Aus dem Institut für Anatomie III
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Scaal

Untersuchungen zur Regulation und Funktion von Filopodien bei der Somitenentwicklung im Hühnerembryo

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Gereon Kruse
aus Georgsmarienhütte, Deutschland

promoviert am 08. September 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2026

Dekan:	Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter:	Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Scaal
2. Gutachter:	Universitätsprofessor Dr. rer. nat. A. Wodarz

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Valentina Dörl, Frau Claudia Bismar und Frau Dr.rer.nat. Margarethe Draga durchgeführt worden. Die statistische Auswertung der Experimente wurde durch mich und durch Frau Dr.rer.nat Margarethe Draga geleistet. Die grafische Aufarbeitung der statistischen Auswertung sowie das Verfassen der Dissertationsschrift erfolgte durch meine Person und wurde mit Frau Dr.rer.nat Margarethe Draga und Herrn Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Martin Scaal diskutiert und validiert.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 05.03.2026

Unterschrift: .....

Danksagung

Vielen Dank an die gesamte AG Scaal für die Möglichkeit, meine Dissertation bei Ihnen durchführen zu können. Ich habe mich vom ersten Moment an sehr wohl gefühlt und bin jeden Tag gerne in die AG gekommen. Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. Margarethe Draga für ihre herausragende, kompetente Betreuung, ohne die diese Dissertationsschrift mit Sicherheit nicht in dieser Weise möglich gewesen wäre. Vielen Dank an Valentina Dörl und Claudia Bismar. Die Unterstützung in- und außerhalb des Labors war sehr häufig Gold wert. Ein großes Dankeschön an Frau Prof. Dr. Felicitas Pröls, Julia Khabhyuk und Frau Dr. Vanessa Holtwick für die fachlichen Gespräche und Ratschläge, die mir sehr geholfen haben, die Zusammenhänge meiner Forschungsarbeit besser zu verstehen.
Und natürlich vielen Dank an Prof. Dr. Martin Scaal für die hervorragende Betreuung, für die Möglichkeit, in der Lehre des anatomischen Instituts mitwirken zu dürfen und dafür, Doktorvater bei meiner Dissertation zu sein.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an meine Familie, an Mama, Papa, Johanna und Maximilian, und meine Freunde Lisa, Lukas, Moritz, Deniz, Giulia, Sophia, Stien, Lotte, Nele, Basti, Anja, Flo und Jonas aussprechen. Vielen Dank, dass ihr mich durch diese Zeit begleitet habt, für euren Zuspruch, aber auch für eure konstruktive Kritik, ohne die diese Arbeit bestimmt nicht möglich gewesen wäre.

Für Johanna, Maximilian, Mama und Papa

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 10

1. ZUSAMMENFASSUNG 12

2. EINLEITUNG 15

2.1. Frühembryonale Entwicklung *in a nutshell* 15

2.2. Anatomie des Hühnerembryos unter dem Lichtmikroskop 16

2.3. Entwicklung des Dermomyotoms 17

2.4. Somitenepithelialisierung 19

2.4.1. Der kanonische Wnt-Signalweg 24

2.5. Kleine Rho-GTPasen 25

2.6. Wirkung von GTPasen im Rahmen der Somitenepithelialisierung 26

2.7. Cdc42 und Rac1-Wirkung auf den Wnt-Signalweg während der Somitenepithelialisierung 27

2.8. Mesenchymalisierende Wirkung 27

2.8.1. IQGAP1 27

2.9. Epithelialisierende Wirkung 28

2.9.1. Rac1-abhängige JNK-Aktivierung 28

2.9.2. Rac1-LEF1-Komplexe 29

2.10. Dermomyotomale Filopodien 30

2.11. Wechsel zwischen mesenchymalisierender und epithelialisierender Wirkung 33

2.12. Zusammenfassung der Einleitung 34

2.13. Definition der Fragestellung 34

3. MATERIAL UND METHODEN 36

3.1. Methoden 36

3.1.1. Modellorganismus 36

3.1.2. Elektroporation 36

(1) *In-ovo* Elektroporation (siehe Tabelle 1) 36
(2) *ex-ovo* Elektroporation (siehe Tabelle 2) 38
(3) Plasmide 40
3.1.3. Embryonenisolierung (siehe Tabelle 3) 43
3.1.4. Immunhistochemie 43
3.1.5. GBS-Einbettung (siehe Tabelle 5) 46
3.1.6. Vibratomschnitte (siehe Tabelle 6) 47
3.1.7. Bildaufnahmen im LSM 47
3.1.8. Filopodien quantifizieren 47

3.2. Material 48
3.2.1. Chrom-Gelatine-Objektträger (siehe Tabelle 7+8) 48
3.2.2. GBS-Mix (siehe Tabelle 9) 49
3.2.3. Plasmide 49
(1) Transformationslösungen 49
(2) Transformation (siehe Tabelle 10) 49
(3) Plasmid DNA-Extraktion (siehe Tabelle 11) 51

3.3. Geräte 53

3.4. Reagenzien 56

ERGEBNISSE 57

4.1. pCAG-GFP 60

4.2. dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP 64

4.3. dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP 67

4.4. Zusammenfassung der Filopodieninhibition 70

4.5. Cofilin-*rescue* 70

4.6. dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1 Cofilin 71

4.7. dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP 74

4.8. dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP+EGFP-N1 Cofilin 77

4.9. dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP+CofilinS3A-GFP 80

4.10. Zusammenfassung des Cofilin-*rescues* 83

4.11. Tabellen 83

4.12. Übersicht **84**

4.13. Abbildungsübersicht über die Elektroporation der oben beschriebenen Plasmide (Abb. 14-20) **89**

4.14. Expression von MF20 nach Elektroporation **90**

4.15. Immunhistochemische Markierung von Skelettmuskelfasern mit MF20 **91**

4.16. Zusammenfassung der Immunhistochemie mit MF20 **94**

5. DISKUSSION 95

5.1. Rac1 ist an der Filopodienbildung im dorsalen Dermomyotom beteiligt **95**

5.2. Die Coexpression von Cofilin mit dnRac1 führt zu keiner relevanten Änderung gegenüber der alleinigen Elektroporation von dnRac1 **96**

5.3. Die Coexpression von dauerhaft aktivem CofilinS3A mit dnRac1 führt zu einer Relevanten Änderung gegenüber der Expression von dnRac1 allein **96**

5.4. dnCdc42 hat in dieser Versuchsanordnung keine Auswirkung auf die relative Filopodienzahl **97**

5.5. Die Coelektroporation von Plasmiden zur Expression von dnCdc42 und Cofilin führt zu einer verringerten relativen Filopodienzahl gegenüber der alleinigen Elektroporation des Plasmides zur Expression von dnCdc42 **97**

5.6. CofilinS3A erhöht trotz dnCdc42 die relative Filopodienzahl gegenüber der Kontrollgruppe **98**

5.7. Die Inhibition von Rac1 korreliert mit der Auflösung der Epithelformation des Dermomyotoms **99**

5.8. Ausblick auf mögliche experimentelle Prüfungen der oben genannten Hypothesen **100**

5.9. Die Dermomyotomzellen werden in keiner der untersuchten Elektroporations-konstellationen nach der Elektroporation MF20-Ak-positiv **102**

5.10. Nicht alle dermomyotomalen Zellen haben nach dem CofilinS3A-*rescue* wieder einen epithelialen Charakter **103**

5.11. Werden die Zellen, die dnRac1 exprimieren, zu Mesenchymzellen? **103**

5.12. Die Frage nach der weiteren Entwicklung der neu entstandenen mesenchymal

konfigurierten Zellen und die damit einhergehenden Auswirkungen 104

5.13. Zusammenfassung der Diskussion 105

6. LITERATURVERZEICHNIS 108

7. ANHANG 114

7.1. Abbildungsverzeichnis 114

7.2. Tabellenverzeichnis 116

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AB	Augenbläschen
Abb	Abbildung
ADF	Actin-depolymerising-factor
AL	Anteriore Lippe
Am	Amnion
APC	Adenomatous-polyposis-coli-protein
Asn	Asparagin
bHLH	Basic-helix–loop–helix
bp	Basenpaare
BSA	Bovines-Serum-Albumin
ca	Circa
CD	Zentrales Dermomyotom
Cdc42	Cell-division-control-protein-42
CIN	Cofilin-Phosphatase-Chronophin
CK1γ	Casein-Kinase-1-gamma
cm	Zentimeter
Cofilin-S3A	Aktiviertes Cofilin durch die Substitution von Serin durch Alanin an der 3. Position
Cor	Herz
COS-7-Zellen	Fibroblastenartige Zellen der Spezies *Chlorocebus aethiops*
Da	Dalton
DaM AF568	Donkey-anti-rabbit-IgG(H+L)-highly-cross-adsorbed-secondary-antibody
DAPI	4´-6-Diamidin-2-phenylindol
DM	Dermomyotom
DML	Dermomyotomale Lippe
dn	*Dominant-negative* (deutsch: dominant-negativ)
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DsRed	DsRed2 from *Discosoma* species
E.	*Escherichia*
EGFP	Enhanced-green-fluorescent-protein
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
En1	Entgrailed
et al.	Und andere (latein: *et alii*)
EtOH	Ethanol
FGF	Fibroblastic-growth-factor
FiLiPs	Filopodia-like-protrusions
Fzd	Frizzled
g	Gramm
GAP	GTPase-activating-protein
GBS	Gelatine-BSA-Saccharose
GDI	GDP-dissociation-inhibitor
GDP	Guanosindiphsophat
GEF	Guanine-nucleotide-exchange-factors
GFP	Green-fluorescent-protein
GSK3β	Glycogensythasekinase-3beta
GTP	Guanosintriphosphat
H	Hekto
h	Stunde
HH	Entwicklungsstadium nach Hamburger und Hamilton (1951) [1]
HSP90	Hitzeschockprotein (90kDa)
IHC	Immunhistochemie
IQGAP	Ras-GTPase-activating-like protein
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle

JNK	C-Jun-N-terminale-Kinasen
k	Kilo
K	Plasmid
k.-o.	*Knock-out*
LEF1	Lymphoid-enhancer-binding-factor
LIM	Lin-11-Isl-1-Mec-3
Lrp6	Lipoproteinreceptor-related-protein-6
M	Mol
M	Myotom
Mes	Mesencephalon
MET	Mesenchymal-epitheliale Transformation
MF20	Myosin-4-monoclonal-antibody
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
NT	*Neural tube* (deutsch: Neuralrohr)
N-WASP	Neural-Wiskott-Aldrich-syndrome-protein
Pa	Pascal
pAB	*Primary antibody* (deutsch: primärer Antikörper)
PAK	P-21-aktivierten-Kinase
PBS	Phosphate-buffered-saline
PBST	Phosphate-buffered-saline mit zusätzlichem Reagenz
pCAG	DNA-Promotor bestehend aus dem Zytomegalievirus, dem ersten Intron des beta-Aktin-Gens von Hühnern und dem 3´-Teil des zweiten Introns und dem 5'-Teil des dritten Exons des beta-Globin-Gens vom Kaninchen
PFA	Paraformaldehyd
PL	Posteriore Lippe
Pro	Prosencephalon
PSM	Praesomitisches Mesoderm
Rac1	Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate-1
Ras	Rat-sarcoma
Rho	Ras-Homolog
Rho-GTPase	Ras-Homolog-GTPase
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	*Rounds per minute* (Runden pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sAB	*Secondary antibody* (deutsch: sekundärer Antikörper)
Ser	Serin
Shh	Sonic-hedgehog
Som	Somit
Src	Sarcoma-Tyrosinkinase
s.u.	siehe unten
t	Zeit
V	Volt
VLL	Ventrolaterale Lippe
WAVE1	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Faktor- 1

1. Zusammenfassung

In der embryonalen Entwicklung der Vertebraten entsteht im Rahmen der Gastrulation die dreiblättrige Keimscheibe, bestehend aus Ekto-, Meso- und Endoderm [2]. Im Mesoderm werden die Somiten gebildet, aus welchen sich bei Vertebraten das Rumpfskelett, die Skelettmuskulatur sowie die Dermis des Rückens entwickeln [3]. Die Somiten lassen sich wiederum in ein ventromediales Sklerotom und ein dorsolaterales Dermomyotom (DM) unterteilen. Die Sklerotomzellen mesenchymalisieren, wandern zur Chorda dorsalis und bilden dort die Wirbelsäule [4,5]. Die im Verlauf mesenchymalisierten myogenen Zellen des Dermomyotoms bilden das Myotom [6]. Aus jenem entsteht die hypaxiale und epaxiale Rumpfmuskulatur [7,8]. Die späteren Dermiszellen verbleiben zunächst epithelial, mesenchymalisieren aber vor ihrer Differenzierung [9]. Während der Phase, in welcher das Dermomyotom epithelial strukturiert vorliegt, bildet dieses dorsolaterale Zellausläufer, sogenannte Filopodien aus, welche bis an das Ektoderm heran reichen [10].

Im Rahmen der Somitogenese sowie der folgenden dermomyotomalen Epithelialisierungs- und Mesenchymalisierungsprozesse ist ein Zusammenspiel verschiedener Signalproteine unerlässlich. Die Somitenepithelialisierung benötigt ein ektodermales Signal. Die Signalwirkung von ektodermalem Wingless-int-1-6 (Wnt6) ist hierfür hinreichend [11]. Aufgrund der lipophilen Eigenschaft von Wnt6 kann dieses Protein nicht suffizient durch den zwischen dem Ektoderm und den Somiten gelegenen subektodermalen Raum diffundieren, um am DM zu wirken. Unsere Arbeitsgruppe stellte folglich die Hypothese auf, dass die dorsolateralen, dermomyotomalen Filopodien den Kontakt von ektodermalem Wnt6 mit dem dermomyotomalen Wnt-Rezeptor Frizzled7 (Fzd7) ermöglichen, indem sie die Distanz zwischen Ektoderm und Dermomyotom minimieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fzd7 entlang der dermomyotomalen Filopodien in Richtung des Ektoderms in der Zellmembran vorhanden ist [10]. Sollte die Hypothese zutreffen, wären die Filopodien für die Epithelialisierung des Dermomyotoms essenziell, da sie eine Voraussetzung für die Signaltransduktion des hydrophoben ektodermalen Wnt6 im Dermomyotom sind. Folglich würde eine Inhibition der Filopodienbildung auch eine Deepithelialisierung des Dermomyotoms bedeuten.

Für die Filopodien-Genese sind Rat-sarcoma-homologous-GTPasen (Rho-GTPasen) von entscheidender Bedeutung. Im Allgemeinen werden Filopodien durch verschiedene Rho-GTPasen wie Cell-division-cycle-42 (Cdc42) [12] oder RhoD [13] induziert. Bislang konnte bestätigt werden, dass die dermomyotomalen Filopodien von der Rho-GTPase Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate-1 (Rac1)-abhängig sind [10].

In meiner Doktorarbeit wird im ersten Schritt die Wirksamkeit einer durch die Arbeitsgruppe etablierten Methode zur Filopodieninhibition demonstriert (s.u.), indem die Filopodienzahl von mit dieser Methode behandelten Embryonen im Vergleich zur Filopodienzahl einer Kontrollgruppe quantifiziert wird. Im zweiten Schritt erfolgt der deskriptive Vergleich des Dermomyotoms von behandelten Embryonen und Embryonen der Kontrollgruppe.
Es wurden 2,5-3 Tage alte Embryonen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus)* verwendet. Zur Inhibition der Filopodienausbildung wurden Plasmide mit dominant-negativem(dn)Rac1 oder dnCdc42 in 2-3 der kaudal liegenden, neu gebildeten Somiten mittels Elektroporation eingebracht. Um zu zeigen, dass der Effekt auf die elektroporierten Zellen auf die Inhibition von Filopodien zurückzuführen ist und nicht auf unspezifische filopodienunabhängige Effekte, wurde eine Gruppe von Embryonen zusätzlich mit Cofilin oder CofilinS3A (dauerhaft aktivem Cofilin) elektroporiert. Cofilin ist ein weiter stromabwärts der Signalkaskade zur Filopodienbildung wirkendes Protein. Die Filopodien müssten nach Überexpression von Cofilinkonstrukten bei vitalen Zellen nach unserer Hypothese trotz Inhibition von Rac1 und Cdc42 gebildet werden, da die Genese durch Cofilin weiterhin ermöglicht wird. Auf Signalwege unabhängig von der Filopodienbildung hätte Cofilin keinen relevanten Effekt, sodass der *rescue* nicht funktionieren würde. Die Plasmide trugen zusätzlich GFP (green-fluorescent-protein) zur Visualisierung der Transgene. Die Kontrollgruppe wurde ausschließlich mit GFP elektroporiert. Als Test für die Effekte der Experimente auf die Somitenentwicklung wurde die Bildung des Myotoms untersucht. Dafür wurden die Myotomzellen mittels dem Antikörper MF20, welcher Myosin in Muskelvorläuferzellen markiert, immunhistochemisch gefärbt.
Von den behandelten Somiten wurden Vibratomschnitte angefertigt und unter einem konfokalen Lasermikroskop fotografiert.
Für die Quantifizierung wurden die Filopodien verblindet von drei unterschiedlichen Personen händisch ausgezählt und gemittelt. Anschließend erfolgte der Vergleich der Filopodienzahl zwischen den verschiedenen Gruppen.
Im Folgenden wurde das Dermomyotom in den verschiedenen Gruppen qualitativ beurteilt.
Als Ergebnis konnte im Rahmen meiner Doktorarbeit gezeigt werden, dass

- die Elektroporation der Somiten mit dnRac1 zu einer relevanten Verringerung der Filopodienzahl führt
- die Coelektroporation von Cofilin mit dnRac1 zu keiner relevant veränderten relativen Filopodienzahl im Vergleich zur alleinigen Elektroporation mit dnRac1 führt.
- die Coelektroporation von CofilinS3A (dauerhaft aktives Cofilin) mit dnRac1 zu einer relevant höheren relativen Filopodienzahl im Vergleich zur alleinigen Elektroporation mit dnRac1 führt.
- die Elektroporation der Somiten mit dnCdc42 zu keiner relevanten Veränderung der relativen Filopodienzahl führt.

- die Coelektroporation von dnCdc42 und Cofilin zu einer verringerten relativen Filopodienanzahl im Vergleich zur alleinigen Elektroporation mit dnCdc42 führt.
- die Coelektroporation von dnCdc42 und CofilinS3A die relative Filopodienzahl gegenüber der alleinigen Elektroporation mit dnCdc42 erhöht.
- die Inhibition von Rac1 mit der Auflösung der Epithelformation des Dermomyotoms korreliert.
- die Dermomyotomzellen in keiner der untersuchten Elektroporationskonstellationen nach der Elektroporation MF20-Ak-positiv werden.
- der *rescue* der mit dnRac1 oder dnCdc42 elektroporierten Somiten mittels CofilinS3A nicht bei sämtlichen dermomyotomalen Zellen zu einer Wiederherstellung des epithelialen Charakters führt.

Die hier aufgeführten experimentellen Befunde zeichnen ein komplexes Bild, das die Ausgangshypothese, dass die dermomyotomalen Filopodien notwendig für die Wnt-vermittelte Epithelialisierung sind, nicht eindeutig beantworten lässt. Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse lässt sich aber folgern, dass die Inhibition von Rac1 sowohl die Ausbildung von Filopodien im dorsolateralen Dermomyotom in relevantem Maße verringert als auch dazu führt, dass die dermomyotomalen Zellen ihren epithelialen Charakter verlieren. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass die Filopodien für die Signaltransduktion von ektodermalem Wnt6 am Dermomyotom notwendig sind, um den subektodermalen Spalt zu überbrücken. Es kann allerdings durch diese Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von Rac1 auf die Epithelanordnung des Dermomyotoms unabhängig von der Filopodien-Genese erfolgt. Ob eine dermomyotomale Zelle myogenes oder dermatogenes Potential hat, scheint zu dem untersuchten Zeitpunkt hingegen schon festgelegt zu sein, da der Verlust der epithelialen Struktur des Dermomyotoms nicht dazu führt, dass die GFP-positiven Zellen MF20-positiv werden.

Unklar bleibt bisher noch die Frage, welche Effekte der verlorene epitheliale Charakter der dermomyotomalen Zellen auf die weitere Entwicklung des Dermomyotoms hat. So wäre es möglich, dass die mesenchymalisierten Zellen apoptotisch werden. Ebenso wäre es möglich, dass sie zwar vital bleiben, allerdings ihr dermatogenes oder myogenes Potential verlieren. Um zu verstehen, welche Effekte der Verlust des epithelialen Zellcharakters auf die weitere Entwicklung des Dermomyotoms hat, bedarf es weiterer Forschung.

2. Einleitung

2.1. Frühembryonale Entwicklung *in a nutshell*

Nachdem die Eizelle befruchtet wurde, durchläuft sie eine Vielzahl an Zellteilungen. Diese Zellen bilden den zum Dottersack gewandten Hypoblasten und den zum Amnion gewandten Epiblasten aus. Während der Hypoblast in erster Linie die weitere embryonale Differenzierung im Epiblasten induziert, entwickeln sich aus dem Epiblasten, während der Gastrulation, die embryonalen Gewebe [14,15]. Aus dem Primitivstreifen wachsen embryonale Zellen in Richtung des Hypoblasten und bilden das Endoderm [16]. Die dorsal liegenden Zellen bilden das Ektoderm. Embryonale Zellen, die vom Primitivstreifen nach ventral zwischen Ektoderm und Endoderm wandern, bilden das Mesoderm. Sie breiten sich von der Medianlinie nach außen aus [2]. Im Folgenden durchläuft die Keimscheibe eine kraniokaudale und eine laterale Abfaltung. Durch die kraniokaudale Abfaltung wandert unter anderem die kranial des Kopfes liegende Herzanlage vor den Brust- bis Halsbereich des Embryos. Durch die laterale Abfaltung wird die Körperhöhle gebildet. Aus dem paraxialen Mesoderm, also dem Teil des Mesoderms, der direkt lateral an die Chorda dorsalis angrenzt, entwickeln sich die Somiten [1]. Aus ihnen entwickeln sich unter anderem die Wirbelsäule, großer Teile der Skelettmuskulatur sowie der Dermis [5,6,9].

2.2. Anatomie des Hühnerembryos unter dem Lichtmikroskop

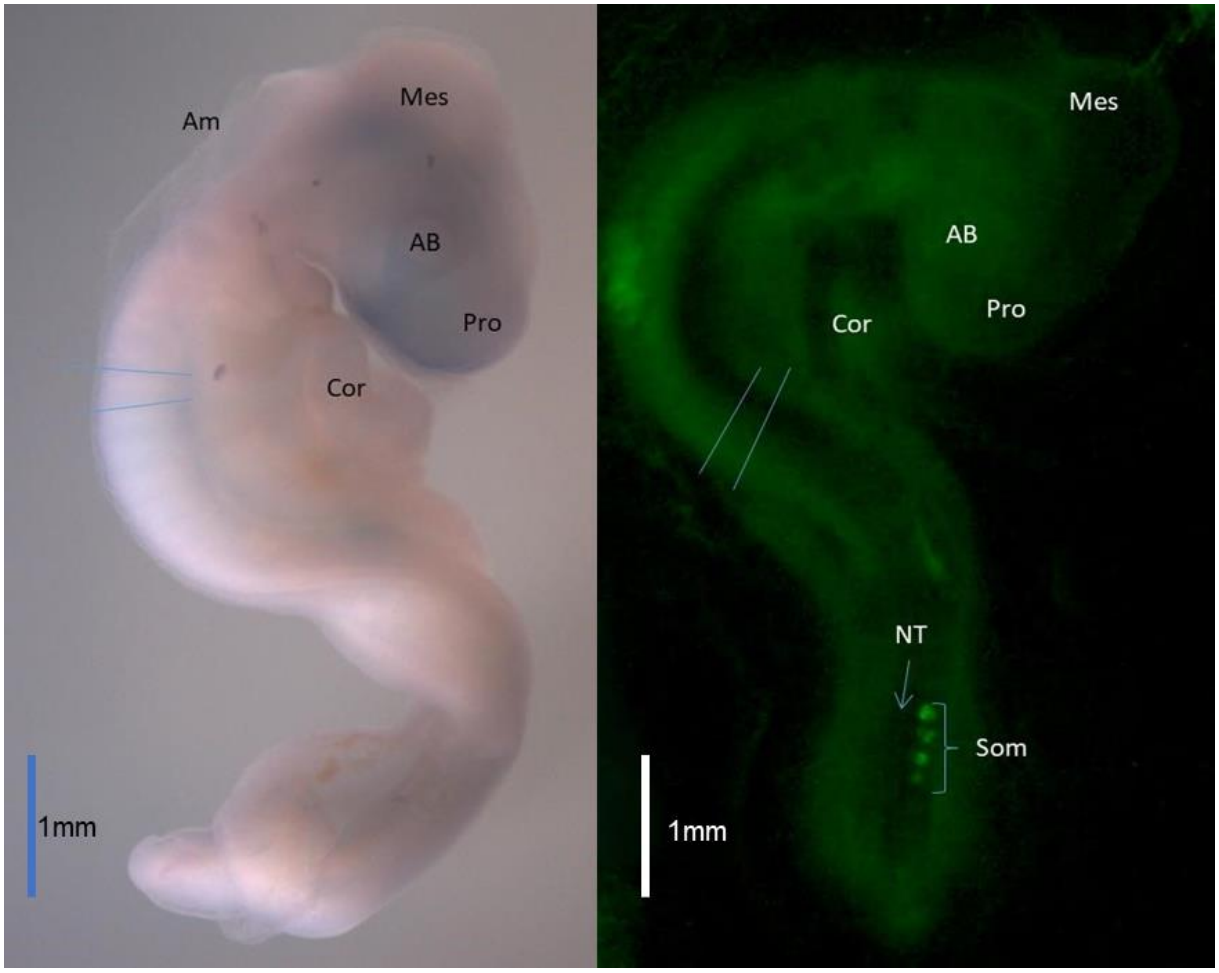


***Abbildung 1**: **unbehandelter, isolierter Hühnerembryo im Stadium HH17**[1]. Die Vitellinmembran wurde vollständig entfernt, das Amnion liegt noch am Embryo an. Der kraniale Abschnitt des Embryos befindet sich am oberen, der kaudale Teil am unteren Bildrand. Der Kopf ist zur rechten Seite rotiert. Der kaudale Anteil des Embryos ist nach der Entnahme aus dem Ei artefiziell übermäßig verdreht.*

***Abbildung 2**: **isolierter Embryo im Stadium HH18** [1] **nach Elektroporation mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP und einer Reinkubation von ca. 4h bei 37,8°C und 16-20h über Nacht bei RT unter dem Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop**. Zum Zeitpunkt der Elektroporation war der Embryo 2,5 Tage alt. Der Kopf befindet sich im oberen Bildabschnitt, der Schwanz am unteren Bildrand. Amnion und Vitellinmembran wurden entfernt. Der kraniale Teil des Embryos ist nach rechts rotiert. Im Gegensatz zum Embryo in Abbildung 1 ist der kaudale Teil lediglich um 90° links rotiert. Das spezifisch angeregte GFP emittiert grünes Fluoreszenzlicht.*

Vier kaudale Somiten wurden mit den Konstrukten dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP elektroporiert. Diese Somiten leuchten stärker.
AB: Augenbläschen; Am: Amnion; Cor: Herz; Mes: Mesencephalon; NT: Neuralrohr; Pro: Prosencephalon; Som: Somiten; Die zwei gezogenen Linien begrenzen ein Segment

Der Grundbauplan des Embryos ist segmental [17]. Gerade zum Kopf hin hat sich die Entwicklung aber evolutionär bedingt stark verändert [18]. Die grundlegende Segmentierung bleibt jedoch erhalten (bspw. bei der Schlundbögenentwicklung) [19]. In der Rumpfentwicklung lassen sich die einzelnen Segmente hingegen noch sehr gut erkennen (ein Segment wurde jeweils mit zwei Linien eingegrenzt). Zu einem Segment gehören je zwei paarige Somiten (Som) links und rechts des Neuralrohrs (NT) [20]. Das Amnion (Am) bildet eine mit Fruchtwasser gefüllte Hülle um den Embryo [21].

2.3. Entwicklung des Dermomyotoms

Während der Somitogenese, d.h. der Somitenentstehung, durchläuft das noch unsegmentierte praesomitische Mesoderm (PSM) den Prozess der mesenchymal-epithelialen Transformation (MET) [22]. Die so neugebildeten Somiten bestehen je aus einem äußeren Epithel, mit nach außen gerichteter Basalmembran, und einem inneren mesenchymalen Anteil, den Somitocoelzellen [20,22,23]. Die Somitogenese wird durch oszillierende Wachstumsfaktoren organisiert. Die exakte Physiologie dieses Vorgangs ist noch nicht abschließend geklärt, doch konnte gezeigt werden, dass die Notch- [24]; Wnt-[25], und FGF-Signalwege [26] eine oszillierende Expression aufweisen und die Segmentierung regulieren. Die Somitogenese läuft von anterior nach posterior, also in Kopf-Schwanz Richtung (kraniokaudal), sodass der am weitesten posterior gelegene Somit immer der jüngste ist. [23]. Aus den Somiten entstehen unter anderem das Rumpfskelett, ein Großteil der Skelettmuskulatur, Bindegewebe und ein Teil der Dermis [5,7-9](Übersicht in [3,27]). Als erstes bildet sich aus dem ventromedialen Teil des Somiten das Sklerotom, aus dem sich wiederum das Rumpfskelett entwickelt. Die Sklerotomzellen durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transformation (EMT). Dabei wandern die Zellen aus dem Epithelverband in Richtung der Chorda dorsalis und bilden dort die Wirbelkörper sowie die Wirbelbögen, die Rippen und den intervertebralen Bandapparat [4,5,28]. Der restliche Teil des Somiten verbleibt epithelial als Dermomyotom (DM). [28]; (Übersicht in [29]).

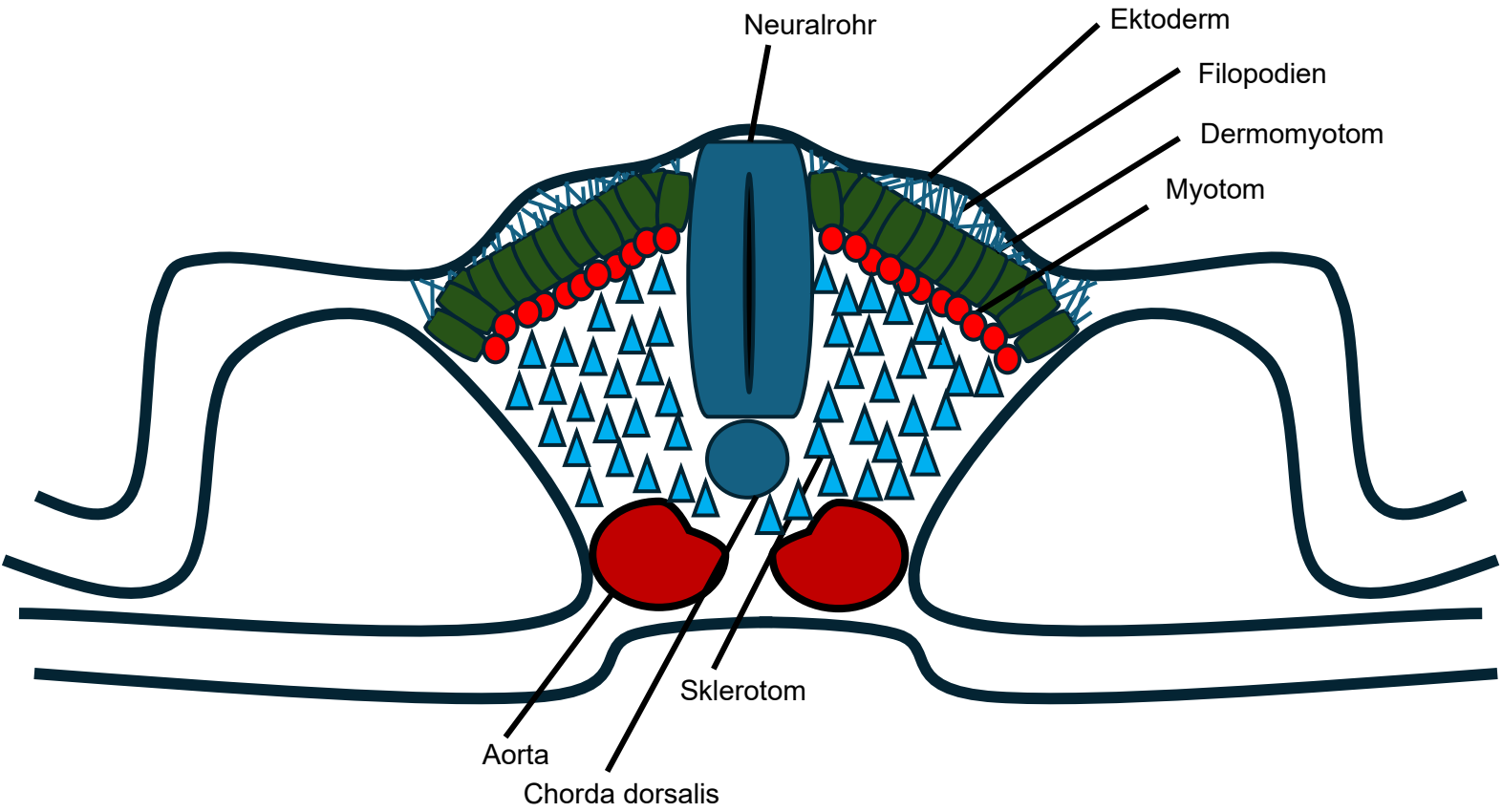


***Abbildung 3**: **Schematische Übersichtsskizze eines Transversalschnittes durch einen Embryo mit zu Dermomyotom, Myotom und Sklerotom differenzierten Somiten.** Die Somiten liegen lateral des Neuralrohrs. Das epitheliale Dermomyotom bildet dorsolaterale Filopodien aus, die sich in den subektodermalen Raum erstrecken. Diejenigen Dermomyotomzellen, die eine myogene Entwicklung durchlaufen, mesenchymalisieren, wandern nach ventromedial und bilden das Myotom [6]. Der am weitesten ventral gelegene Anteil der Somiten ist das Sklerotom. Es mesenchymalisiert und wandert nach ventromedial, um in der weiteren Entwicklung das Rumpfskelett zu bilden [4,5,28]. Ventral der Chorda dorsalis liegt die paarig angelegte Aorta [30].*

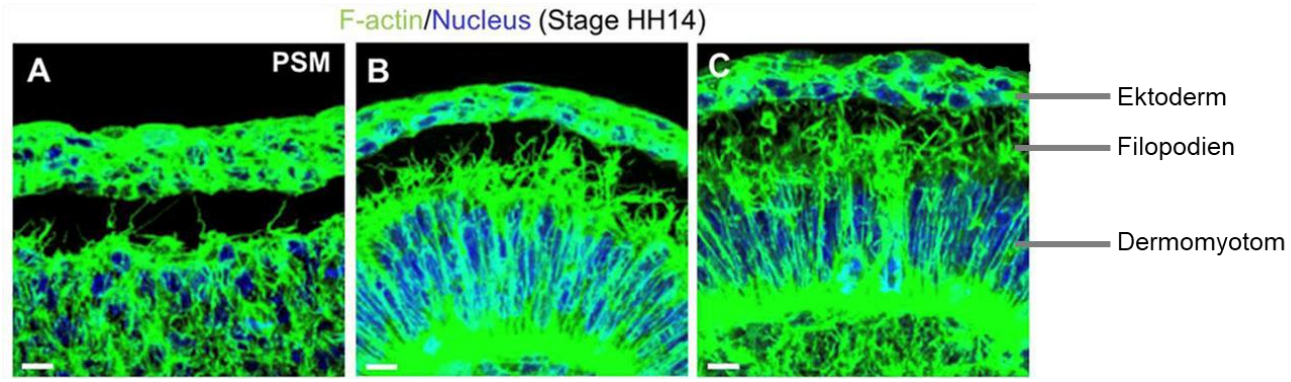


***Abbildung 4**: **Sagittalschnitt eines Embryos (HH14 [1]) in verschiedenen Stadien der Somitenentwicklung; A)** Die Zellen des praesomitischen Mesoderms (PSM)*

*bilden wenige Filopodien in Richtung des dorsalen Ektoderms. Im epithelialen Somiten (**B+C**) erkennt man deutlich Filopodien, die vom ventral gelegenen Dermomyotom durch den subektodermalen Raum bis zum dorsal gelegenen Ektoderm reichen [10]. Aus Sagar, et al., Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. Development, 2015. 142(4): p. 665-71.*

An den epithelialen Grenzen des DM kommt es zu einer stufenweisen Bildung des Myotoms unter dem Dermomyotom (**Abb.3**). Nachdem die ersten myotomalen Zellen von der dorsomedialen dermomyotomalen Lippe (DML) gebildet werden, folgen die anteriore (AL), die posteriore (PL) und zuletzt die ventrolaterale Lippe (VLL). Die Muskelvorläuferzellen wandern unter das Demomyotom, verlängern sich bis an die anterioren und posterioren Somitengrenzen und bilden so das primäre Myotom [6].Die Zellen der DML verhalten sich wie ein Blastem. Sie wandern entweder in das Myotom und vollziehen eine myogene Entwicklung oder verbleiben epithelial und proliferieren weiter als zeitlich begrenzte Quelle weiterer myogener Zellen [31,32]. Als wichtiges Signalprotein für die Myotombildung konnte in der DML u.a. Notch ausgemacht werden. Der Notch-Signalweg wird durch Delta-1-exprimierende Neuralleistenzellen, die von der Neuralplatte zum Somiten wandern, mittels eines *kiss-and-run*-Mechanismus aktiviert. Die Zellen, bei denen der Notch-Signalweg aktiviert ist, starten die myogene Entwicklung und migrieren in das Myotom [33]. Die ebenfalls im Neuralrohr gebildeten Proteine Wnt1 und Wnt3a haben koordinierende Funktionen [34]; [35]; [36]. Aus dem Myotom bildet sich die epaxiale sowie die hypaxiale Rumpfmuskulatur heraus [7,8]. Der epithelial verbleibende zentrale Teil des DMs bildet die Grundlage der späteren Dermis des Rückens, und liefert zudem eine zweite Welle von zukünftigen Muskelzellen [9,37]. Die noch epithelial verbliebenen VLL und DML dienen als Proliferationszonen, sorgen also für eine kontinuierliche Myotombildung [31]. Erst zum Ende der Somitenentwicklung mesenchymalisieren auch VLL und DML [6]. Für die korrekte MET und EMT ist ein Zusammenspiel von verschiedenen Signalproteinen, allen voran Wnt und Sonic-hedgehog (Shh), unerlässlich [37].

2.4. Somitenepithelialisierung

Es wurde gezeigt, dass Wnt-Signale entscheidend für die Epithelialisierung von Somiten sind. Burgess et al. [38] konnten diesen Zusammenhang über den *knock-out (k.-o.)* des Basic-helix-loop-helix(bHLH)-Transkriptionsfaktors Paraxis in Mäusen nachweisen. Der Transkriptionsfaktor Paraxis wird durch den Wnt-Signalweg reguliert [39]. Bei den Mäusen, die das *k.-o.*-Paraxis exprimierten, fand keine Somitenepithelialisierung statt (***Abb.5***) [38]. Sinkt die Wnt-Aktivität, sinkt auch die Paraxis-Aktivität [39]. Dies hat eine verringerte Somitenepithelialisierung zur Folge [38]. Auch Schmidt et al. [11] beschrieben in einem 2004

erschienenen Paper, dass die Somitenepithelialisierung ein ektodermales Signal benötigt, und dass Wnt6-Applikation das Fehlen des Ektoderms kompensieren kann, was für eine Rolle von ektodermalem Wnt6 bei der Somitenepithelialisierung spricht. Eine Ausnahme der ektodermalen Abhängigkeit stellt der dorsomediale Teil des Somiten dar, welcher abhängig von Signalproteinen aus dem medial des Dermomyotoms liegenden Neuralrohr ist. Bei Abschirmung des Ektoderms ließ sich eine fehlende Somitenepithelialisierung feststellen. Nur der oben beschriebene dorsomediale Anteil des Dermomyotoms verbleibt epithelial. Als Nachweis für die Abhängigkeit der Somitenepithelialisierung von Wnt6 wurde die Transkription des weiter *downstream* von Wnt6 liegenden Signalproteins Paraxis quantifiziert. Die Paraxis-Transkription war bei Abschirmung des Ektoderms reduziert, sodass eine epithelialisierende Wirkung von Wnt6 anzunehmen ist (**Abb.6; Abb.7**) [11].

