G bewirkt und so ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Abb. 1.4 B). Die Aktivierung der PKC wirkt sich auf das Aktin Cytoskelett aus, während die „Nemo-like Kinase“ (NLK) kanonische Wnt Signaltransduktion hemmt (Thorpe und Moon, 2004; Yamada *et al.*, 2006). Calcineurin (CNA) und p38 bewirken die Aktivierung verschiedener NF-AT und ATF2 Zielgene (Ma und Wang, 2007; Saneyoshi *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2004).

1.2.3 Möglichkeit einer Synergie zwischen Δ Np63 α und kanonischer Wnt Signaltransduktion

In mehrschichtigen Plattenepithelien wie der Epidermis befinden sich die Stammzellen in der Basalmembran und bewirken durch ihre hohe Teilungsrate die konstante, suprabasale Erneuerung von Zellen. Ein Transkriptionsfaktor der p53-Familie, p63, ist essentiell für den Erhalt der Selbsterneuerungskapazität epithelialer Stammzellen. In terminal differenzierenden, basalen Zellen wird die p63 Expression durch die microRNA-203 unterdrückt und somit der Zellzyklus-Arrest vermittelt (Yi *et al.*, 2008). In anderen Stammzellpopulationen, wie den Krypten-Stammzellen im Dünndarm, in den Haarfollikeln und den Brustdrüsen, konnte die kanonische Wnt Signaltransduktion als essentiell für den Erhalt des Proliferationspotentials identifiziert werden (Barker *et al.*, 2007; Pinto und Clevers, 2005). Eine mögliche, synergistische Wirkung von p63 und kanonischer Wnt Signaltransduktion wurde bislang nicht untersucht.

p63 wurde 1988 von unterschiedlichen Laboratorien als Mitglied der p53 Familie entdeckt. Bei p53 handelt es sich um einen wichtigen Tumorsuppressor, und obwohl p63 im Vergleich zu p53 eine hohe strukturelle Identität aufweist (Abb. 1.5), so zeigt es doch deutliche funktionale Divergenz. p63 kodiert für verschiedene Isoformen, die sowohl Transkriptionsaktivator- wie Repressordomänen beinhalten. p63 kann von unterschiedlichen Promotoren abgelesen werden; ein Promotor liegt vor dem originalen Startkodon und einer im dritten Intron. Dadurch entstehen die sogenannten TA- und Δ N-Isoformen. Sowohl die TA- als auch die Δ N-Isoform

können durch alternatives „Splicing“ ihrer C-Termini α , β und γ Isoformen bilden. Alle p63-Proteine weisen eine DNA-Bindedomäne, eine Oligomerisationsdomäne und die α -Isoformen zusätzlich ein „Sterile Alpha“-Motif (SAM), welches der Protein-Protein-Interaktion dient, auf. Es zeigte sich, dass TA-Isoformen die Reporter-gen-Expression von p53-responsiven Promotorelemente aktivieren können, während Δ Np63 Proteine dominant-negativ auf die p53-vermittelte Reporter-gen-Expression wirken.

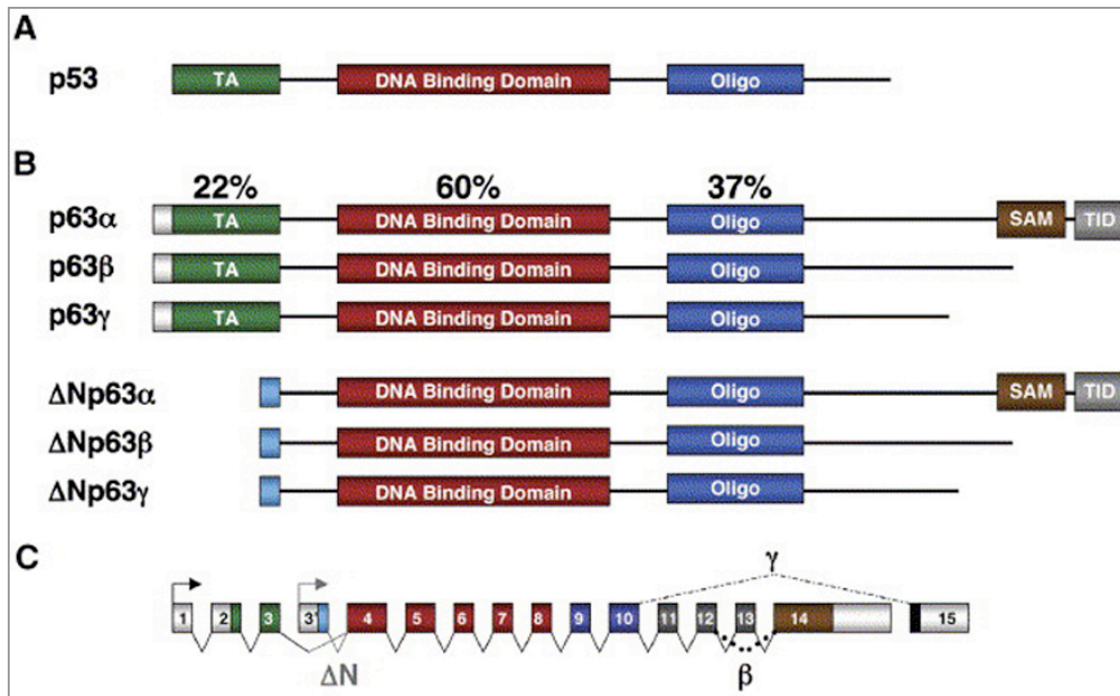


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der funktionalen Domänen von p53 und p63 Proteinen (Barbieri und Pietenpol, 2006). (A) p53 besteht aus drei funktionalen Einheiten, der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA), der DNA-Bindedomäne und einer C-terminalen Oligomerisationsdomäne (Oligo). (B) Domänenstruktur der p63 Proteine. Die Prozentangaben beziehen sich auf identische Aminosäuren in p53 und p63. Zusätzlich weisen p63 Proteine ein C-terminales „Sterile-alpha“ Motif (SAM) und eine „transactivation inhibitory domain“ (TID) auf. (C) Genstruktur von p63. Beide Promotoren und die „Splice“-Vorgänge der einzelnen Isoformen sind dargestellt.

In verschiedenen Modellsystemen wurden nach Verlust von p63 schwere Defekte der Extremitäten und das Fehlen von mehrschichtigem Plattenepithel beschrieben (Lee und Kimelman, 2002; Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Auch im Menschen sind Auswirkungen von Mutationen in p63 bekannt, die sogenannten EEC und AEC Syndrome. Beim EEC Syndrom kommt es zu Ectrodactylie, ektodermaler Dysplasie und Lippen-/Gaumenspalten. Beim AEC oder Hay-Weels Syndrom kommt es anstatt

von Missbildungen der Extremitäten zu fusionierten Augenlidern. Als die in mehrschichtigen Plattenepithelien am höchsten exprimierte Isoform konnte $\Delta Np63\alpha$ identifiziert werden (Bamberger und Schmale, 2001; Di Como *et al.*, 2002). $\Delta Np63\alpha$ wird nicht ausschließlich in der Epidermis, sondern auch in Basalmembranen anderer mehrschichtiger Plattenepithelien, wie zum Beispiel der Mundschleimhaut oder auch der Harnblase, und in einigen komplexen Drüsen wie der Prostata und den Brustdrüsen exprimiert (Dellavalle *et al.*, 2001; Di Como *et al.*, 2002).

Im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass die $\Delta Np63\alpha$ Expression durch BMPs („Bone Morphogenetic Proteins“) aktiviert werden kann (Bakkers *et al.*, 2002). Weiterhin wurde für $\Delta Np63\alpha$ eine Interaktion mit Jagged1 und Jagged2, Komponenten der Notch Signaltransduktion, beschrieben (Jiang *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2002). $\Delta Np63\alpha$ ist ein transkriptionaler Repressor, der für den Erhalt der Vorläuferzellen während der epithelialen Entwicklung essentiell ist (Barbieri *et al.*, 2002). Eine Verbindung zwischen $\Delta Np63\alpha$ und kanonischer Wnt Signaltransduktion, welche ebenfalls für den Erhalt verschiedener Stammzellpopulationen wichtig ist (Barker *et al.*, 2007), wurde bislang nicht untersucht, scheint jedoch auch in epithelialen Stammzellen möglich.

1.2.4 Extrazelluläre Antagonisten der Wnt Signaltransduktion

Extrazelluläre Wnt Antagonisten unterbinden die Liganden-Rezeptor-Interaktion durch zwei unterschiedliche Mechanismen und werden daher in zwei Klassen unterteilt.

1.2.4.1 Die Dickkopf Klasse

Die Dickkopf Klasse umfasst vier Mitglieder, Dkk-1 bis Dkk-4, sowie ein Dkk-3-verwandtes Protein, Soggy (Sgy). Dickkopf Proteine besitzen zwei Cystein-reiche Domänen (Cys-1 und Cys-2), wobei die Cys-2 Domäne zehn konservierte Cystein-Reste beinhaltet und eine schwache Homologie zu Colipasen aufweist (Aravind und Koonin, 1998). Ihren Namen verdanken die Dickkopf Proteine der Kopf-induzierenden Wirkung von Dkk-1, da dieses Protein nach Ko-Injektion mit einem

dominant-negativen BMP-Rezeptor eine zweite dorsale Körperachse mit kompletten Kopfstrukturen in *Xenopus* Embryonen induzieren kann (Glinka *et al.*, 1998).

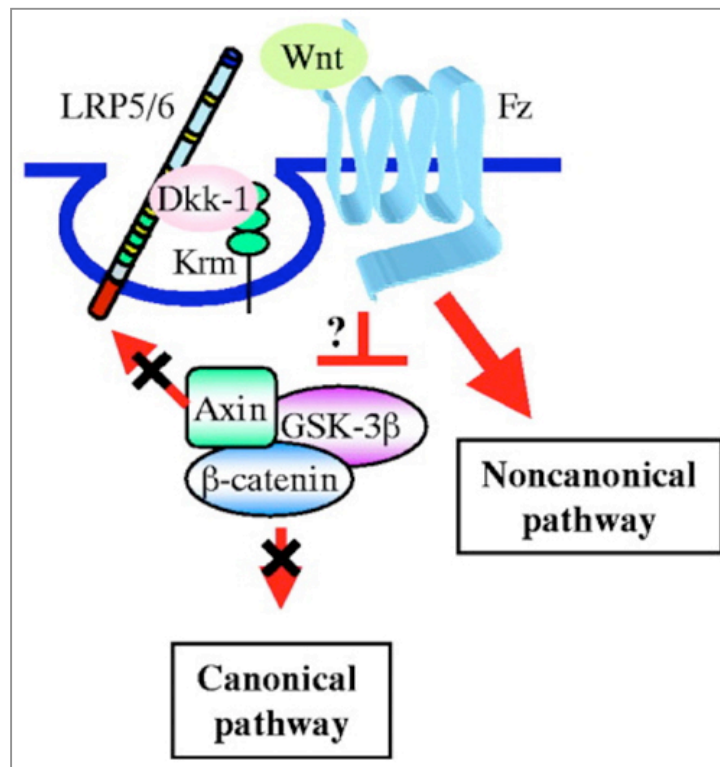


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Funktionsweise von Dkk Proteinen [modifiziert nach (Kawano und Kypta, 2003)]. Die Bindung von Dkk-1 an die Ko-Rezeptoren LRP5/6 und Kremen (Krm) führt zur Internalisation des ternären Komplexes. Nur der kanonische Zweig der Wnt Signaltransduktion wird durch den Mangel an Ko-Rezeptoren inhibiert.

Dkk Proteine binden an den LRP5/6 Ko-Rezeptor, sowie an die Transmembranproteine Kremen1 und Kremen2 (Mao *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2001; Semenov *et al.*, 2001). Der dadurch entstehende ternäre Komplex aus LRP5/6, Kremen und Dkk induziert die Endocytose des Komplexes und verringert die Anzahl an der Membran vorhandenen Wnt Rezeptoren (Mao *et al.*, 2002). Dkk Proteine sind in der Lage, kanonische Wnt Signaltransduktion zu unterdrücken, während nicht-kanonische Wnt Signale nicht auf LRP5/6 Ko-Rezeptoren angewiesen sind und in Folge dessen nicht inhibiert werden (Abb. 1.6).

1.2.4.2 Die sFRP Klasse

Zur Klasse der sogenannten „secreted Frizzled-related Proteins“ oder sFRPs zählen die sFRP Familie bestehend aus sFRP1 bis sFRP5, Sizzled, Sizzled2 und Crescent

sowie die Proteine Cerberus und WIF-1. Die Mitglieder der sFRP Familie besitzen eine ähnliche Cystein-reiche Wnt-Bindedomäne wie die „seven-span“ Frizzled Transmembranrezeptoren (Abb. 1.7). Diese Wnt-Bindedomäne zeigt 30 bis 50% Sequenzidentität zu Frizzled Rezeptoren und weist zehn konservierte Cystein-Reste auf (Melkonyan *et al.*, 1997). Die C-terminale Hälfte der sFRPs weist Ähnlichkeit zu Netrin auf, einem wichtigen Protein bei der axonalen Wegweisung. Eine solche Netrin-Homologiedomäne, bestehend aus zehn konservierten Cystein-Resten und hydrophoben Bereichen, wurde auch für Metalloproteasen und einige Komplementproteine beschrieben (Banyai und Patthy, 1999).

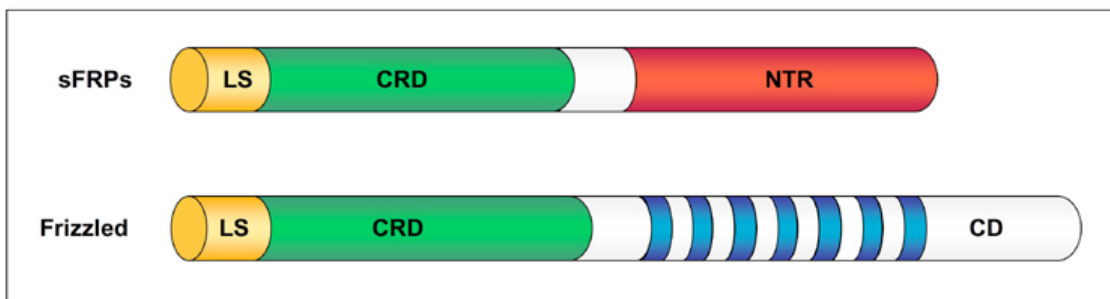


Abb. 1.7: Vergleich der Domänenstruktur von sFRP und Frizzled-Rezeptor Proteinen. Die sieben Transmembrandomänen der Frizzled Rezeptoren sind blau dargestellt. LS = Lokalisierungssequenz, CRD = Cystein-reiche Domäne, NTR = Netrin-Homologiedomäne, CD = C-terminale Domäne

Basierend auf der Sequenzhomologie werden sFRP1, sFRP2 und sFRP5 sowie sFRP3 und sFRP4 jeweils als eine Untergruppe der sFRP Familie bezeichnet. Sizzled, Sizzled2 und Crescent bilden eine dritte Untergruppe (Pera und De Robertis, 2000). Für Sizzled und Sizzled2 wurde keine signifikante Interaktion mit Wnt Proteinen nachgewiesen, sie konnten als BMP-Antagonisten identifiziert werden (Lee *et al.*, 2006).

Bei Cerberus handelt es sich um ein sekretiertes Protein, welches nicht nur Wnt, sondern auch TGF β -artige Signalmoleküle, wie beispielsweise BMP und Nodal, inhibieren kann (Piccolo *et al.*, 1999) Cerberus weist eine sogenannte „cysteine-knot“ Domäne auf, wie sie auch aus einigen Cytokinen bekannt ist (Piccolo *et al.*, 1999). WIF-1 ist ein Wnt Antagonist, der keine Frizzled-homologe Domäne, sondern eine sogenannte WIF Domäne, wie sie auch in Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der RYK Familie gefunden wurde, besitzt (Hsieh *et al.*, 1999; Patthy, 2000).

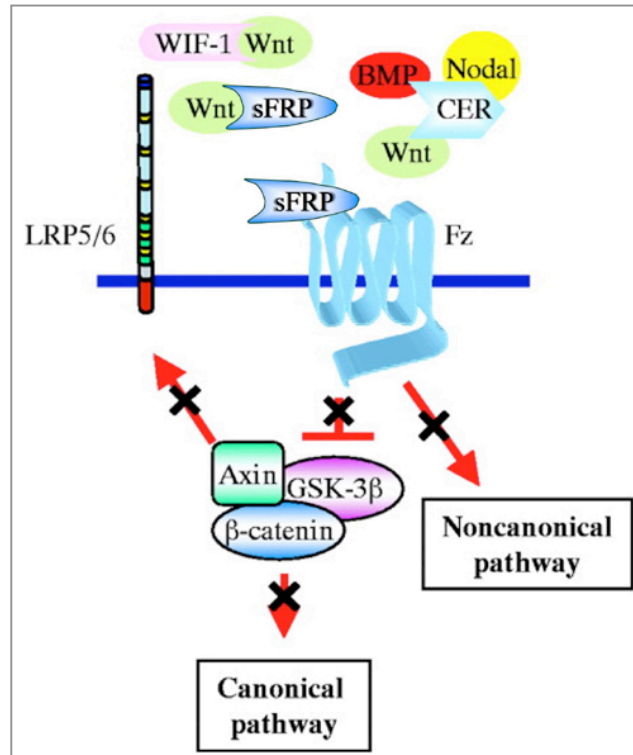


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Funktionsweise von „secreted Frizzled-related“ Proteinen [modifiziert nach (Kawano und Kypta, 2003)]. sFRP, WIF-1 und Cerberus (CER) Proteine binden im extrazellulären Raum direkt an ihre Liganden und verhindern dadurch die Entstehung funktionaler Rezeptor-Liganden-Komplexe. Sowohl kanonische als auch nicht-kanonische Wnt Signaltransduktion wird unterbunden.

Wie in Abb. 1.8 gezeigt, binden die sFRPs direkt an Wnt Proteine (Leyns *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998), es konnte für sFRP1 jedoch auch die Interaktion mit einem Frizzled Rezeptor, humanem Fz6, gezeigt werden (Bafico *et al.*, 1999). sFRP Proteine verhindern die Ausbildung eines funktionalen Wnt-Frizzled Rezeptor-Komplexes und sind so in der Lage, kanonische und nicht-kanonische Wnt Signale zu inhibieren (Abb. 1.8).

1.2.4.3 sFRP5 Orthologe

sFRP5 Orthologe wurden bereits in mehreren Modellorganismen beschrieben. Bovines sFRP5 wurde aus einer cDNA-Bank, welche für Transkripte des retinalen Pigmentepitheliums angereichert war, isoliert (Chang *et al.*, 1999). In dieser Studie konnte eine moderate Inhibition von Xwnt8-vermittelter Achsenduplikation in *Xenopus* Embryonen durch Ko-Injektion von bovinem sFRP5 erzielt werden (Chang *et al.*, 1999). Humanes sFRP5 (hSFRP5) wird ebenfalls in der Retina sowie im

adulten Pankreas exprimiert (Chang *et al.*, 1999). *Xenopus* sFRP5 wurde aus einer Herz-cDNA-Bank des Stadiums 46 gewonnen (Pilcher und Krieg, 2002). Die XsFRP5 Expression wurde in der Leberanlage sowie in Magen und Duodenum detektiert, wobei keine Expression von XsFRP5 während der Gastrulation festzustellen war (Pilcher und Krieg, 2002). Im Gegensatz dazu wird murines sFRP5 (Sfrp5) bereits während der Gastrulation im anterioren visceralen Entoderm (AVE) exprimiert (Finley *et al.*, 2003). In späteren Stadien wird Sfrp5 in der Region des Entoderms exprimiert, welche die Leber hervorbringt (Finley *et al.*, 2003). Kürzlich konnte jedoch in Sfrp5 „Knock-out“ Mäusen gezeigt werden, dass der Verlust von Sfrp5 keine Auswirkungen auf die Expression des Lebervorläuferzell-Markers Hex zeigt (Leaf *et al.*, 2006).

1.3 Die Rolle der Wnt Signaltransduktion bei der entodermalen Musterbildung in Vertebraten

1.3.1 Dorso-ventrale Achsenspezifikation in *Xenopus* Embryonen

Der kanonische Wnt Signalweg konnte in vielen Modellorganismen als essentiell für die Achseninduktion identifiziert werden. So führt der Verlust von β -Catenin in der Maus zu Defekten in der anterior-posterioren Körperachse (Morkel *et al.*, 2003), ebenso wie in Zebrafisch, wo der kanonische Wnt Signalweg durch den Einsatz eines dominant-negativen Frizzled Rezeptor blockiert wurde (Nasevicius *et al.*, 1998). Diese Rolle des kanonischen Wnt Signalweges in der Achsenspezifizierung scheint evolutionär sehr konserviert zu sein, denn auch die Körperachsen der Seeanemone, welche der Gattung *Cnidaria* angehört, werden durch Wnt Signale determiniert (Wikramanayake *et al.*, 2003).

In *Xenopus* kommt es nach dem Spermieeintritt in die animale Hälfte der Oocyte durch Mikrotubuli-Polymerisation zu einer directionalen Verschiebung des vegetalen Kortex und des kortikalen Cytoplasmas in Richtung der prospektiven dorsalen Seite (Larabell *et al.*, 1997). Dieser Prozess wird als kortikale Rotation bezeichnet. Schon länger ist bekannt, dass β -Catenin und Dishevelled Proteine durch die kortikale Rotation auf der dorsalen Seite angereichert werden und dort so zu einer Aktivierung

kanonischer Wnt Signaltransduktion führen (Miller *et al.*, 1999; Rowling *et al.*, 1997). Außerdem ist bekannt, dass die GSK3 β auf der dorsalen Seite des Embryos inhibiert wird (Dominguez und Green, 2000). Das legte die Vermutung nahe, dass der kanonische Wnt Signalweg auf der zukünftigen dorsalen Seite des Embryos durch einen extrazellulären Wnt Liganden aktiviert wird. Obwohl bislang ausschließlich der nicht-kanonischen Signalkaskade zugeordnet, konnte vor einigen Jahren Xwnt11 als vegetal lokalisierte Determinante des kanonischen Wnt Signalweges identifiziert werden. Nach der kortikalen Rotation löst sich die *Xwnt11* mRNA aus der kortikalen Verankerung und diffundiert in das Cytoplasma der dorsalen Zellen. Dort bewirkt die Translation von Xwnt11 eine Aktivierung des kanonischen Signalweges (Tao *et al.*, 2005).

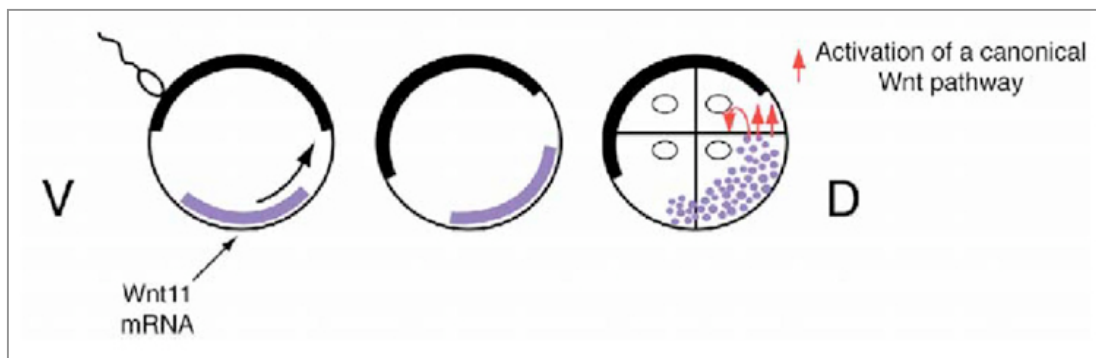


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der dorso-ventralen Achseninduktion in *Xenopus laevis* (Tao *et al.*, 2005). Vegetal lokalisierte *Wnt11* mRNA wird im Zuge der kortikalen Rotation auf die prospektive dorsale Seite des Embryos transloziert. Die *Wnt11* mRNA löst sich vom Kortex und diffundiert in das Cytoplasma der dorsalen Zellen. In frühen Teilungsstadien aktiviert das Wnt11 Protein (violette Punkte) den kanonischen Wnt Signaltransduktionsweg, wodurch es zu einer Stabilisierung von β -Catenin auf der dorsalen Seite des Embryos kommt.

Abb. 1.9 veranschaulicht das Prinzip der dorsalen Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges durch dorsal angereichertes Xwnt11 Protein in frühen *Xenopus* Teilungsstadien. Diese kanonische Signaltransduktion führt überlappend mit dem vegetalen Transkriptionsfaktor VegT und dem TGF β -artigen Liganden Vg1 zur Induktion des sogenannten Nieuwkoop Zentrums, welches wiederum durch die Sekretion von Nodal Faktoren im darüber liegenden Mesoderm den Spemann Organisator induziert. Werden Wnt Proteine, die in der Lage sind, den kanonischen Wnt Signalweg zu aktivieren, in frühen Teilungsstadien von *Xenopus laevis* ektopisch auf der ventralen Seite exprimiert, so hat dies die Ausbildung eines sekundären Nieuwkoop Zentrums zur Folge. Dadurch kommt es auch auf der

ventralen Seite zur Induktion dorsaler Strukturen, welche sich in späteren Stadien durch die Duplikation der dorsal-anterioren Körperachse ausprägen (Sokol *et al.*, 1991).

1.3.2 Die Bedeutung der Wnt Signaltransduktion bei der Differenzierung des Gastrointestinaltrakts

Die kanonische Wnt Signaltransduktion spielt für die Entwicklung vieler der entodermalen Organe, wie Leber, Lunge oder Pankreas, eine wichtige Rolle.

Beispielsweise konnte im Huhn gezeigt werden, dass Wnt3a über kanonische Wnt Signale die Größe und Form der entstehenden Leber wesentlich beeinflusst (Suksaweang *et al.*, 2004). Aus Zebrafisch ist bekannt, dass mesodermal exprimiertes Wnt2b für die Proliferation hepatischer Vorläuferzellen essentiell ist (Ober *et al.*, 2006).

Auch für die Pankreasentwicklung ließ sich ein regulatorischer Einfluss des Wnt Signalweges feststellen. So hat die Überexpression von β -Catenin in Mäuseembryonen zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung (E11.5) pankreatische Hypoplasie zur Folge, während die ektopische Aktivierung des kanonischen Signalweges zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung (E13.5) eine Überproliferation induziert (Heiser *et al.*, 2006). Nach Verlust von β -Catenin durch konditionalen „Knock-Out“ wurden Defekte in der Entwicklung des exokrinen und auch des endokrinen Pankreas beschrieben (Dessimoz *et al.*, 2005; Murtaugh *et al.*, 2005). Aber auch für nicht-kanonische Wnt Signale konnte eine Funktion in der Pankreasentwicklung beschrieben werden. So ist die Wnt5a vermittelte Signaltransduktion essentiell für die Migration endokriner Vorläuferzellen im Zebrafisch (Kim *et al.*, 2005b).

Die Inhibition der kanonischen Wnt Signaltransduktion scheint eine essentielle Rolle in der Lungenentwicklung zu spielen, da die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von β -Catenin im Lungenepithel von Mäuseembryonen die ektopische Expression intestinaler Markergene induzierte (Okubo und Hogan, 2004). Auch die Abgrenzung des Magens vom Duodenum bedarf der Inhibierung des Wnt

Signalweges. Es konnte gezeigt werden, dass die vom Homöobox-Transkriptionsfaktor Barx1 induzierte Synthese und Sekretion der Wnt Antagonisten sFRP1 und sFRP2 zur Spezifizierung des Magen-Epithels notwendig ist (Kim *et al.*, 2005a). Weiterhin führt ein gemeinsamer Funktionsverlust von TCF1 und TCF4 im Magen-Duodenumbereich zur anterioren Transformation (Gregorieff *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine genaue räumliche und zeitliche Regulation der Wnt Signalwege durch sekretierte Antagonisten einen wesentlichen Beitrag zur Etablierung einzelner Organanlagen zu leisten scheint.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle des sekretierten Wnt Antagonisten XsFRP5 während der Entwicklung entodermaler Organe in *Xenopus* Embryonen untersucht werden. Verschiedene Strategien wie Ko-Immunopräzipitation und Achsenduplikations-Experimente sollen Aufschluss über die Identität der mit XsFRP5 interagierenden Xwnt Proteine geben. Die Auswirkungen des Funktionsverlustes von XsFRP5 nach Injektion von „antisense“ Morpholino Oligonukleotiden auf die Musterbildung des Gastrointestinaltrakts soll anhand der Expression entodermaler Markergene analysiert werden. Eine mögliche Korrelation dieser Daten mit Ergebnissen, welche durch die entodermale ektopische Aktivierung des kanonischen Wnt Signalwegs erzielt wurden, soll überprüft werden. Der Einfluss von ektopisch exprimiertem XsFRP5 auf die Embryonalentwicklung wird ebenfalls untersucht. Zusätzlich soll ein möglicher Zusammenhang zwischen $\Delta Np63\alpha$ und der kanonischen Wnt Signaltransduktion anhand von Achsenduplikations-Experimenten aufgeklärt werden.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 *Xenopus laevis*

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Familie der zungenlosen Froschlurche (Pipidae) der Ordnung Anura. Pigmentierte und Albinofrösche wurden von der Firma Nasco (Ft. Atkinson, USA) erworben und gemäß den Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt. Die Bestimmung der Embryonalstadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber, 1967.

2.1.2 *Escherichia coli*

Es wurde der folgende *E. coli*-Stamm von Stratagene GmbH (Heidelberg, Deutschland) verwendet:

XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F⁺ proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)]^c

2.2 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biomol, Boehringer Mannheim, Gibco BRL, Merck, Roche, Roth, Sigma-Aldrich

2.3 Gebrauchswaren und Geräte

Gebrauchswaren und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystems, Biometra, Eppendorf, Falcon, Heinemann, Heraeus, Granich, Liebherr, Mytrom, Qiagen, Sarstedt, Sartorius, Scientific Industries, Schott, Schütt, Sorvall, Zeiss, Ziegler

2.4 Computer-Software

Textverarbeitung: Microsoft Office 2004

Bild- und Graphikbearbeitung: Adobe Photoshop 7.0, ImageQuant Version 5.2 (Amersham Biosciences)

Nukleotid- und Aminosäuresequenzbearbeitung: VectorNTI (Invitrogen)

Blast-Datenbanksuchmaschine: (Altschul *et al.*, 1990)

2.5 Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas bezogen.

CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase): Fermentas

GoTaq DNA-Polymerase: Promega Deutschland GmbH

Pfu DNA-Polymerase: Stratagene

Pyrophosphatase: Roche

T4 DNA-Ligase: Fermentas

Sp6, T3 und T7 RNA-Polymerasen: Stratagene GmbH

Reverse Transkriptase: Roche

RNase A, RNase T1: Fermentas

RNase-Out: Invitrogen

2.6 Molekulargewichtsstandards

2.6.1 DNA Marker

FastRuler™ DNA Ladder (low range, middle range, high range), Fermentas (St. Leon-Roth)

2.6.2 Protein Marker

Precision Plus Protein Dual Color Proteinmolekulargewichtsstandard, Biorad (München)

2.7 Reaktionssysteme (Kits)

2.7.1 DNA

QIAprep^R PCR Purification Kit: Qiagen GmbH

QIAEX^R Gel Extraction Kit: Qiagen GmbH

QIAquick^R Spin Mini Kit: Qiagen GmbH

QIAGEN Plasmid Mini / Midi Kit: Qiagen GmbH

illustraTM GFXTM PCR DNA und Gel Bund Purification Kit: GE Healthcare

illustraTM plasmidPrep Mini Spin Kit: GE Healthcare

pGEM^R-T / pGEM^R-Teasy Kit: Promega Deutschland GmbH

T_nT-Coupled Reticulocyte Lysate System: Promega Deutschland GmbH

Big Dye Terminator Kit: Applied Biosystems

2.7.2 RNA

RNAqueous^R-Micro Kit: Ambion Inc.

Sp6, T3 und T7 mMESSAGE mMACHINE Kit: Ambion Inc.

RNeasy^R Mini Kit: Qiagen GmbH

illustraTM RNA Spinmini Kit: GE Healthcare

2.7.3 Proteine

SuperSignal^R West Dura Extended Duration Substrate: Pierce Biotechnology

2.8 Vektoren und Konstrukte

2.8.1 pGEM-T und Derivate

pGEM^R-T und pGEM^R-Teasy: Promega Deutschland GmbH.

2.8.2 pCS2+ und Derivate

pCS2+: Dieser Vektor eignet sich zur Expression mikroinjizierter DNA und RNA in *Xenopus* Embryonen sowie zur *in vitro* Transkription und Translation. (<http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors>).

pCS2+/MT: Dieses Derivat von pCS2+ enthält sechs N-terminale c-Myc Epitope (Rupp *et al.*, 1994).

pCS2+/3'HA: Das Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) wurde, wie unter Punkt 3.2.7 beschrieben, in das mit XbaI linearisierte und dephosphorylierte pCS2+ Plasmid ligiert. Durch die Ligation der 3' BclI-Schnittstelle des dimerisierten HA-Fragments in die XbaI-Schnittstelle von pCS2+ ging diese Restriktionsschnittstelle verloren. Die 5' gelegene XbaI-Schnittstelle blieb erhalten und konnte in Folge zur Insertion verschiedener Fragmente N-terminal zum HA-Epitop benutzt werden.

pCS2+/5'GR: Die Ligandenbindedomäne (LBD) des humanen Glucocorticoidrezeptors (GR) wurde durch PCR (GR-BamHI-fw: 5'-CGG **ATC CAT** GAC CTC TGA AAA TCC TGG TAA C-3', GR-ClaI-rev: 5'-CCA **TCG ATC** TTT TGA TGA AAC AGA AG-3') amplifiziert, verdaut und in den mit BamHI und ClaI geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+ Vektor ligiert. Die GR-LBD enthält ein Startkodon.

pCS2+/GR: Die GR-LBD wurde in die XhoI / XbaI-Schnittstellen des pCS2+ Vektors kloniert (Y. Chen, unveröffentlicht).

