

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Darstellung der Deletionsmutanten

Für einen dominant negativen Ansatz, in dem neben der Zelladhäsions- auch die Cateninbindungsfunktion endogen vorhandener Moleküle affektiert werden sollte, wurde entsprechend der strukturellen Bindungseigenschaften der Cadherine eine Deletion im extrazellulären Bereich eingeführt. Ausgehend von dem in pBluescript vorliegenden XB/U-Cadherin Klon Nr. 5 (M. Kühl, Doktorarbeit 1995) wurden mehrere Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen ausgewählt, mit denen Deletionen unterschiedlicher Größe innerhalb des Leserasters eingeführt werden konnten. Insbesondere die Lage der Bcl I-Schnittstellen an Position 833 und 1880 ermöglichte neben der Deletion der Calciumbindungsstellen eine Beschädigung des für die Spezifität der Bindung notwendigen HAV-Motivs. Das für Prozessierung und Membrantransfer erforderliche Propeptid mit der Signalsequenz blieb bei allen verwendeten Deletionsmutanten intakt. Um das Risiko

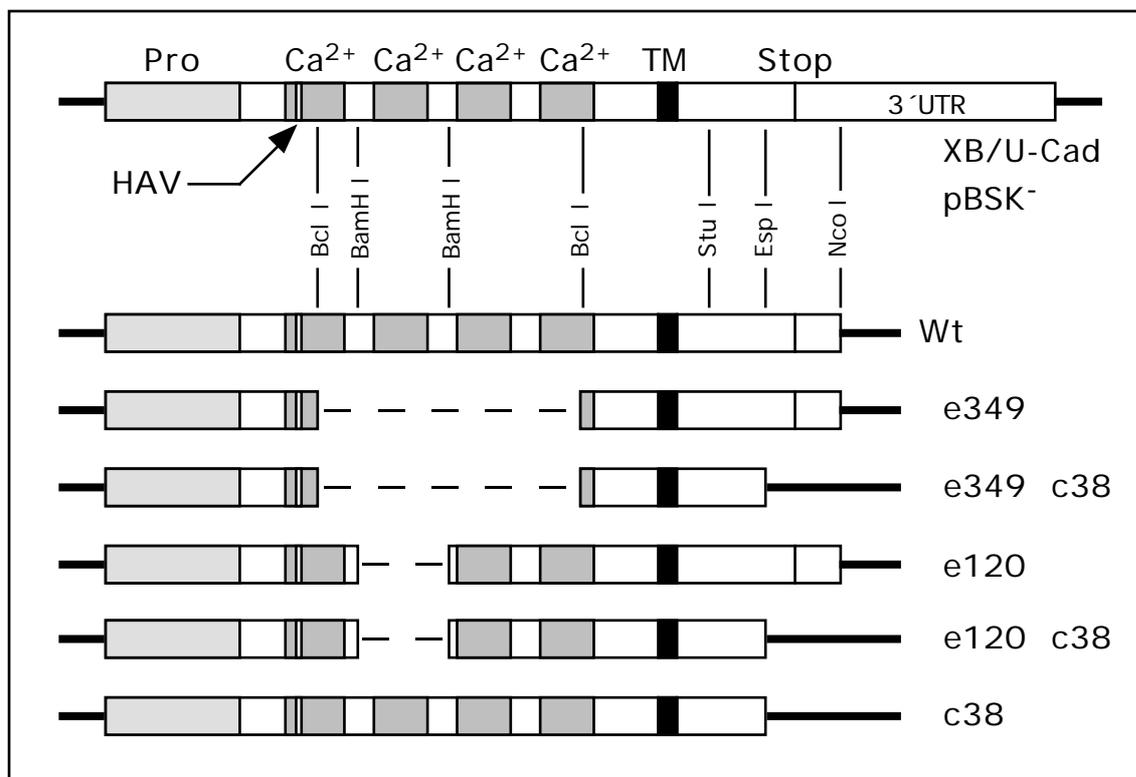


Abb. 3.1: Die in dieser Arbeit erstellten und/oder verwendeten Konstrukte von XB/U-Cadherin. Zur Vermeidung vorzeitiger Strangabbrüche während der *in vitro* Transkription wurde in Wt, e349 und e120 3'seitig der nichttranslatierte Bereich deletiert. Ca<sup>2+</sup>: Calciumbindungsstelle; HAV: HAV-Motiv; Pro: Propeptid; TM: Transmembrandomäne; 3'UTR: 3'nichttranslatierter Bereich.

vorzeitiger Strangabbrüche bei späteren *in vitro* Transkriptionen zu minimieren, wurden XB/U<sup>WT</sup> und die extrazellulär deletierten Konstrukte 3´-seitig bis kurz hinter das Stop-Signal an Position 2897 mit Nco I gekürzt. Als Kontrollkonstrukt zu der in dieser Arbeit verwendeten Mutante XB/U<sup>e349</sup> wurden diese und das Konstrukt XB/U<sup>c38</sup>, welches von G. Otto im Rahmen ihrer Diplomarbeit kloniert und bereits untersucht wurde (Finnemann et al., 1995; Kühl et al., 1996), mit Stu I im Insert an Position 2386 und Bgl I im Vektor an Position 1667 geschnitten, und die so erhaltenen Deletionen zur Doppelmutante XB/U<sup>c38e349</sup> neu kombiniert. Diese sollte nach Überexpression im Embryo keinerlei funktionellen Eigenschaften aufweisen. Das Leseraster aller Konstrukte wurde durch Subklonierung und Sequenzierung sämtlicher Deletions- oder Klonierungsstellen verifiziert. Eine Zusammenstellung aller in dieser Arbeit erstellten und/oder verwendeten XB/U-Cadherin-Konstrukte zeigt Abbildung 3.1. Sämtliche Konstrukte wurden, z.T. bereits vor der Deletionseinführung, in die Xho I Stelle des Vektorsystems pSP64T3 überführt (Abb. 3.2).

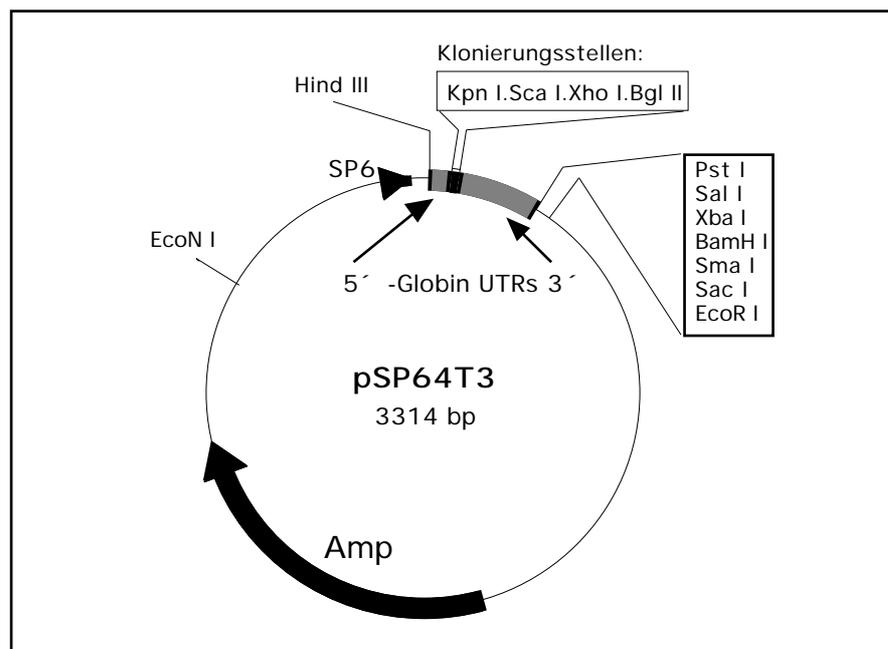


Abb. 3.2: Vektorkonstrukt zur Darstellung von *in vitro* Transkripten. Die Klonierung erfolgt in eine der Klonierungsstellen zwischen den 5´ und 3´ nichttranslatierten Regionen von Xenopus  $\beta$ -Globin und 23 zusätzlichen Aminosäuren. Die Polymerisation erfolgt durch SP6-Polymerase mit 5´mCap-Struktur als Run off-Transkription (Melton et al., 1984; modifiziert und zur Verfügung gestellt von S. Sokol).

Die das Insert 5´- und 3´-seitig flankierenden nichttranslatierten Bereiche von Xenopus  $\beta$ -Globin erhöhen dabei die Stabilität geCAPter *in vitro* Transkripte im Embryo (modifiziert von Sokol; Melton et al., 1984). Da die Klonierungseffizienz in diesen Vektor u. a. durch

seine limitierte Konierungsstelle nur sehr gering ist, wurden positive rekombinante Klone mittels radioaktiver Hybridisierung nach Buluwela et al. (1989) identifiziert.

### 3.2 Translationskontrolle

Sämtliche Cadherin-Konstrukte wurden hinsichtlich ihrer Translatierbarkeit im kombinierten in vitro Transkriptions-/Translationssystem TNT von Promega getestet. Die so erhaltenen  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markierten Proteine zeigen im Western Blot nach autoradiographischer Auswertung sowohl jeweils eine singuläre Bande als auch die korrekten Größenverhältnisse untereinander (Abb. 3.3). Die absoluten Größen weichen dabei nur

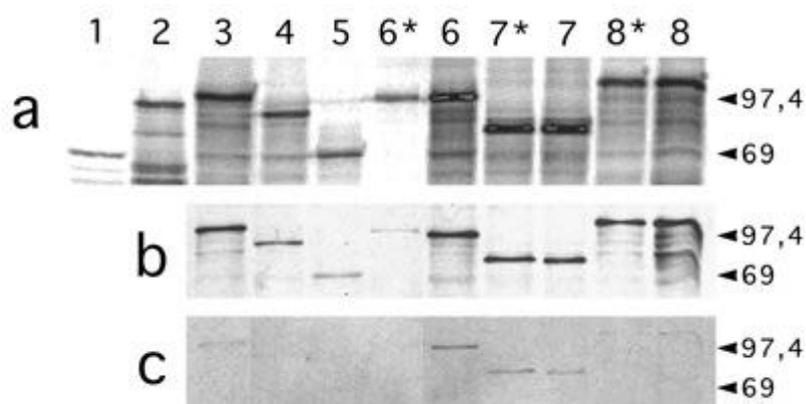


Abb. 3.3: In vitro Translationskontrolle der erstellten cDNA-Konstrukte. a) Autoradiographie der im TNT-System synthetisierten  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteine. Detektion auf Imaging Plates im Phosphorimager. b) Western Blot. Nachweis der Detektierbarkeit erstellter Cadherinkonstrukte durch mAb6D5 im in vitro System. ECL-Photolumineszenzdetektion für 2 min auf Kodak AR. c) Der mit b identische Blot zeigt nach Entfernen der Antikörper im Vergleich zu b den nach 2 min lediglich schwachen  $^{35}\text{S}$ -Anteil des Signals. 1: Luciferase. 2: h-Catenin(N-TAG). 3: XB/U c38. 4: XB/U e120 c38. 5: XB/U e349 c38. 6: XB/U e120. 7: XB/U e349. 8: XB/UWt. 1 in pGEM<sup>®</sup>-2, 2-8 in pSP64T3. \*: die experimentell verwendeten, 3'-seitig verkürzten Cadherinkonstrukte.

geringfügig von den theoretisch aus den Sequenzen abgeleiteten Werten (Tab. 3.1) nach oben ab, was dem Glycosylierungsmuster im verwendeten Kaninchen-Retikulocytenlysat zugeschrieben werden kann. Der monoklonale Antikörper 6D5 zeigt für denselben Blot im ECL-System eine Bindungsaffinität für alle XB/U-Cadherin-Konstrukte. Um sicherzugehen, daß das Photolumineszenzsignal während der kurzen Detektionsphase nicht durch die radioaktive Markierung überlagert wurde, wurde der Blot anschließend mit 4 M  $\text{MgCl}_2$  pH 4,0 gestrippt und für die Zeitdauer der ECL-Detektion erneut autoradiographiert. Nur bei den Mutanten XB/U e120 und XB/U e349 zeigte sich nach einer Expositionszeit von zwei

Konstrukt	Vektor	theoretische kD	ermittelte kD
XB/UWt	pSP64T3	100,390	117
XB/U c38	pSP64T3	95,838	105
XB/U e349	pSP64T3	62,481	79
XB/U e349 c38	pSP64T3	57,928	69
XB/U e120	pSP64T3	87,375	98
XB/U e120 c38	pSP64T3	82,823	81
bPreprolactin	pSP35T	25,796	25
h -Catenin (+ N-TAG)	pSP64T3	87,174	87
Luciferase (Kontrolle)	pGEM <sup>®</sup> - 2	61	61

Tab. 3.1: Im in vitro Translationssystem überprüfte Konstrukte. Die rechnerisch aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Molekulargewichte sind den aus Elektrophorese und Western-Blot erhaltenen Werten gegenübergestellt. Die Differenz ergibt sich aus der möglichen Nutzung putativer Glycosylierungsstellen im in vitro-System.

Minuten ein schwaches Signal, welches aber durchaus auf eine Restaktivität des Lumineszenzsignals zurückgeführt werden kann.

### 3.2.1 Proteinexpression exogener Konstrukte im Embryo

Die in pSP64T3 vorliegenden Cadherin-Konstrukte XB/UWt, XB/U e349 sowie XB/U c38 e349 wurden zur Überprüfung ihrer Proteinexpression als in vitro Transkripte mit CAP-Struktur animal in beide Blastomeren von Xenopus Zweizellstadien mikroinjiziert. Hierbei wurde mit bis zu 0,5 ng RNA pro Blastomere eine Konzentration gewählt, die bereits deutlich über den in den folgenden Experimenten zur Funktionsuntersuchung eingesetzten Konzentrationen lag. Die Aufarbeitung der Embryonen erfolgte nach verschiedenen Methoden im Stadium 9-10. Weder aus Embryonenlysaten noch aus Con A-Sepharose gereinigten Lysaten ließen sich die Proteine im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper 6D5 identifizieren. Die Aufreinigung aus im Stadium 9-10 präparierten animalen Kappen durch Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose gekoppeltem Antikörper 6D5 erbrachte lediglich das endogene XB/U-Cadherin-Signal. Selbst eine Koinjektion von XB/U-Cadherin mRNA mit <sup>35</sup>S-Methionin (bis 0,4 ng RNA und 178,26 nCi pro 20 nl und Blastomere) führte hier nicht zum Erfolg. Dieses Phänomen wird auch nach Überexpression der cytoplasmatischen Deletionsmutante XB/U c38 unter Expressionskontrolle des CMV-Promotors in Xenopus laevis beobachtet. Der Nachweis entsprechender Transkripte mittels RNase-Protection-Assay gelingt hier nur in lokal eng umgrenzten, phänotypisch auffälligen Teilbereichen des Embryos, wie M. Kühl in seiner Doktorarbeit zeigen konnte. Daß es sich nach der Mikroinjektion von Transkripten ähnlich verhält, wurde durch spätere

Experimente bestätigt. Dort gelang der Nachweis der Proteinexpression der verwendeten XB/U-Cadherinkonstrukte neben dem endogenen Molekül in der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper 6D5 (siehe Abb. 3.9). Offenbar ist die Kompetenz des monoklonalen Antikörpers 6D5 hinsichtlich der Zielerkennung der extrazellulären Deletionsmutante für die verschiedenen experimentellen Ansätze unterschiedlich.

### **3.3 Mikroinjektion in Embryonen von *Xenopus laevis***

Zur Mikroinjektion sämtlicher in dieser Arbeit verwendeter Konstrukte wurden die über Anionenaustauschersäulen gereinigten Plasmide distal des 3'-Globinanteils mittels der Restriktionsendonuklease EcoR I linearisiert, und als "run off"-Transkripte mit 5' 7-Methylguanosinkappe (CAP) *in vitro* transkribiert. Bis zur Verfügbarkeit einer Silicagelaufreinigung wurden die Transkripte lediglich einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen, was nicht nur - bedingt durch verbleibende Phenolreste - zu einer erhöhten Lethalität im Embryo, sondern auch zu etwa fünffach erhöhten Konzentrationsangaben führte. Zur Vereinheitlichung wurden diese Angaben für die wenigen betroffenen Experimente auf die neuen Werte normiert.

