

### 2.3.5. Mutagenese der Calponin-Proteine

Das Fehlen eines Calponineffekts im Überexpressionsexperiment kann auch durch eine inaktive Konformation der Proteine erklärt werden. Es gibt eine Reihe von intrazellulären Regulationsmechanismen, die den Aktivitäts- bzw. Konformationzustand von Proteinen kontrollieren. Solche Regulationen können beispielsweise Methylierung, Acetylierung oder Glycosylierung sein. Der für Proteine am weitesten verbreitete und wichtigste Mechanismus stellt jedoch die Phosphorylierung dar. Bei diesem Prozess handelt es sich um eine reversible kovalente durch Kinasen vermittelte Bindung einer negativen Phosphatgruppe von einem ATP-Molekül an Hydroxylgruppen von Proteinen. Neben ihrem Einfluss auf die Proteinkonformation kann die Phosphorylierung innerhalb spezieller Domänen auch positiven oder negativen Einfluss auf die Proteinkomplexbildung haben. Auf diesem Weg werden zum Beispiel G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert. Auch die Aktivität von einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wird durch Phosphorylierung beeinflusst. Im Signalweg der TGF $\beta$  ähnlichen Wachstumsfaktoren Bone Morphogenetic Protein (BMP), Activin und Nodal stellen die membranständigen Rezeptoren Kinasen dar, die nach Ligandenbindung Transkriptionsfaktoren aus der Smad-Familie phosphorylieren. Die phosphorylierten Smad-Proteine (Smad 1, 2, 3 oder 5) binden an Smad 4 und bilden einen Transkriptionsfaktorkomplex, der in den Nukleus gelangt und die Transkription der Zielgene kontrolliert.

Auf den ersten Blick scheint ein Phosphorylierungsmechanismus, der das überexprimierte Calponin-Protein deaktiviert, unwahrscheinlich. Jegliche zelluläre Regulation sollte angesichts der in solchen Experimenten erzielten Proteinmengen nicht wirksam sein. Dennoch gibt es in der Literatur Hinweise, dass solche Regulationsmechanismen hoch effizient

sind. Als Beispiel dafür kann eine Studie von Pera et al. (2003) dienen, die eine inhibitorische Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Smad 1 untersuchte.

Smad 1 ist ein Mediator für die Liganden/Rezeptor Bindung des sekretierten Wachstumsfaktors BMP 4. BMP 4 spielt eine entscheidende Rolle bei der dorso-ventralen Musterbildung im Wirbeltierembryo. Überexpression von BMP 4 in *Xenopus laevis* Embryonen führt zu einem ventralisierten Phänotyp, d.h. zum völligen Verlust von dorsalem Gewebe wie dem ZNS, der Chorda dorsalis oder den Somiten.

Überraschenderweise erzielte man diesen Phänotyp nicht bei der Überexpression des BMP 4-Effektors Smad 1. Vielmehr führte das Experiment nur zu milden Veränderungen in der Embryonalentwicklung. Es zeigte sich, dass Smad 1 spezifische Aminosäuren besitzt, die durch die Aktivierung des Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)-Signalwegs über die Mitogen aktivierte Protein-Kinase (MAPK) phosphoryliert werden. Als Konsequenz dieses Vorgangs verbleibt das Protein im Zytoplasma und verliert somit seine transkriptionelle Aktivität. Die biologische Bedeutung konnte durch die *in vitro* Mutagenese der MAPK Phosphorylierungsstellen gezeigt werden. Die Überexpression von diesem mutierten Smad 1-Protein resultierte schließlich wie bei BMP 4 in einem stark ventralisierten Phänotyp mit fehlenden Kopfstrukturen und fehlendem ZNS.

Diese Befunde zeigen, dass Proteine, die *in vivo* von Kinasen phosphoryliert und deaktiviert werden, auch in einem Überexpressionsexperiment dem gleichen Regulationsmechanismus unterliegen können. Dies führt gegebenenfalls zu einem fast völligen Funktionsverlust der Proteine im Experiment.

Die Aktivität von Calponin beruht auf dessen Fähigkeit an das F-Aktin zu binden. In der Literatur existieren zahlreiche Publikationen, die zeigen, dass diese Aktinbindefähigkeit hauptsächlich durch Phosphorylierung reguliert wird. Eine Phosphorylierung in der Aktinbindedomäne des menschlichen Calponin h1 und h3 führte zum Verlust der Bindung und

somit zum Verlust der Proteinfunktion. In den glatten Muskelzellen reguliert die Protein-Kinase C und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase II (CamK II) die Calponin Funktion (Winder et al., 1990; Naka et al., 1990). Aber auch andere Signalwege wurden beschrieben. Ebenso konnte während der embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* stadienabhängige Phosphorylierung nachgewiesen werden. Morgan et al. (1999) untersuchten die posttranslationale Modifikation des XclpH3 durch Phosphorylierung mit Hilfe der Western Blot Analyse. Es wurde beobachtet, dass das XclpH3-Protein zum Zeitpunkt der Blastula und der Gastrula *in vivo* phosphoryliert vorliegt. Zum Ende der Gastrulation (St.12,5) und zu Beginn der Neurulation liegt das Protein jedoch zunehmend unphosphoryliert vor.

#### **2.3.5.1. Mutation von Phosphorylierungsstellen von Xclp3**

Basierend auf den Erkenntnissen der Literatur könnte das Ausbleiben einer phänotypischen Veränderung nach der Überexpression von Calponin mit einer Inaktivierung des Proteins durch Phosphorylierung in den Aktinbindedomänen oder durch autoregulatorische Inhibition der Aktinbindedomänen erklärt werden. Um die Funktion der Calponine im sich entwickelnden Embryo zu ermitteln, sollte ein konstitutiv aktives Protein erzeugt werden. Bei der Phosphorylierung handelt es sich um einen effizienten Regulationsmechanismus, der die Interaktionen von Calponin mit dem Aktinfilament inhibieren kann. Die Mutagenese des Calponin-Proteins, das nicht mehr inaktiviert werden kann, würde zu einem konstitutiv aktiven Protein führen und damit zu einem Mittel um diese embryologischen Prozesse experimentell aufzudecken. Die Identifikation der dafür verantwortlichen Kinase/n, könnte auch Hinweise auf den dafür notwendigen embryonal aktiven Signaltransduktionsweg geben. Da eine Mutagenese der drei Calponin-Proteine aufgrund des Arbeitsaufwandes nicht durchführbar war und alle drei Calponine im Funktionsgewinnexperiment inaktiv waren, wurde das Xclp3 exemplarisch

ausgewählt. Das Calponin 3 verbindet ein interessantes Expressionsmuster während der Gastrulation mit zwei dem Calponin 1 vergleichbaren Aktinbindestellen, über die es in der Literatur eine Reihe funktioneller Daten gibt.

In den Xclp3 Aktinbindedomänen sind zahlreiche hoch konservierte potentiell durch Phosphorylierung modifizierbare Aminosäuren enthalten. Dabei handelt es sich hauptsächlich um die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin.

Ein Ansatz, all diese Aminosäuren durch Punktmutation zu verändern, ist weder experimentell praktikabel, da möglicherweise ein durch Strukturveränderung inaktives Protein entsteht, noch repräsentativ, da keine spezifische Aussage über die Kinasen und deren Signalwege zu treffen ist.

Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren erfolgte durch einen evolutiven Ansatz. Dieser beruhte darauf, dass sich die grundsätzlichen Funktionen eines Proteins innerhalb der Vertebraten gleichen. Die Stärke der Inaktivierung von Calponin im Experiment lässt auf einen wichtigen Prozess schließen, der innerhalb der Wirbeltiere konserviert sein sollte. Trifft dies zu, dann betrifft diese Konservierung sowohl den Signalweg, die Kinasen als auch die zu phosphorylierenden Aminosäuren. Dabei ist entscheidend, dass die Phosphorylierung ein spezifischer Vorgang ist, d.h. eine Aminosäure wird nur dann durch eine Kinase phosphoryliert, wenn mit Hilfe der flankierenden Sequenzen die Kinase diese als Zielaminosäure erkennt.

#### **2.3.5.1.1. Identifikation von konservierten Phosphorylierungsstellen des Xclp3**

Die Calponin 3 Aminosäuresequenzen von Frosch, Maus, Ratte, Mensch und Zebraquappe wurden mit dem online Suchprogramm „Motivscan“ ([scansite.mit.edu/cgi-bin/motifscan\\_seq](http://scansite.mit.edu/cgi-bin/motifscan_seq)) nach spezifischen, von Kinasen erkannten Zielsequenzen analysiert. Mit Hilfe des Programms konnten innerhalb der Aktinbindedomänen des Proteins 5

konservierte Phosphorylierungsstellen (Serin 162, Threonin 203, Serin 205, Tyrosin 229 und Serin 244) identifiziert werden, die Zielsequenzen von drei bekannten Kinasetypen darstellen.

Die entsprechenden Kinasen waren die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Protein-Kinase II (CamK II, Serin 162 und Threonin 203 phosphorylierend), die Casein Kinase 1 (CK1, Serin 205 und Serin 244 phosphorylierend) und die Src Kinase (Tyrosin 229 phosphorylierend).

### $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Protein-Kinase II

Mit Hilfe der computergestützten Sequenzanalyse fanden sich zwei konservierte potentielle CamK II Zielsequenzen in den Xclp3 Aktinbindedomänen.

