

Inaugural Dissertation

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
naturwissenschaftlich-mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

vorgelegt von
Diplom Biologe Martin Ritthaler
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Funktionelle Konservierung der Wnt-Liganden in *Nematostella vectensis*

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas W. Holstein

Zweitgutachter: Prof. Dr. Herbert Steinbeisser

Erklärung:

Ich versichere, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen – die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Heidelberg, den 15.12.2011

Martin Ritthaler, Diplom Biologe

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden zur Publikation eingereicht oder bereits veröffentlicht:

Rigo-Watermeier T, Kraft B, Ritthaler M, Walkkamm V, Holstein TW, Wedlich D (2011): Functional conservation of Nematostella Wnts in canonical and noncanonical Wnt-signaling. *Biology Open* 2011 000, 1-10

Ever tried. Ever failed.

No matter.

Try again. Fail again. Fail better.

Samuel Beckett (Worstward Ho 1983)

Zusammenfassung

Die Ausbildung des Blastoporus und die Etablierung eines Organisatorzentrums ist ein entscheidender Moment in der Embryonalentwicklung. Der dafür notwendige Symmetriebruch erfolgt in den meisten rezenten Metazoen durch eine lokale Stabilisierung von β -Catenin und scheint auch in basalen Stämmen wie Schwämmen und Nesseltieren konserviert. Dies verdeutlicht die enorme Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs für die frühe Entwicklung. Die Existenz von Homologen aller aus Bilateriern bekannten *Wnt*-Gene, mit Ausnahme von *Wnt9*, in der basalen Seeanemone *Nematostella vectensis* überrascht. Jedoch legt die Expression der Wnt-Liganden eine Beteiligung an unterschiedlichen Entwicklungsprozessen nahe. Die Identifikation von Komponenten des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalwegs deutet außerdem darauf hin, dass es bereits in der Evolution der Cnidarier zu einer Trennung von kanonischen und nicht-kanonischen Signalwegen kam.

Da sich die *Nematostella* Wnt-Liganden relativ einfach in die verschiedenen Unterfamilien einteilen lassen, wurde in funktionellen Studien mit heterologen Systemen versucht, die *Wnt*-Gene dem Wnt/ β -Catenin- oder Wnt/PCP-Signalweg zuzuordnen. Von den hier untersuchten *Wnt*-Genen lieferte lediglich *Wnt1*, jedoch nicht das in Bilateriern kanonische *Wnt3*, einen verlässlichen Hinweis auf die Aktivierung des kanonischen Signalwegs im Achseninduktionsassay in *Xenopus laevis* und für den TOP-Flash-Reporter im Zellkultursystem. Weitere Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass *NvWnt5* und *NvWnt11* die konvergente Extension im Frosch beeinflussen, also den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg bedienen. Interessanterweise scheint jedoch die genaue Funktion der beiden Gene vertauscht, da *NvWnt5* die Depletion von endogenem *XlWnt11* retten kann, bzw. *NvWnt11* die Depletion von *XlWnt5*.

Der Vergleich der in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster mit der hier erstellten Kinetik brachte neue Ergebnisse für die Wnt-Expression. Durch die höhere Sensitivität der RT-PCR-Methode konnten die Transkripte von *NvWnt5*, *-7a*, *-7b*, *-8b* und *-11* bereits maternal nachgewiesen werden. Die weitere Expression aller *Wnt*-Gene im Blastula-Stadium deutet außerdem auf die Etablierung eines Organisationszentrums durch die Liganden hin, wobei die verschiedenen *Wnt*-Gene entweder durch redundante Funktionen eine höhere Robustheit des Zentrums gewährleisten oder an einer Feinjustierung beteiligt sind.

Zusammenfassung

In weiteren Experimenten wurde schließlich die endogene Funktion von *NvWnt3* und *-11* untersucht, deren Bilaterier-Homologe sich stereotypisch kanonisch bzw. nicht-kanonisch verhalten. Dabei zeigte die Depletion *NvWnt3* durch einen Morpholino keine Effekte auf die frühe Entwicklung, sondern äußerte sich in einer fehlenden Metamorphose zum Primärpolypen. Dadurch verharrten die Tiere in einem „Dauerblastula“-artigem Zustand ohne erkennbare Körperachse, bei dem ungeordnetes Mesenchym unter einer prospektiven Ektodermschicht zu erkennen war. Verantwortlich für diesen Phänotyp scheint die Repression des *Forkhead*-Transkriptionsfaktors zu sein, der in *Nematostella* die epithelial-mesenchymalen Übergänge reguliert. Da sonstige Wnt-Zielgene in der RT-PCR unbeeinflusst schienen, spricht dies für eine sehr spezifische Rolle von *Wnt3* in *Nematostella*.

Die hier beschriebene maternale Expression von *NvWnt11* erinnert an die Situation im Frosch, bei der maternales *XlWnt11* für die Etablierung der dorso-ventralen Achse benötigt wird. Die Kolo-kalisation mit anderen Komponenten des Wnt-Signalwegs am zukünftigen oralen Pol in der Blastula deutet eine ähnliche Rolle von *Wnt11* in der Achsenspezifizierung von *Nematostella* an. Die Repression von Wnt-Zielgenen sowie Endoderm-Markern durch den *NvWnt11*-Morpholino sprechen außerdem für eine überraschende Funktion von *Wnt11* im Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Die Kompensation sowohl morphologischer als auch genregulatorischer Effekte des Morpholinos durch eine Stabilisation von β -Catenin mit Alsterpaullone sind ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von *NvWnt11* am kanonischen Signalweg. Da der Morpholino jedoch auch die Depletion des Wnt/PCP-Rezeptors Strabismus phänokopiert, kann von einer dualen Funktion von *NvWnt11* sowohl im kanonischen als auch im nicht-kanonischen Weg ausgegangen werden.

