

# **1. Einleitung**

## **1.1. Körperachsen**

Alle vielzelligen Organismen weisen mindestens eine Körperachse auf. Bei den Wirbeltieren verläuft diese Längs- oder antero-posteriore Achse vom Kopf mit dem Gehirn über den Rumpf zum Schwanz. Im rechten Winkel hierzu besitzt der Wirbeltierkörper eine dorso-ventrale (Rücken-Bauch) Ausrichtung, wobei der Mund auf der ventralen Seite und das Rückenmark mit der segmentierten Wirbelsäule auf der dorsalen Seite liegt (Wolpert, 1999). Die Wirbeltiere besitzen neben der antero-posterioren und dorso-ventralen Ausrichtung auch eine bilaterale Symmetrie. Strukturen wie die Augen, Ohren und Gliedmaßen finden sich paarig auf beiden Seiten der Mittellinie. Damit ist ihr Körper nach außen symmetrisch. Seine inneren Organe sind jedoch meist asymmetrisch angelegt. Beim Mensch zum Beispiel finden sich die Milz, das Herz und der Magen auf der linken Körperseite. Die Vena cava liegt rechts. Der linke Lungenflügel besitzt einen Lobus weniger als der rechte. Für den Aufbau der embryonalen Körperachsen werden verschiedene Strategien verwendet.

### **1.1.1. Polarität der Eizellen**

Mit Ausnahme der Säuger besitzen die Eizellen der Wirbeltiere eine erkennbare Polarität. Diese wird durch die Konzentrationsgefälle zytoplasmatischer Komponenten, wie mRNA, Proteine und vor allem Dottergranula festgelegt. Die Eizellen der Säuger besitzen jedoch keinen Dotter. Zur Entwicklung und Ernährung tragen hier die extraembryonalen Strukturen der Plazenta bei. Die Furchung ist holoplastisch. Bis zur ersten Differenzierung der Blastocyste in Trophoblast und Embryoblast sind die Zellen des Säugerkeims totipotent. Damit erhalten die frühen Blastomeren

von Säugern die gleiche Menge zytoplasmatischer Bestandteile aus der Eizelle.

Die Eier von Vögeln, Reptilien und vielen Fischen sind dagegen besonders dotterreich, was Einfluss auf ihre Furchungsmuster hat. Der Dotter des Froscheies liegt eng gepackt im vegetativen Bereich. Am entgegengesetzten animalen Pol, dem prospektiven anterioren Pol des Embryos, der den Zellkern enthält, ist die Dotterkonzentration dagegen nur niedrig. Durch die maternal festgelegte animal-vegetative Eipolarität bildet sich der Kopf im Umkreis dieses animalen Pols.

### **1.1.2. Spezifizierung der dorso-ventralen und antero-posterioren Achse im Modellorganismus *Xenopus laevis***

Die dorso-ventrale Achse wird durch die Spermieintrittsstelle spezifiziert, bzw. aus der daraus folgenden Rindenrotation. Die Zentriole des Spermiums reorganisiert die Mikrotubuli des Zytoskeletts des Zellkortex und löst damit die Rotation des kortikalen Zytoplasmas in Richtung der Spermieintrittsstelle aus. Im Zuge der kortikalen Rotation verlagern sich die maternalen dorsalisierenden Mitglieder des kanonischen Wnt-Signalweges Wnt 11 (Heasman et al., 1994), Dsh (Dishevelled) und das Kinesin-Bindeprotein GBP (ein für Vertebraten spezifisches Glycogen-Synthase-Kinase 3 Bindeprotein) (Miller et al., 1999; Weaver et al., 2003) entlang der Mikrotubuli vom vegetativen Pol ein Stück dorsal in Richtung des späteren Urmundes. Die Signalaktivität von Wnt 11 führt im Zellkern zur Anreicherung des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin und damit zur Entstehung von zwei Signalzentren. Der  $\beta$ -Catenin-Signalweg induziert in der dorsal-animale Polkappe und der dorsalen Randzone, auch Präorganisatorregion oder BCNE (Blastula Center for Chordin and Noggin Expression) genannt, die Expression der BMP-Antagonisten (Bone Morphogenetic Proteins) Chordin und Noggin

(Wessely et al., 2001). In dem sich nach dem Mid-Blastula-Übergang gebildeten Nieuwkoopzentrum induziert der Wnt-Signalweg über  $\beta$ -Catenin während der späten Blastula die Expression mesoderminduzierender Nodal- verwandter Faktoren (*Xnr 1, 2, 4, 5* und *6*) und *Cerberus* (Agius et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Hohe Konzentrationen der Nodal-Proteine induzieren in den darüber gelegenen Zellen dorsales Mesoderm bzw. den Spemannorganisor. Während der Gastrulation werden die gleichen Gene im Mesoderm des Spemannorganisors unter Kontrolle von Nodal-verwandten Proteinen exprimiert (Agius et al. 2000; Wessely et al., 2001). Das für die Entwicklung des dorsalen Entoderms verantwortliche Nieuwkoopzentrum, wie auch das die neurale Entwicklung steuernde BCNE werden somit gleichzeitig in Abhängigkeit von  $\beta$ -Catenin Signalen auf der dorsalen Seite des Embryos gebildet (De Robertis and Kuroda, 2004). In den folgenden Entwicklungsstadien tragen die Zellen der BCNE neben der Entwicklung des Vorder-, Mittel- und Nachhirns, der Bodenplatte und des Neuralrohrs auch zur Bildung der Chorda dorsalis bei (Kuroda et al., 2004). Die Zellen des Nieuwkoopzentrums differenzieren selbst in anteriores Entoderm. Somit bewirkt das frühe  $\beta$ -Catenin während der Blastula die Bildung zweier Signalzentren.

### **1.1.3. Spemannorganisor**

Während der Gastrulation kontrolliert der Spemannorganisor die dorsoventrale Musterbildung, induziert das zentrale Nervensystem und ist für die antero-posteriore Achsenentwicklung von großer Bedeutung. Der Organisor wird in *Xenopus laevis* durch die Wirkung der maternalen Determinanten des dorsalisierenden Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und der vegetalen TGF $\beta$ -Signalkaskade festgelegt (Harland and Gerhart, 1997; Nieto, 1999). Transplantiert in das ventrale Mesoderm eines gastrulierenden Molchembryos, konnte der Organisor (in Abhängigkeit von seinem Entwicklungsstadium) eine zweite Achse mit genau

definierter antero-posteriorer und dorso-ventraler Ausrichtung induzieren (Spemann and Mangold, 1924; Harland and Gerhart, 1997; Nieto, 1999). Bereits Spemann entdeckte, dass sich die Eigenschaften und induktiven Fähigkeiten des Organisators mit dessen Entwicklung verändern. Die durch den Organisator eines Embryos im späten Gastrulastadium induzierten zweiten Körperachsen besitzen nur noch Rumpf- und Schwanzstrukturen (Spemann and Mangold 1924).

#### **1.1.3.1. Der Rumpfororganisator**

Mit der Expression der sekretierten BMP-Antagonisten *Chordin*, *Noggin* und *Follistatin* im Chordamesoderm (der Prächordalplatte und der Chorda dorsalis) kann der Organisator die Wirkung der TGF $\beta$ -ähnlichen Signale (der BMP-Proteine) hemmen, die von ventralen Mesodermzellen ausgesandt werden. Die BMP-Antagonisten binden an BMP-Proteine im extrazellulären Raum. Durch die Bildung von inaktiven Komplexen verhindern sie die Bindung an die BMP-Rezeptoren (Piccolo et al., 1996). Dies wirkt der ventralen Entwicklung entgegen und führt zur Bildung der dorso-ventralen Achse des Rumpfes.

#### **1.1.3.2. Der Kopfororganisator**

Neben den BMP-Antagonisten exprimiert der Spemannorganisator viele andere sekretierte Faktoren wie Cerberus, Crescent, Dickkopf (Dkk-1) und die mit Frizzled verwandten Proteine Frzb1/sFRP3 und sFRP2 (Secreted Frizzled-related Proteins), die die Aktivität der Wnt-Proteine antagonisieren (Niehrs, 1999; Bouwmeester and Leyns, 1997).

Die Wnt-Proteine binden an Frizzled und LRP6 (Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein) und bilden auf der Zelloberfläche einen Rezeptorkomplex (Tamai et al., 2000). Dieser wiederum vermittelt die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne des Wnt-Corezeptors LRP5/6. LRP5/6 verbindet den Wnt-Signalweg mit der Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin.

Ektopisch exprimiertes *Cerberus* kann Kopfstrukturen induzieren (Bouwmeester et al., 1996). Dabei bindet das Protein sowohl an Nodal, BMP als auch an Wnt 8 und verhindert deren Signalweg (Piccolo et al., 1999).

Die als Wnt-Antagonisten wirkenden FRPs binden direkt an die Wnt-Proteine im extrazellulären Raum und verhindern deren Signalweg (Leyns et al., 1997).