<b>A) Potentiell phosphorylierbare Aminosäure</b>	<b>Erkennungssequenzen der <math>\text{Ca}^{2+}</math>/Calmodulin abhängigen Kinase II</b>
<i>Xenopus laevis</i> ; <b>S162</b>	EKMKAGQ <b>S</b> VIGLQMG
<i>Mus musculus</i>	GKLKAGQ <b>S</b> VIGLQMG
<i>Homo sapiens</i>	GKLKAGQ <b>S</b> VIGLQMG

<b>B) Potentiell phosphorylierbare Aminosäure</b>	<b>Erkennungssequenzen der <math>\text{Ca}^{2+}</math>/Calmodulin abhängigen Kinase II</b>
<i>Xenopus laevis</i> ; <b>T203</b>	DKPFDQ <b>T</b> ISLQMGT
<i>Danio rerio</i>	EKPYDQ <b>T</b> ISLQMGT
<i>Mus musculus</i>	DKPFDQ <b>T</b> ISLQMGT
<i>Homo sapiens</i>	DKPFDQ <b>T</b> ISLQMGT

**Tab.7 Homologe  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase II -Zielsequenz in Calponin 3 von Frosch, Fisch, Maus und Mensch.**

Die Aminosäuren Serin 162, bzw. Threonin 203 (rot), deren Seitenketten, durch Phosphorylierung modifiziert werden können, befinden sich in der ersten, bzw. in der Zwischensequenz der zweiten Aktinbindedomäne von Calponin 3. Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase II -Zielsequenzen sind zwischen den analysierten Vertebraten weitgehend konserviert. *Mus musculus* (Acc.NP\_082320,Vers.GI:21312564); *Homo sapiens* (Acc.CAG46646,Vers.GI:49456651); *Danio rerio* (Acc.AAH53309,Vers.GI:31419012); *Xenopus laevis* (Xclp3). Benutzt wurde das Programm ([scansite.mit.edu/cgi-bin/motifscan\\_seq](http://scansite.mit.edu/cgi-bin/motifscan_seq)).

Die CamK II gehört zu den Serin/Threonin Kinasen. In glatten Muskelzellen wird über den sekundären Botenstoff Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Calmodulin die CamK II Aktivität gesteuert. Zu den CamK II gehört unter

anderem die Myosin Light Chain Kinase (MLCK). Die Glattnuskel MLCK induziert die Kontraktion durch den Anstieg der Aktin-aktivierten Myosin-ATPase Aktivität. In Nichtmuskelzellen sind die MLCK Schlüsselfaktoren in zahlreichen, auf Aktin-Myosin-Interaktionen basierenden Prozessen, wie etwa des intrazellulären Transports von Organellen oder der Zellmotilität. Eine direkte Regulation von Calponin h1 durch die CamK II ist in der Literatur beschrieben (Winder und Walsh, 1990). Im aktiven Zustand phosphoryliert die CamK II Calponin h1 in der ersten Aktinbindedomäne, was zum Funktionsverlust und somit zur Kontraktion der Muskelfilamente führt. Das Vorhandensein von CamK II Zielsequenzen in Calponin 3 könnte somit auf einen ähnlichen Regulationsmechanismus hindeuten.

### Casein Kinase 1

Eine Phosphorylierung der Aminosäuren Serin 205 bzw. 244 in den aktinbindenden Clik Modulen 1 bzw. 3 von Xclp3 könnte durch die Casein Kinase 1 katalysiert werden, da deren Zielsequenz innerhalb der untersuchten Spezies hoch konserviert ist.

<b>C) Potentiell phosphorylierbare Aminosäure</b>	<b>Erkennungssequenzen der Casein Kinase 1</b>
<i>Xenopus laevis</i> ; <b>S205</b>	PFDQTTISLQMGTNK
<i>Danio rerio</i>	PYDQTTISLQMGTNK
<i>Mus musculus</i>	PFDQTTISLQMGTNK
<i>Homo sapiens</i>	PFDQTTISLQMGTNK

<b>D) Potentiell phosphorylierbare Aminosäure</b>	<b>Erkennungssequenz der Casein Kinase 1</b>
<i>Xenopus laevis</i> ; <b>S244</b>	PADNSTISLQMGTNK
<i>Danio rerio</i>	PMDNSTISLQMGTNK
<i>Mus musculus</i>	PVDNSTISLQMGTNK
<i>Homo sapiens</i>	PVDNSTISLQMGTNK

**Tab.8 Homologe Casein Kinase 1 Zielsequenz in Calponin 3 von Frosch, Fisch, Maus und Mensch.**

Die Aminosäure Serin 205 und 244 (rot), deren Seitenketten, durch Phosphorylierung modifiziert werden können, befinden sich in der zweiten Aktinbindedomäne von Calponin 3. Die Casein Kinase 1 Zielsequenzen sind zwischen den Vertebraten weitgehend

konserviert; *Mus musculus* (Acc.NP\_082320, Vers.GI:21312564); *Homo sapiens* (Acc.CAG46646, Vers.GI:49456651); *Danio rerio* (Acc.AAH53309, Vers.GI:31419012); *Xenopus laevis* (*Xclp3*). Benutzt wurde das Programm (scansite.mit.edu/cgi-bin/motifscan\_seq).

Die 7 Familienmitglieder der Serin/Threonin phosphorylierenden Casein Kinasen sind interessante Kandidaten, da sie nachweislich an embryonal aktiven Vorgängen beteiligt sind. So können sie mit Membranproteinen, wie den Cadherinen über Phosphorylierung interagieren. Die Cadherine gelten als sehr wichtige Membranproteine, die zum Beispiel an der Bildung von Tightjunctions beteiligt sind. Die auf Cadherin basierenden Zell-Zellverbindungen werden je nach Bedarf auf oder abgebaut (Dupre-Crochet et al., 2007). Cadherine agieren über Interaktionspartner wie Catenin, Vinculin und Aktinin mit dem Aktin-Zytoskelett. Die Casein Kinase 1 phosphoryliert die zytoplasmatische Domäne des Membranproteins E-Cadherin (vor allem in Epithelien) *in vitro* und in Zellkultursystemen (Dupre-Crochet et al., 2007). Die Proteinmodifikation bewirkt, dass das für Zell-Zellinteraktion verantwortliche E-Cadherin seine interzellulären Kontakte abschwächt. Eine geringere Zell-Zell Adhäsion erhöht die Mobilität der Zelle und ist zum Beispiel eine wichtige Voraussetzung für den epithelial-mesenchymalen Übergang. Casein Kinasen fungieren somit als negative Regulatoren von Zell-Zellinteraktionen (Dupre-Crochet et al., 2007).

Embryologisch noch bedeutsamer ist die Verbindung der Casein Kinase 1 $\epsilon$  mit dem Wnt-Signalweg. So wurde eine Regulation des sogenannten Kanonischen-Signalwegs nachgewiesen, indem Casein Kinasen den Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin phosphorylierten (Sakanaka et al., 2002).

### **Src Kinase**

Die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin 229 könnte durch die Src Kinase (Familie von zytoplasmatischen Tyrosin Kinasen) katalysiert werden. Zwischen den untersuchten Spezies war die Erkennungssequenz der Src Kinase in Calponin 3 hoch konserviert.

E) Aminosäure, die durch Phosphorylierung modifiziert werden kann	Erkennungssequenz der Src Kinase
<i>Xenopus laevis</i> ; Y229	PGTRRDIYDQKAVSQ
<i>Danio rerio</i>	PGTRRDIYDQKAALQ
<i>Mus musculus</i>	PGTRRDIYDQKLTQL
<i>Homo sapiens</i>	PGTRRDIYDQKLTQL

**Tab.9 Erkennungssequenzen der Src Kinase in den Aminosäuresequenzen der sauren Calponin-Proteine verschiedener Vertebraten.**

Die Aminosäuren, deren Seitenketten durch Phosphorylierung modifiziert werden können sind rot gekennzeichnet. *Danio rerio* (Acc.AAH53309, Vers.GI:31419012); *Mus musculus* (Acc.NP\_082320, Vers.GI:21312564); *Homo sapiens* (Acc.CAG46646, Vers.GI:49456651); *Xenopus laevis* (*Xclp3*). Benutzt wurde das Programm: (scansite.mit.edu/cgi-bin/motifscan\_seq).

Das virale Oncoprotein V-Src ist eine konstitutiv aktive Tyrosin Kinase des Rous Sarcoma Virus (RSV), deren Aktivität im infizierten Hühnchen für die Entstehung von Sarcoma verantwortlich war (Bishop and Varmus, 1989). Die Src Kinasen spielen in vielzelligen Organismen bei der Signalübertragung als spezifische Mehrsignalsammler eine wichtige Rolle. Das heisst, die Aktivierung dieser Kinase bedarf der Eingabe mehrerer abgeschlossener vorgeschaltet gelegener Einzelvorgänge. Die Src Kinase ist vor allem in die Zelldifferenzierung und Proliferation involviert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Prozesse, die in der frühen embryonalen Entwicklung von größter Bedeutung sind. Im frühen *Xenopus laevis* Embryo sind beispielsweise die Mitglieder der TGF $\beta$  und der FGF Liganden entscheidend für die Mesoderminduktion. Die *Xenopus laevis* Src Kinase Fyn und das einzige Src Homolog Lallo scheinen die wesentlichen Komponenten zu sein, die das FGF Signal an der Zelloberfläche mit den Reaktionsabläufen im Kern verbinden, was letztlich zur Induktion des Mesoderms führt. So konnten beide Faktoren in Funktionsgewinnexperimenten in ektodermalen Explantaten Mesoderm induzieren (Hama et al., 2002; Weinstein et al., 1998). Da bei diesem Prozess ein epithelial-mesenchymaler Übergang der Zellen eingeleitet wird, der mit einer Umlagerung des Zytoskeletts einhergeht, würde ein Einfluss des Src-Signalwegs auf die Calponin-Aktivität Sinn machen.



Die in der Literatur beschriebenen Funktionen der durch den evolutiven Ansatz ermittelten potentiellen Kinasen von *Xclp3* sind entweder bekannte negative Regulatoren des Calponin h1-Proteins (CamK II) oder in wesentliche embryologische Entwicklungsprozesse involviert (Casein- bzw. Src Kinase) und könnten somit für die beobachtete Inaktivierung des überexprimierten Calponins verantwortlich sein.

