

**Funktion und Regulation des Transkriptionsfaktors
Xsna während der Embryonalentwicklung von
*Xenopus laevis***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Hady Ibrahim
aus Mönchengladbach

Druck: copy team cologne

Köln 2002

Berichtersteller: Prof. Dr. R. Winklbauer
Prof. Dr. S. Berking

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Rudolf Winklbauer durchgeführt. Ich danke ihm sehr für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit, für seine Bereitschaft zu ausgedehnten Diskussionen und seine Unterstützung in allen Bereichen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Stephan Wacker, Dr. Tina Nagel und Melanie Maniura für hilfreiche Gespräche und kritische Anmerkungen zu dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Dr. Michael Kroiher und Uwe Hoffmann für die Hilfe in Fragen der Molekularbiologie.

Allen Mitarbeitern möchte ich für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Außerdem danke ich Prof. Dr. S. Berking für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Mitteln, als auch für die freundliche Unterstützung in allen Bereichen.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Ergebnisse	16
2.1. Internalisierung des Mesoderms auf der Ventralseite	16
2.1.1. Expression des posterioren Mesodermmarkers <i>Xbra</i> als Grundlage für eine räumliche Unterteilung der an der Involutionsbewegung beteiligten Regionen	16
2.1.2. Entwicklung isolierter Explantate des vegetalen Blastocoeldachrandes	22
2.1.3. Detaillierter Anlageplan der ventralen Lippenregion	24
2.1.4. Das Blastocoeldachmesoderm verliert sein Abstoßungsverhalten	30
2.1.5. Die Oberlippe erwirbt die Eigenschaft des Separationsverhaltens	31
2.1.6. Der Verlust des Abstoßungsverhaltens des Blastocoeldachmesoderms wird nicht durch eine reduzierte Zell-Zell-Adhäsion hervorgerufen	33
2.2. Funktion und Regulation von <i>Xsna</i>	36
2.2.1. Die Rolle von <i>Xsna</i> bei der Gewebstrennung	36
2.2.1.1. Die Expression des Transkriptionsfaktor <i>Xsna</i> breitet sich fortschreitend in das Blastocoeldachmesoderm aus	36
2.2.1.2. <i>Xsna</i> ist an der Regulation des Abstoßungsverhaltens beteiligt	38
2.2.1.3. <i>Xsna</i> und bFGF beeinflussen das Separationsverhalten	40
2.2.1.4. Kann das durch <i>Xsna</i> hervorgerufene Separationsverhalten durch andere Faktoren erhöht werden?	41
2.2.1.5. Die Repression von <i>Xbra</i> ist nicht notwendig für das Separationsverhalten	43
2.2.1.6. Die Effekte von <i>Xfz7</i> und <i>Xsna</i> auf das Separationsverhalten sind voneinander unabhängig	44
2.2.1.7. <i>Drosophila snail</i> löst in <i>Xenopus</i> kein Separationsverhalten aus	46
2.2.1.8. Der Einfluß von <i>Xsna</i> und bFGF auf die Zell-Zell-Adhäsion	48
2.2.2. Die Überexpression von <i>Xsna</i> führt zu einer vorzeitigen Auslösung der Vegetalen Rotation auf der Ventralseite	51
2.2.3. Die Rolle von <i>Xsna</i> in Genexpressionskontrolle und Achsenbildung	55
2.2.3.1. <i>Xtwi</i> bewirkt keine Aktivierung der <i>Xsna</i> -Expression	55
2.2.3.2. <i>Xsna</i> ist sowohl hinreichend als auch notwendig für die Repression von <i>Xbra</i>	55
2.2.3.3. Der an Gewebstrennung beteiligte Eph-Rezeptor <i>EphA4</i> wird durch <i>Xsna</i> reguliert	58
2.2.3.4. Die Regulation von <i>EphA4</i> durch <i>Xsna</i> und bFGF wird nicht durch <i>Xbra</i> vermittelt	61
2.2.3.5. Das direkte <i>Xbra</i> -Zielgen <i>Xwnt11</i> wird auch <i>Xbra</i> -unabhängig durch <i>Xsna</i> reguliert	63

2.2.3.6.	Die dorsale Überexpression von <i>Xsna</i> führt zu einer Reduktion der anterior-posterior Achse	63
2.2.3.7.	Überexpression als auch Inhibition der Translation von <i>Xsna</i> führen zu einer Störung der Somitenbildung	66
2.2.4.	<i>Xsna</i> hat einen Einfluß auf die Links-Rechts-Orientierung der Organe	68
2.2.4.1.	<i>Xsna</i> ist sowohl hinreichend als auch notwendig für die Links-Rechts-Orientierung der Organe	68
2.2.4.2.	<i>Xsna</i> wirkt aktivierend auf das an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligte Gen <i>Xnr1</i>	72
3.	Diskussion	75
3.1.	Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Dorsal- und Ventralseite	75
3.1.1.	Dorsale und ventrale Lippe besitzen trotz unterschiedlichem Schicksal Gemeinsamkeiten im Zellverhalten	75
3.1.2.	Das Blastocoeldachmesoderm	77
3.2.	Die Beziehung zwischen <i>Xsna</i> und <i>Xbra</i>	78
3.2.1.	Die Dynamik des Expressionsmusters von <i>Xsna</i> und <i>Xbra</i>	78
3.2.2.	Der Transkriptionsfaktor <i>Xsna</i> ist notwendig für das Abschalten der <i>Xbra</i> -Expression nach Involution	79
3.3.	Achsenbildung und Links-Rechts-Asymmetrie	83
3.3.1.	Störung der anterior-posterior Achse durch <i>Xsna</i> -Überexpression	83
3.3.2.	Störung der Bildung des Zentralnervensystems durch <i>Xsna</i>	84
3.3.3.	Der Effekt von <i>Xsna</i> auf die Somitenbildung	85
3.3.4.	<i>Xsna</i> und die Links-Rechts-Asymmetrie	86
3.4.	<i>Xsna</i> -Effekte auf Gewebstrennung und Zell-Zell-Adhäsion	90
3.4.1.	Mitglieder der Snail-Superfamilie regulieren Zell-Zell-Adhäsion	90
3.4.2.	Gewebstrennung in der <i>Xenopus</i> Gastrula	92
3.4.3.	<i>Xsna</i> und das Abstoßungsverhalten	95
3.4.4.	Starkes Separationsverhalten und niedrige Zell-Zell-Adhäsion sind korreliert	96
3.4.5.	Möglicherweise ist das vorzeitige Auslösen der Vegetalen Rotation durch <i>Xsna</i> auch auf eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion zurückzuführen	98
3.5.	<i>Xenopus</i> snail und <i>Drosophila</i> snail	100
4.	Material und Methoden	103
4.1.	Gewinnung von Embryonen	103
4.2.	Präparation von Embryonen und Explantaten	103
4.3.	Zelladhäsionstests	104
4.3.1.	Reaggregationstest	104
4.3.2.	Dissoziationstest	104
4.4.	Mikroinjektion von RNA, Morpholinos und Lucifer Yellow	105

4.5.	Dil-Markierung zur Erstellung eines Anlageplans der Lippenregion	106
4.6.	Schneiden von fixierten Präparaten	106
4.7.	Blastocoeldachtest zur Untersuchung von Abstoßungs- und Separationsverhalten	106
4.8.	Statistische Auswertung	108
4.9.	Mesoderminduktion animaler Kappen	108
4.10.	Fotodokumentation	109
4.11.	Videodokumentation	109
4.12.	Molekulare Arbeitsmethoden	110
4.12.1.	Transformation	110
4.12.2.	Ansetzen einer Flüssig-Kultur	110
4.12.3.	Plasmidpräparation	111
4.12.4.	Linearisierung der Plasmide und mRNA-Synthese	111
4.12.5.	Gelelektrophorese	113
4.12.6.	Inhibition der Xsna-Translation durch Morpholinos	113
4.12.7.	Herstellung von Digoxigenin-markierter RNA zur <i>in situ</i> Hybridisierung	114
4.12.8.	Hydrolyse der Digoxigenin-markierten RNA	114
4.12.9.	<i>In situ</i> Hybridisierung	115
4.12.10.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Embryonen und Explantaten für RT-PCR (Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion)	116
4.12.11.	Reverse Transkription	117
4.12.12.	PCR (Polymerasekettenreaktion)	117
4.13.	Lösungen und Chemikalien	120
5.	Literaturverzeichnis	123
6.	Kurzzusammenfassung	143
7.	Abstract	144

1. Einleitung

Die Gastrulation gehört zu den wichtigsten Prozessen in der Entwicklung von Metazoen. Sie führt dazu, daß in triploblastischen Organismen das Ektoderm den Embryo von außen umschließt, das Endoderm nach innen verlagert und das prospektive Mesoderm zwischen Ektoderm und Endoderm bewegt wird.

In *Xenopus* ist die Gastrulation sehr komplex, wohingegen dieser Prozeß in *Drosophila* einfacher erscheint. Trotz Unterschiede können Aspekte jedoch konserviert sein, wie die Funktion an der Gastrulation beteiligter Gene. In *Drosophila* besitzt der Transkriptionsfaktor snail (sna) eine wichtige Rolle während der Gastrulation (Nüsslein-Volhard et al., 1984; Leptin, 1991; Leptin, 1995). Wie später noch ausführlicher beschrieben wird, war eine konservierte Funktion für das in dieser Arbeit untersuchte snail-Homolog in *Xenopus* (Xsna) zu vermuten (Sargent and Bennett, 1990). Deshalb wird zunächst die Gastrulation von *Drosophila* einschließlich der Rolle von sna betrachtet.

Bei *Drosophila* geschieht die Verlagerung des Mesoderms in das Innere des Embryos in Form einer lokalen Invagination des bei der Zellularisierung entstehenden Epithels. Das präsumtive Mesoderm befindet sich bei *Drosophila* auf der Ventralseite, so daß die durch Invagination entstehende Einstülpung als ventrale Furche bezeichnet wird. Die Internalisierung des Mesoderms wird gefolgt von einer Auflösung des epithelialen Verbandes im Bereich des Mesoderms und der Wanderung der Mesodermzellen auf dem außen verbleibenden Ektoderm. Das präsumtive Endoderm wird ebenfalls durch Invagination von Gewebe am anterioren und posterioren Ende nach innen verlagert (Leptin, 1995).

Die beiden Transkriptionsfaktoren twist (twi) und sna spielen bei *Drosophila* für die Mesodermbildung eine entscheidende Rolle (Nüsslein-Volhard et al., 1984; Leptin, 1991; Leptin, 1995). Unter dem Einfluß eines die Dorsoventralachse gliedernden maternalen Systems gelangt das Protein dorsal (dl) bevorzugt ventral in

die Zellkerne (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989; Steward 1989). Dort aktiviert es direkt die Transkription von *twi* und *sna* (Abb. 1; Jiang et al., 1991; Ip et al., 1992a). Für die vollständige Expression von *sna* ist zusätzlich das Genprodukt von *twi* notwendig (Leptin, 1991; Ip et al., 1992a).

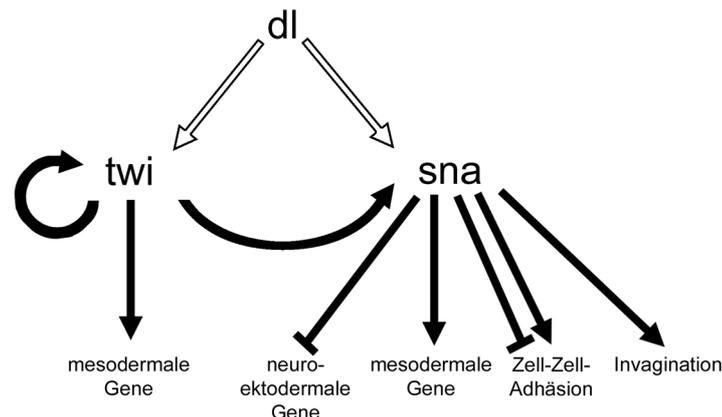


Abb. 1: Schematische Darstellung der frühen Geninteraktionen in der Mesodermanlage von *Drosophila*.

Weißer Pfeil symbolisieren maternale Regulation, schwarze Pfeile stehen für die Interaktionen der zygotischen Gene untereinander. Die dargestellten Interaktionen können auch indirekt sein. Pfeil: aktivierende Wirkung; Linie mit Querbalken: reprimierende Wirkung.

Tw wird auf der Ventralseite im Bereich des präsumtiven Mesoderms exprimiert, seine Expression reicht aber noch etwas nach lateral über die Grenze des präsumtiven Mesoderm hinaus (Leptin, 1991). *Sna* wird zwar ebenfalls im zukünftigen Mesoderm exprimiert, seine Expression endet jedoch scharf an dessen Grenze (Leptin, 1991). Folglich wird *sna* in allen invaginierenden Zellen transkribiert (Abb. 2 links).

Tw kodiert für ein basisches „Helix-Loop-Helix-Protein“, das hauptsächlich die Transkription vieler mesodermaler Gene, darunter auch sich selbst und *sna*, aktiviert (Abb. 1; Leptin 1991).

Das Genprodukt von *sna* ist ein Zinkfingerprotein (Boulay et al., 1987; Mauhin et al., 1993). Mit seiner Zinkfingerdomäne bindet *sna* an Zielsequenzen im Promotor und bewirkt dadurch, daß die Transkription von Zielgenen reprimiert wird (Ip et al., 1992b;

Gray et al., 1994; Gray and Levine, 1996). Der Transkriptionsfaktor *sna* wirkt als Repressor vieler nicht-mesodermaler Gene. Hierzu gehören die neuroektodermalen Gene (Abb. 1) *single-minded (sim)*, *rhomboid (rho)*, *lethal of scute (T3)* und *crumbs (crb)* (Kosman et al., 1991; Leptin, 1991; Ip et al., 1992b). Da *sna* im präsumtiven Mesoderm exprimiert wird, bewirkt die Repression dieser Gene eine Begrenzung ihrer Expression auf ventrolaterale Bereiche außerhalb des Mesoderms. In *sna*-Mutanten unterbleibt diese Begrenzung, was zu einer Expression der neuroektodermalen Gene auf der Ventralseite führt.

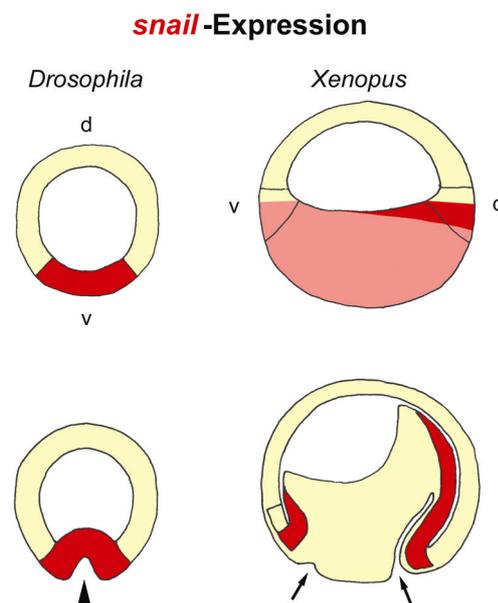


Abb. 2: Schematische Darstellung der *snail*-Expression in *Drosophila* und *Xenopus*. Starke *snail*-Expression wird durch dunkles Rot symbolisiert, schwache Expression durch helles. Bereiche ohne Expression sind gelb dargestellt. In der oberen Reihe ist ein Stadium kurz vor der Internalisierung des Mesoderms dargestellt, in der unteren Reihe eines während der Internalisierung. In *Drosophila* wird *snail* auf der Ventralseite im präsumtiven Mesoderm exprimiert, das durch Invagination in das Innere des Embryos gelangt. In *Xenopus* wird *snail* im vegetalen Endoderm der frühen Gastrula schwach exprimiert. Starke *snail*-Expression ist in *Xenopus* mit der Involution des Mesoderms korreliert. Pfeilspitze: ventrale Furche in *Drosophila*; Pfeil: Blastoporus in *Xenopus*; d: dorsal; v: ventral.

Allerdings ist in *sna*-Mutanten auch die Expression einiger mesodermaler Gene reduziert, wie *tinman (tin)*, *folded gastrulation (fog)*, *zinc-finger homeobox-1(zfh-1)* und *dGATAb* (Costa et al., 1994; Hemavathy et al., 1997). Das spricht dafür, daß *sna* nicht nur die Repression neuroektodermaler Gene bewirkt, sondern auch an der

Regulation mesodermaler Gene beteiligt ist, indem es vermutlich indirekt auf ihre Expression aktivierend wirkt (Abb. 1).

Zudem ist *sna* während der Gastrulation an der Regulation von Zell-Zell-Adhäsion beteiligt. Im Mesoderm von *Drosophila* findet während der Gastrulation ein Umschalten von DE-Cadherin zu DN-Cadherin statt (Oda et al., 1998). Hierbei ist *sna* sowohl an der Reduktion der *DE-Cadherin* Expression, als auch an der Erhöhung der *DN-Cadherin* Expression beteiligt (Abb. 1; Oda et al., 1998).

Homozygote Mutationen in *sna* und *twi* führen zu einer Störung der Internalisierung des Mesoderms. Hierbei bestehen jedoch Unterschiede in den Phänotypen der beiden Mutanten. In *twi*-Mutanten wird zwar kurzzeitig eine ventrale Furche gebildet, diese ist jedoch nur halb so breit wie in Wildtyp-Embryonen. *Sna*-Mutanten zeigen einen stärkeren Phänotyp, da sich bei ihnen keine ventrale Furche bildet, sondern nur unregelmäßige Krümmungen des Epithels entstehen. Doppelmutanten für *twi* und *sna* besitzen den stärksten Phänotyp. Ihr ventrales Epithel ist nicht von dem andere Regionen zu unterscheiden (Leptin and Grunewald, 1990).

In *twi*-Mutanten ist auch die Expression von *sna* reduziert (Leptin, 1991; Ip et al., 1992a). Allerdings kann eine *twi*-unabhängige Expression von *sna* durch ein transgenes Konstrukt erzeugt werden, in dem die kodierende Region von *sna* unter die Kontrolle des *twi*-Promotors gebracht wird, so daß die Transkription nur noch von *dl* abhängig ist. In Doppelmutanten von *twi* und *sna* führt dieses transgene Konstrukt zur Bildung einer ventralen Furche. Folglich ist *sna* in der Abwesenheit des Genproduktes von *twi* hinreichend, Invagination hervorzurufen (Ip et al., 1994). Dieses Ergebnis in Verbindung mit dem Verlust der Invagination in *sna*-Mutanten spricht für eine zentrale Rolle von *sna* bei der Internalisierung des Mesoderms in *Drosophila*.

Bisher ist noch unklar, welche Zielgene von *sna* an der Kontrolle der Invagination beteiligt sind. Jedenfalls ist die Repression der neuroektodermalen Gene *sim* und *rho* nicht für die Bildung der ventralen Furche notwendig, da Invagination auch in der Anwesenheit ihrer Genprodukte stattfinden kann (Ip et al., 1994; Hemavathy et al., 1997).

Das snail-Homolog in *Xenopus* (*Xsna*) besitzt in der Zinkfingerdomäne große Ähnlichkeit zu *Drosophila* snail (Sargent and Bennett, 1990). *Xsna* wird in der frühen Gastrula schwach im Endoderm exprimiert (Abb. 2; Essex et al., 1993). Starke *Xsna*-Expression ist während der Gastrulation in den mesodermalen Zellen zu finden, sobald diese involutieren (Abb. 2; Essex et al., 1993). Mesoderm dessen Involution noch bevorsteht ist dagegen *Xsna*-negativ (Essex et al., 1993). Diese enge Korrelation zwischen *Xsna*-Expression und Involution des Mesoderms läßt auch in *Xenopus* eine wichtige Rolle von snail für die Mesoderminternalisierung vermuten.

Im *Xenopus*-Embryo lassen sich morphogenetische Bewegungen besser untersuchen als in den meisten anderen Modelorganismen. Zur Untersuchung der Funktion eines Gens läßt sich dieses auch leicht überexprimieren oder seine Translation inhibieren. Daher ist der *Xenopus*-Embryo ideal zur Untersuchung von Genen, für die eine Rolle bei morphogenetischen Bewegungen vermutet wird. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion und Regulation des Transkriptionsfaktors *Xsna* während der Gastrulation von *Xenopus laevis* untersucht.

In *Xenopus* liegt das prospektive Mesoderm zu Beginn der Gastrulation ringförmig in der marginalen Zone des Embryos. Es wird animal von prospektivem Ektoderm und vegetal von prospektivem Endoderm begrenzt. Im Gegensatz zu *Drosophila* sind im *Xenopus*-Embryo mehrere morphogenetische Prozesse an den Gewebeumlagerungen während der Gastrulation beteiligt.

Die Epibolie stellt bei *Xenopus* den ersten morphogenetischen Prozeß dar, da sie bereits in der mittleren Blastula beginnt (Keller, 1978; Keller, 1986). Dabei werden die Zellen des Blastocoeldaches über die vegetalen Zellen geschoben. Dieser Prozeß ist erst beendet, wenn zum Gastrulationsende alle vegetalen Zellen vom prospektiven Ektoderm des Blastocoeldaches umschlossen sind (Keller, 1986). Die Oberflächenvergrößerung des Blastocoeldaches wird in den epithelialen Zellen von Abflachung und in den tiefen Zellen von radialer Interkalation begleitet (Keller, 1980; Keller and Winklbauer, 1992).

Das erste äußere Anzeichen der Gastrulation ist die Bildung der Flaschenzellen (Gerhart and Keller, 1986; Keller, 1986). Sie entstehen aus epithelialen Zellen, die ihre apikale Seite kontrahieren und deshalb flaschenförmig erscheinen. Die Kontraktion führt außerdem dazu, daß sich das vorher schwach verteilte Pigment konzentriert und dadurch ein Pigmentstreifen entsteht, der das erste Anzeichen des sich bildenden Blastoporus ist (Keller, 1978; Keller, 1986). Die Entstehung der Flaschenzellen beginnt zunächst dorsal und breitet sich lateral aus bis schließlich die Ventralseite erreicht ist (Hardin and Keller, 1988).

Die Vegetale Rotation ist eine aktive morphogenetische Bewegung der vegetalen Zellmasse. Ein Teilaspekt dieser Rotationsbewegung ist die Blastocoelbodenausdehnung, bei der Zellen der vegetalen Hälfte sich in Richtung des animalen Pols bewegen bis sie den Blastocoelboden erreichen und dort interkalieren (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Im Embryo hat dies zur Folge, daß der expandierende Blastocoelboden an seiner Peripherie an das Blastocoeldach gerollt wird (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Diese Blastocoelbodenapposition ist der zweite Teilaspekt der Vegetalen Rotation. Nachdem Zellen des Blastocoelbodens mit dem Blastocoeldach in Kontakt gekommen sind, mischen sich diese nicht, sondern es findet eine Gewebstrennung statt, die zur Bildung des Brachet'schen Spaltes führt (nach Brachet, 1903).

Nachdem sich der Brachet'sche Spalt gebildet hat, lassen sich folgende Regionen gut abgrenzen. Auf der äußeren Seite des Brachet'schen Spaltes befindet sich das Blastocoeldach (Abb. 3), das an dem vegetalen Ende des Brachet'schen Spaltes in die Blastoporuslippe übergeht, die vegetal bis zu den Flaschenzellen reicht (Abb. 3). Auf der Innenseite des Brachet'schen Spaltes befindet sich bereits internalisiertes Gewebe, wie involutiertes Mesoderm und Endoderm (Abb. 3).

Bei einem weiteren Mechanismus, der Involution, werden Zellen aus einer marginalen Position durch eine Rollbewegung über die Blastoporuslippe in das Innere des Embryos bewegt (Keller, 1986). Um dabei zwei Teilprozesse zu unterscheiden, wurden die Begriffe passive und aktive Involution eingeführt. Unter aktiver Involution versteht man eine aktive Einwärtsbewegung der Zellen durch die

Blastoporuslippe. Da sich die Zellen auf bogenförmigen Bahnen aneinander vorbeibewegen, ist dieser Prozeß vermutlich mit einer Wanderung der einzelnen Zellen verbunden (Ibrahim and Winklbauer, 2001). Unter passiver Involution versteht man die durch die Vegetale Rotation angetriebene Einwärtsrotation der gesamten marginalen Zone, wie sie auch in Gastrulascheibchen beobachtet wird (Ibrahim and Winklbauer, 2001).

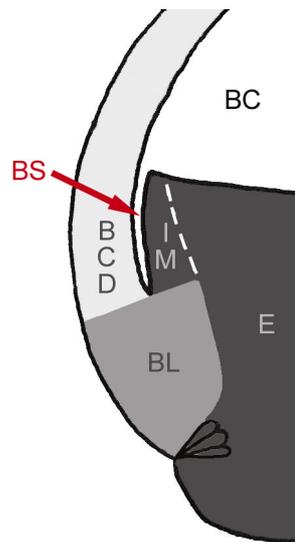


Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Regionen in der *Xenopus*-Gastrula. Das Blastocoeldach ist hellgrau dargestellt, die Blastoporuslippe mittelgrau und internalisiertes Gewebe dunkelgrau. Die Grenze innerhalb des internalisierten Gewebes zwischen dem involutierten Mesoderm und dem Endoderm wird durch eine gestrichelte Linie angezeigt. BC: Blastocoel; BCD: Blastocoeldach; BL: Blastoporuslippe; BS: Brachet'scher Spalt; E: Endoderm; IM: involutierte Mesoderm.

Die durch Involution auf der Innenseite des Brachet'schen Spaltes angekommenen Zellen sind in der Lage, aktiv auf dem Blastocoeldach zu wandern (Winklbauer, 1990). Die Wanderung des Mesoderms bei Amphibien zeigt die folgenden generellen Merkmale: Das Mesoderm wandert als eine mehrschichtige kohärente Zellmasse und nicht als Einzelzellen (Winklbauer et al., 1992). Die Mesodermbewegung findet zielgerichtet von der Blastoporuslippe zum animalen Pol statt (Winklbauer and Nagel, 1991). Die Mesodermzellen wandern auf der extrazellulären Matrix des Blastocoeldaches, die hauptsächlich aus dem

Glykoprotein Fibronectin besteht (Nakatsuji, 1976; Nakatsuji and Johnson, 1983; Nakatsuji et al., 1985).

Fibronectin wird für die Zellwanderung des Mesoderms bei *Xenopus laevis* eine wichtige Rolle zugeschrieben. Die Interaktion von Mesodermzellen mit Fibronectin induziert die Bildung von lamelliformen zytoplasmatischen Fortsätzen, die eine Wanderung der Mesodermzellen auf dem Blastocoeldach ermöglichen (Winklbauer et al., 1991; Winklbauer and Keller, 1996; Winklbauer et al., 1996). Die extrazelluläre Matrix des Blastocoeldaches enthält richtungsweisende Signale, die Mesodermaggregaten auch *in vitro* eine zielgerichtete Wanderung in Richtung animaler Pol erlauben. Die den richtungsweisenden Signalen zugrundeliegende Blastocoeldachpolarität wird in der späten Blastula unter dem Einfluß der vegetalen Hälfte, und hierbei insbesondere durch das Mesoderm, gebildet (Nagel and Winklbauer, 1999). Inhibiert man die Fibrillenbildung bei ungestörter Sekretion von Fibronectin, so können Mesodermaggregate auf dem Substrat noch immer wandern, diese erfolgt jedoch ungerichtet (Winklbauer and Nagel, 1991; Winklbauer et al., 1991; Winklbauer et al., 1996). Das richtungsgebende Signal der Blastocoeldachmatrix ist vermutlich ein Gradient von matrixgebundenem PDGF (platelet-derived growth factor). Hierfür spricht, daß sowohl eine Überexpression einer matrixbindenden Form von PDGF, als auch die Expression eines inhibitorischen PDGFs, sowie die Inhibition des PDGF-Signalweges im wandernden Mesoderm zum Verlust der gerichteten Wanderung führt (Nagel, 2001).

Weitere in der *Xenopus*-Gastrula auftretende morphogenetische Bewegungen sind Konvergenz und Extension. Konvergenz bezeichnet einen Prozeß, bei dem sich Zellen der dorsalen Mittellinie annähern. Vogt bezeichnete diesen Vorgang als Raffung (Vogt, 1929). Extension stellt die Längsstreckung eines Gewebes dar, die Vogt Staffelung und Streckung nannte (Vogt, 1929). Beide Prozesse treten im Embryo gleichzeitig auf, so daß sie auch als konvergente Extension bezeichnet werden. Sie findet im involutierten Mesoderm und Neuralektoderm der Dorsalseite statt (Keller, 1978; Keller and Danilchik, 1988; Keller et al., 1992). Durch die dorsale konvergente Extension kommt es zur Elongation der präsumtiven Chorda (Shih and Keller, 1992). Auf zellulärer Ebene wird die konvergente Extension durch mediolaterale Interkalation verursacht (Keller, 1984; Keller et al., 1989; Keller and

Tibbetts, 1989; Shih and Keller, 1992). Die konvergente Extension ist auch in isolierten Explantaten zu beobachten, da dieser Prozeß gewebsautonom und substrat-unabhängig abläuft (Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; Wilson and Keller, 1991).

Xsna wird während der Gastrulation im Mesoderm und Endoderm exprimiert (Essex et al., 1993). Daher kommt *Xsna* als Kandidat für die Regulation der Involution bzw. damit verbundener Gewebstrennung und der Vegetalen Rotation in Frage. *Xsna*-Expression findet in der frühen Gastrula auch in der präsumtiven Chorda statt. Während ihrer morphogenetischen Bewegung wird *Xsna* dort jedoch nicht mehr exprimiert (Essex et al., 1993), was gegen eine Beteiligung von *Xsna* an der Regulation der konvergenten Extension spricht.

Da *Xsna* während der Gastrulation am stärksten im Mesoderm exprimiert ist (Essex et al., 1993), wird nachfolgend auf einen Prozeß eingegangen, der für die Bildung dieses Keimblattes notwendig ist. Im frühen *Xenopus*-Embryo sind zunächst nur zwei prospektive Keimblätter angelegt. So entwickelt sich aus der animalen Hälfte des Embryos das Ektoderm, wohingegen die vegetale Hälfte präsumtives Endoderm bildet. Das dritte Keimblatt, das Mesoderm, wird erst während des Blastulastadiums durch Interaktionen der beiden anderen Keimblätter induziert (Woodland and Jones, 1987).

Die Induktion des Mesoderms wird durch Signale des Endoderms im Bereich des Ektoderms hervorgerufen (Nieuwkoop, 1969; Nieuwkoop, 1973). Animale Hälften der frühen Blastula von *Xenopus laevis* entwickeln sich in Isolation zu Epidermis, einem ektodermalen Derivat (Gurdon et al., 1985). Durch Kontakt mit einem Explantat vegetaler Zellen wird in der animalen Hälfte die Bildung des Mesoderms induziert (Nieuwkoop, 1973; Dale et al., 1985; Gurdon et al., 1985). Man konnte Vertreter zweier Klassen von sekretierten mesoderminduzierenden Faktoren identifizieren. Hierbei handelt es sich um Mitglieder der TGF- β -Familie („transforming growth factor β “), sowie der FGF-Familie („fibroblast growth factor“).

Zur TGF- β -Familie gehören Activin (Asashima et al., 1990; Smith et al., 1990; Thomson et al., 1990), Vg1 (vegetal 1) (Thomsen and Melton, 1993), *Xenopus nodal*-related 1 - 6 (Xnr1 – Xnr6) (Jones et al., 1995a; Takahashi et al., 2000) und *derrière* (Thomson and Melton, 1993; Jones et al., 1995a; Smith, 1995; Sun et al., 1999).

Durch Inkubation mit Activin, Xnr1, Xnr2, Xnr4 - Xnr6 und einer prozessierten Form von Vg1 kann in der animalen Kappe Mesoderm induziert werden (Smith et al., 1990; van den Eijnden Van Raaij et al., 1990; Dale et al., 1993; Thomsen and Melton, 1993; Kessler and Melton, 1995; Jones et al., 1995a; Joseph and Melton, 1997; Osada and Wright, 1999; Takahashi et al., 2000).

Genetische Untersuchungen bei Maus und Zebrafisch lassen vermuten, daß den *nodal*-Genen eine zentrale Rolle bei der Mesodermbildung zukommt (Zhou et al., 1993; Conlon et al., 1994; Waldtrip et al., 1998; Nomura and Li, 1998; Song et al., 1999; Sampath et al., 1998; Rebagliati et al., 1998b; Feldman et al., 1998; Gritsman et al., 1999).

Es wird angenommen, daß Activin für die Mesoderminduktion im *Xenopus*-Embryo eine untergeordnete Rolle spielt. Grund hierfür ist, daß die Inhibition der Activin-Aktivität durch Follistatin (Activin- und BMP-Inhibitor) keinen Einfluß auf die Mesodermbildung des Embryos hat (Ueno et al., 1987; Nakamura et al., 1990; Schulte-Merker et al., 1994a). Trotzdem lassen sich in der animalen Kappen durch Inkubation mit unterschiedlichen Activin-Konzentrationen verschiedene mesodermale Zelltypen und die Expression verschiedener mesodermspezifischer Gene induzieren, da Activin und nodal vermutlich dieselben Rezeptoren stimulieren (Green and Smith, 1990; Dale et al., 1992; Green et al., 1992; Gurdon et al., 1994; Gurdon et al., 1995; Jones et al., 1995a; Kessler and Melton, 1995; Sun et al., 1999).

Durch niedrige Activin-Konzentrationen werden im ektodermalen Gewebe ventrale mesodermale Zelltypen induziert, als auch posterior und/oder ventral exprimierte Gene, wie *Xenopus brachyury* (*Xbra*), angeschaltet. Hohe Activin-Konzentrationen induzieren dagegen anteriore und/oder dorsale Mesodermstrukturen, als auch dorso-anterior exprimierte Gene, wie *goosecoid* (*gsc*) (Green and Smith, 1990; Cho et al., 1991; Smith et al., 1991; Green et al., 1992; Gurdon et al., 1994; Gurdon et al., 1995).

Neben der TGF- β -Familie sind auch Mitglieder der FGF-Familie Mesoderminduktoren. Basic FGF (bFGF) kommt im Embryo vor und induziert in animalen Kappen Mesoderm (Kimelman and Kirschner, 1987; Slack et al., 1987; Kimelman et al., 1988; Slack et al., 1990). Allerdings können nicht alle mesodermalen Derivate gebildet werden, da nur ventrales und laterales Mesoderm entsteht, jedoch keine Chorda (Kimelman and Kirschner, 1987; Slack et al., 1987; Kimelman and Maas, 1992).

Eine starke Expression von *embryonic FGF* (*eFGF*) entsteht erst im Mesoderm während der Gastrulation (Isaacs et al., 1994). Daher kann eFGF kaum eine wichtige Rolle als Mesoderminduktor besitzen. Allerdings ist es an der Aufrechterhaltung der *Xbra*-Expression beteiligt. Für eFGF wurde gezeigt, daß es *Xbra*, ein Zielgen des FGF-Signalweges, aktiviert (Isaacs et al., 1994). *Xbra* aktiviert wiederum die Expression von *eFGF* (Isaacs et al., 1994; Casey et al., 1998). Diese Regulationsschleife mit eFGF und *Xbra* ist für die Mesodermbildung notwendig (Schulte-Merker and Smith, 1995).

Außer den sekretierten Faktoren der FGF- und TGF- β -Familie spielt der T-Box-Transkriptionsfaktor *VegT* für die Mesoderminduktion eine wichtige Rolle. Seine maternalen Transkripte sind vegetal lokalisiert. Durch Überexpression von *VegT* wird sowohl Endoderm, als auch Mesoderm induziert. Dahingegen besitzen Embryonen, deren *VegT*-Transkripte depletiert wurden, weder Endoderm noch Mesoderm (Lustig et al., 1996b; Stennard et al., 1996; Zhang and King, 1996; Horb and Thomson, 1997; Zhang et al., 1998; Kofron et al., 1999).

Die Untersuchung der Funktion von *snail* könnte durch zwei Dinge kompliziert werden. Einerseits existieren in Vertebraten und Invertebraten zu *snail* nahverwandte Gene mit teilweise redundanter Funktion, andererseits besitzt *snail* auch Aufgaben außerhalb des Mesoderms. Deshalb werden diese Punkte anschließend behandelt.

In *Drosophila* wird *sna* neben der vorher beschriebenen frühen Expression im Mesoderm auch im Neuraektoderm exprimiert und bleibt dort erhalten bis die Neuroblasten vom Neuraektoderm delaminieren. Später in der

Embryonalentwicklung wird *snail* in den Vorläuferzellen einiger Imaginalgewebe exprimiert, darunter die Flügel-Imaginalscheiben (Alberga et al., 1991; Kosman et al., 1991; Leptin, 1991).

In *Drosophila* sind drei zu *snail* nahverwandte Zinkfingerproteine bekannt, die als Mitglieder der Snail-Superfamilie gelten. Hierzu gehören *escargot* (*esg*), *scratch* (*sctr*) und *worniu* (*wor*) (Whiteley et al., 1992; Roark et al., 1995; Ashraf et al., 1999).

Escargot wird im Blastodermstadium im Neuralektoderm exprimiert (Whiteley et al., 1992). In späteren Stadien ist Expression in den Imaginalscheiben für Bein, Flügel, Haltere und der Genitalimaginalscheibe zu finden (Whiteley et al., 1992; Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1996). Außerdem wird *escargot* in den Zellen an der Tracheenspitze exprimiert (Tanaka-Matakatsu et al., 1996).

Escargot wird in den Imaginalscheiben der Larve von *Drosophila* exprimiert und ist dort notwendig zur Aufrechterhaltung des diploiden Zustandes der Zellen. Aus den Imaginalscheiben werden während der Metamorphose die Strukturen der zukünftigen Adultform, dem Imago, gebildet. Anstelle diploid zu bleiben werden in *escargot*-Mutanten einige dieser imaginalen Zellen polyploid. Andererseits führt die Überexpression von *escargot* in den polyploiden Speicheldrüsenzellen von *Drosophila* zu einer Inhibition der Endoreplikation (Replikation ohne anschließende Mitose und Cytokinese) (Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1994).

Zusätzlich spielt *Escargot* noch eine Rolle bei die Bildung der Flügelimaginalscheibe. Diese Funktion ist jedoch redundant mit der von *snail* in diesem Gewebe. Daher bleibt die Bildung der Flügelimaginalscheibe nur in *escargot-snail*-Doppelmutaten aus, jedes der beiden Gene ist aber hinreichend diesen Phänotyp zu retten (Fuse et al., 1996).

In den Zellen der Tracheenspitze wirkt *escargot* aktivierend auf die Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls *DE-Cadherin*. In *escargot*-Mutanten unterbleibt die Fusion von Tracheenzweigen, weil die Tracheenspitzen keinen Kontakt mehr untereinander aufbauen können. Dieser Effekt lässt sich durch eine Hitzeschock-induzierte Überexpression von *DE-Cadherin* aufheben (Tanaka-Matakatsu et al., 1996).

Das Gen *scratch* wird in den meisten delaminierenden Neuroblasten exprimiert und ist an der Regulation der Neuralentwicklung beteiligt. Mutationen im *scratch*-Gen und Doppelmutationen in *snail* und *scratch* führen jedoch zu keinen Defekten im Zentralnervensystem. Eine Doppelmutation von *scratch* und dem panneuralen Gen *deadpan* dagegen bewirken eine signifikanten Verringerung der Neuronenanzahl. Die Hitzeschock-induzierte Überexpression von *scratch* führt zu einer erhöhten Bildung von Neuronen (Roark et al., 1995).

Worniu, das zuletzt gefundene Mitglied der Snail-Superfamilie in *Drosophila*, wird ebenfalls während der Entwicklung des Zentralnervensystems exprimiert (Ashraf et al., 1999). Es liegt auf dem Chromosom zwischen den Genloci von *snail* und *escargot*. Die Deletion eines Fragmentes, das alle drei Gene beinhaltet führt, zu einem Verlust später Marker des Zentralnervensystems, wohingegen frühe Marker nicht betroffen sind. Die transgene Expression jedes der drei Gene allein führt wenigstens zu einer partiellen Rettung des durch die Deletion hervorgerufenen Effektes (Ashraf et al., 1999).

Neben *Xenopus* wurden in den Vertebraten Maus, Zebrafisch, Hühnchen und Mensch jeweils *snail*-Homologe identifiziert (Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Hammerschmidt and Nüsslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995; Issac et al., 1997; Paznekas et al., 1999; Twigg and Wilkie, 1999). Die *snail*-Expression in *Xenopus*, Zebrafisch und Maus findet wie in *Drosophila* in enger Korrelation zur Internalisierung des Mesoderms statt, was eine konservierte Funktion von *snail* bei diesem Prozeß vermuten läßt (Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Essex et al., 1993; Hammerschmidt and Nüsslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995). Für die Maus wurde bereits gezeigt, daß eine Mutation des *snail*-Gens zur Störung der Mesodermzellen beim Übergang von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Charakter führt und so Gastrulationsdefekte hervorruft (Carver et al., 2001).

Wie in *Drosophila*, wird auch in Vertebraten die *snail*-Expression im Neuralektoderm beobachtet, diese ist jedoch nur auf die Neuralleisten begrenzt. Bei dem Auswandern der Neuralleistenzellen machen auch sie einen Übergang von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Charakter durch (Nieto et al., 1992; Smith et al., 1992; Essex

et al., 1993; Hammerschmidt and Nüsslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993; Thisse et al., 1995).

Eine weitere Parallele zwischen *Drosophila* und Vertebraten besteht darin, daß das snail-Homolog von Maus und Mensch die Transkription des jeweiligen *E-Cadherins* reprimiert (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Carver et al., 2001). Dies findet durch eine direkte Bindung von snail an den *E-Cadherin*-Promotor statt (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000). Außerhalb der Embryonalentwicklung wurde das snail-Protein in invasiven Karzinom-Zelllinien und Tumoren von Maus und Mensch gefunden, die die Gemeinsamkeit besitzen, *E-Cadherin* nicht mehr zu exprimieren. Diese invasiven Zellen machen ebenfalls einen Übergang von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Charakter durch (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Poser et al., 2001; Tan et al., 2001).

Eine besondere Funktion übernimmt das snail-Homolog im Hühnchen (cSnR). Es wird dort nach einer kurzen beidseitigen Expression später nur noch im Seitenplattenmesoderm der rechten Seite exprimiert. Ein Ausschalten der rechtsseitigen Expression führt zu deutlichen Effekten auf die Orientierung des Herzsitus (Issac et al., 1997). Demzufolge spielt snail im Hühnchen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie. Auch in der Maus wird das *snail*-Homolog nach einer anfangs beidseitigen Expression schließlich nur im rechten Seitenplattenmesoderm exprimiert (Sefton et al., 1998), was auch eine Beteiligung von snail an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie der Maus vermuten läßt.

Neben den *snail*-Genen wurden in allen bisher untersuchten Vertebraten (außer den Fischen *Takifugu rubripes* und Zebrafisch) das zu snail verwandte Zinkfingerprotein slug gefunden (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 1995; Savagner et al., 1997; Cohen et al., 1998; Sefton et al., 1998). Es wird angenommen, daß in Vertebraten die Duplikation eines gemeinsamen Vorfahrengenes stattgefunden hat, durch die *snail* und *slug* hervorgegangen sind (Sefton et al., 1998; Hemavathy et al., 2000; Manzanares et al., 2001). Die Gruppe der *slug*-Gene besitzt außerhalb und innerhalb der Zinkfingerregion für *slug* charakteristische Domänen, die sie von den *snail*-Genen unterscheidet (Sefton et al., 1998; Manzanares et al., 2001). Die Expression beider Gruppen zeigt Ähnlichkeiten, da auch die *slug*-Homologe im Mesoderm und den Neuralleisten exprimiert werden (Nieto et al., 1994; Mayor et al., 1995; Sefton et

al., 1998; Mayor et al., 2000). Interessanterweise erscheint im Hühnchen die Expression von *snail* und *slug* umgekehrt, verglichen mit den Expressionsmustern der beiden Gene in der Maus (Sefton et al., 1998). Die Summe der Expressionsdomänen von *snail* und *slug* ist in Vertebraten stark konserviert (Sefton et al., 1998).

Im Hühnchen ist *slug* für den Übergang wandernder Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Charakter notwendig. Ein Ausfall des Genproduktes führt zur Störung der Mesoderm- und Neuralleistenzellwanderung (Nieto et al., 1994). Dahingegen zeigen Mutationen des *slug*-Genes der Maus keine Störung der Mesoderminternalisierung und der Neuralleistenzellbildung und -wanderung (Jiang et al., 1998). In der Maus ist *slug* jedoch an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion in Epithelzellen beteiligt, da es die Dissoziation von Desmosomen verbunden mit einem Verschwinden des Desmosomen-spezifischen Cadherins Desmoglein bewirkt (Savagner et al., 1997). In *Xenopus* ist *slug* in einer frühen Phase für die Bildung und in einer späteren für die Wanderung der Neuralleistenzellen notwendig (Carl et al., 1999; LaBonne and Bronner-Fraser, 2000). In den Neuralleistenzellen von *Xenopus* besteht außerdem funktionelle Redundanz zwischen *snail* und *slug* (Carl et al., 1999).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Mitglieder der Snail-Superfamilie wichtige Funktionen während mehrerer Phasen der Embryonalentwicklung übernehmen, innerhalb einer Spezies kann jedoch funktionelle Redundanz der Mitglieder bestehen. So ist *snail* zusammen mit den Mitgliedern seiner Familie an der Kontrolle morphogenetischer Bewegungen des Mesoderms und der Neuralleistenzellen beteiligt. Außerdem spielen die Mitglieder der Snail-Superfamilie eine wichtige Rolle für die Regulation der Zell-Zell-Adhäsion. In Vertebraten ist *snail* an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie der Organe beteiligt.

Über die Funktion und Regulation von *snail* in *Xenopus* ist sehr wenig bekannt. In Anbetracht der engen Korrelation zwischen seiner Expression und Mesoderminternalisierung und den weiteren wichtigen Funktionen, die dieses Gen in anderen Organismen spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion und Regulation von *Xsna* während der Embryonalentwicklung untersucht.

2. Ergebnisse

Snail spielt in *Drosophila* eine wichtige Rolle für die Internalisierung des Mesoderms. In *Xenopus* besteht eine Korrelation zwischen der Involution der Zellen und der Expression des *snail*-Homologs (Essex et al., 1993). Daher war zu vermuten, daß auch Xsna eine Rolle bei der Mesoderminternalisierung in *Xenopus* spielt, was in dieser Arbeit untersucht wurde. Da die Internalisierung des Mesoderms in *Xenopus* kaum verstanden ist, wurde aber zunächst dieser Prozeß untersucht. Die Dorsalseite des Embryos stellt hierbei einen Sonderfall dar. Deshalb wurde die Ventralseite erforscht, um den generellen Mechanismus der Mesoderminternalisierung zu verstehen. Anschließend wurde die Funktion von Xsna bei Gewebstrennung, der Vegetalen Rotation, Genexpressionskontrolle und Achsenbildung, als auch der Links-Rechts-Asymmetrie untersucht.

2.1. Internalisierung des Mesoderms auf der Ventralseite

Es ist sinnvoll Regionen im Embryo zu definieren, die an der Involutionbewegung des Mesoderms beteiligt sind. Wie sich im nächsten Abschnitt zeigen wird, bietet es sich an, hierzu die Expression des posterioren Mesodermmarkers *Xbra* mit einzubeziehen.

2.1.1. Expression des posterioren Mesodermmarkers *Xbra* als Grundlage für eine räumliche Unterteilung der an der Involutionbewegung beteiligten Regionen

Zur Verdeutlichung der genauen Lage der *Xbra*-Expression wurde bei einigen Embryonen das Blastocoeldach weggeklappt, wodurch die Form der Gastrula etwas

verzerrt wurde. Deshalb wird die *Xbra*-Expression neben den Präparaten (Abb. 4A-G) auch in einem Schema dargestellt (Abb. 4H).

Zu Beginn der Gastrulation (Stadium 10) entstehen dorsal Flaschenzellen, die das erste äußere Anzeichen des sich bildenden Blastoporus sind (Abb. 4A). In diesem Stadium hat sich noch kein Brachet'scher Spalt gebildet, der das Blastocoeldach von involutiertem Mesoderm und Endoderm trennt. Der periphere Rand des Blastocoelbodens ist in Abbildung 4A dorsal und ventral mit (x) gekennzeichnet.

Auf der dorsalen Seite liegt die *Xbra*-Expressionsdomäne unmittelbar unterhalb der Ebene des Blastocoelbodens in der marginalen Zone. Diese Markierung erstreckt sich jedoch nicht bis zum sich bildenden Blastoporus, so daß animal von ihm ein Bereich nicht exprimierender Zellen zu erkennen ist (Abb. 4A).

