

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von XB/U-Cadherin bei der Mesodermdifferenzierung von *Xenopus laevis* untersucht. Hierzu wurden verschiedene Mutanten dieses Zelladhäsionsmoleküls erstellt und im dominant negativen Ansatz während der frühen Embryonalentwicklung in *Xenopus* untersucht.

4.1 Die Überexpression der Cadherinmutanten im dominant negativen Ansatz

Die nach Überexpression der verwendeten Cadherinkonstrukte beobachteten Effekte sind spezifisch: das Verhältnis auftretender Phänotypen war konzentrationsabhängig; die bifunktionell inaktive Doppelmutante XB/U e349 c38 zeigte annähernd keinen Effekt; die Effekte ließen sich durch Koinjektion mit anderen Konstrukten in Rescueexperimenten aufheben oder in Richtung des Wildtyps verschieben.

Sämtliche Cadherinkonstrukte zeigten in der Immunhistologie eine deutliche Überexpression gemäß der Auswahl des Injektionsortes in der dorsalen Marginalzone. Gleichwohl waren die Auswirkungen auf die Integrität des Zellverbandes hierbei qualitativ unterschiedlich.

Die dominant negative Expression der hochkonservierten cytoplasmatischen Cadherindomäne durch Injektion der zugehörigen RNA wirkt im Pancadherinansatz. Sie kompetiert die - Cateninbindung aller endogen vorhandener Cadherine (Kintner, 1992; Dufour et al., 1994; Holt et al., 1994).

Frühe Effekte von XB/U e349, wie die in dieser Arbeit festgestellte Dissoziation von Blastomeren aus dem Zellverband, die später diskutierten Wirkungen auf den Wnt-Signalweg und induktive Prozesse, sind zwar auf die Beeinflussung maternaler Cadherine zurückzuführen, werden aber entsprechend auch nach Überexpression der cytoplasmatischen Domänen von E- und N-Cadherin gefunden (Heasman et al., 1994). Beide maternalen Cadherine, XB/U- und EP/C-Cadherin, liegen koexprimiert in *Xenopus* vor und finden sich bis zur Gastrulation in allen neu gebildeten Zellmembranen, während der Gastrulation ubiquitär in allen drei Keimblättern (Herzberg et al., 1991; Ginsberg et al., 1991; Choi et al., 1990). Spätere Entwicklungsdefekte beziehen entsprechend auch die durch zygotische

Cadherine vermittelte Zelladhäsion mit ein. Die Expression extrazellulärer Deletionsmutanten läßt also keine Aussagen über die Funktion nur eines bestimmten, sondern aller zum Zeitpunkt der Expression vorhandener endogener Cadherine zu.

Anders interagiert die exprimierte cadherintypspezifische extrazelluläre Domäne in XB/U c38 homophil nur mit endogenem XB/U-Cadherin. Die Überexpression der cytoplasmatisch deletierten Mutante XB/U c38 ergab im immunhistologischen Befund keinen Hinweis auf eine verminderte Zelladhäsion. Die beobachtete Zelladhäsion könnte daher auf die Aktivität des endogenen EP/C-Cadherins zurückzuführen sein. Finnemann et al. (1995, 1997) berichten jedoch von einem Adhäsionsverlust in XB/U c38 exprimierenden Ltk-Zellen.

Aussagen über eine Möglichkeit der Beeinflussung -cateninvermittelter dorsaler Achsenbildung lassen sich durch Verwendung von XB/U c38 nicht treffen. Die Verwendung der extrazellulären Deletionsmutante XB/U e349 hingegen wirkt zwar nicht cadherinspezifisch, bietet aber die Möglichkeit, durch -Catenindepletion sowohl Zelladhäsions-, als auch -cateninabhängige Induktionsvorgänge und Achsenspezifizierung zu untersuchen.

4.2 Die Überexpression von XB/U Δ e349 führt zu drei unterschiedlichen Phänotypen

Die Überexpression von XB/u e349 führte zu drei unterscheidbaren Phänotypen. Der posteriorisierte Phänotyp I und der Spina bifida Phänotyp II werden auch nach Überexpression von cytoplasmatisch deletiertem EP/C- und XB/U-Cadherin nach MBT gefunden (Lee und Gumbiner, 1995; Kühl et al., 1996). Kühl et al. (1996) konnten zeigen, daß der beobachtete Phänotyp II einer Störung der Involution einwandernden Mesoderms während der Gastrulation zugrunde liegt. Anstatt zu involutieren, wandern manipulierte Zellen lateral um den Blastoporus herum und bilden so zwei Bänder axialen Gewebes (Abb. 4.1). Der die Gastrulation vorantreibende Vorgang der konvergenten Extension ist in manipuliertem Gewebe gestört (Lee und Gumbiner, 1995; Broders und Thiery, 1995; Kühl und Wedlich, 1996). Die Beeinflussung der konvergenten Extension bleibt allerdings auf die maternalen Cadherine beschränkt: So beeinflußt E-Cadherin unabhängig vom Injektionsort nicht die konvergente Extension sondern die Epibolie der animale Kappe (Levine et al., 1991).

