

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Die Embryonalentwicklung des Modellorganismus <i>Xenopus laevis</i> ..... | 1         |
| 1.2      | Zelladhäsion und ihre Bedeutung in der Embryogenese.....                  | 4         |
| 1.3      | Zelladhäsionsmoleküle.....  | 6         |
| 1.4      | Cadherine.....  | 8         |
| 1.4.1    | Aufbau und Struktur klassischer Cadherine.....                            | 8         |
| 1.4.2    | Die Bindungsfunktionen klassischer Cadherine.....                         | 12        |
| 1.4.3    | Morphoregulatorische Funktionen klassischer Cadherine.....                | 14        |
| 1.4.4    | Desmosomale Cadherine, Protocadherine und cadherinverwandte Proteine..... | 15        |
| 1.4.5    | Cadherine in <i>Xenopus laevis</i> .....                                  | 16        |
| 1.4.5.1  | Zygotische Cadherine.....   | 16        |
| 1.4.5.2  | Maternale Cadherine.....  | 17        |
| 1.5      | Dorsoventrale Musterbildung und der Wnt-Signalweg.....                    | 18        |
| 1.6      | Integrine und Zell-Substratadhäsion in <i>Xenopus</i> .....               | 21        |
| 1.7      | Zielsetzung der Arbeit.....   | 24        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>26</b> |
| 2.1      | Material und Bezugsquellen.....   | 26        |
| 2.1.1    | Bakterienstämme.....  | 26        |
| 2.1.2    | Vektoren.....   | 26        |
| 2.1.3    | Verwendete cDNA-Klone.....  | 26        |
| 2.1.4    | Oligodesoxynukleotide.....  | 26        |
| 2.1.5    | Antikörper.....   | 27        |
| 2.1.6    | Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme.....                          | 27        |
| 2.1.7    | Versuchstiere.....  | 27        |
| 2.1.8    | Kits.....   | 28        |
| 2.1.9    | Radioaktivität.....   | 28        |
| 2.1.10   | Trägermaterialien.....  | 28        |
| 2.1.11   | Chromatographiematrizes.....  | 28        |
| 2.1.12   | Reagenzien.....   | 28        |
| 2.1.13   | Geräte.....   | 30        |
| 2.1.14   | Sonstiges.....  | 30        |
| 2.2      | Arbeiten mit Material von <i>Xenopus laevis</i> .....                     | 31        |
| 2.2.1    | Puffer und Medien.....  | 31        |
| 2.2.2    | Induktion der Ovulation und Gewinnung von Embryonen.....                  | 31        |
| 2.2.3    | In vitro Fertilisation.....   | 32        |
| 2.2.4    | Embryonenpflege.....  | 32        |
| 2.2.5    | Mikroinjektion.....   | 32        |
| 2.2.6    | Whole Mount Blastocoeldach Immunfluoreszenzfärbung.....                   | 32        |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.2.7    | Zelldissoziation animaler Kappenexplantate.....                                | 33 |
| 2.2.8    | Adhäsionsassay.....  | 34 |
| 2.3      | Molekularbiologische Bearbeitung von DNA.....                                  | 34 |
| 2.3.1    | Medien, Puffer und Lösungen.....   | 34 |
| 2.3.2    | Phenolextraktion von DNA.....  | 36 |
| 2.3.3    | Präzipitation von DNA.....   | 36 |
| 2.3.4    | Analyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....                         | 36 |
| 2.3.5    | Agarose-Gelelektrophorese.....   | 37 |
| 2.3.6    | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Wieslander, 1979).....         | 37 |
| 2.3.7    | Dephosphorylierung freier DNA-Enden.....                                       | 38 |
| 2.3.8    | "Fill in" von 5' überhängenden Enden.....                                      | 38 |
| 2.3.9    | Entfernen 3' überhängender Enden.....  | 38 |
| 2.3.10   | Ligation mit T4 DNA-Ligase.....  | 38 |
| 2.3.11   | Herstellung kompetenter E. coli-Zellen.....                                    | 39 |
| 2.3.12   | Transformation von Bakterienzellen.....  | 39 |