Auf der Ventralseite exprimieren sowohl Zellen der marginalen Zone als auch überraschenderweise des peripheren Blastocoelbodens das Gen *Xbra* (Abb. 4A).

In der mittleren Gastrula (Stadium 10,5) bilden sich auch auf der ventralen Seite Flaschenzellen, die erkennen lassen, wo hier der Blastoporus gebildet wird (Abb. 4B, C). Dorsal als auch ventral ist der Brachet'sche Spalt durch die Vegetale Rotation entstanden. Diese Gastrulationsbewegung bewirkt, daß die Zellen des peripheren Blastocoelbodens an das Blastocoeldach gerollt werden (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Zur besseren Unterscheidung des Blastocoeldaches, der Blastoporuslippe und des involutierten Mesoderms wurde das Blastocoeldach ventral (Abb. 4B) und dorsal (Abb. 4C, D) bis zum vegetalen Ende des Brachet'schen Spaltes weggeklappt (siehe auch Abb. 3).

Ventral ist *Xbra* um das vegetale Ende des Brachet'schen Spaltes herum exprimiert. (Abb. 4B). Ein kleiner Bereich der ventral bereits involutierten Zellen exprimiert *Xbra*. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um frühere Zellen des ventralen peripheren Blastocoelbodens, die schon zu Beginn der Gastrulation *Xbra* transkribierten (Abb. 4A) und durch die Vegetale Rotation an das Blastocoeldach gerollt wurden. Im Gegensatz zu ventral ist dorsal keine Markierung im involutierten Bereich vorhanden (Abb. 4C).

Eine Gemeinsamkeit der dorsalen und ventralen Seite besteht darin, daß *Xbra* jeweils in dem oberen Teil der Blastoporuslippe exprimiert wird, jedoch nicht im unteren (Abb. 4B, C). So ist eine deutliche Lücke der Expression zu den

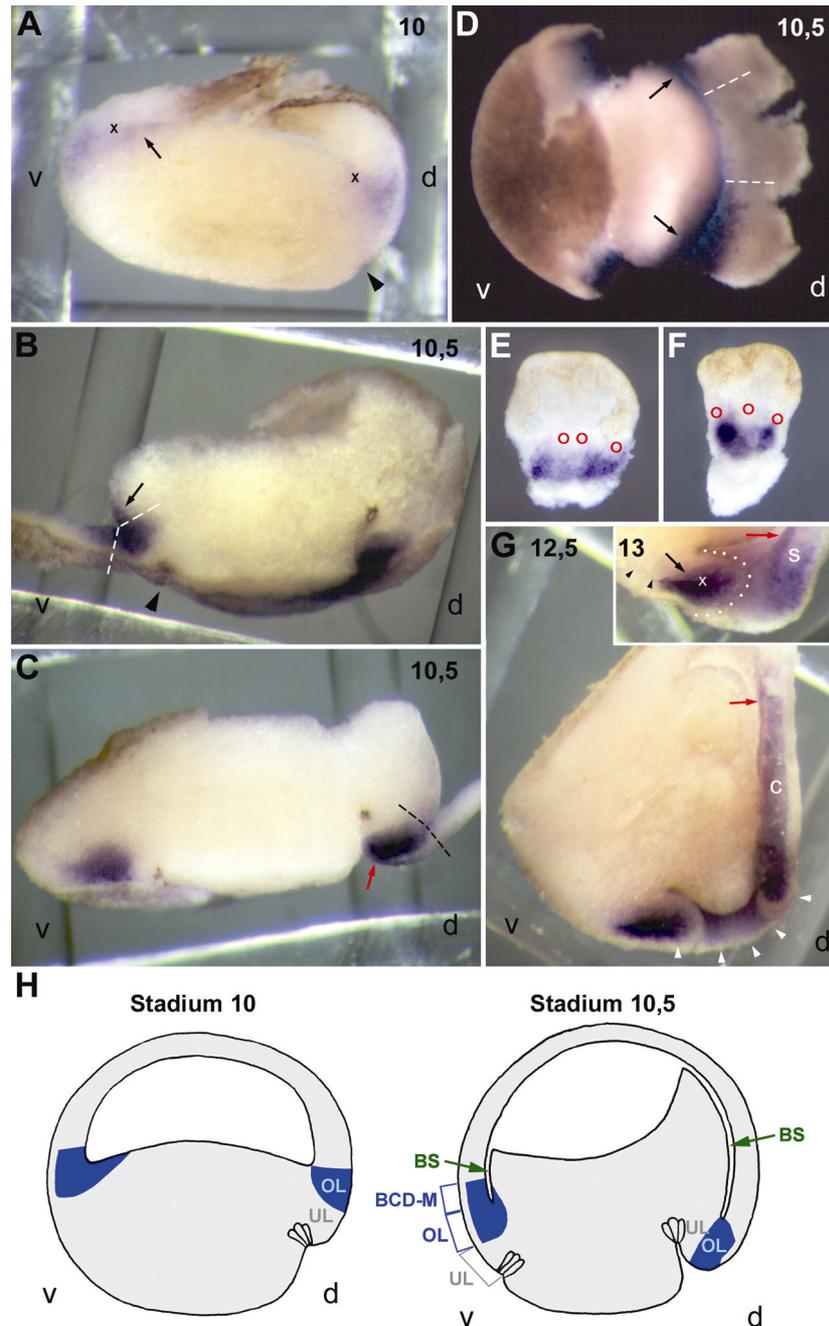


Abb. 4: Die *Xbra*-Expression während der Gastrulation.

A-C: Embryonen ohne (A) und mit weggeklapptem Blastocoeldach (B, C) wurden im angegebenen Stadium fixiert, *in situ* hybridisiert und sagittal halbiert. Animal ist oben, ventral ist links. Das vegetale Ende des Brachet'schen Spaltes in (B, C) wird mit einer gestrichelten Linie angezeigt. Das prospektive Ende des Brachet'schen Spaltes (Ecke zwischen Blastocoelboden und Blastocoeldach) in (A) wird mit (x) gekennzeichnet. Die *Xbra*-Expression im Blastocoelboden (A) bzw. im involutierten Mesoderm (B) wird angezeigt (schwarzer Pfeil). Große schwarze Pfeilspitze: Blastoporus; roter Pfeil: *Xbra*-Expression in der epithelialen Schicht; d: dorsal; v: ventral.

D: Embryonen mit dorsal weggeklapptem Blastocoeldach wurden im angegebenen Stadium fixiert, *in situ* hybridisiert und mit Blick auf den animalen Pol betrachtet. Ventral ist links. Zwischen den beiden gestrichelten Linien ist ein *Xbra*-negativer Sektor im dorsalen

Blastocoeldach; schwarzer Pfeil: *Xbra*-Expression im involutierten Mesoderm; d: dorsal; v: ventral.

E, F: Explantate der dorsalen Blastoporuslippe mit angrenzendem Blastocoeldach wurden im Stadium 10 herausgeschnitten und anschließend die Grenze zwischen Lippe und Blastocoeldach mit Nilblausulfatkristallen markiert. Nach 5 (E) oder 8 (F) Stunden Kultivierung wurden die Explantate fixiert und mit der *Xbra*-Sonde hybridisiert. Weil der Farbstoff nicht fixierbar war, wurden die Explantate vor der Fixierung aufgenommen und die Position der Farbmarken (rote Kreise) auf die dargestellten Fotos übertragen.

G: Embryonen wurden im angegebenen Stadium fixiert, *in situ* hybridisiert und sagittal (großes Bild) oder parasagittal (kleines Bild rechts oben) halbiert. Das kleine Bild rechts oben zeigt eine Lippenregion nach Blastoporuschluß. Animal ist oben, ventral ist links. Weiße Pfeilspitzen: Circumblastoporaler Kragen; kleine schwarze Pfeilspitzen: Brachet'scher Spalt; schwarzer Pfeil: *Xbra*-Expression im involutierten Mesoderm; roter Pfeil: *Xbra*-Expression in der epithelialen Schicht; (x): vegetales Ende des Brachet'schen Spaltes; c: Chorda; d: dorsal; s: Somiten; v: ventral.

H: Zusammenfassendes Schema der *Xbra*-Expression für Stadium 10 und 10,5. Zur Vereinfachung wurde die Grenze zwischen epithelialer Schicht und inneren Zellen nicht eingezeichnet. Animal ist oben, ventral ist links. Blaue Fläche: *Xbra*-Expression; BCD-M: Blastocoeldachmesoderm; BS: Brachet'scher Spalt; d: dorsal; OL: Oberlippe; UL: Unterlippe; v: ventral.

Alle Teilabbildungen außer (D) und (H) stammen aus meiner Diplomarbeit (Ibrahim, 1997).

Flaschenzellen erkennbar, die sich ventral noch an der Oberfläche des Embryos befinden, sich aber dorsal bereits mit der Bildung des Archenterons nach innen verlagert haben und sich jetzt an dessen Spitze befinden.

Schließlich wird *Xbra* ventral im vegetalen Rand des Blastocoeldaches exprimiert. Im Gegensatz dazu scheint das dorsale Blastocoeldach keine Markierung aufzuweisen (Abb. 4B, C). Dieser *Xbra*-negative Sektor im Blastocoeldach der Dorsalseite beträgt nur etwa 45° (Abb. 4D), so daß im gesamten Embryo der überwiegende Teil des Blastocoeldaches an seinem vegetalen Rand eine *Xbra*-Expressionsdomäne besitzt.

Die Tatsache, daß der posteriore Mesodermmarker *Xbra* nicht im dorsalen Blastocoeldach exprimiert wird, ist insofern erstaunlich, als es den vielzitierten Anlageplänen für *Xenopus* widerspricht. Nach diesen reicht das Mesoderm auch dorsal bis in das Blastocoeldach der frühen Gastrula herein (Keller, 1976; Keller, 1991). Es ist allerdings durch das gezeigte Expressionsmuster noch nicht auszuschließen, daß die vegetalsten Zellen des dorsalen Blastocoeldaches der frühen Gastrula Mesoderm bilden und auch den posterioren Mesodermmarker *Xbra* exprimieren. Wenn diese Zellen während der Involutionbewegung erst dann *Xbra* anschalten, sobald sie das Blastocoeldach verlassen und in die Blastoporuslippe

gelangen, würde die Expression scheinbar nie in Blastocoeldachzellen stattfinden. Man würde aber in Explantaten, die man für die Dauer der Gastrulation kultiviert, erwarten, daß sich die *Xbra*-Expression bis in das Blastocoeldach ausbreitet.

Deshalb wurden Explantate der dorsalen marginalen Zone unmittelbar nach Gastrulationsbeginn (frühes Stadium 10) isoliert, welche die komplette Blastoporuslippe und das angrenzende Blastocoeldach beinhalteten. Die Grenze zwischen Lippe und Blastocoeldach wurde unmittelbar nach dem Herausschneiden mit einem Vitalfarbstoff markiert. Nach der Kultivierung wurde eine *in situ* Hybridisierung zum Nachweis der *Xbra*-Transkripte durchgeführt. Da der Vitalfarbstoff nicht fixierbar war, wurden die Farbmarken als rote Kreise in Fotos der Explantate (Abb. 4E, F) übertragen. Explantate, die kultiviert wurden bis Kontrollembryonen das späte Gastrulastadium (Stadium 12,5; Abb. 4E) bzw. das frühe Neurulastadium (Stadium 14; Abb. 4F) erreicht hatten, zeigen immer noch eine Zweiteilung der Lippenregion. Der obere Teil der Lippe (unterhalb der roten Kreise) exprimiert immer noch *Xbra*, wohingegen der untere Teil der Lippe keine Transkripte des Mesodermmarkers erkennen läßt. Außerdem gab es keine Ausbreitung der Expression über die Lippengrenze des Stadiums 10 in das Blastocoeldach (oberhalb der roten Kreise) hinein. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Grenze der dorsalen Blastoporuslippe bereits im frühen Gastrulastadium das posteriore Ende des Mesoderms markiert. Demzufolge würde das Blastocoeldach der dorsalen Seite dieses Stadiums nicht zum Mesoderm beitragen.

In der späten Gastrula (Stadium 12,5-13) hat sich der Blastoporus weitestgehend geschlossen, so daß das Endoderm bereits seine Position im Innersten des Embryos eingenommen hat. Auch nahezu das gesamte Mesoderm ist aus seiner ursprünglichen marginalen Position in das Innere des Embryos gelangt und liegt nun zwischen Endoderm und Ektoderm.

Abbildung 4G zeigt ein solch spätes Gastrulastadium. Deutlich ist auf der Dorsalseite die präsumtive Chorda zu erkennen, deren Zellen immer noch *Xbra*-positiv sind. Hierin bildet die Chorda eine Ausnahme zum restlichen involutierten Mesoderm, da sonst kurz nach der Involution die Expression von *Xbra* abgeschaltet wird (Essex et al., 1993). Dies ist z.B. im Bereich der posterioren Somiten zu erkennen (Abb. 4G kleines Bild). Auf der Ventralseite ist die Lücke zwischen *Xbra*-Expressionsdomäne und Blastoporuslippe verschwunden (Abb. 4G, G kleines Bild). Ansonsten hat sich

das *Xbra*-Expressionsmuster nicht grundlegend verändert. Man findet immer noch Markierung in einem kleinen Bereich des gerade involutierten Mesoderms, in der Blastoporuslippe und im vegetalen Bereich des Blastocoeldaches (Abb. G, G kleines Bild).

Bislang wurde nur das Expressionsmuster der inneren Zellen beschrieben. Allerdings kann auch ein Unterschied der *Xbra*-Expression in den epithelialen Zellen der Dorsal- und Ventralseite beobachtet werden. So wird *Xbra* nicht ventral sondern nur dorsal in der epithelialen Schicht exprimiert (Abb. 4B, C), die nach Ende der Gastrulation das Archenterondach bildet und noch *Xbra*-positiv ist (Abb. 4G).

Zusammenfassend läßt sich für die *Xbra*-Expression folgendes feststellen:

Das Gen *Xbra* wird in der ventralen und dorsalen Blastoporuslippe exprimiert, und auf beiden Seiten des Embryos findet man die Transkripte nur im oberen Teil der Lippe.

Ventral wird der posteriore Mesodermmarker *Xbra* bis zum Ende der Gastrulation in einem Teil des Blastocoeldaches exprimiert. Im Gegensatz dazu kann man ab dem frühen Gastrulastadium keine Markierung im dorsalen Blastocoeldach erkennen. Es findet in Explantaten auch keine Ausbreitung der Expression in diese Region hinein statt.

Ventral aber nicht dorsal ist eine deutliche Markierung in einem kleinen Teil des involutierten Mesoderms zu erkennen. Als Ausnahme hierzu exprimieren die Zellen der sich dorsal bildenden Chorda bis nach der Gastrulation *Xbra* (Smith et al., 1991; Essex et al., 1993).

Eine Markierung der epithelialen Zellschicht ist nur auf der Dorsalseite zu beobachten.

2.1.2. Entwicklung isolierter Explantate des vegetalen Blastocoeldachrandes

Das Expressionsmuster des posterioren Mesodermmarkers *Xbra* läßt vermuten, daß der ventrale, aber nicht der dorsale Teil des Blastocoeldaches zum Mesoderm beiträgt. Deshalb wurde anhand kultivierter Explantate diese Fragestellung untersucht.

Es wurden ventrale Explantate aus *Xbra*-positivem Blastocoeldach (unmittelbar oberhalb der Blastoporuslippe) und einem ebenso großen Stück des angrenzenden *Xbra*-negativen Blastocoeldaches isoliert. Nach Kultivierung entwickeln sich diese zu einer glatten bläschenartigen Struktur (Abb. 5A), bestehend aus typischer Epidermis und Mesenchym. Die Bildung eines solchen Bläschens läßt also auf das Vorhandensein von Mesoderm im ventralen Blastocoeldach schließen.

Wird zur Kontrolle ein ebenso großes Stück des ventralen Blastocoeldaches oberhalb der *Xbra*-Expressionsdomäne isoliert, so bildet sich kein Bläschen, sondern das Explantat besitzt eine kompakte Form mit runzeliger Oberfläche (Abb. 5B). Es ist atypische Epidermis entstanden, der das Mesoderm zur Bildung eines glatten Bläschens fehlt. Der morphologische Unterschied zwischen den zwei Typen ventraler Explantate (Abb. 5A, B) läßt den Schluß zu, daß das *Xbra*-positive Blastocoeldach prospektives Mesoderm beinhaltet, daß für die Bildung des Bläschens in Abbildung 5A verantwortlich ist.

Dorsales Mesoderm bildet in Isolation kein Bläschen, sondern zeigt nach Kultivierung eine deutliche Elongation (Abb. 5C). Die Explantate bestanden aus der dorsalen Blastoporuslippe und angrenzendem Blastocoeldach. Die Elongation der Explantate ist darauf zurückzuführen, daß die Zellen der dorsalen Blastoporuslippe der frühen Gastrula später die Chorda bilden (Keller, 1976) und dabei der Prozeß der konvergenten Extension stattfindet (Vogt, 1929). Da dieser Vorgang gewebsautonom und substrat-unabhängig abläuft (Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988) wird er erwartungsgemäß auch in isolierten Explantaten beobachtet (Abb. 5C; Wilson and Keller, 1991).

Schließlich werden dorsale Explantate isoliert, welche nicht die Blastoporuslippe enthalten, sondern nur das *Xbra*-negative dorsale Blastocoeldach unmittelbar oberhalb der Lippe. Nach der Kultivierung hat sich weder ein Bläschen gebildet, noch

ist das Explantat deutlich elongiert (Abb. 5D). Auffällig ist jedoch, daß Haftdrüsen zu erkennen sind.

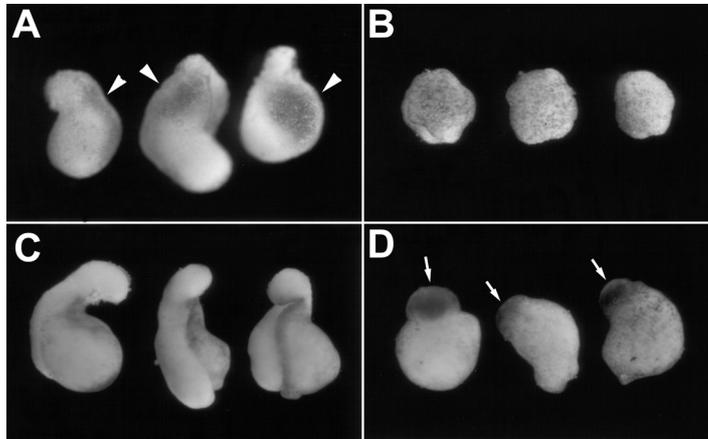


Abb. 5: Entwicklung isolierter Explantate des vegetalen Blastocoeldaches.

Die Explantate wurden in der mittleren Gastrula (Stadium 10,5; A, B) oder frühen Gastrula (Stadium 10; C, D) isoliert und für 3 Tage kultiviert. (A) ventrales Explantat bestehend aus Blastocoeldach unmittelbar oberhalb der Blastoporuslippe. (B) ventrales Explantat bestehend aus Blastocoeldach etwa oberhalb der *Xbra*-Expression. (C) dorsales Explantat bestehend aus Blastoporuslippe und angrenzendem Blastocoeldach. (D) dorsales Explantat bestehend aus Blastocoeldach unmittelbar oberhalb der Blastoporuslippe. Pfeil: Haftdrüse; Pfeilspitze: Bläschen.

Der vegetale Rand des ventralen Blastocoeldaches exprimiert also den posterioren Mesodermmarker *Xbra* (Abb. 4B). Außerdem zeigt Abbildung 5A, daß diese Region in Isolation Mesoderm bildet. Dieser prospektiv mesodermale Bereich des Blastocoeldaches wird fortan als **Blastocoeldachmesoderm** bezeichnet. Es ist davon auszugehen, daß auch lateral Blastocoeldachmesoderm existiert, da auch hier *Xbra* im Blastocoeldach exprimiert wird.

Vieles spricht aber dafür, daß auf der Dorsalseite der frühen Gastrula kein Blastocoeldachmesoderm vorhanden ist. So wird *Xbra* nicht im dorsalen Blastocoeldach exprimiert und breitet sich auch nicht in diesen Bereich aus (Abb. 4). In Isolation zeigt diese Region keine Anzeichen von Mesodermbildung des dorsalen (konvergente Extension) oder ventralen (Mesenchymbildung) Typs (Abb. 5). Da die Bildung der Haftdrüse mit der Neuralinduktion korreliert (Sive et al., 1989), lassen sich vielmehr Anzeichen von Neuralinduktion erkennen. Schließlich konnte mit Hilfe homotoper Transplantate gezeigt werden, daß der vegetalste Teil des dorsalen

Blastocoeldaches der frühen Gastrula nach Ende der Gastrulation nicht involutiert ist (Winklbauer and Schürfeld, 1999).

So scheint die Dorsalseite des Embryos in Hinblick auf die Abwesenheit des Blastocoeldachmesoderms ein Sonderfall zu sein. Eine weitere Besonderheit der Dorsalseite besteht darin, daß ausschließlich hier konvergente Extension stattfindet.

Um den generellen Mechanismus der Mesoderminternalisierung ungestört von konvergenter Extension erforschen zu können, wird nachfolgend nur die Internalisierung des Mesoderms der Ventralseite untersucht.

Basierend auf dem *Xbra*-Expressionsmuster werden dabei folgende Regionen auf der Ventralseite definiert (siehe Abb. 4H). Die Blastoporuslippe ist zweigeteilt und besteht aus der *Xbra*-negativen **Unterlippe** und der *Xbra*-positiven **Oberlippe**. Daran schließt sich animal das *Xbra*-positive **Blastocoeldachmesoderm** an, gefolgt von *Xbra*-negativem **Blastocoeldachektoderm**.

Die Begriffe Oberlippe und Unterlippe werden in der Literatur auch als Synonym verwendet für dorsale bzw. ventrale Blastoporuslippe (z. B. Spemann, 1938; Lane and Smith, 1999). In dieser Arbeit werden die Begriffe Ober- und Unterlippe jedoch nur verwendet, um die Zweiteilung der Blastoporuslippe in einen animalen und vegetalen Teil zu verdeutlichen.

2.1.3. Detaillierter Anlageplan der ventralen Lippenregion

Um die Internalisierung der oben definierten Regionen und deren weiteres Schicksal zu verfolgen, wurden die inneren Zellen nach dem Erscheinen der Flaschenzellen (Stadium 10,5) mit dem Vitalfarbstoff Dil markiert. Hierzu wurde ein Schlitz in die epitheliale Schicht gemacht, so daß die darunterliegenden inneren Zellen bis zur anschließenden Wundheilung für den Farbstoff zugänglich waren. Die epithelialen Zellen an der Schnittkante wurden zwangsläufig mitmarkiert.

Zunächst wurde die *Xbra*-negative Unterlippe gefärbt. Embryonen, die unmittelbar nach dem Setzen der Farbmarke fixiert wurden zeigen eine rundliche Markierung in dieser Region (Abb. 6A). Anderthalb Stunden später, jedoch noch bevor sich ventral

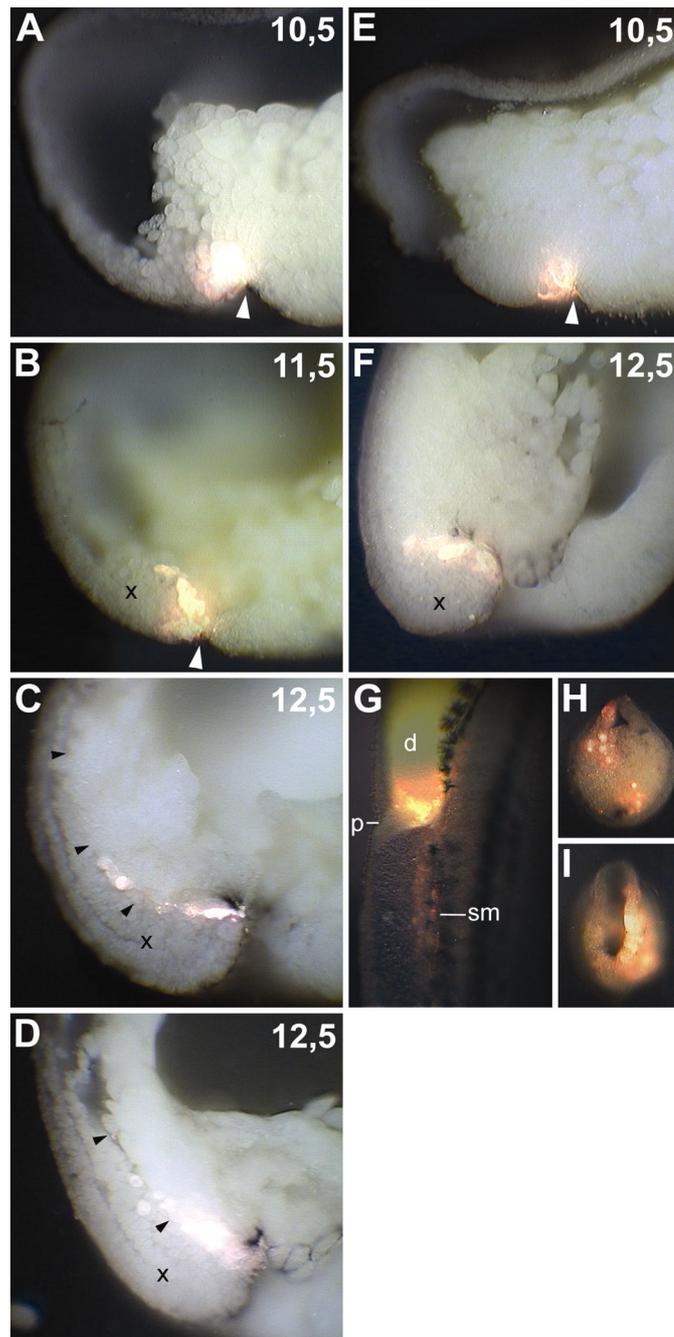


Abb. 6: Bewegung und Schicksal der ventralen Unterlippe.

A-F: Die inneren Zellen der Unterlippe wurden im Stadium 10,5 markiert und die Embryonen im angegebenen Gastrulastadium fixiert. Das Fluoreszenzbild der markierten Zellen wurde mit der Auflichtaufnahme überlagert. Ventral ist links, animal ist oben. Weiße Pfeilspitze: Blastoporus; schwarze Pfeilspitze: Meso-Endodermaler Spalt; (x): Ende des Brachet'schen Spaltes.

G-I: Die Markierung erfolgte wie bei (A-F), die Embryonen wurden aber erst im Kaulquappenstadium fixiert. Das Fluoreszenzbild der markierten Zellen wurde mit der Auflichtaufnahme überlagert. (G) ist ein Ausschnitt um die posteriore Darmregion einer Kaulquappe herum (ventral ist links, anterior ist oben). (H, I) sind Querschnitte durch deren Darm. d: Darm; p: Proctodaeum; sm: Somitenmuskulatur.

das Archenteron bildet, hat sich die Form der Markierung verändert. Mittlerweile erscheint sie langgestreckt (Abb. 6B). Diese Streckung verstärkt sich noch deutlich bis zum Ende der Gastrulation, so daß die markierten Zellen von der Spitze des Archenterons, teilweise aufgereiht wie die Perlen einer Kette, nach animal zeigen (Abb. 6C). In diesem Stadium hat bereits die Delamination von Mesoderm und Endoderm stattgefunden (Nieuwkoop and Faber, 1967). Die beiden Keimblätter werden durch den **Meso-Endodermalen Spalt** getrennt, der in Abbildung 6D eindeutig zu erkennen ist. Erstaunlicherweise sind die meisten markierten Zellen der früheren Unterlippe im endodermalen Teil zu finden (Abb. 6C, D). Nur vereinzelt befinden sich markierte Zellen im mesodermalen Teil (Abb. 6D). Dieses Ergebnis ist unerwartet, da nach den vielzitierten Anlageplänen für *Xenopus* die gesamte ventrale Lippe zum Mesoderm beiträgt (Keller, 1976; Keller, 1991).

Werden nur Flaschenzellen markiert (Abb. 6E), so bleiben sie bis zum Ende der Gastrulation an der Spitze des Archenterons (Abb. 6F).

Zur Bestätigung, daß die ventrale Unterlippe aus prospektivem Endoderm besteht, wurden entsprechend markierte Embryonen bis zum Kaulquappenstadium kultiviert. Vereinzelt ist eine Markierung in Muskelzellen erkennbar, das stärkste Signal ist aber im posterioren Teil der Darmes zu finden (Abb. 6G). Querschnitte des Darmes zeigen, daß die Markierungen verstreut in der massiven Wand des Darmes zu finden sind (Abb. 6H), als auch weiter posterior im bereits differenzierten Darmepithel (Abb. 6I).

Als nächstes wurden die Zellen der *Xbra*-positiven Oberlippe verfolgt. Auch hier erkennt man anfangs eine rundliche Markierung (Abb. 7A), die ebenso nach anderthalb Stunden beginnt sich in die Länge zu strecken (Abb. 7B). Demzufolge ist die gesamte ventrale Lippe schon vor der Bildung des Archenterons an einer Einwärtsbewegung der Zellen beteiligt. Gegen Ende der Gastrulation ist auch die Markierung der Oberlippe langgestreckt und läuft bogenförmig aus der Lippe in die Region zwischen Brachet'schen Spalt und Endo-Mesodermalen Spalt, um sich dem Blastocoeldach anzunähern (Abb. 7C). Folglich sind die markierten Oberlippenzellen, die während der Involution die Lippe verlassen im Bereich des Mesoderms zu finden. Daß die ventralen Oberlippenzellen ein mesodermales Schicksal einnehmen, bestätigt sich auch bei der Betrachtung von markierten Embryonen, die bis zum Kaulquappenstadium kultiviert wurden. Hier kann man gefärbte Zellen im

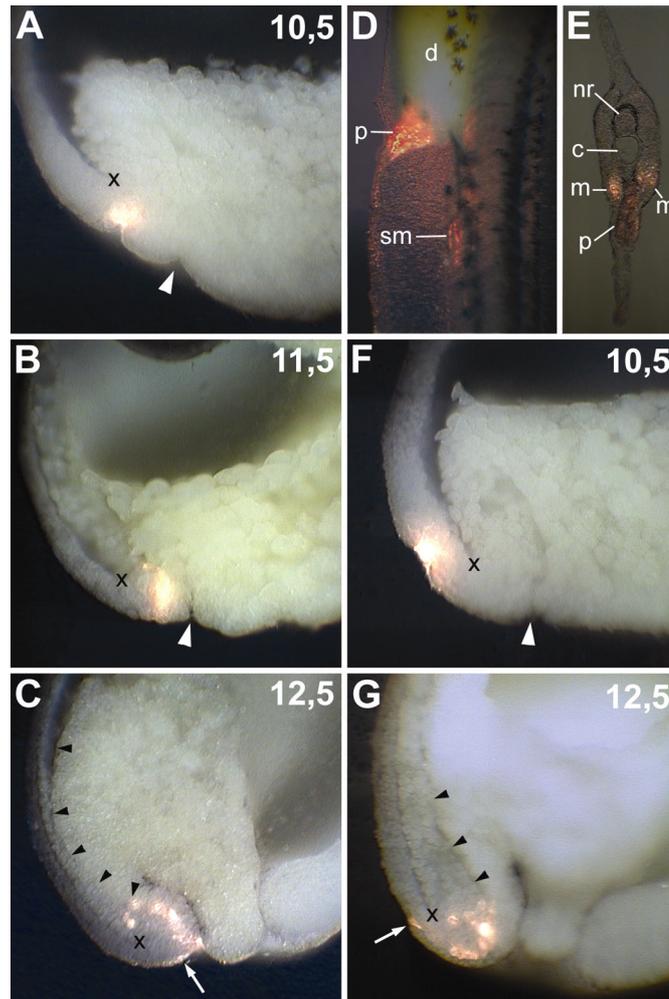


Abb. 7: Bewegung und Schicksal der ventralen Oberlippe und des Blastocoeldachmesoderms.

A-C: Die inneren Zellen der Oberlippe wurden im Stadium 10,5 markiert und die Embryonen im angegebenen Gastrulastadium fixiert. Das Fluoreszenzbild der markierten Zellen wurde mit der Auflichtaufnahme überlagert. Ventral ist links, animal ist oben. Weiße Pfeilspitze: Blastoporus; schwarze Pfeilspitze: Meso-Endodermaler Spalt; weißer Pfeil: markierte Zellen der epithelialen Schicht; (x): Ende des Brachet'schen Spaltes.

D, E: Die Markierung erfolgte wie bei (A-C), die Embryonen wurden aber erst im Kaulquappenstadium fixiert. Das Fluoreszenzbild der markierten Zellen wurde mit der Auflichtaufnahme überlagert. (D) ist ein Ausschnitt um die posteriore Darmregion einer Kaulquappe herum (ventral ist links, anterior ist oben). (E) ist ein Querschnitt auf Höhe des Proctodaeums (dorsal ist oben). c: Chorda; d: Darm; m: Mesoderm in der Nähe des Proctodaeums; nr: Neuralrohr; p: Proctodaeum; sm: Somitenmuskulatur.

F, G: Die inneren Zellen des Blastocoeldachmesoderms wurden im Stadium 10,5 markiert und die Embryonen im angegebenen Gastrulastadium fixiert. Sonst ist alles wie bei (A-C) beschrieben.

Proctodaeum umgebenden Mesoderm erkennen (Abb. 7E). Außerdem sind Zellen der Somitenmuskulatur und des Proctodaeums markiert (Abb. 7D).

Schließlich wurde das *Xbra*-positive Blastocoeldachmesoderm markiert (Abb. 7F). Die gefärbten Zellen sind zum Ende der Gastrulation verstreut in der Blastoporuslippe zu finden (Abb. 7G) und ersetzen so die früheren Lippenzellen nach deren Involution.

Auffällig ist, daß sich die Markierung in der epithelialen Schicht gegenüber der inneren Zellen verschoben hat und bezüglich der Involution deutlich zurückliegt (Abb. 7G). Dieser Effekt konnte auch bei der Markierung der Oberlippe beobachtet werden (Abb. 7C).

Der Zweiteilung der ventralen Lippe bezüglich der *Xbra*-Expression entspricht also auch ein unterschiedliches Schicksal. Die Unterlippe besteht aus prospektivem Endoderm, wohingegen die Oberlippe zum Mesoderm beiträgt. Die Färbung im ektodermalen Proctodaeum kann auf die Mitmarkierung der epithelialen Zellen zurückgeführt werden. Nach Nieuwkoop und Florschütz (1950) bildet der invaginierende Teil der epithelialen Schicht das Proctodaeum.

Abbildung 8 zeigt zusammenfassend alle untersuchten Farbmarken. Auch hier ist erkennbar, daß sich die zunächst runden Markierungen der Ober- und Unterlippe um das zwei- bis dreifache verlängern und in Richtung animal zeigen (Abb. 8A, A'). Die Markierungen der Unterlippe (gelb) liegen jetzt im Bereich des Endoderms und laufen etwa parallel zum Brachet'schen Spalt entlang der Grenze zum Mesoderm. Die Farbmarken in der Oberlippe (rot) verlaufen in dem mesodermalen Bereich bogenförmig von der Lippenspitze hin zur Innenseite des Brachet'schen Spaltes.

Wird der mittlere Bereich der Lippe markiert (orange), dann befindet sich die Färbung später größtenteils im Endoderm (Abb. 8B, B'). Der Übergangsbereich zwischen Oberlippe und Blastocoeldach (violett) ist nach Gastrulation im mesodermalen Teil der Lippenspitze.

Zellen des *Xbra*-positiven Blastocoeldaches (blau) füllen später den gesamten Teil der mesodermalen Blastoporuslippe aus, verbleiben aber gelegentlich noch im Blastocoeldach (Abb. 8C, C'). Weiter animal gelegene Markierungen im Blastocoeldach (grau) sind nach Gastrulation immer noch darin zu finden, wenn auch jetzt näher an der Lippe.

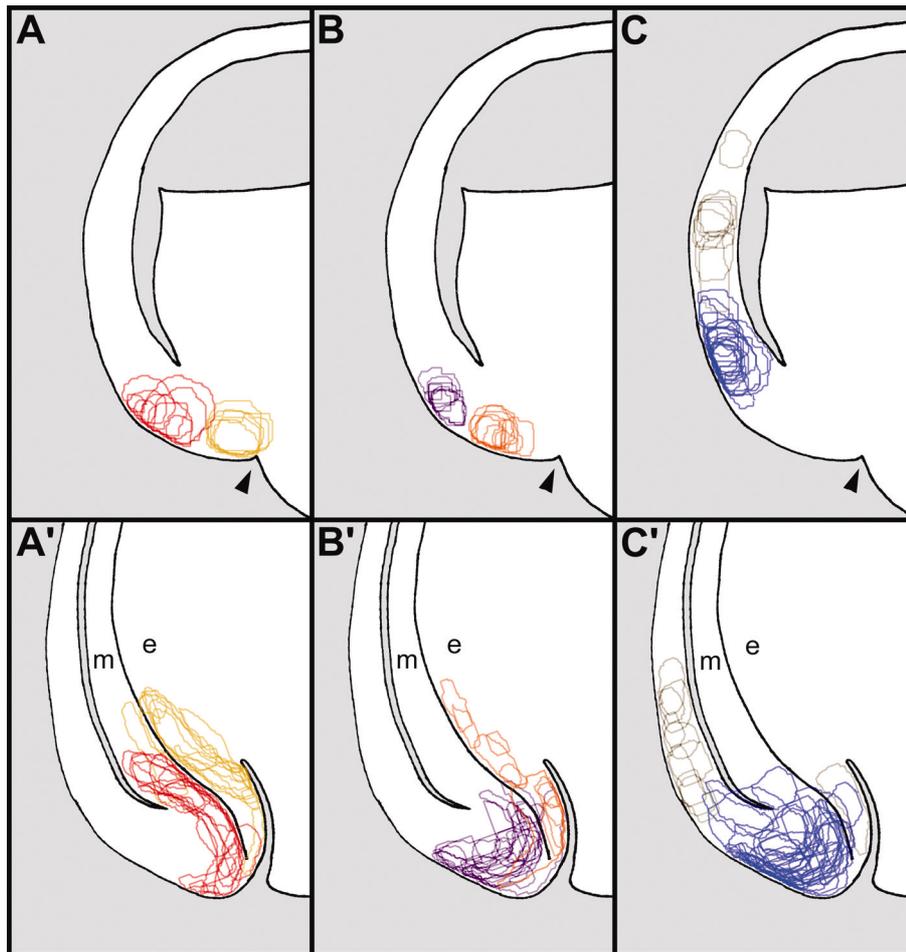


Abb. 8: Gesamtergebnis des Anlageplans.

Die Anfangsposition der Markierung im Stadium 10,5 (A-C) und die Position im Stadium 12,5 (A'-C') sind dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder Umriß eine Markierung. Zur Vereinfachung wurde die Grenze zwischen epithelialer Schicht und inneren Zellen nicht eingezeichnet. Rot: Oberlippe, gelb: Unterlippe (A, A'); violett: zwischen Blastocoeldach und Oberlippe, orange: zwischen Ober- und Unterlippe (B, B'); blau: Blastocoeldachmesoderm, grau: Blastocoeldachektoderm (C, C'); Pfeilspitze: Blastoporus; e: Ektoderm; m: Mesoderm.

In der Blastoporuslippe finden also starke nach Innen gerichtete Zellbewegungen statt. Eine Zellpopulation durchläuft während der Gastrulation verschiedene Regionen um die Lippe herum, die morphologische Integrität der Regionen bleibt aber erhalten. Es ist deshalb davon auszugehen, daß dafür Veränderung im Zellverhalten notwendig sind, die als nächstes untersucht werden.

2.1.4. Das Blastocoeldachmesoderm verliert sein Abstoßungsverhalten

Mit Hilfe des Blastocoeldachttests (siehe auch Material und Methoden; Winklbauer and Keller, 1996; Winklbauer et al., 1996; Wacker et al., 2000; Ibrahim and Winklbauer, 2001; Winklbauer et al., 2001) kann unterschieden werden, ob sich zwei Gewebe bei Kontakt mischen oder getrennt voneinander bleiben. Dazu werden Testaggregate auf ein Substrat (Blastocoeldach oder Blastoporuslippe) gebracht. Die Aggregate sinken entweder in das Substrat ein, oder bleiben abgegrenzt auf dessen Oberfläche. Für diese Gewebstrennung müssen folgende Eigenschaften der Gewebe vorhanden sein:

Das Substrat muß **Abstoßungsverhalten** besitzen. Dieses stellt sicher, daß z.B. involutierte Mesoderm und Endoderm nicht, andere Zellen aber sehr wohl in das Substrat einsinken können. Das Abstoßungsverhalten des Substrates alleine reicht also noch nicht für eine Gewebstrennung aus. Sie kann nur erfolgen, wenn die Aggregate, wie z.B. solche des involutierten Mesoderms oder Endoderms, auch **Separationsverhalten** besitzen, was es ihnen erlaubt, von einem abstoßenden Substrat auch tatsächlich getrennt zu bleiben (Wacker et al., 2000).

In diesem Abschnitt wird zunächst das Abstoßungsverhalten untersucht. Die animale Kappe des Blastocoeldaches besitzt dieses Verhalten, so daß das involutierte Mesoderm auf dessen Oberfläche bleibt (AIM auf AK; Abb. 9), Zellen der animalen Kappe aber einsinken (AK auf AK; Abb. 9). In dieser Hinsicht verhält sich der animale Teil des Blastocoeldaches so wie das weiter vegetal gelegene ventrale Blastocoeldachmesoderm (AIM auf BCD-M und AK auf BCD-M; Abb. 9). Dies ist zu erwarten, da beide auf das Abstoßungsverhalten getesteten Substrate Bestandteil des Blastocoeldaches sind.

Die Zellen des früheren Blastocoeldachmesoderms sind zu Ende der Gastrulation in der gesamten Lippe zu finden (siehe Abb. 8). Dort zeigen sie im Vergleich zu vorher ein stark reduziertes Abstoßungsverhalten (AIM auf L; Abb. 9). Dieser Effekt ist hoch signifikant ($p < 0,001$). Folglich ist das Abstoßungsverhalten der Zellen des Blastocoeldachmesoderms beim Übergang in die Blastoporuslippe abgeschaltet worden.

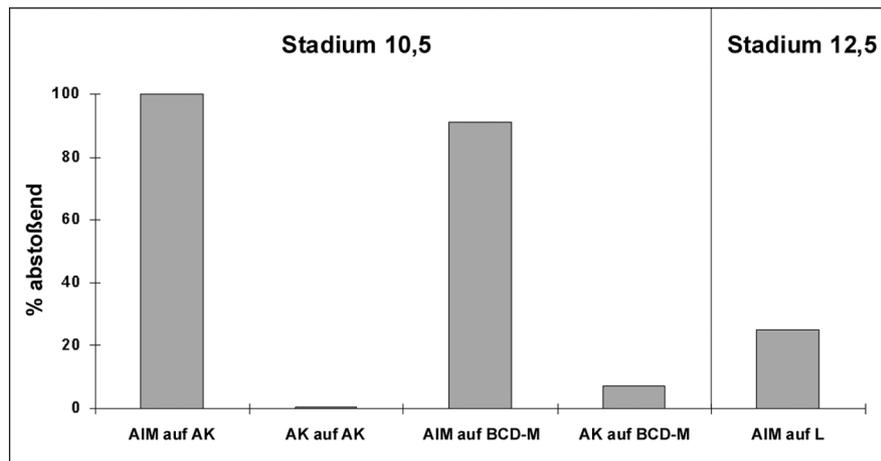


Abb. 9: Verlust des Abstoßungsverhaltens des Blastocoeldachmesoderms.

Testaggregate des anterioren involutierten Mesoderms (AIM), oder der animalen Kappe (AK) wurden auf das Blastocoeldach der animalen Kappe (AK), oder auf das Blastocoeldachmesoderm (BCD-M) des Stadiums 10,5 gelegt. Außerdem wurde die ventrale Lippe (L) des Stadiums 12,5 als Substrat verwendet. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt. Zur Vergrößerung der Oberfläche von BCD-M und L wurden vor dem Test jeweils mehrere dieser Regionen isoliert und kurzzeitig so kultiviert, daß sie Kante an Kante verheilen konnten. **AIM auf AK:** 100% abstoßend (n=24); **AK auf AK:** 0% abstoßend (n=35); **AIM auf BCD-M:** 91% abstoßend (n=32); **AK auf BCD-M:** 7% abstoßend (n=30); **AIM auf L:** 25% abstoßend (n=20).

Die dieser Abbildung zugrundeliegenden Versuche wurden zusammen mit R. Winklbauer durchgeführt.

2.1.5. Die Oberlippe erwirbt die Eigenschaft des Separationsverhaltens

Das Separationsverhalten ist die Eigenschaft der Aggregate, die es ihnen erlaubt, von einem abstoßenden Substrat auch tatsächlich abgegrenzt zu bleiben. Dieses Verhalten findet man in der mittleren Gastrula sowohl im anterioren involutierten Mesoderm, als auch in der endodermalen Unterlippe (Abb. 10A). Die mesodermale Oberlippe zeigt dieses Verhalten nur in geringem Maße. Blastocoeldachmesoderm und -ektoderm besitzen nicht die Eigenschaft, sich von einem abstoßenden Substrat zu separieren.

In der späten Gastrula zeigt das anteriore involutierte Mesoderm immer noch starkes Separationsverhalten (Abb. 10B). Das als nächstes involutierte, posteriore Mesoderm besitzt ebenso diese Eigenschaft. Sie muß hier jedoch während der Gastrulation erworben worden sein, da die Zellen ursprünglich aus der Oberlippe

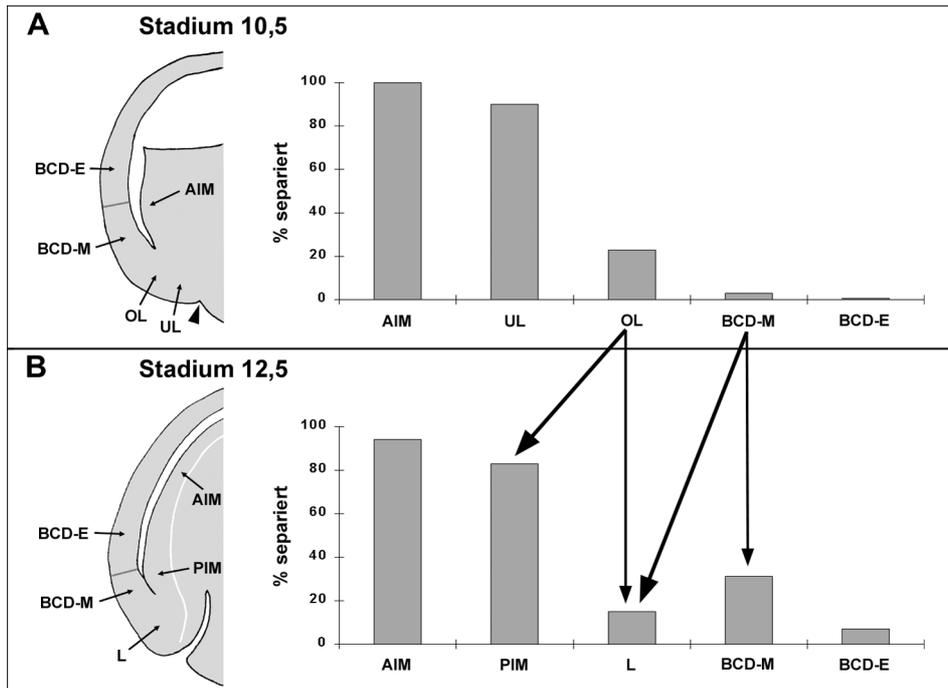


Abb. 10: Erwerb von Separationsverhalten in der Oberlippe.

Testaggregate verschiedener Regionen des Stadiums 10,5 (A) und 12,5 (B) wurden auf abstoßende Blastocoeldächer des Stadiums 10+ bis 10,5 gelegt. Der Herkunft der Aggregate ist jeweils links im Schema angedeutet, in dem die Grenze zwischen epithelialer Schicht und inneren Zellen zur Vereinfachung nicht eingezeichnet wurde. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt. Die großen Pfeile deuten die aus dem Anlageplan gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Zellbewegungen an. Pfeilspitze: Blastoporus.

A: AIM (anteriores involutiertes Mesoderm): 100% separiert (n=24); UL (Unterlippe): 90% separiert (n=30); OL (Oberlippe): 29% separiert (n=30); BCD-M (Blastocoeldachmesoderm): 3% separiert (n=30); BCD-E (Blastocoeldachektoderm): 0% separiert (n=35).