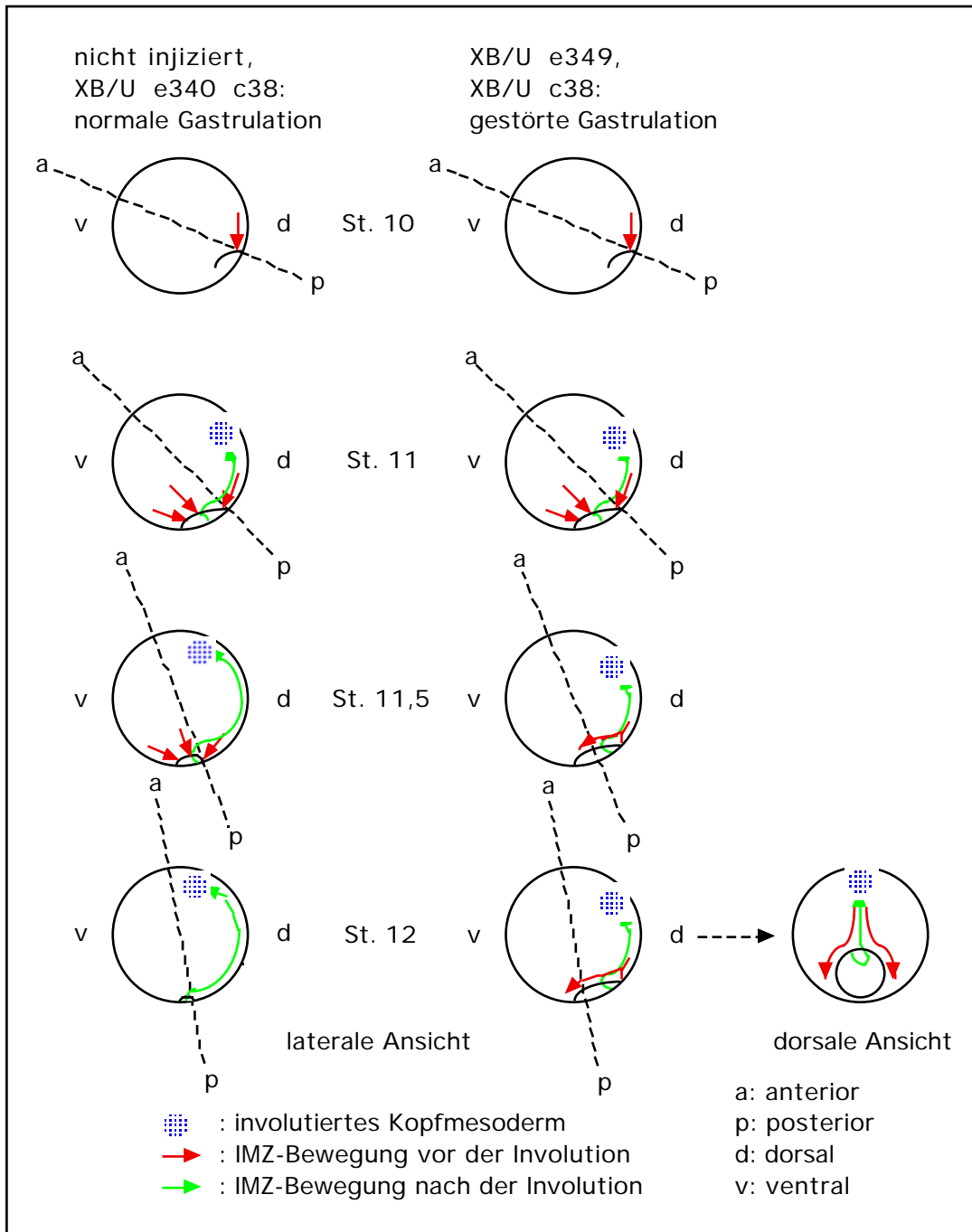


Abb. 4.1: Darstellung der Gastrulationsbewegungen normaler (links) und XB/U 349 bzw. XB/U c38 überexprimierender Typ I- und Typ II-Embryonen (rechts). Laterale Fehlwanderung der involutierenden Marginalzone (IMZ) vermindert die Progression und den Anteil anterioren (Kopf)mesoderms.

Bei geringerer RNA-Konzentration dominierte der posteriorisierte Phänotyp II mit Reduktion der Kopfstrukturen und Defekten in den Augenanlagen. Die anterioren neuralen Defekte dieses gegenüber Typ II abgeschwächte Phänotyps werden auch für die gerichtete anterior neurale Überexpression extrazellulärer Deletionsmutanten von E-, EP/C-, N- und

XB/U-Cadherin beschrieben, scheint aber für XB/U- und EP/C-Cadherin am stärksten ausgeprägt zu sein (Dufour et al., 1994; Broders und Thiery, 1995). Sie könnten auf eine verminderte oder fehlgerichtete Wanderung anterioren (Kopf)mesoderms zurückzuführen sein, mit dem Ergebnis, daß weniger Zellmaterial den anterioren Bereich des Embryos erreicht. Die Bedeutung der maternalen Cadherine für die Integrität des Kopfmesoderms als Voraussetzung für die gerichtete Migration konnte u.a. von Winkelbauer et al. (1992) gezeigt werden.

Der dritte Phänotyp III weist im Extremfall keinerlei Orientierung hinsichtlich der anteroposterioren und dorsoventralen Achse auf, in weniger schweren Fällen findet sich im Schwanzknospenstadium allerdings noch ein Rest des Flossensaums. Dieser Phänotyp wird von anderen Gruppen auch nach Überexpression der Wildtyp RNA von E-, N- und EP/C-Cadherin in Oocyten, in hohem Maße auch nach Überexpression extrazellulär deletierten N-Cadherins dorsal-äquatorial in Vierzellembryonen gefunden (Heasman et al., 1994/a; Holt et al., 1994). Fagotto et al. (1996) unterscheiden je nach Injektionsort von Wt-EP/C nach dorsal marginal oder dorsal vegetal Gastrulationsdefekte von Achsendefizienzen: ist die erste Region in erster Linie zellbewegungsaktiv, zeichnet sich die zweite eher durch Signalaktivität im frühen Embryo aus. Eine Diversität der Effekte in Abhängigkeit vom mehr animal oder vegetal gewählten Injektionsort konnten durch eigene Experimente nicht bestätigt werden. Vielmehr war das Verhältnis der unterschiedlichen Phänotypen allein von der eingesetzten RNA-Konzentration abhängig.

Um den Phänotyp III einer gestörten Signalaktivität zuordnen zu können (s.u.), ist daher der Vergleich der Phänotypen nach Überexpression -Catenin depletierender extrazellulärer mit solchen nach Überexpression cytoplasmatisch deletierter Cadherinmutanten der geeigneterer Ansatz. Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt die dorsal marginale Injektion von XB/U e349 in jedem Fall zu einem Auftreten aller drei Phänotypen. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von XB/U c38 auch bei erhöhter Konzentration niemals zu Typ III-Embryonen.

Die Verwendung des XB/U-Cadherin Wildtypkonstrukts resultierte nur in geringem Ausmaß in den Phänotypen I und II. Erst bei sehr hohen Konzentrationen trat vereinzelt der achsendefiziente Phänotyp III auf. Dies ist konsistent mit den immunhistologischen Befunden (Abb. 3.10.b), die für XB/UWt überexprimierende Zellen keine augenscheinliche Störung der Zelladhäsion ergaben, und mit der Tatsache, daß nach gezielt dorsal marginal überexprimiertem Wildtyp von E- und N-Cadherin in Zweizellstadien oder befruchteten

Eizellen von *Xenopus* keine Achsendefizienz beschrieben wurde (Detrick et al., 1990; Heasman et al., 1994). Die in diesen Arbeiten gegenüber XB/UWt verstärkt auftretenden Adhäsionsstörungen beschränken sich auf ektodermale Läsionen und gestörte Neuralentwicklung und legen für frühe Effekte den Schluß einer durch mosaikartigen Expression exogener Konstrukte erlangten Interferenz mit dem zelltypspezifischen und homophilen endogenen Adhäsionssystem maternaler Cadherine nahe. Die Überexpression des zu diesem Zeitpunkt tatsächlich endogen vorhandenen XB/U-Cadherins fügt sich hingegen nahezu nahtlos durch homophile Interaktionen in das bestehende Adhäsionssystem ein (Abbildung 4.2).

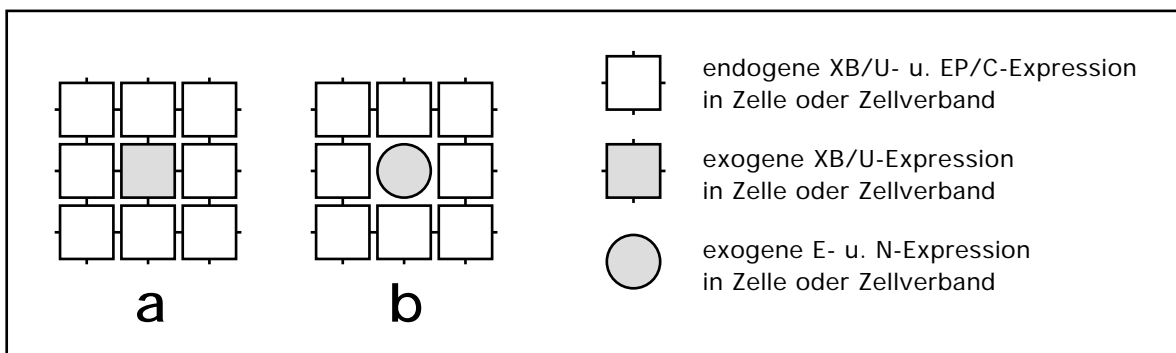


Abb. 4.2: Während sich XB/U-Cadherin überexprimierende Zellen durch homophile Interaktionen in den bestehenden Verband umgebener Zellen einbinden können (a), führt die Überexpression zygotischer Cadherine vor MBT zur Interferenz mit dem typspezifischen Adhäsionssystem endogen vorhandener maternaler Cadherine (b). Ektodermale Läsionen und eine gestörte Neuralentwicklung sind die Folge.