#### **3.3.1 Die dominant negative Überexpression von XB/U $\Delta$ e349 führt neben Fehlwanderungen des Mesoderms zu Defizienzen der Dorsoventralachse**

Zur näheren Funktionsuntersuchung von Cadherinen in der frühen Embryogenese wurden im dominant negativen Ansatz *in vitro* Transkripte der Mutante XB/U e349 in die Marginalzone beider dorsalen Blastomeren des Vierzellstadiums von *Xenopus* mikroinjiziert, einer Region, aus der ektodermales und besonders mesodermales Gewebe hervorgeht (Moody et al., 1987; Bauer et al., 1994). Dabei wurde mit 0,05 bis 0,2 ng RNA pro Blastomere ein Konzentrationsbereich gewählt, der neben einer klaren phänotypischen Ausprägung eine durchschnittliche Mortalitätsrate der Embryonen von maximal 40 % zum Zeitpunkt der Auswertung nicht überschreitet.

Erste Hinweise auf einen spezifischen Effekt zeigten die injizierten Embryonen bereits vor und während der Gastrulation bis zur Involution der Marginalzone. Bedingt durch die lokale Überexpression auf der dorsalen Seite kam es dort zur partiellen Störung der Adhäsion mit Ablösung einzelner Zellen aus dem Gewebeverband, was in leichteren Fällen äußerlich lediglich durch eine zeitliche Verzögerung des Gastrulationsvorganges, in schweren Fällen jedoch von Gastrulationsstopp und Absterben der Embryonen begleitet war (Abb. 3.4.b). Die

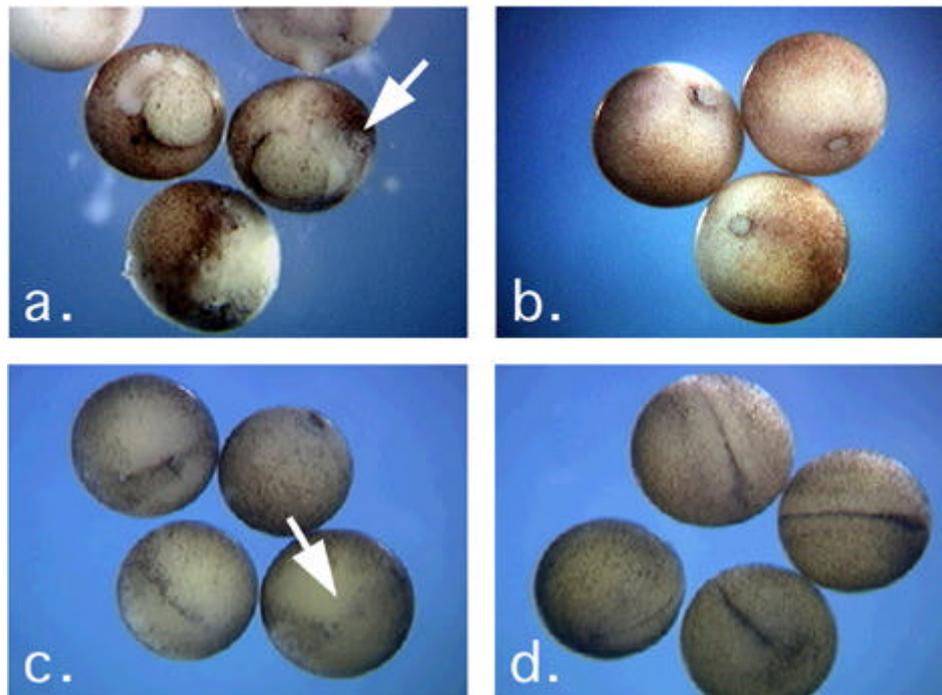


Abb. 3.4: Spezifische Effekte der Überexpression von XB/U e349 auf Gastrulation und Neuralisation. a) Gastrulationsverzögerung und gestörte Adhäsion (Pfeil) nach dorsal marginaler Überexpression von XB/U e349. c) Verminderte Ausbildung des von posterior nach anterior verlaufenden Pigmentstreifens verdeutlicht die gestörte Dorsalisierung nach Überexpression von XB/U e349. b und d) Normal verlaufende Gastrulation und Neuralisierung ohne Verlust an Zelladhäsion nach Überexpression von XB/U e349 c38 und in nichtinjizierten Kontrollembryonen.

fehlerhafte Ausbildung der dorsoventralen Körperachse infolge der XB/U e349-Expression ließ sich bereits zu Beginn des Neurulastadiums erkennen. Es kam zu keiner Elongation des Embryos. Der sich in dieser Phase entlang der dorsalen Mittellinie des Embryos mit fortschreitender Dorsalisierung von posterior nach anterior ausbildende Pigmentstreifen fand sich in einigen XB/U e349 überexprimierenden Embryonen in diffuser Ausprägung nur posterior (Abb. 3.4.c), während alle kontroll- und nichtinjizierten Embryonen eine normale Entwicklung entlang der dorsalen Mittellinie aufwiesen (Abb. 3.4.d). Dieser Entwicklungsunterschied ist dabei nicht auf eine zeitliche Verzögerung der Entwicklung zurückzuführen.

Mit Beginn des Schwanzknospenstadiums konnten in XB/U e349 injizierten Embryonen drei unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden: Neben normalen Embryonen konnten solche mit Spina bifida (Typ II) von posteriorisierten (Typ I) und achsendefizienten Embryonen (Typ III) unterschieden werden (Abb. 3.5). Zur statistischen Auswertung wurden nur solche Gelege verwendet, die weder bei nichtinjizierten, noch bei XB/U e349 c38 einen erhöhten Anteil an mißgebildeten Embryonen aufwiesen. Die ebenfalls in Kontrollgelegen erhaltenen

Zelladhäsionseffekte sind im beobachteten Rahmen als Injektionsartefakte zu betrachten. Sie wurden in ähnlicher Häufigkeit auch nach RNA-Überexpression von bovinem Preprolactin gefunden.

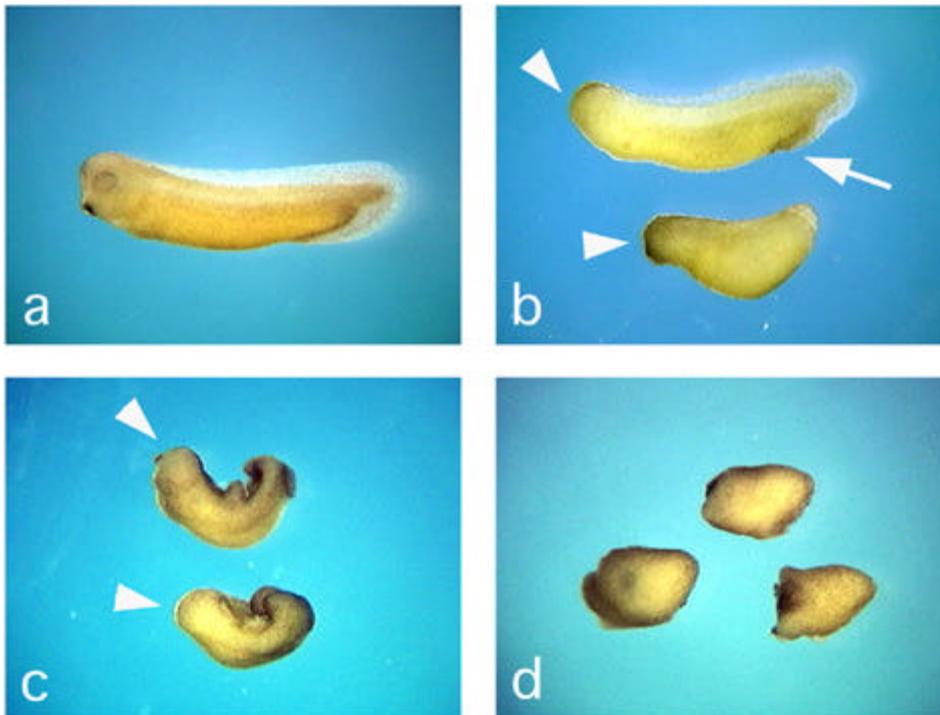


Abb. 3.5: Die Überexpression von XB/U e349 führt zu drei unterscheidbaren Phänotypen (b-d). a) Normaler Embryo nach Mikroinjektion der Kontrollmutante XB/U e349 c38. b) Posteriorisierter Phänotyp I. Auffällig sind stark verringerte anteriore Strukturen (Pfeilkopf) und ein vergrößertes Proctodeum (Pfeil). c) Spina bifida-ähnlicher Phänotyp II. Laterale Fehlwanderung des Mesoderms verhindert den Schluß des Blastoporus. Teilweise traten anteriore Defekte auf (Pfeilkopf). d) Achsendefizienter Phänotyp III. Alle Embryonen im Stadium 32.

Die Ausprägung der Phänotypen war dabei deutlich konzentrationsabhängig (Tab. 3.2). Mit Zunahme der RNA-Konzentration von 0,05 auf 0,2 ng pro Blastomere sank nicht nur die Überlebensrate von 98 auf 64 %, sondern auch der Anteil normaler (von 15 auf 2,5 %) und posteriorisierter Embryonen (von 70 auf 31 %). Demgegenüber stand ein Anstieg der Anteile an Spina bifida (von 11 auf 32 %) und vor allem an Achsendefizienz aufweisenden Embryonen (von 4 auf 36 %). Untersuchungen mit XB/U e349 RNA oberhalb 0,2 ng ließen aufgrund der erhöhten Toxizität der RNA keine vernünftige statistische Auswertung zu.

Typ I Embryonen entwickelten einen stark posteriorisierten Phänotyp. Kopfstrukturen, wie beispielsweise die Augenanlagen, waren reduziert oder fehlten ganz. Die im Vergleich zu Kontrollembryonen verkürzte und gedrungene Gestalt ging mit einer Betonung der

posteriorisierten Regionen einher. In vielen Fällen fiel dabei ein vergrößertes Proctodeum auf.

Typ II Embryonen zeigten Spina bifida. Bei diesem Phänotyp wanderte das Mesoderm der involutierenden Marginalzone während der Gastrulation nur unvollständig in das Keimesinnere ein. Stattdessen führte eine laterale Migration der Zellen um den Blastoporus zur Ausbildung zweier Bänder axialen Mesoderms. In späteren Stadien kam es infolgedessen nicht zum Schluß des Blastoporus. Die Embryonen nahmen eine V- oder schneckenförmige Gestalt an (Abb. 3.6). Teilweise traten gesplittete Schwänze auf. Dem überwiegenden Anteil dieser Embryonen fehlten zudem ausgeprägte Kopfstrukturen. Beide Phänotypen werden ebenfalls bei dominant negativer Überexpression der cytoplasmatischen Deletionsmutante XB/U c38 nach MBT unter Kontrolle des CMV-Promotors beobachtet (Kühl et al., 1996).

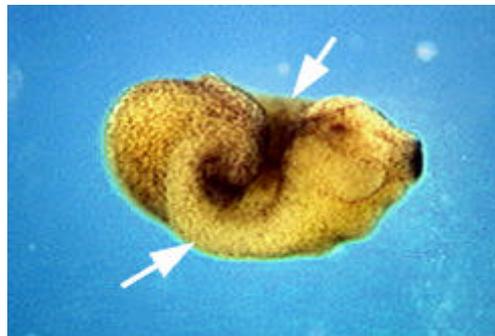


Abb. 3.6: Laterale Fehlwanderung der involutierenden Marginalzone infolge der XB/U e349-Überexpression führt zur Ausbildung zweier Bänder axialen Mesoderms (Pfeile). Der Blastoporus schließt sich nicht. Embryonen des Typs II nehmen eine V- oder schneckenförmige Gestalt an.

Mit zunehmender Konzentration an XB/U e349 RNA manifestierte sich zusätzlich zum Zelladhäsionseffekt der extrazellulären Deletionsmutante ein weiterer Phänotyp III (Tab. 3.2). Nach Injektion von 0,2 ng pro Blastomere waren mehr als 35 % der Embryonen bezüglich der Ausbildung dorsaler Achsenstrukturen stark defizient bis hin zum vollständigen Achsenverlust. Solche Embryonen waren um etwa 60 % gegenüber den Kontrollen verkleinert und ließen aufgrund ihrer im Extremfall nahezu kugeligen Gestalt keinerlei Orientierung erkennen (Abb. 3.5). Während in Transversalschnitten Kontrollembryonen im Stadium 26 eine klare Ausdifferenzierung der Keimblätter erkennen ließen, fehlte diese in Embryonen des Typs III. Typische axiale Strukturen wie Notochord, Spinalchord und Somiten oder eine korrekte Anordnung von Lateralplattenmesoderm konnten nicht identifiziert werden (Abb. 3.7).

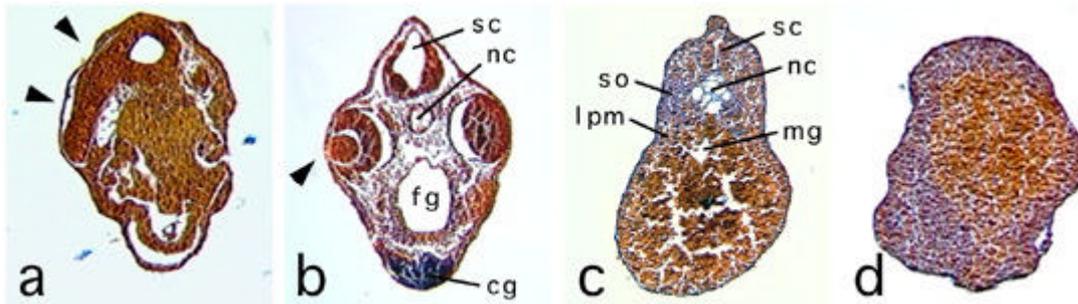


Abb.3.7.: Histologische Befunde in Stadium 30-Embryonen nach Mikroinjektion verschiedener Cadherinkonstrukte. Die Embryonen wurden in Paraffin eingebettet und geschnitten. a-c) Transversalschnitte a) Posteriorisierte Embryonen des Typs I zeigen nach Überexpression von XB/U e349 oder XB/U c38 anteriore Defekte. Hier Fusion von Auge und Hirn (Pfeilköpfe). b und c) Normaler Verlauf der anterioren und mesodermalen Entwicklung nach Überexpression der Kontrollmutante XB/U e349 c38. d) Nur die Injektion von XB/U e349 führt zu Embryonen ohne erkennbare anteroposteriore oder dorsoventrale Achsenbildung. Strukturen wie Notochord, Spinalchord oder Somiten fehlen. cg: Zementdrüse; fg: Vorderdarm; lpm: Lateralplattenmesoderm; mg: Mitteldarm; nc: Notochord; sc: Spinalchord; so: Somiten.

Kühl et al. (1996) konnten zeigen, daß den Fehlwanderungen des Mesoderms bei Typ I und II Embryonen eine Störung der konvergenten Extension durch Interferenz der Mutante mit dem endogenen, XB/U-Cadherin-vermittelten Zelladhäsionssystem zugrunde liegt. Zur Überprüfung, ob die Überexpression der Mutante XB/U c38 vor MBT in den gleichen Phänotypen resultiert, wie sie mit der extrazellulären Deletionsmutante erhalten wurden, wurde in pSP64T3 umklont und die mit CAP-Struktur versehenen Transkripte mikroinjiziert. Die Injektion von 0,2 ng XB/U c38 je Blastomere ergab nur Typ I und II, nicht jedoch Typ III Embryonen (Tab. 3.2). Im Gegensatz zur Überexpression der extrazellulären Deletionsmutante, wiesen hier allerdings rund 74 % aller Typ II Embryonen äußerlich intakte und vollständige Kopfstrukturen auf. Das Ergebnis nach Mikroinjektion von XB/U c38 kann als erster Hinweis darauf gedeutet werden, daß die nach Überexpression von XB/U e349 gefundenen Phänotypen des Typs III in erster Linie Zelladhäsions-unabhängig hervorgerufen wurden.

