
2 Einleitung

Hans Spemann und Hilde Mangold erkannten in den Zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts durch Transplantationsexperimente, dass eine kleine Region im sich entwickelnden Frosch-Embryo für die Induktion der Körperachse essentiell ist. Mit der Entdeckung dieses nach ihnen benannten Spemann-Mangold-Organisators legten sie den Grundstein für die moderne Entwicklungsbiologie (Spemann and Mangold, 2001). Heute haben wir ein tieferes Verständnis für die molekularbiologischen und genetischen Mechanismen, die die Ontogenese in Metazoen kontrollieren. Damit aus der befruchteten Eizelle ein lebensfähiger Organismus entstehen kann, der aus multiplen, hoch spezialisierten Geweben und Organen besteht, bedarf es eines komplexen Signalnetzwerkes, das Differenzierung, Wachstum und Position der embryonalen Zellen koordiniert. Man kennt mittlerweile die wichtigen Signalwege, wie z. B. FGF-, TGF β -, Notch-, Hedgehog- oder Wnt-Signalweg, die in diesen Prozessen involviert sind (Brivanlou and Darnell, Jr., 2002). Dennoch ist das vorhandene Wissen unvollständig. So erfordert die Etablierung der Körperachsen im sich entwickelnden Embryo die Reorganisation ganzer Zellverbände durch gerichtete Zellwanderungsprozesse. Eine zentrale Frage in der Entwicklungsbiologie befasst sich mit der Aufklärung dieses komplizierten Vorgangs. Die Beantwortung dieser Frage auf embryonaler Ebene kann ebenfalls Lösungen für Fragen der Krankheitsentstehung anbieten. Prinzipiell spielen dieselben Signalwege, die Zellwanderungen während der Embryogenese steuern, ebenfalls entscheidende Rollen während der Tumorentwicklung, insbesondere bei der Mobilisierung von Tumorzellen in Metastatisierungsprozessen (Bogenrieder and Herlyn, 2003; Huber et al., 2005). Embryonale Fehlbildungen des Herzens, des sensorischen Epithels, des Zentralen Nervensystems und auch Neuralrohrdefekte, wie z. B. Spina Bifida, sind häufig auf Mutationen von Genen zurückzuführen, die Zellwanderungsprozesse während der Embryogenese koordinieren (Henderson et al., 2006; Wang and Nathans, 2007). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass in Tiermodellen, wie Fruchtfliege, Frosch, Zebrafisch oder Maus und auch im Menschen, in vielen Fällen Gene des Wnt-Signalweges betroffen sind.

Eines dieser Gene ist Diversin (Schwarz-Romond et al., 2002). Die vorliegende Arbeit beschreibt den molekularen Mechanismus von Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg und zeigt, dass es für die Achsenbildung und Herzentwicklung während der

Embryogenese essentiell ist. Diese Arbeit trägt zum Verständnis von Signalprozessen bei, die Zellwanderungen im sich entwickelnden Embryo regulieren.

Der Wnt-Signalweg - Ein Überblick

Wnt-Liganden sind sezernierte Glykoproteine, die an Sieben-Transmembran-Rezeptoren der Frizzled-Familie binden (Cadigan and Liu, 2006; Gordon and Nusse, 2006). Das erste Mitglied der Wnt-Familie, Wnt1, wurde in den Achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts entdeckt. Damals identifizierte man es als Proto-Onkogen in Tumovirus-induzierten Mamma-Karzinomen in Mäusen und nannte es *int-1* (Nusse and Varmus, 1982). Der Name rührt von der Integrationsstelle proviraler DNA des Tumovirus MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) in das murine Genom her. Die Integration viraler DNA führte zu einem drastischen Anstieg der Expression des benachbarten Gens. Dieses Gen war *int-1* (Integrator-1), und dessen Virus-vermittelte, ektopische Expression wurde für die Induktion der Tumoren verantwortlich gemacht (Nusse et al., 1985). Später entdeckte man, dass *int-1* ein Sequenzhomologes des Gens *wingless* in der Fliege *Drosophila melanogaster* ist (Rijsewijk et al., 1987; Cabrera et al., 1987). *Wingless* gehört zur Familie der Segmentpolaritätsgene, die in der Embryonalentwicklung der Fliege musterbildende Prozesse kontrollieren (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Aufgrund der Homologie wurde ein Namenshybrid aus *int-1* und *wingless*, nämlich *wnt1*, gebildet (Nusse et al., 1991). Inzwischen hat man in Mensch und Maus 19 Wnt-Gene, 10 Gene, die für Frizzled-Rezeptoren kodieren und zwei LRP (Low-density lipoprotein receptor-related protein) -Wnt-Korezeptoren identifiziert (Miller, 2002; Huang and Klein, 2004, siehe auch Wnt-Homepage: www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html).

Die Wnt-Signaltransduktionskaskade lässt sich in wenigstens drei Zweige untergliedern. Neben dem zuerst entdeckten Kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg, sind mittlerweile mindestens zwei weitere, β -Catenin-unabhängige, Nicht-kanonische Wnt-Signalwege beschrieben. Es handelt sich dabei um den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg und den Wnt/JNK- bzw. Wnt/Planare Zellpolaritäts-Signalweg (Huelsenken and Birchmeier, 2001; Veeman et al., 2003a). Die Aktivierung der Wnt-Signalwege erfolgt durch Bindung sezernierter Wnt-Liganden an entsprechende Frizzled-Rezeptoren und führt zur Phosphorylierung des zytosomatischen Multiadapterproteins Dishevelled. Dishevelled wird als Knotenpunkt angesehen, an dem sich Kanonischer und Nicht-

kanonische Wnt-Signalwege aufteilen (Boutros and Mlodzik, 1999). Im Wnt/ β -Catenin-Signalweg nimmt das Zelladhäsionsmolekül β -Catenin eine zentrale Stellung ein und vermittelt die Weiterleitung des extrazellulären Signals in den Kern. In Zellen, in denen der Wnt-Signalweg nicht aktiviert ist, wird zytoplasmatisches β -Catenin kontinuierlich N-terminal phosphoryliert, ubiquitinyliert und in Proteasomen abgebaut (Aberle et al., 1997; Ikeda et al., 1998). Der β -Catenin-Abbaukomplex enthält als zentrale Moleküle das Gerüstprotein Axin/Conductin, das Adenomatöse Poliposis Coli Genprodukt APC und Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β). Die E3-Ubiquitinligase β -TrCP markiert zuvor phosphoryliertes β -Catenin für den proteasomalen Abbau (Kitagawa et al., 1999). Die Wnt-induzierte Aktivierung von Dishevelled führt im Kanonischen Wnt-Signalweg zur Inhibierung des Abbau-Komplexes, was zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma der Zelle führt (Kimelman and Xu, 2006). Zytoplasmatisches β -Catenin transloziert dann in den Zellkern und aktiviert dort Zielgene durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996; Tetsu and McCormick, 1999).

Der Kanonische Wnt-Signalweg ist evolutionär hoch konserviert und reguliert zahlreiche Prozesse während der Embryonalentwicklung, wie z. B. die Induktion der Körperachsen, Ausbildung der Extremitäten und die Entwicklung von Organen, wie Zentralnervensystem und Herz (De Robertis et al., 2000; Logan and Nusse, 2004; Lee et al., 2006; Guder et al., 2006). Im adulten Organismus ist der Wnt-Signalweg zur Erhaltung der Homöostase von Geweben, wie z. B. des Darmepithels essentiell (Radtko et al., 2006). Genetische Defekte von Komponenten des Signalweges sind häufig mit der Entstehung von Krebs assoziiert, stehen aber auch in Verbindung mit anderen Krankheiten, wie Diabets, Störungen des Fettstoffwechsels und Neurodegenerativen Krankheiten (Giles et al., 2003; De Ferrari and Moon, 2006; Christodoulides et al., 2006; Grant et al., 2006).

β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege

Im Kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt β -Catenin die Weiterleitung des extrazellulären Wnt-Signals in den Zellkern und induziert die Expression von Zielgenen. Dies führt zur Initiierung genetischer Programme, die Proliferation anregen und/oder transformierend auf Zellen wirken, wie z. B. bei der Mesodermbildung während der Gastrulation (Dierick and Bejsovec, 1999; Tam et al., 2006).