#### **2.3.5.1.2. Ortsspezifische Mutagenese**

Um eine mögliche negative Regulation zu unterbinden wurden mutierte *Xclp3*- Proteine hergestellt, in welchen Kinase-Zielaminosäuren durch nicht phosphorylierbare Aminosäuren ersetzt wurden. Da die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren Einfluss auf die dreidimensionale Struktur des Proteins und somit auf dessen Funktion nehmen, wurde wenn möglich, eine Aminosäure mit gleicher Polarität in die mutierte *Xclp3* Sequenz integriert. In allen anderen Fällen wurde die Zielaminosäure in die unpolare, damit nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin umgewandelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei der fünf möglichen Phosphorylierungstellen in Calponin 3 mutiert werden. Die ortsspezifische Mutationen der Zielaminosäuren wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion in die *Xclp3* cDNA Sequenz eingebracht und anschließend in den CS2+ Expressionsvektor kloniert. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Dabei entstanden drei veränderte *Xclp3* Konstrukte.

```

Xclp3      MANFNKGPAYGLSAEVKNKIAQKYDPQVEEDLRLWIEEVTGMIIGENFQQGLRDGVILCN
Xclp3mut  MANFNKGPAYGLSAEVKNKIAQKYDPQVEEDLRLWIEEVTGMIIGENFQQGLRDGVILCN
Cons      *****

Xclp3      LINKLQPGSIRKINEAKLNWHKLENIGNFIKSMQEYGMKPHDIFEANDLFENGNMTQVQT
Xclp3mut  LINKLQPGSIRKINEAKLNWHKLENIGNFIKSMQEYGMKPHDIFEANDLFENGNMTQVQT
Cons      *****

Xclp3      SLVSLAGLAKTKGFHTSVDIGVKYAEKQRRQFGDEKMKAGQSVIGLQMGTNKCASQAGMT
Xclp3mut  SLVSLAGLAKTKGFHTSVDIGVKYAEKQRRQFGDEKMKAGQCVIGLQMGTNKCASQAGMT
Cons      *****
                                   ( agt ) S162C ( tgt )
                                   CamKmutXclp3(S162C)

Xclp3      AYGTRRHLYDPKMRTDKPFDQTTISLQMGTNKGASQAGMPAPGTRRDIYDQKAVSQPADN
Xclp3mut  AYGTRRHLYDPKMRTDKPFDQTTISLQMGTNKGASQAGMPAPGTRRDIYDQKAVSQPADN
Cons      *****
                                   ( tac ) Y229A ( gca ) ;
                                   SrcmutXclp3 ( Y229A)

Xclp3      STISLQMGTNKVASQKGM SVYGLGRQVYDPKYCAAPTEPIIHNGSQGTNGSEISDSY
Xclp3mut  STIALQMGTNKVASQKGM SVYGLGRQVYDPKYCAAPTEPIIHNGSQGTNGSEISDSY
Cons      *****
                                   ( tca ) S244A ( gca )
                                   CK1mutXclp3 ( S244A)

Xclp3      QAEYPDEYQGEYPDDYPRDYHGQYSDQGIDYLEI
Xclp3mut  QAEYPDEYQGEYPDDYPRDYHGQYSDQGIDYLEI
Cons      *****

```

**Abb.15 Ortsspezifische Mutagenese der drei konservierten Phosphorylierungszielsequenzen von Xclp3. Vergleich von Wildtyp- und veränderter Xclp3 Aminosäuresequenz**

Insgesamt wurden drei Konstrukte kloniert. Die Bezeichnungen dieser Mutationskonstrukte wurden unterhalb der Aminosäuresequenzen aufgeführt CamKmutXclp3(S162C); SrcmutXclp3(Y229A); CK1mutXclp3(S244A). Die dabei veränderten Aminosäuren wurden rot gekennzeichnet und die codierenden Basentriplets wurden im Vergleich in Klammer dargestellt. Die Aminosäuren der jeweiligen Kinasezielsequenz wurden farbig gekennzeichnet. Die verschiedenen Aminosäuren mit chemisch ähnlichen Eigenschaften wurden mit einem Punkt. Die Calponin Homologie Domäne wurde grau, die erste Aktinbindedomäne (ABD 1) hellblau und das Calponin ähnliche Wiederholungs Modul (ABD 2) gelb unterlegt.

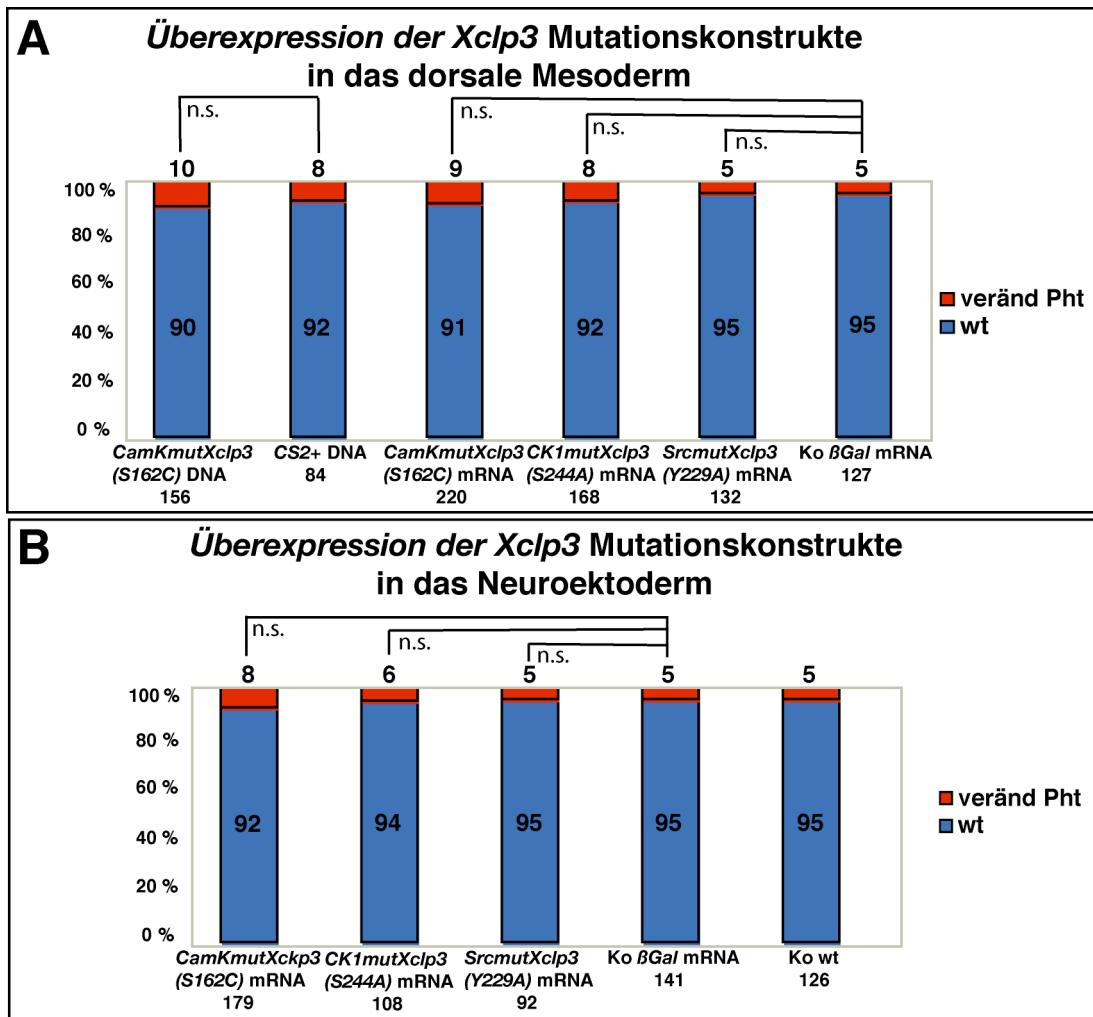
Im Konstrukt „CamKmutXclp3(S162C)“ wurde die Mutation der CamK II Zielaminosäure in der ersten Aktinbindedomäne durchgeführt. Obwohl das Serin 162 in der Zebrabärbling Calponin 3 Sequenz nicht vorhanden war, wurde diese Aminosäure dennoch für die Mutagenese ausgewählt. Da der Zebrabärbling häufig multiple Allele eines Gens aufweist und zum Zeitpunkt der Arbeit das Zebrafisch Genom noch nicht sequenziert war, konnte ein unbekanntes Calponin 3 Allel mit einem Serin 162 nicht ausgeschlossen werden. Weitere Gründe für die Auswahl des Serins 162 für die Mutagenese waren das Fehlen weiterer, innerhalb der Wirbeltiere konservierter Kinasezielsequenzen der ersten Aktinbindedomäne, sowie

deren Ähnlichkeit mit Calponin h1, in dem CamK II Phosphorylierung beschrieben wurde. Die im Konstrukt anstelle des Serins eingesetzte Aminosäure Cystein, ist wie das Serin eine kleine polare Aminosäure mit neutralem Charakter und würde daher keinerlei Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins nehmen.