Um zu prüfen, ob die Entstehung der Phänotypen auf voneinander unabhängigen Effekten der Mutante auf das cadherinvermittelte Zelladhäsionssystem bzw. den cateninvermittelten Wnt-Signalweg beruht, sollte die Überexpression einer äquimolaren Menge des "full-length" Proteins XB/UWt zu einem erhöhten Anteil an achsendefizienten Embryonen führen ohne dabei die Zelladhäsion stärker zu beeinflussen. Die Mikroinjektion einer zu 0,1 ng XB/U e349 mindestens äquimolaren Menge von 0,2 ng XB/UWt RNA ergab nur Embryonen des Typs I und II. Ihr Anteil lag mit 2 und 13 % in dem für Injektionsartefakte erwarteten Bereich. Diese Größenordnung wurde auch nach Injektion der Kontrollmutante

XB/U e349 c38 gefunden und daher nicht als spezifischer Zelladhäsionseffekt interpretiert. Erst nach Verwendung höherer Konzentrationen wurden ebenfalls achsendefiziente Embryonen gefunden. Ihr Anteil fiel jedoch entgegen der Erwartung sehr viel niedriger aus als bei Überexpression der extrazellulären Deletionsmutante (Tab. 3.2). Dieses Ergebnis entspricht qualitativ den Verhältnissen, die nach Überexpression von N-Cadherin gefunden wurden (Heasman et al., 1994). Allerdings führte hier bereits eine vergleichsweise geringe Menge an RNA zu Typ III Embryonen.

nicht injizierte Kontrollembryonen						
ng/Blast.	inj.	% <sub>Ü-Rate</sub>	% normal	% Typ I	% Typ II	% Typ III
--	333	97,80	98,37	--	1,63	--

XB/U e349 c38						
ng/Blast.	inj.	% <sub>Ü-Rate</sub>	% normal	% Typ I	% Typ II	% Typ III
0,05	57	100	98,25	1,75	--	--
0,1	105	88,67	80,88	4,76	13,38	0,98

XB/Uc38						
ng/Blast.	inj.	% <sub>Ü-Rate</sub>	% normal	% Typ I	% Typ II	% Typ III
0,2	93	63,44	32,20	25,42	42,38	--

XB/U e349						
ng/Blast.	inj.	% <sub>Ü-Rate</sub>	% normal	% Typ I	% Typ II	% Typ III
0,05	54	98,15	15,09	69,81	11,32	3,78
0,1	177	88,26	13,58	49,63	26,71	10,08
0,2	298	64,01	2,57	30,71	31,56	35,16

XB/UWt						
ng/Blast.	inj.	% <sub>Ü-Rate</sub>	% normal	% Typ I	% Typ II	% Typ III
0,2	61	75,41	84,78	2,17	13,05	--
0,4	206	94,40	51,86	3,41	43,03	1,70

Tab. 3.2: Statistische Auswertung mikroinjizierter Embryonen. Stabilisierte in vitro Transkripte mit mCAP-Struktur der Cadherinkonstrukte wurden in den angegebenen Konzentrationen marginal in beide dorsalen Blastomeren von Vierzellstadien injiziert. Die Auswertung erfolgte im Schwanzknospenstadium 32. ng/Blast.: RNA-Konzentration pro Blastomere in ng; inj.: Gesamtzahl injizierter Embryonen; %<sub>Ü-Rate</sub>: prozentuale Überlebensrate; Typ I: posteriorisiert; Typ II Spina bifida; Typ III: achsendefizient.

### 3.3.2 "Rescue"-Experimente

Ein Charakteristikum für spezifische Effekte einer RNA-Spezies ist die Möglichkeit, diese durch Koinjektion mit geeigneten Konstrukten rückgängig zu machen ("rescue"). Entsprechend den beiden Bindungsfunktionen der Cadherine, homophile adhäsive Bindung zu Cadherinen in der extrazellulären Domäne und Cateninbindung der cytoplasmatischen Domäne, wurden zunächst zwei Ansätze für Rescue-Experimente verfolgt.

Eine Koinjektion der Mutante XB/U e349 mit  $\beta$ -Catenin RNA sollte nicht nur den cadheringekoppelten, sondern auch den für den korrekten Ablauf der Wnt-Signalkaskade erforderlichen cytoplasmatischen Cateninpool wieder auffüllen. Für  $\beta$ -Catenin-Koinjektionsexperimente wurde ein humanes  $\beta$ -Cateninkonstrukt verwendet, welches -freundlicherweise von Jürgen Behrens zur Verfügung gestellt - in den Vektor pSP64T3 umkloniert wurde. Das Konzentrationsverhältnis beider RNA-Spezies wurde dabei so gewählt, daß bei gegebener  $\beta$ -Catenin-Konzentration neben einem deutlich sichtbaren Effekt eine möglichst geringe Toxizität der Transkripte zu erwarten war. Um zu möglichst niedrigen effektiven Konzentrationswerten für  $\beta$ -Catenin zu gelangen, wurden diese zunächst ventral marginal in Vierzellstadien von *Xenopus* überexprimiert und die Achseninduktionskapazität dieser Konzentration bestimmt (Abb. 3.8). Parallel wurde eine

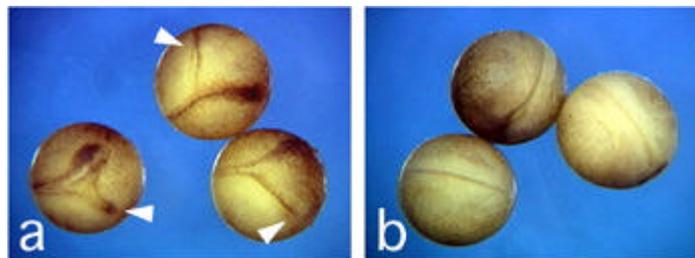


Abb. 3.8: Ausbildung sekundärer Körperachsen infolge der Überexpression von humanem  $\beta$ -Catenin. a) Je 0,2 ng  $\beta$ -Catenin RNA wurde marginal in beide ventralen Blastomeren von Vierzellstadien mikroinjiziert. Embryonen des Stadiums 14 zeigen die Anlage einer zweiten Körperachse (Pfeilköpfe). b) Mit bovinem Preprolactin kontrollinjizierte Embryonen weisen eine normale Entwicklung auf. Gleiche Experimente wurden für Plakoglobin durchgeführt.

ventral marginale Koinjektion mit 0,2 ng XB/U e349 durchgeführt. 0,2 ng  $\beta$ -Catenin RNA führten ventral zu einer Achseninduktionskapazität von 76 %. Dieser Effekt konnte ventral durch Koexpression der extrazellulären Deletionsmutante vollständig aufgehoben werden, so daß von einem funktionellen Überschuß der Mutante ausgegangen werden konnte. Für die Koinjektion von XB/U e349 auf der dorsalen Seite des Embryos konnten allerdings nur 0,1

ng  $\beta$ -Catenin RNA verwendet werden, da höhere Konzentrationen  $\beta$ -Catenin - vermutlich infolge erhöhter Toxizität - keinen Rescueeffekt insbesondere der Phänotypen I und II zeigten. Die Koinjektion von 0,2 ng XB/U e349 und 0,1 ng  $\beta$ -Catenin führte zu einer Reduktion der Achsendefizienz von 35 auf 8 %, jeweils zugunsten des Anteils von Typ I und II und phänotypisch unauffälliger Embryonen. Innerhalb der Phänotypen I und II gab es einen Shift zu dem weniger drastischen posteriorisierten Phänotyp. Insgesamt konnte somit ein deutlicher Rescueeffekt durch  $\beta$ -Catenin-Koinjektion festgestellt werden (Tab. 3.3).

Der im Vergleich zur dorsal marginalen Überexpression von XB/U e349 unerwartet niedrige Effekt von XB/Uwt auf die Ausbildung der Dorsoventralachse legte die Vermutung nahe, daß die beobachteten Achsendefizienzen nicht allein auf eine Depletion von  $\beta$ -Catenin aus der Wnt-Signalkaskade, sondern zusätzlich auf eine gestörte Zelladhäsion zurückzuführen sein könnte. Für die Koinjektion von XB/U e349 mit XB/Uwt wurde daher die Strategie verfolgt, mit einer möglichst niedrigen Menge an koinjizierter Wildtyp-RNA die Zelladhäsion wiederherzustellen, ohne dabei den Überschuß an cytoplasmatischen Bindungsstellen für endogenes  $\beta$ -Catenin zu stark zu erhöhen. Die Koinjektion von 50 pg Wildtyp-RNA mit der extrazellulären Deletionsmutante in die Marginalzone dorsaler Blastomeren von Vierzellstadien resultierte erwartungsgemäß in einem Rückgang des Anteils an Spina bifida zugunsten posteriorisierter und normaler Embryonen. Dieser Effekt fiel insgesamt im Vergleich zur Koinjektion mit  $\beta$ -Catenin RNA etwas deutlicher aus. Trotz im Embryo mit XB/Uwt zusätzlich überexprimierter  $\beta$ -Catenin-Bindungsstellen konnte in diesem Experiment ebenfalls eine deutliche Abnahme an Achsendefizienz um 50 % festgestellt werden (Tab.3.3).

Dem cytoplasmatisch an Cadherine anstelle von  $\beta$ -Catenin ebenfalls direkt bindenden Catenin Plakoglobin (oder  $\gamma$ -Catenin) kommt eine besondere Bedeutung zu, da es anders als  $\beta$ -Catenin zusätzlich an desmosomale Cadherine bindet. Sind beide Catenine in den Wnt-Signalweg involviert, so scheint Plakoglobin seine Wirkung diesbezüglich auch in cytoplasmatisch verankerter Form ohne Translokation in den Zellkern ausüben zu können (Karnovsky und Klymkowsky, 1995; Merriam et al., 1997). Desweiteren wird für E-Cadherin gebundenes Plakoglobin eine Signalfunktion bei der Regulation der Kommunikation zwischen "adherens junctions" und Desmosomen angenommen (Lewis et al., 1997). Um die Kompetenz von  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin im Rescueansatz zu vergleichen, wurden Einzel- und Koinjektionen wie für  $\beta$ -Catenin beschrieben durchgeführt. Mit einem Anteil von 82 % Doppelachsen aufweisender Embryonen ergab sich nach ventral marginaler Überexpression von 0,2 ng Plakoglobin RNA ein ähnliches Bild wie nach  $\beta$ -Catenin Überexpression. Der ventrale Rescue von Plakoglobin mit der extrazellulären Deletionsmutante XB/U e349 wies

hier auf einen verwendeten funktionellen Überschuß des Cadherinkonstruktes hin. Es wurde keine Achseninduktionskapazität gefunden. Abweichend von den Ergebnissen mit  $\beta$ -Catenin zeigte jedoch die Koinjektion von 0,2 ng Plakoglobin und 0,1 ng XB/U e349 dorsal marginal einen mit 17 % um den Faktor zwei geringeren Rescue achsendefizienter Embryonen, im wesentlichen zugunsten von Typ I- und normalen Embryonen (Tab. 3.3).

ng/Blast.	inj.	% <sub>U-Rate</sub>	% normal	% Typ I	% Typ II	% Typ III	% sec.ax.
<b>XB/U <math>\Delta</math>e349:</b>							
0,05	54	98,15	15,09	69,81	11,32	3,78	--
0,1	177	88,26	13,58	49,63	26,71	10,08	--
0,2	298	64,01	2,57	30,71	31,56	35,16	--
<b>XB/U <math>\Delta</math>e349 + XB/UWt:</b>							
0,1+0,05	54	88,89	31,25	50	14,58	4,17	--
0,2+0,05	54	75,93	4,88	51,22	24,39	19,51	--
<b>XB/U <math>\Delta</math>e349 + <math>\beta</math>catWt, dorsal:</b>							
0,1+0,05	61	96,72	27,12	15,25	55,93	1,7	--
0,2+0,1	54	46,3	8	52	32	8	--
0,2+0,2	140	65,27	--	19,23	76,02	9,51	--
<b>XB/U <math>\Delta</math>e349 + PKGWt, dorsal:</b>							
0,2 + 0,1	194	64,82	12,83	43,44	26,86	16,87	--
<b><math>\beta</math>catWt, ventral:</b>							
0,2	106	79,25	19,51	--	4,9	--	75,59
<b>PKGWt, ventral:</b>							
0,2	66	50	12,12	--	6,06	--	81,82
<b>XB/U <math>\Delta</math>e349 + <math>\beta</math>catWt, ventral:</b>							
0,2+0,2	70	95,71	83,58	--	16,42	--	--
<b>XB/U <math>\Delta</math>e349 + PKGWt, ventral:</b>							
0,2+0,2	53	65,6	83,33	3,33	13,34	--	--

Tab. 3.3: Statistische Auswertung der Koinjektionen von XB/U e349 mit XB/UWt oder Cateninen. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Injektion in den angegebenen Konzentrationen marginal in beide dorsalen Blastomeren von Xenopus-Vierzellstadien. Die Auswertung erfolgte im Schwanzknospenstadium 32. ng/Blast.: RNA-Konzentration(en) pro Blastomere in ng; inj.: Gesamtzahl injizierter Embryonen; %<sub>U-Rate</sub>: prozentuale Überlebensrate; Typ I: posteriorisiert; Typ II Spina bifida; Typ III: achsendefizient; % sec.ax.: prozentualer Anteil an Embryonen mit sekundärer Körperachse.

### 3.4 Immunhistologische Befunde

Um zu untersuchen, wie sich oben beschriebene Befunde im gastrulierenden Embryo manifestieren, wurden Embryonen im Vierzellstadium in die marginale Zone beider dorsaler Blastomeren mikroinjiziert. Neben der Überexpression einzelner Konstrukte von XB/U-Cadherin wurden insbesondere auch die Koinjektionen der Mutante XB/U e349 mit XB/UWt oder -Catenin RNA durchgeführt. Die Embryonen wurden im Stadium 10,5 fixiert, präpariert und zu Schichtdicken von 50 µm sagittal geschnitten (Abb.3.9.c). Die Detektion der XB/U-Cadherin Konstrukte erfolgte primär mit dem monoklonalen Antikörper 6D5 und sekundär mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper GAM-CY3. Bei der späteren Auswertung mittels konfokalem Laser-Scanning Mikroskop sollte neben dem exogenen auch das endogene Cadherinsignal detektierbar sein, da der monoklonale Antikörper 6D5 die extrazellulären Anteile beider XB/U-Cadherin-Spezies erkennen sollte.

Die Wahl der dorsal marginalen Injektionsstelle beschränkte die Überexpression der Konstrukte in Stadium 10,5-Embryonen strikt auf die dorsale Seite oberhalb des Blastoporus. Zellen dieses Areals zeigten gegenüber anderen Regionen eine erhöhte Cadherinexpression in den Zellmembranen. Vereinzelt cytoplasmatisch auftretende Signale sind möglicherweise auf vesikulär lokalisierte XB/U-Konstrukte zurückzuführen. Infolge der Überexpression des XB/U-Cadherins bzw. der jeweiligen Mutante scheint deren Targeting zur Zellmembran limitiert zu sein. Diese Signale belegen die korrekte Expression der exogenen Cadherintranskripte. Die Ergebnisse der einzelnen Injektionen sind in den Abbildungen 3.9 und 3.10 gegenübergestellt. Die Expression der Doppelmutante XB/U e349 c38 zeigte auf die Integrität des Zellverbandes erwartungsgemäß keinen Einfluß. Sämtliche Zellen bildeten als Bestandteil des intakten Gewebes enge Zell-Zellgrenzen aus (Abb. 3.9.a). Auch die Überexpression des "full-length"-Konstruktes von XB/U-Cadherin führte im Bereich der dorsalen Marginalzone und des involutierten dorsalen Mesoderms zu keiner gestörten Zell-Zelladhäsion (Abb. 3.9.b) Im Gegensatz dazu führte die Überexpression der Mutante XB/U e349 zu einer starken Störung der Zelladhäsion. Die an einigen Embryonen bereits äußerlich beobachteten epithelialen Läsionen durch partielles Ablösen einzelner dorsaler Zellen wurde durch diesen Befund bestätigt. Insbesondere Zellen der subepithelialen Schicht und der internen Involutionszone verloren den Kontakt zum umgebenden kompakten Zellverband und lagen als Einzelzellen oder in lockerem Verband mit Nachbarzellen vor. Infolgedessen nahmen die meisten dieser Zellen eine eher abgerundete Form an (Abb. 3.10.a). Die ventrale Seite desselben Embryos zeigte dagegen den intakten Zellverband bei ausschließlicher Expression des endogenen XB/U-Cadherins (Abb. 3.9.d). Interessant gestaltete sich auch das Bild nach Überexpression der cytoplasmatischen Deletionsmutante XB/U c38. Durch Beeinflussung der Zelladhäsion für die Entstehung der