Summary

The formation of the blastopore and the establishment of an organizing center is a crucial event in the development of the embryo. The necessary symmetry break occurs in most extant metazoans by local stabilization of β -catenin and seems conserved in basal phyla such as sponges and cnidarians. This illustrates the crucial role of the canonical Wnt signalling pathway for early development. The existence of homologs of all known bilaterian *Wnt* genes, with the exception of *Wnt9*, in the basal sea anemone *Nematostella vectensis* was surprising. The identification of components of the non-canonical Wnt/PCP pathway further indicates that the separation of canonical and non-canonical signaling happened during the cnidarian evolution.

Since the *Nematostella* ligands quite easily group into their different Wnt subfamilies, it was tried to assign the *Wnt* genes to either the Wnt/ β -catenin or the Wnt/PCP pathway using functional studies in heterologous systems. Of all *Wnt* genes analyzed in this studies only *Wnt1*, but not *Wnt3*, was able to reliably activate canonical Wnt signalling in the axis induction assay in *Xenopus laevis* and for the TOP-Flash reporter in cell culture. Other results further show, that *NvWnt5* and *NvWnt11* affect convergent extension in frog, thereby act through the non-canonical pathway. However interestingly their exact functions seem to be shifted, as *NvWnt5* can rescue the depletion of endogenous *XlWnt11*, respectively *NvWnt11* the depletion of *XlWnt5*.

The comparison of expression patterns described in literature with the kinetics described in this thesis gained new insight for the expression of the *Wnt* genes. Due to the higher sensitivity of the RT-PCR method transcripts for *NvWnt5*, *-7a*, *-7b*, *-8b* and *-11* could already be detected maternally. The later expression of all *Wnt* genes during blastula stage further suggest a role for these ligands in establishing an organizing center where different *Wnt* genes may provide for a higher robustness of this center or help to fine tune the signal.

Additional experiments examined the endogenous function of *NvWnt3* and *-11*, whose bilaterian homologues stereotypically signal through the canonical or the non-canonical pathway respectively. Though the depletion of *NvWnt3* by morpholino did not affect early development morphants did not metamorphose to primary polyps. Thus animals remained in a „Dauerblastula“ like state with no apparent body axis

Summary

showing disorganized mesenchyme covered by prospective ectodermal layer. The repression of the *Forkhead* transcription factor, that regulates the epithelial-mesenchymal transition in *Nematostella*, seems to be responsible for this phenotype. Since other Wnt target genes were unaffected in the RT-PCR this points to a very specific role of *Wnt3* in *Nematostella*.

The maternal expression of *NvWnt11* described here is reminiscent of the situation in frog, where maternal *XlWnt11* is needed to establish the dorso-ventral axis. The colocalisation with other components of the Wnt signalling cascade at the future oral pole of the blastula suggests a similar role of *Wnt11* for the axis specification in *Nematostella*. The repression of Wnt target genes and endoderm markers by the *NvWnt11* morpholino further are indicative of surprising function of *Wnt11* in Wnt/ β -catenin signalling. The compensation of both morphological and gene regulatory effects of the morpholino by a stabilisation of β -catenin further indicate an involvement of *NvWnt11* in canonical signalling. However since the morpholino also phenocopies the depletion of the Wnt/PCP receptor *Strabismus* one can argue for a dual function of *NvWnt11* in both the canonical and non canonical pathway.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Summary	VIII
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Der Wnt-Signalweg	1
1.2 Signaltransduktion durch Wnt-Liganden	2
1.3 Bauplan und taxonomische Stellung der Cnidaria	4
1.4 Genetische Komplexität in Cnidariern	6
1.5 Der Modellorganismus <i>Nematostella vectensis</i>	6
1.6 Wnt-Signalweg und Achsendetermination in Cnidariern	8
2 Zielsetzung	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.1.1 Chemikalien	12
3.1.2 Lösungen	14
3.1.3 Bakterien	18
3.1.4 Enzyme	18
3.1.5 Geräte	18
3.1.6 Primer	20
3.2 Entwicklungsbiologische Methoden in <i>Xenopus laevis</i>	29
3.2.1 Induktion der Oogenese und <i>in vitro</i> Fertilisation	29
3.2.2 Entfernen der Gallerthülle	29
3.2.3 Mikroinjektion	29
3.3 Entwicklungsbiologische Methoden in <i>Nematostella vectensis</i>	30
3.3.1 Tierhaltung von <i>Nematostella vectensis</i>	30
3.3.2 Induktion der Oogenese und <i>in vitro</i> Fertilisation	30
3.3.3 Entfernen der Gallerthülle	30
3.3.4 Mikroinjektion	30
3.3.5 Embryonenpflege und –reifung	31
3.3.6 Ganzkeimfärbung (<i>In situ</i> -Hybridisierung)	31
3.3.7 Fluoreszenzfärbung mit Phalloidin	33
3.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden	33