B: AIM: 94% separiert (n=32); PIM (posteriores involutiertes Mesoderm): 83% separiert (n=30); L (Lippe): 15% separiert (n=39); BCD-M: 31% separiert (n=36); BCD-E: 7% separiert (n=27).

Die dieser Abbildung zugrundeliegenden Versuche wurden zusammen mit R. Winklbauer durchgeführt.

stammen (siehe Abb. 8), wo sie sich noch anders verhielten (Abb. 10A). Dieser Anstieg des Separationsverhaltens ist hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Zellen der späten Blastoporuslippe stammen zum größten Teil aus dem Blastocoeldachmesoderm, aber wohl auch zu einem kleineren Teil aus der Oberlippe (siehe Abb. 8). Die späte Lippe weist, wie die Regionen, aus denen ihre Zellen ursprünglich stammen, nur geringes Separationsverhalten auf (Abb. 10B, A). Erstaunlicherweise zeigen die Zellen des späten Blastocoeldachmesoderm im Vergleich zur frühen Gastrula einen hoch signifikanten Anstieg des Separationsverhaltens ($p < 0,01$). Dies ist insofern paradox, als sie immer noch

Bestandteil des Blastocoeldaches sind. Es hat sich gezeigt, daß es sich hierbei um einen Artefakt handelt, der in diesen Zellen ab Stadium 11 durch eine Sensibilität gegenüber dem Kulturmedium ausgelöst wird. Je länger die Zellen kultiviert werden, um so deutlicher ist dieser Effekt. Es reicht aber auch ein Kontakt dieser inneren Zellen von wenigen Minuten mit dem Medium aus, um dieses aberrante Verhalten auszulösen (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Zusätzlich neigen diese Zellen, wenn sie ohne umgebende epitheliale Schicht kultiviert werden, zur Selbstdissoziation (nicht gezeigt). Dieses aberrante Verhalten tritt aber nur im Blastocoeldachmesoderm ab Stadium 11 auf und nicht in anderen Regionen des Embryos (nicht gezeigt). Das angrenzende ventrale Blastocoeldachektoderm der späten Gastrula sinkt immer noch in abstoßende Blastocoeldächer ein (Abb. 10B).

Während der Involution bewegen sich Zellen aus der Blastoporuslippe in das Innere des Embryos. Die aus der mesodermalen Oberlippe stammenden Zellen gelangen dabei auf die Innenseite des Brachet'schen Spaltes und bekommen so Kontakt zum Blastocoeldach. Gleichzeitig erwerben sie Separationsverhalten, daß es ihnen erlaubt vom abstoßenden Blastocoeldach getrennt zu bleiben. In dem Maße, wie Zellen die Lippe verlassen, wird diese von früheren Zellen des Blastocoeldachmesoderms aufgefüllt. Bei diesem Übergang vom Blastocoeldachmesoderm in die Blastoporuslippe wird das Abstoßungsverhalten der Zellen abgeschaltet.

2.1.6. Der Verlust des Abstoßungsverhaltens des Blastocoeldachmesoderms wird nicht durch eine reduzierte Zell-Zell-Adhäsion hervorgerufen

Es ist gezeigt worden, daß Mesoderm eine geringere Zell-Zell-Adhäsion besitzt als Ektoderm (Davis et al., 1997). So wird beispielsweise die Zell-Zell-Adhäsion durch den Mesoderminduktor Activin in den ursprünglich ektodermalen Zellen reduziert (Briher and Gumbiner, 1994). Diese verminderte Zell-Zell-Adhäsion ist im

Blastocoeldachtest notwendig für das Separationsverhalten des Mesoderms (Wacker et al., 2000).

Ob es innerhalb des Mesoderms Zonen unterschiedlicher Zell-Zell-Adhäsion gibt, ist unklar. Das Blastocoeldachmesoderm verhält sich in vieler Hinsicht wie der übrige ektodermale Teil des Blastocoeldaches. So zeigt es Abstoßungsverhalten (Abschnitt 2.1.4.), aber kein Separationsverhalten (Abschnitt 2.1.5.) und bildet im Gegensatz zum restlichen Mesoderm Fibronektinfibrillen (Ibrahim and Winklbauer, 2001). Deshalb ist es naheliegend in Erwägung zu ziehen, daß das Blastocoeldachmesoderm adhäsiver ist als der Rest des Mesoderms und sich so auch in diesem Punkt wie der Rest des Blastocoeldaches verhält. Setzt man dies einmal theoretisch voraus, so könnte eine Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion im Blastocoeldachmesoderm eine Rolle spielen bei dem Verlust des Abstoßungsverhaltens und der Translokation der Zellen in die Blastoporuslippe.

Um diese Fragestellungen zu untersuchen wurde eine neue Variante eines Zell-Zell-Adhäsionstests entwickelt. Ein bereits publizierter Test basiert auf der Reaggregation dissoziierter Zellen (Briehar and Gumbiner, 1994). Man benötigt für diesen Test jedoch relativ viele Zellen, so daß er nicht geeignet ist, die Adhäsion kleiner Bereiche des Embryos zu untersuchen. Dafür bietet sich aber die neu entwickelte Variante des Adhäsionstests an, da dieser auf der Dissoziation von Aggregaten basiert, die aus wenigen Zellen bestehen können. Hierbei wird der zeitliche Verlauf der Dissoziation unter Standardbedingungen verfolgt und daraus werden Rückschlüsse auf die Zell-Zell-Adhäsion gezogen. Beide Adhäsionstests liefern vergleichbare Ergebnisse (Abschnitt 2.2.1.8.).

Abbildung 11 zeigt ein typisches Ergebnis des Dissoziationstests der folgenden Regionen. Das anteriore involutierte Mesoderm (AIM; Abb. 11A) ist bereits zu einem Zeitpunkt dissoziiert, an dem das Mesoderm des Blastocoeldaches noch größtenteils als Aggregat vorliegt. Das gilt sowohl für direkt getestete Aggregate dieser Region (BCD-M; Abb. 11B), als auch für solche, die solange kultiviert wurden bis Kontrollembryonen das späte Gastrulastadium erreicht hatten (BCD-M+3h; Abb. 11C). Um das im vorigen Abschnitt beschriebene aberrante Verhalten dieser Region zu vermeiden, wurden die Gewebe mit umgebender epithelialer Schicht kultiviert. Das Blastocoeldachektoderm weist zum gleichen Zeitpunkt noch keine Anzeichen von Dissoziation auf (BCD-E; Abb. 11D).

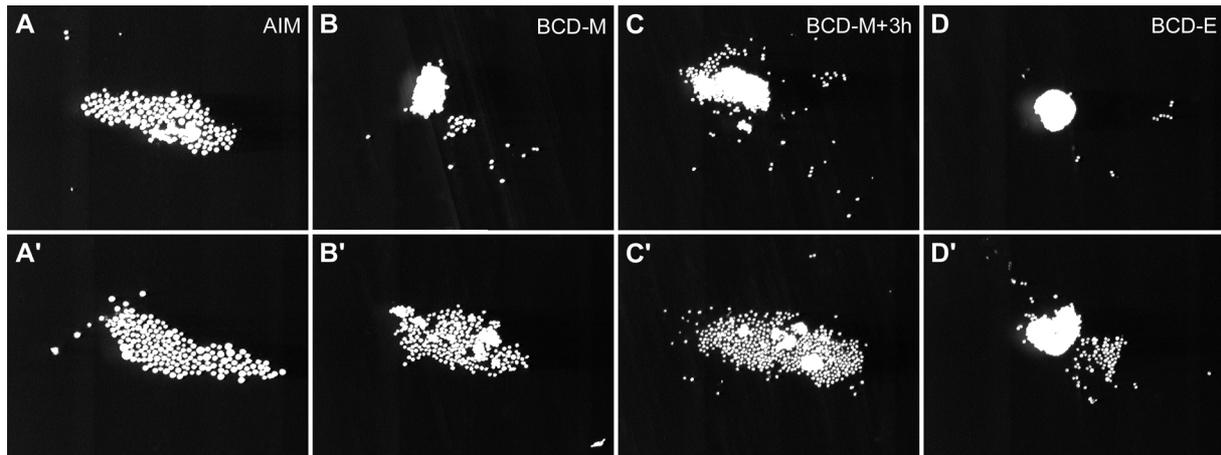


Abb. 11: Zell-Zell-Adhäsionstest basierend auf Dissoziation.

Es wurden gleich große Aggregate der inneren Zellen des Stadiums 10,5 isoliert und gleichzeitig bei gleicher Scherkraft dissoziiert. A'-D' sind die selben Aggregate wie A-D, nur zu einem späteren Zeitpunkt. C bzw. C' wurden vor dem Dissoziieren für 3 Stunden kultiviert. Bei der Kultivierung waren die inneren Zellen noch von der epithelialen Schicht umgeben. Der Typ des Aggregates ist rechts oben angegeben.

AIM: anteriores involutiertes Mesoderm; BCD-M: Blastocoeldachmesoderm; BCD-M+3h: Blastocoeldachmesoderm nach 3 Stunden Kultivierung; BCD-E: Blastocoeldachektoderm

Auch bei fortschreitender Dissoziation ist kein deutlicher Unterschied zwischen kultivierten (Abb. 11C') und nicht kultivierten Aggregaten des Blastocoeldachmesoderms (Abb. 11B') zu erkennen, wobei sie fast in Einzelzellen zerfallen sind. Zum gleichen Zeitpunkt liegt das Ektoderm des Blastocoeldaches jedoch noch größtenteils aggregiert vor (Abb. 11D').

Da in diesem Test die Aggregate adhäsiverer Zellen langsamer dissoziieren als Aggregate weniger adhäsiver Zellen, kann man über den Grad des Zerfalls auf Unterschiede in der Zell-Zell-Adhäsion schließen. Das Blastocoeldachektoderm ist folglich adhäsiver als das Mesoderm des Blastocoeldaches. Letzteres besitzt wiederum eine deutlich höhere Zell-Zell-Adhäsion als das anteriore involutierte Mesoderm, so daß innerhalb dieses Keimblattes starke Unterschiede auftreten. Der Grad des Zerfalls von direkt getesteten und bis zum Ende der Gastrulation kultivierten Aggregaten des Blastocoeldachmesoderms ist vergleichbar. Während der Gastrulation gelangen die Zellen des Blastocoeldachmesoderms in die Blastoporuslippe (Abschnitt 2.1.3.) und verlieren ihr Abstoßungsverhalten (Abschnitt 2.1.4.). Anscheinend ist hierfür auf zellulärer Ebene jedoch keine Verminderung der Adhäsion erforderlich.

2.2. Funktion und Regulation von *Xsna*

2.2.1. Die Rolle von *Xsna* bei der Gewebstrennung

2.2.1.1. Die Expression des Transkriptionsfaktor *Xsna* breitet sich fortschreitend in das Blastocoeldachmesoderm aus

Der Transkriptionsfaktor *Xsna* wird während der Gastrulation in den prospektiv mesodermalen Zellen exprimiert, die bereits involutiert sind. Mesodermale Zellen deren Involution noch bevorsteht sind dagegen *Xsna*-negativ (Essex et al., 1993). Folglich muß zur Aufrechterhaltung dieses Expressionsmusters die Transkription beginnen, sobald die Zellen involutieren. Zur Untersuchung dieses dynamischen Expressionsmusters bietet sich die Ventralseite des Embryos an, da hier Blastocoeldachmesoderm existiert, dessen Involution in der frühen Gastrula noch nicht begonnen hat. Dorsal sind bereits zu Anfang der Gastrulation alle mesodermalen Zellen in der Blastoporuslippe zu finden, so daß sie schon auf dem Weg in das Innere des Embryos sind.

Es konnte an ventralen Explantaten gezeigt werden, daß sich die *Xsna*-Expression nach Ende der Gastrulation bis in das gesamte Blastocoeldachmesoderm ausgebreitet hat (Ibrahim, 1997). Um zu untersuchen, ob diese Ausbreitung wie im Embryo auch im Explantat ein langsam fortschreitender Prozeß ist, wurden ergänzende Expressionsstudien durchgeführt. Die Einschätzung, wie weit sich die *Xsna*-Expressionsdomäne ausgebreitet hat, wurde anhand der *Xbra*-Expression vorgenommen.

In der mittleren Gastrula (Stadium 10,5) wird *Xbra* erwartungsgemäß in der Oberlippe und im Blastocoeldachmesoderm des Explantates exprimiert. Die endodermale Unterlippe ist *Xbra*-negativ (Abb. 12A). Die *Xsna*-Expression ist schwächer, man kann aber erkennen, daß die Markierung zu diesem Zeitpunkt nur in der Oberlippe zu finden ist (Abb. 12A).

In Explantaten, die anderthalb Stunden kultiviert wurden (Stadium 11,5) kann man zwar nicht mehr genau die verschiedenen Regionen voneinander abgrenzen (Abb. 12B). Trotzdem wird deutlich, daß die animale Grenze der *Xsna*-Expression der animalen Grenze der *Xbra*-Expression näher gekommen ist, diese aber noch nicht erreicht hat (Abb. 12B).

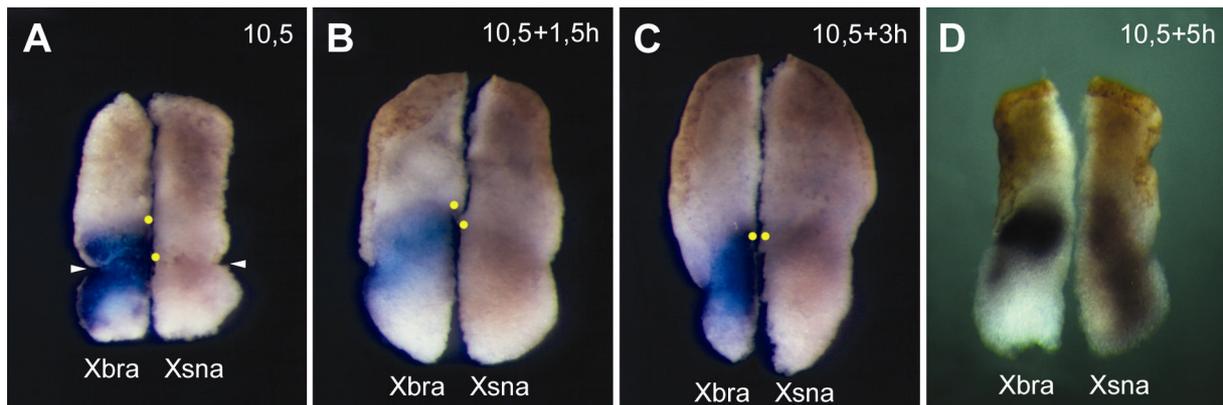


Abb. 12: Doppel-*in situ* Hybridisierung an Explantaten der Ventralseite.

Die Explantation fand im Stadium 10,5 statt. Die Explantate wurden anschließend (A), nach 1,5 Stunden (B), nach 3 Stunden (C) oder nach 5 Stunden Kultivierung (D) fixiert und währenddessen halbiert. In dem sofort fixierten Explantat (A) wurde die Lippengrenze rechts und links mit einer Kerbe markiert. Für die Hälften wurde einzeln *in situ* Hybridisierung mit der *Xbra*-Sonde (linke Hälfte) und der *Xsna*-Sonde (rechte Hälfte) durchgeführt. Die vegetale Schnittkante entlang der Flaschenzellen ist unten. Die gelben Punkte verdeutlichen den Abstand zwischen der animalen Grenze der *Xbra*- und *Xsna*-Expression. Pfeilspitze: Grenze zwischen Blastoporuslippe und Blastocoeldachmesoderm.

Die Teilabbildung (D) stammt aus meiner Diplomarbeit (Ibrahim, 1997).

Erst nach 3 Stunden Kultivierung, wenn Kontrollembryonen die Gastrulation beendet haben (Stadium 13), liegt die animale Grenze der *Xsna*-Expression auf gleicher Höhe mit der animalen Grenze von *Xbra* (Abb. 12C).

Theoretisch kann das Angleichen der Grenze der Expressionen von *Xsna* und *Xbra* auch durch ein Zurückweichen von *Xbra* erklärt werden. Der Vergleich der Proportionen von Explantat und Expressionsdomäne spricht aber für eine Ausbreitung von *Xsna*.

Werden Explantate 5 Stunden kultiviert, nach denen sich Kontrollembryonen im Neuralplattenstadium (Stadium 14) befinden, so fällt auf, daß die Fläche der *Xbra*-Expressionsdomäne kleiner geworden ist (Abb. 12D). Zwar scheint die Expression noch im ehemaligen Blastocoeldach zu persistieren, aber nicht in der ehemals *Xbra*-positiven Oberlippe.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die *Xsna*-Expression im Explantat während der Gastrulation (Abb. 12A-C) fortschreitend ausbreitet und sich folglich wie im Embryo verhält.

2.2.1.2. *Xsna* ist an der Regulation des Abstoßungsverhaltens beteiligt

Die Zellen des frühen Blastocoeldachmesoderms sind in der späten Gastrula in der Blastoporuslippe zu finden (Abschnitt 2.1.3.). Dabei hat ein Übergang im Verhalten dieser Zellen von abstoßend zu nicht abstoßend stattgefunden (Abschnitt 2.1.4.). Parallel dazu haben diese ursprünglich *Xsna*-negativen Zellen mit der Expression des Transkriptionsfaktors begonnen (Abschnitt 2.2.1.1.). Diese Korrelation macht *Xsna* zu einem guten Kandidaten für die Regulation des Abstoßungsverhaltens.

Es wird zunächst das Blastocoeldach als Testsystem verwendet um zu untersuchen, ob durch ektopische Expression von *Xsna* das Abstoßungsverhalten reduziert werden kann. Um der Situation des Blastocoeldachmesoderms möglichst nahe zu kommen, wurde die Expression von *Xbra* in den zu untersuchenden Blastocoeldächern mit bFGF induziert. Diese Induktion führt alleine nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung des Abstoßungsverhaltens des Blastocoeldaches (Wacker et. al., 2000). Durch die ektopische Expression von *Xsna* in *Xbra*-positiven Blastocoeldächern wird das volle Abstoßungsverhalten des unbehandelten Blastocoeldaches etwa auf die Hälfte reduziert (Abb. 13A). Dieser Effekt ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

Um zu untersuchen, ob die Kontaktfläche von Aggregat und Substrat auch die typischen Anzeichen einer Durchmischung der Gewebe aufweist, wurde Lucifer Yellow-markiertes Mesoderm als Aggregat verwendet. Nach Kultivierung auf Dächern, die ektopisch *Xsna* und *Xbra* exprimieren, ist eine beginnende Durchmischung zu erkennen (Abb. 13B). Einerseits erscheint die Kontaktfläche nicht glatt, sondern eher verzahnt, andererseits haben sich markierte Zellen bereits vom Aggregat gelöst.

Falls *Xsna* an der Regulation des Abstoßungsverhaltens im Embryo beteiligt ist, wäre ein Effekt bei ektopischer Expression im Blastocoeldachmesoderm zu erwarten. Da die Anwesenheit von *Xsna* mit einem Fehlen des Abstoßungsverhaltens korreliert ist, würde man bei einer Überexpression des Transkriptionsfaktors erwarten, daß die ursprünglich abstoßenden Zellen des Blastocoeldachmesoderms diese Eigenschaft verlieren. Demzufolge müßte die Blastoporuslippe auf Kosten des Blastocoeldachmesoderms in ihrer Höhe zunehmen. Abbildung 13D zeigt einen Embryo, der *Xsna* ektopisch im Blastocoeldachmesoderm exprimiert. Um sicherzustellen, daß die gewünschte Region getroffen wurde, ist der Fluoreszenz-

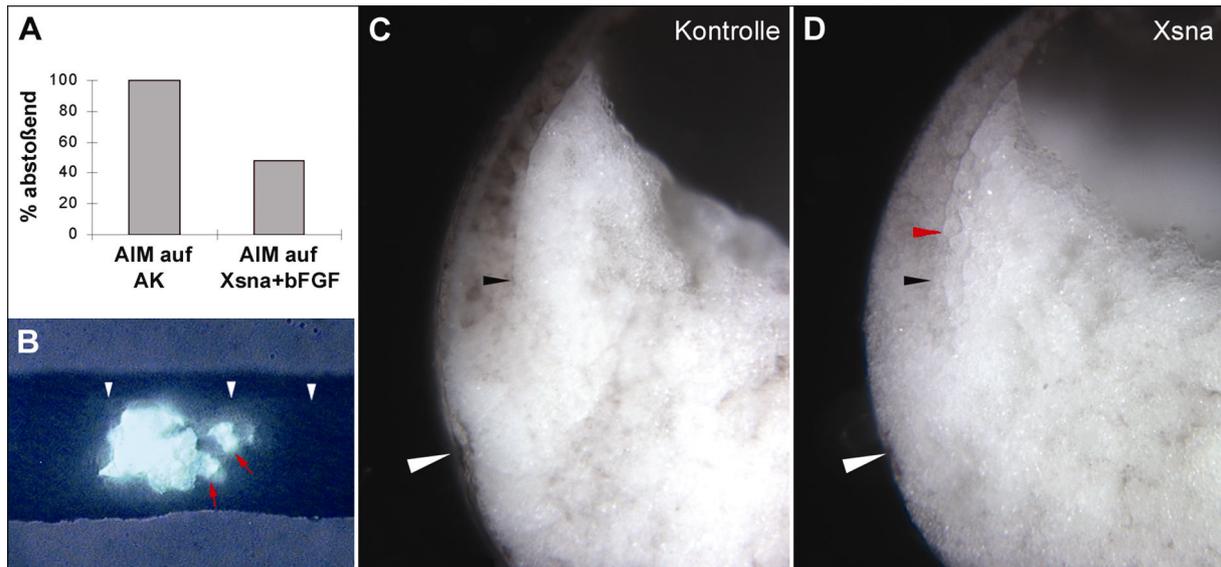


Abb. 13: Das Abstoßungsverhalten nach ektopischer *Xsna*-Expression.

A: Testaggregate des anterioren involutierten Mesoderms (AIM) wurden auf das Blastocoeldach der animalen Kappe des Stadiums 10+ gelegt. Neben unbehandelten Kappen (AK) wurden auch solche als Substrat verwendet, in deren Zellen ektopisch *Xsna*-RNA exprimiert wurde und die zusätzlich mit bFGF zu Mesoderm induziert wurden (*Xsna*+bFGF). Die Injektion der RNA wurde im Stadium 4 (2000pg / Blastomere) durchgeführt. Die bFGF-Induktion wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt. **AIM auf AK:** 100% abstoßend (n=24); **AK auf *Xsna*+bFGF:** 48% abstoßend (n=42).

B: Blastocoeldachtest mit Lucifer Yellow-markiertem anterioren involutierten Mesoderm auf *Xsna*+bFGF-Dächern nach 1,5 h Kultivierung. Weiße Pfeilspitzen: Innenseite des Substrates (darüber ist Schatten); rote Pfeile: markierte Zellen, die sich gelöst haben.

C, D: Ventraler Ausschnitt sagittal halbiertes Embryonen des Stadiums 10,5. Ventral ist links. (C): Kontrollembryo; (D): In den Embryo wurde im Stadium 4 ventral 2000pg *Xsna*-RNA und 200pg *GFP*-RNA pro Blastomere injiziert. Das vegetale Ende des Brachet'schen Spaltes vom Kontrollembryo (schwarze Pfeilspitze) und vom *Xsna*-injiziertem Embryo (rote Pfeilspitze) ist angezeigt. Die schwarze Pfeilspitze aus (C) wurde auch in (D) übertragen. Weiße Pfeilspitze: Blastoporus.

Marker GFP (Green Fluorescent Protein) coexprimiert worden. Es fällt auf, daß bei diesem Embryo die Höhe der Blastoporuslippe im Vergleich zur Kontrolle vergrößert ist (Abb. 13D, C). So steigt die Höhe der Blastoporuslippe der mittleren Gastrula von durchschnittlich 265µm (n=22) durch Überexpression von *Xsna* auf durchschnittlich 323µm (n=18). Das entspricht einem Anstieg der Lippenhöhe um 22%. Dieser Effekt ist signifikant (Mann-Whitney-Test: $p < 0,05$).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors *Xsna* an der Regulation des Abstoßungsverhaltens des Blastocoeldachmesoderms.

2.2.1.3. *Xsna* und bFGF beeinflussen das Separationsverhalten

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, daß *Xsna* an der Regulation des Abstoßungsverhaltens beteiligt ist. Wahrscheinlich tritt dieser Effekt relativ schnell nach dem Beginn der *Xsna*-Expression in den Zellen auf. Hierfür spricht, daß die Zellen des Blastocoeldachmesoderm erst beim Übergang in die Blastoporuslippe mit der Expression von *Xsna* beginnen und dies ist zeitgleich korreliert mit einem Übergang im Abstoßungsverhalten. Es ist zusätzlich möglich, daß *Xsna* auch an der Regulation des Separationsverhaltens beteiligt ist, da die Expression gut hierzu paßt. So wird *Xsna* im gesamten involutierten Mesoderm und dem mesodermalen Teil der Lippe exprimiert (Abschnitt 2.2.1.1.; Essex et al., 1993). Jedoch ist anzunehmen, daß dieser Effekt erst relativ spät nach dem Beginn der Expression in den Zellen auftritt, da die bereits *Xsna*-positive mesodermale Oberlippe das Separationsverhalten noch nicht erworben hat (Abschnitt 2.1.5.; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Erst wenn die Zellen die Lippe verlassen haben und involutiert sind, so daß sie auf der Innenseite des Brachet'schen Spaltes liegen, zeigt sich voll ausgeprägtes Separationsverhalten (Abb. 14, AIM). Es wird nun zunächst an Aggregaten untersucht, ob durch ektopische Expression von *Xsna* in animalen Kappen das Separationsverhalten ausgelöst werden kann. Unbehandelte animale Kappen zeigen dieses Verhalten nicht (Abb. 14). Die Injektion von 200pg *Xsna*-RNA pro animale Blastomere führt zu einem geringen, nicht signifikanten Anstieg des Separationsverhaltens ($p > 0,05$). Die ektopische Expression von 500pg bzw. 2000pg bewirkt eine stärkere Zunahme, die jeweils hoch signifikant ist ($p < 0,001$). Der Effekt von 2000pg *Xsna*-RNA steigt durch eine Induktion mit bFGF hoch signifikant an ($p < 0,001$) und erreicht damit das Niveau des Effektes von Activin. Das Separationsverhalten induziert durch Activin, und das von *Xsna* zusammen mit bFGF, ist nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$). Das bFGF alleine bewirkt nur eine geringe, nicht signifikante Zunahme des Separationsverhaltens ($p > 0,05$).

Das Separationsverhalten läßt sich auch an Einzelzellen untersuchen. Diese wurden in Nilblausulfatlösung angefärbt, um die Zellen später wiederfinden zu können. Die Untersuchung der Einzelzellen bestätigt prinzipiell die Ergebnisse, die anhand der Aggregate gewonnen wurden (Abb. 14). So führt auch hier die Injektion von 2000pg *Xsna*-RNA pro Blastomere zu einem hoch signifikanten Anstieg des

Separationsverhaltens ($p < 0,001$). Die zusätzliche Induktion mit bFGF bewirkt ebenfalls eine hoch signifikante weitere Zunahme des Verhaltens ($p < 0,001$).

Die Untersuchung der Aggregaten und Einzelzellen spricht für eine mögliche Beteiligung von Xsna an der Regulation des Separationsverhaltens.

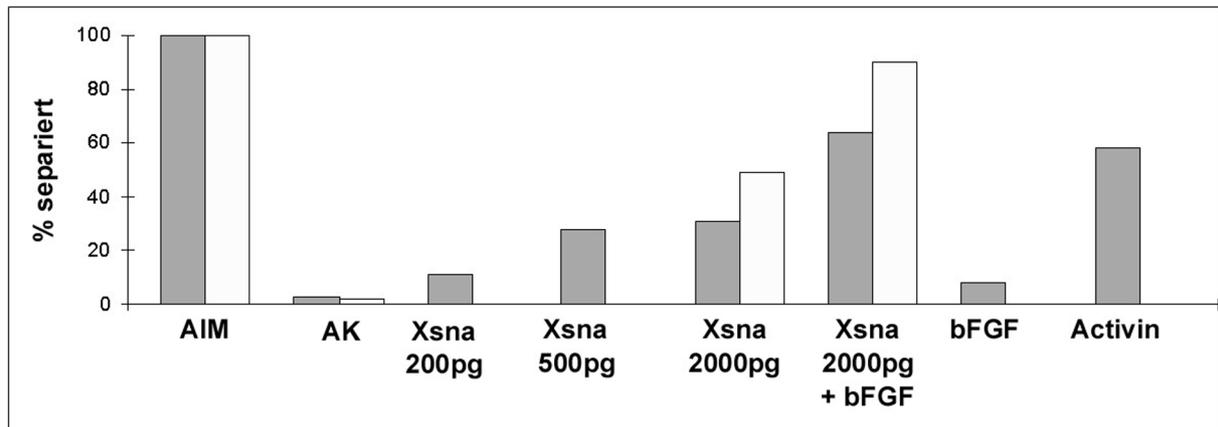


Abb. 14: Das Separationsverhalten nach ektopischer Xsna-Expression.

Testaggregate (dunkle Balken) und Einzelzellen (helle Balken) wurden auf abstoßende Blastocoeldächer des Stadiums 10+ bis 10,5 gelegt. Die Einzelzellen wurden von Hand isoliert und in Nilblaulösung angefärbt, um das spätere Auffinden zu ermöglichen. Xsna-RNA wurde im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert. Die Mengenangaben gelten pro Blastomere. Die bFGF- und Activin-Induktion der animalen Kappen wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bzw. Einzelzellen bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt.

AIM (anteriores involutiertes Mesoderm): Aggregate 100% separiert (n=35), Einzelzellen 100% separiert (n=27); **AK** (animale Kappe): Aggregate 3% separiert (n=38), Einzelzellen 2% separiert (n=53); **Xsna 200pg**: Aggregate 11% separiert (n=106); **Xsna 500pg**: Aggregate 28% separiert (n=53); **Xsna 2000pg**: Aggregate 31% separiert (n=68), Einzelzellen 49% separiert (n=61); **Xsna 2000pg+bFGF**: Aggregate 64% separiert (n=61), Einzelzellen 90% separiert (n=31); **bFGF**: Aggregate 8% separiert (n=53); **Activin**: Aggregate 58% separiert (n=53).

2.2.1.4. Kann das durch Xsna hervorgerufene Separationsverhalten durch andere Faktoren erhöht werden?

In Zellen der animalen Kappe kann zwar durch Activin bzw. Xsna zusammen mit bFGF deutliches Separationsverhalten hervorgerufen werden, das voll ausgeprägte Verhalten des anterioren involutierten Mesoderms wird jedoch nicht erreicht (Abschnitt 2.2.1.3.). Deshalb wurde untersucht, ob das Separationsverhalten Activin-

induzierter Kappen durch zusätzliche ektopische *Xsna*-Expression auf das Niveau des anterioren involutierten Mesoderms erhöht werden kann. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abb. 15 links). Die zusätzliche *Xsna*-Expression führt zu keiner signifikanten Veränderung des Separationsverhaltens ($p > 0,05$). Es ist auffällig, daß das Separationsverhalten Activin-induzierter Kappen trotz Gleichbehandlung in Abbildung 14 und 15 stark voneinander abweicht. Die deutlichen Unterschiede in den beiden Abbildungen mögen darin begründet sein, daß Activin konzentrationsabhängig verschiedene mesodermale Gewebe induziert (Green et al., 1992). Es wurde zwar dieselbe Activinkonzentration verwendet, gelegespezifische Faktoren, wie z.B. eine unterschiedliche Kompetenz der Zellen, können jedoch nicht beeinflußt werden. Um innerhalb eines Experimentes vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden zur Untersuchung der Activin-Effekte (Abb. 15 links) die Ansätze parallel durchgeführt.

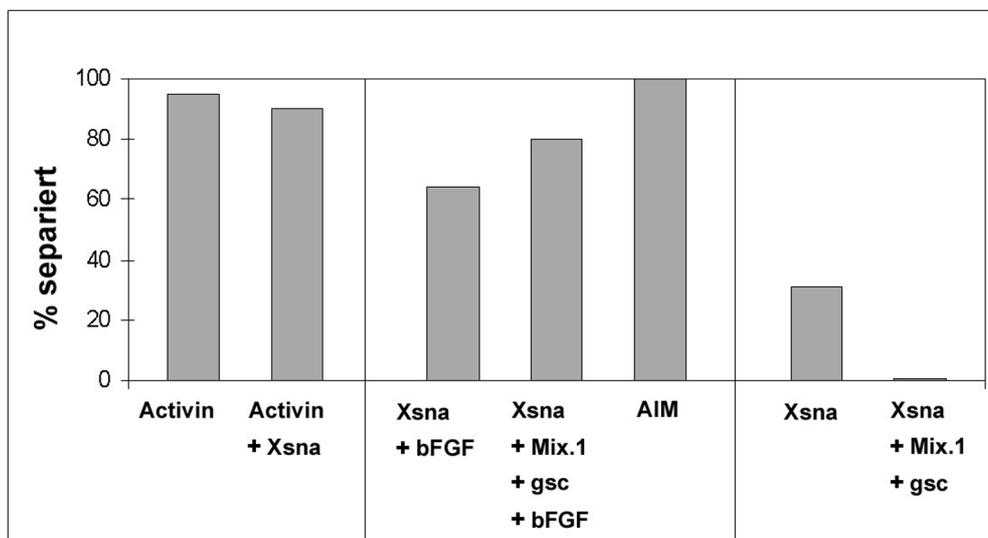


Abb. 15: Das Separationsverhalten von *Xsna* in Verbindung mit anderen Separationsverhalten auslösenden Faktoren.

Testaggregate wurden auf abstoßende Blastocoeldächer des Stadiums 10+ bis 10,5 gelegt. Die RNAs wurden im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert (*Xsna*: 2000pg; *Mix. 1*: 50pg; *gsc*: 25pg). Die bFGF- und Activin-Induktion der animalen Kappen wurden ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt.

Activin: 95% separiert (n=39); **Activin+Xsna:** 90% separiert (n=47); **Xsna+bFGF (aus Abb. 14):** 64% separiert (n=61); **Xsna+Mix.1+gsc+bFGF:** 80% separiert (n=30); **AIM (anteriores involutiertes Mesoderm):** 100% separiert (n=35); **Xsna (aus Abb. 14):** 31% separiert (n=68); **Xsna+Mix.1+gsc:** 0% separiert (n=34).

Es konnte gezeigt werden, daß die Transkriptionsfaktoren *Mix.1* (Rosa, 1989) und *gsc* an der Regulation des Separationsverhaltens des anterioren Mesoderms beteiligt sind (Wacker et al., 2000). Werden beide Gene ektopisch in bFGF-induzierten Kappenzellen exprimiert, so zeigen diese ein deutliches Separationsverhalten (Wacker et al., 2000), etwa vergleichbar mit dem Effekt von *Xsna* in Verbindung mit bFGF. Also bietet es sich an zu untersuchen, ob eine Kombination bestehend aus *Xsna*, *Mix.1*, *gsc* und bFGF zu voll ausgeprägtem Separationsverhalten führt. Die zusätzliche ektopische Expression von *Mix.1* und *gsc* in *Xsna*-exprimierenden und bFGF-induzierten Kappen resultiert zwar in einer Erhöhung des Separationsverhaltens, die aber nicht signifikant ist ($p > 0,05$). Der voll ausgeprägte Effekt des anterioren involutierten Mesoderms wird also nicht erreicht (Abb. 15 Mitte).

Sowohl *Xsna* alleine (Abb. 15 rechts), als auch *Mix.1* zusammen mit *gsc* (Wacker et al., 2000) bewirken jeweils ein geringes Separationsverhalten. Interessanterweise führt die Kombination dieser jeweils schwach wirkenden Faktoren zu einem vollständigen Verlust des Verhaltens. Dieser Effekt ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß der Activin-Effekt auf das Separationsverhalten durch *Xsna* nicht verstärkt wird. *Gsc* und *Mix.1* erhöhen den Effekt von *Xsna* und bFGF nicht signifikant. Das voll ausgeprägte Verhalten des anterioren involutierten Mesoderms wird also nicht erreicht.

2.2.1.5. Die Repression von *Xbra* ist nicht notwendig für das Separationsverhalten

Wie noch in dieser Arbeit gezeigt wird, ist *Xsna* sowohl hinreichend als auch notwendig für die Repression von *Xbra* (Abschnitt 2.2.3.2.). Andererseits erzeugt *Xsna* zusammen mit bFGF deutliches Separationsverhalten (Abschnitt 2.2.1.3.). Die Transkriptionsfaktoren *gsc* und *Mix.1* reprimieren ebenfalls *Xbra* (Artinger et al., 1997; Latinkic et al., 1997; Lemaire et al. 1998; Latinkic and Smith, 1999) und sind zusammen an der Etablierung des Separationsverhaltens des anterioren Mesoderms beteiligt (Wacker et al., 2000). Folglich haben diese an der Kontrolle des

Separationsverhaltens beteiligten Faktoren die Gemeinsamkeit, *Xbra* zu reprimieren. So stellt sich die Frage, ob die Repression von *Xbra* notwendig ist für die Etablierung des Separationsverhaltens.

Deshalb wurde untersucht, ob das Separationsverhalten durch die Injektion von *Xbra*-mRNA, die einer nicht durch *Xsna* transkriptionell regulierbaren Expression entspricht, verlorenght. Diese ektopische Expression von *Xbra* führt jedoch nicht zu einem Verlust des Separationsverhaltens, das in animalen Kappen durch *Xsna* und bFGF hervorgerufen wurde. Man beobachtet eine Zunahme des Effektes, die aber nicht signifikant ist ($p > 0,05$; Abb. 16). Folglich ist die Repression von *Xbra* für das Separationsverhalten nicht notwendig.

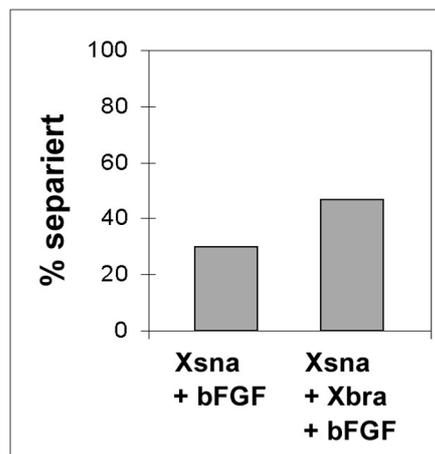


Abb. 16: Das Separationsverhalten von *Xsna* und FGF in Verbindung mit transkriptionell nicht regulierbarem *Xbra*.

Testaggregate wurden auf abstoßende Blastocoeldächer des Stadiums 10+ bis 10,5 gelegt. Die RNAs wurden im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert (*Xsna*: 2000pg; *Xbra*: 500pg). Die bFGF-Induktion der animalen Kappen wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt.

Xsna+bFGF: 30% separiert (n=33); **Xsna+Xbra+bFGF:** 47% separiert (n=32).

2.2.1.6. Die Effekte von *Xfz7* und *Xsna* auf das Separationsverhalten sind voneinander unabhängig

Für eine Komponente des Wnt-Signalweges wurde gezeigt, daß sie eine wichtige Rolle für die Gewebstrennung in *Xenopus* spielt. Der *Xenopus* Frizzled 7-Rezeptor

(*Xfz7*) ist sowohl hinreichend als auch notwendig für das Separationsverhalten des involutierten Mesoderms (Medina et al., 2000; Sumanas et al., 2000; Winklbauer et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor *Xsna* ist ebenfalls hinreichend dieses Verhalten auszulösen (Abschnitt 2.2.1.3.). Die Überexpression beider Gene einzeln führt jeweils zu einem schwachen Effekt. In Verbindung mit bFGF wird jedoch jeweils deutliches Separationsverhalten erkennbar (Abschnitt 2.2.1.3.; Winklbauer et al., 2001). Neben diesen Gemeinsamkeiten besteht auch Ähnlichkeit im Expressionsmuster von *Xfz7* und *Xsna*. So werden beide Gene im involutierten Mesoderm exprimiert (Medina et al., 2000; Djiane et al., 2000; Essex et al., 1993). Es wurde untersucht, ob diese Übereinstimmungen in Funktion und Expression darin begründet liegen, daß beide Faktoren Mitglieder eines gemeinsamen Signalweges sind und sich entsprechend transkriptionell regulieren.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung, wurde die RT-PCR als Methode verwendet. Die mit ihr gewonnenen Ergebnisse sind semiquantitativ, so daß nur starke Unterschiede in der Intensität der Banden für vielversprechend erachtet werden. Berücksichtigt man dies, ist sie trotzdem geeignet, die Regulation von Genen zu untersuchen, da mit ihr die Beteiligung von *Xsna* an der Regulation von *Xbra* gezeigt werden konnte, was sich schließlich auch mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung eindeutig bestätigen ließ (Abschnitt 2.2.3.2.).

Würde *Xsna* im Signalweg oberhalb von *Xfz7* angesiedelt sein und darüber das Separationsverhalten kontrollieren, so wäre folgendes zu erwarten: Die Überexpression von *Xsna* (alleine und in Verbindung mit bFGF) müßte einen Effekt auf die *Xfz7*-Transkription haben. Und zwar ist mit einer Zunahme der Transkription zu rechnen, da die Überexpression beider Gene einzeln zu einem Anstieg des Separationsverhaltens führt. FGF alleine sollte zu keiner Veränderung der *Xfz7*-Transkription führen. Diese Erwartungen werden jedoch nicht erfüllt. *Xsna* alleine und in Verbindung mit bFGF führt in der animalen Kappe zu keiner Erhöhung der *Xfz7*-Expression (Abb. 17A).

Alternativ könnte *Xfz7* im Signalweg oberhalb von *Xsna* liegen. Folglich wäre bei einer Überexpression von *Xfz7* analoges bezüglich der *Xsna*-Transkription zu erwarten. Dies bestätigt sich jedoch auch nicht, da auch hier keine deutliche Erhöhung der *Xsna*-Expression beobachtet wird (Abb. 17B).

Es ist also unwahrscheinlich, daß die Effekte von *Xsna* und *Xfz7* auf das Separationsverhalten voneinander abhängig sind.

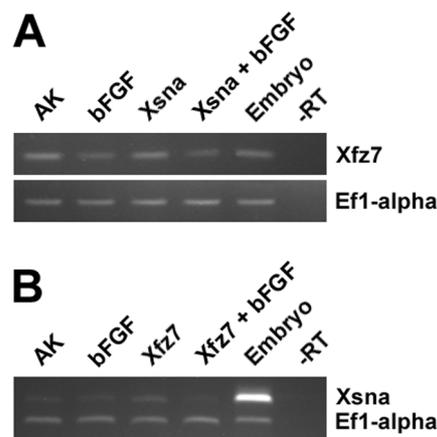


Abb. 17: Untersuchung der Abhängigkeit von Xsna und Xfz7.

RT-PCR animaler Kappen (AK) des Stadiums 10. Es wurden 2000pg *Xsna*-RNA (A) und 150pg *Xfz7*-RNA (B) im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert. Die bFGF-Induktion wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten ganze Embryonen des selben Stadiums. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne vorherige Reverse Transkription (-RT). Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als Quantitätskontrolle der PCR amplifiziert.

2.2.1.7. *Drosophila snail* löst in *Xenopus* kein Separationsverhalten aus

Durch *Xsna* konnte in der animalen Kappe von *Xenopus* deutliches Separationsverhalten hervorgerufen werden (Abschnitt 2.2.1.3.). Nun wird untersucht, ob das *Drosophila*-Homolog dieselbe Eigenschaft im *Xenopus*-Kontext zeigt.

Die ektopische Expression von *Drosophila snail* (*sna*) in der animalen Kappe von *Xenopus* führt zwar zu einer leichten Erhöhung des Separationsverhaltens (Abb. 18A), die jedoch nicht signifikant ist ($p > 0,05$). Auch eine zusätzliche Induktion mit bFGF führt nicht zu einem Anstieg des Separationsverhaltens, wie es in Verbindung mit *Xsna* beobachtet wurde. Im Gegenteil, die bFGF-Induktion führt dazu, daß das durch *sna* hervorgerufene geringe Separationsverhalten reduziert wird ($p < 0,05$). Folglich kann *sna* weder alleine, noch in Verbindung mit bFGF deutliches Separationsverhalten in animalen Kappen von *Xenopus* hervorrufen.

Anschließend wurde die Wirkung von *sna* auf Activin-induziertes Separationsverhalten untersucht. Da trotz Gleichbehandlung bei verschiedenen Gelegen stark abweichende Effekte durch Activin zu beobachten waren (siehe

Abschnitt 2.2.1.4.), wurden die entsprechenden Ansätze (Abb. 18B, D) wieder parallel durchgeführt. Das durch Activin induzierte deutliche Separationsverhalten wird durch die ektopische Expression von *sna* deutlich reduziert (Abb. 18B). Dieser Effekt ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

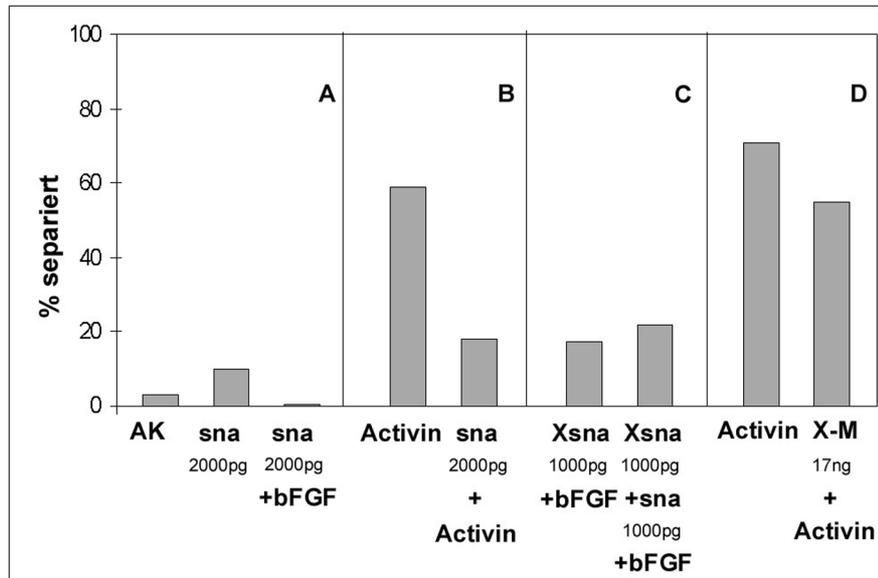


Abb. 18: Die Wirkung von *Drosophila snail* auf das Separationsverhalten in *Xenopus*. Testaggregate wurden auf abstoßende Blastocoeldächer des Stadiums 10+ bis 10,5 gelegt. Die RNA und Morpholinos wurden im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert. Die Mengenangaben gelten pro Blastomere. Die bFGF- und Activin-Induktion der animalen Kappen wurden ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Nach 45 Minuten wurde der Anteil der Aggregate bestimmt, der vom Substrat abgegrenzt blieb. Dieser Anteil ist prozentual dargestellt.

(A): AK (animale Kappe): 3% separiert (n=38); **sna 2000pg** (*Drosophila snail*): 10% separiert (n=31); **sna 2000pg+bFGF**: 0% separiert (n=53).

(B): **Activin**: 59% separiert (n=49); **sna 2000pg+Activin**: 18% separiert (n=51).

(C): **Xsna 1000pg+bFGF**: 17% separiert (n=69); **Xsna 1000pg+sna 1000pg+bFGF**: 22% separiert (n=49).

(D): **Activin**: 71% separiert (n=38); **X-M** (Xsna-Morpholino) **17ng+Activin**: 55% separiert (n=38).

Activin induziert die Expression von *Xsna* (Sargent and Bennett, 1990) und beide lösen in animalen Kappen deutliches Separationsverhalten aus (Abschnitt 2.2.1.3.). Deshalb ist denkbar, daß das durch Activin induzierte Separationsverhalten teilweise oder auch vollständig durch *Xsna* vermittelt wird. Setzt man dies einmal theoretisch voraus, so könnte man den gezeigten Effekt von *sna* auf das Activin-induzierte Separationsverhalten durch eine Störung der Wirkung von *Xsna* erklären. *Sna* ist anscheinend nicht so stark konserviert, daß es deutliches Separationsverhalten in

Xenopus auslösen kann (Abb. 18A). Möglicherweise reicht die Konservierung aber aus, um im Überschuß *Xsna* kompetitiv inhibieren zu können. *Sna* bewirkt jedoch keine Reduzierung des durch *Xsna* und bFGF hervorgerufenen Separationsverhaltens (Abb. 18C), wie man es bei einer kompetitiven Inhibition erwarten würde. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Reduktion des Activin-induzierten Separationsverhaltens durch *sna* nicht auf eine Störung der Wirkung von *Xsna* zurückzuführen ist.