2.8.3 Überexpressionskonstrukte und Konstrukte für whole-mount *in situ* Hybridisierungssonden

Die jeweiligen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in den PCR-Oligonukleotiden sind fett gedruckt.

2.8.3.1 Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten oder generiert wurden

pCDNA3/XsFRP2: Dieses Konstrukt enthält den kompletten offenen Leserahmen (ORF) von *Xenopus* sFRP2 (NM_001087194; Pera und DeRobertis, 2000). Zur Mikroinjektion geeignete CapRNA wurde vom XhoI-linearisierten Plasmid unter Verwendung der T7 Polymerase synthetisiert. Eine „antisense“ DIG-markierte Sonde für die *in situ* Hybridisierung wurde vom EcoRI-linearisierten Plasmid durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pBSK/XsFRP5: Der gesamte offene Leserahmen (ORF) von *Xenopus* sFRP5 im pBSK-Vektor wurde von Paul Krieg erhalten (Pilcher und Krieg, 2002). Die „Accession“-Nummer von XsFRP5 in der NCBI-Datenbank lautet AY164461.

pCS2+/XsFRP5: Der ORF von XsFRP5 (AY164461) wurde mittels PCR aus pBSK/XsFRP5 amplifiziert, mit ClaI / XhoI geschnitten und in den mit ClaI / XhoI geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+ Vektor ligiert. Die eingesetzten Oligonukleotide waren XsFRP5-EcoRI-fw (5'- CCA **TCG ATA** TGC GAT TTC AGT GGA ATA ATT TTT G-3') und XsFRP5-XhoI-rev (5'- CCG **CTC GAG** CGG AAG GAA CCC AAG TGT GAT CC-3'). Die *in vitro* Transkription von CapRNA erfolgte mit der SP6 Polymerase vom NotI-geschnittenen Plasmid.

pCS2+/XsFRP5-HA: Das Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) wurde, wie unter Punkt 3.2.7 beschrieben, in das mit XbaI geschnittene und dephosphorylierte pCS2+/XsFRP5 Konstrukt ligiert. Die das HA-Epitop enthaltenden Oligonukleotide waren HA-XbaI/BclI-fw (5'- **CTA GAC** TAC CCT TAC GAT GTA CCG GAT TAC GCA **A** -3') und HA-XbaI/BclI-rev (5'- **CTA GTT** GCG TAA TCC GGT ACA TCG TAA GGG TAG **T** -3'). Für die *in vitro* Synthese von CapRNA wurde das Konstrukt mit NotI geschnitten und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pCMV-SPORT6-5512233: Dieser Vollängenklon wurde bei Open Biosystems bestellt (Katalognummer MXL1736-9506888) und enthält den gesamten offenen Leserahmen (ORF) von *Xenopus* sFRP5 (CF285348.1).

pCS2+/UTR-MT-UFP: Der 5' untranslatierte Bereich (UTR) von *Xenopus* sFRP5 (AY164461) wurde mit den folgenden Oligonukleotiden aus pCMV-SPORT6-5512233 amplifiziert: 5'UTR_BamHI_fw (**CGGATCC**TCTCTCCTTACAGCTG) und 5'UTR_BamHI_rev (**CGGATCC**GTATCGCATGATTTCTC). Der 5' UTR wurde „in frame“ zum Startkodon des Myc-Epitops in die BamHI-Schnittstelle des pCS2+/MT-UFP Vektors ligiert. Für die Synthese von CapRNA wurde das Plasmid mit NotI geschnitten und mit der SP6 Polymerase abgelesen.

pGEMT/XsFRP5: Der XsFRP5 ORF wurde PCR-amplifiziert (XsFRP5-5'-Clal: 5'-**CCA TCG ATA** TGC GAT TTC AGT GGA ATA ATT TTT G-3', XsFRP5-3'-XhoI: 5'-**CCG CTC** GAG CGG AAG GAA CCC AAG TGT GAT CC-3') und nach Herstellerangaben in den pGEM^R-T Vektor kloniert.

pCS2+/hFz5: Der komplette ORF des humanen Frizzled 5 Rezeptor (NM_003468; He *et al.*, 1997) wurde von Michael Kühl erhalten. Für die Transkription von CapRNA wurde das Plasmid mit NsiI linearisiert und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pXT7/Xwnt2b: Der komplette ORF von *Xenopus* Wnt2b entstammt dem Labor von Sergei Sokol (Landesman und Sokol, 1997). Für die Transkription von CapRNA wurde das Plasmid mit Sall geschnitten und durch die T7 Polymerase abgelesen. Für die *in vitro* Transkription einer Digoxigenin-markierten Sonde wurde das Plasmid mit HindIII geschnitten und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pCS2+/MT-Xwnt2b: Der *Xenopus* Wnt2b ORF wurde aus dem pXT7/Xwnt2b Konstrukt mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen lauten myc-Xwnt2b-EcoRI-fw (5'- **CCG AAT TCA** ATG CAT TTT GCT TAT ATT TTA ATA C-3') und myc-Xwnt2b-XhoI-rev (5'- **CAC TCG AGT** GTT TGG TCT AGC CAT TC-3'). Das geschnittene PCR-Produkt wurde in den mit EcoRI / XhoI geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+/MT Vektor ligiert. Für die *in vitro* Synthese von CapRNA wurde das Konstrukt mit NotI geschnitten und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pCS2+/MT-Xwnt3a: Der *Xenopus* Wnt3a ORF wurde mittels folgender Oligonukleotide aus pGEM^R-2/Wnt-3a (Wolda *et al.*, 1993) durch PCR amplifiziert: myc-Xwnt3a-EcoRI-fw (5'- **CGA ATT CAA** TGG GCT GCT TTG GST ATT TG-3') und myc-Xwnt3a-XbaI-rev (5'- **CCT CTA GAC** TTG CAG GTG TGA ACG TC-3'). Das geschnittene PCR-Produkt wurde in das mit EcoRI / XbaI geschnittene und dephosphorylierte pCS2+/MT Plasmid ligiert. Zur *in vitro* Synthese von CapRNA wurde das Konstrukt mit NotI geschnitten und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pSP64T/Xwnt4-MT: Dieses Konstrukt enthält den ORF von *Xenopus* Wnt4 (NM_001087728) und stammt aus dem Labor von Randy Moon (Maurus *et al.*, 2005). Es enthält ein C-terminales Myc-Epitop. Vom Sall-geschnittenen Plasmid wurde mittels der SP6 Polymerase CapRNA geschrieben.

pCS2+/MT-Xwnt4: Der *Xenopus* Wnt4 ORF wurde mittels PCR aus pSP64T/Xwnt4-MT amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide sind myc-Xwnt4-XhoI-fw2 (5'- **GAT CT GAG** ATG ACC CCA GAG T-3') und myc-Xwnt4-XbaI-rev (5'- **CAT CTA GAC** CGG CAT GTG TGC ATT TC-3'). Das geschnittene PCR-Produkt wurde in das mit XhoI und XbaI geschnittene und dephosphorylierte pCS2+/MT Plasmid ligiert. CapRNA wurde von dem NotI-geschnittenen Plasmid durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pSP64T/Wnt5a: Dieses Konstrukt mit dem kompletten *Xenopus* Wnt5a ORF wurde von Moon *et al.* (1993) publiziert und von Michael Kühl erhalten. Zur *in vitro* Synthese von CapRNA wurde das Konstrukt mit XbaI geschnitten und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pCS2+/MT-Xwnt5a: Der *Xenopus* Wnt5a ORF wurde durch PCR aus pSP64T/Wnt5a mit den Oligonukleotiden 5'-Xwnt5a-EcoRI-fw (5'- **CGA ATT CAA** TGA GAA AGA ATC TGT G-3') und 3'-Xwnt5a-XhoI-rev (5'- **CAC TCG AGC** TAC TTG CAT GCA AAC TG-3') amplifiziert. Das geschnittene PCR-Produkt wurde in das mit EcoRI und XhoI geschnittene und dephosphorylierte pCS2+/MT Plasmid ligiert. CapRNA wurde vom NotI-geschnittenen Plasmid durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pCS2+/MT-Xwnt8: Der *Xenopus* Wnt8 ORF wurde aus pSP64T/X-wnt8-myc (Christian *et al.*, 1991) mit den Oligonukleotiden myc-Xwnt8_EcoRI_fw (CCG AAT TCA ATG CAA AAC ACC ACT TTG) und myc-Xwnt8_XhoI_rev (CAC TCG AGT CTC CGG TGG CCTCTG TTC) PCR-amplifiziert, geschnitten und in den ebenfalls mit EcoRI / XhoI-geschnittenen pCS2+/MT Vektor ligiert. Für die *in vitro* CapRNA Synthese wurde das Plasmid mit NotI linearisiert und durch die SP6 Polymerase abgelesen.

pSP64T/Xwnt8b: Dieses Konstrukt enthält den kompletten *Xenopus* Wnt8b ORF (NM_001090285) sowie die ersten 30 Aminosäuren von *Xenopus* Wnt8 als N-terminale Signalsequenz (Cui *et al.*, 1995). CapRNA wurde von dem Sall-geschnittenen Plasmid durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pGEM/Xwnt8b(2.2): Dieses Konstrukt von Jan Christian enthält den *Xenopus* Wnt8b (Cui *et al.*, 1995) ORF (NM_001090285). Um die *in vitro* Transkription einer Digoxigenin-markierten *in situ* Sonde zu ermöglichen, wurde das Plasmid mit NcoI geschnitten und mit der SP6 Polymerase abgelesen.

pCS2+/MT-Xwnt8b: Der *Xenopus* Wnt8b ORF (NM_001090285) wurde mit den Oligonukleotiden myc-Xwnt8b_XhoI_fw (CCC TCG AGA TGC AAA ACA CCACTT TG) und myc-Xwnt8b_NheI_rev (CCC CGC TAG CAA GTT TCT TCT TAA G) PCR-amplifiziert, restriktionsendonukleolytisch gespalten und in den ebenfalls mit XhoI / XbaI-geschnittenen pCS2+/MT Vektor ligiert.

pCS2+/MT-Xwnt11: Aus dem Plasmid pGEM^R-7 Zf(+)/Wnt11 wurde der *Xenopus* Wnt11 ORF (Ku und Melton, 1993) mit folgenden Oligonukleotiden PCR-amplifiziert: myc-Xwnt11_EcoRI_fw (CGA ATT CAA TGG CTC CGA CCC GTC AC) und myc-Xwnt11_XhoI_rev (CAC TCG AGT TGC AGA CAT ACC TCT C). Das geschnittene PCR-Produkt wurde in den ebenfalls mit EcoRI / XhoI-geschnittenen pCS2+/MT Vektor ligiert. Die *in vitro* Transkription von CapRNA erfolgte vom NotI-linearisierten Plasmid durch die SP6 Polymerase.

pBS/Xwnt11R: Der Vollängen-cDNA Klon von *Xenopus* Wnt11R (NM_001093610) stammt aus dem Labor von Paul Krieg (Garriock *et al.*, 2005). Eine Digoxigenin-

markierte Sonde für die whole-mount *in situ* Hybridisierung wurde vom NotI-linearisierten Plasmid mit T7 Polymerase hergestellt.

pCS2+/Xwnt11R: Der ORF von *Xenopus* Wnt11R (NM_001093610) wurde mit den Oligonukleotiden Xwnt11R_fw (CCC **ATC GAT** ATG AAG ATT TAT TTT CTG) und Xwnt11R_rev (CAC **TCG AGT** TTG CAC ACA TAC C) aus pBS/Xwnt11R amplifiziert, geschnitten und in den ebenfalls ClaI / XbaI-geschnittenen pCS2+ Vektor ligiert. Die Transkription von CapRNA erfolgte von dem NotI-geschnittenen Plasmid durch die SP6 Polymerase.

pCS2+/MT-Xwnt11R: Mit Hilfe der Oligonuklotide myc-Xwnt11R_XhoI_fw (CAC **TCG AGA** TGA AGA TTT ATT TTC TG) und myc-Xwnt11R_XbaI_rev (CAT **CTA GAT** CAT TTG CAC ACA TAC CG) wurde der *Xenopus* Wnt11R ORF (NM_001093610) aus pBS/Xwnt11R amplifiziert, geschnitten und in den ebenfalls XhoI / XbaI-geschnittenen pCS2+/MT Vektor ligiert. Die Transkription von CapRNA erfolgte von dem NotI-geschnittenen Plasmid durch die SP6 Polymerase.

pSP64T/Lef1: Dieses Konstrukt enthält murines Lef1 [NM_010703; (Behrens *et al.*, 1996)]. *In vitro* CapRNA konnte nach Linearisierung mit XbaI durch die SP6 Polymerase synthetisiert werden.

pCS2+/Lef1-GR: Murines Lef1 (NM_010703) wurde mit den Oligonukleotiden Lef1-ClaI-fw (5'-CAT **CGA TAT** GCC CCA ACT TTC CGG AG-3') und Lef1-XhoI-rev (5'-GAC **TCG AGG** ATG TAG GCA GCT GTC ATT C-3') aus pSP64T/Lef1 amplifiziert, mit ClaI und XhoI verdaut und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+/GR Vektor kloniert. CapRNA wurde nach Linearisierung mit NotI durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pSP64T/Lef Δ BD: Dieses Konstrukt enthält C-terminal trunkiertes, murines Lef1 [(NM_010703; Behrens *et al.*, 1996)]. *In vitro* CapRNA konnte nach Linearisierung mit XbaI durch die SP6 Polymerase synthetisiert werden.

pCS2+/Lef Δ BD-GR: Unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide wurde N-terminal trunkiertes, murines Lef1 (NM_010703) amplifiziert: Lef Δ BD-Clal-fw (5'-**CAT CGA TAT GGG CCT GTA CAA CAA GG**-3') und Lef1_XhoI_rev (5'-**GAC TCG AGG ATG TAG GCA GCT GTC ATT C**-3'). Das PCR-Produkt wurde mit Clal und XhoI geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+/GR Vektor kloniert. CapRNA wurde nach Linearisierung mit NotI durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pSP64T/Lef Δ HMG: Dieses Konstrukt enthält N-terminal trunkiertes, murines Lef1 [(NM_010703; Behrens *et al.*, 1996)]. *In vitro* CapRNA konnte nach Linearisierung mit XbaI durch die SP6 Polymerase synthetisiert werden.

pCS2+/Lef Δ HMG-GR: Durch Verwendung der folgenden Oligonukleotide wurde C-terminal trunkiertes, murines Lef1 (NM_010703) amplifiziert: Lef1_Clal_fw (5'-**CAT CGA TAT GCC CCA ACT TTC CGG AG**-3') und Lef1-XhoI_rev (5'-**GAC TCG AGG ATG TAG GCA GCT GTC ATT C**-3'). Das PCR-Produkt wurde mit Clal und XhoI geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+/GR Vektor kloniert. CapRNA wurde nach Linearisierung mit NotI durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pCS2+/ β -CateninS33A: Murines β -Catenin (NM_007614) enthält mehrere Punktmutationen, welche zu den folgenden Aminosäure-Substitutionen führen: Serin33 \rightarrow Alanin, Serin37 \rightarrow Alanin, Tyrosin41 \rightarrow Alanin; und wird so nicht mehr der proteasomalen Degradation zugeführt (Aberle *et al.*, 1997). CapRNA wurde nach Linearisierung mit NotI durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

pCS2+/ β -CatS33A-GR: Stabilisiertes β -CateninS33A wurde mit Hilfe der Oligonukleotide β -CatS33A-BamHI-fw (5'-**CGG ATC CAT GGC TAC TCA AGC TG**-3') und β -CatS33A-Clal_rev (5'-**CAT CGA TCA GGT CAG TAT CAA ACC**-3') amplifiziert, mit BamHI und Clal geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten pCS2+/GR Vektor ligiert. CapRNA wurde nach Linearisierung mit NotI durch die SP6 Polymerase synthetisiert.

2.8.3.2 Konstrukte zur Herstellung von CapRNA oder markierten „antisense“ Sonden aus dem Laborbestand

Tabelle 2.1: Konstruktliste zur *in vitro* Transkription von CapRNA (sense) und Digoxigenin-markierten Sonden („antisense“)

Konstrukt	Referenz	Linearisierung mit	Transkription mit
pCS2+/ Δ Np63 α	Y. Chen, unveröffentlicht	NotI	SP6 („sense“)
pCS2+/ β -Gal	(Bier <i>et al.</i> , 1989)	NotI	SP6 („sense“)
pGEMT/Nkx2.1	(Holleman und Pieler, 2000)	NotI	T7 („antisense“)
pGEMT/XPtf1a/p48	(Afelik <i>et al.</i> , 2006)	NotI	T7 („antisense“)
pGEMT/XIHbox8	(Afelik <i>et al.</i> , 2006)	NotI	T7 („antisense“)
pBSK/Hex	(Newman <i>et al.</i> , 1997)	NotI	T7 („antisense“)
pBK-CMV/XPDIp	(Afelik <i>et al.</i> , 2004)	BamHI	T7 („antisense“)
pCS2+/fibrinogen α	(Chen <i>et al.</i> , 2003)	NcoI	T3 („antisense“)
pBSK/Sox2	(Chalmers <i>et al.</i> , 2000)	EcoRI	T7 („antisense“)

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 RT-PCR Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 μ M in dH₂O bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.2: Liste aller in dieser Arbeit zur Anwendung gekommener Oligonukleotide für die RT-PCR Analyse

Name	5' - 3' Sequenz	T _M (°C)	Zyklenzahl
XsFRP5 vorwärts	AGGTCCTTAAAGCAGGGAAG	60	36
XsFRP5 rückwärts	GCGATGGTGGCACTTAAAG		
Histon H4 vorwärts	CGGGATAACATTCAGGGTATCACT	56	26
Histon H4 rückwärts	ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT		
XTwist vorwärts	AGAACCTGGAGCTGGATC	56	30
XTwist rückwärts	GGCTTCAAAGGCACGACT		
Ptf1a/p48 vorwärts	GAGAAGCGACTGTCCAAG	54	33
Ptf1a/p48 rückwärts	CATCAGTCCATGAGAGAG		

Name	5' - 3' Sequenz	T _M (°C)	Zykluszahl
XIHbox8 vorwärts	AATCCACCAAATCCCACACCT	56	36
XIHbox8 rückwärts	GCCTCAGCGACCCAATAGAA		
Insulin vorwärts	ATGGCTCTATGGATGCAGTG	56	35
Insulin rückwärts	AGAGAACATGTGCTGTGGCA		
XPDlp vorwärts	GGAGGAAAGAGGGACCAA	60	33
XPDlp rückwärts	GCGCCAGGGCAAAAGTG		
Hex vorwärts	GGTTCCAGAACAGAAGAG	56	30
Hex rückwärts	CCTTTGTGCGCTTCAATG		
Ttr vorwärts	GGAATCCCCGCTGCCAATC	56	36
Ttr rückwärts	ATGAGAAGGAGTAGGGGGTGAGC		
Sox2 vorwärts	GAGGATGGACACTTATGCCAC	59	26
Sox2 rückwärts	GGACATGCTGTAGGTAGGCGA		
Xwnt2b vorwärts	ACTGGGAGCAAGGGTTATCTGTG	65	32
Xwnt2b rückwärts	GCCCGTGCATCTTTCAATCTTTTC		
Xwnt3a vorwärts	TTGCGCTGAGGGATCTGCTACC	65	32
Xwnt3a rückwärts	CCCCGGGATTCTCGATGTTTCT		
Xwnt4 vorwärts	ACTGGCTGTACCTGGCAAAACTGT	65	32
Xwnt4 rückwärts	AAATGACTGGGAAAAGGCGACTC		
Xwnt5a vorwärts	TGGGCTATCGCAGGGTCAGAAGAA	70	32
Xwnt5a rückwärts	CACAGCCGCCCATAGCCAGT		
Xwnt8 vorwärts	TGTGGCCGGTCTGAACTTATTTT	65	32
Xwnt8 rückwärts	GTCATCTCCGGTGGCCTCTGTTCT		
Xwnt8b vorwärts	CCGGACGAAAGGCAGTAAAGAGTA	65	32
Xwnt8b rückwärts	TAACGGCTAAACCACAGTCACCAC		
Xwnt11 vorwärts	CCGGGTGGCCTGGAATGAGAGC	65	32
Xwnt11 rückwärts	CACAGGCACGCGCAATGGTATGG		
Xwnt11R vorwärts	GATTCACGCAGCATAATGGC	63	32
Xwnt11R rückwärts	GTGCTGGGTCTGATTCAACG		

2.9.2 Sequenzierungsoligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100µM in dH₂O bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.3: Liste der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Sequenzierungsoligonukleotide

Name des Oligonukleotides	5´- 3´ Sequenz des Oligonukleotides
SP6	TTAGGTGACACTATAGAATAC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7 (pCS2+)	TCTACGTAATACGACTCACTATAG
T7 (pGEM-T)	TAATACGACTCACTATAGGGCGA
SP6 (pCMV-Sport6)	CTATTTAGGTGACACTATAG
T7 (pCMV-Sport6)	TAATACGACTCACGTATAGGG
Lef1-internal1	GTC AGA TGT CAA CTC CAA GC
Lef1-internal2	GAA GCC TCA ACA CGA ACA GAG

2.9.3 Morpholino Oligonukleotide

Morpholino Oligonukleotide wurden von der Firma Gene Tools erworben. Die Morpholinos wurden in RNase-freiem Wasser ad 300mM gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Das ATG von *Xenopus* sFRP5 in der korrespondierenden Sequenz der Morpholino Oligonukleotide ist fett gedruckt. Die fünf „Mismatch“-Basen im MM-XsFRP5-Morpholino sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten „antisense“ Morpholino Oligonukleotide

Name des Morpholinos	5´- 3´ Sequenz des Morpholinos
XsFRP5-Mo1	ATCG CAT GATTTCTCCAAAAAGTGG
MM-XsFRP5-Mo1	AT <u>GG</u> CAT <u>CAT</u> <u>TCT</u> <u>CG</u> AAAA <u>ACT</u> GG
XsFRP5-Mo2	TTTAACCCAAAGGCTTATCCTCCTG

2.10 Antikörper

2.10.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.5: Aufstellung der zur Anwendung gebrachten primären Antikörper

Antikörper	Firma	Katalognummer	WB	CoIP
Goat anti-Myc IgG	Abcam/Biozol	ab19234	1:10.000	-
Mouse anti-HA IgG	Covance	MMS-101 P	1:1.000	1:150
Mouse anti-Actin IgG	Chemicon	MAB1501	1:5.000	-

2.10.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.6: Aufstellung der zur Anwendung gebrachten sekundären Antikörper

Antikörper	Firma	Katalognummer	WB
Donkey anti-Goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2020	1:10.000
Goat anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2005	1:5.000

2.11 Medien und Stammlösungen

100x Denhardts: 2% (w/v) BSA, 2% (w/v) PVP, 2% (v/v) Ficoll

DEPC-H₂O: 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat, vor dem Autoklavieren über Nacht rühren

EDTA-Lösung: 1M EDTA, pH 8,0

EGTA-Lösung: 0,5M EDTA

Ethidiumbromid-Lösung: 10mg/ml Ethidiumbromid

Kaliumchlorid-Lösung: 1M KCl

Lithiumchlorid-Lösung: 4M LiCl

1M Tris-Puffer (pH 7,5 – 9,0): 1M Tris-HCl

Tween 20-Lösung: 20% (v/v) Tween

Magnesiumchlorid-Lösung: 1M MgCl₂ · 6 H₂O

Magnesiumsulfat-Lösung: 1M MgSO₄ · 7 H₂O

5M Natriumchlorid: 5M NaCl

SDS-Lösung: 10% (w/v) Natrium-Dodecyl-Sulfat

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Anzuchtbedingungen

Luria-Bertani-Medium: 32g LB-Medium / L dH₂O (autoklaviert, bei 4°C gelagert)

Ampicillin: 100µg / ml dH₂O

E. coli Flüssigkulturen (LB / Amp) wurden bei 220Upm und 37°C über Nacht inkubiert. Die Anzucht von *E. coli* auf Agarplatten (LB / Amp) erfolgte bei 37°C über Nacht.

3.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Hanahan-Methode hergestellt (Sambrook und Russel, 2001).

3.1.3 Chemische Transformation von Bakterienzellen

Die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente *E. coli* Zellen erfolgte wie in Sambrook und Russel (2001) beschrieben.

3.1.4 Anlegen von Glycerol-Stammkulturen

500µl einer Übernacht-Flüssigkultur wurden mit 500µl autoklaviertem 87%-igem Glycerol versetzt, gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen und präparativen Maßstab

3.2.1.1 TELT-Präparation

TELT-Lösung: 50mM Tris-HCl pH7,5, 62,5mM EDTA, 2,5M LiCl, 0,4% Triton X-100

Lysozym: 10mg / ml Lysozym in dH₂O

3ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und das Sediment anschließend in 150µl TELT-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 15µl Lysozym wurde der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur, 2 Minuten bei 90°C und anschließend 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und die DNA durch Zugabe von 150µl Isopropanol bei -20°C ausgefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation wurde das Sediment mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in P1 Puffer von Qiagen aufgenommen und 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA ein weiteres Mal in Isopropanol ausgefällt, mit Ethanol gewaschen und das Sediment in dH₂O aufgenommen.

3.2.1.2 Mini-Präparation

Die Präparation von DNA aus einer 5ml Übernachtskultur erfolgte mittels des QIAGEN Plasmid Mini / Midi Kit (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben.

3.2.1.3 Midi-Präparation

Die Präparation von DNA aus einer 50ml Übernachtskultur erfolgte mittels des QIAGEN Plasmid Mini / Midi Kit (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 1µg/µl verdünnt.

3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde in einem Spektralphotometer (Amersham Biosciences) bei 260nm Wellenlänge gegen einen Leerwert ermittelt. Die Konzentration ergab sich aus der OD_{260} wie folgt:

$OD_{260} = 1$ entspricht $50\mu\text{g dsDNA}$

$OD_{260} = 1$ entspricht $40\mu\text{g RNA}$

Es wurde das automatische Programm des Photometers genutzt, um die Konzentration zu bestimmen. Um eine Kontamination der Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen auszuschließen, sollte der Quotient von OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 für DNA und 2,0 für RNA liegen.

3.2.2 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

10x TAE: 400mM Tris Base, 200mM Essigsäure, 1mM EDTA

Gelauftragspuffer: 30% (v/v) Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol in dH_2O

Die Agarose-Gele (1 – 2%) wurden nach Sambrook und Russel (2001) hergestellt. Nach der Auftrennung der DNA- oder RNA-Proben wurden diese durch die Inkorporation von Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX^R Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) und dem illustraTM GFXTM PCR DNA und Gel Bund Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben.

3.2.4 Aufreinigung von PCR Fragmenten und Restriktionsansätzen

Die Aufreinigung von PCR Fragmenten und Restriktionsansätzen erfolgte mit dem QIAprep^R PCR Purification Kit (Qiagen GmbH) sowie dem illustraTM GFXTM PCR DNA und Gel Bund Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben.

3.2.5 Restriktionsendonukleolytische Spaltung von DNA

3.2.5.1 Spaltung von PCR-Termini

Die Klonierungsprimer waren entsprechend der Tabelle 1.21. „Cleavage Efficiency Close to the Termini of PCR Fragments“ (Fermentas Katalog, 2006/2007) mit 5' Überhängen versehen worden. Nach einer Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte die endonukleolytische Spaltung über Nacht.

3.2.5.2 Spaltung von Vektoren und Plasmiden

Zur analytischen wie präparativen Restriktionsspaltung von DNA wurde diese mit 1U bis maximal 5U einer Restriktionsendonuklease im entsprechenden 10x Reaktionspuffer bei 37°C für mindestens 1 Stunde inkubiert.

3.2.5.3 Linearisierung von „sense“ und „antisense“ Matrizen für die RNA-Synthese

10µg „Template“-DNA wurde in einem 50µl Ansatz mit 4U des entsprechenden Restriktionsenzym sowie des mitgelieferten 10x Puffers (Fermentas) über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation kompatibler DNA-Enden zu verhindern, wurden die Vektoren während des Restriktionsverdaus mit 1U CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) inkubiert (Sambrook und Russel, 2001).

3.2.7 Oligomerisierung kurzer DNA-Fragmente

Kurze Oligonukleotide, die mit überhängenden Enden versehen waren, wurden separat in einer Kinase-Reaktion phosphoryliert:

Oligonukleotid (5µg/µl)	2µl
10x Puffer (+ ATP)	2µl
HPLC-H ₂ O	15µl
PNK NEB T4 Kinase	1µl

Die Kinase-Reaktion wurde wie folgt im Thermozykler durchgeführt:

30 Minuten	37°C
20 Minuten	65°C
∞	12°C

Die Dimerisierung der phosphorylierten Oligonukleotide erfolgte nach folgendem Ansatz:

Oligo fw	2µl
Oligo rev	2µl
500mM Tris-HCl pH 7,5	2µl
500mM NaCl	2µl
H ₂ O	12µl

Fünf Minuten Inkubation in einem 90°C Wasserbad, gefolgt von einer langsamen Abkühlungsphase, dienen der Dimerisierung der gegenläufigen Oligonukleotide. Der Probenansatz musste sofort zur Ligation benutzt werden.

3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation kompatibler DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von T4 DNA Ligase (Fermentas) in einem 10µl Ansatz unter Verwendung des mitgelieferten 10x Puffers (Fermentas). Der Vektor und das zu inserierende Fragment wurden dazu in Verhältnissen von 1:1 bis 1:10 eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden bzw. bei 16°C über Nacht (nach Sambrook und Russel, 2001).

3.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.9.1 Analytischer Maßstab

Um nach der Transformation auf positive Bakterienklone zu testen, wurden einige Zellen einer Kolonie mit Hilfe des „GoTaq“ Reaktionssystems (Promega) einer PCR-Reaktion unterzogen.

3.2.9.2 Präparativer Maßstab

Alle Klonierungsoligonukleotide wurden mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen versehen, um so für die folgenden Klonierungsschritte passende Fragmente generieren zu können (Sambrook und Russel, 2001). Für die Präparation der PCR-Produkte wurde jeweils ein 80µl Ansatz eingesetzt.

3.2.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit dem Big Dye Terminator Kit von Applied Biosystems. Die Proben wurden in einem ABI 3100 Automated Capillary DNA Sequencer ausgewertet (Applied Biosystems).

3.3 Arbeiten mit RNA

Zum Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich DNase- und RNase-freie Gefäße und Lösungen verwendet.

3.3.1 *in vitro* Synthese von RNA

3.3.1.1 *in vitro* Transkription von Monomethylguanodin-Cap-RNA zur Mikroinjektion in *Xenopus* Embryonen

Zur *in vitro* Transkription von CapRNA wurde das mMACHINE Kit mit SP6 oder T7 RNA-Polymerasen (Ambion) verwendet. Das übliche Volumen eines Transkriptionsansatzes betrug 10µl und die Reaktion erfolgte für 3 Stunden bei

37°C. Anschließend wurde die „Template“-DNA durch Zugabe von 1µl RNase-freier DNase für 15 Minuten bei 37°C verdaut.

3.3.1.2 *in vitro* Transkription Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Alle in dieser Arbeit eingesetzten „antisense“-Sonden wurden durch Verwendung von Digoxigenin-gekoppelten UTP markiert.

Die *in vitro* Transkription erfolgte nach folgendem Ansatz für 3 Stunden bei 37°C:

5µl	5x Transkriptionspuffer	(Fermentas)
4µl	Digoxigenin-11-dUTP Mix	(Roche)
1µl	DTT (0,75M)	(Merck)
5µl	linearisiertes Plasmid (ca. 170ng/µl)	
0,5µl	RNase-Out	(Invitrogen)
0,5µl	Pyrophosphatase	(Fermentas)
0,5µl	RNA-Polymerase	(Fermentas)
33,5µl	DEPC-H ₂ O	

Anschließend wurde die Template-DNA durch Zugabe von 1µl RNase-freier DNase für 15 Minuten bei 37°C verdaut.

3.3.2 Aufreinigung von RNA

Die Aufreinigung der *in vitro* transkribierten RNA erfolgte mittels des RNeasy^R Mini Kit (Qiagen GmbH) oder des illustraTM RNA Spinmini Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben.