| 2.3.13   | Identifizierung rekombinanter Plasmide in Bakterienkulturen.....               | 39 |
| 2.3.14   | Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....                              | 40 |
| 2.3.15   | Anlegen von Glycerinkulturen.....  | 40 |
| 2.3.16   | Präparation von Plasmid-DNA.....   | 40 |
| 2.3.16.1 | Präparation im Kleinmaßstab (Minipräp)<br>nach Birnboim und Doly (1979).....   | 40 |
| 2.3.16.2 | Präparation im Großmaßstab (Midipräp).....                                     | 41 |
| 2.3.16.3 | Präparation mit Quiagensäulen im Midi(Maxi)maßstab.....                        | 42 |
| 2.3.17   | Sequenzierung nach der Didesoxymethode (Sanger, 1977).....                     | 42 |
| 2.3.18   | Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....   | 43 |
| 2.3.18.1 | Isolierung von Gesamt-RNA aus Embryonen<br>(Chomczynski und Sacchi, 1987)..... | 43 |
| 2.3.18.2 | RT-PCR (Rupp und Weintraub, 1991).....   | 44 |
| 2.3.18.3 | cDNA-Synthese durch Reverse Transkription<br>(Random Hexamer Primed).....      | 44 |
| 2.3.18.4 | Amplifizierung von cDNA mittels PCR.....                                       | 44 |
| 2.4      | Molekularbiologische Bearbeitung von RNA.....                                  | 45 |
| 2.4.1    | Puffer und Lösungen.....   | 45 |
| 2.4.2    | RNase-freies Arbeiten.....   | 46 |
| 2.4.3    | In vitro Transkription.....  | 46 |
| 2.4.4    | Aufreinigung von in vitro Transkripten.....                                    | 47 |
| 2.4.4.1  | Aufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion.....                           | 47 |
| 2.4.4.2  | Aufreinigung über Silica Gel-Säulen.....                                       | 47 |
| 2.4.5    | Kombinierte in vitro Transkription und Translation.....                        | 48 |
| 2.4.6    | Whole Mount In situ Hybridisierung von Xenopus Embryonen.....                  | 48 |
| 2.4.6.1  | Darstellung der Digoxigenin-markierten antisense-Probe.....                    | 48 |
| 2.4.6.2  | Aufreinigung der Probe über Gelfiltration (Sambrook et al., 1989).....         | 49 |
| 2.4.6.3  | Hybridisierungsprotokoll.....  | 49 |
| 2.4.6.4  | Antikörperinkubation.....  | 50 |
| 2.4.6.5  | Farbreaktion.....  | 50 |
| 2.5      | Proteinbiochemische und immunchemische Methoden.....                           | 51 |
| 2.5.1    | Puffer und Lösungen.....   | 51 |
| 2.5.2    | Maßnahmen gegen proteolytischen Abbau.....                                     | 53 |

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.5.3    | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....  | 54        |
| 2.5.4    | Coomassie-Gelfärbung.....  | 54        |
| 2.5.5    | Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen.....   | 54        |
| 2.5.6    | Quantitative Proteinbestimmung.....  | 55        |
| 2.5.6.1  | Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....  | 55        |
| 2.5.6.2  | Proteinbestimmung durch UV-Absorption.....   | 55        |
| 2.5.7    | Autoradiographie von SDS-Proteingelen.....   | 55        |
| 2.5.8    | Aufreinigung von Fusionsproteinen.....   | 56        |
| 2.5.8.1  | Kleinmaßstab.....  | 56        |
| 2.5.8.2  | Großmaßstab.....   | 57        |
| 2.5.9    | Schlauchdialyse.....   | 57        |
| 2.5.10   | In vivo-Markierung von Proteinen mit <sup>35</sup> S-Methionin.....  | 57        |
| 2.5.11   | Aufreinigung von Proteinen aus Embryonenlysaten.....   | 58        |
| 2.5.12   | Aufreinigung von Glykoproteinen mit Con A-Sepharose.....   | 58        |
| 2.5.13   | Immunpräzipitation von Proteinen.....  | 58        |
| 2.5.14   | Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose.....   | 59        |
| 2.5.15   | Western Blot Analyse.....  | 59        |