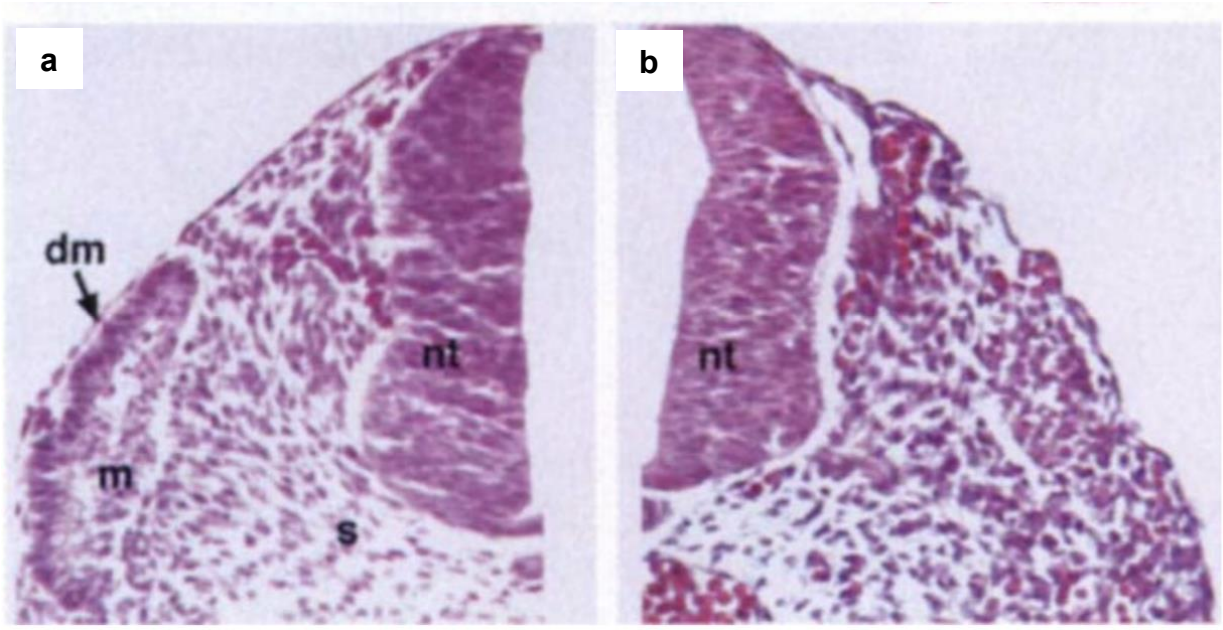


Abbildung 5: Transversalschnitt durch die Schwanzregion (a) eines Mausembryos (Stadium E11.5) vom Wildtyp beziehungsweise (b) eines Embryos mit einer knock-out Paraxis-Mutation in Haematoxylin-Eosin-Färbung*; **(a)** Das Dermomyotom (dm) und Myotom (m) sind beim Wildtyp regelhaft epithelial ausgebildet; Bei der mutierten Variante (k.-o. Paraxis) **(b)** gibt es diese organisierte dermomyotomale Struktur nicht [38]. Aus Burgess, R., et al., Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. Nature, 1996. **384**(6609): p. 570-3.*

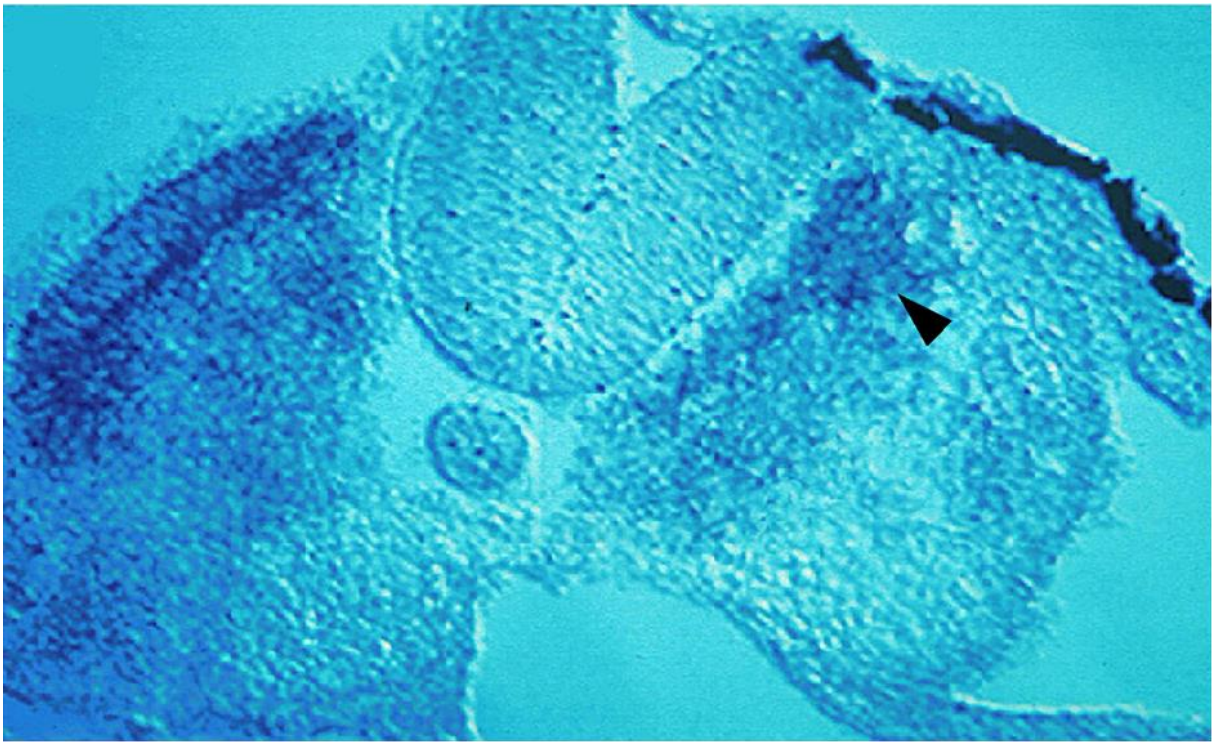


Abbildung 6: Transversalschnitt eines 3 Tage alten Hühnerembryos nach einseitiger Ektodermentfernung und in-situ Hybridisierung gegen Paraxis*. Das Ektoderm auf der rechten Bildseite wurde entfernt und durch Goldfolie ersetzt. Das Ektoderm auf der linken Bildseite hingegen wurde belassen. Während auf der linken Seite eine regelhafte Somitenepithelialisierung und Paraxis-Expression vorliegt, ist auf der rechten Seite keine Epithelialisierung erkennbar. Die Paraxis-Expression ist dort (Markierung durch Pfeilspitze) vermindert [11]. Aus Schmidt, C., et al., Wnt 6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. Dev Biol, 2004.* ***271****(1): p. 198-209.*



***Abbildung 7**: **Transversalschnitt durch einen 3 Tage alten Hühnerembryo nach einseitiger Ektodermresektion, rescue durch Implantation Wnt6-produzierender Zellen und anschließender Reinkubation (18h)**. Darstellung der Expression von Paraxis durch in-situ Hybridisierung; Infolge des rescues mittels Wnt6-produzierender Zellen ist die Paraxis-Expression gegenüber dem Versuchsaufbau in Abb.6 erheblich erhöht (siehe Pfeilspitze). Die Goldfolie, die an die Stelle des Ektoderms platziert wurde, ist hier bereits entfernt [11]. Aus Schmidt, C., et al., Wnt6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. Dev Biol, 2004. **271**(1): p. 198-209.*

Im weiteren Verlauf der dermomyotomalen Entwicklung wird der Wnt6-Einfluss auf den medialen Anteil des Dermomyotoms durch in der dorsomedialen Lippe exprimiertes Wnt11 gehemmt. Die epithelialisierende Wirkung von Wnt6 findet folglich nur noch im lateralen DM an der VLL statt. Wnt11 wirkt jedoch ebenfalls epithelialisierend und übernimmt diese Funktion in der DML. Die Wnt11-Expression wird durch Wnt1 und Wnt3a aus dem Neuralrohr induziert [40,41]. Die Signaltransduktion erfolgt durch migrierende Neuralleistenzellen [42]. Nach dieser Signalkaskade mit Ursprung im Neuralrohr wirkt Wnt11 epithelialisierend auf die DML, Wnt6 epithelialisierend auf die VLL. Diese Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass es sich bei den in Schmidt et al. [11] beschriebenen Signalproteinen medialen Ursprungs um Wnt1 und Wnt3a handelt, wodurch Wnt11 im

medialen Dermomyotom exprimiert wird. Der Wnt11-abhängige mediale Teil des Dermomyotoms ist Wnt6-unabhängig und behält seine epitheliale Struktur folglich auch bei Ektodermentfernung bei [41].

Im nächsten Schritt können zuerst myotomale Vorläufer aus den dermomyotomalen Lippen und später dermale Vorläufer aus dem zentralen DM mesenchymalisieren [6,37] . Im Verlauf kann Wnt11 nicht nur im dorsomedialen Somiten, sondern auch im subektodermalen Mesenchym [40], insbesondere im Bereich zwischen DML und NT, nachgewiesen werden [37]. In Myotom und Sklerotom hingegen lässt sich keine relevante Wnt11-Expression beobachten [40]. Wnt11 scheint mit seiner Funktion folglich eine entscheidende Rolle in der dermalen Genese einzunehmen [37]. Die Dermisentwicklung findet mit einem zeitlichen Gefälle von kranial nach kaudal und von medial nach lateral statt [37,43]. Während die medialen dermalen Progenitorzellen auch bei ihrer Mesenchymalisierung Wnt11 exprimieren, findet sich im lateralen Bereich der Dermis-Anlage der Marker des zentralen DM und Transkriptionsrepressor Engrailed1 (En1), von dem man zwar weiß, dass er abhängig vom Ektoderm ist, dessen aktivierender Faktor allerdings unbekannt ist [37]. Es wurde bereits gezeigt, dass En1-exprimierende Zellen des zentralen Dermomyotoms (CD) eine führende Rolle in der Dermisentwicklung einnehmen [44]. Wnt-Proteine scheinen nicht nur bei der Epithelialisierung und der folgenden zeitlich versetzten CD-Mesenchymalisierung eine maßgebliche Rolle zu spielen, sondern auch bei der Differenzierung des Zellschicksals innerhalb des CD. Nicht alle En1-exprimierenden Zellen im CD differenzieren zur Dermis. Ein Teil differenziert zu Muskelzellen (Myogenin positiv) der epaxialen Muskulatur, ein Teil zu braunem Fettgewebe. Der Anteil der Dermo-1-exprimierenden Zellen (später dermale Zellen) korreliert positiv mit der β-Catenin-Aktivität im CD. Bei Embryonen mit *β-Catenin-gain-of-function* Mutation nimmt der Anteil der Myogenin exprimierenden Zellen hingegen signifikant ab. Die dermale Differenzierung innerhalb des CD ist folglich Wnt-abhängig [45].

Während Einigkeit darüber herrscht, dass der Großteil der dorsalen dermalen Vorläuferzellen aus dem CD des medialen Somiten stammt, bestehen noch Differenzen in der Frage, welche Bereiche noch beteiligt sind. Olivera Martinez et al. [37] haben gezeigt, dass die dermalen Vorläuferzellen aus dem CD, aber auch, für die Dermis über dem Neuralrohr, aus der DML stammen.

In einer anderen Versuchsreihe wurde beobachtet, dass die Zellen aus der DML in das CD wandern und dort anfangen *En1* zu exprimieren. Von dort aus können sie sich weiter zur Dermis differenzieren [46].

Eine Dritte Versuchsreihe zeigte hingegen, dass die dermalen Vorläufer sowohl aus dem medialen als auch aus dem lateralen Teil zentralen Dermomyotoms stammen [47]. Das dorsomediale Mesenchym, welches laut Olivera-Martinez et al. [37] seinen Ursprung in der DML

hat und die Dermis über dem Neuralrohr bildet, würde hingegen sklerotomalen Ursprungs sein und im Verlauf an der Bildung der Wirbelkörper beteiligt sein. Die Dermis über dem Neuralrohr entspringe hingegen aus dem medialen DM [47].

2.4.1. Der kanonische Wnt-Signalweg

Neben dem kanonischen Wnt-Signalweg existieren mehrere nicht-kanonische Signalwege, wie beispielsweise der Ca^{2+}-abhängige oder der V-Jun-N-terminale-Kinase (JNK)-aktivierende Signalweg (*reviewed* durch [48]). Im Gegensatz zum kanonischen Signalweg sind die nicht kanonischen in ihrer Funktionsweise nur unzureichend verstanden und werden von mir deshalb nur kurz behandelt.

Im ersten Schritt des kanonischen Wnt-Signalweg bindet das Wnt-Protein an eine cysteinreiche Domäne des Frizzled(Fzd)-Co-Rezeptors, einem 7-Transmembrandomänen-Protein an der Zellmembran [49,50]. Der Fzd-Co-Rezeptor bildet einen Komplex mit dem Low-density-lipoproteinreceptor-related-protein-5-and-6 (Lrp5/6), einem single-transmembrane-domain-protein [51]. Kelly et al. [52] demonstrierten, dass Lrp5 und Lrp6 in ihrer Funktion identisch sind. Nach der Aktivierung des Fzd-Lrp5/6-Komplexes durch Wnt-Bindung, findet eine Phosphorylierung von Lrp5/6 durch die Casein-Kinase-1-gamma (CK1γ), die als *Primer* des kanonischen Wnt-Signalwegs fungiert, statt [53]. Dadurch wird die Rekrutierung von Axin zum Rezeptorkomplex gefördert [54]. Sowohl die CK1γ als auch Axin sind Teil des β-Catenin-Destruction-Komplexes [55].

Dieser setzt sich unter anderem aus den eben genannten CK1γ, Axin sowie der Glycogensynthasekinase-3-beta (GSK3β) und dem Protein Adenomatous-polyposis-coli (APC) zusammen [55]. Ist der Destruction-Komplex aktiv, wird β-Catenin an verschiedenen Serin/Threonin-Residuen durch die GSK3β sowie die CK1γ phosphoryliert [56]. Das polyphosphorylierte β-Catenin wird vom Enzym3 des Ubiquitinierungskomplexes erkannt und aufgrund der folgenden Ubiquitinierung proteasomal abgebaut [57]. Bindet allerdings der in der Plasmamembran lokalisierte Wnt-Fzd-Lrp6-Komplex am Destruction-Komplex, wird dieser in seiner Gänze Signalosom genannte Proteinkomplex gehemmt. Die genaue Physiologie dieser Hemmung ist noch nicht vollständig verstanden [54].

Allerdings gibt es einige Arbeiten, die eine Hemmung der GSK3β durch Phosphorylierung vermuten lassen. Durch diese Inhibition wird die zelluläre Destruction-Komplex-Aktivität herabgesetzt und mündet in einer erhöhten Aktivität des β-Catenins [58,59]. Als verstärkender Faktor für die β-Catenin-Stabilisierung dient Dishevelled, das zur Clusterbildung der Wnt-Rezeptorkomplexe beiträgt [54]. Das β-Catenin wandert in den Zellkern und stimuliert durch Bindung an Transkriptionsfaktoren, wie dem Lymphoid-Enhancer-Binding-Factor-1 (LEF1), die Transkription spezifischer Gene [60]. Zu den durch β-Catenin aktivierten Transkriptionsfaktoren gehört auch Paraxis [39]. Durch *knock-out* Studien an Mäusen konnte

gezeigt werden, dass der durch β-Catenin aktivierte bHLH-Transkriptionsfaktor Paraxis für die Somitenepithelialisierung notwendig ist [38].

2.5. Kleine Rho-GTPasen

Cdc42 und Rac1 gehören zu zwei von 20 verschiedenen in Säugetieren vorkommenden Subfamilien der Rho-GTPasen-Familie [61]. Alle Angehörigen dieser Familie eint ein CAAX-Motiv am C-Terminus, der posttranslational prenyliert wird und so die Lokalisation an der Zellmembran ermöglicht [62].

GTPasen sind Proteine, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einnehmen. Sie liegen in aktiver, GTP-bindender, oder inaktiver, GDP-bindender, Form vor. Beim Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand sind Guanine-nucleotide-exchange-factors (GEF), beim Wechsel vom aktiven in den inaktiven Zustand GTPase-activating-proteins (GAP) aktiv. GEFs und GAPs nehmen bei der GTPase-Signaltransduktion eine regulierende Funktion ein. Als zusätzlich regulierende Faktoren sind die Rho-guanine-nucleotide-dissociation-inhibitors (GDI) zu nennen. Sie binden an Isoprenylgruppen der G-Proteine und lösen diese somit von Plasmamembranen. Dies verhindert die Bindung von Signalen an dessen Rezeptoren (**Abb. 8**) [63].

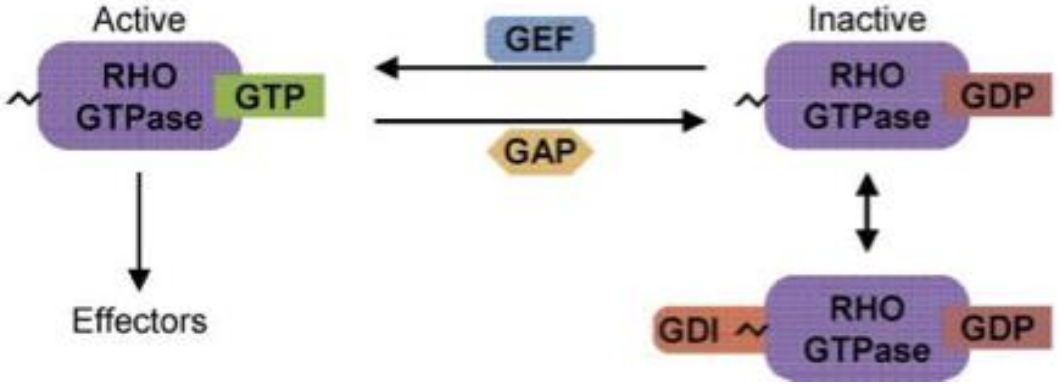


***Abbildung 8: Funktionsschema von Rho-GTPasen**. Bindet die Rho-GTPase GTP, ist sie aktiviert, bindet sie GDP, ist sie inaktiv. Der Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand wird durch GEFs verstärkt induziert, der Wechsel vom aktiven in den inaktiven Zustand durch GAPs. GDIs schirmen Rho-GTPasen von der Umgebung ab und wirken so inaktivierend [63]. Aus Lawson, C.D. and A.J. Ridley, Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. J Cell Biol, 2018. **217**(2): p. 447-457*

Die Familie der Rho-GTPasen hat in Signalwegen zur Regulation der Aktinfilamentsynthese im Rahmen von beispielsweise Zellmigration, Epithelialisierung, Filopodien- und Lamellipodienbildung, eine regulatorische Funktion, die in zahlreichen Publikationen

ausführlich behandelt wurde (siehe unter anderem [63-65]). In meiner Doktorarbeit lege ich das Augenmerk auf die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 und insbesondere auf ihren Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) und mesenchymal-epitheliale Transformation (MET) sowie die Filopodienausbildung der Somiten.

2.6. Wirkung von GTPasen im Rahmen der Somitenepithelialisierung

Die Rho-GTPasen spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Somitenepithelialisierung.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Cdc42-Inhibition durch Überexpression des stromab von Cdc42 liegenden Faktors Neural-Wiskott-Aldrich-syndrome-protein (N-WASP) zu einer Überepithelialisierung des Somiten führt. Eine dauerhafte Cdc42-Aktivierung hingegen verhindert die mesenchymal-epitheliale Transformation des Somiten und fördert den mesenchymalen Charakter der Zellen [66].

Rac1 scheint nur in einem bestimmten Aktivitätskorridor die Somitenepithelialisierung zu fördern. Sowohl eine dauerhafte Aktivierung als auch die Expression von dominant-negativem Rac1 (Inhibition) stören die Epithelbildung des Somiten. [66].

Mit unserer Forschungsarbeit konnten wir zeigen, dass die Überexpresssion von dnRac1 im Somiten zu einer Verringerung der Filopodienbildung im Dermomyotom führt (**Abb.9**) [10].

Überdies zeigten *in-vitro* erhobene Daten, dass die Rho-GTPasen im Allgemeinen zu einem überwiegenden Teil epithelialisierend, beispielsweise durch Förderung der Cadherin- [67,68] oder Metalloproteinasen- [69] vermittelten Zell-Zell-Adhäsionen, wirken.

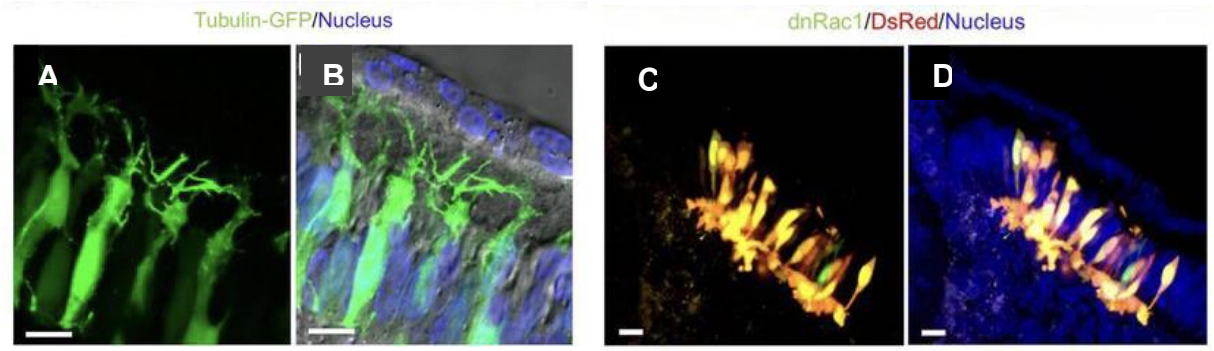


Abbildung 9: Dermomyotomale Zellen eines Hühnerembryos (HH18 [1]) unter dem Fluoreszenzmikroskop. *Die dermomyotomalen Zellen wurden mit Tubulin-GFP (green-fluorescent-protein) [(A),(B)] beziehungsweise dominant-negativem Rac1 (dnRac1) und pCAG-DsRed [(C),(D)] elektroporiert. Bei (B) und (D) wurden die Zellkerne anschließend zusätzlich mit 4´-6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Diejenigen dermomyotomalen Zellen, welche ausschließlich mit Tubulin-GFP elektroporiert wurden*

(A und B), bilden Filopodien aus, welche sich in den subektodermalen Raum erstrecken. Dermomyotomale Zellen, welche mit dnRac1 (grün fluoreszierend) und DsRed (rot fluoreszierend) elektroporiert wurden (C und D), bilden hingegen keine Filopodien aus. Durch die Anfärbung der Kerne in (B) und (D) ist das Ektoderm sichtbar [10]. Aus Sagar, et al., Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. Development, 2015. ***142****(4): p. 665-71.*

2.7. Cdc42 und Rac1-Wirkung auf den Wnt-Signalweg während der Somitenepithelialisierung

Wie bereits oben beschrieben, gilt es allgemein als akzeptiert, dass die Somitenepithelialisierung abhängig von Wnt-Signalen aus dem Ektoderm ist [11]. Als epithelialisierender Transkriptionsfaktor stromab des Wnt-Signalwegs konnte Paraxis identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass die Rac1-Inhibition eine verringerte Paraxis-Aktivität zur Folge hat. Für die Wirkung von Cdc42 auf Paraxis gibt es bislang noch keine veröffentlichten Daten. Die Korrelation von Rac1-Inhibition und verringerter Paraxis-Aktivität lässt die Hypothese zu, dass die Regulation der Somitenepithelialisierung mittels Rho-GTPasen über die Aktivitätssteuerung von Paraxis geschieht [66].

Über welche Mechanismen die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 auf die Expression von Paraxis wirken, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. Im Folgenden werde ich einige vielversprechende Ansätze aufzeigen, die eine mögliche Brücke zwischen den Signalwegen von Rho-GTPasen und dem bHLH-Transkriptionsfaktor Paraxis schlagen können und so die teilweise gegensätzlichen Funktionen in der Somitogenese erklären könnten.

2.8. Mesenchymalisierende Wirkung

2.8.1. IQGAP1

Eine mögliche Erklärung für die mesenchymalisierenden Eigenschaften von Cdc42 und Rac1 liefert der hemmende Einfluss der GTPasen auf das Struktur-Protein IQGAP1 [70].

IQGAP1 interagiert in epithelialen Zellen mit β-Catenin und sorgt so für die Dissoziation des β-Catenin-Cadherin-Komplexes von α-Catenin [70]. Das frei vorliegende β-Catenin kann zytoplasmatisch akkumulieren, in den Zellkern gelangen und Paraxis aktivieren [39]. Zusätzlich steigert IQGAP1 ebenjene β-Catenin-abhängige Transkriptions-Coaktivierung [71]. Cdc42 und Rac1 können also über Inhibition von IQGAP1 mesenchymalisierend wirken. Als Kritik an dieser Hypothese ließe sich anführen, dass die komplexlösende Wirkung bei Fukata et al. [70] nur bei E-Cadherin-β-Catenin-α-Catenin-Komplexen gezeigt

wurde. Die Funktion des E-Cadherins als epithelialer Strukturgeber wird im Somiten allerdings durch N-Cadherin ausgeführt [72]. Zwar bildet auch das im Somiten vorkommende N-Cadherin zelladhäsive Komplexe mit β-Catenin und α-Catenin aus [73] und hat im Prozess der Osteoblastengenese eine inhibierende Wirkung auf den β-Catenin-Wnt-Signalweg. Jedoch wird dieser Effekt mit einer N-Cadherin-abhängigen Destruction-Komplex-Aktivierung erklärt. Ob IQGAP1 auch im Somiten eine komplexlösende Wirkung besitzt, bleibt folglich fraglich [74].

Ebenso muss angemerkt werden, dass Cdc42 auch eine oligomerisierende Wirkung auf IQGAP1 hat und durch diesen Mechanismus die epitheltypische Aktinbündelung fördern kann [75], was wiederum der mesenchymalisierenden Funktion entgegenwirken würde. Ebenso verhält es sich mit den Ergebnissen von Watanabe et al. [76]. Sie konnten zeigen, dass IQGAP1 in *Vero*-Zellen einen ternären Komplex mit Rac1/Cdc42 und APC (Teil des Destruction-Komplexes) bildet. Dies steigert die Aktinnetzwerkstabilität [76].

Die aktivierende Wirkung von IQGAP1 auf β-Catenin hingegen bliebe bei diesen Beobachtungen bestehen.

2.9. Epithelialisierende Wirkung

Der mesenchymalisierenden Wirkung, während der Somitogenese, stehen die epithelerhaltende Wirkung nach der MET sowie die allgemein eher zell-zelladhäsionsfördernde Wirkung von Cdc42 und Rac1 gegenüber.

2.9.1. Rac1-abhängige JNK-Aktivierung

Neben der Wirkung über IQGAP1 beeinflusst Rac1 den Wnt-Signalweg auch direkt. Es konnte gezeigt werden, dass Rac1 den JNK-Wnt-Signalweg reguliert. Über den genauen Regulationsmechanismus herrscht hingegen noch Uneinigkeit [77,78].

So konnten Wu et al. [77] in einer Versuchsreiche an ST2-Zellen die Wnt3a abhängige Rac1-Aktivierung demonstrieren, die wiederum über Hochregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs (β-Catenin) den Transkriptionsfaktor LEF1 aktiviert. Der beobachtete Effekt wurde auf die C-jun-N-terminal-Kinase-2 (JNK2) (zu einem geringen Teil auch JNK1) zurückgeführt. Rac1 aktiviert diese Kinasen und führt so zur Phosphorylierung an den Phosphatbindungsstellen S191 und S605 des β-Catenins, dessen Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Kern nach Phosphorylierung *in-vitro* signifikant erhöht wird [77]. Phelps et al. [78] konnten in Zellen der SW-480-Colon-cancer-Zelllinie demonstrieren, dass die β-Catenin-Konzentration im Zellkern von Zellen, bei denen die Phosphatbindungsstellen S191 und S605 des β-Catenin blockiert wurden, signifikant

abnimmt. In einer Kontrollgruppe mit intakten Phosphorylierungsstellen konnte diese Abnahme nicht registriert werden. Gleiche Effekte wie die Phosphorylierungsinhibition an β-Catenin, erhielt die Gruppe bei Rac1-Inhibition. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese der Rac1-abhängigen JNK2-Aktivität [78].

2.9.2. Rac1-LEF1-Komplexe

Doch gibt es immer wieder Daten, die die Beobachtungen von Phelps et al. [78] und Wu et al. [77] in Frage stellen. So konnten Myant et al. [79] zeigen, dass die β-Catenin-Akkumulation im Zellkern von APC-deletierten Zellen bei Rac1-Deletion nicht, wie es die Ergebnisse von Phelps et al. [78] und Wu et al. [77] vermuten ließen, inhibiert wurde. Sie verorteten den proliferativen Effekt von Rac1 unterhalb von Wnt im Wnt-Signalweg. Eine konkretere Hypothese stellten Jamieson et al. [80] auf. Sie konnten bei der Untersuchung von Zellen der SW-480-Colon-cancer-Zelllinie, die mit an S191 und S605 inaktiviertem β-Catenin transfiziert wurden, keinen signifikanten Unterschied in der β-Catenin-Konzentration des Zellkerns feststellen. Auch bei der β-Catenin-Importrate in den Nucleus war kein Unterschied ersichtlich [80].

Sie vermuteten hingegen, dass eine Rac1-Aktivierung den Komplex aus β-Catenin und dem weiter unterhalb liegenden Transkriptionsfaktor LEF-1 stabilisiert und so den Wnt-Signalweg hochreguliert. Konsistent mit dieser Vermutung zeigte sich, dass die β-Catenin-LEF1-Komplexbildung im Zellkern von Zellen, die dauerhaft aktives Rac1 exprimieren, bei Wnt-Stimulation signifikant mehr Komplexe gebildet werden als in Zellen des Wildtyps. Außerdem ließ sich bei Rac1-Aktivierung eine verringerte Plasmamembranständigkeit von β-Catenin-Rac1-Komplexen beobachten [80].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Rac1 eine Rolle dabei spielt, die Aktivität des Wnt-Signalwegs zu fördern. Die exakte Physiologie dieses Prozesses ist allerdings noch nicht vollumfassend verstanden und bedarf weiterer Forschung.

Die oben beschriebenen Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass Rac1 auch im Somiten die JNK2-abhängige Phosphorylierung von β-Catenin unterstützt, dadurch den nukleären Transport des β-Catenins fördert und schlussendlich über Paraxis-Aktivierung die Epithelialisierung der Somiten erhält. Auch die vermehrte Bildung und Stabilisierung von β-Catenin-Paraxis-Komplexen durch Rac1 wäre für den Epithelerhalt denkbar. Hierzu muss allerdings angemerkt werden, dass diese Einflüsse bislang nur bei Zellen der SW-480-Colon-cancer-Zelllinie mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 gezeigt wurden und eine direkte Übertragbarkeit auf Paraxis im Somiten nicht ohne Weiteres erfolgen kann. Ebenso undurchsichtig bleibt die Funktion von Cdc42, da die Modifikation dieser Rho-GTPase keinerlei Veränderung in den betrachteten Parametern aufgewiesen hat [77-80].

2.10. Dermomyotomale Filopodien

Neben Mechanismen wie Diffusion oder vesikulärem Transport konnte ein neuer Weg der interzellulären Signaltransduktion aufgedeckt werden: die Zell-Zell-Kommunikation über Filopodien. Nachdem sie in *wing-imaginal-discs* von Drosophila beschrieben wurden [81], fand man Filopodia-like-protrusions (FiLiPs) auch im dorsalen Bereich des Dermomyotoms. Diese FiLiPs werden Rac1-abhängig gebildet. Die Elektroporation von Somiten mit dnRac1 führt zu einer Verminderung der Filopodienbildung im Dermomyotom des Somiten (**Abb.9**) [10]. Filopodien-, bzw. Zellprotrusionsinduktion generell wird durch verschiedene Rho-GTPasen gesteuert, wie Cdc42 [12] oder RhoD [64].

Die Filopodieninduktion durch Rho-GTPasen fußt auf verschiedenen Mechanismen. Elementarer Bestandteil von FiLiPs sind Bündel von Aktinfilamenten, die unter anderem Transportfunktionen übernehmen [10]. Aktinfilamente befinden sich in einem steten Auf- und Abbauprozess. Ein stabiles Aktinfilament ist dementsprechend ein *steady-state*, in dem sich Auf- und Abbau die Waage halten (**Abb. 10**) [82]. Bei der Aktinfilamentsynthese wird ein ATP-bindendes Aktinmonomer auf eine Aktinmonomerkette übertragen. Zwar kann auch Aktin-ADP auf ein Aktinpolymer übertragen werden, die Wahrscheinlichkeit der Polymerisierung sinkt jedoch beträchtlich [83]. Der Auf- bzw. Abbau wird durch Nucleation-promoting-factors *(reviewed* in [84]) respektive Depolymerisation-factors, wie beispielsweise dem Actin-depolymerizing-factor (ADF), reguliert [85]. Die Rho-GTPasen können die Aktinpolymerisation über Aktivierung von Nucleation-promoting-factors, wie dem Actin-related-protein-2/3 (Arp2/3)-Komplex steigern [86,87]. So konnte in COS-7-Zellen gezeigt werden, dass Cdc42 die Filopodienbildung steigert, indem es an N-WASP bindet [88]. N-WASP wiederum bindet an den Arp2/3-Komplex und aktiviert diesen [89].

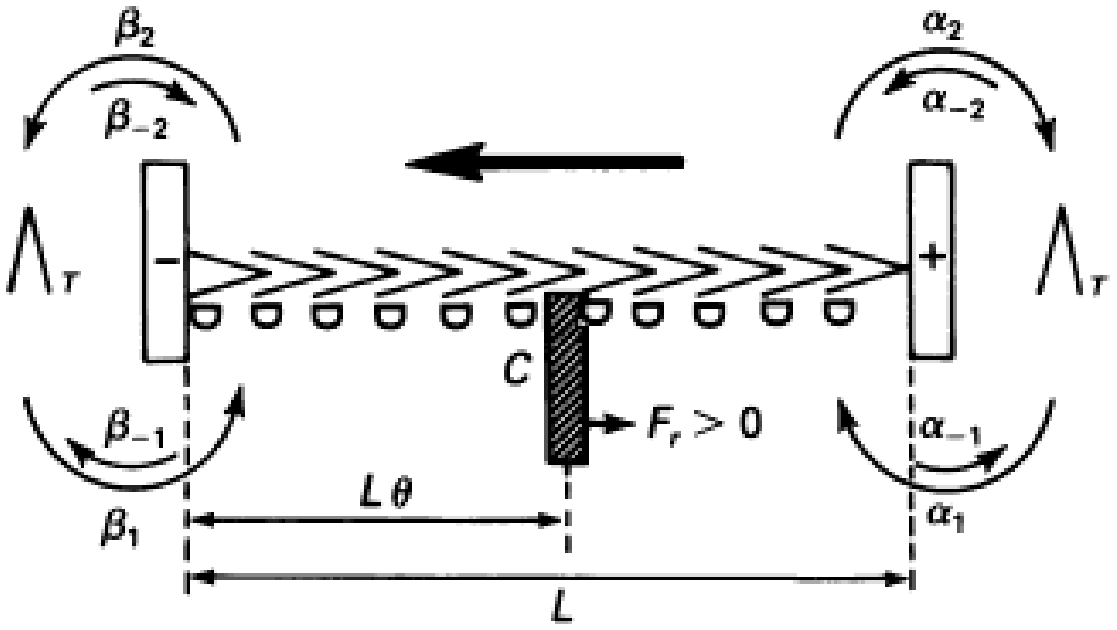


***Abbildung 10**: **Schema der „Aktin-treadmill“;** Aktinpolymere befinden sich in einem ständigen Auf-und Abbau. Das Polymer ist folglich nicht statisch, sondern eher als steady-state zu begreifen. Der Einbau von Aktinmonomeren (^T) erfolgt am (+)-Ende des Polymers, der Abbau am (-)-Ende. Das eingebaute Aktinmonomer wandert im Polymer folglich in Richtung des großen Pfeils vom (+)-Ende zum (-)-Ende [82]. Aus Hill, T.L. and M.W. Kirschner, Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(2): p. 490-4.*

Auch während der Depolymerisation haben die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 eine regulatorische Funktion. Diese entfalten sie über ihren Einfluss auf die Cofilin-Aktivität. Cofilin ist ein Depolymerisations-Faktor, der die Abspaltung von Aktin-Monomeren vom Aktinpolymer beschleunigt [85]. Die Regulation von Cofilin ist im höchsten Maße komplex und bislang nur unvollständig verstanden. Dies führt dazu, dass man in der Literatur sowohl aktivierende als auch hemmende Effekte von Cdc42 und Rac1 auf Cofilin finden kann.

So haben Cdc42 und Rac1 über die Aktivierung der P-21-aktivierten-Kinase (PAK1) eine aktivierende Wirkung auf die Lin-11-Isl-1-Mec-3(LIM)-Kinase1, die wiederum Cofilin phosphoryliert und damit dessen depolymerisierende Wirkung auf Aktinfilamente hemmt [90,91]. Gleichzeitig hat Cdc42 eine aktivierende Wirkung auf Cofilin, vermutlich unter anderem über die Aktivierung von Cofilin-Phosphatasen wie es Garvalov et al. [92] in hippocampalen Neuronen zeigen konnten. Diese Aussage stützen die Ergebnisse von Niwa et al. [93], die einen Aktinfilament stabilisierenden Effekt der Cofilin-Phosphatase Slingshot demonstrierten. Aber

auch eine inhibierende dephosphorylierende Wirkung der Rho-GTPasen auf LIM-Kinasen wäre möglich, zumal ein Cdc42-*knock-out* bei Garvalov et al. [92] eine verstärkte LIM-Kinasen-Phosphorylierung zur Folge hatte. Ob Cdc42 in der embryonalen Entwicklung eher phosphorylierend, wie Edwards et al. [90] nahelegt, oder dephosphorylierend, wie die Ergebnisse von Garvalov et al. [92] vermuten lassen, auf die LIM-Kinasen und somit auf Cofilin wirken, ist bisher noch nicht vollständig erforscht.

Daten zur Regulation von Cofilin durch Rac1 liefern Liu et al. [94]. Sie beschrieben den Zusammenhang zwischen Rac1, der Cofilin-Phosphatase Slingshot (SSH1) und Cofilin. Bei *knock-down* der Rho-GTPase Rac1 sank die SSH1-Aktivität. Gleichzeitig lag Cofilin vermehrt in phosphorylierter Form und Aktin vermindert in monomerer Form vor. Hieraus konnten sie folgern, dass Rac1 über die Aktivierung von SSH1 die Cofilin-Aktivität erhöht. Dies würde dann in einen vermehrten Aktinpolymerumbau münden [94].

So wie bei den Filopodien der *wing-imaginal-discs* [81] wird auch bei den FiLiPs, die im Dermomyotom zu finden sind, eine Signaltransduktionswirkung vermutet [10]. Die Epithelialisierung von Somiten ist, wie oben bereits beschrieben, von Wnt6 abgängig [11], welches im Ektoderm exprimiert wird. Da Wnt-Proteine allerdings aufgrund einer Lipidmodifikation hydrophob sind, ist es für sie nahezu unmöglich durch den subektodermalen Raum zwischen Ektoderm und Dermomyotom zu diffundieren, um die nötige Signalwirkung zu erzielen [95]. Wnt6 entfaltet seine Wirkung im Dermomyotom durch Bindung an Frizzled(Fzd)7-Rezeptoren [39]. Um den hydrophilen Raum zu überbrücken, könnten die FiLiPs, die sich vom DM zum Ektoderm im subektodermalen Raum aufspannen, das benötigte Bindeglied darstellen. Es konnte ein retrograder Transport von Fzd7-Rezeptoren entlang der Plasmamembran festgestellt werden (**Abb.11**). Dieser Rezeptor könnte sich also das Wnt6-Signal aus dem Ektoderm „abholen“ und so im Dermomyotom den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren [10,11]. Ein weiteres Indiz für die Signalfunktion von FiLiPs liefert der Nachweis von Tubulin, sowie den Motorproteinen Dynein und Kinesin in ihnen. Dies lässt vesikulären Transport an den Zellfortsätzen vermuten [10].