3.3.3 Whole-mount *in situ* Hybridisierung

Ethanol-Reihe: 100% Ethanol, 75% Ethanol in Wasser, 50% Ethanol in Wasser, 25% Ethanol in PTw

10x PBS: 1,75M NaCl, 1M KCl, 65mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄, pH 7,4

PTw: 0,1% (v/v) Tween-20 in 1x PBS

PTw/FA: 4% (v/v) Formaldehyd in Pt w

Proteinase K: 5µg/ml Proteinase K in PTw

Hybridisierungs-Mix: 50% Formamid (deionisiert), 1mg/ml Torula-RNA, 10µg/ml Heparin, 1x Denhardts, 0,1% Tween-20, 0,1% CHAPS, 10mM EDTA in 5x SSC

20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat

RNase-Lösung: 10µg/ml RNase A, 0,01 U/ml RNase T1 in 2x SSC

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

MAB/BMB: 2% BMB in 1x MAB

MAB/BMB/HS: 2% BMB, 20% Pferdeserum (HS) in 1x MAB

Antikörper-Lösung: 2% BMB, 20% Pferdeserum (HS), 1:2.000 Verdünnung des an Alkalische Phosphatase gekoppelt anti-Digoxigenin Antikörpers in 1x MAB

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

Färbelösung: 80µg/ml NBT, 175µg/ml BCIP in APB

BCIP: 50mg/ml in 100% Dimethylformamid, bei -20°C gelagert

NBT: 100mg/ml in 70% Dimethylformamid, bei -20°C gelagert

Die whole-mount *in situ* Hybridisierung wurde im Wesentlichen wie beschrieben durchgeführt (Harland, 1991; Hollemann *et al.*, 1999). Alle „antisense“ RNA-Sonden wurden mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Die Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler.

3.3.3.1 Fixierung von *Xenopus* Embryonen und Explantaten

10x MEM: 1M Mops, 20mM EGTA, 10mM MgSO₄, pH 7,4 (steril filtriert und im Dunkeln gelagert)

MEMFA: 4% (v/v) Formaldehyd in 1x MEM

10x PBS: 1,75M NaCl, 1M KCl, 65mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 18mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4

Xenopus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien wurden in MEMFA eingelegt. Embryonen, die keiner whole-mount *in situ* Hybridisierung unterzogen werden sollten, wurden für mindestens eine Stunde fixiert, zur Auswertung in 1x MEM überführt und anschließend in MEMFA dauergelagert.

Embryonen, die einer *in situ* Hybridisierung unterzogen werden sollten, wurden eine Stunde in MEMFA fixiert, mit 100% Ethanol gewaschen und anschließend bei -20° C gelagert. Embryonen, deren Entoderm explantiert werden sollte, wurden 45 Minuten anfixiert, in 1x PBS gewaschen und das Entoderm explantiert. Die Explantate wurden entweder einer β-Galaktosidase Färbung unterzogen oder sofort für 15 Minuten refixiert und in Ethanol gelagert.

3.3.3.2 β -Galaktosidase Färbung von Embryonen

10x PBS: 1,75M NaCl, 1M KCl, 65mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 18mM KH_2PO_4 , pH 7,2-7,4

10x MEM: 1M Mops, 20mM EGTA, 10mM MgSO_4 , pH 7,4 (steril filtriert und im Dunkeln gelagert)

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: 0,5M in dH_2O (im Dunkeln gelagert)

$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$: 0,5M in dH_2O (im Dunkeln gelagert)

X-Gal: 40mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galaktosidase (X-Gal) in Formamid (bei -20°C im Dunkeln gelagert)

MEMFA: 4% (v/v) Formaldehyd in 1x MEM

β -gal Färbelösung: $5\mu\text{M}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5\mu\text{M}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $2\mu\text{M}$ MgCl_2 , 1mg/ml X-Gal in 1xPBS

Mit β -gal „sense“-RNA als „Lineage tracer“ ko-injizierte Embryonen oder Explantate wurden für 45 Minuten in MEMFA fixiert, 3x je 10 Minuten in 1x PBS gewaschen und anschließend im Dunkeln für maximal zwei Stunden in der Färbelösung inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten für je 10 Minuten in 1x PBS wurden die Embryonen oder Explantate 30 Minuten in MEMFA refixiert, mit Ethanol gewaschen und bis zur *in situ* Hybridisierung bei -20°C gelagert.

3.3.3.3 Whole-mount in situ Hybridisierung

Die Embryonen und Explantate wurden mittels einer Ethanolreihe rehydriert und in PTw umgepuffert. Nach dreimaligem Waschen in PTw für je 10 Minuten wurde eine Proteinase K-Behandlung durchgeführt, um die Membranen der Embryonen und Explantate permeabler für die RNA-Sonden zu machen.

Tabelle 3.1: Inkubationszeiten für den Proteinase K-Verdau

Stadium	Dauer (Minuten)	Temperatur (°C)
44 – 46	32	37 (bei 30Upm)
40 - 41	30	RT
40 (Explantate)	4	RT
37 – 39	25	RT
32 – 35	22	RT
25 – 27	15	RT
17 / 18	10	RT

Die Embryonen und Explantate wurden je zweimal in 0,1% Triethanolamin gewaschen, um den Proteinase K-Verdau abubrechen. Durch Zugabe von 12,5µl Acetanhydrid wurden die Embryonen acetyliert. Nach 5 Minuten Inkubation wurden weitere 12,5µl Acetanhydrid zur Lösung pipettiert.

Anschließend wurden die Embryonen und Explantate in PTw/FA für 20 Minuten refixiert. Fünf weitere je fünfminütige Waschschrte in PTw folgten. Die Embryonen oder Explantate in 1ml PTw wurden mit 250µl Hybridisierungs-Mix versetzt und leicht geschüttelt. Die Lösung wurde durch 500µl Hybridisierungs-Mix ersetzt und die Embryonen für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen und Explantate mit 1ml Hybridisierungs-Mix für sechs Stunden bei 65°C prähybridisiert. Danach wurde der Hybridisierungs-Mix durch die Digoxigenin-markierten Sonden ersetzt und die Embryonen über Nacht bei 65°C inkubiert.

Am zweiten Tag wurde die RNA-Sonde gesammelt und bei -20°C gelagert. Nachdem einmal mit 1ml Hybridisierungs-Mix für 10 Minuten bei 65°C gewaschen wurde, folgten drei 15-minütige Waschschrte in 2xSSC bei 65°C. Es folgte ein einstündiger RNase-Verdau in 2xSSC bei 37°C, um einzelsträngige RNA abzubauen. Ein Waschschrte in 2x SSC für 5 Minuten und zwei Waschschrte in 0,2x SSC für je eine halbe Stunde bei 65°C folgten. Anschließend wurden die Embryonen in 1x MAB umgepuffert. Die Embryonen wurden in MAB/BMB für 20 Minuten und in MAB/BMB/HS für 40 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den anti-Digoxigenin-Antikörper zu blockieren. Die Antikörper-Inkubation erfolgte für vier Stunden. Es folgten drei zehnminütige Waschschrte in 1x MAB, anschließend wurden die Embryonen über Nacht in 1x MAB bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Embryonen weitere fünfmal für je fünf Minuten in 1x MAB gewaschen. Die Kappen der Glasröhrchen wurden ausgewechselt und die Embryonen dreimal in APB gewaschen. Anschließend wurde die Färbelösung auf die Embryonen und Explantate pipettiert und bis zu fünf Tage bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

3.3.3.4 Reduktion der Hintergrundfärbung sowie Bleichung pigmentierter Embryonen und Explantate

Methanol-Reihe: 100% Methanol, 50% Methanol in Wasser

Blechlösung: 50% (v/v) Formamid, 2% (v/v) Wasserstoffperoxid in 5x SSC

Die Farbreaktion wurde durch einen fünfminütigen Waschschrift in Wasser beendet. Zwei Minuten in 100% Methanol führte zur Dehydrierung der Embryonen. Eine Rehydrierung in 50% Methanol und danach in Wasser löste überschüssige Farblagerungen ab und reduzierte dadurch die Hintergrundfärbung. Die Embryonen und Explantate wurden in MEMFA eingelegt und bei 4°C aufbewahrt. Sollte natürliches Pigment der Embryonen bzw. Explantate gebleicht werden, wurden sie 30 Minuten in MEMFA fixiert und anschließend zweimal in 5x SSC gewaschen. Die folgende Behandlung in Wasserstoffperoxid führte zur Bleichung des Pigments. Sie wurde bis zum Erreichen des gewünschten Pigmentverlustes durchgeführt, wonach die Embryonen und Explantate wiederum zweimal in 5x SSC gewaschen wurden. Anschließend wurden die Embryonen in MEMFA bei 4°C gelagert.

3.3.3.5 Vibratomschnitte

Gelatine-Albumin-Lösung: 4,88mg/ml Gelatine, 0,3g/ml BSA, 0,2mg/ml Sukrose in 1x PBS. Die Gelatine wurde durch Erhitzen auf 60°C verflüssigt und das Albumin und die Sukrose wurden zugegeben. Anschließend wurde die Lösung filtriert (0,45µm Porengröße, Sartorius) und bei -20°C gelagert.

Mowiol: 5g Mowiol wurde über Nacht in 20ml 1x PBS gerührt. Nach Zugabe von 10ml Glycerol wurde eine weitere Nacht gerührt. Nach einer Zentrifugation von 30

Minuten bei 20.000g wurde der Überstand auf pH 7,0 eingestellt und bei -20°C gelagert.

Gelatine-Albumin wurde durch Zugabe von Glutaraldehyd ausgehärtet und die Präparate, welche in 1x PBS überführt worden waren, auf dem Gelatine-Albumin Sockel platziert. Umgebende Flüssigkeit wurde vollständig abgesaugt und die Präparate mit Gelatine-Albumin-Glutaraldehyd-Lösung überschichtet. 30µM Vibratomschnitte wurden, wie in Hollemann *et al.* (1999) beschrieben, an einem Leica VT1000M Vibratom hergestellt.

3.3.4 Präparation von DNA-freier Gesamt-RNA

3.3.4.1 aus verschiedenen Embryonalstadien

Je zwei *Xenopus* Embryonen verschiedener Stadien wurden in einem Eppendorf Gefäß ohne Flüssigkeit in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion der Gesamt-RNA bei -80°C gelagert. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte entweder nach Herstellerangaben mit dem RNAqueous^R-Micro Kit (Ambion Inc.) oder wurde wie folgend beschrieben mit Trizol (Invitrogen) durchgeführt:

Die Embryonen wurden mit 400µl Trizol versetzt und durch Hilfe einer Insulinspritze vollständig lysiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden gevortext. Es wurden 80µl Chloroform pro 400µl Trizolgemisch zugefügt und weitere 30 Sekunden gevortext. Die Proben wurden 10 Minuten bei 13.000Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Es wurden 200µl Chloroform zugefügt und wiederum für 30 Sekunden gevortext. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 13.000Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200µl Isopropanol erfolgte die Fällung für eine Stunde bei -20°C. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 13.000Upm und 4°C zentrifugiert und mit 400µl Ethanol gewaschen. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 13.000Upm und 4°C wurde der Überstand verworfen, die Sedimente bei Raumtemperatur getrocknet und in 50µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.3.4.2 aus adulten Geweben und Organen

Adulte Organe und Gewebe wurden aus *Xenopus* Männchen im Zuge der Testis-Präparation entnommen, nach einer Waschung in 1x MBSH sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die RNA aus adulten Geweben wurde mit Trizol (Invitrogen) extrahiert. Dazu wurden die Organe oder Gewebe in einem Mörser unter steter Zugabe von flüssigem Stickstoff zermahlen und nach vollständiger Zerkleinerung in einen Glaskolben mit Trizol überführt. Das Gewebe wurde durch Minzeration vollständig in Trizol aufgelöst. Anschließend wurde die Gesamt-RNA wie unter Punkt 3.3.4.1 beschrieben extrahiert.

3.3.4.3 aus animalen Kappen-Explantaten

Die RNA aus animalen Kappen wurde entweder mit dem RNAqueous^R-Micro Kit von Ambion oder mit Trizol (Invitrogen) extrahiert. Bei Verwendung des Ambion Kits wurde entsprechend der Herstellerangaben gearbeitet. Für die Extraktion mit Trizol wurden die animalen Kappen in 400µl Trizol mit Insulinkanülen lysiert und anschließend wie unter Punkt 3.3.4.1 beschrieben weiterbehandelt.

3.3.5 Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die extrahierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von „Rundom hexamers“ und Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die erhaltenen „Pools“ an cDNA mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden (siehe Punkt 2.9.1.) auf die Expression spezifischer Transkripte hin untersucht (Sambrook und Russel, 2001).

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 *in vitro* Transkription und Translation („TnT“)

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde in einem 12,5µl Reaktionsvolumen mit dem T_NT^R Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteine wurden mittels denaturierender SDS-

Gelelektrophorese aufgetrennt (Harlow und Lane, 1988) und mit Hilfe eines Autoradiogramms detektiert.

3.4.2 Ko-Immunopräzipitation

CoIP-Puffer: 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5% (v/v) NP-40, 1x Proteinase-Inhibitor-Tablette („complete EDTA-free“, Roche)/50ml

6x SDS-Gelauftragspuffer: 125mM Tris pH6,8, 30% Glycerol, 10% SDS, 0,6M DDT, 0,012% Bromphenolblau

Die Ko-Immunopräzipitation wurde wie in Harlow und Lane (1988) beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils 25 Embryonen eingesetzt, wobei 10% des Zelllysats als „Input“ abgenommen wurden und eine Inkubation der Proben mit 20µl ProteinG Sepharose vor der eigentlichen Immunpräzipitation die unspezifisch an ProteinG Sepharose bindenden Proteine entfernen sollte.

3.4.3 Western Blot

10x Lämmli-Puffer: 250mM Tris pH8,3, 192mM Glycin, 1% (w/v) SDS

Transfer Puffer: 39mM Glycin, 48mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,04% SDS, 20% Methanol

„Blocking“ Puffer: 5% (w/v) in TBS

10x TBS: 200mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,5µM NaCl, 0,5% (v/v) Tween-20

TBST: 0,5% Tween-20 in 1x TBS

1. Antikörperlösung: 1:1.000 bis 1:10.000 Verdünnung des primären Antikörpers in „Blocking“ Puffer

2. Antikörperlösung: 1:10.000 bis 1:20.000 Verdünnung des sekundären Antikörpers gekoppelt an die Horseradish Peroxidase (HRP) in „Blocking“ Puffer

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine 0,45µm dicke Nitrocellulosemembran durch Semi-dry Blotting übertragen (Harlow und Lane, 1988). Die Membran wurde für eine Stunde im Milchpulverhaltigen „Blocking“ Puffer und über Nacht mit den primären Antikörperlösungen bei 4°C auf einer rotierenden Scheibe inkubiert. Nach dreimaligem 10minütigen Waschen in TBST wurde die Membran in den sekundären Antikörper-

Lösungen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei 10minütigen Waschschrritten wurde die Membran mit dem SuperSignal^R West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) behandelt, um die Proteine auf einem lichtsensitiven Film sichtbar zu machen (Harlow und Lane, 1988).

3.5 Manipulierung von *Xenopus* Embryonen

5x MBSH: 440mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 5mM KCl, 50mM Hepes, 4,1mM MgSO₄, 2,05mM CaCl₂, 1,65mM Ca(NO₃)₂

2% Cysteinhydrochlorid-Lösung: 2% (w/v) Cys-HCl in 0,1x MBSH, pH8,0

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

Natriumdihydrogenphosphat-Lösung: 1M NaH₂PO₄:1 H₂O

Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung: 0,5M Na₂HPO₄:2 H₂O

Nilblau-Lösung: 179,2ml 0,5M Na₂HPO₄, 10,4ml 1M NaH₂PO₄, eine Spatelspitze Nilblau-Chlorid in 1l dH₂O, bei 50°C einen halben Tag rühren lassen, sterilfiltrieren

3.5.1 Stimulation der Eiablage

Xenopus Weibchen wurden am Vorabend des Injektionstages mit 800 bis 1000U humanem Choriongonadotropin (HCG) injiziert und bei 16°C über Nacht inkubiert. Am Morgen des nächsten Tages war mit der Eiablage zu rechnen. Für Animale Kappenexplantate wurden die Frösche am Vorabend mit 50U HCG vorstimuliert und am nächsten Morgen mit 1000U induziert. Die Eiablage war 6 Stunden nach der Injektion zu erwarten.

Die *Xenopus* Weibchen wurden einmal pro Stunde am Rücken massiert und das Gelege in einer Petrischale aufgefangen. Testis-Lösung mit den in 1x MBSH unbeweglichen Spermien wurde in der Petrischale mit Wasser auf 0,1x MBSH verdünnt und die Oozyten damit befruchtet. Nach zehnmütiger Inkubation wurde das Gelege mit 0,1x MBSH überschichtet (Sive *et al.*, 2000).

Um eine Mikromanipulation der Embryonen zu ermöglichen, wurde die Gallerhülle der Embryonen vor der ersten Zellteilung durch Behandlung mit 2%-iger Cysteinhydrochlorid-Lösung abgelöst. Die Embryonen wurden danach mehrfach mit 0,1x MBSH gespült. Albinoembryonen wurden zur leichteren Bestimmung des Stadiums mit dem Vitalfarbstoff Nilblau-Lösung angefärbt.

3.5.2 Präparation von *Xenopus* Testes

Ein *Xenopus* Männchen wurde dekapitiert und mit einer Schere die Bauchdecke geöffnet. Die Testes wurden entnommen und sorgfältig von Fettgewebe und Blutgefäßen befreit. Die Testes wurden einmal in 1xMBSH gewaschen und anschließend bei 4°C in 1xMBSH gelagert (Sive *et al.*, 1998).

3.5.3 Mikroinjektion

Injektionspuffer: 1% (v/v) Ficoll, 1x MBSH

Die Glaskapillaren für die Mikroinjektion wurden an einem Nadelzieher gezogen (PN-30, Science Products) und die Mikroinjektion an einem Mikromanipulator (Pneumatic PicoPump PV 820, World Precision Instruments) durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 4nl/Blastomere und wurde anhand einer μM -Skala eingestellt. Für die Mikroinjektion wurden die Embryonen in Injektionspuffer überführt und nach der Injektion für eine weitere Stunde darin inkubiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Embryonen in 0,1x MBSH überführt.

3.5.3.1 Achsenduplikations-Assay

Die pigmentierten Embryonen wurden marginal bis vegetal in eine ventrale Blastomere im Vierzellstadium injiziert. Eine Auswertung der Injektion erfolgte zwischen Stadium 30 und 35, als die stark pigmentierte Anhaftdrüse sowie die Augenhülsen deutlich zu erkennen waren. Dorsale Achsenduplikation führte entweder zur Induktion einer zweiten Körperachse mit vollständigen Kopfstrukturen oder zu einer zusätzlichen partiellen Achse bestehend aus Rumpfstrukturen.

3.5.3.2 Entoderm-Injektion

Embryonen im Vier- oder Achtzellstadium wurden vegetal in alle vier Blastomere injiziert, um eine optimale Verteilung der Morpholino Oligonukleotide in das prospektive Entoderm zu erreichen.

3.5.4 Animale Kappenexplantate

Penicillin/Streptomycin: 10.000U / ml Penicillin, 10mg / ml Streptomycin in 0,9% Natriumchlorid (100x Stock-Lösung)

Animale Kappen wurden unter Verwendung einer „Gastromaster“-Spitze aus dem Dach des Blastocoels von Embryonen im Stadium 8 bzw. 9 geschnitten. Die weitere Kultivierung erfolgte in 0,8x MBSH / 0,1x Penicillin/Streptomycin auf mit Agar beschichteten Kulturschalen (0,7% (w/v) Agar in 0.8x MBSH) bei 16 bzw. 18°C bis zum Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums. Die Explantate wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Extraktion der Gesamt-RNA bei -80°C gelagert (Sive *et al.*, 2000).

3.5.5 Gastrointestinale Explantate

Die Präparation gastrointestinaler Explantate erfolgte im Stadium 40. Dazu wurde mit zwei Präzisionspinzetten die Bauchdecke geöffnet, der Ösophagus durchtrennt und der Gastrointestinaltrakt von der umgebenden Haut sowie den dorsalen mesodermalen Strukturen abgelöst (Chalmers und Slack, 1998).

3.5.6 Behandlung der Embryonen oder animalen Kappenexplantate mit Chemikalien

3.5.6.1 Retinsäure und Retinsäure-Antagonist BMS453-Behandlung

10mM Retinsäure: *all-trans Retinsäure (Sigma) in 100% Ethanol*

10mM BMS453: 4,01mg „Bristol Meyers Squibb“ (BMS) 453 in 1ml 100% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Die Behandlung der animalen Kappenexplantate mit 5µM Retinsäure erfolgte für eine Stunde im Stadium 9. Die Behandlung mit 1µM BMS453 wurde unter Lichtabschluß ebenfalls für eine Stunde im Stadium 9 durchgeführt. Alle

Versuchszugehörigen Explanate wurden entweder mit Ethanol oder mit DMSO behandelt.

3.5.6.2 Dexamethason-Behandlung

1000x Dex: 4mg Dexamethason / ml 100% Ethanol

Die Freisetzung der von „Heat Shock“ Proteinen komplexierten Glucocorticoid Receptor-fusionierten Proteine wurde durch Zugabe von 1x Dex / 0,1x MBSH induziert. Die Embryonen wurden während der Behandlung unter Lichtabschluß inkubiert. Für Achsenduplikationsexperimente mit Lef1-GR wurde Dexamethason spätestens im 16-Zell-Stadium zugegeben und die Induktion am nächsten Morgen abgebrochen.

4 Ergebnisse

4.1 Biochemische und funktionale Charakterisierung des sekretierten Wnt Antagonisten *Xenopus* sFRP5

4.1.1 XsFRP5 zeigt während der Embryonalentwicklung ein sehr dynamisches Expressionsmuster

Der sekretierte Wnt Antagonist sFRP5 wurde aus einer *Xenopus* Herz-cDNA-Bank isoliert und eine erste Expressionsanalyse bereits im Jahr 2002 von Pilcher und Krieg veröffentlicht. Die Autoren beschrieben die Leber-spezifische Expression von XsFRP5 während früher Schwanzknospenstadien und einen dynamischen Wechsel der XsFRP5 Expression in den Grenzbereich zwischen Magen und Duodenum in frühen Kaulquappenstadien. Desweiteren wurde eine überlappende Expression von XsFRP5 mit dem frühen Leber-Markergen *hex*, einem Homöobox-Transkriptionsfaktor, beschrieben (Pilcher und Krieg, 2002).

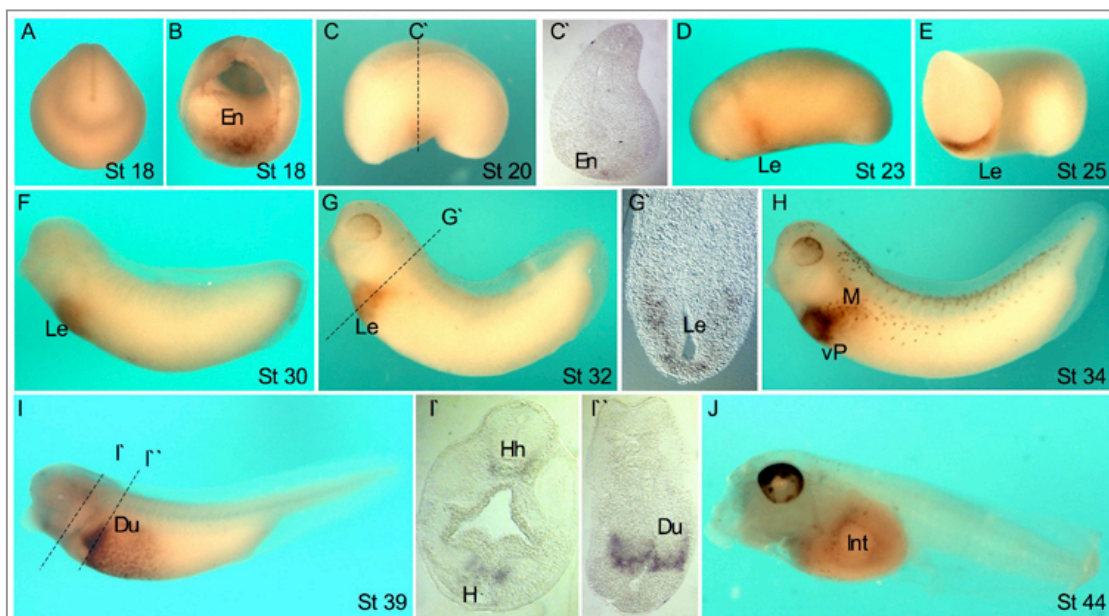


Abb. 4.1: XsFRP5 zeigt ein ausgeprägt dynamisches Expressionsverhalten in *Xenopus* Embryonen. (A-J) Verschiedene Embryonalstadien wurden mittels whole-mount *in situ* Hybridisierung auf die Expression von XsFRP5 mRNA untersucht. (C', G', I', I'') Vibratomschnitte dienen der Veranschaulichung interner Expressionsdomänen. (A, B, C', G', I', I'') Anterior nach vorne. (C, D, E, F, G, H, I, J) Laterale Ansicht mit anterior nach links. Du = Duodenum, En = Entoderm, H = Herzanlage, Hh = Hinterhirn, Int = Intestinaltrakt, Le = Leberanlage, M = Magen, St = Stadium, vP = ventrales Pankreas

Im Rahmen unserer weiterführenden Analyse konnte das embryonale und adulte Expressionsmuster von XsFRP5 zeitlich und räumlich präzisiert werden. So kann die XsFRP5 Expression bereits deutlich früher als zuvor beschrieben im ventralen Entoderm des späten Neurulastadiums in einer Region detektiert werden, welche die Vorläuferzellen der Leberanlage sowie des ventralen Pankreas beinhaltet (Abb. 1.1 A, B). Zusätzlich wurde zur bereits beschriebenen Expression in Leber und Magen-Darm-Bereich eine Färbung der Herzanlage und des Hinterhirns festgestellt (Abb. 1.1 I, I', I'').

Eine temporäre Expressionsanalyse mittels RT-PCR, die in unterschiedlichen Embryonalstadien durchgeführt wurde, bestätigte, dass XsFRP5 bereits während der Neurulation in *Xenopus* Embryonen stark exprimiert wird (Abb. 4.2 A). Eine schwache Expression von XsFRP5 konnte bereits im Gastrulastadium (Stadium 10) nachgewiesen werden. Wie auch aus der whole-mount *in situ* Hybridisierung ersichtlich, bleibt die Expression von XsFRP5 bis in späte Embryonalstadien erhalten. XsFRP5 Transkripte wurden weiterhin in einer Vielzahl von adulten Geweben detektiert, wobei festzustellen ist, dass lediglich die Epidermis sowie die Ovarien kein XsFRP5 enthalten. Die fehlende Expression von XsFRP5 in den Ovarien ist konsistent mit der Beobachtung, dass XsFRP5 nicht als maternales Transkript vorliegt und somit auch nicht vor der „Mid-Blastula-Transition“ (MBT) in den Embryonalstadien detektiert werden konnte.

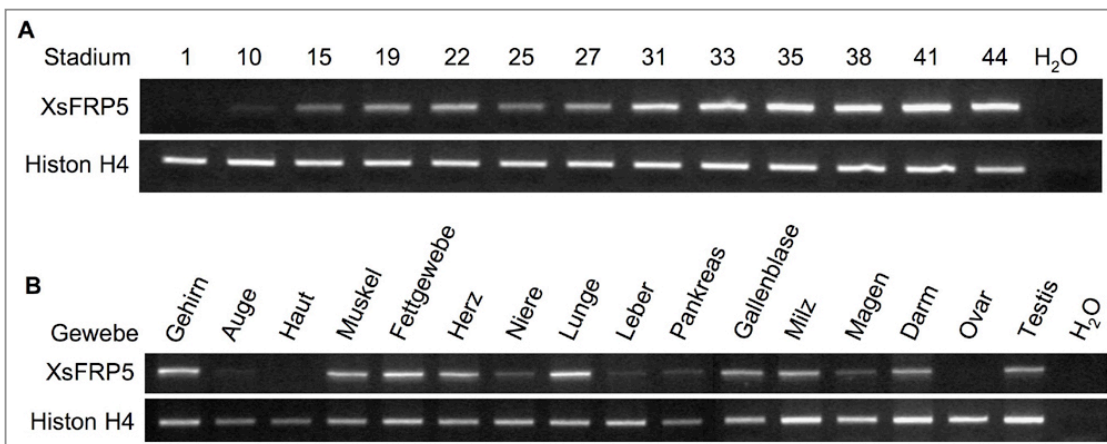


Abb. 4.2: Die Expression von XsFRP5 beginnt während der Gastrulation und bleibt in späten Embryonalstadien wie auch in vielen adulten Geweben erhalten. (A) RT-PCR Analyse der XsFRP5 Expression in verschiedenen Embryonalstadien. (B) RT-PCR Analyse der XsFRP5 Expression in adulten Geweben und Organen. Histon H4-spezifische RT-PCR dient als Kontrolle.

Für bovines sFRP5 wurde eine Expression im retinalen Pigmentepithelium und für humanes sFRP5 im Pankreas nachgewiesen (Chang *et al.*, 1999); beide Gewebe zeigen auch im Frosch eine Expression von sFRP5, jedoch sind es nicht die Gewebe mit der höchsten Zahl an Transkripten (Abb. 4.2 B). Chang *et al.* (1999) konnten zusätzlich eine schwache Expression in Herz, Leber und Muskelzellen detektieren; diese Gewebe zeigen auch im Frosch deutliche XsFRP5 Expression.

4.1.2 Biochemische Interaktionsstudien von XsFRP5 mit verschiedenen *Xenopus* Wnt Proteinen

4.1.2.1 Ko-Injektion von XsFRP5 inhibiert die Wnt-vermittelte dorsale Achsenduplikation

Bereits im Jahr 1999 wurde für das bovine sFRP5 eine schwache Interaktion mit *Xenopus* Wnt8 nachgewiesen (Chang *et al.*, 1999). Für XsFRP5 waren außer des Expressionsmusters keine funktionalen Daten bekannt, wenngleich auch von einer Aktivität als Wnt Antagonist ausgegangen wurde (Pilcher und Krieg, 2002). Da einige Mitglieder der sFRP Familie überraschend als BMP Antagonisten charakterisiert wurden (Lee *et al.*, 2006), sollte das Potential von XsFRP5 als Inhibitor von Wnt-vermittelter Achsenduplikation in *Xenopus* Embryonen direkt untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene *Xenopus* Wnt Proteine ausgewählt, jeweils vier dem kanonischen Signalweg zugeordnete und vier der nicht-kanonischen Signaltransduktion zugeordnete Kandidaten. Es wurde außerdem auf eine Auswahl der bislang als für die Embryonalentwicklung am wichtigsten beschriebenen Wnt Proteine Wert gelegt. Alle diese Wnt Proteine wurden auf der ventralen Seite von Embryonen in frühen Teilungsstadien überexprimiert, um durch die ektopische Aktivierung kanonischer Wnt Signaltransduktion die Induktion eines sekundären Spemann Organisations und weiterführend einer zweiten Körperachse zu bewirken. Für die vier nicht-kanonischen Wnt Liganden, welche selbst nicht in der Lage sind, dorsale Achsenduplikation zu vermitteln, wurde der humane Frizzled5 Rezeptor (hFz5) ko-injiziert (He *et al.*, 1997). Das Überangebot dieses dem kanonischen Signalweg zugeordneten Rezeptors führt durch die Bindung nicht-kanonischer Wnt Proteine zu einer Stimulation der kanonischen Wnt Signaltransduktion. Die Ko-

Injektion ansteigender Mengen an XsFRP5 sollte im Fall einer Interaktion die Verminderung der Wnt-vermittelten Achsenduplikation zur Folge haben.

Die kanonischen Wnt Proteine Xwnt2b, Xwnt3a, Xwnt8 und Xwnt8b zeigen eine 80 bis 90%-ige Induktion zweiter Körperachsen (Abb. 4.3 A –D). Dabei wurde nicht zwischen der Induktion kompletter dorsaler Strukturen (inklusive Anhaftdrüse und Augenfelder) und einer partiellen Achsenduplikation unterschieden. Ko-Injektion einer niedrigen Dosis an XsFRP5 zeigte, dass Xwnt2b- und Xwnt8b-vermittelte Achseninduktion bereits nahezu vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 4.3 A, D), während Xwnt8b lediglich zu 50% und Xwnt3a kaum inhibiert wurde. Ko-Injektion einer höheren Dosis an XsFRP5 unterband auch die Xwnt8-vermittelte Achsenduplikation, während Xwnt3a nicht signifikant in seiner Funktion beeinträchtigt wurde (Abb. 4.3 C, B). Hieraus wird deutlich, dass XsFRP5 verschiedene kanonische Wnt-Liganden mit deutlich unterschiedlicher Effektivität inhibieren kann.

Die Injektion der nicht-kanonischen Wnt Proteine Xwnt4, Xwnt5a, Xwnt11 und Xwnt11R führte alleine, wie erwartet, nicht zur Induktion zweiter Körperachsen (Abb. 4.3 E-H). Die Injektion von hFz5 alleine führte zu einer schwachen Achsenduplikation und definierte somit einen Grundwert, welcher durch die Ko-Injektion der nicht-kanonischen Wnt Proteine deutlich erhöht wurde. Um eine klare Aussage über eine Interaktion zwischen XsFRP5 und den nicht-kanonischen Wnt Proteinen zu ermöglichen, wurde XsFRP5 in drei verschiedenen Dosen ko-injiziert. Es zeigte sich, dass Xwnt4 bereits bei einer Ko-injektion der geringsten Dosis an XsFRP5 beinahe völlig inhibiert werden konnte (Abb. 4.3 E), während die Xwnt5a- und Xwnt11R-vermittelte Achsenduplikation nur bei hohen XsFRP5-Konzentrationen auf das Niveau hFz5-vermittelter Induktion reduziert werden konnte. Xwnt11 wird auch bei der höchsten hier eingesetzten Dosis an XsFRP5 deutlich schwächer inhibiert.