Die bisher publizierten Befunde hinsichtlich beobachteter Adhäsionsschäden und phänotypischer Ausprägung sind also aufgrund der Varianz in den verwendeten Cadherinspezies, den Injektionsorten und -zeiten nicht einheitlich. Für eine Diskussion einer möglichen Beteiligung cadherinvermittelter Zelladhäsion an anderen zellulären Prozessen, wie dem Wnt-Signalweg (s.u.), ist daher die experimentelle Verwendung endogen vorhandener Cadherinspezies, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, vorzuziehen.

4.3 Ein Rescue der Phänotypen ist in verschiedenen Ansätzen in unterschiedlicher Ausprägung möglich

Die Defizienz dorsoventraler Achsenausprägung bei Typ III-Embryonen ist auf die Depletion des in die gut untersuchte Wnt-Signalkaskade involvierten cytoplasmatischen β -Catenin-pools durch exogene cytoplasmatische Cadherin-domänen zurückzuführen. So wird dieser Phänotyp auch nach β -Catenin Antisense Oligodesoxynukleotid Knock Out-Experimenten beschrieben (Heasman et al., 1994). Als Mediator dorsoventraler Musterbildung wird β -Catenin dorsal im Kern lokalisiert gefunden; die Überexpression von β -Catenin oder Mikroinjektion eines vermutlich β -Catenin stabilisierenden Antikörpers auf der ventralen Seite führt in *Xenopus* zur Ausbildung einer zweiten Körperachse (Funayama et al., 1995; McCrea et al., 1993; Schneider et al., 1996).

Der Rescue der durch XB/U e349 erzeugten Phänotypen gelang durch Koinjektion von β -Catenin nur unvollständig. Der Anteil achsenreduzierter Embryonen ging um 87 % zugunsten der Zelladhäsionsphänotypen und normaler Embryonen zurück. Innerhalb Letzterer war allerdings ein deutlicher Shift von Typ I nach Typ II zu verzeichnen. Dieser aber vergleichsweise geringe Effekt auf die Zelladhäsion ist nicht etwa auf eine zu geringe RNA-Konzentration zurückzuführen, da eine sogar erhöhte Menge β -Catenin-RNA durch Koexpression mit XB/U e349 auf der ventralen Seite zu einer vollständigen Wiederherstellung der singulären Körperachse führt. Die in der Immunhistologie beobachtete unvollständige Wiederherstellung der Adhäsivität betroffener Gewebsregionen läßt neben β -Catenin vermittelter Wnt-Signaltransduktion Raum für die Hypothese einer Bedeutung der Zelladhäsion für die Induktion dorsoventraler Achsenstrukturen. Sollte das für E-Cadherin jüngst postulierte kooperative Reißverschlußmodell der Adhäsion auch für XB/U- und/oder EP/C-Cadherin gelten (Shapiro et al., 1995), wäre eine vollständige Wiederherstellung der Zelladhäsion ohnehin jenseits der Erwartungen. β -Catenin könnte die durch XB/U e349 gestörte Kooperativität vermutlich nicht absolut kompensieren: auch mit β -Catenin besetzte exogene cytoplasmatische Domänen konkurrierten um die Zytoskelettbindung.

Anders die Verhältnisse nach Rescue mit dem Wiltypkonstrukt von XB/U-Cadherin: immunhistologisch konnte die Wiederherstellung der Zelladhäsion gezeigt werden. Innerhalb der Zelladhäsionsphänotypen wurde ein deutlicher Shift zu posteriorisierten und zu

normalen Embryonen verzeichnet. Ein exogenes Wildtyp-Konstrukt könnte im Gegensatz zu β -Catenin effektiv eine durch XB/U e349 gestörte Adhäsion zumindest bis zu einem Gleichgewicht zwischen Mutante und Wildtyp kompensieren. Der hier beobachtete geringe Rescue der Phänotypen I und II beruht auf der vergleichsweise geringen Menge koinjizierter XB/UWt-Transkripte. Interessanterweise zeigte sich mit diesem Ansatz aber eine Reduktion des Phänotyps III um 45 % gegenüber lediglich XB/U e349 überexprimierenden Embryonen. Dies ist umso erstaunlicher, als daß koexprimierte intakte Cadherine über ihre cytoplasmatische Domänen die Konkurrenz zwischen Cadherinen und cytosolischen APC-Proteinen um die β -Cateninbindung und damit die Reduktion dorsaler Strukturen eigentlich noch verstärken sollten. Der stattdessen beobachtete Rescue-Effekt einerseits und das Ausbleiben achsenreduzierter Embryonen nach Überexpression selbst erhöhter Mengen an XB/UWt-RNA andererseits weist durchaus auf eine Notwendigkeit cadherinvermittelter Zelladhäsion für die Spezifizierung der Dorsoventralachse hin.

Sowohl der Rescue mit β -Catenin als auch der mit XB/UWt ist unvollständig. Ein vollständiger Rescue könnte hingegen durch Koinjektion von XB/U e349 mit XB/UWt und β -Catenin möglich sein, wobei hier allerdings der zunehmend toxische Effekt durch die erhöhte RNA-Menge in Betracht gezogen werden muß.

Die Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung von Plakoglobin werden in diesem Zusammenhang derzeit kontrovers diskutiert. β -Catenin und Plakoglobin werden zumindest bis zum Schwanzknospenstadium in *Xenopus* koexprimiert und finden sich, allerdings jeweils exklusiv, assoziiert mit der cytoplasmatischen Domäne klassischer Cadherine (DeMarais und Moon, 1992; Knudsen und Wheelock, 1992; Butz und Kemler, 1994). Beide erfüllen hier eine Brückenfunktion über β -Catenin zum Actin-Zytoskelett der Zelle. Anders als β -Catenin bindet Plakoglobin an desmosomale Cadherine, eine Bindung, die die Assoziation mit β -Catenin strukturell ausschließt (Wahl et al., 1996). Lewis et al. (1997) beschreiben E-Cadherin assoziiertes Plakoglobin (und nicht β -Catenin) als Voraussetzung für die Ausbildung funktioneller Desmosomen und vermuten hier eine besondere Signalrolle des Proteins. Plakoglobin bindet an das Produkt des Tumorsuppressorgens APC und weist nach ventraler Überexpression der korrespondierenden RNA in *Xenopus* dorsalisierende Eigenschaften auf (Karnovsky und Klymkowsky, 1995 und diese Arbeit).

Der Rescue nach dorsal marginaler Überexpression von XB/U e349 erhaltener Phänotypen durch Koinjektion mit Plakoglobin-RNA ergab ein von β -Catenin abweichendes Bild: offenbar

ist die Kompetenz von Plakoglobin, in das Zelladhäsionssystem einzugreifen, höher, als die Catenindepletion mit den Folgen der Achsendefizienz zu kompensieren. Sollten sowohl β -Catenin als auch Plakoglobin in vivo als Mediatoren des Wnt-Signalweges wirken, ließe sich aufgrund der hier dargelegten Ergebnisse für Plakoglobin allenfalls eine untergeordnete Rolle annehmen. Vor dem Hintergrund des beobachteten Anteils normaler und posteriorisierter Embryonen ist aber eine hauptsächliche Bedeutung von Plakoglobin innerhalb der Zelladhäsion wahrscheinlicher. So weisen Embryonen nach Plakoglobin Antisense Oligidesoxynukleotid Knock Out-Experimenten in Oocyten einen teilweisen Adhäsionsverlust, Gastrulationsverzögerung und eine gestörte Zytoarchitektur, nicht aber einen Verlust dorsaler Achsenstrukturen auf (Kofron et al., 1997, vergl. Heasman et al., 1994). β -Catenin und Plakoglobin sind daher hinsichtlich ihrer Adhäsions- und Signalfunktion nicht redundant. Die Achseninduktionskompetenz ventral exprimierten exogenen Plakoglobins und die Möglichkeit des Rescues durch cytoplasmatische Cadherindomänen könnten daher eher auf dem Vorhandensein struktureller als funktioneller Gemeinsamkeiten beider Proteine beruhen. Miller und Moon (1997) konnten zeigen, daß der Achsensinduktionskompetenz von exogenem Plakoglobin auf der ventralen Seite in *Xenopus* als indirekte Wirkung die Kernlokalisierung von endogenem β -Catenin zugrunde liegt. Zudem differieren Plakoglobin und β -Catenin hinsichtlich ihrer Translokation in den Kern. Hier ist lediglich β -Catenin zur Komplexierung von Lef-1 in der Lage (Simcha et al., 1998).