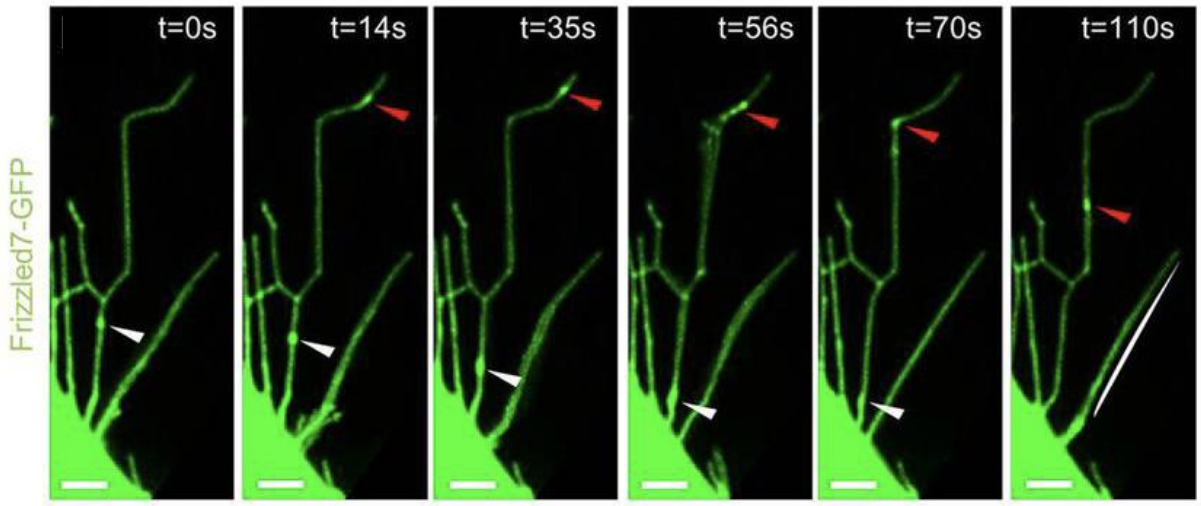


***Abbildung 11**: **Retrograder Transport vom Wnt-Rezeptor Frizzled7 in Filopodien dermomyotomaler Zellen eines Hühnerembryos (HH17 [1])**; Die dermomyotomalen Zellen wurden mit Frizzled7-GFP elektroporiert. Die Fotos zeigen den retrograden Transport des Frizzled7 entlang eines Filopodiums über einen Zeitraum von 110 Sekunden (rote Pfeilspitze) [10]. Aus Sagar et al., Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. Development, 2015. **142**(4): p. 665-71.*

2.11. Wechsel zwischen mesenchymalisierender und epithelialisierender Wirkung

Vor dem Hintergrund der epithelialisierenden, aber auch der mesenchymalisierenden Signalkaskaden, erscheint es sehr einleuchtend, dass sowohl bei Überaktivierung als auch bei Hemmung von Rac1 eine dysfunktionale Epithelialisierung der Somiten stattfindet. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass mesenchymalisierende und epithelialisierende Signalkaskaden gleichzeitig wirken und nur im richtigen Rac1-Aktivierungsverhältnis korrekt funktionieren und so eine korrekte Epithelbildung gewährleisten.

Von besonderem Interesse im Zusammenspiel der durch die GTPasen Cdc42 und Rac1 gesteuerten Signalkaskaden ist hierbei die Frage, wie die eher mesenchymalisierende Wirkung in der Somitogenese in die epithelialisierende Wirkung während der EMT umschlagen kann [66]. Eine mögliche Erklärung liefern Hart et al. [96], die zeigen konnten, dass Cdc42 durch das gebundene IQGAP1 im aktiven GTP-gebundenen Zustand stabilisiert wird. Dies bietet die Möglichkeit zur stufenweisen Akkumulation von GTP-bindendem Cdc42 im Cytosol, welches aufgrund eines daraus folgenden relativen IQGAP1-Mangels zunehmend im nicht-IQGAP1-bindenden Zustand vorläge. Cdc42 würde somit IQGAP1-unabhänigig und damit epithelialisierend wirken.

2.12. Zusammenfassung der Einleitung

Die dermomyotomale Entwicklung ist ein hochkomplexer Mechanismus, in dem die unterschiedlichsten Signalwege unter strenger Kontrolle ablaufen müssen, um eine adäquate Entwicklung zu gewährleisten. Von besonderer Wichtigkeit sind hier die Prozesse der Somitenepithelialisierung und Deepithelialisierung. Für diese Entwicklungsschritte sind die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 von entscheidender Bedeutung [66]. Es gibt zahlreiche Ansätze, wie Cdc42 und Rac1 Einfluss auf die Epithelialisierung und Mesenchymalisierung nehmen können. Als Beispiel sei die Interaktion mit IQGAP1 [70], die Aktivierung des Wnt-JNK-Signalwegs über β-Catenin-Phosphorylierung [77,78], die Rac1-LEF1-Komplexbildung [80] oder die FiLiPs-Induktion genannt [10]. Um festzustellen, welche Prozesse in der Somitogenese in welchem Maße eine Rolle spielen, bedarf es weiterer Forschung.

2.13. Definition der Fragestellung

In meiner Arbeit ging ich der Frage nach, ob das Einbringen der dominant-negativen(dn) und somit dysfunktionalen Form der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 die Filopodienbildung des Dermomyotoms verändert. Die Arbeit von Sagar et al. [10] gab bereits einen Hinweis darauf, dass die Elektroporation der Somiten mit dnRac1 die Filopodienbildung inhibiert. Das Ziel meiner Arbeit war, diese Beobachtung zu quantifizieren und um die Rho-GTPase Cdc42 erweitern. Ein Hinweis darauf, dass neben Rac1 auch andere Rho-GTPasen wie beispielsweise Cdc42 die Filopodienbildung im Dermomyotom steigern könnten, findet sich unter anderem in den oben beschriebenen Beobachtungen von Miki et al. [88], die diesen Effekt in COS-7-Zellen beobachten konnten. In einem nächsten Schritt quantifizierte ich die Filopodien-Genese in Somiten, die mit dnRac1 oder dnCdc42, sowie Cofilin oder CofilinS3A (dauerhaft aktives Cofilin) coelektroporiert wurden. Cofilin spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktinpolymerisation [85], die wiederum entscheidend für die Filopodienbildung ist [10]. Wenn sich der Effekt von dnRac1 bzw. dnCdc42 durch die Coelektroporation mit Cofilin bzw. CofilinS3A aufheben ließe, wäre dies ein Hinweis darauf, dass Cofilin ein Effektor in der Filopodien-Genese im Dermomyotom ist, der unterhalb der Rho-GTPasen liegt. Überdies würde ein *rescue* durch Cofilin bzw. CofilinS3A den Schluss zulassen, dass der Effekt der Elektroporation durch die Wirkung über den Rho-GTPasen-Signalweg zu erklären ist und nicht beispielsweise durch unspezifische Schäden aufgrund der Elektroporation.

Neben der Wirkung auf die Filopodienbildung sollte der Effekt der einzelnen Konstrukte auf die Bildung des Dermomyotoms und des Myotoms untersucht werden. Auch hierzu wurden Konstrukte zur Expression von dnRac1 und dnCdc42 in die Somiten der untersuchten Embryonen elektroporiert. Zusätzlich erfolgte bei einem Anteil der Embryonen der *rescue* mit Cofilin oder CofilinS3A. Im Anschluss wurden die Skelettmuskelfasern des Myotoms mit dem Marker MF20 immunhistochemisch markiert. Das Myotom entsteht aus dem Dermomyotom

im Rahmen einer komplexen epithelial-mesenchymalen Transformation [6]. Daraufhin wurden das epitheliale Dermomyotom sowie das Myotom qualitativ anhand der Zellmorphologie, der Polarität und der Dermomyotomstruktur beurteilt. Folglich überprüfte ich im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese, ob sich die Morphologie von Dermomyotom und Myotom qualitativ nach Elektroporation der im Methodenteil beschriebenen Konstrukte verändert.

3. Methoden und Material

3.1. Methoden

3.1.1. Modellorganismus

Als Modell in meiner Dissertation wurde der Embryo von Hühnern der Art *Gallus gallus domesticus* verwendet.

Bis zur Inkubation wurden die befruchteten Eier in einem Kühlschrank bei 14°C gelagert. Diese Temperatur gewährleistete, dass die Embryonen am Leben blieben, sich aber nicht weiterentwickeln konnten.

Für die im Rahmen meiner Dissertation erfolgte Elektroporation wurden die Eier für 2,5-3 Tage bei 37,8°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis die Embryonen ca. das Stadium HH15-HH18 [1] erreicht hatten.

3.1.2. Elektroporation

(1) In-ovo Elektroporation (siehe Tabelle 1)

Die *in-ovo* Elektroporation ist eine in unserer Arbeitsgruppe sehr gut etablierte Methodik zum Transfer von genetischem Material in die Somitenzellen des Embryos und wurde bereits durch Mitglieder unserer Arbeitsgruppe in früheren Arbeiten genutzt und beschrieben [97].

Das Ei wurde in gleichbleibend längs-liegender Lage in ein vorab präpariertes Nest (Petrischale mit unsterilen Tupfern ausgekleidet) überführt. Dort wurde zuerst mit einer Schere ein Loch ca. 2 cm unterhalb des breiteren Pols der Eioberfläche gestochen. Durch diese Öffnung wurden anschließend ca. 3ml Eiweiß aus dem Ei entfernt. Hierzu wurde eine Kanüle durch das Loch an der Schale entlang in das Eiweiß geführt, sodass dieses mit Hilfe einer Spritze abgenommen werden konnte. Im nächsten Schritt wurde die obenliegende Schale mit einem transparenten Klebestreifen überklebt. In diesen Bereich wurde nun eine ca. 3-4 cm im Umfang messende Öffnung geschnitten, sodass der Embryo im Eigelb obenliegend sichtbar wurde. Um den Kontrast von Embryo zu Eigelb zu verstärken, wurde mit einer im 90°-Winkel gebogenen Hohlnadel eine variable Menge Tinte knapp unterhalb des Embryos injiziert.

War der Embryo nun gut zu erkennen, wurde die Vitellinmembran, die oberhalb des Embryos liegt, entfernt. Hierfür wurde zunächst mit einer Tungsten-Nadel die Vitellinmembran perforiert. Auf dieses Loch wurden 1-2 Tropfen 1xphosphate-buffered-saline (PBS) gegeben. Anschließend wurde die Membran mit einer Pinzette abgezogen, sodass die kaudalen Somiten nun frei lagen. In die letzten 2-3 kaudalen Somiten wurde im nächsten Schritt das Plasmid injiziert, welches in 1xPBS gelöst und mit dem Farbstoff *fast-green* gemischt wurde. Hierzu wurde ein Injektor (*FemtoJet/4i*)

genutzt, der das Plasmid durch eine Glaskapillare mit 110-150 hPa in den Somiten injiziert. In den Phasen zwischen den Injektionen lag in den Kapillaren ein angelegter Druck von 30-50 kPa vor. Die für die Injektion benötigten Glaskapillaren wurden mit Hilfe eines *Sutter-P-97-Pullers* aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem äußeren Durchmesser von 1,5mm und einem inneren Durchmesser von 1,10mm hergestellt.

Für den Elektroporator (*NEPA/NEPA21*) wurden folgende Einstellung verwendet:
Spannung: 20V; Pulslänge: 20ms; Pulsintervall: 50ms; Pulsanzahl: 4 Pulse; Decay rate (Druckabfallrate): 10%
Für die Elektroporation wurde die Anode (+) knapp oberhalb und die Kathode (-) knapp unterhalb des Embryos platziert. Als Pole dienten zwei Platin-Drähte mit einem Durchmesser von 1,0 mm, an denen die oben beschriebene Spannung angelegt wurde. Hierbei war darauf zu achten, dass die imaginäre Verbindungslinie der beiden Pole parallel zur gewünschten Plasmidwanderungsrichtung lag. Ebenfalls sollten die Pole selbst nicht direkt dem Embryo anliegen, um spannungsinduzierte Verbrennungen zu vermeiden. Danach wurde elektroporiert, indem ein durch die oben genannten Voreinstellungen regulierter Strom von der Kathode zur Anode geleitet wurde. Der Strom floss nur, wenn der Stromkreis durch ein Fußpedal geschlossen wurde. Durch den Strom entstanden in der Zellmembran Poren, durch die das negativ geladene und deshalb Richtung Anode wandernde DNA-Plasmid von dorsal nach ventral in die Somiten-Zellen gelangte.
Nach der Elektroporation wurde die Öffnung in der Schale mit einem transparenten Klebestreifen zugeklebt. Die Embryonen, bei denen die Filopodien quantifiziert werden sollten, wurden daraufhin bei 37,8°C bei 60% relativer Luftfeuchtigkeit für 4h reinkubiert. Im Anschluss folgte die weitere Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (RT) (ca.16-20h). Diejenigen Embryonen, bei denen eine Immunhistochemie durchgeführt werden sollte, wurden über Nacht (16-20h) im Inkubator inkubiert.
Nach erfolgter Inkubation wurden die Embryonen mit Hilfe eines Durchlicht-Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die nach erfolgreicher Elektroporation GFP-positiven Embryonen wurden aus dem Ei isoliert und fixiert [97].

Protokoll der verwendeten in-ovo Elektroporation
Loch mit einer Hohlnadel in die Eischale stechen
ca. 3ml Eiweiß aus dem Ei herausziehen
die obenliegende Schale mit transparentem Klebestreifen überkleben
Eischale im Bereich des Klebestreifens aufschneiden (3-4cm)
0,5ml Tinte-1xPBS-Mix unter den Embryo spritzen (Kontrasterhöhung)

Vitellinmembran oberhalb der kaudalen Somiten entfernen
Wenn die Somiten schon von Amnion überdeckt sind (Entwicklung bereits fortgeschritten), die betreffenden Teile des Amnions entfernen, bis die Somiten frei vorliegen
DNA-Plasmid in 2-3 Somiten mit dem Injektor injizieren
1 Tropfen 1xPBS auf den Embryo geben
Kathode unterhalb, Anode oberhalb des Embryos platzieren
Elektroporation durchführen (*Einstellung Elektroporator: Spannung: 20V; Pulslänge: 20ms; Pulsintervall: 50ms; Pulsanzahl: 4 Pulse; Decay rate (Druckabfallrate): 10%*)
Öffnung der Eischale mit einem Klebestreifen zukleben
Elektroporierte Embryonen bei 37,8°C und 60% Luftfeuchtigkeit inkubieren (Dauer bei Filopodienquantifizierung: 4h im Inkubator sowie 16-20h bei RT; Dauer IHC: 16-20h im Inkubator)

Tabelle 1

(2) Ex-ovo Elektroporation (siehe Tabelle 2)

Die Methodik der *ex-ovo* Elektroporation wurde durch Mitglieder der Arbeitsgruppe bereits in vorigen Arbeiten genutzt und beschrieben [98]. Bevor die Elektroporation begonnen wurde, wurden die Eier für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um die Umgebungstemperatur anzunehmen.

Das Ei wurde vorsichtig über einer Glaspetrischale, in die eine kleine Menge 1xPBS gefüllt wurde, aufgeschlagen. Der Inhalt des Eis wurde vorsichtig in die Petrischale überführt, sodass sich der Embryo bei intakter Vitellinmembran auf der Oberfläche des intakten Eidotters befand. Im Anschluss wurde ein *Whatman*-Papierring mit einem äußeren Durchmesser von 2,8cm und einem inneren Durchmesser von 1,5cm um den Embryo herum platziert. Dieser Schritt musste möglichst zügig nach dem Aufschlagen erfolgen, um die Unversehrtheit des Dotters nicht zu gefährden. Dies war notwendig, damit die Vitellinmembran und damit der Embryo am Papierring haften blieb. Ebendiese Vitellinmembran wurde im Folgenden außen um den Ring herum geschnitten. Der nun am Papierring haftende Embryo wurde von Eidotter befreit, in die 1xPBS-gefüllte Elektroporationskammer überführt und oberhalb der Kathode(-), die an der Elektroporationskammer angelegt wurde, platziert. Die Kammer sollte so mit 1xPBS gefüllt sein, dass das 1xPBS zwar den Ring erreicht, dieser aber nicht schwimmt. Wie bereits *in-ovo* beschrieben, wurde auch *ex-ovo* das DNA-Plasmid in die kaudalen Somiten injiziert.

Der Elektroporator wurde für die *ex-ovo* Elektroporation wie folgt eingestellt:

Spannung: 10V; Pulslänge: 50ms; Pulsintervall: 50ms; Pulsanzahl: 5 Pulse; Decay rate: 40%.

Als Kathode diente ein 0,4mm dicker Platindraht innerhalb der Elektroporationskammer. Die Anode war auch hier der oben beschriebene 1,0 mm Platindraht.

Die Anode wurde nun über dem Embryo platziert und der Stromfluss mit Hilfe eines Pedals aktiviert. Die Anode musste hierbei zwingend Kontakt zum 1xPBS haben.

Die elektroporierten Embryonen wurden auf 0,2%Ham´s/Agarose-Platten überführt und anschließend für 4h bei 37,8°C im Inkubator und danach bei RT über Nacht (ca.16-20h) inkubiert. Die *ex-ovo* Elektroporation wurde ausschließlich im Rahmen der Filopodienquantifizierung, nicht aber bei der Immunhistochemie genutzt. Exprimierten die elektroporierten Somiten am Folgetag das Plasmid, wurden die Embryonen isoliert [98].

Protokoll der verwendeten ex-ovo Elektroporation
Ei in eine mit 1xPBS benetzte Schale aufschlagen
Whatman-Papierring um den Embryo herum platzieren
Vitellinmembran um den Papierring herum mit einer Federschere aufschneiden
Papierring mit innen haftendem Embryo in die Elektroporationskammer überführen
Vitellinmembran oberhalb der kaudalen Somiten entfernen
Wenn die Somiten schon von Amnion überdeckt sind (Entwicklung zu weit fortgeschritten), die betreffenden Teile des Amnions entfernen, bis die Somiten frei vorliegen
DNA-Plasmid in 2-3 Somiten mit dem Injektor injizieren
1 Tropfen 1xPBS auf den Embryo geben
Als Anode dient ein 1,0mm dicker Platindraht oberhalb des Embryos, als Kathode ein 0,4mm dicker Platindraht in der Elektroporationskammer
Elektorporation durchführen *(Einstellung Elektroporator: Spannung: 10V; Pulslänge: 50ms; Pulsintervall: 50ms; Pulsanzahl: 5 Pulse; Decay rate (Druckabfallrate): 40%.)*
Papierring mit innen haftendem Embryo in eine Petrischale mit 0,2%Ham´s/Agarose-Gel überführen
Elektroporierte Embryonen bei 37,8°C und 60% Luftfeuchtigkeit für 4h inkubieren, danach für 16-20h bei RT

Tabelle 2

(3) Plasmide

Bei der *in-ovo* und *ex-ovo* Elektroporation wurden folgende Plasmide injiziert (die K-Nummern entsprechen der laborinternen Plasmidliste):

- K207- **pCAG-GFP**
- K187- **dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP**
- K322+K207- **dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP**
- K187+K149- **dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+ EGFP-N1-Cofilin**
- K187+K147- **dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP +Cofilin-S3A-GFP**
- K322+K149- **dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP + EGFP-N1-Cofilin**
- K322+K147- **dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP+Cofilin-S3A-GFP**

pCAG-GFP: Plasmid, bestehend aus dem Transkriptionspromotor CAG und dem Reportergen GFP zur Translation des grün fluoreszierenden Proteins, beschrieben durch Matsuda et al. [99]. Als Vektor dient das Plasmid pCIG K34 (Vektorgröße: ca 6kb). Die in das Genom von Ampicillin-resistenten *Escherichia (E.) coli*-Stämmen eingebrachte DNA hat eine Länge von ca. 800bp. Sie wird durch die Plasmidposition *XhoI* in 5´und *NotI* in 3´Richtung begrenzt.

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP: Erstmalig wurde die Nutzung von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP durch Ridley et al. [100] beschrieben. Durch eine *misssense* Mutation (Ser17Asn) erhöht sich die Affinität von Rac1 zu GDP auf das 10-fache der Affinität zu GTP. Rac1 ist inaktiv, wenn GDP gebunden ist. Folglich ist das mutierte Rac1 (Rac1(N17)) dauerhaft inaktiv [100]. Da die Bindungsaffinität von Rho-GTPasen mit einer Punktmutation (Asparagin für Serin an Position 17 der Aminosäurekette [Ser17Asn]) zu GDP circa der Bindungsaffinität des Wildtyps entspricht, binden die GEFs in den elektroporierten Zellen folglich auch vermehrt an dnRac1(N17) und stehen der Zelle zur Aktivierung von Wildtyp Rac1 in Signaltransduktionsprozessen nicht mehr zur Verfügung [101,102]. Die GEFs interagieren mit den GDP-bindenden Rho-GTPasen und erleichtern die Dissoziation der Nukleotide durch die Bildung eines ternären Komplexes. GEFs wirken dabei gleichermaßen dissoziierend für GTP- und GDP. Da die intrinsische Dissoziationsrate von GDP jedoch doppelt so hoch ist wie die von GTP, ist die GEF-induzierte Dissoziationswahrscheinlichkeit von GDP höher, sodass der Wechsel von GDP-Bindung zur GTP-Bindung wahrscheinlich wird [103]. Als Beispiel sei

hier der GEF Dock10 angeführt. Ruiz-Lafuente et al. [104] konnten zeigen, dass die Interaktion von Dock10 mit inaktivem Rac1 dessen GTPasen-Aktivität steigert. Dock10 ist folglich ein GEF für die Rho-GTPase Rac1. Da diese Funktion in den mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP elektroporierten Zellen aufgrund eines relativen Mangels an GEFs stark reduziert ist, sinkt folglich auch die Rac1-Aktivität [105]. Das Plasmid wurde bereits durch Shoval und Kalchheim [106], sowie durch Sagar et al. [10] verwendet. Es besitzt die Codierung für Rac1(N17) und wurde nochmals in einen pCAGG-IRES-GFP-Vektor subkloniert. IRES ist eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), an welcher die Translation unabhängig von der 5´cap-Struktur durch Ribosomen initiiert und nach welcher somit GFP translatiert werden kann [106,107].

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP: Bei Cdc42T17N handelt es sich um die Rho-GTPase Cdc42, welche eine *misssense*-Mutation an der Translationsstelle der 17. Aminosäure aufweist (Ser17Asn). Ebenso wie bei Rac1(N17) sorgt diese Mutation bei Cdc42 dafür, dass die Affinität für GDP gegenüber dem Wildtyp Cdc42 stark erhöht ist. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Rho-GTPase im GDP-bindenden und damit inaktiven Zustand bleibt [105]. Es wird vermutet, dass, ebenso wie bei Rac1(N17), auch Cdc42T17N GEFs bindet, sodass jene nicht mehr für die physiologische Signaltransduktion der zellulären GTPase Cdc42 zur Verfügung stehen [108]. Als Vektor dient das Plasmid K34. Die in das Genom von Ampicillin-resistenten *E. Coli*-Stämmen zwischen den DNA-Positionen 5´*EcoRI* und *NotI* 3´ eingebrachte DNA ist ca. 600kb lang. Sie beinhaltet die Codierung von Cdc42, sowie dem Cdc42 Fusionsprotein.

***EGFP-N1*-Cofilin:** Die Codierung für das Protein Cofilin der Ratte ist in den Vektor EGFP-N1 für Ampicillin-resistente *E. coli*-Stämme subkloniert worden. EGFP-N1 beinhaltet einen CMV-Promotor und die Codierung für GFP [109].

CofilinS3A-GFP: Die Codierung für das Protein Cofilin ist so geändert worden, dass die Aminosäure Serin an 3. Stelle durch Alanin ersetzt wird. Diese *misssense*-Mutation führt dazu, dass CofilinS3A nicht mehr phosphoryliert werden kann und somit dauerhaft aktiv bleibt [110]. Dieses Konstrukt ist in den Expressionsvektor pCDNA3-Vektor Kanamycin-resistenter *E. coli*-Stämme subkloniert worden[111].

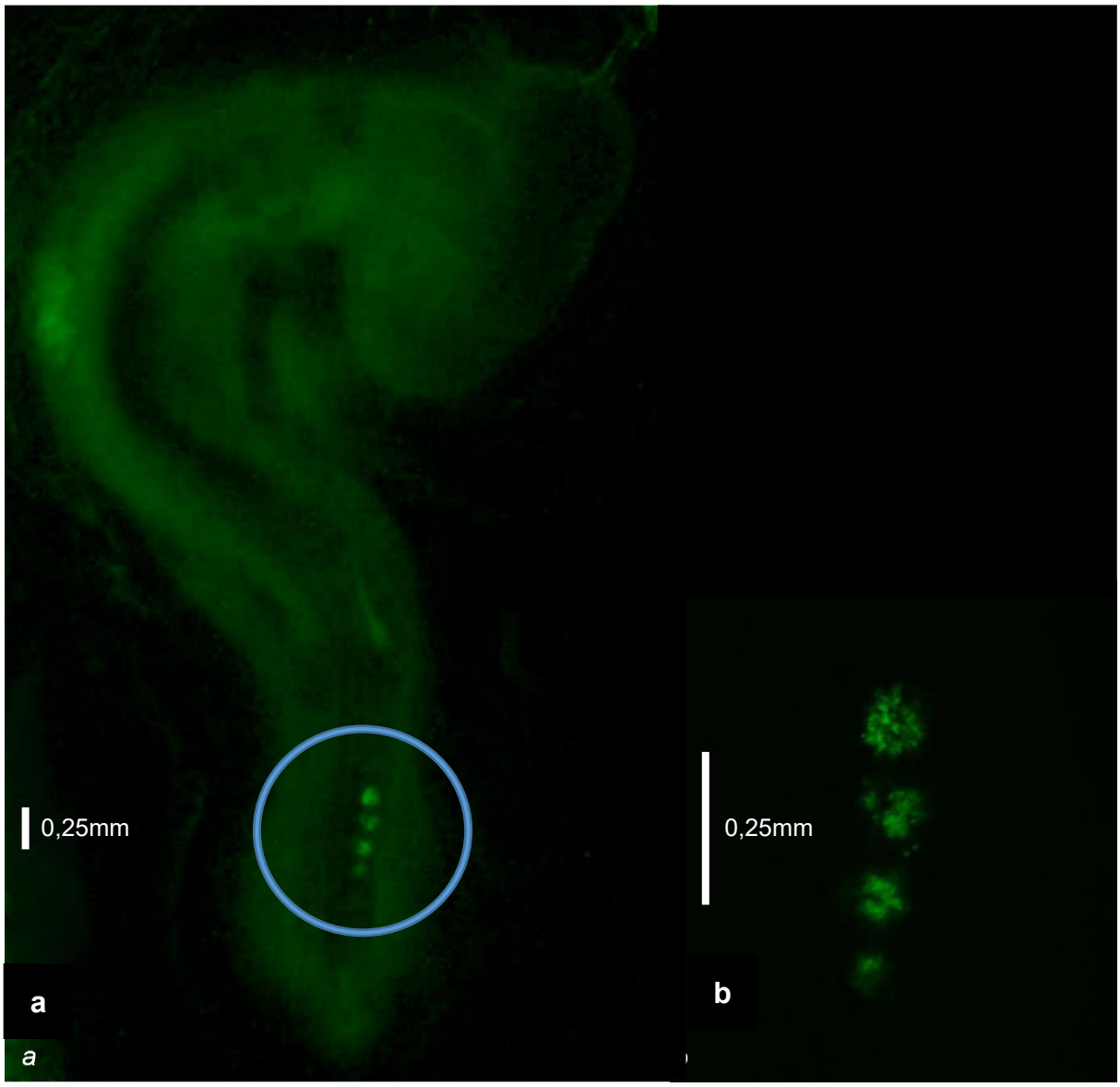


Abbildung 12*: isolierter Hühnerembryo (HH18 [1]) nach Elektroporation mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP.** *Die Elektroporation erfolgte nach vorheriger Inkubation von 2,5 Tagen. Im Anschluss wurde der Embryo für 4h bei 37,8°C und über Nacht (ca.16-20h) bei RT reinkubiert.* ***Abbildung 12a *zeigt den behandelten Embryo in toto und* ***Abbildung 12b*** *eine Nahaufnahme der elektroporierten Somiten. In Abbildung 12a ist ein Embryo im Stadium von ca. HH18[1] im Stereomikroskop unter Fluoreszenzlicht unmittelbar nach der Elektroporation dargestellt. Die GFP-exprimierenden Zellen in den elektroporierten Somiten im kaudalen Teil des Embryos leuchten grün. Der kraniale Teil des Embryos liegt im oberen Bildteil, der kaudale Teil im unteren Bildteil. Die Kopfanlage ist nach rechts gedreht. Mit einem blauen Kreis ist der Ausschnitt, der in Abbildung 12b*

abgebildet ist, hervorgehoben. In Abbildung 12b sind die vier elektroporierten Somiten aus der Abbildung 12a nochmals in stärkerer Vergrößerung dargestellt.

3.1.3. Embryonenisolierung (siehe Tabelle 3)

Die Embryonenisolierung wurde bei 1,5-facher Vergrößerung unter dem Auflichtmikroskop mittels Pinzette und Federschere durchgeführt. Der Embryo wurde mit Hilfe eines Sieblöffels aus dem Ei geborgen, bzw. bei der *ex-ovo* Elektroporation von der Agaroseplatte und in eine Petrischale mit 1xPBS überführt. Vor der Fixierung musste der Embryo von den Ei-Hüllen, der Vitellinmembran und der Amnionhülle befreit werden.

Die kraniale, bereits geschlossene Amnionhöhle wurde durch einen Schnitt mit der Federschere eröffnet. Der Embryo konnte aus dieser nun „herausgeschält" werden. Die kaudalen Verwachsungen wurden, unter Erhaltung der embryonalen Grenzschichten, abgetrennt.

Anschließend folgte die Feinpräparation, bei der noch vorhandene Vitellin- oder Amnionreste entfernt wurden.

Die isolierten Embryonen wurden in 4%Paraformaldehyd (PFA) gelöst in 1xPBS bei 4°C auf dem Schüttler über Nacht fixiert.

Embryonenisolierung
Embryo mit einem Sieblöffel in eine Petrischale mit 1xPBS überführen
Entfernung der umliegenden Vitellinmembran
Entfernung des Amnions unter Schonung des Seitenplattenmesoderms (im kaudalen Bereich teilweise noch mit Amnionepithel verwachsen)
isolierten Embryo in ein Bijoux-Röhrchen mit 4%PFA-1xPBS überführen und bei 4°C auf dem Schüttler lagern

Tabelle 3

3.1.4. Immunhistochemie (siehe Tabelle 4)

Für die Immunhistochemie wurden ausschließlich Embryonen verwendet, die *in-ovo* elektroporiert wurden. Alle Waschschritte in 1xPBS wurden bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler (110 rpm) durchgeführt.

Um möglichst wenig Fluoreszenzfähigkeit der Marker zu verlieren, wurden die Embryonen bei allen Schritten, die im Labor bei RT durchgeführt wurden, mit einer Schachtel bedeckt. Auch die restlichen Schritte im Kühlschrank und im Inkubator wurden vor Lichteinstrahlung abgeschirmt.

Die im Kühlschrank bei 4°C in 4%PFA-1xPBS fixierten, auf dem Schüttler gelagerten Embryonen wurden auf eine mit 1xPBS gefüllte Petrischale überführt. In dieser wurden die

Köpfe unter dem Auflichtmikroskop abgetrennt, um durch das verringerte Embryovolumen die Menge an benötigter Antikörperlösung zu reduzieren. Im nächsten Schritt wurden sie auf eine 24-*Well*-Platte überführt (max. 4 Embryonen pro *Well*).
Diese Embryonen wurden 2x10 Minuten mit 1xPBS gewaschen.
Um das embryonale Gewebe für den Antikörper durchlässig zu machen, wurden die Embryonen für eine Stunde bei 37°C im Inkubator auf dem Schüttler (90rpm) mit Hyaluronidaselösung (2mg/ml) verdaut. Im Folgenden wurde mit 1xPBS einmal kurz (das 1xPBS wurde, direkt nachdem es in den *Well* gefüllt wurde, wieder entfernt) und einmal für 10 Minuten gewaschen. Daraufhin wurden die Embryonen in 4%PFA-0,1%PBST(TritonX100) bei RT auf dem Schüttler (90rpm) erneut fixiert. Nach der Fixierung wurde das 4%PFA-0,1%PBST(TritonX100) durch 0,1%PBST(Tween 20) ersetzt und die Embryonen darin einmal kurz (siehe kurzer Waschschritt bei 1xPBS) sowie zweimal für jeweils 10 Minuten bei RT auf dem Schüttler (110rpm) gewaschen. Durch diesen Waschschritt wurden die Zellwände abermals für die Antikörper durchlässiger. Um die Störsignale durch unerwünschte Antikörperbindung mit unspezifischen Antigenen zu vermeiden, wurden die Embryonen für mindestens eine Stunde mit 10%Donkey-Serum-1%BSA-0,1%PBST(Tween20) (Blockierlösung) bei RT auf dem Schüttler (90rpm) blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (MF20[DSHB]) in einer 1:10-verdünnten Primärantikörper(pAB)-Blockierlösung auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.
Am Folgetag wurde der Primärantikörper entfernt und die Embryonen für 7 Stunden und 40 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Dabei wurde das 1xPBS in den ersten 40 Minuten alle 10min gewechselt, danach jeweils stündlich. Anschließend wurde zur Markierung der Primärantikörper ein sekundärer Antikörper (DaM AF568) in einer 1:500 verdünnten Sekundärantikörper(sAB)-BSA-0,1%PBST(Tween20)-Lösung auf die Embryonen gegeben und bei 4°C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.
Am nächsten Tag wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Embryonen für 4 Stunden und 40 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Nach dem ersten kurzen Waschschritt (siehe kurzes Waschen mit 1xPBS) wurde das 1xPBS in den ersten 40 Minuten alle 10 Minuten gewechselt. In den folgenden 4 Stunden jeweils stündlich. Danach wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler in 1xPBS inkubiert.
Am vierten Tag wurden die Embryonen wieder in 4%PFA-0,1%PBST(TritonX100*)* bei RT auf dem Schüttler (90rpm) fixiert. Nach der Fixierung wurden sie in 3 Schritten in 1xPBS gewaschen. Nach dem ersten kurzen Waschschritt wurden sie für 10 Minuten gewaschen, wobei das 1xPBS alle 5 Minuten gewechselt wurde. Daraufhin wurden sie in Gelatine-BSA-Saccharose (GBS) eingebettet.

Immunhistochemie
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1h in Hyaluronidaselösung (2mg Hyaluronidase/ml 1xPBS) bei 37°C und 90rpm inkubieren
kurz bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
20 min bei RT in 4%PFA-0,1%PBST(TritonX100) auf dem Schüttler nachfixieren
kurz bei RT in 0,1%PBST(Tween20) auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 0,1%PBST(Tween20) auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 0,1%PBST(Tween20) auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 10%Donkey-Serum-1%BSA-0,1%PBST(Tween20) auf dem Schüttler blockieren
über Nacht bei 4°C in Antikörperlösung (200µl primärer Antikörper+1800µl Blockierlösung) auf dem Schüttler inkubieren
kurz bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
über Nacht bei 4°C in Antikörperlösung (4µl sekundärer Antikörper+1996µl Blockierlösung) auf dem Schüttler inkubieren
kurz bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
1 h bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
über Nacht bei 4°C in 1xPBS auf dem Schüttler waschen

20 min bei RT in 4%PFA-0,1%PBST(TritonX100) auf dem Schüttler fixieren
kurz bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
5 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen

Tabelle 4

3.1.5. GBS-Einbettung (siehe Tabelle 5)

Die Embryonen wurden 3x10 Minuten in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden sie in GBS bei RT auf dem Schüttler (90rpm) equilibriert, bis sie vollständig abgesunken waren (ca.1-4h). Während der Equilibrierung wurde die erste Schicht des Einbettmediums vorbereitet. Hierzu wurde pro Einbettform (2x2x2cm; Gesamtvolumen: 8ml) 2ml GBS mit 293µl 37%-Formaldehyd unter kontinuierlichem Auf- und Abpipettieren vermischt, bis das Gemisch frei von Schlieren war. Dieses wurde dann in die Einbettform gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass das Einbettmedium keine Luftblasen enthält. Die Form wurde 2-3h bei RT gelagert, bis die Konsistenz des Mediums geleeartig war. Dann wurden die mittlerweile equilibrierten Embryonen auf die semiharte Schicht überführt und so ausgerichtet, dass sie sich für die Vibratomschnitte gut zuschneiden ließen (siehe unten). Im Anschluss wurden die Embryonen mit einer frisch angesetzten GBS-Lösung (2ml GBS plus 293µl 37%-Formaldehyd (Procedere wie oben bereits beschrieben)) beschichtet. Zum Aushärten wurde das GBS über Nacht bei RT zugedeckt stehen gelassen. Um eine zu starke Austrocknung zu vermeiden, wurden mit autoklaviertem Wasser befeuchtete Papiertücher um die Einbettformen angeordnet.

GBS-Einbettung
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
10 min bei RT in 1xPBS auf dem Schüttler waschen
3-4 h bei RT in GBS auf dem Schüttler equilibrieren
Parallel zur Equilibrierung 2ml GBS mit 293µl 37%-Formaldehyd unter kontinuierlichem Auf- und Abpipettieren vermischen und in eine Aushärteform füllen
Bei semiharter Konsistenz des Einbettmediums die equilibrierten Embryonen auf die Schicht überführen
2ml GBS mit 293µl 37%-Formaldehyd unter kontinuierlichem Auf- und Abpipettieren vermischen und auf die erste Schicht in die Aushärteform geben
Das Einbettmedium über Nacht bei RT aushärten lassen

Tabelle 5

3.1.6. Vibratomschnitte (siehe Tabelle 6)

Die ausgehärteten Formen wurden bis zum Vibratomschnitt bei 4°C in einer Feuchtkammer gelagert.

Um die Filopodien zu quantifizieren, wurden Transversalschnitte der embryonalen Somiten von 50µm Dicke am Vibratom angefertigt.

Die Embryonen wurden aus den Einbettformen herausgelöst, grob zugeschnitten und mit Sekundenkleber so auf die Präparatträgerplatte des Vibratoms geklebt, dass der Kopf nach unten und der Schwanz senkrecht nach oben zeigt. Die Präparatträgerplatte wurde im Vibratom eingespannt und fixiert. Die Auffangschale wurde mit 1xPBS befüllt, sodass der GBS-Block komplett bedeckt war. Anschließend wurden die Schnitte angefertigt und auf einen Chrom-Gelatine-Objektträger überführt. Um nur die Schnitte erfolgreich elektroporierter Somiten einzudecken, wurde jeder Schnitt unter dem Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Nur diejenigen Schnitte, die Fluoreszenzlicht emittierten, wurden weiterverwendet. Die Übrigen wurden verworfen. Die fluoreszierenden Schnitte auf dem Objektträger wurden mit 2-3 Tropfen 4´,6´-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in 1%BSA bedeckt und im Dunkeln für ca. 20 Minuten ruhen gelassen. Anschließend wurde das überschüssige DAPI mittels eines Papiertuchs vom Objektträger entfernt und mit dem Eindeckmittel *prolong-diamond* eingedeckt. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe von Gewichten fixiert. Die Präparate härteten über Nacht bei RT aus.

Vibratomschnitte
50µm dicke Transversalschnitte des Embryos mit dem Vibratom anfertigen
Schnitte auf einen Chrom-Gelatine-Objektträger überführen
2-3 Tropfen DAPI-Lösung auf die Schnitte tropfen und ca. 30 Minuten einwirken lassen
Schnitte mit *Prolong diamond* eindecken und über Nacht mit Gewichten in der Position fixieren

Tabelle 6

3.1.7. Bildaufnahmen im LSM

Die in den oben beschriebenen Schritten hergestellten Schnitte wurden unter einem konfokalen Lasermikroskop (*LSM880*) fotografiert, sodass anhand dieser Bilder die Filopodien quantifiziert werden konnten.

3.1.8. Filopodien quantifizieren

Um die Wirksamkeit der von uns injizierten DNA-Plasmide zur Filopodienhemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachzuweisen, wurden die Filopodien der elektroporierten

Somiten nach einer Reinkubationszeit von mindestens 4h bei 37,8°C im Inkubator und 16-20h bei RT quantifiziert.

Hierfür wurden die Zellen und die Filopodien jedes Schnittes von drei verschiedenen Personen unter verblindeten Bedingungen gezählt. Aus den jeweiligen Schnittbildserien der einzelnen Embryonen wurde der Quotient aus Filopodienzahl/Zellzahl gebildet. Die Quotienten der Embryonen wurden wieder dem injizierten Plasmid zugeordnet. Aus den einzelnen Quotienten eines Plasmides wurden der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Im Anschluss wurden die Quotienten-Mittelwerte der einzelnen Plasmide verglichen.

3.2. Material

3.2.1. Chrom-Gelatine-Objektträger (siehe Tabelle 7+8)

Zur Herstellung von Chrom-Gelatine wurden 15g Gelatine in 500ml autoklaviertem Wasser auf der Wärmeplatte gelöst. Nachdem die Gelatine vollständig gelöst war, wurden 0,75g Chromalaun hinzugefügt und mit autoklaviertem Wasser auf 1,5l aufgefüllt.