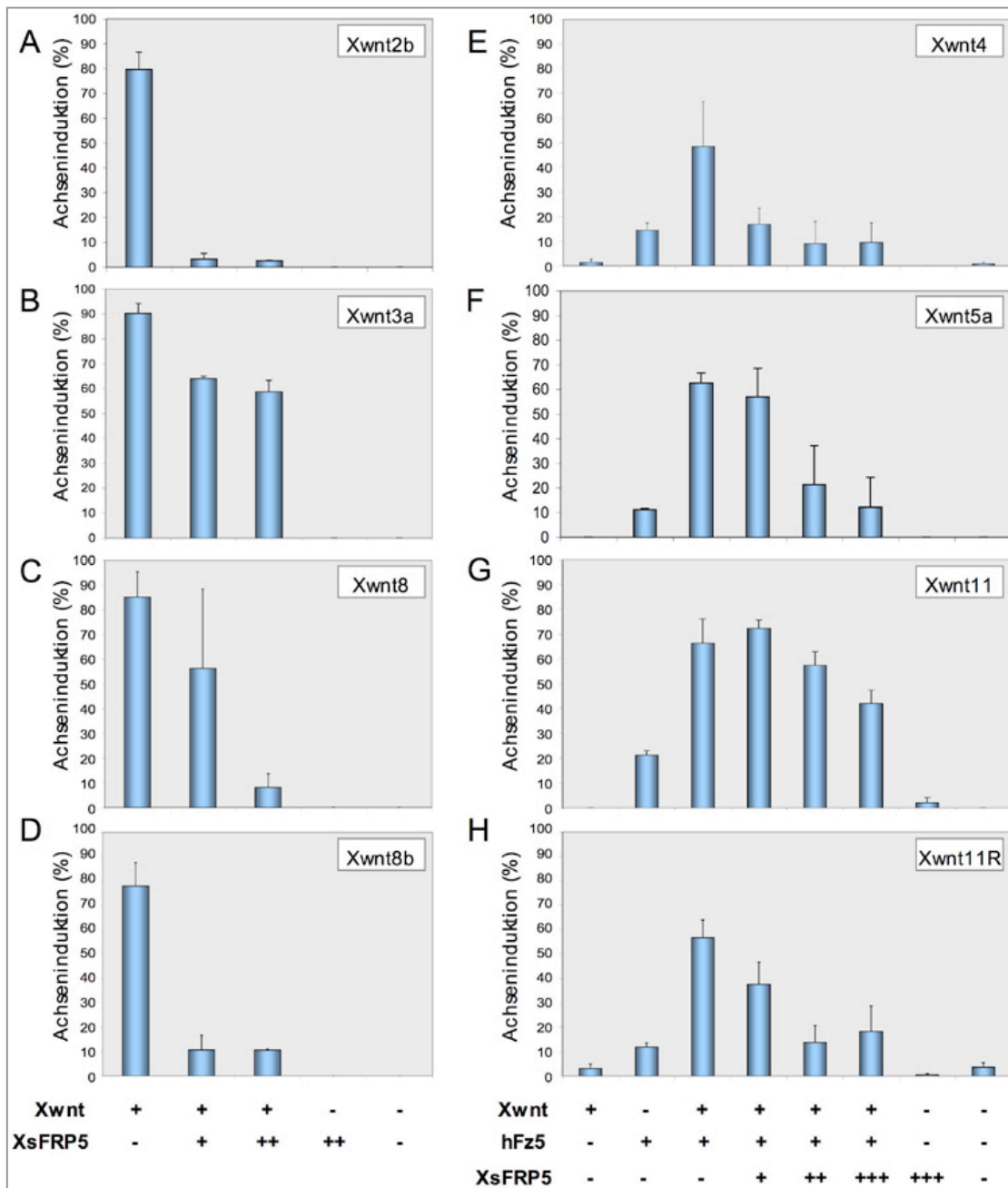


Abb. 4.3: XsFRP5 ist in der Lage, Xwnt-vermittelte dorsale Achsenduplikation zu unterdrücken. 10pg bzw. 50pg *XsFRP5* mRNA wurden zu 60pg *Xwnt2b* mRNA (A) sowie zu je 10pg *Xwnt3a* (B), *Xwnt8* (C) und *Xwnt8b* mRNA (D) ko-injiziert, um eine robuste Achseninduktion zu erzielen. Je 5pg *Xwnt4* (E), *Xwnt5a* (F), *Xwnt11* (G) und *Xwnt11R* (H) wurden mit und ohne 50pg *hFz5* sowie 10 (+), 50 (++) und 100pg (+++) *XsFRP5* injiziert. Es wurden insgesamt 397 Embryonen (A), 306 Embryonen (B), 419 Embryonen (C) und 232 Embryonen (D), 413 Embryonen (E), 277 Embryonen (F), 405 Embryonen (G) in jeweils 2 unabhängigen Experimenten und 867 Embryonen (H) in 3 unabhängigen Experimenten untersucht.

Anhand dieser Resultate wird deutlich, dass XsFRP5, ähnlich wie für die kanonischen Wnt Liganden beschrieben, auch verschiedene nicht-kanonische Wnt Liganden mit unterschiedlicher Effektivität inhibieren kann. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass XsFRP5 die Aktivität aller hier eingesetzten Wnt Proteine inhibieren kann, unabhängig davon, ob sie den kanonischen oder nicht-kanonischen Wnt Signalweg stimulieren, dass es jedoch unterschiedliche Affinitäten in der Interaktion der verschiedenen Wnts mit XsFRP5 zu geben scheint.

4.1.2.2 Ko-Immunopräzipitation von XsFRP5 und unterschiedlichen Xwnt Proteinen

Die in den Achsenduplikations-Experimenten erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass XsFRP5 in der Lage ist, Xwnt-vermittelte Achsenduplikation zu inhibieren. Ob diese antagonistische Wirkung durch eine direkte Bindung an die Xwnt Proteine oder durch die Bildung nicht-funktionaler XsFRP5-Frizzled Komplexe zustande kam, ist unklar. Eine direkte Interaktion zwischen XsFRP5 und verschiedenen Xwnt Proteinen sollte durch ein Ko-Immunopräzipitation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde XsFRP5 mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) versehen und die Xwnt Proteine an das Myc-Epitop (MT) fusioniert. Nach Überexpression der unterschiedlich Epitop-markierten Proteine in *Xenopus* Embryonen, wurden diese lysiert und 10% des Lysats für die Input-Fraktion (I) abgenommen. Als Ladekontrolle diente Aktin, welches durch einen Maus anti-Aktin Antikörper separat in allen Input-Fraktionen bei einer Größe von ca. 45 kDa nachgewiesen wurde (Abb. 4.4 Bahnen 1'-25'). Die Proben wurden in der Folge mit Protein G-Sepharose Kügelchen präinkubiert, um alle Proteine, welche unspezifisch an Protein G binden, durch Zentrifugation aus den Proben entfernen zu können. Das erhaltene Sediment wurde als Pellet-Fraktion (P) im folgenden Western Blot untersucht. Die Ko-Immunopräzipitation erfolgte unter Verwendung eines Maus anti-HA Antikörpers und anschließender Inkubation mit Protein G-Sepharose-Kügelchen. Das so erhaltene Sediment wurde als IP bezeichnet.

XsFRP5-HA kann in zwei Protein-Banden detektiert werden, bei einer Größe von ungefähr 33 und 35kDa (Abb. 4.4). Dieser Größenunterschied von 2kDa beruht vermutlich auf einer nicht vollständig prozessierten Form von XsFRP5, welche noch

das Signalpeptid mit einer Größe von 2kDa trägt. Wie aus Bahnen 1 bis 3 ersichtlich wird, sind die verwendeten Antikörper spezifisch für die Epitop-markierten Proteine, da in den Proben nicht-injizierter Kontrollembryonen keine Banden detektiert werden konnten. Wie in Abb. 4.4 gezeigt, ko-präzipitieren alle Xwnt Proteine mit XsFRP5, jedoch lassen sich anhand der Bandenstärke in den IP-Fraktionen Unterschiede in der Bindungsstärke zwischen XsFRP5 und einzelnen Wnt Proteinen erkennen.

MT-Xwnt2b konnte bei einer Größe von 50kDa detektiert werden (Abb. 4.4 Bahnen 4, 6). XsFRP5-HA interagiert mit MT-Xwnt2b, jedoch liegt die Effizienz der Interaktion bei nur ungefähr 2% des im Input vorhanden Wnt Proteins (Abb. 4.4 Bahn 6). MT-Xwnt3a hingegen konnte effizienter ko-präzipitiert werden, gemessen an der Bandenstärke von XsFRP5-HA zu MT-Xwnt3a in der IP-Fraktion wurden ca. 10% des gesamt vorhandenen MT-Xwnt3a gebunden. Auffällig ist, dass mehrere Banden für MT-Xwnt3a in der Input-Fraktion in Größen zwischen 45 und 70kDa detektiert wurden, XsFRP5-HA jedoch nur mit einer dieser Banden spezifisch interagiert (Abb. 4.4 Bahnen 7-9). Für das Auftreten multipler Banden bei Wnt Proteinen gibt es mehrere Erklärungen. Da die Überexpression der Proteine in *Xenopus* Embryonen erfolgte, wurden die Epitop-markierten Proteine höchstwahrscheinlich ebenso modifiziert wie endogene Wnt Proteine, bei denen es sich um palmitoylierte Glykoproteine handelt. Wahrscheinlich wurden auch unprozessierte Vorläuferstufen aus dem ER nach Lyse der Zellen weiter aufgearbeitet und führen so zu den unterschiedlichen Bandenmustern, die für die einzelnen Wnt Proteine beobachtet werden konnten (Abb. 4.4 Bahnen 10, 13, 16, 22, 25). Auch für MT-Xwnt4 und MT-Xwnt5a konnte gezeigt werden, dass XsFRP5 spezifisch mit einer Proteinbande interagiert, wenngleich die Interaktion nicht so stark zu sein scheint wie für MT-Xwnt3a gezeigt, sondern bei ca. 5% des gesamten MT-Xwnt4 Proteins und bei ca. 1% für MT-Xwnt5a liegt (Abb. 4.4 Bahnen 12, 15). MT-Xwnt4 wurde auch in der Sediment-Fraktion (P) detektiert, was auf eine schwache unspezifische Bindung an Protein G schließen lässt (Abb. 4.4 Bahn 11). MT-Xwnt8 zeigt die stärkste Interaktion mit XsFRP5, wobei in diesem Fall zwei Proteinbanden von MT-Xwnt8 mit einer Effizienz von ca. 15% mit XsFRP5-HA ko-präzipitiert werden konnten (Abb. 4.4 Bahnen 16-18). Für MT-Xwnt8b konnte nur eine Bande von ca. 75 kDa detektiert werden. Obwohl Xwnt8b in den Achsenduplikations-Experimenten sehr effizient von XsFRP5 inhibiert worden war, konnten hier nur kaum detektierbare Mengen an MT-

Xwnt8b ko-präzipitiert werden (Abb. 4.4 Bahnen 19-21). MT-Xwnt11 zeigt ein sehr komplexes Bandenmuster, welches vermutlich ebenfalls durch unterschiedliche Modifikationen des Proteins hervorgerufen wird. XsFRP5-HA führte in diesem Fall zur Ko-Präzipitation von vier MT-Xwnt11 Banden im Bereich zwischen 55 und 70 kDa (Abb. 4.4 Bahnen 22-24). Für MT-Xwnt11R zeigte sich ebenfalls eine Interaktion mit XsFRP5-HA, hoch spezifisch für eine der verschiedenen detektierten Xwnt11R-Banden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa (Abb. 4.4 Bahnen 25-27).

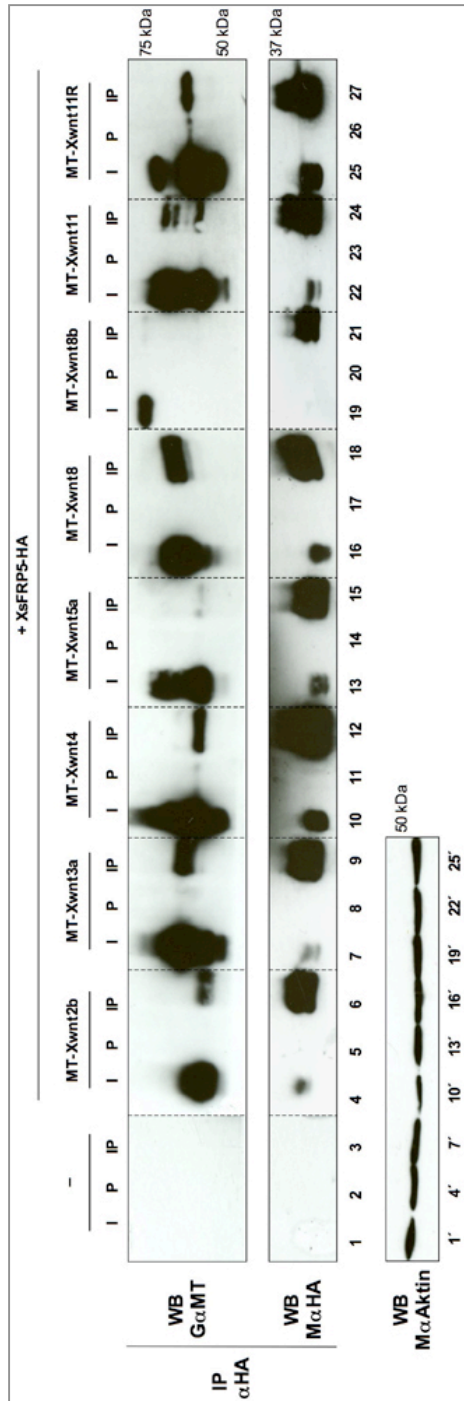


Abb. 4.4: XsFRP5 ko-präzipitiert mit allen untersuchten Xwnt Proteinen, zeigt jedoch eine unterschiedliche Präferenz einzelner Proteinbanden. Embryonen wurden im Zweizell-Stadium mit je 500pg *XsFRP5-HA* mRNA und 500pg *MT-Xwnt* mRNA injiziert und in Stadium 10,5 für die Ko-Immunopräzipitation gesammelt. I = 10% Input, P = Sediment aus der Prä-Inkubation mit Protein G-Sepharose, IP = Immunopräzipitation mit dem α HA-Antikörper. Pro IP-Bahn wurde das Äquivalent aus 10 Embryonen geladen. Ein Western Blot (WB) mit dem $G_{\alpha}MT$ Antikörper detektiert *MT-Xwnt* Proteine von 45 bis 75 kDa. Ein WB mit dem $M_{\alpha}HA$ Antikörper zeigt zwei Banden von *XsFRP5-HA*, vermutlich mit oder ohne Signalpeptid bei ca. 35 kDa. Aktin konnte im WB bei ca. 45 kDa detektiert werden.

Um eine Auswahl der relevantesten Interaktionspartner zu erleichtern, wurden die in den Achsenduplikations-Experimenten und in der Ko-Immunopräzipitation erhaltenen Daten in Tabelle 4.1 gegenübergestellt. Dabei wurden die Xwnt Proteine nach ihrem Verhalten in den Achsenduplikations-Experimenten in drei Gruppen unterteilt: solche, die schon bei geringsten Mengen an XsFRP5 effizient inhibiert werden konnten (++)), solche, die bei höheren Dosen inhibiert werden konnten (+) und solche, die durch XsFRP5 nicht effizient in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden ((+)). Da alle untersuchten MT-Xwnt Proteine mit XsFRP5 ko-präzipitierten, wurden sie in drei Gruppen unterteilt: solche, die nach Abschätzung der Bandenstärken von XsFRP5-HA und MT-Xwnts in der IP-Fraktion stark interagierten (++)), solche, die eine moderate Bindung zeigten (+) und solche, die nur sehr schwach zu binden schienen ((+)).

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der erhaltenen Daten aus den Interaktionsstudien von XsFRP5 mit verschiedenen Xwnt Proteinen.

	Xwnt	2b	3a	4	5a	8	8b	11	11R
interagiert mit	Achsenduplikation	++	(+)	++	+	+	++	(+)	+
XsFRP5 in der	Ko-IP*	++	++	++	(+)	++	(+)	+	+

* Ko-IP = Ko-Immunopräzipitation

Auffällig ist, dass XsFRP5-HA in der Ko-Immunopräzipitation auch jene Xwnts effizient bindet, welche in den Achsenduplikationsexperimenten nicht effektiv inhibiert worden sind, nämlich Xwnt3a und Xwnt11. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass XsFRP5 Xwnt Liganden durch eine Bindung nicht nur von einer Interaktion mit Frizzled Transmembranrezeptoren abhalten kann, sondern diese Wnt Protein möglicherweise im extrazellulären Bereich stabilisiert. So würden sFRPs nur bei einer geringen Menge an verfügbaren Fz Rezeptoren als Antagonisten fungieren (Kawano und Kypta, 2003).

Die in den Achsenduplikations-Experimenten und der Ko-Immunopräzipitation erhaltenen Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf die Interaktionspartner von XsFRP5 erlauben. Jedoch konnte kein Xwnt Protein als präferierter Interaktionspartner für XsFRP5 identifiziert werden. Vielmehr ist XsFRP5 in der Lage, verschiedene der

untersuchten XwnTs stark zu binden und effizient zu inhibieren. Sowohl die Achsenduplikations-Experimente wie auch die Ko-Immunopräzipitationsdaten legen nahe, dass XsFRP5 im Rahmen seiner dynamischen Expression während der Organogenese verschiedenen Xwnt Proteinen entgegenwirken kann.

4.1.2.3 Überexpression von XsFRP5 in ganzen Embryonen führt zu Defekten der anterior-posterioren Körperachse

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion von XsFRP5 mit nicht-kanonisch wirkenden, endogenen Wnt Liganden zu untersuchen, besteht in der Analyse der Effekte von XsFRP5 Überexpression auf die Gastrulation. Hierzu wurde *XsFRP5* mRNA vegetal in frühe Teilungsstadien injiziert, um eine Expression des Proteins im prospektiven Entoderm zu begünstigen. Es zeigte sich, dass die frühe Überexpression von XsFRP5, die der endogenen Expression weit voraus eilt, zu einer starken Verlangsamung der Gastrulationsbewegungen führt (Abb. 4.5 A-D). Dieser Phänotyp gleicht einem sogenannten „Convergent Extension“-Phänotyp, wie er schon für die Inhibition verschiedener an der nicht-kanonischen Wnt Signaltransduktion beteiligter Proteine beschrieben worden ist (Kühl *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004; Tahinci *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2002). Diese Verlangsamung der Gastrulation ist von der injizierten Dosis an XsFRP5 abhängig (Abb. 4.5 D), wobei eine Missbildung des Blastoporus (wie in Abb. 4.5 C gezeigt) nicht dosis-abhängig verstärkt werden konnte. Eine Kultivierung injizierter Embryonen bis ins frühe Schwanzknospenstadium zeigte, dass diese Embryonen im Vergleich mit nicht-injizierten Kontrollen eine stark verkürzte Körperachse aufweisen (Abb. 4.5 E, F). Auch dieser Phänotyp korreliert mit einer Störung der konvergenten Extension und kann somit auf einen Defekt der durch den Wnt/PCP Signalweg gesteuerten planaren Zellpolarität zurückgeführt werden. Als das hierfür essentielle Wnt Protein wurde Xwnt5a beschrieben (Moon *et al.*, 1993). Diese Beobachtung bestätigt die oben beschriebene Interaktion (Punkt 4.1.2.1 und 4.1.2.2) von XsFRP5 mit Xwnt5a, wobei die frühe ektopische Sekretion von XsFRP in Ento- und Mesoderm hier zum Auftreten eines „Convergent Extension“-Phänotyps führt.

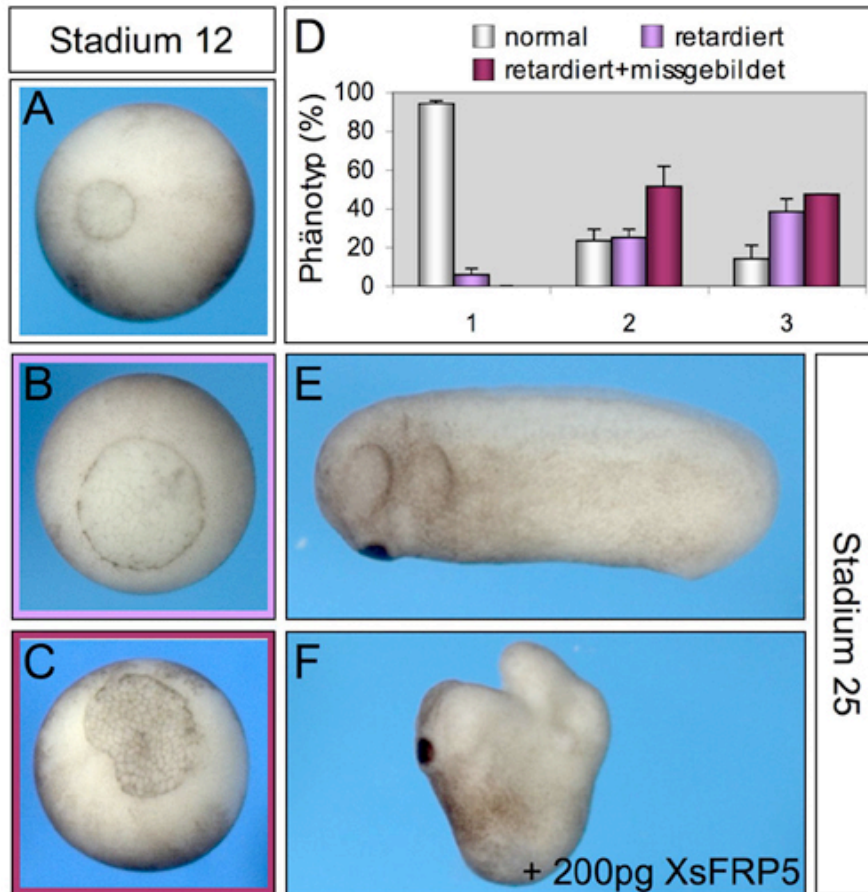


Abb. 4.5: Frühe Überexpression von XsFRP5 verlangsamt die Gastrulationsbewegungen und induziert Defekte in der konvergenten Extension. Injektion von 200pg *XsFRP5* mRNA führt zur Retardierung (B) und Missbildung (C) des Blastoporus im Vergleich zu einem nicht injizierten Zwillingsembryo (A). Statistische Auswertung der Blastoporusgröße und Form in Kontrollembryonen (1), mit 100pg *XsFRP5* mRNA (2) injizierten Embryonen sowie mit 200pg *XsFRP5* mRNA (3) injizierten Embryonen (D). Nach Injektion von 200pg *XsFRP5* mRNA zeigt ein Zwillingsembryo zu (E) eine drastische Verkürzung der anterior-posterioren Körperachse (F). Posteriore Ansicht mit dorsal nach oben (A-C). Laterale Ansicht mit anterior nach links (E, F).

Da für weiterführende Analysen im Hinblick auf die Organentwicklung Embryonen im späten Schwanzknospen- bzw. Kaulquappenstadium benötigt werden, ist eine Injektion von *XsFRP5* in frühe Teilungsstadien in dieser Hinsicht nicht zielführend.

4.1.3 Funktionelle Charakterisierung von XsFRP5 während der Organogenese

Auf Grund der dynamischen Expression in der Leber und an der Grenze zwischen Magen und Duodenum wurde die Funktion von XsFRP5 im Kontext der entodermalen Organogenese weiter untersucht.

4.1.3.1 Der Funktionsverlust von XsFRP5 nach Injektion von „antisense“ Morpholino Oligonukleotiden führt zu einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage und zu einer Vergrößerung des Magens

Die Auswirkungen des Funktionsverlustes eines Proteins können in *Xenopus laevis* mit Hilfe sogenannter „antisense“ Morpholino Oligonukleotide untersucht werden. Durch die Bindung dieser komplementären Morpholino Oligonukleotide an die mRNA wird die Translation des Proteins unterdrückt. Um effektiv zu sein, sollte das Morpholino Oligonukleotid zu 100% komplementär zur Zielsequenz sein und direkt am Startkodon oder aber im 5' untranslatierten Bereich (5'-UTR) binden. Durch eine Analyse der *Xenopus laevis* und *tropicalis* EST-Datenbanken konnte für XsFRP5 die Existenz eines Pseudoallels in *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Die im Folgenden beschriebenen Morpholino Oligonukleotide wurden in ihrer Sequenz so gewählt, dass die Translation aller Allele von XsFRP5 inhibiert werden kann. Wie in Abb. 4.6 A gezeigt, wurden zwei verschiedene Morpholino Oligonukleotide gegen XsFRP5 gewählt, wobei XsFRP5-Mo1 im Bereich des Startkodons, und XsFRP5-Mo2 50bp aufwärts im 5'-UTR bindet. Zusätzlich wurde ein „miss-match“-Morpholino mit fünf willkürlichen Basenaustauschen in der sonst der XsFRP5-Mo1 entsprechenden Sequenz als Kontrolle gewählt. Der Sequenzabschnitt des 5'-UTRs von XsFRP5, welcher die Morpholino-Bindestellen aufweist, ist in Abb. 4.6 B dargestellt. Die Sequenzunterschiede zwischen dem „Expressed Sequence Tag“ (EST) von XsFRP5 und seinem Pseudoallel wurden rot markiert. Die Morpholino-Bindestellen liegen in Bereichen 100%-iger Sequenzidentität, wie durch die schwarzen Balken veranschaulicht. Das XsFRP5 Startkodon wurde fett gedruckt dargestellt.

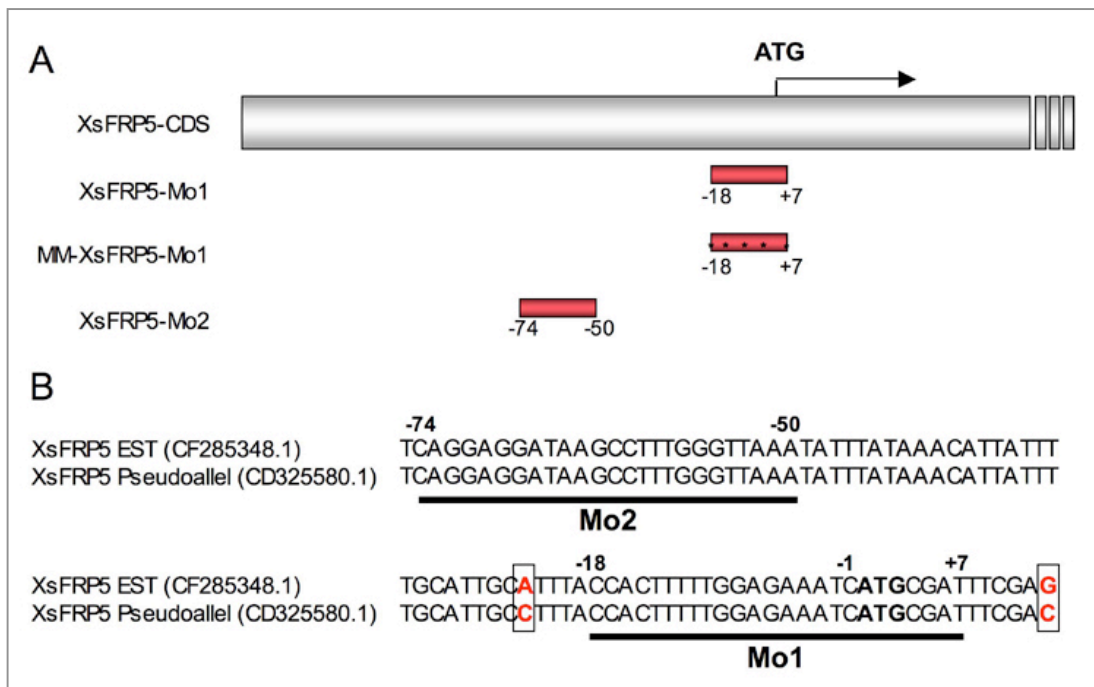


Abb. 4.6: Verschiedene „antisense“ Morpholino Oligonukleotide wurden komplementär zu XsFRP5 und seinem Pseudoallel gewählt. (A) Der XsFRP5-Mo1 und der MM-XsFRP5-Mo1, welcher sich durch fünf Basenaustausche vom Mo1 unterscheidet, wurden komplementär zur Region um das Startkodon gewählt. XsFRP5-Mo2 bindet im 5' untranslatierten Bereich (5'-UTR) von XsFRP5. (B) Eine Datenbankanalyse zeigte Unterschiede in der Basensequenz des 5'-UTRs zwischen dem XsFRP5 EST und dem Pseudoallel (in rot dargestellt). Die Morpholino-Bindestellen liegen zwischen diesen Bereichen (schwarze Balken). Das Startkodon ist fett gedruckt. Die NCBI Datenbank-Nummern für den EST und das Pseudoallel sind in Klammern angegeben.

Die Morpholino Oligonukleotide wurden *in vitro* und *in vivo* auf ihre Effektivität untersucht. Um die Effektivität der XsFRP5-Morpholinos *in vitro* zu analysieren, wurde eine gekoppelte Transkriptions- und Translationsreaktion durchgeführt, im Zuge derer ³⁵S-Methionin in das XsFRP5 Protein inkorporiert wurde. Es wurden ansteigende Konzentrationen der XsFRP5-Morpholinos eingesetzt. Sowohl der XsFRP5-Mo1, wie auch der XsFRP5-Mo2, konnten die Translation von XsFRP5 effizient inhibieren, während der MM-XsFRP5-Mo1 nur eine sehr leichte Reduktion der XsFRP5 Translationseffizienz bewirken konnte. Eine Kombination aus XsFRP5-Mo1 und Mo2 stellte sich als besonders effizient in der Blockierung der Translation heraus (Abb. 4.7 A). Zur *in vivo* Analyse wurde ein Fusionskonstrukt bestehend aus dem XsFRP5 5'-UTR von -311bp bis +7bp „in frame“ vor dem Leserahmen für sechs Myc-Epitope und das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) generiert. Dieses wurde

animal in frühe Teilungsstadien injiziert und die Embryonen im Gastrulastadium auf GFP Expression untersucht (Abb. 4.7 B). XsFRP5-Mo1 und Mo2 unterbinden eine Expression des GFP Proteins völlig. Der MM-XsFRP5-Mo1 hingegen konnte die Translation von GFP nicht verhindern. Zur Kontrolle wurden alle drei Morpholino Oligonucleotide mit GFP ohne Fusion des *XsFRP5* 5'UTR ko-injiziert. Dabei konnte kein Rückgang der GFP Fluoreszenz verzeichnet werden, ein weiteres Indiz für die Spezifität der Morpholinos für XsFRP5.