Zellkulturexperimente und Studien in *Drosophila* und *Xenopus* lieferten erste Hinweise, dass die Aktivierung von Frizzled-Rezeptoren durch Wnt-Liganden nicht notwendigerweise zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma führte und keine transformierende Wirkung auf Epithel-Zellen hatte (Wodarz and Nusse, 1998). Aufgrund dieser Eigenschaft unterteilte man Wnt-Liganden in stark transformierende, wie Wnt1, Wnt3a, Wnt7a, Wnt8 und Wnt8b, in transformierende, wie Wnt2, Wnt5b und Wnt7b und in nicht transformierende, zu denen Wnt4, Wnt5a, Wnt6 und Wnt11 gezählt werden (Moon et al., 1997). Transformierende Wnts kennzeichnet ein hohes bis mittleres Potential, Epithel-Zellen (C57MG) zu transformieren bzw. die Fähigkeit, sekundäre Körperachsen in *Xenopus*-Embryonen zu induzieren. Nicht transformierende Wnts haben dagegen keinen transformierenden Effekt auf Epithel-Zellen und kaum Potential, sekundäre Körperachsen in Frosch-Embryonen zu induzieren. Sie initiieren keine β -Catenin-vermittelten genetischen Programme, beeinflussen jedoch Zellwanderungsprozesse in gastrulierenden *Xenopus*-Embryonen (Moon et al., 1997).

Da nicht transformierende Wnt-Liganden unabhängig von β -Catenin Signalprozesse vermitteln, stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen. Es zeigte sich, dass Injektion von Wnt5a-mRNA in *Xenopus*-Embryonen einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zur Folge hatte (Slusarski et al., 1997b). Diese Befunde waren ein Hinweis auf einen Kalzium-abhängigen, Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg. Weitere Studien unterstützten diese Annahme und führten zu einem tieferen Verständnis der involvierten molekularen Mechanismen. So erkannte man, dass der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg nur von bestimmten Wnt-Liganden, wie Wnt4, Wnt5a und Wnt11, und diversen Frizzled-Rezeptoren aus Ratte (R) und Maus (M), wie Rfz-2, Mfz-3, Mfz-4 und Mfz-6, aktiviert wird (Kuhl et al., 2000b). Überexpression dieser Rezeptoren, entsprechender Wnt-Liganden oder von Dishevelled führt zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, die nachfolgend über Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase C (PLC) den Phosphatidylinositol-Signalweg anschalten (Slusarski et al., 1997a; Sheldahl et al., 1999; Cantley, 2002; Sheldahl et al., 2003). Aktivierung dieses Signalweges führt zur Synthese von Inositol-1, 4, 5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), wobei IP_3 die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus dem Endoplasmatischem Reticulum stimuliert und freigesetzte Kalzium-Ionen und Diacylglycerol Protein-Kinase C (PKC) aktivieren (Divecha and Irvine, 1995; Sheldahl et al., 2003). Weitere Kalzium-sensitive Proteine, wie Calcineurin (CaCN) und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige-Protein-Kinase II (CamKII) wurden als Stromabwärts-

Effektoren in diesem Signalweg identifiziert (Kuhl et al., 2000a; Saneyoshi et al., 2002). Auch wurde gezeigt, dass dieser Zweig des Wnt-Signalweges die Aktivierung von Phosphodiesterase (PDE) cGMP-abhängig induzieren kann (Ahumada et al., 2002). Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg kontrolliert Prozesse während der Embryogenese, wie z. B. die Etablierung der dorso-ventralen Körperachse in Zebrafischembryonen, wobei dies durch Modulation des Kanonischen Wnt-Signalweges geschieht (Westfall et al., 2003a; Westfall et al., 2003b).

Ein weiterer Zweig des Wnt-Signalnetzwerkes ist der Wnt/JNK- bzw. Planare Zellpolaritäts-Signalweg (englisch: Planar Cell Polarity, PCP), der in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bislang am intensivsten studiert wurde. Dieser Signalweg kontrolliert in der Fliege die korrekte Orientierung epithelialer Zellen, wie z. B. die Rotation der Ommatidien im Auge oder die parallele Ausrichtung der Flügelhärchen. Auch in Vertebraten reguliert dieser β -Catenin-unabhängige Signalweg, in ähnlicher Weise wie in der Fliege, die Polarität epithelialer Zellen, die z. B. erforderlich ist für die Ausbildung der antero-posterioren Körperachse im Zebrafisch oder die korrekte Anordnung sensorischer Epithelzellen im Innenohr von Mäusen. Im Folgenden wird dieser Signalweg im Detail beschrieben.

Planare Zellpolarität in *Drosophila melanogaster*

Kennzeichen vieler Zelltypen ist eine asymmetrische bzw. polarisierte Morphologie, die für Organisation und Aufrechterhaltung der Funktion von Organen und Geweben in Organismen erforderlich ist. So sind Nervenzellen besonders stark polarisiert, was an der Ausbildung von Dendriten auf der einen und dem Axon auf der anderen Seite des Zellkörpers zu erkennen ist. Auch müssen diese Zellen in einem Gewebeverband die korrekte Orientierung besitzen, um eine Funktion des Organs (z. B. des Zentralnervensystems) zu ermöglichen. Die Polarität anderer Zelltypen ist weniger offensichtlich und wird erst durch Visualisierung bestimmter Marker-Proteine erkennbar. Nahezu alle Epithelzellen weisen einen gewissen Grad an Polarität bzw. Asymmetrie auf, der ihre spezifischen Funktionen gewährleistet. So sind Epithelzellen charakteristischerweise apiko-basolateral polarisiert. Oft sind diese Zellen zusätzlich in einer Ebene polarisiert, die rechtwinklig zur apiko-basolateralen Achse liegt. Die zielgerichtete Organisation von Zellen in dieser flachen Ebene wird als Planare Zellpolarität bezeichnet (siehe Abb. 2). Die Zellen werden dabei nicht nur in einem

bestimmten Muster relativ zueinander, sondern auch relativ zur Körperachse angeordnet (Karner et al., 2006a; Karner et al., 2006b).

Kontrolliert wird die Planare Zellpolarität unter anderem durch den Wnt/Planare-Zellpolaritäts-Signalweg (PCP). In *Drosophila* reguliert dieser Signalweg die Ausrichtung und Orientierung der Flügel- und Körperhaare und die Rotation der Ommatidien während der Augenentwicklung (Strutt et al., 1997; Abb. 1). Neben diesen

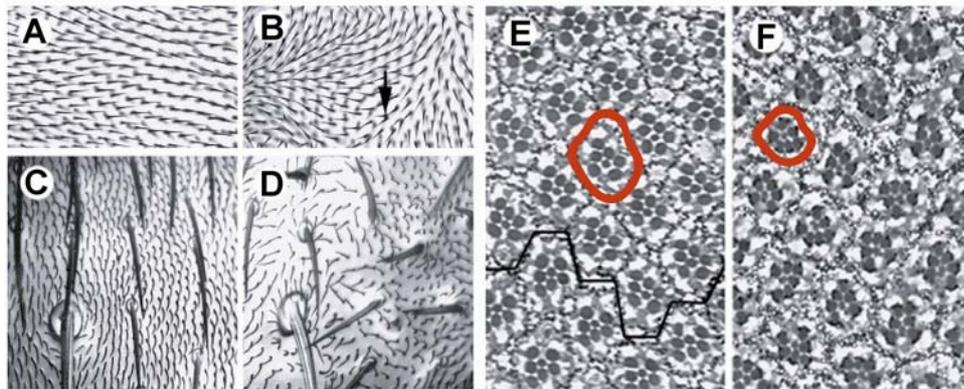


Abb.1 Polarisierete Epithelgewebe in *Drosophila* und Phänotypen von PCP-Mutanten. Dargestellt sind vergrößerte Ausschnitte von Flügel (A, B), Notum (C, D) und Sagittalschnitte vom adulten Auge (E, F). A-D) Während Epithelzellen des Flügels oder Notums in Wildtyp-Fliegen jeweils ein distal ausgerichtetes Härchen ausbilden und so ein geordnetes Muster erzeugen, führen Mutationen von PCP-Genen wie *Prickle* (B) oder *Dishevelled* (D) zu zufälligen Ausrichtungen der Härchen mit invarianten Mustern. In *Prickle*-Mutanten kommt es auch zur Ausbildung mehrerer Härchen pro Zelle (Pfeil in B). Im Wildtyp-Fliegenauge (E) bilden die Photorezeptoren im Ommatidium (roter Kreis) ein chirales, trapezoides Muster (siehe auch Abb. 3). Alle Ommatidien sind zum Äquator (schwarze Linie in E) ausgerichtet. *Frizzled*-Mutanten (F) zeigen dagegen Chiralitäts- und Rotationsdefekte. (Abbildung modifiziert aus Tree et al., 2002).