Die Src Zielsequenz um das Tyrosin 229 befindet sich in dem zweiten Clik Modul des Xclp3-Proteins. Die potentielle Src Zielaminosäure Tyrosin 229 wurde im Konstrukt „SrcmutXclp3(Y229A)“ durch Alanin ersetzt. Die Aminosäure Serin an Position 244 des Xclp3-Proteins befindet sich in dem dritten Clik Wiederholungs-Modul der zweiten Aktinbindedomäne (ABD 2) und könnte durch eine Casein Kinase phosphoryliert werden. Im Konstrukt „CK1mutXclp3(S244A)“ wurde das Serin durch Alanin ersetzt. Mit den zur Verfügung stehenden Mutationskonstrukten konnten drei der fünf potentiellen Phosphorylierungsstellen innerhalb der ersten und zweiten Aktinbindedomäne des Xclp3 ausgeschaltet werden. Falls eine der Zielaminosäuren der drei Kinasen für die Inaktivierung des Xclp3-Proteins im Funktionsgewinnexperiment verantwortlich wäre, sollte das entsprechende mutierte Protein nun konstitutiv aktiv sein. Daher wurden nach deren Klonierung erneut Überexpressionsexperimente durchgeführt.

#### **2.3.5.1.3. Funktionelle Analyse der Xclp3 Mutationskonstrukte**

Für die Überexpression der mutierten Xclp3-Proteine wurden neben der DNA der Expressionskonstrukte hauptsächlich synthetisch hergestellte mRNAs in die dorsale Randzone bzw. in den dorso-animalen Bereich von vierzelligen Embryonen injiziert (Abb.10, gelbmarkierter Bereich). Als Kontrolle dienten unbehandelte Embryonen oder Injektionen mit dem *CS2+* Leervektor bzw. synthetische  $\beta$ Galaktosidase mRNA. Die Analyse der resultierenden phänotypischen Veränderung erfolgte im Kaulquappenstadium.



**Abb.16 Die Fehlexpression von drei *Xclp3* Phosphorylierungsmutanten in das zukünftige Mesoderm bzw. Neuroektoderm hatte keine Entwicklungsveränderungen zur Folge.**

Die DNA bzw. die mRNA der mutierten *Xclp3* *CS2+* wurden in die dorsale Randzone (A) und in den dorso-animalen Bereich (B) von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen injiziert. Die Embryonen wurden während ihrer Entwicklung beobachtet und nach ihrer Fixierung im Kaulquappenstadium (St.45) auf ihren veränderten Phänotyp hin untersucht. Als Kontrolle dienten Wildtypembryonen, bzw. Injektionen mit der DNA des *CS2+* Leervektors (A) oder mit  $\beta$ Gal mRNA (A, B). Der Anteil der phänotypischen Veränderungen nach der Injektion der DNA des *CS2+* Expressionskonstruktes von *CamKmutXclp3(S162C)* war im Vergleich mit den Kontrollembryonen statistisch nicht signifikant (A, 8 Exp., n.s.).

Die Anzahl der veränderten Phänotypen als Folge der Injektion der mRNA der *CS2+* Expressionskonstrukte von *CamKmutXclp3(S162C)* (11 Exp.), *CK1mutXclp3(S244A)* (8 Exp.) oder von *SrcmutXclp3(Y229A)* (8 Exp.) in das dorsale Mesoderm war statistisch nicht signifikant (A, n.s.).

Die Injektionen der mRNA von *CamKmutXclp3(S162C)* (11 Exp.) oder *CK1mutXclp3(S244A)* (11 Exp.) bzw. von *SrcmutXclp3(Y229A)* (6 Exp.) in das zukünftige Neuroektoderm führte zu keiner signifikanten Anzahl an phänotypischen Veränderungen (B, n.s.).

Rot: Anteil an resultierenden phänotypischen Veränderungen (veränd Pht), Blau: Anteil an Wildtypembryonen (wt). Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert.

Es wurden 24 Fehlexpressionsexperimente mit „CamKmutXclp3(S162C)“, 11 Experimente mit „CK1mutXclp3(S244A)“ und 8 Experimente mit „SrcmutXclp3(Y229A)“ durchgeführt. Keine der Xclp3 Phosphorylierungsmutanten konnte eine statistisch signifikante Entwicklungsstörung auslösen.

Die Phänotypen der mit *CamKmutXclp3(S162C)* DNA bzw. mRNA in die dorsale Randzone injizierten Embryonen (n = 156; 8 Exp, bzw. n = 220; 11 Exp.) unterschieden sich nicht signifikant von den *CS2+* bzw. *βGal* mRNA Kontrollen (n = 84, p = 0,91 bzw. n = 127, p = 0,26).

	n	wt	v.Pht.	p
<i>CS2+</i> DNA	84	77 (92%)	7 (8%)	
<i>CamKmutXclp3(S162C)</i> DNA	156	140 (90%)	16 (10%)	0,9118
Ko <i>βGal</i> mRNA	127	120 (95%)	7 (5%)	
<i>CamKmutXclp3(S162C)</i> mRNA	220	201 (91%)	19 (9%)	0,8048
<i>CK1mutXclp3(S244A)</i> mRNA	168	154 (92%)	14 (8%)	0,8864
<i>SrcmutXclp3(Y229A)</i> mRNA	132	126 (95%)	6 (5%)	0,2660

**Tab.10 Phänotypische Veränderungen nach Überexpression von durch ortsspezifische Mutation veränderter *Xclp3* DNA- oder mRNA in dem zukünftigen dorsalen Mesoderm von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen**

Die Darstellung der Werte erfolgte numerisch und prozentual. wt: Wildtypembryonen; v.Pht.: veränderter Phänotyp. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert.

Auch die Überexpression des *CamKmutXclp3(S162C)* Konstruktes im Neuroektoderm hervorgerufen durch Injektion von mRNA (11 Exp.) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Embryonalentwicklung im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,33).

	n	wt	v.Pht	p
<i>CamKmutXclp3(S162C)</i> mRNA	179	165 (92%)	14(8%)	0,3368
<i>CK1mutXclp3(S244A)</i> mRNA	108	101 (94%)	7 (6%)	0,4727
<i>SrcmutXclp3(Y229A)</i> mRNA	92	87 (95%)	5 (5%)	0,9381
<i>βGal</i> mRNA	141	134 (95%)	7 (5%)	
Ko wt	126	120 (95%)	6 (5%)	

**Tab.11 Veränderung des Phänotyps nach Überexpression von durch ortsspezifische Mutation veränderter konstitutiv aktiver *Xclp3* mRNA in dem dorsalen animalen Bereich vierzelliger *Xenopus laevis* Embryonen**

Die Darstellung der Werte erfolgte numerisch und prozentual. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert.  
wt: Wildtypembryonen; v.Pht.: veränderter Phänotyp.

Nicht signifikant waren auch die phänotypischen Veränderungen nach der Injektion der mRNA des Mutationskonstruktes *CK1mutXclp3(S244A)* in die dorsale Randzone (11 Experimente,  $p = 0,88$ ) bzw. in die dorso-animale Region (11 Experimente,  $p = 0,47$ ) im Vergleich zu den *βGal* mRNA exprimierenden Embryonen. Auch die Überexpression der *SrcmutXclp3(Y229A)* in Form von mRNA in das zukünftige dorsale Mesoderm (8 Exp.) oder Neuroektoderm (6 Exp.) bewirkte keine signifikante Veränderung des Phänotyps ( $p = 0,26$  bzw.  $p = 0,93$ ).

### **2.3.5.2. Calponin-Deletionsmutanten**

Nachdem der Versuch durch die Überexpression von mutierten Xclp3 die Achsenentwicklung von *Xenopus* zu beeinflussen nicht erfolgreich war, wurden andere Regulationsmechanismen des Calponin-Proteins untersucht. Ein Kandidat hierfür ist der Carboxyterminus. Die Regulation der Proteinfunktion durch dessen strukturell flexible Endregionen ist in zytoskelettalen Proteinen ein allgemein bekanntes Phänomen. Dies trifft auch für die Calponin-Proteine zu (Burgstaller et al., 2002).

#### **C-terminale Regulation der Calponin-Proteine**

Die drei Calponin-Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in der Aminosäuresequenz des carboxyterminalen Bereiches. Der C-Terminus wurde als eine autoregulatorische Einheit der Calponin-Proteine beschrieben (Danninger und Gimona, 2000). Als Folge von Interaktionen mit den negativ geladenen Aminosäuren des C-Terminus erfährt die zweite ABD oder Clik-Domäne möglicherweise einen Konformationswechsel. Sie wird unzugänglich und verliert damit ihre Funktion bei der Aktinfilamentbündelung und Stabilisierung (Leinweber et al., 2000; Kranewitter et al., 2001).

Das Entfernen der C-terminalen Domäne führt wiederum zu einer konstitutiv zugänglichen ABD 2 und steigert die Assoziation der Calponine im zentralen Bereich der Aktin-Stressfasern und deren Stabilisierung (Burgstaller et al., 2001; Lener et al., 2004).

Im besonderen Maße ist allerdings das Calponin 2 von dieser C-terminalen Regulation betroffen, da die ABD 1 in Calponin 2 selbst nicht in der Lage ist, an Aktin zu binden (Gimona et al., 2003). Entfernt man die ABD 1, verliert Calponin 1 seine Aktinbinde- nicht aber seine über die ABD 2 vermittelte Aktinfilamentstabilisierungsfunktion. Bei Calponin 2 jedoch führt die Deletion der ABD 1 zu keinem Funktionsverlust. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Aktinbindefähigkeit des Calponin 2-Proteins ausschließlich über die funktionelle ABD 2 erfolgt (Burgstaller et al., 2001).

Daher wurde versucht, durch C-terminale Deletion konstitutiv aktive Calponin-Proteine zu erzeugen. Für die Herstellung der Deletionsmutanten wurde Xclp2 als auch Xclp1 ausgewählt. Somit wurden zwei verschiedene carboxyterminale Deletionskonstrukte mit und ohne Funktion der ersten Aktinbindedomäne erzeugt. Ein Vergleich der phänotypischen Konsequenzen in Missexpressionsexperimenten könnte Rückschlüsse über die Funktionalität der jeweiligen Aktinbindedomänen während der embryonalen Entwicklung erlauben.