Der sekretierte Wnt-Signal Inhibitor Dkk-1 dagegen interagiert mit dem Wnt-Cofaktorprotein LRP5/6 (LDL Rezeptor-related Protein-5/6). Dabei bindet Dickkopf-1 (Dkk-1) sowohl an LRP5/6 (Mao et al., 2001) als auch an Kremen, ein zweites Transmembranprotein. Der resultierende trimolekulare Komplex wird endozytiert, was zum Verlust des LRP5/6-Corezeptors an der Plasmamembran führt (Pera and De Robertis 2000; Bafico et al., 2001). Die Inhibition der BMP-Rezeptoren, kombiniert mit der Inhibition des Wnt-Signalweges, resultiert in der Induktion einer zweiten Achse mit Kopfstrukturen (Glinka et al., 1997; Piccolo et al., 1999).

#### **1.1.4. Die Links-Rechts-Achse**

Ist die antero-posteriore und die dorso-ventrale Achse vorhanden, erfolgt die Unterscheidung von rechts und links. Für die Seitenausrichtung auf molekularer Ebene muss eine Asymmetrie vorhanden sein. Diese wird auf die zelluläre bzw. auf die multizelluläre Ebene übertragen. Dabei handelt es sich um hoch konservierte genetische Signalwege. Der embryonale Körperbauplan ist anfangs symmetrisch. Der Symmetriebruch findet bei Säugern am entstehenden posterioren Notochord während der späten Gastrulastadien/frühen Neurulastadien statt. Die Links-Rechts-Achse orientiert sich nach den anderen Körperachsen.

In Vertebraten wird der Symmetriebruch meist durch gerichtete, synchrone Zilienrotation und den dadurch resultierenden Flüssigkeitsstrom zur linken

Seite hin hervorgerufen (Flow-Modell). Dieser Flüssigkeitsstrom erfolgt an der posterioren Chorda der Maus (Nonaka et al., 2002), im Kupfervesikel des Zebrafisches (Kramer-Zucker et al., 2005; Essner et al., 2005) sowie im Gastrocoelraum von *Xenopus laevis* (Schweickert et al., 2007). Im sich entwickelnden Huhn konnte ein solcher Mechanismus bislang nicht nachgewiesen werden.

Der morphologisch-asymmetrischen Organentwicklung sind Aktivitäten von Signalmolekülen vorgeschaltet. Diese werden jeweils nur auf einer Seite der Mittellinie des Embryo exprimiert (Levin et al., 1995; Boettger et al., 1999). Zusammen etablieren diese Signale die Links-Rechts-Achse und vermitteln die Positionsinformationen für den Körpersitus.

## **1.2. Zellmigration während der embryonalen Entwicklung**

Während der Embryogenese wird die Struktur eines Tieres durch die Wanderung einzelner Zellen zu bestimmten Orten und durch die koordinierte Wanderung oder Verschiebung ganzer Epithelschichten festgelegt (Alberts et al., 2004). Die ersten Zellbewegungen finden während der Gastrulation und der Neurulation statt.

### **1.2.1. Zellbewegungen während der Gastrulation**

Zellwanderungen während der Gastrulation bewirken eine Reorganisation des Embryos von einer einfach gestalteten Blastula in einen dreischichtigen Keim, in dem der Körperbauplan angelegt ist. Die Gastrulation und frühe Organogenese des Säugerembryos verlaufen dabei ähnlich wie beim Vogel oder Reptil. In *Xenopus laevis* vollzieht sich die Gastrulation mit folgenden zellmorphologischen Veränderungen und region-spezifischen Bewegungen: Entstehung der Flaschenhalszellen, Epibolie der ektodermalen Animalkappe, konvergente Extension des

eingewanderten Mesoderms, und Migration des Kopfmesoderms auf dem Blastocoeldach (Keller, 1986).

### **Zellmorphologie während der Gastrulation**

Durch Gestaltveränderungen entstehen in der dorsalen Randzone die Flaschenhalszellen (spätere Entodermzellen). Aufgrund von Aktin-Myosin-Interaktionen kontrahiert deren apikale Oberfläche stark, während ihr Inneres expandiert. Die Zellen besitzen deshalb einen dicken Zellkörper und einen dünnen Hals, der sie in der Oberfläche des Epithels verankert (Lee et al., 2007). Möglicherweise wird über diese Zellen eine Kraft auf das Epithel ausgeübt. Das Epithel krümmt sich und beginnt einwärts zu sinken. Dadurch bildet sich der Urmund oder Blastoporus als erstes sichtbares Zeichen der Gastrulation (Wolpert, 1999; Gilbert, 1994). Der obere Rand dieser Falte bildet die dorsale Urmundlippe. Durch Zellexplantatexperimente mit dorsalen und ventralen Zellen der inneren dorsalen Randzone eines *Xenopus laevis* Embryos im frühen Gastrulastadium konnten Reintsch et al. 2001 zeigen, dass die Kontakte zwischen den Zellen der dorsalen Region viel weniger stabil und damit weitaus flexibler waren als zwischen den Zellen des ventralen Bereiches, was die Zellbewegungen in dieser Region begünstigen könnte. Die mesodermalen Zellen der frühen Gastrula sind zunächst multipolar, isodiametrisch und gleichförmig. Im Verlaufe der Gastrulation werden diese Zellen polarisiert.

#### **1.2.1.1. Epibolie**

Die aktiven Involutionsbewegungen während der Gastrulation werden durch die Epibolie des Blastoderms unterstützt. Der animale Bereich des Blastulaembryos besteht zunächst aus mehreren Zellschichten. Bei den äußeren der drei- bis vier Zellschichten handelt es sich um ein echtes Epithel. Die inneren Schichten können dagegen frei interkalieren (Chalmers et al., 2003). Vor den eigentlichen Gastrulationsbewegungen

arrangieren sich die Zellschichten im Prozess der sogenannten Epibolie durch die radiäre Interkalation der tieferen Schichten und die koordinierte Ausbreitung der darüber liegenden Zellschicht neu. Die Zellen der Außenwand dehnen sich aus und kompensieren flächenmäßig den epithelialen Zellverlust, denn trotz der festen Verbindungen der Zellen innerhalb eines Epithels sind diese in der Lage, ihre Positionen zu verändern.

### **1.2.1.2. Involutionbewegung während der Gastrulation**

Die Gastrulation beginnt mit dem nach innen Gleiten der doppelschichtigen dorsalen Randzone. Die zukünftigen Mesodermzellen der oberen Schicht der einwandernden dorsalen Randzone besitzen epithelialen Charakter. Sie involutieren als zusammenhängender Zellverband und bilden einen Teil des Gastrocoeldaches im Neurulaembryo. Unterhalb dieses superfiziellen Epithels liegt eine vielschichtige tiefe Region aus zukünftigen Mesodermzellen mit mesenchymaler Organisation. Diese bilden die vorläufige Chorda dorsalis, einen Teil des Somitenmesoderms, sowie Kopf-, Herz- und ventrolaterales Mesoderm.

Diese Involutionbewegungen setzen sich an der ventralen Lippe der Blastopore fort. Das Entoderm der ventralen Region wandert ein, um den gesamten Darm auszukleiden (Wolpert, 1999).

### **1.2.1.3. Konvergente Extension**

Der Prozess der konvergenten Extension erscheint neben der Gastrulation, in der Neurulation, während der Elongation der Achsen und während der Organogenese in Embryonen von Vertebraten als auch von Invertebraten.

Im Froschembryo wird die konvergente Extension durch die Zellinterkalation vorangetrieben. Diese resultiert aus der gerichteten

Bewegung der einwandernden mesodermalen Zellschichten. Im Gegensatz dazu verlaufen die Interkalationsbewegungen der superfiziellen Epithelzellen passiv. Die zukünftigen mesodermalen Zellen bilden bereits vor den Gastrulationsbewegungen lamellipodienförmige Auswüchse in alle Richtungen (Keller, 2002).

Im Verlaufe der Gastrulation stabilisieren sich die Fortsätze entlang der mediolateralen Achse. Damit besitzen die Zellen nun große, mediolateral orientierte lamellipodienförmige und feine filliforme Auswüchse oder feine Kontaktpunkte an ihren posterior oder anterior gelegenen Zellabschnitten. Über diese Fortsätze sind die Zellen mit ihren benachbarten mesodermalen Zellen verbunden und können auf diese die für die mediolaterale Interkalation notwendigen Zugkräfte ausüben (Keller et al., 2000). Die Mesodermzellen lagern sich an die Grenze zwischen der Chorda und den Somiten an. Im Verbindungsbereich der Zellen verschwinden die Fortsätze (Shih and Keller, 1992). Mit den verbleibenden Fortsätzen erzeugen die Mesodermzellen weiterhin Zugkräfte auf benachbarte Zellen und ziehen diese gegen den Grenzbereich. Durch die fortlaufende Interkalation weiterer Zellen im Zentrum der Chorda beginnt sich die dorsale Randzone, aus der vorläufigen Chorda dorsalis, dem Somitenmesoderm und dem posterior gelegenen Neuralgewebe bestehend, animal entlang der mediolateralen Achse zu verengen (konvergieren) und entlang der antero-posterioren Achse auszudehnen (Extension, Wallingford et al., 2002). Mit Bestehen der mediolateralen Fortsätze und der Bindungsfähigkeit der mesodermalen Zellen wird die konvergente Extensionsbewegung aufrechterhalten (Keller et al., 1992, 2000). Diese Bewegungen dienen der fortdauernden Involutionbewegung der dorsalen Randzone und führen in den zirkumblastoporalen Bereichen durch Verengung zum Verschluss der Blastopore (Keller et al., 2000; Keller et al., 2002).