gut untersuchten Beispielen vermittelt der PCP-Signalweg die Polarität von Epithelzellen im adulten Thorax und in Epithelzellen von Organanlagen, den sogenannten Imaginalscheiben und asymmetrische Zellteilungen in Vorläuferzellen des sensorischen Organs (Kiefer, 2005). Die asymmetrische Morphologie der Zellen wird vermittelt durch Kern- bzw. Primäre-PCP-Proteine und weiteren Komponenten, die als sekundäre PCP-Proteine bezeichnet werden. Der Siebentransmembrandomänen-Rezeptor *Frizzled* (Fz) wurde als erstes PCP-Gen identifiziert (Vinson and Adler, 1987; Vinson et al., 1989). In *Drosophila* vermittelt Fz die Signalweiterleitung eines polarisierenden Signals, jedoch unabhängig von dem Liganden *Wingless*/*Wnt* (Lawrence et al., 2002). Ein extrazellulärer Faktor, der Planare Zellpolarität in *Drosophila* durch Fz induziert, konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Als weitere Kern-PCP-Proteine gelten *Dishevelled* (Dsh), das direkt an der

zytoplasmatischen Fz-Domäne bindet, Flamingo/Starry Night (Fmi/Stan), ein atypisches Protocadherin, das Ankyrin-Repeat Protein Diego (Dgo), Prickle/Spiny Legs (Pk), ein LIM-Domänen enthaltendes Protein und das Transmembranprotein Strabismus/VanGogh (Stbm/Vang, Taylor et al., 1998; Wolff and Rubin, 1998; Chae et al., 1999; Gubb et al., 1999; Usui et al., 1999b; Feiguin et al., 2001). Fz, Dsh und Dgo gelten als positive Regulatoren des PCP-Signalweges, während Pk und Stbm als Antagonisten agieren (Jenny and Mlodzik, 2006). In *Drosophila* wurde PCP-Signaltransduktion am intensivsten im Flügel und im Auge untersucht. Die Flügel sind aus hexagonalförmigen Epithelzellen zusammengesetzt, die jeweils ein Härchen auf der distalen Seite in gleicher Richtung ausbilden (Abb. 1 und 2). Die Verteilung der

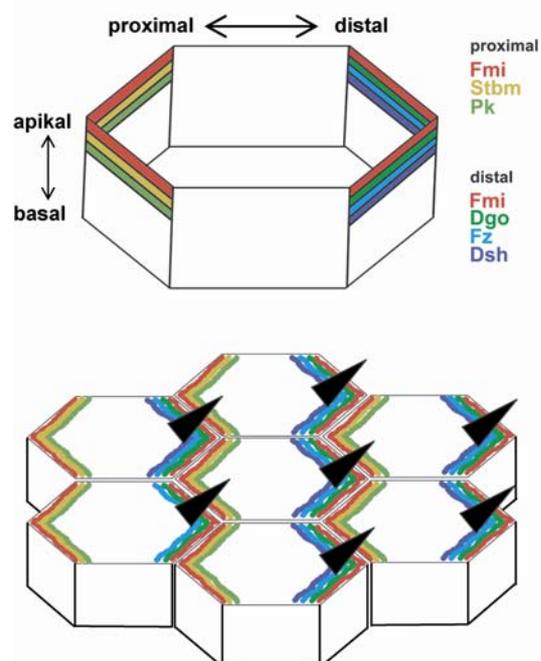


Abb. 2 Subzelluläre Verteilung der Kern-PCP-Proteine in Epithelzellen des *Drosophila*flügels. Kern-PCP-Proteine in Epithelzellen des Flügels sind proximo-distal und apiko-basolateral polarisiert. Schematisch dargestellt ist die Verteilung von Kern-PCP-Proteinen in einer Epithelzelle (oben) und im Zellverband (unten), in dem PCP-Signaltransduktion die Ausbildung von Flügelhärchen (schwarze Dreiecke) an der distalen Spitze jeder Epithelzelle induziert. (Abbildung nach Fanto and McNeill, 2004).

Kern-PCP-Proteine ist innerhalb der Flügel-Epithelzelle sowohl in apiko-basolateraler als auch in proximo-distaler Ebene polarisiert. So sind Frizzled, Dishevelled und Diego auf der distalen Seite des apikalen Kortex der Zelle lokalisiert. Prickle und Strabismus sind dagegen proximo-apikal und Flamingo sowohl proximal als auch distal in der Zelle

angereichert (Abb. 2). Die Ausbildung der Flügelhärchen auf der distalen Seite der Zelle ist direkt abhängig von der Lokalisation der PCP-Gene. Flamingo vermittelt apiko-basolaterale Polarität, d. h. es induziert und erhält, in Abhängigkeit von Frizzled, die Lokalisierung der weiteren Kern-PCP-Proteine am apikalen Kortex der Zelle. Außerdem wird vermutet, dass interzelluläre Wechselwirkungen von Flamingo-Proteinen zur Integrität der Polarität beitragen (Saburi and McNeill, 2005). Während Prickle und Strabismus antagonistisch auf Frizzled-induzierte PCP-Signale wirken, aktivieren Frizzled, Dishevelled und Diego Stromabwärts-Effektoren, die die Haarinduktion regulieren (Jenny et al., 2005). Diese Effektoren sind z. B. die kleine GTPase RhoA und Drosophila-Rho-Kinase (Drok; Strutt et al., 1997; Winter et al., 2001). Kennzeichen der Kern-PCP-Proteine ist, dass der Verlust eines einzelnen Mitglieds zum Verlust der asymmetrischen Verteilung der anderen Mitglieder führt und es dadurch zum Verlust der Polarität der Zelle kommt. Vermutlich wirken Kern-PCP-Proteine in einem Multi-Proteinkomplex, um asymmetrische Lokalisation der einzelnen Mitglieder gegenseitig zu induzieren (Klein and Mlodzik, 2005b).

Differenzierung des Komplexauges in Drosophila

Die Differenzierung des Komplexauges in Drosophila wird durch die Kern-PCP-Proteine reguliert. Das Drosophila-Auge ist zusammengesetzt aus hunderten von Untereinheiten, den Ommatidien. Jedes Ommatidium enthält 8 Photorezeptorzellen, die in einem trapezförmigen Muster, also chiral angeordnet sind (Abb. 3). Die Rezeptorzellen R1 bis R6 umranden die Rezeptoren R7 und R8, die übereinander liegen (Abb. 3B, nur R7 ist sichtbar; Tomlinson, 1988). In Abbildung 3 ist ein schematischer Querschnitt eines differenzierenden Drosophila-Auges dargestellt. Das Auge enthält dorsale und ventrale Ommatidien, die an der dorso-ventralen Mittellinie, dem Äquator, aneinander grenzen (siehe auch Abb. 1E). Differenzierte Ommatidien (Adult in Abb. 3A) sind spiegelsymmetrisch zueinander angeordnet, dagegen sind undifferenzierte Ommatidien (Vorläufer in Abb. 3A) parallel zum Äquator ausgerichtet.