Zwar konnte anhand einer β -Cateninmutante die Unabhängigkeit der β -Catenininteraktion mit dem Cadherinsystem von seiner Rolle im Wnt-Signalweg ventral gezeigt werden, bei der eine Inhibierung der Achseninduktion durch Koexpression mit Wildtypcadherin nicht möglich ist (Fagotto et al., 1996); dies scheint aber in letzter Konsequenz für einen Ausschluß der Cadherinbeteiligung in vivo nicht ausreichend evident zu sein, da die experimentelle Ausgangssituation nicht von einer Störung der Zelladhäsion ausgeht. Interessant wäre hier der Vergleich von Embryonen nach exogener Expression von β -Cat mit XB/U c38+ β -Cat und XB/U c38+XB/UWt+ β -Cat auf der ventralen Seite des Embryos.

Bis heute ist eine Signalfunktion von β -Catenin nur im Kontext des Wnt-Signalweges bekannt und eine direkte Beteiligung von Cadherinen an der Transduktion des Wnt-Signals in den Kern bisher nicht beschrieben worden. Da β -Catenin-vermittelte Zelladhäsion und Signalvermittlung aber gleichzeitige Prozesse derselben Zelle sind, ist deren Koordination in

vivo wahrscheinlich. Denkbar wäre eine dynamische Feinregulation des cytoplasmatischen -Catenin-pools durch Cadherine in Abhängigkeit veränderter Adhäsion sich entwickelnder Gewebe. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einen Schluß in diese Richtung zu.

4.4 XB/U-Cadherin ist am Community-Effekt beteiligt, beeinflusst den Wnt-Signalweg und die Expression mesodermaler Markergene

Die Untersuchung mesodermaler Markergene hat in den letzten Jahren den rein deskriptiven Ansatz zugunsten der Erkenntnis molekularer wechselseitiger Einflüsse auf die Spezifizierung des Mesoderms verlassen und damit einen Komplexitätsgrad erlangt, der insbesondere Einflüsse des Cadherin-Systems hinsichtlich reiner Zelladhäsions- und/oder Signaleffekte nicht mit letzter Sicherheit unterscheiden läßt. So läßt die Störung des Cadherin/Catenin-Systems durch pancadherin-wirksame dominant negative Überexpression von XB/U e349 dorsal marginal für die erhaltenen Beobachtungen unterschiedliche interpretatorische Ansätze zu:

1. Die Depletion von -Catenin aus dem Wnt-Signalweg führt zu einer Reduktion Wnt-abhängiger Expression dorsaler Markergene.
2. Die gestörte Zelladhäsion resultiert in gestörter Induktion oder Erhalt der Expression diffusibler dorsaler Markergene. Bei diesem Einfluß können frühe induktive Effekte (i.e. Mesoderminduktion durch vegetale Signale), welche in Folge zu einer generellen Reduktion von Markergenen im affizierten Bereich führen können, und spätere Effekte, die über den Community-Effekt einzelne Marker betreffen, in Betracht gezogen werden.
3. Die reduzierte Expression eines Markergens beeinflusst die eines zweiten abhängigen Markergens (wechselseitiger Einfluß der Markergenexpression und damit indirekte Wirkung der Cadherinüberexpression).
4. Kombination aus 1. bis 3.

Holt et al. (1994) konnten in Reaggregationsexperimenten mit Muskel- und Notochordvorläuferzellen zeigen, daß die Induktion von MyoD nur in einer Mindestanzahl von einhundert Zellen mit engen Zellkontakten vonstatten geht. Hierfür ist das intakte cadherinvermittelte Zell-Zelladhäsionsystem essentiell (Community-Effekt). Der Verlust von MyoD nach Überexpression extrazellulär deletierten N-Cadherins (N^e) läßt sich durch Koexpression von Wildtyp N- oder E-Cadherin wieder aufheben. Dies ist konsistent mit den eigenen Ergebnissen, in denen die Überexpression von XB/U^e349, nicht aber von XB/U^wt zu einem Verlust oder einer starken Reduktion des Signals in der Whole Mount in situ Hybridisierung führte. Der fehlende Einfluß von XB/U^c38 in diesem Ansatz (Kühl et al., 1996) könnte auf der bestehenden Zelladhäsion des endogenen EP/C-Cadherins beruhen.

Die Detektion des MyoD-Signals wurde in dieser Arbeit in späteren Embryonalstadien vorgenommen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß hier zusätzlich auch frühe Induktions- und Signalwege betroffen sind. So geschieht die MyoD-Aktivierung als Antwort auf die Mesoderminduktion (Hopwood et al., 1989), was ebenfalls im Kontext des Community-Effekts gesehen werden kann. Die MyoD-Expression ist aber auch von dem Vorhandensein cytoplasmatischer β -Catenins abhängig und Wnt-reguliert (Heasman et al., 1994).

Interessanterweise führt auch die dominant negative Überexpression des bFGF-Rezeptors zu einer Reduktion von MyoD und zu Spina bifida Embryonen des Typs II mit Fehlwanderungen dorsalen Mesoderms (Isaacs et al., 1994). Inwieweit hier ein Zusammenhang mit dem Cadherinsystem besteht, ist ungeklärt.

Während die Überexpression cytoplasmatisch deletierten XB/U-Cadherins pre und post MBT keinen Einfluß auf die Signalstärke von XFD-1 nimmt, bewirkt XB/U^e349 einen dramatischen Verlust des Signals. Auch hier ist unter Ausschluß der Aktivität von EP/C-Cadherin in diesem Bereich von einer besonderen Einflußnahme des integren Zellverbandes auszugehen.

Die Ergebnisse hinsichtlich des panmesodermalen Markers Brachyury (Xbra) fielen schwächer aus. Zeigten 35 % der Embryonen kein Signal, so wiesen die anderen eine deutliche Schwächung innerhalb der Marginalzone und einen Verlust im Bereich putativer Überexpression von XB/U^e349 auf. Die Überexpression des XB/U-Cadherin-Wildtyps hatte dagegen keinen Effekt. Sokol konnte desweiteren direkt in Reaggregationsassays mit

Marginalzonenexplantaten die Bedeutung horizontaler calciumabhängiger Zell-Zellinteraktion innerhalb der Marginalzone für die Expression von Xbra, Xgsc und XWnt8 nachweisen (1994). Vor dem Hintergrund dieser und der eigenen Ergebnisse, muß die Beobachtung von Holt et al. (1994), die Überexpression von N e resultiere in keinerlei Änderung der Xbra-Expression, kritisch betrachtet werden. Zusammen mit der unveränderten Expression von Xbra nach -Catenindepletion (Heasman et al., 1994) muß also eher von einer Adhäsions- als von einer rein -Catenin abhängigen Expression von Xbra ausgegangen werden.