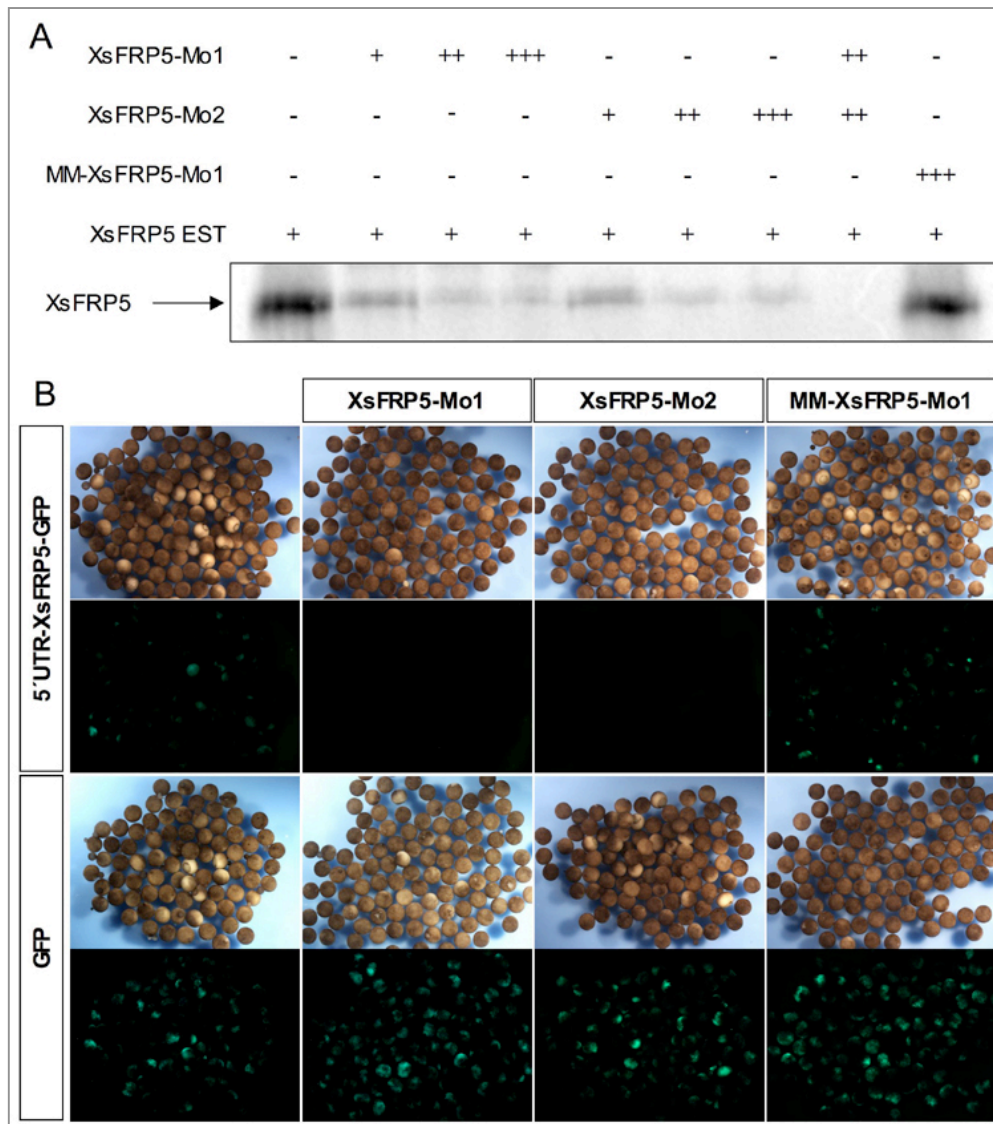


Abb. 4.7: Mehrere „antisense“ Morpholino Oligonucleotide komplementär zu *XsFRP5* können die Translation effizient unterdrücken. (A) Die *in vitro* Analyse der Morpholino Oligonucleotide in einem gekoppelten Transkriptions- und Translationsansatz zeigt, dass beide XsFRP5-Morpholinos die Translation effizient unterdrücken können, wobei die Kombination beider Morpholinos das beste Ergebnis erzielte. Der MM-XsFRP5-Mo1 konnte die Translation nicht signifikant inhibieren. (B) Sowohl 4ng XsFRP5-Mo1, als auch 4ng

XsFRP5-Mo2, unterdrücken die Translation von GFP zu 100%, während 4ng des MM-XsFRP5-Mo1 keine Wirkung zeigen. Nach Injektion der *GFP* mRNA ohne den *XsFRP5* 5'-UTR kommt es in keinem Fall zu einer Inhibition der Translation von GFP durch Morpholino Ko-Injektion.

Um den Einfluß von XsFRP5 auf die Entwicklung gastrointestinaler Organe zu untersuchen, wurden die Morpholino Oligonukleotide vegetal in frühe Teilungsstadien injiziert, wobei die Ko-Injektion von *LacZ* mRNA zur Kontrolle der Lokalisation der Morpholino Oligonukleotide diente. Die Injektion von XsFRP5-Mo1 wurde mehrfach mit unterschiedlichen Konzentrationen und in Kombination mit XsFRP5-Mo2 durchgeführt, in dieser Arbeit wird ein repräsentatives Experiment gezeigt (Abb. 4.8). Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen in allen Fällen den in Abb. 4.8 gezeigten. Die Embryonen wurden im späten Schwanzknospen- bzw. im Kaulquappenstadium fixiert und mittels whole-mount *in situ* Hybridisierung auf die Expression verschiedener Markergene untersucht. Alle Organe, welche XsFRP5 exprimieren, oder proximal zu einem XsFRP5 exprimierendem Gewebe liegen, wurden untersucht, wobei die Analyse von Vorläuferzell- und Differenzierungsmarker des Herzens (anhand von *Nkx2.5*), der Leber und des Darmtraktes (Fibrinogen) keinen Effekt zeigte (Abb. 4.8 M-R). Bei *Nkx2.5* handelt es sich um ein Mitglied der *Nkx*-Familie der Homöobox-Transkriptionsfaktoren, der spezifisch für das frühe Herzfeld ist (Tonissen *et al.*, 1994). Es konnten im Stadium 37/38 keine Unterschiede in der Expression von *Nkx2.5* in der Herzanlage zwischen Kontrollembryonen und mit XsFRP5-Morpholinos injizierten Embryonen festgestellt werden (Abb. 4.8 M-O). Fibrinogen, ein wichtiges Protein, das bei der Blutgerinnung und an der Entzündungsreaktion beteiligt ist und in *Xenopus* Embryonen im Stadium 40 in der Leber sowie dem Darmepithel exprimiert ist (Chen *et al.*, 2003), wurde ebenfalls untersucht. Weder die Leber noch das Darmepithel scheinen nach Injektion von XsFRP5-Morpholinos in der Expression von Fibrinogen beeinträchtigt zu sein (Abb. 4.8 P-R).

Die Analyse des pankreatischen Vorläufermarkers *Ptf1a/p48*, einem bHLH-Transkriptionsfaktor, ergab eine Reduktion der ventralen Pankreasanlage (Abb. 4.8 A-C). Dabei zeigte sich auch, dass andere Expressionsdomänen wie die Retina und das dorsale Pankreas nicht vom Funktionsverlust von XsFRP5 betroffen sind. Die dorsale Pankreasanlage scheint nach Injektion der XsFRP5-Morpholinos schwächer

gefärbt als im Kontrollembryo, dieser Effekt lässt sich jedoch durch eine stärkere Makierung der dorsalen Anlage durch überliegendes Mesoderm begründen (Abb. 4.8 C). In den *Ptf1a/p48*-gefärbten Vibratonschnitten lässt sich erkennen, dass die dorsale Pankreasanlage (markiert mit blauen Pfeilspitzen) in den Morpholino-injizierten Embryonen vergleichbar groß wie im Kontrollembryo ist (Abb. 4.8 A-C). Die ventralen Anlagen hingegen scheinen schmaler und verkürzt (rote Pfeilspitzen), ein Effekt der auch in den MM-XsFRP5-Mo1 injizierten Embryonen, wenngleich deutlich schwächer, zu beobachten ist. Dennoch ist anzumerken, dass alle Morpholino-injizierten Embryonen ventrale Pankreasanlagen aufwiesen, was auf einen Wachstumseffekt und nicht auf eine Wirkung von XsFRP5 auf die Spezifizierung dieser Organanlage hinweist. Die verringerte Größe der ventralen Pankreasanlage scheint auch mit einer leicht verringerten Größe des differenzierten Organs zu korrelieren, wie durch die Expression des exokrinen Markergens *XPDlp* gezeigt wird (Abb. 4.8 D-F). Allerdings ist der Effekt relativ schwach. Es lässt sich nicht eindeutig feststellen, ob der ventrale Anteil des Pankreas reduziert ist, oder womöglich das Duodenum einen größeren Teil des Pankreas verdeckt.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Explantate des gastrointestinalen Trakts von Morpholino-injizierten und Kontrollembryonen auf die Expression von Sox2 untersucht (Abb. 4.8 G-I). Sox2 ist ein ektodermal, aber auch ösophagial und im Magen exprimierter „SRY-related“ HMG-Box Transkriptionsfaktor (Chalmers *et al.*, 2000; Mizuseki *et al.*, 1998). Es zeigte sich nach Verlust von XsFRP5 eine posteriore Expansion der Sox2 Expression (markiert durch einen blauen Pfeil), welche möglicherweise den Effekt auf die *XPDlp* Expression erklärt. Sollte es sich um einen transienten Wachstumsdefekt handeln, könnte der ventrale Pankreas in späteren Stadien durch einen verbreiterten Magen stärker maskiert werden. Allerdings ist es in Kontrollembryonen das Duodenum, welches durch die Darmrotation über dem Pankreas zu liegen kommt. Um zu klären, ob der Verlust von XsFRP5 zur Expansion des Magens auf Kosten des Duodenums führt, wurden injizierte Embryonen auf die Expression von *XIHbox8* untersucht (Abb. 4.8 J-L). *XIHbox8*, ein Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, wird in allen pankreatischen Vorläuferzellen sowie dem Duodenum exprimiert. Wie schon für die *Ptf1a/p48* Expression konnte auch anhand dieses Markergens eine Reduktion der ventralen Pankreasanlage festgestellt werden (markiert mit einem roten Pfeil). Zusätzlich lässt sich ein starker Rückgang der

duodenalen *XIHbox8* Expression erkennen (markiert mit weißen Pfeilen), was auf eine Vergrößerung des Magens unter Verlust duodenaler Strukturen hinweist.

Generell war nach Analyse aller verwendeten Markergene erkennbar, dass auch der MM-XsFRP5-Mo1 die bereits für die Ko-Injektion der beiden XsFRP5-Morpholinos beschriebenen Phänotypen (siehe oben) hervorrief, wenngleich mit nicht signifikanter statistischen Häufigkeit (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Reduktion der *XIHbox8* Färbung im Duodenum war auch nach Injektion des „miss match“-Morpholinos deutlich erkennbar (Abb. 4.8 K). In den durchgeführten Spezifitätskontrollen zeigte der MM-XsFRP5-Mo1 *in vivo* und *in vitro* keine Inhibition der Translation von XsFRP5 (Abb. 4.7). Die beobachtete schwache Inhibition endogener *XsFRP5* Expression könnte durch die hohe Konzentration von „miss match“-Morpholino Molekülen in Vergleich zur *XsFRP5* mRNA bedingt sein.

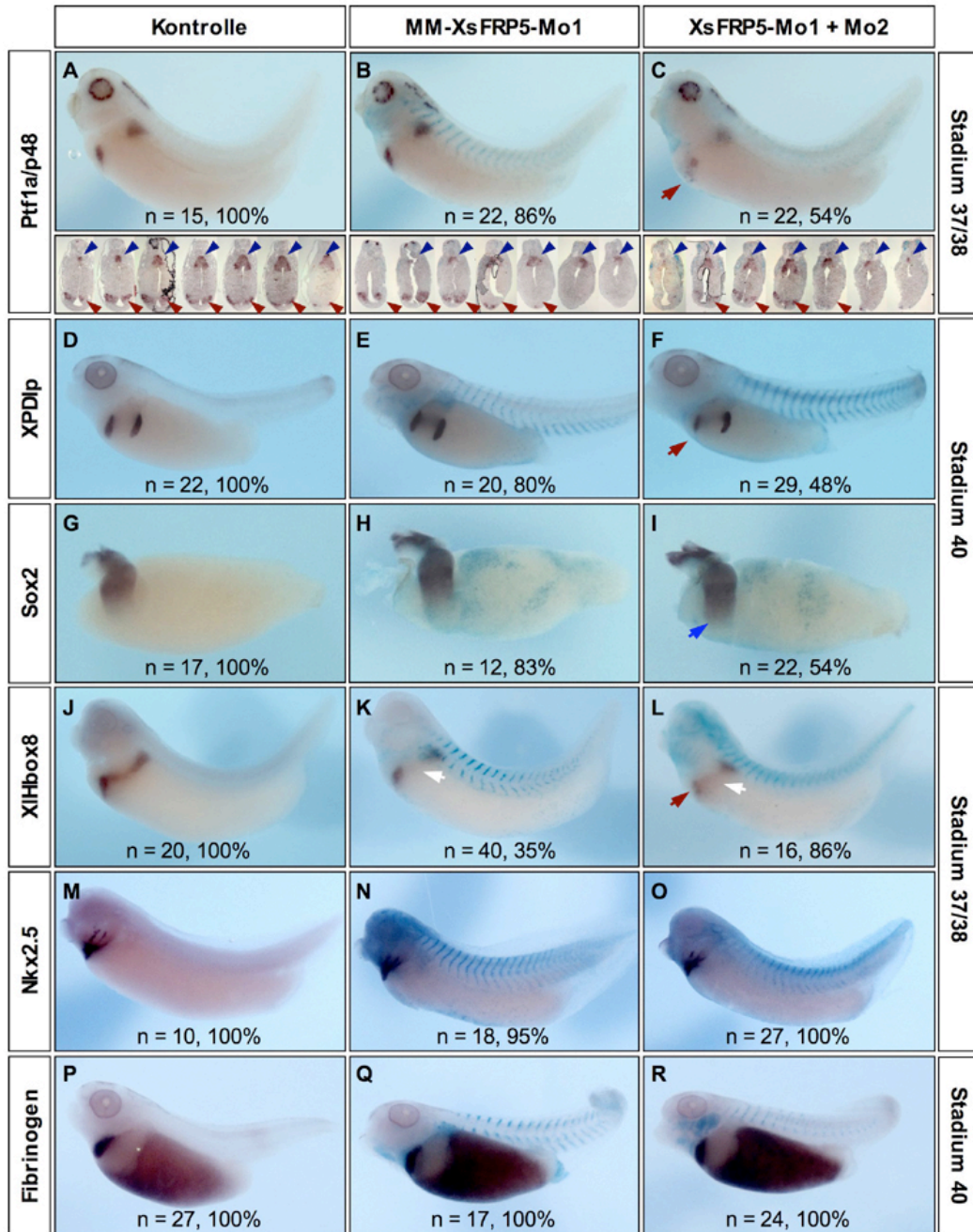


Abb. 4.8: Der Funktionsverlust von XsFRP5 im Entoderm führt zu einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage sowie zu einer Vergrößerung des Magens unter Verlust duodener Stukturen. Kontrollembryonen, mit 4ng MM-XsFRP5-Mo1 injizierte Embryonen oder mit einer Kombination von 4ng XsFRP5-Mo1 und 2ng XsFRP5-Mo2 injizierte Embryonen wurden einer whole-mount *in situ* Hybridisierung gegen *Ptf1a/p48* (A, B, C), *XPDlp* (D, E, F), *Sox2* (G, H, I), *XIHbox8* (J, K, L), *Nkx2.5* (M, N, O) und *Fibrinogen* (P, Q, R) unterzogen. (A-C) Vibratom-Schnitte *Ptf1a/p48*-gefärbter Embryonen zeigen die dorsale und die beiden ventralen Pankreasanlagen. 150pg *LacZ* mRNA wurden als „lineage tracer“ ko-injiziert. Der rote Pfeil markiert das ventrale Pankreas, der blaue Pfeil die posteriore Expansion der *Sox2* Expression und weiße Pfeile das Duodenum. Blaue Pfeilspitzen markieren die dorsale Pankreasanlage, rote Pfeilspitzen die beiden ventralen Anlagen. Laterale Ansicht mit anterior nach links.

Die relativ geringe Anzahl an untersuchten Embryonen lag in der starken Toxizität der verwendeten Morpholino Oligonukleotide begründet. So wurde mit einer Injektion von insgesamt 6ng an XsFRP5-Morpholinos der Rahmen des Möglichen voll ausgeschöpft. Die geringe statistische Wahrscheinlichkeit der Phänotypen von ungefähr 50% könnte durch die besseren Überlebenschancen von Embryonen, welche weniger Morpholino Moleküle im prospektiven Entoderm aufwiesen, erklärt werden, da die Injektion geringerer Dosen an XsFRP5-Morpholino Oligonukleotiden generell in sehr schwachen bis nicht detektierbaren Effekten resultierte (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nach Funktionsverlust von XsFRP5 eine möglicherweise transiente Reduktion der ventralen Pankreasanlage, sowie eine Expansion des Magens in den Bereich des Duodenums auftritt. Andere Organe, wie Herz und Leber sowie das Darmepithel, schienen nicht von einem „Knock-down“ von XsFRP5 betroffen zu sein.

4.1.3.2 Die intrazelluläre Stimulation kanonischer Wnt Signaltransduktion bewirkt eine Reduktion der ventralen und einen Verlust der dorsalen Pankreasanlage

Nachdem die Funktion der XsFRP5 vermittelten Inhibition der Wnt Signaltransduktion während der Entwicklung entodermaler Organe auf extrazellulärer Ebene untersucht wurde, sollte die Analyse auf die Transkriptionsfaktor-Ebene erweitert werden. Die Klonierung und ektopische Expression verschiedener Lef1- bzw. β -Catenin basierter Konstrukte an die Glucocorticoid-Rezeptor-Ligandenbindedomäne (GR-LBD, Abb. 4.9) ermöglichte die Entoderm-spezifische und zeitlich kontrollierte Stimulation kanonischer Wnt Signaltransduktion.

Bei Lef1-GR handelt es sich um ein Fusionskonstrukt des murinen Lef1 C-terminal an die GR-LBD (Abb. 4.9). Lef1 gehört zu den HMG-Box Transkriptionsfaktoren und weist zusätzlich zur DNA-bindenden HMG-Domäne eine N-terminale β -Catenin-Bindedomäne und eine Transaktivierungsdomäne auf. Nach Injektion von *Lef1-GR*

mRNA in *Xenopus* Embryonen wird eine ektopische Aktivierung der kanonischen Wnt Signaltransduktion erwartet. Nach einer Deletion der β -Catenin-Bindedomäne bzw. der HMG-Domäne sollen die erhaltenen Konstrukte Lef Δ BD-GR und Lef Δ HMG-GR nach ektopischer Expression dominant-negativ wirken. Um kanonische Wnt Signaltransduktion konstitutiv aktivieren zu können, wurde eine Variante des murinen β -Catenin C-terminal an die GR-LBD fusioniert. In β -CateninS33A wurde das Serin an Position 33 durch ein Alanin ersetzt, wodurch die GSK3 β β -Catenin nicht mehr phosphorylieren und dadurch der proteolytischen Degradation zuführen kann (Abb. 4.9). Zusätzliche Punktmutationen führten zu Aminosäureaustauschen an Position 37 (Serin zu Alanin) sowie an Position 41 (Tyrosin zu Alanin), wodurch neben der primären auch alle sekundären Phosphorylierungsstellen für GSK3 β zerstört sind.

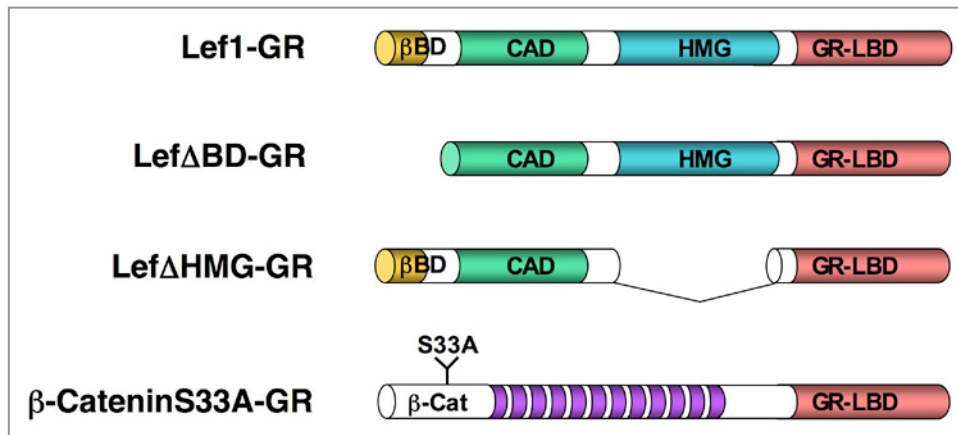


Abb. 4.9: Domänenstruktur verschiedener Lef1- bzw. β -Catenin basierter Hormon-induzierbarer Fusionskonstrukte. BD = β -Catenin Bindedomäne, CAD = Transkriptionsdomäne, HMG = „High Mobility Group“ DNA-Bindedomäne, GR-LBD = Glucocorticoid Rezeptor Ligandenbindedomäne. S33A symbolisiert den Aminosäureaustausch von Serin33, Serin37 und Tyrosin41 zu Alanin. Die 12 Armadillo Repeat-Sequenzen in β -Catenin sind violett dargestellt.

Die Fusionskonstrukte wurden auf ihre Wirkung auf die dorso-ventrale Achsenspezifizierung untersucht, wobei die konstitutiv-aktiv wirkenden Konstrukte in eine ventrale Blastomere im 4-Zell-Stadium und die dominant-negativ wirkenden Konstrukte in beide dorsalen Blastomeren im 4-Zell-Stadium injiziert wurden (Abb. 4.10). Die Induktion der Konstrukte durch Dexamethason-Behandlung erfolgte im 16-Zell-Stadium und wurde über Nacht bis zum Beginn der Gastrulation fortgesetzt. Die Embryonen wurden nach Injektion der konstitutiv-aktiven Konstrukte zwischen

Stadium 30 und 35 auf die Ausprägung einer zweiten Körperachse oder nach Injektion der dominant-negativen Konstrukte auf eine Ventralisierung untersucht.

Es zeigte sich, dass besonders Lef1-GR eine gute Induzierbarkeit in Achsenduplikations-Experimenten, sowie wenig bis keine Hintergrundaktivität ohne Hormon-Induktion besitzt (Abb. 4.10 A). Lef1-GR induziert nach Behandlung mit Dexamethason beinahe 100%-ige Achsenduplikation, während uninduziertes Lef1-GR kaum einen Effekt auf die Achsendetermination zeigt. β -CateninS33A-GR ist nicht so effektiv in der Induktion zweiter Körperachsen wie Lef1-GR, zeigt jedoch auch ohne Hormon-Behandlung einen starken Effekt. Die Injektion niedrigerer Konzentrationen an β -CateninS33A-GR führte nicht mehr zu einer signifikanten Induktion zweiter Körperachsen. Die Injektion von β -CateninS333A diene als Kontrolle, um den Effekt von stabilisiertem β -Catenin auf die frühembryonale Musterbildung darzustellen (Abb. 4.10 B). Die beiden dominant-negativen Konstrukte sollten durch die Inhibition der kanonischen Wnt Signaltransduktion auf der prospektiven dorsalen Seite zu einer Ventralisierung der Embryonen führen. Dieser Effekt konnte beobachtet werden, jedoch zeigen sowohl Lef Δ BD-GR (Abb. 4.10 C) wie auch Lef Δ HMG-GR (Abb. 4.10 D) auch ohne Induktion durch Dexamethason einen stark ventralisierenden Effekt. Die Injektion einer niedrigeren Konzentration an mRNA wirkte sich bei Lef Δ BD-GR nicht positiv auf die Hintergrundaktivität ohne Dexamethason-Behandlung aus (Abb. 4.10 C). Die Injektion einer niedrigeren Konzentration von Lef Δ HMG-GR reduzierte die Hintergrundaktivität des Fusionsproteins auf 10%, jedoch konnte auch nach Dexamethason-Behandlung keine für weiterführende Experimente ausreichend starke Ventralisierung der Embryonen mehr hervorgerufen werden (Abb. 4.10 D).

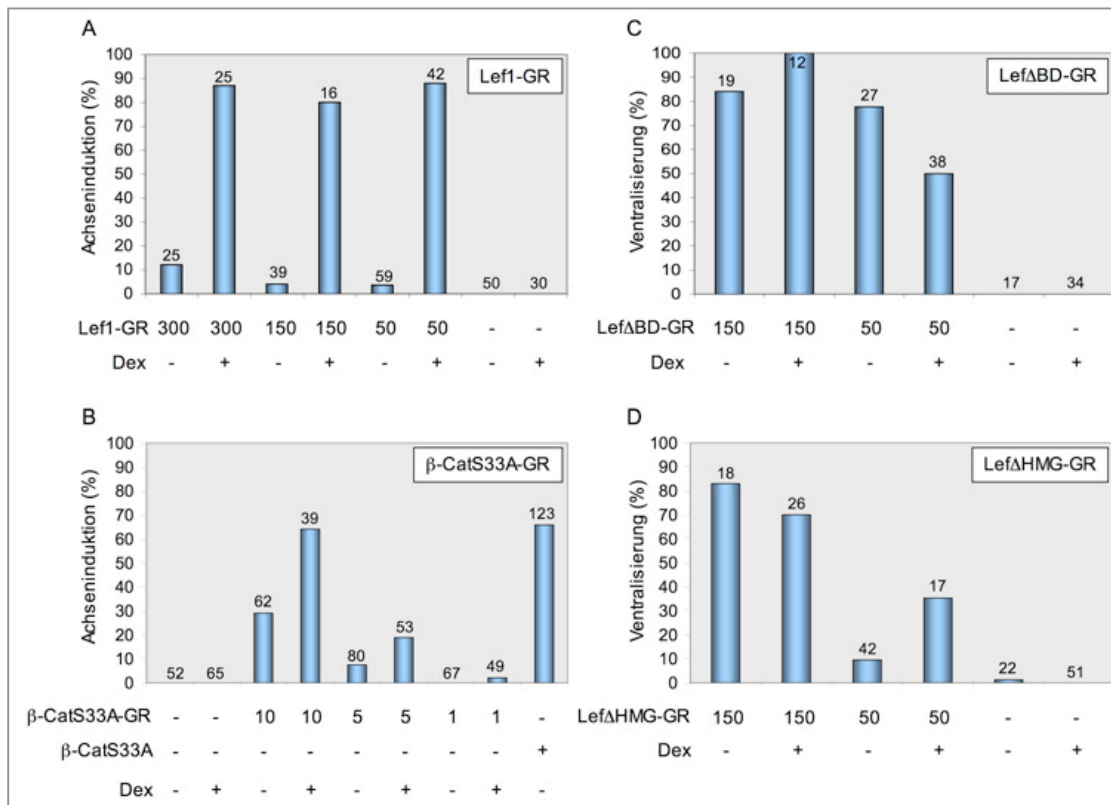


Abb. 4.10: Bei Injektion in frühe Teilungsstadien induzieren konstitutiv-aktiv wirkende Konstrukte nach Dexamethason-Behandlung dorsale Achsenduplikation, während dominant-negative Konstrukte zu einer Ventralisierung der Embryonen führen. Die konstitutiv-aktiv wirkenden, Hormon-induzierbaren Konstrukte wurden im 4-Zell-Stadium in eine von zwei ventralen Blastomeren in den angegebenen Konzentrationen (pg/Embryo) injiziert. Die dominant-negativ wirkenden Konstrukte wurden in beide dorsalen Blastomeren im 4-Zell-Stadium injiziert. Die Dexamethason-Behandlung (Dex) wurde vom 16-Zell-Stadium bis zum Beginn der Gastrulation im Dunkeln durchgeführt. Da die Experimente nur 1x durchgeführt wurden, ist die jeweilige Zahl an Embryonen über den einzelnen Balken aufgeführt.

Für weiterführende Studien wurde anhand der in den Achsenduplikations-Experimenten erzielten Ergebnisse Lef1-GR ausgewählt. Die Auswirkungen der Lef1-GR-vermittelten, entoderm-spezifischen Stimulation der kanonischen Wnt Signaltransduktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung auf die Ausbildung verschiedener Organanlagen wurde in einer weiterführenden Studie bearbeitet (Melchert, Diplomarbeit 2007).

Im Wesentlichen wurde *Lef1-GR* mit *LacZ* mRNA als „lineage tracer“ in das prospektive Entoderm früher Embryonalstadien injiziert und Lef1-GR zu

unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung durch Dexamethason-Behandlung aktiviert. Dazu wurden das Ende der Gastrulation (Stadium 13), ein spätes Neurula-Stadium (Stadium 18) und ein Zeitpunkt während der Ausknospung unterschiedlicher Organanlagen (Stadium 25) zur ektopischen Aktivierung von Lef1-GR gewählt. Eine umfassende Analyse verschiedener entodermaler Markergene mittels whole-mount *in situ* Hybridisierung folgte (Melchert, Diplomarbeit 2007). Im Besonderen soll hier die Auswirkung einer stimulierten kanonischen Wnt Signaltransduktion auf das exokrine Markergen XPDip hervorgehoben werden. Nach Induktion von Lef1-GR mit Dexamethason zu allen untersuchten Zeitpunkten kam es zu einem Verlust exokriner Zellen der dorsalen Pankreasanlage (Abb. 4.11 F-H). Das ventrale Pankreas war reduziert, wobei eine Korrelation zwischen der Reduktion der ventralen Anlage und dem Zeitpunkt der Dexamethason-Behandlung beobachtet werden konnte (Abb. 4.11 F-H). Je später die Dexamethason-Behandlung durchgeführt wurde, umso schwächer ausgeprägt war die Reduktion der ventralen Pankreasanlage.






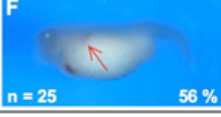


	- DEX	+ DEX St. 13	+ DEX St. 18	+ DEX St. 25	
Kontrolle	 A n = 22 100 %	 B n = 23 100 %	 C n = 25 100 %	 D n = 17 94 %	XPDip
75 pg Lef1-GR 4/4 vegetal	 E n = 22 86 %	 F n = 25 56 %	 G n = 20 85 %	 H n = 26 77 %	
Stadium 40/41					

Abb. 4.11: Die Aktivierung von Lef1-GR zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung resultiert in einem Verlust der dorsalen und einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage [entnommen aus (Melchert, Diplomarbeit 2007)]. Uninjizierte Kontrollembryonen (A-D) und mit Lef1-GR injizierte Embryonen (E-H) wurden mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung auf die Expression von XPDip untersucht. Die Induktion von Lef1-GR durch Dexamethason-Behandlung erfolgte in Stadium 13 (B, F), Stadium 18 (C, G) und Stadium 25 (D, H). Die dorsale Pankreasanlage ist mit einem roten Pfeil markiert. Anterior nach links.

Sowohl der Funktionsverlust von XsFRP5 (Abb. 4.8) wie auch die Überaktivierung kanonischer Wnt Signaltransduktion [Abb. 4.11; (Melchert, Diplomarbeit 2007)] wirkten sich inhibierend auf die Pankreasentwicklung aus. Der Verlust von XsFRP5 beeinflusst jedoch nur das ventrale Pankreas negativ, was mit der endogenen Expression von XsFRP5 in der Leberanlage erklärt werden könnte. Demgegenüber

ist XsFRP5 nicht im Bereich der dorsalen Pankreasanlage exprimiert (siehe Abb. 4.1). Die pan-entodermale Aktivierung kanonischer Signaltransduktion wirkt sich stärker inhibierend auf die Pankreasentwicklung aus, wobei der dorsale Teil besonders betroffen ist. Die stärkste Inhibition konnte bei Aktivierung von Lef1-GR nach dem Ende der Gastrulation im Stadium 13 erzielt werden (Abb. 4.11 B, F); zu diesem Zeitpunkt wird endogenes XsFRP5 nur schwach exprimiert. Zusätzlich kommt es wahrscheinlich nach „Knock-down“ von XsFRP5 zu einer De-Repression nicht-kanonischer Wnt Proteine, welche die hier durch die Aktivierung kanonischer Wnt Signaltransduktion beobachteten Effekte nicht induzieren können.

4.1.3.3 Expressionsanalyse von XsFRP5 und verschiedenen Xwnt Proteinen

Ein Vergleich der Expressionsdomänen von XsFRP5 und den in dieser Studie verwendeten Xwnt Proteinen sollte gemeinsam mit den funktionalen Daten ein oder mehrere Wnt Proteine als Kandidaten einer XsFRP5-vermittelten Inhibition der Wnt Signaltransduktion in der entodermalen Organogenese definieren. Untersucht wurde die Expression aller XwnTs, wobei besonders die Expression während der Organogenese in den Stadien 35 und 40 beleuchtet wurde. Da nach Funktionsverlust von XsFRP5 kein Defekt in der Spezifikation der Organanlagen festgestellt werden konnte, wurde auf einen möglicherweise transienten Wachstumsdefekt geschlossen (Punkt 4.1.3.1). Folglich sollte ein Xwnt Protein, um ein potentielles Ziel einer XsFRP5-vermittelten Inhibition zu sein, während der Ausknospung der pankreatischen Organanlage im oder um das Pankreasepithel exprimiert werden. Diese Ausknospung erfolgt in Froschembryonen ab Stadium 37 (Nieuwkoop und Faber, 1967). Selbige Schlussfolgerung kann auch für die gastroduodenale Vorläuferzellpopulation angewandt werden, da sich ab Stadium 37 entodermale Zellen der dorsalen Wand des Verdauungstrakts lösen, um die posteriore Wand des Magens zu bilden (Nieuwkoop und Faber, 1967). Auch an diesem Prozess könnten Wnt Proteine des umliegenden Ento- oder Mesoderms beteiligt sein, welche nach Funktionsverlust von XsFRP5 eine Expansion des Magens induzieren.

In Stadium 35 konnte die XsFRP5 Expression, wie bereits beschrieben, in der sich entwickelnden Leberanlage detektiert werden (Pilcher und Krieg, 2002; Abb. 4.1;

Abb. 4.12 A). *Xwnt2b* konnte nur nach langer Färbedauer detektiert werden, wobei lediglich die Expression im Hinterhirn und in den Branchialbögen spezifisch zu sein scheint (Abb. 4.12 B). *Xwnt3a* Expression konnte entodermal nicht nachgewiesen werden, sondern nur in der Schwanzspitze sowie in Mittel- und Hinterhirn (Abb. 4.12 C). *Xwnt4* zeigte ebenfalls keine entodermale Expression, sondern markierte neben verschiedenen Gehirnregionen und den Somiten den Hyoidbogen und die Branchialbögen, sowie den Pronephros (Abb. 4.12 D). Auch *Xwnt5a* scheint zu diesem Zeitpunkt nicht entodermal exprimiert zu sein. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Färbung der Schwanzspitze und der Branchialbögen (Abb. 4.12 E). *Xwnt8* Expression konnte in diesem Stadium anhand von *in situ* Hybridisierung nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.12 F). *Xwnt8b* wird sehr schwach im Isthmus exprimiert (Abb. 4.12 G). *Xwnt11* und *Xwnt11R* zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster in den Somiten und den migrierenden Neuralleistenzellen, wobei zu beachten ist, dass *Xwnt11R* zusätzlich in der Herzanlage sowie in migratorischen mesenchymalen Zellen in der dorsalen Flosse exprimiert wird [(Abb. 4.12 H, I; (Garriock *et al.*, 2005; Ku und Melton, 1993)].

