

1 Einleitung

Vielzellige Organismen präsentieren sich als eine geordnete Ansammlung unterschiedlich spezialisierter Zellen. Aus einer einzigen Ursprungszelle, der Zygote, entstanden, manifestiert sich der genetische Zellklon nicht nur durch die Differenzierung einzelner Zellen sondern auch durch komplexe Morphogenese vielzelliger Anordnungen wie Geweben und Organen, beides Voraussetzungen für den funktionellen Aufbau eines Körpers. Welche Mechanismen dabei der Umsetzung zeitlich und räumlich strikt geordneter Musterbildung im sich entwickelnden Organismus zugrunde liegen, ist Mittelpunkt embryologischer Fragestellungen.

Waren es noch mit der Präformationstheorie von Haller und Bonnet im 17. Jahrhundert oder der epigenetischen Hypothese von Wolff im 18. Jahrhundert Theorien und Hypothesen mit teilweise stark philosophischer Prägung (Gilbert, 1988), so wurde mit den bahnbrechenden Transplantationsexperimenten von Spemann und Mangold an Amphibienkeimen in den zwanziger Jahren unseres Jahrhunderts eine Entwicklung auf diesem Forschungsgebiet eingeleitet, die insbesondere durch die Verfeinerung experimenteller Technik auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene heute zu einem tieferen Verständnis grundlegender Prozesse und Mechanismen der Embryogenese geführt haben. Die gewonnenen Erkenntnisse haben dabei mittlerweile auch weitreichende Konsequenzen für andere Forschungsrichtungen.

1.1 Die Embryonalentwicklung des Modellorganismus

Xenopus laevis

Trotz der vorhandenen Vielzahl von unterschiedlichen Organismen und Körperformen scheinen fundamentale Mechanismen der Entwicklung auch zwischen evolutionär weiter entfernten Klassen wie Insekten und Säugetieren hochkonserviert zu sein (DeRobertis und Sasai, 1996; Arendt und Nübler Jung, 1997). Dieser Grad an Homologie ermöglicht die Erforschung molekularer Mechanismen, zellulärer Signalwege und die Interaktionen beteiligter Faktoren an geeigneten Modellorganismen.

Nicht zuletzt auch aus historischer Tradition heraus steht dabei neben Maus, Huhn, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und neuerdings auch *Danio rerio* der

südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Als Vertebratenvertreter bietet die sich nach induzierbarer Eiablage und in vitro Fertilisation hohe Zahl sich parallel entwickelnder Nachkommen, die extrauterine Entwicklung und die Größe früher Embryonalstadien ideale Voraussetzungen für unterschiedliche experimentelle Ansätze. Eine bereits im Vierzellstadium äußerlich sichtbar determinierte Dorsoventralachse läßt beispielsweise durch gerichtete Überexpressionsstudien eine gezielte Untersuchung dieses Entwicklungsweges zu. Die auf zellulärer und morphologischer Ebene sehr gut charakterisierten Vorgänge der Gastrulation (Keller und Jansa, 1992) geben auch hier *Xenopus laevis* den Vorzug. Allerdings verschließt sich der Organismus aufgrund seines pseudotetraploiden Genoms (Bisbee et al., 1977) klassischen genetischen Studien. "Knock out"-Experimente, wie im Maussystem als gängige Methodik angewandt, sind in dieser Weise nicht möglich und finden teilweisen Ersatz in der Anwendung synthetischer antisense Oligodesoxynukleotide zur gezielten temporären funktionellen Inhibition bestimmter Gene. Genetische Fragestellungen innerhalb der Embryologie werden deshalb vorzugsweise an *Drosophila melanogaster* bearbeitet, neuerdings auch am Zebrafisch *Danio rerio*, der die genetische Zugänglichkeit mit den Vorteilen der Amphibienentwicklung verbindet (Mullins und Nüsslein-Vollhard, 1993). In jüngerer Zeit wurde jedoch auch für *Xenopus laevis* ein experimentelles System etabliert, durch die Herstellung transgener Frösche die genetische Ebene direkt zu bearbeiten (Slack, 1996).

Die Entwicklung eines bilateral symmetrischen Organismus aus einer radialsymmetrischen Ursprungszygote setzt die frühe Etablierung von Körperachsen voraus. Bei *Xenopus* weist bereits die Oozyte eine maternal determinierte Polarität auf. So kennzeichnet die gegenüber der vegetalen Hälfte stark pigmentierte animale Hälfte den späteren Verlauf der anteroposterioren Körperachse des Embryos. Mit dem Eintritt des Spermiums in die animale Hälfte erfolgt der Übergang zur bilateralen Symmetrie. Dabei legt der Spermieeintrittspunkt (SEP) die spätere ventrale Seite des Organismus fest. Bei der anschließenden Cortexrotation (Gerhard, 1989) erfolgt durch eine Verschiebung des Cortex gegenüber der inneren Zellmasse nach dorsal und der damit verbundenen Orientierung des Zytoskeletts ein vesikulärer Transport von Faktoren in den dorsal äquatorialen Bereich (Rowling, 1997). Augenscheinlich ist diese gegenläufige Rotationsbewegung durch eine Ausrichtung des animalen Pols im Schwerfeld nach oben und, bedingt durch die begleitende Pigmentverschiebung, durch das Auftreten des sogenannten grauen Halbmondes sichtbar.

Die ersten beiden Furchungsteilungen verlaufen horizontal, wobei sich der links-rechts-eine dorsal-ventral-Teilung anschließt. So entstandene Vierzellstadien bieten sehr gute Bedingungen für Überexpressionsstudien. Durch gezielte Auswahl des Mikroinjektionsortes kann beschränkt diffusible exogene mRNA oder DNA zur Manipulation bestimmter embryonaler Areale und Entwicklungsvorgänge herangezogen werden. Die Furchungsteilungen verlaufen zunächst rasch. Ein großer Pool maternal gespeicherter Proteine und Transkripte erlauben dem Embryo unter Ausschluß der Zellzyklusphasen G1 und G2 Teilungsraten, die sonst nur für bakterielle Systeme gefunden werden. Erst nach der zwölften Zellteilung, dem Zeitpunkt der Mid Blastula Transition (MBT), beginnt die Expression zygotischer Gene. Die nunmehr etwa viertausend Zellen umfassende embryonale Hohlkugel (Blastula) beginnt mit asynchronen Zellteilungen, Zellmigration und eigentlichem Wachstum (Kirschner et al., 1985). Die molekulare Achsendetermination erfolgt während des Blastulastadiums durch graduelle Anordnung von Faktoren und die Etablierung der dorsalen Organisationszentren Nieuwkoop-Center und Spemannscher Organisator. Den involvierten Faktoren kommt dabei eine fundamentale Bedeutung bei der spezifischen Ausprägung des späteren mesodermalen Schicksals zu. Die Bedeutung solcher Induktionsvorgänge läßt sich durch Transplantationsexperimente nachvollziehen. So zeigten bereits Spemann und Mangold (1924) an Amphibienembryonen im Gastrulastadium, daß auf die ventrale Seite des Embryos transplantiertes Gewebe der oberen Urmundlippe dort das weitere Entwicklungsschicksal umgebender Zellen bestimmt und zur Ausbildung einer sekundären Achse führt. Die in jüngerer Vergangenheit in *Xenopus laevis* isolierten mesoderminduzierenden Proteine wie Noggin und Mitglieder der FGF-, Activin- und Wnt-Familie und ihrer Rezeptoren (Übersicht in Sive, 1993) eröffnen nun eine molekulare Deutung dieser Befunde.

Mit der Gastrulation schließlich tritt der Embryo in eine Entwicklungsphase ein, die geprägt durch vielgestaltige Zellbewegungen und -umlagerungen zur Anlage der drei Keimblätter Endo-, Meso- und Ektoderm führt. Nach der Induktion des Mesoderms beginnt dieses im Bereich der involutierenden Marginalzone über den Blastoporus einzuwandern. Eine im späten Blastulastadium des Keims auf dem Blastocoeldach gebildete Fibronektinmatrix unterstützt dabei die gerichtete Migration involutierter Zellen nach anterior. Als die Involution treibende Kraft werden Konvergenz und Extension angenommen (Keller, 1986), während Zellen der nichtinvolutierenden Marginalzone durch Epibolie der animalen Kappe ineinandergeschoben werden und so die animal-vegetale Streckung des Embryos

unterstützen. Gegen Ende der Gastrulation führt die ektodermale Ausweitung zu einer vollständigen Bedeckung des Embryos mit diesem Keimblatt. Entlang der dorsalen Mittellinie beginnt die Ausdifferenzierung des Neuralgewebes. Epidermale Zellen bilden zunächst die Neuralplatte, deren Ränder sich als Neuralleisten zur Neuralfurche aufwölben. Der Schluß zum Neuralrohr markiert den Beginn der Entwicklung des Rückenmarks und anterior der Hirnanlage. Als erste mesodermale Gewebe differenzieren sich Chorda dorsalis (Notochord) und die Somiten als Muskelvorläufer. Die Streckung des Embryos nimmt zu; Augenanlagen, Kiemenbögen und Ohrvesikel entwickeln sich. Die weitere Differenzierung insbesondere innerer Organe und Auswachsen des Schwanzes gipfelt schließlich im Schlüpfen des Tieres aus der Eihülle.

Die Embryonalstadien von *Xenopus laevis* werden üblicherweise nach Nieuwkoop und Faber (1967) in Stadien eingeteilt, die den jeweiligen Entwicklungsstand markieren und fortlaufenden Nummern zugeordnet sind. Diese Einteilung wird in der folgenden Arbeit übernommen.