Für die Beschichtung wurden die Glasobjektträger nacheinander für 5 Minuten in 20%-ige Essigsäure, für 15 Minuten in autoklaviertes Wasser und für 30 Sekunden in Chrom-Gelatine eingetaucht. Bei der Chrom-Gelatine wurden die Glasobjektträger langsam und gleichmäßig eingetaucht und herausgezogen.

Chrom-Gelatine-Mix
15 g Gelatine in 500ml autoklaviertem Wasser auf der Wärmeplatte lösen
0,75 g Chromalaun hinzugeben
auf 1,5 l mit autoklaviertem Wasser auffüllen

Tabelle 7

Chrom-Gelatine-Objektträger
5 min in 20%-ige Essigsäure eintauchen
15 min in autoklaviertes Wasser eintauchen
30 sek in Chrom-Gelatine langsam eintauchen und wieder herausziehen

Tabelle 8

3.2.2. GBS-Mix (siehe Tabelle 9)

In Vorbereitung auf die beschriebene Einbettung der Embryonen in GBS-Formaldehyd musste der GBS-Mix hergestellt werden. Zu Beginn wurden 2,2g Gelatine mit 5ml 1xPBS gemischt. Anschließend wurden 445ml 1xPBS auf 70°C erwärmt und hinzugefügt. Das Gelatine-1xPBS-Gemisch wurde nun so lange mit einem Rührgerät vermengt, bis die Gelatine vollständig gelöst war. Wenn die Flüssigkeit auf 40°C abgekühlt war, wurden 135g BSA portionsweise hinzugefügt. Dies wurde über Nacht auf dem Rührgerät gelöst. Am nächsten Tag wurden 90g Succrose in diesem Gemisch gelöst. Der fertige GBS-Mix wurde im letzten Schritt aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

GBS-Mix-Herstellung
2,2g Gelatine mit 5ml 1xPBS mischen
445ml 1xPBS auf 70°C erwärmen und hinzufügen
Gelatine unter stetigem Rühren vollständig lösen
135g BSA bei 40°C portionsweise dazugeben
Über Nacht unter stetem Rühren lösen
90g Succrose lösen
GBS-Mix aliquotieren und bei -20°C im Kühlschrank lagern

Tabelle 9

3.2.3. Plasmide

Für die Plasmidherstellung wurden kompetente Zellen (JM109) mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und vermehrt.

(1) Transformationslösungen

Sämtliche Lösungen wurden in den verwendeten Transformationskits mitgeliefert.

(2) Transformation (siehe Tabelle 10)

Sämtliche Transformationsschritte fanden, sofern nicht explizit anders beschrieben, unter semisterilem Umfeld am Bunsenbrenner sowie auf Eis statt.

Nachdem die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen und die bei -20°C gelagerten Plasmide langsam auf 4°C aufgetaut worden waren, wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mindestens 30µl kompetente Zellen und ca. 1µg Plasmid-DNA (suspendiert in 10µl autoklaviertem Wasser) pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 30 Minuten auf Eis gelagert, damit sich das Plasmid adäquat

um die Zellen herum verteilt. Um das Plasmid in die Zellen zu transferieren, wurde die Zellen-Plasmid-Lösung für 45 Sekunden in einem 42°C-Wasserbad schockerhitzt. Durch diesen Schritt öffneten sich Poren in der Zellmembran, die damit durchlässig für das Plasmid wurden. Nach Ablauf der 45 Sekunden wurden die transformierten Zellen auf Eis abgekühlt, sodass sich die Zellmembran wieder schließen konnte. Es wurde 500µl *LB-Medium* hinzugefügt. Deckel und Flasche waren bei diesem Schritt abzuflämmen, um Kontaminationen vorzubeugen. Zur Regeneration wurden die Zellen bei 37°C und 210 Umdrehungen/Minute für 45 Minuten inkubiert.

Die aufgenommenen DNA-Plasmide enthielten zusätzlich neben der gewünschten genetischen Aberration in den Genen von bspw. Rho-GTPasen die genetische Information für die Ausbildung einer spezifischen Antibiotikaresistenz. In unserem Setting wurden entweder Amipicillin- oder Kanamycin-Resistenzen in die Zellen translozíert. Bei einer Ampicillin-Resistenz wurden die transformierten Zellen zur Resistenztestung in eine 50ml *LB-Medium*-100mg Ampicillin-Lösung überführt und über Nacht bei 210 Umdrehungen/Minute und 37°C inkubiert. Diejenigen Zellen, die in Ampicillin überlebten, besaßen eine Ampicillin-Resistenz, mussten also das Plasmid aufgenommen haben. Die abgestorbenen Zellen wurden nicht erfolgreich transformiert. So wurde durch die Resistenztestung eine qualitativ hochwertige Transformation gewährleistet. Die Kanamycin-Resistenztestung erfolgte nach demselben Prinzip.

Transformation
mindestens 30µl kompetente Zellen (JM109) und 1µg Plasmid-DNA (suspendiert in 10µl autoklaviertem Wasser) bei 4°C pipettieren
Zell-Plasmid-Mix für 30 min bei 4°C lagern
Zell-Plasmid-Mix für 45 Sekunden im Wasserbad (42°C) schockerhitzen
schockerhitzten Zell-Plasmid-Mix auf Eis abkühlen
500µl *LB-Medium* hinzufügen (abflämmen von Deckel und Flasche des Mediums)
Zell-Plasmid-*LB-Medium*-Mix für 45 min bei 37°C und 210 Umdrehungen/Minute auf dem Schüttler inkubieren
die transformierten Zellen in 50ml *LB-Medium*-100mg Ampicillin-Lösung überführen
Mix über Nacht bei 210 Umdrehungen/Minute und 37°C inkubieren

Tabelle 10

(3) Plasmid DNA-Extraktion (siehe Tabelle 11)

Für die Extraktion wurde das *E.Z.N.A.-kit* von *OMEGA bio-tek* genutzt.

Alle Arbeitsschritte fanden bei RT statt. Es wurden 50-200ml der Zellkultur mit 4000g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Im nächsten Schritt wurden 10ml der *Solution-I* mit *RNaseA* gemischt und in die Lösung unter kontinuierlichem Auf- und Abpipettieren überführt und vollständig suspendiert. Daraufhin wurden 10ml der *Solution-II* hinzugegeben. Die Lösung wurde 8–10-mal vorsichtig gewendet. Dann wurde gewartet, bis ein klares Lysat entstanden ist (max. 5 min). Nach Zugabe von 5ml *N3-Puffer* wurde die Lösung so lange geschwenkt, bis das Lysat in weißlichen Schlieren ausgefallen ist. Die Flüssigkeit wurde nun mit Hilfe eines *Lysate-Clearance-Filter-Syringe* gefiltert, sodass eine lysatfreie Flüssigkeit aufgefangen werden konnte. Anschließend wurde ein *ETR-Bindungs-Puffer* im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Im nächsten Schritt wurde die Flüssigkeit mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt, sodass nur der Überstand aus DNA durch eine *HiBind-DNA-Maxi-Säule* gesammelt wurde. Dieser Überstand wurde im Folgenden mit 10ml *ETR-Wasch-Puffer*, einer Lösung aus 10ml *EHBC-Puffer* verdünnt mit 100%Isopropanol, aus 15ml *DNA-Wasch-Puffer* verdünnt mit 100%EtOH und einer Lösung aus 10ml *DNA-Wasch-Puffer* verdünnt mit 100%EtOH gewaschen. Hierfür wurden die Lösungen nacheinander in die Säule gefüllt und im Folgenden wieder abgesaugt. Die *HiBind-DNA-Maxi-Säule* wurde nach dem Waschen für 10 min durch Absaugen getrocknet und anschließend in ein Nuklease-freies 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. 1,5-3ml *Endo-free-Elution-Puffer* wurden direkt in die Säule pipettiert und für 5 Minuten ruhen gelassen. Daraufhin wurde für 5 Minuten mit 4000 g zentrifugiert. Die durch diesen Schritt ausgewaschene DNA wurde bei -20°C gelagert.

DNA-Extraktion
alle Schritte finden bei RT statt
50-200ml der Zellkultur für 10 Minuten mit 4000 g zentrifugieren und den Überstand abpipettieren
10ml *Solution-I* mit *RNaseA* hinzugeben und vollständig resuspendieren
10ml *Solution-II* hinzufügen und mischen, bis ein durchsichtiges Lysat entsteht
5ml kalten *N3-Puffers* hinzugeben und langsam drehen, bis ein weißlich flockiges Lysat entsteht
Das Lysat ohne Druck mit einem *Lysate-Clearance-Filter-Syringe* filtern
ETR-Binding-Puffer im Verhältnis 1:1 zum Filtrat hinzugeben und 10-mal langsam drehen
Das Filtrat mittels einer Vakuumpumpe durch eine *HiBind-DNA-Maxi-Säule* saugen
10ml *ETR-Wasch-Puffer* durch die *HiBind-DNA-Maxi-Säule* saugen
10ml *EHBC-Puffer* verdünnt mit 100%Isopropanol durch die *HiBind-DNA-Maxi-Säule* saugen
15ml *DNA-Wasch-Puffer* verdünnt mit 100%EtOH durch die *HiBind-DNA-Maxi-Säule* saugen
10ml *DNA-Wasch-Puffer* verdünnt mit 100%EtOH durch die *HiBind-DNA-Maxi-Säule* saugen
Der Rückstand in der Säule mit der Vakuumpumpe für 10 Minuten trocken saugen
HiBind-DNA-Maxi-Säule in einem Nuklease-freien Zentrifugenröhrchen mit 1,5-3ml *Endo-free-Elution-Puffer* befüllen und 5 Minuten stehen lassen
Die DNA bei 4000 g für 5 Minuten abzentrifugieren und bei -20°C lagern

Tabelle 11

3.3. Geräte

Gerätebezeichnung	*Hersteller/Produktbezeichnung*
6-Kant-Schraubendreher	Amf/CrV906-3
Abfwurf	Dahlhausen/sharp safe
Akku-betriebene Pipettierhilfe	Hirschmann/pipetus
Amplifier	Intracell/ EP21
Becherglas 1000ml	vwr/Becherglas,niedrige Form 1000ml
Becherglas 150ml	vwr/Becherglas,niedrige Form 150ml
Becherglas 250ml	vwr/Becherglas,niedrige Form 250ml
Becherglas 400ml	vwr/Becherglas,niedrige Form 400ml
Bleistift 1200HB	Soennecken
Brutschrank	BSS/420
Brutschrank	Compact/S84
Bunsenbrenner	Campinggaz/Gaskocher
Cryobox	Simport/T314-2100
Deckplatte 22x22mm	diverse
Deckplatte 24x32mm	diverse
Digitalkamera	Leica/DFC320 incl. Pow. supply
Durchlichtbasis	Leica/TL RC MDG 32
Einmalpipette 3,5ml	Sarstedt/Transferpipette
Einmal-Skalpell	Braun/Surgical disposable scalpel
Elektroporator	NEPA/NEPA21
Reaktionsgefäß 5ml	Sarstedt/Safeseal 1,5ml
Federschere	Geuder/19760
Filter Set UV für MZ 16 /F/FA	Leica/
Filterpapier	Whatman/Filterpapier
Fluoreszenzlampe	Leica/ebq100
Gefrierschrank	Liebherr/LGex3410
Gefrierschrank	Liebherr/LGUex1500
Glasflasche 1000ml	Schott Duran/Gewindeflasche
Glasflasche 100ml	Schott Duran/Gewindeflasche
Glasflasche 500ml	Schott Duran/Gewindeflasche
Glaskapillare 10ml	Sarstedt/serological pipette 10ml
Glaskapillare 25ml	Falcon/serological 25ml
Glaskapillare 5ml	Sarstedt/serological pipette 5ml
Kaltlichtquelle	Leica/KL 1500 LCD
Kaltlichtquelle	Leica/Modul CLS100X
Kaltlichtquelle	Leica/KL 1500 LCD
Kaltlichtquelle	Leica/KL 1500 LCD für TL RC
Kamera	Leica/DFC450 C
Kamera	Leica/MC120
Kanüle 0,4x20mm	Braun/sterilum
Kanüle 0,8x40mm	Braun/sterilum
Kühlschrank	Liebherr/LKuexv3910
Kühlschrank	Liebherr/LKuexv1610

Lagerbox	Sarstedt/Lagerbox
Lichtleiter	Leica/für TL RC MGD 32 Basen
Membran-Vakuumpumpe	Qiagen/QIAmp DSP Circulating NA Kit
Messzylinder 1000ml	Labsolute/Messzylinder hohe Form Klasse A 1000ml
Messzylinder 100ml	vwr/Messzylinder 100ml
Messzylinder 100ml	Hirschmann/ Messzylinder, Kl.A 100ml
Messzylinder 500ml	Hirschmann/ Messzylinder, Kl.A 500ml
Micropipette	HEKA Sutter /Puller P97
Mikroinjektor	FemtoJet/4i
Mikroreaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf/Eppendorf-Tubes 5,0ml
Mikroskop	Leica/DM5000 B (SN:352951)
Mikroskop	Leica/Inversmikroskop DMIL LED
Mikroskop	Leica/M80 Stereo (SN: 5844787)
Mikroskop	Leica/MZ 16 F mit Kamera DFC320
Mikroskop	Leica/MZ 7,5
Multiwell (24-er Platte)	Falcon/ Platten für Gewebekulturen
Objektiv	Leica/Achromatic 1.5x, M-Serie
Objektiv	Leica/Planapo 1.0x, M-Serie
Objektiv	Leica/Planapo 1.6x, MZ12.5/MZ16
Objektträger 76x26mm	Starfrost/Objektträger
Papiertücher	papernet/defendtech facial tissues
Petrischale-Glas	diverse
Petrischale-Plastik 100mm	Sarstedt/FEFTCDish 100-Standard
Petrischale-Plastik 60mm	Falcon;Sarstedt/bakteriologische Petrischale mit Deckel
Pinsel	Solo Goya/Basic line 3
Pinzette-gebogen	Bochem/Pinzette 18/8
Pinzette-gerade	Dumont/FST
Pipette 10µl	Eppendorf/Eppendorf research plus
Pipette 100µl	Eppendorf/Eppendorf research plus
Pipette 1000µl	Eppendorf/Eppendorf research plus
Pipette 2,5µl	Eppendorf/Eppendorf research plus
Pipette 5000µl	Eppendorf/Eppendorf research plus
Pipettenspitze	fisher scientific/Fisherbrand SureOne 1000UL
Pipettenspitze	Sarstedt/Biosphere
Pipettenspitze	Eppendorf/Microloader
Plasmid DNA-Extraktionskit	omega/E.Z.N.A. Endo-free plasmid DNA Maxi Kit Quick Guide
Plastikformen	diverse
Plastikschale 750ml	Labcor products/Plastikschale Siegelfähig
Plastikzylinder	ThermoFisher/Sterilin disposable Polypropylene Container
Reagenzglashalter	diverse
Schere	BC107R
Schraubröhre 15ml	Sarstedt/ 15ml Schraubröhre
Schraubröhre 50ml	Sarstedt/ 50ml Schraubröhre

Schüttelinkubator	Ecotron/
Schüttler	Heidolph/Rotamax120
Sekundenkleber	Uhu/Sekundenkleber blitzschnell mini
Sieblöffel	Geuder/15758
Spritze	Braun/omnifix
Timer	Labsolute/Dual Timer
Tinte	Rotring/Drawing-ink
Tungsten-Nadel	diverse
Tupfer	Hartmann/pure-Zellin
Vibratom	Leica/VT1000S
Vibratom-Klinge	diverse
Eierkühlschrank	Liebherr/WKB1812
Vortex	Benchmark/Vornado
Wasserbad	Benchmark/myBath
Zentrifuge	eppendorf/Centrifuge 5430R
Zentrifuge	vwr/Ministar silverline

Tabelle 12

3.4. Reagenzien

Wenn nicht explizit anders angegeben, ist das verwendete Wasser autoklaviert.

Reagenz	Zusammensetzung und Herstellung
0,1%PBST(TritonX100)	10%TritonX100 mit 1xPBS auf 1:100 verdünnen
0,1%PBST(Tween20)	10%Tween20 mit 1xPBS auf 1:100 verdünnen
0,2%Ham´s/Agarose-Gel	Ham´s F12 w/L Glutamin im Wasserbad auf 55°C erhitzen und mit 2% Agarose auf 0,2% verdünnen
1%BSA(bovines-Serum-Albumin)-0,1%PBST(Tween 20)	BSA mit 0,1%PBST(Tween20) auf 1% verdünnen
1xPBS	100ml 10xPBS auf 1000ml mit Wasser auffüllen
10xPBS	Pro 1000ml: 80g 1,37M NaCl; 2g 26,8mM KCl; 14,4g 101,4mM Na_2HPO_4; 2,4g 17,63mM KH_2PO_4
4%PFA-0,1%PBST(TritonX100)	Paraformaldehyd mit 0,1%PBST(TritonX100) auf 4% verdünnen
4%PFA-1xPBS	Paraformaldehyd mit 1xPBS auf 4% verdünnen
Blockierlösung	1ml 10%Donkeyserum mit 1%BSA-0,1%PBST(Tween20) auf 10ml auffüllen
DAPI-Lösung	1µl DAPI auf 1ml mit 1%BSA-0,1%PBST(Tween20) auffüllen
Elektroporationsplasmid	DNA-Plasmid in Wasser auf 1µg/µl verdünnen und *fast-green* zugeben, sodass dieses im Verhältnis 1:10 vorliegt
GBS-Mix	2,2g Gelatine; 450ml 1xPBS; 135g BSA; 90g Succrose (Herstellung: vgl. 3.2.2.)
Hyaluronidaselösung	Hyaluronidase (gelagert bei einer Konzentration von 10mg/ml in 1xPBS) verdünnen auf 2mg/ml mit 1xPBS
Primärantikörperlösung	200µl primärer Antikörper (MF20[DSHB]) und 1800µl Blockierlösung
Sekundärantikörperlösung	4µl sekundärer Antikörper (DaM AF568) und 1996µl 1%BSA-0,1%PBST(Tween20)
Tinte-Wasser-Mix	0,5ml Rotring-*Drawing-ink* mit 1xPBS auf 3ml aufgefüllen

Tabelle 13

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die in Material und Methoden (vgl. 3.1.2.(3)) beschriebenen elektroporierten Konstrukte einen Einfluss auf die Ausbildung dermomyotomaler Filopodien haben. Hierzu wurde die Filopodienzahl nach Elektroporation verschiedener Plasmide quantifiziert.
Da ich in den einzelnen Subgruppen relevante Unterschiede erkennen konnte und eine Erhöhung der Stichprobenzahl den zeitlichen Rahmen meiner Doktorarbeit gesprengt hätte, entschied ich mich dazu, die Stichprobenzahl von 7-22 Embryonen nicht weiter zu erhöhen.

Um die Funktion der Filopodien während der Entwicklung des Dermomyotoms zu untersuchen, sollte die Filopodien-Genese durch die Elektroporation der Plasmide dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP gehemmt werden. Die beiden genannten Konstrukte codieren für die dominant-negativen(dn)-Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1, deren Expression die Funktion von zellulärem Cdc42 und Rac1 inhibiert (vgl. 3.1.2.(3)) [100,105].

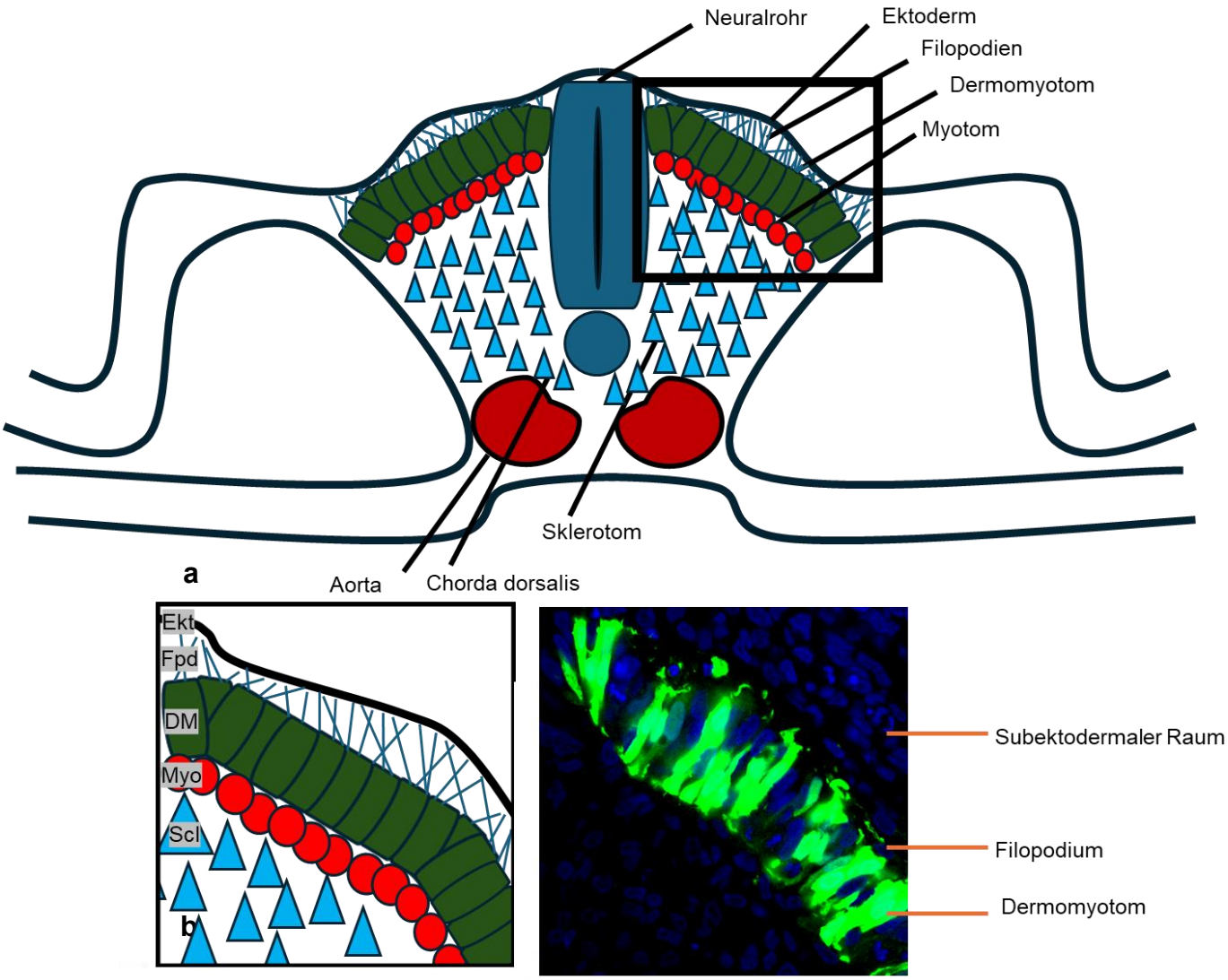


Abbildung 13: Orientierende Skizze eines Transversalschnittes durch einen Hühnerembryo sowie beispielhafte Darstellung der untersuchten Bereiche. *In* ***Abbildung 13a*** *sieht man die Übersichtsskizze eines Transversalschnittes durch den Embryo. Das Dermomyotom liegt dorsolateral des Neuralrohrs. Das epitheliale Dermomyotom bildet dorsolaterale Filopodien aus, die sich in den subektodermalen Raum bis zum Ektoderm erstrecken. Dermomyotomzellen, die eine myogene Entwicklung durchlaufen, mesenchymalisieren, wandern nach ventromedial und bilden dort das Myotom* [6]*. Der am weitesten ventromediale Teil des Somiten ist das Sklerotom, welches mesenchymalisiert und in Richtung Neuralrohr und Chorda dorsalis migriert, um dort die Wirbelkörper zu bilden* [4,5,28]*. Ventral der Chorda dorsalis sieht man die paarig angelegte Aorta* [30]*.* ***Abbildung 13b*** *zeigt eine schematische Skizze der in den angefertigten Transversalschnitten untersuchten Bereiche. Man sieht das Ektoderm (Ekt), das Dermomyotom (DM), dermomyotomale Filopodien (Fpd), das Myotom (Myo) und das Sklerotom (Scl). In* ***Abbildung 13c*** *findet sich ein beispielhafter*

Transversalschnitt durch einen mit pCAG-GFP elektroporierten Somiten. Es handelt sich um den Bildausschnitt, welcher in Abbildung 13b skizzenhaft dargestellt wurde. Zwischen dem dorsolateral gelegenen Ektorderm und dem ventromedial gelegenen Dermomyotom spannen sich eine Vielzahl von Filopodien im subektodermalen Raum auf.

In den folgenden Abbildungen zeige ich repräsentative Transversalschnitte des Dermomyotoms, die mit den jeweils beschriebenen Plasmiden elektroporiert wurden. In den jeweiligen Transversalschnitten befindet sich der subektodermale Spalt im oberen rechten Quadranten des Bildes, das epitheliale Dermomyotom befindet sich in der Diagonalen zwischen der oberen linken und der unteren rechten Bildecke. Das Myotom befindet sich unmittelbar links unterhalb des epithelialen Dermomyotoms. An die obere rechte Bildecke angrenzend befindet sich das Ektoderm, an die linke Bildkante angrenzend das Neuralrohr und an die untere linke Bildecke angrenzend die Chorda dorsalis. Die jeweiligen Ausschnitte befinden sich in dem in Abb. 13a mit einem schwarzen Rechteck markierten Bereich. Die im Folgenden abgebildeten Schnittbilder (Abb. 14-20) werden für eine bessere Vergleichbarkeit nochmals nebeneinander in Abb.22 aufgeführt.

4.1 pCAG-GFP

Das Kontrollplasmid pCAG-GFP wurde sowohl im gesamten epithelialen Zellkörper des Dermomyotoms als auch in den Zellfortsätzen/Filopodien exprimiert. Insgesamt wurden die GFP-positiven Filopodien und Zellkörper von 22 Embryonen gezählt, die ausschließlich mit pCAG-GFP elektroporiert wurden. Nur diejenigen Somiten, die erfolgreich elektroporiert wurden, wurden im nächsten Schritt ausgewertet. Dies führte dazu, dass pro ausgezählten Embryo zwischen 1 und 3 Somiten ausgewertet wurden.

pCAG-GFP

Zellzahl:	30
Filopodienzahl:	45
Filopodienzahl/: Zellzahl	1,5

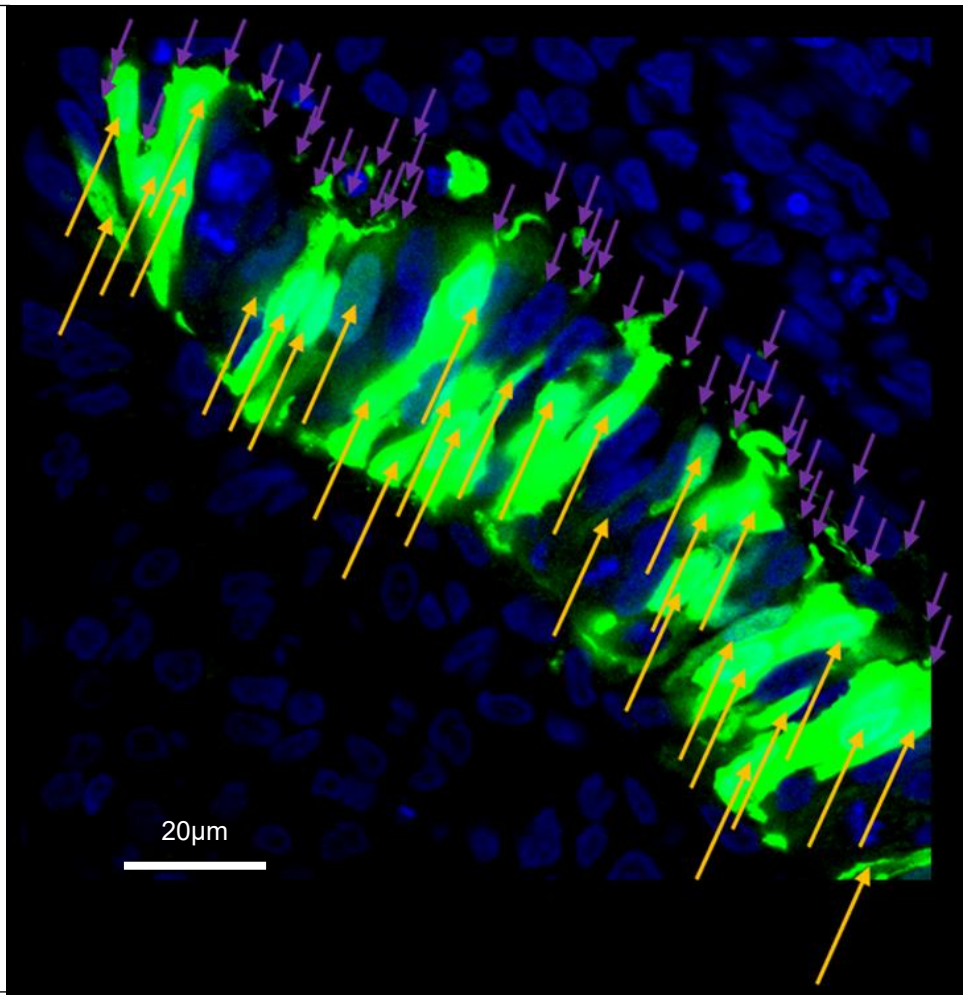


Abbildung 14a

pCAG-GFP

Zellzahl: 30

Filopodienzahl: 44

Filopodienzahl/: 1,47

Zellzahl

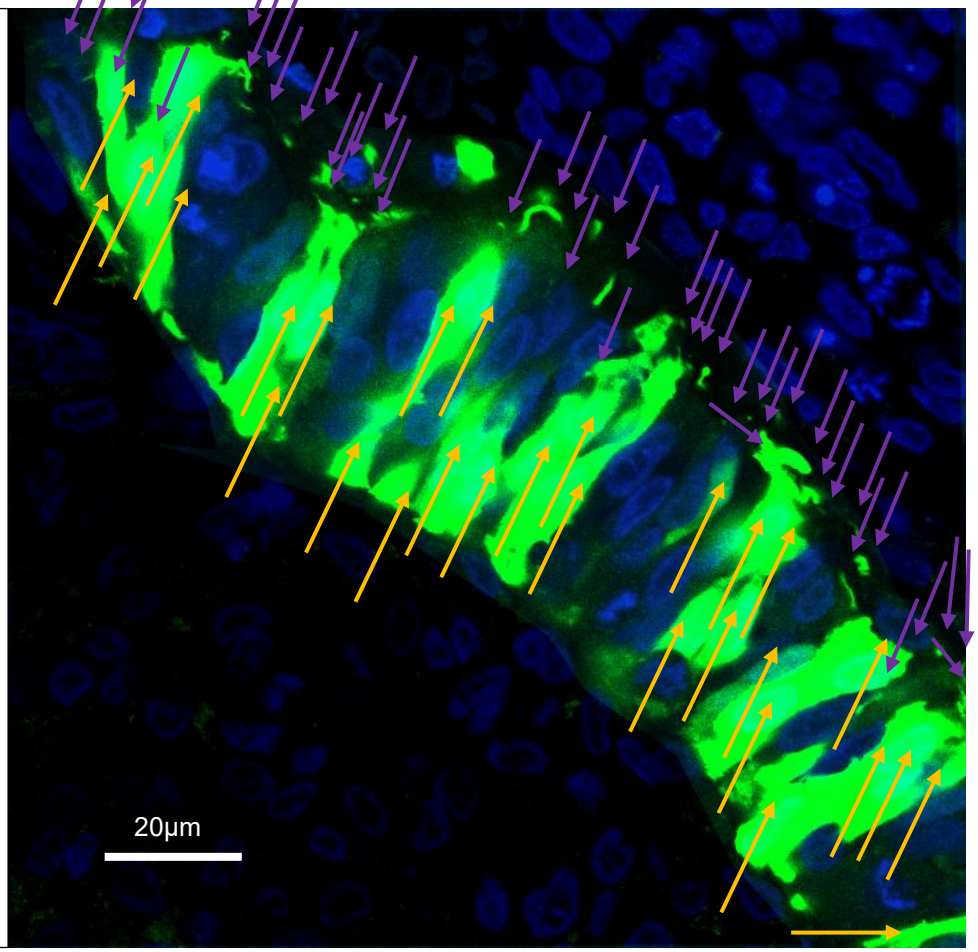


Abbildung 14b

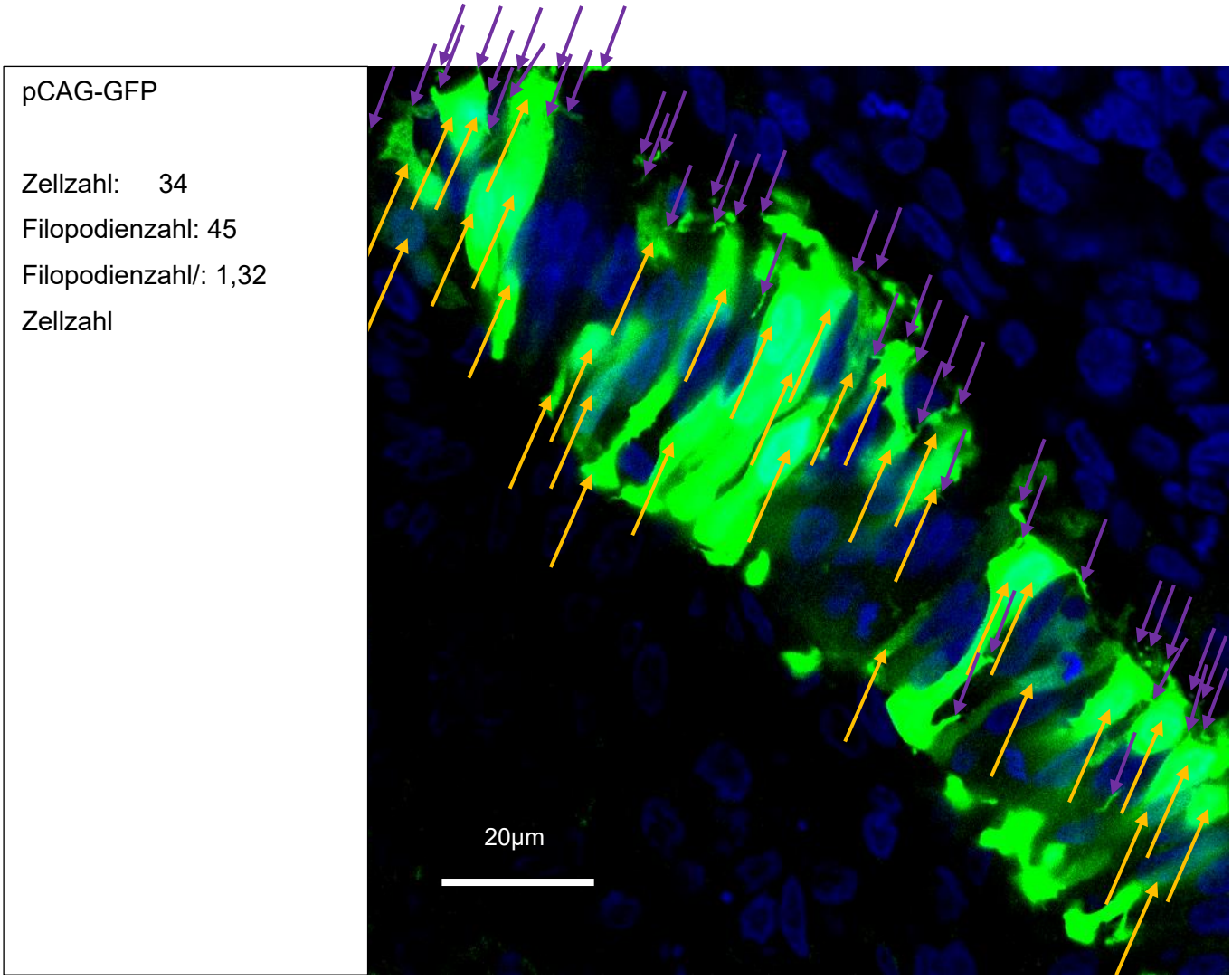


Abbildung 14c

Abbildung 14: ausgewählte Schnitte von 22 Somiten nach Elektroporation mit dem KonstruktpCAG-GFP; *In* ***Abbildungen 14a, b und c*** *(vgl. Abb 22b) sind Aufnahmen repräsentativer Schnitte mit dem konfokalen Lasermikroskop dargestellt. Die Somiten, die auf den Abbildungen zu sehen sind, wurden mit dem Plasmid pCAG-GFP elektroporiert. Mit den gelben Pfeilen (→) wurden die Zellsomata markiert. Die Anzahl der mit DAPI markierten Zellkerne gibt in größeren GFP-positiven Gebieten Aufschluss über die Zellzahl. Mit den violetten Pfeilen (→) sind die Filopodien markiert. Um die Mehrfachzählung eines Filopodiums zu vermeiden, betrachteten wir auch die anliegenden Schnittebenen. Manche Filopodien haben einen gewundenen Verlauf, sodass sie in einer Ebene mehrfach angeschnitten sind und so auch mehrfach gezählt werden könnten. Durch Betrachtung der angrenzenden Ebenen lassen sich die Anschnitte als Teile eines Filopodiums identifizieren und werden so korrekt als ein Filopodium gezählt. Der Quotient aus Filopodienzahl/Zellzahl beträgt über die drei Untersucher gemittelt 1,25 mit einer*

Standardabweichung von 0,31. Für eine genauere Aufschlüsselung der Werte siehe Tabelle 14-16 (pCAG-GFP).

***Abbildung 14a:** Im vorliegenden Schnitt wurden 45 Filopodien bei 30 Zellen gezählt. Dies entspricht einem Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten von 1,5. Die GFP-positiven Zellsomata sind hochprismatisch und in einer Reihe angeordnet, was eine epitheliale Struktur vermuten lässt. Die Filopodien sind zum größten Teil an den Apices der Zellen zu finden. Man findet einige wenige Filopodien von großem Durchmesser, aus denen oftmals weitere kleinere Fortsätze aussprossen. Zusätzlich gibt es eine große Zahl von dünnen Zellausläufern, die häufig in Clustern angeordnet sind. **Abbildung 14b:** Im vorliegenden Schnitt wurden 44 Filopodien bei 30 Zellen gezählt. Der Filopodienzahl/Zellzahl-Quotient ist 1,47. Auch hier sind die Zellen hochprismatisch in Reihe angeordnet. Die Filopodien liegen größtenteils apikal zum Ektoderm hingewandt und sind überwiegend filigran. **Abbildung 14c:** In diesem Schnitt wurden 34 Zellen und 45 Filopodien gezählt, was einem Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten von 1,32 entspricht. Die Somitenzellen sind epithelial angeordnet. Die Filopodien sind größtenteils filigran formiert und apikal gelegen.*

Für eine bessere Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.2 dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP

Nach Überexpression von dnRac(N17)-pCAGG-IRES-GFP ist die Anzahl der Filopodien, die vom Dermomyotom gebildet werden, reduziert.