Die im vorigen Absatz theoretisch vorausgesetzte Beteiligung von *Xsna* an dem Activin-induzierten Separationsverhalten wird anschließend untersucht. Dazu wurde die *Xsna*-Translation durch die Injektion von Morpholinos (Antisense-Oligonucleotide mit modifiziertem Phosphatrückgrad) spezifisch inhibiert (siehe Material und Methoden). Das Prinzip der Translationsinhibition besteht darin, daß ein Morpholino verwendet wird, der am Translationsstart der *Xsna*-mRNA bindet und dadurch die Translation verhindert. Die Inhibition der *Xsna*-Translation führt jedoch nur zu einer leichten und nicht signifikanten Reduktion ($p > 0,05$) des Activin-induzierten Separationsverhaltens (Abb. 18D). Dieses Ergebnis spricht folglich dafür, daß *Xsna* nicht an der Etablierung des Activin-induzierten Separationsverhaltens beteiligt ist.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß *Drosophila snail* weder alleine noch mit bFGF in der animalen Kappe von *Xenopus* Separationsverhalten auslösen kann. Auf das Activin-induzierte Separationsverhalten wirkt *sna* stark reduzierend. Dieser Effekt kommt aber nicht durch eine kompetitive Inhibition von *Xsna* zustande.

2.2.1.8. Der Einfluß von *Xsna* und bFGF auf die Zell-Zell-Adhäsion

Es ist auffällig, daß starkes Separationsverhalten mit einer relativ niedrigen Zell-Zell-Adhäsion korreliert ist. So besitzt (1.) das separierende involutierte Mesoderm eine geringere Zell-Zell-Adhäsion als das nicht separierende Ektoderm (Abschnitt 2.1.5.; Abschnitt 2.1.6.; Davis et al., 1997). Bei der Mesoderminduktion durch Activin wird (2.) starkes Separationsverhalten induziert und gleichzeitig die Zell-Zell-Adhäsion deutlich reduziert (Abschnitt 2.2.1.3.; Briehar and Gumbiner, 1994). Durch eine Erhöhung der Adhäsion im Activin-induzierten Mesoderm geht (3.) das Separationsverhalten verloren (Wacker et al., 2000). Auf der anderen Seite kann es

(4.) in Zellen der animalen Kappe alleine durch eine Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion hervorgerufen werden (Wacker et al., 2000). Folglich können die in Abschnitt 2.2.1.3. beschriebenen Effekte von *Xsna* und bFGF auf das Separationsverhalten durch eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion bewirkt werden.

Zunächst wurde der Zell-Zell-Adhäsionstest nach Briehar und Gumbiner (1994) angewandt, um diese Fragestellung zu untersuchen. Hierbei werden Einzelzellen unter Standardbedingungen reaggregiert, und der zeitliche Verlauf der Reaggregation verfolgt. Adhäsivere Zellen bilden dabei schneller größere Aggregate als weniger adhäsive Zellen. Die bereits gezeigte Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion durch Activin (Briehar and Gumbiner, 1994) konnte mit diesem Reaggregationstest bestätigt werden (Abb. 19A, E). Zellen der animale Kappe, die ektopisch *Xsna* exprimieren (Abb. 19B) und solche, die mit bFGF induziert wurden (Abb. 19C), besitzen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 19A) eine leicht reduzierte Zell-Zell-Adhäsion. *Xsna*-exprimierende und zusätzlich bFGF-induzierte Zellen (Abb. 19D) zeigen eine deutliche Verringerung der Zell-Zell-Adhäsion, die fast vergleichbar ist mit dem Effekt von Activin (Abb. 19E).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine neue Variante des Zell-Zell-Adhäsionstests entwickelt. Hierbei werden Aggregate der gleichen Größe bei gleicher Scherkraft dissoziiert, so daß Aggregate adhäsiverer Zellen langsamer zerfallen als Aggregate weniger adhäsiver Zellen. Diese Methode bietet den Vorteil, daß nur wenige Zellen pro Ansatz benötigt werden, so daß er bequem für die Untersuchung kleiner Regionen verwendet werden kann (siehe auch Abschnitt 2.1.6.). Mit Hilfe des Dissoziationstests lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen (Abb. 19F), *Xsna*-exprimierenden Zellen (Abb. 19G) und bFGF-induzierten Zellen (Abb. 19H) erkennen. Die bereits im Reaggregationstest beobachtete Reduktion der Adhäsion bFGF-induzierter und zusätzlich *Xsna*-exprimierender Zellen wird auch im Dissoziationstest deutlich (Abb. 19I). Durch zusätzliche Expression des ubiquitär vorkommenden Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls *EP/C-Cadherin* (Angres et al., 1991; Ginsberg et al., 1991), steigt die Adhäsion auf das Niveau unbehandelter Zellen an (Abb. 19J). Der Effekt von *Xsna* in Verbindung mit bFGF kann also durch EP/C-Cadherin rückgängig gemacht werden. Zusammenfassend läßt sich folglich feststellen, daß auch für *Xsna* in Verbindung mit bFGF eine Korrelation zwischen stark ausgeprägtem Separationsverhalten und deutlich reduzierter Zell-Zell-Adhäsion besteht.

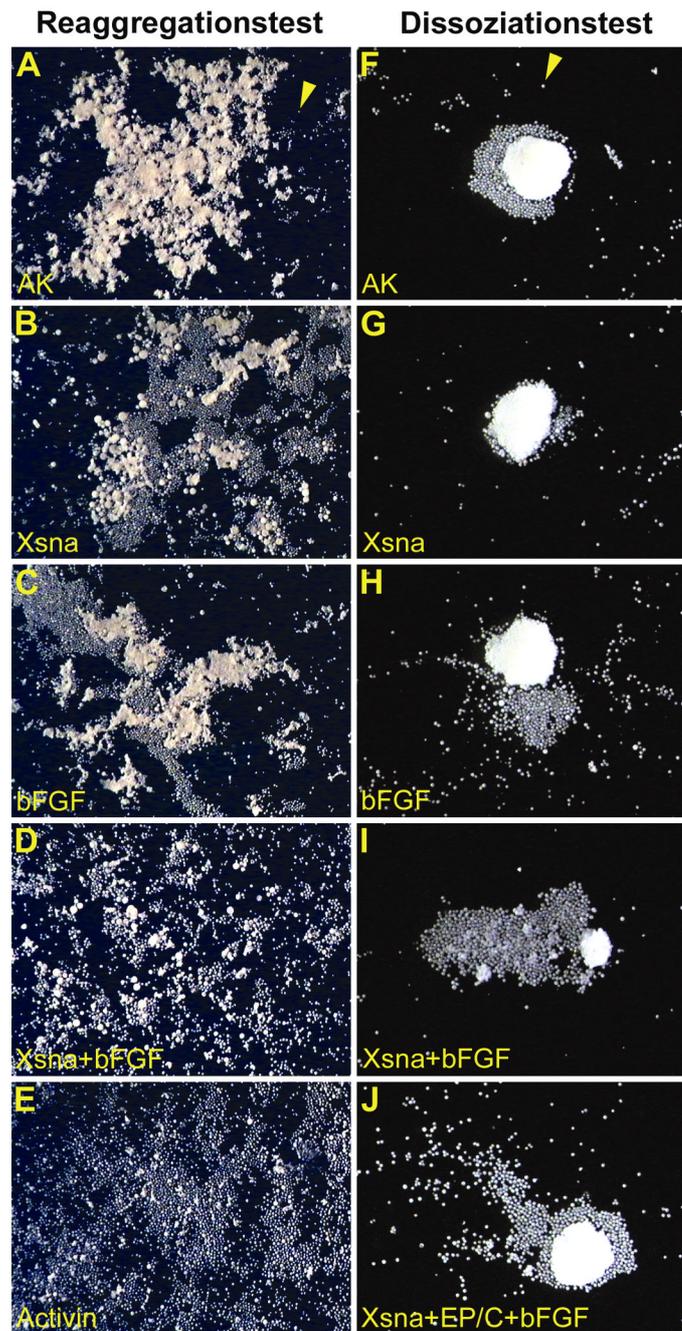


Abb. 19: Der Einfluß von Xsna und bFGF auf die Zell-Zell-Adhäsion.

A-E: Reaggregationstest: Animale Kappen werden in Kalzium-und-Magnesium-freiem Medium dissoziiert. Die Einzelzellen werden nach Zugabe von Kalzium bei gleicher Scherkraft reaggregiert. Hierbei bilden adhäsivere Zellen schneller größere Aggregate als weniger adhäsive Zellen.

F-J: Dissoziationstest: Gleich große Aggregate werden aus animalen Kappen bei gleicher Scherkraft in Kalzium-und-Magnesium-freiem Medium dissoziiert. Die Aggregate adhäsiverer Zellen zerfallen langsamer als Aggregate weniger adhäsiver Zellen.

(A, F): unbehandelte animale Kappe; (B, G): 2000pg Xsna-RNA wurde pro animale Blastomere im Stadium 4 injiziert; (C, H): ab dem Stadium 8 wurde die animale Kappe für 1,5 h mit bFGF induziert; (D, I): es wurde sowohl wie bei (B, G) Xsna injiziert als auch wie bei (C, H) bFGF induziert; (E): ab dem Stadium 8 wurde die animale Kappe für 1,5 h mit Activin induziert; (J): die Kappen wurden behandelt wie (D, I) und zusätzlich 300pg *EP/C-Cadherin*-RNA injiziert.

Pfeilspitze: Einzelzelle

2.2.2. Die Überexpression von *Xsna* führt zu einer vorzeitigen Auslösung der Vegetalen Rotation auf der Ventralseite

Neben der starken Expression von *Xsna* im Mesoderm, wird dieser Transkriptionsfaktor auch schwächer im Endoderm der Gastrula exprimiert (Sargent and Bennett, 1990; Essex et al., 1993). Es hat sich gezeigt, daß die Zellen des Endoderms eine wichtige Rolle bei der Internalisierung während der Gastrulation spielen (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). So findet im Endoderm die Vegetale Rotation statt (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Bei dieser Gastrulationsbewegung werden die Zellen des Blastocoelbodens in radialer Richtung zur Peripherie bewegt, bis sie dort auf das Blastocoeldach treffen und sich zwischen ihnen und dem Dach der Brachet'sche Spalt bildet (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Die Vegetale Rotation beginnt dorsal und breitet sich anschließend über beide Seiten des Embryos aus, bis sie auf der Ventralseite angekommen ist (Winklbauer and Schürfeld, 1999). Für *Xsna* wurde gezeigt, daß sich die Expression ebenfalls von dorsal nach ventral ausbreitet (Sargent and Bennet, 1990). Deshalb wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen *Xsna*-Expression und Vegetaler Rotation besteht. Wenn dem so wäre, dann sollte eine frühzeitige *Xsna*-Überexpression auf der Ventralseite dort die Vegetale Rotation vorzeitig auslösen.

Dazu wurde zunächst die Bewegung der Blastocoelbodenzellen untersucht, nachdem das Blastocoeldach entfernt wurde. In den ersten 30 Minuten der Gastrulation zeigt ein Kontrollembryo im gesamten Blastocoelboden geringe Bewegungen (Abb. 20A oben). Nur dorsal und ventrolateral ist jeweils ein Bereich zu erkennen, in dem eine leicht verstärkte Zellbewegung stattfindet, die meist radial in Richtung der Peripherie verläuft (Abb. 20A oben). Im Vergleich dazu führt die Überexpression von *Xsna* auf der Ventralseite dort zu einer deutlich stärkeren Bewegung der Zellen, die zunächst jedoch noch relativ ungeordnet erscheint (Abb. 20A unten). So wechseln einige Zellen von einer zuerst nach innen gerichteten Bewegung doch noch die Richtung (Abb. 20A unten).

Im folgenden Halbstunden-Intervall ist im Kontrollembryo eine starke Bewegung auf der dorsalen Seite zu sehen, wohingegen in der ventralen Hälfte kaum Zellbewegungen stattfinden (Abb. 20B oben). Ventral führt die Überexpression von

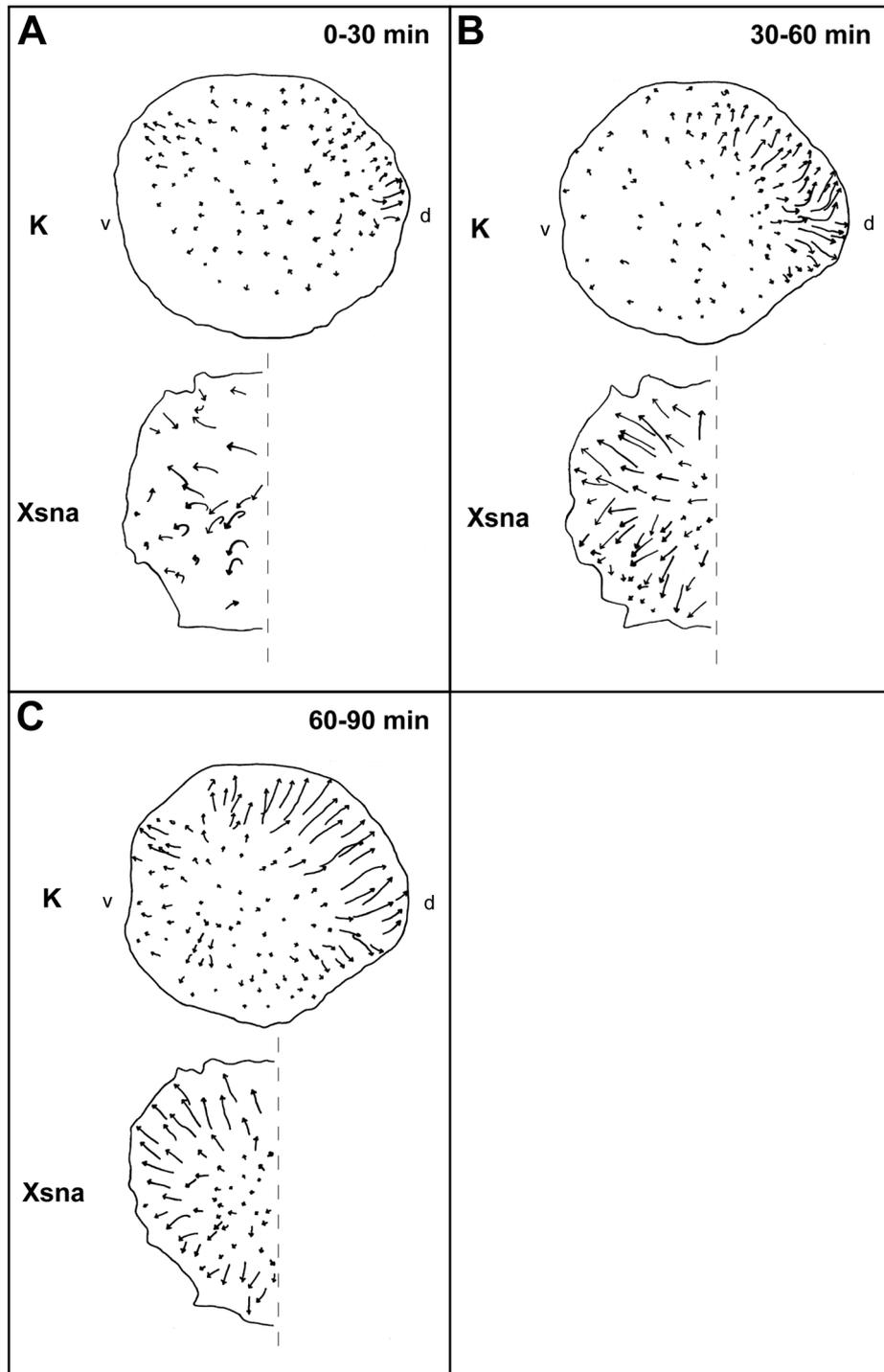


Abb. 20: Der Einfluß von Xsna auf die Bewegung der Zellen des Blastocoelbodens. Unmittelbar nach Gastrulationsbeginn wurde das Blastocoeldach auf Höhe des Blastocoelbodens entfernt und dieser unter Zeitraffung gefilmt. Der Blastocoelboden wird von animal betrachtet dargestellt. Die Bewegung einzelner Blastocoelbodenzellen wird für die angegebenen Zeitintervalle (A-C) als Pfeil symbolisiert. K: Blastocoelboden eines Kontrollembryos; Xsna: ventrale Hälfte des Blastocoelbodens eines Embryos, in dessen ventrale Blastomeren des Stadiums 4 *Xsna*-RNA (2000pg / Blastomere) injiziert wurde; d: dorsal; v: ventral; Ventral ist immer links. Die Abbildungen des Kontrollembryos (A-C oben) stammen von R. Winklbauer.

Xsna nun zu starken Zellbewegungen, wobei die zurückgelegte Strecke teilweise größer ist als auf der Dorsalseite des Kontrollembryos beobachtet wurde (Abb. 20B). Die durch *Xsna* hervorgerufene Zellbewegung verläuft jetzt auch radial in typischer Richtung (Abb. 20B unten).

Während des letzten untersuchten Halbstunden-Intervalls ist die Vegetale Rotation des Kontrollembryos kurz davor die Ventralseite zu erreichen (Abb. 20C oben). In diesem Embryo hat die Ausbreitung bisher nur über eine Seite stattgefunden. Eine nicht symmetrische Ausbreitung wird jedoch häufiger beobachtet (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Auf der Ventralseite hat die Überexpression von *Xsna* immer noch eine deutlich stärkere Zellbewegung bewirkt, als sie auf der Ventralseite des Kontrollembryos beobachtet wird (Abb. 20C).

Folglich kann die Vegetale Rotation auf der Ventralseite durch eine frühzeitige Überexpression von *Xsna* vorzeitig ausgelöst werden.

Die Zellbewegungen der Vegetalen Rotation können auch in einem sagittalen Scheibchen untersucht werden (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Daher wird dies für Embryonen, auf deren ventraler Seite *Xsna* überexprimiert wird, durchgeführt und mit Kontrollembryonen verglichen. In einem Scheibchen eines Kontrollembryos herrscht im ersten Zeitintervall eine in das Zentrum gerichtete Zellbewegung vor, die hauptsächlich ventral auftritt (Abb. 21A). Erst in den darauffolgenden Zeitintervallen nimmt diese Einwärtsbewegung ab, so daß sich ventral kaum noch Zellen bewegen (Abb. 21B-D). Dafür beginnen die Zellen der Dorsalseite mit einer zur Peripherie gerichteten Bewegung (Abb. 21B-D).

Ein sagittales Scheibchen aus einem Embryo, auf dessen Ventralseite *Xsna* überexprimiert wurde, zeigt im ersten untersuchten Zeitintervall ventral kaum Einwärtsbewegung (Abb. 21E). Es dominiert zunächst eine leichte Bewegung der dorsalen Zellen, die zur Peripherie gerichtet ist (Abb. 21E). In den darauffolgenden Zeitintervallen nimmt diese Bewegung der Dorsalseite zu (Abb. 21F-H). Nahezu im gleichen Maße beginnen aber auch die Zellen der Ventralseite mit dieser zur Peripherie gerichteten Bewegung (Abb. 21F-H).

Die durch eine *Xsna*-Überexpression hervorgerufene vorzeitige Auslösung der Vegetalen Rotation auf der Ventralseite wird also erwartungsgemäß auch im sagittalen Scheibchen beobachtet.

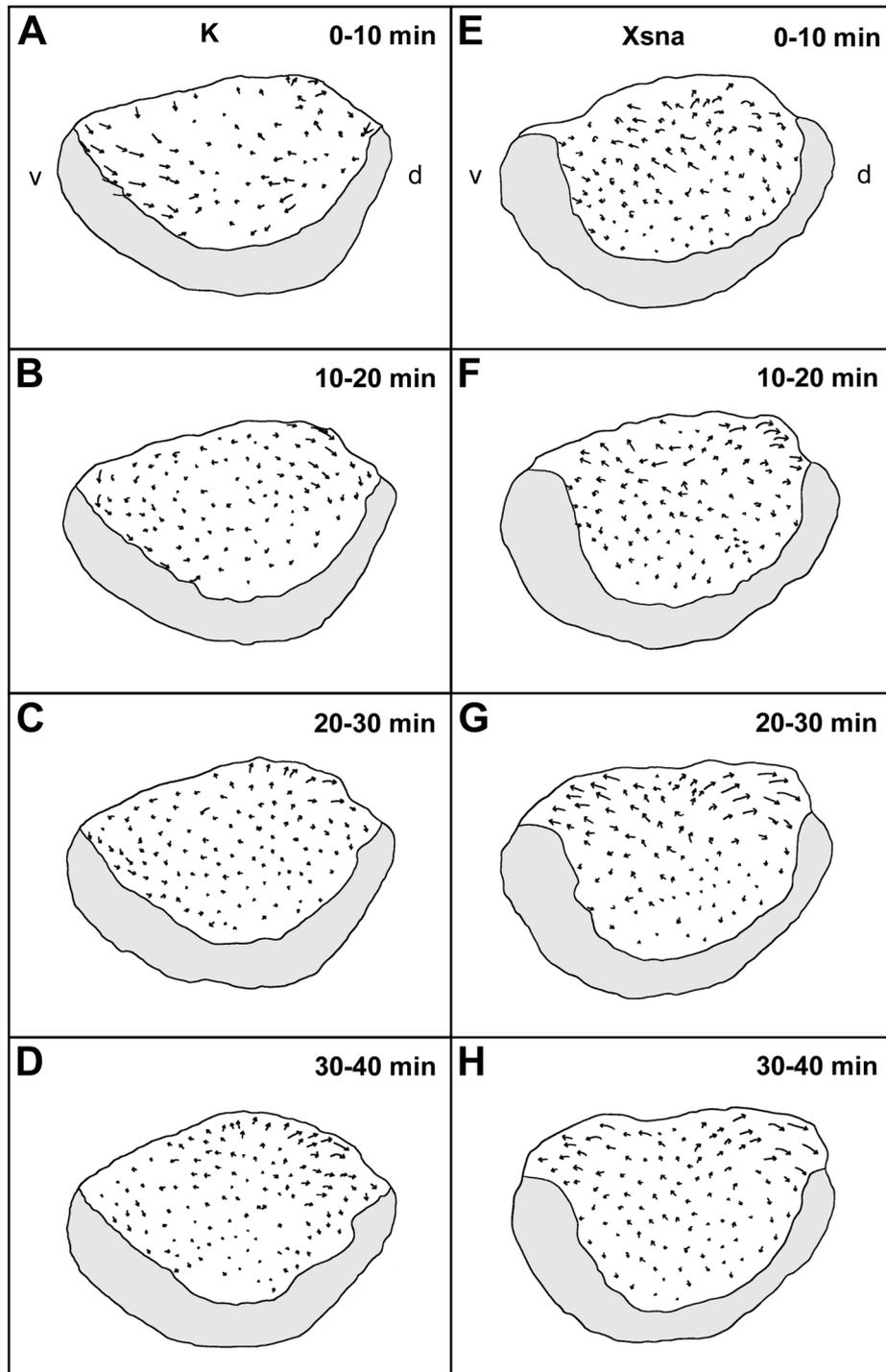


Abb. 21: Der Einfluß von Xsna auf die Bewegung der Zellen des Blastocoelbodens untersucht in einem sagittalen Scheibchen.

Im Stadium 4 wurde in jede ventrale Blastomere *Xsna*-RNA (2000pg / Blastomere) injiziert. Unmittelbar nach Gastrulationsbeginn wurde das Blastocoeldach nicht-injizierter (A-D) und injizierter (E-H) Embryonen auf Höhe des Blastocoelbodens entfernt. Aus dem verbleibenden Teil des Embryos wurde mittig ein sagittales Scheibchen herausgeschnitten und unter einem Deckgläschen kultiviert. Dieses Scheibchen wird von sagittal betrachtet dargestellt, so daß der Blastocoelboden oben ist. Die Bewegung einzelner Zellen wird für die angegebenen Zeitintervalle als Pfeil symbolisiert. Die graue Fläche soll die epitheliale Schicht darstellen. Ventral ist immer links. d: dorsal; v: ventral.

Die dieser Abbildung zugrundeliegenden Versuche wurden im Rahmen eines Praktikums von M. Kordhals unter meiner Anleitung durchgeführt.

2.2.3. Die Rolle von Xsna in Genexpressionskontrolle und Achsenbildung

2.2.3.1. Xtwi bewirkt keine Aktivierung der Xsna-Expression

Snail wird in *Drosophila* unter anderem durch den Transkriptionsfaktor *twist* aktiviert (Leptin, 1991; Ip et al., 1992a). Es ist zwar für *Xenopus* gezeigt, daß die *Xsna*-Expression durch die Mesoderminduktoren bFGF und Activin induziert werden kann (Sargent and Bennett, 1990), trotzdem erscheint eine Beteiligung des *twist*-Homologs in *Xenopus* (*Xtwi*) an der Regulation von *Xsna* möglich (Hopwood et al., 1998; Stoetzel et al., 1998).

Deshalb wird untersucht, ob die ektopische Expression von *Xtwi* in animalen Kappen zu einer Erhöhung der *Xsna*-Transkription führt. Dies konnte nicht beobachtet werden (Abb. 22). Folglich erscheint eine Beteiligung von *Xtwi* an der Regulation der *Xsna*-Expression unwahrscheinlich.

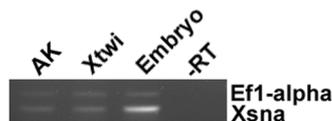


Abb. 22: Untersuchung einer möglichen Aktivierung von *Xsna* durch *Xtwi*.

RT-PCR animaler Kappen (AK) des Stadiums 10. Die *Xtwi*-RNA wurde im Stadium 4 in die animalen Blastomeren (500pg / Blastomere) injiziert. Als Positivkontrolle dienten ganze Embryonen des selben Stadiums. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne vorherige Reverse Transkription (-RT). Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als Quantitätskontrolle der PCR amplifiziert.

2.2.3.2. Xsna ist sowohl hinreichend als auch notwendig für die Repression von Xbra

In Abschnitt 2.2.1.1. wurde gezeigt, daß sich die *Xsna*-Expression in kultivierten Explantaten der Ventralseite während der Gastrulation fortschreitend in das Blastocoeldachmesoderm ausbreitet (Abb. 12). Nach einer Kultivierung bis zum Neuralplattenstadium (Stadium 14) hatte sich außerdem die Fläche der *Xbra*-

Expressionsdomäne im Vergleich zu vorher verkleinert (Abb. 12D). Zwar schien die Expression noch im ehemaligen Blastocoeldach zu persistieren, aber nicht mehr in der ehemals *Xbra*-positiven Oberlippe. Möglicherweise wurde *Xbra* in diesem Bereich reprimiert. Als Repressor kommt *Xenopus snail* in Frage, da (1.) das Homolog in *Drosophila* und dem Urochordaten *Ciona* als Repressor wirkt (Ip et al., 1992b; Gray et al., 1994; Gray and Levine, 1996; Fujiwara et al., 1998), (2.) *Xsna* dazu rechtzeitig in der Oberlippe exprimiert wird und (3.) gezeigt wurde, daß bei *Ciona Brachyury* ein direktes Zielgen des snail-Repressors ist (Fujiwara et al., 1998). Deshalb wurde zunächst in animalen Kappen untersucht, ob auch *Xenopus Brachyury* durch *Xenopus snail* reprimierbar ist. *Xbra* wird in der animalen Kappe so schwach exprimiert, daß man mittels *in situ* Hybridisierung keine Markierung erkennt (Abb. 4), durch RT-PCR können aber sehr schwach Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 23A). *Xbra* kann erwartungsgemäß in animalen Kappen durch den Mesoderminduktor bFGF induziert werden (Abb. 23A). Hierfür ist keine Proteinsynthese notwendig, so daß es sich um einen unmittelbaren und frühen („immediate early“) Effekt der Induktion handelt (Smith et al., 1991). Durch ektopische Expression des Transkriptionsfaktors *Xsna*, wird die *Xbra*-Expression in bFGF-induzierten Kappen stark reduziert (Abb. 23A). Die basale Expression in uninduzierten Kappen kann jedoch nicht durch *Xsna* reprimiert werden (Abb. 23A). Anschließend wurde untersucht, ob *Xsna* auch die *Xbra*-Expression im endogenen Mesoderm reprimieren kann. Durch die Überexpression von *Xsna* im ventralen Mesoderm wird die sonst ringförmige *Xbra*-Markierung (Abb. 23B) unterbrochen (Abb. 23D) und es kommt zu einem vollständigen Verlust der Färbung auf der Ventralseite (vergleiche auch Abb. 23C mit Abb. 23E). Auch auf der Dorsalseite kann ein Effekt durch die Überexpression von *Xsna* beobachtet werden. In seltenen Fällen kommt es wie ventral zu einem vollständigen Verlust der *Xbra*-Expression (vergleiche Abb. 23F rechts mit Abb. 23B). Die Abwesenheit von *Xbra* in den inneren Zellen wurde durch das Aufbrechen des Embryos bestätigt (nicht gezeigt). Zumeist ist aber nur der vegetale Bereich der *Xbra*-Expressionsdomäne durch *Xsna* reprimiert, so daß dorsal eine schmalere Markierung zurückbleibt (vergleiche Abb. 23F links mit Abb. 23B). Die verbleibende Markierung wird in den inneren und epithelialen Zellen beobachtet (nicht gezeigt).

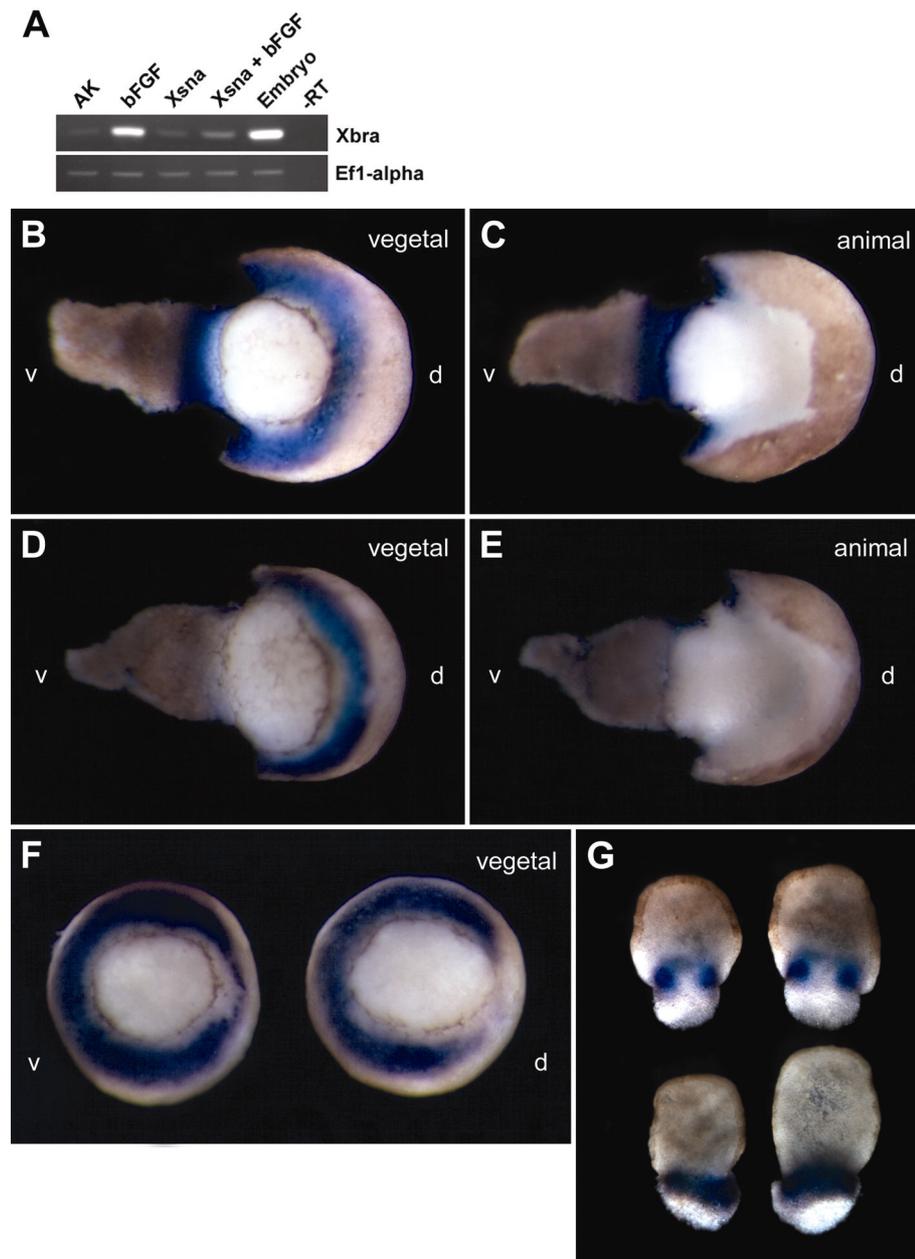


Abb. 23: Die Wirkung von Xsna auf die *Xbra*-Expression.

A: RT-PCR animaler Kappen (AK) des Stadiums 10.

Die *Xsna*-RNA wurde im Stadium 4 in die animalen Blastomeren (2000pg / Blastomere) injiziert. Die bFGF-Induktion wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten ganze Embryonen des selben Stadiums. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne vorherige Reverse Transkription (-RT). Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als Quantitätskontrolle der PCR amplifiziert.

B-F: *In situ* Hybridisierung des Stadiums 10,5 zum Nachweis von *Xbra*-Transkripten.

Im Stadium 4 wurden je 2000pg *Xsna*-RNA in die ventralen (D, E) oder dorsalen (F) Blastomeren injiziert. (B, C) zeigen uninjizierte Kontrollembryonen. Bei einigen Embryonen wurde das Blastocoeldach ventral weggeklappt (B-E). Die Embryonen werden von vegetal (B, D, F) bzw. animal (C, E) betrachtet. Ventral ist links; d: dorsal; v: ventral.

G: *In situ* Hybridisierung an ventralen Explantaten zum Nachweis von *Xbra*-Transkripten.

Im Stadium 4 wurden je 17ng *Xsna*-Morpholino in die ventralen Blastomeren injiziert. Im Stadium 10,5 wurde die ventrale marginale Zone injizierter Embryonen (untere Reihe) und nicht injizierter Embryonen (obere Reihe) isoliert, für 5h kultiviert und hybridisiert. Die vegetale Schnittkante entlang der Flaschenzellen ist unten.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß *Xsna* hinreichend ist, sowohl bFGF-induziertes *Xbra* der animalen Kappe, als auch *Xbra* des endogenen Mesoderms der Dorsal- und Ventralseite zu reprimieren.

So stellt sich als nächstes die Frage, ob *Xsna* auch für die Repression von *Xbra* in den involutierten Zellen notwendig ist. Hierfür bieten kultivierte ventrale Explantate ein ideales Testsystem, da sich die Expressionsdomänen von *Xbra* und *Xsna* wie im Embryo verhalten, wobei *Xsna* sich in das Blastocoeldachmesoderm ausbreitet und *Xbra* in der Oberlippe verschwindet (Abschnitt 2.2.1.1.). Die Untersuchung der Explantate besitzt gegenüber dem Embryo den Vorteil, daß keine für die Interpretation störende Involutionsbewegung stattfindet. Erste deutlich erkennbare Anzeichen der *Xbra*-Repression werden in ventralen Explantaten sichtbar, die bis zum Neuralplattenstadium (Stadium 14) kultiviert werden (Abb. 12D). Nun wird untersucht, ob dieser Effekt auch auftritt, wenn spezifisch die *Xsna*-Translation durch die Injektion von Morpholinos inhibiert wird.

Die *Xbra*-Expressionsdomäne der mittleren Gastrula liegt ringförmig um den Blastoporus herum (Abb. 23B). Folglich besitzen ventrale Kontrollexplantate zunächst eine ununterbrochene *Xbra*-Expressionsdomäne (nicht gezeigt). Werden diese Kontrollexplantate bis zum Neuralplattenstadium kultiviert, so ist eine Lücke in der ehemals durchgängigen *Xbra*-Expressionsdomäne entstanden (Abb. 23G obere Reihe). Diese Zone, in der keine *Xbra*-Expression zu erkennen ist, tritt nicht in Explantaten auf, in denen spezifisch die *Xsna*-Translation inhibiert wurde (Abb. 23G untere Reihe). Folglich ist der Transkriptionsfaktor *Xsna* nicht nur hinreichend für die Repression von *Xbra*, sondern auch auf der Ventralseite dafür notwendig.

2.2.3.3. Der an Gewebstrennung beteiligte Eph-Rezeptor EphA4 wird durch *Xsna* reguliert

Durch Überexpression von *Xsna* wird im Explantat und im Embryo das Abstoßungsverhalten reduziert (Abschnitt 2.2.1.2.). Außerdem wird durch ektopische Expression von *Xsna* in Explantaten Separationsverhalten erzeugt (Abschnitt 2.2.1.3.). Das legt nahe, daß *Xsna* eine Rolle bei der Gewebstrennung in der

Xenopus Gastrula spielt. Da *Xsna* als Transkriptionsfaktor wirkt, muß es die obengenannten Effekte durch die Regulation entsprechender Zielgene hervorrufen. Deshalb wird als nächstes für ausgewählte Kandidaten untersucht, ob sie durch *Xsna* reguliert werden. Als Kriterium für die Auswahl wurde eine zu *Xsna* räumlich und zeitlich passende Expression berücksichtigt, sowie zusätzlich eine vermutete bzw. gezeigte Rolle bei Gewebstrennung oder der Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion in anderen Systemen.

So ist die Gruppe der Eph-Rezeptoren in Verbindung mit ihren Liganden, den Ephrinen, an der Gewebstrennung während der Embryogenese beteiligt (Holder and Klein, 1999; Mellitzer et al., 2000). Für zwei der Mitglieder ist es unwahrscheinlich, daß sie durch *Xsna* reguliert werden. Hierzu gehört ***EphB4***, weil es im gesamten Embryo erst ab dem Neurulastadium exprimiert wird (Helbling et al., 1999) und das *ephrin-A1* verwandte ***Xelf-a***, da die Transkripte während der Gastrulation gleichmäßig im Embryo lokalisiert sind (Weinstein et al., 1996). Die restlichen in *Xenopus* bekannten Eph-Rezeptoren und Ephrine wurden daraufhin untersucht, ob sie durch *Xsna* reguliert werden. Hierzu gehören ***EphA2*** (*XE10*), ***EphA4*** (*Sek-1*, *Pagliaccio*), ***EphB1*** (*Xek*), ***EphB2***, ***EphB3*** (*TCK*), ***ephrin-B1*** (*Xlerk*), ***ephrin-B2*** und ***ephrin-B3*** (Winning and Sargent, 1994; Brändli and Kirschner, 1995; Jones et al., 1995b; Scales et al., 1995; Xu et al., 1995; Weinstein et al., 1996; Jones et al., 1997; Smith et al., 1997; Tanaka et al., 1998; Helbling et al., 1999). Für die mesodermal exprimierten Gene *EphA4* und *ephrin-B1* wurde zusätzlich gezeigt, daß ihre Überexpression in der animalen Kappe zu einem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt (Winning et al., 1996; Jones et al., 1998), was sie zu besonders interessanten Kandidaten macht.

Neben der Gruppe der Eph-Rezeptoren und Ephrine wurde die GTPase ***Xrnd1*** daraufhin untersucht, ob sie durch *Xsna* reguliert wird. Einerseits wird das Gen wie *Xsna* im involutierten Mesoderm der Gastrula exprimiert, andererseits führt eine Überexpression in der animalen Kappe zu einer deutlich verminderten Zell-Zell-Adhäsion (Wünneberg-Stapleton et al., 1999).

Zur Untersuchung, ob *Xsna* an der Regulation der Kandidaten beteiligt ist, wurde die RT-PCR als Methode verwendet. Die mit ihr gewonnenen Ergebnisse sind semiquantitativ, so daß nur starke Unterschiede in der Intensität der Banden für vielversprechend erachtet werden. Berücksichtigt man dies, ist sie trotzdem geeignet, die Regulation von Genen zu untersuchen, da mit ihr die Beteiligung von

Xsna an der Regulation von *Xbra* gezeigt werden konnte, was sich schließlich auch mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung eindeutig bestätigen ließ (Abschnitt 2.2.3.2.). Der Einfluß von Xsna auf die Transkription der ausgewählten Gene wurde in animalen Kappen, auch nach einer Induktion mit bFGF (Abb. 24A) und Activin (Abb. 24B), untersucht.

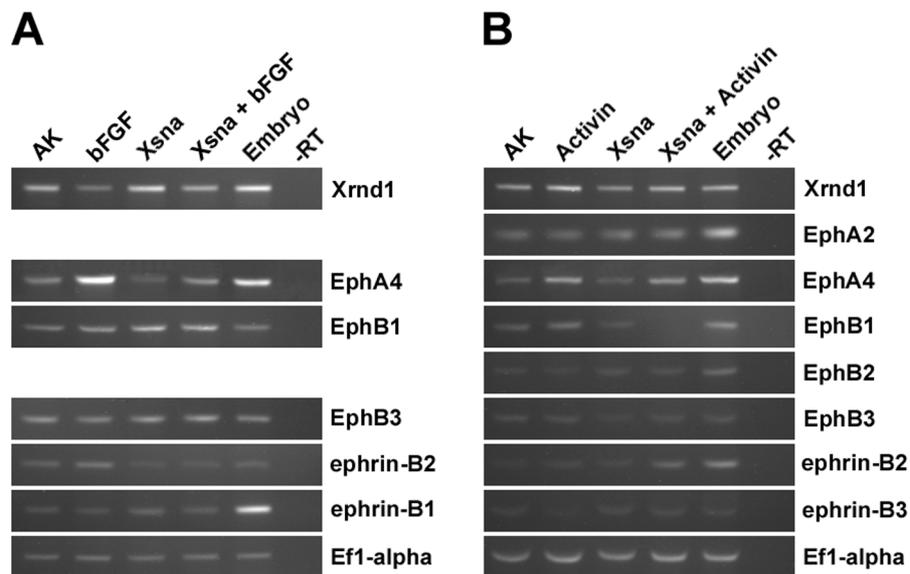


Abb. 24: Suche nach Genen, die an Gewebstrennung beteiligt sind und durch Xsna reguliert werden.

RT-PCR animaler Kappen (AK) des Stadiums 10. Die *Xsna*-RNA wurde im Stadium 4 in die animalen Blastomeren (2000pg / Blastomere) injiziert. Die bFGF-Induktion (A) und Activin-Induktion (B) der animalen Kappen wurden ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten ganze Embryonen des selben Stadiums. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne vorherige Reverse Transkription (-RT). Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als Quantitätskontrolle der PCR amplifiziert.

Der Eph-Rezeptor *EphA4* wird sowohl durch Activin, als auch durch bFGF induziert (Abb. 24A, B). Die Überexpression von *Xsna* führt zu keiner Veränderung der *EphA4*-Transkription in Activin-induzierten Kappen (Abb. 24B). Allerdings wird ein deutlicher Effekt von Xsna auf das bFGF-induzierte *EphA4* erkennbar. Die Überexpression von *Xsna* führt hier zu einer starken Reduktion der induzierten *EphA4*-Transkription auf ein Niveau vergleichbar mit der unbehandelten Kappe (Abb. 24A). Xsna bewirkt in nicht induzierten Kappen keine deutliche Reduktion der dort schon ohnehin schwachen *EphA4*-Expression (Abb. 24A, B).

Die restlichen Gene zeigen keine bzw. nur geringe Anzeichen für eine Regulation durch Xsna (Abb. 24A: *EphB1*, *EphB3*, *ephrin-B1*; Abb. 24B: *EphA2*, *EphB2*, *EphB3*, *ephrin-B3*). Ein schwacher Effekt durch Xsna ist allerdings auf die Expression von *EphB1* zu beobachten. Anscheinend kann *EphB1* durch Activin leicht induziert werden, durch Xsna wird diese *EphB1*-Expression Activin-induzierter Kappen reduziert (Abb. 24B). Der Ligand *ephrin-B2* wird durch eine Kombination von Activin und Xsna leicht induziert. Activin und Xsna alleine haben aber kaum einen Effekt auf seine Expression (Abb. 24B). In Abbildung 24A scheint jedoch die *ephrin-B2*-Expression durch Xsna leicht reduziert zu werden. Da dieser Effekt nur schwach ist, wird *ephrin-B2* nicht als vielversprechender Kandidat für eine weitere Untersuchung erachtet.

Die GTPase *Xrnd1* wird durch Activin leicht induziert und durch eine bFGF-vermittelte Wirkung leicht reduziert, aber es sind keine Anzeichen auf eine Regulation durch Xsna zu erkennen (Abb. 24A, B).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß der deutlichste Effekt von Xsna auf die bFGF-induzierte Transkription von *EphA4* beobachtet wurde, was für eine mögliche direkte oder indirekte Regulation durch Xsna spricht.

2.2.3.4. Die Regulation von *EphA4* durch Xsna und bFGF wird nicht durch Xbra vermittelt

Es ist auffällig, daß *EphA4* und *Xbra* Ähnlichkeiten in ihrer Regulation durch Xsna und bFGF zeigen (vergleiche Abb. 24A mit Abb. 23A). So sind *EphA4* und *Xbra* in animalen Kappen durch bFGF induzierbar. Xsna wirkt reprimierend auf diese induzierte Expression beider Gene, jedoch nicht auf deren basale Expression. Eine mögliche Erklärung für diese Gemeinsamkeiten wäre, daß die Regulation von *EphA4* durch Xsna und bFGF nicht direkt ist, sondern über den Transkriptionsfaktor Xbra vermittelt wird. In diesem Fall würde man eine aktivierende Wirkung von Xbra auf die Expression von *EphA4* voraussetzen. Daß Xbra ein Transkriptionsaktivator ist, wurde bereits mehrfach gezeigt (Kispert et al., 1995; Conlon et al., 1996; Casey et al., 1998).

So wurde untersucht, ob die Wirkung von Xsna und bFGF auf *EphA4* von Xbra abhängig ist. Wenn dem so wäre, müßte die Injektion von Xbra-RNA in der animalen Kappe eine deutliche Erhöhung der Expression von *EphA4* bewirken. Diese durch Xbra erhöhte Expression dürfte aber durch eine zusätzliche ektopische Expression von Xsna nicht reduziert werden, da das durch RNA-Injektion ektopisch exprimierte Xbra nicht transkriptionell durch Xsna reguliert werden kann.

Die Injektion von Xbra-RNA in animalen Kappen führt jedoch nicht zu einer Erhöhung der basalen *EphA4*-Expression (Abb. 25A). Zur Kontrolle der erfolgreichen ektopischen Expression von Xbra, wurde zusätzlich die Expression einer Komponente des Wnt-Signalweges untersucht. *Xwnt11* ist ein direktes Zielgen von Xbra und wird von diesem aktiviert (Saka et al., 2000; Tada and Smith, 2000). Erwartungsgemäß ist in Xbra-injizierten animalen Kappen die *Xwnt11* Expression stark erhöht (Abb. 25A), was der Beweis für eine erfolgreiche Überexpression von Xbra ist.

Xsna ist wiederum nicht in der Lage, die nach der Xbra-Expression basal gebliebene *EphA4*-Transkription deutlich zu reduzieren (Abb. 25A). Die Regulation von *EphA4* durch Xsna und bFGF wird also nicht durch Xbra vermittelt.

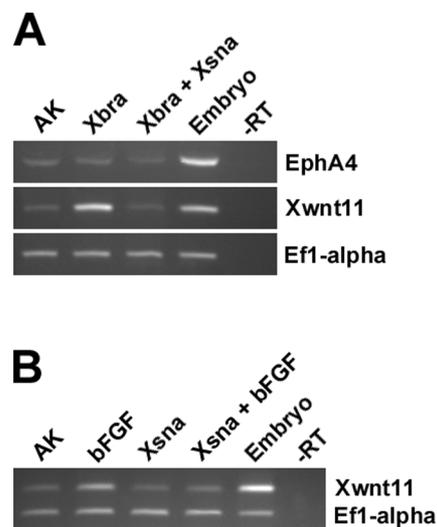


Abb. 25: Untersuchung, ob der Xsna-Effekt auf EphA4 durch Xbra vermittelt wird. RT-PCR animaler Kappen (AK) des Stadiums 10. Die RNAs wurde im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert (Xsna: 2000pg; Xbra: 500pg). Die bFGF-Induktion der animalen Kappen wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten ganze Embryonen des selben Stadiums. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne vorherige Reverse Transkription (-RT). Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als Quantitätskontrolle der PCR amplifiziert.