1.2 Zelladhäsion und ihre Bedeutung in der Embryogenese

Die Fähigkeit von Zellen zur Adhäsion stellt für die Entstehung und Integrität von Metazoen eine essentielle Voraussetzung dar.

Während der Embryogenese spielen adhäsive Prozesse bei einer Vielzahl morphogenetischer Vorgänge eine entscheidende Rolle. Die zugrunde liegenden Interaktionen beruhen dabei sowohl auf direkten Zell-Zell-Kontakten als auch auf Interaktionen der Zellen zum Netzwerk der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Neben dem eigentlichen Bindungsvorgang durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die spezifisch und direkt mit einem externen Liganden interagieren, vermittelt die Aktivität des Kräfte übertragenden Cytoskelettes innerhalb der Zelle zusätzlich eine morphogenetische Komponente. Beide Teilprozesse verlangen einen hohen Grad an Koordination, um zur Differenzierung unterschiedlicher Gewebe und Organe und schließlich des gesamten Organismus zu gelangen.

Mit den grundlegenden Experimenten von Townes und Holtfreter an *Amblystoma punctatum* begann die moderne Analyse selektiver Zelladhäsionsprozesse. Sie vermischten durch leichte Alkalibehandlung dissoziierte Zellen prospektiven epidermalen und neuralen Gewebes unter neutralen Bedingungen. Es erfolgte eine Reaggregation der Zellen in ihre entsprechenden Herkunftsgewebe ("sorting out"). Die relative Anordnung entsprach dabei der des normalen

Embryos: Neuralgewebe wurde von epidermalem Gewebe umschlossen (Townes und Holtfreter, 1955). Ähnliche Ergebnisse erhielt Moscona durch die Untersuchung des Reaggregationsverhaltens von Hautzellen aus Mäuseembryonen in Rotationskulturen. Nach proteolytischer Dissoziation der Zellen mit Trypsin bildeten sich unter ständiger Bewegung nur Aggregate aus, die den Scherkräften des Mediums widerstehen konnten. Innerhalb dieser zunächst zufälligen Aggregate rekonstituierte sich korrekt strukturiertes Hautgewebe (Moscona, 1961). Experimente an Blastomeren von *Arbacia punctulata* führten nach Reaggregation sogar zur Entwicklung normaler Pluteus-Larven (Giudice, 1962; Spiegel und Spiegel, 1975). Die Spezifität der Zellinteraktionen folgt dabei der jeweils maximalen thermodynamischen Stabilität (Steinberg und Poole, 1982). Holtfreter prägte in diesem Zusammenhang den Begriff der selektiven Affinität: eine anfangs unspezifische Zelladhäsion sollte durch eine stärkere gewebsspezifische Adhäsion überlagert werden. Als Ursache für das "sorting out" werden heute die Spezifität und Menge der exprimierten Zelladhäsionsmoleküle, sowie deren spezifische Verknüpfung zum Zytoskelett angesehen (Friedlander et al., 1989; Jaffe et al., 1990). Die Veränderung des Zellverhaltens muß dabei entwicklungsabhängig reguliert sein, wie Trinkaus an isolierten Fundulus-Blastomeren zeigen konnte: erst mit Beginn der Gastrulation erwarben diese Zellen die Fähigkeit, auf einem artifiziellen Substrat zu adhären und zu migrieren (Trinkaus, 1963).

Von den prinzipiellen Vorgängen, die während der Embryogenese unter Beteiligung von Adhäsionsprozessen ablaufen, seien die Segregation verschiedener Zellgruppen in unterschiedliche Keimschichten und Gewebe, das Ablösen von Einzelzellen aus einem anfangs kohärenten Zellverband, die Migration einzelner Zellen und deren Aggregation zu Geweben sowie das Auswachsen von Neuriten beispielhaft erwähnt (s.u.).

Neben diesen in erster Linie die Morphogenese des Organismus direkt betreffenden Prozessen, können verschiedene Kategorien von Zellinteraktionen unterschieden werden, die umgrenzte Zellverbände zu interzellulärer Kommunikation mit unterschiedlicher Ausprägung befähigt (Gurdon et al., 1993). Bei der embryonalen Induktion induziert ein Zelltyp A einen anderen nicht festgelegten Zelltyp X zur Umwandlung in einen Zelltyp B. Dieser Prozeß ist von der Zellzahl unabhängig; unter Beteiligung größerer Zellzahlen wird er bei Induktionsvorgängen der Amphibienentwicklung (Gurdon, 1987; Slack, 1991), unter Beteiligung kleiner Zellzahlen oder auf Einzelzellebene beispielsweise bei der Augenentwicklung von *Drosophila* gefunden (Basler und Hafen, 1991). Induziert ein

gegebener Zelltyp B dagegen nicht festgelegte Zellen des Typs X ebenfalls zur Umwandlung in den Zelltyp B, so spricht man von homoioenetischer Induktion. So kann Neuralgewebe in benachbartem Ektoderm ein neurales Schicksal induzieren (Mangold, 1933; Spemann, 1938). Weitere Beispiele finden sich bei der Mesoderminduktion (Represa und Slack, 1989). Völlig unterschiedlich präsentiert sich hingegen der Community-Effekt. Nicht festgelegte Zellen kooperieren in einer Zellgemeinschaft zu einem gemeinsamen Differenzierungsstatus hin. Eine erforderliche Mindestanzahl von Zellen innerhalb des integren Verbandes gewährleistet dabei den Anstieg eines angenommenen diffusiblen Faktors über eine wirksame Schwelle hinaus. Beispiele sind die myogene Differenzierung von Muskelvorläuferzellen (Gurdon et al., 1993; Holt et al., 1994) und die Notochordentwicklung in *Xenopus laevis* (Weston et al., 1994). Eine Zusammenfassung dieser drei Interaktionsformen zeigt Abbildung 1.1.

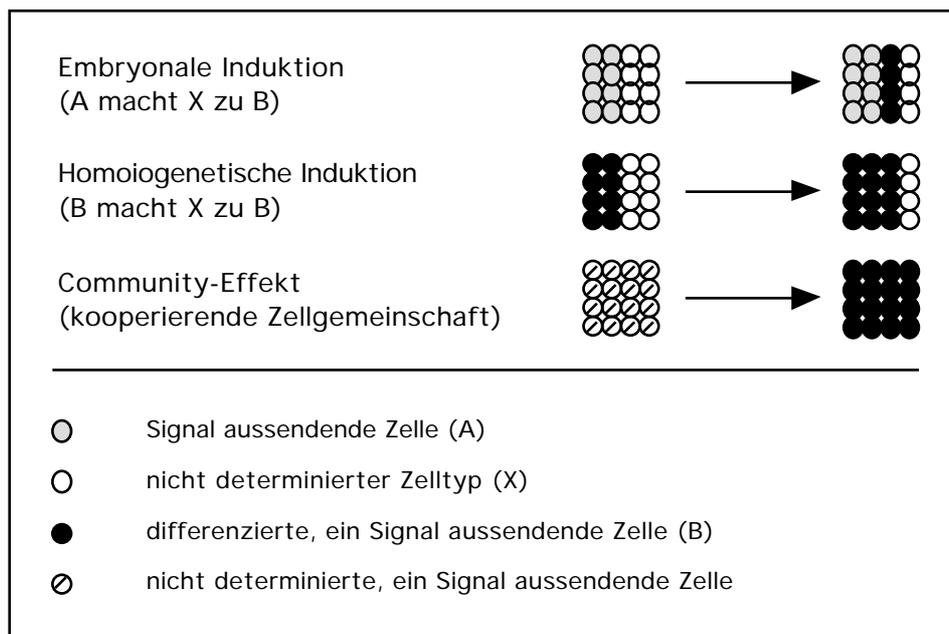


Abb. 1.1: Verschiedene Kategorien von Zellinteraktionen, die umgrenzte Zellverbände zu interzellulärer Kommunikation unterschiedlicher Ausprägung befähigt. Der Community-Effekt setzt eine Mindestanzahl von Zellen voraus. Nach Gurdon et al., 1993.

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

Aufgrund struktureller Unterschiede werden vier Familien von Zelladhäsionsmolekülen unterschieden. Fast alle ihre Vertreter sind Transmembranglycoproteine, deren Spezifität

eine distale extrazelluläre Domäne festlegt, während die Verbindung zu zytoskelettalen Strukturen durch die intrazelluläre Domäne hergestellt ist.

Als erstes Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulinsuperfamilie wurde N-CAM beschrieben (Cunningham et al., 1987). Es weist extrazellulär mehrere Wiederholungen immunglobulinähnlicher Domänen und in Membrannähe zusätzlich Fibronectin Typ III-Domänen auf. Seine Bindungsfunktion ist unabhängig von divalenten Kationen, und die Spezifität der Bindung ist in der distalen extrazellulären Domäne festgelegt. Neben den in der Regel homophilen Bindungen (Cunningham et al., 1987) wurden auch heterophile Interaktionen mit Heparansulfat gefunden (Cole et al., 1986; Reyes et al., 1990). Die Bindung anderer Vertreter dieser Molekülfamilie wie ICAM-1/2 und VCAM-1 gestaltet sich hingegen ausschließlich heterophil. N-CAM wird in vier alternativen Spleißvarianten exprimiert, die sich in ihren Transmembran- und cytoplasmatischen Domänen unterscheiden.