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP	
Zellzahl:	26
Filopodienzahl:	16
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,62

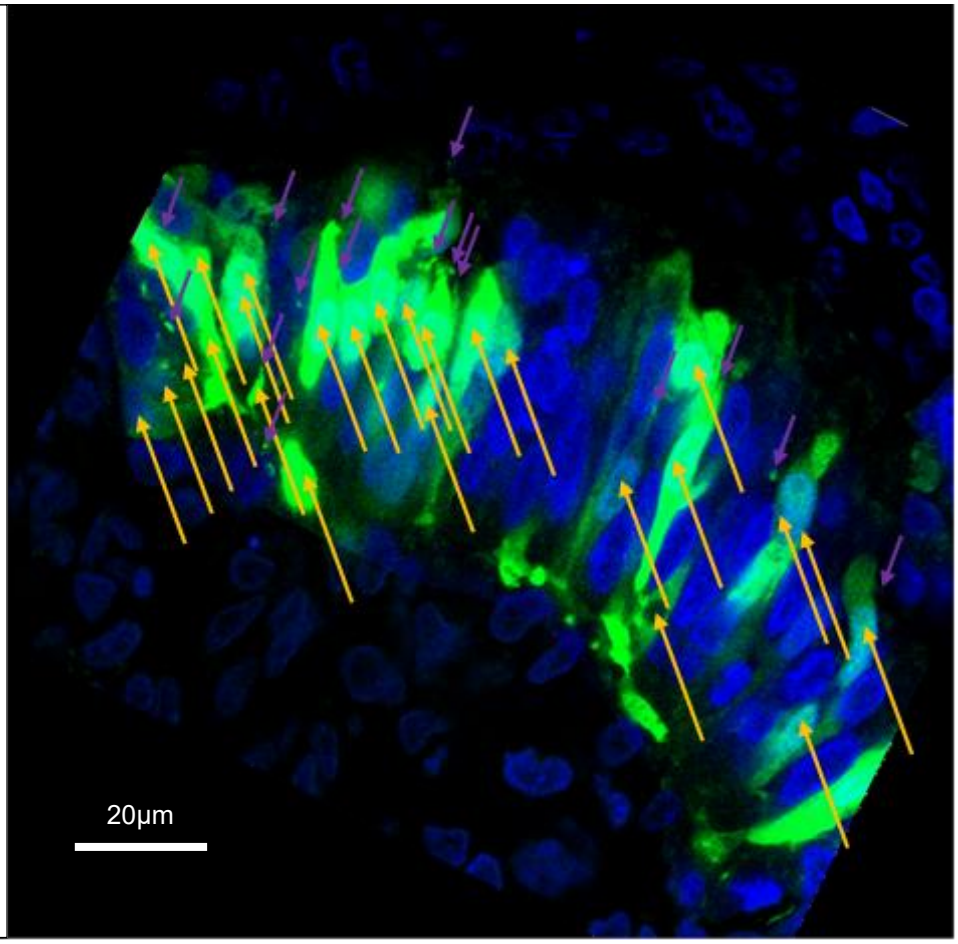


Abbildung 15a

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP

Zellzahl: 31

Filopodienzahl: 15

Filopodienzahl/: 0,48 Zellzahl

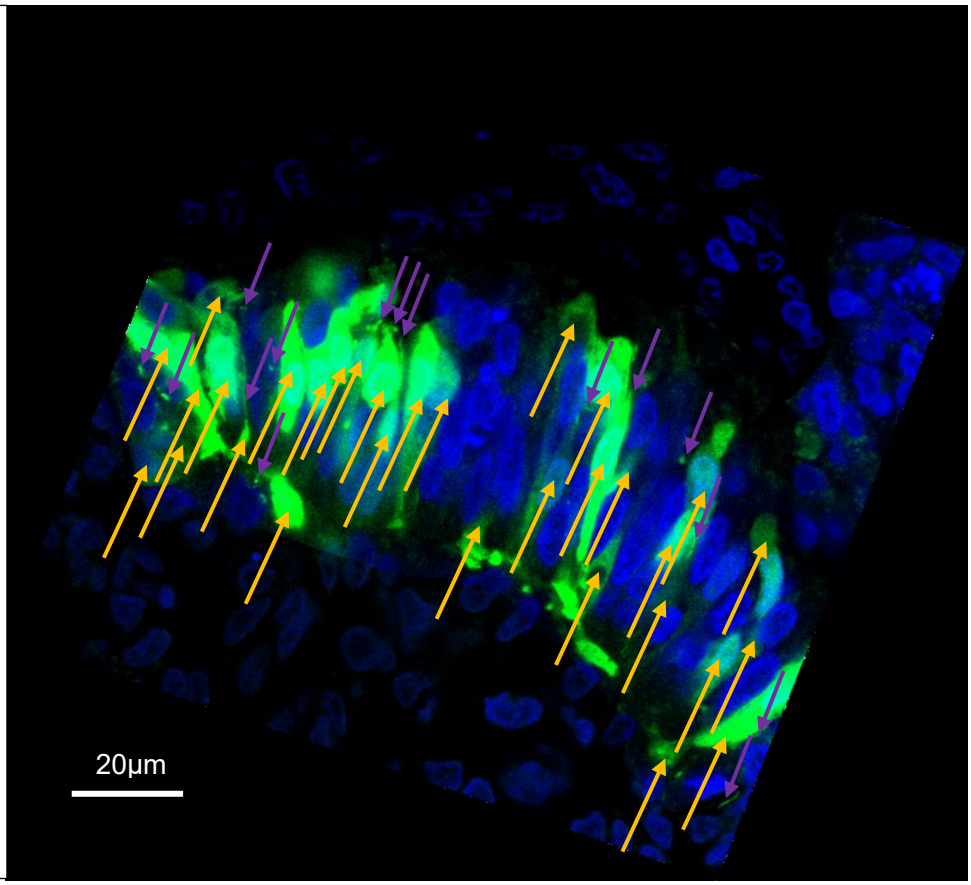


Abbildung 15b

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP

Zellzahl: 26
Filopodienzahl: 15
Filopodienzahl/: 0,58 Zellzahl

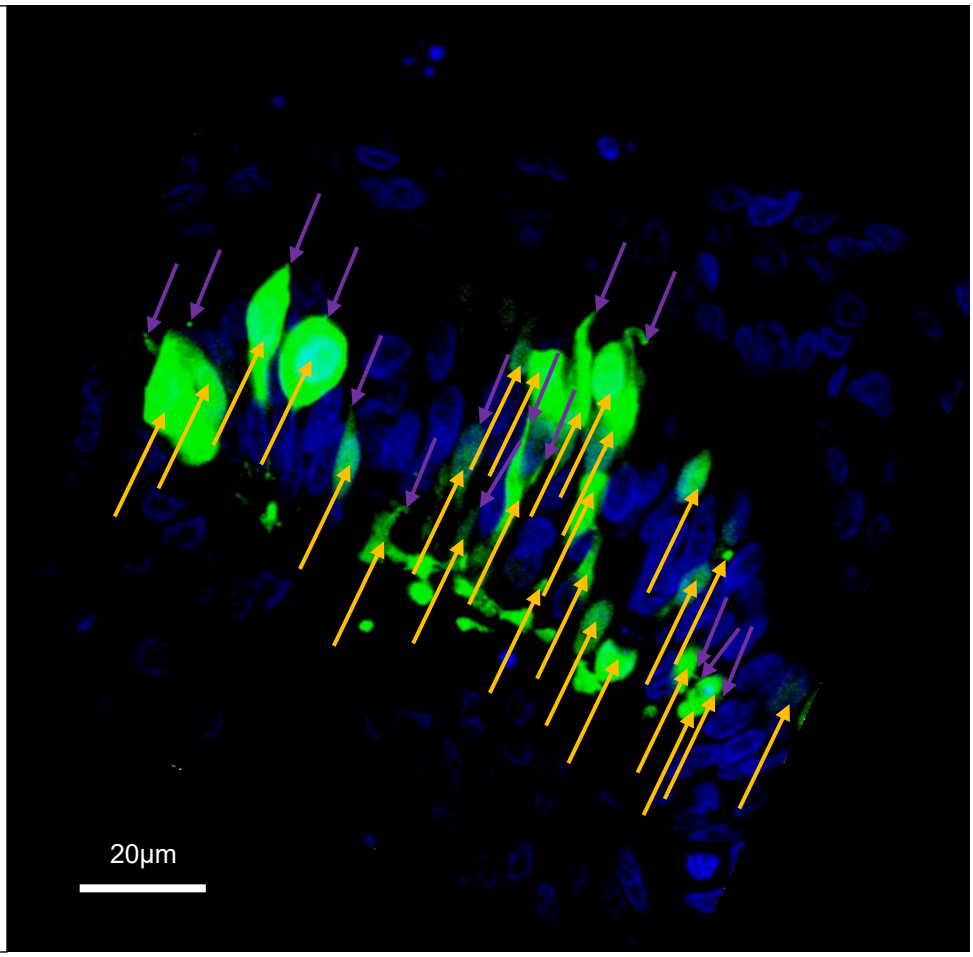


Abbildung 15c

Abbildung 15: ausgewählte Schnitte von 18 Somiten nach Elektroporation des Konstruktes dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP. *Zellsomata sind mit →, Filopodien mit → gekennzeichnet. Der gemittelte Quotient aus Filopodienzahl/Zellzahl beträgt 0,69 mit einer Standardabweichung von 0,10. Für eine genauere Aufschlüsselung der Werte siehe Tabelle 14-16 (dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP). Die in Abbildung 14 beschriebenen kleinen Zellfortsätze finden sich hier nur noch in sehr geringer Zahl. Die Strecke, über die die Filopodien im subektodermalen Raum verfolgt werden können, ist ebenfalls kürzer als in der Kontrollgruppe.* ***Abbildung 15a:*** *In diesem Schnitt (vgl. Abb. 22c) wurden 26 Zellen (gelbe Pfeile) und 16 Filopodien (violette Pfeile) gezählt. Dies ergibt einen Quotienten von 0,62. Die Zellen sind weiterhin eher hochprismatisch und in Reihe geordnet. Die Zellkonturen wirken allerdings unregelmäßig. Am deutlichsten zeigt sich dies im linken Bildrand, an welchem die Zellen ihren normalerweise epithelialen Charakter nahezu verloren haben. Sie scheinen nicht mehr in Reihe zu stehen und sind nicht mehr hochprismatisch, sondern unstet, wie es eher für mesenchymale Zellen typisch ist.* ***Abbildung 15b:*** *Auch hier sind die Zellsomata hochprismatisch angeordnet. Die Filopodienzahl ist verringert. Es wurden 31 Zellen,*

sowie 15 Filopodien gezählt, was einem Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten von 0,48 entspricht. ***Abbildung 15c:*** *Die Zellen sind in diesem Schnitt nur teilweise angeschnitten, sodass die Zellsomata nicht über die komplette Länge hin verfolgbar sind. Die Filopodien sind rarefiziert. Es wurden 26 Zellen, sowie 15 Filopodien gezählt, was einem Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten von 0,58 entspricht.*

Für eine bessere Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.3 dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP

Durch die Elektroporation mit einer dominant-negativen Mutante des Gens für die Rho-GTPase Cdc42 (dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS getagged mit pCAG-GFP) sollte diese gehemmt werden.

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP	
Zellzahl:	23
Filopodienzahl:	14
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,61

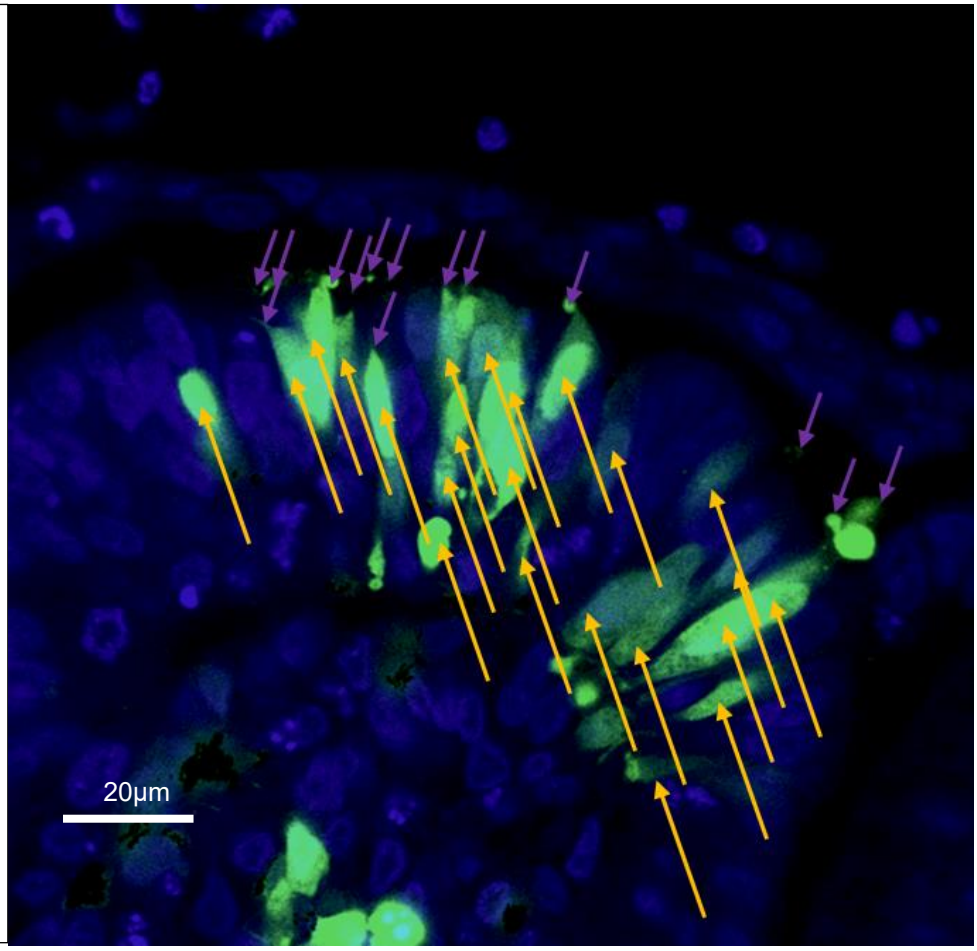


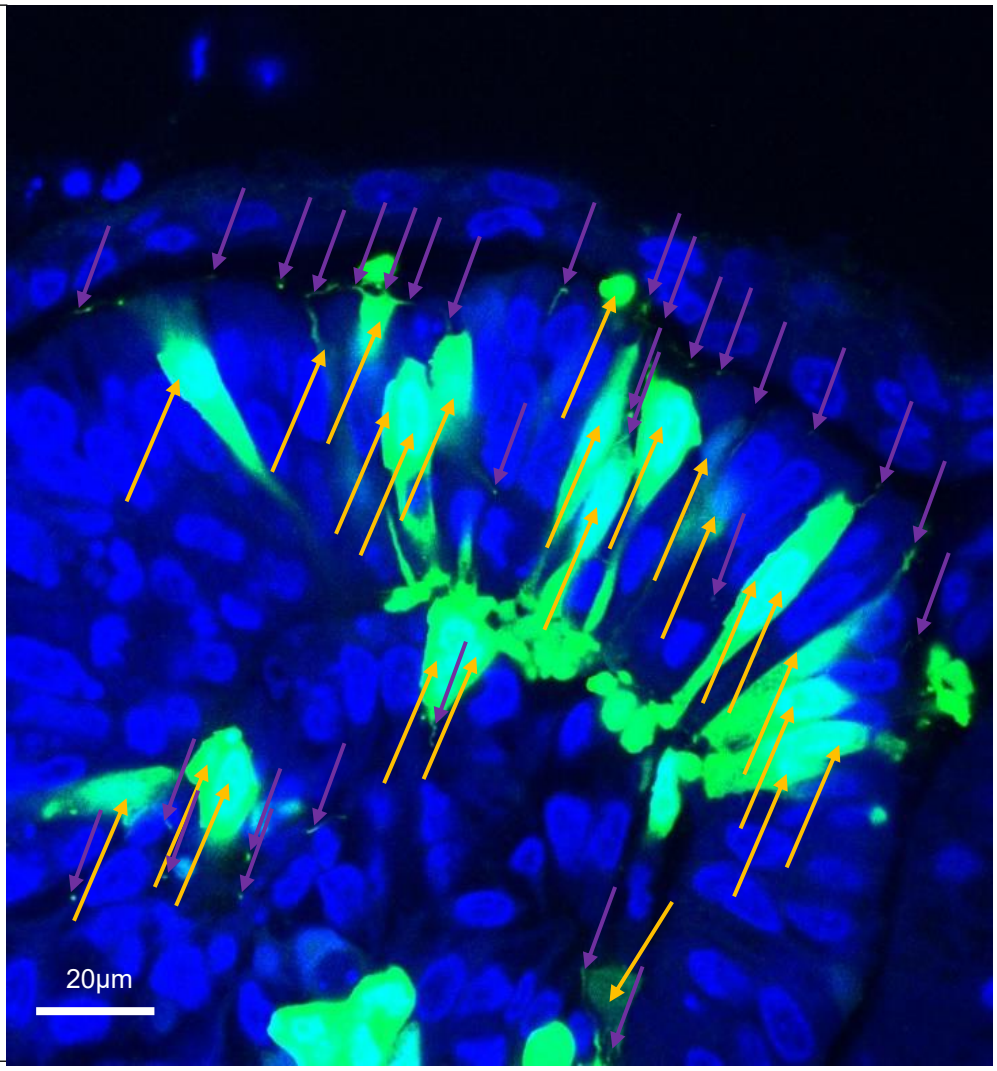
Abbildung 16a

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP

Zellzahl: 24

Filopodienzahl: 31

Filopodienzahl/: 1,29
Zellzahl



dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP	
Zellzahl:	35
Filopodienzahl:	45
Filopodienzahl/: Zellzahl	1,29

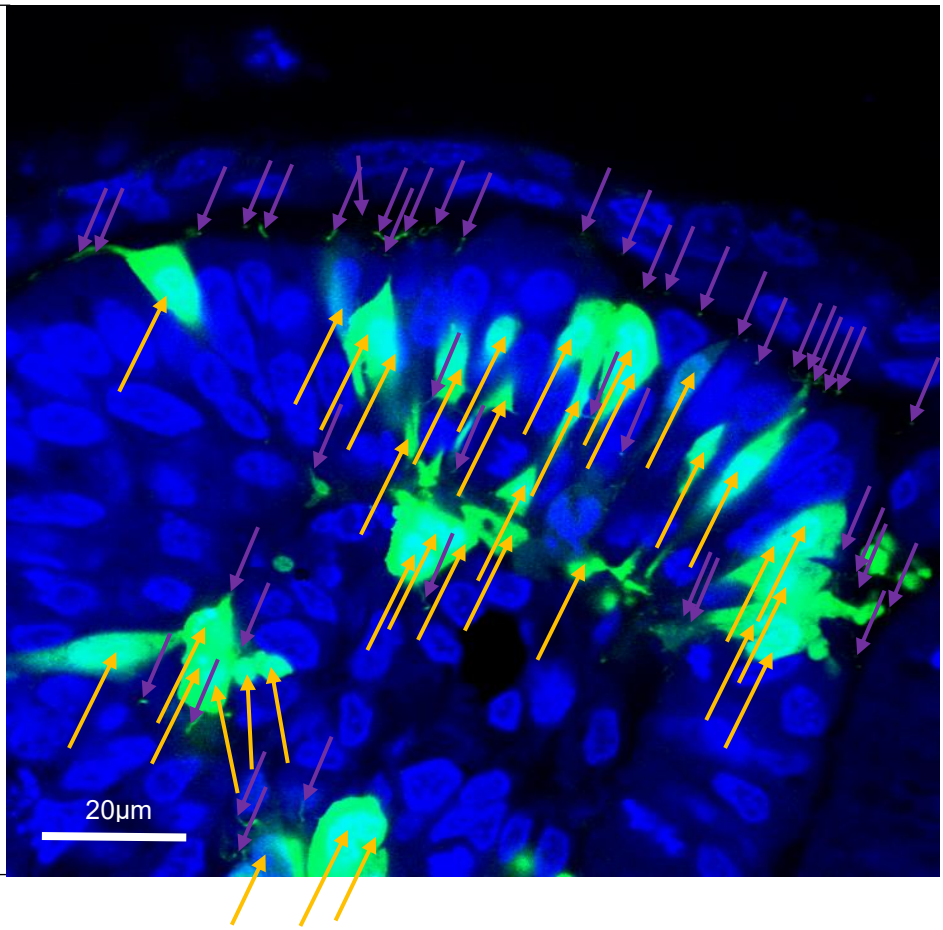


Abbildung 16c

Abbildung 16: ausgewählte Schnitte von 19 Somiten nach Elektroporation des Konstruktes dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP; *Gezeigt werden drei exemplarische Schnitte nach Elektroporation des Konstruktes dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP, in denen sowohl die Zellsomata (→) als auch die Filopodien (→) quantifiziert wurden. Der Quotient aus Filopodienzahl/Zellzahl beträgt über die 19 betrachteten Somiten gemittelt 1,30 mit einer Standardabweichung von 0,31. Für eine genauere Aufschlüsselung der Werte siehe Tabelle 14-16 (dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP).* ***Abbildung 16a:*** *In diesem repräsentativen Schnitt (vgl. hierzu auch Abb. 22f) wurden 23 Zellen (gelbe Pfeile) und 14 Filopodien (violette Pfeile) gezählt. Dies entspricht einem Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten von 0,61. Die Zellkörper sind epithelial geordnet und hochprismatisch. Die Zellen liegen unregelmäßig in der Ebene. Die Filopodienmorphologie ist variabel. Es finden sich sowohl Filopodien von dickerem als auch von dünnerem Durchmesser.* ***Abbildung 16b:*** *Es wurden 24 Zellen und 31 Filopodien gezählt, woraus sich ein Quotient von 1,29 ergibt. Die Zellen sind hochprismatisch formiert und bilden eine Vielzahl filigraner Filopodien aus.* ***Abbildung 16c:*** *In diesem Schnitt ergab die Quantifizierung 35 Zellsomata sowie 45 Filopodien. Auch hier sind die Zellen hochprismatisch angeordnet.*

Die Filopodien sind filigran und befinden sich größtenteils apikal der Zellen. Ein geringerer Teil der Filopodien ist nach basal ausgerichtet. Der Zellzahl/Filopodienzahl-Quotient ist 1,29.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.4 Zusammenfassung der Filopodieninhibition

Zusammenfassend ergibt sich für die Inhibition der Filopodienbildung durch die Elektroporation der Plasmide dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein Bild, welches in **Tabelle 14** dargestellt wird. Ich konnte zeigen, dass

- die Elektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP zu einer, im Vergleich zur Kontrollgruppe, relevanten Reduktion des Filopodienzahl-Zellzahl-Quotienten führt.
- sich aus der Elektroporation mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP gegenüber der Kontrollgruppe kein relevanter Unterschied in der relativen Filopodienzahl ergibt.

4.5 Cofilin-*rescue*

Nachdem geprüft wurde, ob und in welcher Qualität die Experimente eine Filopodieninhibition induzieren, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob die Zellen durch die Elektroporation mit den Konstrukten dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP unspezifisch beeinträchtigt oder letal werden. Dies ist notwendig, um zu bestätigen, dass die im weiteren Verlauf auftretenden Beobachtungen aufgrund der Inhibition von Filopodienbildung zustande kommen und nicht durch Filopodien-unabhängige Mechanismen oder Zelluntergang bzw. Apoptose bedingt sind. Hierfür werden vier Gruppen mit jeweils dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin, dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP, dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1-Cofilin und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+CofilinS3A-GFP coelektroporiert. Cofilin ist, wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 2.10), ein Protein, welches im Rho-GTPasen-Signalweg der Filopodien-Genese *downstream* der Rho-GTPasen aktiv ist und folglich die inhibitorische Wirkung der oben genannten Plasmide aufheben sollte [90,92]. CofilinS3A ist eine dauerhaft aktive Form des Cofilins [110]. Die verstärkte Aktivierung von Cofilin sollte als *rescue* die Filopodien-Genese trotz gehemmter Rho-GTPasen regenerieren. Dies würde zeigen, dass die Zellen durch die Elektroporation mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS nicht unspezifisch filopodienunabhängig beeinflusst oder letal werden.
Durch die Coelektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP mit EGFP-N1-Cofilin zeigt sich folgendes Bild:

4.6 dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1 Cofilin

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin	
Zellzahl:	18
Filopodienzahl:	15
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,83

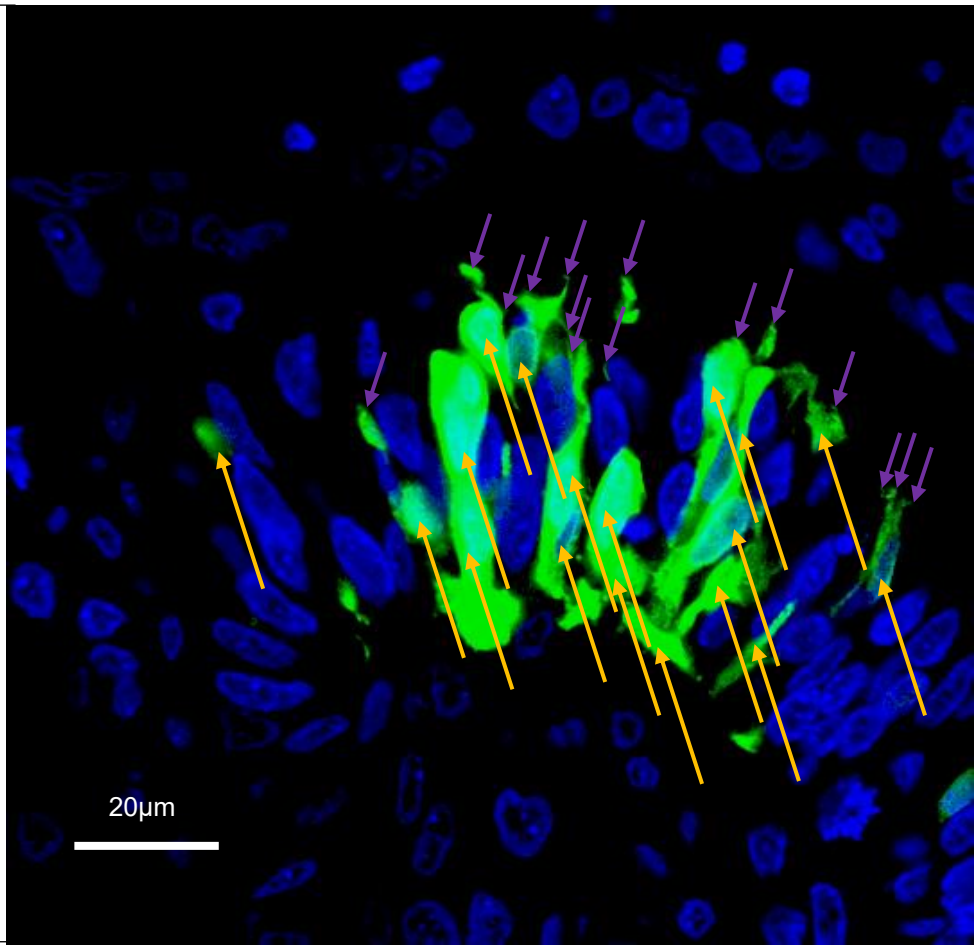


Abbildung 17a

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1 Cofilin

Zellzahl:	36
Filopodienzahl:	29
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,81

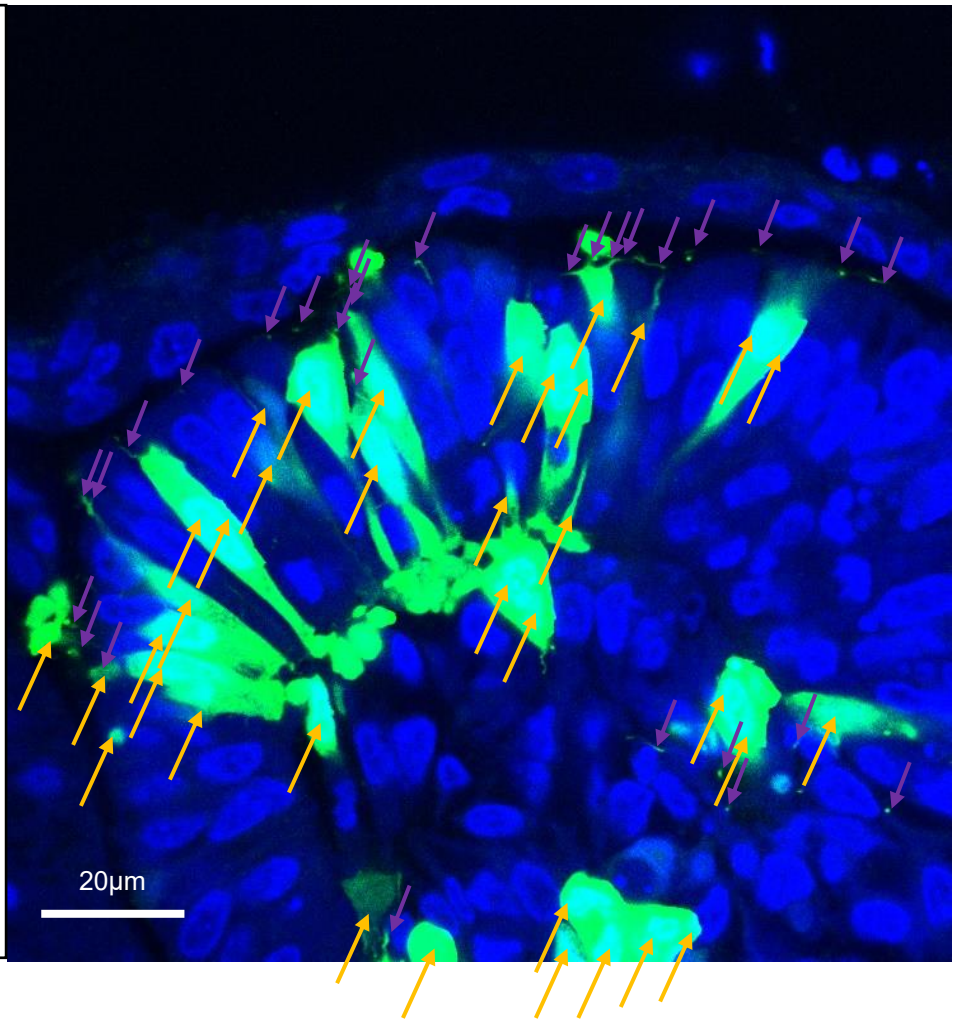


Abbildung 17b

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1 Cofilin	
Zellzahl:	30
Filopodienzahl:	18
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,6

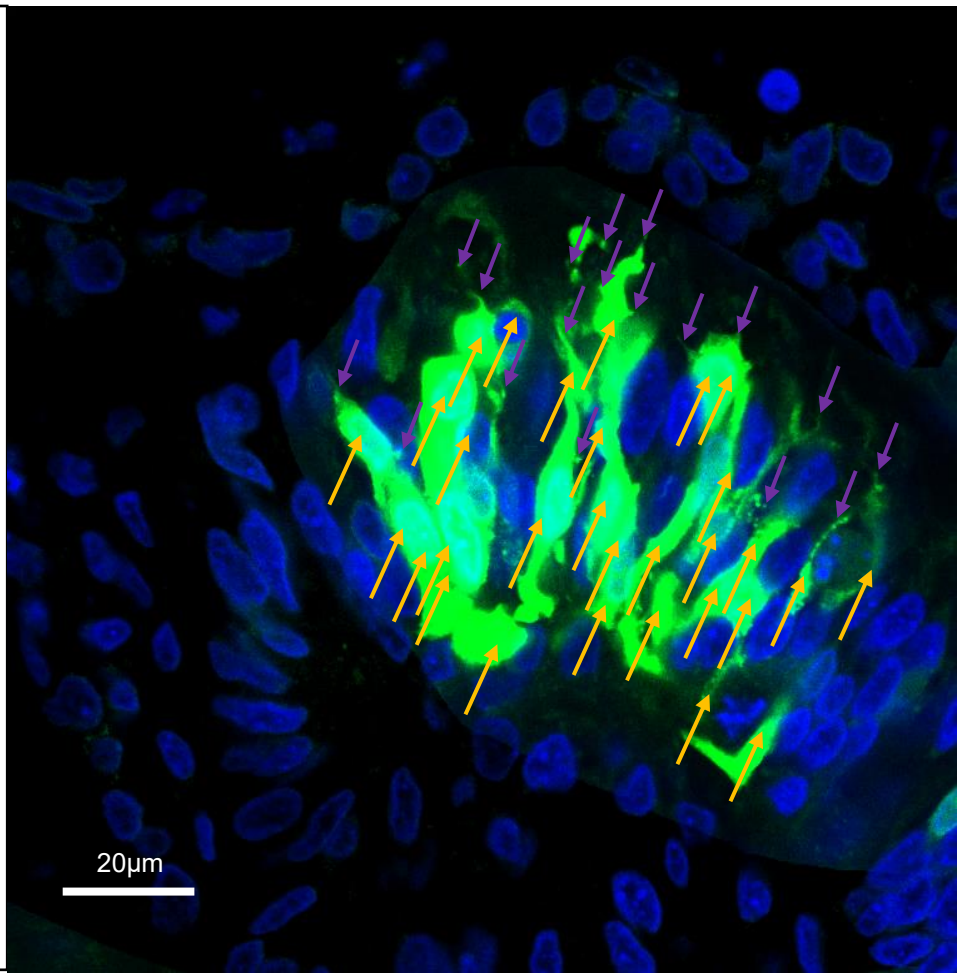


Abbildung 17c

Abbildung 17: repräsentative Schnitte von 14 Somiten nach Elektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin*. Insgesamt wurden 14 Somiten quantifiziert. Der gemittelte Quotient beträgt 0,86 mit einer Standardabweichung von 0,17. Hieraus ergibt sich folgendes Bild: Die Coexpression von Cofilin und dnRac1 führt zu keiner relevanten Änderung des Filpodienzahl/Zellzahl-Quotienten im Vergleich zum Quotienten bei alleiniger Expression von dnRac1. Für eine genauere Aufschlüsselung der Werte siehe Tabelle 14-16 (dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin).* ***Abbildung 17a*** *(vgl. Abb. 22d) zeigt einen repräsentativen Transversalschnitt eines Somiten, der mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin elektroporiert wurde. Es wurden 18 Zellen (gelbe Pfeile) und 15 Filopodien (violette Pfeile) gezählt, was einem Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten von 0,83 entspricht. Es ist nur ein Teil des DM´s getroffen worden. Auch hier wirkt die Zellmorphologie variabel. Es sind sowohl Filopodien von großem Durchmesser als auch Filopodien von geringerem Durchmesser zu erkennen. Die Filopodien sind homogen über die gesamten DM-Zellen verteilt.* ***Abbildung 17b:*** *Die Zellen sind hochprismatisch angeordnet, zeigen aber zusätzlich eine unebene Struktur. Gleiches*

gilt für die Filopodien, welche sich im Durchmesser stark unterscheiden. Es wurden 36 Zellsomata und 29 Filopodien gezählt, sodass sich ein Quotient von 0,81 ergibt. ***Abbildung 17c:*** *Die Quantifizierung von Zellen und Filopodien ergab 30 Zellsomata bei 18 Filopodien und einen Quotienten von 0,6.*

Für eine bessere Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.7 dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP

Bei der Coelektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und Cofilin-S3A-GFP ergab sich Folgendes:

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP	
Zellzahl:	27
Filopodienzahl:	33
Filopodienzahl/: Zellzahl	1,22

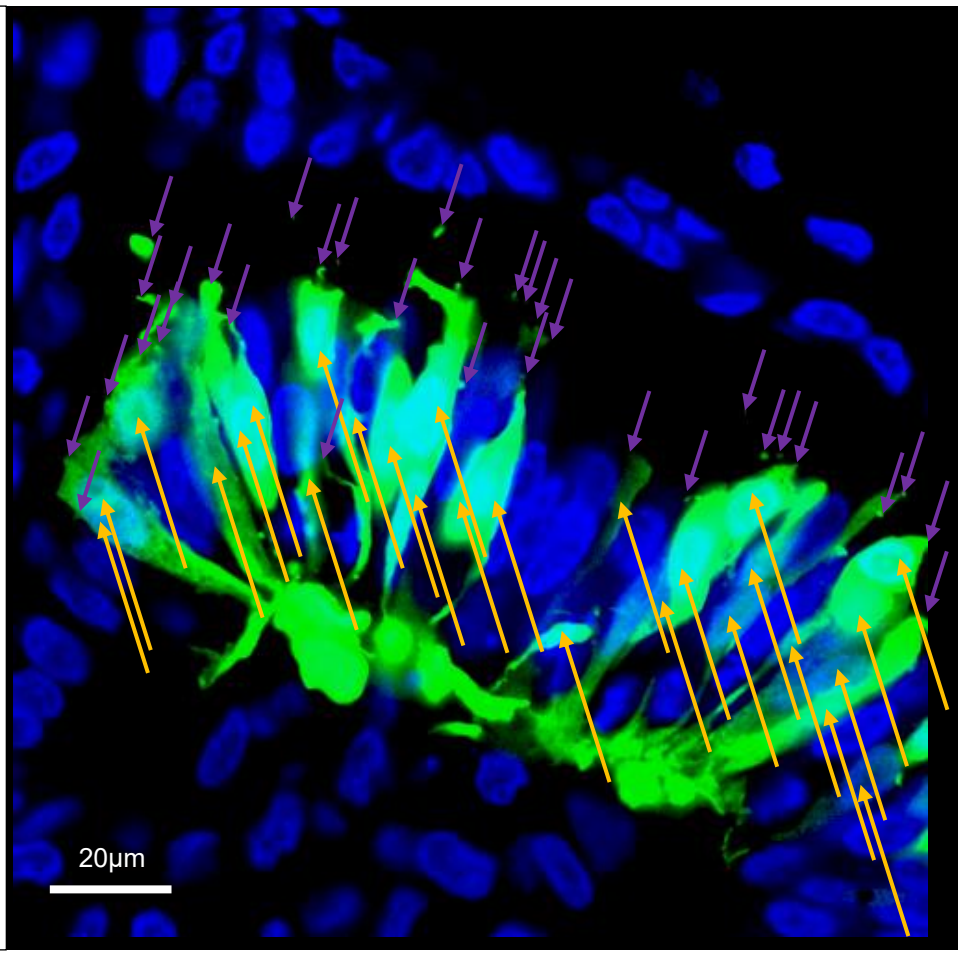


Abbildung 18a

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP

Zellzahl:	28
Filopodienzahl:	41
Filopodienzahl/: Zellzahl	1,46

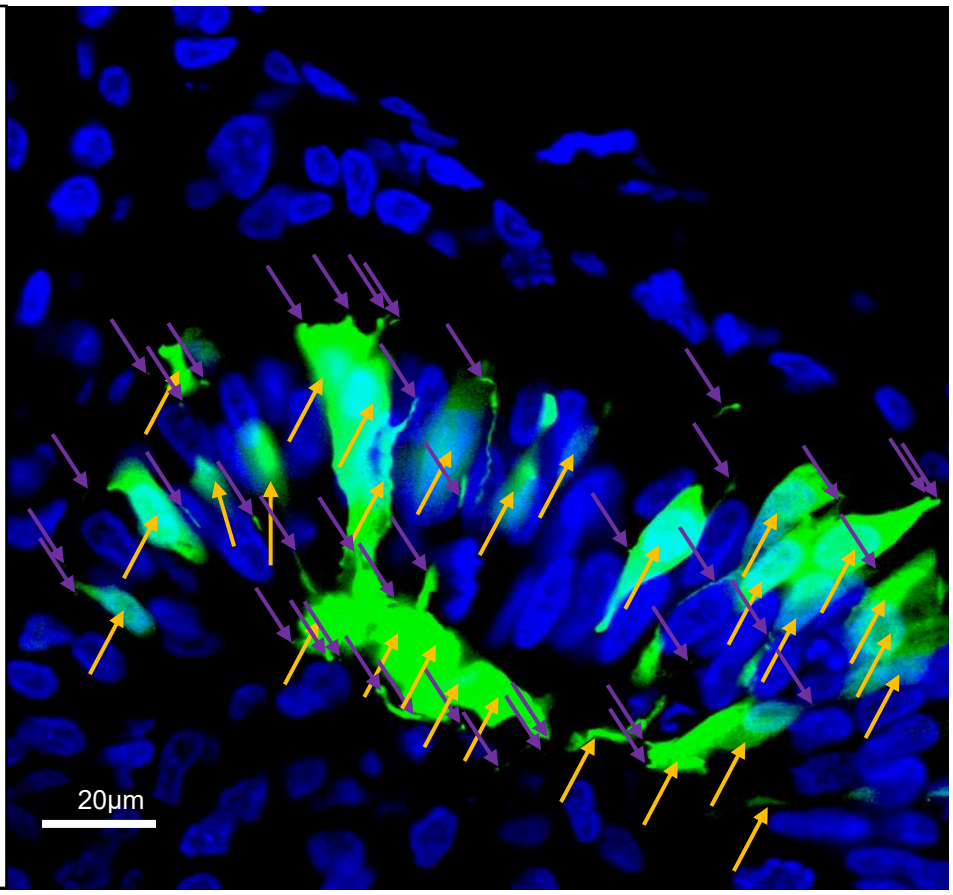


Abbildung 18b

dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP	
Zellzahl:	29
Filopodienzahl:	39
Filopodienzahl/: Zellzahl	1,34