2.2.3.5. Das direkte Xbra-Zielgen *Xwnt11* wird auch Xbra-unabhängig durch *Xsna* reguliert

Im vorigen Abschnitt wurde das direkte Xbra-Zielgen *Xwnt11* zur Kontrolle der erfolgreichen ektopischen Xbra-Expression verwendet. Die Injektion von *Xbra*-RNA in animale Kappen führte erwartungsgemäß zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von *Xwnt11* (Abb. 25A). Interessanterweise wird diese erhöhte *Xwnt11*-Expression durch *Xsna* stark reduziert (Abb. 25A). Da die ektopische Expression von *Xbra* durch die Injektion von RNA hervorgerufen wurde und damit nicht transkriptionell durch *Xsna* regulierbar ist, muß dieser Effekt Xbra-unabhängig sein.

Xwnt11 ist in Zellen der animalen Kappe durch bFGF induzierbar (Abb. 25B). Es ist anzunehmen, daß dieser Effekt durch Xbra vermittelt wird, da (1.) *Xbra* durch bFGF induziert wird (Abb. 23A; Smith et al. 1991) und (2.) *Xwnt11* ein direktes Zielgen von Xbra ist (Saka et al., 2000; Tada and Smith, 2000). Wie nun erwartet, wird durch die ektopische Expression von *Xsna*, die *Xwnt11*-Expression der bFGF-induzierten Kappen reduziert (Abb. 25B). Die basale Expression in uninduzierten Kappen kann wiederum nicht durch *Xsna* reprimiert werden (Abb. 25B).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß *Xsna* die Wnt-Signalweg-Komponente *Xwnt11* regulieren kann. Neben einer indirekten Regulation über Xbra ist *Xsna* zusätzlich in der Lage *Xwnt11* Xbra-unabhängig zu regulieren.

2.2.3.6. Die dorsale Überexpression von *Xsna* führt zu einer Reduktion der anterior-posterior Achse

Der Transkriptionsfaktor *Brachyury* ist notwendig für die Bildung der Chorda und posteriorer Somiten in Maus (Chelsey, 1935; Gluecksohn-Schoenheimer, 1938; Gruneberg, 1958), Zebrafisch (Schulte-Merker et al., 1994; Odenthal et al., 1996; Stemple et al., 1996) und *Xenopus* (Conlon et al., 1996; Conlon and Smith, 1999). Es wurde gezeigt, daß die ektopische Expression des Transkriptionsfaktors *Xsna* hinreichend ist, um in *Xenopus* auf der Dorsalseite des Embryos *Brachyury* zu reprimieren (Abschnitt 2.2.3.2.). Da diese *Xbra*-exprimierenden Zellen der

Dorsalseite die spätere Chorda bilden (Smith et al., 1991; Keller, 1976), ist zu erwarten, daß diese Repression von *Xbra*, hervorgerufen durch eine ektopische *Xsna*-Expression, zu einer Reduktion der anterior-posterior Achse führt.

Deshalb wurde *Xsna* dorsal überexprimiert und die Embryonen bis zum Kaulquappenstadium kultiviert (Abb. 26B). Diese besitzen erwartungsgemäß im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 26A) eine deutlich reduzierte anterior-posterior Achse. Der Kopf ist in diesen Embryonen jedoch normal entwickelt (Abb. 26B).

Erstaunlicherweise führt eine zusätzliche Überexpression von *Xsna* im weiter animal angrenzenden Ektoderm neben der Achsenreduktion auch zu einem Verlust typischer Kopfstrukturen (Abb. 26D, C). Diese Kaulquappen besitzen anterior nur eine bläschenartige Struktur, in der das Gehirn und die Augen fehlen (Abb. 26D).

Der Elongation der Achse liegt der Prozeß der konvergenten Extension zugrunde, die gewebsautonom und substrat-unabhängig stattfindet (Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988; siehe auch Abschnitt 2.1.2.). Deshalb wird anschließend untersucht, ob diese morphogenetische Bewegung in Explantaten durch eine Überexpression von *Xsna* gestört wird. Dorsale Kontrollexplantate (Abb. 26E) zeigen eine deutliche Elongation (100% deutlich elongiert; n=11). Die Überexpression von *Xsna* in den präsumtiven Chordazellen dieser Explantate (Abb. 26F) führt zu einer hoch signifikant geringeren Anzahl deutlich elongierter Explantate ($p < 0,01$) (50% deutlich elongiert; n=16). Wird neben *Xsna* zusätzlich *Xbra* überexprimiert (Abb. 26G), steigt die Anzahl der deutlich elongierten Explantate nicht signifikant an ($p > 0,05$) (54% deutlich elongiert; n=13). Explantate, die durch Überexpression von *Xsna* nicht mehr deutlich elongiert sind, zeigen aber noch schwache Ansätze von Elongation (Abb. 26F und G untere Reihe). Sie unterscheiden sich darin von ventralen Explantaten, die rund sind (Abb. 26H) und folglich keine Ansätze von Elongation erkennen lassen (0% deutlich elongiert; n=9).

Demzufolge führt die Überexpression von *Xsna* zu einer Reduktion der anterior-posterior Achse. In Explantaten zeigt sich eine Störung der konvergenten Extension dieser Region, die sich durch eine Überexpression von *Xbra* nicht beheben läßt.

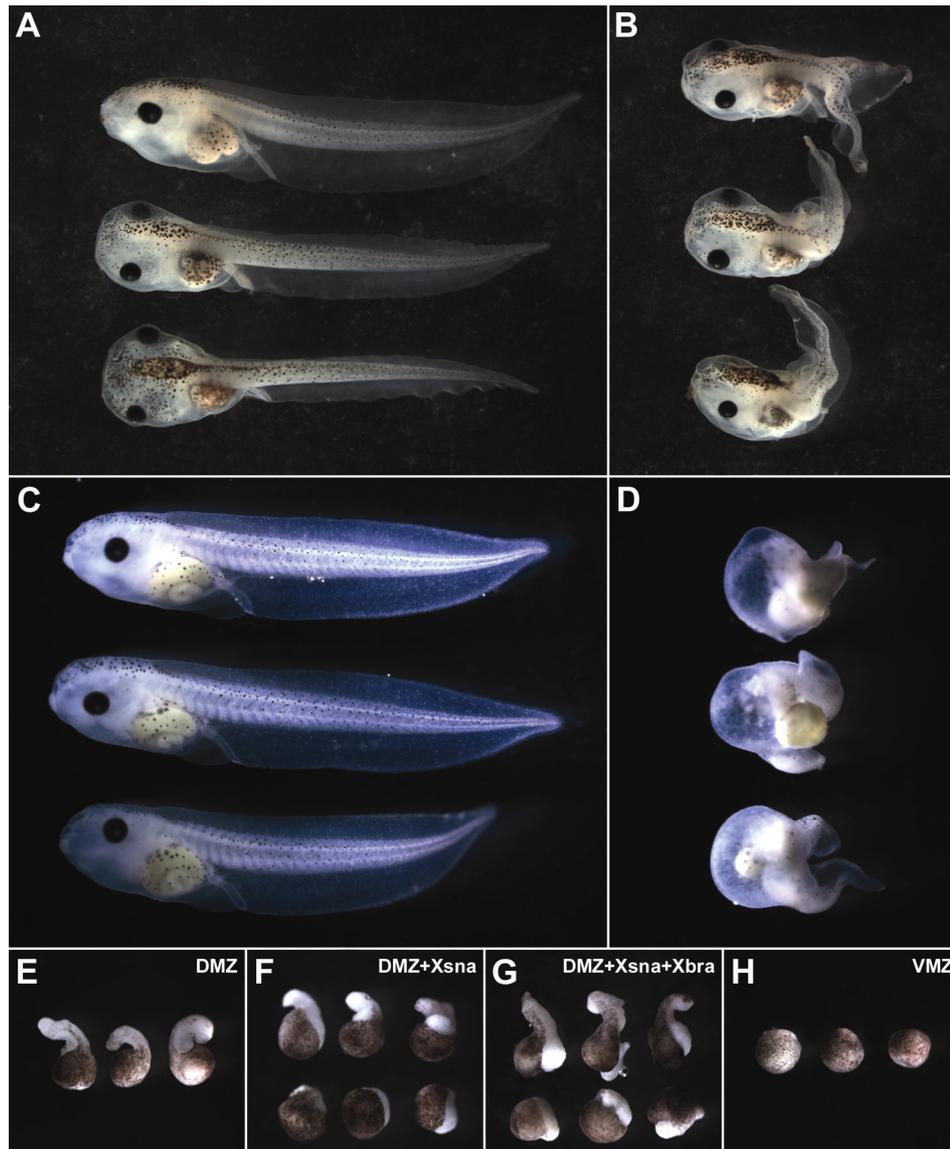


Abb. 26: Der Effekt von Xsna auf die anterior-posterior Achse.

A-D: Kontrollembryonen (A, C) und *Xsna*-injizierte Embryonen (B, D) wurden bis zum Kaulquappenstadium kultiviert. Anterior ist immer links. Die *Xsna*-RNA (2000pg / Injektion) wurde im Stadium 4 injiziert. Dazu wurde dorsal in alle 4 Blastomeren injiziert, so daß hauptsächlich die *Xbra*-exprimierende marginale Zone getroffen wurde (B). Außerdem wurden Embryonen wie (B) behandelt und zusätzlich 2 Injektionen auf der Dorsalseite weiter animal vorgenommen, so daß neben der marginalen Zone auch das präsumtive Neuralektoderm getroffen wurde (D).

E-H: Die Explantate der Dorsalseite (E-G) wurden in der frühen Gastrula (Stadium 10), die der Ventralseite (H) in der mittleren Gastrula (Stadium 10,5) isoliert und für 1 Tage kultiviert. Alle Explantate bestehen aus Blastoporuslippe und angrenzendem Blastocoeldach. *Xsna*-RNA (F-G; 2000pg / Blastomere) und *Xbra*-RNA (G; 500pg / Blastomere) wurden im Stadium 4 in alle vier dorsalen Blastomeren injiziert. DMZ: dorsale marginale Zone; VMZ: ventrale marginale Zone.

2.2.3.7. Überexpression als auch Inhibition der Translation von *Xsna* führen zu einer Störung der Somitenbildung

Da Brachyury auch notwendig ist für die Bildung posteriorer Somiten in Maus (Chelsey, 1935; Gluecksohn-Schoenheimer, 1938; Gruneberg, 1958), Zebrafisch (Schulte-Merker et al., 1994; Odenthal et al., 1996; Stemple et al., 1996) und *Xenopus* (Conlon et al., 1996; Conlon and Smith, 1999), wurde anschließend untersucht, ob die Somitenbildung durch eine frühe *Xsna*-vermittelte Repression von *Xbra* gestört wird. Dazu wurde *Xsna* auf einer Seite des Embryos im Bereich der präsumtiven Somiten überexprimiert und *GFP* als Marker coexprimiert.

Zunächst wurde *Xsna* auf der linken Seite des Embryos überexprimiert und dieser bis zum Schwanzknospentadium kultiviert. Die durch GFP hervorgerufene Fluoreszenz zeigt, daß auf der linken Seite die Region, in der normalerweise Somiten entstehen, getroffen wurde (Abb. 27A'). Scheinbar ist auf der rechten Seite desselben Embryos auch Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 27B'). Diese stammt aber, mit Ausnahme weniger Zellen, von der durchscheinenden Fluoreszenz der linken Seite (nicht gezeigt). So besitzt die rechte Seite erwartungsgemäß normal entwickelte Somiten (Abb. 27B). Dahingegen wurde die Somitenbildung auf der linken Seite durch die Überexpression von *Xsna* deutlich gestört (Abb. 27A). Dort ist anstelle von segmentierten Somiten (Abb. 27B) nur dunkel pigmentiertes Gewebe zu erkennen (Abb. 27A). Um auszuschließen, daß darunter normal entwickelte Somiten verborgen sind, wurde die Kultivierung fortgesetzt bis dieser Bereich durchsichtiger war. Nun sind in der anterioren Hälfte dieser Seite keine (Abb. 27C), in der posterioren Hälfte jedoch Somiten zu sehen (Abb. 27C'). Die von der Überexpression verschonte, rechte Seite dieses Stadiums ist erwartungsgemäß normal entwickelt (Abb. 27D, D').

Wird *Xsna* auf der rechten Seite des Embryos überexprimiert, führt dies dort auch zu einer gestörten Somitenbildung (nicht gezeigt).

Da die Überexpression von *Xsna* diesen Effekt auf die Somiten hat, stellt sich nun die Frage, wie sich eine Inhibition der *Xsna*-Translation auf die Somitenbildung auswirkt. Dazu wurden *Xsna*-Morpholinos und *GFP*-RNA auf einer Seite des Embryos injiziert. Der Erfolg der Injektion wurde wiederum anhand der GFP-Fluoreszenz beurteilt (nicht gezeigt).

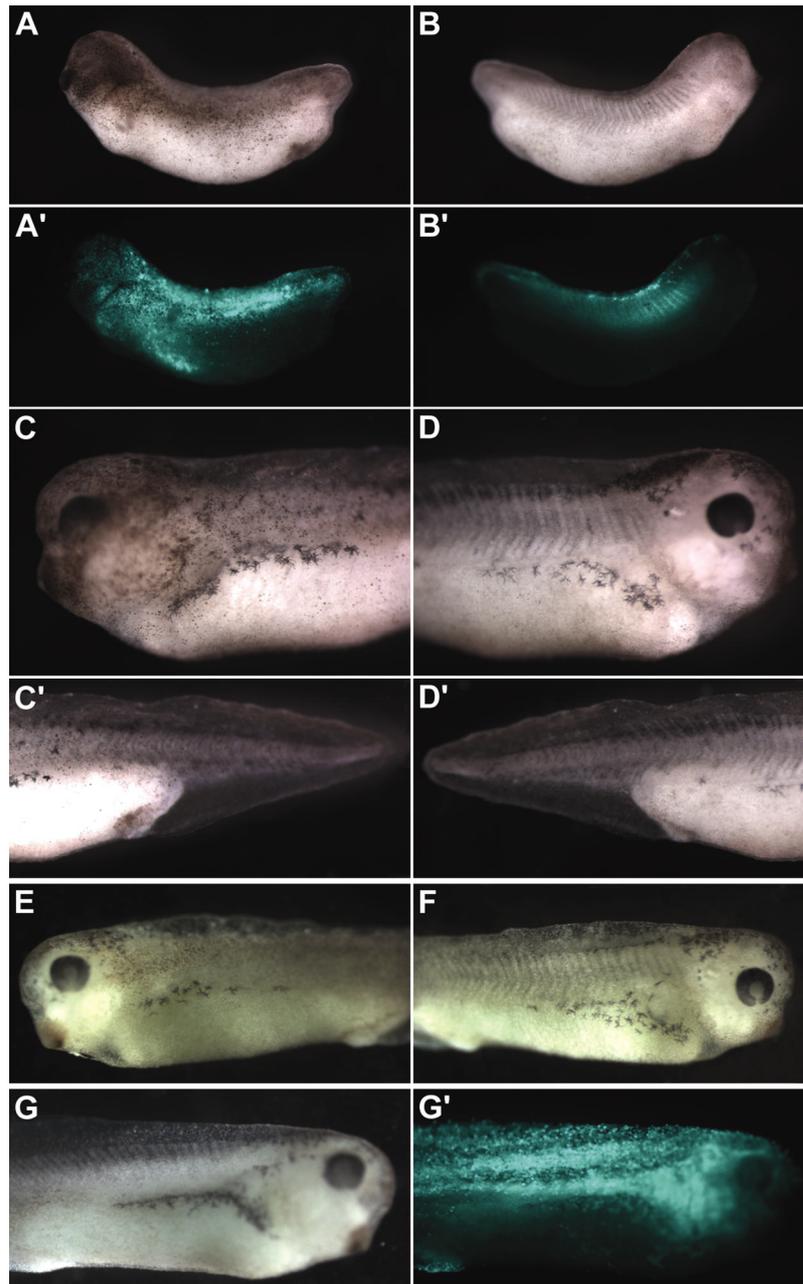


Abb. 27: Der Effekt von *Xsna* auf die Somitenbildung.

A-D: Auf der zukünftigen linken Seite des Embryos wurde *Xsna*-RNA (2000pg / Blastomere) in zwei Blastomeren des Stadiums 4 injiziert, so daß die Somiten aber nicht die Chorda getroffen wurde. Zu Kontrollzwecken wurde *GFP*-RNA (200pg / Blastomere) coexprimiert. (A) und (B) zeigen Auflichtaufnahmen der linken und rechten Seite eines injizierten Embryos des Stadiums 31. (A') und (B') sind Fluoreszenzbilder desselben Embryos zur gleichen Zeit. (C, C') und (D, D') sind Auflichtaufnahmen der linken und rechten Seite desselben Embryos im Stadium 37. (C, D) zeigt die anteriore, (C', D') die posteriore Hälfte.

E-F: Auf der zukünftigen linken Seite des Embryos wurden *Xsna*-Morpholinos (17ng / Blastomere) in gleicher Weise wie unter (A-D) beschrieben injiziert. *GFP*-RNA wurde ebenfalls coexprimiert. (E) und (F) zeigen Auflichtaufnahmen der linken und rechten Seite eines injizierten Embryos des Stadiums 38.

G: Auf der zukünftigen rechten Seite des Embryos wurde *GFP*-RNA in gleicher Weise wie unter (A-D) beschrieben injiziert. (G) zeigt eine Auflichtaufnahme der rechten Seite eines injizierten Embryos des Stadiums 37. (G') ist ein Fluoreszenzbild desselben Embryos zur gleichen Zeit.

Interessanterweise führt die Inhibition der *Xsna*-Translation auf der linken Seite des Embryos ebenfalls zu einer Störung der Somitenbildung (Abb. 27E), wohingegen sich die verschonte, rechte Seite normal entwickelt hat (Abb. 27F). Eine Inhibition der Translation führt auf der rechten Seite wiederum zum selben Effekt (nicht gezeigt).

Abbildung 25G und G' verdeutlichen, daß der Marker GFP alleine keine störende Wirkung auf die Somitenbildung hat.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß sowohl die Überexpression, als auch die Inhibition der Translation von *Xsna* störend auf die Bildung der Somiten wirkt. Dieser Effekt kann auf beiden Seiten des Embryos beobachtet werden.

2.2.4. *Xsna* hat einen Einfluß auf die Links-Rechts-Orientierung der Organe

2.2.4.1. *Xsna* ist sowohl hinreichend als auch notwendig für die Links-Rechts-Orientierung der Organe

Die Chorda spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie. So hat eine Störung der Chordabildung auch Auswirkungen auf die Links-Rechts-Orientierung der Organe in Maus, Zebrafisch und *Xenopus* (Danos and Yost, 1995; Danos and Yost, 1996; Lohr et al., 1997; Nascone and Mercola, 1997; Hyatt and Yost, 1998; King et al., 1998). Mutationen in den *Brachyury*-Homologen von Maus (*T*) und Zebrafisch (*no tail*) führen neben einer Störung der Chorda auch zu einer Randomisierung (Zufallsentscheidung) der Links-Rechts-Orientierung des Herzens (Danos and Yost, 1996; King et al., 1998). Es wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt, daß die Überexpression von *Xsna* zu einer Repression von *Xenopus Brachyury* und einer Störung der anterior-posterior Achse führt (Abschnitt 2.2.3.2., 2.2.3.6.). Demzufolge erscheint eine indirekte Wirkung von *Xsna* auf die Links-Rechts-Orientierung des Herzens möglich.

Wird *Xsna* dorsal so überexprimiert, daß hauptsächlich präsumtive Chorda betroffen ist (Abb. 28A), steigt der Anteil der Herz-Inversionen stark an (Tabelle 1A, als Beispiel siehe Abb. 29B). Dieser Effekt ist hoch signifikant. Berücksichtigt man neben

den alleinigen Herz-Inversion (46,2%) auch die Inversionen von Herz und Darm zusammen (3,8%), entspricht das einer Randomisierung des Herz-situs.

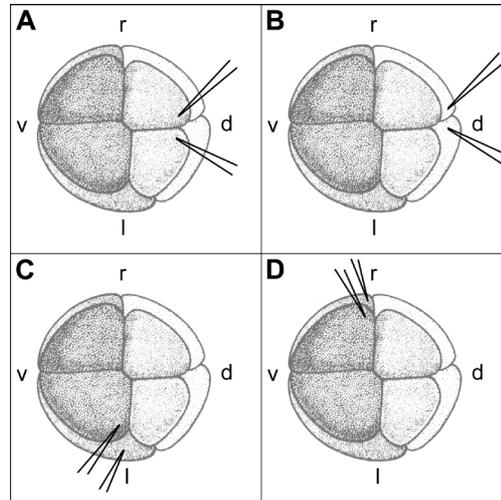


Abb. 28: Injektionsschema.

Die Injektion der *Xsna*-RNA (2000pg / Blastomere) und *Xsna*-Morpholinos (17ng / Blastomere) wurde im Stadium 4 durchgeführt. Zu Kontrollzwecken wurde jeweils *GFP*-RNA (200pg / Blastomere) coexprimiert. (A): Injektion in die dorsalen animalen Blastomeren auf Höhe der späteren B-Blastomeren, die größtenteils Chorda bilden. (B): Injektion in die dorsalen vegetalen Blastomeren auf Höhe der späteren C-Blastomeren, die kaum zur Chorda, sondern hauptsächlich zum Endoderm beitragen. (C): Injektion in die linken ventralen Blastomeren. (D): Injektion in die rechten ventralen Blastomeren. Die bei (C) und (D) getroffenen Blastomeren tragen kaum zur Chorda bei. d: dorsal; l: links; r: rechts; v: ventral.

Interessanterweise führt die Überexpression von *Xsna* auf der Dorsalseite in einer Region, die vegetal der präsumtiven Chorda liegt und hauptsächlich zum Endoderm beiträgt (Abb. 28B), ebenfalls zu hoch signifikanten Veränderungen der Orientierung der Organe (Tabelle 1B, Abb. 29), obwohl hier durch *Xsna* keine Reduktion der anterior-posterior Achse entsteht (nicht gezeigt). Neben dem hoch signifikanten Anstieg der alleinigen Inversion des Herz, wird auch eine hoch signifikante Zunahme von Herz- und Darminversion festgestellt. Da dieses Ergebnis nicht mit der durch *Xsna* hervorgerufenen Achsenreduktion erklärt werden kann und das *snail*-Homolog des Hühnchens (*cSnR*) an der Kontrolle der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligt ist (Isaac et al., 1997; Boettger et al., 1999; Patel et al., 1999), wurde dies auch für *Xenopus* untersucht.

Da *Xsna* bisher nur symmetrisch zur anterior-posterior Achse überexprimiert wurde, kann also noch nichts darüber ausgesagt werden, auf welcher Seite die Überexpression zu einer Störung des situs führt. Deshalb wurde *Xsna* anschließend

nur auf der linken (Abb. 28C) oder der rechten Seite (Abb. 28D) so überexprimiert, daß die präsumtiven Chordazellen nicht betroffen waren. Interessanterweise führt sowohl die Überexpression auf der rechten, als auch auf der linken Seite zu hoch signifikanten Veränderungen des situs (Tabelle 1C, D). Die deutlichsten Effekte werden jeweils gleichzeitig auf Herz und Darm beobachtet. Folglich ist die Überexpression von *Xsna* auf beiden Seiten hinreichend, um hoch signifikante Veränderungen in der Links-Rechts-Orientierung von Herz und Darm hervorzurufen.

Als nächstes wurde untersucht, ob *Xsna* auch notwendig ist, für den normalen situs von Herz und Darm. Dazu wurde die *Xsna*-Translation spezifisch durch die Injektion von Morpholinos inhibiert. Die Inhibition der *Xsna*-Translation führt weder links (Abb. 28C) noch rechts (Abb. 28D) zu einem signifikanten Anstieg gleichzeitiger Herz- und Darminversion (Tabelle 1E, F). Es zeigt sich jedoch, daß die Inhibition der *Xsna*-Translation jeder Seite sich hauptsächlich in der Inversion eines bestimmten Organs widerspiegelt. So führt diese Inhibition rechts nur zu einem hoch signifikanten Anstieg der Darminversionen (Tabelle 1F). Eine hoch signifikante Zunahme der Inversionen durch die Inhibition der *Xsna*-Translation auf der linken Seite wird nur für das Herz beobachtet (Tabelle 1E).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Überexpression von *Xsna* auf der rechten bzw. linken Seite des Embryos hinreichend ist für die Inversion von Herz und Darm. Die mittels Translationsinhibition gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß *Xsna* auf der linken Seite notwendig ist für die ungestörte Orientierung des Herzens und auf der rechten Seite für die des Darmes.

Bez.	Injektion von	Injektionsort	siehe auch	normal (situs solitus) siehe Abb. 29A	nur Herz invertiert siehe Abb. 29B	nur Darm invertiert siehe Abb. 29C	Herz und Darm invertiert siehe Abb. 29D	n
A	<i>Xsna</i> -RNA	dorsal, animal	Abb. 28A	48,1%	46,2% ***	1,9%	3,8%	52
B	<i>Xsna</i> -RNA	dorsal, vegetal	Abb. 28B	74,1%	13,8% **	1,7%	10,3% **	58
C	<i>Xsna</i> -RNA	links	Abb. 28C	68,4%	10,5%	5,3%	15,8% **	19
D	<i>Xsna</i> -RNA	rechts	Abb. 28D	57,9%	5,3%	10,5% *	26,3% ***	19
E	<i>Xsna</i> -Morpholino	links	Abb. 28C	47,8%	39,1% ***	8,7% *	4,3%	23
F	<i>Xsna</i> -Morpholino	rechts	Abb. 28D	59,1%	4,5%	36,4% ***	0,0%	22
G	- (Kontrolle)	-	-	98,8%	1,2%	0,0%	0,0%	82

Tabelle 1: Quantitative Ergebnisse der Effekte von *Xsna* auf die Links-Rechts-Orientierung von Herz und Darm.

Die Injektionen von *Xsna*-RNA und *Xsna*-Morpholinos wurde vorgenommen wie in Abbildung 28 dargestellt. Die erfolgreiche Injektion wurde anhand der GFP-Fluoreszenz kontrolliert. Signifikant von der Kontrolle abweichende Werte sind mit Ausnahme der Spalte „situs solitus“ gekennzeichnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

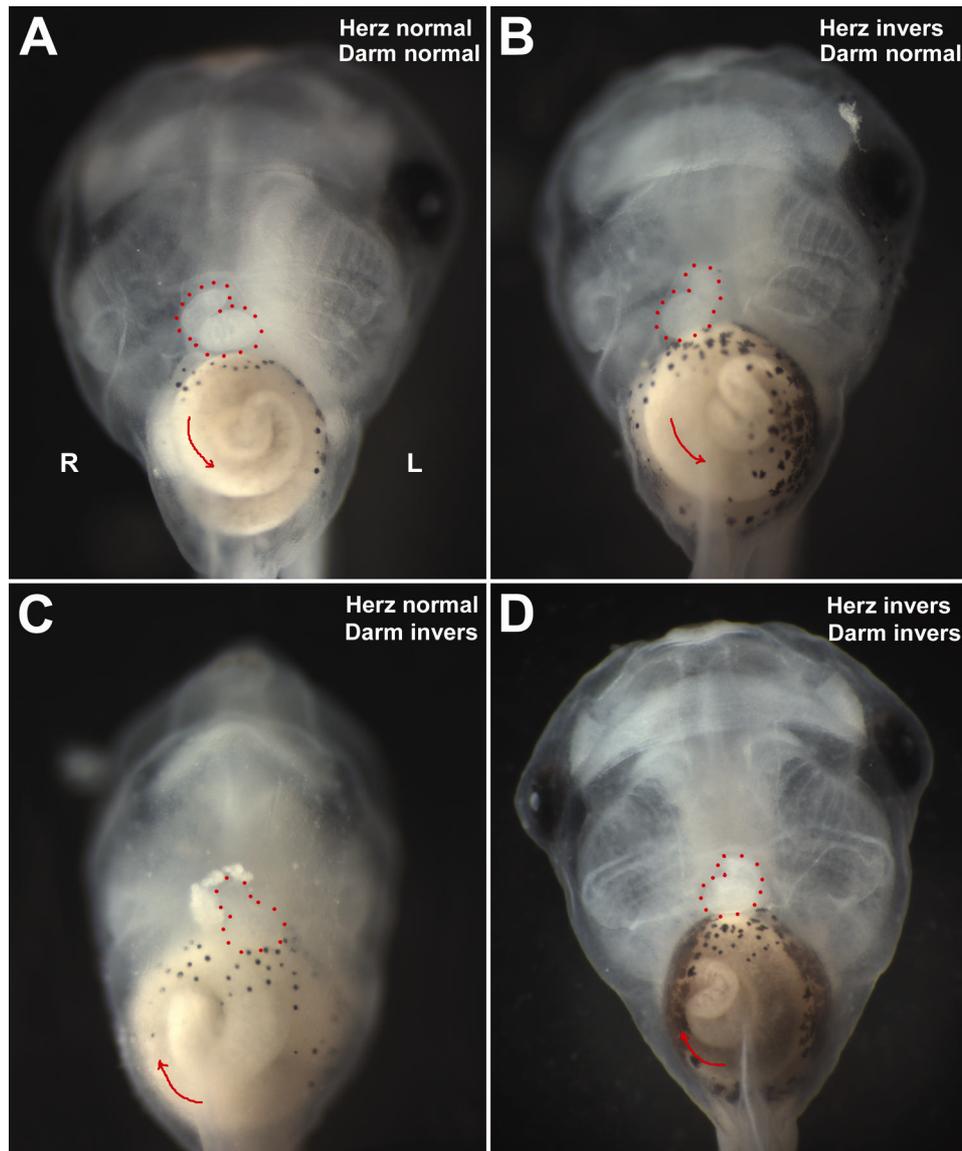


Abb. 29: Effekte von Xsna auf die Links-Rechts-Orientierung von Herz und Darm.

Die Injektionen wurden vorgenommen, wie in Abbildung 28 dargestellt. Die anteriore Region der Kaulquappen des Stadiums 45 wird von ventral betrachtet. Exemplarisch werden verschiedene Links-Rechts-Orientierungen von Herz und Darm gezeigt. Die quantitativen Daten sind aus Tabelle 1 zu entnehmen.

(A): Normale Links-Rechts-Orientierung von Herz und Darm (situs solitus). Das Herz krümmt sich zur rechten Seite der Kaulquappe. Die Windung des Darmes verläuft gegen den Uhrzeigersinn. (B): Das Herz ist invertiert zu (A), der Darm ist normal orientiert. (C): Der Darm ist invertiert zu (A), das Herz ist normal orientiert. (D): Herz und Darm sind invertiert zu (A). Die linke (L) und rechte Seite (R) der Kaulquappe sind erkennbar. Gepunktete Linie: Umriß des Herzens; Pfeile: Windungsrichtung des Darmes.

2.2.4.2. *Xsna* wirkt aktivierend auf das an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligte Gen *Xnr1*

Es sind einige Gene in Maus, Hühnchen und *Xenopus* bekannt, die an der Kontrolle der Links-Rechts-Orientierung der Organe beteiligt sind. Obwohl die Details der Genaktivierungskaskaden anscheinend nicht konserviert sind, kennt man bislang zwei Gene, deren Funktion für die Links-Rechts-Asymmetrie trotzdem konserviert zu sein scheint (Ramsdell and Yost, 1998).

Hierzu gehört *Pitx2*, dessen Expression in allen untersuchten Modelorganismen nur auf der linken Seite des Embryos zu finden ist. Außerdem führt die ektopische Expression von *Pitx2* bei verschiedenen Vertebraten zu Effekten auf die Links-Rechts-Asymmetrie (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; St Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999; Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999; Essner et al., 2000; Schweickert et al., 2000). Für *Xenopus* wurde gezeigt, daß dort die Isoform *Pitx2c* für diese Effekte verantwortlich ist (Schweickert et al., 2000). Da das snail-Homolog des Hühnchens die Expression von *Pitx2* reprimiert (Patel et al., 1999), wurde nun untersucht, ob auch *Xenopus* snail die Isoform *Pitx2c* reguliert.

Pitx2c wirkt aktivierend auf seine eigene Transkription (Schweickert et al., 2000). Um diese Autoregulation zu vermeiden und dadurch die Effekte von *Xsna* besser beurteilen zu können, wurde die Proteinsynthese in den animalen Kappen ab der Activin-Induktion inhibiert. Die Expression von *Pitx2c* kann in animalen Kappen durch Activin induziert werden. Dieser Effekt ist unmittelbar und früh („immediate early“), so daß er auch bei einer Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) stattfindet (Abb. 30A; Schweickert et al., 2000). *Xsna* führt jedoch nicht zu einer Veränderung der induzierten und basalen *Pitx2c*-Expression (Abb. 30A). Folglich wird *Pitx2c* im Testsystem der animalen Kappe nicht durch *Xsna* reguliert.

Nodal ist das zweite Gen mit konservierter Funktion für die Links-Rechts-Asymmetrie. Es wird in allen bisher untersuchten Vertebraten auf der linken Seite des Embryos exprimiert (Levin et al., 1995; Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Lustig et al., 1996a; Lohr et al., 1997; Sampath et al., 1997; Rebagliati et al., 1998a; Feldman et al., 1998). In Hühnchen, *Xenopus* und Maus führt eine veränderte *nodal*-Expression zu einer gestörten Links-Rechts-Asymmetrie (Collignon et al., 1996;

Levin et al., 1997; Sampath et al., 1997). Für *Xenopus* und Hühnchen wurde gezeigt, daß nodal in einem linksseitig wirkenden Signalweg oberhalb von Pitx2 angesiedelt ist und für dessen Aktivierung sorgt (Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Campione et al., 1999; Schweickert et al., 2000). Obwohl es in *Xenopus* mehrere *nodal*-Gene gibt, wird dieser Effekt nur „*Xenopus nodal related 1*“ (*Xnr1*) zugeschrieben (Lustig et al., 1996a; Sampath et al., 1997). Möglicherweise werden die gezeigten Effekte des Transkriptionsfaktors Xsna durch die Regulation von *Xnr1* hervorgerufen. Deshalb wird nun untersucht, ob Xsna an der Kontrolle von *Xnr1* beteiligt ist.

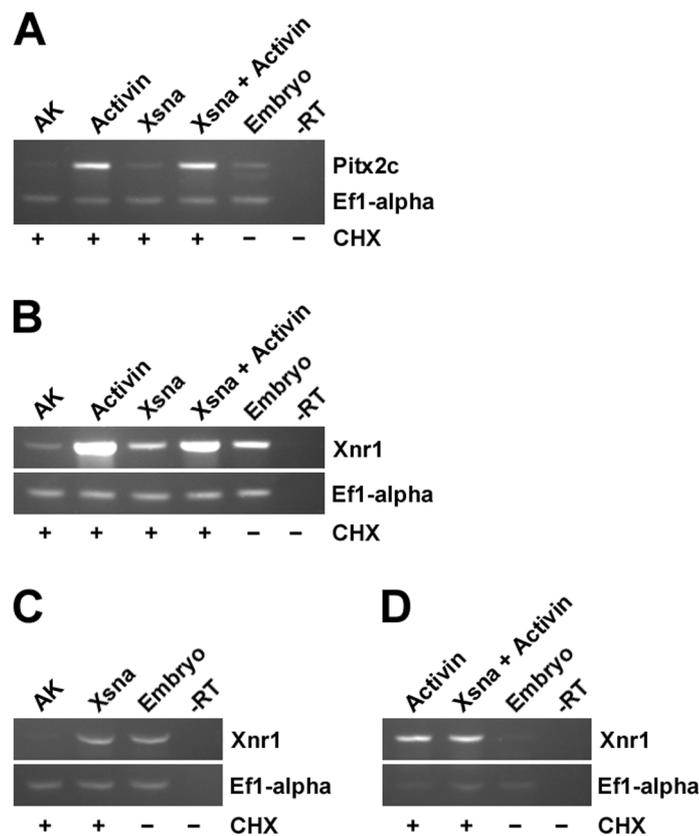


Abb. 30: Der Einfluß von Xsna auf die Transkription von Genen, die an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligt sind.

RT-PCR animaler Kappen (AK) des Stadiums 11. Die *Xsna*-RNA wurde im Stadium 4 in die animalen Blastomeren injiziert (2000pg / Blastomere). Die Activin-Induktion der animalen Kappen wurde ab dem Stadium 8 für 1,5 h durchgeführt. Um die Proteinsynthese zu inhibieren wurden die animalen Kappen ab der Induktion in Anwesenheit von 20 µg/ml Cycloheximid (CHX) kultiviert. Als Positivkontrolle dienten ganze Embryonen des selben Stadiums. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne vorherige Reverse Transkription (-RT). Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als Quantitätskontrolle der PCR amplifiziert.

Xnr1 wirkt ebenfalls aktivierend auf seine eigene Transkription (Hyde and Old, 2000; Osada et al., 2000). Daher wurde die Proteinsynthese in den animalen Kappen wiederum ab der Activin-Induktion inhibiert. Die Expression von *Xnr1* ist in animalen Kappen durch Activin induzierbar (Jones et al., 1995a). Auch dieser Effekt ist unmittelbar und früh („immediate early“), so daß er bei Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) stattfindet (Abb. 30B; Schweickert et al., 2000). Die ektopische Expression von *Xsna* in den induzierten Kappen scheint zu einer leichten Reduktion der *Xnr1*-Transkription zu führen, trotzdem bleibt die Bande noch sehr massiv (Abb. 30B). Da bei so starken Banden jedoch eine Abschätzung der Unterschiede schwerfällt, wurde nochmals eine PCR mit niedrigerer Zyklenzahl durchgeführt (Abb. 30D). Der anfänglich vermutete Effekt von *Xsna* auf die Activin-induzierte *Xnr1*-Expression konnte aber nicht bestätigt werden (Abb. 30D). Wird *Xsna* aber in einer uninduzierten Kappe überexprimiert, führt dies zu einem deutlichen Anstieg der *Xnr1*-Transkription (Abb. 30B). Dieser für einen Repressor unerwartete Effekt ließ sich bestätigen (Abb. 30C).

Diese Ergebnisse sprechen also dafür, daß *Xsna* zwar nicht an der Kontrolle von *Pitx2* beteiligt ist, jedoch *Xnr1* reguliert.

3. Diskussion

3.1. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Dorsal- und Ventralseite

Zur Untersuchung der Rolle von *Xsna* an der Internalisierung von Mesoderm und Endoderm war es sinnvoll, zunächst Regionen im Embryo zu definieren und deren Zellverhalten zu bestimmen. Neben morphologischen Kriterien wurde zur Unterteilung dieser Regionen die *Xbra*-Expression miteinbezogen.

Untersuchungen zur Gastrulation in *Xenopus* werden meist nur auf der Dorsalseite des Embryos vorgenommen, wohingegen die Ventralseite vernachlässigt wird. In dieser Arbeit wird jedoch das Hauptaugenmerk auf die Ventralseite gelegt. Neue Ergebnisse, diese Seite betreffend, erlauben nun einen Vergleich der Dorsal- und Ventralseite.

3.1.1. Dorsale und ventrale Lippe besitzen trotz unterschiedlichem Schicksal Gemeinsamkeiten im Zellverhalten

Schon anhand der *Xbra*-Expression wurde deutlich, daß die Blastoporuslippe zweigeteilt ist. Es läßt sich eine *Xbra*-negative Unterlippe und eine *Xbra*-positive Oberlippe unterscheiden. Diese Zweiteilung der Lippe wird sowohl dorsal als auch ventral beobachtet (Abschnitt 2.1.1.). Dorsal bildet die Unterlippe das Kopfmesoderm, die Oberlippe axiales Mesoderm (Keller, 1976; Keller, 1991) und beide Regionen unterscheiden sich auch in ihrer Induktionsfähigkeit. Oberlippen-Explantate induzieren im Ektoderm anteriore und posteriore Neuralmarker, wohingegen Unterlippen-Explantate nur anteriore Neuralmarker induzieren können (Zoltewicz and Gerhart, 1997).

Für die Ventralseite hat sich gezeigt, daß die zukünftige Grenze zwischen Mesoderm und Endoderm durch die Blastoporuslippe verläuft (Abschnitt 2.1.3.). Die *Xbra*-positive Oberlippe bildet präsumtives Mesoderm, das in der Kaulquappe in der Nähe des Proctodaeums zu finden ist. Es läßt sich anhand der Form der Zellen in der Kaulquappe eindeutig Somitenmuskulatur erkennen. Ihr Vorhandensein stimmt überein mit dem revidierten Anlageplan von Keller (1991), nach dem Somiten auch vom ventralen Mesoderm gebildet werden. Außerdem entsteht aus dieser Region Seitenplattenmesoderm (Keller, 1976; Keller, 1991), so daß es sich bei den markierten mesodermalen Zellen nahe dem Proctodaeum vermutlich um Mesenchym handelt. Neben diesen mesodermalen Strukturen wird auch der ektodermale Teil des posterioren Darmes, das Proctodaeum, aus den Zellen der Oberlippe gebildet (Abschnitt 2.1.3.). Nach Nieuwkoop and Florschütz (1950) wird das Proctodaeum aus dem invaginierenden Teil der epithelialen Schicht gebildet. Die Markierung des Proctodaeums ist somit darauf zurückzuführen, daß an der Schnittkante zwangsläufig die epithelialen Zellen mitmarkiert wurden.

Die *Xbra*-negative ventrale Unterlippe besteht aus präsumtivem Endoderm. Ihre Zellen bilden in der Kaulquappe keine bestimmte Struktur, sondern sind verstreut im posterioren Teil des Darmes zu finden (Abschnitt 2.1.3.). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den vielzitierten Anlageplänen für *Xenopus*, da nach ihnen die gesamte ventrale Lippe zum Mesoderm beiträgt (Keller, 1976; Keller, 1991). Die Markierung der Zellen für diese Anlagepläne wurde jedoch schon im Stadium 10+ vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt sind ventral noch keine Flaschenzellen entstanden, die als äußerer Anhaltspunkt bei der Markierung verwendet werden können, so daß in diesem Stadium das Setzen definierter Farbmarken für die Ventralseite schwierig erscheint.

Obwohl die Zweiteilung der Blastoporuslippe direkt nur für die Dorsal- und Ventralseite gezeigt wurde, ist dies vermutlich ein generelles Phänomen in *Xenopus*, da auch lateral zunächst eine Lücke zwischen der *Xbra*-Expression und den Flaschenzellen besteht (Abschnitt 2.1.1.).

Die Zweiteilung der Blastoporuslippe spiegelt sich auch in ihrem Zellverhalten wider. Hierbei fallen Gemeinsamkeiten zwischen der dorsalen und ventralen Blastoporuslippe auf. So zeigen die Unterlippen beider Seiten schon in der frühen

Gastrula Separationsverhalten, obwohl sie zu verschiedenen Keimblättern beitragen (Wacker et al., 2000; Abschnitt 2.1.5.; Abschnitt 2.1.3.). Das Separationsverhalten der Zellen der Oberlippen beider Seiten ist zu Beginn der Gastrulation noch nicht vorhanden, wird aber später erworben (Wacker et al., 2000; Abschnitt 2.1.5.).

3.1.2. Das Blastocoeldachmesoderm

Die Dorsalseite bildet zu den restlichen Seiten des Embryos eine Ausnahme, da hier zu Beginn der Gastrulation kein Blastocoeldachmesoderm existiert. Erstes Indiz hierfür ist die Abwesenheit der *Xbra*-Expression (Abschnitt 2.1.1.). Außerdem findet während der Involutionbewegung keine Ausbreitung der Expression in das Blastocoeldach hinein statt (Abschnitt 2.1.1.).

Diese Beobachtungen alleine reichen allerdings nicht als Beweis für das Fehlen von Mesoderm im dorsalen Blastocoeldach aus, da die *Xbra*-Expression nicht strikt mit den Mesodermgrenzen übereinstimmt. So wurde gezeigt, daß *Xbra* im Schwanzknospenstadium auch in einem kleinen Bereich des posterioren Neuralrohres exprimiert wird (Gont et al., 1993). Neben dieser Expressionsdomäne im Ektoderm ist auch eine im Bereich des prospektiven Endoderms zu finden. *Xbra* wird in der epithelialen Schicht der dorsalen marginalen Zone exprimiert (Essex et al., 1993; Vodicka and Gerhart, 1995; Abschnitt 2.1.1.). Dieser Bereich wird als suprablastoporales Endoderm bezeichnet und bildet größtenteils das Archenterondach (Keller, 1975). Auch dort sind noch *Xbra*-Transkripte nachweisbar (Vodicka and Gerhart, 1995; Abschnitt 2.1.1.).

Die Kultivierung des vegetalen Blastocoeldachrandes der Dorsalseite spricht ebenfalls dafür, daß diese Region kein mesodermales, sondern vielmehr ein neuroektodermales Schicksal besitzt (Abschnitt 2.1.2.). Schließlich konnte mit Hilfe homotoper Transplantate gezeigt werden, daß diese Region nach Ende der Gastrulation nicht involutiert ist (Winklbauer and Schürfeld, 1999). Zusammen sprechen diese Ergebnisse dafür, daß der vegetale Teil des dorsalen Blastocoeldaches der frühen Gastrula nicht zum Mesoderm, sondern zum Ektoderm beiträgt. Auch dies widerspricht den vielzitierten Anlageplänen für

Xenopus, nach denen auch dorsal Blastocoeldachmesoderm existiert (Keller, 1976; Keller, 1991).

Da die Dorsalseite in Hinblick auf das Blastocoeldachmesoderm und auf morphogenetische Bewegungen (konvergente Extension) ein Sonderfall ist, wurde sich auf die Ventralseite beschränkt, um dort die Rolle von *Xsna* an generellen Internalisierungsprozessen zu untersuchen.

3.2. Die Beziehung zwischen *Xsna* und *Xbra*

Die Gene *Xsna* und *Xbra* zeigen ventral ein interessantes Muster, da sie größtenteils komplementär und nur in einem kleinen Bereich überlappend exprimiert werden (Essex et al., 1993). Hinzukommt, daß dieses Muster der beiden Gene sich dynamisch verhält.

3.2.1. Die Dynamik des Expressionsmusters von *Xsna* und *Xbra*

Xsna wird im Embryo während der Gastrulation in den Zellen exprimiert, sobald sie involutieren (Essex et al., 1993). Mesoderm, dessen Involution noch bevorsteht ist dagegen *Xsna*-negativ (Essex et al., 1993). Folglich muß zur Aufrechterhaltung dieses Expressionsmusters während der Gastrulation die *Xsna*-Expression beginnen, sobald die Zellen involutieren. Dies kommt de facto einer Ausbreitung der *Xsna*-Expression aus der mesodermalen Oberlippe in das Blastocoeldachmesoderm gleich. Um dies zu untersuchen, wurden isolierte und unter Deckglas festgelegte Explantate verwendet, die den Vorteil bieten, daß keine für die Interpretation störende Involutionsbewegung stattfinden kann. An solchen Explantaten der Ventralseite konnte gezeigt werden, daß sich die *Xsna*-Expression fortschreitend nach animal in das Blastocoeldachmesoderm ausbreitet (Abschnitt 2.2.1.1.), so daß der Mechanismus der Ausbreitung in dem Gewebe bereits vor der Isolierung implementiert sein muß. Welche Faktoren für die langsam fortschreitende

Ausbreitung der *Xsna*-Expression verantwortlich sind ist nicht bekannt. Durch ektopische Expression von *Xbra* in der animalen Kappe wird die *Xsna*-Transkription angeschaltet (Cunliffe and Smith, 1992), daher ist auch eine aktivierende Wirkung des endogenen *Xbra* der Ventralseite auf die *Xsna*-Expression zu vermuten. Dies alleine kann jedoch noch nicht die langsam fortschreitende Ausbreitung der *Xsna*-Expression erklären, da man sonst (1.) eine ebenso langsame und gleichgerichtete Ausbreitung der *Xbra*-Expression annehmen müßte und (2.) die animalen Grenzen der beiden Expressionsdomänen sich nicht annähern dürften. Die kultivierten Explantate der Ventralseite sprechen jedoch gegen diese beiden Annahmen (Abschnitt 2.2.1.1.).