Selectine oder LECAMS finden sich auf Blut- und Endothelzellen und sind am Lymphocyten-Homing beteiligt. Im Gegensatz zur ersten Familie ist die Bindung der C-Typ Lektin Domäne an spezifische Kohlenhydratgruppen Ca^{2+} -abhängig. Aufgrund der Domänenstruktur werden für diese Gruppe weitere Bindungsspezifitäten diskutiert.

Auf die beiden weiteren Molekülfamilien der Cadherine und der α -heterodimeren Integrine soll in den nächsten Kapiteln näher eingegangen werden.

Eine sich an der Funktion und Lokalisation orientierende frühere Systematik der Zelladhäsionsmoleküle (Edelman und Thiery, 1985) unterschied neben den Zell-Substrat-Adhäsionsmolekülen SAMs, welche den Kontakt zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln (z.B. Fibronectin, Laminin, Kollagen und Integrine), vor allem Zellkontakt-Moleküle CJMs als strukturelles Grundgerüst der Desmosomen, "adherens junctions" oder "tight junctions" von den Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen CAMs, die den direkten Zell-Zell-Kontakt vermitteln. Die Abgrenzung der CJMs von den CAMs kann allerdings so nicht aufrechterhalten werden, da beide Gruppen mittlerweile in den "adherens junctions" gefunden worden sind (Boller et al., 1985; Volk und Geiger, 1986; Burridge et al., 1988). Zusätzlich werden die desmosomalen Proteine Desmoglein und Desmocollin aufgrund ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit mit den Cadherinen (Buxton und Magee, 1992; Koch et al., 1992) mit diesen zur Cadherin-Proteinsuperfamilie zusammengefaßt.

1.4 Cadherine

Mit den ersten Cadherinen wurden solche Vertreter dieser Molekülfamilie isoliert, die eine Klassifizierung aufgrund ihrer gewebsspezifischen Expression zuließen. Zu den epithelial/embryonal exprimierten Cadherinen wird neben Uvomorulin/E-Cadherin der Maus (Ringwald et al., 1987) und seinen Interspezies-Homologen CAM 120/80 des Menschen (Damsky et al., 1983; Mansouri et al., 1988), rr-1/Arc-1 des Hundes (Behrens et al., 1985; Gumbiner und Simons, 1986) auch das eng verwandte L-CAM aus dem Huhn gezählt (Gallin et al., 1987). In *Xenopus* finden sich neben dem direkten Homologen E-Cadherin (Choi und Gumbiner, 1989) mit EP/C- und XB/U-Cadherin zwei embryonale Vertreter dieser Gruppe (Ginsberg et al., 1991; Herzberg et al., 1991, Angres et al., 1991).

Zu den neuronal exprimierten Cadherinen wurde neben den N-Cadherin-Homologen aus Huhn, Maus und *Xenopus* (Hatta et al., 1988; Volk und Geiger 1984, Miyatani, 1989; Detrick et al., 1990) auch das aus Mausmyoblasten isolierte T-Cadherin gezählt, dessen einzig vorhandene extrazelluläre Domäne ("truncated") über einen Lipidanker mit der Zellmembran verbunden ist (Rantsch und Dours-Zimmermann, 1991). Als plazentale Cadherine wurden die Homologen aus Maus, Mensch und Rind isoliert (Nose et al., 1987; Shimoyama et al., 1989; Liaw et al., 1990). Im Zusammenhang mit ihrer gewebsspezifischen Verteilung sind in der Vergangenheit noch weitere Vertreter charakterisiert worden, so das retinale R-Cadherin, B-Cadherin aus dem Hirn und M-Cadherin aus dem Muskel (Donalies et al., 1991; Inuzuka et al., 1991; Napolitano et al., 1991, Geiger und Ayalon, 1992).

Aufgrund der gerade in den vergangenen vier Jahren zahlreich neu isolierten Cadherine oder cadherinverwandter Moleküle ist die oben beschriebene Ordnung nicht ausreichend. Eine sich hauptsächlich auf Strukturdaten und Sequenzvergleiche stützende Einteilung erlaubt heute die Unterscheidung der klassischen und desmosomalen Cadherine von den Protocadherinen und cadherinverwandten Proteinen (Suzuki, 1996).

1.4.1 Aufbau und Struktur klassischer Cadherine

Klassische Cadherine sind Transmembranglycoproteine mit einer relativen Molekülmasse von etwa 120-140 kD. Die im wesentlichen aus der Analyse ihrer cDNA-Klone erhaltenen

Primärstrukturdaten (Schuh et al., 1986; Nagafuchi et al., 1987; Ringwald et al., 1987; Hatta et al., 1988) ergeben für das mature Protein einen Gehalt an 723-748 Aminosäuren (Takeichi, 1988, 1990). Diese im Vergleich zur Molekülmasse vergleichsweise kleine Anzahl beruht auf zusätzlicher Glycosylierung durch N-glycosidisch gebundene Oligosaccharide. Ihr Vorhandensein konnte direkt nachgewiesen und durch Sequenzanalysen bestätigt werden (Damsky et al., 1983; Peyrieras et al., 1983, 1985; Hatta et al., 1988). Ihre Rolle ist jedoch unklar; eine Blockierung der N-Glycosylierung mit Tunicamycin hat anders als bei N-CAM offenbar keinen Effekt auf die adhäsiven Eigenschaften von E-Cadherin (Gallin et al., 1987; Shirayoshi, 1986).

Das primäre Genprodukt enthält neben dem hydrophoben Signalpeptid ein 100-180 As langes Propeptid, dessen korrekte Abspaltung für die Cadherinfunktion notwendig ist (Ozawa

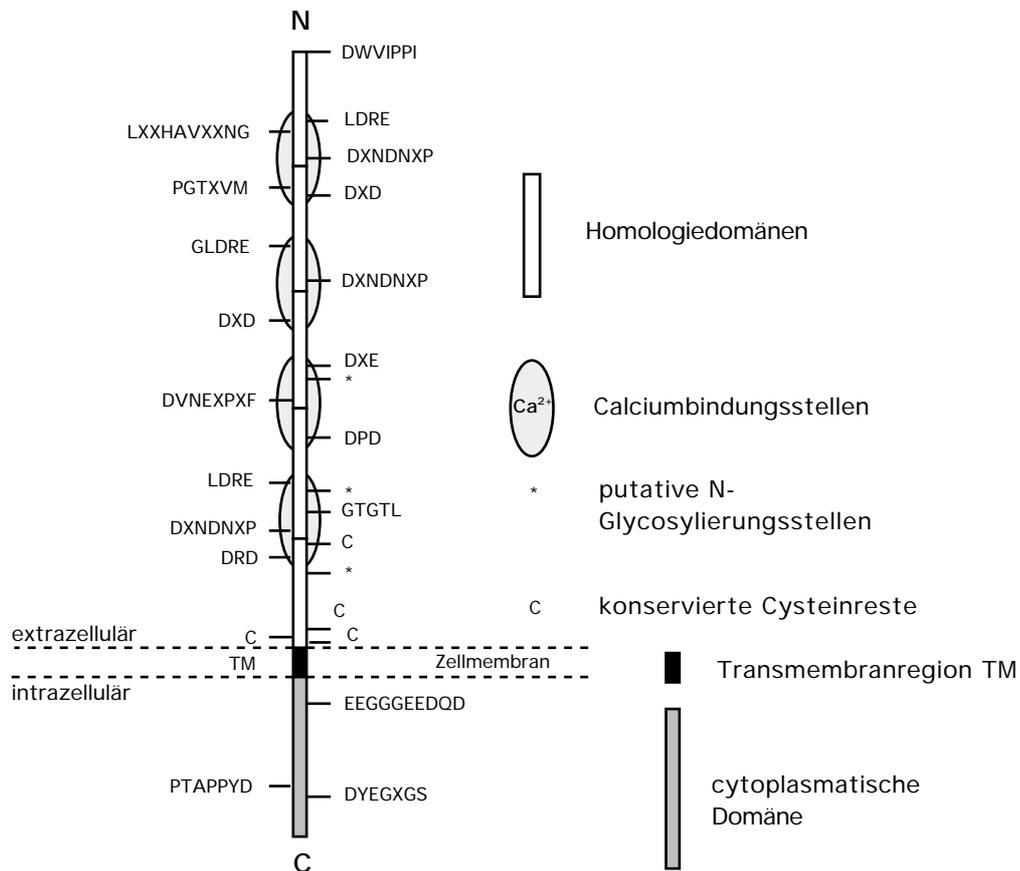


Abb. 1.2: Cadherinstruktur nach Abspaltung des Propeptids. Gezeigt sind die Positionen putativer N-Glycosylierungsstellen und konservierter Aminosäuren. Die angezeigten konservierten Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne sind nicht identisch mit den Bindungsstellen für β -Catenin oder p120. Die extrazelluläre Domäne umspannt etwa 550 As, die cytoplasmatische Domäne 150-160 As.

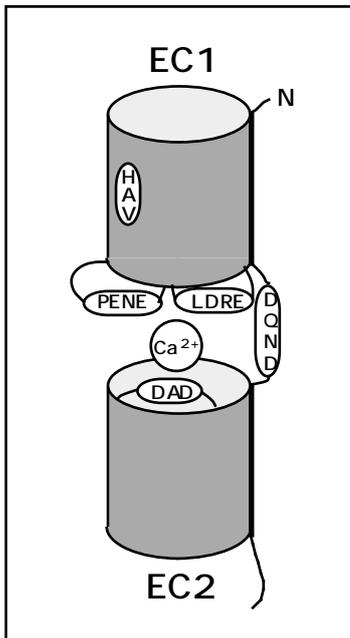
und Kemler, 1990). Durch eine einzelne Transmembrandomäne von 24-28 hydrophoben Aminosäuren erfolgt die Unterteilung des Moleküls in einen langen aminoterminalen, extrazellulären Bereich von etwa 550 As und in eine carboxyterminale, cytoplasmatische Region von etwa 150-160 As (Abbildung 1.2).