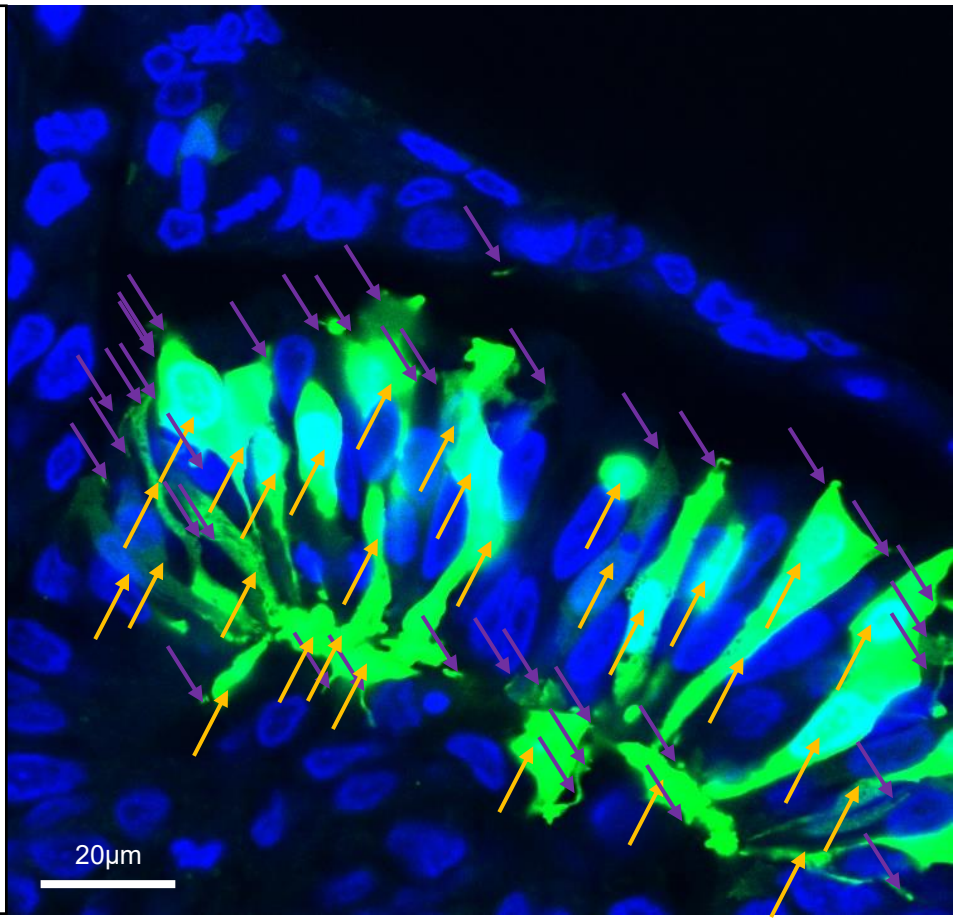


Abbildung 18c

Abbildung 18: repräsentative Transversalschnitte von 7 Somiten nach Elektroporation des Konstruktes dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP*. Der mittlere Filopodienzahl/Zellzahl-Quotient der 7 quantifizierten Somiten beträgt 1,33 (Standardabweichung: 0,23). Der Filopodienzahl/Zellzahl-Quotient ist bei Coexpression von dnRac1 und CofilinS3A relevant gegenüber dem Quotienten bei alleiniger Expression von dnRac1 erhöht. Für eine genauere Aufschlüsselung der Werte siehe Tabelle 14-16 (dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP).* ***Abbildung 18a (****vgl. Abb. 22e****)*** *zeigt einen typischen Vibratomschnitt (transversal). In diesem wurden 27 Zellen (gelbe Pfeile) und 33 Filopodien (violette Pfeile) gezählt, was einem Quotienten von 1,22 entspricht. Die Zellen sind epithelial angeordnet, gerade im rechten Bereich wirkt die Anordnung einheitlich. Sowohl Filopodien mit großem Durchmesser als auch solche mit geringerem Durchmesser sind vorhanden. In* ***Abbildung 18b*** *wurden 28 Zellsomata und 41 Filopodien gezählt (Filopodienzahl/Zellzahlquotient: 1,46). In einem dritten repräsentativen Transversalschnitt in* ***Abbildung 18c*** *wurden 29 Zellen sowie 39 Filopodien gezählt, was einem Filopodienzahl-Zellzahl-Quotienten von 1,34 entspricht****.*** *Für eine bessere*

Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.8 dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1 Cofilin

Ebenso wurden Embryonen mit dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS und EGFP-N1-Cofilin coelektroporiert.

dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1-Cofilin Zellzahl: 12 Filopodienzahl: 4 Filopodienzahl/: 0,33 Zellzahl

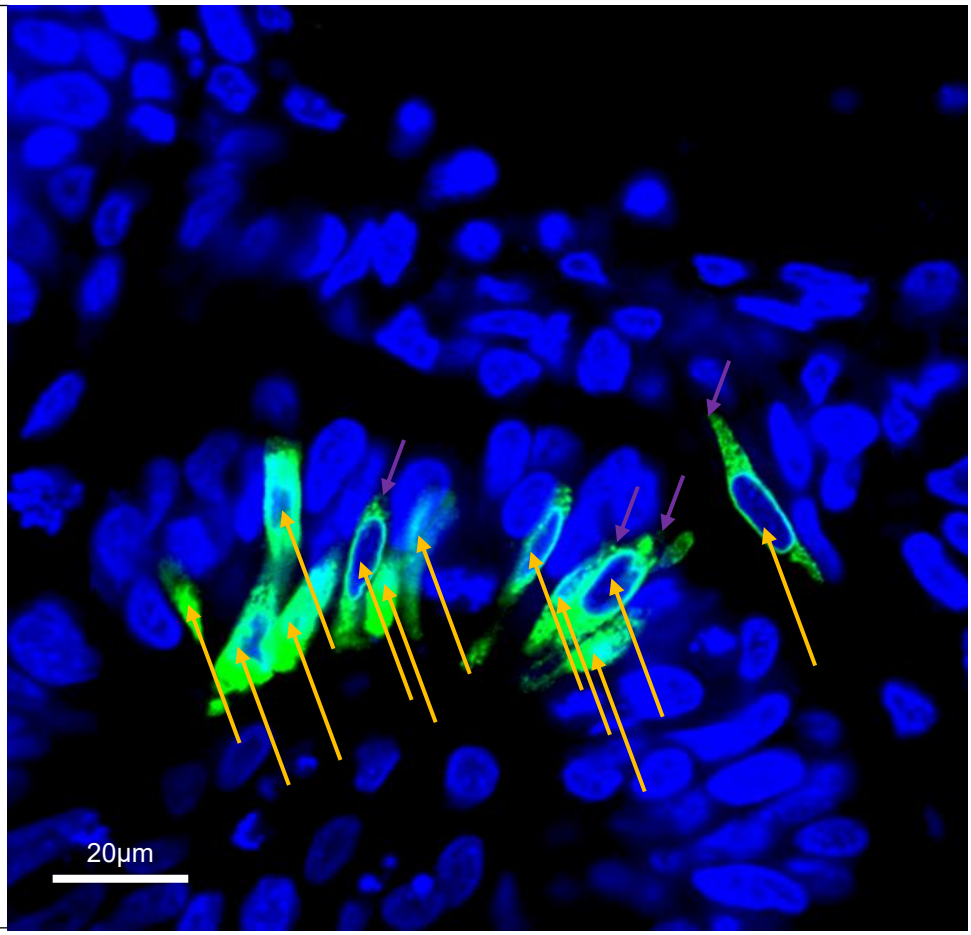


Abbildung 19a

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + EGFP-N1-Cofilin	
Zellzahl:	12
Filopodienzahl:	6
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,5

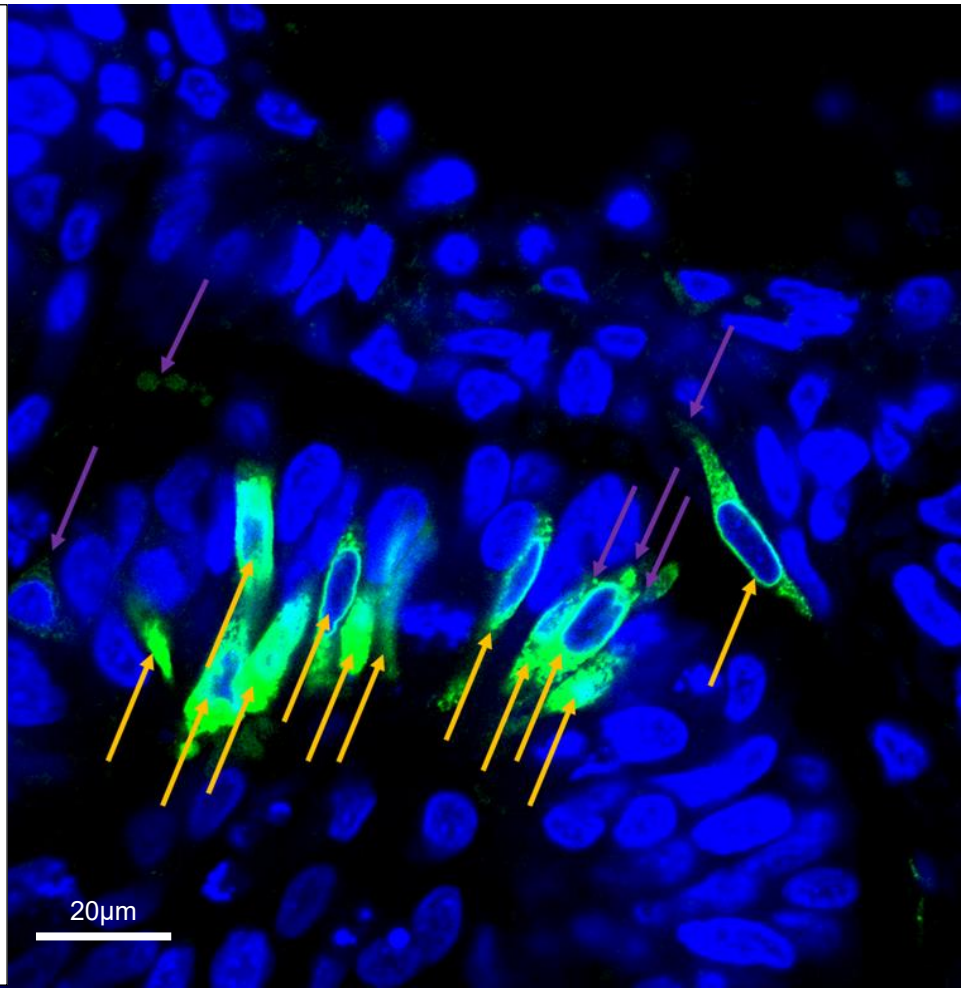


Abbildung 19b

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + EGFP-N1-Cofilin	
Zellzahl:	13
Filopodienzahl:	6
Filopodienzahl/: Zellzahl	0,46

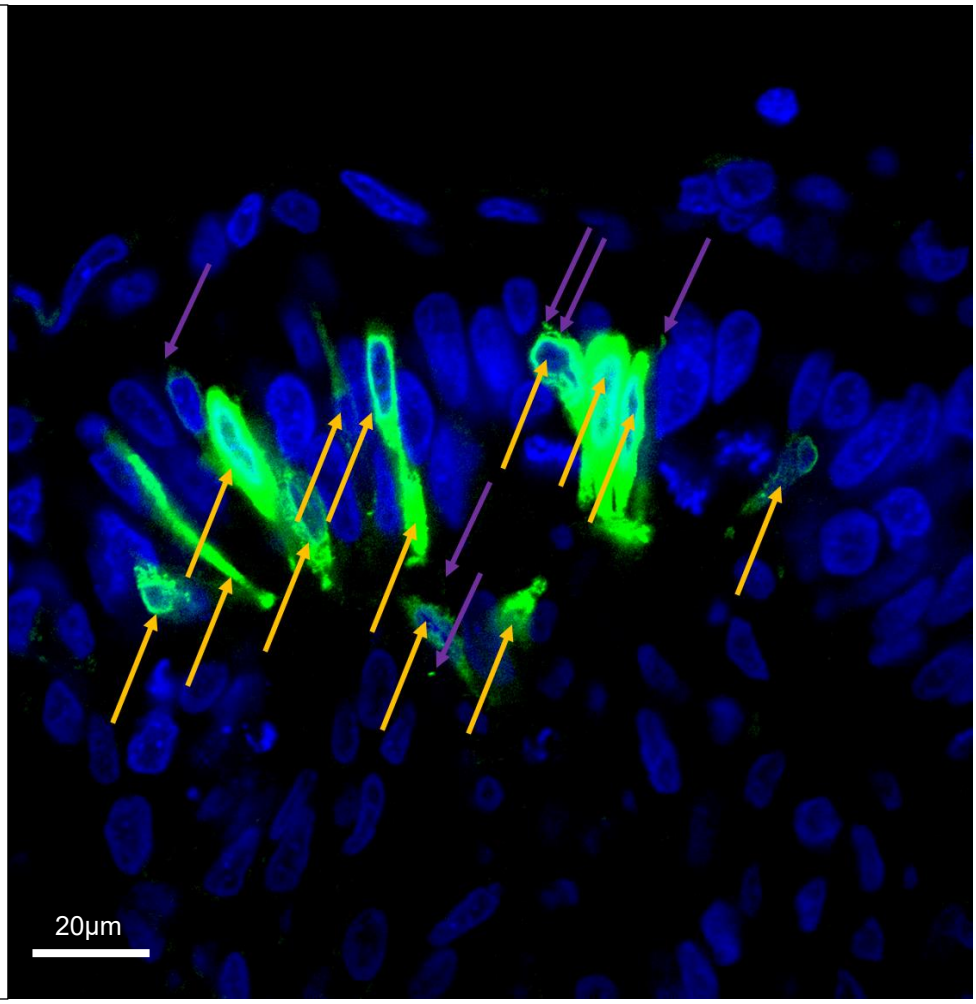


Abbildung 19c

Abbildung 19: ausgewählte Transversalschnitte von 9 Somiten nach der Elektroporation des Konstruktes dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1-Cofilin*. Der gemittelte Filopodienzahl/Zellzahl-quotient beträgt 0,54 (Standardabweichung: 0,26). Die relative Filopodienzahl ist bei Expression von dnCdc42 und Cofilin relevant gegenüber der relativen Filopodienzahl bei alleiniger Expression von dnCdc42 erniedrigt. Für eine genauere Aufschlüsselung der Daten vergleiche Tabelle 14-16 (dnCdc42*T17N in Vektor *pCAGGS + EGFP-N1*-Cofilin). Die Fluoreszenzfärbung durch GFP war, wie in den Beispielen, so auch im Allgemeinen, eher schwach und inhomogen. Die Zellen wirken epithelial strukturiert und relativ einheitlich.* ***Abbildung 19a*** *(vgl. Abb. 22g): Es wurden 4 Filopodien (violette Pfeile) bei 12 Zellkörpern (gelbe Pfeile) gezählt, was einem Filpodien-/Zellzahl-Quotienten von 0,33 entspricht. In* ***Abbildung 19b*** *ergab die Quantifizierung 12 Zellen und 6 Filopodien (Filopodien-/Zellzahl-Quotient: 0,5). In* ***Abbildung 19c*** *wurden 13 Zellen und 6 Filopodien gezählt (Filopodien-/Zellzahl-Quotient: 0,46). Für eine bessere*

Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.9 dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+CofilinS3A-GFP

Das gleiche Procedere wurde auch mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS und dauerhaft aktivem Cofilin (CofilinS3A), *getagged* mit GFP, durchgeführt.

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP	
Zellzahl:	25
Filopodienzahl:	32
Filopodienzahl/: Zellzahl	1,28

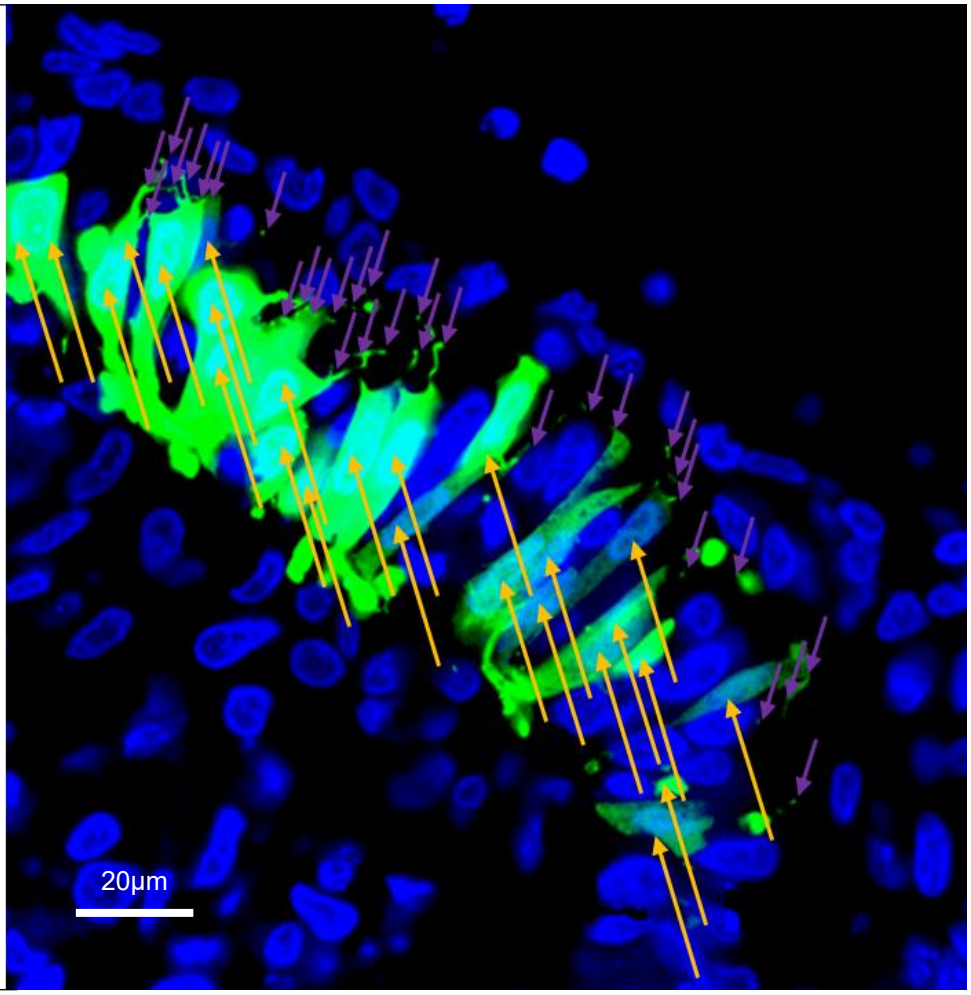


Abbildung 20a

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP

Zellzahl:	21
Filopodienzahl:	47
Filopodienzahl/: Zellzahl	2,24

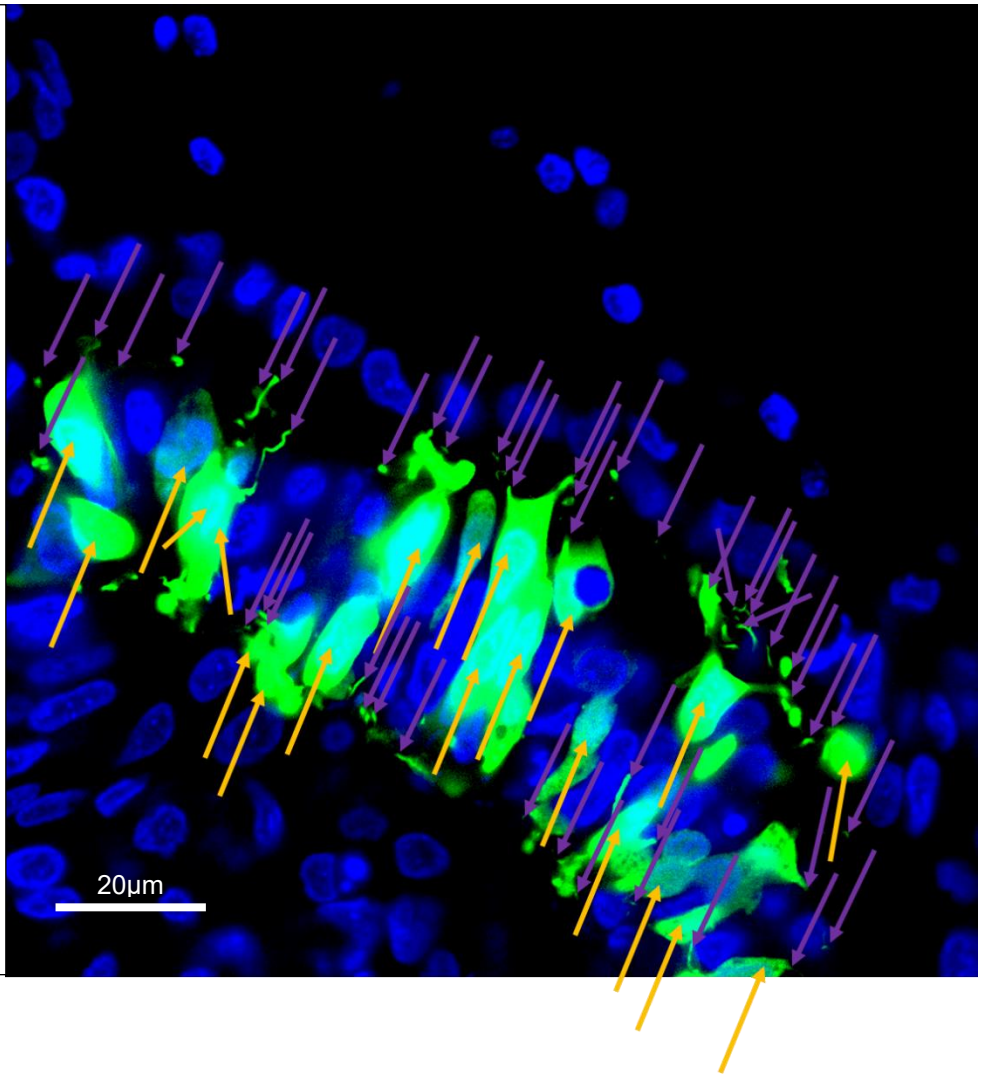


Abbildung 20b

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP	
Zellzahl:	23
Filopodienzahl:	54
Filopodienzahl/: Zellzahl	2,35

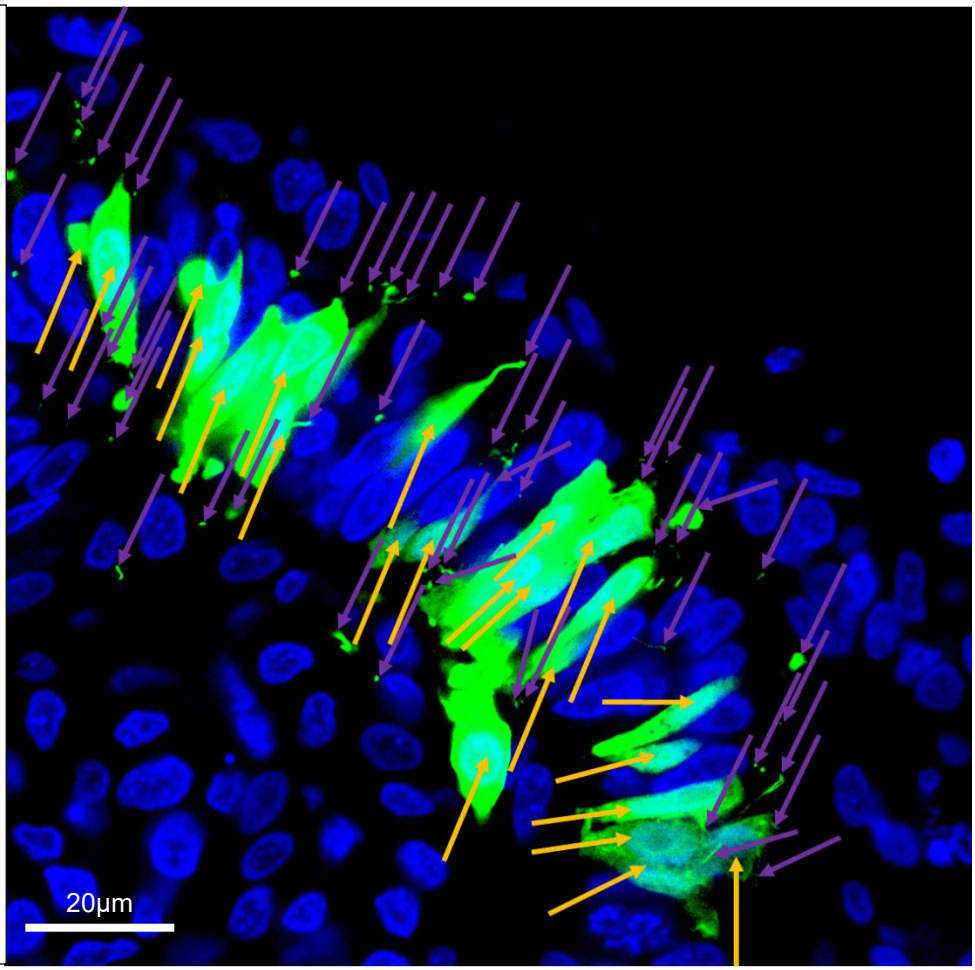


Abbildung 20c

Abbildung 20: Ausgewählte, repräsentative Transversalschnitte von 17 Somiten nach Elektroporation mit dem Konstrukt dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP. *Bei der Zählung ergab sich im Mittel ein Filopodienzahl/Zellzahlquotient von 2,05 mit einer Standardabweichung von 0,45. Die Coexpression von dnCdc42 und CofilinS3A führt zu einer relevanten Erhöhung des Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten, sowohl gegenüber dem Quotienten bei alleiniger Expression von dnCdc42 als auch gegenüber demjenigen der Kontrollgruppe. Für eine ausführlichere Darstellung der Daten siehe Tabelle 14-16 (dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP). Die Zellen in den Schnitten sind größtenteils, aber nicht ausschließlich, hochprismatisch, oftmals gebogen und gestaucht. Die Färbung ist wesentlich stärker als diejenige in Abbildung 19.;* ***Abbildung 20a*** *(vgl. Abb. 22h)****:*** *Es wurden 32 Filopodien (violette Pfeile) bei 25 Zellen (gelbe Pfeile) gezählt, was einem Filopodien-/Zellzahl-Quotienten von 1,28 entspricht.* ***Abbildung 20b:*** *Die Quantifizierung ergibt 21 Zellen bei 47 Filopodien, was einen Filopodien-/Zellzahl-Quotienten von 2,24 ergibt.* ***Abbildung 20 c:*** *Es wurden 23 Zellen und 54 Filopodien gezählt (Filopodien-/Zellzahl-Quotient: 2,35). Für eine bessere*

Vergleichbarkeit der präsentierten Schnitte findet sich in Abbildung 22 eine Sammlung der Abbildungen 14-20.

4.10 Zusammenfassung des Cofilin-*rescues*

Bei der Coelektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS mit EGFP-N1-Cofilin und CofilinS3A-GFP ergab die Auswertung der erhobenen Daten, dass

- die relative Filopodienzahl bei Coexpression von Cofilin mit dnRac1 nicht relevant gegenüber derjenigen bei alleiniger Expression von dnRac1 verändert ist.
- die relative Filopodienzahl bei Coexpression von dauerhaft aktivem CofilinS3A mit dnRac1 relevant gegenüber derjenigen bei alleiniger Expression von dnRac1 erhöht ist.
- die relative Filopodienzahl bei Coexpression von Cofilin mit dnCdc42 relevant gegenüber derjenigen bei alleiniger Expression von dnCdc42 verringert ist.
- die relative Filopodienzahl bei Coexpression von CofilinS3A mit dnCdc42 relevant gegenüber der relativen Filopodienzahl der Kontrollgruppe erhöht ist.

4.11 Tabellen

	Quotient Untersucher 1	*Quotient Untersucher 2*	*Quotient Untersucher 3*	*Mittelwert der Quotienten*	*Standard-abweichung der Quotienten*
pCAG-GFP	1,52	0,92	1,30	1,25	0,31
dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP	0,75	0,57	0,75	0,69	0,10
dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS +pCAG-GFP	1,54	0,95	1,41	1,30	0,31
dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP +EGFP-N1-Cofilin	0,88	0,67	1,01	0,86	0,17
dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP	1,51	1,06	1,40	1,33	0,23
dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1-Cofilin	0,46	0,33	0,82	0,54	0,26

dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP	2,36	1,54	2,25	2,05	0,45

Tabelle 14; Übersicht über die Filopodienquantifizierung aufgeschlüsselt nach Untersucher*In, dem jeweiligen Konstrukt sowie einer Betrachtung der jeweiligen Mittelwerte.

Quotient± Standardabweichung: Kontrollgruppe (GFP)	*Quotient± Standardabweichung: dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP*	*Quotient± Standardabweichung: dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS +pCAG-GFP*
1,25±0,31	0,69±0,10	1,30±0,31

Tabelle 15; Vergleich des Quotienten aus Filopodienzahl und Zellzahl inklusive Standardabweichungen zwischen den Konstrukten pCAG-GFP, dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP

4.12 Übersicht

Die oben beschriebenen Ergebnisse werden in den folgenden Tabellen und Graphen nochmals zusammenfassend dargestellt.

elektroporiertes Plasmid	*mittlerer Filopodien-/Zellzahl-Quotient*	*Standardabweichung der Quotienten*
pCAG-GFP (Kontrollgruppe)	1,25	0,31
dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP	0,69	0,10
dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP	1,30	0,31
dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP + EGFP-N1-Cofilin	0,86	0,17
dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP +Cofilin-S3A-GFP	1,33	0,23
dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS +EGFP-N1-Cofilin	0,54	0,26
dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP	2,05	0,45

Tabelle 16; Zusammenfassung der Ergebnisse

Nimmt man die Kontrollgruppe (pCAG-GFP) als Maßstab, so erkennt man, dass die Injektion eines dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP-Plasmids zu einer im Verhältnis zur Zellzahl relevant verringerten Filopodienzahl führt. Deshalb ist der Quotient verringert. Der *rescue*-Versuch mit einfachem Cofilin führt lediglich zu einer geringen Erhöhung des Quotienten, der jedoch nicht als relevant einzustufen ist. Anders ist es beim dauerhaft aktiven CofilinS3A. In dieser Versuchsgruppe ist die relative Filopodienzahl sogar leicht höher als in der Kontrollgruppe.

Die Elektroporation von dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP hat im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied von relevantem Ausmaß im Filopodien-/Zellzahl-Quotienten. Die zusätzliche Injektion von Cofilin hat keinen *rescue*-Effekt, sondern wirkt eher gegenteilig. In diesen Embryonen ist eine wesentlich geringere relative Filopodienzahl zu verzeichnen. Dauerhaft aktives CofilinS3A sorgt in Kombination mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP für eine im Vergleich zur Kontrollgruppe relevant gesteigerte relative Filopodienbildung.

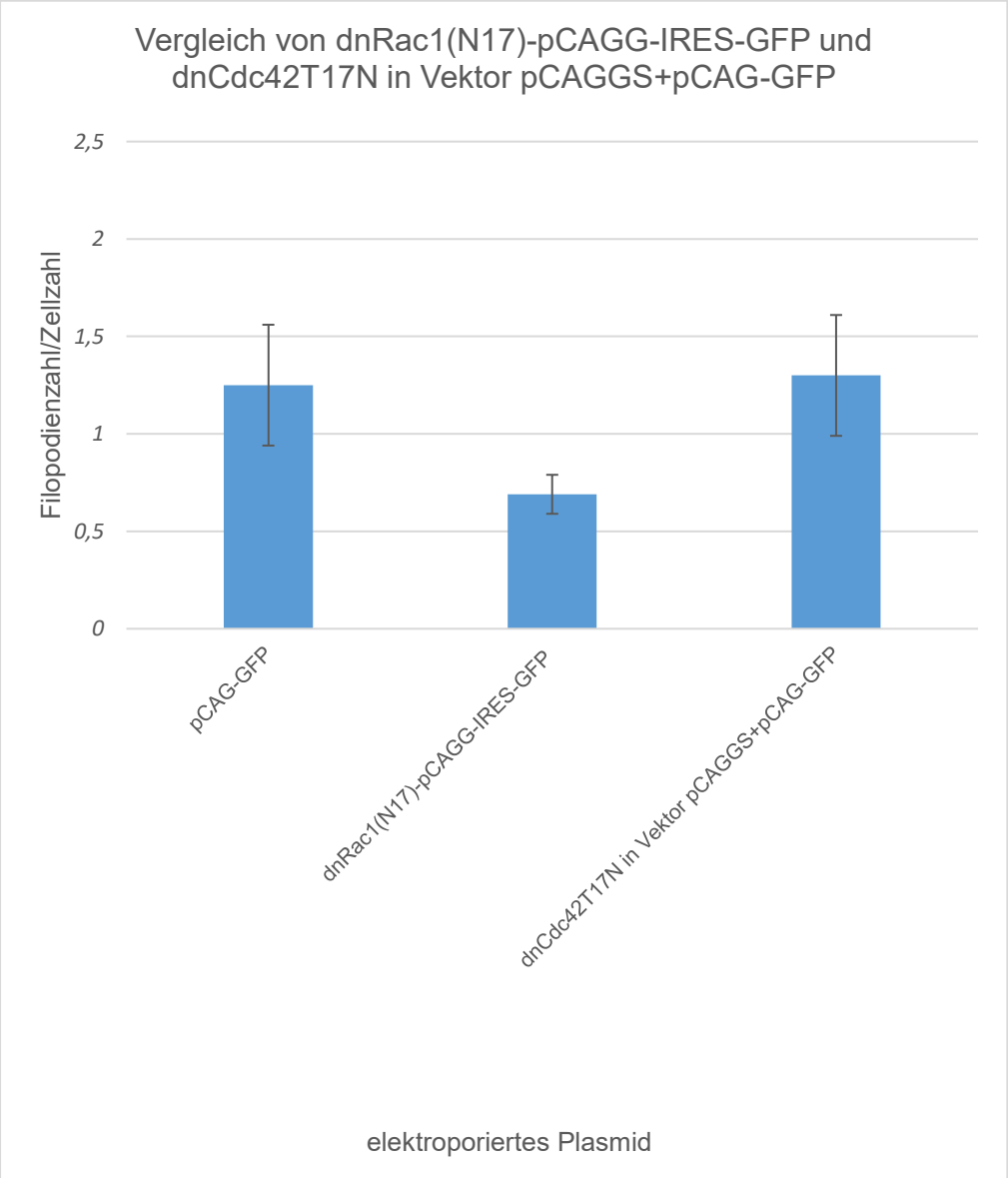


Abbildung 21a

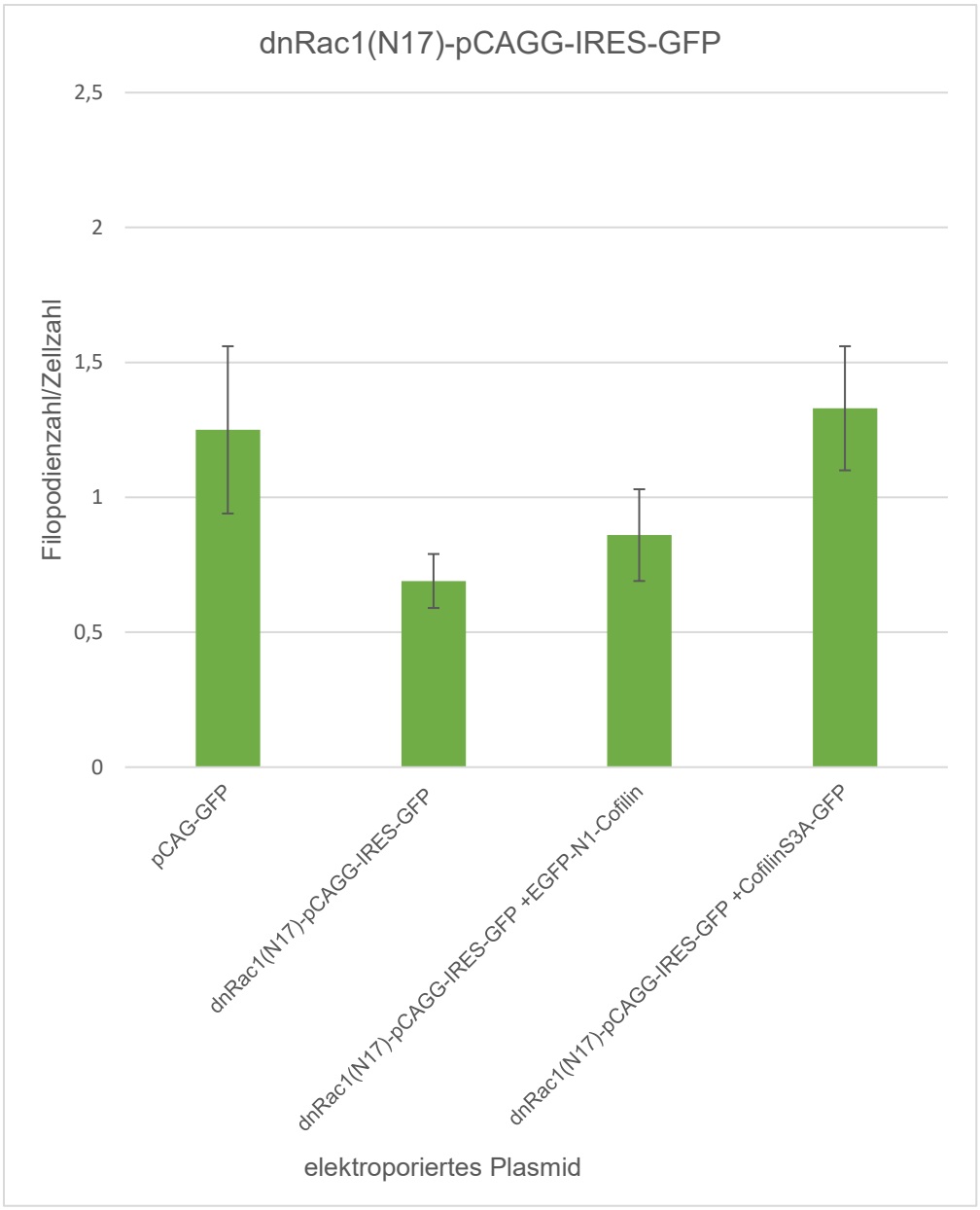


Abbildung 21b

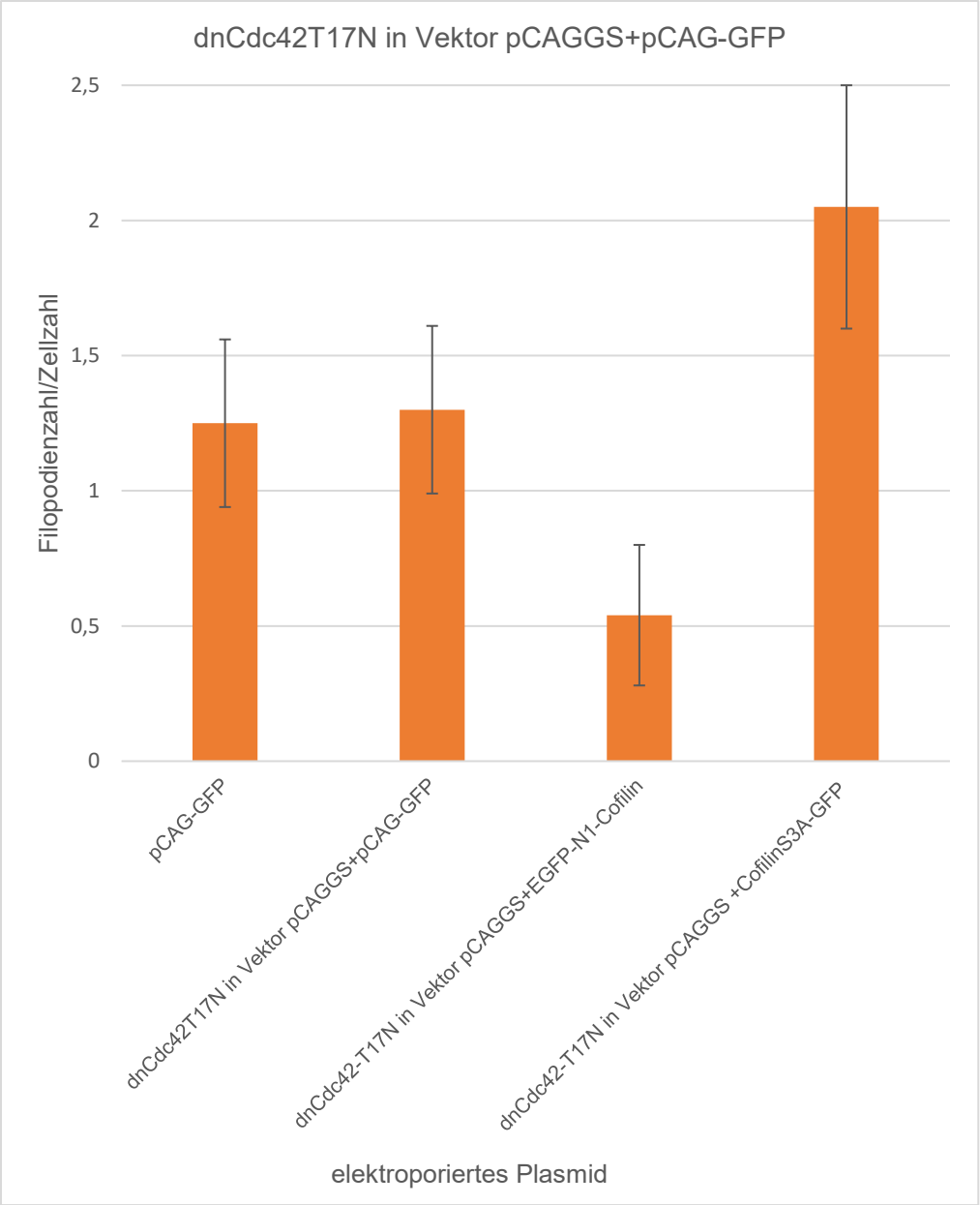


Abbildung 21c

Abbildung 21: graphische Darstellung der Ergebnisse der Filopodienquantifizierung. Abbildung 21a *zeigt die durchschnittliche Filopodienzahl/Zellzahl in der Kontrollgruppe (pCAG-GFP), in der Gruppe, die mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP sowie der Gruppe, die mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP elektroporiert wurde. Überdies wird jeweils die Standardabweichung angegeben. Wie bereits oben beschrieben, zeigt sich bei der Gruppe dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP ein relevant verringerter Filopodienzahl/Zellzahl-Quotient im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Quotient der Gruppe dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP ist nicht relevant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe.* ***Abbildung 21b*** *zeigt den Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten der Kontrollgruppe (pCAG-GFP) und der Gruppen, die mit dnRac1(N17)-*

pCAGG-IRES-GFP, dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP + EGFP-N1-Cofilin und dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP +CofilinS3A-GFP elektroporiert wurden. Wie in Abbildung 21a beschrieben ist der Quotient von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP gegenüber der Kontrollgruppe in relevantem Maße verringert. Der Quotient nach Elektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP + EGFP-N1-Cofilin ist gegenüber der Gruppe, die mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP elektroporiert wurde, nicht eindeutig verändert. Der Quotient der Gruppe, die mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP +CofilinS3A-GFP elektroporiert wurde, ist relevant gegenüber der Gruppe, die mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP elektroporiert wurde, erhöht.
***Abbildung 21c** zeigt den Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten der Kontrollgruppe (pCAG-GFP) und der Gruppen, die mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP, dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+ EGFP-N1-Cofilin und dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS +CofilinS3A-GFP elektroporiert wurden. Der Quotient bei Elektroporation des Plasmids dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP ist nicht eindeutig gegenüber der Kontrollgruppe verändert. Nach Elektroporation des Plasmides dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1-Cofilin ist der Quotient gegenüber der Kontrollgruppe klar verringert. Der Quotient der Gruppe, die mit dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS +CofilinS3A-GFP elektroporiert wurde, ist in relevantem Maße gegenüber der Kontrollgruppe, sowie gegenüber der Gruppe, die mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP elektroporiert wurde, erhöht.*

Bisher wurde geprüft, ob und in welchem Ausmaß die Inhibition der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 auf die Filopodienausbildung wirkt. Zusätzlich hat man durch einen *rescue* – Versuch mit Cofilin und dauerhaft-aktivem CofilinS3A die Spezifität der Ergebnisse für die Filopodienbildung untersucht. Da Cofilin ein Protein ist, welches unterhalb des Signalweges der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 liegt [85], sollte die Wirkung der Elektroporation mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP durch Cofilin wieder kompensiert werden. Im Rahmen meiner Dissertation konnte gezeigt werden, dass die dauerhaft aktive Form des Cofilins (CofilinS3A) im Plasmid CofilinS3A-GFP zu einer relevanten Erhöhung des Filopodienzahl/Zellzahl-Quotienten bei Coelektroporation mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP geführt hat. Dies lässt den Schluss zu, dass die Wirkung des Plasmids dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP (relevante Reduktion des Quotienten und damit der Filopodienbildung) spezifisch auf die Inhibition des Rac1-Signalweges zurückzuführen ist und nicht nur auf unspezifischen Zellschädigungen oder auf Inhibition außerhalb des oben beschriebenen Rac1-Signalweges beruht. In diesen Fällen würde dauerhaft aktives Cofilin zu keinem eindeutig erhöhten Filopodienzahl-/Zellzahl-Quotienten führen.