Im Embryo wird die Expression von *Xbra* im Mesoderm abgeschaltet, kurz nachdem die Zellen involutiert sind (Essex et al., 1993). Im Explantat würde das einem Abschalten der *Xbra*-Expression in der mesodermalen Oberlippe gleichkommen, was ebenfalls beobachtet wurde (Abschnitt 2.2.1.1.). Also verhalten sich ventrale Explantate bezüglich der *Xsna*- und *Xbra*-Expression in Isolation so wie im Embryo. Daß für das Abschalten der *Xbra*-Expression in den involutierten Zellen der Ventralseite *Xsna* verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit geklärt werden.

3.2.2. Der Transkriptionsfaktor *Xsna* ist notwendig für das Abschalten der *Xbra*-Expression nach Involution

Obwohl *Xbra* durch die Mesoderminduktoren FGF, Activin, Vg1 und VegT induziert wird (Smith et al., 1991; Isaacs et al., 1994; Lustig et al., 1996b; Henry and Melton, 1998; Joseph and Melton; 1998; Kofron et al., 1999), ist seine Expression nur auf die marginale Zone begrenzt. Die Abwesenheit der *Xbra*-Expression in der vegetalen Hälfte wird durch Repression hervorgerufen. Es wurde gezeigt, daß daran Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren mitwirken. So sind *gsc* und *Mix.1* an der Repression von *Xbra* in der vegetalen Hälfte beteiligt (Artinger et al., 1997; Latinkic et al., 1997; Lemaire et al. 1998; Latinkic and Smith, 1999).

Es wird aber nicht nur die vegetale Grenze der *Xbra*-Expressionsdomäne durch Repression gebildet, sondern auch die animale. Daran ist SIP1 (Smad-interacting

protein1), ein Mitglied der δ EF1-Familie, beteiligt (Verschueren et al., 1999; Remacle et al., 1999; Lerchner et al., 2000).

Nach dieser Eingrenzung der *Xbra*-Domäne auf die marginale Zone sorgt *Xsna* auf der Ventralseite dafür, daß die Zellen aufhören *Xbra* zu exprimieren, nachdem sie involutiert sind. Hierfür spricht, daß sich (1.) die Expression von *Xsna* immer weiter in die *Xbra*-Expressionsdomäne ausbreitet (Abschnitt 2.2.1.1.) und (2.) gezeigt wurde, daß *Xsna* hinreichend und notwendig ist für die Repression von *Xbra* auf der Ventralseite (Abschnitt 2.2.3.2.). Demzufolge ist das langsame Zurückweichen der *Xbra*-Expressionsdomäne auf die Ausbreitung von *Xsna* und seine reprimierende Wirkung auf *Xbra* zurückzuführen. In Kontrollexplantaten wurde das Zurückweichen der *Xbra*-Expression nur im Zentrum des Explantates beobachtet (Abschnitt 2.2.3.2.). Es ist aber davon auszugehen, daß es sich bei der verbleibenden *Xbra*-Expression an den Rändern des Explantates um einen Artefakt handelt, da im Embryo ventral und lateral alle Zellen die Expression verlieren (Essex et al., 1993). Vermutlich entsteht dieser Artefakt durch das Schneiden des Gewebes. Eine ektopische Aktivierung der MAP-Kinase durch Verletzung des Gewebes wurde bereits nachgewiesen (LaBonne and Whitman, 1997). Die MAP-Kinase ist eine Komponente des FGF-Signalweges durch den *Xbra* induziert wird (Smith et al., 1991; Howe et al., 1992; Graves et al., 1994). Möglicherweise wird so die *Xbra*-Expression nahe der Schnittkante auf ein Niveau erhöht, von dem aus *Xsna* nicht mehr in der Lage ist, für eine vollständige Repression zu sorgen.

Obwohl *Xsna* hinreichend und notwendig für die Repression von *Xbra* ist (Abschnitt 2.2.3.2.), werden Transkripte beider Gene überlappend in der Oberlippe exprimiert (Abschnitt 2.2.1.1.). Es ist zu erwarten, daß zwischen dem Beginn der Transkription des *Xsna*-Repressors in einer Zelle und dem Vorhandensein einer wirksamen Menge des Genproduktes eine Zeitspanne vergeht. Diese ist jedoch vermutlich nicht so groß, daß mit ihr alleine ein länger andauerndes Überlappen der Expressionen erklärt werden könnte. Es gibt jedoch verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diese länger andauernde Überlappung. Einerseits ist denkbar, daß die Repression von *Xbra* durch *Xsna* indirekt erfolgt, so daß ein oder mehrere Gene die reprimierende Wirkung von *Xsna* übertragen und dadurch eine größere Verzögerung zwischen *Xsna*-Transkription und *Xbra*-Repression entsteht. Andererseits könnte die endogene reprimierende Wirkung von *Xsna* alleine relativ schwach sein und erst durch einen Kofaktor verstärkt werden, der unabhängig von *Xsna* reguliert wird.

Ob das Abschalten der *Xbra*-Expression durch *Xsna* direkt oder indirekt verläuft, ist nicht bekannt. Allerdings erscheint eine direkte Wirkung von *Xsna* nicht unwahrscheinlich, da das *Brachyury*-Homolog in dem Urochordaten *Ciona* ein direktes Zielgen des snail-Repressors ist (Fujiwara et al., 1998). Im *Brachyury*-Promotor von *Ciona* wurden vier Bindungsstellen für snail identifiziert (Fujiwara et al., 1998). Aus *Drosophila* sind ebenfalls die Sequenzen mehrerer DNA-Bindungsstellen für snail bekannt (Mauhin et al., 1993; Gray et al., 1994; Gray and Levin., 1996). An welche Sequenzmotive *Xsna* bindet, ist nicht untersucht.

Neben *Xbra* wurde in *Xenopus* noch das Pseudoallel *Xbra2* gefunden, welches das gleiche räumliche und zeitliche Expressionsmuster wie *Xbra* besitzt (Latinkic et al., 1997). Die Promotoren von *Xbra* und *Xbra2* (Artinger et al., 1997; Latinkic et al., 1997) zeigen mehrere Sequenzen von 6 - 8 Basenpaaren, die mit Teilbereichen der DNA-Bindungsstellen aus *Ciona* und *Drosophila* übereinstimmen. Dies läßt eine Untersuchung der *Xbra*-Promotoren auf DNA-Bindungsstellen für *Xsna* vielversprechend erscheinen.

Die ringförmige *Xbra*-Expressionsdomäne ist eigentlich aus zwei Unterdomänen zusammengesetzt, die verschieden reguliert werden. Der *Xbra2*-Promotor bewirkt nur eine ventrolaterale, jedoch keine dorsale Expression des Pseudoallels *Xbra2* (Lerchner et al., 2000). Es wird angenommen, daß ein unbekanntes „Enhancer-Element“ für die Expression auf der Dorsalseite verantwortlich ist (Lerchner et al., 2000). Die Überexpression von *Xsna* auf der Dorsal- und Ventralseite des Embryos führt zur Repression von *Xbra* auf beiden Seiten. Es wurden jedoch Unterschiede in der Wirksamkeit der Repression beobachtet (Abschnitt 2.2.3.2.), die vermutlich durch die verschiedene Regulation der beiden Seiten zustande kommt. Die gesamte Ventralseite scheint für die Repression sensitiv zu sein, da hier *Xbra* vollständig verschwindet. Auf der Dorsalseite, wo *Xbra* nur in der Oberlippe und der darüberliegenden epithelialen Schicht exprimiert wird, ist eine vollständige Repression nur selten zu beobachten. In den meisten Fällen wird nur der vegetale Teil der normalerweise *Xbra*-positiven Oberlippe reprimiert, so daß im animalen Teil der Oberlippe Expression zurückbleibt. Eine derart typische Verschmälerung der *Xbra*-Domäne in den meisten Präparaten kann kaum darauf beruhen, daß bei der Injektion immer nur der vegetale Teil der Oberlippe getroffen wurde. Vermutlich besteht die dorsale Oberlippe aus zwei Zonen. Der vegetale Teil der dorsalen

Oberlippe ist wie die gesamte ventrale Seite sensitiv, der animale Teil scheint dagegen weniger sensitiv zu sein. Trotzdem ist dort eine vollständige Repression möglich (Abschnitt 2.2.3.2.).

Da die Involution der Zellen von vegetal nach animal fortschreitet, handelt es sich bei den schlecht reprimierbaren animalen Oberlippenzellen um solche, die bis zum Ende der Gastrulation in der Lippe verbleiben. Zu diesem Zeitpunkt wird dort immer noch *Xbra* exprimiert. Die Nachkommen dieser Zellen bilden beim Auswachsen des Schwanzes den posterioren Teil der Chorda, in dem noch bis zum Schwanzknospenstadium *Xbra*-Expression nachweisbar ist (Gont et al., 1993). Möglicherweise spiegelt sich die lang andauernde *Xbra*-Expression in dieser Region auch in der Robustheit gegenüber der Repression durch *Xsna* wider.

Obwohl sich die *Xbra*-Expression auf der Dorsalseite durch *Xsna* reprimieren läßt, findet dies vermutlich im Embryo nicht statt. Grund hierfür ist, daß ab der mittleren Gastrula die präsumtiven Chordazellen aufhören, *Xsna* zu exprimieren, so daß die anfangs ringförmige Expressionsdomäne dorsal eine Lücke bekommt (Essex et al., 1993). In der präsumtiven Chorda wird *Xbra* weit über das Gastrulationsende hinaus exprimiert (Smith et al., 1991; Gont et al., 1993). Es ist anzunehmen, daß das Abschalten von *Xsna* in den Chordazellen dort erst diese lang andauernde *Xbra*-Expression gestattet.

Das gleiche wurde auch für *Ciona* gezeigt. *Snail* wird dort im gesamten Mesoderm, außer der Chorda, exprimiert. *Brachyury* wird überall da reprimiert, wo *snail* vorkommt, so daß seine Expression auf die Chorda beschränkt wird. Die ektopische Expression von *snail* in der präsumtiven Chorda von *Ciona* führt wie in *Xenopus* zu einer Repression von *Brachyury*. Folglich gestattet auch in *Ciona* die Abwesenheit von *snail* in der präsumtiven Chorda dort die Expression von *Brachyury* (Yasuo and Satoh, 1994; Corbo et al., 1997; Fujiwara et al., 1998).

3.3. Achsenbildung und Links-Rechts-Asymmetrie

Durch Überexpression von *Xsna* wurden Effekte auf die anterior-posterior Achse und die Links-Rechts-Asymmetrie der Organe beobachtet.

3.3.1. Störung der anterior-posterior Achse durch *Xsna*-Überexpression

Zwei Prozesse sind in *Xenopus* für die ungestörte Entwicklung der anterior-posterior Achse notwendig. Es muß Chorda-Differenzierung erfolgen, wofür in Maus (Chelsey, 1935; Gluecksohn-Schoenheimer, 1938; Gruneberg, 1958), Zebrafisch (Schulte-Merker et al., 1994; Odenthal et al., 1996; Stemple et al., 1996) und *Xenopus* (Conlon et al., 1996; Conlon and Smith, 1999) Brachyury notwendig ist.

Eine morphogenetische Bewegung, die konvergente Extension, bewirkt die Elongation der präsumtiven Chorda in *Xenopus*. Hierfür ist *Xwnt11*, ein Mitglied des Wnt-Signalweges, notwendig, das außerdem ein direktes Zielgen des Transkriptionsaktivators *Xbra* ist (Saka et al., 2000; Tada and Smith, 2000).

Die Überexpression von *Xsna* auf der Dorsalseite führt zu einer Reduktion der anterior-posterior Achse des Embryos (Abschnitt 2.2.3.6.). Dies liegt vermutlich daran, daß *Xsna* das für die Differenzierung der Chordazellen notwendige Gen *Xbra* reprimiert (Abschnitt 2.2.3.2.). Folglich ist zu erwarten, daß in diesen Embryonen die Reduktion der Achse darauf zurückzuführen ist, daß weniger Chordazellen differenzieren.

Da die Elongation der Chorda gewebsautonom und substrat-unabhängig stattfindet (Keller et al., 1985; Keller and Danilchik, 1988), bot sich eine Untersuchung anhand von Explantaten an. Nach *Xsna*-Überexpression wurde eine verminderte Elongation der dorsalen Explantate beobachtet (Abschnitt 2.2.3.6.). Diese ist vermutlich ebenfalls auf die Repression des für Chorda-Differenzierung notwendigen Genes *Xbra* zurückzuführen (Abschnitt 2.2.3.2.).

Durch eine zusätzliche Überexpression von *Xbra* läßt sich jedoch die gestörte Elongation der Explantate nicht beheben (Abschnitt 2.2.3.6.). Da die Injektion der *Xbra*-mRNA zu einer nicht durch *Xsna* transkriptionell regulierbaren Expression führt, ist zu erwarten, daß die Chorda-Differenzierung in diesen Explantaten normal verläuft. Es ist jedoch anzunehmen, daß in diesen Explantaten die konvergente Extension der präsumtiven Chorda gestört ist. Hierfür spricht, daß *Xsna* das für diese morphogenetische Bewegung notwendige Gen *Xwnt11* auch *Xbra*-unabhängig reprimiert (Abschnitt 2.2.3.5.).

Die Störung der Achsenbildung durch *Xsna* läßt sich also durch die Repression von Genen erklären, die für Differenzierung und morphogenetische Bewegung der Chordazellen notwendig sind.

3.3.2. Störung der Bildung des Zentralnervensystems durch *Xsna*

Findet die ektopische Expression von *Xsna* neben den präsumtiven Chordazellen auch im animal angrenzenden präsumtiven Neuralektoderm statt (Keller, 1991; Bauer et al., 1994; Vodicka and Gerhart, 1995), führt dies neben der Reduktion der Achse zu einem Verlust neuraler Kopfstrukturen (Abschnitt 2.2.3.6.). In diesen Embryonen waren nach äußerer Betrachtung keine Gehirnstrukturen und keine Augen zu erkennen. Wichtig für die Augenbildung ist das Augenbläschen, ein anteriorer Teil des Gehirns. Einerseits wird ein Teil des Auges von ihm gebildet, andererseits ist es notwendig für die Induktion der Linse (Jacobsen, 1966; Cvekl and Piatigorsky, 1996). So ist in Abwesenheit des Gehirns das Fehlen der Augen nicht verwunderlich. Es ist allerdings unklar, wie die Neuralentwicklung durch die ektopische Expression von *Xsna* gestört wird. Eine mögliche Erklärung wäre, daß in diesen Embryonen kein neural-induzierendes Mesoderm existiert. Da die zusätzliche ektopische Expression von *Xsna* in diesen Embryonen hauptsächlich das Neuralektoderm betrifft, erscheint jedoch wahrscheinlicher, daß die Störung der Neuralinduktion auf Seiten des Ektoderms zu finden ist. Denkbar ist eine Störung der Kompetenz der ektodermalen Zellen, so daß keine Induktion stattfinden kann. Möglich wäre aber auch, daß die Induktion zunächst normal verläuft, dann aber ein notwendiges Gen für die Neuralentwicklung reprimiert wird. Falls *Xsna* in der Lage ist

neurale Gene in *Xenopus* zu reprimieren, dann wäre dies ein konservierter Aspekt, da *snail* in *Drosophila* als Repressor vieler neuroektodermaler Gene wirkt (Kosman et al., 1991; Leptin, 1991; Ip et al., 1992b).

Es ist unwahrscheinlich, daß die Störung der Neuralentwicklung durch *Xsna* auf die Repression von *Xbra* zurückzuführen ist. Es wurde zwar gezeigt, daß *Xbra* auch in einem kleinen Teil des posterioren Neuralektoderms exprimiert wird, der überwiegende Teil des Neuralektoderms ist jedoch *Xbra*-negativ (Gont et al., 1993).

Xsna wird ab der späten Gastrula in einem Teil des Neuralektoderms exprimiert. Diese Expression ist aber nur auf Neuralleistenzellen begrenzt (Essex et al., 1993). Über die Funktion von *Xsna* in diesen Zellen ist wenig bekannt. Daher ist auch denkbar, daß das gesamte Neuralektoderm bei *Xsna*-Überexpression ein Neuralleistenzell-Schicksal annimmt, was zu einem Auswandern aller neuralen Zellen führen würde.

3.3.3. Der Effekt von *Xsna* auf die Somitenbildung

Durch Überexpression von *Xsna* wird eine Störung der Somitenbildung hervorgerufen (Abschnitt 2.2.3.7.). Es ist jedoch unklar, ob nur die Segmentierung des paraxialen Mesoderms gestört wird, oder ob kein paraxiales Mesoderm gebildet wird.

Brachyury ist notwendig für die Bildung posteriorer Strukturen in Maus (Chelsey, 1935; Gluecksohn-Schoenheimer, 1938; Gruneberg, 1958), Zebrafisch (Schulte-Merker et al., 1994; Odenthal et al., 1996; Stemple et al., 1996) und *Xenopus* (Conlon et al., 1996; Conlon and Smith, 1999), so daß ohne funktionelles Brachyury auch kein posteriores paraxiales Mesoderm entsteht. Da die *Xsna*-Überexpression zu einer Repression von *Xbra* führt (Abschnitt 2.2.3.2.), könnte dadurch die Störung der Somitenbildung hervorgerufen werden. Hierzu paßt jedoch nicht, daß die Störung im anterioren Bereich auftrat, wohingegen der posteriore Bereich in der Lage war segmentierte Somiten zu bilden (Abschnitt 2.2.3.7.). Deshalb ist unklar, ob diese Störung durch die *Xsna*-vermittelte Repression von *Xbra* zustande kommt, oder *Xbra*-unabhängig entsteht. Für letzteres spricht auch, daß die Inhibition der *Xsna*-

Translation morphologisch denselben Effekt auf die Somiten zeigt, wie eine Überexpression von *Xsna* (Abschnitt 2.2.3.7.). Da sich also sowohl zuviel, als auch zuwenig des Transkriptionsfaktors gleichermaßen auswirkt, scheint *Xsna* in einer definierten Menge für die ungestörte Entwicklung der Somiten vorhanden sein zu müssen.

Für die Segmentierung des paraxialen Mesoderms in Vertebraten spielen die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, eine wichtige Rolle. Im Zebrafisch werden *EphA4* und *ephrin-B2* in einer iterativen Art und Weise in den sich entwickelnden Somiten exprimiert. *EphA4* ist hierbei in der anterioren Hälfte, *ephrin-B2* in der posterioren Hälfte der Somiten zu finden (Durbin et al., 1998). Die Störung des Eph-Signalweges durch die ektopische Expression dominant negativ wirkender Konstrukte führt zur Bildung unregelmäßiger Somitengrenzen in Zebrafisch (Durbin et al., 1998). Im Hühnchen findet nach einem Verlust der *EphA4*-Expression keine Segmentierung des paraxialen Mesoderms statt (Schmidt et al., 2001).

In *Xenopus* ist *Xsna* zumindest in der frühen Gastrula in der Lage den EphA4-Rezeptor *Xbra*-unabhängig zu regulieren (Abschnitt 2.2.3.4.). Daher liegt die Vermutung nahe, daß die so verminderte EphA4-Expression eine Störung der Segmentierung des paraxialen Mesoderms hervorruft. So ließe sich jedenfalls der beobachtete Effekt bei *Xsna*-Überexpression erklären. Worauf die Störung bei der Inhibition der *Xsna*-Translation beruht, ist jedoch unklar.

3.3.4. Xsna und die Links-Rechts-Asymmetrie

Die Überexpression von *Xsna* auf der Dorsalseite des *Xenopus*-Embryos führte dort zu einer Repression von *Xbra*, verbunden mit einer vermutlichen Störung der Chordabildung (Abschnitt 2.2.3.2.; Abschnitt 2.2.3.6.). Für Maus, Zebrafisch und *Xenopus* wurde gezeigt, daß eine gestörte Chordabildung Auswirkungen auf die Links-Rechts-Orientierung der Organe hat (Danos and Yost, 1995; Danos and Yost, 1996; Lohr et al., 1997; Nascone and Mercola, 1997; Hyatt and Yost, 1998; King et al., 1998). So führen Mutationen in den *Brachyury*-Homologen von Maus (*T*) und Zebrafisch (*no tail*) neben dem Effekt auf die Achse zu einer Randomisierung der

Links-Rechts-Orientierung des Herzens (Danos and Yost, 1996; King et al., 1998). Daher ist auch für *Xenopus* ein indirekter Effekt von *Xsna* auf den situs denkbar, der durch die Repression von *Xbra* und der damit verbundenen Störung der Achsenbildung zustande kommt. Tatsächlich führte die *Xsna*-Überexpression in der präsumtiven Chorda zu einer Randomisierung des Herz-situs (Abschnitt 2.2.4.1.). Neben dieser artifiziellen Störung spricht jedoch vieles dafür, daß *Xsna* tatsächlich an der Regulation der Links-Rechts-Orientierung der Organe beteiligt ist:

So führte die Inhibition der *Xsna*-Translation auf der rechten bzw. linken Seite in einem Bereich, in dem nicht Chorda sondern nur Somiten und Seitenplattenmesoderm betroffen ist, ebenfalls zu Veränderungen des situs (Abschnitt 2.2.4.1.). Es wurde deutlich, daß *Xsna* auf der linken Seite für eine normale Orientierung des Herzens und auf der rechten Seite für die des Darmes notwendig ist (Abschnitt 2.2.4.1.). Dieses Ergebnis ist äußerst interessant, da erstmals ein Genprodukt, das in Somiten und Seitenplattenmesoderm beider Seiten exprimiert wird (Essex et al., 1993) auf jeder Seite nur für den ungestörten situs eines der untersuchten Organe notwendig ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß ein wichtiges Gen für die Links-Rechts-Asymmetrie durch *Xsna* reguliert werden kann. *Xnr1* ist eines von mehreren *nodal*-Genen in *Xenopus*, dem als einzigen eine Rolle bei der Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie zugeschrieben wird (Lowe et al., 1996; Lustig et al., 1996a; Sampath et al., 1997; Varlet and Robertson, 1997). *Nodal*-Homologe werden in allen bisher untersuchten Vertebraten auf der linken Seite des Embryos exprimiert (Levin et al., 1995; Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Lustig et al., 1996a; Lohr et al., 1997; Sampath et al., 1997; Rebagliati et al., 1998a; Feldman et al., 1998). Für Hühnchen, *Xenopus* und Maus wurde gezeigt, daß eine veränderte *nodal*-Expression zu einer gestörten Links-Rechts-Asymmetrie führt (Collignon et al., 1996; Levin et al., 1997; Sampath et al., 1997). Folglich ist die Beteiligung von *nodal* an einer linksseitig wirksamen Signalkaskade in Vertebraten konserviert.

Die ektopische Expression von *Xsna* in animalen Kappen von *Xenopus* führte zu einer Aktivierung der *Xnr1*-Expression (Abschnitt 2.2.4.2.). Da die snail-Homologe in *Drosophila* und *Ciona* als Repressor wirken (Ip et al., 1992b; Gray et al., 1994; Gray and Levine, 1996; Fujiwara et al., 1998) und im Frosch *Xsna* auch auf *Xbra*, *Xwnt11*

und *EphA4* reprimierend wirkt, ist eine indirekte Wirkung von *Xsna* auf *Xnr1* zu vermuten. Der „*Xenopus* lefty-related factor antivin“ (*Xatv*) wirkt als „Feedback-Inhibitor“ von *Xnr1* (Cheng et al., 2000). Daher ist für *Xsna* denkbar, daß es *Xatv* oder eine in der „Feedback-Inhibition“ nachgeordnete Komponente direkt reprimiert, was zu einer indirekten Aktivierung von *Xnr1* führen würde.

Xnr1 wird im linken Seitenplattenmesoderm nahe der Herzanlage exprimiert (Lohr et al., 1997) und seine ektopische Expression auf der rechten Seite führt zu situs-Defekten von Herz und Darm (Sampath et al., 1997). Möglicherweise ist die linksseitige *Xnr1*-Expression jedoch nur notwendig für die normale Orientierung des Herzens, aber nicht des Darmes. Wenn *Xsna* wiederum für die *Xnr1*-Expression der linken Seite notwendig wäre, dann ließe sich so der auf das Herz begrenzte Effekt der linksseitigen Inhibition der *Xsna*-Translation (Abschnitt 2.2.4.1.) erklären.

Analog hierzu ist *Xsna* vermutlich auf der rechten Seite für eine Komponente notwendig, die wiederum nur für die ungestörte Orientierung des Darmes, aber nicht des Herzens notwendig ist. Es ist hierfür jedoch bisher kein Kandidat bekannt.

Auch die Überexpression von *Xsna* auf einer Seite des Embryos in einem Bereich, in dem nicht Chorda, sondern nur Somiten und Seitenplattenmesoderm betroffen waren, führte zu Inversionen von Herz und Darm (Abschnitt 2.2.4.1.). Allerdings wurden die deutlichsten Effekte der links- bzw. rechtsseitigen Überexpression auf beide Organe gleichzeitig beobachtet. In geringerem Umfang war nur der Darm oder das Herz betroffen. Diese Beobachtungen erinnern an einen Effekt, der auftritt, wenn *Xnr1* neben der endogenen linksseitigen Expression zusätzlich rechtsseitig ektopisch exprimiert wird (Sampath et al., 1997). Folglich ist der Effekt der einseitigen *Xsna*-Überexpression konsistent mit dem einer beidseitigen *Xnr1*-Expression. Mehrere Punkte sprechen in der Tat dafür, daß eine einseitige Überexpression von *Xsna* zu einer beidseitigen *Xnr1*-Expression führen kann: *Xsna* ist in der Lage die Expression von *Xnr1* zu aktivieren (Abschnitt 2.2.4.2.). Weiterhin ist bekannt, daß die Expressionsdomäne von *Xnr1* wandert. Zunächst wird *Xnr1* linksseitig nahe der dorsalen Mittellinie exprimiert, bevor sich die Expression weit in das linke Seitenplattenmesoderm ausbreitet (Lohr et al., 1997). Es wird allgemein angenommen, daß die Mittellinie eine Barriere (physikalisch, biochemisch oder beides) zwischen der rechten und linken Seite bildet (Capdevila et al., 2000; Yost, 2001). Die Mittellinie spielt auch für die Begrenzung der *Xnr1* Expression auf die

linke Seite eine wichtige Rolle. Das Entfernen der Chorda mit dem darüberliegendem neuralen Gewebe führt zu einer beidseitigen *Xnr1*-Expression (Lohr et al., 1997). Die *Xsna*-Überexpression wurde weit vor der Bildung der Chorda vorgenommen. Daher ist anzunehmen, daß auch die Aktivierung von *Xnr1* vor der Entstehung der dorsalen Mittellinie stattfand. So konnte sich die durch *Xsna* aktivierte *Xnr1*-Expressiondomäne noch ungestört auf die jeweils andere Seite ausbreiten.

Das snail-Homolog des Hühnchens spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie. *cSnR* wird nur im Seitenplattenmesoderm der rechten Seite exprimiert (Abb. 31; Isaac et al., 1997). Dort reprimiert es den Homeodomänen-Transkriptionsfaktor *Pitx2* und sorgt dadurch für dessen linksseitig begrenzte Expression (Abb. 31; Patel et al., 1999). Im Hühnchen wird *nodal* linksseitig exprimiert und durch seine reprimierende Wirkung ist es dafür verantwortlich, daß die *cSnR*-Expression nur rechtsseitig auftritt (Patel et al., 1999). So ist hier also *nodal* im Signalweg oberhalb von *cSnR* angesiedelt.

Anders sieht die Situation in *Xenopus* aus. Die Homologen zu *nodal* (*Xnr1*) und *cSnR* (*Xsna*) sind zwar auch an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligt (Sampath et al., 1997; Abschnitt 2.2.4.1.), *Xsna* scheint jedoch im Signalweg oberhalb von *Xnr1* angesiedelt zu sein (Abb. 31). Da *Xsna* sowohl auf der rechten als auch auf der linken Seite des Embryos exprimiert wird (Essex et al., 1993), kann seine aktivierende Wirkung alleine nicht für die einseitig linke Expression von *Xnr1* verantwortlich sein. Vielmehr ist anzunehmen, daß im Embryo zusätzliche aktivierende Faktoren der linken Seite oder reprimierende Komponenten der rechten Seite für die einseitige *Xnr1*-Expression sorgen (Abb. 31).

Die Signalwege in *Xenopus* und Hühnchen haben gemeinsam, daß *Xnr1* bzw. *nodal* oberhalb von *Pitx2c* bzw. *Pitx2* angesiedelt ist und für dessen Aktivierung sorgt (Abb. 31; Logan et al., 1998; Piedra et al., 1998; Campione et al., 1999; Schweickert et al., 2000).

Die *Pitx2*-Expression hält in Vertebraten länger an als die anderer linksseitig exprimierter Gene. So wird *Pitx2* noch während der Organogenese von Herz, Darm und Magen auf deren linker Seite exprimiert. Das macht *Pitx2* zu einem guten Kandidaten für die Vermittlung zwischen den transient exprimierten Signalmolekülen und der Asymmetrie der Organe (Ramsdell and Yost, 1998).

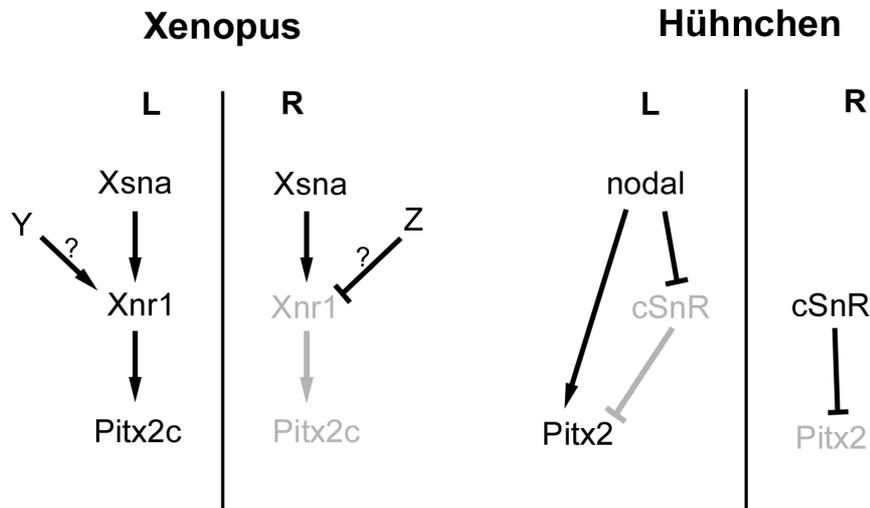


Abb. 31: Interaktionen der snail- und nodal-Homologen in *Xenopus* und Hühnchen
 Schema der linken (L) und rechten Seite (R) mit dazwischenliegender Mittellinie eines *Xenopus*- und Hühnchenembryos. Gene, die auf einer Seite nicht exprimiert werden sind dort in hellgrau dargestellt. Y: unbekannter Faktor der aktivierend auf die *Xnr1*-Expression der linken Seite wirkt; Z: unbekannter Faktor, der reprimierend auf die *Xnr1*-Expression der rechten Seite wirkt.

Auch in der Maus wird das *snail*-Homolog nach einer anfangs beidseitigen Expression schließlich nur im rechten Seitenplattenmesoderm exprimiert (Sefton et al., 1998). Eine Rolle für die Links-Rechts-Orientierung der Organe wurde aber noch nicht nachgewiesen.

3.4. Xsna-Effekte auf Gewebstrennung und Zell-Zell-Adhäsion

3.4.1. Mitglieder der Snail-Superfamilie regulieren Zell-Zell-Adhäsion

Für mehrere Mitglieder der Snail-Superfamilie wurde gezeigt, daß sie an der Kontrolle der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind.

Im Mesoderm von *Drosophila* findet während der Gastrulation ein Umschalten von DE-Cadherin zu DN-Cadherin statt (Oda et al., 1998). Hierbei ist *snail* sowohl an der Reduktion der *DE-Cadherin* Expression, als auch an der Erhöhung der *DN-Cadherin* Expression beteiligt (Oda et al., 1998). Ein weiteres Mitglied der Snail-Superfamilie

spielt eine wichtige Rolle für die Verzweigung des Tracheensystem in *Drosophila*. *Escargot* wird an den Tracheenspitzen exprimiert und bewirkt dort die Expression von *DE-Cadherin*. Das Vorhandensein dieses Cadherin-Typs ist notwendig für die Adhäsion und spätere Fusion der Tracheen (Tanaka-Matakutsa et al., 1996).

Für Maus und Mensch wurde gezeigt, daß *snail* auch als Onkogen wirken kann. So wird *snail* in einigen invasiven Tumor-Zell-Linien exprimiert, die die Gemeinsamkeit besitzen, *E-Cadherin* nicht zu exprimieren. Diese inverse Korrelation zwischen der Expression von *snail* und *E-Cadherin* liegt darin begründet, daß *snail* in Maus und Mensch ein Repressor von *E-Cadherin* ist (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Poser et al., 2001; Tan et al., 2001).

Schließlich bewirkt das Genprodukt von *slug* in Säuger-Epithelzellen die Dissoziation von Desmosomen verbunden mit einem Verschwinden des Desmosomen-spezifischen Cadherins Desmoglein (Savagner et al., 1997).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Überexpression von *Xsna* in Verbindung mit bFGF-Induktion zu einer stark reduzierten Zell-Zell-Adhäsion führt (Abschnitt 2.2.1.8.). Dies wurde sowohl mit Hilfe des Adhäsionstests nach Briehner und Gumbiner (1994) nachgewiesen, als auch mit einer neu entwickelten Variante, die sich besonders für die Untersuchung kleinerer Regionen des Embryos eignet. Die durch *Xsna* und bFGF verringerte Zell-Zell-Adhäsion konnte durch zusätzliche Expression von *EP/C-Cadherin* rückgängig gemacht werden. Dies spricht dafür, daß *Xsna* und bFGF einen spezifischer Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion hervorrufen. Daß Mitglieder der Snail-Superfamilie in Vertebraten und Invertebraten durch die Regulation von Cadherinen an der Kontrolle der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind, läßt zunächst selbiges auch für *Xsna* vermuten. Allerdings ist bislang in *Xenopus* kein Cadherin bekannt, dessen räumliche und zeitliche Expression zu einer Regulation durch *Xsna* in der Gastrula paßt (Choi and Gumbiner, 1989; Angres et al., 1991; Ginsberg et al., 1991; Herzberg et al., 1991; Levi et al., 1991; Espeseth et al., 1995; Tashiro, et al., 1995; Kühl and Wedlich, 1996; Hadeball et al., 1998; David and Wedlich, 2000).

3.4.2. Gewebstrennung in der *Xenopus* Gastrula

In diesem Abschnitt wird allgemein auf die Gewebstrennung in der *Xenopus*-Gastrula eingegangen, um anschließend den Beitrag von Xsna daran zu diskutieren.

In der frühen *Xenopus*-Gastrula wird noch keine Gewebstrennung beobachtet. Erst durch die Vegetale Rotation werden die Zellen des peripheren Blastocoelbodens nach außen bewegt, bis sie auf das Blastocoeldach treffen, von deren Zellen sie abgegrenzt bleiben, wodurch der Brachet'sche Spalt entsteht (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Somit sind die durch den Brachet'schen Spalt getrennten Gewebe ursprünglich räumlich voneinander getrennt, was diesen Vorgang von einer Delamination, wie sie z.B. in der ventralen Seite der späten Gastrula zwischen dem Endoderm und Mesoderm stattfindet (Abschnitt 2.1.3.), unterscheidet. Für die Gewebstrennung am Brachet'schen Spalt sind zwei Eigenschaften verantwortlich. Das Blastocoeldach benötigt Abstoßungsverhalten, das dafür sorgt, daß Endoderm und involutiertes Mesoderm abgestoßen werden. Dieses Verhalten alleine reicht jedoch nicht für die Gewebstrennung aus. Endoderm und involutiertes Mesoderm müssen zusätzlich Separationsverhalten besitzen, das es ihnen ermöglicht, von einem potentiell abstoßenden Blastocoeldach auch tatsächlich getrennt zu bleiben (Wacker et al., 2000).

Das Abstoßungsverhalten des Blastocoeldaches steigt erst nach der Mittblastula-Transition, dem Beginn der zygotischen Transkription, an und erreicht in der frühen Gastrula das voll ausgeprägte Niveau (Wacker et al., 2000). Der Grundzustand des Blastocoeldaches ist folglich „nicht abstoßend“, und erst durch die zygotische Transkription wird Abstoßungsverhalten erworben (Wacker et al., 2000).

Die vegetalen Zellen des präsumtiven Endoderms zeigen schon zu Beginn der Mittblastula-Transition voll ausgeprägtes Separationsverhalten. Deshalb entsteht dieses vermutlich unter maternaler Kontrolle (Wacker et al., 2000). Endoderm der ventralen Unterlippe besitzt zum frühesten Zeitpunkt, zu dem man die Region klar abgrenzen kann (Stadium 10,5) bereits stark ausgeprägtes Separationsverhalten (UL, Abb. 32). Ob dieses maternal oder zygotisch reguliert wird, ist jedoch unklar.

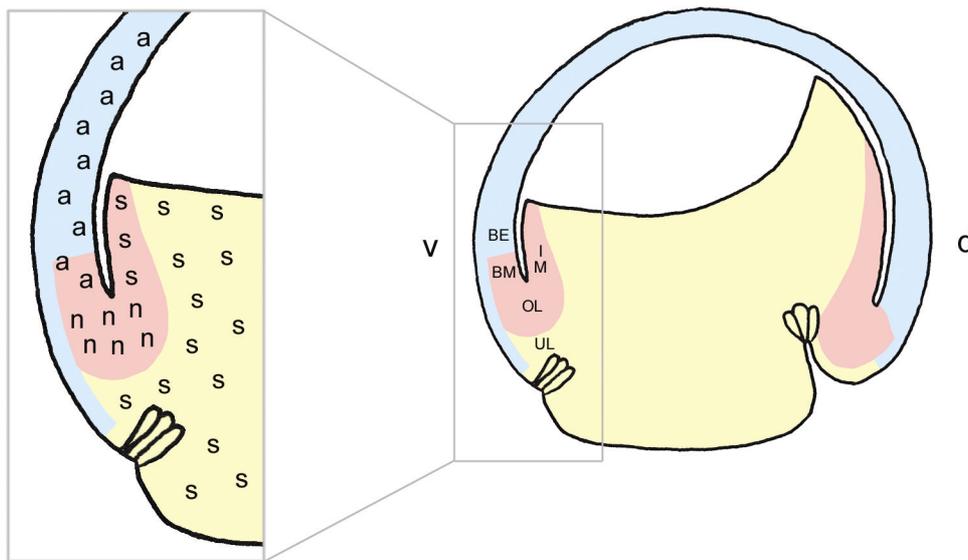


Abb. 32: Schema separierender und abstoßender Bereiche der Ventralseite.

Ein Embryo der mittleren Gastrula (Stadium 10,5) ist im Sagittalschnitt dargestellt und seine ventrale Seite vergrößert. Die Keimblätter sind durch verschiedene Farben dargestellt: Ektoderm blau, Mesoderm rot und Endoderm gelb. Zur Vereinfachung wurde die Grenze zwischen epithelialer Schicht und den inneren Zellen nicht eingezeichnet. a: abstoßend; BE: Blastocoeldachektoderm; BM: Blastocoeldachmesoderm; d: dorsal; IM: involutiertes Mesoderm; n: neutral (weder abstoßend noch separierend); OL: Oberlippe; s: separierend; UL: Unterlippe; v: ventral.

Das ventrale Mesoderm befindet sich während der Gastrulation um den Brachet'schen Spalt herum. Involutiertes Mesoderm ist auf der Innenseite des Brachet'schen Spaltes zu finden und besitzt Separationsverhalten (IM, Abb. 32). Auf der äußeren Seite des Brachet'schen Spaltes befindet sich das Blastocoeldach, das Abstoßungsverhalten zeigt. Dies ist eine Eigenschaft des gesamten Blastocoeldaches und somit auch in seinem mesodermalen Teil zu finden (BM, Abb. 32). Die mesodermale Oberlippe übernimmt eine besondere Funktion. Sie bildet eine Verbindung zwischen dem involutierten Mesoderm und dem Blastocoeldach, so daß sie an separierendes als auch an abstoßendes Gewebe grenzt (OL, Abb. 32). Da sie selbst weder Separations- noch Abstoßungsverhalten besitzt, ist sie eine „neutrale Zone“, was notwendig ist für einen spaltlosen Übergang der drei Regionen. Besäße sie z.B. Separationsverhalten, so würde das zwangsläufig zur Bildung eines Spaltes zwischen ihr und dem abstoßenden Blastocoeldachmesoderm führen. Hätte sie Abstoßungsverhalten, dann würde ein Spalt an der Grenze zum separierenden involutierten Mesoderm, als auch zur separierenden Unterlippe entstehen.

Da während der Gastrulation starke Zellbewegungen in das Innere des Embryos auftreten, die Integrität der Regionen um die Blastoporuslippe aber erhalten bleibt, müssen Separations- und Abstoßungsverhalten dynamisch reguliert werden. Für die Dorsalseite wurde bereits gezeigt, daß sich dort das Separationsverhalten im Mesoderm von anterior nach posterior ausbreitet (Wacker et al., 2000). Da dorsal zu Gastrulationsbeginn kein Blastocoeldachmesoderm existiert, scheint dort keine dynamische Veränderung des Abstoßungsverhaltens erforderlich. Für die Ventralseite wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß das Abstoßungsverhalten zurückweicht und sich das Separationsverhalten ausbreitet, was für eine Aufrechterhaltung der Regionen um die Blastoporuslippe sorgt.

Nun stellt sich die Frage, was zu der Gewebstrennung am Brachet'schen Spalt führt. Arbeiten von Holtfreter haben gezeigt, daß sich *in vitro* embryonale Explantate keimblattspezifisch neu anordnen (Holtfreter, 1939). Dabei kommt mesodermales Gewebe zwischen endodermalem und ektodermalem Gewebe zu liegen. Später wurde gezeigt, daß sich auch dissoziierte Zellen der Keimblätter voneinander abgrenzen. Aus einer Mischung embryonaler Zelltypen sortieren sich die Zellen der drei Keimblätter und ordnen sich gemäß ihrer relativen Lage im Embryo neu an (Townes and Holtfreter, 1955; Turner et al., 1989). Dieser Vorgang wird als „Sorting-out“ bezeichnet. Weitere Arbeiten zeigen, daß sich zwei Aggregate unterschiedlicher Herkunft in einem bestimmten Muster anordnen: ein Gewebe umgibt das andere (Übersichtsartikel: Steinberg, 1964). Auch dissoziierte Zellen nehmen nach einiger Zeit diese Anordnung an (Townes and Holtfreter, 1955; Steinberg, 1963; Steinberg, 1970). Gewebe, das im Inneren des Embryos liegt, umgibt hierbei Gewebe aus den äußeren Bereichen des Embryos (Steinberg, 1963; Steinberg, 1964; Steinberg, 1970). Ausgehend von diesen Ergebnissen und weiteren Experimenten wurde die „Differentielle Adhäsionshypothese“ (DAH) formuliert (Übersichtsartikel: Steinberg, 1978). Danach sind Unterschiede in der Kohäsivität von Zellpopulationen für diese Beobachtungen verantwortlich. Die DAH besagt, daß kohäsivere Aggregate von weniger kohäsiven Aggregaten umgeben werden. Die Kohäsivität von Zellen ist abhängig von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, wie z.B. den Cadherinen.

Von „Sorting-out“-Experimenten und der Messung der Kohäsivität der Zellen wird geschlossen, daß in der frühen Gastrula drei sich gegenseitig nicht mischende Zellpopulationen existieren. Obwohl die Grenzen dieser Populationen nicht genau

bestimmt wurden, wird zusätzlich angenommen, daß sie den drei Keimblättern entsprechen. Es wird bis zur späten Gastrula außer dem Brachet'schen Spalt keine Gewebstrennung beobachtet. Folglich scheinen die Kohäsionsunterschiede nur ein Durchmischen der Populationen zu verhindern, jedoch nicht für eine vollständige Gewebstrennung auszureichen.

An anderer Stelle gezeigte Ergebnisse sprechen zusätzlich gegen eine Beteiligung des „Sorting-out“ an der Gewebstrennung zwischen Blastocoeldach und involutiertem Mesoderm (Grimm, 1998; Wacker et al., 2000). Vielmehr wird angenommen, daß durch den Kontakt vom Blastocoeldach mit involutiertem Mesoderm eine lokale Verringerung der Zell-Zell-Adhäsion entsteht, die zur Spaltbildung führt (Wacker et al., 2000).

3.4.3. Xsna und das Abstoßungsverhalten

Während der Embryogenese spielt neben den Cadherinen auch die Gruppe der Eph-Rezeptoren in Verbindung mit ihren Liganden, den Ephrinen, eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zell-Zell-Adhäsion und damit verbundener Gewebstrennung (Holder and Klein, 1999; Mellitzer et al., 2000). An der Bildung des Brachet'schen Spaltes am nicht-mesodermalen Blastocoeldach ist der Eph-Signalweg beteiligt (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Die Untersuchung mit konstitutiv aktiven Eph-Rezeptoren und Ephrinen spricht dafür, daß die Interaktion zwischen einem Rezeptor vom EphB-Typ mit einem Ephrin-B dort zur Gewebstrennung führt, wobei der Rezeptor im Blastocoeldach und der Ligand im involutierten Mesoderm zu finden sein muß (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung).

Die Überexpression von *Xsna* führt zu einer Reduktion des Abstoßungsverhaltens in der animalen Kappe, als auch zu einer Zunahme der Höhe der Blastoporuslippe auf der Ventralseite (Abschnitt 2.2.1.2.). Dies spricht dafür, daß *Xsna* an der Kontrolle des Abstoßungsverhalten beteiligt ist, indem es für dessen Abschaltung sorgt. Da sich *Xsna* zudem fortschreitend in das abstoßende Blastocoeldachmesoderm ausbreitet (Abschnitt 2.2.1.1.), ist anzunehmen, daß dies für den Verlust des Abstoßungsverhaltens des Blastocoeldachmesoderms verantwortlich ist.

Als einziges der untersuchten Eph-Rezeptoren und Ephrine zeigte *EphA4* eine deutliche Veränderung der Transkription nach ektopischer *Xsna*-Expression (Abschnitt 2.2.3.3.). *EphA4* ist bFGF-induzierbar und wird ringförmig in der marginalen Zone der Gastrula exprimiert (Winning and Sargent, 1994). Möglicherweise ist *EphA4* verantwortlich für das Abstoßungsverhalten des Blastocoeldachmesoderms. Die Ausbreitung von *Xsna* in das Blastocoeldachmesoderm könnte dort zu einer Repression von *EphA4* führen, wie sie auch in animalen Kappen beobachtet wird (Abschnitt 2.2.3.3.). So wäre an dieser Stelle keine Interaktion mit einem Ephrin-Liganden des involutierten Mesoderms mehr möglich. Wenn diese Interaktion notwendig wäre für die lokale Verringerung der Zell-Zell-Adhäsion und einer damit verbundenen Aufrechterhaltung des Brachet'schen Spaltes, so würde sich dieser auflösen und die Höhe der Blastoporuslippe zunehmen, wie dies beobachtet wurde.

3.4.4. Starkes Separationsverhalten und niedrige Zell-Zell-Adhäsion sind korreliert

Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, besteht eine Korrelation zwischen Separationsverhalten und niedriger Zell-Zell-Adhäsion. So besitzt das voll separierende involutierte Mesoderm eine geringere Zell-Zell-Adhäsion als das nicht separierende Ektoderm (Davis et al., 1997). Bei der Mesoderminduktion durch Activin wird starkes Separationsverhalten induziert und gleichzeitig die Zell-Zell-Adhäsion deutlich reduziert (Briehner and Gumbiner, 1994). Durch eine Erhöhung der Adhäsion im Activin-induzierten Mesoderm geht das Separationsverhalten verloren (Wacker et al., 2000). Auf der anderen Seite kann es in Zellen der animalen Kappe allein durch eine Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion hervorgerufen werden (Wacker et al., 2000).