#### **2.3.5.2.1. Klonierung von amino- und carboxyterminalen Deletionsmutanten von Xclp2 und Xclp1**

Neben der Funktion des C-Terminus konnte in der Literatur gezeigt werden, dass auch die N-terminale Domäne negativen Einfluss auf die Funktion der Calponin-Proteine hat. Thomas Lener et al. bewiesen anhand von Fusionskonstrukten mit metastasierenden Melanom- und Mamakarzinomzellen, dass die Aktivität der Clik Module ebenfalls durch die CH Domäne des Calponin signifikant reduziert werden konnte. Dies führte zu verminderter Beweglichkeit der betroffenen Zellen in Kultur

(Lener et al., 2004). Man nimmt an, dass die Calponinaktivität *in vivo* durch die Interaktionen der Aminosäuren der C- und N-terminalen Domäne mit der ABD 2 reguliert wird.

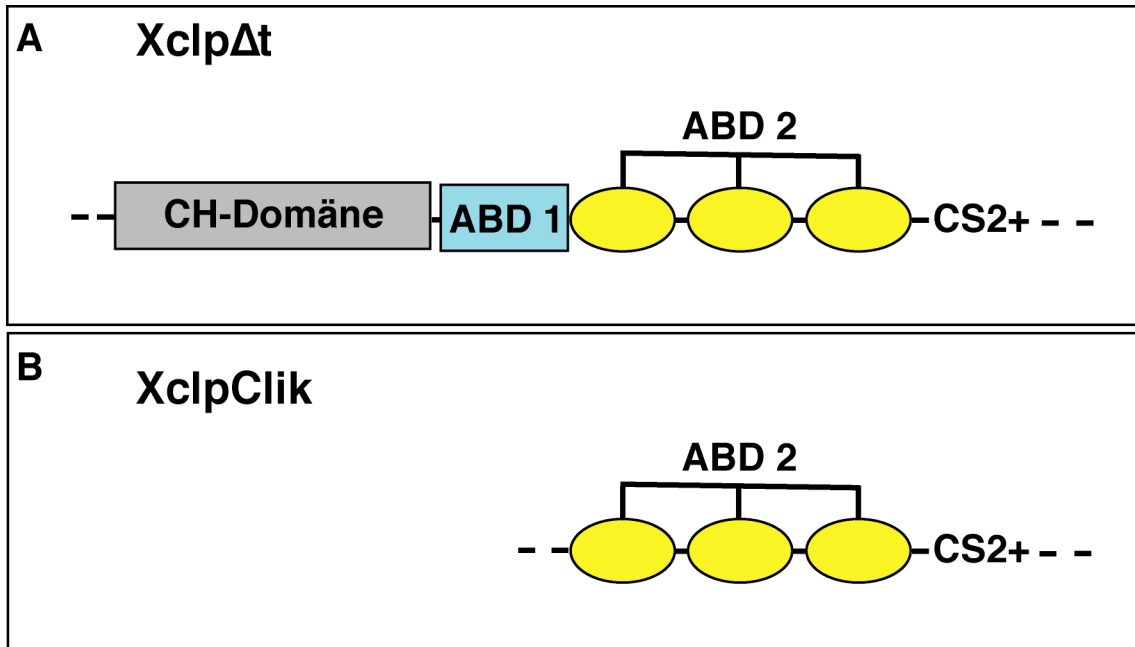
Mit einem Konstrukt, das lediglich die ABD 2 besitzt, sollten alle möglichen Regulationen durch den C-terminalen und N-terminalen Bereich der Xclp-Proteine gänzlich ausgeschlossen werden. Diese Deletionsmutante wäre in Bezug auf ihre Interaktionen mit den Aktinstressfasern konstitutiv aktiv. Wieder wurden für die Mutationskonstrukte das Xclp1 und das Xclp2 ausgewählt. Die Annahme war, dass die Clik Domänen aufgrund ihrer Ähnlichkeit bei beiden Proteinen die gleichen funktionellen Eigenschaften aufweisen.

Die C-terminalen Konstrukte und die Clik Domänen als konstitutiv aktive Proteine wurden in der dorsalen Randzone des Embryos überexprimiert. Damit müsste es möglich sein, die Migration der Zellen während der Embryonalentwicklung aufgrund der Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts zu unterbinden. So sollten zum Beispiel die intensiven Wanderbewegungen der Zellen bei der Involution, der konvergenten Extension und der Epibolie während der Gastrulation beeinflusst werden. Die Folge wären markante phänotypische Veränderungen der Embryonen wie Verschlussdefekte des Blastoporus, Neuralrohrschlussdefekte oder die Verkürzung der Körperachse.

Für die Klonierung der Deletionsmutanten wurden spezielle Oligonukleotide entworfen. Als Matrize in der PCR dienten die codierenden *Xclp* Sequenzen. In die DNA der Mutanten *Xclp1Clik* und *Xclp2Clik* wurde als Translationsstart das Startcodon für Methionin N-terminal eingeführt. Zur Durchführung von Überexpressionsexperimenten wurden die veränderten *Xclp* cDNA in den CS2+ Vektor kloniert. Um die Zellbewegungen während der Gastrulation zu beeinflussen, wurde die DNA- bzw. mRNA der Deletionskonstrukte von *Xclp2* und *Xclp1* in das zukünftige Neuroektoderm und dorsale Mesoderm von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen injiziert (Abb.10,



orangemarkierter Bereich). Die manipulierten Embryonen wurden kontinuierlich bis zum Kaulquappenstadium St.46 auf Veränderungen ihres Phänotyps untersucht.



**Abb.17 Schematische Darstellung der klonierten *Xclp*- Deletionsmutanten**

**A) Die C-terminalen Deletionsmutanten *Xclp1 $\Delta$ t(1-265)*, *Xclp2 $\Delta$ t(1-267)*** wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und in den Expressionsvektor CS2+ kloniert. Der für das regulative C-terminale Ende des Proteins codierende Sequenzabschnitt wurde entfernt. Die Mutanten bestehen aus der Calponin Homologie Domäne (CH Domäne, grau), der ersten Aktinbindedomäne (ABD 1, blau) und der zweiten Aktinbindedomäne (ABD 2, aus dem Calponin like Modul (Clik 26) bestehend, gelb).

**B) Die *Xclp1Clik*, *Xclp2Clik* ABD 2 Deletionsmutanten** bestehen nur aus dem für die zweite Aktinbindedomäne (gelb) codierenden DNA Sequenzabschnitt. Sowohl der für die CH Domäne, der für die erste Aktinbindedomäne (ABD 1) und der für das C-terminale Ende des Calponin-Proteins codierende Sequenzabschnitt wurden entfernt. Ein für das Methionin codierendes Basentriplett wurde als Translationsstart in die 5' cDNA Sequenz eingeführt.

### 2.3.5.2.2. Funktionelle Analyse der Deletionsmutanten von *Xclp2* und *Xclp1*

Die Überexpressionen der DNA der C-terminalen *Xclp2 $\Delta$ t(1-267)CS2+* Deletionsmutanten (11 Exp.,  $p = 0,38$ ) oder der ABD 2 Deletionsmutanten *Xclp2ClikCS2+* (11 Exp.,  $p = 0,34$ ) führten nicht zu einem statistisch signifikanten Effekt.

	n	wt	v.Pht	p
<i>CS2+</i> DNA	146	137 (94%)	9 (6%)	
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	330	302 (92%)	28 (8%)	0,3833
<i>Xclp2Clik</i> DNA	357	326 (91%)	31 (9%)	0,3432

Ko wt	91	84 (92%)	7 (8%)	
<i>βGal</i> mRNA	51	46 (90%)	5 (10%)	
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> mRNA	136	123 (90%)	13 (10%)	0,9596
<i>Xclp2Clik</i> mRNA	90	82 (90%)	8 (10%)	0,8568

**Tab.12 Veränderung des Phänotyps nach der Überexpression der DNA oder mRNA der C-terminalen Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)CS2+* oder der ABD 2 Deletionsmutanten *Xclp2Clik* in das zukünftige Neuroektoderm von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen.** Die Daten wurden numerisch und prozentual dargestellt. Wt: Wildtypembryonen; v.Pht.: veränderter Phänotyp. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert.

Auch nach der Überexpression der mRNA der Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)CS2+* (6 Exp.,  $p = 0,95$ ) oder der mRNA von *Xclp2ClikCS2+* (6 Exp.,  $p = 0,85$ ) waren die Abweichungen von der embryonalen Entwicklung im Vergleich mit den Kontrollembryonen, die mit *βGal* mRNA injiziert wurden, statistisch nicht signifikant. Die resultierenden phänotypischen Veränderungen als Folge der Missexpression der Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)CS2+* bzw. *Xclp2ClikCS2+* in das zukünftige dorsale Mesoderm war statistisch nicht signifikant (10 Exp.,  $p = 0,50$  bzw.  $p = 0,65$ ).

	n	wt	v.Pht	p
Ko wt	98	90 (92%)	8 (8%)	
<i>CS2+</i> DNA	99	89 (90%)	10 (10%)	
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	205	179 (87%)	26 (13%)	0,5061
<i>Xclp2Clik</i> DNA	153	135 (88%)	18 (12%)	0,6513

**Tab.13 Veränderung des Phänotyps als Folge der Überexpression der DNA der C-terminalen Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)CS2+* oder der ABD 2 Deletionsmutanten *Xclp2ClikCS2+* im Bereich des zukünftigen dorsalen Mesoderms von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen** Die Darstellung der Werte erfolgte numerisch und prozentual. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert. Wt: Wildtypembryonen; v.Pht.: veränderter Phänotyp.