Bei dem Prozess der konvergenten Ausdehnung spielt die Modulation der über das Zytoskelett erfolgenden Zelladhäsion eine zentrale Rolle. Hier

sind vor allem die Cadherine wichtig (Ca<sup>2+</sup>-Ionen abhängige Transmembran-Zelladhäsionsproteine). Cadherine spielen eine Rolle bei der Kontrolle der Stabilisierung, Bildung und Auflösung epithelialer Zelllagen und Zellcluster. Sie verbinden die Zellen untereinander und bilden Anheftungspunkte für intrazelluläre Aktinfilamente (Alberts et al., 2004).

Zusätzlich bilden die migrierenden Zellen Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix. Die essentielle Funktion von Integrinen und extrazellulären Matrixproteinen wie zum Beispiel Fibronectin wurde in diesem Zusammenhang in verschiedenen Publikationen beschrieben, wie zum Beispiel von Marsden et al. 2001. Integrine beeinflussen die Zellbewegung, indem sie die Zellen an die extrazelluläre Matrix als Unterlage (als Substrat) binden. Obwohl sich alle Zellen des Embryos an Fibronectin anlagern können, haben nur diese Wanderzellen die Fähigkeit sich auszubreiten und auf den Fibronectinfibrillen zu migrieren (Alberts et al., 2004). Diese Fibrillen säumen das Dach des Blastocoels. Bewegt sich das Mesoderm während der Amphibiengastrulation ins Innere des Embryos, wandern die Zellen an den freien Rändern der Mesodermis an diesen Fibrillen entlang (Gilbert, 1994).

### **1.2.2. Zellbewegungen während der Neurulation**

Die Mechanik der Neurulation hängt unter anderem von der Änderung der Zellverbindungen und Zellgestalt im ektodermalen Epithel ab. Zunächst dehnt sich der einschichtige Epithelzellverband entlang der apikal-basalen Achse im dorsalen Ektoderm aus. Die Zellen ändern ihre kuboidale Gestalt in die von elongierten Säulenzellen und bilden eine verdickte Platte, die sogenannte *Plakode*. Man nennt diese Veränderung der Zellform auch *Kolumnarisierung* (Keller et al., 1992).

Für diese Gestaltveränderung sind Mikrotubuli verantwortlich. Diese verändern intrazellulär ihre Position und werden länger. Nach der *Plakoden*-Bildung erfolgen konvergente Extensionsbewegungen.

### **1.2.2.1. Konvergente Extension der Neuralplatte**

Während der späten Gastrulation in *Xenopus laevis* liegt das neurale Ektoderm, aus einer oberen Schicht epithelialer Zellen und einer tieferen Zellschicht bestehend, über dem involutierten dorsalen Mesoderm. Zu diesem Zeitpunkt und während der Neurulation laufen in beiden Geweben konvergente Extensionsbewegungen ab. In Kontakt mit dem Mesoderm erfolgt die konvergente Extension des neuralen Ektoderms autonom (Keller et al., 1992; Keller and Tibbetts, 1989) und mit Hilfe von Zellinterkalation (Keller et al., 1992). Die Interkalation selbst basiert hier unter anderem auf der durch Signale der Mittellinie induzierten, medial gerichteten Aktivität der Zellfortsätze und der Anheftung der Zellen an der Grenze zwischen der Neuralplatte und der Chordaplatte (Elul et al., 1997; Elul and Keller, 2000). Die Folge hiervon ist die Verlängerung der Neuralplatte entlang der Mittellinie, der antero-posterioren Achse. Dabei expandiert das Neuralgewebe schneller als das darunter gelegene axiale und paraxiale Mesoderm.

### **1.2.2.2. Neuralrohrbildung**

Die Neuralplatte verengt sich im zentralen und posterioren Bereich des Embryos im Stadium 15. Im Stadium 16 verdickt sich ihr antero-lateraler Bereich und die seitlichen Grenzbereiche beginnen zu konvergieren und die Neuralfalten zu bilden (Wolpert, 1999).

Die Zellen der Neuralplatte besitzen am apikalen Ende eine parallele Anordnung von kreuzweise orientierten Aktin- bzw. Myosinfilamenten. Diese Mikrofilamente kontrahieren das apikale Zellende und verleihen den Zellen eine keilförmige Gestalt (Bray, 2001; Gilbert, 1994). Die Neuralfalten verschmelzen zum Neuralrohr.

Neuralrohrschlussdefekte können durch Fehler der Konvergenz hervorgerufen werden. Wird zum Beispiel in *Xenopus laevis* die

konvergente Extension inhibiert, unterbleibt die Fusion der Neuralfaltens (Wallingford and Harland, 2002).

### **1.2.3. Migration der Neuralleistenzellen**

#### **Neuralleisteninduktion**

Anders als in Urodelen und allen anderen Vertebraten existiert in Anuren ein zweischichtiges Neuroepithelium. Die zukünftige Neuralleiste stammt von der tiefen (unteren) und der oberflächigen Schicht des Ektoderms, welche die Neuralplatte flankiert (Schroeder, 1970; Essex et al., 1993).

Die Neuralleisteninduktion findet im dorsolateralen Bereich der Neuralfaltens entlang der gesamten embryonalen Neuralachse statt (der mediolateralen Achse des Mittelhirns und der Rückenmarksregion; Mayor et al., 2001).

Diese Induktion erfolgt durch Interaktionen zwischen der Neuralplatte (dem Neuroepithelium) und dem nicht neuralen Ektoderm, der zukünftigen Epidermis (dem Oberflächenektoderm; Moury and Jacobson, 1990; Selleck and Bronner-Fraser, 1995). Dabei ist vor allem ein mediolateraler und antero-posteriorer BMP-Aktivitätsgradient in der Neuralplatte entlang des Neuralrohrs caudal des Mittelhirns für die Induktion notwendig. Dieser entsteht durch die Wechselwirkung zwischen der BMP Produktion im Ektoderm und den BMP-Inhibitoren, die im axialen Mesoderm (Chorda dorsalis) sekretiert werden. Hohe Aktivität von BMP führt zur Epidermisbildung. Dagegen spezifiziert fehlende BMP-Aktivität die Neuralplattenregion. Die moderate Signalaktivität von BMP führt zur Spezifizierung der Neuralplattengrenze (Tribulo et al., 2003; Mayor et al., 2001; Morgan and Sargent, 1997).

Außerdem sind weitere Signale aus dem Ektoderm (Wnt), bzw. dem unterhalb liegenden paraxialen Mesoderm (FGF) notwendig. Das Zwischenspiel von BMP-Signalen mit deren Antagonisten, wie beispielsweise den sekretierten Proteinen der Wnt-Familie, scheint für den

Ort und den Zeitpunkt der Neuralleistenbildung wichtig zu sein (Trainor et al., 2002).

Zwei der bisher bekannten frühen Indikatoren der Neuralleisteninduktion sind die Transkriptionsrepressoren *Slug* und *Snail*. *Snail* bindet an den Promotor des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin und unterdrückt dessen Expression. Ektopisch überexprimiert ist *Snail* deshalb in der Lage in epithelialen Zellen den epithelial-mesenchymalen Übergang und damit die Migration dieser Zellen zu verhindern (Cano et al., 2000). Für das Auswandern ist ein reguliertes Gleichgewicht von *Cadherin* Expression notwendig. In den Neuralleistenzellen wird die Expression der Zelladhäsionsmoleküle wie *NCAM*, *N-Cadherin* und *Cadherin 6B* nach unten und die Expression von *Cadherin 7*, bzw. *11* nach oben reguliert (Akitaya and Bronner-Fraser, 1992; Kimura et al., 1995). In *Xenopus* kontrolliert *Snail* außerdem die Transkription von *Slug*, welches wiederum die Transkription anderer Neuralleistengene wie *Twist* kontrolliert (Linker et al., 2000; Mayor et al., 2000). Die Expression dieser Gene beginnt während der Gastrulation an den Randzonen der zukünftigen Neuralplatte.

### **Epithelial-mesenchymaler Übergang**

Nach ihrer Induktion, kurz vor dem Neuralrohrschluss durchlaufen die Neuralleistenzellen einen epithelial-mesenchymalen Übergang und verlieren damit ihren epithelialen Charakter. Sie nehmen die Eigenschaften mesenchymaler Zellen an (Verlust der Polarität, Bildung von Fortsätzen, Auflösung der Stressfasern, Veränderung der Zelladhäsion, bzw. Interaktionen mit Integrinen) und beginnen aus der unteren der beiden Zellschichten der Neuralplatte, medial subektodermal über die Oberfläche des cranialen Mesoderm zu wandern (Schroeder, 1970; Essex et al., 1993).

## **Migration**

Die Zellen besitzen monopolare protrusive Aktivität. Die von bestimmten rostro-caudalen (Kopf→Schwanz) Ebenen stammenden Neuralleistenzellen wandern isoliert, wie amöboide Zellen in einzelnen Zellströmen entlang der Kiemenbögen. Es gibt sechs Kiemenbögen des visceralen Skeletts.