Auch vor dem Hintergrund gestörter eFGF-Expression wird die Beteiligung des Community-Effekts bei dem Erhalt der Xbra-Expression nach MBT diskutiert. Die Expression von Xbra und eFGF scheint durch eine autokatalytische regulatorische Schleife reguliert zu sein (Isaacs et al., 1994). Ob der geringere Effekt der XB/U e349-Überexpression auf Xbra auf einer Residualaktivität des Activin- und Wnt-abhängigen DNA-bindenden Transkriptionsrepressors Xgsc beruht, scheint hier zumindest möglich zu sein (Artinger et al., 1997).

Xgsc selbst ist jedoch infolge der Cadherinüberexpression reduziert. Daß der beobachtete Effekt der Mutante XB/U e349 sehr viel drastischer ausfiel, als der des Wildtyps XB/UWt, spricht neben einer Beteiligung des Wnt-Signalweges für eine starke Bedeutung der Zelladhäsion, was auch von anderen Autoren vermutet wird (Holt et al., 1994; Heasman et al., 1994; Sokol, 1994). Interessanterweise konnte für Goosecoid eine Funktion bei der Kontrolle der Gastrulationsbewegungen in der Regulation der konvergenten Extension gezeigt werden (Niehrs et al., 1993). Die nach XB/U e349 beobachtete Störung der Zelladhäsion könnte durch die zusätzlich verminderte gsc-Expression also noch verstärkt sein.

Einen möglichen Kandidaten für die Steuerung der goosecoid-Expression könnte das diffusible Protein des Spemann Organisers Noggin darstellen, welches zur Induktion von gsc in der Lage ist. Sowohl für die cytoplasmatisch als auch für die extrazellulär deletierte Mutante von XB/U-Cadherin zeigte sich in der RT-PCR eine Abschwächung, für die Koexpression von XB/U e349 mit XB/UWt oder -Catenin wieder eine leichte Verstärkung des Signals. Ähnliche Ergebnisse wurden für das Homeodomänenprotein des Spemann Organisers Chordin gefunden. Der Rescue gelang hier allerdings nur mit XB/UWt-RNA. Die Vielzahl experimenteller, für die jeweiligen Ansätze unabhängig und getrennt voneinander

auszuführender Schritte bergen aber gerade bei der empfindlichen RT-PCR eine Vielzahl von Fehlerquellen, die eine vergleichende Interpretation nur mit Vorsicht gestatten.

Auch die veränderte Expression der späteren dorsalen Markergene Troponin und Engrailed war vor dem Hintergrund der beobachteten Wanderungsdefekte und verminderter Ausprägung anterioren Mesoderms zu erwarten. Die Bedeutung des Community-Effektes für die Entwicklung des Kopfmesoderms konnte zwar von Wilson und Melton gezeigt werden (1994), die Engrailedexpression scheint aber zusätzlich Wnt-reguliert zu sein (Koster et al., 1996).

Die dorsal marginale Überexpression von XB/U e349 beeinflusst stärker als XB/U c38 die Zell-Zelladhäsion im Bereich des Spemann Organisators. Alle in diesem Bereich untersuchten und zum Zeitpunkt der Spezifizierung dorsalen Mesoderms exprimierten Markergene werden durch die Beeinflussung des Cadherinsystems in Mitleidenschaft gezogen. Integre Zelladhäsion scheint für die normale Induktion und wechselseitige Regulation diffusibler Signale also eine wichtige Rolle zu spielen (Abb. 4.3). Auf welcher zeitlich-funktionellen Ebene, Mesoderminduktion und/oder Spezifizierung des Mesoderms, cadherinvermittelte Zelladhäsion in erster Linie notwendig ist, bleibt ungeklärt. Aber auch die in diesem Ansatz möglicherweise erlangte Herunterregulierung Wnt-abhängiger dorsaler

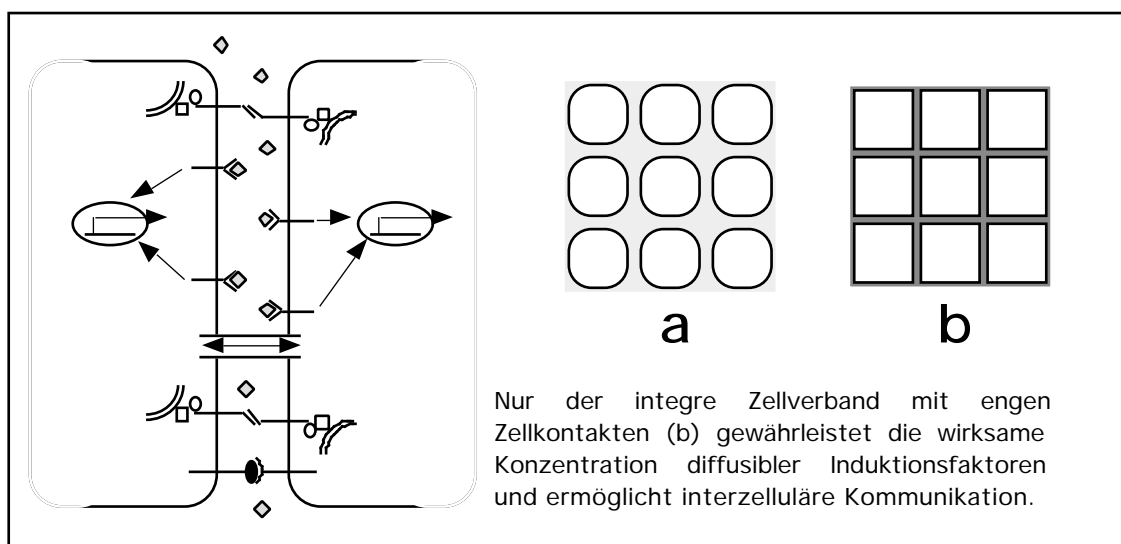


Abb. 4.3: Integre Zell-Zelladhäsion als Voraussetzung interzellulärer Kommunikation. Nur die Ausbildung enger Zellkontakte ermöglicht die Signalvermittlung über membranständige Ligand-Rezeptorinteraktionen und Gap-Junctions. Sie erhöht aber auch die Konzentration diffusibler labiler Induktionsfaktoren innerhalb des Zellverbandes über eine wirksame Schwelle (a, b).

Marker durch Depletion von β -Catenin aus dem Wnt-Signalweg spräche letztendlich für die Notwendigkeit einer dynamische Regulation von Zell-Zelladhäsion und Signalvermittlung mit β -Catenin als gemeinsamem Mediator. Promotorstudien an den maternalen Cadherinen böten hier und vor dem Hintergrund gsc-regulierter konvergenter Extension (s.o) eventuell interessante Einblicke.

Das frühe ventrale Markergen Xvent-1 zeigte in der Whole Mount in situ Hybridisierung und in der RT-PCR erwartungsgemäß keine veränderte Expression in XB/U e349 dorsal marginal überexprimierenden Embryonen.