3.4.1	Restriktionsverdau von DNA	33
3.4.2	Fällung von DNA und RNA	34
3.4.3	Isolierung von Gesamt RNA	34
3.4.4	cDNA-Synthese	35
3.4.5	Analytische Flachbett-Gelelektrophorese	35
3.4.6	Präparative Flachbett-Gelelektrophorese	36
3.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.4.8	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	37
3.4.9	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	37
3.4.10	Isolierung bakterieller Plasmid-DNA	37
3.4.11	<i>In vitro</i> Transkription	38
3.4.12	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	39
3.4.13	Quantifizierung der Expressionsstärke mittels <i>Real-Time</i> PCR	39
3.4.14	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.4.15	Coomassiefärbung	41
3.4.16	Proteinanalyse mittels Western Blot	41
3.5	Zellbiologische Methoden	43
3.5.1	Kultivierung humaner Cervix-Karzinom-Zellen (HEK293-T)	43
3.5.2	Kalziumphosphat-Transfektion von Kulturzellen	43
3.5.3	Reportergen-Assay im Zellkultursystem	44
3.5.4	Messung von Luziferaseaktivität in Zell-Lysaten	44
3.5.5	Nachweis von β -Galaktosidase in Zell-Lysaten	44
3.5.6	Statistische Auswertung des Reportergen-Assays	45
3.6	Mikroskopie	45
3.6.1	Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie	45
3.6.2	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Heterologe Expression der <i>Nematostella</i> Wnt-Liganden	46
4.1.1	TOP-Flash Reporter-Assay im Zellkultursystem	46
4.1.2	Achseninduktionsassay in <i>Xenopus laevis</i>	47
4.2	Zeitliche Expressionsanalyse der <i>Nematostella</i> Wnt-Liganden	48
4.2.1	Semiquantitative RT-PCR	49
4.2.2	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qPCR)	50

4.3	β-Catenin-Abhängigkeit der <i>Nematostella</i> Wnt-Expression	53
4.4	Pharmakologische Tests zum Wnt-Signalweg in <i>Nematostella</i>	56
4.4.1	Identifizierung von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs	56
4.4.2	Identifizierung von Zielgenen des Wnt-/JNK-Signalwegs	57
4.5	Funktionelle Analyse von <i>Wnt3</i> in <i>Nematostella vectensis</i>	61
4.5.1	Phänotypen nach Injektion von NvWnt3-Morpholino	61
4.5.2	Einfluß von <i>Wnt3</i> auf die Genregulation	63
4.6	Funktionelle Analyse von <i>Wnt11</i> in <i>Nematostella vectensis</i>	66
4.6.1	Frühe räumliche Expression von NvWnt11	66
4.6.2	Phänotypen nach Injektion von NvWnt11-Morpholino	67
4.6.3	Einfluß von <i>Wnt11</i> auf die Genregulation	69
4.6.4	Kompensationsexperimente mit Alsterpaullone	71
5	Diskussion	74
5.1	<i>Nematostella</i> Wnt-Liganden aktivieren entweder den kanonischen oder nicht-kanonischen Signalweg in heterologen Systemen	74
5.2	Frühe Expression der <i>Nematostella</i> Wnt-Liganden und die Achsenbildung	76
5.3	Kinetik und Regulation der <i>Nematostella</i> Wnt-Expression	78
5.4	Wird die späte Funktion von NvWnt3 in der Achsendetermination durch den HNF3/FoxA-Transkriptionsfaktor <i>Forkhead</i> vermittelt?	83
5.5	Die Expression von NvWnt11 in der frühen Embryonalentwicklung	86
5.5	Die duale Funktion von NvWnt11 im kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg	87
6	Anhang	91
6.1	Literatur	91
6.2	Danksagung	98
6.3	Lebenslauf	99

1 Einleitung

Eine Voraussetzung für die Entstehung vielzelliger Tiere aus einzelligen Vorfahren vor über 600 Millionen Jahren war die konzertierte Aktion von Prozessen wie Zell-Zell-Adhesion, Zell-Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Die Notwendigkeit von Signaltransduktionskaskaden für die Zell-Zell-Kommunikation und Signal-Weiterleitung ins Zellinnere ist offensichtlich. Es ist also davon auszugehen, dass erst die Entwicklung regulatorischer Netzwerke die Evolution der Metazoen ermöglichte. So überrascht es, dass Eumetazoen mit dem Wnt-, TGF β -, Hedgehog- und Delta/Notch-Signalweg über ein relativ kleines, aber hoch konserviertes Repertoire an Signalwegen verfügen, das wahrscheinlich in ähnlicher Form schon im gemeinsamen Vorfahren der Metazoen existierte. In diesem Kontext bietet die Untersuchung basaler Metazoen wie Cnidarier und Porifera einen Einblick in die Evolution der Signalkaskaden.

1.1 Der Wnt-Signalweg

Die Grundlagen zur Erforschung des Wnt-Signalwegs sind bald 30 Jahre alt. 1980 wurde in *Drosophila melanogaster* die Mutante *wingless* (*wg*) beschrieben (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). 1982 wurde das Onkogen *Int1* (integration1) durch die Aktivierung des MMT-Virus (mouse mammary tumor virus) entdeckt, das in Mäusen zu Entstehung von Brustkarzinomen beiträgt (Nusse und Varmus, 1982). Als schließlich feststand, dass es sich bei beiden Genen um Homologe handelt, die zu einer großen, evolutionär konservierten Familie gehören (Rijsewijk et al., 1987), wurden die Namen *Int1* und *wingless* zu „Wnt“ zusammengefasst. Die entscheidende Bedeutung dieses Signalwegs wurde schon bei seiner Entdeckung als Entwicklungsgen und als Onkogen erkannt. Im Folgenden wurden weitere bedeutende Rollen für den Wnt-Signalweg in der Achsendetermination, für morphogenetische Bewegungen, die Musterung des Nervensystems, der Somitogenese, der Bestimmung der Gliederpolarität, der Homöostase, der Stammzellendifferenzierung und weiterer Prozesse gefunden (Miller, 2002; Logan und Nusse, 2004; Bejsovec, 2006; Croce and McClay, 2008).