Der Mandibular-Bogen oder erster Branchialbogen trägt hauptsächlich zur Gesichtsentwicklung bei. Ihm folgt der zweite Branchialbogen oder Hyoid-Bogen (Zungenbein; Os hyoideum) und weitere vier Kiemen-Bögen, der dritte (großes Zungenbein; Cornu majus ossis hyoidei) und der vierte-bis sechste (Kehlkopfknorpel, Schildknorpel, Pharynx, usw.; Hörstadius und Sellman, 1946). Der cranialen Neuralleiste folgen von anterior nach posterior die cardiäre, die vagale und die Neuralleiste des Rumpfes. Die wandernden Neuralleistenzellen aller Bereiche sind sehr invasiv. Es gibt nahezu kein Gewebe im embryonalen oder adulten Körper, welches keine Nachkommen dieser Zellen besitzt. Vor der Migration sind die Neuralleistenzellen bis zu einem gewissen Grad multipotent und können somit in eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen differenzieren. Innerhalb eines begrenzten Zeitraumes sind die Zellen in der Lage, sich selbst zu regenerieren (Shah and Anderson, 1997). Während der Migration werden die Zellen von ihrer Umgebung beeinflusst. Diese beeinflussenden Faktoren wie andere Zellen, Wachstumsfaktoren oder Hormone schränken die multipotente Entwicklungsfähigkeit der Neuralleistenzellen ein.

### 1.3. Mechanismen der Zytoskelettdynamik

Jede eukaryotische Zellbewegung resultiert aus der Dynamik ihres Zytoskeletts. Bei der Migration oder der Interkalation kommt es zur Kooperation der Zellausstülpung am vorderen Plasmasaum und der Kontraktion des mittleren und hinteren Zellbereiches. An beiden Mechanismen sind Aktinfilamente beteiligt (Small et al., 2005).

#### 1.3.1. Aktin

Aktin ist eine essentielle Komponente des Zytoskeletts und spielt somit eine zentrale Rolle bei jeder Form der Zellmotilität. In eukaryotischen Zellen sind Aktinfilamente im Zusammenwirken mit weiteren funktionellen Molekülen an der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellgestalt, an der Zellteilung, Kontraktion, Adhäsion, Phagozytose usw. beteiligt. Höhere Eukaryoten besitzen multiple Isoformen des Proteins, die unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle erfüllen.  $\alpha$  Aktin fungiert als Bestandteil kontraktiler Strukturen, während polymerisierendes  $\beta$  Aktin in den Fortsätzen der sich bewegenden Zelle zu finden ist.

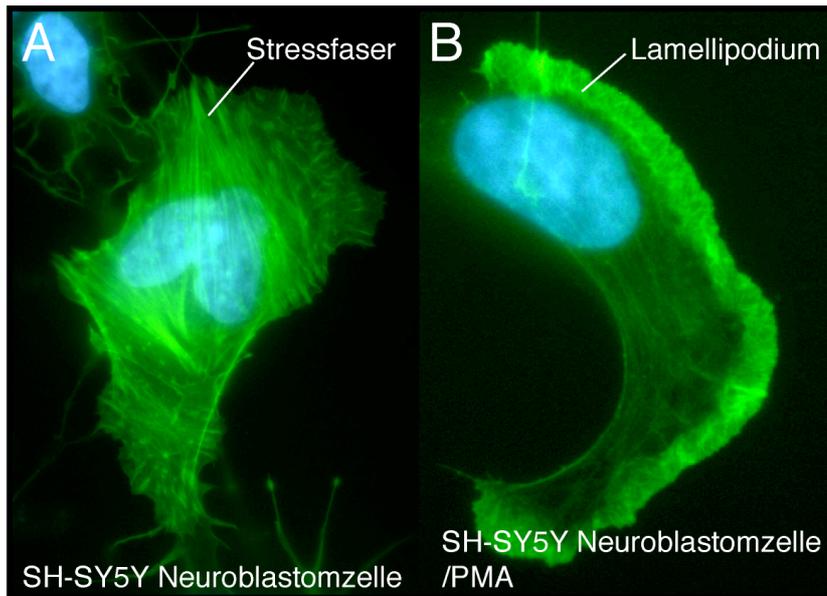
In der Zelle erscheint Aktin als globuläres monomeres Aktin (G-Aktin) und als filamentöses polymeres Aktin (F-Aktin; Winder S. J. et al, 2005). Das globuläre Aktinprotein besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette. Jedes Aktinmolekül enthält ein  $Mg^{2+}$  Ion komplexiert mit ATP oder ADP. Somit existieren vier Stadien des Aktins: ATP-G-Aktin, ADP-G-Aktin, ATP-F-Aktin und ADP-F-Aktin.

Im Aktin- oder Mikrofilament sind die Aktinmoleküle reversibel zu linearen Ketten verknüpft. Zwei solcher Ketten sind spiralförmig umeinander gewunden. Die Verknüpfung wird von der Hydrolyse des ATP zu ADP und  $P_i$  begleitet. Die ATP-Hydrolyse betreibt direktionales Filamentwachstum. Aktinfilamente besitzen eine einheitliche Polarität, in Abhängigkeit von der Orientierung ihrer Aktinmoleküle. Dies führt dazu, dass die verschiedenen

Enden des Filaments unterschiedliche Polymerisationsraten aufweisen und als positiv (schnell wachsend) oder negativ (langsam wachsend) bezeichnet werden. Beide Filamentenden unterscheiden sich strukturell (Alberts et al., 2004).

### **1.3.2. Stressfasern**

Die kontraktile Stressfasern verlaufen geradlinig durch die Zelle und haben über Zelladhäsionskomplexe Kontakt zur extrazellulären Matrix. In ihnen sind die gebündelten Aktinfilamente mit alternierend angeordnetem Myosin II und  $\alpha$  Aktinin verknüpft. Die Myosinfilamente, Bestandteile des kontraktile Apparates in Muskelzellen, fungieren hier als aktinabhängige Motorproteine. Myosin besitzt ATPase-Aktivität. Aktin ist der physikalische Aktivator der Myosin ATPase. Das Substrat ist  $MgATP^{2+}$ . Myosin hydrolysiert ATP, und die Myosinfilamente in den kontraktile Komplexen benutzen die Aktinfilamente als Schienen entlang derer sie sich bewegen. In Abhängigkeit von ihren Strukturen können die Myosinmoleküle zum Beispiel Vesikel entlang der Aktinfilamente oder die Aktinfilamente selbst transportieren und diese an die Plasmamembran anheften und somit das Zytoskelett organisieren (Evans et al., 1998; Wu et al., 2000). Den kontraktile Stressfasern werden hauptsächlich Funktionen bei der Zellstabilisierung und Zelladhäsion zugeschrieben. Deshalb werden sie vor allem in nicht motilen Zellen ausgebildet (Abb.1, A) und sind in motilen Zellen kaum vorhanden.



**Abb.1 Intrazelluläre Aktinfilamentanordnungen in Abhängigkeit der Zellbewegung von SH-SY5Y Neuroblastomzellen**

In nicht motilen Zellen liegen die Aktinfilamente (grün) in Verbindung mit Myosin II Filamenten als kontraktile Stressfasern vor (**A**). In migrierenden Zellen, wie den mit dem Tumorpromotor PMA (Phorbol 12-Myristat 13 Acetat) über die Aktivierung der PKC stimulierten Neuroblastomzellen entstehen in Bewegungsrichtung Lamellipodien (**B**). In diesen Zellen finden sich kaum noch Aktin-Myosin-Stressfasern. Die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin sichtbar gemacht. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. H. Rösner.

### 1.3.3. Aktin-Zytoskelettdynamik motiler Zellen

In migrierenden Zellen scheint neben den Aktin-Myosin-Interaktionen die Dynamik der F-Aktin Polymerisation und Depolymerisation wichtig zu sein. Bei der Zell-Migration handelt es sich um einen sehr komplexen Vorgang, für den die Ausbildung des Zellkortex unter der Plasmamembran verantwortlich ist. Hierbei sind vor allem drei unterschiedliche Mechanismen beteiligt:

- 1) Die Ausbildung von Fortsätzen (Lamellipodien und Filopodien);
- 2) Der retrograde Aktinfluss;
- 3) Die Anheftung an die extrazelluläre Matrix.

In der wandernden Zelle wird durch Polymerisation von Aktin ein Leitsaum gebildet. Unterschiedliche Zellen bilden dabei unterschiedliche

vorgestülpte Strukturen. Dazu gehören die Filopodien, Lamellipodien (Abb.1, B) und die Pseudopodien. Die Lamellipodien enthalten zum Beispiel nahezu die gesamte für die Zellbewegung nötige Maschinerie. Dabei handelt es sich um zweidimensionale, blattähnliche Strukturen. Sie werden hauptsächlich von Epithelzellen, Mesenchymzellen, Fibroblasten sowie von wandernden Neuralleistenzellen ausgebildet.

### **1.3.3.1. Lamellipodienausbildung**

Der in den Lamellipodien stattfindenden Filamentpolymerisation geht die sogenannte Keimbildung voraus. An der Frontseite, dem Leitsaum der sich bewegenden Zelle, werden Nukleations-Promotions-Faktoren, wie die Proteine der WASP-Familie (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) über Signalwege aktiviert. Diese aktivieren den Nukleationsaktivator Arp2/3 (Aktin verwandte Proteinkomplexe 2 + 3 und fünf weitere Polypeptide mit 50% Sequenzhomologie zu Aktin) und führen dem positiven Filamentende Aktinmonomere zu (Winder et al, 2005). Der Arp2/3 Komplex kann sich während der Polymerisation seitlich an andere Aktinfilamente anlagern. Dabei entstehen Verästelungen individueller Filamente, was in dieser Region des Zytoplasmas zu einem dichten Aktinfilamentnetzwerk führt (Alberts et al., 2002; Pollard and Borisy, 2003).