	n	wt	v.Pht	p
Ko wt	62	60 (97%)	2 (3%)	
CS2+ DNA	80	74 (93%)	6 (7%)	
<i>Xclp1Δt(1-265)</i> DNA	81	75 (93%)	6 (7%)	0,1208.
<i>Xclp1Clik</i> DNA	78	71 (91%)	7 (9%)	0,3164

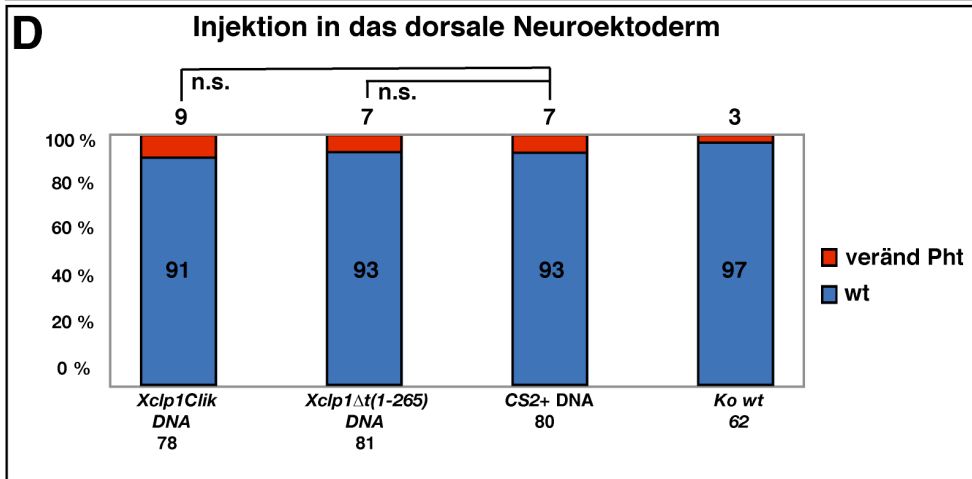
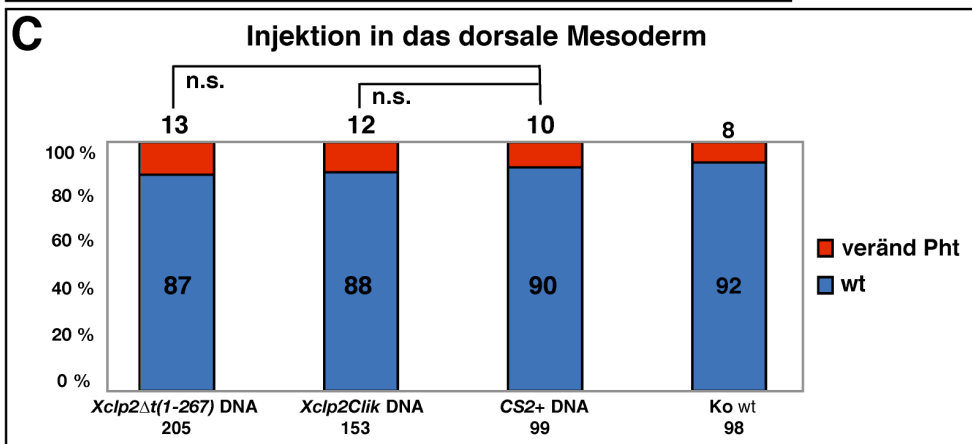
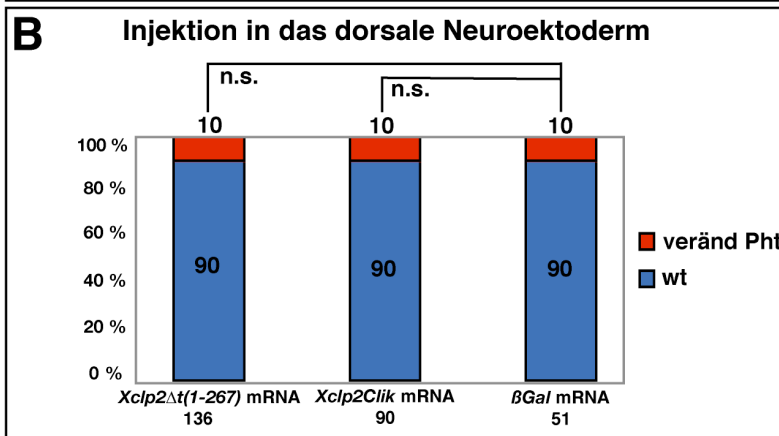
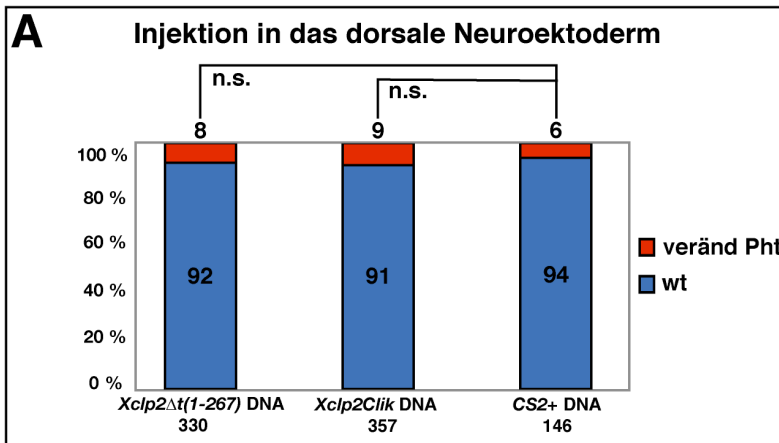
**Tab.14 Veränderungen des Phänotyps nach der Überexpression von DNA der C-terminalen Deletionsmutanten *Xclp1Δt(1-265)*CS2+ oder der ABS 2**

***Xclp1Clik*CS2+ DNA in das zukünftige Neuroektoderm von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen.**

Die Daten wurden numerisch und prozentual dargestellt. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert. Wt: Wildtypembryonen; v.Pht.: veränderter Phänotyp.

Nach der Injektion des DNA-Expressionskonstruktes der *Xclp1Δt(1-265)*CS2+ Deletionsmutanten waren die resultierenden morphologischen Abweichungen im Vergleich zu den mit CS2+ DNA injizierten Embryonen statistisch nicht signifikant (6 Exp., n = 81, p = 0,12).

Ebenso verhielt es sich mit den Veränderungen als Folge der Injektion mit *Xclp1Clik*CS2+ DNA. Der Befund war statistisch nicht signifikant (6 Exp., n = 78, p = 0,31). Obwohl *Xclp1* eine zusätzliche funktionelle ABD 1 mit hoher Affinität zu F-Aktin hat, gab es in Bezug auf die morphologischen Veränderungen der Embryonen nach der Überexpression im Vergleich zu *Xclp2* keinen Unterschied.



**Abb.18 Die Fehlexpression der C-terminalen Deletionsmutanten und der ABD 2 von *Xclp1* und *Xclp2* in das zukünftige Neuroektoderm und das dorsale Mesoderm zeigte keine phänotypischen Veränderungen**

Vierzellige *Xenopus laevis* Embryonen wurden mit der DNA und mRNA der C-terminalen Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)CS2+* (**A, B, C**) und *Xclp1Δt(1-265)CS2+* (**D**) in den dorso-animalen Bereich (**A, B, D**) und in die dorsale Randzone (**C**) injiziert. Die Embryonen wurden während ihrer Entwicklung kontinuierlich beobachtet und nach ihrer Fixierung im Kaulquappenstadium auf ihre veränderten Phänotypen hin untersucht. Als Kontrolle diente die Injektion der DNA des *CS2+* Leervektors (**A, C, D**) bzw. die Injektion von *βGal* mRNA (**B**) und Wildtypembryonen (**C, D**).

Die Injektion der DNA von *Xclp2Δt(1-267)CS2+* bzw. *Xclp2ClikCS2+* in den dorso-animalen Bereich (**A**, 11 Exp.) bzw. in die dorsale Randzone (**C**, 10 Exp.) resultierte nicht in einer statistisch signifikanten Anzahl von veränderten Phänotypen (n.s.). Ebenfalls nicht signifikant war der Anteil an veränderten Phänotypen nach der Injektion der DNA von *Xclp1Δt(1-265)CS2+* oder *Xclp1ClikCS2+* in diesen Bereich (**D**, 4 Exp., n.s.). Auch die Fehlexpression der mRNA von *Xclp2Δt(1-267)CS2+* bzw. *Xclp2ClikCS2+* resultierte nicht in einer statistisch signifikanten Anzahl von Entwicklungsstörungen im Neuroektoderm (**B**, 6 Exp., n.s.).

Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert. n.s., statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Rot: Anteil an resultierenden phänotypischen Veränderungen (veränd Pht), Blau: Anteil an Wildtypembryonen (wt).

Der Befund, dass die Fehlexpression der Deletionsmutanten keine Entwicklungsstörung erzeugte war sehr überraschend.

So ergab sich die Möglichkeit, dass der fehlende veränderte Phänotyp nach der Überexpression der Deletionsmutanten die Folge eines Kompensationsmechanismus durch andere benachbarte nichtmanipulierte Zellen mit ähnlichem Schicksal war. In der Literatur fanden sich hierzu Hinweise in dem bisher gut erforschten Bereich des Regenerationsmechanismus nach Amputationen bei Amphibien. Die Regeneration tritt beispielsweise nach operativer Entfernung von Schwanz (Gargioli et al., 2004), Extremitäten (Lo et al., 1993; Kumar et al., 2000) und im Rahmen der dorso-ventralen Musterbildung von *Xenopus* Embryonen (Reversade et al., 2005) auf.