4.13 Abbildungsübersicht über die Elektroporation der oben beschriebenen Plasmide (Abb. 14-20)

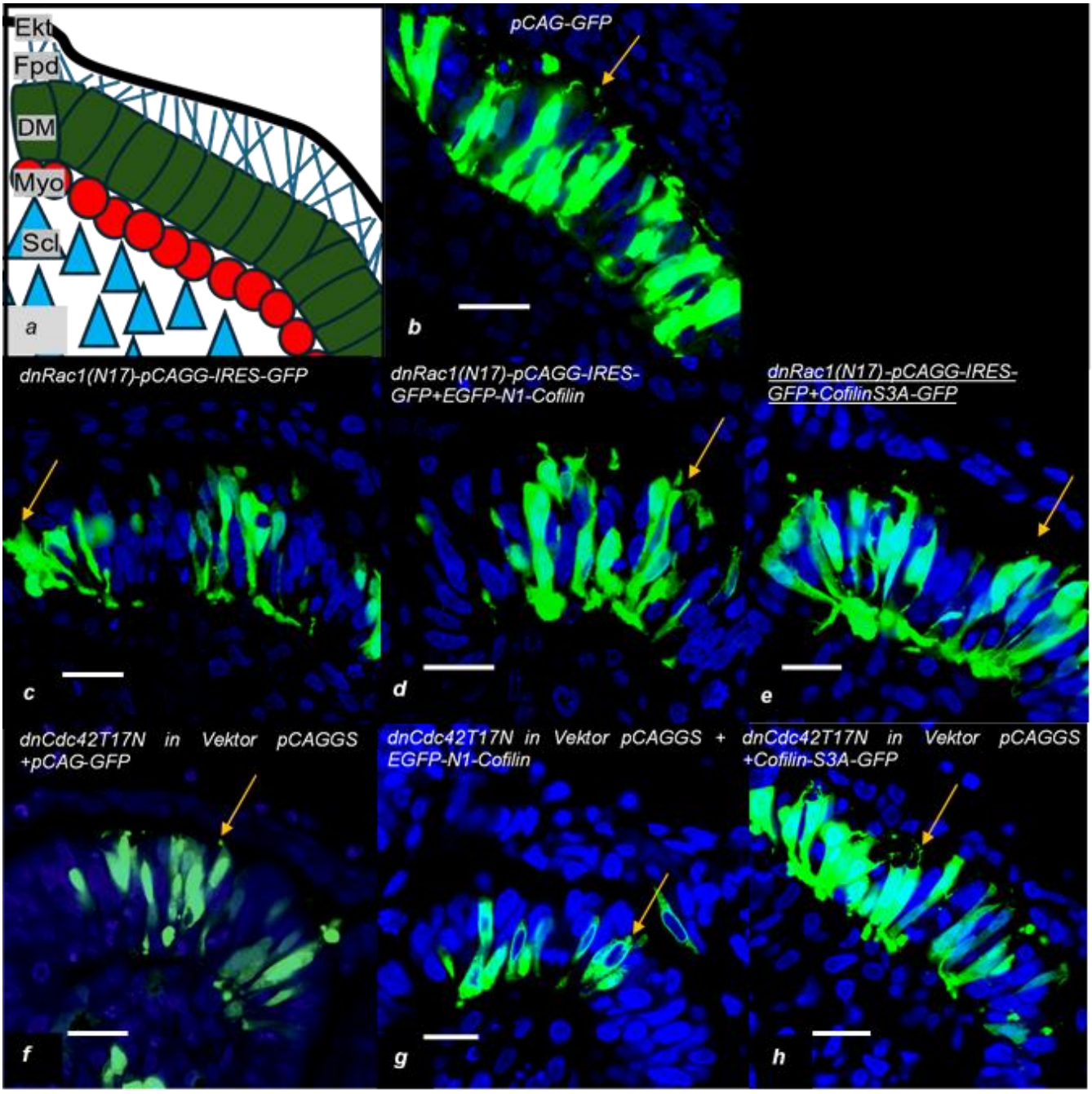


***Abbildung 22: Zusammenfassung der Abbildungen 14-20**; Filopodien sind mit →markiert; der weiße Balken entspricht einer Länge von 20µm; um die Auswirkungen von Cofilin und CofilinS3A auf die mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS elektroporierten Somiten besser zu veranschaulichen, werden in dieser Abbildung die Schnitte, in denen dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP Teil der elektroporierten Plasmide war, nebeneinander abgebildet.*

Gleiches gilt für die Schnitte, in denen dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS Teil der elektroporierten Plasmide war. ***Abbildung 22a: Orientierendes Schema*** *mit: Ektoderm (Ekt), Filopodien (Fpd), Dermomyotom (DM), myotomaler Skelettmuskulatur (Myo) und Sklerotom (Scl); die Anordnung im Schema entspricht der Anordnung der Schnitte.* ***Abbildung 22b: pCAG-GFP****; die Zellen des epithelialen DMs bilden Filopodien aus (vgl. Abbildung 14)* ***Abbildung 22c: dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP****; es sind nur vereinzelte, deformierte Filopodien sichtbar (vgl.* ***Abb. 15****)* ***Abbildung 22d: dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin****; man findet morphologisch variable Filopodien in reduzierter Zahl (vgl. Abbildung 17)* ***Abbildung 22e: dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP****; man erkennt eine Vielzahl schmaler Filopodien (vgl. Abbildung 18)* ***Abbildung 22f: dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS +pCAG-GFP****; es sind vereinzelte, morphologisch variable Filopodien sichtbar (vgl. Abbildung 16)* ***Abbildung 22g: dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + EGFP-N1-Cofilin****; man sieht nur vereinzelte, dysmorphe Filopodien (vgl. Abbildung 19)* ***Abbildung 22h: dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS +Cofilin-S3A-GFP****; man erkennt eine Vielzahl schmaler Filopodien (vgl. Abbildung 20)*

4.14 Expression von MF20 nach Elektroporation

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung der Plasmide auf die Bildung von Skelettmuskelzellen betrachtet. Verändert sich der Anteil oder die Morphologie der gebildeten Muskelzellen, ist dies ein Indiz für die Hypothese, dass Filopodien durch eine regulatorische Funktion in der Epithelerhaltung der Somiten einen Einfluss auf die Myotombildung, und damit auf die Ausbildung von myotomalen Skelettmuskelzellen nehmen. Zur Prüfung des Einflusses auf die Bildung der Skelettmuskulatur wurde mit den elektroporierten Gruppen eine Immunhistochemie durchgeführt, in der das Myosin der Skelettmuskelzellen mit dem Primär-Antikörper MF20 markiert wurde, an welchen wiederum der Sekundär-Antikörper DaM AF568 bindet.

4.15 Immunhistochemische Markierung von Skelettmuskelfasern mit MF20

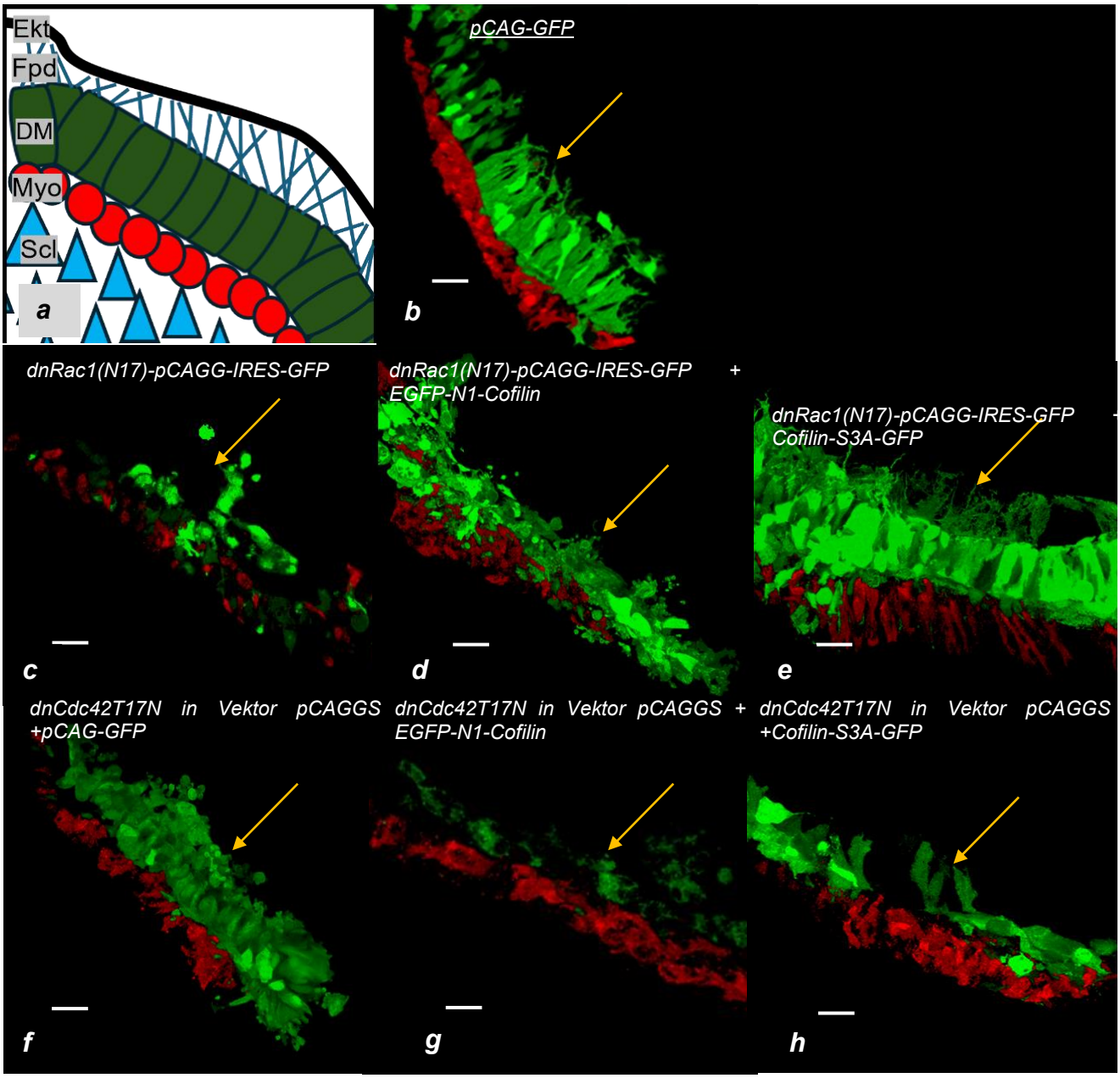


Abbildung 23: Dermomyotom mit elektroporiertem Plasmid sowie immunhistochemischer Markierung mit MF20*; die mit GFP markierten Zellen sind grün, die mit MF20 markierten Muskelzellen rot leuchtend. Filopodien wurden beispielhaft mit → markiert. Die weißen Balken entsprechen 20µm.* ***Abbildung 23a****:* ***Orientierendes Schema*** *mit: Ektoderm (Ekt), Filopodien (Fpd), Dermomyotom (DM), myotomaler Skelettmuskulatur (Myo) und Sklerotom (Scl); die Anordnung im Schema entspricht der Anordnung der Schnitte.* ***Abbildung 23b****:* ***pCAG-GFP+MF20 (IHC)****; Abbildung 23b zeigt den repräsentativen Schnitt eines Embryos aus der Kontrollgruppe. Die epithelialen Somitenzellen sind durch die Expression von GFP grün fluoreszierend. Die Skelettmuskelfasern emittieren rotes Fluoreszenzlicht. Wie in*

Abbildung 14 und 22b (Elektroporation mit pCAG-GFP) bereits beschrieben wurde, liegen die epithelialen Somitenzellen auch hier hochprismatisch und geordnet vor. Man erkennt eine große Zahl an Filopodien von unterschiedlichem Durchmesser an den apikalen Polen der Epithelzellen. Am basalen Pol des Epithels liegt eine MF20-positive Zellschicht. Es handelt sich folglich um Skelettmuskelfasern des Myotoms. Diese sind ca. halb so breit wie das GFP-positive epitheliale Dermomyotom. Die einzelnen Zellkörper sind aufgrund der Schnittebene nicht eindeutig abzugrenzen. Die Zellmorphologie der Skelettmuskelfasern ist im Querschnitt rundlich bis unregelmäßig. Die Muskelzellen wirken vital. ***Abbildung 23c: dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+MF20 (IHC)****; Die GFP-positiven Dermomyotomzellen in Abbildung 23c haben eine vergleichbare Morphologie wie diejenigen in Abbildung 15 und 22c (Elektroporation mit dnRac1(N17)-pCAGG-*IRES*-GFP). Eine regelmäßige epitheliale, hochprismatische Anordnung ist nicht zu erkennen. Vielmehr wirken die Zellen ungeordnet, eher abgerundet und unregelmäßig geformt. Sie haben folglich mesenchymalen Charakter. Es sind nur noch wenige Filopodien mit großem Durchmesser zu erkennen. Dünne Filopodien finden sich nicht. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe gibt es keine eindeutige Abgrenzung zwischen den GFP-positiven und den MF20-positiven Zellen. Sie durchmischen sich. Die Myotomzellen sind allerdings nur in geringerer Anzahl vorhanden.* ***Abbildung 23d****: **dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+ EGFP-N1-Cofilin+MF20 (IHC)****; In Abbildung 23d findet sich ein Bild, das dem in Abbildung 23c (Elektroporation mit dnRac1(N17)-pCAGG-*IRES*-GFP+MF20 (IHC)) ähnelt. Zwar sind die GFP-positiven Zellen in diesem spezifischen Schnitt zahlreicher und wirken vitaler, dennoch gibt es auch hier weder eine erkennbare Polarität der Zellen, noch einen epithelialen Zelltypus oder eine eindeutige Abgrenzung zwischen GFP-positiven und MF20-positiven Zellen. Die GFP-positiven Zellen sind abgerundet und ungleichmäßig verteilt. Sie durchbrechen die Grenze zwischen Dermomyotom und Skelettmuskulatur und überlagern die MF20-positiven Zellen.* ***Abbildung 23e****: **dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP+MF20 (IHC)****; Die Zellen in Abbildung 23e ähneln denen in Abbildung 14, bzw. 22b (Elektroporation mit pCAG-GFP) und Abbildung 23b (Elektroporation mit pCAG-GFP+MF20 (IHC)). Die GFP-positiven Zellen zeigen epithelialen Charakter. Sie sind hochprismatisch und haben größtenteils eine scharfe Abgrenzung zu den MF20-positiven Zellen. Die Filopodienzahl ist im Vergleich zur reinen Rho-GTPasen-Inhibition deutlich erhöht. Es finden sich sowohl Filopodien von großem als auch von kleinem Durchmesser. Im oberen Bildabschnitt erkennt man allerdings Überschneidungen von Epithel- und Myotomzellen. In diesem Bereich sind auch einige GFP-positive Zellen mit mesenchymalem Charakter zu erkennen. Die Myotomzellen sind regelmäßig*

angeordnet. ***Abbildung 23f****:* ***dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP+MF20 (IHC)****; Im Vergleich zur Rac1-Inhibition ist der Effekt der Inhibition von Cdc42 auf die Somitenzellen in Abbildung 23f eher gering (vgl. hierzu Abb.16 und 22f-Elektroporation mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS). Die GFP-positiven Zellen sind zwar eher abgerundet, aber nichtsdestotrotz noch prismatisch. Außerdem ist die geordnete Anordnung entlang der dermomyotomal-myotomalen Grenze größtenteils erhalten. Nur einige wenige GFP-positive Zellen ragen in das Myotom. Es besteht folglich weiterhin eine eindeutige Trennung zwischen GFP-positiven und MF20-positiven Zellen. Die einzelnen MF20-positiven Zellen sind nur schwer voneinander abgrenzbar.* ***Abbildung 23g: dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+ EGFP-N1-Cofilin+MF20 (IHC)****; Der Effekt von gleichzeitiger Elektroporation der Konstrukte dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS und EGFP-N1-Cofilin scheint dem der gleichzeitigen Elektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und EGFP-N1-Cofilin zu ähneln. Auch in Abbildung 23g verlieren die GFP-positiven Zellen ihren epithelialen Charakter. Sie haben eine unregelmäßige Zellform. Die Abgrenzung zu MF20-positiven Zellen jedoch ist durchgehend erhalten. Filopodien sind auf diesem Schnitt kaum bis gar nicht zu erkennen, sodass eine Konturbeschreibung kaum möglich ist. Die Myotomzellen erscheinen morphologisch unverändert.* ***Abbildung 23h: dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+CofilinS3A-GFP+MF20 (IHC)****; In Abbildung 23h sind die GFP-positiven Zellen wiederum teilweise hochprismatisch und geordnet an der Dermomyotom-Myotom-Grenze aufgereiht. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Abbildung 23b-Elektroporation mit pCAG-GFP+MF20(IHC)) sind allerdings einige Zellen abgerundet und ungeordnet. Die Grenze von GFP-positiven zu MF20-positiven Zellen ist allerdings klar zu erkennen. Die Filopodien sind zahlreich und eher von geringerem Durchmesser. Die Myotomzellen zeigen ihre typische Morphologie im Querschnitt.*

4.16 Zusammenfassung der Immunhistochemie mit MF20

Die qualitative Analyse der immunhistochemisch markierten Schnitte ergaben somit folgende Ergebnisse:

- Die Inhibition von Rac1 korreliert mit der Auflösung der Epithelformation des Dermomyotoms.
- Diejenigen Dermomyotomzellen, die ihren Epithelcharakter verlieren, werden nicht MF20-positiv.
- Nicht alle dermomyotomalen Zellen haben nach dem CofilinS3A-*rescue* wieder einen epithelialen Charakter.

5. Diskussion

5.1 Rac1 ist an der Filopodienbildung im dorsalen Dermomyotom beteiligt

Bei dominant-negativem Rac1 (dnRac1) handelt es sich um eine mutierte Form des Proteins Rac1, durch welche die Bindungsaffinität von Rac1 zu GDP gegenüber GTP stark erhöht wird. DnRac1 ist folglich aufgrund der sehr wahrscheinlichen Bindung mit GDP dauerhaft inaktiv [100]. In Zellen eingebrachtes dnRac1 bindet an GEFs, wodurch die Dissoziation von GDP unterstützt wird. Eine Bindung von GTP bleibt allerdings weiterhin sehr unwahrscheinlich, sodass dnRac1 in diesem Nukleotid-freien Zustand verbleibt und nicht durch Bindung von GTP aktiviert wird. Die GEFs bleiben in der Folge an dnRac1 gebunden und stehen dem zellulären Rac1 nicht mehr zur Verfügung. Somit bleibt auch das zelluläre Rac1 größtenteils inaktiv [100-102]. Die Expression von dnRac1 kann durch Elektroporation eines dnRac1-Plasmids, wie dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP induziert werden. Da es sich bei dem genutzten Mechanismus um kompetitive Hemmung handelt, kann die Wirkung des Wildtyps nie komplett inhibiert, sondern nur minimiert werden. Die Elektroporation eines dnRac1-Plasmids sorgt, wie in den Ergebnissen bereits beschrieben, für eine relevante Verringerung der relativen Filopodienzahl im dorsalen Dermomyotom. Dies lässt den Schluss zu, dass die aktive Rho-GTPase Rac1 an der Filopodieninduktion beteiligt ist. Die möglichen Wege, über die Rac1 Einfluss auf die Filopodien ausüben kann, sind unterschiedlich.

Ein Weg führt über die Proteine WAVE1 und Arp2/3. Durch die fehlende Aktivität von Rac1 wird WAVE1 nicht ausreichend phosphoryliert. Dies mindert den aktivierenden Effekt von WAVE1 auf den Proteinkomplex Arp2/3 und damit auf die Aktinfilamentsynthese. Rac1 kann folglich über die Aktivierung von Arp2/3 die für Filopodien notwendige Aktinfilamentsynthese vorantreiben [87].

Eine andere Art der Einflussnahme kann über Cofilin erfolgen. Cofilin ist ein Protein, das den Abbau von Aktinfilamenten fördert. Diese Maschinerie ist für die Filopodien-Genese notwendig, um einen ausreichenden Aktinmonomerpool aufrechtzuerhalten, der wiederum die Grundlage für neue Filamente legt. Filopodien benötigen eine hohe Cofilin-Aktivität bei ihrer Genese [112]. Über Rho-GTPasen im Zusammenhang mit Cofilin gibt es bisher noch kein klares Bild. Rac1 sowie auch Cdc42 können die Cofilin-Phosphatase Slingshot aktivieren, die wiederum Cofilin dephosphoryliert und damit aktiviert [92;94]. Es gibt allerdings auch Daten, die zeigen, dass Cdc42 und Rac1 die p-21-aktive Kinase (PAK1) disinhibieren. Dies aktiviert die LIM-Kinase1. Cofilin wird in der Folge phosphoryliert und damit gehemmt [90]. Die Aktivität von Cofilin ist entscheidend für den korrekten Ablauf des fortwährenden Auf- und Abbaus von

Aktinfilamenten. Cofilin beschleunigt die Abspaltung von Aktinmonomeren aus Aktinpolymeren, indem es als Depolymerisationsfaktor fungiert [85]. Diese Funktion ist elementar für die Ausbildung von Zellfortsätzen wie beispielsweise Filopodien. Ist die Cofilinaktivität erhöht, so steigt auch die Aktinpolymerisation [113]. Aktinfilamente wiederum sind elementarer Bestandteil der Filopodien im Dermomyotom [10].

5.2 Die Coexpression von Cofilin mit dnRac1 führt zu keiner relevanten Änderung gegenüber der alleinigen Elektroporation von dnRac1

In den Ergebnissen zeigt sich kein relevanter Unterschied zwischen der alleinigen Elektroporation von dnRac1 und der Coelektroporation von dnRac1 und Cofilin. Ein vermehrtes Vorliegen von Cofilin allein ändert folglich nicht die Aktinpolymerisationsrate. Dies lässt sich so deuten, dass das Cofilin zwar vermehrt vorliegt, aber nicht infolgedessen zwangsläufig aktiv ist. Ohne den aktivierenden Effekt der Rho-GTPasen ist die aktive Form von Cofilin also nicht vermehrt vorhanden. Cofilin ist somit in dieser Versuchsanordnung kein hinreichend aktivierender Faktor in der Aktinfilamentsynthese. Zwar gibt es auch weitere Cofilin aktivierende Faktoren, wie eine EGF-getriggerte Phospholipase C [114] oder die Cofilin Phosphatase Chronophin (CIN), welche ATP-abhängig aktiviert wird und die aktivierende Dephosphorylierung von Cofilin induziert [115]. Die eventuelle Aktivität dieser und weiterer Signalwege reicht allerdings nicht aus, um die fehlende Rho-GTPasen-Aktivität zu kompensieren.

5.3 Die Coexpression von dauerhaft aktivem CofilinS3A mit dnRac1 führt zu einer relevanten Änderung gegenüber der Expression von dnRac1 allein

Anders stellt es sich bei dauerhaft aktivem Cofilin (CofilinS3A) dar. Die Somiten dieser Versuchsreihe präsentieren sich mit höheren relativen Filopodienzahlen. Dies belegt, dass der Rückgang der Filopodienzahl nach Elektroporation von dnRac1 nicht an einer unspezifischen Schädigung der Zellen liegt, da auch nach der Elektroporation die Filopodienzahl durch aktiviertes Cofilin noch erhöht werden kann. Die Filopodieninhibition fußt folglich auf der verringerten Rho-GTPasen-Aktivität und nicht auf Zelltod.

Mit der Injektion des Plasmides zur Expression von CofilinS3A wurde nicht nur die Gesamtkonzentration von Cofilin im Somiten erhöht, sondern gleichzeitig auch die Konzentration von aktivem Cofilin. CofilinS3A kann aufgrund einer *misssense*-Mutation in der 3.Aminosäure (Alanin statt Serin) nicht mehr an der Phosphatbindungsstelle (Ser3) phosphoryliert und dem zu Folge nicht mehr inaktiviert werden. CofilinS3A ist somit dauerhaft aktiv [110]. Die darauffolgende erhöhte Filopodienzahl lässt den Schluss zu, dass es sich bei Cofilin um einen Effektor handelt, der stromab der Rho-GTPase

Rac1 wirkt und von dieser aktiviert wird. Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten Filopodienanzahl.

5.4 dnCdc42 hat in dieser Versuchsanordnung keine Auswirkung auf die relative Filopodienzahl

Eigentlich wurde erwartet, dass nach Hemmung von Cdc42 durch Elektroporation des Plasmides zur Expression von dnCdc42 die relative Filopodienzahl gesenkt wird. Stanganello et al. [12] zeigten bereits, dass Filopodien in der Neuralplatte von Zebrafischen Cdc42-abhängig gebildet werden können. Sagar et al. [10] konnten nachweisen, dass dermomyotomale Filopodien abhängig von der Rho-GTPase Rac1 sind [10]. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass die Expression von dnCdc42 funktional ist und die Bildung von dauerhaft inaktivem Cdc42 induziert [105,116]. Dies lässt die Hypothese zu, dass auch die Elektroporation mit dem Plasmid zur Expression von dnCdc42 zu einer Inhibition der Filopodien-Genese im Dermomyotom führt. Der fehlende Effekt von dnCdc42 auf die relative Filopodienzahl ist folglich überraschend. Er kann darauf zurückzuführen sein, dass die Filopodienbildung im Dermomyotom Cdc42-unabhängig ist. In der Literatur findet sich bislang kein Beleg, dass die dermomyotomalen Filopodien Cdc42-abhängig sind.

5.5 Die Coelektroporation von Plasmiden zur Expression von dnCdc42 und Cofilin führt zu einer verringerten relativen Filopodienzahl gegenüber der alleinigen Elektroporation des Plasmides zur Expression von dnCdc42

Diese Beobachtung führt zu der Schlussfolgerung, dass das Einbringen von Cofilin einen negativen Effekt auf die Filopodienbildung hat. Das bedeutet, dass der negative Einfluss des elektroporierten Cofilin entweder in der Wirkung von Effektoren auf Cofilin oder von Cofilin auf unterhalb liegende Signalproteine liegen muss. Ein möglicher Grund ist, dass das Einbringen von extrinsischem Cofilin zu einer Überexpression von Cofilin im Embryo führt und dies inhibierend auf die unterhalb von Cofilin liegenden Signalwege wirkt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Überexpression von Wildtyp-Cofilin in Wildtyp-kortikalen Neuronen aus dem Embryo der Maus (E14.5) zu einer fehlerhaften Cofilin-Wirkung in der Zellmigration und Zellmorphologie führt [117]. Die Ergebnisse von Lee et al. [118] lassen die Vermutung zu, dass dies auf die Destabilisierung des Aktin-Zytoskelettes zurückzuführen ist. Sie konnten zeigen, dass eine Überexpression von Cofilin in nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinomzellen zu einer verringerten Lamellipodienbildung und zum Strukturverlust des Zytoskeletts führt. Folglich kann man die Hypothese formulieren, dass eine Überexpression von Cofilin mittels Elektroporation eine fehlerhafte Filopodienbildung im Dermomyotom induziert,

indem es die Zytoskelettarchitektur destabilisiert [118].

Kritisch anzumerken ist allerdings, dass der hemmende Effekt von eingebrachtem Cofilin bei dnRac1 nicht zu erkennen ist. Die für dnCdc42 aufgestellten Erklärungsansätze müssten allerdings auch dort gelten, da Cofilin unterhalb von Rac1 wirkt [90,94]. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass die erfolgreiche Inhibition der Filopodienbildung durch die Elektroporation mit Plasmiden zur Expression von dnRac1 schon nahezu maximal ist. Daraus ließe sich folgern, dass eine weitere Filopodieninhibition durch die Gabe von nicht-aktivem Cofilin nicht möglich ist.

Betrachtet man die oben aufgestellte Hypothese, dass die Filopodien-Genese im Dermomyotom Cdc42-unabhängig ist, so passt es ins Bild, dass zusätzlich eingebrachtes Cofilin bei der Coexpression mit dnRac1 keine Wirkung zeigt, bei der Coexpression mit dnCdc42 hingegen schon. Eine Cofilin-Überexpression entfaltet nur dann seine Wirkung auf die Filopodien-Genese, wenn diese nicht schon weiter oberhalb des Signalweges unterbunden ist. Nimmt man an, dass Rac1 in der Filopodienbildung im Signalweg oberhalb von Cofilin liegt (vergleiche hierzu die Ergebnisse von Edward et al. [90] und Liu et al. [94]), so kann Cofilin seine Wirkung nicht entfalten, da der Signalweg vorher bereits unterbrochen wurde. Bei der Coexpression mit dnCdc42 wäre die Filopodienbildung, wenn man annimmt, dass sie Cdc42-unabhängig ist, unbeeinträchtigt, sodass die Überexpression von Cofilin über Zytoskelettdestabilisierung die Filopodien-Genese inhibieren kann [118].

Auch eine zelluläre Schädigung durch die Coelektroporation von Plasmiden zur Expression von dnCdc42 und Cofilin wäre möglich. Da die Coelektroporation von Plasmiden zur Expression von dnRac1 und Cofilin sowie für dnCdc42 und CofilinS3A zu keinem Abfall der relativen Filopodienzahl führt, ist diese Hypothese allerdings eher unwahrscheinlich.

Um die Hypothese zu prüfen, dass Cofilin seine Wirkung nicht entfalten kann, da der Signalweg schon weiter stromaufwärts durch die Expression von dnRac1 inhibiert ist, könnte man die Filopodienzahl in Embryonen quantifizieren, die ausschließlich mit Cofilin elektroporiert wurden. Sollte die Hypothese stimmen, sollte die relative Filopodienzahl auch nach alleiniger Elektroporation von Cofilin in relevantem Maße reduziert sein.

5.6 CofilinS3A erhöht trotz dnCdc42 die relative Filopodienzahl gegenüber der Kontrollgruppe

Nimmt man an, dass die Überexpression von Cofilin zu einer verringerten Filopodien-Genese führt, so drängt sich die Frage auf, warum die Expression von dauerhaft

aktivem Cofilin zu einer erhöhten Filopodienzahl führt und die von nicht dauerhaft aktiviertem Cofilin hingegen zu einer verringerten Filopodienzahl, obwohl gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Cofilin-Konzentration das Aktinfilamentsystem destabilisiert [118]. Dieser scheinbare Widerspruch ließe sich ausräumen, indem man die Ergebnisse von Andrianantoandro et al. [113] betrachtet. Diese zeigen, dass die Cofilin-Aktivität von der Cofilin-Konzentration abhängt. Sowohl eine verringerte als auch eine erhöhte Cofilin-Konzentration senken die Cofilin-Aktivität. Die Cofilinaktivität wiederum korreliert positiv mit der mittleren Aktinfilamentlänge [113]. Da CofilinS3A allerdings dauerhaft aktiviert ist, sinkt die Cofilin-Aktivität nicht bei steigender Cofilin-Konzentration. Die Cofilin-Funktion bleibt folglich unbeeinflusst. Wird hingegen nicht-aktiviertes Cofilin elektroporiert, sinkt infolge der erhöhten Cofilin-Konzentration die Cofilin-Aktivität. Die Dynamik im Aktinstoffwechsel ist gestört und resultiert in einer Destabilisierung des Aktin-Zytoskelettes und folglich in einer verringerten Filopodiengenese [113,118]. Nimmt man an, dass die Filopodien-Genese Cdc42-unabhängig ist, passt die Erhöhung der Filopodienzahl gut ins Bild. Die Filopodien-Genese ist wie oben bereits beschrieben, Rac1-abhängig. Rac1 entfaltet seine Wirkung unter anderem über die Steuerung der Cofilinaktivität [90]. Die alleinige Expression von dnCdc42 beeinflusst den Rac1-Signalweg nicht. Die Coelektroporation von Cofilin hingegen senkt die Rac1-induzierte Cofilinaktivität und führt so zu einer verringerten Filopodienzahl [113]. Die Coexpression von CofilinS3A steigert hingegen die Cofilinaktivität unabhängig von Rac1 und resultiert in einer erhöhten Filopodienzahl [110].

Für die weitere Interpretation werden vor allen Dingen die Daten der Rho-GTPase Rac1 betrachtet.

5.7 Die Inhibition von Rac1 korreliert mit der Auflösung der Epithelformation des Dermomyotoms

Vergleicht man die GFP-positiven Dermomyotomzellen in den Somiten, die mit dem Konstrukt zur Expression von dnRac1 elektroporiert wurden, mit denen der Kontrollgruppe, so fällt auf, dass die Zellen nicht mehr geordnet hochprismatisch aufgereiht sind, sondern eher mesenchymale Charakteristika aufweisen. Sie sind eher rundlich und haben keine morphologisch erkennbare Polarität mehr. Die Rho-GTPase Rac1 ist folglich notwendig für die Epithelerhaltung in dermomyotomalen Somiten.

Verbindet man diese Erkenntnis nun mit der Beobachtung, dass die Inhibition von Rac1 die Filopodien-Genese hemmt, liegt die Hypothese nahe, dass die Wirkung von Rac1 auf das Epithel des DMs über die Filopodien transduziert wird. Dies unterstützt die Hypothese von Sagar et al. [10]. Demnach wirkt Wnt6 über die Aktivierung des

kanonischen Wnt-Signalwegs und die dadurch induzierte Hochregulation von Paraxis epithelialisierend auf DM-Zellen. Wnt6 wird, wie bereits beschrieben, nur im Ektoderm gebildet [11], ist allerdings hydrophob und kann nicht durch den subektodermalen Spalt diffundieren [95]. Die Rac1-induzierten Filopodien könnten diesen Spalt überbrücken und bringen somit nach der Hypothese von Sagar et al. [10] den dermomyotomalen Fzd7-Rezeptor zum Wnt6-Liganden, damit der Wnt-Signalweg aktiviert werden kann.

Ebenso möglich wäre es allerdings, dass die Rac1-induzierte Filopodien-Genese lediglich ein Nebeneffekt ist, der mit der Epithelialisierung in keinem Zusammenhang steht. Wenn dies der Fall ist, muss Rac1 seine Wirkung über andere Signalwege entfalten. Eine Möglichkeit liegt hier in der Rac1-vermittelten Aktivierung der JNK-Kinase. Diese phosphoryliert β-Catenin und erhöht so dessen Kern-Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Als Konsequenz erhöht sich die β-Catenin-Wirkung als Effektor für Paraxis und erhielte damit die Epithelialisierung [77,78]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Rac1 Komplexe zwischen dem Wnt-Signalweg-Transkriptionsfaktor LEF1 und β-Catenin induziert. Durch diese Komplexbildung wird die Effektivität von LEF1 erhöht [80]. Wenn Rac1 diese Komplexe auch zwischen β-Catenin und Paraxis induziert, hätte die Rho-GTPase dadurch ebenfalls epithelialisierende Funktionen, die nicht mit den Filopodien in Verbindung stehen.
Welche Hypothese stimmt, ist bis jetzt jedoch noch nicht abschließend geklärt, und kann aufgrund der hier vorliegenden Befunde nicht entschieden werden.

5.8 Ausblick auf mögliche experimentelle Prüfungen der oben genannten Hypothesen

Im Folgenden werde ich einige Vorschläge präsentieren, um die oben genannten Hypothesen zu prüfen.
Mit unserer Forschungsarbeit konnten wir zeigen, dass eine dnRac1-Überexpression zu einer verringerten Filopodienzahl führt. Nach der Hypothese von Sagar et al. [10] könnte die Filopodieninhibition den Wnt-Signalweg blockieren, da die Rac1-abhängigen Filopodien nicht mehr den subektodermalen Raum überbrücken können. Das ektodermale Wnt6-Signal könnte den dermomyotomalen Wnt-Signalweg somit nicht mehr aktivieren. Dies würde die β-Catenin-Konzentration in der Zelle verringern [10]. β-Catenin ist ein Signalprotein *downstream* von Wnt [55]. Im Umkehrschluss könnte die Expression von Rac1 bei Zellen, deren endogenes System noch nicht β-Catenin-gesättigt ist, die Filopodienbildung und damit die Wnt6-abhängige β-Catenin-Konzentration in der Zelle erhöhen [10]. Nach Wu et al. [77]und Phelps et al. [78] hingegen würde sich durch Rac1 nicht die freie β-Catenin-Konzentration in der Zelle verändern, sondern nur dessen Kernaufenthaltswahrscheinlichkeit erhöhen. Nach Jamieson et

al. [80] könnte die Regulation noch weiter unterhalb, auf Höhe des bHLH-Transkriptionsfaktors Paraxis, ansetzten. Rac1 würde laut dieser Hypothese β-Catenin-Paraxis-Komplexe stabilisieren, was wiederum die Paraxis-Aktivität erhöht. Dieser Effekt konnte bislang jedoch nur am bHLH-Transkriptionsfaktor LEF1 demonstriert werden [80].

