

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut wurde nach bestem Wissen als solches gekennzeichnet.

Silke Schmalholz
Stuttgart, den 22. Oktober 2008

Zusammenfassung

Die wesentlichen embryonalen Stadien der Wirbeltierentwicklung kennzeichnen sich durch kontrollierte Zellbewegungen. Dazu gehören die Wanderung der Herzvorläuferzellen, die Migration der Neuralleistenzellen (NLZ) nach dem Neuralrohrschluss und vor allem die Zellinterkalationsbewegungen der konvergenten Extension während der Gastrulation und der Neurulation. Mit deren Hilfe werden die Chorda dorsalis, das Neuralrohr und damit die antero-posteriore Körperachse gebildet, was zur Verlängerung des Embryos führt. Die Inhibition der konvergenten Extensionsbewegungen führt zu schweren Achsen- und Neuralrohrschlussdefekten.

Die notwendigen morphologischen Veränderungen und die Migration der Zellen beruhen auf der Dynamik ihrer Zytoskelettkomponenten und bedürfen der exakten Regulation der Filamentpolymerisation beziehungsweise der Interaktionen durch Bindeproteine.

Bei der Regulation der konvergenten Extensionsbewegungen wird vor allem den sekretierten Wachstumsfaktoren der Wnt-Familie eine Rolle zugesprochen. Dabei handelt es sich um die Mitglieder des sogenannten planaren Wnt-Zellpolarisations- (PCP) und des Wnt /Ca²⁺-Signalwegs. Deren Zielproteine, d.h. die mit dem Aktin-Zytoskelett direkt interagierenden Effektoren, sind bisher nur zum Teil bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten in diesem Zusammenhang die Eigenschaften der Calponin-Proteine als mögliche Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts während den Zellumordnungs- und Bewegungsabläufen der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* untersucht werden. Die Proteine der Calponinfamilie sind in der Lage die Aktin-Myosinkontraktion inhibierend zu beeinflussen. Linear an die Aktinfilamente angelagert stabilisieren diese Proteine zudem das Aktin-Zytoskelett und wirken der Aktindepolymerisation entgegen.

Durch *in situ* Detektion von in *Xenopus laevis* klonierten *Xclp1*, *Xclp2* und *Xclp3* wurden erste Erkenntnisse der transkriptionellen Aktivität während der embryonalen Entwicklung gewonnen. Tatsächlich werden die, für die Proteine kodierenden Gene, in den motilen Zellen während der Gastrulation, Neurulation, Herzvorläuferzellmigration und Neuralleistenzell (NLZ)-wanderung exprimiert, wie hier zum ersten mal beschrieben wurde.

Überexpressions- beziehungsweise Missexpressionsexperimente in *Xenopus laevis* sollten der Analyse der embryonalen Proteinfunktion dienen. Das Ausbleiben einer phänotypischen Veränderung in diesen Experimenten, ließ auf eine negative Regulation durch posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung oder eine autoregulatorische Inhibition schließen. Daher wurden potentielle Regulationsdomänen mutiert und Deletionsmutanten der Calponin-Proteine erzeugt. Über- bzw. Missexpressionsexperimente der mutanten Calponin-Proteine resultierten überraschenderweise nicht in phänotypischen Veränderungen der Froschembryonen.

Dennoch konnte die Aktivität einer Calponin-Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Die Überexpression der zweiten, für die Aktinfilamentstabilisierung verantwortlichen Aktinbindedomäne, führte zum Block von NLZ Migration. Funktionelle Analysen deuteten auf eine starke negative Regulation der embryonalen Calponin-Aktivität, hervorgerufen durch noch unbekannte Signalwege. Die Expressionsanalyse zeigte jedoch, dass embryonale Gewebe, in denen die nichtkanonischen Wnt-Signalwege aktiv sind, *Xclp2* und *Xclp3* Transkription aufweisen. Damit stellen diese beiden Regulationsproteine der Aktindynamik potentiell neue Effektoren der nichtkanonischen Wnt-Signalwege während der Gastrulation und dem Neuralrohrschluss dar.