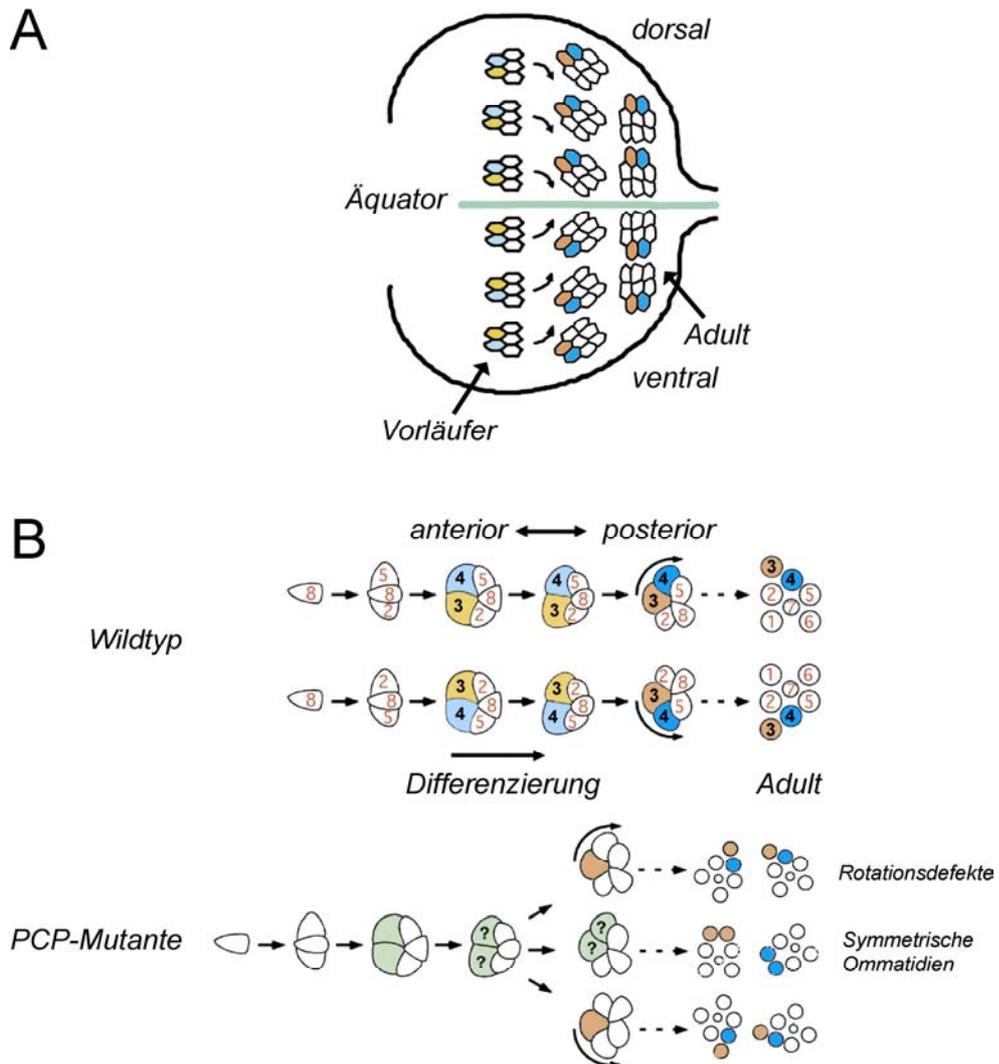


Abb. 3 Differenzierung der Photorezeptoren während der Augenentwicklung in *Drosophila*. A) Dargestellt ist ein Modell eines sich entwickelnden Komplexauges von *Drosophila* (Tangentialschnitt). Links sind undifferenzierte, symmetrische und rechts differenzierte, chirale Ommatidien, nach einer Rotation von 90° abgebildet. B) Während der Embryonalentwicklung entstehen die Ommatidien durch Zusammenlagerung der einzelnen Photorezeptorzellen. Photorezeptoren von Ommatidien im Wildtyp-Auge sind nach der Differenzierung chiral angeordnet. Dorsale und ventrale Ommatidien haben eine Rotation von 90° erfahren und liegen spiegelsymmetrisch zueinander vor. Ommatidien in PCP-Mutanten zeigen Verlust der Chiralität und Rotationsdefekte. Abbildungen modifiziert nach (Strutt, 2003; Jenny et al., 2003).

Während der Entwicklung und Differenzierung erfahren die Ommatidien eine Rotation um 90° und die Etablierung des trapezoiden Musters durch Spezifizierung der Photorezeptoren. Je nachdem, ob sich das Ommatidium in der dorsalen oder in der ventralen Hälfte des Auges befindet, erfolgt die Rotation entweder im oder gegen den Uhrzeigersinn (Abb. 3). Defekte in der korrekten Ausrichtung der Ommatidien

entstehen in allen Fliegen-Mutanten, in denen eines der Kern-PCP-Gene mutiert ist. Die Ommatidien dieser Mutanten werden zwar gebildet, jedoch kommt es zu Rotationsdefekten und/oder zum Verlust der asymmetrischen Anordnung der Photorezeptorzellen (Abb. 1F und 3B). Daneben treten weitere Defekte auf, wie Inversionen, d. h. dorsale Ommatidien haben Spezifikationen ventraler Ommatidien und umgekehrt. Es wurde gezeigt, dass die Spezifikation der Photorezeptorzellen R3 und R4 entscheidend ist für die korrekte Orientierung der Ommatidien und, dass deren Differenzierung durch Frizzled induziert wird (Mlodzik, 2002; Strutt, 2003). Wie oben bereits erwähnt, sind undifferenzierte Ommatidien parallel zur dorso-ventralen Mittelachse angeordnet (Abb. 3A). R3-Vorläufer haben also eine geringere Distanz zum Äquator als R4-Vorläuferzellen. Aufgrund dieser räumlichen Konstellation vermutet man, dass ein bisher noch nicht identifiziertes Signal, das graduell vom Äquator ausgeht, zur Aktivierung von Frizzled zuerst in R3-Vorläuferzellen führt. Das Signal induziert über Dishevelled, Diego und den kleinen GTPasen Rac und Rho die Aktivierung von JNK (Boutros et al., 1998; Fanto et al., 2000). Substrate der JNK-Kaskade sind Transkriptionsfaktoren im Zellkern, wie z. B. c-Jun (Weber et al., 2000). Die Aktivierung von Frizzled und Dishevelled in R3-Vorläufern induziert letztendlich die Expression von Zielgenen, wie Delta (DI), dessen korrespondierender Rezeptor Notch (N) in R4-Vorläuferzellen exprimiert ist. Die Expression von Delta in R4-Vorläufern wird aufgrund von Notch-Aktivierung blockiert und die Vorläuferzelle als R4 durch Notch-induzierte Expression von „Enhancer-of-split“-Genen, wie Enhancer-of-split $m\delta$ spezifiziert (Cooper and Bray, 1999; Fanto and Mlodzik, 1999). In R4-Vorläufern wird die Frizzled-vermittelte Induktion der JNK-Kaskade durch Prickle und Strabismus blockiert, was ebenfalls zur Spezifizierung der Rezeptorzellen erforderlich ist (Jenny et al., 2005).

Frühe Embryogenese und Herzentwicklung im Zebrafisch

Die Embryogenese des Zebrafisches verläuft in mehreren Entwicklungsstufen. Das Zebrafischei besteht aus einer Animalpolzelle mit darunter liegender Dotterzelle (Abb. 4A). In den ersten drei Stunden der Entwicklung finden hauptsächlich Zellteilungen ohne Zellwachstum statt, bis aus der einzelligen Zygote ca. 1000 Zellen, die als Blastomere bezeichnet werden, hervorgegangen sind (Abb. 4B). Etwa zu diesem Zeitpunkt entwickelt sich extraembryonales Gewebe, das Dotter-Syncytium. Es

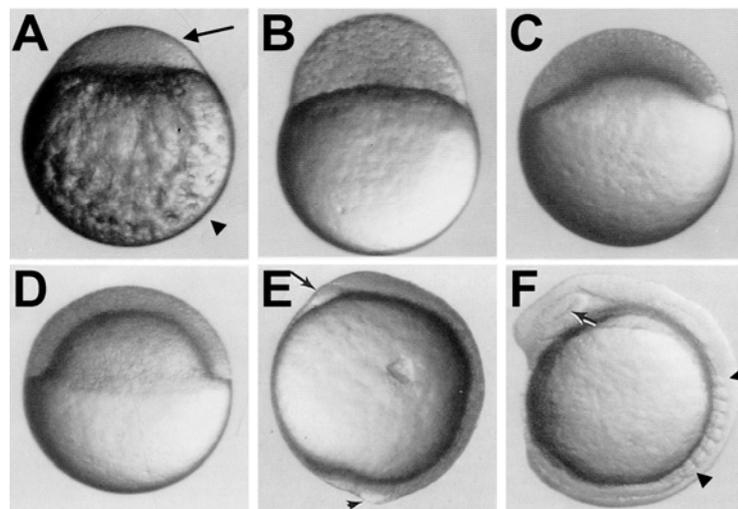


Abb. 4 Entwicklungsstufen des Zebrafischembryos Dargestellt sind laterale Ansichten von Zebrafischembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstufen. A) Gezeigt ist eine Zygote im Einzellstadium mit Animalpolzelle (Pfeil) und darunter liegender Dotterzelle (Pfeilspitze). B, C) Embryonen im Blastulastadium ~3 Stunden (B) und ~4 Stunden (C) nach Fertilisation sind dargestellt. D, E) Embryos bei 50% (D) und 100% (E) Epibolie markieren Anfang und Ende der Gastrulationsphase. Die antero-posteriore Körperachse des Embryos (E) ist flankiert vom Polster (Pfeil) und der Schwanzknospe (Pfeilspitze). F) 13 Stunden nach Fertilisation ist das 8-Somitenstadium erreicht. Deutlich zur erkennen sind die Somiten (Pfeilspitzen) und die Augenanlage (Pfeil). (Abbildungen entnommen aus Kimmel et al., 1995)