Interessanterweise zeigte sich aber reproduzierbar bei annähernd 60 % der untersuchten Embryonen unabhängig vom Phänotyp keinerlei und bei den restlichen meist nur ein schwaches T1Globin-Signal. Strikt begrenzt auf den dorsalen Bereich der Marginalzone kann XB/U e349 unmöglich direkt für die Expression dieses ventralen Markergens verantwortlich sein. Entgegen der früheren Auffassung, ein dorsaler Grundzustand des Embryos würde durch graduelle Reduktion dorsaler Determinanten zur ventralen Seite des Embryos hin das dorsoventrale Schicksal mesodermaler Zellen bestimmen, wird heute mit BMP-4 als zentrales ventralisierendes Morphogen der ventrale Zustand als Grundzustand des frühen Embryos angesehen (Graff, 1997). Dorsale und neurale Strukturen entwickeln sich nur in Abwesenheit des BMP-Signals. Die primäre Aufgabe des Organisators ist es demnach, der Ventralisierung antagonistisch entgegenzuwirken. Es konnte gezeigt werden, daß sekretierte Proteine des Organisators wie Noggin, Chordin und Follistatin direkt BMP-4 binden und damit für die Ventralisierung inaktivieren (Piccolo et al., 1996; Zimmermann et al., 1996; Fainsod et al., 1997). Eine Erklärung für die beobachtete Reduktion von T1Globin könnte in der primären Reduktion dieser BMP-4 bindenden Proteine liegen. BMP-4 würde dorsal nicht mehr ausreichend inaktiviert werden und der so weiter nach dorsal verlaufende BMP-4-Gradient zu einer absoluten Reduktion von BMP führen. Unterhalb einer kritischen Schwelle auf der ventralen Seite des Embryos wäre die Induktion des ventralen Markers T1Globin nicht mehr gewährleistet. Sowohl der Rescue XB/U e349 dorsal marginal überexprimierender Embryonen mit BMP-4 auf der ventralen als auch mit β -Catenin auf der dorsalen Seite ohne Bevorzugung eines bestimmten Phänotyps und - im ersten Fall ohne phänotypischen Rescue - fügen sich in dieses hypothetische Modell ein (Abb. 4.4). Die Haltbarkeit dieses Modells müssen allerdings noch weitere Experimente zeigen.

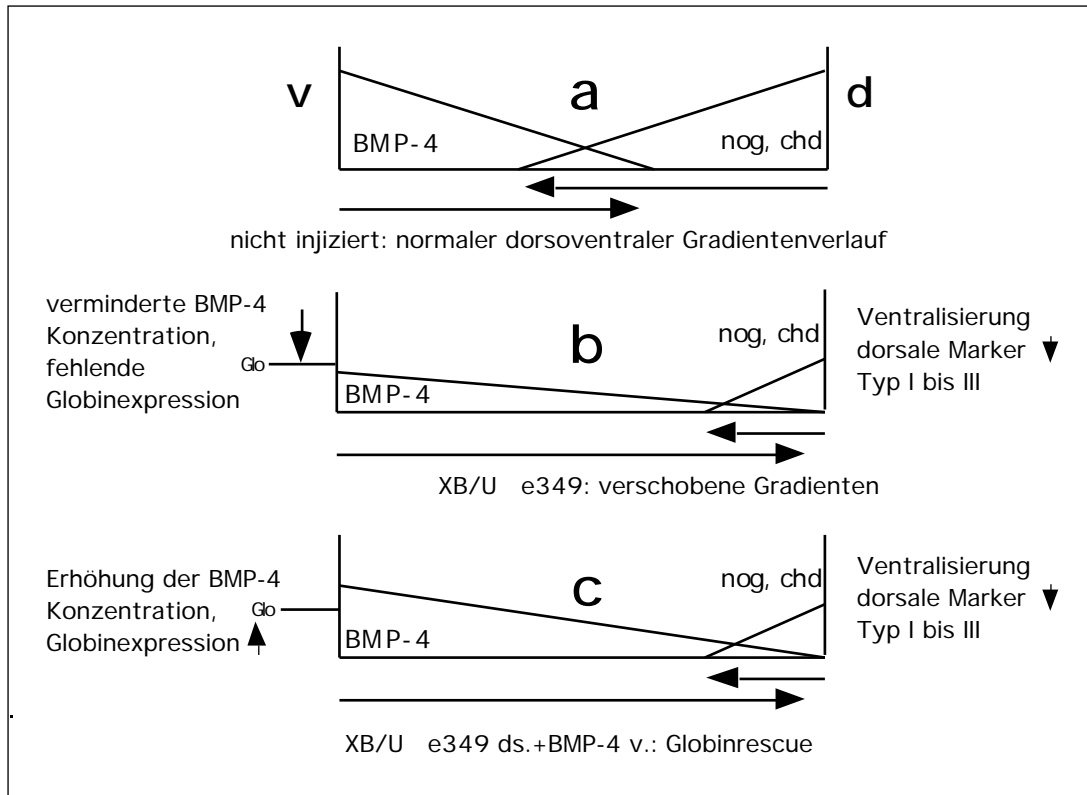


Abb. 4.4: Hypothetische Erklärung der in der Whole Mount in situ Hybridisierung für T1Globin erhaltenen Ergebnisse. a) Gradientenverlauf der Antagonisten BMP-4 und Noggin/Chordin der normalen *Xenopus*-Blastula. b) XB/U e349-Überexpression führt zu einer Verringerung von Chordin und Noggin, der BMP-4-Gradient verschiebt sich nach dorsal mit verringerter ventraler Konzentration. c) Koinjektion von BMP-4 auf der ventralen Seite führt zum Globinrescue, nicht aber zur phänotypischen Veränderung.

Eigene Versuche, ein verändertes Expressionsprofil von BMP-4 nach XB/U e349 Überexpression im Embryo mittels Whole Mount in situ Hybridisierung nachzuweisen, gelangen bisher nicht. Eine Herunterregulierung von BMP-4 und Xvent-1 ist dabei nicht unbedingt zu erwarten, vielmehr ist mit einer Ausdehnung des räumlichen Expressionsprofils nach dorsal zu rechnen (Dosch et al., 1997).

Die Frage, ob die Störung cadherinvermittelter Zelladhäsion mit einer generellen Reduktion von Mesoderminduktion einhergeht, ist nicht ohne weiteres zu beantworten. Generalisierte Depletion beider Cadherine in Antisense Oligodesoxynukletid Knock Out-Experimenten scheidet wegen fehlender Integrität des Embryos aus. Der wie in dieser Arbeit verwendete dominant negative Ansatz einer extrazellulären Cadherinmutante auf der ventral marginalen Seite des Embryos vor der Mid Blastula Transition könnte aber Hinweise auf die Expression ventraler Marker geben. Zumindest die phänotypische Ausprägung ist im Vergleich zur

Expression auf der wanderungsaktiveren dorsalen Seite des Embryos eher moderat (eigenes Ergebnis, nicht gezeigt).

Es kann aufgrund der hier dargelegten Ergebnisse aber festgestellt werden, daß cadherinvermittelte Zell-Zelladhäsion direkt und indirekt in den Kontext induktiver Signale während der Mesodermspezifizierung eingebunden ist.

4.5 Die Überexpression von XB/U-Cadherinkonstrukten hat keinen Einfluß auf die Fibronektinmatrixbildung des Blastocoeldaches in vivo

Während der Gastrulation erlangt die involutierende Marginalzone Kontakt zur inneren Oberfläche des Blastocoeldaches. Dieses ist in Amphibien mit einem fibrillärem Netzwerk von Fibronektin ausgekleidet (Boucaut und Darribère, 1983; Nakatsuji und Johnson, 1983; Lee et al., 1984). Die absolute Bedeutung von Fibronektin wird allerdings in Abhängigkeit von der betrachteten Spezies kontrovers diskutiert. Die für den Urodelen *Pleurodeles* beschriebene hinreichende Notwendigkeit von Fibronektin für Gastrulation und mesodermale Zellmigration (Boucaut et al., 1984; Darribère et al., 1990) läßt sich nicht unbedingt auf *Xenopus* übertragen. Für die Adhärenz mesodermaler Zellen auf dem Blastocoeldach ist Fibronektin in *Xenopus* hinreichend aber nicht notwendig; hier wird ein zusätzlicher fibronektinunabhängiger Zell-Zellkontakt, welcher nicht über maternales XB/U- oder EP/C-Cadherin vermittelt wird, angenommen (Winklbauer und Keller, 1996). Anders als in *Pleurodeles* blockieren die Zugabe von RGD-haltigen Peptiden oder gar die Entfernung des Blastocoeldaches bei *Xenopus* die Gastrulation nicht (Winklbauer, 1989; Smith et al., 1990; Keller und Jansa, 1992). Fibronektin erfüllt zudem nicht die Aufgabe einer mechanischen Barriere zwischen mesodermalen und Blastocoeldachzellen, ist aber sehr wohl notwendig für Migration und Ausbildung von Ausläufern mesodermaler Zellen (Winklbauer und Keller, 1996).