**2.3.5.2.3. Veränderung des Wanderverhaltens von cranialen Neuralleistenzellen nach Missexpression der *Xclp*-Deletionsmutanten**

Die Tatsache, dass *Xclp2* in den wandernden Neuralleistenzellen des Kopfes und des Rumpfes exprimiert wurde, legte einen Einfluss dieses Proteins auf den epithelial-mesenchymalen Übergang und/oder die

Migration dieser Zellen nahe. Im Froschembryo fehlexprimiert sollten die beiden trunkierten Xclp-Proteine diese Aktindynamik in gleicher Weise inhibieren können und schließlich die Zellmigration der Neuralleistenzellen vermindern, um letztlich die gleichen phänotypischen Veränderungen hervorzurufen. Es wurden Missbildungen in den Knorpeln der rostralen Hälfte des Kiefers (wie zum Beispiel des Meckelschen Knorpels) erwartet, die durch die cranialen Neuralleistenzellen des mandibularen oder hyoidalen Zellstromes gebildet werden. Trotzdem zeigten die Überexpressionen von Xclp2, von dessen C-terminaler Deletionsmutanten und von dessen ABD 2 im zukünftigen Neuroektoderm und im dorsalen Mesoderm auf den ersten Blick keinen Einfluss auf diese Prozesse. Auch bei den Neuralleistenzellen ist der Regulationsmechanismus ein bekanntes Phänomen. Für eine begrenzte Zeit, besitzen beispielsweise die Neuralrohrzellen die Fähigkeit die Neuralleiste zu regenerieren. Zu einem späteren Zeitpunkt waren angrenzende Neuralleistenzellen in der Lage ihre Migrationsrouten und ihre Genexpression zu ändern um fehlende Leistenregionen des Nachhirns zu kompensieren (Couly et al., 1996). Diese Zellen sind in der Lage durch Veränderung ihres Schicksals und/oder ihrer Zellmigration, ihrer Zellteilung und über den verminderten Zelltod die fehlenden Strukturen zu ersetzen. Damit haben neurale Manipulationen oft keinen veränderten Phänotyp zur Folge.

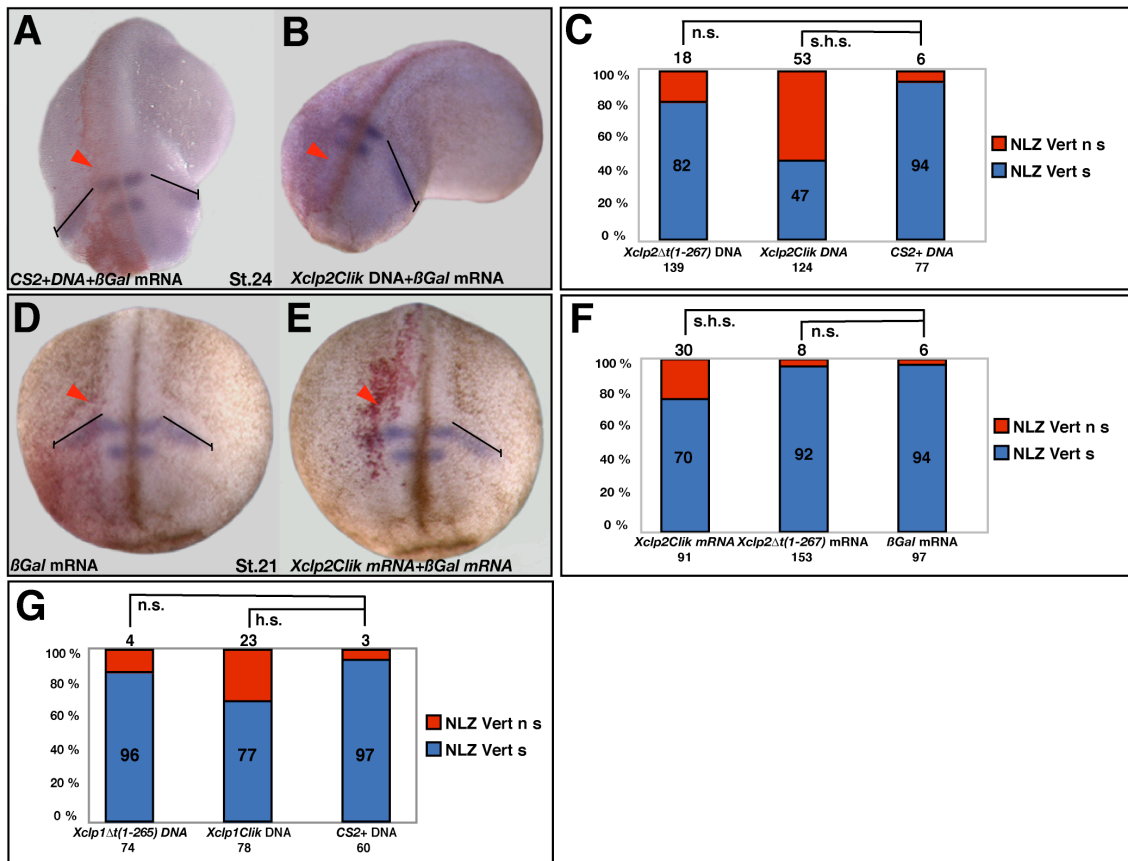
Aufgrund dieser Tatsache, dass fehlende Neuralleistenzellen durch benachbarte Zellen regeneriert werden können, wurde eine subtilere Methode gewählt. Um die direkte Auswirkung der Überexpression der mutierten Xclp-Proteine auf den epithelial-mesenchymal Übergang und das Wanderverhalten migrierender Zellen im funktionsfähigen Organismus beobachten zu können, wurde ein experimenteller Nachweis auf Ebene der Genexpression gewählt. Der Transkriptionsfaktor *Krox20* spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des segmentierten Nachhirns. Neben der Expression in den Rhombomeren 3 und 5 wird *Krox20* mRNA in den Neuralleistenzellen, die von der 5. Rhombomere aus entlang des dritten

Branchialbogens wandern, exprimiert. Diese *Krox20* mRNA positiven Zellen wandern auf beiden Seiten des frühen Kaulquappen Embryos mit gleicher Geschwindigkeit nach ventral. Das Expressionsmuster erscheint bilateral symmetrisch (Gishlain et al., 2003). Beim Vorhandensein von dominant aktiv wirkenden Aktinbindedomänen der Xclp-Proteine sollten die epithelialen neuralen Zellen nicht mehr in der Lage sein, den mesenchymalen Zelltyp zu bilden. Zudem sollte durch die Stabilisierung der Aktinstressfasern im Zytoskelett das Migrationsverhalten dieser *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellsubpopulation empfindlich gestört werden.

Im direkten Vergleich mit Wildtypneuralleistenzellen wäre die Veränderung des Migrationsverhaltens der ausgewählten *Krox20* mRNA positiven cranialen Neuralleistenzellen feststellbar. Deshalb wurden die verschiedenen Deletionsmutanten von Xclp1 und Xclp2 einseitig in dem zukünftigen Neuroektoderm vierzelliger *Xenopus laevis* Embryonen überexprimiert. Die Entwicklung der Embryonen wurde während der Neuralleistenzellwanderung im späten Neurulationsstadium St.21 und der frühen Schwanzknospenstadien St.23/24 gestoppt. Anschließend wurde eine *In Situ* Hybridisierung mit einer *Krox20* Sonde durchgeführt. Das Wanderverhalten der *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen nach einseitiger Überexpression der C-terminalen Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)* bzw. *Xclp1Δt(1-265)* wurde jeweils mit dem der nicht injizierten Neuralleistenzellen des selben Embryos verglichen. Die erhoffte konstitutive Aktivität der *Xclp1* und *Xclp2* Deletionskonstrukte sollte zu einer asymmetrischen Verteilung der *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellströme des jeweiligen Embryos führen. Das Schicksal der injizierten Zellen wurde durch die Koinjektion von *βGal* mRNA verfolgt.

**Die Überfunktion der C-terminalen Deletionsmutanten von *Xclp2* und *Xclp1* im zukünftigen Neuroektoderm hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen**

Die Injektionen der DNA der carboxyterminalen Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)CS2+* und *Xclp1Δt(1-265)CS2+* und der *Xclp2CS2+* in voller Länge (nicht gezeigt) in das zukünftige Neuroektoderm von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen ergaben keine Unterschiede im Wanderverhalten der *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen.



**Abb.19 Die Misexpression der Aktinbindedomäne 2 von *Xclp2* und *Xclp1*, aber nicht deren C-terminale Deletionsmutanten, inhibieren die Migration der branchialen Neuralleistenzellen der Rhombomere 5**

Die Aktinbindedomäne 2 (ABS 2) bzw. eine C-terminale Deletionsmutante von *Xclp1* (*Xclp1Clik*, bzw. *Xclp1Δt(1-265)*) und *Xclp2* (*Xclp2Clik*, bzw. *Xclp2Δt(1-267)*) wurden unilateral in den dorso-animalen Bereich von vier-bis achtzelligen Embryonen, in Form eines Expressionsvektors (*CS2+*) oder als synthetische mRNA, injiziert. Zur Überprüfung der neuroektodermalen Misexpression wurde *βGalaktosidase* (*βGal*) mRNA koinjiziert und mittels Färbereaktion im späten Neurulastadium (St.21), bzw. im frühen Schwanzknospenstadium (St.23/24) sichtbar gemacht (A, B, C, E; rote Pfeilspitze). Die



fixierten Embryonen wurden anschließend einer *In Situ* Hybridisierung mit einer *Krox20* Sonde, einem Marker für die wandernden branchialen Neuralleistenzellen (NLZ) der Rhombomere 5, unterzogen. Als Kontrolle dienten unilaterale Injektionen des *CS2+* Leervektors (**A, C, G**) bzw. der *βGal* mRNA (**D, F**), was im Vergleich zur unbehandelten Seite zu keiner Veränderung der zurückgelegten Distanz der migrierenden *Krox20* mRNA positiven NLZ führte. Das *Krox20* Expressionsmuster zeigte somit eine bilateral symmetrische Verteilung (**A, D**). Die Überexpression der C-terminalen Deletionsmutanten von *Xclp1Δt(1-265)* (**G, 4 Exp.**) oder *Xclp2Δt(1-267)* (**C, 4 Exp.; F, 4 Exp.**) hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das NLZ Wanderverhalten. Die unilaterale Fehlexpression von *Xclp2Clik* hemmte in der injizierten Embryohälfte die Migration der NLZ. Dies konnte durch das bilateral asymmetrische *Krox20* Expressionsmuster beobachtet werden (**B, E**). Die statistische Auswertung, im Vergleich zu den Kontrollembryonen ergab, dass die Inhibition der branchialen NLZ Wanderung durch *Xclp2Clik*, entweder als DNA Expressionsvektor bzw. mRNA, sehr hoch signifikant war (**C, 4 Exp., s.h.s.** bzw. **F, 4 Exp., s.h.s.**). Die unilaterale Fehlexpression der ABD 2 von *Xclp1* als *CS2+* Vektor im Neuroektoderm führte ebenfalls, statistisch hoch signifikant, zu einer Beeinträchtigung der Wanderung von *Krox20* positiven NLZ (**G, 4 Exp., h.s.**).

Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert. h.s = statistisch hoch signifikant; s.h.s.= statistisch sehr hoch signifikant;

Rot: bilateral asymmetrisches *Krox20* Expressionsmuster der NLZ

Blau: bilateral symmetrisches *Krox20* Expressionsmuster der NLZ

Die Missexpression von *Xclp2Δt(1-267)* DNA war im Vergleich mit dem NLZ Migrationsverhalten der mit *CS2+* DNA injizierten Embryonen statistisch nicht signifikant (4 Exp.,  $p = 0,0329$ ), (Abb.19, A). Die Injektion der *Xclp2Δt(1-267)* mRNA hatte keine statistisch signifikante Veränderung im Wanderverhalten der Neuralleistenzellen ( $p = 0,66$ ) zur Folge. Von den mit *Xclp1Δt(1-265)* DNA injizierten Embryonen waren die Abweichungen im Wanderverhalten der *Krox20* mRNA exprimierenden NLZ statistisch nicht signifikant (4 Exp.,  $p = 0,81$ ).

### **Die Überexpression der ABD 2 Deletionsmutanten von *Xclp2* und *Xclp1* in das zukünftige Neuroektoderm hatte Einfluss auf das Verhalten der *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen**

Einseitig mit *Xclp2ClikCS2+* DNA injizierte Embryonen zeigten verändertes Verhalten der *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen ( $n = 124$ ,  $p < 0,001$ ) (Tab.15; Abb.19). Auch hier waren die betroffenen Embryonen phänotypisch unauffällig.

	n	symmetrisch	nicht symmetrisch	p
Exp.1 Ko wt	24	22	2	
CS2+ DNA	26	24	2	
<i>Xclp2Clik</i> DNA	75	37	38	0,0003
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	35	25	10	0,0886
Exp.2 Ko wt	24	22	2	
CS2+ DNA	17	14	3	
<i>Xclp2Clik</i> DNA	36	16	20	0,0213
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	42	36	6	0,9406
Exp.3 CS2+ DNA	15	11	4	
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	30	26	4	0,4907
Exp. 4 CS2+ DNA	20	17	3	
<i>Xclp2Clik</i> DNA	13	5	8	0,0167
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	32	27	5	0,7382
Zusfsg. Exp.1,2,3,4				
CS2+DNA	77	72 (94%)	5(6%)	
Ko wt	48	44 (92%)	4 (8%)	
<i>Xclp2Clik</i> DNA	124	58 (47%)	66 (53%)	0,000
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> DNA	139	114 (82%)	25 (18%)	0,0329

**Tab.15 Das Verhalten und die daraus resultierende Verteilung der nach ventral migrierenden *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen nach der Injektion der DNA der Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)*, bzw. der *ABD 2* von *Xclp2* (*Xclp2Clik*) in das zukünftige Neuroektoderm von vierzelligem *Xenopus laevis* Embryonen. Die Werte wurden numerisch und prozentual angegeben. n: Anzahl der im Experiment verwendeten Embryonen. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert.**

Die Überexpression von *Xclp2Clik* mRNA im zukünftigen Neuroektoderm beeinflusste das Verhalten der *Krox20* mRNA exprimierenden Neuralleistenzellen um fast 30%. Im Vergleich mit dem Verhalten der NLZ bei den mit *βGal* mRNA injizierten Embryonen ergab sich statistisch eine sehr hohe Signifikanz (n = 91, bzw. n = 97, p < 0,01). Trotzdem hatte die Migrationsinhibition in dieser Größenordnung ebenfalls keine phänotypischen Veränderungen der betroffenen Embryonen zur Folge.

	n	symmetrisch	nicht symmetrisch	p
Exp.1 <i>βGal</i> mRNA	24	21	3	
<i>Xclp2Clik</i> mRNA	24	16	8	0,1696
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> mRNA	20	17	3	0,8411
Exp.2 Ko wt	35	34	1	
<i>βGal</i> mRNA	22	22		
<i>Xclp2Clik</i> mRNA	33	20	13	0,0023
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> mRNA	18	18		
Exp.3 Ko wt	31	31		
<i>βGal</i> mRNA	26	24	2	
<i>Xclp2Clik</i> mRNA	34	27	7	0,3070
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> mRNA	62	59	3	0,9817
Exp.4 <i>βGal</i> mRNA	25	24	1	
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> mRNA	53	46	7	0,3948
<b>Zusfsg. Exp.1,2,3,4</b>				
<i>βGal</i> mRNA	97	91 (94%)	6(6%)	
<i>Xclp2Clik</i> mRNA	91	63 (70%)	28(30%)	0,0000
<i>Xclp2Δt(1-267)</i> mRNA	153	140 (92%)	13(8%)	0,6693

Tab.16 Die Verteilung der nach ventral wandernden *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen als Folge des veränderten Verhaltens nach der Überexpression der mRNA der Deletionsmutanten *Xclp2Δt(1-267)* oder *Xclp2Clik* in das zukünftige Neuroektoderm von *Xenopus laevis* Embryonen.

Der Anteil der Embryonen mit asymmetrisch migrierenden NLZ nach der Überexpression von *Xclp1Clik* DNA lag bei 23% und war statistisch hoch signifikant (n = 78, p < 0,01). Trotz der ortsspezifischen Überexpression der Deletionsmutanten zeigte der Embryo keine phänotypischen Veränderungen in Bezug auf die Achsenentwicklung oder den Neuralrohrschluss.

	n	symmetrisch	nicht symmetrisch	p
Exp.1 Ko wt	12	11	1	
<i>CS2+</i> DNA	15	15		
<i>Xclp1Clik</i> DNA	13	9	4	0,752
<i>Xclp1Δt(1-265)</i> DNA	15	14	1	1,0

Exp.2 Ko wt	15	13	2	
CS2+ DNA	16	16		
<i>Xclp1Clik</i> DNA	11	4	7	0,0011
<i>Xclp1Δt(1-265)</i> DNA	7	7		
Exp.3 CS2+ DNA	13	12	1	
<i>Xclp1Clik</i> DNA	15	14	1	0,5283
Exp.4 Ko wt	35	33	2	
CS2+ DNA	16	15	1	
<i>Xclp1Clik</i> DNA	39	33	6	0,6328
<i>Xclp1Δt(1-265)</i> DNA	52	50	2	0,7744
Zusfsg. von Exp. 1,2,3,4				
CS2+ DNA	60	58 (97%)	2 (3%)	
<i>Xclp1Clik</i> DNA	78	60 (77%)	18 (23%)	0,0025
<i>Xclp1Δt(1-265)</i> DNA	74	71 (96%)	3 (4%)	0,8108

**Tab.17 Verhalten und das daraus resultierende Verteilungsmuster der nach ventral migrierenden *Krox20* mRNA positiven Neuralleistenzellen in Folge der Injektion der DNA der Deletionsmutanten *Xclp1Δt(1-265)* oder *Xclp1Clik* in das zukünftige Neuroektoderm von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen.**

Die Werte wurden numerisch und prozentual angegeben. Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert.

Der Funktionsgewinn von Xclp1, 2 oder 3 durch die Deletion der autoregulatorischen Domänen der Proteine führte in den unterschiedlichen Keimblättern weder in der frühen noch in der späteren embryonalen Entwicklung von *Xenopus laevis* zu wesentlichen Veränderung des Phänotyps. Deshalb konnten die bisher auf Zellebene erhaltenen Erkenntnisse über die Funktion der Proteine nicht auf den sich entwickelnden Organismus ausgeweitet werden. Mit der Nutzung einer Subpopulation einzeln migrierender Neuralleistenzellen war es gelungen, deren Beeinflussung durch das mutierte Xclp1 und Xclp2 innerhalb des embryonalen Organismus zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass die funktionellen Aktinbindedomänen der Xclp-Proteine über Interaktionen mit den N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen inhibitorisch reguliert werden. Erst mit der Deletion beider Regulationsdomänen war es gelungen, konstitutiv aktive Xclp-Proteine zu erzeugen, die den epithelial-mesenchymalen Übergang bzw. die Migration der Neuralleistenzellen über

ihre zweite Aktinbindedomäne beeinflussen konnten. Damit war es möglich, die Calponin-Proteine als wichtige Regulatoren in der Aktindynamik des Zytoskeletts der Zellen nachzuweisen. Allein die zweite Aktinbindedomäne dieser Proteine war in der Lage die Aktin-Stressfasern der Neuralleistenzellen so zu stabilisieren, dass der Übergang in den motilen Zelltyp unterbunden wurde.