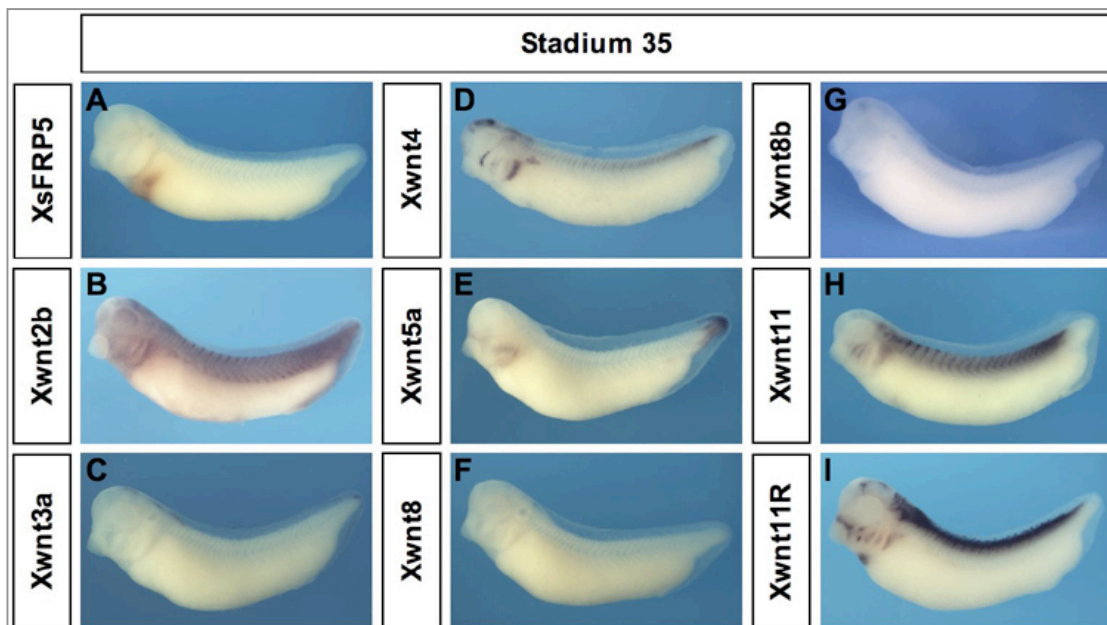


Abb. 4.12: Mehrere XwnTs zeigen komplementäre oder überlappende Expressionsmuster zu XsFRP5 im Stadium 35. Die whole-mount *in situ* Hybridisierung erfolgte unter Verwendung Digoxigenin-markierten „antisense“-Sonden gegen *XsFRP5* (A), *Xwnt2b* (B), *Xwnt3a* (C), *Xwnt4* (D), *Xwnt5a* (E), *Xwnt8* (F), *Xwnt8b* (G), *Xwnt11* (H) und *Xwnt11R* (I). Laterale Ansicht mit anterior nach links.

Im Stadium 40 wurden zur detaillierteren Analyse der Expressionsmuster der Gastrointestinaltrakt und das Herz herauspräpariert und anschließend einer whole-mount *in situ* Hybridisierung unterzogen. Dabei wurde XsFRP5 Expression wie bereits beschrieben im posterioren Magen und im Duodenum detektiert (Abb. 4.13 A, Pilcher und Krieg, 2002). Xwnt2b wird im gesamten anterioren Gastrointestinaltrakt exprimiert, wobei der Ösophagus die höchste Expression aufweist (Abb. 4.13 B). Xwnt3a wird zu diesem Zeitpunkt ausschließlich in der Lunge exprimiert (Abb. 4.13 C). Xwnt4 Transkripte konnten nur in der Spitze der Lungenanlage detektiert werden (Abb. 4.13 D). Xwnt5a konnte im Ösophagus, der Lungenspitze, dem anterioren Magen und dem posterioren Darm detektiert werden (Abb. 4.13 E). Im Stadium 40 konnte keine entodermale Xwnt8 oder Xwnt8b Expression festgestellt werden (Abb. 4.13 F, G). Xwnt11 zeigt eine sehr spezifische Expression im Septum transversum Mesenchym sowie in einigen Zellen des dorsalen Ösophagus (Abb. 4.13 H), während Xwnt11R hauptsächlich im Herzen detektiert werden konnte (Abb. 4.13 I).

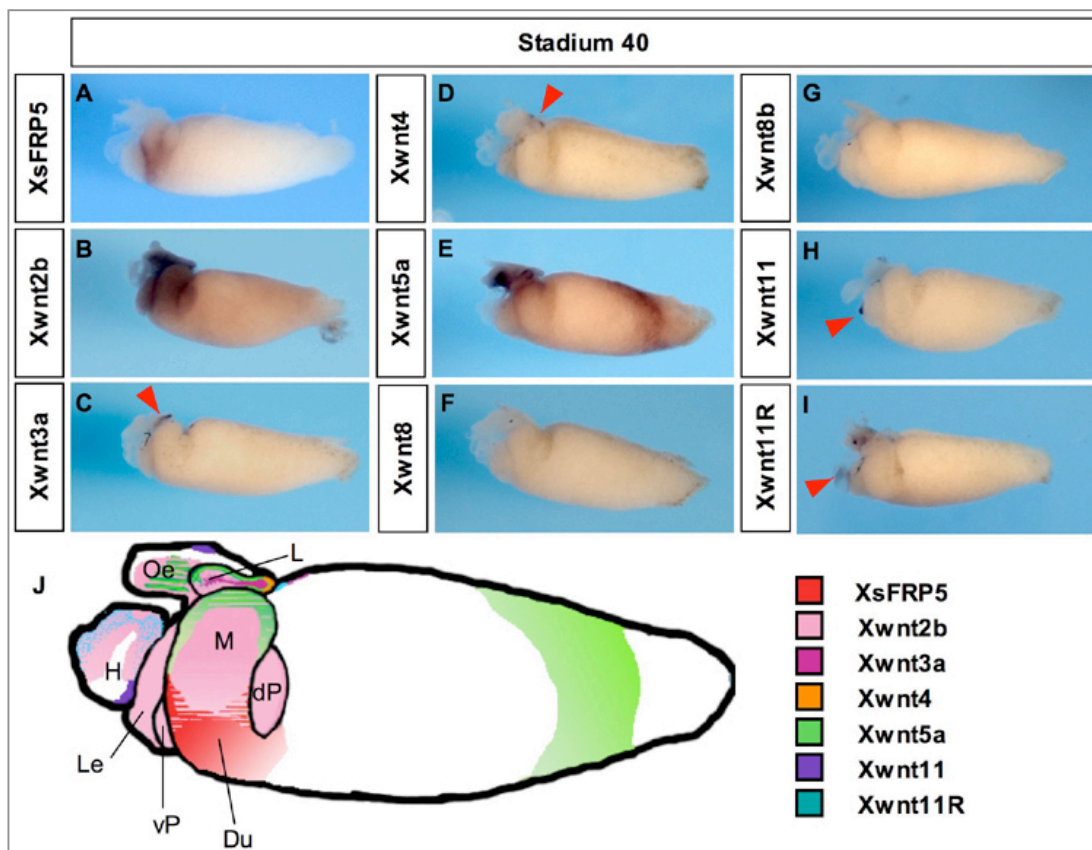


Abb. 4.13: Mehrere Xwnts zeigen komplementäre oder überlappende Expressionsmuster zu XsFRP5 in gastrointestinalen Explantaten des Stadiums 40. Der Gastrointestinaltrakt und das Herz wurden aus Kontrollembryonen im Stadium 40 explantiert

und einer whole-mount *in situ* Hybridisierung unter Verwendung Digoxigenin-markierten „antisense“ Sonden gegen *XsFRP5* (A), *Xwnt2b* (B), *Xwnt3a* (C), *Xwnt4* (D), *Xwnt5a* (E), *Xwnt8* (F), *Xwnt8b* (G), *Xwnt11* (H) und *Xwnt11R* (I) unterzogen. Rote Pfeilspitzen markieren spezifische Expressionsdomänen. (J) Graphische Darstellung aller detektierten Expressionsdomänen. Laterale Ansicht mit anterior nach links. Du = Duodenum, dP = dorsales Pankreas, H = Herz, L = Lunge, Le = Leber, M = Magen, Oe = Ösophagus, vP = ventrales Pankreas.

Um den Vergleich der einzelnen Expressionsdomänen zu erleichtern, wurden die verschiedenen Muster in einer graphischen Darstellung vereint (Abb. 4.13). Dabei zeigten sich *Xwnt2b* als überlappend mit und *Xwnt5a* als komplementär zu *XsFRP5* exprimiert. Dieses Expressionsmuster unterstreicht die unter Punkt 4.1.2 erhaltenen Interaktionsdaten von *XsFRP5* mit *Xwnt2b* bzw. *Xwnt5a*, was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei *Xwnt2b* und *Xwnt5a* um die endogenen Interaktionspartner von *XsFRP5* handeln könnte. Besonders *Xwnt2b* zeichnet sich durch eine sehr starke Immunopräzipitation aus (Tabelle 4.1). Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten „antisense“ Morpholino Oligonukleotide gegen *Xwnt2b* oder *Xwnt5a* zum Einsatz gebracht werden. Sollten *Xwnt2b* und *Xwnt5a* die gesuchten Kandidaten sein, wäre nach Injektion dieser Morpholinos ins prospektive Entoderm mit einem gegenteiligen Effekt auf die ventrale Pankreasanlage bzw. den Magen als nach Funktionsverlust von *XsFRP5* beschrieben (Punkt 4.1.3.1) zu rechnen.

4.1.4 Überexpression von *XsFRP5* und *VegT* in animalen Kappenexplantaten induziert pankreatische Genexpression

Im Blastulastadium bilden ektodermale Zellen das Dach des Blastocoels. Diese Zellen können isoliert und kultiviert werden, wobei sie ohne weiteren Stimulus zu atypischen Epidermiszellen differenzieren. Die Behandlung der Explantate mit Morphogenen, oder auch die Injektion verschiedener Keimblatt-spezifischer Determinanten oder Wachstumsfaktoren, erlaubt eine Differenzierung dieser pluripotenten Vorläuferzellpopulation in verschiedenste Zelltypen und Gewebe (Henry *et al.*, 1996; Lamb *et al.*, 1993). Diese Methode sollte für die weitere Analyse der Effekte einer *XsFRP5* Überexpression genutzt werden.

Dazu wurde in den Kappenexplantaten durch die Expression von *VegT*, einem Transkriptionsfaktor, welcher in diesem System ausreichend für die Spezifizierung

ento- und mesodermaler Zellen ist, eine gemischte Population solcher Zellen induziert. Die Auswirkung einer Ko-Expression von XsFRP5 auf pankreatische und hepatische Genexpression sollte nach Kultivierung der Explantate bis zur späten Organogenese-Phase mittels RT-PCR untersucht werden (Abb. 4.14).

Anhand verschiedener Kontrollen konnte die Qualität und Homogenität der untersuchten Proben festgestellt werden. Eine PCR mit Histon H4-spezifischen Oligonukleotiden zeigt in allen Proben eine gleichmäßig starke Bande, welche jedoch nicht ohne eine vorangegangene Reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA, auftritt. Folglich enthielten die RNA-Präparationen keine genomische DNA. Die effektive Induktion mesodermaler Zelltypen in den Explantaten durch VegT wurde anhand des mesodermalen Markergens *Xtwist* festgestellt. Kappenexplantate, welche mit VegT injiziert wurden, weisen die Expression duodенaler und hepatischer Markergene auf. Die Behandlung dieser VegT-injizierten Kappenexplantate mit Retinsäure (RA) führt zu einer robusten Induktion pankreatischer Markergene (Chen *et al.*, 2004a). *XIHbox8*, eine Homöobox-Transkriptionsfaktor, wird in pankreatischen Vorläuferzellen und im Duodenum exprimiert. Da die mit VegT injizierten Explantate keine der anderen pankreatischen Marker wie *Ptf1a/p48* bzw. *XPD1p* und Insulin exprimieren, scheint es sich bei den *XIHbox8*-exprimierenden Zellen um solche mit duodенaler Identität zu handeln. Weiters zeigte sich, dass die Expression von XsFRP5 durch VegT induziert werden konnte. XsFRP5 alleine zeigt keine Wirkung auf die hier analysierten Gene. Eine Ko-Expression von VegT und ansteigender Dosen an XsFRP5 führt zu einer robusten und Dosis-abhängigen Induktion pankreatischer Vorläufer- und Differenzierungsmarker. Eine Insulin Expression konnte durch XsFRP5 jedoch nicht induziert werden, im Gegensatz zur Behandlung VegT-injizierter Kappen mit 5µM Retinsäure (RA). Insulin-produzierende β-Zellen werden in *Xenopus* Embryonen nur in der dorsalen Pankreasanlage gebildet, was die Vermutung nahe legt, dass XsFRP5 die Bildung einer ausschließlich ventralen, pankreatischen Zellpopulation in VegT-injizierten Kappenexplantaten induziert. Die Expression des Homöobox Transkriptionsfaktors *Hex*, eines hepatischen Vorläufermarkers, kann durch XsFRP5 Ko-Injektion ebenfalls leicht erhöht werden. Transthyretin, ein Marker für differenzierte Leberzellen, zeigt jedoch keine Reaktion auf die XsFRP5 Expression. Die Expression des „SRY-related“ HMG-box Transkriptionsfaktors *Sox2*, eines Markergenes für Ösophagus und Magen, wird bei

Koinjektion niedriger Dosen induziert, mit ansteigender XsFRP5 Dosis geht dieser Effekt jedoch wieder verloren. Die schwache Expression von Sox2 in Kontrollkappen könnte neurale Expression reflektieren, bei VegT-Injektion kann jedoch von einer Spezifizierung entodermaler Sox2-exprimierender Zellen ausgegangen werden. Koinjektion geringer Dosen von XsFRP5 verstärken die Sox2 Expression, bei Injektion höherer Dosen geht dieser Effekt wieder verloren.

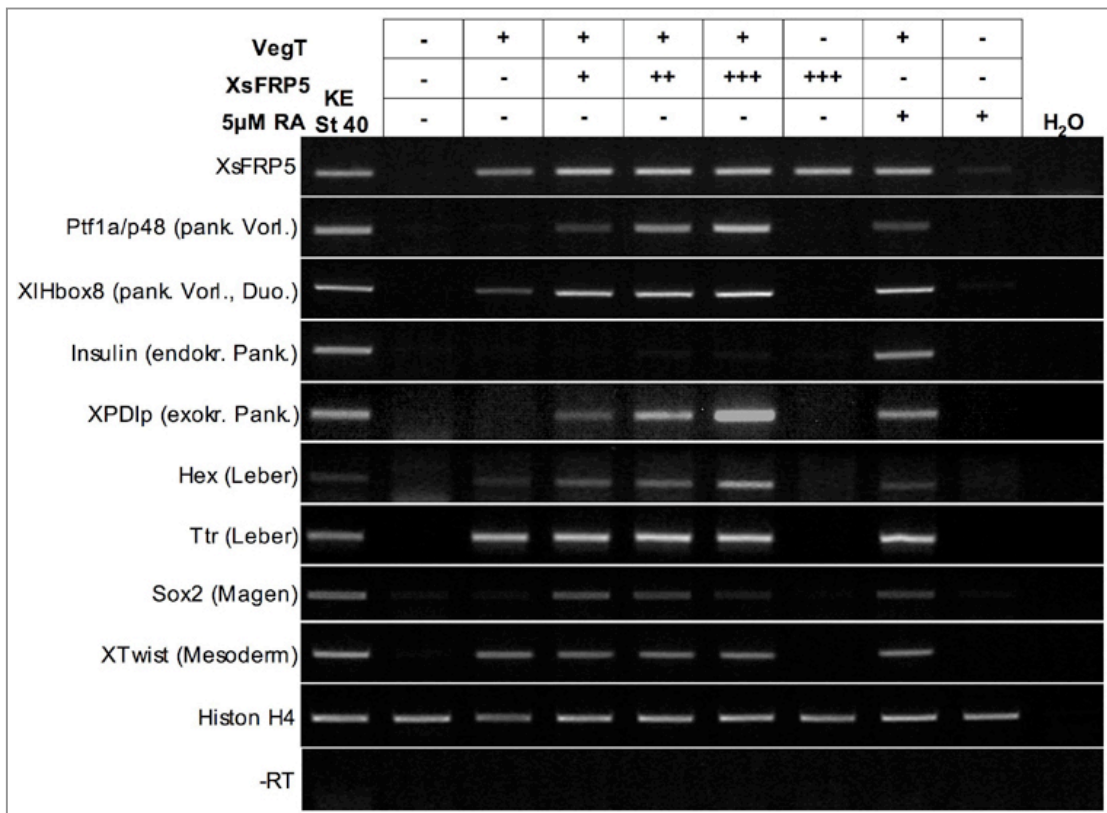


Abb. 4.14: Die Überexpression von XsFRP5 in VegT-injizierten animalen Kappenexplantaten induziert die robuste Expression pankreatischer Markergene. Es wurden 200pg *VegT* mRNA und 50, 100 und 200pg *XsFRP5* mRNA animal in beide Blastomeren im Zweizell-Stadium injiziert. Animale Kappenexplantate wurden im Stadium 8/9 geschnitten, die Explantate in Stadium 9 mit RA behandelt und die Explantate bis Stadium 40 kultiviert. Die RT-PCR Analyse der pankreatischen Vorläufermarker *Ptf1a/p48* und *XIHbox8* sowie der exokrine Marker *XPDlp* zeigen eine deutliche Induktion nach Injektion von ansteigenden Dosen an *XsFRP5* mRNA. Die *XsFRP5* RT-PCR Analyse zeigt die endogene *XsFRP5* Expression. KE = Kontrollembryonen im Stadium 40, RA = Retinsäure.

Die Analyse der Effekte einer ektopischen Expression von XsFRP5 gemeinsam mit VegT in animalen Kappenexplantaten zeigte eine starke Induktion ventral-pankreatischer Markergenenexpression, ein Effekt, der mit der spezifischen Reduktion der ventralen Pankreasanlage bei einem Funktionsverlust von XsFRP5 in ganzen Embryonen korreliert. Auch die, wenngleich schwache, Reduktion der Sox2

Expression in Kappen komplementiert die nach einem Funktionsverlust von XsFRP5 auftretende Verbreiterung des Magens (wie unter Punkt 4.1.3.1 beschrieben).

4.1.4.1 Die XsFRP5-vermittelte pankreatische Genexpression in VegT-injizierten Kappenexplantaten ist Retinsäure-abhängig

Durch Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Retinsäure nicht nur essentiell für die Spezifizierung der dorsalen Pankreasanlage ist, sondern auch die Bildung exokriner Zellen in der ventralen Anlage verstärkt (Chen *et al.*, 2004a). Wie bereits unter Punkt 4.1.4 beschrieben legt die nach Überexpression von XsFRP5 in VegT-injizierten Kappenexplantaten aufgetretene XPDlp-Expression bei Fehlen von Insulin Expression die Induktion einer reinen ventral-pankreatischen Zellpopulation nahe. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Überexpression des Wnt Antagonisten XsFRP5 und der Retinsäure-Signalwirkung bei der Induktion dieser ventralen Pankreaszellen sollte in VegT-injizierten Kappenexplantaten untersucht werden (Abb. 4.15).

Die Expression von VegT in Kappenexplantaten induziert die Expression ento- und mesodermaler Gene, als Kontrolle dieser Induktion diente, wie bereits beschrieben, das mesodermale Markergen *Xtwist*. VegT-Injektion alleine reichte nicht aus, um pankreatische Markergen-Expression zu induzieren. Durch Retinsäure-Behandlung kann die Expression des pankreatischen Vorläufermarkers Ptf1a/p48, des exokrinen Markers XPDlp, sowie des endokrinen Markers Insulin in VegT-injizierten Kappenexplantaten induziert werden (Chen *et al.*, 2004a). Die Ko-Injektion von VegT und XsFRP5 führte, wie bereits in Abb. 4.14 gezeigt, zur robusten Expression von Ptf1a/p48 und XPDlp, während Insulin Expression nicht detektiert werden konnte. RALDH2, die Retinal-Dehydrogenase 2, ist das Schlüsselenzym in der Retinsäure-Biosynthese. Die Überexpression von XsFRP5 in VegT-injizierten Kappenexplantaten führte jedoch nicht zu einem Anstieg der RALDH2 Expression, somit auch nicht zu verstärkter Retinsäure-Biosynthese. Die Behandlung der VegT- und XsFRP5 ko-injizierten Kappenexplantate mit BMS453 führte zu einem starken Rückgang der Ptf1a/p48 und der XPDlp Expression (Abb. 4.15). Bei BMS453 handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor der Retinsäure, der mit Retinsäure um die Bindung an die Retinsäure-Rezeptoren α und γ konkurriert (Schulze *et al.*,

2001). Da die Induktion pankreatischer Markergene durch BMS453-Behandlung inhibiert werden konnte, handelt es sich um einen vom Retinsäure-Signalweg abhängigen Effekt. RALDH2 konnte aber nicht als indirektes Zielgen von XsFRP5 identifiziert werden. Da die Aktivierung des Retinsäure-Signalweges durch XsFRP5 möglicherweise auf der Rezeptor-Ebene stattfindet, wurden die Retinsäure-Rezeptoren $RAR\alpha 2.1$ und $RAR\gamma 2.1$ auf ihre Expression in den animalen Kappen untersucht. Obwohl diese Rezeptoren die Kompetenz des dorsalen Entoderms, auf RA Signale zu reagieren, vermitteln (Pan *et al.*, 2007), zeigte sich keine Änderung des Expressionsverhaltens in VegT- und XsFRP5-injizierten Kappenexplantaten (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise trat durch die Ko-Injektion von VegT und XsFRP5 in animalen Kappenexplantaten eine transiente Induktion der Expression von RALDH2 oder der Retinsäure-Rezeptoren auf, die in Stadium 40 nicht mehr detektiert werden konnte. Oder aber XsFRP5 beeinflusst die Expression anderer, hier nicht untersuchter, Elemente des RA Signalweges.

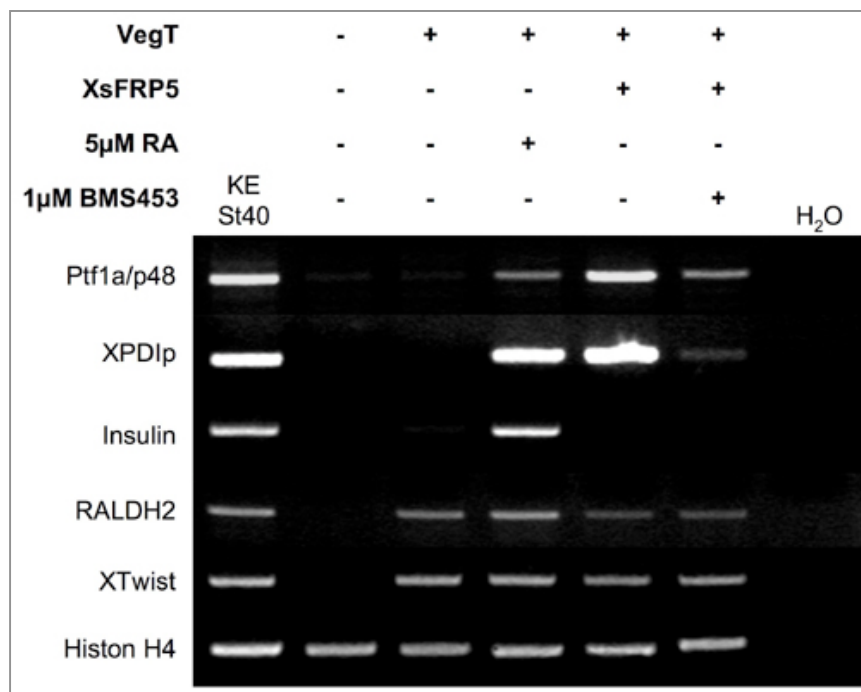


Abb. 4.15: Durch Behandlung der Kappenexplantate mit dem Retinsäure-Antagonisten BMS453 wird die XsFRP5-vermittelte Induktion pankreatischer Markergene unterdrückt. Es wurden je 200pg VegT und XsFRP5 mRNA animal im Zweizell-Stadium injiziert, die animalen Kappenexplantate im Stadium 8 präpariert und bis Stadium 40 kultiviert. Retinsäure (RA) und BMS453 Behandlung erfolgte für 1 Stunde in Stadium 9. KE = Kontrollembryo im Stadium 40.

Durch die Behandlung mit BMS453 konnte gezeigt werden, dass die Induktion ventraler pankreatischer Markergene nach Ko-Injektion von VegT und XsFRP5 in animale Kappenexplantate vom Retinsäure-Signalweg abhängig ist.

4.1.4.2 Die Überexpression von XsFRP2 und VegT führt nicht zur Induktion pankreatischer Markergenexpression in animalen Kappenexplantaten

Um die Spezifität des Effekts nach Überexpression von XsFRP5 zu bestätigen, wurde XsFRP2, ein weiteres Mitglied der sFRP Familie, ebenfalls in VegT-injizierten Kappen ko-exprimiert. sFRP2 zählt auf Grund von Sequenzanalysen zur gleichen Untergruppe der sFRPs wie sFRP5 (Kawano und Kypta, 2003). Sowohl XsFRP2 als auch XsFRP5 sind Proteine von ungefähr 300 Aminosäuren (Abb. 4.16 A, B), wobei sich eine Identität von 67% in der N-terminalen Frizzled-homologen Domäne feststellen lässt. Diese N-terminale Domäne enthält 10 konservierte Cystein-Reste (Melkonyan *et al.*, 1997) und ermöglicht die Interaktion der sFRPs mit Wnt Proteinen. Die C-terminale Netrin-ähnliche Domäne zeigt kaum Identität auf der Ebene der Aminosäuren. In der Maus bewirkt sFRP2 zusammen mit sFRP1 die Spezifizierung des Magenepithels (Kim *et al.*, 2005a). Weiters konnte auch für sFRP2 eine Interaktion mit Wnt3a gezeigt werden (Deb *et al.*, 2008; Galli *et al.*, 2006).

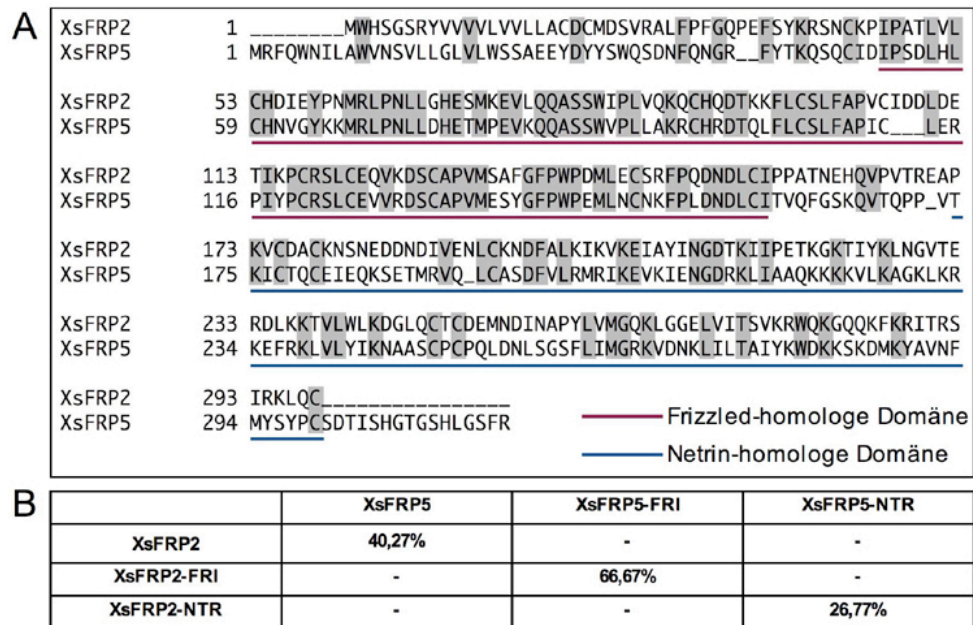


Abb. 4.16: Ein Aminosäure-Sequenzvergleich zeigt ähnliche Wnt-bindende Domänen in XsFRP2 und XsFRP5. (A) Identische Aminosäuren in der XsFRP2 (NP_001080663) und XsFRP5 (NP_001083946) Sequenz wurden grau unterlegt. (B) Prozentualer Anteil an

identischen Aminosäuren in den XsFRP2 und XsFRP5 Proteinen sowie in den einzelnen Proteindomänen.

XsFRP2 wird bereits während der Gastrulation vom Spemann Organisator sekretiert; Die Expression weitet sich im Stadium 20 auf die Augen, das Neuralrohr, die Somiten und eine anteriore, Gürtelförmige Expressionsdomäne aus (Pera und De Robertis, 2000). Eine weiterführende Untersuchung sollte die Expression von XsFRP2 im Vergleich mit den für XsFRP5 beschriebenen Expressionsdomänen im Schwanzknospenstadium aufklären (Abb. 4.17).

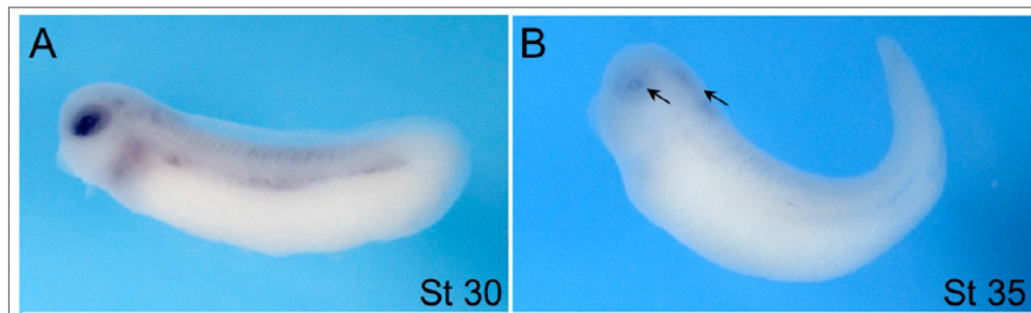


Abb. 4.17: XsFRP2 zeigt ein dynamisches, aber deutlich unterschiedliches Expressionsmuster zu XsFRP5. Laterale Ansicht mit anterior nach links auf Embryonen, die einer whole-mount *in situ* Hybridisierung gegen XsFRP2 unterzogen wurden. (A) In Stadium 30 wird XsFRP2 in den Augen, den Somiten, im Hinterhirn und dem anterioren Mesoderm exprimiert. (B) In Stadium 35 ist nur noch eine schwache XsFRP2 Expression in der Retina und neural festzustellen (markiert mit schwarzen Pfeilen).

Im frühen Schwanzknospenstadium wird XsFRP2 neural, in den Augen, den Somiten und dem anterioren Mesoderm exprimiert (Abb. 4.17 A). Die mesodermale XsFRP2 Expression scheint in diesem Stadium angrenzend an die XsFRP5 Expression in der Leberanlage zu sein. In Stadium 35 zeigt XsFRP2 eine schwache Expression in der Retina und im Hinterhirn (Abb. 4.17 B). In späteren Stadien konnte keine XsFRP2 Expression mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte in keinem Entwicklungsstadium eine überlappende Expression von XsFRP5 und XsFRP2 festgestellt werden.

Da aber auch für XsFRP2 die Interaktion mit kanonischen Wnt Proteinen beschrieben ist, sollte der induktive Effekt auf pankreatische Markergene durch Ko-Injektion von XsFRP2 und VegT in animale Kappenexplantate untersucht werden (Abb. 4.18). Eine Ko-Injektion von VegT und XsFRP5 diente dabei als Kontrolle der bereits diskutierten Induktion pankreatischer Markergene. Wie bereits erwähnt,

induziert die Expression von VegT Ento- und Mesoderm in animalen Kappenexplantaten, wie anhand des mesodermalen Markergens *Xtwist* gezeigt. Die Ko-Injektion von XsFRP5 zeigt wie oben eine Induktion von *Ptf1a/p48*, dem pankreatischen Vorläufermarker, sowie von XPDIP, einem exokrinen Differenzierungsmarker. Eine Ko-Injektion von VegT und XsFRP2 führt jedoch nicht zur Induktion dieser pankreatischen Genexpression.