Mit 43-58 % Homologie auf Proteinebene weist die evolutive Konservierung innerhalb dieser Cadherinklasse ein hohes Maß auf; werden Cadherine gleicher Gewebsspezifität verglichen, finden sich noch stärkere Übereinstimmungen (Kemler et al., 1989). Die höchste Konservierung findet sich im cytoplasmatischen Bereich und am aminoterminalen Ende des reifen Proteins, wobei proximal extrazellulär nur eine geringe Übereinstimmung gefunden wird.

Aufgrund geringer aber signifikanter Variationen innerhalb der Aminosäuresequenz (Insertionen oder Deletionen) werden klassische Cadherine weiter in Typ I und Typ II-Cadherine unterteilt (Tanihara et al., 1994, 1994; Suzuki, 1996). Während das Ausmaß der extrazellulären Homologie bei Typ I-Cadherinen in der distalen Domäne (EC1) am höchsten ist, weisen Typ II-Cadherine ihre höchste Übereinstimmung in der anschließenden EC2-Domäne auf. Typ II-Cadherine sind bisher wenig untersucht. Zwar unterstützen sie wie die gut untersuchten Typ I-Cadherine die Zell-Zell-Adhäsion, aber offenbar schwächer als diese. Ihre Expression wurde entsprechend unter anderem in locker assoziierten Zellverbänden wie mesenchymalen Geweben gefunden (Kimura et al., 1995).

Mit zwei Ausnahmen weisen klassische Cadherine innerhalb der extrazellulären Domäne fünf etwa 113 As lange interne Sequenzwiederholungen auf, die von N-terminal ausgehend als EC1 bis EC5 bezeichnet werden. Der domänenartige Aufbau der Cadherine konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (Pokutta et al., 1994). Das Auftreten wiederholter Sequenzcluster (G)LDRE-DXNDNXP-DXD innerhalb der Domänenstruktur steht in enger Verbindung zu den calciumbindenden Eigenschaften des Moleküls (Ringwald et al., 1987). Ozawa et al. (1990a) konnten anhand circular dichroischer Untersuchungen die Beteiligung der Aspartatreste an der spezifischen Calciumionenbindung zeigen. Offenbar vermag die extrazelluläre Domäne vier Calciumionen zu binden. Die Bindung erfolgt dabei kooperativ und ist für die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation mit einem erhöhten Anteil an β -Faltblattstruktur essentiell (Pokutta et al., 1994). Die Auflösung der dreidimensionalen Struktur des N-Terminus von E- und N-Cadherin mittels 2D-NMR und Röntgenstrukturanalyse ergab, daß die konservierten Motive

als Calciumbindungstasche innerhalb einer β -Helix (LDRE) oder mehrerer Loops (PENE, DXNDN und DXD) jeweils zwischen sieben β -Faltblattstrukturen angeordnet sind, die durch



ihre zumeist antiparallele Ausrichtung eine β -Faßstruktur annehmen (Abb. 1.3). Jeweils ein Calciumion ist dabei zwischen den Faßdomänen EC1-5 gebunden (Overduin et al., 1995; Shapiro et al., 1995) Die so ermittelte Struktur weist große Ähnlichkeit mit der Immunglobulinsuperfamilie auf (Wagner, 1995).

Abb. 1.3: Aufgrund von NMR-Studien postulierter modularer Aufbau der EC-Domänen von E-Cadherin. β -Faltblattstränge sind antiparallel in einer Faßstruktur angeordnet. Das HAV-Motif liegt auf der Außenseite der EC1-Domäne. Das Calciumion liegt in einer Bindungstasche zwischen den Domänen. Nach Overduin et al., 1995.

Innerhalb der für die Spezifität der klassischen Cadherine notwendigen N-terminalen 113 Aminosäuren befindet sich das für die adhäsive Funktion mitentscheidende Sequenzmotiv LXXHAVXXNG (Blaschuk et al., 1990). Die HAV-flankierenden Aminosäuren X beeinflussen dabei die Bindungsspezifität (Nose et al., 1990). Das HAV-Motiv selbst liegt an der Außenseite des β -Fasses (Overduin et al., 1995). Eine HAV-ähnliche Region, die zur Cadherin-Erkennung in der Lage ist, wird auch für den Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor FGFR-1 beschrieben (Williams et al., 1994).

Proximal der Transmembrandomäne werden extrazellulär vier Cysteinreste an konservierten Positionen gefunden, die vermutlich an der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken beteiligt sind. Deletionsmutanten von N-Cadherin mit nur drei Cysteinresten zeigen hingegen eine Dimerisierung (Kintner, 1992).

Die cytoplasmatische Domäne stellt die zwischen den Cadherinen am höchsten konservierte Region dar. Immunpräzipitationen von Maus-Uvomorulin mit einem E-Cadherin-Antikörper ergaben neben dem Cadherin drei Kopräzipitate von 102, 88 und 80 kD (Ozawa et al., 1989). Die Cadherinbindungsstellen dieser als β -, γ - und δ -Catenin bezeichneten Proteine liegt innerhalb der 72 C-terminalen Aminosäuren (Ozawa et al., 1990b). Einige Domänen des β -Catenins weisen Homologien zu den Domänen von Vinculin auf, einem weiteren cytoplasmatischen Protein der "adherens junctions" (Nagafuchi et al., 1991; Herrenknecht

et al., 1991). Xenopus -Catenin wurde als Homologes zum menschlichen Plakoglobin und zum Produkt des Segmentpolaritätgens Armadillo aus Drosophila identifiziert (McCrea und Gumbiner, 1991). -Catenin ist identisch mit Plakoglobin (Peifer et al., 1992). Der Cadherin/Catenin-Komplex enthält -Catenin und exklusiv entweder -Catenin oder Plakoglobin (Hinck et al., 1994; Näthke et al., 1994). Dabei bindet -Catenin das Cadherin direkt, während -Catenin die Bindung zwischen -Catenin und dem Aktinfilament des Cytoskeletts vermittelt (Ozawa et al., 1990b; McCrea und Gumbiner, 1991; Ozawa und Kemler, 1992). Die spezifische -Cateninbindungsstelle fehlt jedoch in einigen Typ II-Cadherinen. Heute kann eine weitere Unterteilung in ubiquitär exprimierte und zelltypspezifische Catenine vorgenommen werden (Wheelock, 1990; Wheelock und Knudsen, 1991; Hirano et al., 1992).

1.4.2 Die Bindungsfunktionen klassischer Cadherine

Cadherine vermitteln extrazellulär den direkten Zell-Zell-Kontakt zu Cadherinen der Nachbarzelle. Dieser Vorgang ist, wie auch die Sensitivität gegenüber Proteaseabbau, stark von Calciumionen abhängig, die vermutlich die aktive Konformation des Moleküls aufrechterhalten (Takeichi, 1977; Hyafil et al., 1981, Overduin et al., 1995). Eine Aminosäuresubstitution innerhalb der Calciumbindungsstelle führt zum Verlust der Bindung und zur proteolytischen Spaltung des Cadherins (Ozawa et al., 1990a). Mutageneseexperimente zeigen, daß das an der Adhäsivität beteiligte HAV-Motiv innerhalb eines 113 As langen N-terminalen Bereiches liegt, der die Spezifität der E-Cadherin-Bindung festlegt (Nose et al., 1990). Die Schlüsselrolle des HAV-Motivs für allgemeine Cadherininteraktionen wird allerdings durch seine geringe Konservierung in Typ II-Cadherinen auch kontrovers diskutiert (Takeichi, 1995). Ob Cadherine benachbarter Zellen über ihre gesamte extrazelluläre Ausdehnung hinweg (Kopf-zu-Schwanz, heteroepitope Erkennung) oder nur über ihre N-Termini (Kopf-zu-Kopf, homoepitope Erkennung) miteinander interagieren, ist unsicher. Während Experimente mit monoklonalen Antikörpern beide Hypothesen unterstützen können (Geiger et al., 1990; Ozawa et al., 1991), favorisieren die Ergebnisse aus den Röntgenstrukturdaten von N-Cadherin eher eine homoepitope Erkennung (Shapiro et al., 1995). Die gleichen Autoren postulieren die parallele Anordnung zweier N-Cadherine einer Zelle zu einem Strang-Dimer. Jede ihrer Einheiten interagiert über den Aminoterminus mit der eines Strang-Dimers auf der

gegenüberliegenden Zelle. Ähnlich einem Reißverschluß ergäbe sich so ein kooperativer Bindungseffekt (Dinshaw und Gumbiner, 1995). Cadherine gehen bevorzugt homophile Bindungen mit Cadherinen gleichen Typs der Nachbarzelle ein (Hirano et al., 1987, Nose et al., 1990), obgleich auch heterophile Interaktionen beschrieben werden (Volk et al., 1987; Inuzuka, 1991; Matsunami, 1993). Mit unterschiedlichen Cadherinen transfizierte Zellen zeigen aber gewöhnlich ein "sorting out" (Nose et al., 1988). Ebenso gibt es Hinweise für Ausnahmen vom Prinzip der Homotypie: so interagiert E-Cadherin mit den Integrinen α_7 und β_2 und N-Cadherin mit FGFR-1 (Cepek et al., 1994; Karecla et al., 1995; Williams et al., 1994).