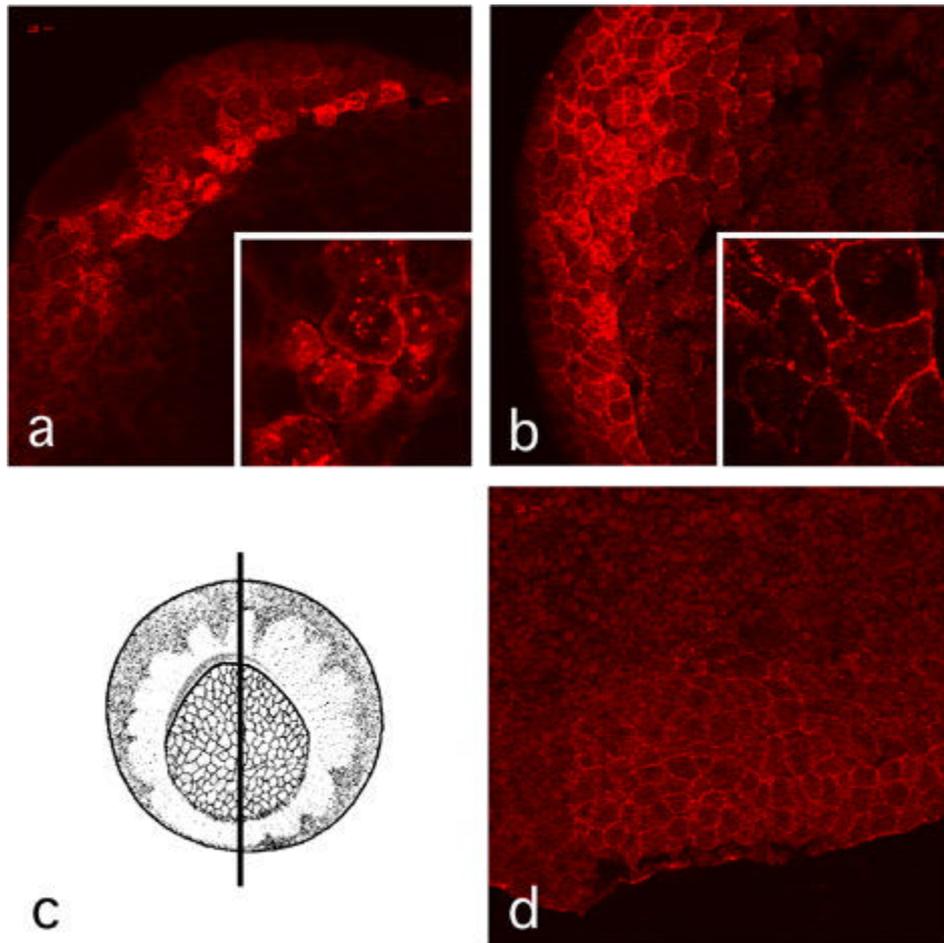


Abb. 3.9: Immunhistologische Befunde nach Überexpression der Cadherinkonstrukte. Die Injektion der RNA erfolgte marginal in die Blastomeren von Vierzellstadien. Die Embryonen wurden im Stadium 10,5 präpariert und sagittal zu einer Schichtdicke von 50  $\mu\text{m}$  geschnitten (d). Die Detektion des XB/U-Cadherinsignals erfolgte durch den Primärantikörper mAb6D5 und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper GAM-CY3 mittels konfokalem Laser-Scanning Mikroskop. a und b) Weder die Überexpression der Kontrollmutante XB/U e349 c38 noch des Wiltypkonstruktes XB/UWt führte im Bereich der dorsalen Marginalzone und des involutierenden Mesoderms zu einer Störung der Zelladhäsion. Jeweils dorsale Ansicht. d) Die dorsale Injektion von XB/U e349 führte nicht zur ventralen Expression der Mutante. Hier konnte lediglich das endogene Cadherinsignal und ein intakter Zellverband festgestellt werden. Ventrale Ansicht. RNA-Menge je Blastomere: XB/U e349 c38 0,1 ng; XB/U e349 und XB/UWt 0,2 ng.

beiden Phänotypen I und II verantwortlich, deutete die Immunhistologie auf keine augenfällige starke Störung der Gewebsintegrität hin (Abb. 3.10.b). Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß diese Mutante spezifisch die XB/U-Cadherin vermittelte Zelladhäsion beeinflusst. Für die hier beobachtete Adhäsivität der Zellen könnte demnach die Aktivität des während dieses Stadiums neben XB/U-Cadherin hauptsächlich vorhandenen maternalen EP/C-Cadherins verantwortlich sein. Im dominant negativen Ansatz mit einer extrazellulären Deletionsmutante von XB/U-Cadherin wird aber dieses Cadherin mitbeeinflusst.

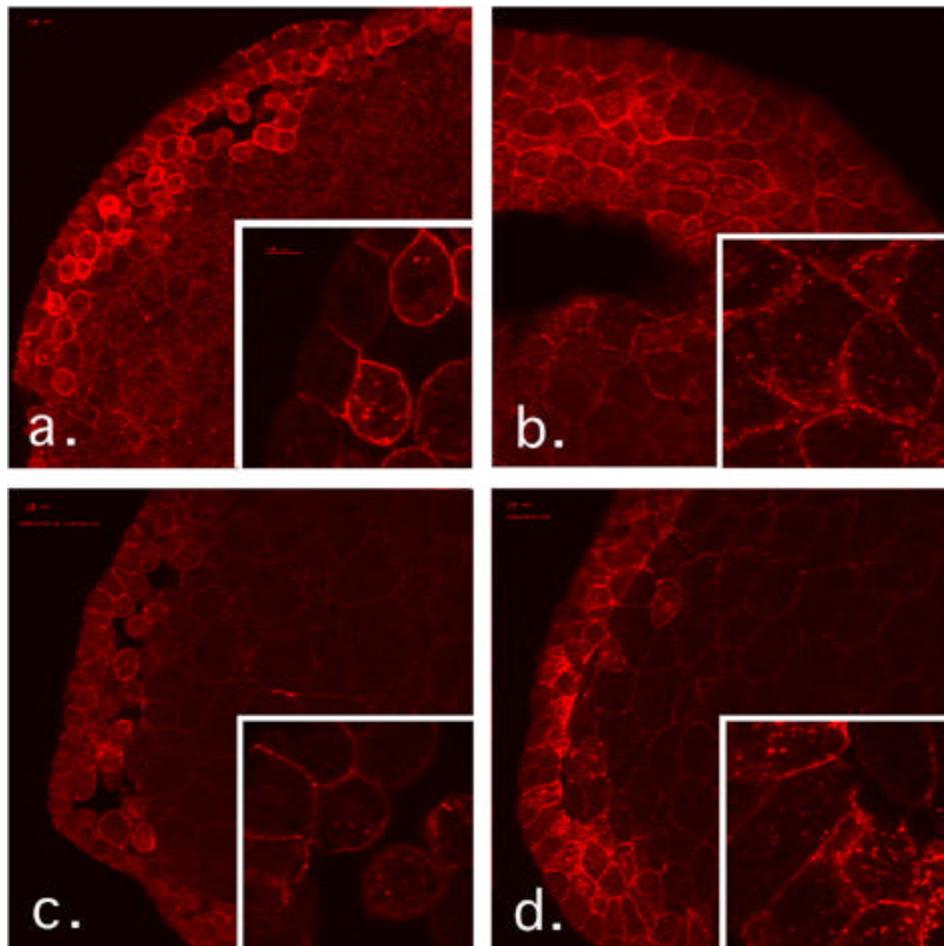


Abb. 3.10: Immunhistologische Befunde nach Überexpression von Cadherinmutanten und Rescue der Zelladhäsion. a) Signifikante Störung der Zelladhäsion XB/U e349 überexprimierender Zellen insbesondere der subepithelialen Schicht (Pfeil) und der internen Involutionszone (Pfeilkopf). b) Die Überexpression der cytoplasmatisch deletierten Mutante XB/U c38 bewirkt keine augenfällige Schwächung des Zellverbandes. c) Nur unvollständige Wiederherstellung des Gewebeverbandes nach Koinjektion von XB/U e349 und  $\beta$ -Catenin. d) Dagegen vollständige Wiederherstellung der Adhäsion nach Koinjektion von XB/U e349 und XB/UWt. a bis d) Dorsale Ansicht. RNA-Menge je Blastomere: XB/U e349 und XB/U c38 0,2 ng;  $\beta$ -Catenin 0,1 ng; XB/UWt 0,05 ng.

Die Koinjektion der extrazellulären Deletionsmutante mit humanem  $\beta$ -Catenin erbrachte keine vollständige Wiederherstellung der Zelladhäsion in der Immunhistologie, wenngleich die relative Anzahl vollständig aus dem Verband gelöster Einzelzellen im Vergleich zur Überexpression der Deletionsmutante allein deutlich erniedrigt war (Abb. 3.10.c).

Eine vollständige Wiederherstellung der Adhäsivität ergab jedoch die Koexpression der Mutante mit dem Wildtyp-Cadherin. Alle eine Überexpression zeigende Zellen waren im kompakten Zellverband mit distinkten Zellgrenzen angeordnet (Abb. 3.10.d). Die unterschiedlichen Rescueeffekte in der Immunhistologie bestätigte dabei die qualitativen Unterschiede beider Ansätze für den Rescue der Zelladhäsionsphänotypen I und II.

### 3.5 Whole Mount in situ Hybridisierung

Um die Auswirkung der Überexpression der Cadherin-Konstrukte auf die mesodermale Differenzierung der Embryonen zu untersuchen, wurden in situ Hybridisierungen ganzer Embryonen mit räumlich und zeitlich unterschiedlich exprimierten mesodermalen und neuralen Markergenen durchgeführt. Die verwendeten Markerkonstrukte wurden mit einer geeigneten DNA-abhängigen RNA-Polymerase in antisense-Orientierung transkribiert und dabei mittels digoxigeningekoppeltem UTP markiert. Die so als Sonden erhaltenen in vitro Transkripte wurden nach der Reaktion von nicht eingebauten Ribonukleotiden mittels Gelfiltration über eine Sephadex G-50 Matrix gereinigt. Die Mikroinjektion der Embryonen erfolgte bezüglich Konzentration und Lokalisation der Cadherin-Konstrukte wie in den vorherigen Versuchen beschrieben. Die Embryonen wurden im geeigneten Entwicklungsstadium fixiert und dem Hybridisierungsprotokoll mit den erstellten RNA-Sonden unterworfen. Da die Expression früher Markergene aufgrund der in den betrachteten Stadien fehlenden phänotypischen Ausprägung keine Aussagen hinsichtlich der Korrelation mit einem bestimmten Phänotyp zuließ, konnten hier nur statistische Aussagen hinsichtlich der Expression gemacht werden. Hierzu wurden mindestens fünfzig manipulierte oder Kontrollembryonen in die in situ Hybridisierung eingesetzt. Zur Auswertung wurden nur intakte Embryonen oder solche, die trotz Schädigung durch den experimentellen Prozeß eine klare Aussage zuließen, herangezogen. Die statistische Aussage beschränkt sich dabei nur auf das Vorhandensein einer Färbung, nicht aber auf deren Intensität. Spätere Stadien konnten dagegen nach Phänotypen getrennt auf die Markergenexpression untersucht werden.

#### 3.5.1 Auswirkungen auf die Expression früher Markergene

Die Genexpression des DNA bindenden Proteins der T-Box Familie Brachyury (Xbra) findet sich in der frühen Gastrula in der gesamten Marginalzone (Abb. 3.11.a). Später findet sich dieser panmesodermale Marker in Notochord und ventrolateralem Mesoderm (Smith et al., 1991). Die Überexpression der Kontrollmutante XB/U e349 c38 hatte auf die Expression keinen Einfluß. Wie bei nichtinjizierten Embryonen wurde in allen Fällen ein starkes Signal für Xbra in Stadium 10 bis 10,5 gefunden (Abb. 3.11.b). Hingegen zeigten 35 % der Embryonen nach Überexpression der extrazellulären Deletonsmutante XB/U e349 keinerlei Färbung, während die restlichen Embryonen eine deutlich schwächere Färbung aufwiesen (Abb. 3.11.c und d). In einem Folgeexperiment wurde die Farbreaktion verlängert. Es fand sich zwar in allen XB/U e349 überexprimierenden Embryonen das Xbra-Signal, allerdings gegenüber den anderen Cadherinkonstrukten deutlich abgeschwächt und in einem weniger distinkt abgegrenzten Expressionsareal. Auffällig war hier insbesondere der Bereich putativ

erhöhter Überexpression der Cadherinkonstrukte innerhalb der dorsalen Marginalzone des Embryos (vergleiche Abb. 3.9 und 3.10). Zeichnet sich der Beginn der Involution oberhalb der Urmundlippe in allen anderen Ansätzen als eng umgrenztes Areal ohne Xbra-Färbung ab, so zeigen XB/U e349 überexprimierende Embryonen desselben Stadiums hier über einen weiteren Bereich keinerlei Färbung (Abb. 3.11.g und h). Sowohl die Überexpression der cytoplasmatischen Deletionsmutante XB/U c38 als auch des Wildtyp-Cadherins XB/UWt hatte in der Hybridisierung keinen Einfluß auf das Vorhandensein des Signals (Abb. 3.11.e und f). Es kann also für die Überexpression der extrazellulären Cadherinmutante wenn nicht von einem vollständigen Verlust, so doch zumindest von einer verringerten Expression mit verändertem räumlichen Expressionsprofil von Xbra gesprochen werden.

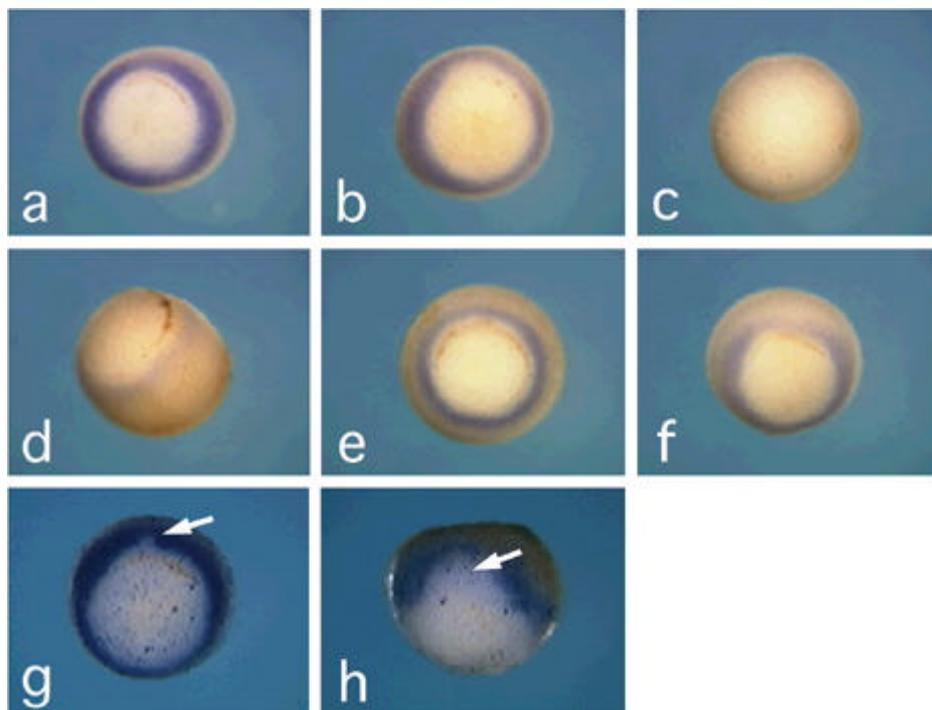


Abb. 3.11: Whole Mount in situ Hybridisierung von Embryonen nach Cadherinüberexpression im Stadium 10 bis 10,5 für den panmesodermalen Marker Xbra. a) Nicht injizierte Kontrolle. Xbra wird ringförmig in der gesamten Marginalzone exprimiert. b) Die Kontrollmutante XB/U e349 c38 hatte auf die Expression keinen Einfluß. c) 35 % der XB/U e349 überexprimierenden Embryonen wies kein Xbra-Signal auf; der Rest zeigte eine deutlich verminderte Expression (d). XB/U c38 und XB/UWt hatten keinen Einfluß (e, f). In einem zweiten Experiment wurde die Farbreaktion verlängert. Das in XB/U e349 c38-Kontrollen (g) mit Beginn der Involution oberhalb des Urmundes eng umgrenzte Areal ohne Xbra-Signal fand sich im Bereich putativer XB/U e349-Überexpression (h) deutlich erweitert (Pfeile).

Das Gen für das Homeoboxprotein Goosecoid (Xgsc) wird ab MBT exprimiert und findet sich im frühen bis mittleren Gastrulastadium im Spemann Organisator entlang des dorsalen

Urmundes (Abb. 3.12.a). Später findet es sich in der Region der Prechordalplatte und im Kopfmesoderm (Blumberg et al., 1991). Weder die Überexpression der Kontroll- noch der cytoplasmatischen Deletionsmutante zeigten im Stadium 10 bis 10,5 gegenüber den nichtinjizierten Kontrollen eine Abweichung (Abb. 3.12.b und e). Dagegen stieg der Anteil der Embryonen ohne Xgsc-Signal nach Überexpression von XB/U e349 auf 60 % und von XB/UWt auf etwa 8 % an (Abb.3.12.c und f).