Die positiven Enden der Aktinfilamente sind in Richtung der Zellbewegung ausgerichtet, die negativen Enden weisen in Richtung des Zellkerns (Bray, 2001). Das sich ausdehnende Filamentgeflecht bedingt schließlich die Verschiebung der Plasmamembran in Bewegungsrichtung.

### **1.3.3.2. Retrograder Aktinfluss**

Die Lamellipodien besitzen unabhängig von der Bewegungsrichtung eine konstante Saumdicke. Diese kann durch den regulierten Aktinturnover erklärt werden. Neben den verzweigten Aktinfilamentstrukturen des Lamellipodiums gibt es in der sich bewegenden Zelle weitere lineare

Aktinfilamente. Beide Aktinpolymere haben Kontakt zu Myosin II Komponenten. Diese erzeugen einen retrograden Aktinfilamentfluss (Cramer et al., 1997). Deshalb zeigen die meisten Lamellipodien eine Kombination aus einer nach vorne gerichteten, durch Aktinpolymerisation betriebene Ausstülpung und einem nach hinten gerichteten Aktinfluss (Retrograder Aktinfluss). Bei letzterem bewegt sich das gesamte Aktinnetzwerk rückwärts zum Zellkörper und wird abgebaut. Die Aktinfilamentverästelungen depolymerisieren und liefern den Rohstoff für neue Filamente (Bray, 2001; Alberts et al. 2004).

### **1.3.3.3. Zell-Matrix-Interaktionen**

In den Lamellipodien bilden sich Aktin-Myosin I Filament enthaltende Adhäsionsproteinkomplexe, die über Integrine (durch die Membran reichende heterodimere Adhäsionsproteine) mit der extrazellulären Matrix verbunden sind. Die Zelle ist damit in der Lage, die für die Bewegung erforderlichen Zugkräfte auf die Unterlage, an die sie gebunden ist, auszuüben. Während sich die Zelle über sie hinwegbewegt, bleiben die Adhäsionskonstrukte bestehen. Kriecht die Zelle vorwärts, entstehen an der Vorderseite neue Fokalkontakte. Die alten Kontakte an der Zellrückseite werden abgebaut. In ähnlicher Weise werden Zugkräfte für die Zellmigration durch bivalente Brücken aus Myosin II und Aktinfilamenten, die ihrerseits mit der extrazellulären Matrix verknüpft sind, erzeugt.

### **1.3.4. Regulationsmechanismen der Zytoskelettdynamik**

Diese Interaktionen müssen vor allem in embryonalen Zusammenhängen koordiniert werden.

### 1.3.4.1. Regulation durch Wnt-Signalwege

Die Regulation der konvergenten Extensionsbewegungen wird den Proteinen der Wnt-Familie zugesprochen. In Säugerzellen sind bisher 18 Wnt-Proteine bekannt (Venter et al., 2001), die man in zwei Klassen unterteilen kann. Die Wnt-Proteine interagieren alle mit den Frizzled Zelloberflächenrezeptoren. Der Aktivierung durch Frizzled folgen intrazellulär drei verschiedene Signalkaskaden.

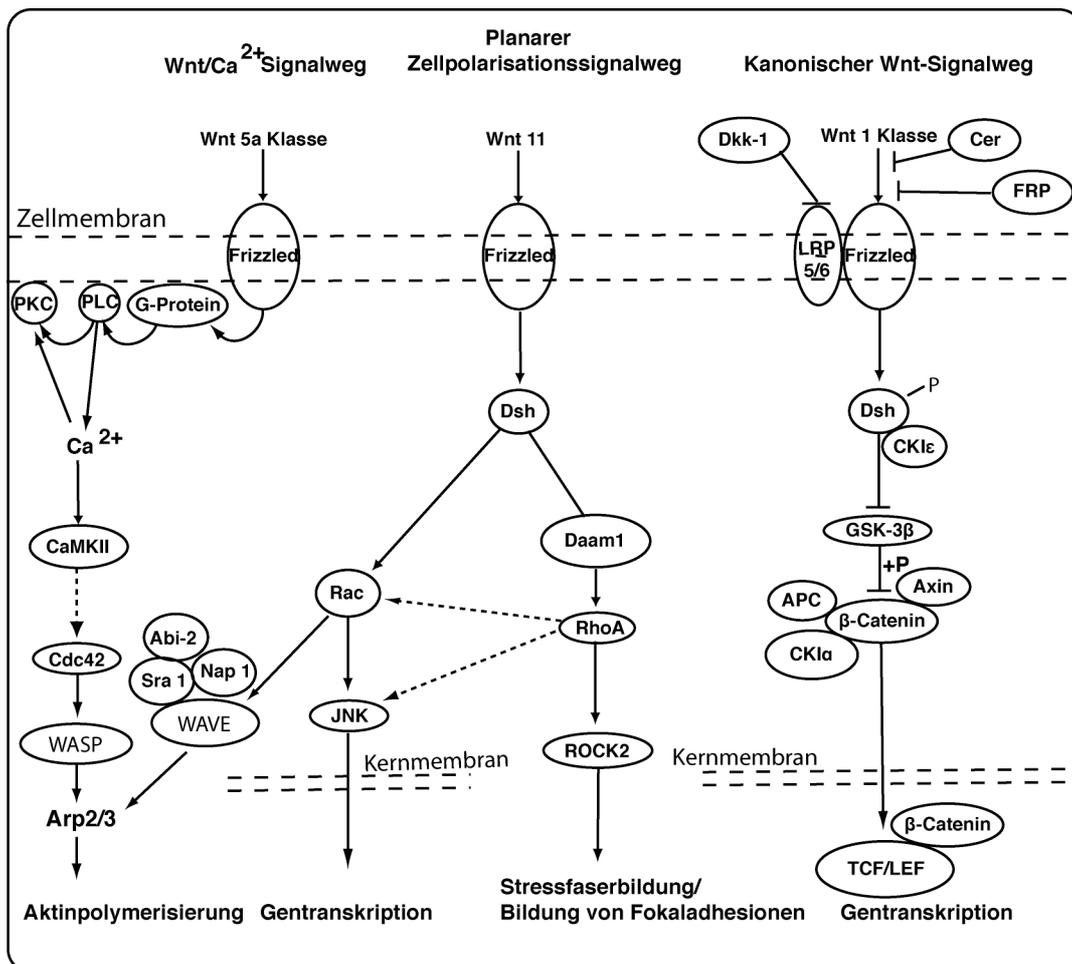


Abb.2. Die drei Wnt-Signalwege (Details siehe Text).

#### Der kanonische Wnt-Signalweg

Die Mitglieder der Wnt 1/Wg Gruppe (Wnt 1, 3a, 8a und 8b) sind in der Lage nach ventraler Missexpression in *Xenopus laevis* eine zweite Achse zu bilden und die Zelladhäsion zu verstärken. Die Proteine dieser Wnt-Familie stabilisieren das bifunktionelle β-Catenin (Abb.2). Normalerweise

befindet sich  $\beta$ -Catenin in der Nähe der Plasmamembran. Dort ist es assoziiert mit Cadherinen und dem Aktin-Zytoskelett. Seine Interaktionen mit Cadherinen stehen in Verbindung mit der  $\alpha$ -Catenin Isoform. Durch diese Interaktionen verstärkt sich die Cadherin-vermittelte Adhäsion wesentlich. Die Interaktionen von  $\beta$ -Catenin mit dem Aktin-Zytoskelett stehen in Verbindung mit  $\alpha$  Aktinin. Diese Interaktionen sind für die Koordination des Aktin-Zytoskeletts wichtig. Wird  $\beta$ -Catenin über Dsh stabilisiert gelangt es in den Kern. Dort bildet es zusammen mit den Co-Transkriptionsfaktoren Lef $\beta$ /Tcf (Lymphocyte enhancer factors/ Tcell Factors) einen Transkriptionsfaktorkomplex.

### **Der planare Wnt-Signalweg**

Die Proteine des planaren Zellpolarisations-Signalwegs (PCP) regulieren die konvergenten Extensionsbewegungen. Die mediolateralen Interkalationen der mesodermalen Zellen sind ein wesentlicher Bestandteil der konvergenten Extensionsbewegungen während wichtiger Entwicklungsprozesse der Vertebraten. Diese werden durch die polarisierte Aktivität ihrer Fortsatzbildung vorangetrieben. Die Polarität wird über den planaren Zellpolarisations-Signalweg (PCP) kontrolliert (Adler, 2002; Knust et al., 2002). Dafür spricht, dass viele der in die konvergente Extension involvierten Gene denen des PCP in *Drosophila* homolog sind. (Der PCP wurde zunächst in *Drosophila* nachgewiesen). Dort kontrolliert diese Kaskade die einheitliche Orientierung von Borsten auf der Körperoberfläche der Fliege. Weiterhin sind sechs Kern-Proteine involviert: Frizzled, Disheveled, Flamingo, Diego, Strabismus und Prickle (Klein et al., 2005; Tree et al., 2002; Adler et al., 2002).