Auch Regionen der cytoplasmatischen Domäne sind für die adhäsiven Eigenschaften der extrazellulären Domäne notwendig. Die Deletion der 37 C-terminalen Aminosäuren von E-Cadherin führt zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit der intakten extrazellulären Domäne (Nagafuchi und Takeichi, 1988). Liegt hier eine Schwächung der Cadherin/Catenin-Interaktion vor, so geht diese nach Deletion von 72 C-terminalen As gänzlich verloren (Ozawa et al., 1990b). Stapert und Kemler (1994) schränken den Bereich der β -Catenin-Bindung auf einen Bereich von 30 Aminosäuren mit neun konservierten, teilweise phosphorylierten Serinresten ein. EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von β - und γ -Catenin unterbricht die Bindung zum Cytoskelett; der EGF-Rezeptor findet sich kolokalisiert mit E-Cadherin auf den lateralen Membranen von Epithelzellen (Hoschützky et al., 1994). Als Reaktion auf das EGF-Signal wird eine Akkumulation tyrosinphosphorylierten β -Catenins als cytoplasmatischer Pool gefunden, eine Antwort, die auch nach Ras-Transformation unter Beteiligung von p120 beobachtet wird (Kinch et al., 1995). Obwohl p120, auch p120^{CAS} für "Cadherin-Associated Src Substrate" oder p120^{ctn} für "catenin" (s.u.), β -Catenin und Plakoglobin durch die vorhandene zentrale Armadillo-Repeat-Domäne strukturell sehr ähnlich ist, bindet es aber nicht wie die vorgenannten an β -Catenin oder das Produkt des Tumorsuppressorgens APC (Daniel und Reynolds, 1997). Hamaguchi et al. (1993) konnten die Inaktivierung N-Cadherin-vermittelter Adhäsion nach Tyrosinphosphorylierung des Cadherins und β -Catenins zeigen. In der Zonula adherens wurden verschiedene Tyrosinkinase gefunden, darunter Genprodukte der src-, yes- und lyn-Protooncogenfamilie (Gentry und Rohrschneider, 1984; Tsukita et al., 1991). Allgemein kann ein Zusammenhang zwischen Tyrosinphosphorylierung und Integrität der Zellbindungen hergestellt werden. Für das Catenin p120^{CAS}, welches ursprünglich als Substrat von Src und anderen Rezeptortyrosinkinase identifiziert wurde, und das verwandte Protein p100 wurde die

Interaktion mit dem Cadherin- -Catenin-Komplex gezeigt (Reynolds et al., 1994; Aghib und McCrea, 1995; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995). Yap et al. (1998) konnten die Bindung von p120^{CAS} an den proximalen Anteil der cytoplasmatischen Domäne von EP/C-Cadherin zeigen. Im in vitro-System scheint p120^{CAS} an der lateralen Clusterung der Cadherine beteiligt zu sein und die zeitabhängige Verstärkung der ligandabhängigen und cadherinvermittelten Adhäsion zu vermitteln.

1.4.3 Morphoregulatorische Funktionen klassischer Cadherine

Neben ihrer reinen Fähigkeit zur homophilen Zell-Zell-Interaktion werden Cadherine aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der embryonalen Morphogenese auch als "morphoregulatorische" Moleküle bezeichnet (Edelman, 1988). Sie nehmen dabei direkten Einfluß auf Vorgänge wie Zellkondensation, Segregation, Migration oder Aggregation von Zellen.

Vom Achtzellstadium bis zur nächsten Teilung wird in Mausembryonen eine Zellkondensation beobachtet, die als Kompaktion bezeichnet wird. Durch Konzentration von E-Cadherin in die Zonula adherens bilden sich interblastomer enge Zellkontakte aus, die den anfangs lockeren Zellverband in eine kompakte Zellmasse überführen (Vestweber et al., 1987).

Bei der Entwicklung des Neuralrohres während der Neurulation wurde die Cadherinbeteiligung bei der Segregation von Zellschichten nachgewiesen. Ursprünglich E-Cadherin exprimierendes Ektoderm verliert an den Stellen der Neuralrohrdifferenzierung seine E-Cadherin-Expression zugunsten der Expression von N-Cadherin, während nun darüberliegendes Ektoderm weiterhin E-Cadherin exprimiert (Takeichi, 1988). Die bei dem Schluß des Neuralrohrs entstehenden Neuralleistenzellen stellen die Expression von E-Cadherin ein und exprimieren nur vorübergehend N-Cadherin. Auswandernde Neuralleistenzellen hingegen exprimieren weder E- noch N-Cadherin und grenzen sich dadurch von Ektoderm und Neuralrohr ab. Stattdessen findet sich in ihnen die Expression anderer Cadherine (Rantsch und Dours, 1989; Rantsch und Dours-Zimmermann, 1991; Nakagawa und Takeichi, 1995). Mit Beginn der N-Cadherin-Expression erfolgt am Zielort wieder eine Aggregation der Zellen mit dem Neuralrohr (Takeichi, 1987). Cadherinvermittelte Zellinteraktionen werden auch für die Clusterbildung während der Migration primordialer Keimzellen diskutiert (Gomperts et al., 1994).

Im adulten Organismus sorgt unter anderem die gewebsspezifische differentielle Expression der Cadherine für Bildung, Abgrenzung und Integrität der Gewebe und Organe, aber auch für pathologische Vorgänge wie die Metastasierung von Tumoren. So erfordert das Ablösen invasiver Zellen vom Primärtumor ein Zusammenbruch der interzellulären Adhäsion. Dieser Prozeß wird von Funktions- oder Expressionsverlust von E-Cadherin verursacht (Behrens et al., 1989, 1992).

Morphologische Auswirkungen der Cadherinexpression zeigen sich auch auf der Ebene einzelner Zellen. So verursacht die Transfektion von Fibroblasten mit E-Cadherin eine Verteilung der Na⁺/K⁺-ATPase in die basolaterale Membranregion (McNeill et al., 1990). Die Transfektion von E-Cadherin in eine retinale Pigmentzelle mit endogen unterschiedlicher Cadherinausstattung bewirkt Änderungen der Zellpolarität und die Etablierung von Desmosomen (Watabe et al., 1994). Unterschiedliche Zelldifferenzierung zu organisierten Geweben ist vom exprimierten Cadherintyp abhängig. So zeigen E-Cadherin Null-Mutanten embryonaler Mausstammzellen gegenüber dem Wildtyp nicht nur eine defekte Zellaggregation, sondern auch ein verändertes Expressionsprofil an Differenzierungsmarkern. Ein Rescue der E-Cadherin Expression führt zur Ausbildung epithelialer Strukturen, ein Rescue durch konstitutive N-Cadherin Expression hingegen zur Ausbildung von Neuroepithel und Knorpelgewebe (Larue et al., 1996).

1.4.4 Desmosomale Cadherine, Protocadherine und cadherinverwandte Proteine

Innerhalb der desmosomalen Cadherine werden Desmocolline von Desmogleinen unterschieden. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein von vier extrazellulären Domänen aus, deren Homologie zu den Cadherindomänen ihre Gruppierung in die Cadherinsuperfamilie begründet. Cytoplasmatisch zeigen sich allerdings kaum Homologien. Ist die Länge der cytoplasmatischen Domäne der Desmocolline denen klassischer Cadherine sehr ähnlich, weisen Desmogleine eine starke Extension mit antiparalleler β -Faltblattstruktur dieses Bereiches auf. Desmosomale Cadherine zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an intrazellulären Cysteinresten aus, die möglicherweise der Interaktion mit anderen desmosomalen Proteinen dienen (Buxton und Magee, 1992).

Protocadherine weisen mehr als die fünf extrazellulären Wiederholungen klassischer Cadherine auf. Die Homologien beschränken sich hierbei hauptsächlich auf die Domänen EC2 und EC4 (Sano et al., 1993; Suzuki et al., 1996).

Als Vertreter der cadherinverwandten Proteine weist LI-Cadherin mit EC1a und EC2a zwei weitere extrazelluläre Domänen auf. Das HAV-Motiv in EC1 ist durch das Tripeptid AAL ersetzt, die Prosequenz fehlt, und die cytoplasmatische Domäne ist auf 18 Aminosäuren verkürzt (Berndorff et al., 1994). Trotz seiner nur geringen Sequenzhomologien wird auch das Oncogen c-ret zu dieser Klasse gezählt (Iwamoto et al., 1993).

1.4.5 Cadherine in *Xenopus laevis*

Bisher wurde die Charakterisierung von neun cadherinkodierenden cDNA-Klonen beschrieben, von denen alle, bis auf das den Typ II-Cadherinen zugeordnete F-Cadherin, dem Typ I der klassischen Cadherine angehören. Aufgrund der unterschiedlichen temporären Expression während der Embryogenese werden zwei Gruppen unterschieden: maternale Cadherine liegen maternal als Protein und/oder mRNA bereits in der Oocyte gespeichert vor, während die zygotischen Cadherine erst mit dem Beginn der zygotischen Transkription zum Zeitpunkt der Mid Blastula Transition exprimiert werden.