1.2 Signaltransduktion durch Wnt-Liganden

Bei den namengebenden *Wnt*-Genen handelt es sich um sezernierte Glykoproteine, die über 22-24 stark konservierte Cysteinreste verfügen, die von ebenfalls konservierten Sequenzmotiven flankiert werden (Mikels und Nusse, 2006). Klassisch werden die Wnt-Liganden der kanonischen (*Wnt1*, *-2A*, *-3* und *-8*) oder nicht-kanonischen Signalkaskade (*Wnt5A* und *-11*) zugeteilt, je nachdem ob sie in *Xenopus laevis* eine sekundäre Körperachse induzieren bzw. murine C57MG-Zellen transformieren können oder nicht (McMahon und Moon, 1989; Wong et al., 1994). Am besten ist der kanonische Signalweg untersucht, der ultimativ zur Stabilisierung von β -Catenin und Genexpression führt. Hier binden die Wnt-Liganden den Rezeptor Frizzled (Fzd) und seinen Korezeptor LRP 5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein) an der Zelloberfläche und aktivieren auf der cytoplasmatischen Seite das Phosphoprotein Dishevelled (Dsh). Dsh wiederum inhibiert einen β -Catenin-Destruktionskomplex, bestehend aus Glykogensynthasekinase3 β (GSK3 β), Caseinkinase1 (CK1), Axin und APC (Adenomatous Polyposis Coli). Dieser Destruktionskomplex hält in Abwesenheit eines gebundenen kanonischen Wnt-Liganden das cytoplasmatische Level an freiem β -Catenin niedrig, indem es β -Catenin durch Phosphorylierung für einen Abbau im Proteasom markiert. Durch die Inhibition des Destruktionskomplexes kann β -Catenin akkumulieren und in den Zellkern eindringen, wo es schließlich zusammen mit Lef/Tcf (lymphoid enhancer factor/ T-cell enhancer factor) als Heterodimer die Expression von Zielgenen aktiviert. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass eine Phosphorylierung von LRP5/6 und die Bildung von Signalosomen, Aggregaten aus mehreren Wnt/Fzd/LRP-Komplexen, notwendig ist, um den Destruktionskomplex zu hemmen und eine Akkumulation von β -Catenin zu ermöglichen (Bilic et al., 2007; Taelman et al., 2010).

Unter den nicht-kanonischen Signalwegen ist die Wnt/PCP-Signalkaskade (planar cell polarity) wahrscheinlich am besten untersucht. In *Drosophila* bildet dieser Signalweg die Grundlage für eine polarisierte Ausrichtung der Zellen im Auge, den Flügeln und des Thorax und reguliert sowohl im Zebrafisch *Danio rerio* und in *Xenopus* die Zellbewegungen während der konvergenten Extension (Tada et al., 2000). Dabei wird dieser Signalweg auch durch den Frizzled-Rezeptor und Dsh vermittelt, jedoch ohne Beteiligung von LRP5/6, β -Catenin oder Lef/Tcf. Stattdessen reguliert Frizzled über Dishevelled die Aktivierung kleiner GTPasen wie Rho und

Rac. Rac aktiviert weiterhin über MAP-Kinasen (mitogen activated protein kinase) die Jun-Kinase (JNK), welche die Zellpolarität über eine Reorganisation des Cytoskeletts reguliert (van Amerongen et al., 2008). In *Drosophila* scheint die Aktivierung von Frizzled unabhängig von Wnt-Liganden über Korezeptoren wie VanGogh/Strabismus, Flamingo/Starry night und Prickle zu geschehen, in Maus und Zebrafisch dagegen ist die Anwesenheit von Wnt5 oder 11 jedoch notwendig für geordnete Bewegungen der konvergenten Extension (van Amerongen et al., 2008).