In den Vertebraten ist das sekretierte Protein Wnt 11 als Ligand von Frizzled 7 (Fz7, Zelloberflächenrezeptor) für die konvergente Extension wichtig. Wnt 11 wird im sich ausdehnenden Mesoderm von *Xenopus* exprimiert. Sowohl Wnt 11 als auch Wnt 5a sind möglicherweise an der Regulation der Zellinterkalation während der konvergenten Extension des

Notochords beteiligt. Das Wnt 11/Fz7/Dsh Signal kann die konvergenten Extensionsbewegungen möglicherweise über die Aktivität des PCP oder des Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs beeinflussen (Medina and Steinbeisser, 2000; Medina et al., 2000). Studien in *Xenopus* belegten, dass die Wnt/Fz-Signale das Zytoskelettregulationsprotein Rho mit Hilfe von Dishevelled (Dsh, Protein im Zytosol) und einer direkten Interaktion von Dishevelled mit dem Gerüstprotein Daam1 (Dishevelled-assoziiierter Aktivator der Morphogenese) aktivieren kann (Abb.2; Habas et al., 2003). Die Rho-GTPase aktiviert die Protein-Kinasen ROCK (Rho assoziierte Kinase), die wiederum die Funktion einer mit den Myosin-Leichtketten interagierenden Phosphatase inhibiert. Als Folge erhöht sich die Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung und damit die kontraktile Myosinaktivität in der Zelle. Dies führt wiederum zur Bündelung von Aktin- und Myosin II Filamenten und zur Ausbildung von Stressfasern (Winter et al., 2001; Katoh et al., 2001). Außerdem bewirkt Rho-GTP die Komplexierung von Integrinen mit anderen Hilfsproteinen für die Bildung fokaler Kontakte (Alberts et al., 2002). Eine Wnt/Frizzled stimulierte Rho/ROCK Signalkaskade während der konvergenten Extension könnte die für die Veränderung der Zellmorphologie notwendige mediolaterale Kontraktion erzeugen. Zudem wird durch die Rho-GTPase im Randbereich der motilen Zellen Rac, eine weitere GTPase aktiviert. Rac-GTP kann über bestimmte Mitglieder der WASP-Familie den Arp2/3 Komplex aktivieren und die beschleunigte Aktinfilamentpolymerisierung, bzw. Ausbildung von Lamellipodien bewirken. Bei den Rac-GTP Zielproteinen handelt es sich um die sogenannten WAVE-Proteine (WASP-Verprolin homologe Proteine; Stradal et al., 2004). Die Bindung von Rac-GTP an WAVE erfolgt nicht direkt. Einem aus Nervenzellen isolierter Komplex aus den vier Proteinen Sra 1 (Specifically Rac associated Protein 1), Nap1 (Nck associated Protein 1), Abi-2 (Ab1 interactor-2) und WAVE1 wird hierbei eine Rolle zugeschrieben (Eden, et al., 2002). Die moderate Konzentration von Rac bewirkt die Bildung von Lamellipodien in den interkalierenden Zellen während den konvergenten

Extensionsbewegungen (Pankov et al., 2005). Dabei könnte die GTPase möglicherweise durch die radiale Spannung, die die Zelle erfährt, aktiviert werden (Keller et al., 2002).

### **Wnt /Ca<sup>2+</sup>-Signalweg**

Die Proteine der Wnt 5a-Gruppe (Wnt 4, Wnt 5a und Wnt 11) sind nicht in der Lage, in *Xenopus laevis* eine sekundäre Achse zu induzieren. Wnt 5a aktiviert mit der Bindung an Fzl den sogenannten Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg. Dieser Wnt-Signalweg verläuft unabhängig von dem Protein Dsh und beeinflusst über die verminderte Ca<sup>2+</sup> abhängige Zelladhäsion die konvergenten Extensionsbewegungen während der embryonalen Entwicklung, sowie die Gewebetrennung in *Xenopus* (Torres et al., 1996; Kühl et al., 2000; Winklbauer et al., 2001).

Die Proteine des Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs antagonisieren die Funktion der Wnt 1 Klasse (Torres et al., 1996). So können die Mitglieder beider Wnt-Gruppen auf verschiedene Weise die konvergenten Extensionsbewegungen beeinflussen.

Im Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg führt die Bindung der Wnt-Liganden an den Membranrezeptor Fzl in Abhängigkeit eines G-Proteins zur intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Ausschüttung und zur Aktivierung der Protein-Kinase C (Slusarski et al., 1997; Sheldahl et al., 1999) und der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängigen Kinase II (CamK II; Kühl et al., 2000). Unterhalb der Protein-Kinasen wird die GTPase Cdc42 aktiviert (Choi et al., 2002). Als Zielproteine der Cdc42 konnten die Mitglieder der Familie der WASP-Proteine identifiziert werden. WASP und N-WASP (neurale Form des Proteins) können über ihre zentrale GTPase bindende Domäne (GBD) direkt an Cdc42 binden (Stradal et al., 2004). In Verbindung mit Cdc42 verbleiben die Proteine in einem aktivierten, entfalteten Zustand und sind in der Lage an den Arp-Komplex zu binden, was dessen Keimbildungsfähigkeit, den zeitlich begrenzenden Faktor der Polymerisation wesentlich erhöht (s. Abb.2).

### **1.3.4.2. Kontrolle durch regulative Proteine**

Die Aktindynamik wird letztlich durch Aktinbinde- und Stabilisierungsproteinen reguliert. Diese Kontrolle kann während der Polymerisation der Filamente oder auf Ebene der Aktinfilamente zum Beispiel bei deren Bündelung erfolgen.

#### **Regulation der Aktinpolymerisation**

Mit den Aktinmonomeren verbundene Proteine erleichtern zum Beispiel den Nukleotidaustausch (Profilin und CAP), versorgen die Filamentbildungsstellen mit Aktinmonomeren (Twinfilin, Srv2CAP, Profilin, WASP) und dienen als Nukleationsstartpunkte (Arp2/3 und Formin). Andere Proteine wie die Cappingproteine Gelsolin und Tensin wiederum kontrollieren die Anlagerung weiterer Aktinmonomere an das positive Ende des Filaments und kontrollieren somit dessen Länge (Winder et al., 2005).

#### **Regulation der Aktinfilamentdynamik- und interaktion**

Neben den Regulationsproteinen, die im Rahmen der Aktinfilamentbildung bzw. der Aktindepolymerisation wirksam sind, gibt es Bindeproteine, die mit dem Aktinfilament interagieren. Je nach Bewegungszustand sind diese Aktinfilamente hauptsächlich als Bündel (Stressfasern) oder als gespinnstartige (gelartige) Netzwerke vorhanden. Alle Aktinfilamentbindeproteine besitzen mindestens eine Aktinbindedomäne (Winder et al., 2005; Burtnick et al., 2004). Proteine, welche zwei Aktinbindestellen für F-Aktin besitzen, können Verbindungen mit zwei Untereinheiten innerhalb eines einzelnen Filaments oder zwischen zwei benachbarten Aktinfilamenten bilden. Im letzteren Fall werden die Filamente gebündelt oder quervernetzt (crosslinking). Der Unterschied zwischen dem Bündeln und dem Crosslinking selbst ist nicht groß. Er hängt von der Länge des Proteinabschnitts zwischen den Aktinbindedomänen und der Stärke der Bindung ab. Das

Aktinbindeprotein Fimbrin zum Beispiel besitzt als kleiner Quervernetzer zwei Aktinbindedomänen in geringem Abstand auf einer einzigen Polypeptidkette. In den Filopodien bildet Fimbrin dicht gepackte parallele Aktinfilamentbündel aus 20-30 Filamenten. Diese sehr enge Aktinfilamentpackung schließt Myosin II aus. Deshalb sind Filopodien nicht kontraktile. In Lamellipodien verbindet das Aktinbindeprotein Filamin jeweils zwei Aktinfilamente im Winkel von 90° miteinander. Dabei entsteht ein sehr visköses Filamentgel (Bray, 2001).

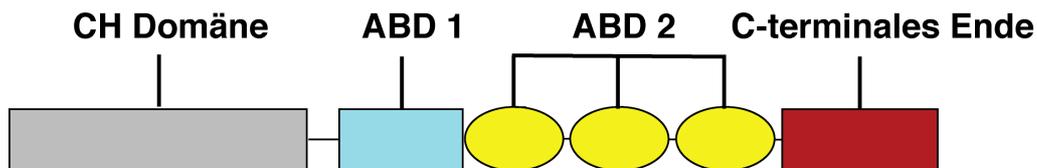
Neben den Hilfsproteinen, welche die Aktinfilamente quervernetzen, unterscheidet man die stabilisierenden Proteine. Diese lagern sich seitlich linear an das Aktinfilament an und verhindern so dessen Depolymerisation und die Interaktionen mit anderen Bindepartnern. Zu diesen flankierenden und stabilisierenden Proteinen gehören zum Beispiel Adducin, Caldesmon, Nebuline, Tropomyosin und Calponin (Winder et al., 2005).