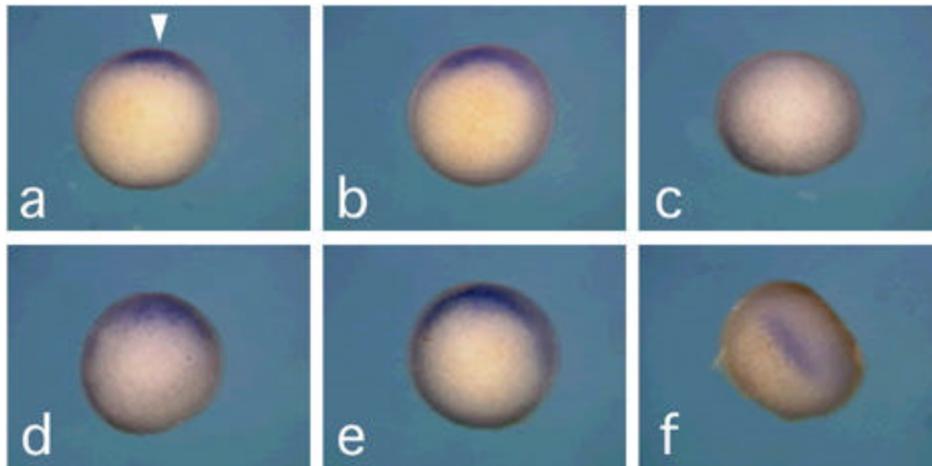


Abb. 3.12: Whole Mount in situ Hybridisierung von Embryonen nach Cadherinüberexpression im Stadium 10 bis 10,5 für den dorsalen Marker Xgsc. a) Nicht injiziert. Expression von Xgsc im Spemann Organisator oberhalb des Urmundes. b) XB/U e349 c38. Kein Einfluß. c und d) 60 % der XB/U e349 überexprimierender Embryonen ohne Signal; der Rest zeigte verminderte Xgsc-Expression. XB/U c38 und XB/UWt hatten keinen Einfluß (e, f).

Ein ähnliches Bild zeigte die Untersuchung des Gens der Fork-Head Familie DNA bindender Proteine XFD-1. Aktiviert mit MBT zeigt sich die Expression dorsal als schmaler Streifen in der Region der Blastoporuslippe (Abb.3.13.a). In der fortschreitenden Gastrula und der Neurula wird XFD-1 im sich bildenden Notochord und der neuralen Bodenplatte gefunden (Knöchel et al., 1992). Während die Kontrollmutante und das Wildtyp-Konstrukt im Stadium 10,5 mit 5 bzw. 2 % fehlender Färbung nur einen geringen Effekt zeigten, resultierte die Überexpression der extrazellulären Cadherinmutante in einem 70 %igen Verlust des XFD-1 Signals. Die Überexpression von XB/U c38 hatte in diesem Ansatz keinen Einfluß (Abb. 3.13.b-e).

Transkripte des mesodermalen Markers Twist (Xtwi) erscheinen erstmals während der frühen Gastrula. Innerhalb des Mesoderms wird er nur im Notochord und in der Lateralplatte gefunden (Abb. 3.14.a), nicht aber im Myotom. Xtwi zeigt ein zu muskelspezifischen Markergenen komplementäres Expressionsmuster (Hopwood et al., 1989). Auch bei der Untersuchung dieses Markers wurde nach Überexpression der Cadherinkonstrukte nur im

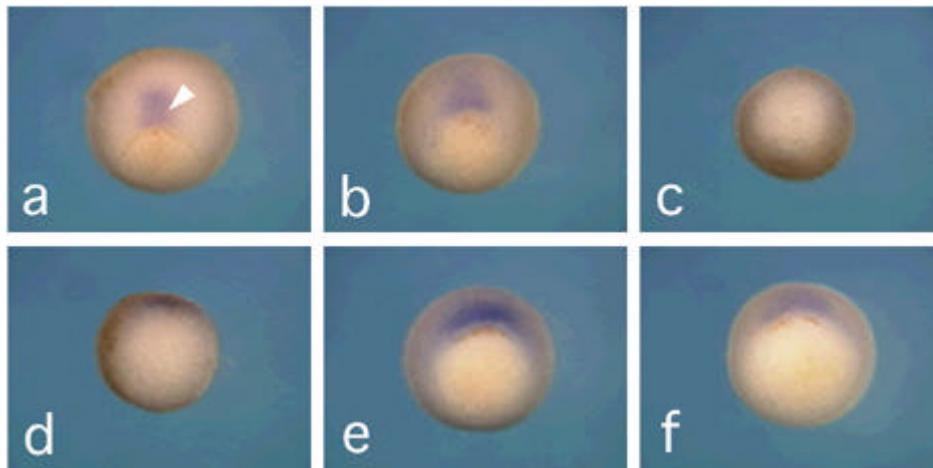


Abb. 3.13: Whole Mount in situ Hybridisierung von Embryonen nach Cadherinüberexpression im Stadium 10,5 für den dorsalen Marker XFD-1. Lediglich die Injektion von XB/U e349 führte zu einem Verlust des Signals bei 70 % der untersuchten Embryonen. a) Nicht injiziert. Expression von XFD-1 als schmaler Streifen entlang des Urmundes. b) XB/U e349 c38. c/d) XB/U e349 mit/ohne Expression von XFD-1. e) XB/U c38. f) XB/UWt.

Fall der extrazellulären Deletionsmutante XB/U e349 eine starke Reduktion der Xtwi-Expression gefunden. Die Wildtyp überexprimierenden Embryonen zeigten dabei ein allerdings nur schwaches Twist-Signal (Abb. 3.14.b-e).

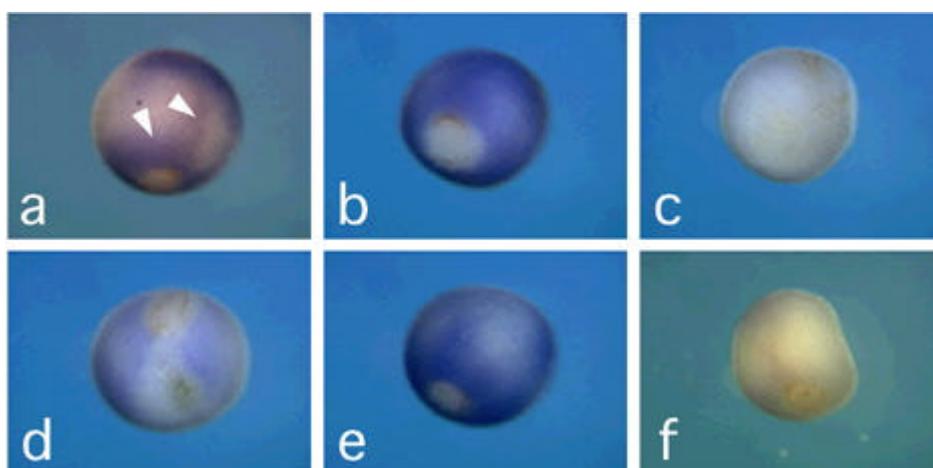


Abb. 3.14: Whole Mount in situ Hybridisierung von Embryonen nach Cadherinüberexpression im Stadium 11,5-12 für den dorsalen Marker Xtwi. Eine starke Reduktion des Signals wurde nur in XB/U 349 überexprimierenden Embryonen gefunden. a) Xtwi-Expression in nichtinjizierten Kontrollembryonen in Notochord und Lateralplattenmesoderm. b) XB/U e349 c38. c/d) XB/U e349 mit/ohne Expression von Xtwi. e) XB/U c38. f) XB/UWt.

Neben den oben beschriebenen dorsalen mesodermalen Markergenen wurde mit dem Homeoboxgen Xvent-1 ein ventraler mesodermaler Marker ausgewählt. Entsprechend seiner

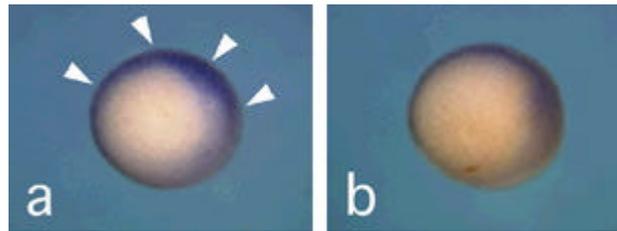


Abb. 3.15: Whole Mount in situ Hybridisierung von Embryonen im Stadium 10 für den ventralen Marker Xvent-1. Die Expression als ventrolateraler Bogen innerhalb der Marginalzone wurde durch Cadherinüberexpression nicht beeinflusst. a) Nicht injizierter Kontrollembryo. b) XB/U e349.

Rolle in der Festlegung des ventralen mesodermalen Schicksals findet sich die Expression in der frühen Gastrula in der Marginalzone als ventraler und ventrolateraler Bogen (Abb. 3.15; Gawandtko et al., 1995).

Der Anteil an Embryonen ohne Xvent-1 Signal lag für die Kontrollmutante in dem Bereich, der auch für nichtinjizierte Kontrollen gefunden wurde. Eine Abweichung hinsichtlich der Intensität oder des Expressionsprofils des Xvent-1-Signals war für die Cadherinmutanten und -wildtyp überexprimierenden Embryonen hingegen nicht augenfällig. Eine Zusammenfassung der ermittelten statistischen Werte gibt Tabelle 3.4.

Cadherin-Konstrukt	% Xbra (-)	% Xgsc (-)	% XFD-1 (-)	% Xtwi (-)
nicht injizierte Kontrolle	0 (n=30)	0 (n=21)	0 (n=50)	4 (n=26)
XB/U e349 c38 0,1 ng/Blast.	0 (n=15)	0 (n=14)	4,76 (n=22)	0 (n=10)
XB/U e349 0,2 ng/Blast.	35,29 (n=46)	60,00 (n=48)	69,23 (n=44)	72,73 (n=19)
XB/U c38 0,2 ng/Blast.	0 (n=52)	0 (n=54)	0 (n=56)	0 (n=31)
XB/UWt 0,2 ng/Blast.	0 (n=53)	8,33 (n=52)	2,38 (n=43)	4,35 (n=48)

Tab. 3.4: Statistische Auswertung der Whole Mount in situ Hybridisierung für frühe mesodermale Marker. Angegeben sind die Prozentanteile von Embryonen ohne Expressionssignal an der Gesamtzahl n der untersuchten Embryonen nach Cadherinüberexpression.

### 3.5.2 Auswirkungen auf die Expression später Markergene

Im Unterschied zur Untersuchung früher Markergene ist aufgrund der phänotypischen Ausprägung der manipulierten Embryonen in späteren Stadien eine direkte Unterscheidung der Phänotypen I, II und III hinsichtlich der Expression später Markergene möglich. Entsprechend wurden die injizierten Embryonen im Schwanzknospenstadium fixiert und die erhaltenen Phänotypen in die Whole Mount in situ Hybridisierung eingesetzt. Die verwendeten RNA-Konzentrationen entsprachen denen vorangegangener Experimente.

Der paraxiale dorsale Marker MyoD wird von Muskelvorläuferzellen in den Somiten während des Schwanzknospenstadiums exprimiert. Die Expression beschränkt sich dabei auf die Skelettmuskulatur und fehlt in der Herzanlage (Hopwood et al., 1989). Nach Überexpression von XB/U e349 zeigten sämtliche Typ III-Embryonen keinerlei MyoD-Färbung. Auch die Zelladhäsionsphänotypen I und II zeigten entweder einen Verlust oder eine starke Reduktion der MyoD-Expression gegenüber den Kontrollinjektionen (Abb. 3.16.a-b).

Die gleichen Verhältnisse waren für den herzspezifischen Marker Cardiac Troponin anzutreffen. Beschränkt auf das Myokard findet sich die Expression von Stadium 28 an im Embryo (Drysdale et al., 1995). Auch hier wurde bei XB/U e349-injizierten Embryonen neben einem vollständigen Verlust bei Typ III-Embryonen eine Reduktion oder ein gänzlich Fehlen des Expressionssignals für Typ I und II-Embryonen gefunden (Abb. 3.16.c-d).

Embryonen, die entweder Achsenreduktion oder infolge von Wanderungsdefekten des Mesoderms anteriore Defekte aufwiesen, waren erwartungsgemäß ebenfalls bezüglich des neuralen Markers Engrailed defizient, dessen Expression normalerweise die Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn kennzeichnet (Hemmati-Brivanlou et al., 1991; Abb. 3.16.e-f).

Um die Ausbildung auch des ventralen Mesoderms injizierter Embryonen in späteren Stadien zu untersuchen, wurden Schwanzknospenstadien (Stadium ca. 32) nach Mikroinjektion auf die Expression von *Xenopus* T1Globin in der in situ Hybridisierung überprüft. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung ist die Expression dieses ventralen Markergens streng auf die bilateral symmetrisch entlang der anteroposterioren Achse angeordneten Blutinseln beschränkt. Posterior fusioniert, zeigt das Signal anterior eine Bifurkation (Widmer et al., 1981, Abb. 3.17.a). Die Injektion der Kontrollmutante hatte erwartungsgemäß keinen Einfluß. Die nach Überexpression der cytoplasmatischen Deletionsmutante XB/U c38 neben normalen Embryonen erhaltenen Phänotypen I und II ließen alle eine deutliche Globinexpression erkennen (Abb. 3.17.c-e). Ein ähnliches Bild ergab die Injektion des Wildtypkonstruktes. Selbst bei Embryonen, die Wanderungsdefekte aufwiesen, konnte das Globinsignal identifiziert werden (Abb. 3.17.f-h). Auch eine Verdoppelung der injizierten RNA-Menge auf 0,4 ng XB/UWt pro Blastomere führte nicht zu einem Verlust des Signals. Unabhängig von den erhaltenen Phänotypen resultierte die Injektion von XB/U e349

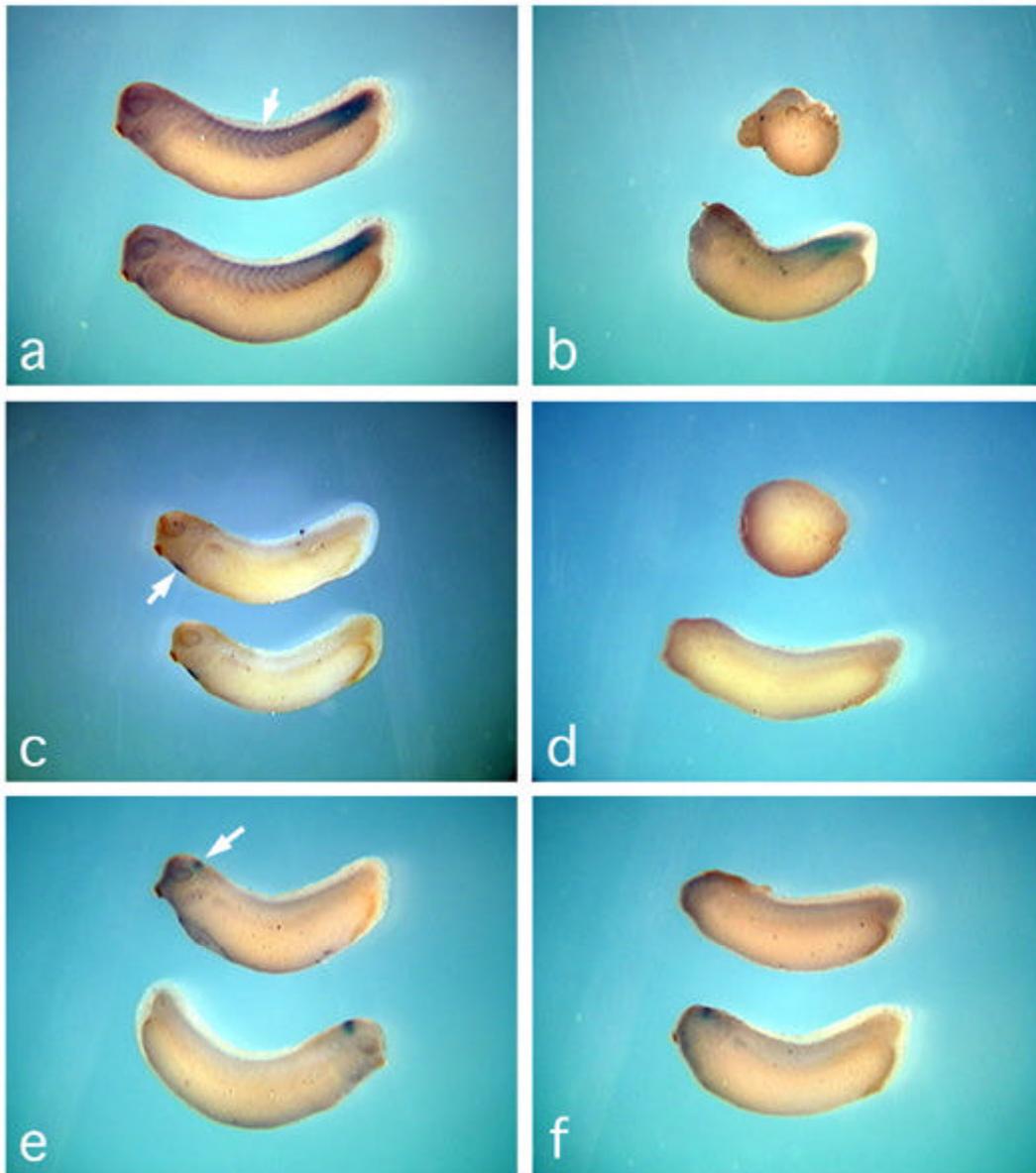


Abb. 3.16: Whole Mount in situ Hybridisierung von Embryonen im Schwanzknospenstadium für späte dorsale mesodermale Markergene nach XB/U e349-Überexpression. Die Expression später dorsaler Markergene fehlt in Typ III-Embryonen und fehlt (oder ist zumindest stark reduziert) in den Zelladhäsionsphänotypen (hier Typ I gezeigt). a, c, e) Oben nicht injiziert, unten XB/U e349 c38. Der Pfeil weist auf das normale Expressionsprofil hin. b, d) Oben Typ III, unten Typ I. f) Typ I. a, b) MyoD. c, d) Cardiac Troponin. e, f) Engrailed.

hingegen bei 57 % aller Embryonen zu einem vollständigen Verlust des Signals; die übrigen Embryonen zeigten im überwiegenden Fall nur eine schwache Färbung (Abb. 3.17.i-k, 3.18.a-b).