Für einige Genprodukte, die deutliches Separationsverhalten hervorrufen, wurde bislang nicht untersucht, ob sie auch zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion führen. Dies gilt für *Mix.1* und *gsc*, die an der Regulation des Separationsverhaltens des anterioren Mesoderms beteiligt sind und *in vitro* zusammen mit bFGF starkes

Separationsverhalten hervorrufen (Wacker et al., 2000). Für das Separationsverhalten des anterioren Mesoderms spielt auch Xfz7 eine wichtige Rolle, da es sowohl hinreichend also auch notwendig dafür ist (Winklbauer et al., 2001). Es ist ebenfalls nicht bekannt, ob dieser Effekt durch eine Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion hervorgerufen wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Xsna zusammen mit bFGF zu einer stark reduzierten Zell-Zell-Adhäsion führt (Abschnitt 2.2.1.8.). Gleichzeitig sind diese Faktoren hinreichend, stark ausgeprägtes Separationsverhalten hervorzurufen (Abschnitt 2.2.1.3.). Ob Xsna im Embryo notwendig ist für das Separationsverhalten, wurde jedoch noch nicht abschließend geklärt. Wenn Xsna dazu notwendig wäre, dann ist zu erwarten, daß eine spezifische Inhibition der Xsna-Translation durch Morpholinos zu einem Anhalten der Involutionbewegung führt, wie dies für Xfz7 bereits gezeigt wurde (Winklbauer et al., 2001). Erste Vorversuche mit geringer Anzahl von Embryonen sprechen aber gegen eine entscheidende Rolle bei der Etablierung des Separationsverhaltens. Embryonen, deren Xsna-Translation ventral inhibiert wurde, gastrulierten von außen betrachtet scheinbar so wie Kontrollembryonen (nicht gezeigt). Auch in der geringen Anzahl von Aufbrüchen verschiedener Gastrulastadien waren keine reproduzierbaren Unterschiede zu Kontrollembryonen zu beobachten (nicht gezeigt). Diese Vorversuche sprechen dafür, daß Xsna nicht notwendig ist für das Separationsverhalten der gesamten Ventralseite. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Möglicherweise ist Xsna nur notwendig für das Separationsverhalten eines kleinen Teils des ventralen Mesoderms, was in den Vorversuche nicht auffiel. Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, daß Xsna notwendig ist für das Separationsverhalten des anterioren dorsalen Mesoderms, wie dies für Xfz7 gezeigt wurde (Winklbauer et al., 2001). Anteriores dorsales Mesoderm kann durch hohe Activin-Konzentration induziert werden (Green et al., 1992; Gurdon et al., 1996), die Inhibition der Translation hat jedoch gezeigt, daß Xsna nicht für das Activin-induzierte Separationsverhalten notwendig ist (Abschnitt 2.2.1.7.). Denkbar ist aber, daß Xsna nur für das Separationsverhalten des posterioren Mesoderms notwendig ist.

Eine anderen Erklärungsmöglichkeit wäre, daß Xsna zwar hinreichend, aber tatsächlich nicht notwendig für das Separationsverhalten ist. Möglicherweise kann ein nahverwandtes Mitglied der Snail-Superfamilie bei einem Ausfall von Xsna

diesen Effekt kompensieren. So wurde für *Xenopus* gezeigt, daß das spezifische Ausschalten der *slug*-Expression durch antisense-RNA zu einer verstärkten Expression von *Xsna* während der Gastrulation führt (Carl et al., 1999). Umgekehrt ist also auch beim Ausfall von *Xsna* eine Kompensation durch *slug* denkbar. Zusätzliche Versuche müssen aber erst noch zeigen, ob auch durch *slug* Separationsverhalten ausgelöst werden kann, so daß eine Kompensation möglich erscheint.

3.4.5. Möglicherweise ist das vorzeitige Auslösen der Vegetalen Rotation durch *Xsna* auch auf eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion zurückzuführen

Die Vegetale Rotation ist an der Internalisierung von Mesoderm und Endoderm beteiligt. Sie beginnt dorsal und breitet sich über beide Seiten nach ventral hin aus (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Ihre Ausbreitung ist nicht immer auf beiden lateralen Seiten symmetrisch (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Dies ließ zunächst möglich erscheinen, daß eine Beziehung zwischen der asymmetrischen Ausbreitung der Vegetalen Rotation und der späteren Links-Rechts-Asymmetrie der Organe besteht. Der Effekt der Überexpression von *Xsna* auf die Links-Rechts-Orientierung der Organe (Abschnitt 2.2.4.1.) wäre dann auf die Störung der Ausbreitung der Vegetalen Rotation zurückzuführen. Wenn eine Beziehung zwischen beiden Prozessen besteht, dann würde man für Kontrollembryonen erwarten, daß in den allermeisten Fällen bei der Ausbreitung der Vegetalen Rotation dieselbe laterale Seite führt. Erste Vorversuche sprechen jedoch gegen eine Beziehung zwischen der Ausbreitung der Vegetalen Rotation und der Links-Rechts-Orientierung der Organe (M. Kordhals und R. Winklbauer, persönliche Mitteilung).

Die Untersuchung der Vegetalen Rotation an Gastrulascheibchen verdeutlicht, daß die Bewegung nicht nur auf die obersten Zellen des Blastocoelbodens beschränkt ist, sondern daß auch Zellbewegungen in der vegetalen Zellmasse unterhalb des

Blastocoelbodens stattfinden. Diese führen dazu, daß aus der Tiefe des Endoderms stammende Zellen an der Oberfläche des Blastocoelbodens interkalieren und diesen ausdehnen (Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001). Es ist bisher nicht bekannt, welcher Mechanismus für die Bewegung der Zellen bei der Vegetalen Rotation verantwortlich ist und welche Moleküle letztendlich die Bewegung vorantreiben.

Für die *Xsna*-Expression wurde gezeigt, daß sich diese wie die Vegetale Rotation von dorsal nach ventral ausbreitet (Sargent and Bennet, 1990), was einen möglichen Zusammenhang vermuten läßt. In der Tat bewirkt die ektopische Expression von *Xsna* auf der Ventralseite ein vorzeitiges Auslösen der Zellbewegungen (Abschnitt 2.2.2.). Dies findet nach kurzer Anfangsphase in einer für die Vegetale Rotation typischen Weise statt.

Die Zell-Zell-Adhäsion spielt eine wichtige Rolle für morphogenetische Bewegungen während der Gastrulation. So ist eine verringerte Zell-Zell-Adhäsion wichtig für die Bewegung der Zellen während der konvergenten Extension (Brieher and Gumbiner, 1994; Lee and Gumbiner, 1995; Hadeball et al., 1998; Kim et al., 1998). Es ist auffällig, daß in dem Bereich des Blastocoelbodens, in dem bei der Vegetalen Rotation starke Zellbewegungen auftreten, die Zellen wenig adhäsiv erscheinen (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Vermutlich ist also für die Vegetale Rotation neben einem Prozeß, der für die Bewegung der Zellen sorgt, auch eine Erniedrigung der Zell-Zell-Adhäsion nötig, die letztendlich erst die Beweglichkeit der Zellen ermöglicht.

Obwohl bisher nur gezeigt wurde, daß *Xsna* die Adhäsion animaler Zellen reduziert, erscheint ein vergleichbarer Effekt für endodermale Zellen möglich. Folglich könnte *Xsna* auf die Vegetale Rotation permissiv wirken, indem es sie durch eine Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion ermöglicht, ohne die Bewegung der Zellen aktiv voranzutreiben. Daß *Xsna* an der Kontrolle des bewegungserzeugenden Prozesses der Vegetalen Rotation beteiligt ist, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ob *Xsna* notwendig ist für die Vegetale Rotation, ist noch zu untersuchen.

Neben *Xsna* scheint auch der endodermal exprimierte Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Mix.1 (Rosa, 1989) an der Regulation der Vegetalen Rotation beteiligt zu sein. Es wird angenommen, daß Mix.1 als Transkriptionsaktivator wirkt

(Lemaire et al., 1998; Latinkic and Smith, 1999). Die ektopische Expression eines *Mix.1*-Konstruktes, bei dem die *Mix.1*-DNA-Bindungsdomäne an die Aktivator-domäne von Herpes VP16 ligiert wurde (Lemaire et al., 1998), bewirkt eine leichte Verstärkung der Vegetalen Rotation (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Andererseits führt die Expression eines Konstruktes, bei dem anstelle der Aktivator-domäne die Repressor-domäne von *Drosophila* Engrailed verwendet wurde (Lemaire et al., 1998) zum Anhalten der Vegetalen Rotation (R. Winklbauer, persönliche Mitteilung). Ob *Mix.1* notwendig ist für die Vegetale Rotation, kann jedoch mit diesen Konstrukten nicht geklärt werden. Anstelle eines tatsächlichen Ausschaltens eines Transkriptionsfaktors wird in diesem Fall ein Transkriptionsaktivator in einen Transkriptionsrepressor verwandelt. Um *Mix.1* tatsächlich auszuschalten, bietet sich die Verwendung von Morpholinos an.

3.5. *Xenopus* snail und *Drosophila* snail

Twist und snail spielen in *Drosophila* eine entscheidende Rolle für die Internalisierung des Mesoderms. Neben dem Faktor dorsal wirkt dort auch der Transkriptionsfaktor twist aktivierend auf die *snail*-Expression (Leptin, 1991; Ip et al., 1992a). Es erschien auch in *Xenopus* eine Beteiligung des twist-Homologs an der Regulation von *Xsna* möglich. Ein derartiger Effekt konnte in animalen Kappen jedoch nicht beobachtet werden (Abschnitt 2.2.3.1.). In *Xenopus* ist *snail* durch die Mesoderminduktoren bFGF und Activin induzierbar (Sargent and Bennett, 1990).

Anders als *Xsna* ist das *Drosophila*-Homolog nicht hinreichend, deutliches Separationsverhalten in der animalen Kappe von *Xenopus* zu erzeugen (Abschnitt 2.2.1.7.). Jedoch wird Activin-induziertes Separationsverhalten durch *Drosophila* snail stark reduziert (Abschnitt 2.2.1.7.). Dieser Effekt könnte durch eine kompetitive Inhibition erklärt werden. Voraussetzung hierfür wäre, daß *sna* zwar die DNA-Bindungsstellen von *Xsna* im Promotor eines angenommenen Zielgenes erkennt und dort bindet, jedoch im *Xenopus*-Kontext nicht reprimieren kann. Damit stimmt überein, daß die Genprodukte von *sna* und *Xsna* keine signifikante Homologie

außerhalb der DNA-bindenden Zinkfingerdomäne besitzen, diese Domäne selbst jedoch insgesamt zu 66% homolog ist (Sargent and Bennett, 1990). An der DNA-Bindung ist jedoch nicht der gesamte Bereich eines Zinkfingers beteiligt. Zwei nicht-kanonische Bereiche der Finger von denen angenommen wird, daß sie im Zentrum der DNA-Bindungsstelle liegen, sind zwischen *sna* und *Xsna* für alle 5 Finger zu 80% bzw. 90% identisch (Gibson et al., 1988; Sargent and Bennett, 1990). Folglich erscheint es möglich, daß *sna* an DNA-Bindungsstellen von *Xsna* bindet, wenn auch vielleicht schlechter als das *Xenopus*-Homolog.

Will man die Reduktion des Activin-Effektes durch *sna* mit einer kompetitiven Inhibition an *Xsna*-Bindungsstellen erklären, so müßte zusätzlich angenommen werden, daß die ungestörte Wirkung von *Xsna* für voll ausgeprägtes Separationsverhalten notwendig ist. Dann wäre zu erwarten, daß *sna* auch das durch *Xsna* in Verbindung mit bFGF hervorgerufen Separationsverhalten reduziert. Ein derartiger Effekt wurde jedoch nicht beobachtet (Abschnitt 2.2.1.7.). Dies kann aber auch an einem technischen Grund liegen. Da die Injektionsmenge von 2000pg Gesamt-RNA pro Blastomere bereits hoch ist, erschien das Überschreiten dieser Menge nicht sinnvoll. Deshalb wurde die halbe Menge *sna*-RNA bei der Koexpression mit *Xsna* verwendet als im Activin-Ansatz (Abschnitt 2.2.1.7.), so daß beide Versuche nicht direkt vergleichbar sind. Wenn *Xsna* im *Xenopus*-Kontext deutlich besser an die DNA bindet als *sna*, wäre bei der Injektion gleicher Mengen zu erwarten, daß eine mögliche kompetitive Inhibition unerkannt bleibt. Allerdings konnte durch die Inhibition der *Xsna*-Translation gezeigt werden, daß *Xsna* nicht notwendig ist für das Activin-induzierte Separationsverhalten (Abschnitt 2.2.1.7.). Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß der Effekt von *sna* auf das Activin-induzierte Separationsverhalten durch eine kompetitive Inhibition mit *Xsna* zu erklären ist.

Sna könnte aber zu einer kompetitiven Inhibition eines anderen nahverwandten Mitglieds der Snail-Superfamilie in *Xenopus* führen. *Slug* und *snail* sind vermutlich in höheren Vertebraten durch eine Genduplikation entstanden (Sefton et al., 1998). Die Genprodukte von *Xenopus slug* und *Xsna* sind hochkonserviert. Ihre Zinkfingerdomänen sind zu 94% identisch, aber auch der restliche Teil ist stark konserviert (Mayor et al., 1995). Die Homologie der Zinkfingerdomänen von *Xenopus slug* und *Drosophila snail* beträgt 69% (Mayor et al., 1995) und ist damit vergleichbar

mit der von Xsna und *Drosophila snail* (66%; Sargent and Bennett, 1990). Außerhalb der Zinkfingerdomäne besteht keine signifikante Homologie zwischen *Xenopus slug* und *Drosophila snail* (Mayor et al., 1995). Bisher ist aber noch nicht bekannt, ob *Xenopus slug* durch Activin induziert wird und es eine Rolle bei der Entstehung des Separationsverhaltens spielt. Eine direkte Wirkung von *Xenopus slug* als Repressor wurde bereits gezeigt (Mayor et al., 2000).

4. Material und Methoden

4.1. Gewinnung von Embryonen

Durch Injektion des Hormons Gonadotropin wird bei adulten *Xenopus laevis* Eiablage und Befruchtung induziert. Dazu wurden je 500 U humanes Gonadotropin (Serva) in die dorsalen Lymphsäcke eines Weibchens und eines Männchens injiziert. Die Gallerthülle der so gewonnenen Embryonen ließ sich durch etwa fünfminütige Inkubation in 1/10 MBS, 2% Cystein, pH 8,0 entfernen. Anschließend wurden die Embryonen in 1/10 MBS überführt und zwischen 18 und 23° C gehalten. Die Bestimmung der Stadien erfolgte nach der Normaltafel von Nieuwkoop and Faber (1967).

4.2. Präparation von Embryonen und Explantaten

Zur Operation wurden die Embryonen in Petrischalen (35-mm-Gewebekulturschalen, Greiner), deren Böden mit Plastilin ausgekleidet waren, überführt. Alle Eingriffe wurden in 1 x MBS vorgenommen. Die Befruchtungsmembranen ließen sich mit zwei Uhrmacherpinzetten (Dumont) entfernen. Als Operationsmesser dienten Kanülen mit montierten Wimpern. Bei einigen Embryonen wurde ein Sagittalschnitt mittels einer Rasierklinge vorgenommen.

Um ein Abkugeln mit anschließender Verheilung der Schnittkanten zu vermeiden, wurden die Explantate auf den Petrischalenböden mittels Deckglasstreifen eingeklemmt und kultiviert. Befestigt wurden die Deckglasstreifen mit Silikon. Die Petrischalen und Deckgläser waren zuvor 30 Minuten mit 5% Rinderserumalbumin (BSA) in H₂O abgesättigt worden, um ein Ankleben der Explantate zu vermeiden.

Bei einigen dorsalen Explantaten wurde die Grenze der Blastoporuslippe mit Nilblausulfatkristallen (Kirschner and Hara, 1980) markiert und während der Kultivierung durch Zeitraffer-Aufnahmen (Panasonic Colour CCTV-Kamera WV-

CP210/G, Panasonic Videorecorder AG-6720, JVC Video Monitor TM-1500PS) dokumentiert. Die Farbmarken der Lippengrenze ließen sich nicht fixieren, wurden aber nach der Kultivierung auf die Fotos (Abb. 4) übertragen.

4.3. Zelladhäsionstests

4.3.1. Reaggregationstest

Der Reaggregationstest wurde nach Briehar and Gumbiner (1994) modifiziert. Fünf animale Kappen wurden in Kalzium-und-Magnesium-freiem Medium dissoziiert. Die epitheliale Schicht wurde verworfen. Die Einzelzellen wurden in 24-Lochplatten überführt, deren Böden mit 1% Agar beschichtet waren. Zu den Zellen im Kalzium-und-Magnesium-freiem Medium wurde Kalzium (Endkonzentration 2 mM) zugegeben. Die anschließende Reaggregation wurde auf einem Schütteltisch vorgenommen, so daß auf alle Proben die gleiche Scherkraft wirkte. Dabei bilden adhäsivere Zellen schneller größere Aggregate als weniger adhäsive Zellen.

4.3.2. Dissoziationstest

Es wurden gleich große Aggregate in Kalzium-und-Magnesium-freiem Medium dissoziiert. Die Dissoziation wurde auf einem Schütteltisch vorgenommen, so daß auf alle Proben die gleiche Scherkraft wirkte. Die Aggregate adhäsiverer Zellen zerfallen langsamer als Aggregate weniger adhäsiver Zellen.

4.4. Mikroinjektion von RNA, Morpholinos und Lucifer Yellow

Für die Injektion wurden Glaskapillaren (GB120F8P von Science Products) mit einem Mikropipettenpuller (Modell P-87 von Sutter Instrument Co.) ausgezogen. Die Spitzen der so entstandenen Injektionskanülen wurden mit einer Uhrmacherpinzette abgebrochen, so daß eine Öffnung von etwa 1 µm entstand. Ein Tropfen der zu injizierenden Lösung wurde auf Parafilm gegeben und durch eine Vakuumpumpe (ME2C/1,7 von Vakuuberg GmbH & Co.) in die Injektionskanüle gesaugt.

Die zu injizierenden Embryonen wurden 30 - 40 Minuten in 2% Ficoll 400 in 1/10 MBS inkubiert. Die osmotisch aktive Lösung entzieht dem perivitellinen Raum Wasser. Dadurch legt sich die Befruchtungsmembran direkt auf den Embryo, so daß dieser nicht rotieren kann.

Die Lösungen wurden mittels Druckinjektion (Pneumatic Pico Pump PV 820 von Bachofer) in 8-Zell-Embryonen injiziert. Die Ausrichtung der Injektionskanüle erfolgte mit einem Mikromanipulator (Leitz GmbH, Wetzlar). Die Kalibrierung des Injektionsvolumens geschah in einem Immersionsöl-Tropfen. Nach Einstellung des Haltedrucks, der ein Zurücklaufen von Flüssigkeit in die Kanüle verhinderte, wurde eine Injektion in das Öl durchgeführt. Über den Durchmesser des injizierten Tropfens konnte sein Volumen ermittelt werden. Injektionen mit einem Volumen von 8 nl in eine Blastomere des 8-Zell-Stadium (Stadium 4) haben sich als besonders erfolgreich erwiesen. Das gewünschte Volumen wurde durch die Wahl einer geeigneten Injektionsdauer eingestellt. Die Konzentration der Injektionslösung wurde so gewählt, daß das Injektionsvolumen die gewünschte Menge enthielt. Alle zu injizierenden Lösungen wurden mit Gurdon's Puffer verdünnt. Die pro Blastomere injizierte Menge an RNA und Morpholinos ist angegeben. Es wurden 8 nl Lucifer Yellow Dextran (Molecular Probes, 1,5%) injiziert. Animal wurde in die vier Blastomeren des animalen Pols injiziert. Die dorsale bzw. ventrale Injektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, ebenfalls in alle vier Blastomeren der jeweiligen Seite. Um den Wundverschluß zu ermöglichen, wurden die Embryonen nach der Injektion für etwa eine Stunde in 1 x MBS und anschließend in 1/10 MBS kultiviert.

4.5. Dil-Markierung zur Erstellung eines Anlageplans der Lippenregion

Die Markierung der Zellen durch den Vitalfarbstoff Dil wurde nach Gont et al. (1993) modifiziert. Dil (Molecular Probes) wurde in Dimethylformamid gelöst (6 mg/ml) und mit 0,2 M Sucrose auf 0,7 mg/ml verdünnt. Diese Lösung wurde in Injektionskapillaren gesaugt. Die Markierungen wurden im Stadium 10,5 auf der Ventralseite vorgenommen. Dazu wurde zuerst die Befruchtungsmembran entfernt. Dann wurde ein kleiner Schnitt durch die epitheliale Schicht an der Stelle vorgenommen, an der die darunterliegenden inneren Zellen markiert werden sollten. Ein kurzzeitiges Aufklaffen der epithelialen Schicht machte die inneren Zellen für den Farbstoff zugänglich. Die Dil-Lösung wurde aus der Kapillare auf die inneren Zellen gegeben ohne diese zu verletzen. Nach kurzer Zeit war der Schnitt verheilt und die Embryonen wurden entweder sofort in 4% Formaldehyd fixiert oder bis zu den angegebenen Stadien kultiviert.

4.6. Schneiden von fixierten Präparaten

Die Präparate wurden vor dem Schneiden mindestens 1 Stunde in 4% Formaldehyd fixiert. Schnitte durch Gastrulae und den vorher präparierten Darm von Kaulquappen wurden mit einer Rasierklinge vorgenommen. Querschnitte durch Kaulquappen (Schichtdicke: 100 µm) wurden mit einem Vibratom (D.S.K. Microslicer DTK-3000) nach Standardmethoden durchgeführt.

4.7. Blastocoeldachttest zur Untersuchung von Abstoßungs- und Separationsverhalten

Mit Hilfe des Blastocoeldachttests (Winklbauer and Keller, 1996; Winklbauer et al., 1996; Wacker et al., 2000; Ibrahim and Winklbauer, 2001; Winklbauer et al., 2001)

kann unterschieden werden, ob sich zwei Gewebe bei Kontakt mischen oder getrennt voneinander bleiben. Dazu werden Testaggregate auf ein Substrat (Blastocoeldach oder Blastoporuslippe) gebracht (Abb. 33). Die Aggregate sinken entweder in das Substrat ein, oder bleiben abgegrenzt auf dessen Oberfläche. Für diese Gewebstrennung müssen folgende Eigenschaften der Gewebe vorhanden sein:

Das Substrat muß **Abstoßungsverhalten** besitzen. Dieses stellt sicher, daß z.B. involutierte Mesoderm und Endoderm nicht, andere Zellen aber sehr wohl in das Substrat einsinken können. Das Abstoßungsverhalten des Substrates alleine reicht also noch nicht für eine Gewebstrennung aus. Sie kann nur erfolgen, wenn die Aggregate, wie z.B. solche des involutierten Mesoderms oder Endoderms, auch **Separationsverhalten** besitzen, was es ihnen erlaubt, von einem abstoßenden Substrat auch tatsächlich getrennt zu bleiben (Wacker et al., 2000).

Mit Hilfe des Blastocoeldachttests (Abb. 33) kann sowohl das Separationsverhalten, als auch das Abstoßungsverhalten untersucht werden. Zur Untersuchung des Abstoßungsverhaltens des Substrates wurden Aggregate aus dem involutierten Mesoderm verwendet, das voll ausgeprägtes Separationsverhalten zeigt. Um das Separationsverhalten der Aggregate zu testen wurden Blastocoeldächer des Stadiums 10+ bis 10,5 als Substrat verwendet, die voll ausgeprägtes Abstoßungsverhalten besitzen.

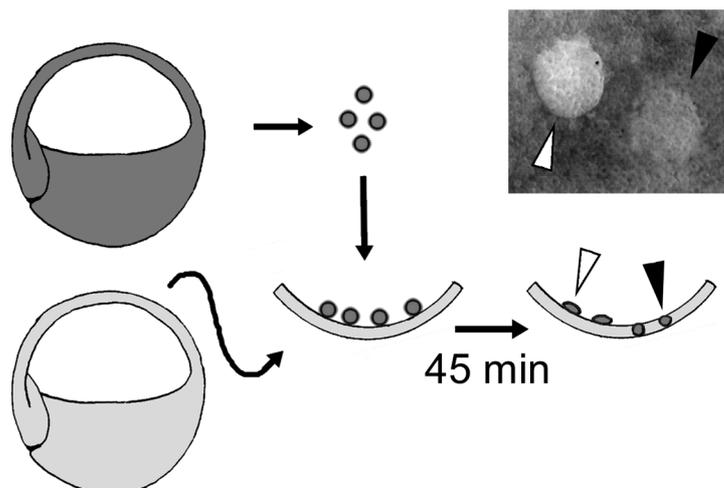


Abb. 33: Schematische Darstellung des Blastocoeldachttests.

Explantierte Zellaggregate wurden auf die Innenseite eines Substrates, in diesem Fall ein Blastocoeldach, gelegt. Nach 45 Minuten wird unter Streiflicht der Anteil nicht eingesunkener Aggregate bestimmt. Die Streiflichtansicht eines eingesunkenen (schwarze Pfeilspitze) und eines nicht eingesunkenen Aggregates (weiße Pfeilspitze) ist rechts oben exemplarisch dargestellt.

Aggregate von etwa 10 Zellen wurden auf das Substrat gelegt. Als Substrat wurden Blastocoeldächer oder Blastoporuslippen verwendet. Bei den Blastoporuslippen wurde vorher die Testoberfläche durch das Verheilen mehrerer Lippen aneinander vergrößert. Die Substrate wurden mit den daraufliegenden Aggregaten unter einem Deckgläschen fixiert, um ein Zusammenrollen zu vermeiden und für 45 Minuten kultiviert. Danach wurde unter Streiflicht der Anteil der Aggregate bestimmt, der nicht eingesunken war. Je nachdem, welches der beiden Verhalten untersucht wurde, wird dieser Anteil als **abstoßend** oder **separierend** bezeichnet.

4.8. Statistische Auswertung

Zur Prüfung der Signifikanz eines Unterschiedes zur jeweiligen Kontrollgruppe wurde für Ergebnisse des Blastocoeldachttests der Fisher-Exact-Test verwendet. Zur Bewertung der Unterschiede der Höhe der Blastoporuslippe von Embryonen mit *Xsna*-Überexpression zu Kontrollembryonen wurde der Mann-Whitney-Test benutzt. Als Schwelle für die Irrtumswahrscheinlichkeit einer Signifikanzaussage wurde $p < 0,05$ betrachtet. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$ oder $p < 0,001$) sind auch angegeben.

4.9. Mesoderminduktion animaler Kappen

Zur Induktion mit bFGF wurde das Ektoderm der animalen Kappen im Stadium 8 explantiert und für 90 Minuten in bFGF (Humanes rekombinantes bFGF, Konzentration 100-400 ng/ml) inkubiert. Das bFGF wurde in 1 x MBS mit 0.1% BSA auf die benötigte Endkonzentration gebracht.

Die Induktion mit Activin (Humanes rekombinantes Activin, Konzentrationen 200-600 U/ml) erfolgte durch Injektion in das Blastocoel (Cooke and Smith, 1989), um wenig Activin zu verbrauchen. Zuvor wurden die Embryonen für 15 Minuten in Ficoll (2% in

1/10 MBS) inkubiert. Das Activin wurde im Stadium 8 in das Blastocoel injiziert und nach 90 Minuten wurden die induzierten Kappen explantiert.

Nach Induktion wurden die Kappen in 1 x MBS überführt und darin bis zum Experiment inkubiert. Zusätzlich wurden mindestens 3 induzierte Kappen als Kontrolle für die erfolgreiche Induktion weiter kultiviert. Während nicht induzierte animale Kappen kompakt bleiben und eine faltige Oberfläche haben, zeigen Activin-induzierte Kappen nach einigen Stunden eine deutliche Elongation (Smith, 1987; Smith et al., 1990; van den Eijnden Van Raaij et al., 1990). Nach Induktion mit bFGF zeigen animale Kappen bis zu einem Tag ebenfalls deutliche Elongation, die dann jedoch zurückgeht. Statt dessen bildet sich ein großes, flüssigkeitsgefülltes Bläschen mit glatter Oberfläche (Slack et al., 1987).

4.10. Fotodokumentation

Die Fotos entstanden entweder an einem Binokular (Leica MZFLIII) oder einem Mikroskop (IM35). Diafilme (Agfa CTX 100) wurden mit einer Spiegelreflexkamera (Olympus OM 4) belichtet. Es wurde aber auch eine Digitalkamera (Zeiss AxioCam) mit entsprechender Software (AxioVision 3.0) verwendet oder ein Schnappschuß vom Bild einer Videokamera (CCD-Videokamera Panasonic WV-CL 700/G) mit einer geeigneten Computersoftware (Hauppauge WinTV) gemacht. Zur Aufnahme von GFP-, Dil- und Lucifer Yellow-Markierungen wurden geeignete Fluoreszenzfilter verwendet. Die Bearbeitung der Fotos wurde mit Adobe Photoshop 4.0 vorgenommen.

4.11. Videodokumentation

Die verwendete Videoanlage bestand aus den folgenden Komponenten:

CCD-Videokamera Panasonic WV-CL 700/G

Zeitraffer-Videorecorder Panasonic AG-6720

Monitor JVC TM-1500 PS

Alle Filme wurden auf handelsübliche VHS-Kassetten aufgenommen. Als Mikroskop wurde ein IM35 verwendet.

4.12. Molekulare Arbeitsmethoden

4.12.1. Transformation

100 µl einer Suspension Calcium-kompetenter Zellen (*E.coli* XL1-Blue) wurden mit 10-500 ng Plasmid-DNA für mindestens 25 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 35 Sekunden bei 42° C wurden die Zellen zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz in 400 µl LB-Medium 1 h bei 37° C inkubiert. Es folgte das Ausstreichen der Zellen zur Selektion auf LB-Ampicillin-Platten (50 µg/ml Ampicillin). Nach einer Inkubation bei 37° C für 16 Stunden wurden die Platten bei 4° C gelagert.

4.12.2. Ansetzen einer Flüssig-Kultur

Zur Vermehrung der gewünschten Bakterienkolonie wurde flüssiges LB-Ampicillin-Medium (25 ml mit 50 µg/ml Ampicillin) mit einer Kolonie der Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37° C auf einem Rundschüttler (225 Upm) inkubiert. Mittels Plasmidpräparation und anschließendem Restriktionsverdau wurden die Kulturen auf erfolgreiche Klonierung des gewünschten Fragmentes untersucht.

4.12.3. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Präparation wurde ohne RNase-Behandlung entsprechend der Arbeitsanleitung durchgeführt.

4.12.4. Linearisierung der Plasmide und mRNA-Synthese

Die verwendeten Plasmide und mRNAs haben folgende Herkunft:

- *EP/C-Cadherin*: Geschenk von Thomas Joos (MPI Tübingen)
- *GFP*: Geschenk von Herbert Steinbeisser (MPI Tübingen)
- *gsc*: Geschenk von Christof Niehrs (DKFZ Heidelberg)
- *Mix. 1*: Geschenk von Patrick Lemaire (Universität Marseille)
- *sna*: Geschenk von Maria Leptin (Universität zu Köln)
- *Xbra*: Geschenk von Michael Sargent (National Institute For Medical Research, London)
- *Xfz7*: Geschenk von Herbert Steinbeisser (MPI Tübingen)
- *Xsna*: Geschenk von Michael Sargent (National Institute For Medical Research, London)
- *Xtwi*: Geschenk von Ralph Rupp (Universität München)

Für *EP/C-Cadherin* und *Xfz7* wurde mRNA zur Verfügung gestellt, die restlichen mRNAs wurden nach Linearisierung der Plasmide synthetisiert:

Die Plasmide wurden durch die Inkubation mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert (Tabelle 2). Für die analytischen Verdauungen wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit 2,5 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 µl eingesetzt und mittels Gelelektrophorese analysiert. Für die präparativen Verdauungen wurden 5 µg der Plasmid-DNA und 5-10 U des Restriktionsenzym in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Diese Ansätze wurden 2 bis 3 Stunden meist bei 37° C (je nach Aktivitätsoptimum des Enzyms) inkubiert und ein Aliquot von 5 µl mittels

Gelelektrophorese auf Vollständigkeit der Restriktion kontrolliert. Anschließend fand eine Phenol/Chloroform-Extraktion statt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen 100% Ethanol bei -20° C für eine Stunde präzipitiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten mit 15 000 x g wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in H₂O bidest gelöst.

mRNA	Plasmid	Restriktionsstelle	RNA-Polymerase
<i>GFP</i>	pCMTEGFP	Asp718	SP6
<i>gsc</i>	pSPgsc	EcoRI	SP6
<i>Mix. 1</i>	pBSRN3 Mix.1	SfiI	T3
<i>sna</i>	pNB Snail C1	NotI	SP6
<i>Xbra</i>	pSP73 Xbra (DB30)	HindIII	SP6
<i>Xsna</i>	pMX569	NotI	SP6
<i>Xtwi</i>	pCS+Xtwi (pRR67)	Asp718	SP6

Tabelle 2: Zur Injektion hergestellte mRNAs, zugehörige Plasmide und verwendete Restriktionsstellen und RNA-Polymerasen.

Für Injektionsexperimente wurde "gecappte" mRNA mit Hilfe des SP6- oder T3 mRNA-Synthese-Kits (Ambion: mMessage mMachine) synthetisiert.

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µg der linearisierten DNA der verschiedenen Konstrukte eingesetzt, sowie 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 10 µl 2 x Ribonukleotidgemisch, 2 µl 10 x Enzym-Gemisch und H₂O bidest dazugegeben. Anschließend fand eine Inkubation bei 37° C für 2 Stunden statt. Die Reaktion wurde mit 115 µl H₂O bidest und 15 µl 5 M Ammoniumacetat gestoppt. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die RNA wurde anschließend in 50 µl H₂O bidest aufgenommen und durch Zugabe von 50 µl 100% Isopropylalkohol bei -20° C für mindestens 15 Minuten präzipitiert. Nach einer Zentrifugation bei 4° C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Abdampfen des Alkohols wurde die RNA in 10 µl TE-Puffer aufgenommen und die Qualität der RNA durch Gelelektrophorese geprüft. Die Konzentrationsbestimmung der mRNA fand photometrisch statt. Die mRNA wurde in 75% Ethanol bei -20° C gelagert.

4.12.5. Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA und RNA fand in horizontalen Agarosegelen in Gegenwart von Ethidiumbromid statt. Die Agarosekonzentration wurde entsprechend der erwarteten Größe der Fragmente gewählt (0,8 bis 1,5%). Zur Herstellung wurde die Agarose in 0,5 x TBE aufgekocht und nach leichter Abkühlung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach Auspolymerisation in einer Gelkammer wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer (0,5 x TBE) überschichtet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 5 x Ladepuffer (Sambrook et al., 1989) versetzt (Endkonzentration 1 x Ladepuffer) und in die Geltaschen pipettiert. Die Fragmente wurden bei 60 - 90 Volt aufgetrennt, auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

4.12.6. Inhibition der Xsna-Translation durch Morpholinos

Morpholinos (Gene Tools) entsprechen Oligonucleotiden mit modifiziertem Phosphatrückgrad, was sie vor dem Abbau durch Nukleasen schützt. Die Basen, wie sie in der DNA vorkommen, sind aber unmodifiziert. Es wurde ein Morpholino benutzt, das am Translationsstart der *Xsna*-mRNA bindet und dadurch spezifisch die *Xsna*-Translation inhibiert. Zur Verdünnung auf die angegebenen Injektionsmengen wurde Gurdon's Puffer verwendet.

Xsna-antisense-Morpholino: 5'- AAT GAC CGG GGC ATG TTG CTG AGC C -3'

4.12.7. Herstellung von Digoxigenin-markierter RNA zur *in situ* Hybridisierung

Die antisense-RNA wurden durch „run off“ *in vitro* Transkription hergestellt. Die Markierung der RNA erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-gekoppeltem UMP. Zu 500 ng der linearisierten Plasmide wurden 1 µl Dig RNA Labeling Mixture (Boehringer Mannheim), 1 µl 10 x Transcription Buffer (Boehringer Mannheim) und 20 U RNA-Polymerase gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O bidest auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37° C wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 2 µl 200 mM EDTA pH 8,0 beendet. Anschließend ließen sich die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1,25 µl LiCl und 37,5 µl 100% Ethanol bei -20° C über Nacht präzipitieren. Nach einer Zentrifugation bei 15.800 g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O bidest gelöst. Schließlich wurde die Qualität der RNA mittels Gelelektrophorese getestet.

4.12.8. Hydrolyse der Digoxigenin-markierten RNA

Die RNA wurde durch eine begrenzte alkalische Hydrolyse (Cox et al., 1984) auf eine Fragmentlänge von etwa 150 Basen gebracht. Dadurch soll das Eindringen der RNA in das Gewebe erleichtert werden. Der Hydrolysepuffer (5 µl 1 M NaHCO₃, 7 µl 1 M Na₂CO₃ und 48 µl H₂O bidest) wurde stets frisch angesetzt. Die RNA wurde in H₂O bidest auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend gab man 10 µl 100 mM Dithiothreitol und 60 µl Hydrolysepuffer zu. Die Hydrolyse erfolgte bei 60° C und wurde für *Xsna*-RNA 45 Minuten bzw. für *Xbra*-RNA 53,5 Minuten durchgeführt. Die Zugabe von 10 µl 6% Essigsäure, 140 µl 4 M Ammoniumacetat und 700 µl 100% Ethanol bewirkte ein Abstoppen der Reaktion und ermöglichte die Präzipitation der Nukleinsäuren bei -20° C über Nacht.

Nach einer Zentrifugation bei 15.800 g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Trocknen des Pellets erfolgte bei Raumtemperatur. Dann wurde es in H₂O bidest gelöst. Schließlich wurde

die Größe und Menge der RNA mittels Gelelektrophorese bestimmt, wobei gescherte Heringssperma-DNA mit einer Fragmentlänge von etwa 150 Basenpaaren als Standard diente.

4.12.9. *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung von *Xenopus*-Embryonen wurde nach einem Standardprotokoll für *Xenopus laevis* (Harland, 1991) durchgeführt, das in einigen Punkten modifiziert wurde (H. Steinbeisser, persönliche Mitteilung).

Embryonen und Explantate wurden in MEMFA (Harland, 1991) bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparate wurden insgesamt mindestens 1 Stunde, jedoch nicht länger als 2 Stunden fixiert. Anschließend fand eine sukzessive Überführung in Methanol statt. Die fixierten Präparate wurden bis zum Beginn der *in situ* Hybridisierung bei -20° C gelagert.

Die fixierten und in Methanol gelagerten Präparate wurden über eine absteigende Methanolreihe (66%, 33% in PBST) mit einer Inkubationszeit von je 5 Minuten in PBST überführt. Anschließend folgten 2 Waschschriffe mit PBST für je 5 Minuten. Die Inkubation in 10 µg/ml Proteinase K in PBST gewährleistete eine bessere Zugänglichkeit für alle nachfolgenden Lösungen und wurde 25 Minuten durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBST für 5 Minuten folgte eine Nachfixierung in PFA/PBS für 20 Minuten. Das PFA wurde durch sechsmaliges Waschen mit PBST für je 5 Minuten gründlich ausgespült. Es folgte eine Inkubation in 100 µl eines 1:2-Gemisches aus PBST und Hybridisierungsmix für 5 Minuten und zweimaliges Waschen in 100 µl Hybridisierungsmix für ebenfalls 5 Minuten. Zur Zerstörung der Aktivität endogener Phosphatasen wurden die Ansätze 1 Stunde auf 65° C erhitzt. Um unspezifische Bindungsstellen für Nukleinsäuren abzusättigen, fand eine Prähybridisierung für 6 Stunden bei 58° C statt. Die Digoxigenin-markierte RNA-Probe (20 ng) in 100 µl Hybridisierungsmix wurde für 2 - 5 Minuten auf 95° C erhitzt und anschließend zu den Präparaten gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 58° C über Nacht.

Nach der Hybridisierung folgte je ein kurzzeitiges Waschen in 100 µl Hybridisierungsmix, 100 µl eines 1:2-Gemisches aus Hybridisierungsmix und 37° C

Wasch und schließlich 1 ml 37° C-Wasch. Es wurde bei 37° C zweimal für 30 Minuten mit 37° C-Wasch inkubiert und anschließend kurzzeitig mit dem stringenten 60° C-Wasch gewaschen. Danach erfolgten zwei 30minütige Inkubationen mit 60° C-Wasch bei 60° C. Anschließend wurde für je 5 Minuten in TBS und TBSX gewaschen. Die Präparate und der Antikörper (Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment mit alkalischer Phosphatase) wurden getrennt mit Antikörperpuffer bei 4° C präabsorbiert. Die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:1500. Nach 2 Stunden wurde der Puffer durch den präabsorbierten Antikörper ersetzt, und es folgte eine Inkubation bei 4° C über Nacht.

Es wurde dann einmal kurz und viermal für 1 Stunde mit TBSX gewaschen und schließlich noch bei 4° C über Nacht mit TBSX inkubiert. Daraufhin erfolgte dreimaliges Waschen für 5 Minuten in AP-Puffer. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde NBT (Nitrobluetetrazolium) und BCIP (5-bromo-4-chloroindolylphosphat) verwendet (6,8 µl/ml NBT und 3,5 µl/ml BCIP in AP-Puffer), oder BM Purple AP Substrat (Boehringer Mannheim). Die Substratreaktion wurde durch dreimaliges Waschen in Stop-Mix beendet.

4.12.10. Isolierung von Gesamt-RNA aus Embryonen und Explantaten für RT-PCR (Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion)

Die Embryonen und Explantate wurden in 1 x MBS durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80° C bis zur RNA-Isolierung gelagert. Die Zerkleinerung der Präparate fand in 600 µl RNA-Isolationspuffer mit Hilfe eines Homogenisators statt. Dann wurden 60 µl 2 M Natriumazetat pH 4, 600 µl Phenol pH 5 (wassergesättigt) und 120 µl Chloroform dazugegeben und 10 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis folgte eine Zentrifugation (10000 x g) für 15 Minuten. Die obere wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen 100% Isopropanol versetzt und die RNA bei -20° C für 1 Stunde präzipitiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4° C wurde das Pellet in 120 µl 4 M LiCl resuspendiert, so daß Polysaccharide in Lösung gingen. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 3000 x g wurde das Pellet in 120 µl Rex-Puffer gelöst und

danach 120 µl Chloroform zugegeben, wieder zentrifugiert und die wässrige Phase in 0,1 Volumen 2 M Natriumazetat pH 4 und 120 µl Isopropanol für 15 Minuten bei -20° C inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert und das Pellet mit kaltem 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

4.12.11. Reverse Transkription

Zur Erststrang-cDNA-Synthese wurden für einen 20 µl Reaktionsansatz 5 µg der jeweiligen Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurden 250 ng Zufalls-Primer (5'-NNN NNC -3') und dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP je 10 mM) dazugegeben und mit H₂O bidest auf 13 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 65° C wurden die Proben auf Eis gestellt und 4 µl 5 x Erststrang-Puffer (Life Technologies) und 2 µl 100 mM DTT zugegeben. Zunächst erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 25° C bevor die Temperatur auf 42° C erhöht wurde. Nach Zugabe von 200 Units Reverser Transkriptase (Superscript II, Life Technologies) fand eine Inkubation für 50 Minuten bei 42° C statt. Zum Stoppen der Reaktion wurde für 15 Minuten bei 70° C inkubiert. Anschließend wurden die abgestoppten Reaktionsansätze mit TE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Für die spätere PCR wurden je Ansatz etwa 2 µl eingesetzt.

4.12.12. PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR wurde semiquantitativ durchgeführt. Zur Quantitätskontrolle wurde der Elongationsfaktor 1α (EF1α) in jedem Ansatz mitamplifiziert. Wenn jedoch zu große Mengenunterschiede zwischen EF1α-cDNA und der zu untersuchenden cDNA bestanden, mußte die Quantitätskontrolle in einem eigenen Ansatz durchgeführt werden.

Pipettierschema für einen 50 µl - Ansatz:

5 µl 10 x Taq-Puffer (Promega)

2 µl 50 mM MgCl

1 µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP je 10 mM)

1 µl Primermix (je 20 pmol/µl) pro cDNA, die amplifiziert werden soll

2 - 5 µl cDNA

auf 50 µl mit H₂O bidest auffüllen

Die Proben wurden mit 35 µl Mineralöl überschichtet und im PCR-Block für 2 Minuten auf 94° C erhitzt. Anschließend wurde 3 µl Taq-DNA-Polymerase (Geschenk von Michael Kroiber, Universität zu Köln) durch das Öl hinzupipettiert (hot start). Dann wurde die Amplifikation unter folgenden Bedingungen fortgeführt: Denaturierung bei 94° C für 25 Sekunden, Annealing-Temperatur bei 54 - 57° C (abhängig von den eingesetzten Primerpaaren) für 25 Sekunden, Elongation bei 72° C für 40 Sekunden. Die Anzahl der Zyklen lag bei 30 – 36. Zum Schluß fand noch eine Elongation bei 72° C für 40 Sekunden statt. Die Proben wurden auf ein 1,2% Agarosegel so aufgetragen, daß die EF1 α -Bande jedes Ansatzes gleich stark wirkte.

Die folgenden Oligonukleotide wurden als genspezifische Primer zur RT-PCR-Amplifikation eingesetzt:

<i>EF 1α</i> 269 bp	Vorwärtssequenz: 5'- CAG ATT GGT GCT GGA TAT GC -3'
	Reverssequenz: 5'- ACT GCC TTG ATG ACT CCT AG -3'
<i>EF 1α</i> 518 bp	Vorwärtssequenz: 5'- AGG CAT GGT GGT TAC CTT TG -3'
	Reverssequenz: 5'- ACT GCC TTG ATG ACT CCT AG -3'
<i>EphA2</i> 137 bp	Vorwärtssequenz: 5'- CAG TTT CCA GAG ACC GTT GC -3'
	Reverssequenz: 5'- GGT ACC AGC CAC TCT CCG TC -3'
<i>EphA4</i> 471 bp	Vorwärtssequenz: 5'- AGC GTT TCA TTC GTG AAA CC -3'
	Reverssequenz: 5'- AGC AAG CTG CAT CTG TTG AG -3'

<i>EphB1</i> 373 bp	Vorwärtssequenz: 5'- GGA TAC ACA AGG GTG GGT AG -3' Reverssequenz: 5'- GTC GGA AAT GAG GGA CAC AG -3'
<i>EphB2</i> 350 bp	Vorwärtssequenz: 5'- TGT CTT CAG GAG TGA CCC TC -3' Reverssequenz: 5'- GTT GGT CGA GTA CCA GGA AG -3'
<i>EphB3</i> 351 bp	Vorwärtssequenz: 5'- CTA CAG CAA CCA AGG AAC TC -3' Reverssequenz: 5'- TTC CTT CTC ACA CTC CTC AC -3'
<i>ephrin-B1</i> 348 bp	Vorwärtssequenz: 5'- GCA GCA CAG TCA TAG ATC CCA ATG -3' Reverssequenz: 5'- CAG GGT TTT GTA CAG GAC CAT TCC -3'
<i>ephrin-B2</i> 277 bp	Vorwärtssequenz: 5'- ACT CAG TAC ATT AGC CAC AC -3' Reverssequenz: 5'- ATA ACG AGC CAC TTC AAA CC -3'
<i>ephrin-B3</i> 340 bp	Vorwärtssequenz: 5'- TCT CTA GGA TCC ATC ACC TC -3' Reverssequenz: 5'- CCT CCA AAT ACC AAC ATT GC -3'
<i>Pitx2c</i> 412 bp	Vorwärtssequenz: 5'- TCT GGG GAG TGT AAG TCA AG -3' Reverssequenz: 5'- TGT ACG AGT AAC TGG GGT AC -3'
<i>Xbra</i> 323 bp	Vorwärtssequenz: 5'- CAC AGT TCA TAG CAG TGA CCG -3' Reverssequenz: 5'- TTC TGT GAG TGT ACG GAC TGG -3'
<i>Xfz7</i> 266 bp	Vorwärtssequenz: 5'- CAC GAG TGG CTA TCT AGT TTG C -3' Reverssequenz: 5'- AAC AGC AGC GAG ACT GTA GAG G -3'
<i>Xnr1</i> 452 bp	Vorwärtssequenz: 5'- AGT CAA GTC CTC TGC CAA CC -3' Reverssequenz: 5'- TCA AAA CAA CCT CAT CTC CC -3'
<i>Xrnd1</i> 549 bp	Vorwärtssequenz: 5'- GAT GAT TCT GAC ACA AGT AGC -3' Reverssequenz: 5'- AGA TAC CAA GAT CTG CAA TGC -3'

<i>Xsna</i> 407 bp	Vorwärtssequenz: 5'- GGA CAC ATC AGA ACA CAC AC -3' Reverssequenz: 5'- TGC ATC ATA GAC AAT AGA CG -3'
<i>Xwnt11</i> 372 bp	Vorwärtssequenz: 5'- ACA AAA TGC AAG TGC CAC GG -3' Reverssequenz: 5'- TTG ACA GCG TTC CAC GAT GG -3'

4.13. Lösungen und Chemikalien

Kalzium-und-Magnesium-freies Medium:

88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 7,5 mM Tris, pH 7,6

RNA-Isolationspuffer:

4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,
0,5% Sarkosyl, 0,1 M 2-Mercaptoethanol

Rex-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8, 0,5% SDS

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8

DEPC-behandeltes H₂O bidest:

0,05% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H₂O bidest 1 Stunde
geschüttelt und 30 Minuten bei 121° C und 1,2 bar autoklaviert

MEMFA: 3,7% Formaldehyd, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄,
100 mM MOPS pH 7,4

PBS: 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl pH 7,5

PBST: 10 mM Na₂HPO₄, 0,1% Tween 20, 150 mM NaCl pH 7,5

PFA/PBS:	4% Paraformaldehyd in PBS
50 x Denhart's:	1% Rinderserumalbumin (BSA), 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficoll 400
20 x SSC:	3 M NaCl, 300 mM Tri-Natriumcitrat pH 7,0
Hybridisierungsmix:	50% Formamid, 5 x SSC, 1 mg/ml Heringssperm-DNA, 100 µg/ml Heparin, 1 x Denhart's, 0,1% Tween 20, 0,1% Chaps, 5 mM EDTA
37° G-Wasch:	2 x SSC, 0,2% Chaps
60° G-Wasch:	0,2 x SSC, 0,2% Chaps
10 x TBS:	40 g NaCl, 1 g KCl, 15 g Tris-Base pH 8,0 in 500 ml
TBSX:	0,1% Triton X-100 in TBS
Antikörperpuffer:	15% Ziegenserum für 30 Minuten bei 56° C inaktiviert, 5% <i>Xenopus</i> -Eiextrakt in TBSX
Antikörper für <i>in situ</i> Hybridisierung:	Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment gekoppelt mit alkalischer Phosphatase 150 U/200 µl (Boehringer Mannheim)
AP-Puffer:	100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 1 mM Levamisol, 100 mM Tris pH 9,5
NBT:	50 mg/ml Nitrobluetetrazolium in Dimethylformamid
BCIP:	50 mg/ml 5-bromo-4-chloroindolylphosphat Natriumsalz in H ₂ O
Stop-Mix:	10 mM EDTA in PBST

- LB-Medium: 8 g Bacto-tryptone, 4 g Bacto-yeastextract, 8 g NaCl auf 1 l, pH 7,5
- 10 x TBE-Puffer: 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 l
- 5 x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerol in H₂O
- MBS: 10 mM HEPES, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 0,82 mM MgSO₄, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 0,41 mM CaCl₂, 10 mg/l Bencylpenicillin, 10 mg/l Streptomycin pH 7,4
- Gurdon's Puffer: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 15 mM Tris pH 7,5

5. Literaturverzeichnis

Alberga, A., Boulay, J., Kempe, E., Dennefeld, C., and Haenlin, M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111: 983-992.