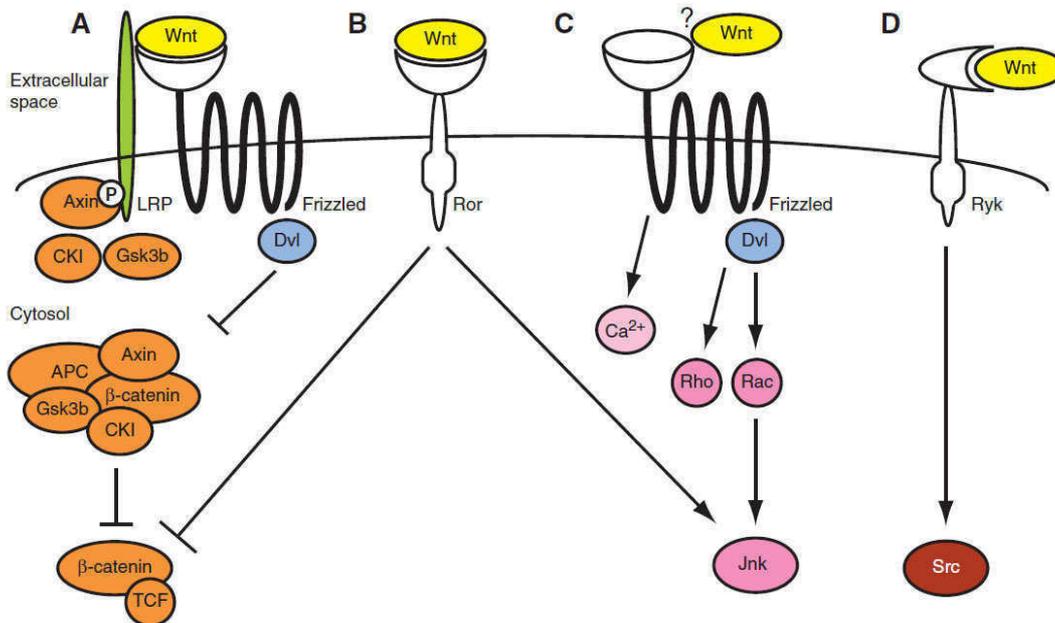


Abb.1 Schematische Darstellung der Wnt-Signalwege: **A** Im kanonischen Signalweg führt die Bindung von Wnt an den Frizzled-Rezeptor zur Stabilisation von β -Catenin. β -Catenin dringt in den Zellkern ein und reguliert dort zusammen mit Tcf die Genregulation. **B** Die Interaktion von Wnt mit der Rezeptortyrosinkinase Ror2 inhibiert den kanonischen Signalweg und aktiviert JNK. **C** Frizzled vermittelt im Wnt/PCP-Signalweg über Dishevelled (Dvl) die Aktivierung kleiner GTPasen wie Rho und Rac. Rac aktiviert weiterhin die JNK. Dies reguliert über die Reorganisation des Cytoskeletts die Zellpolarität und ermöglicht morphogenetische Bewegungen. In manchen Fällen vermittelt Frizzled auch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern durch den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg. Eine Beteiligung von Wnt scheint nur für den Wnt/PCP-Signalweg notwendig zu sein. **D** Die Interaktion mit der Rezeptortyrosinkinase Ryk in der neuronalen Entwicklung aktiviert Src. (Abbildung verändert nach van Amerongen und Nusse, 2009)

Neben dem Wnt/PCP- vermittelt Frizzled auch den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg, bei dem über G-Proteine die PLC (PhospholipaseC) aktiviert wird (Kohn und Moon, 2005; Li et al., 2005). Dies führt zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und aktiviert so die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Protein Kinase II (CamKII) und die Protein-KinaseC (PKC) (Kühl et al., 2000; Sheldahl et al., 1999). Ein Anstieg des intrazellulären Calcium-Levels als Antwort auf eine Stimulation durch ektopische Wnt-Liganden wurde bislang noch nicht beobachtet, außerdem beeinflussen einige

Frizzleds die PKC- und CamKII-Aktivität auch in Abwesenheit von Wnt (Kühl et al., 2000; Sheldahl et al., 1999), weshalb dieser Signalweg möglicherweise unabhängig von Wnt-Liganden funktioniert (van Amerongen und Nusse, 2009).

Unabhängig von Frizzled interagieren Wnts auch direkt mit den Rezeptor-tyrosinkinasen wie Ryk und Ror2. Die Interaktion von Wnt5 mit Ror2 inhibiert den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg und reguliert über JNK die konvergente Extension (Schambony und Wedlich, 2007). Die Bindung an den Ryk-Rezeptor scheint hauptsächlich in der neuronalen Entwicklung eine Rolle zu spielen und aktiviert dort Src-Proteine (van Amerongen und Nusse, 2009).

1.3 Bauplan und taxonomische Stellung der Cnidaria

Die Cnidaria oder Nesseltiere sind mit ca. 9000 rezenten Arten ein breitgefächertes Phylum, das sich grob in zwei Gruppen einordnen lässt: Anthozoa und Medusozoa. Dabei werden die Anthozoen (Blumentiere), zu denen auch *Nematostella vectensis* gehört, als die basalste Klasse unter den Cnidariern angesehen und zeichnen sich mit den Seeanemonen, Korallen und Seefedern dadurch aus, dass sie neben dem Embryo und der Larve lediglich ein sessiles Polypenstadium besitzen. Fast alle Medusozoa besitzen dagegen außerdem ein namensgebendes Medusenstadium, bei dem es sich meist um die geschlechtliche Form handelt. Unter den Medusozoa werden weiterhin die Klasse der Staurozoa (Stielquallen), Cubozoa (Würfelquallen), Scyphozoa (Schirmquallen) und Hydrozoa (Wassertiere), zu der auch *Hydra* gehört, unterschieden. Vier dieser fünf Klassen wurden bereits in kambrischen Fossilienfunden identifiziert (Cartwright et al., 2007), weshalb die beträchtliche Artenbildung der Cnidarier voraussichtlich bereits vor ca. 500 Millionen Jahren stattfand. Nach den Schwämmen (Porifera) als basalste Metazoen stellen Cnidaria zusammen mit den Ctenophora (Rippenquallen) die basalsten echten Metazoen (Eumetazoa) mit epithelialen Gewebeschichten dar. Molekulare Studien legen nahe, dass die Trennung von Cnidariern und ihrer Schwestergruppe, den Bilateriern, bereits vor 650 Millionen Jahren geschah und somit der kambrischen Explosion um mehr als 100 Millionen Jahre vorrausging (Kusserow et al., 2005). Dadurch bietet die Erforschung der Cnidaria eine gute Möglichkeit, die Evolution von Bilaterier-Merkmalen zu verstehen.

Bilaterier zeichnen sich durch ein drittes Keimblatt, ein zentrales Nervensystem und eine zweite Körperachse aus. Cnidarier dagegen besitzen lediglich zwei Keimblätter, die mit der Mesogloea durch eine azelluläre Matrix getrennt sind. Zusammen mit den namensgebenden Nesselzellen oder Nematocyten lassen sich etwa 12 Zelltypen in Cnidariern morphologisch unterscheiden, jedoch weisen Unterschiede in der Genexpression auf eine viel größere Vielfalt hin. Ihr Nervensystem ist mit einer netzförmigen Organisation relativ simpel. Äußerlich erscheinen Cnidarier entlang einer oral-aboralen Achse radiärsymmetrisch. Jedoch zeigen die basalen Anthozoen bereits Ansätze einer Bilateralsymmetrie in der Anlage ihrer Retraktormuskeln und der schlitzförmigen Mundöffnung, die sich in einem schlitzförmigen Pharynx mit paarigen Cilienbändern, den Siphonoglyphen, fortsetzt. Auch auf molekularer Ebene sind Gene wie *Chordin*, *Gremlin* und *Decapentaplegic (Dpp)* senkrecht zur oral-aboralen Achse entlang einer direktiven Achse orientiert (Matus et al., 2006; Rentzsch et al., 2006). Die Bedeutung der direktiven Achse und ihr möglicher sekundärer Verlust in den weniger basalen Medusozoen sind Thema fortlaufender Debatten.