Ob und auf welcher Ebene der Zell-Substratadhäsion in vivo ein Zusammenhang mit cadherinvermittelter Zell-Zelladhäsion besteht, ist bisher unklar. Finnemann et al. (1995) finden in mit murinem E-Cadherin oder XB/U-Cadherin stabil transfizierten XTC-Zellen eine Herunterregulation der Synthese von Fibronektin und $\alpha_1\beta_3$ -Integrin, nicht aber von $\alpha_2,4,5,6$ und β_3 -Integrinuntereinheiten. Die Zugabe gegen die extrazelluläre Domäne von XB/U-

Cadherin gerichteter Fab-Fragmente hat auf dieses Ergebnis keinen Einfluß. Gradl et al. (1997) konnten durch Kotransfektion mit XWnt8, humanem β -Catenin und durch Inhibition von gsk-3 mit LiCl die Wnt-abhängige Synthese von Fibronektin und $\alpha_3\beta_1$ -Integrin zeigen. Cadherintransfizierte XTC-Zellen zeigen zudem eine drastisch reduzierte Adhärenz auf Fibronektin. Der Cadherineinfluß in diesem artifiziellen System beschränkt sich also auf die Signalvermittlung. Dagegen inhibieren Antikörper gegen E- und P-Cadherin in sich terminal differenzierenden Keratinocyten sowohl die calciuminduzierte Stratifikation als auch die Integrinsynthese (Hodivala und Watt, 1994).

Ein entsprechender in vivo-Einfluß XB/U-Cadherin überexprimierender animaler Kappen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Weder wurde dabei eine durch XB/UWT oder XB/U e349 mögliche putative Kompetition des Wnt-Signalweges noch eine durch XB/U e349 mögliche Störung der Zelladhäsion mit Einfluß auf die Menge oder fibrilläre Organisation von Fibronektin des Blastocoeldaches festgestellt. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf den umfangreichen maternalen Speicher an Fibronektin und Integrinen zurückzuführen, der eine Transkriptionsänderung maskieren würde. Die Kappenpräparation in diesem experimentellen Ansatz erforderte allerdings die weitestgehende Integrität der animalen Kappe. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß zu stark adhäsionsdefiziente animale Kappenexplantate insbesondere nach Überexpression der extrazellulären Deletionsmutante von XB/U-Cadherin einen Effekt zeigen. RT-PCR-Untersuchungen manipulierter Kappenexplantate könnten hier unabhängig von der resultierenden Adhäsion Aussagen hinsichtlich der Fibronektinsynthese ermöglichen. Die selektive Überexpression cytoplasmatisch deletierten XB/U- und EP/C-Cadherins in animalen Kappen würde unter Beibehaltung des jeweils anderen maternalen Cadherinsystems einen weniger drastischen Zelladhäsionseffekt setzen und auf diese Weise zum Erfolg führen.

4.6 XB/U Δ e349 beeinflusst die activinabhängige Spreitung und Migration, nicht aber die Adhärenz animaler Kappenzellen

Der morphogenetische Prozeß der Gastrulation in *Xenopus* erfordert die Adhäsion und Migration mesodermaler Zellen auf dem extrazellulären Matrixprotein Fibronektin des Blastocoeldaches. Während alle embryonalen Blastomeren zu diesem Zeitpunkt in der Lage sind, auf Fibronektin zu adhären, ist ihre Fähigkeit zur Migration positionsspezifisch und

temporär reguliert. So zeigen zwar Zellen der involutierenden Marginalzone in vitro Spreitung und Migration auf Fibronektin, nicht aber Zellen des preinvolutierenden Mesoderms, des vegetalen Endoderms oder der animalen Kappe. Der Regulationsmechanismus, der diesem Zellverhalten zugrunde liegt, beinhaltet die Erkennung multipler zellinteraktiver Epitope innerhalb des Fibronektinmoleküls. Ramos et al. (1996) konnten zeigen, daß neben dem RGD-Motiv in der Untereinheit III 10 des Fibronektinmoleküls ein weiteres, synergistisch wirkendes Epitop der Untereinheit III 9 (Synergie-Epitop) von entscheidender Bedeutung ist, welches activinabhängig und vermutlich über ein Inside-Out-Signal (Hynes, 1992) beteiligter Integrinrezeptoren vermittelt wird. So resultiert auch die Behandlung von Blastomeren der animalen Kappe von *Xenopus* mit Activin A integrinvermittelt in Adhärenz, Spreitung und Wanderung dieser Zellen auf einem Fibronektin-Substrat (Smith et al., 1990).

In XB/U e349 überexprimierenden Kappenzellen war die Fähigkeit zur activinabhängigen Spreitung und Migration der Zellen auf Fibronektin erheblich reduziert. Spreitungs- und Migrationsverhalten der Zellen auf den verwendeten Fusionskonstrukten von Fibronektin deuten auf eine Störung activinabhängiger Erkennung des Synergie-Epitops in der Untereinheit III 9 des Fibronektins hin. Wie die Störung der Zell-Zelladhäsion eine Veränderung des Zell-Substratadhäsionsverhaltens herbeiführt, ist unklar. Während die activinabhängige Spreitung und Migration per se weder Transkription noch Proteinsynthese erfordern (Ramos et al., 1996), wäre zumindest infolge der Störung des cadherinvermittelten Zell-Zelladhäsionssystems eine veränderte Integrinexpression im Vorfeld der Activinwirkung denkbar (Finnemann et al., 1995; Gradl et al., 1997). Die hier in Frage kommende α_3 -Untereinheit von Fibronektin liegt zwar maternal gering exprimiert vor, erfährt aber erst während der Gastrulation einen Expressionsanstieg und zeigt zudem ein gewebsspezifisches Expressionsmuster: es wird zunächst im dorsalen involutierenden Mesoderm exprimiert und scheint die anteriore Progression des presumptiven Notochords zu begleiten, wird aber nicht im stark wandernden Kopfmesoderm gefunden. Für das an Fibronektin bindende $\alpha_3\beta_1$ Integrin (Hynes, 1992) wird daher eher eine Beteiligung an der konvergenten Extension und der Notochordentwicklung angenommen (Whittaker und DeSimone, 1993). Als wahrscheinlicher Kandidat für die Regulation von Adhärenz, Spreitung und Migration auf Fibronektin wird $\alpha_5\beta_1$ Integrin angesehen. Es ist auf allen Zellen des frühen Embryos stark exprimiert, erkennt abhängig von seinem Aktivierungszustand RGD- und Synergieepitop und ist über Inside-Out-Signale aktivierbar (Joos et al., 1995;

Aota et al., 1991; Danen et al., 1995; Faull et al., 1993). Die Expression der α_5 -Integrinuntereinheit wird durch stabile Transfektion von XTC-Zellen mit XB/U- oder murinem E-Cadherin aber nicht beeinflusst. Zwar zeigen die Autoren in XB/U-Cadherin transfizierten XTC-Zellen eine um 17 % und nach E-Cadherin-Transfektion eine um 42 % verminderte α_1 -Integrinexpression, finden aber im Gegensatz dazu einen vollständigen Adhäsionsverlust für XB/U- und eine lediglich um 25 % verminderte Adhäsion für E-Cadherin transfizierte Zellen auf Fibronektin (Finnemann et al., 1995). Vor dem Hintergrund vor allem der unverminderten Adhärenz XB/U e349 überexprimierender Zellen auf Fibronektin und dem RGD-Fusionskonstrukt sowie dem der Kontrollen entsprechenden Verhalten XB/UWt überexprimierender Kappenzellen erscheint eine veränderte Integrinexpression ebenfalls weniger wahrscheinlich. Eine Klärung dieser Frage ist letztendlich nur durch quantifizierende Experimente möglich.