Angres, B., Müller, A., Kellermann, J., and Hausen, P. (1991). Differential expression of two cadherins in *Xenopus laevis*. *Development* 111: 829-844.

Artinger, M., Blitz, I., Inoue, K., Tran, U., and Cho, K.W. (1997). Interaction of goosecoid and brachyury in *Xenopus* mesoderm patterning. *Mech Dev* 65: 187-196.

Asashima, M., Nakano, H., Shimada, K., Kinoshita, K., and Ishii, K. (1990). Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differentiation factor). *Roux's Arch Dev Biol* 198: 330-335.

Ashraf, S., Hu, X., Roote, J., and Ip, Y.T. (1999). The mesoderm determinant Snail collaborates with related zinc finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis. *EMBO J* 18: 6426-6438.

Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and de Herreros, A.G. (2000). The Transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology* 2: 84-89.

Bauer, D.V., Huang, S., and Moody, S.A. (1994). The cleavage stage origin of Spemann's Organizer: analysis of the movements of blastomere clones before and during gastrulation in *Xenopus*. *Development* 120: 1179-1189.

Boettger, T., Wittler, L., and Kessel, M. (1999). FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr Biol* 9: 277-280.

Boulay, J.L., Dennefeld, C., and Alberga, A. (1987). The *Drosophila* developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* 330: 395-398.

Brachet, A. (1903). Recherches sur l'ontogenese des Amphibiens, Urodeles et Anoures (*Siredon piciformis*, *Rana temporaria*). *Arch Biol* 20: 1-243.

Brändli, A.W., and Kirschner, M.W. (1995). Molecular Cloning of Tyrosine Kinases in the Early *Xenopus* Embryo: Identification of Eck-Related Genes Expressed in Cranial Neural Crest Cells of the Second (Hyoid) Arch. *Dev Dyn* 203: 119-140.

Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1994). Regulation of C-Cadherin Function during Actin Induced Morphogenesis of *Xenopus* Animal Caps. *J Cell Biol* 126: 519-527.

- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., and Blum, M.** (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 126: 1225-1234.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A.** (2000). The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin Expression. *Nature Cell Biology* 2: 76-83.
- Capdevila, J., Vogan, K.J., Tabin, C.J., and Izpisua Belmonte, J.C.** (2000). Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* 101: 9-21.
- Carl, T.F., Dufton, C., Hanken, J., and Klymkowsky, M.W.** (1999). Inhibition of neural crest Migration in *Xenopus* using antisense Slug RNA. *Dev Biol* 213: 101-115.
- Carver, E.A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K.F., and Gridley, T.** (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21: 8184-8188.
- Casey, E.S., O'Reilly, M.J., Conlon, F.L., and Smith, J.C.** (1998). The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. *Development* 125: 3887-3894.
- Cheng, A.M., Thisse, B., Thisse, C., and Wright, C.V.E.** (2000). The lefty-related factor *Xatv* acts as a feedback inhibitor of Nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in *Xenopus*. *Development* 127: 1049-1061.
- Chesley, P.** (1935). Development of the short-tailed mutation in the house mouse. *J Exp Zool* 70: 429-459.
- Cho, K.W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E.M.** (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* 67: 1111-1120.
- Choi, Y.S., and Gumbiner, B.** (1989). Expression of cell adhesion molecule E-Cadherin in *Xenopus* embryos begins at gastrulation and predominates in the ectoderm. *J Cell Biol* 108: 2449-2458.
- Cohen, M.E., Yin, M., Paznekas, W.A., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E.W.** (1998). Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics* 51: 468-471.
- Collignon, J., Varlet, I., and Robertson, E.J.** (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* 381: 155-158.
- Conlon, E.L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B., and Robertson, E.J.** (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120: 1919-1928.

Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M., and Smith, J.C. (1996). Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal mesoderm. *Development* 122: 2427-2435.

Conlon, F.L., and Smith, J.C. (1999). Interference with Brachyury Function Inhibits Convergent Extension, Causes Apoptosis, and Reveals Separate Requirements in the FGF and Activin Signalling Pathways. *Dev Biol* 213: 85-100.

Cooke, J., and Smith, J.C. (1989). Gastrulation and larval pattern in *Xenopus* after blastocoelic injection of a *Xenopus*-derived inducing factor: experiments testing models for the normal organization of mesoderm. *Dev Biol* 131:383-400.

Corbo, J.C., Levine, M., and Zeller, R.W. (1997). Characterization of a notochord-specific enhancer from the Brachyury promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* 124: 589-602.

Costa, M., Wilson, E.T., and Wieschaus, E. (1994). A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation. *Cell* 76: 1075-1089.

Cox, K.H., DeLeon, D.V., Angerer, L.M., and Angerer, R.C. (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* 101: 485-502.

Cunliffe, V., and Smith, J.C. (1992). Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. *Nature* 358: 427-430.

Cvekl, A., and Piatigorsky, J. (1996). Lens development and crystallin gene expression: Many roles for Pax-6. *BioEssays* 18: 621-630.

Dale, L., Smith, J.C., and Slack, J.M. (1985). Mesoderm induction in *Xenopus laevis*: a quantitative study using a cell lineage label and tissue-specific antibodies. *J Embryol Exp Morphol* 89: 289-313.

Dale, L., Howes, G., Price, B.M., and Smith, J.C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 115: 573-585.

Dale, L., Matthews, G., and Colman, A. (1993). Secretion and mesoderm-inducing activity of the TGF-beta-related domain of *Xenopus* Vg1. *EMBO J* 12: 4471-4480.

Danos, M.C., and Yost, H.J. (1995). Linkage of cardiac left-right asymmetry and dorsal-anterior development in *Xenopus*. *Development* 121: 1467-1474.

Danos, M.C., and Yost, H.J. (1996). Role of Notochord in Specification of Cardiac Left-Right Orientation in Zebrafish and *Xenopus*. *Dev Biol* 177: 96-103.

David, R., and Wedlich, D. (2000). *Xenopus* cadherin-6 is expressed in the central and peripheral nervous system and in neurogenic placodes. *Mech Dev* 97: 187-190.

- Davis, G.S., Phillips, H.M., and Steinberg, M.S.** (1997). Germ-Layer Surface Tension and "Tissue Affinities" in *Rana pipiens* Gastrulae: Quantitative Measurements. *Dev Biol* 192: 630-644.
- Djiane, A., Riou, J.F., Umbhauer, M., Boucaut, J.C., and Shi, D.L.** (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *xenopus laevis*. *Development* 127: 3091-3100.
- Durbin, L., Brennan, C., Shiomi, K., Cooke, J., Barrios, A., Shanmugalingam, S., Guthrie, B., Lindberg, R., and Holder, N.** (1998). Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Genes Dev* 12: 3096-3109.
- Espeseth, A., Johnson, E., and Kintner, C.** (1995). *Xenopus* F-Cadherin, a novel member of the cadherin family of cell adhesion molecules, is expressed at boundaries in the neural tube. *Mol Cell Neurosci* 6: 199-211.
- Essner, J.J., Branford, W.W., Zhang, J., and Yost, H.J.** (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development* 127: 1081-1093.
- Essex, L.J., Mayor, R., and Sargent, M.G.** (1993). Expression of *Xenopus* snail in mesoderm and prospective neural fold ectoderm. *Dev Dyn* 198: 108-122.
- Feldmann, B., Gates, M.A., Egan, E.S., Dougan, S.T., Rennebeck, G., Sirotkin, H.I., Schier, A.F., and Talbot, W.S.** (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395: 181-185.
- Fujiwara, F., Corbo, J.C., and Levine, M.** (1998). The Snail repressor establishes a muscle/notochord boundary in the *Ciona* embryo. *Development* 125: 2511-2520.
- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S.** (1994). Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev* 8: 2270-2281.
- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S.** (1996). Determination of wing cell fate by *escargot* and *snail* genes in *Drosophila*. *Development* 122: 1059-1067.
- Gage, P.J., Suh, H., and Camper, S.A.** (1999). Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* 126: 4643-4651.
- Gerhart, J., and Keller, R.** (1986). Region-specific cell activities in amphibian gastrulation. *Annu Rev Cell Biol* 2: 201-229.
- Gibson, T.J., Postma, J.P.M., Brown, R.S., and Argos, P.** (1988). A model for the tertiary structure of the 28 residues DNA-binding motif (zinc-finger) common to many transcriptional regulatory proteins. *Protein Engineering* 20: 209-218.
- Ginsberg, D., DeSimone, D., and Geiger, B.** (1991). Expression of a novel (EP-cadherin) in unfertilized eggs and early *Xenopus* embryos. *Development* 111: 315-325.

- Gluecksohn-Schoenheimer, S.** (1938). The development of two tailless mutants in the house mouse. *Genetics* 23: 573-584.
- Gont, L.K., Steinbeißer, H., Blumberg, B., and De Robertis, E.M.** (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119: 991-1004.
- Graves, L.M., Northrop, J.L., Potts, B.C., Krebs, E.G., and Kimelman, D.** (1994). Fibroblast growth factor, but not activin, is a potent activator of mitogen-activated protein kinase in *Xenopus* explants. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1662-1642.
- Gray, S., Szymanski, P., and Levine, M.** (1994). Short-range repression permits multiple enhancers to function autonomously within a complex promoter. *Genes Dev* 8: 1829-1838.
- Gray, S., and Levine, M.** (1996). Short-range transcriptional repressors mediate both quenching and direct repression within complex loci in *Drosophila*. *Genes Dev* 10: 700-710.
- Green, J.B., and Smith, J.C.** (1990). Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature* 347: 391-394.
- Green, J.B., New, H.V., and Smith, J.C.** (1992). Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell* 71: 731-739.
- Grimm, K.** (1998). Untersuchungen zum Involutionsverhalten bei *Xenopus laevis* mit besonderer Berücksichtigung der Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion. *Diplomarbeit* Universität zu Köln.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S., and Schier, A.F.** (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97: 121-132.
- Gruneberg, H.** (1958). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XXIII. The development of Brachyury and Anury. *J Embryol Exp Morph* 6: 424-443.
- Gurdon, J.B., Fairman, S., Mohun, T.J., and Brennan, S.** (1985). Activation of muscle-specific actin genes in *Xenopus* development by an induction between animal and vegetal cells of a blastula. *Cell* 41: 913-922.
- Gurdon, J.B., Harger, P., Mitchell, A., and Lemaire, P.** (1994). Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature* 371: 487-492.
- Gurdon, J.B., Mitchell, A., and Mahony, D.** (1995). Direct and continuous assessment by cells of their position in a morphogen gradient. *Nature* 376: 520-521.
- Gurdon, J.B., Mitchell, A., and Ryan, K.** (1996). An experimental system for analyzing response to a morphogen gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9334-9338.

- Hadeball, B., Borchers, A., and Wedlich, D.** (1998). *Xenopus* cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mech Dev* 72: 101-113.
- Hammerschmidt, M., and Nüsslein-Volhard, C.** (1993). The expression of a zebrafish gene homologous to *Drosophila* snail suggests a conserved function in invertebrate and vertebrate gastrulation. *Development* 119: 1107-1118.
- Hardin, J., and Keller, R.** (1988). The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 103: 211-230.
- Harland, R.M.** (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36: 685-695.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T., and Shirras, A.D.** (1993). Control of imaginal cell development by the escargot gene of *Drosophila*. *Development* 118: 105-115.
- Helbling, P.M., Saulnier, D.M.E., Robonson, V., Christiansen, J.H., Wilkonson, D.G., and Brändli, A.W.** (1999). Comparative Analysis of Embryonic Gene Expression Defines Potential Interaction Sites for *Xenopus* EphB4 Receptors With Ephrin-B Ligands. *Dev Dyn* 216: 361-373.
- Hemavathy, K., Meng, X., and Ip, Y.T.** (1997). Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development* 124: 3683-3691.
- Hemavathy, K., Ashraf, S.I., and Ip, Y.T.** (2000). Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257: 1-12.
- Henry, G.L., and Melton, D.A.** (1998). Mixer, a homeobox gene required for endoderm development. *Science* 281: 91-96.
- Herzberg, F., Wildermuth, V., and Wedlich, D.** (1991). Expression of Xbcad, a novel cadherin, during oogenesis and early development. *Mech Dev* 35: 33-42.
- Holder, N., and Klein, R.** (1999). Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 126: 2033-2044.
- Holtfreter, J.** (1939). Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung. *Arch Exp Zellf Bes Gewebezücht* 23: 169-209.
- Hopwood, N.D., Pluck, A., and Gurdon, J.B.** (1989). A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59:893-903.
- Horb, M.E., and Thomson, G.H.** (1997). A vegetal localized T-box transcription factor in *Xenopus* eggs specifies mesoderm and endoderm formation in *Xenopus*. *Development* 124: 1689-1698.

Howe, L.R., Leever, S.J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C.J. (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71: 335-342.

Hyatt, B.A., and Yost, H.J. (1998). The left-right coordinator: The role of Vg1 in organizing left-right axis formation. *Cell* 93: 37-46.

Hyde, C.E., and Old, R.W. (2000). Regulation of the early expression of the Xenopus nodal-related 1 gene, Xnr1. *Development* 127: 1221-1229.

Ibrahim, H. (1997). Untersuchungen zum Expressionsmuster von Xbra und Xsna während der Gastrulation von *Xenopus laevis* anhand von Embryonen und Explantaten. *Diplomarbeit* Universität zu Köln.

Ibrahim, H., and Winklbauer, R. (2001). Mechanisms of mesendoderm internalization in the *Xenopus* Gastrula: Lessons from the ventral side. *Dev Biol* 240: 108-122.

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992a). Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6: 1518-1530.

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E., and Levine, M. (1992b). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6: 1728-1739.

Ip, Y.T., Maggert, K., and Levine, M. (1994). Uncoupling gastrulation and mesoderm differentiation in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 13: 5826-5834.

Isaac, A., Sargent, M.G., and Cooke, J. (1997). Control of Vertebrate Left-Right Asymmetry by a Snail-Related Zinc Finger Gene. *Science* 275: 1301-1304.

Isaacs, H.V., Pownall, M.E., and Slack, J.M. (1994). eFGF regulates Xbra expression during *Xenopus* gastrulation. *EMBO J* 13: 4469-4481.

Jacobsen, A.G. (1966). Inductive processes in embryonic development. *Science* 152: 25-34.

Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y.T., and Levine, M. (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 5: 1881-1891.

Jiang, R., Lan, Y., Norton, C.R., Sundberg, J.P., and Gridley, T. (1998). The Slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Dev Biol* 198: 277-285.

Jones, C.M., Kuehn, M.R., Hogan, B.L.M., Smith, J.C., and Wright, C.V.E. (1995a). Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* 121: 3651-3662.

- Jones, T.L., Karavanova, I., Maéno, M., Ong, R.C., Kung, H.F., and Daar, I.O.** (1995b). Expression of an amphibian homolog of the Eph family of receptor tyrosine kinases is developmentally regulated. *Oncogene* 10: 1111-1117.
- Jones, T.L., Karavanova, I., Chong, L., Zhou, R.P., and Daar, I.O.** (1997). Identification of XLerk, an Eph family ligand regulated during mesoderm induction and neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Oncogene* 14: 2159-2166.
- Jones, T.L., Chong, L.D., Kim, J., Xu, R.H., Kung, H.F., and Daar, I.O.** (1998). Loss of cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos mediated by the cytoplasmic domain of XLerk, an erythropoietin-producing hepatocellular ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 576-581.
- Joseph, E.M., and Melton, D.A.** (1997). Xnr4: a *Xenopus* nodal-related gene expressed in the Spemann organizer. *Dev Biol* 184: 367-372.
- Joseph, E.M., and Melton, D.A.** (1998). Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* 125: 2677-2685.
- Keller, R.E.** (1975). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. *Dev Biol* 42: 222-241.
- Keller, R.E.** (1976). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. *Dev Biol* 51: 118-137.
- Keller, R.E.** (1978). Timelapse Cinemicrographic Analysis of Superficial Cells Behaviour during in prior to Gastrulation in *Xenopus laevis*. *J Morphol* 157: 223-248.
- Keller, R.E.** (1980). The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 60: 201-234.
- Keller, R.E.** (1984). The Cellular Basis of Gastrulation in *Xenopus laevis*: Active, Postinvolution Convergence and Extension by Mediolateral Interdigitation. *Amer Zool* 24: 589-603.
- Keller, R.E.** (1986). The cellular basis of amphibian gastrulation. In „Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis“ Vol 2 The Cellular Basis of Morphogenesis (ed. L. Browder), New York, Plenum Press, pp. 241-327.
- Keller, R.E.** (1991). Early embryonic development of *Xenopus laevis*. In Methods in Cell Biology, Vol 36: *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology (ed. B. Kay and H.B. Peng), Chapter 5, pp. 61-113. New York, Academic Press.
- Keller, R.E., Danilchik, M., Gimlich, R., and Shih, J.** (1985). Convergent extension by cell intercalation during gastrulation of *Xenopus laevis*. In „Molecular Determinants of Animal Form“, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series 31 (ed. G. M. Edelman), A. R. Liss, New York, pp. 111-141.

- Keller, R., and Danilchik, M.** (1988). Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 103: 193-209.
- Keller, R., Cooper, M.S., Danilchik, M., Tibbetts, P., and Wilson, P.** (1989). Cell intercalation during notochord development in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 251: 134-154.
- Keller, R., and Tibbetts, P.** (1989). Mediolateral cell intercalation in the dorsal, axial mesoderm of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 131: 539-549.
- Keller, R., Shih, J., and Domingo, C.** (1992). The patterning and functioning of protrusive activity during convergence and extension of the *Xenopus* organiser. *Dev Suppl* 81-91.
- Keller, R., and Winklbauer, R.** (1992). Cellular basis of amphibian gastrulation. *Curr Top Dev Biol* 27: 39-89.
- Kessler, D.S., and Melton, D.A.** (1995). Induction of dorsal mesoderm by soluble, mature Vg1 protein. *Development* 121: 2155-2164.
- Kim, S.H., Yamamoto, A., Bouwmeester, T., Agius, E., and De Robertis, E.M.** (1998). The role of Paraxial Protocadherin in selective adhesion and cell movements of the mesoderm during *Xenopus* gastrulation. *Development* 125: 4681-4691.
- Kimelman, D., and Kirschner, M.** (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* 51: 869-877.
- Kimelman, D., Abraham, J.A., Haaparanta, T., Palishi, T.M., and Kirschner, M.W.** (1988). The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: its role as a natural mesoderm inducer. *Science* 242: 1053-1056.
- Kimelman, D., and Maas, A.** (1992). Induction of dorsal and ventral mesoderm by ectopically expressed *Xenopus* basic fibroblast growth factor. *Development* 114: 261-276.
- King, T., Beddington R.S., and Brown, N.A.** (1998). The role of the brachyury gene in heart development and left-right specification in the mouse. *Mech Dev* 79: 29-37.
- Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katho-Kukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., Nakahara, Y., et al.** (1999). Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* 126: 5749-5758.
- Kirschner, M.W., and Hara, K.** (1980). A new method of local vital staining of amphibian embryos using ficoll and "crystals" of Nile Red. *Mikroskopie* 36: 12-15.
- Kispert, A., Korschorz, B., and Herrmann, B.G.** (1995). The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J* 14: 4763-4772.

- Kofron, M., Demel, T., Xanthos, J., Lohr, J., Sun, B., Sive, H., Osada, S.I., Wright, C., Wylie C., and Heasman, J.** (1999). Mesoderm induction in *Xenopus* is a zygotic event regulated by maternal VegT via TGF β growth factors *Development* 126: 5759-5770.
- Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M., and Arora, K.** (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254: 118-122.
- Kühl, M., and Wedlich, D.** (1996). *Xenopus* Cadherins: Sorting out Types and Functions in Embryogenesis. *Dev Dyn* 207: 121-134.
- LaBonne, C., and Whitman, M.** (1997). Localization of MAP Kinase Activity in Early *Xenopus* Embryos: Implications for Endogenous FGF Signaling. *Dev Biol* 183: 9-20
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M.** (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221: 195-205.
- Lane, M.C., and Smith, W.C.** (1999). The origin of primitive blood in *Xenopus*: implications for axial patterning. *Development* 126: 423-434.
- Latinkic, B.V., Umbhauer, M., Neal, K.A., Lerchner, W., Smith, J.C., and Cunliffe, V.** (1997). The *Xenopus* Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. *Genes Dev* 11: 3265-3276.
- Latinkic, B.V., and Smith, J.C.** (1999). Goosecoid and Mix.1 repress Brachyury expression and are required for head formation in *Xenopus*. *Development* 126: 1769-1779.
- Lee, C., and Gumbiner, B.** (1995). Disruption of Gastrulation Movements in *Xenopus* by a Dominant-Negative Mutant for C-cadherin. *Dev Biol* 171: 363-373.
- Lemaire, P., Darras, S., Caillol, D., and Kodjabachian, L.** (1998). A role for the vegetally expressed *Xenopus* gene Mix.1 in endoderm formation and in the restriction of mesoderm to the marginal zone. *Development* 125: 2371-2380.
- Leptin, M.** (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5: 1568-1576.
- Leptin, M.** (1995). *Drosophila* Gastrulation: From Pattern Formation to Morphogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11: 189-212.
- Leptin, M., and Grunewald, B.** (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110: 73-84.

- Lerchner, W., Latinkic, B.V., Remacle, J.E., Huylebroeck, D., and Smith, J.C.** (2000). Region-specific activation of the *Xenopus* Brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. *Development* 127: 2729-2739.
- Levi, G., Gumbiner, B.M., and Thiery, J.** (1991). The distribution of E-cadherin during *Xenopus* development. *Development* 111: 159-169.
- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., and Tabin, C.** (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82: 803-814.
- Levin, M., Pagan, S., Roberts, D.J., Cooke, J., Kuehn, M.R., and Tabin, C.** (1997). Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects *in situ* in the chick embryo. *Dev Biol* 189: 57-67.
- Lin, C.R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J.C., and Rosenfeld, M.G.** (1999). *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401: 279-282.
- Logan, M., Pagan-Westphal, S.M., Smith, D.M. Paganessi, L., and Tabin, C.J.** (1998). The transcription factor *Pitx2* mediates *situs*-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 94: 307-317.
- Lohr, J.L., Danos, M.C., and Yost, H.J.** (1997). Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development* 124: 1465-1472.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P., and Kuehn, M.R.** (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine *situs inversus*. *Nature* 381: 158-161.
- Lu, M.F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R.L., and Martin, J.F.** (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 401: 276-278.
- Lustig, K.D., Kroll, K., Sun, E., Ramos, R., Elmendorf, H., and Kischner, M.W.** (1996a). A *Xenopus* nodal-related gene that acts in synergy with *noggin* to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development* 122: 3275-3282.
- Lustig, K.D., Kroll, K.L., Sun, E.E., and Kischner, M.W.** (1996b). Expression cloning of a *Xenopus* T-related gene (*Xombi*) involved in mesodermal patterning and blastopore lip formation. *Development* 122: 4001-4012.
- Manzanares, M., Locascio, A., and Nieto, M.A.** (2001). The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trend Genet* 17: 178-181.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C., and Alberga, A.** (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Research* 21: 3951-3957.

- Mayor, R., Morgan, R., and Sargent, M.G.** (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121: 767-777.
- Mayor, R., Guerrero, N., Young, R.M., Gomez-Skarmeta, J.L., and Cuellar, C.** (2000). A novel function for the *Xslug* gene: control of dorsal mesendoderm development by repressing BMP-4. *Mech Dev* 97: 47-56.
- Medina, A., Reintsch, W., and Steinbeisser, H.** (2000). *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech Dev* 92: 227-237.
- Mellitzer, G., Xu, Q., and Wilkinson, D.G.** (2000). Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* 10: 400-408.
- Nagel, M.** (2001). Blastocoeldach-Polarität und richtungsweisende Signale bei der Mesodermwanderung in der *Xenopus*-Gastrula. *Doktorarbeit* Universität zu Köln.
- Nagel, M., and Winklbauer, R.** (1999). Establishment of substratum polarity in the blastocoel roof of the *Xenopus* embryo. *Development* 126: 1975-1984.
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., and Sugino, H.** (1990). Activin binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247: 836-838.
- Nakatsuji, N.** (1976). Studies on the gastrulation of amphibian embryos: Ultrastructure of the migrating cells of anurans. *Roux's Arch Dev Biol* 180: 229-240.
- Nakatsuji, N., and Johnson, K.E.** (1983). Comparative study of extracellular fibrils on the ectodermal layer in gastrulae of five amphibian species. *J Cell Sci* 59: 61-70.
- Nakatsuji, N., Smolira, M.A., and Wylie, C.C.** (1985). Fibronectin visualized by scanning electron microscopy immunocytochemistry on the substratum for cell migration in *Xenopus laevis* gastrulae. *Dev Biol* 107: 264-268.
- Nascone, N., and Mercola, M.** (1997). Organizer induction determines left-right asymmetry in *Xenopus*. *Dev Biol* 189: 68-78.
- Nieto, M.A., Bennett, M.F., Sargent, M.G., and Wilkinson, D.G.** (1992). Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila* snail gene. *Development* 116: 227-237.
- Nieto, M.A., Sargent, M.G., and Wilkinson, D.G.** (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by *slug*, a zinc finger gene. *Science* 264: 835-839.
- Nieuwkoop, P.D.** (1969). The formation of mesoderm in Urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm. *Roux's Arch Entw Org* 162: 341-373.
- Nieuwkoop, P.D.** (1973). The organization center of the amphibian embryo: its origin, spatial organization, and morphogenetic action. *Adv Morphog* 10: 1-39.

- Nieuwkoop, P. D., and Florschütz, P.A.** (1950). Quelques caractères spéciaux de la gastrulation et de la neurulation de l'oeuf de *Xenopus laevis*, Daud. Et de quelques autres Anoures. *Arch. Biol.* 61, 113-150.
- Nieuwkoop, P.D., and Faber, J.** (1967). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2nd Edition. North-Holland, Amsterdam
- Nomura, M., and Li, E.** (1998). Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* 393: 786-790.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* 193: 267-282.
- Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M.** (1998). Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion System during *Drosophila* Gastrulation. *Dev Biol* 203: 435-450.
- Odenthal, J., Haffter, P., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Warga, R.M., Allende, M.L., Weinberg, E.S., and Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Mutations affecting the formation of the notochord in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 103-115.
- Osada, S.I., and Wright, C.V.E.** (1999). *Xenopus* nodal-related signaling is essential for mesendodermal patterning during early embryogenesis. *Development* 126: 3229-3240.
- Osada, S.I., Saijoh, Y., Frisch, A., Yeo, C.Y., Adachi, H., Watanabe, M., Whitman, M., Hamada, H., and Wright, C.V.E.** (2000). Activin/Nodal responsiveness and asymmetric expression of a *Xenopus* nodal-related gene on a FAST-regulated module in intron 1. *Development* 127: 2503-2514.
- Patel, K., Isaac, A., and Cooke, J.** (1999). Nodal signaling and the roles of the transcription factors SnR and Pitx2 in vertebrate left-right asymmetry. *Curr Biol* 9: 609-612.
- Paznekas, W.A., Okajima, K., Schertzer, M., Wood, S., and Jabs, E.W.** (1999). Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAIL1) and a related processed pseudogene. *Genomics* 62: 42-49.
- Piedra, M.E., Icardo, J.M., Albarjar, M., Rodriguez-Rey, J.C., and Ros, M.A.** (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94: 319-324.
- Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A.G., Varnai, A., Buettner, R., and Bosserhoff, A.K.** (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276: 24661-24666.

- Ramsdell, A.F., and Yost, H.J.** (1998). Molecular mechanisms of vertebrate left-right development *Trend Genet* 14: 459-465.
- Rebagliati, M.R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P., and Dawid, I.B.** (1998a). Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev Biol* 199: 261-272.
- Rebagliati, M.R., Toyama, R., Haffter, P., and Dawid, I.B.** (1998b). cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci* 95: 9932-9937.
- Remacle, J.E., Kraft, H., Lerchner, W., Wuytens, G., Collart, C., Verschueren, K., Smith, J.C., and Huylebroeck, D.** (1999). New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* 18: 5073-5084.
- Roark, M., Sturtevant, M.A., Emery, J., Vaessin, H., Grell, E., and Bier, E.** (1995). scratch, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neural development. *Genes Dev* 9: 2384-2398.
- Rosa, F.M.** (1989). Mix.1, a Homeobox mRNA inducible by mesoderm inducers, is expressed mostly in the presumptive endodermal cells of *Xenopus* embryos. *Cell* 57: 965-974.
- Roth, S., Stein, D., and Nüsslein-Volhard, C.** (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 59: 1189-1202.
- Rushlow, C.A., Han, K., Manley, J.L., and Levine, M.** (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* 59:1165-1177.
- Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., et al.** (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394: 545-551.
- Saka, Y., Tada, M., and Smith, J.C.** (2000). A screen for targets of the *Xenopus* T-box gene *Xbra*. *Mech Dev* 93: 27-39.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, second edition
- Sampath, K., Cheng, A.M., Frisch, A., and Wright, C.V.** (1997). Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination. *Development* 124: 3293-3302.

- Sampath, K., Rubinstein, A.L., Cheng, A.M., Liang, J.O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M.E., and Wright, C.V.E.** (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* 395: 185-189.
- Sargent, M.G., and Bennett, M.F.** (1990). Identification in *Xenopus* of a structural homologue of the *Drosophila* gene snail. *Development* 109: 967-973.
- Savagner, P., Yamada, K.M., and Thiery, J.P.** (1997). The zinc-finger protein Slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137: 1403-1419.
- Scales, J.B., Winning, R.S., Renaud, C.S., Shea, L.J., and Sargent, T.D.** (1995). Novel members of the eph receptor tyrosine kinase subfamily expressed during *Xenopus* development. *Oncogene* 11: 1745-1752.
- Schmidt, C., Christ, B., Maden, M., Brand-Saberi, B., and Patel, K.** (2001). Regulation of Eph4 expression in paraxial and lateral plate mesoderm by ectoderm-derived signals. *Dev Dyn* 220: 377-386.
- Schulte-Merker, S., van Eeden, F.M., Halpern, M.E., Kimmel, C.B., and Nüsslein-Volhard, C.** (1994b). No tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development* 120: 1009-1015.
- Schulte-Merker, S., and Smith, J.C.** (1995). Mesoderm formation in response to Brachyury requires FGF signaling. *Curr Biol* 5: 62-67.
- Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., and Blum, M.** (2000). Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Dev* 90: 41-51.
- Sefton, M., Sanchez, S., and Nieto, M.A.** (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* 125: 3111-3121.
- Shih, J., and Keller, R.** (1992). Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* 116: 901-914.
- Sive, H.L., Hattori, K., and Weintraub, H.** (1989). Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis*. *Cell* 58: 171-180.
- Slack, J.M., Darlington, B.G., Heath, J.K., and Godsave, S.F.** (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326: 197-200.
- Slack, J.M., Darlington, B.G., Gillespie, L.L., Godsave, S.F., Isaacs, H.V., and Paterno, G.D.** (1990). Mesoderm induction by fibroblast growth factor in early *Xenopus* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327: 75-84.

Smith, J.C. (1987). A mesoderm-inducing factor is produced by a *Xenopus* cell line. *Development* 99: 3-14.

Smith, J.C. (1995). Mesoderm-inducing factors and mesodermal patterning. *Curr Opin Cell Biol* 7: 856-861.

Smith, J.C., Price, B.M., van Nimmen, K., and Huylebroeck, D. (1990). Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* 345: 729-731.

Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D., and Herrmann, B.G. (1991). Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67: 79-87.

Smith, D.E., Del Amo, F.F., and Gridley, T. (1992). Isolation of *sna*, a mouse gene homologous to the *Drosophila* genes *snail* and *escargot*: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development. *Development* 116: 1033-1039.

Smith, A., Robinson, V., Patel, K., and Wilkinson, D.G. (1997). The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr Biol* 7: 561-570.

Song, J., Oh, S.P., Schrewe, H., Nomura, M., Lei, H., Okano, M., Gridley, T., and Li, E. (1999). The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol* 213: 157-169.

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

St Amand, T.R., Ra, J., Zhang, Y., Hu, Y., Baber, S.I., Qiu, M., and Chen, Y. (1998). Cloning and expression pattern of chicken *Pitx2*: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 100-105.

Steinberg, M.S. (1963). Tissue reconstruction by dissociated cells. *Science* 141: 401-408.

Steinberg, M.S. (1964). The problem of adhesion selectivity in cellular interactions. In: *Cellular Membranes in Development* (ed. M. Locke), 321-366, New York: Academic Press.

Steinberg, M.S. (1970). Does differentially adhesive self-assembly govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergences of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J Exp Zool* 173: 395-433.

Steinberg, M.S. (1978). Specific cell ligands and the differential adhesion hypothesis: How do they fit together? In "Specificity of Embryological Interactions, Receptors and Recognition" (D.R. Garrod, Ed.), Series B, Vol. 4, pp. 99-130. Chapman & Hall, London.

- Stemple, D.L., Solnica-Krezel, L., Zwartkruis, F., Neuhauss, S.C., Schier, A.F., Malicki, J., Stainier, D.Y., Abdelilah, S., Rangini, Z., Mountcastle-Shah, E., and Driever, W.** (1996). Mutations affecting development of the notochord in zebrafish. *Development* 123: 117-128.
- Stennard, F., Carnac, G., and Gurdon, J.B.** (1996). The *Xenopus* T-box gene, Antipodean, encodes a vegetally localised maternal mRNA and can trigger mesoderm formation. *Development* 122: 4179-4188.
- Steward, R.** (1989). Relocalization of the dorsal protein from cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* 59: 1179-1188.
- Stoetzel, C., Bolcato-Bellmin, A.L., Bourgeois, P., Perrin-Schmitt, F., Meyer, D., Wolff, M., and Remy, P.** (1998). X-twi is expressed prior to gastrulation in presumptive neurectodermal and mesodermal cells in dorsalized and ventralized *Xenopus laevis* embryos. *Int J Dev Biol* 42: 747-756.
- Sumanas, S., Strege, P., Heasman, J., and Ekker, S.C.** (2000). The putative Wnt receptor *Xenopus* frizzled-7 functions upstream of beta-catenin in vertebrate dorsoventral mesoderm patterning. *Development* 127: 1981-1990.
- Sun, B.I., Bush, S.M., Collins-Racie, L.A., La Vallier, E.R., DiBlasio-Smith, E.A., Wolfman, N.M., McCoy, J.M., and Sive, H.L.** (1999). Derrière: a TGF- β family member required for posterior development in *Xenopus*. *Development* 126: 1467-1482.
- Tada, M., and Smith, J.C.** (2000). Xwnt11 is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* 127: 2227-2238.
- Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima, K., Onuma, Y., Goto, J., and Asashima, M.** (2000). Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* 127: 5319-5329.
- Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A.G., and Dedhar, S.** (2001). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20: 133-140.
- Tanaka, M., Wang, D.Y., Kamo, T., Igarashi, H., Wang, Y., Xiang, Y.Y., Tanioka, F., Naito, Y., and Sugimura, H.** (1998). Interaction of EphB2-tyrosine kinase receptor and its ligand conveys dorsalization signal in *Xenopus laevis* development. *Oncogene* 17: 1509-1516.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., and Hayashi, S.** (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot. *Development* 122: 3697-3705.

- Tashiro, K., Tooi, O., Nakamura, H., Koga, C., Ito, Y., Hikasa, H., and Shiokawa, K.** (1995). Cloning and expression of cDNA for a novel *Xenopus* cadherin (XmN-cadherin), expressed maternally and later neural-specifically in embryogenesis. *Mech Dev* 54: 161-171.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T.F., and Postlethwait, J.H.** (1993). Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* 119: 1203-1215.
- Thisse, C., Thisse, B., and Postlethwait, J.H.** (1995). Expression of *snail2*, a second member of the zebrafish *snail* family, in cephalic mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryo. *Dev Biol* 172: 86-99.
- Thomsen, G., Woolf, T., Whitman, M., Sokol, S., Vaughan, J., Vale, W., and Melton, D.A.** (1990). Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63: 485-493.
- Thomsen, G.H., and Melton, D.A.** (1993). Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell* 74: 433-441.
- Townes, P., and Holtfreter, L.** (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool* 128: 53-120.
- Turner, A., Snape, A., Wylie, C., and Heasman, J.** (1989). Regional identity is established before gastrulation in the *Xenopus* embryo. *J Exp Zool* 251: 245-252.
- Twigg, S.R.F., and Wilkie, A.O.M.** (1999). Characterisation of the human *snail* (*SNA1*) gene and exclusion as an major disease gene in craniosynostosis. *Hum Genet* 105: 320-326.
- Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., and Guillemin, R.** (1987). Isolation and partial Characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8282-8286.
- Varlet, I., and Robertson, E.J.** (1997). Left-right asymmetry in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 7: 519-523.
- van den Eijnden Van Raaij, A.J., van Zoelent, E.J., van Nimmen, K., Koster, C.H., Snoek, G.T., Durston, A.J., and Huylebroeck, D.** (1990). Activin-like factor from a *Xenopus laevis* cell line responsible for mesoderm induction. *Nature* 345: 732-734.
- Verschueren, K., Remacle, J.E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B.S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M.T., Bodmer, R., Smith, J.C., and Huylebroeck, D.** (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 274: 20489-20498

- Vodicka, M.A., and Gerhart, J.C.** (1995). Blastomere derivation and domains of gene expression in the Spemann Organizer of *Xenopus laevis*. *Development* 121: 3505-3518.
- Vogt, W.** (1929). Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung, Teil II. *Roux's Arch Entw Mech* 120: 384-706.
- Wacker, S., Grimm, K., Joos, T., and Winklbauer, R.** (2000). Development and Control of Tissue Separation at Gastrulation in *Xenopus*. *Dev Biol* 224: 428-439.
- Waldtrip, W.R., Bikoff, E.K., Hoodless, P.A., Wrana, J.L., and Robertson, E.J.** (1998). Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 92: 797-808.
- Weinstein, D.C., Rahman, S.M., Ruiz, J.C., and Hemmati-Brivanlou, A.** (1996). Embryonic expression of eph signalling factors in *Xenopus*. *Mech Dev* 57: 133-144.
- Whiteley, M., Noguchi, P.D., Sensabaugh, S.M., Odenwald, W.F., and Kassis, J.A.** (1992). The *Drosophila* gene *escargot* encodes a zinc finger motif found in snail-related genes. *Mech Dev* 36: 117-127.
- Wilson, P., and Keller, R.** (1991). Cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus*: direct observation of cultured explants. *Development* 112: 289-305.
- Winklbauer, R.** (1990). Mesodermal cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* 142: 155-168.
- Winklbauer, R., and Nagel, M.** (1991). Directional mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Dev Biol* 148: 573-589.
- Winklbauer, R., Selchow, A., Nagel, M., Stoltz, C., and Angres, B.** (1991). Mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula. In "Gastrulation: movements, patterns and molecules" (R. Keller et al. eds.), New York, Plenum Press, pp. 147-168.
- Winklbauer, R., Selchow, A., Nagel, M., and Angres, B.** (1992). Cell interaction and its role in mesoderm cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Dev Dyn* 195: 290-302.
- Winklbauer, R., and Keller, R.E.** (1996). Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in *Xenopus*. *Dev Biol* 177: 413-426.
- Winklbauer, R., Nagel, M., Selchow, A., and Wacker, S.** (1996). Mesoderm migration in the *Xenopus* gastrula. *Int J Dev Biol* 40: 305-311.
- Winklbauer, R., and Schürfeld, M.** (1999). Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Dev Biol* 125: 3703-3713.

- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R.K., and Steinbeisser, H.** (2001). Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 413: 856-860.
- Winning, R.S., and Sargent, T.D.** (1994). Pagliaccio, a member of the Eph family of receptor tyrosine kinase genes, has localized expression in a subset of neural crest and neural tissue in *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev* 46: 219-229.
- Winning, R.S., Scales, J.B., and Sargent, T.D.** (1996). Disruption of Cell Adhesion in *Xenopus* Embryos by Pagliaccio, an Eph-Class Receptor Tyrosine Kinase. *Dev Biol* 179: 309-319.
- Woodland, H.R., and Jones, E.A.** (1987). The development of an assay to detect mRNAs that affect early development. *Development* 101: 925-930.
- Wünnenberg-Stapleton, K., Blitz, I.L., Hasimoto, C., and Cho, K.W.Y.** (1999). Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* 126: 5339-5351.
- Xu, Q., Aldus, G., Holder, N., and Wilkinson, D.G.** (1995). Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development* 121: 4005-4016.
- Yasuo, H., and Satoh, N.** (1994). An ascidian homolog of the mouse Brachyury (T) gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. *Dev Growth Differ* 36: 9-18.
- Yoshioka, H., Meno, C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., et al.** (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94: 299-305.
- Yost, H.J.** (2001). Establishment of left-right asymmetry. *Int Rev Cytol* 204: 357-381.
- Zhang, J., and King, M.L.** (1996). *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-Box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* 122: 4119-4129.
- Zhang, J., Houston, D.W., King, M.L., Payne, C., Wylie, C., and Heasman, J.** (1998). The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 94: 515-524.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L.M., and Kuehn, M.R.** (1993). Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during Gastrulation. *Nature* 361: 543-547.
- Zoltewicz, J.S., and Gerhart, J.C.** (1997). The Spemann Organizer of *Xenopus* is patterned along its anteroposterior axis at the earliest gastrula stage. *Dev Biol* 192: 482-491.

6. Kurzzusammenfassung

Das Zinkfingerprotein *snail* ist an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion, der Internalisierung des Mesoderms und der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie während der Entwicklung von Vertebraten und Invertebraten beteiligt.

In dieser Arbeit wurde die Funktion und Regulation des *snail*-Homologes in *Xenopus* untersucht. Als Vorarbeit für die Beurteilung der Rolle von *Xsna* an der Mesoderminternalisierung wurde ein detaillierter Anlageplan der ventralen Lippenregion erstellt. Es zeigte sich, daß die ventrale Unterlippe entgegen vielzitierten Anlageplänen zum Endoderm beiträgt. In den Regionen um die Blastoporuslippe werden Separations- und Abstoßungsverhalten, zwei für Gewebstrennung am Brachet'schen Spalt notwendige Eigenschaften, während der Gastrulation dynamisch reguliert.

Ein entsprechendes Expressionsmuster macht *Xsna* zu einem guten Kandidat für die Regulation des Separations- und Abstoßungsverhalten. In einem Testsystem konnte gezeigt werden, daß *Xsna* hinreichend ist, beide Eigenschaften zu regulieren, ob *Xsna* im Embryo auch notwendig dafür ist, wurde noch nicht abschließend geklärt.

Die Vegetale Rotation ist eine Gastrulationsbewegung der vegetalen Zellmasse. Ihre Ausbreitung ist mit der *Xsna*-Expression korreliert. Da die Überexpression von *Xsna* zu einer vorzeitigen Auslösung der Vegetalen Rotation führt, ist *Xsna* vermutlich an der Kontrolle dieser morphogenetischen Bewegung beteiligt.

Mesodermzellen, die involutieren beginnen, mit der Transkription von *Xsna* und kurz danach wird die Expression des posterioren Mesodermmarkers *Xbra* abgeschaltet. Hierfür ist zumindest auf der Ventralseite *Xsna* verantwortlich. Neben der Repression von *Xbra* wird auch dessen direktes Zielgen *Xwnt11* *Xbra*-unabhängig von *Xsna* reprimiert. Auf der Dorsalseite führt Überexpression von *Xsna* zu einer Reduktion der anterior-posterioren Achse, vermutlich durch Repression von *Xbra* und *Xwnt11*, die für Differenzierung und morphogenetische Bewegung der Chorda notwendig sind.

Xsna spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Links-Rechts-Orientierung der Organe. Es ist auf der linken Seite für die ungestörte Orientierung des Herzens und auf der rechten Seite für die des Darmes notwendig. Weiterhin wurde für *Xsna* eine aktivierende Wirkung auf das an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligte Gen *Xnr1* gezeigt.

7. Abstract

The zinc-finger protein snail is involved in regulation of cell cell adhesion, mesoderm internalization and establishment of left-right asymmetry during development of vertebrates and invertebrates.

In this work, function and regulation of the snail homologue in *Xenopus* was elucidated. As a basis for characterizing the contribution of *Xsna* for mesoderm internalization, a detailed fate map of the ventral lip was established. It was shown that the lower ventral lip contributes to endoderm, which is in contrast to existing fate maps. Separation behavior and repulsion behavior, both necessary properties for tissue separation at Brachet's cleft, are dynamically regulated at the blastoporal lip.

The expression pattern of *Xsna* makes it a good candidat for regulation of separation and repulsion behavior. In fact, *Xsna* is sufficient to regulate both properties in a test system, but it is still unclear if it is necessary for the control of separation and repulsion behavior *in vivo*.

Vegetal rotation is a gastrulation movement of the vegetal cell mass. Its spreading is correlated with the expression of *Xsna*. Overexpression of *Xsna* results in a precocious start of this gastrulation movement. Thus, *Xsna* may be a regulator for vegetal rotation.

Mesodermal cells start transcribing *Xsna* when they involute. Shortly after, these cells cease to transcribe *Xbra*. It could be shown that *Xsna* is responsible for this inhibition at least on the ventral side. *Xsna* represses also a direkt target gene of *Xbra*, *Xwnt11* independently from *Xbra*. On the dorsal side, overexpression of *Xsna* leads to a reduced anterior-posterior axis. This effect may be due to the repression of *Xbra* and *Xwnt11*, which together are necessary for differentiation and morphogenetic movement of the notochord.

Xsna plays an important role for left-right orientation of organs, beeing necessary on the left side for an unimpaired orientation of the heart situs. On the right side, *Xsna* is necessary for normal orientation of the gut. Additionally, it is shown that *Xsna* activates the transcription of *Xnr1*, which is involved in establishing left-right asymmetry.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Rudolf Winklbauer betreut worden.

Köln, den 20. Februar 2002

Teilpublikation:

Ibrahim, H. and Winklbauer, R. (2001). Mechanisms of mesendoderm internalization in the *Xenopus* gastrula: Lessons from the ventral side. *Dev Biol* 240: 108-122.