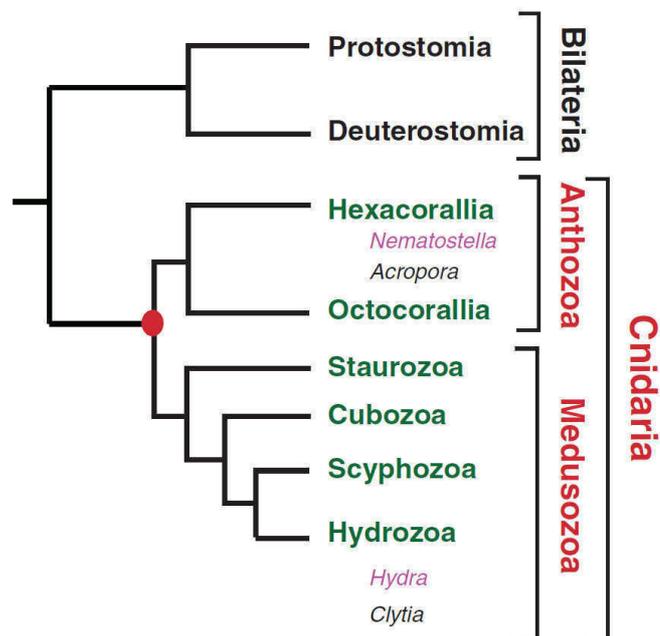


Abb.2 Taxonomische Stellung der Cnidarier: Cnidarier sind eine Schwestergruppe der Bilaterier. Unter ihnen werden die Klasse der Anthozoen und das Subphylum der Medusozoen unterschieden (beide in rot), das sich in weitere vier Klassen einteilt (grün). Die Anthozoen mit ihren zwei Subklassen (grün) werden als die basalste Klasse angesehen und stehen somit dem letzten gemeinsamen Vorfahren der Cnidarier am nächsten. Eine Auswahl der gängigen Modellorganismen ist in kursiv dargestellt. Sequenzierte Genome (pink) sind für *Nematostella vectensis* und *Hydra* verfügbar, während für *Acropora millepora* und *Clytia hemispherica* die Sequenzierung noch läuft. (Abbildung verändert nach Technau und Steele, 2011)

1.4 Genetische Komplexität in Cnidariern

Trotz ihres vergleichsweise simplen Bauplans überraschen Cnidarier mit einer genetischen Komplexität, wie sie bislang nur für Bilaterier angenommen wurde. Erste Hinweise darauf lieferten bereits Untersuchungen von EST-Daten (expressed sequence tags) aus *Nematostella* und *Acropora* (Ball et al., 2004; Kortschak et al., 2003; Miller et al., 2005) sowie die Entdeckung eines beinahe kompletten Sets an *Wnt*-Genen in *Nematostella* (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006), das mit Ausnahme von *Wnt9* alle in Bilateriern gefundenen Mitglieder dieser Familie abdeckt. Da die morphologisch komplexeren Protostomier *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* nur sieben respektive fünf *Wnt*-Gene besitzen, kann man von einem sekundären Verlust dieser Gene in diesen Linien ausgehen und nicht, wie bisher angenommen, zu einer Genduplikation innerhalb der Deuterostomier. Die Sequenzierung des *Nematostella*-Genoms zeigt darüber hinaus, dass Organisation und Komplexität eher Vertebraten entsprechen, als Protostomieren wie *Drosophila* oder *C. elegans* (Putnam et al., 2007). Das paradoxe Verhältnis der genomischen Komplexität und des simplen Körperbauplans in Cnidariern läßt sich jedoch wahrscheinlich über die Diversität von regulatorischen microRNAs (miRNAs) erklären. So besitzen Cnidarier mit 40 miRNAs verglichen zu 147 oder 677 miRNAs in der Fliege bzw. dem Menschen nur eine geringe Anzahl (Grimson et al., 2008).

1.5 Der Modellorganismus *Nematostella vectensis*

Die Seeanemone *Nematostella vectensis* ist in Brackwassergebieten mit unterschiedlichen Salinitäten entlang der Pazifik- und der Atlantikküste Nord-Amerikas endemisch, von wo sie wahrscheinlich sekundär an die Südküste Englands eingeschleppt wurde, wie genomische Untersuchungen der Populationen ergeben (Darling et al., 2005). *Nematostella* entwickelt sich in letzter Zeit immer mehr zum zentralen Modellorganismus der vergleichenden Entwicklungsbiologie, trotz der Existenz einer Vielzahl weiterer Cnidarier-Modelle, und wurde auch unter diesen als erster sequenziert (Putnam et al., 2007). Diesen Umstand verdankt *Nematostella* seiner einfachen Haltung im Labor und der relativ kurzen Generationsdauer von drei bis sechs Monaten (Fritzenwanker und Technau, 2002; Hand und Uhlinger, 1992). Als Anthozoe bietet *Nematostella* darüber hinaus den Vorteil aus phylogenetischer