Abstract

The embryonic development of vertebrates is characterized by controlled cell movements. During gastrulation and neurulation cells of the presumptive heart tissue and the neural crest after neural tube closure migrate towards their final position in the embryo. Cell intercalations, which drive the convergent extension (CE) movements to elongate the embryo also depend on active cell migration. The inhibition of CE leads to shortened body axis and neural tube closure defects (NTD).

The motility of eukaryotic cells is finally based on the dynamic interaction of cytoskeletal components, which act on the actin filament. Secreted growthfactors of the *Wnt* family can regulate embryonic cell movement via the non canonical Wnt signaling pathways. The planar cell polarity (PCP) and the Wnt/Ca²⁺ pathway are thought to be crucial for the process of CE. Up to now there is a lack of knowledge about the cytoskeletal effectors of these signaling cascades. In the presented work, members of the *calponin* gene family (*clp1* to *3*) were analysed in this context. Calponins are actin binding proteins, which have been shown to inhibit actin-myosin-interactions and/or to stabilize the actin filament. Expression patterns provided first insights in the transcriptional activity of *Xclp1*, *Xclp2* and *Xclp3* during embryonic development. Two *Xclp* genes (*Xclp2* and *Xclp3*) were already expressed broadly at the onset of gastrulation. Transcription, however, was not detected in the involuted cells, which form the mesodermal germlayer. At neurula stages *Xclp2* mRNA was specifically found in the notochord, whereas *Xclp3* was expressed in the neuroectoderm. Additionally the migrating cells of the embryonic heart and neural crest were positive for *calponin* expression. In summary the embryonic *calponin* pattern correlated with tissues in which cell movements occur.

Over- or misexpression experiments were performed to manipulate embryonic *calponin* function in *Xenopus laevis*. Gain of function experiments however did not interfere with embryonic development. Probably calponin function was posttranslational negatively regulated in these experiments. The overexpression

of calponin proteins, in which specific phosphorylation sites were mutated or known regulatory calponin domains deleted, again didn't result in altered phenotypes. However, the misexpression of *calponin* actin binding domain 2 (ABD 2) inhibited the migration of *Krox 20* positive neural crest cells, suggesting that in this tissue the Xclp ABD 2 acts dominant negative.

The presented data are not able to proof or disproof the hypothesis, that calponin proteins are effectors of the non canonical Wnt pathways.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungen	X
Kapitel 1.: Einleitung	1
1.1. Körperachsen	1
1.1.1. Polarität der Eizellen.....	1
1.1.2. Spezifizierung der dorso-ventralen und anterior-posterioren Achse im Modellorganismus <i>Xenopus laevis</i>	2
1.1.3. Spemannorganisor.....	3
1.1.3.1. Der Rumpforanisator.....	4
1.1.3.2. Der Kopforganisator.....	4
1.1.4. Die Links-Rechts-Achse.....	5
1.2. Zellmigration während der embryonalen Entwicklung	6
1.2.1. Zellbewegungen während der Gastrulation.....	6
1.2.1.1. Epibolie.....	7
1.2.1.2. Involutionbewegung der Zellen während der Gastrulation.....	8
1.2.1.3. Konvergente Extension.....	8
1.2.2. Zellbewegungen während der Neurulation.....	10
1.2.2.1. Konvergente Extension der Neuralplatte.....	11
1.2.2.2. Neuralrohrbildung.....	11
1.2.3. Migration der Neuralleistenzellen.....	12
1.3. Mechanismen der Zytoskelettdynamik	15
1.3.1. Aktin.....	15
1.3.2. Stressfasern.....	16
1.3.3. Aktin-Zytoskelettdynamik motiler Zellen.....	17
1.3.3.1. Lamellipodienausbildung.....	18
1.3.3.2. Retrograder Aktinfluss.....	18
1.3.3.3. Zell-Matrix-Interaktionen.....	19