entsteht, wenn Blastomere, die die Grenzschicht zur Dotterzelle bilden, kollabieren und dabei ihr Zytoplasma und ihre Zellkerne in das Zytoplasma der Dotterzelle entlassen. Das Syncytium bildet die Grenzschicht zwischen Dotterzelle und Blastoderm und ermöglicht Zellwanderungen während der Gastrulation. Nach ca. 4 Stunden und weiteren Zellteilungszyklen beginnt ein Prozess, der als Epibolie bezeichnet wird (Abb. 4C). Dabei wandern die Blastomeren, vermittelt durch das Dotter-Syncytium, vom Animal- zum Vegetalpol des Embryos, wobei die Dotterzelle vollständig mit Blastodermzellen bedeckt wird. Circa 5 Stunden nach der Befruchtung ist die

Dotterzelle zur Hälfte mit Blastomeren bedeckt (50% Epibolie, Abb. 4D). Dies ist der Beginn der Gastrulationsphase, die nach weiteren 5 Stunden abgeschlossen ist. Am Ende der Gastrulation ist die Bildung der 3 Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) und die Etablierung der dorso-ventralen und antero-posterioren Körperachsen abgeschlossen (Abb. 4E). Nach der Gastrulation beginnt die Segmentierungsphase, in der entlang der antero-posterioren Körperachse die Bildung der Somiten erfolgt (Abb. 4F, Kimmel et al., 1995). Während der Gastrulation, beginnend ca. 5-6 Stunden nach Befruchtung des Eies, und auch in der anschließenden Segmentierungs- bzw. Neurulationsphase finden umfangreiche

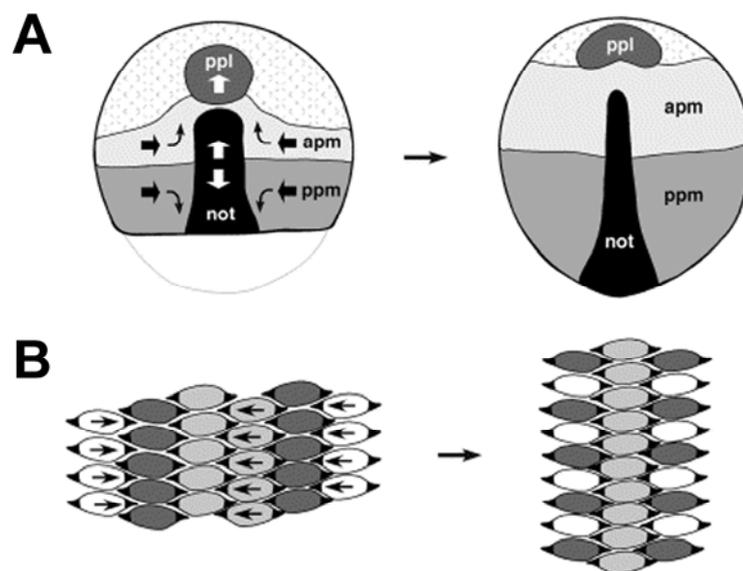


Abb. 5 Konvergenz und Extension im gastrulierenden Zebrafischembryo. A) Dargestellt sind schematische Abbildungen von Zebrafischembryonen bei 70% (A, rechts) und 100% (A, links) Epibolie (dorsale Ansicht, Anterior oben). Konvergenz- und Extensionsbewegungen von Zellen des antero- und postero-paraxialen Mesoderms (apm, ppm) werden durch Wnt11 (apm) und Wnt5a (ppm) vermittelt. Konvergenz und Extension von Mesodermzellen führt zur Kompression der medio-lateralen und Ausdehnung der antero-posterioren Achse, was anhand der Morphologie des Notochords (not) und der Position der Prächordal-Platte (ppl) deutlich wird (vergleiche Embryonen in A). B) Eine schematische Darstellung der Interkalationsprozesse von Mesodermzellen ist gezeigt. Embryonale Zellen des Mesoderms interkalieren medio-lateral (Pfeile in B, links), was zur Extension embryonaler Gewebe führt (B, rechts). (Abb. entnommen aus Tada et al., 2002).

Zellwanderungsprozesse statt, die als Konvergenz und Extension bezeichnet werden. In der Gastrulationsphase wandern laterale und ventrale Blastodermzellen zielgerichtet zur dorsalen Seite des Embryos (Abb. 5A). Diesen Vorgang bezeichnet man als Konvergenz. Die konvergierenden Blastodermzellen interkalieren mit Zellen des dorsalen Mesoderms (Abb. 5B), was zu deren Ausdehnung bzw. Extension entlang der

anterio-posterioren Körperachse führt und zur Bildung des chordalen Mesoderms, dem späteren Notochord beiträgt (Tada et al., 2002).

Während radial-symmetrische Zellwanderungen und Zellinterkalationen vom Animalpol zum Vegetalpol des Embryos (Epibolie) durch Wechselwirkungen des Dotter-Syncytiums mit dem Mesoderm vermittelt werden, erfolgt die Kontrolle von Konvergenz und Extension durch den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg (Solnica-Krezel and Driever, 1994; Cheng et al., 2004). Erste Hinweise auf Implikationen des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in der Kontrolle von Konvergenz und Extension erhielten Genetiker vor einigen Jahren, als sie Mutationen in Genen der Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 in den Zebrafisch-Mutanten *pipetail* und *silberblick* identifizierten (Hammerschmidt et al., 1996; Rauch et al., 1997; Heisenberg and Nusselein-Volhard, 1997; Heisenberg et al., 2000). Später wurden weitere Gene in Zebrafisch-Mutanten entdeckt, deren Fehlfunktionen zu Störungen von Zellwanderungsprozessen während der Gastrulation führten. So wurde gezeigt, dass in *trilobite*-, *knypek*- und *landlocked*-Mutanten die Gene Strabismus/Van-Gogh, Glypican4/6 und Scribble1 Mutationen aufwiesen, die zum Funktionsverlust des jeweiligen Proteins führten (Topczewski et al., 2001; Jessen et al., 2002; Wada et al., 2005). Es stellte sich die Frage, inwieweit dieser β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalweg mit dem PCP-Signalweg, der in *Drosophila* Planare Zellpolarität kontrolliert, übereinstimmt. Die Entwicklung der Antisense-Morpholino-Technologie erlaubte das gezielte Ausschalten von Genfunktionen in Zebrafisch-Embryonen (Corey and Abrams, 2001). So war es möglich, die Funktionen von Zebrafischgenen zu untersuchen, die Homologien zu PCP-Genen von *Drosophila* aufwiesen, um eine Konservierung des Signalweges zu überprüfen. Auf diese Weise konnte man zeigen, dass auch Gene wie Frizzled, Dishevelled, Prickle, Flamingo und Diversin, deren Homologe zu den Kern-PCP-Genen von *Drosophila* gezählt werden, ebenfalls an der Regulation von Konvergenz und Extension im Zebrafisch beteiligt sind (Sumanas et al., 2001; Schwarz-Romond et al., 2002; Veeman et al., 2003b; Formstone and Mason, 2005; Angers et al., 2006).