#### **1.4. Calponin**

Die Proteine der Calponin-Familie besitzen zwei Aktinbindedomänen mit unterschiedlicher Aktivität und können in Abhängigkeit von der Ionenstärke an eine oder zwei Aktinuntereinheiten binden (Hodgkinson et al., 1997). Bei einem ausgeglichenen Verhältnis beider Reaktionspartner, binden die Calponin-Proteine zunächst zufällig und orientieren sich anschließend peripher über die Länge von drei Aktinmonomeren entlang der Aktinfilamente an. Dies bewirkt eine Blockade der Aktinmonomeren durch sterische oder andere repulsive Kräfte (Leinweber et al., 1999; Stafford et al., 1995).

Liegt ein hohes Mengenverhältnis von Calponin-Proteinen gegenüber dem filamentösen Aktin vor, dominiert die transversale Bindung, was die Bündelung der Aktinfilamente begünstigt. (Kolakowski et al., 2002; Kolakowsky et al., 1995). Dabei scheint Calponin das Aktinfilament zu stabilisieren, indem es durch seine Bindung die Anlagerung und Aktivierung von depolymerisierenden Proteinen verhindert. Der

stabilisierende Mechanismus lässt sich möglicherweise mit den subtilen Veränderungen der dreidimensionalen Struktur der an Calponin gebundenen Aktinfilamente erklären (Gimona et al., 2003). Auch das Aktinfilament vermittelt über die Bindung Konformationsveränderungen innerhalb der C-terminalen Domäne der Calponin-Proteine (Bartegi et al., 1999).



**Abb.3 Das Calponin-Protein mit seinen funktionellen Domänen**

Der N-terminalen CH Domäne (Calponin Homologie Domäne) (grau) folgt die erste Aktinbindedomäne (ABD 1, blau) mit hoher Affinität, die zweite Aktinbindedomäne (ABD 2, gelb) aus einem sich dreimal wiederholenden Modul von 23-29 Aminosäuren bestehend und das C-terminale Ende (rot).

Es gibt drei von verschiedenen Genen codierte Calponin-Proteine. Ihre N-terminalen Proteinsequenzen, die zwei Drittel des gesamten Proteins ausmachen, sind evolutionär hoch konserviert. Sie differieren allerdings in erheblichem Maße in ihren C-terminalen Aminosäurefolgen, was sie zu Kandidaten unterschiedlicher biologischer Aktivitäten macht (Gimona and Small, 1996; Morgan et al., 1999). Anhand ihrer verschiedenen isoelektrischen Punkte bezeichnet man die Proteine als basisches Calponin (Calponin 1), neutrales Calponin (Calponin 2) und saures Calponin (Calponin 3; Takahashi and Nadal-Ginard, 1991; Strasser et al., 1993; Applegate et al., 1994; Maguchi et al., 1995).

#### 1.4.1. Funktionelle Domänen der Calponin-Proteine

##### Die CH Domäne

Die Calponin Homologie Domäne (CH Domäne) befindet sich in der N-terminalen Region des Proteins. In den Calponinen hat diese Domäne keinen Einfluss auf die Bindung an das filamentöse Aktin (Gimona et al., 1998, 2002). In anderen Aktin-Crosslinking- oder Bündelproteinen wie

zum Beispiel  $\alpha$  Aktinin oder Filamin dienen mehrerer dieser Module als Aktinbindedomäne.

Morgan et al. (1999) postulierten eine alternative Funktion der CH Domäne im Calponin-Protein. Sie zeigten eine direkte physikalische Interaktion der CH Domänen von Calponin und  $\alpha$  Aktinin mit den MAP (Mitogen Aktivated Protein) Kinase Signalmolekülen ERK1 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase) und ERK2. Zudem diene das Calponin-Protein *in vitro* als ein Substrat der Protein-Kinase C (PKC) und erfüllt diese Funktion möglicherweise auch *in vivo* (Winder et al., 1998). Damit könnte Calponin als ein Adapterprotein zwischen den Signalwegen der PKC und der ERK-Kaskaden fungieren (Menice et al. 1997; Leinweber et al., 1999). Diese einzelne CH Domäne findet sich auch in anderen regulatorischen Molekülen, wie den Proteinen der Familie der Ras-GTPasen, die essentiell für Signaltransduktionen sind. Dazu gehören zum Beispiel das Vav-Proto-Oncogenprodukt und IQGAP1 (Castresana et al., 1995). Zudem fungiert Calponin als ein direktes Zielprotein der Rho-assoziierten Kinase (ROCK), die in die Regulation von auf Aktin-Myosin basierender Kontraktion in Glattmuskelzellen und Nichtmuskelzellen involviert ist (Kaneko et al., 2000).

### **Die Aktinbindedomänen (ABD)**

Calponin-Proteine besitzen zwei voneinander unabhängige Aktinbindedomänen. Die starke (mit hoher Affinität) Aktinbindedomäne 1 von Calponin 1 und 3 umfasst die Aminosäurenreste 145-163 und ist in die Inhibition der Aktin-Myosin ATPase-Aktivität involviert (El-Mezgueldi, 1996; Kolakowski et al., 1995). Eine weitere Aktinbindedomäne in der C-terminalen Hälfte von Calponin 1, 2 und 3 mit geringerer Affinität besteht aus drei aufeinander folgenden Kopien von 23-29 Aminosäuren (Gimona and Mital, 1998; Danninger and Gimona, 2000; Kranewitter et al., 2001). Sie wird Clik (Calponin-like repeat) genannt (Burgstaller et al., 2002) und besteht bei dem menschlichen Calponin h1 aus den Aminosäurefolgen

164-192, 204-232 und 243-271. Diese Domäne ist für die Stabilisierung und Bildung von Aktinfilamentbündeln verantwortlich (Kolakowski et al., 1995).

### **Die C-terminale Endregion**

Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Calponin-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in der C-terminalen Endregion ab der Aminosäure Cys 273. Die Längen und die Anzahl der negativ geladenen Aminosäurereste dieser C-terminalen Endsequenzen der Calponin-Proteine sind verschieden. Von dieser terminalen Sequenz wird vermutet, dass sie regulatorische Eigenschaften auf die Funktion des Proteins hat. Dazu zählen die Interaktionen mit Aktin und mit anderen intrazellulären Liganden (Bartegi et al., 1999).

## **1.4.2. Verschiedene Calponinvarianten**

### **Calponin 1 (basisches Calponin)**

Calponin 1 ist ein für glatte Muskelzellen spezifisches Protein. Im Kaumagen des Huhns wurden zwei Isoformen von Calponin h1 isoliert, Calponin  $\alpha$  und Calponin  $\beta$  (Draeger et al., 1991). Beide werden posttranskriptional durch alternatives Splicen modifiziert (Itoh et al., 1995). Calponin 1 interagiert unter anderem mit der  $\beta$  Aktin Isoform (zytoplasmatisches Aktin), der  $\gamma$  Aktin Isoform (kontraktilen Aktin) und mit Desmin (Takeuchi et al., 1991; Walsh et al., 1993; North et al., 1994). Das Protein wurde im zentralen Bereich der Aktinstressfasern von Glattmuskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen (Danninger et al., 2000; Gimona et al., 1990; Walsh et al., 1993; North et al., 1994). Auf diese Weise war das menschliche Calponin h1 in der Lage die Aktinfilamentbündel sehr effektiv zu stabilisieren und deren Depolymerisation selbst durch toxische Agenzien wie Cytochalasin und Latrunculin zu verhindern (Danninger et al., 2000). Mit Wundheilungsexperimenten zeigten Danninger et al., 2000, dass die Expression von

Calponin h1 in transfizierten NIH 3T3 Fibroblasten der Maus die globale Zellbewegung reduzieren kann. Außerdem ist Calponin 1 möglicherweise für die Regulation des Kontraktion-Relaxationszyklus mitverantwortlich (Walsh et al., 1993; North et al., 1994).

In *in vitro* Bewegungsexperimenten war Calponin h1 in der Lage, die Aktin-aktivierte Myosin MgATPase-Aktivität zu inhibieren und die Aktinfilamentbewegung dosisabhängig um bis zu 80% zu vermindern (Shirinsky et al., 1992; Haeberle et al., 1994; El-Mezgueldi et al., 1996). Im Organismus spielt Calponin 1 eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung der strukturellen Integrität von Blutgefäßen. So waren die Blutgefäße von Mäusen, denen das Glattmuskel-spezifische Calponin fehlte, fragil (Taniguchi et al., 2001). Calponin 1 gilt als sehr sensibler Marker von myoepithelialer Zelldifferenzierung in Katze und Hund und von menschlichem Brustgewebe und Tumoren (Mulas et al., 2004; Fukui et al., 1997).

In den Glattmuskelzellen sind die Aktin-Myosinfilamente nicht regelmäßig zu Myofibrillen angeordnet. Sie liegen vielmehr bündelweise kreuz und quer verteilt vor. Diese Bündel sind an Verdichtungen (dense bodies) des Intermediärfilament-Zytoskeletts, sowie über fokale Verbindungen mit der Plasmamembran verankert. Die hauptsächliche Regulation der Glattmuskelkontraktion erfolgt durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängige Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten. Diese aktiviert die Aktin-Myosin MgATPase (Hartshorne et al., 1987; Somlyo et al., 1994). Die Glattmuskelzellen kontrahieren vergleichsweise langsam, aber sie besitzen eine größere Vielfalt an Steuerungsmechanismen als quergestreifte Muskeln. Die Glattmuskelzellen finden sich vor allem in der Wand von Hohlorganen, wie den Blutgefäßen oder dem Verdauungstrakt. Die Affinität der Aktinisoformen der Glattmuskelzellen gegenüber dem Calponin-Protein ist um das 10-fache höher als die der Nicht-Muskel-Aktin-Isoformen (Sutherland et al., 1990).