Zur näheren Untersuchung dieses unerwarteten Befundes wurden Koinjektionen der extrazellulären Deletionsmutante zusammen mit Transkripten von BMP-4, einem ventralisierenden Morphogen der TGF -Familie, durchgeführt und die Embryonen erneut auf

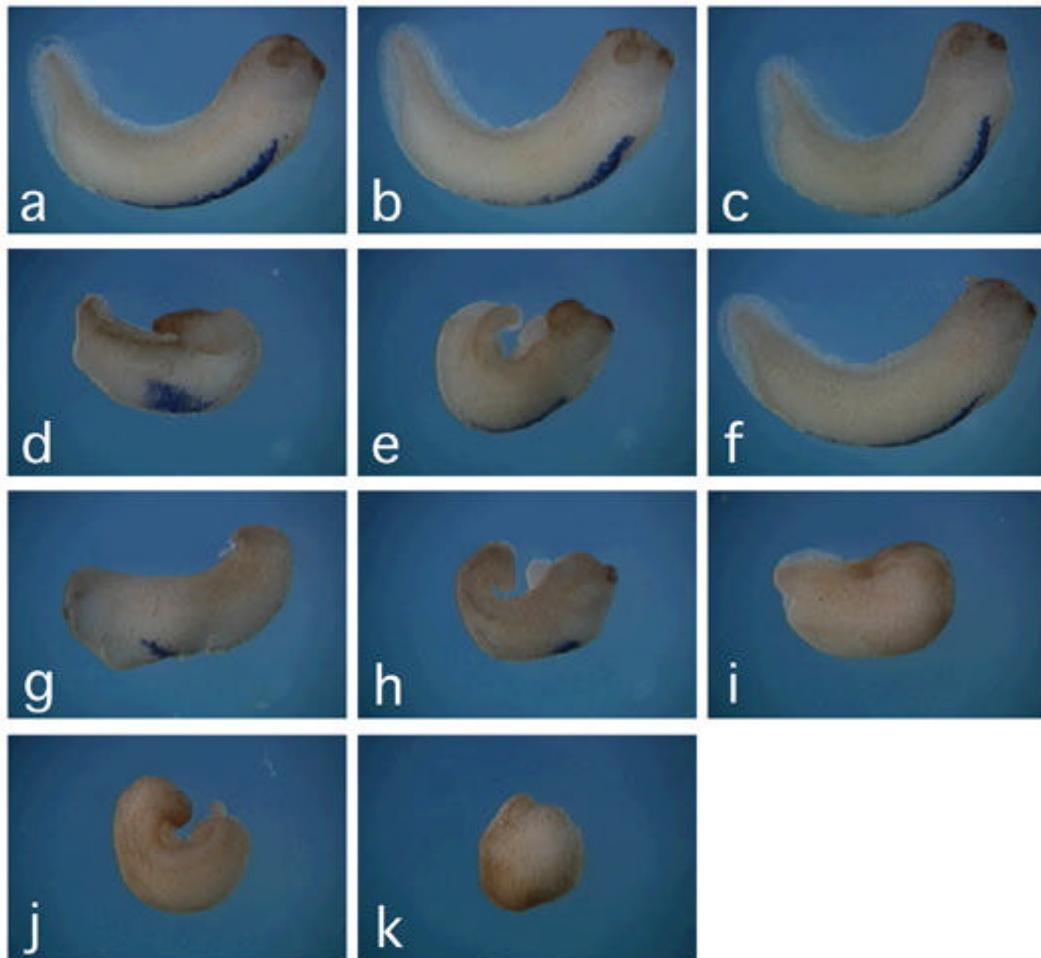


Abb. 3.17: Whole Mount in situ Hybridisierung der Phänotypen I-III nach Cadherinüberexpression für den späten ventralen Marker T1Globin. a) Nicht injiziert. b) XB/U e349 c38. c-e) XB/U c38. Normal, Typ I, Typ II. f-h) XB/UWt. Normal, Typ I, Typ II. i-k) XB/U e349. Keine Globinexpression in Typ I-III.

die Globinexpression untersucht. Um eine bedingt durch die dorsale Injektion von XB/U e349 eventuell unterhalb einer kritischen Schwelle gesunkenen BMP-4-Konzentration innerhalb des von ventral nach dorsal verlaufenden BMP-4-Gradienten wieder zu erhöhen, wurden BMP-4 ventral und XB/U e349 dorsal koinjiziert. Gegenüber der Injektion der Mutante allein kam es hier zu einer Reduktion des Anteils an Embryonen ohne augenscheinliche Globinexpression von 57 % auf 34 %. Es ließ sich dabei aber keine Abhängigkeit vom entstandenen Phänotyp feststellen, i.e. nicht nur stark ventralisierte, sondern alle beobachteten Phänotypen waren von der Wiederherstellung des Globinsignals betroffen (Abb. 3.18.c-d).

Ein Rescue des Globinsignals ließ sich ebenfalls durch dorsale Koinjektion der extrazellulären Cadherinmutante mit  $\beta$ -Catenin Wildtyp-RNA erhalten, während  $\beta$ -Catenin ventral allein, oder ventral mit XB/U e349 dorsal koinjiziert, erwartungsgemäß keinen

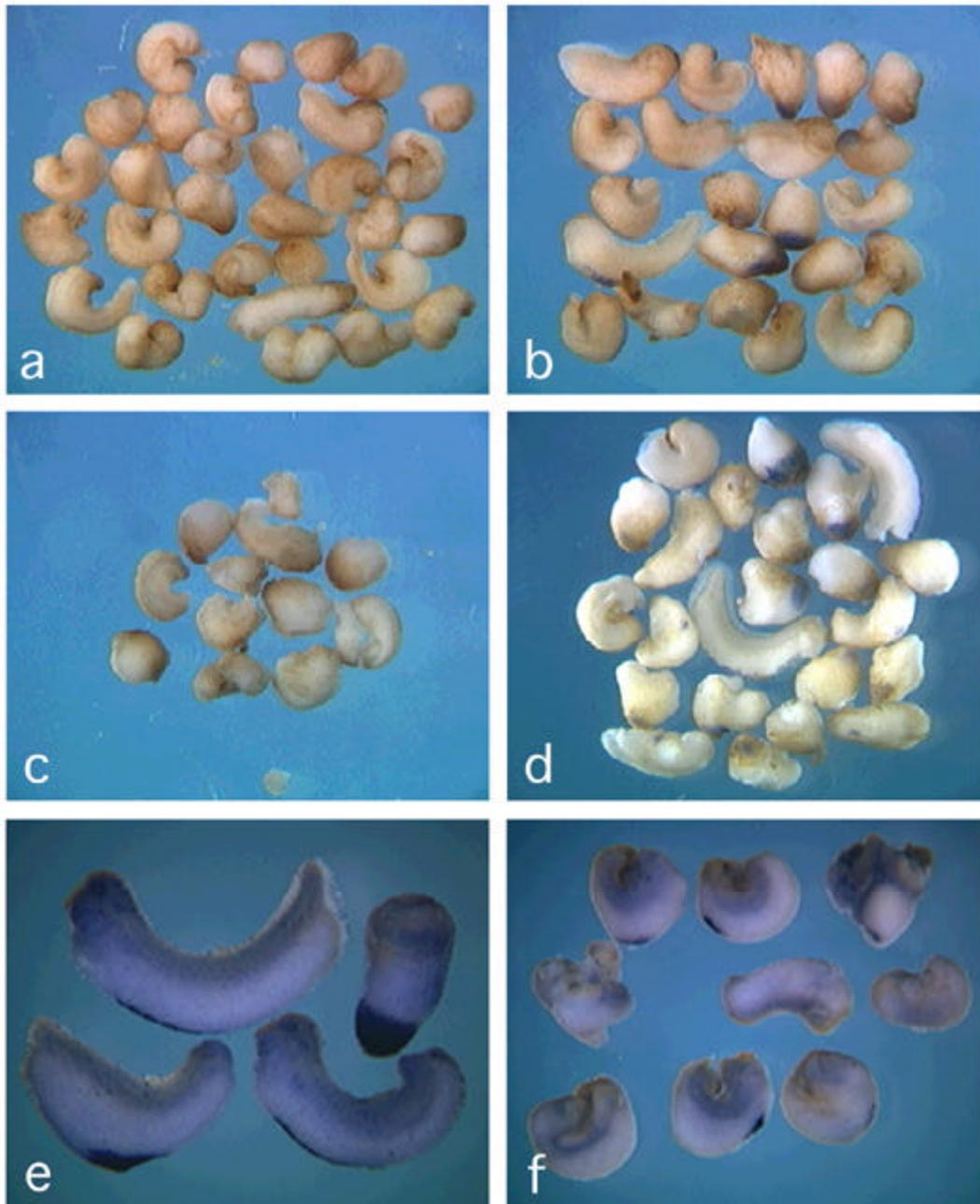


Abb. 3.18: Rescue des Whole Mount in situ Hybridisierungssignals für T1Globin durch Koinjektion. Die untersuchten Embryonen entstammen einem Gelege. XB/U e349 führte in 60 % zu einem Verlust der Globinexpression, welche durch ventrale Koninjektion von BMP-4 (c, d), durch dorsale Koinjektion von  $\beta$ -Catenin (e), nicht aber durch ventrale Koinjektion von  $\beta$ -Catenin (f) teilweise wiederhergestellt werden konnte. a, c) Mit Globinsignal. b, d) Ohne Globinsignal.

Einfluß auf die Globinexpression zeigte. Wie bei BMP-4 war die Wiederherstellung des Globinsignals phänotypunabhängig (Abb. 3.18.e-g, Tab. 3.5).

Neben dem aufgrund des erhaltenen Phänotyps III erwarteten Effekt der Überexpression der extrazellulären Deletionsmutante von XB/U-Cadherin auf die Expression dorsaler

injizierte RNA-Spezies	RNA-Menge je Blast. [ng]	n=	% T1Globin (+)	% T1Globin (-)
nicht injiziert	- -	55	100	0
XB/U e349 c38	0,1 <sub>ds</sub>	66	100	0
XB/U e349	0,2 <sub>ds</sub>	74	43,24	<b>56,76</b>
XB/U c38	0,2 <sub>ds</sub>	54	100	0
XB/UWt	0,2 <sub>ds</sub>	84	98,81	1,19
XB/UWt	0,4 <sub>ds</sub>	11	100	0
-Catenin ventral	0,1 <sub>v</sub>	9	100	0
XB/U e349 <sub>ds</sub> + -Cat <sub>v</sub>	0,2 <sub>ds</sub> +0,1 <sub>v</sub>	9	44,44	<b>55,56</b>
XB/U e349 <sub>ds</sub> + -Cat <sub>ds</sub>	0,2 <sub>ds</sub> +0,1 <sub>ds</sub>	50	76	<b>24</b>
XB/U e349 <sub>ds</sub> + BMP-4 <sub>v</sub>	0,2 <sub>ds</sub> +0,1 <sub>v</sub>	35	65,72	<b>34,28</b>

Tab. 3.5: Statistische Auswertung der Whole Mount in situ Hybridisierung nach Cadherinüberexpression und Rescueansatz für T1Globin. Verlust und Wiederherstellung des Globinsignals sind phänotypenunabhängig. (+) und (-): mit und ohne Globinexpression; ds: dorsal injiziert; v: ventral injiziert. Injektion in die Marginalzonen dorsaler und/oder ventraler Blastomeren von Vierzellstadien, n: Anzahl der Embryonen.

Markergene ergab die Whole Mount in situ Hybridisierung auch eine verminderte Expression des ventralen Markers T1Globin.

### 3.6 Nachweis früher Markergene mittels RT-PCR

Mittels RT-PCR wurden einige frühe Markergene in einem ersten Ansatz hinsichtlich ihrer Expression im Embryo nach Mikroinjektion getestet. Hierzu wurden jeweils fünf Embryonen in einem Batch zur Gesamt-RNA-Isolierung zusammengefaßt. Da die untersuchten Embryonen in frühen Stadien (10-11 nach Nieuwkoop und Faber) keine Phänotypen aufweisen, und das Absammeln der Embryonen daher zufällig erfolgte, sollte mit dieser Methode im günstigsten Fall zwar eine Detektion im Sinne einer ja/nein-Entscheidung möglich sein, wahrscheinlicher ist jedoch lediglich eine Verringerung der Signalstärke. Aussagen hinsichtlich eines veränderten Expressionsmusters, wie es die in situ Hybridisierung gestattet, können mit dieser Methode allerdings prinzipiell nicht untermauert werden. Die Ergebnisinterpretation ist in letzteren Fällen also mit Vorsicht zu betrachten. Die Mikroinjektion erfolgte bezüglich RNA-Menge und Injektionsort den vorangegangenen Experimenten entsprechend.

Eine Verunreinigung der aus der reversen Transkription erhaltenen cDNA mit genomischer DNA wurde durch PCR aus Vergleichsansätzen der cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase für die Expression von Histon H4 ausgeschlossen. Dieses ubiquitär

exprimierte Gen dient zugleich als Referenz für die Intensität der erhaltenen Markergenbanden.

Für den panmesodermalen Marker Xbra wurde in diesem Ansatz eine Doppelbande erhalten. Es konnte kein Verlust des Expressionssignals festgestellt werden.

Die Genexpression des dorsalen Sekretproteins Chordin findet sich erstmals nach der Expression von Goosecoid im Spemann Organisator oberhalb der Urmundlippe in Zellen der Oberschicht und der involutierenden Marginalzone (Sasai et al., 1994).

Während die Überexpression von Cadherin-Wildtyp und -Kontrollkonstrukt im Embryo im Vergleich zur Histon H4-Referenz zu keiner nennenswerter Veränderung der Chordinexpression führte, erbrachte die Überexpression beider Mutanten XB/U c38 und XB/U e349 eine deutliche Herunterregulierung des Chordinsignals. Der Rescue gelang durch Koinjektion der extrazellulären Mutante mit Wildtyp-RNA, nicht aber mit  $\beta$ -Catenin.

Das sekretierte Glycoprotein Noggin findet sich erstmals, kolokalisiert mit Chordin, im Spemann Organisator, später in Kopfmesoderm und Notochord. Es wirkt dorsalisierend auf ventrales Mesoderm und neuralisiert Ektoderm (Smith und Harland, 1992).

Die Überexpression von XB/U c38 und XB/U e349 führte hier lediglich zu einer Abschwächung des Nogginsignals. Allerdings erbrachten die Koinjektionen von XB/U e349 sowohl mit dem Wildtyp von XB/U-Cadherin als auch mit  $\beta$ -Catenin eine leichte Verstärkung der Nogginexpression.