1.4.5.1 Zygotische Cadherine

Das zunächst mit einem kreuzreagierenden Antikörper aus A6-Zellen mit einer Größe von 140 kD identifizierte E-Cadherin (Choi und Gumbiner, 1989) findet sich erstmals im Stadium 9,5 direkt zu Beginn der Gastrulation. Auch seine Transkripte werden erst mit MBT gefunden (Broders et al., 1993; Tooi et al., 1994). Die Expression von E-Cadherin in *Xenopus* ist verglichen mit dem Homologen in Maus und Huhn, in denen E-Cadherin das früheste Adhäsionsmolekül darstellt, spät exprimiert (Thiery et al., 1984; Vestweber et al., 1987). Sowohl Transkript als auch Protein sind auf das Ektoderm beschränkt. Mit Beginn der Neuralinduktion verschwindet die E-Cadherin-Expression ähnlich wie in Maus und Huhn aus den Zellen der Neuralplatte (Angres et al., 1991; Levi et al., 1991). Wird innerhalb des Ektoderms eine polarisierte basolaterale Verteilung von E-Cadherin in der epithelialen Schicht beobachtet, scheint die Expression in der sensorischen Schicht weniger stark zu sein. Das Expressionsmuster in adulten Organen stimmt mit dem des Maus- und Huhn-E-

Cadherins überein (Choi und Gumbiner, 1989; Angres et al., 1991; Levi et al., 1991). Das von Tooi et al. (1994) kürzlich beschriebene Cadherin XTCAD-1 stellt vermutlich eine allelische Variation von E-Cadherin dar (Kühl und Wedlich, 1996).

N-Cadherin wird erstmals infolge der Neuralinduktion im presumptiven Neuroektoderm exprimiert (Detrick et al., 1990; Ginsberg et al., 1991; Simonneau et al., 1992). Es ersetzt in der Neuralplatte direkt die Expression von E-Cadherin (s.o.). N-Cadherin-Expression findet sich zudem in mesodermalen Geweben wie Notochord, Pronephros und Lateralplattenmesoderm, im Gegensatz zu Maus und Huhn allerdings nicht in den Somiten (Duband et al., 1987; Takeichi, 1988). Auch von N-Cadherin sind zwei allelische Varianten bekannt (Ginsberg et al., 1991).

F-Cadherin-Transkripte sind erstmals in der Neuralplatte nachweisbar. Es findet sich weiterhin in Neuralrohr, Niere und optischem Stamm. Die Expression von F-Cadherin trennt die dorsale von der ventralen Hälfte des caudalen Neuralrohrs. Im Hirn markiert es Biegungen zwischen unterschiedlichen Arealen (Espeseth et al., 1995).

1.4.5.2 Maternale Cadherine

Von den maternalen Cadherinen wurden bisher drei Vertreter charakterisiert, die alle bereits in der Oocyte exprimiert sind und maternal gespeichert vorliegen. Im Zuge der Eireifung findet sich progesteroninduziert eine Zunahme der Proteinsynthese. Für XB/U-Cadherin konnte der Zusammenhang der hormoninduzierten Polyadenylierung nachgewiesen werden (Kühl und Wedlich, 1995).

Choi et al. (1990) identifizierten mit einem Pan-Cadherin-Antikörper ein maternal exprimiertes Protein von 120 kD, welches zunächst als "cadherin like protein" CLP und später als C-Cadherin bezeichnet wurde. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie wurde es als allelische Variante zusammen mit dem später identifizierten EP-Cadherin (Ginsberg et al., 1991) als EP/C-Cadherin bezeichnet (Levine et al., 1994). Eine geringere Homologie zeigt sich zu dem pseudoallelen maternalen XB/U-Cadherin. Ursprünglich ebenfalls unabhängig als *Xenopus* blastomerenspezifisches und ubiquitäres Cadherin beschrieben (Herzberg et al., 1991; Angres et al., 1991), konnte die Identität von XB- und U-Cadherin anhand immunologischer Untersuchungen rekombinanter Proteine nachgewiesen werden (Müller et al., 1994). Für XB/U-Cadherin wird neben seiner Aufgabe während der Embryogenese auch

eine Funktion zwischen Oocyte und umgebenden Follikelzellen diskutiert, da es an den Kontaktbereichen dieser beiden Zellen gefunden wird (Müller et al., 1992).

EP/C und XB/U-Cadherin werden mit Beginn der Furchungsteilungen vom Cytoplasma in die inneren Membranbereiche transportiert (Angres et al., 1991; Herzberg et al., 1991; Ginsberg et al., 1991). Die basolaterale Lokalisation von XB/U-Cadherin in den äußeren Blastomeren bleibt dabei auch nach Transplantation in das Innere eines Wirtsembryos erhalten (Müller und Hausen, 1995). Während der frühen Embryogenese bis zum Neurulastadium sind beide Cadherine mit Ausnahme der Außenbereiche gleichmäßig über die Membranen aller Zellen verteilt. Im Schwanzknospenstadium und im adulten Tier zeigen sich nach dem Rückgang der ubiquitären Expression eine teilweise unterschiedliche gewebsspezifische Verteilung dieser beiden Cadherine (Kühl und Wedlich, 1996).

Das kürzlich von Tashiro et al. (1995) in *Xenopus* identifizierte maternal-neurale XmN-Cadherin findet sich im Gegensatz zu den vorgenannten nur als Transkript, nicht aber als Protein im maternalen Speicher, der bis zum Neurulastadium kontinuierlich abnimmt. Ab diesem Stadium beginnt die zygotische Expression streng beschränkt auf neurale Gewebe wie Hirn, anteriores Rückenmark, Augen- und Ohrvesikel. Im adulten Tier findet sich die Expression neben Hirn, Gonaden und Niere auch schwach in intestinalen Organen.

1.5 Dorsoventrale Musterbildung und der Wnt-Signalweg

Eine der entscheidenden Ereignisse der frühen Vertebratenembryogenese besteht in der dorsoventralen Musterbildung des Mesoderms. Liegt die animal-vegetale Körperachse bei *Xenopus* bereits maternal fest, so erfolgt die Spezifizierung der dorsoventralen Achse durch den Spermieintrittspunkt und der nachfolgenden Cortexrotation. Vermutlich durch diese Rotationsbewegung von vegetal nach medial verlagerte, bisher unbekannte Moleküle erzeugen das Nieuwkoop-Center. Es wird angenommen, daß diese so determinierte Gruppe dorsovegetaler Blastomeren im Acht- bis Sechzehnzellstadium in Folge den Spemann Organisator der dorsal equatorialen Zone des Embryos induziert (Übersicht in Slack, 1994). Auf diese Weise spezifiziertes dorsales Mesoderm initiiert die Gastrulationsbewegungen, ist an der Ausprägung von Notochord, paraxialem und lateralem Mesoderm beteiligt und induziert Neuralgewebe.

Die Bildung des Nieuwkoop-Centers ist dabei von der Aktivierung von Komponenten des in *Xenopus* gut untersuchten Wnt-Signalweges abhängig (Carnac et al., 1996; Wylie et al., 1996; Fagotto et al., 1997). Eine Übersicht gibt Abbildung 1.4.

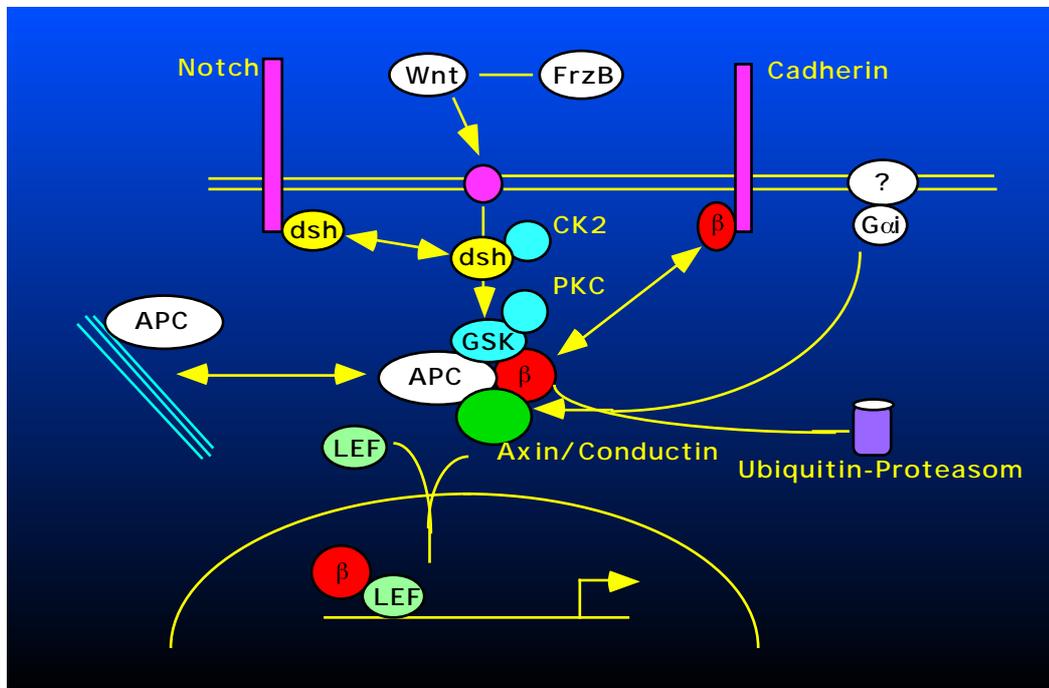


Abb. 1.4: Der Wnt1-Signalweg. Erklärung im Text. APC: Adenomatous Polyposis Coli Tumorsuppressorprotein; β : β -Catenin; CK2: Casein-Kinase II; dsh: Dishevelled; GSK: Glycogensynthase-Kinase 3; G α : G-Proteinuntereinheit; PKC: Proteinkinase C.