Darüber hinaus spielt der PCP-Signalweg im Zebrafisch für die Entwicklung von Organen, wie Herz und Gastrointestinaltrakt eine bedeutende Rolle (Matsui et al., 2005). Wie in allen Vertebraten bildet sich das Herz im Zebrafisch durch Fusion paariger Vorläuferpopulationen (siehe Abb. 6). Die Expression spezifischer Markergene, wie z. B. *gata5/faust*, *bmp2b/swirl* oder *fgf8/acerebellar* ist in

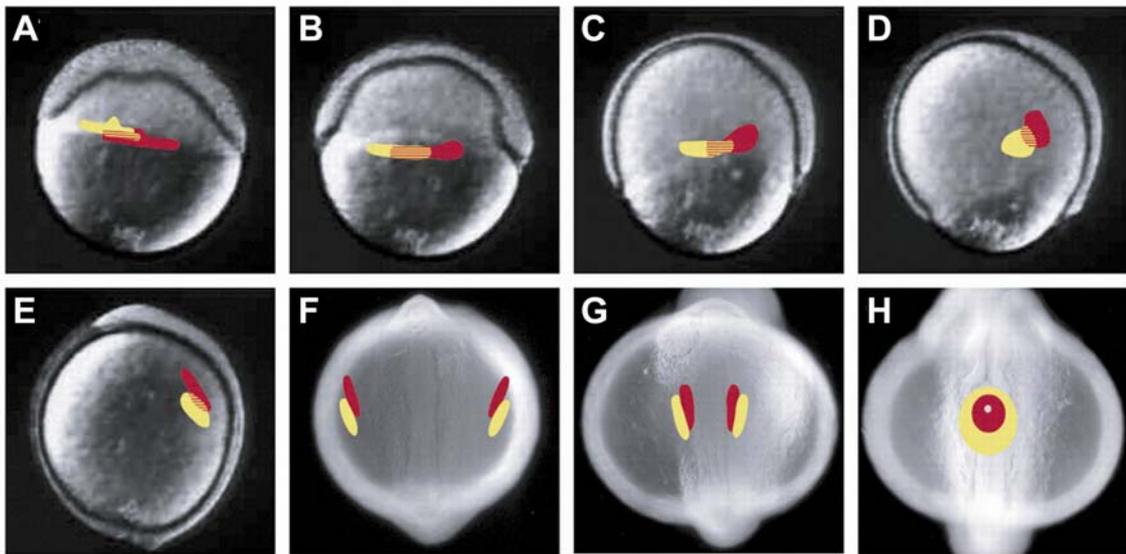


Abb. 6 Entwicklung des Herzens aus zwei Vorläuferpopulationen im Zebrafischembryo
 Dargestellt sind Zebrafischembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstufen, in denen atriale (gelb) und ventrikuläre (rot) Vorläuferzellen markiert sind. A-E) Laterale Ansichten von Embryonen und Position der Herzvorläuferzellen bei 40, 50, 70, 85 und 100% Epibolie sind gezeigt. F-H) Paarige Herzvorläuferpopulationen sind in dorsaler Ansicht von Embryonen im 5- und 15-Somitenstadium (F, G) und fusionierte Herzvorläufer im 22-Somitenstadium (H) zu erkennen. (Abbildung entnommen und modifiziert aus Keegan et al., 2004)

myokardialen Herzvorläuferzellen am Ende des Blastulastadiums zu beobachten. In späteren Embryonalstadien kennzeichnet die Expression des Transkriptionsfaktors *nkx2.5* myokardiale Vorläufer (Stainier, 2001). Die bilateralen Vorläuferzellen lassen sich nochmals in atriale und ventrikuläre Subpopulationen unterteilen (Abb. 6). Erstere bilden später die Herzvorkammer, das Atrium und letztere die Hauptkammer, den Ventrikel. Das muskuläre Gewebe beider Kammern besteht aus dem Myokardium, einer äußeren Muskelschicht und dem Endokardium, einem inneren endothelialen Gewebe (Keegan et al., 2004). Abbildung 6 zeigt die Wanderungsbewegungen der Herzvorläuferzellen im sich entwickelnden Embryo. Ursprung der Herzvorläuferzellen ist das laterale Mesoderm, in dem die myokardiale Differenzierung marginaler Blastomeren durch Expression spezifischer Gene induziert wird (Abb. 6A, Warga and Nusslein-Volhard, 1999). Während der Gastrulation und der Segmentierungsperiode wandern die Vorläuferzellen zur antero-lateralen Seite des Embryos, um schließlich in der Mitte des Embryos miteinander zu fusionieren (Abb. 6H). Es braucht nur etwa 22 Stunden, bis das Zebrafischherz zu schlagen beginnt.

Planare Zellpolarität in Vertebraten

Zahlreiche Studien in Vertebraten wie *Xenopus*, Zebrafisch oder Maus konnten belegen, dass die Kern-PCP-Gene, die in *Drosophila* die Rotation der Ommatidien im Auge oder die parallele Ausrichtung der Flügelhärchen kontrollieren, auch in Vertebraten vergleichbare Prozesse steuern. So manifestieren sich PCP-Defekte im Zebrafisch in Störungen der Konvergenz und Extension, während diese in der Maus zu Neuralrohrdefekten führen, die gekennzeichnet sind durch ein partiell oder komplett offenes Neuralrohr. Dieses Krankheitsbild wird als Spina Bifida bzw. Craniorachischisis bezeichnet und ist auch im Menschen ein häufiger Embryonaldefekt bei Neugeborenen (Copp et al., 2003). Außerdem koinzidieren schwere Neuralrohrdefekte des Typs Craniorachischisis mit Defekten des sensorischen Epithels im Innenohr, in dem die parallele Ausrichtung der Haarzellen gestört ist (Tabelle1).

Eine Übersicht und einen Vergleich von Genen, die in *Drosophila*, Zebrafisch und/oder Maus PCP-Signaltransduktion kontrollieren, ist in Tabelle1 gegeben. Eine erweiterte Liste der *Drosophila*-PCP-Gene ist in Strutt 2003 zu finden (Strutt, 2003).

Im Zebrafisch wurden die Wnt-Liganden Wnt4, Wnt5a und Wnt11 als Komponenten identifiziert, die Konvergenz und Extension regulieren (Rauch et al., 1997; Heisenberg et al., 2000; Matsui et al., 2005). In der Fliege dagegen konnten bislang keine Wnt-Liganden identifiziert werden, die PCP-Signaltransduktion induzieren (Lawrence et al., 2002). Allerdings wurde gezeigt, dass Gene wie *dachsous* (*ds*), *Fat* (*Ft*) und *four jointed* (*fj*) als Stromaufwärts-Komponenten Frizzled-Aktivität kontrollieren (Fanto and McNeill, 2004). Auch in der Maus konnten Wnt-Liganden bislang noch nicht eindeutig mit Planarer Zellpolarität in Verbindung gebracht werden (van Amerongen and Berns, 2006). Zwar wurde gezeigt, dass Wnt7a in der Cochlea graduell exprimiert wird und eventuell an der korrekten Ausrichtung der Haarzellen beteiligt ist, der Beweis dafür wurde jedoch noch nicht erbracht, zumal der Funktionsverlust von Wnt7a in der Maus nicht per se zu PCP-Defekten im Innenohr führt (Dabdoub et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist gezeigt, dass alle homologen Gene der Kern-PCP-Gene von *Drosophila*, wie *Fz*, *Dsh*, *Pk*, *Stbm/Vang*, *Fmi/Stan* und *Dgo/Diversin* im Zebrafisch am PCP-Signalweg partizipieren, was für eine Konservierung des Signalweges in Vertebraten spricht (Tabelle1). In der Maus führen Deletionen des *Fz6*-Gens zu Veränderungen des Musters der Körperhaare, die dem ungeordneten Muster der Flügelhaare in PCP-Mutanten der Fliege ähneln (Guo et al., 2004). Gen-Deletionen von *Fz6* in Kombination mit *Fz3* führen dagegen zu schweren PCP-Defekten, wie Craniorachischisis und