In der RTPCR konnten die in der Whole Mount in situ Hybridisierung für den frühen ventralen Marker Xvent-1 erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. In keinem Fall zeigte sich eine Abweichung der Signalintensität im Vergleich zur Histon H4-Referenz. Die

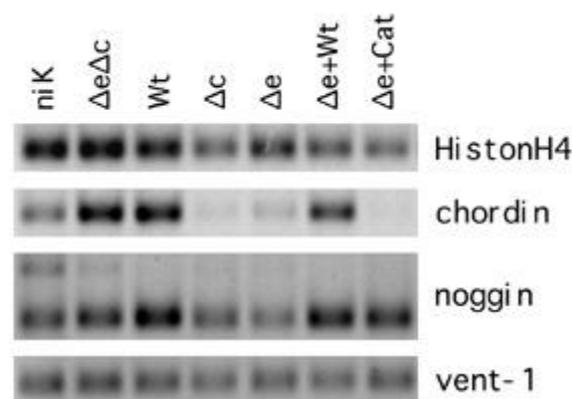


Abb. 3.19: Nachweis der Expression früher Markergene nach Cadherinüberexpression mittels RT-PCR. Je fünf Embryonen (St. 10-11) wurden in die Gesamt-RNA-Isolierung eingesetzt. HistonH4 und chordin: 36 X 94/55/72°C; noggin und Xvent-1: 38 X 94/55/72°C. niK: nicht injiziert; e c: XB/U e349 c38; Wt: XB/UWt; c: XB/U c38; e: XB/U e349; Cat:  $\beta$ -Catenin. Injektion und RNA-Mengen entsprechen denen vorangegangener Experimente.

Ergebnisse für den Nachweis früher Markergene mittels RT-PCR sind in Abbildung 3.19 zusammengefaßt.

### **3.7 Der wechselseitige Einfluß von Zell- und Substratadhäsion in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus***

Embryonale Differenzierung ist mit einer Vielzahl von Zellbewegungen verbunden. Während der Gastrulation, die zur Anlage der drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm führt, wirken in *Xenopus* verschiedene Bewegungen additiv: die Epibolie des präsumptiven Ektoderms und konvergente Extension sowie aktive Migration des zukünftigen Mesoderms. Bei diesen Vorgängen greifen Zell- und Substratadhäsion bewegungsmodulierend ein. Ihre Koordination wird auch für die Entstehung und Absenkung der Neuralplatte, das Wandern der Neuralleistenzellen oder die Segmentierung der Somiten diskutiert. Das geordnete Zusammenspiel dieser Vorgänge läßt ein definiertes Verhältnis von Zelladhäsion zu Substratadhäsion vermuten.

Mit Hilfe der Überexpression der in dieser Arbeit erstellten XB/U-Cadherinkonstrukte sollte ein möglicher Zusammenhang dieser beiden Adhäsionssysteme näher untersucht werden.

#### **3.7.1 Einfluß der XB/U-Cadherin-Überexpression auf die Fibronektin-Matrixbildung des Blastocoeldaches von *Xenopus***

Die Zellen der involutierenden Marginalzone adhäreren nach ihrer Involution über mehrere Bindungsstellen am Fibronektin des Blastocoeldaches. Diese Interaktion der Zellen mit ihrem Substrat Fibronektin trägt entscheidend dazu bei, daß das Kopfmesoderm in die anteriore Position des Embryos gelangt (Ramos et al., 1996). Zellkulturdaten sprechen für eine gegenseitige negative Beeinflussung von Substratadhäsion und Cadherin-vermittelter Zell-Adhäsion. Die Transfektion von XTC-Zellen mit XB/U-Cadherin führt neben einer Herunterregulierung von  $\alpha_3 \beta_1$  Integrin zu einer drastischen Reduktion der Fibronektinexpression (Finnemann et al., 1995). In einem ersten Ansatz sollte die fibrilläre Organisation vom Fibronektin des Blastocoeldaches nach Überexpression der Cadherin-Konstrukte untersucht werden. Hierzu wurden die RNA der Konstrukte animal medial in die Nähe der Teilungsfurche beider Blastomeren des Zweizellstadiums von *Xenopus* mikroinjiziert, um eine direkte Zelladhäsionsstörung in der Entwicklung des Blastocoeldaches zu setzen. Animale Kappen wurden im Stadium 9,5 bis 11,5 präpariert und mit dem Primärantikörper mAb4H2 gegen Fibronektin und dem Sekundärantikörper GAM-

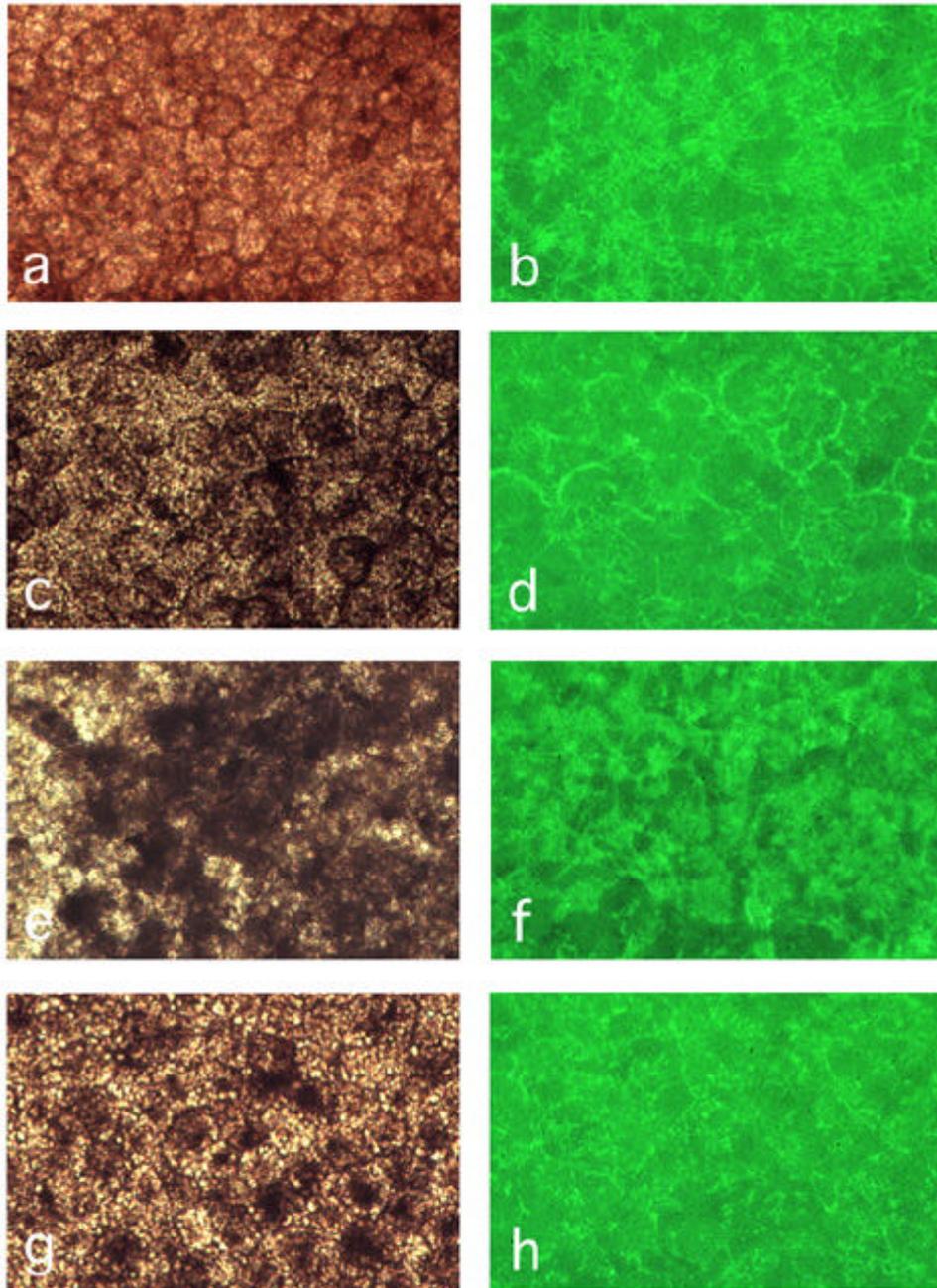


Abb. 3.20: Blastocoeldachpräparation nach Überexpression von Cadherinkonstrukten in der animalen Kappe. Detektion der Fibronektinmatrix mit mAb4H2/GAM-FITC. Links Phasenkontrastdarstellung, rechts FITC-Fluoreszenzkanal. Die Cadherinexpression führte insgesamt zu einem toxischen Effekt auf die epitheliale und sensorische Schicht des Blastocoeldaches (a, c, e, g). Es konnten keine relevanten Veränderungen hinsichtlich der Matrixausbildung festgestellt werden (b, d, f, h). a, b) Nicht injiziert. c, d) XB/U e349 c38. e, f) XB/UWt. g, h) XB/u e349. RNA-Konzentrationen wie in vorangegangenen Experimenten.

FITC immunfluoreszenzmarkiert. Nach vorsichtigem Eindeckeln der Kappen mit dem Blastocoeldach nach oben wurde im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Von jedem Ansatz wurde neben der Aufnahme im Fluoreszenzkanal (FITC) eine Phasenkontrastaufnahme desselben Areals gemacht, um die Qualität des Zellverbandes an dieser Stelle zu beurteilen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 zusammengefaßt. Die Injektion der Cadherinkonstrukte führte im Vergleich zur nichtinjizierten Kontrolle zu einer fehlerhaften Ausbildung der epithelialen und insbesondere der sensorischen Schicht des Blastocoeldaches (Abb. 3.20.c, e, g). Dieses traf auch für die Kontrollmutante XB/U e349 c38 zu, sodaß hierbei von einem nicht spezifischen, toxischen Effekt ausgegangen werden mußte. Die auswertbaren Bereiche injizierter Kappen zeigten untereinander keine wesentlichen Unterschiede in Quantität und Qualität der Fibronectinexpression. Insbesondere die Überexpression des Cadherin-Widtypkonstruktes erbrachte nicht die aus Zellkulturexperimenten erwartete Reduktion (Finnemann et al., 1995, Abb. 3.20.e-f). Insgesamt ergab sich aber, offenbar rein injektionsbedingt, eine Reduktion der Fibronectinexpression im Vergleich zur nichtinjizierten Kontrolle (Abb. 3.20.b, d, f, h).

### **3.7.2 Einfluß der XB/U-Cadherin-Überexpression auf die Zell-Substratadhäsion animaler Kappenzellen**

Die Behandlung von Blastomeren der animalen Kappe von *Xenopus* mit Activin A resultiert integrinvermittelt in Adhärenz, Spreitung und Wanderung dieser Zellen auf einem Fibronectin-Substrat (Smith et al., 1990). Der Regulationsmechanismus, der diesem activinabhängigen Zellverhalten zugrunde liegt, beinhaltet die Erkennung multipler Zell-interaktiver Epitope innerhalb des Fibronectinmoleküls. Ramos et al. (1996) konnten zeigen, daß neben dem RGD-Motiv in der Untereinheit III 10 des Fibronectinmoleküls ein weiteres, synergistisch wirkendes Epitop der Untereinheit III 9 (Synergie-Epitop) von entscheidender Bedeutung ist. Um eine mögliche Interferenz des Cadherin-vermittelten Zelladhäsionssystems mit diesem substratadhäsionsvermittelten Zellverhalten zu untersuchen, wurden die Cadherin-Konstrukte in der animalen Kappe überexprimiert und deren Zellen nach Vereinzelung auf verschiedenen Fibronectin-Fusionsproteinen einem Adhäsionsassay unterworfen.

#### **3.7.2.1 Auswahl der Fibronectinkonstrukte und Aufreinigung der Fusionsproteine**

Neben humanem Plasmafibronektin, welches zu *Xenopus* Fibronectin auf Aminosäureebene 70 % Identität aufweist (DeSimone et al., 1992), wurden als Substrat drei Fusionsproteinkonstrukte von *Xenopus* Fibronectin verwendet, die freundlicherweise von

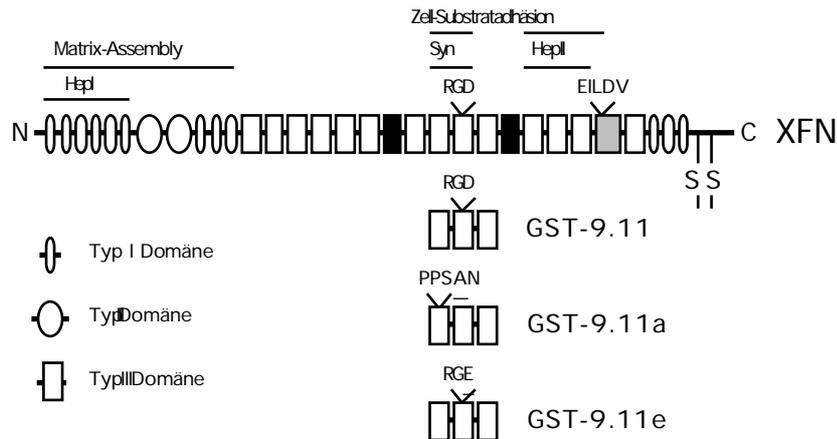


Abb. 3.21: Domänenstruktur des Fibronectinmonomers von *Xenopus* und der verwendeten GST-Fibronectin-Fusionskonstrukte. Das Synergieepitop ist in der Domäne III 9, das RGD-Motiv in Domäne III 10 enthalten. Die Disulfidbindungen stellen die Brücke zwischen zwei Untereinheiten her. GST-9.11 vermittelt Zelladhäsion und -migration, GST-9.11a nur die Zelladhäsion und GST-9.11e weder Zelladhäsion noch -migration.

Douglas DeSimone zur Verfügung gestellt wurden (Ramos et al., 1996). Eine Übersicht gibt Abbildung 3.21. Alle drei Konstrukte umspannen die Domänen Typ III 9 bis 11, Bereiche, die für integrinvermittelte Adhärenz und Migration verantwortlich sind. Das in der Domäne III 9 enthaltene Sequenzmotiv PPSRN ist in vielen Zelltypen für Spreitung und Migration erforderlich (Aota et al., 1994; Bowditch et al., 1994), während das RGD-Motiv in III 10 für die Adhärenz, nicht aber für Spreitung und Migration hinreichend ist. GST-9.11 unterstützt demzufolge als Substrat beide Eigenschaften. GST-9.11a weist eine Mutation im Motiv PPSRN von Arginin nach Alanin auf. Wegen des intakten RGD-Motivs ist auf diesem Substrat nur Adhärenz möglich. Als drittes Konstrukt liegt in GST-9.11e eine Mutation im RGD-Tripeptid von Asparaginsäure nach Glutaminsäure vor. Infolgedessen ist hier weder Adhärenz noch Spreitung zu erwarten. Sämtliche Konstrukte enthalten N-terminal einen Glutathion-S-Transferase Fusionsanteil (GST), der im pGEX-Vektorsystem nach bakterieller Expression eine Aufreinigung ermöglicht (Smith und Johnson, 1988). Hierzu wurden zunächst durch Proteinaufreinigung im Kleinmaßstab nach Transformation in *E. coli* BL21 solche pGEX-rekombinanten Klone ermittelt, die eine starke Expression der drei Konstrukte aufwiesen. Mit diesen Klonen wurde dann im Batch-Verfahren die Aufreinigung der Fusionsproteine im Großmaßstab vorgenommen. Auf eine anschließende Abtrennung des GST-Fusionsanteils konnte für diesen Versuch verzichtet werden. Nach abschließender Dialyse des Eluats konnten Fusionsproteine der gewünschten Größe von 56,9 kd erhalten werden (Abb.3.22).

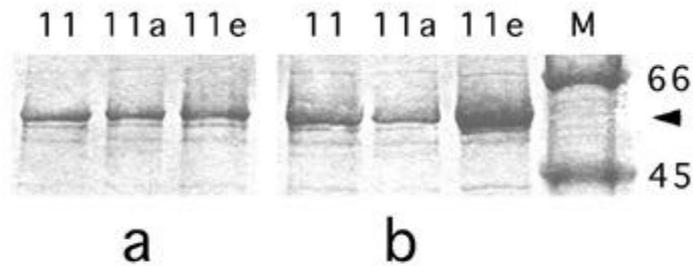


Abb. 3.22: GST-Fusionsproteine von Fibronectin nach bakterieller Expression. b) Aufgereinigte Proteine nach der Dialyse. a) Wie b, nach Normierung des Probenauftrags auf 2  $\mu\text{g}$  je Spur (Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorption). 11: GST-9.11. 11a: GST-9.11a. 11e: GST-9.11e. M: Proteinmarker (Zahlenwerte in kD).