Hinsicht eine wahrscheinlich basalere Stellung einzunehmen, die eher der Urform der Cnidarier entspricht, was wiederum Vergleiche zu Bilateriern erleichtert (Darling et al., 2005). Anders als die Koralle *Acropora millepora*, die ebenfalls zu den Anthozoen gehört, ist man bei *Nematostella* nicht durch saisonale Legezeiten limitiert, sondern kann die Gametogenese unkompliziert etwa alle zwei Wochen im Labor induzieren (Fritzenwanker und Technau, 2002). Die großen Gelege, mit bis zu mehreren hundert Eiern, können dank der Getrenntgeschlechtlichkeit synchron befruchtet werden. Die mit ca. 200 µm relativ großen Eier lassen sich nach der Entfernung ihrer Gallerthülle leicht manipulieren und die weitere Entwicklung lässt sich bequem verfolgen. Deshalb wurde in letzter Zeit neben klassischen Transplantations- und „Fate-Mapping“-Experimenten ein breites Methodenspektrum für *Nematostella* etabliert. So erlauben RNA- und Morpholino-Injektionen funktionelle Studien für einzelne Gene in frühen Stadien, während pharmakologische Versuche mit Inhibitoren wie Alsterpaullone die Analyse ganzer Signalwege ermöglichen. Die Erschaffung transgener Tiere bietet die Möglichkeit die Genregulation in *Nematostella* genauer zu verstehen.

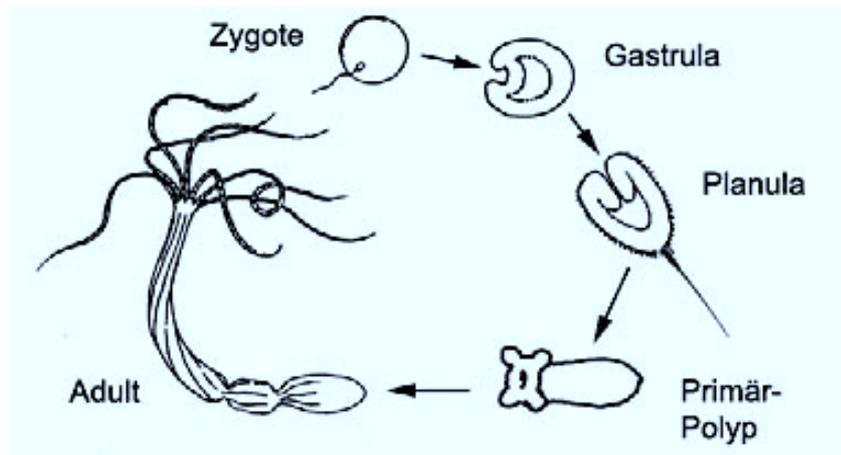


Abb.3 Schematische Darstellung des Generationszyklus von *Nematostella vectensis*: Im Labor lassen sich adulte Tiere ca. alle zwei Wochen zur Gametogenese induzieren. Weibliche Tiere entlassen dabei Eipackete mit mehreren hundert Eiern, die von einer Gallerthülle umgeben sind. Da *Nematostella* getrenntgeschlechtlich ist, lassen sich die Eier synchron befruchten. Nach etwa einem Tag entwickelt sich die Zygote zur Gastrula mit klar erkennbarem Blastoporus, welcher das Hypostom des adulten Tieres definiert. Die Gastrula entwickelt sich drei Tage nach der Befruchtung weiter zur freischwimmenden Planula-Larve, die einen Cilien besetzten Wimperschopf am aboralen Pol besitzt. Die Metamorphose zum sessilen Primärpolypen verläuft graduell und dauert ca. eine Woche. Die Geschlechtsreife erreichen die Tiere nach drei bis sechs Monaten. (Abbildung verändert nach Technau und Steele, 2011)

1.6 Wnt-Signalweg und Achsendetermination in Cnidariern

In Bilateriern wird die antero-posteriore Achse der Embryonen durch eine gestaffelte Expression der *Hox*-Gene gemustert, die auch der kolinearen Anordnung dieser Gene in genomischen Clustern entspricht. Diese Gene und ihre Organisation wurden in *Drosophila melanogaster*, der Maus und weiteren Bilateriern intensiv untersucht und erscheinen hoch konserviert, weshalb auch eine konservierte Funktion in der Achsenspezifikation angenommen wurde. Jedoch erschweren sekundäre Genverluste sowie die extrem vielseitigen Expressionsmuster der *Hox*- und *ParaHox*-Gene in Cnidariern eine genaue Aussage über eine Funktion dieser Gene, zumal es außerdem zu einer beträchtlichen Ableitung dieser Gene innerhalb der Cnidarier kam (Technau und Steele, 2011).