Vergleicht man experimentell die zelluläre β-Catenin-Konzentration von unbehandelten Dermomyotomzellen mit Zellen, in denen Rac1 inhibiert wurde, ließe sich bei den dnRac1-exprimierenden Zellen nur dann eine verringerte β-Catenin-Konzentration beobachten, wenn die Hypothese von Sagar et al. [10] zutrifft. Die Filopodien würden den subektodermalen Spalt nicht mehr überbrücken, sodass der Wnt6-Signalweg nicht mehr durch ektodermales Wnt6 aktiviert werden kann. Das wiederum senkt die β-Catenin-Konzentration [10]. Nach den Hypothesen von Wu et al. [77] und Phelps et al. [78] würde sich lediglich die Kernaufenthaltswahrscheinlichkeit von β-Catenin ändern, nicht aber dessen Konzentration. Auch laut der Hypothese von Jamieson et al. [80] ist diese nicht verändert, da die Wirkung der Stabilisierung von β-Catenin-Paraxis-Komplexe zuzuschreiben ist. Folglich kann man durch eine verminderte β-Catenin-Konzentration im Zellsoma bei dnRac1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu GFP-exprimierenden Zellen zeigen, dass Rac1 seine Wirkung vermutlich über die Filopodien entfaltet. Die Messung der β-Catenin-Konzentration ließe sich durch eine immunhistochemische Untersuchung von dermomyotomalen Zellen auf ihren β-Catenin-Gehalt umsetzen. Alternativ könnte man zur Prüfung der Hypothese von Sagar et al. [10] den Kontakt von Wnt6 am Fzd7-Rezeptor durch beispielsweise Elektronenmikroskopie mit Immunogold-markiertem Wnt6 nachweisen, wie es Gurriaran-Rodriguez et al. [119] bei Wnt7a zeigten. Dieser Schritt wäre nochmals eindeutiger als die β-Catenin-Konzentrationsbestimmung, da keine anderen, unbekannten Signalwege oberhalb von β-Catenin zusätzlichen Einfluss auf die Messparameter ausüben können.

Sollte sich herausstellen, dass die Hypothese von Sagar et al. [10] nicht zutrifft, sollten die Hypothesen von Wu et al. [77], Phelps et al. [78] und Jamieson et al. [80] geprüft werden. Für die Bestätigung von Wu et al. [77] und Phelps et al. [78] könnte die Aktivität der JNK-Kinase in dermomyotomalen Zellen mit und ohne funktionalem Rac1 verglichen werden. Dies kann durch eine immunhistochemische Untersuchung mit dem JNK-Aktivitätsmarker Phospho-cJun [78] und zusätzlich durch die Quantifizierung der β-Catenin-Konzentration innerhalb und außerhalb des Nucleus bei dnRac1-exprimierenden Zellen und bei GFP-exprimierenden Zellen erreicht werden. Sinken die JNK-Kinase-Aktivität und die β-Catenin-Konzentration im Zellkern bei dnRac1-exprimierenden Zellen ab, ist dies ein Beleg für die Hypothese nach Wu et al. [77] und

Phelps et al. [78]. Jamieson et al. [80] nutzte für den Nachweis von β-Catenin-LEF1-Komplexen die Methode der *Immunoprecipitation*. Wenn man diesen Mechanismus auch auf β-Catenin-Paraxis-Komplexe anwenden kann, kann man die Hypothese prüfen. Sinkt die Komplexmenge bei dnRac1-exprimierenden Zellen gegenüber GFP-exprimierenden Zellen, ist die Hypothese bestätigt.
Die wahrscheinlichste Hypothese ist jedoch die, dass eine Kombination verschiedener oder aller Hypothesen zutrifft und das Zusammenspiel dieser zellulären Prozesse die epitheliale Struktur des Somiten reguliert. Deshalb ist es sinnvoll, alle Hypothesen zu prüfen, unabhängig von der Bestätigung der anderen.

5.9 Die Dermomyotomzellen werden in keiner der untersuchten Elektroporationskonstellationen nach der Elektroporation MF20-Ak-positiv

Obwohl die GFP-positiven Zellen bei der Elektroporation mit dem Plasmid zur Expression von dnRac1 ihren Epithelcharakter verlieren und eher mesenchymalen Charakter annehmen, werden sie nicht MF20-positiv. Ein Rho-GTPasen-Mangel induziert folglich keine vermehrte Myotombildung. Die Expression von dnRac1 hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Determination von Muskelvorläuferzellen. Das könnte darin begründet liegen, dass die Somitenzellen schon zu einem Zeitpunkt der Entwicklung ein festgelegtes Schicksal haben, der vor dem 2,5. Tag liegt. Diese Hypothese befindet sich im Einklang mit den Ergebnissen von Krenn et al. [120], sowie Chen et al. [121]. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass bereits im praesomitischen Mesoderm festgelegt ist, ob eine Zelle zur Myotomzelle differenzieren kann [120,121].
Klassische Rotationsexperimente, in denen entlang der dorsoventralen Achse rotierte, kaudale Somiten 2,5 Tage alter Wachtelembryonen in ca. gleich alte Hühnerembryonen implantiert wurden, legten nahe, dass zwar die Differenzierung der Somitenzellen in spätere Sklerotom- und Myotomzellen feststeht, die Festlegung der dorsoventralen Achse allerdings erst im Somiten erfolgt. So entwickelte sich das Sklerotom in den zwei am weitesten kaudal gelegenen dorsoventral rotierten Embryonen regelrecht ventromedial des Somiten, in weiter rostral gelegenen dorsoventral rotierten Embryonen hingegen dorsolateral des Somiten [122]. Dockter et al. [123] hingegen entwickelten eine alternative Interpretation der Rotationsexperimente. Sie vermuteten, dass nur ein Teil der Somitenzellen im Stadium *III* bereits als Myotomzellen festgelegt sind, wohingegen die restlichen Somitenzellen noch nicht differenziert sind [123].
Ob im praesomitischen Mesoderm tatsächlich bereits festgelegt ist, welche Vorläuferzellen zu Myotomzellen differenzieren, muss folglich kritisch hinterfragt

werden. Unter Zusammenschau unserer Ergebnisse sowie der oben beschriebenen Erkenntnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Differenzierung von Somitenzellen zu Dermiszellen oder Muskelzellen zwar erst im Somiten festgelegt wird, dieser Prozess allerdings filopodienunabhängig stattfindet. Alternativ könnte die Festlegung der Zellschicksale im Dermomyotom bereits erfolgt sein.

Die nach der Rac1-Hemmung zu beobachtenden mesenchymal anmutenden Zellen bleiben GFP-positiv. Um herauszufinden, ob es sich bei diesen Zellen um Mesenchymzellen handelt und wie sich ihre weitere Entwicklung vollzieht, bedarf es weiterer Forschung.

5.10 Nicht alle dermomyotomalen Zellen haben nach dem CofilinS3A-*rescue* wieder einen epithelialen Charakter

Obwohl, wie in *Abbildung 18* (Elektroporation mit dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP) dargestellt, wieder über den gesamten dorsolateralen Rand des Dermomyotoms hinweg Filopodien erkennbar sind, werden nicht alle Zellen morphologisch wieder epithelial. Einen möglichen Erklärungsansatz stellt die unvollständige Aufnahme des Plasmids zur Expression von CofilinS3A in die jeweiligen Zellen dar. Gegen diese These spricht, dass das Plasmid zur Expression von dnRac1 im Gegensatz zum Plasmid zur Expression von CofilinS3A in die Dermomyotomzellen gelangt sein muss, um die Epithelformation der Zellen zu stören.

Alternativ wäre es möglich, dass dauerhaft aktives Cofilin keinen vollständigen *rescue* der Wirkung von dnRac1 erreichen kann. Dies würde bedeuten, dass Rac1 zusätzlich eine Funktion erfüllen müsste, die filopodienunabhängig ist und durch die Gabe von CofilinS3A nicht adäquat kompensiert werden kann. Diese könnte beispielsweise die Aktivierung der JNK-Kinasen [77,78] oder die Bildung von β-Catenin-Paraxis-Komplexen [80] sein. Doch auch bei dieser Hypothese müsste die Plasmidaufnahme von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und CofilinS3A-GFP ungleich erfolgt sein, um erklären zu können, warum manche Dermomyotomzellen wieder einen epithelialen Charakter haben, manche Zellen jedoch nicht.

5.11 Werden die Zellen, die dnRac1 exprimieren, zu Mesenchymzellen?

Die Vermutung, dass es sich bei den mit dnRac1 elektroporierten Zellen des DM um experimentell erzeugte mesenchymale Zellen handelt, fußt auf der subjektiven Betrachtung der morphologischen Kriterien wie der asymmetrischen Zellform, der Uneinheitlichkeit der Zellen und der fehlenden Polarität. Diese Methode berücksichtigt zwar sehr viele relevante Punkte, die für die Identifikation des Zelltyps geeignet sind, doch sind sie am Ende auf der subjektiven Betrachtung eines Untersuchers aufgebaut,

sodass die Ergebnisse durch beispielsweise den *confirmation bias* verzerrt werden können. Um dieses Fehlerrisiko zu verringern, sollte man zusätzlich objektive Parameter anwenden, um die Zellen sicher als Mesenchymzellen oder Epithelzellen zu identifizieren. Eine Möglichkeit wäre der Nachweis von Zell-Zell-Kontakten, die epitheltypisch wären. Dies wäre beispielsweise mit einer immunhistochemischen Markierung von N-Cadherin möglich. N-Cadherin bildet zelladhäsive Kontakte im epithelialen Somiten aus [72]. Ließe sich dieser Marker nicht nachweisen, könnte es sich um Mesenchymzellen handeln, was mit Markern wie Vimentin zu überprüfen wäre, oder auch um Zellen unklarer Identität, die aufgrund der exprimierten Konstrukte keine klare Differenzierung aufweisen [124].

5.12 Die Frage nach der weiteren Entwicklung der neu entstandenen mesenchymal konfigurierten Zellen und die damit einhergehenden Auswirkungen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei den GFP-positiven, nicht mehr epithelialen Zellen nicht um Myotomzellen handelt, stellt sich die Frage, wie sich diese Zellen weiterentwickeln. Bei normal aktivem Rac1 bleibt das Epithel noch längere Zeit erhalten und mesenchymalisiert erst später, um sekundäre Myotomzellen und Dermis zu bilden [37,125]. Man konnte zwar zeigen, dass ebendiese mesenchymalisierenden Zellen des DMs En1 und Wnt11 exprimieren, sowohl die exakte Rolle dieser Proteine als auch der Prozess der EMT ist allerdings nur unzureichend verstanden [37 44]. Da die epithelialen Zellen normalerweise anteilig dermal werden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Mesenchymzellen um dermale Progenitorzellen handelt, die durch die Hemmung des Wnt-Signalwegs zu früh eine epithelial-mesenchymale Transformation durchführen. Um das zu prüfen, wäre es sinnvoll, entweder den weiteren Verlauf der Entwicklung und eventuelle Migration zu verfolgen oder die GFP-positiven Zellen auf Dermismarker zu untersuchen. Ein möglicher Marker ist hierbei das Protein Dermo-1 [126].

Die Signalwege der Dermisentwicklung des epithelialen Somiten sind hoch komplex. So ist Wnt11 für die Bildung einer intakten Dermis notwendig [37]. Dieses Wnt11 wird durch Wnt1 aus dem Neuralrohr induziert [44]. So wie in diesem Beispiel ist es auch in unserer Versuchsanordnung sehr wahrscheinlich, dass der Ausfall von Rac1 und mit ihm möglicherweise der Wnt6-Mangel dazu führen kann, dass darauffolgende Signalkaskaden nicht stattfinden können. Dies kann dazu führen, dass die Zellen in ihrer Entwicklung stehenbleiben und als Mesenchymalzellen zurückbleiben. Ebenso wäre es denkbar, dass sie letal werden. Um zu überprüfen, ob die Zellen vital bleiben, dabei aber keine oder nur eine verlangsamte Entwicklung durchlaufen, müssten die

Embryonen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Endpunkt der Beobachtung könnte die Migration der dermalen Progenitorzellen in den subektodermalen Raum darstellen (ca. HH30 nach Hamburger und Hamilton [1]), da nach dieser EMT bis auf wenige Ausnahmen (DML und VLL) sämtliche Zellen des Somiten ausgewandert sind [6]. Sollte sich nach einigen Tagen der Bebrütung keinerlei Veränderung einstellen, kann angenommen werden, dass die Entwicklung ausgesetzt wurde.

Ebenso ist es möglich, dass die mesenchymal konfigurierten, MF20-negativen Zellen, Zellen des sekundären Myotoms sind, welche nach Bildung des primären Myotoms ventromedial des Dermomyotoms direkt aus dem zentralen Dermomyotom heraus in das Myotom wandern. Gros et al. [125] beobachteten mit GFP markierte Zellen des Dermomyotoms, welche ab ca. 24h nach Somitogenese im Myotom zu finden sind. Diese exprimierten den muskelfaserspezifischen Marker Pax-7. Da die in meiner Arbeit betrachteten Embryonen 3-4 Tage bebrütet wurden, sind sekundäre Myotomzellen in den Schnitten zu erwarten [125]. Um zu prüfen, ob es sich bei den in meiner Arbeit beschriebenen Zellen um sekundäre Myotomzellen handelt, bietet sich die immunhistochemische Untersuchung auf die Expression des spezifischen Muskelzellmarkers Pax-7 an. Überdies wäre es von Interesse, ob sich die Anzahl an Pax-7-positiven Zellen bei Elektroporation der verschiedenen Plasmide und bei verschiedenen Bebrütungszeiten verändert. So wäre es denkbar, dass der Erhalt der epithelialen Struktur des Dermomyotoms relevant ist, um das sekundäre Myotom zu bilden. Sollte diese Hypothese zutreffen, so würde die Anzahl der Pax-7-positiven Zellen bei Elektroporation mit dem Plasmid dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP drastisch reduziert werden. Ebenso kann sich der Zeitraum, über den sich die Ausbildung des sekundären Myotoms aus dem zentralen Dermomyotom erstreckt, durch Filopodieninhibition verändern. Die Anzahl Pax-7-positiver Zellen im Myotom hat ihr Maximum ca. 48h *post* Somitogenese und sinkt fortan ab [125]. Es ist eine interessante Frage, ob diese Dynamik auch in Somiten zu sehen ist, deren Filopodien-Genese durch die Expression von dnRac1 inhibiert worden ist. Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es weitergehender Forschung.

Um festzustellen, ob die GFP-positiven Zellen im Somiten, dessen Rac1 inhibiert worden ist, letal werden, bietet es sich an, eine Immunhistochemie mit Apoptosemarkern, wie beispielsweise Caspasen oder Cytochrom-c, durchzuführen [127,128].

5.13 Zusammenfassung der Diskussion

Aktives Rac1 ist an der Filopodienbildung im dorsalen Dermomyotom beteiligt, da

gezeigt werden konnte, dass die Elektroporation mit Plasmiden zur Expression von dnRac1 zu einer Filopodienreduktion führt. Ein Grund kann die unzureichende WAVE1-Phoshorylierung, welche durch Rac1 ausgeführt wird, sein [87]. Ebenso ist die Rac1-abhängige Cofilin-Dephosphorylierung als Ursache in Betracht zu ziehen [92,94].

Es kann angenommen werden, dass Wildtyp-Cofilin die Inaktivität von Rac1 nicht kompensieren kann, da Cofilin Rac1-abhängig aktiviert werden muss, um die Filopodienbildung zu initiieren [90,94]. Anders hingegen verhält es sich mit dauerhaft aktivem CofilinS3A. Dieses ist Rac1-unabhängig aktiv und sorgt so für die Ausbildung von Filopodien [110].

Bei der Elektroporation mit dem Plasmid dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS +pCAG-GFP lässt sich keine Veränderung in der Filopodienzahl feststellen. Dies kann bedeuten, dass die Filopodien-Genese Cdc42-unabhängig ist. Das Einbringen von Cofilin in Kombination mit der Expression von dnCdc42 führt zu einer verringerten Filopodienzahl. Dies ließe sich dadurch erklären, dass Cofilin-Überexpression eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskelettes bedingt [118]. Dauerhaft aktives CofilinS3A hingegen steigert die Filopodien-Genese, auch in Kombination mit der Expression von dnCdc42. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die destabilisierende Wirkung von Cofilin in einer konzentrationsabhängigen Cofilininaktivierung begründet liegt. Je mehr Cofilin vorliegt, desto stärker ist die Cofilininhibition [113]. Da CofilinS3A allerdings konzentrationsunabhängig dauerhaft aktiv ist, steigert es die Filopodien-Genese.

Wird dnRac1 exprimiert, verliert das Dermomyotom seinen epithelialen Charakter. Dies untermauert die Hypothese, dass die Rac1-abhängige Filopodienbildung notwendig ist, um das epithelialisierende ektodermale Wnt6-Signal im Dermomyotom zu empfangen und folglich den Transkriptionsfaktor Paraxis zu aktivieren [10]. Alternativ kann Rac1 seine Wirkung aber auch über die Aktivierung von JNK-Kinasen [77,78] oder die Induktion von β-Catenin-Paraxis-Komplexen entfalten [80]. Um die Frage zu beantworten, welche Hypothese zutrifft, bedarf es weitergehender Forschung, z.B. der spezifischen Hemmung der Filopodienbildung durch andere Konstrukte und Vergleich der Ergebnisse.

Die Inhibition der Rho-GTPase Rac1 hat keinen direkt erkennbaren Einfluss auf die Differenzierung von Zellen, die das primäre Myotom bilden. Zwar verlieren einige Zellen des Dermomyotoms nach der Elektroporation mit dem Konstrukt dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP ihren epithelialen Charakter, sie werden allerdings nicht MF20-positiv, sind also nicht Teil des primären Myotoms. Auch bei der Coelektroporation mit Cofilin oder CofilinS3A werden MF20-postitive Zellen gebildet. Die Zellen des Dermomyotoms werden auch in dieser Elektroporationskonstellation nicht MF20-postiv. Die Filopodienbildung und die Aktivität der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 hat folglich keine

Auswirkung auf die Bildung des primären Myotoms. Die mesenchymal konfigurierten Zellen können dermale Vorläuferzellen [44] oder Zellen des sekundären Myotoms sein [125]. Ebenso ist es denkbar, dass die Zellen keine eindeutige Differenzierung aufweisen oder letal werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; **88**(1): 49-92.
2. F. S. Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des KaninchensOryctolagus cuniculus. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 1960 Jan; **152(1)**: 43-130.
3. Dequéant ML, Pourquié O. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat Rev Genet* 2008; **9**(5): 370-82.
4. Fan CM, Tessier-Lavigne M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 1994; **79**(7): 1175-86.
5. Dalgleish AE. A study of the development of thoracic vertebrae in the mouse assisted by autoradiography. *Acta Anat (Basel)* 1985; **122**(2): 91-8.
6. Gros J, Scaal M, Marcelle C. A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev Cell* 2004; **6**(6): 875-82.
7. Ordahl CP, Le Douarin NM. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 1992; **114**(2): 339-53.
8. Pu Q, Abduelmula A, Masyuk M, et al. The dermomyotome ventrolateral lip is essential for the hypaxial myotome formation. *BMC Dev Biol* 2013; **13**: 37.
9. Christ B, Jacob HJ, Jacob M. On the formation of the myotomes in avian embryos. An experimental and scanning electron microscope study. *Experientia* 1978; **34**(4): 514-6.
10. Sagar, Pröls F, Wiegreffe C, Scaal M. Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. *Development* 2015; **142**(4): 665-71.
11. Schmidt C, Stoeckelhuber M, McKinnell I, Putz R, Christ B, Patel K. Wnt 6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. *Dev Biol* 2004; **271**(1): 198-209.
12. Stanganello E, Hagemann AI, Mattes B, et al. Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nat Commun* 2015; **6**: 5846.
13. Aspenström P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 2004; **377**(Pt 2): 327-37.
14. Eyal-Giladi H, Kochav S, Yerushalmi S. The sorting-out of thymidine-labelled chick hypoblast cells in mixed epiblast--hypoblast aggregates. *Differentiation* 1975; **4**(2): 57-60.
15. Eyal-Giladi H, Wolk M. The inducing capacities of the primary hypoblast as revealed by transfilter induction studies. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 1970; **165**(3): 226-41.
16. Fraser RF. studies on the hypoblast of the young chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* 1954; **August 1954**: 349-99.
17. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* 1980; **287**(5785): 795-801.
18. Spemann H, Mangold H. über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* 1924; **100**(3): 599-638.
19. Veitch E, Begbie J, Schilling TF, Smith MM, Graham A. Pharyngeal arch patterning in the absence of neural crest. *Curr Biol* 1999; **9**(24): 1481-4.
20. Brent AE, Tabin CJ. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**(5): 548-57.
21. Pereira PN, Dobreva MP, Graham L, Huylebroeck D, Lawson KA, Zwijsen AN. Amnion formation in the mouse embryo: the single amniochorionic fold model. *BMC Dev Biol* 2011; **11**: 48.
22. Christ B, Ordahl CP. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 1995; **191**(5): 381-96.
23. Hamilton L. The formation of somites in Xenopus. *J Embryol Exp Morphol* 1969; **22**(2): 253-64.
24. Leimeister C, Dale K, Fischer A, et al. Oscillating expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors. *Dev Biol* 2000; **227**(1): 91-103.

25. Aulehla A, Wehrle C, Brand-Saberi B, et al. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell* 2003; **4**(3): 395-406.
26. Dubrulle J, McGrew MJ, Pourquié O. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 2001; **106**(2): 219-32.
27. Maroto M, Bone RA, Dale JK. Somitogenesis. *Development* 2012; **139**(14): 2453-6.
28. Johnson RL, Laufer E, Riddle RD, Tabin C. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 1994; **79**(7): 1165-73.
29. Scaal M, Christ B. Formation and differentiation of the avian dermomyotome. *Anat Embryol (Berl)* 2004; **208**(6): 411-24.
30. Coffin JD, Poole TJ. Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* 1988; **102**(4): 735-48.
31. Venters SJ, Ordahl CP. Persistent myogenic capacity of the dermomyotome dorsomedial lip and restriction of myogenic competence. *Development* 2002; **129**(16): 3873-85.
32. Eloy-Trinquet S, Nicolas JF. Clonal separation and regionalisation during formation of the medial and lateral myotomes in the mouse embryo. *Development* 2002; **129**(1): 111-22.
33. Rios AC, Serralbo O, Salgado D, Marcelle C. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* 2011; **473**(7348): 532-5.
34. Münsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* 1995; **9**(23): 2911-22.
35. Abu-Elmagd M, Robson L, Sweetman D, Hadley J, Francis-West P, Münsterberg A. Wnt/Lef1 signaling acts via Pitx2 to regulate somite myogenesis. *Dev Biol* 2010; **337**(2): 211-9.
36. Marcelle C, Stark MR, Bronner-Fraser M. Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development* 1997; **124**(20): 3955-63.
37. Olivera-Martinez I, Thélu J, Dhouailly D. Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol* 2004; **48**(2-3): 93-101.
38. Burgess R, Rawls A, Brown D, Bradley A, Olson EN. Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* 1996; **384**(6609): 570-3.
39. Linker C, Lesbros C, Gros J, Burrus LW, Rawls A, Marcelle C. beta-Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis. *Development* 2005; **132**(17): 3895-905.
40. Tanda N, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S, Nohno T. A chicken Wnt gene, Wnt-11, is involved in dermal development. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **211**(1): 123-9.
41. Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Huang R, Christ B, Scaal M. Regulation of ectodermal Wnt6 expression by the neural tube is transduced by dermomyotomal Wnt11: a mechanism of dermomyotomal lip sustainment. *Development* 2006; **133**(15): 2897-904.
42. Serralbo O, Marcelle C. Migrating cells mediate long-range WNT signaling. *Development* 2014; **141**(10): 2057-63.
43. Mayerson PL, Fallon JF. The spatial pattern and temporal sequence in which feather germs arise in the white Leghorn chick embryo. *Dev Biol* 1985; **109**(2): 259-67.
44. Olivera-Martinez I, Missier S, Fraboulet S, Thélu J, Dhouailly D. Differential regulation of the chick dorsal thoracic dermal progenitors from the medial dermomyotome. *Development* 2002; **129**(20): 4763-72.
45. Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, et al. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol* 2006; **296**(1): 164-76.
46. Cheng L, Alvares LE, Ahmed MU, El-Hanfy AS, Dietrich S. The epaxial-hypaxial subdivision of the avian somite. *Dev Biol* 2004; **274**(2): 348-69.
47. Ben-Yair R, Kahane N, Kalcheim C. Coherent development of dermomyotome and dermis from the entire mediolateral extent of the dorsal somite. *Development* 2003; **130**(18): 4325-36.
48. James RG, Conrad WH, Moon RT. Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors. *Methods Mol Biol* 2008; **468**: 131-44.

49. Wang Y, Macke JP, Abella BS, et al. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem* 1996; **271**(8): 4468-76.
50. Bhanot P, Brink M, Samos CH, et al. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996; **382**(6588): 225-30.
51. Semënov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 2001; **11**(12): 951-61.
52. Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 2004; **131**(12): 2803-15.
53. Davidson G, Wu W, Shen J, et al. Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 2005; **438**(7069): 867-72.
54. Bilic J, Huang YL, Davidson G, et al. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 2007; **316**(5831): 1619-22.
55. Stamos JL, Weis WI. The β-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**(1): a007898.
56. Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; **108**(6): 837-47.
57. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 1983; **258**(13): 8206-14.
58. Piao S, Lee SH, Kim H, et al. Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One* 2008; **3**(12): e4046.
59. Wu G, Huang H, Garcia Abreu J, He X. Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PLoS One* 2009; **4**(3): e4926.
60. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; **382**(6592): 638-42.
61. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2007; **24**(1): 203-16.
62. Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 1992; **267**(28): 20033-8.
63. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* 2018; **217**(2): 447-57.
64. Koizumi K, Takano K, Kaneyasu A, et al. RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Mol Biol Cell* 2012; **23**(23): 4647-61.
65. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**(6): 446-54.
66. Nakaya Y, Kuroda S, Katagiri YT, Kaibuchi K, Takahashi Y. Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell* 2004; **7**(3): 425-38.
67. Braga VM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1997; **137**(6): 1421-31.
68. Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 1997; **139**(4): 1047-59.
69. Okamoto I, Kawano Y, Matsumoto M, et al. Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *J Biol Chem* 1999; **274**(36): 25525-34.
70. Fukata M, Kuroda S, Nakagawa M, et al. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem* 1999; **274**(37): 26044-50.
71. Briggs MW, Li Z, Sacks DB. IQGAP1-mediated stimulation of transcriptional co-activation by beta-catenin is modulated by calmodulin. *J Biol Chem* 2002; **277**(9): 7453-65.
72. Duband JL, Dufour S, Hatta K, Takeichi M, Edelman GM, Thiery JP. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J Cell Biol* 1987; **104**(5): 1361-74.

73. Wang T, Wang R, Cleary RA, Gannon OJ, Tang DD. Recruitment of β-catenin to N-cadherin is necessary for smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 2015; **290**(14): 8913-24.
74. Haÿ E, Laplantine E, Geoffroy V, et al. N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol* 2009; **29**(4): 953-64.
75. Fukata M, Kuroda S, Fujii K, et al. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J Biol Chem* 1997; **272**(47): 29579-83.
76. Watanabe T, Wang S, Noritake J, et al. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* 2004; **7**(6): 871-83.
77. Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 2008; **133**(2): 340-53.
78. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009; **137**(4): 623-34.
79. Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, et al. ROS production and NF-κB activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell* 2013; **12**(6): 761-73.
80. Jamieson C, Lui C, Brocardo MG, Martino-Echarri E, Henderson BR. Rac1 augments Wnt signaling by stimulating β-catenin-lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of β-catenin nuclear import. *J Cell Sci* 2015; **128**(21): 3933-46.
81. Ramírez-Weber FA, Kornberg TB. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in Drosophila imaginal discs. *Cell* 1999; **97**(5): 599-607.
82. Hill TL, Kirschner MW. Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; **79**(2): 490-4.
83. Pollard TD. Polymerization of ADP-actin. *J Cell Biol* 1984; **99**(3): 769-77.
84. Chesarone MA, Goode BL. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 2009; **21**(1): 28-37.
85. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 1997; **136**(6): 1307-22.
86. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 1998; **8**(25): 1347-56.
87. Sanchez AM, Flamini MI, Fu XD, et al. Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton. *Mol Endocrinol* 2009; **23**(8): 1193-202.
88. Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 1998; **391**(6662): 93-6.
89. Liu C, Zhang H, Mao J, et al. Mevalonate metabolites boost aged oocyte quality through prenylation of small GTPases. *Nature Aging* 2025.
90. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1999; **1**(5): 253-9.
91. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 1998; **393**(6687): 805-9.
92. Garvalov BK, Flynn KC, Neukirchen D, et al. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* 2007; **27**(48): 13117-29.
93. Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 2002; **108**(2): 233-46.
94. Liu L, Li J, Zhang L, et al. Cofilin phosphorylation is elevated after F-actin disassembly induced by Rac1 depletion. *Biofactors* 2015; **41**(5): 352-9.
95. Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; **423**(6938): 448-52.

96. Hart MJ, Callow MG, Souza B, Polakis P. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *Embo j* 1996; **15**(12): 2997-3005.
97. Scaal M, Gros J, Lesbros C, Marcelle C. In ovo electroporation of avian somites. *Dev Dyn* 2004; **229**(3): 643-50.
98. Draga M, Pröls F, Scaal M. Double electroporation in two adjacent tissues in chicken embryos. *Dev Dyn* 2018; **247**(11): 1211-6.
99. Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; **101**(1): 16-22.
100. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; **70**(3): 401-10.
101. Vikis HG, Stewart S, Guan KL. SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms. *Oncogene* 2002; **21**(15): 2425-32.
102. Feig LA, Cooper GM. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 1988; **8**(8): 3235-43.
103. Lenzen C, Cool RH, Prinz H, Kuhlmann J, Wittinghofer A. Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* 1998; **37**(20): 7420-30.
104. Ruiz-Lafuente N, Alcaraz-García MJ, García-Serna AM, et al. Dock10, a Cdc42 and Rac1 GEF, induces loss of elongation, filopodia, and ruffles in cervical cancer epithelial HeLa cells. *Biol Open* 2015; **4**(5): 627-35.
105. Ruiz-Lafuente N, Minguela A, Muro M, Parrado A. The roles of Cdc42 and Rac1 in the formation of plasma membrane protrusions in cancer epithelial HeLa cells. *Mol Biol Rep* 2021; **48**(5): 4285-94.
106. Shoval I, Kalcheim C. Antagonistic activities of Rho and Rac GTPases underlie the transition from neural crest delamination to migration. *Dev Dyn* 2012; **241**(7): 1155-68.
107. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988; **334**(6180): 320-5.
108. Hooley R, Yu CY, Symons M, Barber DL. G alpha 13 stimulates Na+-H+ exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways. *J Biol Chem* 1996; **271**(11): 6152-8.
109. DesMarais V, Macaluso F, Condeelis J, Bailly M. Synergistic interaction between the Arp2/3 complex and cofilin drives stimulated lamellipod extension. *J Cell Sci* 2004; **117**(Pt 16): 3499-510.
110. Nagaoka R, Abe H, Obinata T. Site-directed mutagenesis of the phosphorylation site of cofilin: its role in cofilin-actin interaction and cytoplasmic localization. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996; **35**(3): 200-9.
111. Zebda N, Bernard O, Bailly M, Welti S, Lawrence DS, Condeelis JS. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J Cell Biol* 2000; **151**(5): 1119-28.
112. Gehler S, Shaw AE, Sarmiere PD, Bamburg JR, Letourneau PC. Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin. *J Neurosci* 2004; **24**(47): 10741-9.
113. Andrianantoandro E, Pollard TD. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell* 2006; **24**(1): 13-23.
114. van Rheenen J, Song X, van Roosmalen W, et al. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J Cell Biol* 2007; **179**(6): 1247-59.
115. Huang TY, Minamide LS, Bamburg JR, Bokoch GM. Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Dev Cell* 2008; **15**(5): 691-703.
116. Akeda Y, Kodama T, Kashimoto T, et al. Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of Vibrio parahaemolyticus into Caco-2 cells. *Infect Immun* 2002; **70**(2): 970-3.
117. Chai X, Zhao S, Fan L, et al. Reelin and cofilin cooperate during the migration of cortical neurons: a quantitative morphological analysis. *Development* 2016; **143**(6): 1029-40.

118. Lee YJ, Mazzatti DJ, Yun Z, Keng PC. Inhibition of invasiveness of human lung cancer cell line H1299 by over-expression of cofilin. *Cell Biol Int* 2005; **29**(11): 877-83.
119. Gurriaran-Rodriguez U, Datzkiw D, Radusky LG, et al. Identification of the Wnt signal peptide that directs secretion on extracellular vesicles. *Sci Adv* 2024; **10**(50): eado5914.
120. Krenn V, Gorka P, Wachtler F, Christ B, Jacob HJ. On the origin of cells determined to form skeletal muscle in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)* 1988; **179**(1): 49-54.
121. Chen Y, Solursh M. The determination of myogenic and cartilage cells in the early chick embryo and the modifying effect of retinoic acid. *Rouxs Arch Dev Biol* 1991; **200**(3): 162-71.
122. Aoyama H, Asamoto K. Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. *Development* 1988; **104**(1): 15-28.
123. Dockter J, Ordahl CP. Dorsoventral axis determination in the somite: a re-examination. *Development* 2000; **127**(10): 2201-6.
124. Busuioc C, Birla RD, Ultimescu F, Duţulescu S, Panaitescu E, Berindan-Neagoe I. Abberant Immunohistochemical Expression of OCT3/4 and EMT Related Markers, Vimentin and E-cadherin, is Correlated with Adverse Histopathological Features in Colorectal Adenocarcinoma. *Chirurgia (Bucur)* 2022; **117**(5): 544-55.
125. Gros J, Manceau M, Thomé V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 2005; **435**(7044): 954-8.
126. Scaal M, Füchtbauer EM, Brand-Saberi B. cDermo-1 expression indicates a role in avian skin development. *Anat Embryol (Berl)* 2001; **203**(1): 1-7.
127. Fan Y, Bergmann A. The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in Drosophila. *Cell Death Differ* 2010; **17**(3): 534-9.
128. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; **94**(4): 491-501.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1**:* ***unbehandelter, isolierter Hühnerembryo im Stadium HH17[1] (Seite 15)

Abbildung 2**:* ***isolierter Embryo im Stadium HH18 [1] nach Elektroporation mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP und einer Reinkubation von ca. 4h bei 37,8°C und 16-20h über Nacht bei RT unter dem Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop (Seite 15-16)

Abbildung 3: ***Schematische Übersichtsskizze eines Transversalschnittes durch einen Embryo mit zu Dermomyotom, Myotom und Sklerotom differenzierten Somiten (Seite 17)***

Abbildung 4: ***Sagittalschnitt eines Embryos (HH14 [1]) in verschiedenen Stadien der Somitenentwicklung*** *aus Sagar, et al., Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. Development, 2015. 142(4): p. 665-71 [10].* ***(Seite 17-18)***

Abbildung 5: ***Transversalschnitt durch die Schwanzregion (a) eines Mausembryos (Stadium E11.5) vom Wildtyp beziehungsweise (b) eines Embryos mit einer knock-out Paraxis-Mutation in Haematoxylin-Eosin-Färbung*** *aus Burgess, R., et al., Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. Nature, 1996.* ***384****(6609): p. 570-3 [38].* ***(Seite 19)***

Abbildung 6: ***Transversalschnitt eines 3 Tage alten Hühnerembryos nach einseitiger Ektodermentfernung und in-situ Hybridisierung gegen Paraxis*** *aus Schmidt, C., et al., Wnt 6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. Dev Biol, 2004.* ***271****(1): p. 198-209 [11].* ***(Seite 20)***

Abbildung 7: ***Transversalschnitt durch einen 3 Tage alten Hühnerembryo nach einseitiger Ektodermresektion, rescue durch Implantation Wnt6-produzierender Zellen und anschließender Reinkubation (18h)*** *aus Schmidt, C., et al., Wnt 6 regulates the epithelialisation process of the segmental plate mesoderm leading to somite formation. Dev Biol, 2004.* ***271****(1): p. 198-209 [11].* ***(Seite 21)***

Abbildung 8: ***Funktionsschema von Rho-GTPasen*** *aus Lawson, C.D. and A.J. Ridley, Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. J Cell Biol, 2018.* ***217****(2): p. 447-457 [63].* ***(Seite 24)***

Abbildung 9: ***Dermomyotomale Zellen eines Hühnerembryos (HH18 [1]) unter dem Fluoreszenzmikroskop*** *aus Sagar, et al., Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development. Development, 2015. 142(4): p. 665-71 [10].* ***(Seite 25-26)***

Abbildung 10: ***Schema der „Aktin-treadmill"*** *aus Hill, T.L. and M.W. Kirschner, Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79(2): p. 490-4 [82].* ***(Seite 30)***

Abbildung 11: ***Retrograder Transport vom Wnt-Rezeptor Frizzled7 in Filopodien dermomyotomaler Zellen eines Hühnerembryos (HH17 [1])*** *aus Sagar, et al., Communication between distant epithelial cells by filopodia-like*

protrusions during embryonic development. Development, 2015. 142(4): p. 665-71 [10]. ***(Seite 32)***

Abbildung 12: ***isolierter Hühnerembryo (HH18 [1]) nach Elektroporation mit dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP (Seite 41-42)***

Abbildung 13: ***Orientierende Skizze eines Transversalschnittes durch einen Hühnerembryo sowie beispielhafte Darstellung der untersuchten Bereiche. (Seite 57-58)***

Abbildung 14: ***ausgewählte Schnitte von 22 Somiten nach Elektroporation mit dem Konstrukt pCAG-GFP (Seite 59-62)***

Abbildung 15: ***ausgewählte Schnitte von 18 Somiten nach Elektroporation des Konstruktes dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP (Seite 63-66)***

Abbildung 16: ***ausgewählte Schnitte von 19 Somiten nach Elektroporation des Konstruktes dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP (Seite 66-69)***

Abbildung 17: ***repräsentative Schnitte von 14 Somiten nach Elektroporation von dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+EGFP-N1-Cofilin (Seite 70-73)***

Abbildung 18: ***repräsentative Transversalschnitte von 7 Somiten nach Elektroporation des Konstruktes dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP+CofilinS3A-GFP (Seite 73-76)***

Abbildung 19: ***ausgewählte Transversalschnitte von 9 Somiten nach der Elektroporation des Konstruktes dnCdc42-T17N in Vektor pCAGGS+EGFP-N1-Cofilin (Seite 76-79)***

Abbildung 20: ***Ausgewählte, repräsentative Transversalschnitte von 17 Somiten nach Elektroporation mit dem Konstrukt dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS + CofilinS3A-GFP (Seite 79-82)***

Abbildung 21: ***graphische Darstellung der Ergebnisse der Filopodienquantifizierung (Seite 84-87)***

Abbildung 22: ***Zusammenfassung der Abbildungen 14-20 (Seite 88-89)***

Abbildung 23: ***Dermomyotom mit elektroporiertem Plasmid sowie immunhistochemischer Markierung mit MF20 (Seite 90-92)***

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1*:** ***Protokoll der verwendeten in-ovo Elektroporation (Seite 36-37)

Tabelle 2: ***Protokoll der verwendeten ex-ovo Elektroporation (Seite 38)***

Tabelle 3: ***Embryonenisolierung (Seite 42)***

Tabelle 4: ***Immunhistochemie (Seite 44-45)***

Tabelle 5: ***GBS-Einbettung (Seite 45)***

Tabelle 6: ***Vibratomschnitte (Seite 46)***

Tabelle 7: ***Chrom-Gelatine-Mix (Seite 47)***

Tabelle 8: ***Chrom-Gelatine-Objektträger (Seite 47)***

Tabelle 9: ***GBS-Mix-Herstellung (Seite 48)***

Tabelle 10: ***Transfomration (Seite 49)***

Tabelle 11: ***DNA-Extraktion (Seite 51)***

Tabelle 12: ***Geräte (Seite 52-54)***

Tabelle 13: ***Reagenzien (Seite 55)***

Tabelle 14: ***Übersicht über die Filopodienquantifizierung aufgeschlüsselt nach Untersucher*In, dem jeweiligen Konstrukt sowie einer Betrachtung der jeweiligen Mittelwerte (Seite 82-83)***

Tabelle 15: ***Vergleich des Quotienten aus Filopodienzahl und Zellzahl inklusive Standardabweichungen zwischen den Konstrukten pCAG-GFP, dnRac1(N17)-pCAGG-IRES-GFP und dnCdc42T17N in Vektor pCAGGS+pCAG-GFP (Seite 83)***

Tabelle 16: ***Zusammenfassung der Ergebnisse (Seite 83)***