Für das erstmals als Protoonkogen isolierte, sekretierte Glycoprotein Wnt1 der Maus wurde aufgrund seiner Homologie zum Produkt des Segmentpolaritätsgens *wingless* aus *Drosophila* bereits früh eine Funktion der Signalvermittlung zugeschrieben (Nusse und Varmus, 1992). Von der mittlerweile zu einer Multigenfamilie angewachsenen Wnt-Gruppe sind bisher sieben Vertreter in *Xenopus* identifiziert worden. Sie werden hinsichtlich Ihrer Fähigkeit, nach ektopischer Expression in der ventralen Marginalzone des Embryos eine sekundäre Achse zu erzeugen, in zwei Kategorien von Wnt-Genen eingeteilt (Du et al., 1995; Torres et al., 1996): Während die Vertreter XWnt1, 3a, 8 und 8b zur Achseninduktion befähigt sind, findet sich für XWnt4, 5a und 11 lediglich eine Abnahme der Zelladhäsion und eine Störung der Gastrulationsbewegungen.

Sekretierte Wnt-Proteine interagieren mit der extrazellulären Matrix (Nusse und Varmus, 1992) und vermutlich mit Mitgliedern der frizzled-Familie, die mit ihren sieben Transmembranregionen entweder den Rezeptor oder Teile eines Rezeptorkomplexes

darstellen (Bahnot et al., 1996; Yang-Snyder et al., 1996). Für das erst nach MBT exprimierte, ventralisierende XWnt8 wurde von Wang et al. (1997) der sekretierte Bindungspartner Xfrzb identifiziert, der durch seine N-terminale Homologie zu frizzled und zu XWnt8 komplementäre Expressionsdomäne die Ventralisierung innerhalb des Spemann Organisators durch XWnt8 verhindern könnte.

Ein eintreffendes Wnt-Signal der Wnt/Wg Untergruppe bewirkt cytoplasmatisch die Hyperphosphorylierung und Aktivierung des membranständigen Phosphoproteins dishevelled (Xdsh), möglicherweise unter Beteiligung von Casein-Kinase II (Klingensmith et al., 1994, Theisen et al., 1994; Sokol et al., 1995). Durch einen bislang unbekanntem Mechanismus erfolgt hierdurch die Inaktivierung der Serin/Threonin-Kinase Glycogensynthase-Kinase GSK-3 (He et al., 1995; Pierce und Kimelmann, 1995). Möglicherweise wird dieser Prozeß durch die Proteinkinase C beeinflusst (Cook et al., 1996). Die so unterbundene Hyperphosphorylierung von β -Catenin führt zu dessen Stabilisierung (Papkoff et al., 1996) und damit zu seiner Akkumulation in Cytosol und Kern (Yost et al., 1996). β -Catenin bindet Mitglieder der HMG-Box-Familie architektonischer Transkriptionsfaktoren Lef-1/TCF-3 und wird dadurch in den Kern transportiert. Hier induziert es im ternären Komplex mit DNA eine Veränderung der Chromatinstruktur (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Darüberhinaus konnte dem C-Terminus von β -Catenin eine transaktivierende Wirkung zugewiesen werden (van de Wetering et al., 1997). Brannon et al. (1997) konnten eine direkte Aktivierung des Promotors des Homeoboxgens siamois (Xsia) durch den β -Catenin/XTCF-3-Komplex nachweisen, während XTCF-3 allein eine reprimierende Funktion einnimmt. Der Promotor von *Xenopus twin* (Xtwn), einem siamois ähnlichen Homeoboxgen mit gleicher Funktion, weist ebenfalls eine funktionelle Lef-1/TCF-Bindungsstelle auf (Laurent et al., 1997).

In Abwesenheit des Wnt-Signals entsteht ein multimerer Komplex aus β -Catenin, APC und GSK-3, vermittelt durch Conductin (Behrens et al., 1998) oder das conductinverwandte Protein Axin (Zeng et al., 1997). Die direkte Phosphorylierung von APC und β -Catenin durch GSK-3 (Yost et al., 1996) führt zur Ubiquitinierung von β -Catenin und zu seiner Degradation im Ubiquitin-Proteosomen-Weg (Aberle et al., 1997). Axin bzw. Conductin fördern die Phosphorylierung von β -Catenin, möglicherweise durch ihre räumliche Fixierung in die Nähe von GSK-3. Unabhängig von der Wirkung β -Catenins auf die Genexpression fördert das Wnt-Signal einen raschen Anstieg der Gap-Junction-Permeabilität in *Xenopus* Blastomeren (Miller und Moon, 1996).

Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs erhöht also primär den cytoplasmatischen Pool von β -Catenin, während dieser in Abwesenheit eines Wnt-Signals vermindert wird. Diese asymmetrische Verteilung von β -Catenin mit einem erhöhten cytoplasmatischen Pool und nukleärer Verteilung auf der dorsalen Seite läßt sich bereits ab dem Zweizellstadium in *Xenopus* nachweisen (Larabell et al., 1997). Mit β -Catenin als gemeinsamem Mediator zweier für die Embryogenese so entscheidender Vorgänge wie cadherinvermittelter Zell-Zelladhäsion und Wnt-Signalweg stellt sich die Frage nach indirekter oder direkter Einflußnahme beider Systeme in vivo (Heasman et al., 1994; Fagotto et al., 1996; Torres et al., 1996).

1.6 Integrine und Zellsubstratadhäsion in *Xenopus*

Für eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Embryogenese, Differenzierung und den Erhalt von Zell- und Gewebsgrenzen ist neben dem cadherinvermittelten Zell-Zelladhäsionssystem die Zell-Substratadhäsion zu Fibronektin und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix von entscheidender Bedeutung. Die Vermittlung der Adhäsion zur extrazellulären Matrix wird dabei weitestgehend von Integrinen übernommen, einer funktionell variablen Familie nichtkovalenter, heterodimerer Transmembranglycoproteinrezeptoren (Hynes, 1992). Sie stellen dabei nicht nur die mechanische Verknüpfung von Matrix und Cytoskelett her, sondern sind ebenso an adhäsionsabhängiger Signalvermittlung unterschiedlichster Ausprägung beteiligt (Sastry und Horwitz, 1993; Clark und Brugge, 1995). Die Kombination der derzeit identifizierten 8 α - (90-110 kD) und 16 β -Untereinheiten (120-180 kD) zu mehr als zwanzig bisher bekannten Rezeptorkomplexen bestimmt die Ligandenspezifität ihrer extrazellulären Domänen. Eine erhöhte Diversität ergibt sich aus dem Umstand, daß ein Integrintyp verschiedene Ligandentypen mit übereinstimmenden Erkennungssequenzen binden können und ein Substratmolekül mehr als einen Integrintyp binden kann. Durch alternatives Spleißen im extra- oder intrazellulären Bereich der Integrine wird hier noch eine zusätzliche Komplexitätsebene eingeführt. Den schematischen Aufbau der Integrine verdeutlicht Abbildung 1.5.

Sind die meisten Liganden Proteine der extrazellulären Matrix wie u.a. Fibronektin (über die Sequenzmotive RGD und EILDV), Vitronektin (RGD), Typ I-Collagen (DGEA), Laminin oder Fibrinogen (KQAGDV, GPRP), so erkennen einige α 2-Integrine integrale

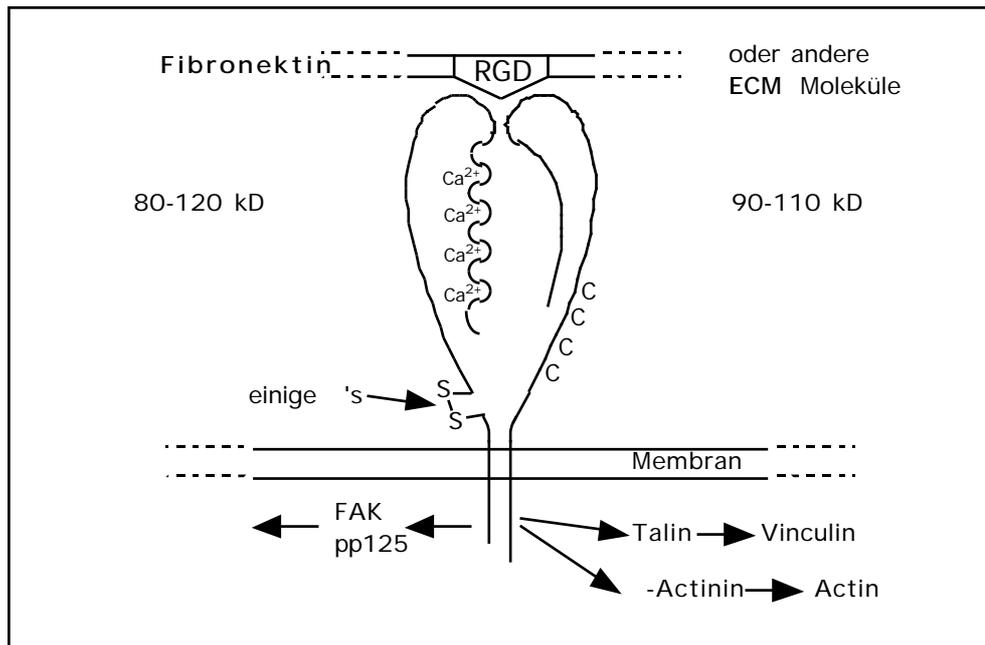


Abb. 1.5: Struktureller Aufbau der Integrine. Die α -Untereinheiten enthalten drei bis vier Bindungsstellen für zweiwertige Kationen; einige liegen posttranslational gespalten und über Disulfidbrücken verknüpft vor. Die β -Untereinheit enthält hochkonservierte cysteinhaltige Wiederholungen. Einige Bindungseigenschaften der Integrine sind exemplarisch angedeutet.