1.3.4.	Regulationsmechanismen der Zytoskelettdynamik.....	19
1.3.4.1.	Regulation durch Wnt-Signalwege.....	20
1.3.4.2.	Kontrolle durch regulative Proteine.....	24
1.4.	Calponin.....	25
1.4.1.	Funktionelle Domänen der Calponin-Proteine.....	26
1.4.2.	Verschiedene Calponinvarianten.....	28
1.4.3.	Funktion und Regulation der Calponin-Proteine.....	31
1.5.	Ziel der Arbeit und Fragestellung:.....	32
Kapitel 2.: Ergebnisse.....		35
2.1.	Klonierung von <i>Xclp1</i> und <i>Xclp3</i> aus <i>Xenopus laevis</i>.....	36
2.1.1.	Sequenzanalyse von <i>Xclp1</i> , 2 und 3.....	37
	Herstellung von <i>Calponin 1</i> und <i>3</i>	
	spezifischen Oligonukleotiden.....	37
2.2.	Untersuchung der genetischen Aktivitätsmuster von <i>Xclp1</i>, <i>Xclp2</i> und <i>Xclp3</i> in frühen Entwicklungsstadien von <i>Xenopus laevis</i>.....	40
2.2.1.	<i>Xclp1</i>	40
2.2.2.	<i>Xclp2</i>	43
2.2.3.	<i>Xclp3</i>	47
2.2.4.	Zusammenfassung der Expressionsdomänen.....	50
2.3.	Funktionelle Analysen.....	51
2.3.1.	<i>Xclp1</i> Überexpression im sich entwickelnden Darm.....	53
2.3.2.	Überexpression von <i>Calponin</i> im dorsalen Mesoderm.....	55
2.3.3.	Überexpression im Neuroektoderm.....	60
2.3.4.	Detektion von <i>Xclp2</i> - und <i>Xclp3</i> -Protein.....	62
2.3.5.	Mutagenese der Calponin-Proteine.....	65
2.3.5.1.	Mutation von Phosphorylierungsstellen des <i>Xclp3</i>	67
2.3.5.1.1.	Identifikation von konservierten <i>Xclp3</i> -Phosphorylierungsstellen.....	68
2.3.5.1.2.	Ortsspezifische Mutagenese.....	73
2.3.5.1.3.	Funktionelle Analyse der <i>Xclp3</i> Mutationskonstrukte.....	75
2.3.5.2.	Calponin-Deletionsmutanten.....	78
2.3.5.2.1.	Klonierung von amino- und carboxyterminalen Deletionsmutanten von <i>Xclp2</i> und <i>Xclp1</i>	79
2.3.5.2.2.	Funktionelle Analyse der Deletionsmutanten von <i>Xclp2</i> und <i>Xclp1</i>	81

2.3.5.2.3.	Veränderung des Wanderverhaltens von cranialen Neuralleistenzellen nach Misexpression der Xclp- Deletionsmutanten.....	85
Kapitel 3.: Diskussion.....		94
3.1.	Expressionsmuster und funktionelle Analyse von Xclp1....	94
3.1.1.	Xclp1 als Marker für Lungenentwicklung in <i>Xenopus laevis</i>	95
3.1.2.	Expression von Xclp1 in den sich differenzierenden glatten Muskelzellen des Darmes.....	95
3.1.3.	Überexpression von Xclp1.....	96
3.2.	Expression von Xclp2 und Xclp3.....	97
3.2.1.	Koexpression von Xclp2 und Xclp3 während der Gastrulation..	98
3.2.2.	Distinkte Expression von Xclp2 und Xclp3 nach der Gastrulation.....	99
3.2.2.1.	Xclp2 Expression in den Zellen der sich entwickelnden Chorda dorsalis.....	100
3.2.2.2.	Expression von Xclp3 im neuralen Ektoderm.....	101
3.3.	Funktionelle Analyse der Calponin Eigenschaften.....	102
3.3.1.	Mutation von potentiellen Phosphorylierungstellen des Xclp3.....	103
3.3.2.	Deletionsmutanten von Xclp1 und Xclp2.....	105
3.3.3.	Die ABD 2 von Xclp1 und Xclp2 inhibiert das Wanderverhalten von <i>Krox20</i> positiven Neuralleistenzellen.....	107
3.4.	Funktion des Aktin-Zytoskeletts während der embryonalen konvergenten Extension.....	110
3.5.	Calponin-Proteine als mögliche Effektoren im nichtkanonischen Wnt-Signalweg.....	111
3.5.1.	Koexpression von Xclp2 und Xclp3 mit der GTPase Cdc42 während den Gastrulationsbewegungen.....	112
3.5.2.	RhoA und Calponin.....	112