Defekten des sensorischen Epithels (Wang et al., 2006b). Diese Phänotypen ergeben sich ebenfalls in Dishevelled-1 und -2 doppelt-defizienten Mäusen, sowie in der Looptail-Maus, die eine Mutation im Van Gogh-like-2-Gen trägt und in Crash und Spin Cycle-Mutanten, die jeweils einen Gendefekt im Celsr1-Lokus aufweisen, der homolog zum Flamingo-Gen der Fliege ist (Tabelle1, Kibar et al., 2001; Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003; Wang et al., 2005). Interessanterweise existieren zwei weitere PCP-Gene in der Maus, Scribble1 und Protein-Tyrosinkinase-7, deren Funktionsverlust gleichfalls zu schweren PCP-Defekten führt (Montcouquiol et al., 2003; Lu et al., 2004). Die homologen Gene in Drosophila, Scribble und off-track, sind jedoch nicht mit PCP-Signaltransduktion assoziiert (siehe Tabelle1). Mutationen im Gen-Lokus des Proteoglykans Glypican-4/6 führen in der Zebrafisch-Mutante knypek zu schweren Defekten der Konvergenz und Extension (Topczewski et al., 2001). Auch hier kann dem entsprechenden Gen in Drosophila, Dally, keine Rolle im PCP-Signalweg zugeordnet werden (Lin and Perrimon, 1999; Baeg et al., 2001). Bemerkenswert ist, dass beide Gene als Wnt-Korezeptoren erachtet werden. Während Dally in der Fliege am Wnt/ β -Catenin-Signalweg partizipiert, reguliert knypek/Glypican-4/6 sowohl im Zebrafisch als auch in Xenopus morphogenetische Zellbewegungen während der Gastrulation durch den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Knypek/Glypican-4/6 wirkt hier als Korezeptor für Wnt11 (Topczewski et al., 2001; Ohkawara et al., 2003). Prickle und Diego werden zu den Drosophila-Kern-PCP-Genen gezählt. Bislang weiß man jedoch nicht, ob deren Funktionsverlust auch in der Maus ähnliche Defekte verursacht, wie sie in anderen Maus-PCP-Mutanten zu beobachten sind (Tabelle1). Darüber hinaus existieren Gene in der Fliege, wie Djun, JNK und Rac, deren Funktionsverlust per se kaum bzw. keine PCP-Phänotypen hervorrufen, von denen jedoch gezeigt wurde, dass sie als Stromabwärts-Effektoren PCP-Signale vermitteln (Kockel et al., 1997; Boutros et al., 1998; Fanto et al., 2000; Weber et al., 2000; Hakeda-Suzuki et al., 2002). In Xenopus-Embryonen ist JNK für die Vermittlung von Konvergenz und Extension erforderlich, dies wurde jedoch noch nicht für Zebrafisch-Embryonen beschrieben (Tabelle1). In der Maus führen kombinierte Gen-Deletionen von JNK1 und JNK2 zur Bildung von Exenzephalie, was einem Neuralrohrdefekt entspricht. Es ist jedoch unklar, ob es sich dabei um einen echten PCP-Defekt handelt oder ob dies das Ergebnis von deregulierter Apoptose von Zellen des ZNS dieser Maus-Mutante ist (Kuan et al., 1999).

Gen	Funktion	PCP-Phänotyp		
		Drosophila	Zebrafisch	Maus
Wingless (Wg)	sezerniertes Signalmolekül	keine PCP-Defekte [#]	Wnt4 (MO), CE [#] ; Wnt5a/pipetail, CE [#] ; Wnt11/silberblick, CE [#]	nicht bekannt
Frizzled (Fz)	7 Transmembrandomänen-Wnt-Rezeptor	PCP-Defekte in allen Geweben (Vinson et al., 1989)	Fz2 (MO), CE (Sumanas et al., 2001)	Fz6 (KO), Ausrichtung der Körperhaare zufällig [#] ; Fz3/6 (DKO), NRD (Cra.), Haarzellen des Innenohrs [#]
Dishevelled (Dsh)	Multiadapter Protein, zytoplasmatisch	PCP-Defekte in allen Geweben (Theisen et al., 1994)	Dvl2/3 (MO), CE Dvl2 (DN), Zellteilungsebene, CE, Herz- und Organentwicklung (Cardia Bifida) (Gong et al., 2004; Matsui et al., 2005; Angers et al., 2006)	Dvl1 (KO), verhaltensgestört (Lijam et al., 1997); Dvl2 (KO), Herzdefekte, NRD (SB) (Hamblet et al., 2002) Dvl1/2 (DKO), NRD (Cra.), Haarzellen des Innenohrs [#]
Prickle (Pk)	LIM-Domänen Protein, zytoplasmatisch	PCP-Defekte in allen Geweben (Gubb et al., 1999)	Prickle1 (MO), CE (Carreira-Barbosa et al., 2003)	nicht bekannt
Strabismus/ VanGogh (Stbm/Vang)	4 Transmembrandomänen-Protein	PCP-Defekte in allen Geweben (Taylor et al., 1998)	Strabismus/trilobite, CE (Jessen et al., 2002)	VanGogh-like2/looptail, NRD (Cra.), Haarzellen des Innenohrs [#]
Flamingo/Starry Night (Fmi/Stan)	7 Transmembrandomänen-Protocadherin	PCP-Defekte in allen Geweben (Usui et al., 1999a)	Fmi1a und 1b (MO), CE (Formstone and Mason, 2005)	Celsr1/crash/spin cycle, NRD (Cra.), Haarzellen des Innenohrs [#]
Diego (Dgo)	Ankyrin-Repeat Protein, zytoplasmatisch	PCP-Defekte in Flügelzellen und Ommatidien (Feiguin et al., 2001)	Diversin (MO), CE (Schwarz-Romond et al., 2002)	nicht bekannt
Dally	Proteoglykan, Wnt/Wg-Korezeptor	keine PCP-Defekte [#]	Glypican4/6/knypek, CE [#]	nicht bekannt
RhoA	kleine GTPase	PCP-Defekte in Flügelzellen und Ommatidien (Strutt et al., 1997)	RhoA (DN), CE, Herz- und Organentwicklung (Cardia Bifida) (Matsui et al., 2005)	nicht bekannt
Rac1	kleine GTPase	keine PCP-Defekte [#]	Rac1 (DN), CE (Bakkers et al., 2004)	nicht bekannt
Drosopila Rho-Kinase (Drok)	Kinase	PCP-Defekte in Flügelzellen und Ommatidien (Winter et al., 2001)	Rok2 (MO), CE (Marlow et al., 2002)	nicht bekannt
c-Jun N-terminale Kinase (JNK), basket	Kinase	keine PCP-Defekte (Riesgo-Escovar et al., 1996)	nicht bekannt In Xenopus (MO), CE (Yamanaka et al., 2002b)	JNK1/2 (DKO), NRD [#]
Scribble (Scrb),	Tumorsuppressor	keine PCP-Defekte (Bilder and Perrimon, 2000)	Scribble1/landlocked, CE (Wada et al., 2005)	Scribble1/circletail, NRD (Cra.), Haarzellen des Innenohrs [#]
off-track (otk)	Rezeptor-Tyrosinkinase	keine PCP-Defekte (Cafferty et al., 2004)	nicht bekannt In Xenopus (MO), CE, NRD (Lu et al., 2004)	Protein-Tyrosinkinase-7 (Ptk7) (KO), NRD (Cra.), Haarzellen des Innenohrs [#]

Tabelle1. PCP-Gene in Drosophila, Zebrafisch und Maus. Dargestellt ist eine Auswahl wichtiger PCP-Gene und Phänotypen entsprechender Mutanten. Abkürzungen: CE, Defekte in Konvergenz und Extension; DN, dominant-negativ; NRD, Neuralrohrdefekte; Cra., Craniorachischisis; SB, Spina Bifida; MO, Morpholinos; KO, knock-out; DKO, doppel-knock-out, [#]Referenzen im Text angegeben

Der Vergleich der Funktionen einiger Gene, die in *Drosophila* Planare Zellpolarität etablieren mit homologen Genen in Vertebraten verdeutlicht, dass diverse Aspekte des PCP-Signalweges konserviert sind. Dennoch bestehen Differenzen, die vermutlich zurückzuführen sind auf unterschiedliche Bedürfnisse der jeweiligen Spezies, was möglicherweise zu Modifikationen einiger Komponenten des Signalweges geführt hat (siehe auch Seifert and Mlodzik, 2007).

Die Funktionen des zytoplasmatischen Multiadapter-Proteins Dishevelled scheinen dagegen in allen Spezies gleich zu sein. In der Tat sind die bekannten funktionellen Domänen des Dishevelled-Proteins vom Süßwasserpolytyp Hydra bis zum Menschen hoch konserviert (Wallingford and Habas, 2005). Alle Dishevelled-Proteine enthalten eine N-terminale DIX-Domäne (Dishevelled, Axin), einen basischen Bereich (b), eine zentrale PDZ-Domäne (Post-synaptic density 95, Discs-large, Zonula occludens-1), eine C-terminale DEP-Domäne (Dishevelled, Egl-10, Plekstrin) und eine hoch konservierte Region am C-Terminus.



Abb. 7 Schematische Darstellung von Dishevelled. Abgebildet ist eine Übersicht der konservierten Dishevelled-Domänen.