### 3.7.2.2 Adhäsionsassay

Das Funktionsprinzip des Adhäsionsassays ist in Abbildung 3.23 schematisch dargestellt. Um sicherzustellen, daß die verwendeten Kappenexplantate das im Embryo von vegetal kommende endogene Activinsignal noch nicht empfangen haben, zum anderen aber für exogen

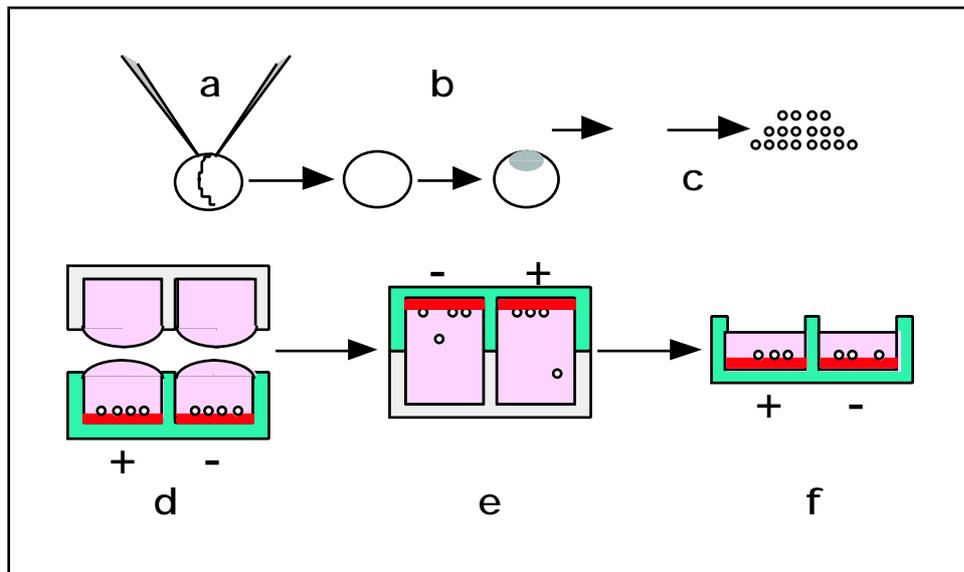


Abb. 3.23: Funktionsprinzip des Adhäsionsassays. Nach Überexpression der Cadherinkonstrukte in der animalen Hälfte von Zweizellstadien (a) werden Kappen im St. 9 präpariert (b) und die Zellen in CMF-Medium vereinzelt (c). Nach Aussäen der Zellen auf Fibronectin oder -fusionsanteilen mit und ohne Activin (d, + und -), wird durch Invertieren gespült (e) und anschließend hinsichtlich Adhärenz und Migration ausgewertet (f).

appliziertes Activin A ausreichend kompetent sind, wurden die Kappen der Embryonen bereits im Stadium 9 präpariert. Um die Zellen der animalen Kappe vor der Präparation zu manipulieren, wurden Transkripte der Cadherinkonstrukte zentral in die Nähe der Teilungsfurche animal in beide Blastomeren des Zweizellstadiums direkt unterhalb des Cortex mikroinjiziert. Auf diese Weise sollte eine bestmögliche diffusible Verteilung der Transkripte während der Zellteilungen in diesem Bereich des Embryos sichergestellt werden. Die Konzentrationen der RNA entsprachen dabei denen der vorangegangenen Versuche. Die animalen Kappenexplantate wurden durch Inkubation in calcium- und magnesiumfreien Medium in ihre Einzelzellen dissoziiert und auf den verschiedenen Substraten (0,23  $\mu$ M humanes Plasmafibronektin bzw. Xenopus Fibronektinkonstrukte im Beschichtungsansatz), jeweils mit oder ohne Zugabe von Activin A ausgesät. Nach 60 min Inkubation wurde nach Sichtkontrolle 10 Minuten passiv gespült und anschließend im Phasenkontrast ausgewertet. Zur Untersuchung der Zellmodi Adhärenz sowie Adhärenz mit Spreitung und Migration wurde die Begriffsbestimmung von Ramos et al. (1996) übernommen. Danach weisen adhärenente Zellen nach Bindung an ein Substrat eine abgerundete, an den Randbereichen durch den engen Kontakt abgeflachte Gestalt auf. Die Spezifität der adhäsiven Bindung wird dabei im quantitativen Vergleich zur Anhaftung der Zellen auf dem unspezifischen Substrat Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt. Adhärenente Zellen bilden insbesondere auf das Activin-Signal hin in geringerem Maße Ausläufer (Filopodien) aus, verbleiben aber in ihrer Gestalt und zeigen keine Wanderung (Abb. 3.25.b, h). Dagegen ist der Migrationsmodus der Zellen durch eine starke Ausbildung von Filopodien gekennzeichnet. Infolge des Rearrangements des Zytoskeletts kommt es zur starken Spreitung und Migration der Zellen. Sie nehmen dabei eine deutlich polygonale Gestalt an. Aufgrund der damit verbundenen Abflachung der Zelle wird der Kern im Phasenkontrast sichtbar (Abb. 3.24.b).

Sämtliche Kappenzellen aus injizierten und nichtinjizierten Embryonen zeigten auf den Substraten Fibronektin, GST-9.11 und GST-9.11.a gegenüber dem Substrat BSA eine starke Adhäsivität, sodaß das im Folgenden nach Überexpression der Cadherinkonstrukte beobachtete Zellverhalten mit einer spezifischen Interaktion der endogenen Integrine mit den Domänen III.9 bis III.11 des Fibronektins hinreichend in Zusammenhang gebracht werden konnte. Erwartungsgemäß lag die Adhäsivität der Zellen auf dem RGD-defizienten Substrat GST-9.11.e quantitativ im Bereich der BSA-Kontrolle. Entsprechend wurde hier auch keine Activin-Antwort beobachtet (nicht gezeigt).

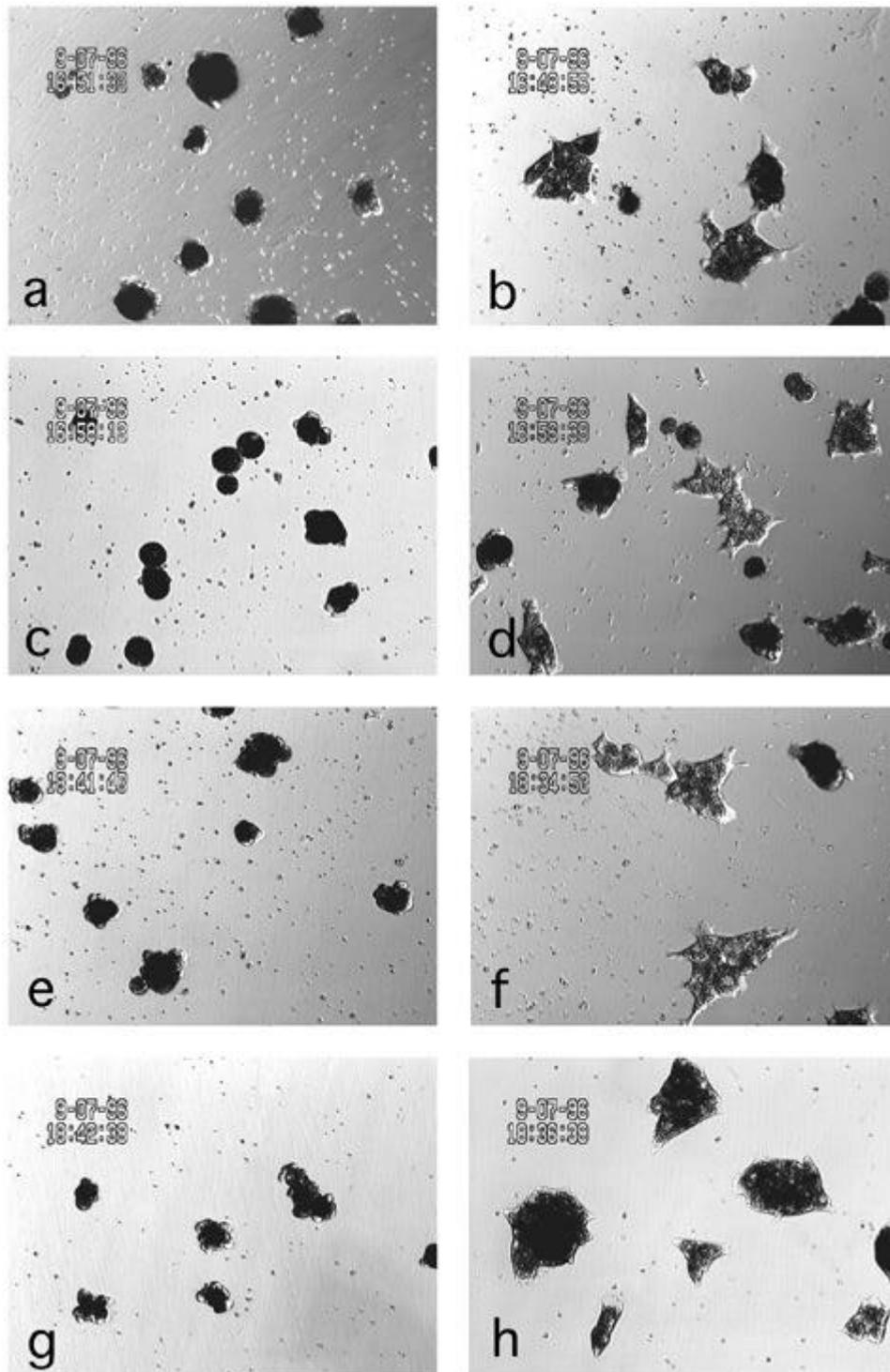


Abb. 3.24: Adhäsionsassay manipulierter Kappenzellen hinsichtlich des activinabhängigen Zellverhaltens auf Fibronectin(FN)substraten. Erklärung im Text. Links ohne, rechts mit Activininkubation. a, b) Nicht injiziert auf FN. c, d) XB/U e349 c38 auf FN. e, f) XB/UWt auf FN. g, h) XB/UWt auf GST-9.11. Die bei der Injektion verwendeten RNA-Konzentrationen entsprachen denen vorangegangener Experimente.

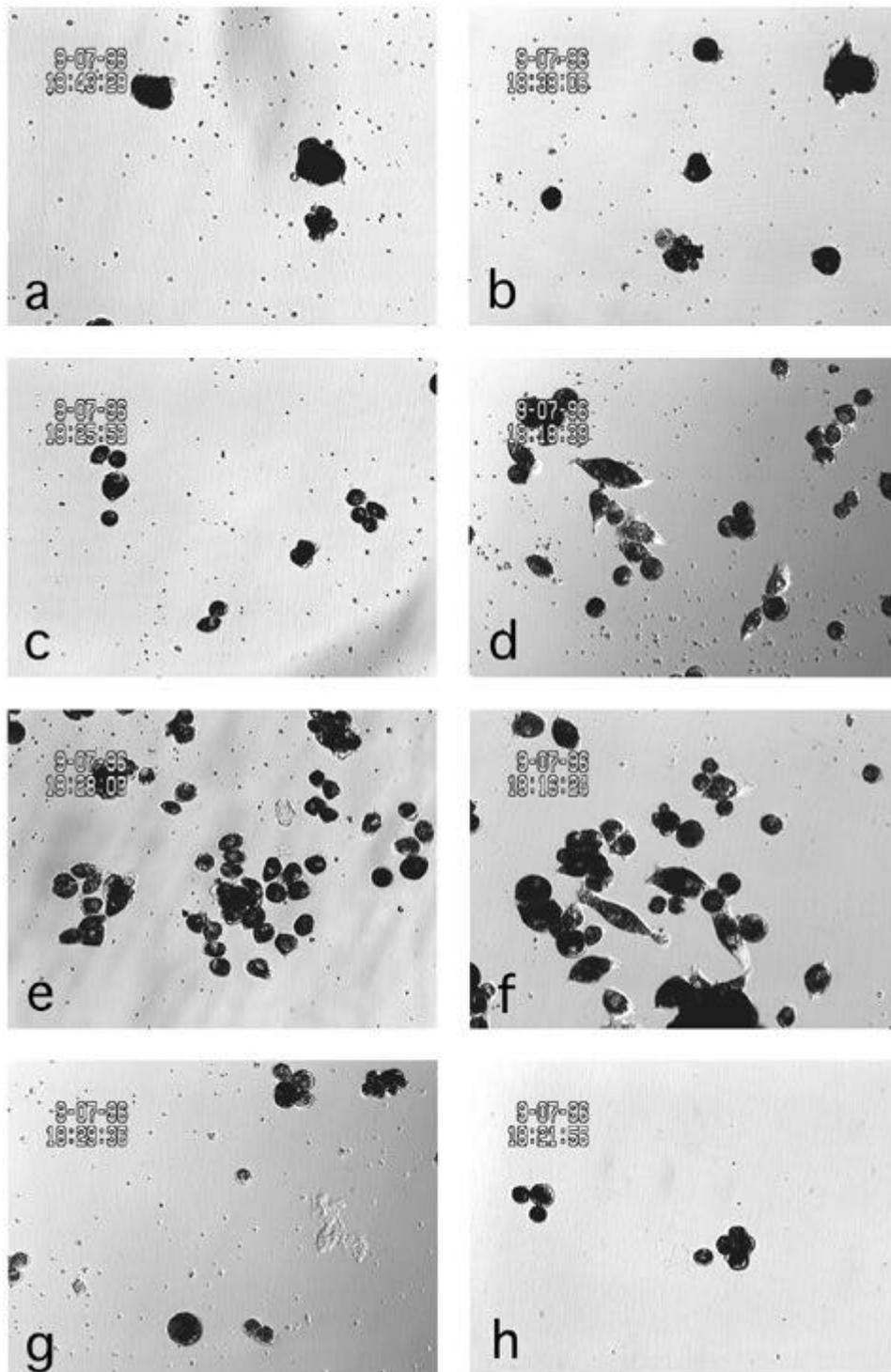


Abb. 3.25: Adhäsionsassay manipulierter Kappenzellen hinsichtlich des activinabhängigen Zellverhaltens auf Fibronectin(FN)substraten. Erklärung im Text. Links ohne, rechts mit Activininkubation. a, b) XB/UWt auf GST-9.11a. c, d) XB/U e349 auf FN. e, f) XB/U e349 auf GST-9.11. g, h) XB/U e349 auf GST-9.11a. Die bei der Injektion verwendeten RNA-Konzentrationen entsprechen denen vorangegangener Experimente.

Wie Kappenzellen nichtinjizierter Kontrollembryonen gingen Zellen nach Überexpression der Kontrollmutante XB/U e349 c38 auf Fibronectin nach Inkubation mit Activin-A nahezu quantitativ vom reinen Adhärenz- in den Migrationsmodus über (Abb. 3.24.c-d). Ein ähnliches Bild zeigte sich nach Überexpression des Cadherin-Wildtyps XB/Uwt auf Fibronectin und dem Fusionskonstrukt GST-9.11. Gegenüber den Kontrollansätzen war hier eine erhöhte Zell-Zelladhäsivität festzustellen (Abb. 3.24.e-h). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Clusterung der Zellen auf Zellteilungsaktivität während des Versuchsablaufs zurückzuführen ist. Die Activin-Antwort dieser Zellen auf dem synergieepitopdefizienten Substrat GST-9.11.a führte erwartungsgemäß nur zur Ausbildung von Filopodien, nicht aber zu Spreitung und Migration der Zellen, was die Notwendigkeit dieser Epitops für die activinabhängige Spreitung des untersuchten Zellverhaltens unterstreicht (Abb. 3.25.a-b). Insgesamt resultierte also die Überexpression des XB/U-Cadherin Wildtyps in keiner Veränderung der Kompetenz der Integrine, auf das Activinsignal zu antworten. Auch ein Hinweis auf eine eventuelle Herunterregulierung der verantwortlichen Integrinausstattung der Zellen vor der Dissoziation der Kappen ließ sich hieraus folglich nicht ableiten

Diese Kompetenz war nach Überexpression der extrazellulären Deletionsmutante XB/U e349 jedoch deutlich reduziert. Neben der Ausbildung von Filopodien zeigten nur etwa 30-40 % aller Zellen Spreitung und Migration auf den Substraten Fibronectin und GST-9.11 (Abb. 3.25.c-f). Auf dem Substrat GST-9.11.a ging auch hier die Integrinantwort auf Activin verloren (Abb. 3.25.g-h). Die auf diesem Substrat beobachtete geringere Zahl adhärenter Zellen wurde auch im Ansatz mit XB/Uwt-überexprimierenden Zellen gefunden und auf eine reduzierte (aktive) Konzentration der Substratschicht zurückgeführt. Um auszuschließen, daß im Fall der Überexpression von XB/U e349 eine verminderte Bindung an das RGD-Motiv zur Reduktion der Activinantwort hinsichtlich Zellspreitung und Migration führte, wurde in Folgeexperimenten die regelrechte Adhäsivität der Zellen an dieses Substrat bestätigt. Hierzu wurden wiederholt XB/U e349 überexprimierende Kappenzellen dem Adhäsionsassay ohne Zugabe von Activin A unterworfen. In keinem Fall kam es zu einer Reduktion der Adhärenz im Vergleich zu Kontrollzellen nichtinjizierter Kappen (nicht gezeigt).