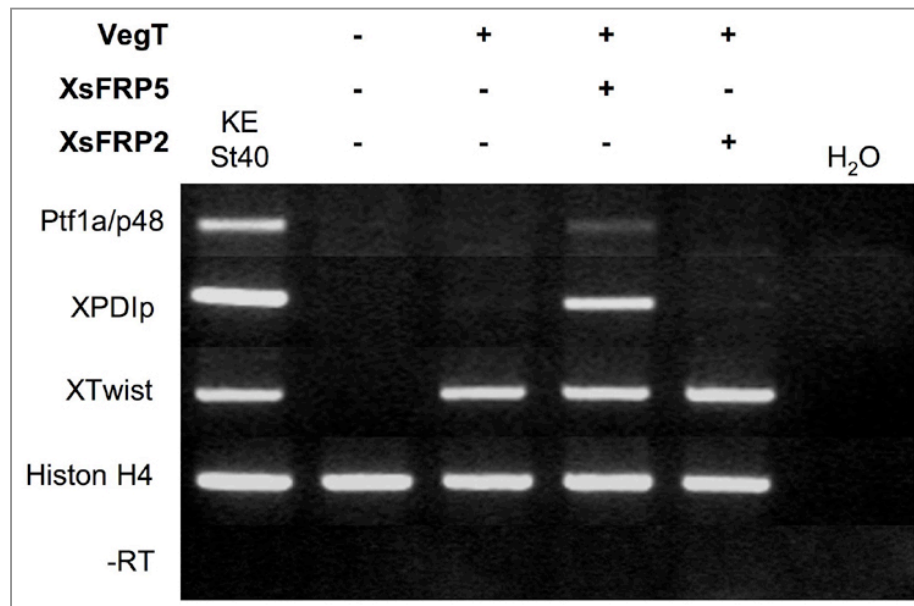


Abb. 4.18: XsFRP2 induziert keine pankreatische Markergenexpression in VegT-injizierten Kappenexplantaten. Es wurden je 200pg *VegT*, *XsFRP2* und *XsFRP5* injiziert, animale Kappenexplantate in Stadium 8 geschnitten und bis zum Stadium 40 kultiviert. XsFRP5 induziert die Expression von *Ptf1a/p48* und XPDip in VegT-injizierten Kappenexplantaten, XsFRP2-injizierte Kappen exprimieren wie VegT-injizierte Kappen keine pankreatischen Markergene. KE = Kontrollembryo im Stadium 40.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der Induktion pankreatischer Markergene in VegT-injizierten Kappenexplantaten um einen XsFRP5-spezifischen Effekt handelt, der durch Injektion eines strukturell ähnlichen Wnt Antagonisten nicht kopiert werden kann.

4.1.4.3 Analyse der Expression verschiedener XwnTs in VegT-injizierten Kappenexplantaten

Ausgehend von der Beobachtung, dass XsFRP5 ein Wnt Antagonist ist, stellt sich die Frage, welches Xwnt Protein in VegT-injizierten Kappen als Ziel von XsFRP5 dienen könnte, um die beschriebenen Effekte auf die pankreatischen Markergene auszulösen (Punkt 4.1.3.1). Um diese Frage zu beantworten, wurden Kontrollembryonen, unbehandelte animale Kappenexplante, sowie mit *VegT* mRNA injizierte Kappenexplante in verschiedenen Embryonalstadien gesammelt und auf die Expressionsmuster der in dieser Studie benutzten XwnTs untersucht (Abb. 4.19). Kontrollembryonen zeigen eine starke Expression aller untersuchten XwnTs von frühen Neurula-Stadien bis in späte Schwanzknospenstadien, wobei sich für Xwnt8 und Xwnt8b eine Reduktion in der Expressionsstärke im Stadium 37 zeigt. Im Gegensatz zu unbehandelten Explantaten zeigen die mit VegT-injizierten und somit ento- und mesodermalisierten Kappen nur eine schwache Expression von Xwnt2b und Xwnt3a, wobei sich in beiden Fällen ein Anstieg während der Organogenese-Stadien beobachten lässt. Alle anderen untersuchten XwnTs zeigen eine relativ gleich bleibende Expression in beinahe allen untersuchten Stadien, allerdings gilt es festzuhalten, dass insbesondere Xwnt8, Xwnt8b, Xwnt11 und Xwnt11R im Gegensatz zu den Kontrollkappen deutlich stärker exprimiert werden. Da XsFRP5 ab Stadium 15 mittels RT-PCR deutlich detektierbar ist, könnten alle ab diesem Zeitpunkt exprimierten Xwnt Proteine als potentiell Ziel in Frage kommen.

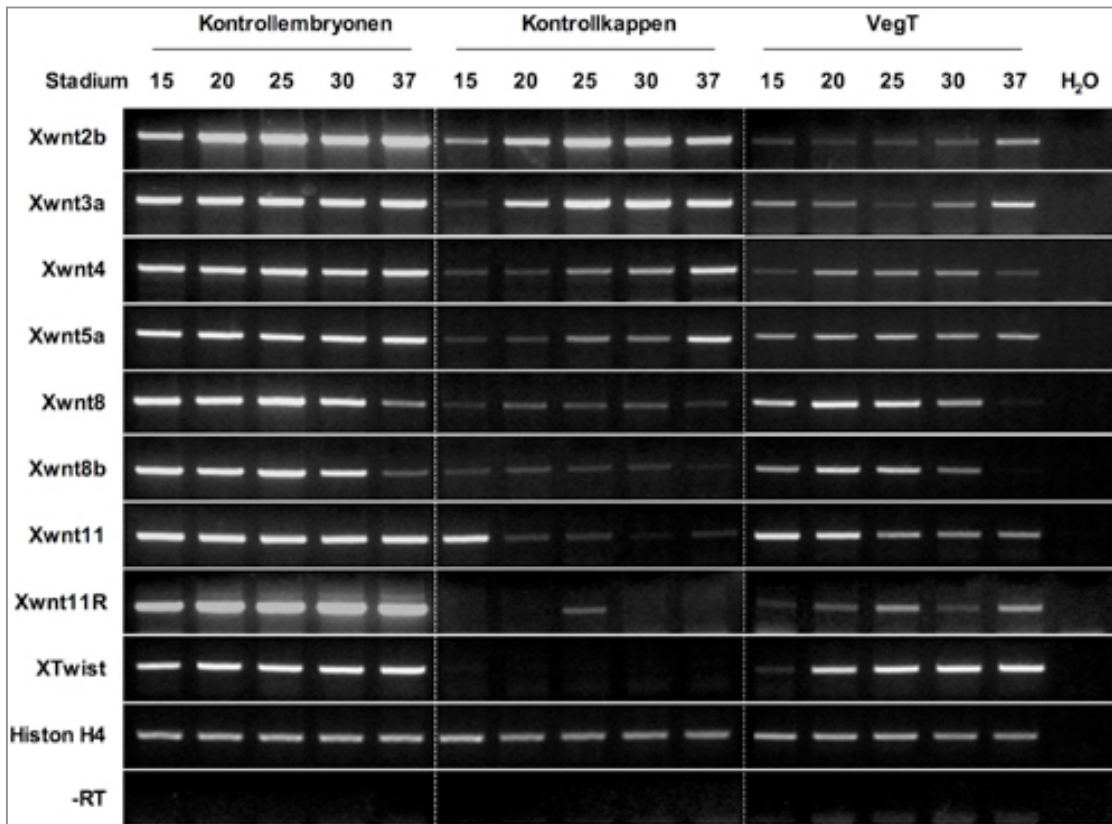


Abb. 4.19: Eine Vielzahl unterschiedlicher XwnTs wird in VegT-injizierten Kappenexplantaten verschiedener Entwicklungsstadien exprimiert. Embryonen wurden im Zweizell-Stadium animal mit 200pg *VegT* mRNA injiziert, animale Kappenexplantate im Stadium 8 aus Kontroll- und VegT-injizierten Embryonen präpariert und diese bis zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien kultiviert. Kontrollembryonen, nicht-injizierte Kappenexplantate und VegT-injizierte Kappenexplantate wurden durch RT-PCR auf die Expression von Histon H4, XTwist sowie der für diese Studie relevanten XwnTs untersucht.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten XwnTs in VegT-injizierten Kappenexplantaten exprimiert werden. Aus der temporären Analyse der unterschiedlichen Expressionsmuster konnten keine neuen Aufschlüsse über mögliche, präferierte Interaktionspartner von XsFRP5 gezogen werden.

4.2 Analyse des Synergieeffektes von $\Delta\text{Np63}\alpha$ auf die Lef1-vermittelte Wnt Signaltransduktion

Im Rahmen dieser Promotion ergab sich eine Kollaboration mit der Abteilung „Molekulare Onkologie“ (AG Dobbelstein). $\Delta\text{Np63}\alpha$, ein Transkriptionsfaktor, welcher in Mensch, Maus, Zebrafisch und *Xenopus* als überwiegend in mehrschichtigen Plattenepithelien exprimiert beschrieben wurde (Lee und Kimelman, 2002; Lu *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 1999; van Bokhoven *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1999), sollte nach vorangegangenen Experimenten in Zellkultur (I. Drewelus, unveröffentlicht) auch in *Xenopus* Embryonen auf einen möglichen Synergie-Effekt mit der kanonischen Wnt Signaltransduktion untersucht werden.

Als experimentelles System wurde das Achsenduplikations-Experiment (wie bereits unter Punkt 4.1.2.1 beschrieben) gewählt, da die Ausprägung einer zweiten Körperachse auf der induktorischen Wirkung kanonischer Wnt Signale beruht (Sokol *et al.*, 1991). Lef1-GR, welches nach Dexamethason-Induktion zur ektopischen Aktivierung des kanonischen Signalweges führt, wurde in einer suboptimalen Dosis injiziert und führte daher nur in einer geringen Zahl der Embryonen zur Achsenduplikation (Abb. 4.20). Eine Ko-Injektion von $\Delta\text{Np63}\alpha$ führt zu einer signifikanten Erhöhung der Achsenduplikation, jedoch wiederum nur nach Dexamethason-Induktion. Daraus lässt sich folgern, dass $\Delta\text{Np63}\alpha$ ohne aktives Lef1-GR nicht in der Lage ist, dorsale Achsenduplikation zu bewirken, was auch durch die ventrale Injektion von $\Delta\text{Np63}\alpha$ alleine gezeigt werden konnte (Abb. 4.20).

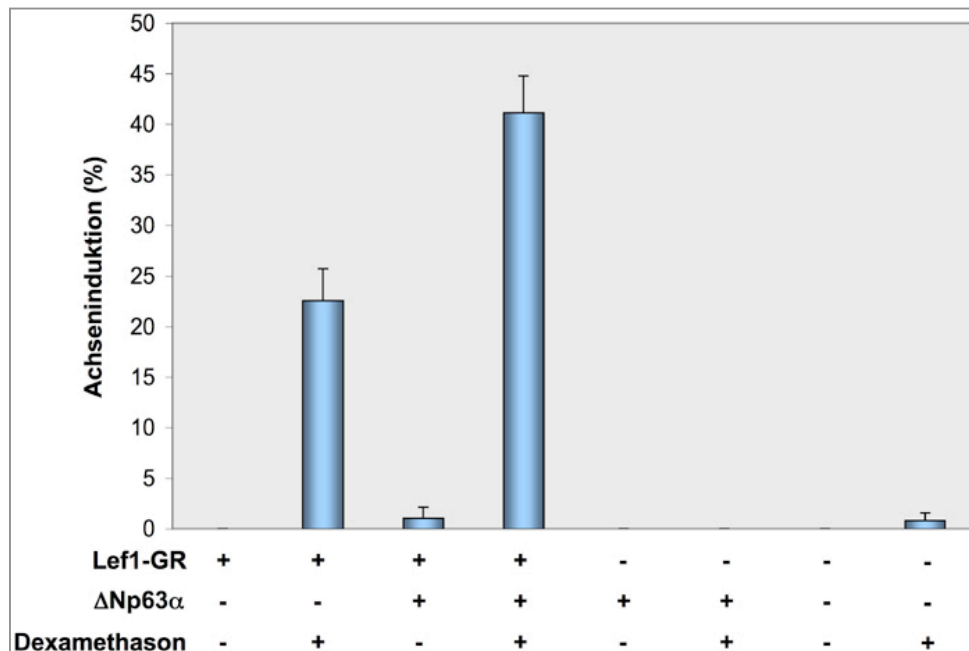


Abb. 4.20: $\Delta Np63\alpha$ wirkt synergistisch auf die Lef1-GR-vermittelte Achsenduplikation in *Xenopus* Embryonen. Je 3pg *Lef1-GR* und 50pg $\Delta Np63\alpha$ mRNA wurden in frühe Teilungsstadien injiziert. Die Induktion mit Dexamethason erfolgte im 16-Zell-Stadium. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Somit konnten die *in vitro* gewonnenen Daten über eine mögliche Synergie zwischen kanonischer Wnt Signaltransduktion und $\Delta Np63\alpha$ *in vivo* bestätigt werden.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass XsFRP5 spezifisch an verschiedene Xwnt Proteine bindet und diese mit unterschiedlicher Effizienz in Achsenduplikations-Experimenten inhibiert. XsFRP5 zeigte eine Präferenz für einzelne Wnt Proteine, wobei eine Einteilung der Interaktionspartner nach den von ihnen aktivierten Signalwegen keine Spezifität von XsFRP5 für einen bestimmten Wnt Signalweg erkennen ließ. Die ektopische Expression von XsFRP5 in ganzen Embryonen resultierte in Defekten bei der Ausbildung der anterior-posterioren Körperachse, ein Phänotyp, welcher die Inhibition des Wnt/PCP Signalweges durch XsFRP5 reflektiert. Durch die Mikroinjektion von „antisense“ Morpholino Oligonukleotiden in das prospektive Entoderm von *Xenopus* Embryonen konnte die Translation von XsFRP5 unterdrückt und die Auswirkungen des Funktionsverlustes auf die Ausbildung entodermaler Organe anhand der Expressionsanalyse von Markergenen untersucht werden. Der Funktionsverlust von XsFRP5 resultierte in einer Verkleinerung der ventralen Pankreasanlage, sowie einer Expansion des Magens. Die Entwicklung anderer Organanlagen war nach Verlust von XsFRP5 nicht verändert. Durch die ektopische Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges im Entoderm konnte eine deutliche Reduktion der dorsalen Pankreasanlage festgestellt werden (Melchert, Diplomarbeit 2007). Ektopische Expression von XsFRP5 in VegT-injizierten animalen Kappenexplantaten induziert eine robuste Expression pankreatischer Markergene, auch ohne Zugabe von Retinsäure. Eine vergleichende Expressionsanalyse der Xwnt Proteine in VegT-injizierten Kappenexplantaten und ganzen Embryonen identifizierte insbesondere Xwnt2b als mögliches Zielprotein für XsFRP5 *in vivo*. Weiterhin konnte ein synergistischer Effekt von $\Delta Np63\alpha$ auf die kanonischen Wnt Signaltransduktion in Achsenduplikations-Experimenten belegt werden.

5.1 Identifizierung von Wnt Bindungspartnern für XsFRP5

In Abschnitt 4.1.2 konnte gezeigt werden, dass es sich bei *Xenopus* sFRP5 um einen Wnt Antagonisten handelt. Die ektopische Expression von XsFRP5 in frühen Teilungsstadien (Abb. 4.5) resultierte in einer dramatischen Verkürzung der anterior-posterioren Körperachse, ein Phänotyp der charakteristisch für Defekte im Wnt/PCP Signalweg ist. Es ist bekannt, welche *Xenopus* Wnt Proteine maßgeblich an der Steuerung der Bewegungen der konvergenten Extension beteiligt sind, nämlich Xwnt5a und Xwnt11 (De Calisto *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 1993). Beide Xwnt Proteine wurden hier in der Ko-Immunopräzipitation, wenn auch nur schwach, als Interaktionspartner für XsFRP5 identifiziert (Abb. 4.4), jedoch wurde nur Xwnt5a in Achsenduplikations-Experimenten signifikant inhibiert (Abb. 4.3 F, G).

Beide Xwnts wurden lange Zeit ausschließlich der nicht-kanonischen Wnt Signaltransduktion zugerechnet, da sie nach Injektion in *Xenopus* Embryonen ohne Ko-Injektion von Frizzled Rezeptoren keine dorsale Achsenduplikation induzieren können [Abb. 4.3 F, G; (Du *et al.*, 1995)] und nicht in der Lage sind, morphologische Veränderungen in Maus C57MG Mamma-Epithelialzellen hervorzurufen (Wong *et al.*, 1994). Neuere Studien belegen jedoch, dass sowohl Xwnt5a als auch Xwnt11 unter bestimmten Bedingungen kanonische Wnt Signaltransduktion aktivieren können. So konnte gezeigt werden, dass Wnt5a im passenden Rezeptorkontext, in diesem Fall mit Frizzled4, in der Lage ist, kanonische Reporter-Expression zu induzieren (Mikels und Nusse, 2006). Die Stabilisierung von β -Catenin auf der prospektiven dorsalen Seite von *Xenopus* Embryonen wird durch Xwnt11 vermittelt (Tao *et al.*, 2005). Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Ko-Injektion dieser Wnt Proteine mit dem human Fz5 Rezeptor resultierte in der ektopischen Aktivierung der kanonischen Wnt Signaltransduktion (Abb. 4.3 E-H). Aus den Daten der Ko-Immunopräzipitation ist ersichtlich, dass XsFRP5 in der Lage ist, Xwnt11 zu binden. Die Funktion von Xwnt11 scheint dadurch aber kaum beeinträchtigt zu werden, da die Xwnt11-vermittelte Achsenduplikation durch XsFRP5 nicht signifikant inhibiert wurde. Entsprechend dieser Ergebnisse konnte nach vegetaler Injektion von XsFRP5 im Zweizell-Stadium keine Auswirkung auf die Ausbildung der dorso-ventralen Achse beobachtet werden; im Stadium 25 weisen der XsFRP5-injizierte

Embryo und der Kontrollembryo keine Unterschiede in den dorsalen Kopfstrukturen auf. Demnach scheint es nach Injektion von XsFRP5 mRNA nicht zu einer Inhibition endogener, Xwnt11-vermittelter kanonischer Wnt Signaltransduktion gekommen zu sein. Zusammenfassend weisen diese Befunde darauf hin, dass es sich bei dem endogenen Xwnt Protein, dessen Inhibition nach Überexpression von XsFRP5 zur Ausprägung des konvergenten Extensions-Phänotyps führt, um Xwnt5a handelt.

Wie bereits angedeutet, kann die strikte Einordnung der Wnt Proteine in kanonisch und nicht-kanonisch kaum noch aufrechterhalten werden. Vieles spricht für die Hypothese, dass der Rezeptorkontext an der Zelloberfläche, auch mit nicht-Frizzled Rezeptoren wie Ryk und Ror, sowie die Konzentration verschiedener Wnt Proteine ausschlaggebend für die Aktivierung der unterschiedlichen Wnt Signalwege sind (Keeble *et al.*, 2006; Mikels und Nusse, 2006; Oishi *et al.*, 2003; Schambony und Wedlich, 2007; Tao *et al.*, 2005). Auch in dieser Studie zeigte sich, dass die Interaktion verschiedener Xwnt Proteine mit einem extrazellulären Antagonisten nicht eindeutig nach den durch diese Wnt Proteine aktivierten Signalwegen eingeteilt werden konnte. XsFRP5 stellte sich als ein spezifischer Antagonist unterschiedlicher Xwnt Proteine und nicht eines einzigen Wnt Signalweges dar.

Ausgehend von der Beobachtung, dass einige Xwnt Proteine zwar an XsFRP5 binden, jedoch durch diese Bindung nicht sehr stark in ihrer Funktion beeinträchtigt scheinen (Punkt 4.1.2), stellt sich die Frage, ob XsFRP5 auch als Agonist der Wnt Signalwege fungieren kann. Für sFRP1 konnte gezeigt werden, dass eine geringe Konzentration Wnt Signaltransduktion aktivieren kann, während hohe Konzentrationen an sFRP1 inhibierend wirken (Uren *et al.*, 2000). Da die Experimente mit Wg, dem *Drosophila* Wnt Homologen durchgeführt wurden, lässt sich allerdings kein genauer Rückschluss auf die Interaktion von sFRP1 mit Vertebraten Wnt Proteinen ziehen. Da in den Achsenduplikations-Experimenten keines der untersuchten Xwnt Proteine nach Ko-Injektion von niedrigen Dosen an XsFRP5 einen Synergieeffekt auf die Achseninduktion erkennen ließ, scheint XsFRP5 keine agonistische Wirkung auf die Wnt Signaltransduktion auszuüben (Abb. 4.3).

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Bindung von Xwnt Proteinen an XsFRP5 zur Wirksamkeit und Stabilität der Xwns im extrazellulären Raum beiträgt. Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus einem dichten Netzwerk von Proteinen, wie Kollagen, Fibronektin oder Laminin, und den Glukosaminoglykanen (GAGs). Diese Polysaccharidketten liegen normalerweise an Proteine gebunden als sogenannte Proteoglykane vor; sie verleihen der EZM eine Gel-artige Konsistenz und erlauben die schnelle Diffusion von Metaboliten oder Hormonen. Die EZM dient nicht nur dem Schutz des Gewebes vor physikalischem Stress, sondern spielt eine wesentliche Rolle bei essentiellen Prozessen wie Form und Proliferation der einzelnen Zellen, Zell-Zell-Kommunikation oder Zellmigration. Die Bindung von Morphogenen an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) kann zu unterschiedlichen Effekten führen: Morphogene können in ihrer Reichweite inhibiert, sterisch in ihrer Funktion behindert, vor proteolytischer Degradation geschützt oder in ihrer lokalen Konzentration erhöht werden.

Bereits in mehreren Studien wurde eine Bindung von Wnt Proteinen an Heparansulfat-Proteoglykane beschrieben, wodurch die Wnt Proteine in der extrazellulären Matrix (EZM) stabilisiert werden (Lin, 2004). Syndecan-4, ein transmembranes Heparansulfat-Proteoglykan, wurde in *Xenopus* als Ko-Rezeptor für die Wnt-vermittelte Regulation der konvergenten Extensions-Bewegungen identifiziert (Munoz *et al.*, 2006). Für sFRP1 konnte eine Komplexbildung mit Wg und Heparansulfat-Proteoglykanen nachgewiesen werden (Uren *et al.*, 2000). Möglicherweise können auch andere sFRPs an Wnt Proteine und an die Glukosaminoglykan-Seitenketten (GAG) von Heparansulfat-Proteoglykanen binden. Bei einer niedrigen Konzentration von Wnt Proteinen in der EZM könnten sFRPs diese wenigen Liganden durch Bindung sequestrieren und dadurch die Bildung einiger weniger Wnt-Rezeptor-Komplexe unterbinden. Dagegen würde eine hohe, regionale Konzentration an Wnt Proteinen nicht vollständig sequestriert werden können und somit die Bildung von Wnt/Rezeptorkomplexen begünstigt werden, die Wnt Signaltransduktion würde aktiviert. In diesem Szenario könnten Heparansulfat-Proteoglykane dazu dienen, gegenläufige Gradienten von Wnt Proteinen und sekretierten Antagonisten durch die Bindung von Wnt/Antagonisten-Komplexen an GAGs weiter abzustufen und so eine feinere Regulation der Wnt Signaltransduktion zu ermöglichen.

5.2 Funktionale Charakterisierung von XsFRP5 in der entodermalen Organogenese

Ausgehend von der Beobachtung, dass XsFRP5 ein ausgeprägt dynamisches Expressionsmuster mit spezifischer Expression in der Leberanlage aufweist, lag die Vermutung einer Funktion von XsFRP5 in der Leberentwicklung nahe. Die in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse nach einem Funktionsverlust von XsFRP5 zeigten keine Auswirkung auf die Leberentwicklung, wie anhand des Differenzierungsmarkers Fibrinogen deutlich wurde (Abb. 4.8 P-R). Mit diesen Daten einhergehend konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch in XsFRP5 „Knock-out“ Mäusen keine Veränderung in der Expression von Hex, einem hepatischen Vorläufermarker, festzustellen war (Leaf *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass sFRP5 möglicherweise redundant zu anderen Wnt Antagonisten exprimiert wird. Jedoch konnten auch in sFRP5^{-/-}/Dkk1^{-/-} Doppel-„Knock-out“ Mäusen keine Auswirkungen auf die Leberentwicklung nachgewiesen werden (Leaf *et al.*, 2006).

Die Leberanlage entspringt der gleichen Vorläuferzellpopulation wie das ventrale Pankreas, welches sich posterior an die Leberanlage angrenzend bildet. Es zeigte sich, dass das ventrale Pankreas nach einem Funktionsverlust von XsFRP5 stark verkleinert vorlag, wohingegen das dorsale Pankreas nicht betroffen war (Abb. 4.8 A-C). Das spricht für die Spezifität der erzielten Phänotypen, da sie, obwohl insgesamt eher moderat, nur Gewebe betreffen, welche der endogenen Sekretion von XsFRP5 ausgesetzt sind. Diese Aussage trifft auch auf das Magenepithel zu, welches ebenfalls durch einen „Knock-down“ von XsFRP5 beeinflusst werden konnte. Im Gegensatz zur beobachteten Reduktion der ventralen Pankreasanlage, konnte die Expansion des im Magenepithel exprimierten Transkriptionsfaktors Sox2 in anteriore Teile des Duodenums beobachtet werden (Abb. 4.8 G-I). In einer Studie an neuronalen Vorläuferzellen der Retina konnte Sox2 interessanterweise als Zielgen der kanonischen Wnt Signaltransduktion identifiziert werden (Van Raay *et al.*, 2005). Wnt2b wurde in der Hühnerretina als essentiell für den Erhalt der undifferenzierten Vorläuferzellpopulation beschrieben (Kubo *et al.*, 2003). In Analogie zu diesen Ergebnissen könnte es im Magen nach Funktionsverlust von XsFRP5 zu einer

verstärkten Wirkung von Xwnt2b gekommen sein, was wiederum die Expansion der Sox2 Expression zur Folge haben könnte.

Auf Grund der Tatsache, dass beide zur Anwendung gekommenen Morpholino Oligonukleotide gegen XsFRP5 sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als sehr effizient in der Unterdrückung der Translation erwiesen haben, die nach Injektion in Embryonen erzielten Defekte jedoch vergleichsweise mild ausfielen, drängt sich die Frage nach der Existenz und Ko-Expression funktionell redundanter Wnt Antagonisten auf. Vergleichende Expressionsanalysen in anderen Systemen, wie der murinen Retina oder dem adulten humanen Darmepithel, sowie der Neuralplatte in Huhn, zeigten, dass sekretierte Wnt Antagonisten oft komplementär und überlappend zueinander exprimiert werden, wodurch ein komplexes Muster an inhibitorisch wirkenden Signalen entsteht (Byun *et al.*, 2005; Chapman *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004b). Folglich besteht die Möglichkeit, dass andere sekretierte Wnt Antagonisten im Entoderm von *Xenopus laevis* exprimiert werden, die in der verfügbaren Literatur nicht beschrieben und im Rahmen dieser Studie nicht untersucht worden sind.

Setzt man die anhand der Xwnt Expressionsanalysen durch whole-mount *in situ* Hybridisierung erhaltenen Daten (Punkt 4.1.3.3) und die nach Funktionsverlust von XsFRP5 erhaltenen Defekte (Punkt 4.1.3.1) in Relation, so identifiziert man zwei Xwnt Proteine, Xwnt2b und Xwnt5a, die auf Grund ihrer räumlichen und zeitlichen Expression die aufgetretenen Pankreas- und Magenphänotypen bewirkt haben könnten. Auch die biochemischen Analysen unterstreichen diese Annahme, da besonders Xwnt2b, aber auch Xwnt5a, nicht nur mit XsFRP5 ko-präzipitiert (Abb. 4.4), sondern auch in den Achsenduplikations-Experimenten (Abb. 4.3 A, F) effizient inhibiert wurde.

Xwnt2b wird in Stadium 35 und 40 im anterioren Entoderm überlappend mit XsFRP5 exprimiert (Abb. 4.12 B; Abb. 4.13 B). Es konnte bereits in Maus und *Xenopus* gezeigt werden, dass eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges während früher Phasen der Pankreasentwicklung zu pankreatischer Hypoplasie führt, wohingegen in der späteren Phase der Ausknospung der Organanlage kanonische Wnt Signaltransduktion für die Proliferation der Zellen essentiell ist (Heiser *et al.*,

2006; McLin *et al.*, 2007; Melchert, 2007). Es wäre möglich, dass es nach Mikroinjektion von Morpholino Oligonukleotiden durch den Anstieg an kanonischen Wnt Signalen zur Spezifizierung einer geringeren Anzahl an pankreatischen Vorläuferzellen in der ventralen Pankreasanlage gekommen ist, wie anhand der Vorläuferzellmarker Ptf1a/p48 und XIHbox8 erkennbar (Abb. 4.8 A-C; Abb. 5.1 A, B). Die Expression des exokrinen Markers XPDlp lässt den Schluss zu, dass es sich um einen transienten Effekt handeln könnte, der durch die verstärkte Proliferation der einzelnen Vorläuferzellen ausgeglichen wird (Abb. 4.8 D-F). Welches Wnt Protein die Aktivierung der kanonischen Signaltransduktion bewirken könnte, lässt sich anhand des in Stadium 35 erstellten Expressionsmusters nicht klären. Zu diesem Zeitpunkt konnte für kein Xwnt eine Expression in der hepato-pankreatischen Region detektiert werden.

Im Stadium 40 könnte der Funktionsverlust von XsFRP5 durch eine De-Repression von Xwnt2b eine Aktivierung kanonischer Wnt Signaltransduktion im anterioren Entoderm nach sich gezogen haben. Wie bereits erwähnt, könnte diese De-Repression von Xwnt2b zu einer verstärkten Expression von Sox2 im Magenepithel geführt haben (Abb. 5.1 C, D). Xwnt5a wird im Stadium 40 im posterioren Magen bogenförmig exprimiert. Die Enden des Bogens schließen mit den Enden der gegenläufigen XsFRP5-Expression ab (Abb. 4.13 E). Auch in diesem Fall könnte es nach Funktionsverlust von XsFRP5 zu einer Verstärkung der Xwnt5a-vermittelten Wnt Signaltransduktion gekommen sein, wodurch die Grenze zwischen Magen und Duodenum verschoben wurde.

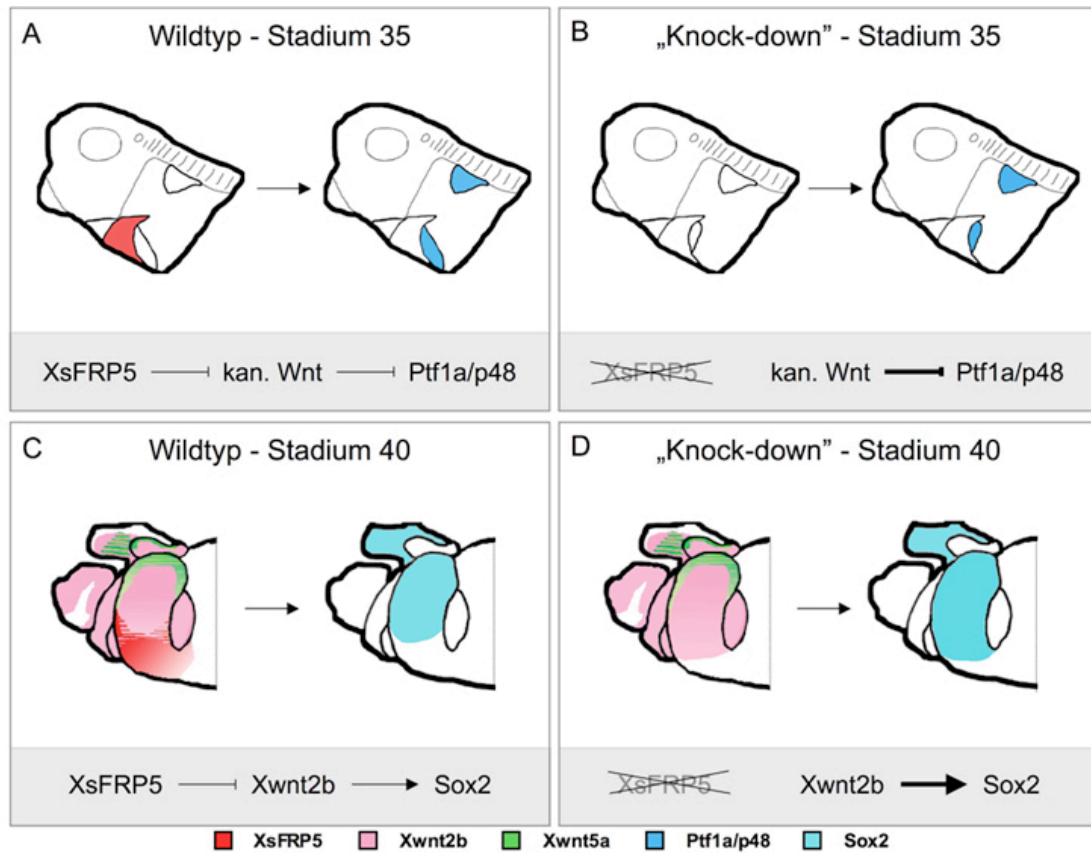


Abb. 5.1: Schematische Darstellung einer möglichen Korrelation zwischen den Wnt Expressionsmustern und den nach XsFRP5-„Knock-down“ erzielten Effekten auf verschiedene Markergene. (A) Anteriore Strukturen eines *Xenopus* Embryos im Stadium 35 mit anterior nach links. Die XsFRP5 Expression in der Leberanlage ist rot hervorgehoben. Anterior zur Leber wurde das Herz, posterior das ventrale Pankreas dargestellt. Das dorsale Pankreas befindet sich im dorsalen Entoderm. Die *Ptf1a/p48* Expression in ventraler und dorsaler Pankreasanlage ist blau dargestellt. (B) Nach einem „Knock-down“ von XsFRP5 ist die Größe der Leber unverändert, während das ventrale Pankreas verkleinert vorliegt. Die *Ptf1a/p48* Expression in ventraler und dorsaler Pankreasanlage ist blau dargestellt. Xwnt Proteine, welche diesen Effekt bewirken könnten, konnten im Rahmen dieser Studie nicht identifiziert werden. (C) Der anteriore Gastrointestinaltrakt eines *Xenopus* Embryos im Stadium 40 mit anterior nach links. Die Expressionsdomänen von *Xwnt2b*, *Xwnt5a*, *XsFRP5* und *Sox2* sind farblich gekennzeichnet. *Sox2* wird im Kontrollembryo vom Ösophagus bis in den posterioren Magen exprimiert. (D) Der Funktionsverlust von XsFRP5 bewirkt eine Expansion der *Sox2* Expression, womöglich durch eine Expansion der *Xwnt2b* Expression.