Membranproteine der Immunglobulinsuperfamilie wie ICAM-1/2 und VCAM-1 und vermitteln somit auch Zell-Zelladhäsion (Hynes, 1992).

Integrine stellen das typische Strukturelement der Fokalkontakte der Zellen dar und bewirken eine Verknüpfung der Enden von Aktinfilamentbündeln mit der extrazellulären Matrix, gleichzeitig die Voraussetzung für die Traktion während der Zellmigration. Zusätzlich zu Aktin finden sich in den Fokalkontakten weitere assoziierte strukturelle Proteine wie α -Actinin und Talin, welche beide direkt an die β cytoplasmatische Integrinuntereinheit binden, sowie Vinculin, Paxillin und Tensin (Huttenlocher et al., 1995; Lewis und Schwartz, 1995).

Neben seiner Funktion als strukturelles Protein erfüllt der Integrinkomplex im Zusammenspiel mit zahlreichen cytoplasmatisch assoziierten Proteinen die Aufgabe als Signaleinheit für die Transduktion cytoplasmatischer und extrazellulärer Signale. Entsprechend der Richtung werden dabei "inside to out"- von "outside to in"-Übertragungen unterschieden, jeweils begleitet von Konformationsänderungen des $\alpha\beta$ -Heterodimers von einem inaktiven geschlossenen zu einem aktiven offenen Rezeptorkomplex (Hynes, 1992). Die Identifizierung zahlreicher regulatorischer Proteine in den

Fokalkontakten deutet auf eine weitreichende Integrinbeteiligung an verschiedenen Signalwegen hin. Neben der Fokalen Adhäsionskinase FAK, der Proteinkinase C (PKC) und pp60^{src}, werden nach Ligandbindungen und/oder Integrinclusterung Faktoren wie csk, grb2, crk, der Guaninaustauschfaktor SOS, C3G, IRS-1 sowie die PI3-Kinase gefunden (Clark und Brugge, 1995). Der Beteiligung von SH2-Domänen scheint hierbei eine fundamentale Rolle zuzukommen. Es konnte auch eine Signalwirkung auf andere Integrine festgestellt werden. So reguliert $\alpha_5\beta_1$ Integrin die Fähigkeit von $\alpha_v\beta_3$ Integrin, die Migration auf Vitronectin zu vermitteln. Die Konvergenz zwischen Integrinsignalwegen und Wachstumsfaktorsignalen bei der Regulation der Migration wurde für HGF, PDGF und EGF gezeigt (Matsumoto et al., 1994, Wenstrom et al., 1994; Chen et al., 1994).

Die im Xenopusembryo bisher charakterisierten Integrine umfassen die differentiell exprimierten Untereinheiten $\alpha_{2,3,4,5,6}$ und β_{1b} und $\alpha_{1,2,3}$ und β_6 (Whittaker und DeSimone, 1993; Ransom et al., 1993) und legen eine Beteiligung integrinvermittelter Substratadhäsion insbesondere bei der Kontrolle der Gastrulationsbewegungen nahe. Mit Beginn der Gastrulation findet sich eine Auskleidung des Blastocoeldaches mit Fibronectin zunächst an den Stellen, die den Kontakt zu Zellen der involutierenden Marginalzone herstellen (Lee et al., 1984). Mikroinjektion von Antifibronectin-Antikörpern oder RGD-Peptiden in das Blastocoel inhibieren das Fortschreiten der Gastrulation (Howard et al., 1992), auch wenn Initiation der Mesoderminvolution, konvergente Extension oder Schluß des Blastoporus hiervon unberührt bleiben (Keller et al., 1985; Yost, 1992; Keller und Jansa, 1992). Ramos et al. (1996) konnten zeigen, daß die integrinabhängige Zelladhäsion zur zentralen Bindedomäne RGD und einem weiteren Synergieepitop von Fibronectin zeitlich und räumlich unter der Kontrolle induktiver Signale, welche die Gastrulationsbewegungen initiieren, reguliert wird. So zeigen in vitro isolierte Zellen der animalen Kappe nach Behandlung mit dem mesoderminduzierenden Faktor Activin, einem Mitglied der TGF- β -Familie, eine Veränderung ihrer adhäsiven Eigenschaften, für die eine Konformationsänderung der Integrine im Sinne eines "inside to out"-Signals und daraus resultierend eine veränderte Epitoperkennung des Rezeptorkomplexes angenommen wird (Ramos und DeSimone, 1996). Ein wahrscheinlicher Kandidat für die Regulation von Adhärenz, Spreitung und Migration embryonaler Zellen in Xenopus stellt $\alpha_5\beta_1$ Integrin dar, welches Synergie- und RGD-Epitop nach Aktivierung durch ein "inside to out"-Signal erkennt und während der Gastrulation in Xenopus ubiquitär exprimiert vorliegt (Aota et al., 1991; Danen et al., 1995; Faull et al., 1993; Joos et al., 1995).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Den Cadherinen kommt während der Entwicklung von *Xenopus laevis* durch ihre morphoregulatorische Funktion eine besondere Bedeutung zu. Neben der Funktion zygotisch exprimierter Cadherine bei der späteren Differenzierung von Geweben und Organen, kann den maternal exprimierten Cadherinen für die frühen Phasen der Froschentwicklung Funktionen zugeordnet werden, die über den rein mechanischen Zusammenhalt der Blastomeren für die Integrität des Embryos hinausgehen. So konnte die Funktion bei der konvergenten Extensionsbewegung während der Gastrulation für einen der beiden bekannten maternalen Cadherine, XB/U-Cadherin, gezeigt werden.

Cadherine sind hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften bifunktionell. Vermittelt die extrazelluläre Domäne homophile Bindungen zu typidentischen Cadherinen der Nachbarzelle, so bindet das Armadillo-Protein β -Catenin an die cytoplasmatische Domäne. β -Catenin selbst wurde auch als Mediator des Wnt-Signalweges bei der dorsoventralen Spezifizierung der frühen Blastula identifiziert.

Inwieweit hier ein Zusammenhang zwischen zelladhäsiver bzw. β -cateninbindender Funktion der maternalen Cadherine und Wnt-vermittelter Signaltransduktion bzw. Spezifizierung des dorsalen Mesoderms besteht, soll in dieser Arbeit näher untersucht werden. Wurde die Charakterisierung zelladhäsiver Cadherinfunktionen anhand der Überexpression cytoplasmatisch deletierter XB/U-Cadherin-Mutanten nach der Mid Blastula Transition durchgeführt, soll hier ein anderer Ansatz gewählt werden: Die Erstellung extrazellulärer Deletionsmutanten von XB/U-Cadherin und ihre Überexpression in Form von stabilisierter RNA vor der Mid Blastula Transition in der dorsalen Marginalzone des frühen *Xenopus* Embryos sollte durch gestörte Zelladhäsion und β -Catenin-Depletion das Organisationszentrum dorsalen Mesoderms beeinflussen. Anhand erhaltener Phänotypen und histologischer Untersuchungen sollen die Auswirkungen dieser Überexpression untersucht werden. Koexpression mit unterschiedlichen Transkripten soll eine Interpretation insbesondere der Bedeutung der einzelnen Komponenten des Cadherinkomplexes in diesem Zusammenhang ermöglichen.

Die Spezifizierung des Mesoderms geht mit spatiotemporär regulierter und ineinandergreifender Genexpression diffusibler und DNA-bindender Proteine einher. Auswirkungen der Cadherinüberexpression auf die Expression dieser molekularen Marker sollen die Interpretation der erhaltenen Phänotypen und statistischen Aussagen unterstützen.

Integrinvermittelte Zell-Substratadhäsion auf Fibronectinmatrizes bilden eine weitere funktionelle Einheit morphoregulatorischer Prozesse in *Xenopus*. Insbesondere während der Gastrulationbewegungen erscheint ein geordnetes Zusammenspiel von cadherinvermittelter Zelladhäsion und integrinvermittelter Substratadhäsion sinnvoll. Transfektionsexperimente von *Xenopus* Fibroblasten mit Cadherinen zeigen, daß Fibronectin- und Integrinexpression Wnt-abhängig reguliert sein können.

Durch Überexpression geeigneter Cadherinkonstrukte in der animalen Kappe von *Xenopus* Embryonen sollen erste Hinweise auf eine möglicherweise veränderte Fibronectinmatrixausbildung des Blastocoeldaches *in vivo* erhalten werden. Zellen der involutierenden Marginalzone erlangen abhängig von mesoderminduzierenden Signalen die Fähigkeit zur Migration auf dem Blastocoeldach. Dieses Zellverhalten läßt sich im *in vitro* Ansatz mit Zellen der animalen Kappe unter Zusatz eines mesoderminduzierenden Faktors simulieren. Welchen Einfluß die Cadherinüberexpression auf dieses integrinvermittelte Zellverhalten nimmt, soll in Adhäsionsassays untersucht werden.