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen aber eher für eine Beeinflussung der activinabhängigen Inside-Out-Signalvermittlung beteiligter Integrinrezeptoren. Bei diesem Mechanismus wird eine activininduzierte Konformationsänderung der Ligandenbindungstasche extrazellulärer Rezeptordomänen angenommen, die den Übergang von einem Zustand hoher Ligandenaffinität unter RGD-Bindung zu einem Zustand geringer Ligandenaffinität unter zusätzlicher Erkennung des Synergieepitops vermittelt (Danen et al., 1995; DeSimone, 1997). Wie die Repression dieser spezifischen Activinantwort durch XB/U e349 induziert werden könnte, ist unklar (Abb. 4.5). Fest steht, daß die Situation im Embryo vor Präparation, Vereinzelung der Zellen und Activinzugabe entscheidend sein muß. Ein direkt auf Activin bezogener Community-Effekt scheidet hier also als Interpretationsmöglichkeit aus. Offen ist weiterhin, ob unter dem Einfluß von XB/U e349 eine generelle oder auf das Inside-Out-Signalling der Integrine beschränkte Unterdrückung der Activinantwort der Zellen erfolgt. Die Klärung dieser Frage wäre auch im Zusammenhang mit den weiter oben beschriebenen Phänotypen und der nach XB/U e349-Überexpression veränderten Markergenexpression interessant. So ist es durchaus denkbar, daß primär Signalwege betroffen sind, die von dem Activinsignal lediglich moduliert werden. Synergistische Effekte dieser Art wurden bereits für die Interaktion von XWnt8 und Activin oder FGF bei der Mesoderminduktion in animalen Kappen beschrieben (Sokol und Melton, 1992; Sokol, 1993).

Die Untersuchung verschiedener Cadherinkonstrukte überexprimierender animaler Kappen(zellen) hinsichtlich Markergenexpression, Migrationsverhalten und Kappenelongation nach Inkubation in +/- Activin kombiniert mit +/- XWnt8 könnten einen

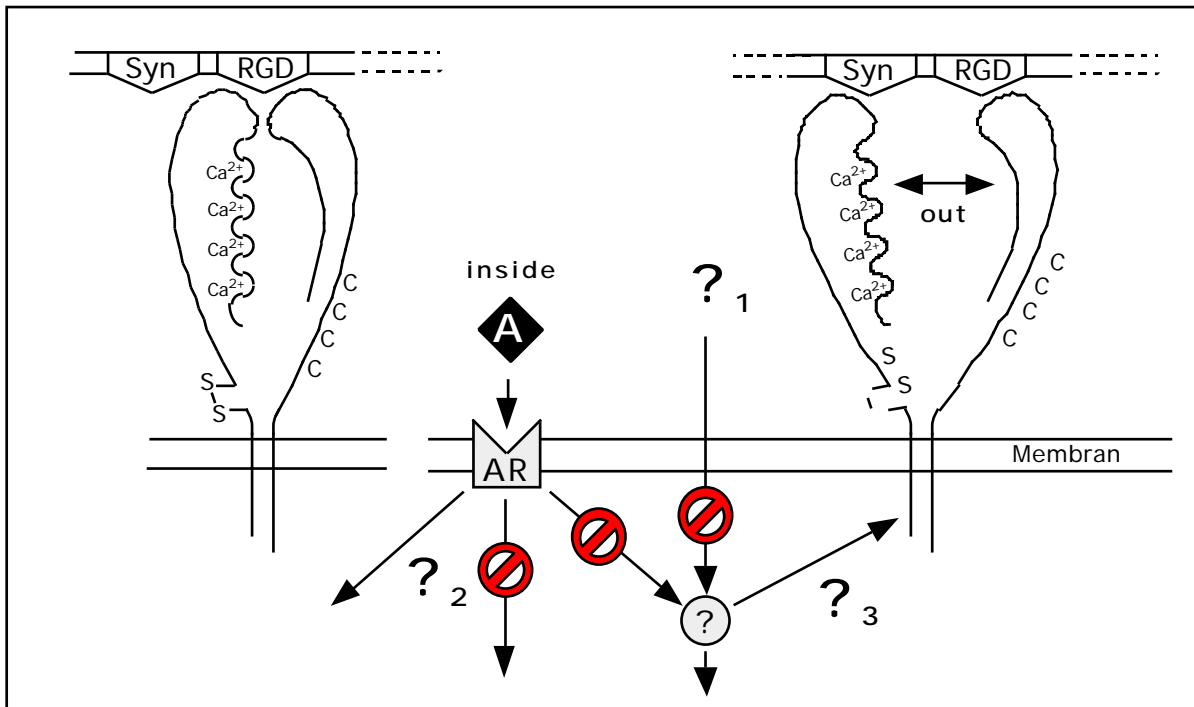


Abb. 4.5: Störung der activinabhängigen Erkennung des Fibronektin-Synergieepitopes durch Integrinrezeptoren infolge der Überexpression von XB/U 349 in animalen Kappenzellen. Entscheidend ist die Zeit vor Vereinzelung der manipulierten Zellen. Es könnten primäre activinmodulierte Signalwege betroffen sein, die über diffusible Proteine vermittelt werden und den Zellverband benötigen (?_{1,3}). Die Signaltransduktion des Activinsignals könnte ganz oder teilweise unterdrückt sein (?₂).

ersten Ansatz darstellen, dieser Frage nachzugehen. Die tatsächliche Beeinflussung des Aktivierungszustandes von Integrinrezeptoren ließe sich mit einem mittlerweile verfügbaren konformationsabhängigen Antikörper nachweisen (DeSimone, 1997). Das unterschiedliche Migrationsverhalten Cadherinwildtyp und -mutante überexprimierender Zellen favorisiert zwar einen adhäsionsbedingten Zusammenhang im Sinne des Community-Effektes, schließt aber dessen kooperative Wirkung z.B. mit β -Catenin vermittelter Wnt-Signaltransduktion nicht aus (siehe oben). Fest steht, daß der Zelladhäsion bei der Migration anterioren (Kopf)mesoderms auf der Fibronektinmatrix in vivo eine besondere Bedeutung zugemessen werden kann. Erst die cadherinabhängige Aggregation des vielschichtigen Kopfmesoderms zu einem Zellverband ermöglicht die matrixabhängige kontinuierliche und vor allem gerichtete Migration auf dem Blastocoeldach in Richtung des animalen Poles (Winklbauer et al., 1992).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse verdeutlichen die fundamentale Bedeutung von XB/U-Cadherin vermittelter Zell-Zelladhäsion während der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Die Störung des maternalen cadherinvermittelten Zelladhäsionssystems durch die Expression der Mutante XB/U e349 muß über den Kontext der mechanischen Zell-Zellinteraktion hinaus auch vor dem Hintergrund ablaufender Signal- und Induktionsprozesse betrachtet werden.