Kapitel 4.: Material und Methoden.....	115
4.1. Material.....	115
4.1.1. Bezugsquellen.....	115
4.1.2. Puffer, Lösungen und Medien.....	119
4.2. Methoden.....	122
4.2.1. Umgang mit Nukleinsäuren.....	122
4.2.1.1. Präparation von RNA.....	123
4.2.1.2. Präparation von DNA.....	125
4.2.2. Embryologische Methoden (<i>Xenopus laevis</i>).....	130
4.2.3. Proteindetektion.....	135
4.2.4. Ortsspezifische Mutation der für das Protein codierenden Nukleotidsequenz.....	139
4.2.5. Klonierung von Deletionsmutanten von Xclp1 und Xclp2.....	140
4.2.6. Statistik.....	141
Kapitel 5.: Literaturverzeichnis.....	142

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
bzw.	Beziehungsweise
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca	circa
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CamKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Kinase II
Chd	Chorda dorsalis
cm	Zentimeter
cDNA	copy DNA-aus RNA mittels reverser Transkriptase
cds	Codierende Sequenz
CMV	Cytomegalievirus
compl	komplementär
CK 1	Casein Kinase 1
Clik	Calponin-like Modul
cM	cardiäres Mesoderm
C-terminal	carboxyterminal
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
E	Extinction
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eE	epidermales Ektoderm
EtOH	Ethanol
et al.	et alii (und andere)
EX p.c.	Embryonaler Tag post coitum
F-Aktin	filamentöses Aktin
for	vorwärts (Oligonukleotid)
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>

HCl	Salzsäure
hNLZ	hyoidaler Neuralleistenzellstrom
Hpf	Hours post fertilisation (Stunden nach der Befruchtung)
IHC	Immunhistochemie
<i>In vivo</i>	(im lebenden) Organismus
<i>In vitro</i>	(im Glas) außerhalb des lebenden Organismus
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
M(X)	Molarität des Stoffes X (g/mol)
m(X)	Masse des Stoffes X (g)
Mg	Magnesium
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mL	Milliliter
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
mM	Millimolar
mNLZ	mandibularer Neuralleistenzellstrom
MOPS	N-Morpholonopropansulfonsäure
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
μL	Mikroliter
n	„Normal“ Äquivalentkonzentration
Na-Citrat	Natriumcitrat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
eN	neurales Ektoderm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Otx2	Orthodenticle homolog 2
P _i	eine Phosphatgruppe
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ⁻	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pg	Pronephrosengang
pH	potentium Hydrogenium
pmol	Picomol

Pt	Pronephrostubulie
rev	revers (Oligonukleotid)
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rNLZ	Rumpfneuralleistenzellstrom
Rpm	Rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raum Temperatur
RT PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S	Serin
s.	siehe
SSC	Standard Saline Citrat
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	Sogenannt
St.	Stadium
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' –Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units (Enzymeinheiten)
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt (Einheit der elektrischen Spannung)
Veränd Pht , v.Pht	veränderter Phänotyp
Vol	Volumen
v/v	Verhältnis: Volumen/Volumen
v/w	Verhältnis: Volumen/Gewicht
W	Watt (Einheit der elektrischen Leistung)
Wnt	von dem Gen <i>Wingless</i> und der Mutanten <i>Int</i>
Wt	Wildtyp
Xclp	<i>Xenopus laevis</i> Calponin
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glaktosid
z.Bsp.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T	zum Teil

Die Gene wurden mit kursiven Buchstaben gekennzeichnet.