| 2.5.15.1 | Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen.....   | 59        |
| 2.5.15.2 | Immunfärbung.....  | 60        |
| 2.5.15.3 | Immundetektion mittels Chemilumineszenz.....   | 60        |
| 2.6      | Histologische Techniken.....   | 61        |
| 2.6.1    | Puffer und Lösungen.....   | 61        |
| 2.6.2    | Fixieren von Embryonen.....  | 61        |
| 2.6.3    | Immunhistologische Färbung ganzer Embryonen.....   | 62        |
| 2.6.4    | Einbetten und Schneiden von Embryonen in Agarose.....  | 62        |
| 2.6.5    | Einbetten und Schneiden von Embryonen in Paraffin.....   | 63        |
| 2.6.6    | Histologische Färbung.....   | 63        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>64</b> |
| 3.1      | Darstellung der Deletionsmutanten.....   | 64        |
| 3.2      | Translationskontrolle.....   | 66        |
| 3.2.1    | Proteinexpression exogener Konstrukte im Embryo.....   | 67        |
| 3.3      | Mikroinjektion in Embryonen von <i>Xenopus laevis</i> .....  | 68        |
| 3.3.1    | Die dominant negative Überexpression von XB/U e349 führt neben Fehlwanderungen des Mesoderms zu Defizienzen der Dorsoventralachse..... | 68        |
| 3.3.2    | "Rescue"-Experimente.....  | 74        |
| 3.4      | Immunhistologische Befunde.....  | 77        |
| 3.5      | Whole Mount in Situ Hybridisierung.....  | 80        |
| 3.5.1    | Auswirkungen auf die Expression früher Markergene.....   | 80        |
| 3.5.2    | Auswirkungen auf die Expression später Markergene.....   | 85        |
| 3.6      | Nachweis früher Markergene mittels RT-PCR.....   | 89        |
| 3.7      | Der wechselseitige Einfluß von Zell- und Substratadhäsion in der frühen Embryonalentwicklung von <i>Xenopus</i> .....                  | 91        |

---

|               |   |            |
|---------------|---|------------|
| 3.7.1         | Einfluß der XB/U-Cadherin-Überexpression auf die Fibronektin-Matrixbildung des Blastocoeldaches von <i>Xenopus</i> .....                                | 91         |
| 3.7.2         | Einfluß der XB/U-Cadherin-Überexpression auf die Zell-Substratadhäsion animaler Kappenzellen.....   | 93         |
| 3.7.2.1       | Auswahl der Fibronektinkonstrukte und Aufreinigung der Fusionsproteine.....   | 93         |
| 3.7.2.2       | Adhäsionsassay.....   | 95         |
| <b>4</b>      | <b>Diskussion</b> .....   | <b>100</b> |
| 4.1           | Die Überexpression von XB/U e349 im dominant negativen Ansatz.....  | 100        |
| 4.2           | Die Überexpression von XB/U e349 führt zu drei unterschiedlichen Phänotypen.....  | 101        |
| 4.3           | Ein Rescue der Phänotypen ist in verschiedenen Ansätzen in unterschiedlicher Ausprägung möglich.....  | 105        |
| 4.4           | XB/U-Cadherin vermittelte Zelladhäsion ist am Community-Effekt beteiligt, beeinflusst den Wnt-Signalweg und die Expression mesodermaler Markergene..... | 108        |
| 4.5           | Die Überexpression von XB/U-Cadherinkonstrukten hat keinen Einfluß auf die Fibronektinmatrixbildung des Blastocoeldaches in vivo.....                   | 114        |
| 4.6           | XB/U e349 beeinflusst die activinabhängige Spreitung und Migration, nicht aber die Adhärenz animaler Kappenzellen.....                                  | 115        |
| <b>5</b>      | <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>120</b> |
| <b>6</b>      | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>122</b> |
| <b>Anhang</b> | .....   | <b>142</b> |
|               | Abkürzungen.....  | 142        |
|               | Veröffentlichungen.....   | 144        |
|               | Lebenslauf.....   | 146        |
|               | Danksagung.....   | 147        |