Die Überexpression von VegT und XsFRP5 in animalen Kappenexplantaten führte auch ohne Retinsäure-Behandlung zu einer robusten und dosis-abhängigen Induktion pankreatischer Markergene wie *Ptf1a/p48* und *XPDlp* (Abb. 4.14). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass in *Xenopus* Embryonen ektopische kanonische Wnt Signaltransduktion ab der Gastrulation bis zur späten Neurulation die Spezifizierung anteriorer, entodermaler Organe wie Leber und Pankreas unterbindet

(McLin *et al.*, 2007). Eine temporäre Expressionsanalyse zeigte bereits während der Gastrulation eine schwache und während der Neurulation (Stadium15) eine robuste Expression von XsFRP5 (Abb. 4.2 A). Möglicherweise inhibiert XsFRP5 in diesen frühen Stadien vorhandene kanonische Wnt Signale und fördert dadurch die Bildung ventral-pankreatischer Vorläuferzellen. Da in allen mit XsFRP5-Morpholino injizierten Embryonen die ventrale Pankreasanlage anhand der *Ptf1a/p48*-Färbung nachgewiesen werden konnte, scheint der Funktionsverlust von XsFRP5 nicht ausreichend, um die Spezifizierung pankreatischer Vorläuferzellen komplett zu unterbinden. In animalen Kappenexplantaten hingegen kommt es nach Mikroinjektion zu einer deutlich früheren, ektopischen Expression von XsFRP5 und somit bereits während Entwicklungsstadien, welche in Kontrollembryonen der Gastrulation entsprechen, zu einer Inhibition möglicher kanonischer Wnt Signaltransduktion. Dadurch könnte die Induktion pankreatischer Genexpression in VegT-injizierten Kappenexplantaten ermöglicht worden sein. Auffällig dabei ist, dass durch die Ko-Injektion von VegT und XsFRP5 zwar XPDlp, aber keine Insulin-Expression in animalen Kappenexplantaten induziert werden konnte (Abb. 4.14, Abb. 4.15). Im Vergleich dazu kann die robuste Expression von Insulin in VegT-injizierten Kappenexplantaten durch die Behandlung mit Retinsäure (RA) induziert werden. RA wurde in der Literatur als essentiell für die dorsale Pankreasentwicklung beschrieben und fördert die Differenzierung endokriner Zellen, nicht aber die exokriner Zellen (Chen *et al.*, 2004a). Aus dieser Beobachtung lässt sich der Schluss ziehen, dass die Ko-Injektion von VegT und XsFRP5 zur Spezifizierung einer ausschließlich ventral-pankreatischen Zellpopulation in den animalen Kappenexplantaten führte.

Ein strukturell sehr ähnlicher Wnt Antagonist, XsFRP2, wurde ebenfalls mit VegT in animalen Kappenexplantaten überexprimiert und auf die Fähigkeit hin, pankreatische Genexpression zu induzieren, untersucht (Abb. 4.18). Dabei zeigte sich, dass die XsFRP5-vermittelte Induktion pankreatischer Markergene von XsFRP2 nicht kopiert werden konnte. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der in VegT-injizierten Kappenexplantaten beobachtete Effekt auf pankreatische Markergene spezifisch für XsFRP5 ist.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sowohl der Funktionsverlust als auch die ektopische Expression von XsFRP5 in VegT-injizierten Kappenexplantaten Einfluss auf ventrale Pankreaszellen sowie Sox2-exprimierende Zellen ausüben, Zellpopulationen, die auch *in vivo* der Expression von XsFRP5 ausgesetzt sind. Die Modulation der XsFRP5 Expression im Entoderm wirkte sich nur auf Organanlagen, die sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzellpopulation mit einer angrenzenden Organanlage entwickeln, aus. Es wurde bereits für andere sFRPs die Vermutung geäußert, dass Wnt Gradienten durch die Expression sekretierter Antagonisten so moduliert würden, dass innerhalb einer Zellpopulation die Abgrenzung einzelner Organanlagen ermöglicht werden könnte (Kawano und Kypta, 2003). Ausgehend von dieser Vermutung wäre es denkbar, dass XsFRP5 die Abgrenzung von Leber und ventralem Pankreas bzw. von Magen und Duodenum reguliert.

5.3 Verknüpfung von Wnt Signalen mit anderen Signalwegen

Die gelungene Reprogrammierung adulter Zellen in solche Zellen, die embryonalen Stammzellen (ES) ähnlich sind, sorgte für viel Aufsehen (Takahashi *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). Murine und humane Fibroblasten wurden durch eine Kombination von nur vier Transkriptionsfaktoren dazu gebracht, ihr Genom zu reprogrammieren und einen pluripotenten, embryonalen Charakter anzunehmen. Eine große Hürde für die Nutzung dieser ES-Zell-ähnlichen Zellen in der regenerativen Medizin ist der Einsatz retroviraler Vektoren, welche unspezifisch ins Genom dieser Zellen integrieren und so möglicherweise tumorigen wirken. Diese Experimente zeigen jedoch, dass die Kenntnis der richtigen Stimuli sogar die *in vitro* de-Differenzierung terminal differenzierter, adulter Zellen ermöglichen kann. Wären in weiterer Folge die genauen molekularen Vorgänge bekannt, welche zur Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen führen, so ließen sich aus ES-ähnlichen Zellen durch die Behandlung mit bestimmten Morphogenen *in vitro* Insulin-produzierende β -Zellen, Neurone oder Kardiomyocyten generieren.

Die gezielte Erforschung des Zusammenspiels einzelner Signalwege während der Embryonalentwicklung liefert wertvolle Hinweise für ein besseres Verständnis, welche Signale für die Differenzierung bestimmter Zellpopulationen essentiell sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine funktionale Verknüpfung des Wnt und des RA Signalweges bei der Pankreasentwicklung festgestellt werden. Die Induktion pankreatischer Genexpression in VegT- und XsFRP5-injizierten Kappenexplantaten konnte durch die Behandlung mit dem Retinsäure-Antagonisten BMS453 inhibiert werden (Abb. 4.15); das heißt, dass die beobachtete Induktion pankreatischer Markergene auch in dieser Situation von Retinsäure Signalen abhängig zu sein scheint. Um RALDH2 als mögliches Wnt Zielgen identifizieren zu können, hätte eine Analyse der RALDH2 Expression in Kappenexplantaten des Gastrulastadiums Aufschluss geben können. Im Stadium 40, wie in Abb. 4.14 untersucht, konnte keine Auswirkung auf die RALDH2 Expression in den verschiedenen Explantaten festgestellt werden. Das gleiche gilt für die Expression von RAR γ 2.1, welcher als notwendig für die Pankreasentwicklung in *Xenopus* beschrieben wurde (Pan et al., 2007), hier hätte ebenfalls die Expression zu einem früheren Zeitpunkt untersucht werden müssen. Möglicherweise gibt es keinen direkten Zusammenhang zwischen den Wnt und RA Signalwegen, denkbar wäre auch ein „relay“ Mechanismus über die Interaktion mit einem dritten Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von Noggin, einem BMP Antagonisten, in animalen Kappenexplantaten eine robuste Aktivierung von RALDH2 erzielt werden kann (Pan et al., 2007). Somit scheint RALDH2 ein negatives BMP Zielgen zu sein.

Es könnte in den VegT und XsFRP5-injizierten Kappenexplantaten durch die Inhibition von Wnt Signalen zu einer Fehlregulation des BMP Signalwegs gekommen sein, welche in weiterer Folge zu einer Induktion der RALDH2 Expression und somit zu einer Aktivierung der RA Signaltransduktion geführt haben könnte. Im Stadium 40 konnte keine Aktivierung von RALDH2 oder verschiedener Retinsäurerezeptoren detektiert werden (Abb. 4.15, Daten nicht gezeigt). Möglicherweise könnte eine Untersuchung von VegT und XsFRP5 injizierten Kappenexplantaten zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt Aufschluss über eine Aktivierung des Retinsäure-Signalweges geben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht nur ein möglicher Zusammenhang zwischen den Wnt und RA Signalwegen gefunden, sondern auch das Zusammenspiel kanonischer Wnt Signaltransduktion mit Δ Np63 α beleuchtet werden. In Achsenduplikations-Experimenten konnte die Aktivität des Transkriptionsfaktors Lef1

durch die Ko-Injektion von $\Delta Np63\alpha$ um 100% gesteigert werden (Abb. 4.20). $\Delta Np63\alpha$ wurde als essentiell für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Status der Stammzellen in der Basalmembran mehrschichtiger Plattenepithelien beschrieben werden und scheint das Überleben und die hohe Zellteilungsrate von Stammzellen durch die negative Regulation von IGFBP-3 („Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3“), einem anti-proliferativen p53-Zielgen, zu ermöglichen (Barbieri *et al.*, 2005). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in Epithelzellen der Schilddrüse der Verlust von $\Delta Np63\alpha$ zur Apoptose führt (Senoo *et al.*, 2007). Diese Studie impliziert $\Delta Np63\alpha$ als Schlüsselfaktor für den Erhalt der Proliferationskapazität embryonaler und adulter Stammzellen. Auch die kanonische Wnt Signaltransduktion wurde als essentiell für adulte Stammzellen beschrieben, als Beispiel seien die Krypten-Stammzellen des Dünndarms, die Stammzellpopulationen des Magens, der Haarfollikel und der Brustdrüsen angeführt, welche sich alle durch die Expression des Wnt Zielgens *Lgr5* auszeichnen (Barker *et al.*, 2007). Eine mögliche Synergie des kanonischen Signalweges mit dem Transkriptionsfaktor $\Delta Np63\alpha$ könnte den undifferenzierten Zustand und das hohe Proliferationspotential der Stammzellen sichern.

6 Zusammenfassung

Bei XsFRP5 handelt es sich um einen Wnt Antagonisten der „secreted Frizzled-related Proteins“ (sFRPs). Es konnte gezeigt werden, dass XsFRP5 sowohl kanonische als auch nicht-kanonische Wnt Liganden binden und inhibieren kann. Andere Xwnt Proteine werden von XsFRP5 zwar effizient gebunden, jedoch kaum in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Der „Knock-down“ von XsFRP5 resultierte in einer Reduktion der ventralen Pankreasanlage. Die ektopische, pan-entodermale, intrazelluläre Aktivierung kanonischer Signaltransduktion wirkt sich ebenfalls negativ auf die Pankreasentwicklung aus [siehe auch (Melchert, Diplomarbeit 2007)]. Es konnte nicht geklärt werden, welches Xwnt Protein diese Funktion *in vivo* vermittelt. Die Überexpression von VegT und XsFRP5 in animalen Kappenexplantaten induziert die robuste Induktion pankreatischer Markergene, wobei dieser Effekt nicht nur durch eine Inhibition der Wnt Signaltransduktion, sondern auch über eine hiervon abhängige Fehlregulation der Retinsäure-Signalwirkung bedingt ist. Der Vergleich mit dem strukturell verwandten Wnt Antagonisten XsFRP2 ergab, dass es sich bei der Induktion pankreatischer Markergene um einen XsFRP5-spezifischen Effekt handelt.

Es scheint wahrscheinlich, dass XsFRP5 die Auftrennung der hepato-pankreatischen Vorläuferzellpopulation in Leber und ventrales Pankreas beeinflusst. Gleiches gilt für die Grenze zwischen Magen und Duodenum, die sich nach Verlust von XsFRP5 zu verschieben scheint. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien gemeinsam mit der Analyse der Expressionsmuster definierten Xwnt2b und Xwnt5a als wahrscheinliche *in vivo* Zielproteine von XsFRP5.

Damianitsch, K. und Pieler, T. (manuscript in preparation). XsFRP5 is a multivalent Wnt inhibitor involved in pancreas and stomach development in *Xenopus laevis*.

Drewelus, I., Möritz, C., Damianitsch, K., Dickmanns, A., Dickmanns, A., Hippel, K., Pieler, T. und Dobbelstein, M. (manuscript in preparation). Δ Np63 α and TCF/Lef family members co-operate for canonical Wnt signaling.

Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. und Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**, 3797-804.

Afelik, S., Chen, Y. und Pieler, T. (2004). Pancreatic protein disulfide isomerase (XPDIp) is an early marker for the exocrine lineage of the developing pancreas in *Xenopus laevis* embryos. *Gene Expr Patterns* **4**, 71-6.

Afelik, S., Chen, Y. und Pieler, T. (2006). Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue. *Genes Dev* **20**, 1441-6.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.

Aravind, L. und Koonin, E. V. (1998). A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkopfs. *Curr Biol* **8**, R477-8.

Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P. W., Yaniv, A. und Aaronson, S. A. (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* **274**, 16180-7.

Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. und Hammerschmidt, M. (2002). Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev Cell* **2**, 617-27.

Bamberger, C. und Schmale, H. (2001). Identification and tissue distribution of novel KET/p63 splice variants. *FEBS Lett* **501**, 121-6.

Banyai, L. und Pathy, L. (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci* **8**, 1636-42.

Barbieri, C. E., Perez, C. A., Johnson, K. N., Ely, K. A., Billheimer, D. und Pietenpol, J. A. (2005). IGFBP-3 is a direct target of transcriptional regulation by DeltaNp63alpha in squamous epithelium. *Cancer Res* **65**, 2314-20.

Barbieri, C. E. und Pietenpol, J. A. (2006). p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res* **312**, 695-706.

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-7.

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**, 638-42.

Bienz, M. und Clevers, H. (2003). Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nat Cell Biol* **5**, 179-82.

Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E. et al. (1989). Searching for pattern and mutation in the Drosophila genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev* **3**, 1273-87.

Bilic, J., Huang, Y. L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C. M., Bienz, M. und Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**, 1619-22.

Blyszczuk, P., Asbrand, C., Rozzo, A., Kania, G., St-Onge, L., Rupnik, M. und Wobus, A. M. (2004). Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol* **48**, 1095-104.

Bort, R., Martinez-Barbera, J. P., Beddington, R. S. und Zaret, K. S. (2004). Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* **131**, 797-806.

Byun, T., Karimi, M., Marsh, J. L., Milovanovic, T., Lin, F. und Holcombe, R. F. (2005). Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues: potential role in stem cell homeostasis. *J Clin Pathol* **58**, 515-9.

Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. und Bejsovec, A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604-8.

Chalmers, A. D. und Slack, J. M. (1998). Development of the gut in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **212**, 509-21.

Chalmers, A. D., Slack, J. M. und Beck, C. W. (2000). Regional gene expression in the epithelia of the *Xenopus* tadpole gut. *Mech Dev* **96**, 125-8.

Chang, J. T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G. et al. (1999). Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* **8**, 575-83.

Chapman, S. C., Brown, R., Lees, L., Schoenwolf, G. C. und Lumsden, A. (2004). Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning. *Dev Dyn* **229**, 668-76.

Chen, C., Zhang, Y., Sheng, X., Huang, C. und Zang, Y. Q. (2008). Differentiation of embryonic stem cells towards pancreatic progenitor cells and their transplantation into streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Biol Int*.

Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. und Courey, A. J. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* **13**, 2218-30.

Chen, Y., Jurgens, K., Hollemann, T., Claussen, M., Ramadori, G. und Pieler, T. (2003). Cell-autonomous and signal-dependent expression of liver and intestine marker genes in pluripotent precursor cells from *Xenopus* embryos. *Mech Dev* **120**, 277-88.

Chen, Y., Pan, F. C., Brandes, N., Afelik, S., Solter, M. und Pieler, T. (2004a). Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in *Xenopus*. *Dev Biol* **271**, 144-60.

Chen, Y., Stump, R. J., Lovicu, F. J. und McAvoy, J. W. (2004b). Expression of Frizzleds and secreted frizzled-related proteins (Sfrps) during mammalian lens development. *Int J Dev Biol* **48**, 867-77.

Christian, J. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P. und Moon, R. T. (1991). Xwnt-8, a *Xenopus* Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* **111**, 1045-55.

Crompton, M. R., Bartlett, T. J., MacGregor, A. D., Manfioletti, G., Buratti, E., Giancotti, V. und Goodwin, G. H. (1992). Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 5661-7.

Cui, Y., Brown, J. D., Moon, R. T. und Christian, J. L. (1995). Xwnt-8b: a maternally expressed *Xenopus* Wnt gene with a potential role in establishing the dorsoventral axis. *Development* **121**, 2177-86.

Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A. und Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**, 867-72.

De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F. und Mayor, R. (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* **132**, 2587-97.

Deb, A., Davis, B. H., Guo, J., Ni, A., Huang, J., Zhang, Z., Mu, H. und Dzau, V. J. (2008). SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autofeedback loop of Wnt3a. *Stem Cells* **26**, 35-44.

Dellavalle, R. P., Egbert, T. B., Marchbank, A., Su, L. J., Lee, L. A. und Walsh, P. (2001). CUSP/p63 expression in rat and human tissues. *J Dermatol Sci* **27**, 82-7.

Dessimoz, J., Bonnard, C., Huelsken, J. und Grapin-Botton, A. (2005). Pancreas-specific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development. *Curr Biol* **15**, 1677-83.

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J. und Zaret, K. S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**, 871-81.

Di Como, C. J., Urist, M. J., Babayan, I., Drobnjak, M., Hedvat, C. V., Teruya-Feldstein, J., Pohar, K., Hoos, A. und Cordon-Cardo, C. (2002). p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* **8**, 494-501.

Dominguez, I. und Green, J. B. (2000). Dorsal downregulation of GSK3beta by a non-Wnt-like mechanism is an early molecular consequence of cortical rotation in early *Xenopus* embryos. *Development* **127**, 861-8.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I. und Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41-6.

Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. und Moon, R. T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **15**, 2625-34.

Finley, K. R., Tennessen, J. und Shawlot, W. (2003). The mouse secreted frizzled-related protein 5 gene is expressed in the anterior visceral endoderm and foregut endoderm during early post-implantation development. *Gene Expr Patterns* **3**, 681-4.

Fuerer, C., Nusse, R. und Ten Berge, D. (2008). Wnt signalling in development and disease. Max Delbruck Center for Molecular Medicine meeting on Wnt Signaling in Development and Disease. *EMBO Rep* **9**, 134-8.

Galli, L. M., Barnes, T., Cheng, T., Acosta, L., Anglade, A., Willert, K., Nusse, R. und Burrus, L. W. (2006). Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. *Dev Dyn* **235**, spc1.

Garriock, R. J., D'Agostino, S. L., Pilcher, K. C. und Krieg, P. A. (2005). Wnt11-R, a protein closely related to mammalian Wnt11, is required for heart morphogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol* **279**, 179-92.

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**, 357-62.

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**, 517-9.

Gregorieff, A., Grosschedl, R. und Clevers, H. (2004). Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4(-)/Tcf1(-) embryos. *Embo J* **23**, 1825-33.

Harland, R. M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* **36**, 685-95.

Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

He, X., Saint-Jeannet, J. P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I. und Varmus, H. (1997). A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-4.

Hebrok, M., Kim, S. K. und Melton, D. A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* **12**, 1705-13.

Heiser, P. W., Lau, J., Taketo, M. M., Herrera, P. L. und Hebrok, M. (2006). Stabilization of beta-catenin impacts pancreas growth. *Development* **133**, 2023-32.

Henry, G. L., Brivanlou, I. H., Kessler, D. S., Hemmati-Brivanlou, A. und Melton, D. A. (1996). TGF-beta signals and a pattern in *Xenopus laevis* endodermal development. *Development* **122**, 1007-15.

Holleman, T., Panitz, F. und Pieler, T. (1999). In situ Hybridization Techniques with *Xenopus* Embryos. In "A Comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos": Oxford University Press Inc., Oxford.

Holleman, T. und Pieler, T. (2000). Xnrx-2.1: a homeobox gene expressed during early forebrain, lung and thyroid development in *Xenopus laevis*. *Dev Genes Evol* **210**, 579-81.

Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B. und Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-6.

Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G. und Gridley, T. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* **12**, 1046-57.

Joseph, E. M. und Melton, D. A. (1998). Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* **125**, 2677-85.

Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M. und Zaret, K. S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**, 1998-2003.

Kawano, Y. und Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34.

Keeble, T. R., Halford, M. M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R. B., Stacker, S. A. und Cooper, H. M. (2006). The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* **26**, 5840-8.

Kelly, O. G. und Melton, D. A. (2000). Development of the pancreas in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* **218**, 615-27.

- Kim, B. M., Buchner, G., Miletich, I., Sharpe, P. T. und Shivdasani, R. A.** (2005a). The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev Cell* **8**, 611-22.
- Kim, H. J., Schleiffarth, J. R., Jessurun, J., Sumanas, S., Petryk, A., Lin, S. und Ekker, S. C.** (2005b). Wnt5 signaling in vertebrate pancreas development. *BMC Biol* **3**, 23.
- Ku, M. und Melton, D. A.** (1993). Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* **119**, 1161-73.
- Kubo, F., Takeichi, M. und Nakagawa, S.** (2003). Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* **130**, 587-98.
- Kühl, M., Geis, K., Sheldahl, L. C., Pukrop, T., Moon, R. T. und Wedlich, D.** (2001). Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech Dev* **106**, 61-76.
- Kühl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C. und Moon, R. T.** (2000). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* **275**, 12701-11.
- 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**, 713-8.
- Lammert, E., Cleaver, O. und Melton, D.** (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* **294**, 564-7.
- Landesman, Y. und Sokol, S. Y.** (1997). Xwnt-2b is a novel axis-inducing *Xenopus* Wnt, which is expressed in embryonic brain. *Mech Dev* **63**, 199-209.
- Larabell, C. A., Torres, M., Rowning, B. A., Yost, C., Miller, J. R., Wu, M., Kimelman, D. und Moon, R. T.** (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* **136**, 1123-36.
- Leaf, I., Tennessen, J., Mukhopadhyay, M., Westphal, H. und Shawlot, W.** (2006). Sfrp5 is not essential for axis formation in the mouse. *Genesis* **44**, 573-578.
- Lee, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R. und Kirschner, M. W.** (2003). The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* **1**, E10.
- Lee, H. und Kimelman, D.** (2002). A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev Cell* **2**, 607-16.
- Lee, H. X., Ambrosio, A. L., Reversade, B. und De Robertis, E. M.** (2006). Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell* **124**, 147-59.

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**, 747-56.

Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**, 6009-21.

Logan, C. Y. und Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.

Lu, P., Barad, M. und Vize, P. D. (2001). Xenopus p63 expression in early ectoderm and neurectoderm. *Mech Dev* **102**, 275-8.

Lu, X., Borchers, A. G., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J. C. und Tessier-Lavigne, M. (2004). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* **430**, 93-8.

Ma, L. und Wang, H. Y. (2007). Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca²⁺ non-canonical pathway. *J Biol Chem* **282**, 28980-90.

Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C. et al. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-7.

Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. und Niehrs, C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-5.

Maurus, D., Heligon, C., Burger-Schwarzler, A., Brandli, A. W. und Kuhl, M. (2005). Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *Embo J* **24**, 1181-91.

McLin, V. A., Rankin, S. A. und Zorn, A. M. (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* **134**, 2207-17.

Melchert, J. (2007). Die Rolle der kanonischen Wnt Signaltransduktion bei der Differenzierung des Gastrointestinaltrakts in *Xenopus laevis*. *Diplomarbeit, Universität Göttingen, Göttingen*.

Melkonyan, H. S., Chang, W. C., Shapiro, J. P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P. A., Kiefer, M. C., Tomei, L. D. und Umansky, S. R. (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13636-41.

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

Miller, J. R., Rowning, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L. und Moon, R. T. (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* **146**, 427-37.

Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R. und Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-13.

Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S. und Sasai, Y. (1998). Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* **125**, 579-87.

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

Morkel, M., Huelsken, J., Wakamiya, M., Ding, J., van de Wetering, M., Clevers, H., Taketo, M. M., Behringer, R. R., Shen, M. M. und Birchmeier, W. (2003). Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development* **130**, 6283-94.

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

Murtaugh, L. C., Law, A. C., Dor, Y. und Melton, D. A. (2005). Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development. *Development* **132**, 4663-74.

Nasevicius, A., Hyatt, T., Kim, H., Guttman, J., Walsh, E., Sumanas, S., Wang, Y. und Ekker, S. C. (1998). Evidence for a frizzled-mediated wnt pathway required for zebrafish dorsal mesoderm formation. *Development* **125**, 4283-92.

Newman, C. S., Chia, F. und Krieg, P. A. (1997). The XHex homeobox gene is expressed during development of the vascular endothelium: overexpression leads to an increase in vascular endothelial cell number. *Mech Dev* **66**, 83-93.

Nieuwkoop, P. D. und Faber, J. (1967). Normal Table of *Xenopus laevis*. *North Holland Publishing, Amsterdam*.

Nusse, R. und Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**, 99-109.

Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.

Ober, E. A., Verkade, H., Field, H. A. und Stainier, D. Y. (2006). Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature* **442**, 688-91.

Ohkawara, B., Yamamoto, T. S., Tada, M. und Ueno, N. (2003). Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* **130**, 2129-38.

Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C. et al. (2003). The receptor tyrosine kinase

Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 645-54.

Okubo, T. und Hogan, B. L. (2004). Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J Biol* **3**, 11.

Pan, F. C., Chen, Y., Bayha, E. und Pieler, T. (2007). Retinoic acid-mediated patterning of the pre-pancreatic endoderm in *Xenopus* operates via direct and indirect mechanisms. *Mech Dev* **124**, 518-31.

Pathy, L. (2000). The WIF module. *Trends Biochem Sci* **25**, 12-3.

Pera, E. M. und De Robertis, E. M. (2000). A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1. *Mech Dev* **96**, 183-95.

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**, 707-10.

Pieler, T. und Chen, Y. (2006). Forgotten and novel aspects in pancreas development. *Biol Cell* **98**, 79-88.

Pilcher, K. E. und Krieg, P. A. (2002). Expression of the Wnt inhibitor, sFRP5, in the gut endoderm of *Xenopus*. *Gene Expr Patterns* **2**, 369-72.

Pinto, D. und Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* **306**, 357-63.

Price, M. A. (2006). CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev* **20**, 399-410.

Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. und Zaret, K. S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* **15**, 1998-2009.

Rowning, B. A., Wells, J., Wu, M., Gerhart, J. C., Moon, R. T. und Larabell, C. A. (1997). Microtubule-mediated transport of organelles and localization of beta-catenin to the future dorsal side of *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1224-9.

Rupp, R. A., Snider, L. und Weintraub, H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* **8**, 1311-23.

Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. und Mikoshiba, K. (2002). The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* **417**, 295-9.

Sasaki, Y., Ishida, S., Morimoto, I., Yamashita, T., Kojima, T., Kihara, C., Tanaka, T., Imai, K., Nakamura, Y. und Tokino, T. (2002). The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem* **277**, 719-24.

Schambony, A. und Wedlich, D. (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779-92.

Schulze, G. E., Clay, R. J., Mezza, L. E., Bregman, C. L., Buroker, R. A. und Frantz, J. D. (2001). BMS-189453, a novel retinoid receptor antagonist, is a potent testicular toxin. *Toxicol Sci* **59**, 297-308.

Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J., Kikuchi, A., Higuchi, Y. und Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 484-92.

Seifert, J. R. und Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* **8**, 126-38.

Semenov, M. V., Habas, R., Macdonald, B. T. und He, X. (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* **131**, 1378.

Semenov, M. V., Tamai, K., Brott, B. K., Kuhl, M., Sokol, S. und He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**, 951-61.

Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P. und McKeon, F. (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* **129**, 523-36.

Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., Pandur, P., Miller, J. R., Kuhl, M. und Moon, R. T. (2003). Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* **161**, 769-77.

Sive, H. J., Grainger, R. M. und Harland, R. M. (2000). Early Development of *Xenopus laevis* - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. und Melton, D. A. (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* **67**, 741-52.

Spemann, H. (1938). Embryonic Development and Induction. *Yale University Press, New Haven*.

Stoick-Cooper, C. L., Moon, R. T. und Weidinger, G. (2007). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev* **21**, 1292-315.

Suksaweang, S., Lin, C. M., Jiang, T. X., Hughes, M. W., Widelitz, R. B. und Chuong, C. M. (2004). Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol* **266**, 109-22.

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

Tahinci, E., Thorne, C. A., Franklin, J. L., Salic, A., Christian, K. M., Lee, L. A., Coffey, R. J. und Lee, E. (2007). Lrp6 is required for convergent extension during Xenopus gastrulation. *Development* **134**, 4095-106.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. und Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72.

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

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 836-47.

The Wnt Homepage, N. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>.

Thomas, P. Q., Brown, A. und Beddington, R. S. (1998). Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* **125**, 85-94.

Thorpe, C. J. und Moon, R. T. (2004). nemo-like kinase is an essential co-activator of Wnt signaling during early zebrafish development. *Development* **131**, 2899-909.

Tonissen, K. F., Drysdale, T. A., Lints, T. J., Harvey, R. P. und Krieg, P. A. (1994). XNkx-2.5, a Xenopus gene related to Nkx-2.5 and tinman: evidence for a conserved role in cardiac development. *Dev Biol* **162**, 325-8.

Topczewski, J., Sepich, D. S., Myers, D. C., Walker, C., Amores, A., Lele, Z., Hammerschmidt, M., Postlethwait, J. und Solnica-Krezel, L. (2001). The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension. *Dev Cell* **1**, 251-64.

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

Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberledge, S. und Rubin, J. S. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* **275**, 4374-82.

van Bokhoven, H., Hamel, B. C., Bamshad, M., Sangiorgi, E., Gurrieri, F., Duijf, P. H., Vanmolkot, K. R., van Beusekom, E., van Beersum, S. E., Celli, J. et al. (2001). p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and

isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* **69**, 481-92.

Van Raay, T. J., Moore, K. B., Iordanova, I., Steele, M., Jamrich, M., Harris, W. A. und Vetter, M. L. (2005). Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* **46**, 23-36.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E. und Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-24.

Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., Bince, J. M., Xu, R. und Martindale, M. Q. (2003). An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* **426**, 446-50.

Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd und Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-52.

Wolda, S. L., Moody, C. J. und Moon, R. T. (1993). Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* **155**, 46-57.

Wong, G. T., Gavin, B. J. und McMahon, A. P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* **14**, 6278-86.

Wright, C. V., Schnegelsberg, P. und De Robertis, E. M. (1989). Xihbox 8: a novel *Xenopus* homeo protein restricted to a narrow band of endoderm. *Development* **105**, 787-94.

Xu, Q., D'Amore, P. A. und Sokol, S. Y. (1998). Functional and biochemical interactions of Wnts with FrzA, a secreted Wnt antagonist. *Development* **125**, 4767-76.

Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Castele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D. et al. (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* **132**, 197-207.

Yamada, M., Ohnishi, J., Ohkawara, B., Iemura, S., Satoh, K., Hyodo-Miura, J., Kawachi, K., Natsume, T. und Shibuya, H. (2006). NARF, an NEMO-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). *J Biol Chem* **281**, 20749-60.

Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S. und Nishida, E. (2002). JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* **3**, 69-75.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-8.

Yi, R., Poy, M. N., Stoffel, M. und Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*.

Yoshida, Y., Kim, S., Chiba, K., Kawai, S., Tachikawa, H. und Takahashi, N. (2004). Calcineurin inhibitors block dorsal-side signaling that affect late-stage development of the heart, kidney, liver, gut and somitic tissue during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Growth Differ* **46**, 139-52.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-20.

Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J. et al. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**, 367-75.

Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C. und Heasman, J. (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* **94**, 515-24.

Zorn, A. M. und Mason, J. (2001). Gene expression in the embryonic *Xenopus* liver. *Mech Dev* **103**, 153-7.

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Tomas Pieler, für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanke ich mich bei Prof. Ernst Wimmer.

Besonderer Dank gilt Dr. Annette Borchers, für viele inspirierende und angenehme Gespräche, und ebenso Katja Ditter, Juliane Melchert und Barbara Rust, die nicht nur Kolleginnen waren, sondern Freunde geworden sind.

Allen weiteren Mitgliedern der Abteilung Entwicklungsbiochemie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mich während meines Studiums auf vielfältige Weise unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Damianitsch
Vorname: Katharina
Geburtstag: 09.10.1979
Geburtsort: Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig
Adresse: Klinkerfuesstraße 15
37073 Göttingen

Ausbildung

1986-1990 Franz-Schubert-Grundschule in Wien, Österreich
1990-1998 Wasagymnasium BGIX in Wien, Österreich
1998 Reifeprüfung am 17. Juni 1998
1998 Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Wien
2000 Vordiplom am 02. Oktober 2000
2000-2003 Hauptstudium an der Universität Wien
2001 Sommersemester 2001: ERASMUS-Aufenthalt an der Universität Göttingen
2003 Anfertigung der Diplomarbeit am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen (Abt. Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanzen)
2003 Diplom am 26. Oktober 2003
Promotionsarbeit am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen (Abt. Entwicklungsbiochemie)
seit Feb. 2004

Göttingen, den 17.03.2008