### **Calponin 2 (neutrales Calponin)**

Calponin 2 spielt möglicherweise bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts von Nichtmuskelzellen eine Rolle (Fukui et al., 1997). Hier wurde Calponin h2 in signifikanten Mengen in Verbindung mit dem nicht kontraktile Aktin-Zytoskelett nachgewiesen (North et al., 1994; Parker et al., 1998). Das Genexpressionsmuster in Vertebraten und die Aktivitätsregulation von Calponin h2, lässt eine Funktion des Proteins bei der Organbildung, dem physiologischen Wachstum und dem Remodulieren von Geweben vermuten (Hossain et al., 2003). Untersuchungen auf Zellebene ergaben, dass Calponin h2 im Gegensatz zu Calponin h1 hauptsächlich in den motilen Fortsätzen in der Peripherie von sich bewegenden Zellen, sowie in den Membranverankerungsbereichen am Ende der Aktinstressfasern zu finden ist. Calponin h2 war folglich nicht in der Lage das Aktin-Zytoskelett gegen die depolymerisierende Wirkung toxischer Agenzien zu stabilisieren (Danninger and Gimona, 2000). Vielmehr wurde dem Protein eine wichtige Rolle bei der Migration von beispielsweise Endothelzellen und damit bei der korrekten vasculären Entwicklung zugesprochen (Tang et al., 2006). Fukui et al. (1997), wiesen Calponin h2 in kultivierten menschlichen Keratinozyten nach. Kultivierte Keratinozyten gelten als wichtige *in vitro* Modelle für die Studien der Regulation epidermaler Differenzierung (Boyce et al., 1983; O'Keefe et al., 1987; Green et al., 1987). Außerdem fand sich das Protein in den Verbindungselementen zwischen benachbarten Cardiomyozyten (Masuda et al., 1996).

### **Calponin 3 (saures Calponin)**

Das saure Calponin erhält seinen Charakter durch eine Folge von 57 Aminosäuren in der C-terminalen Region und lässt sich in glatten Muskelzellen und in nicht muskulären Zellen nachweisen (Takahashi et al., 1991; Strasser et al., 1993). So fand man saures Calponin in Neuronen während der frühen Embryonalentwicklung und in Gehirn, Lunge, Aorta, Niere, Darm und Magen der adulten Ratte (Plantier et al.,

1999; Ferhat et al., 1996; Trabelsi-Terzidis et al., 1995). Dem sauren Calponin wird als neuronalem Generator die Kontrolle der Neuritenbildung und deren Verästelung, sowie der neuronalen Regeneration zugesprochen (Ferhat et al., 1996). Durch die Überexpression von saurem Calponin in nicht neuronalen Zellen ließ sich die Ausbildung von Fortsätzen induzieren (Ferhat et al., 2001).

#### **1.4.3. Funktion und Regulation der Calponin-Proteine**

Calponin 1 und Calponin 3 sind in der Lage durch die Bindung an filamentöses Aktin oder F-Aktin-Tropomyosin die durch Aktin aktivierte MgATPase-Aktivität des phosphorylierten Glattmuskel-Myosins *in vitro* zu inhibieren (Winder et al., 1990; Abe et al., 1990). Möglicherweise führen die von dem jeweils gebundenen Calponin-Protein induzierten, strukturellen Veränderungen des Aktinfilaments zu einer Reduktion des Crossbridgecyclings und damit zur Inhibition der Aktin-Myosin ATPase-Aktivität (Kolakowski et al., 2002). Die Proteine könnten direkt den Übergang von der leichten (Aktin-Myosin-ADP• P<sub>i</sub>) zur festen (Aktin-Myosin-ADP) Bindung der Myosinköpfchen an das Aktinfilament verhindern (EL-Mezgueldi and Marston, 1996). Myosin selbst besitzt Bindestellen für Calponin (Szymanski et al., 1997). Die Calponinbinderegion befindet sich in den Bereichen des Subfragments 2 (S2) und der LMM (Leicht Mero Myosin) des Myosin (Szymanski et al., 1997).

Mit seinen Aminosäuren 146-182 bildet das Calponin h1-Protein die Bindedomäne für Myosin (Szymanski et al., 1997).

Man geht davon aus, dass Calponin simultan mit Aktin und Myosin interagieren kann (Haeberle et al., 1994). Die Inhibition durch Calponin veränderte sich in Abhängigkeit der Ionenkonzentration. Mit zunehmender Ionenkonzentration, verringerte sich der inhibierende Effekt von Calponin (EL-Mezgueldi et al., 1996). Zudem vermögen Calponin 1 und 3 durch die lineare Bindung entlang des Aktinfilaments dieses zu stabilisieren und dessen Depolymerisation zu verhindern. Es zeigte sich,

dass Zellen, die Calponin überexprimierten, mehr stabile Aktinfilamente besaßen (Ferhat et al., 2001). Calponin ist in bezug auf seine Regulation der Aktin-Myosin-Interaktionen in der Lage, auf das Aktin-Zytoskelett der Zelle einzuwirken. Es ist somit involviert in Koordinationsveränderungen der Zellgestalt. Zusammen mit dem intrazellulären molekularen Transport sind diese Veränderungen ein notwendiger Schritt zum Beispiel bei der Cytokinese und der Zellbewegung (Han et al., 1993).

In *in vitro* Studien zeigte es sich, dass die Aktinbindefähigkeiten des Calponins wahrscheinlich hauptsächlich durch zwei Mechanismen beeinflusst werden. Dabei handelt es sich zunächst um die Interaktionen des Proteins mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteinen, wie Calmodulin (Gimona et al., 1996) oder S100b (Fuji et al., 1994). Daneben wird das Protein durch reversible Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste in seinen regulatorischen Domänen durch Protein-Kinase C oder die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Protein-Kinase II kontrolliert (Nakamura et al., 1993; Winder et al., 1993; Tang et al., 1996). Wurden die entsprechenden Aminosäuren des Calponins phosphoryliert, löste sich das Protein von dem filamentösen Aktin und verlor damit seine inhibitorische Aktivität (Winder et al., 1990).

## **1.5. Ziel der Arbeit und Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion der drei Proteine der Calponin-Familie während der Entwicklung von *Xenopus laevis* überprüft werden. Wichtige embryonale Entwicklungsstadien wie die Gastrulation oder Neurulation, basieren auf regulierter und polarisierter Zellgestaltung und Zellbewegung. Die während dieser Prozesse ablaufenden polarisierten Interkalationsbewegungen werden über die Signale der verschiedenen Wnt-Signalkaskaden reguliert. Letztlich das Aktin-Zytoskelett modulierende Effektoren dieser Signalwege sind nur zum Teil bekannt. Bisher vor allem in Zellkulturexperimenten ermittelte

Eigenschaften der Calponine und deren Expressionsmuster machten diese Proteine zu interessanten Kandidaten der Regulation der Zytoskelettmotorik und der damit verbundenen Dynamik von Zellen. Bisher wurden Studien über die Funktion von Calponin 1 in Mäusen (Yamamura et al., 2007; Matthew et al., 2000; Takahashi et al., 2000), von Calponin 2 in Bezug auf die vasculäre Entwicklung im Zebrafisch (Tang et al., 2006) und XclpH3 als Zielgen des Transkriptionsfaktors Otx2 während der frühen Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis* (Morgan et al., 1999) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente und die Expressionsmuster der Gene erlaubten erste Hinweise auf die Interaktionen von Calponin-Proteinen mit dem Aktin-Zytoskelett in der Entwicklung von Wirbeltieren. Anhand des Modellorganismus *Xenopus laevis* sollte die Beteiligung von Calponin 1, 2 und 3 an Bewegungsprozessen und morphologischen Veränderungen der Zellen, vor allem während der konvergenten Extensionsbewegungen der Gastrulation, Neurulation und Organentwicklung untersucht werden. Zu klären galt es, ob es sich bei den Calponin-Proteinen um Effektoren der Signalwege handelte, welche die wesentlichen Entwicklungsstadien kontrollieren. Hierzu wurden neben *Calponin 2* auch *Calponin 1* und *3* in *Xenopus laevis* kloniert. Mit Hilfe der *in situ* Detektion sind Nachweise der Expressionsmuster der drei Gene möglich. Nach der Identifizierung der *Calponin*-transkribierenden Gewebe sollten zusätzlich zu diesen deskriptiven Analysen funktionelle Experimente zur Aufklärung der Funktion von Calponin 1, 2 und 3 beitragen. Durch die Überexpression der drei *Calponine* wurden Veränderungen bei der Zellwanderung und damit der konvergenten Extension, der Zelladhäsion, der morphologischen Dynamik der Zellen und der Zellproliferation erwartet. Während der entscheidenden Entwicklungsstadien hätten diese Manipulationen auf Ebene der Zytoskelettregulation zu einer Veränderung des Phänotyps von *Xenopus laevis* führen sollen.

Ziel der Arbeit war somit, die bislang in erster Linie aus Zellkultur-Experimenten erhaltenen funktionellen Daten in einem *in vivo* Modell zu validieren.