Dishevelled interagiert direkt mit dem C-Terminus von Frizzled-Rezeptoren und stellt somit das erste intrazelluläre Glied in der Wnt-Signalkaskade dar (Wong et al., 2003). Es vermittelt die Aktivierung des Kanonischen und der Nicht-kanonischen Wnt-Signalwege, wobei bisher jedoch noch wenig verstanden ist, wie Dishevelled die verschiedenen Signale kanalisieren kann (Boutros and Mlodzik, 1999). Funktionsanalysen der konservierten Dishevelled-Domänen zeigten jedoch, dass die DIX-Domäne essentiell ist für die Signalvermittlung im Wnt/ β -Catenin-Signalweg und die DEP-Domäne notwendig für die Funktion Dishevelleds im Wnt/JNK-Signalweg ist (Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 1998). Die PDZ-Domäne scheint in beiden Signalwegen Funktionen zu besitzen und bildet ein Interface, das Protein-Interaktionen mit circa 20 Bindungspartnern vermittelt (Wallingford and Habas, 2005). In *Drosophila* wurde bislang ein Dishevelled-Gen, in Maus und Mensch wurden dagegen drei homologe Gene identifiziert (Klingensmith et al., 1994; Sussman et al., 1994; Klingensmith et al., 1996; Tsang et al., 1996). Während Dishevelled-1 und -2 gut charakterisiert sind, weiß man über Dishevelled-3 nur sehr wenig (Wharton, Jr., 2003).

Es ist jedoch zu vermuten, dass es aufgrund der Konservierung der funktionalen Domänen redundante Funktionen zu Dishevelled-1 und -2 besitzt, wie einige Arbeiten es auch vermuten lassen (Torban et al., 2004; Angers et al., 2006; Chan et al., 2006)

Die Funktion des Ankyrin-Repeat-Proteins Diversin im Wnt-Signalweg

Das Ankyrin-Repeat-Protein Diversin wurde in unserer Arbeitsgruppe von Thomas Schwarz-Romond als Interaktionspartner des ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe entdeckten Gerüstproteins Conductin/Axin2 in einem Hefe-2-Hybrid-Screen entdeckt (Behrens et al., 1998; Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin ist ein Adaptermolekül, das 8 N-terminale Ankyrin-Repeats, eine mittlere Kaseinkinase I ϵ - (CKI ϵ) und eine C-terminale Conductin-Bindedomäne enthält. In Vertebraten wie Mensch, Maus und Zebrafisch ist Diversin stark konserviert. In der Fliege besitzt das Planare Zellpolaritäts-Gen Diego die höchste Sequenzhomologie zu Diversin (Feiguin et al., 2001). Diversin gilt als negativer Regulator des Wnt/ β -Catenin- und als Aktivator des β -Catenin-unabhängigen Wnt/JNK-Signalweges. Diego dagegen besitzt diese duale Funktion nicht, sondern reguliert ausschließlich den dem Wnt/JNK-Signalweg sehr ähnlichen Wnt/PCP-Signalweg in der Fliege. Dieser Unterschied manifestiert sich auch in den Bindungseigenschaften von Diego im Vergleich zu Diversin. So bildet Diversin Immunkomplexe sowohl mit dem Gerüstprotein Conductin als auch mit dessen Homolog Axin. Diego dagegen fehlt die Domäne, die die Bindung zu Conductin/Axin vermittelt (Schwarz-Romond et al., 2002). Durch diese Interaktion wird Diversin in den β -Catenin-Abbaukomplex integriert. In diesem Protein-Komplex liegen Axin/Conductin-Dimere vor, die β -Catenin, Diversin und Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) binden, wobei letztere jeweils identische Axin/Conductin-Bindungsstellen besetzen. Diversin fungiert in diesem Komplex als Adapterprotein für CKI ϵ und vermittelt die Phosphorylierung von β -Catenin an Serin-45. Diese Phosphorylierung stellt ein Erkennungsmotiv für GSK-3 β dar, die nachfolgend Threonin-41, Serin-37 und -33 phosphoryliert (Amit et al., 2002). Das so phosphorylierte β -Catenin wird nun als Substrat von E3-Ubiquitinligase β -TrCP erkannt (Kitagawa et al., 1999). Die biologische Relevanz Diversins als negativer Regulator des Kanonischen Wnt-Signalweges wurde in Tiermodellen, wie Xenopus und Zebrafisch unter Beweis gestellt. In Zebrafischembryonen bewirkt die Überexpression von Diversin den Verlust Wnt/ β -Catenin-vermittelter Induktion des dorsalen Organisators, was zur Entwicklung

ventralisierter Embryonen führt, denen markanterweise die Kopfstrukturen fehlen. Injiziert man Zebrafischembryonen gegen Diversin gerichtete Antisense-Morpholinos, um Diversin-Expression zu unterdrücken, so hat dies eine ektopische Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zur Folge. Diese Embryonen sind stark dorsalisiert und gekennzeichnet durch Verlust ventraler Strukturen, wie z.B. der ventralen Schwanzflosse. In beiden Fällen ist die Spezifikation der dorso-ventralen Körperachse des Embryos stark beeinträchtigt (Schwarz-Romond et al., 2002).

Diversin reguliert jedoch nicht nur die Etablierung der dorso-ventralen Körperachse. Es ist auch essentieller Bestandteil des Nicht-kanonischen Wnt-Signalweges, der Konvergenz und Extension von Mesodermzellen während der Gastrulation reguliert. Hier liegt eine parallele Funktion zu dem Fliegen-Gen Diego vor. Beide Gene enthalten N-terminale Ankyrin-Repeats und können in Immunkomplexen mit CK1 ϵ kopräzipitiert werden. Überexpression von Diversin und auch von Diego beeinflusst im Zebrafischembryo die Etablierung der antero-posterioren Körperachse (Schwarz-Romond et al., 2002). Während Diegos Funktion im PCP-Signalweg in der Fliege intensiv untersucht wurde, ist über den molekularen Mechanismus von Diversin im Wnt/JNK-Signalweg nichts bekannt (Das et al., 2004; Jenny et al., 2005). Die CK1 ϵ - und die Conductin-Bindedomäne sind ausreichend für Diversins Funktion als negativer Regulator des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, wohingegen dessen Ankyrin-Repeat-Domäne für diese Funktion entbehrlich zu sein scheint. Ankyrin-Repeats sind beschrieben als Vermittler von Protein-Protein-Interaktionen und könnten deshalb einen Ansatz bieten, die Verbindung von Diversin mit dem Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg herzustellen (Mosavi et al., 2004).

Zielsetzung der Arbeit

Das Verständnis für die molekularen Mechanismen, die in Epithelzellen der Vertebraten Planare Zellpolarität induzieren, ist noch unvollständig. Das Ankyrin-Repeat-Protein Diversin ist in Prozesse eingebunden, die Zellwanderungen in sich entwickelnden Zebrafischembryonen koordinieren, um so die korrekte Etablierung der Körperachsen und die Entwicklung von Organen zu ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Funktion des Ankyrin-Repeat-Proteins Diversin im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus Diversin-abhängiger Signaltransduktion wurden die funktionalen Diversin-Domänen bestimmt und Diversin epigenetisch in den Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg, der Konvergenz und Extension im Zebrafisch kontrolliert, eingeordnet. Im nächsten Schritt wurden die molekularbiologischen Details der Funktion von Diversin untersucht. Hierzu galt es, neue Diversin-Interaktionspartner zu identifizieren, die an der Signalweiterleitung des Nicht-kanonischen Wnt-Signals beteiligt waren. Dazu war es erforderlich, cDNA-Bibliotheken mit der im Wnt/JNK-Signalweg aktiven Diversin-Domäne zu screenen. Die Relevanz der Interaktion neu identifizierter Bindungspartner für die Diversin-vermittelte Signaltransduktion im Nicht-kanonischen Wnt-Signalweg wurde mittels biochemischer und biologischer Assays überprüft und charakterisiert. Ein funktionaler Vergleich von Diversin- und Diego-vermittelter Planarer Zellpolarität gab Aufschluss über mögliche Parallelen bzw. Konservierung der Nicht-kanonischen Wnt-Signalkaskade von Vertebraten und Drosophila. Diese Arbeit trägt so zum Verständnis von Prozessen bei, die die Planare Zellpolarität in Vertebraten kontrollieren.