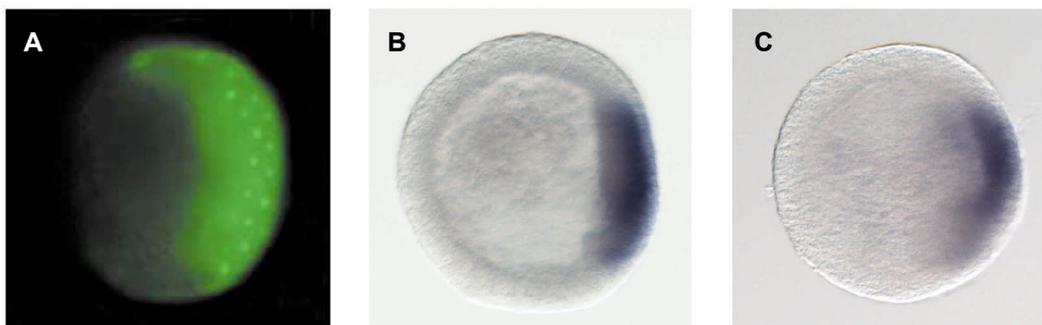


Abb.4 Lokale Wnt-Aktivität in der Blastula von *Nematostella vectensis*: Die Injektion von einer chimären β -Catenin-GFP-RNA verdeutlicht die lokale Stabilisation und Kernlokalisierung des Proteins am zukünftigen oralem Pol (A). Die *in situ* Hybridisierung für *Tcf* (B) und das Wnt-Zielgen *Brachyury* (C) weisen ebenfalls auf eine lokale Aktivierung des kanonischen Signalwegs hin, der für die Achseninduktion verantwortlich ist. (Abbildung verändert nach Wikramanayake et al., 2003 (A) und Watanabe et al., unveröffentlicht (B und C))

Jüngste Studien gehen davon aus, dass bei der Musterung der primären Achse der Cnidarier *Hox*-Gene keine Rolle spielen (Chiori et al., 2009), sondern diese durch *Wnt*-Gene vermittelt wird. Da in der Planula von *Nematostella* sowie im Hypostom von *Hydra* die *Wnt*-Gene gestaffelt exprimiert werden, wird analog zu den *Hox*-Genen eine Rolle in der Achsenmusterung angenommen (Lengfeld et al., 2009; Guder et al., 2006; Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006). So induzieren beispielsweise in *Hydra* die Transplantation des Hypostoms oder in *Nematostella* die Blastoporuslippe eine zweite Körperachse (Browne, 1909; Kraus et al., 2007), beides

Regionen mit einer hohen Dichte an Wnt-Liganden (Lengfeld et al., 2009; Guder et al., 2006; Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006). Genauso geht die *Wnt*-Expression in *Hydra* der Kopfregeneration nach Amputation oder der *de novo* Achsenbildung in Aggregaten dissoziierter Zellen voraus (Lengfeld et al., 2009; Hobmayer et al., 2000). Desweiteren weisen auch Versuche mit verschiedenen GSK3 β -Inhibitoren auf eine Funktion des Wnt-Signalwegs bei der Achsenmusterung von *Hydractinia* hin (Plickert et al., 2006; Duffy et al., 2010). Ob es sich dabei um eine Musterung im strengen Sinne handelt, wie sie durch *Hox*-Gene in Bilateriern vermittelt wird, bleibt jedoch unklar. Fest steht jedoch, dass der kanonische Wnt-Signalweg über die Etablierung eines Signalzentrums die primäre Achse induziert.

In *Clytia hemispherica* wird die oral-aborale Achse durch die maternale Expression zweier gegenüber liegender Frizzled-Rezeptoren definiert (Momose et al., 2007), wobei die Funktion des oralen Frizzleds durch ein ebenfalls maternal exprimiertes *Wnt* gesteuert wird (Momose et al., 2008). Neben der Achsenbildung scheint der kanonische Wnt-Signalweg auch für die Endodermspezifikation verantwortlich zu sein, da eine Stabilisierung von β -Catenin mit LiCl in *Nematostella* zu einer Expansion des Endoderms führt, wohingegen eine Inhibition des Signalwegs zu einem Verlust endodermaler Gene führt (Wikramanayake et al., 2003; Lee et al., 2006). Die Endodermspezifikation scheint in *Nematostella* spezifisch durch Wnt/ β -Catenin- und die Gastrulation spezifisch durch den Wnt/PCP-Signalweg reguliert zu werden, da ein „Knockdown“ des PCP-Korezeptors *Strabismus* die Gastrulation zwar verhindert, Endoderm-Marker jedoch weiterhin exprimiert werden (Kumburegama et al., 2011). In *Nematostella* scheinen diese beiden Ereignisse entkoppelt zu sein, pharmakologische Versuche in *Hydra* dagegen sprechen für eine Hierarchie beider Signalwege, wobei eine Aktivierung des kanonischen Weges dem nichtkanonischen Signalweg vorangeht (Philipp et al., 2007).

Zusammen zeigen diese Daten eine entscheidende Rolle des Wnt-Signalwegs für die Etablierung eines oralen Signalzentrums. Die Definition des oralen Pols durch eine asymmetrische Stabilisation von β -Catenin scheint ein evolutionär hoch konserviertes Grundschema zu sein, da dieser Mechanismus in Vertebraten und anderen Organismen genauso wirkt (Technau und Steele, 2011). Wegen der Homologie des Cnidaria- und Vertebraten-Organisators und da Wnts in Vertebraten ein posteriores Schicksal vermitteln, liegt es nahe, die antero-posteriore Achse der Vertebraten der oral-aboralen Achse der Cnidarier gleichzusetzen, jedoch finden in

Einleitung

Vertebraten umfangreiche morphogenetische Bewegungen statt, wodurch sich die Position einzelner Zellen teilweise stark ändert. Deshalb entspricht die oral-aborale Achse eher der animal-vegetativen Achse des Vertebraten-Embryos (Technau und Steele, 2011).

2 Zielsetzung

Durch die Sequenzierung mehrerer Genome basaler Metazoen wie Schwämme und Cnidarier wurde die überraschende genetische Komplexität dieser Stämme offenbar, die in etwa der höherer Vertebraten entspricht (Srivastava et al., 2010; Putnam et al., 2007; Chapman et al., 2010). Erste Hinweise darauf brachte die Identifikation von 14 Wnt-Liganden in der Seeanemone *Nematostella vectensis*, die 12 der 13 bekannten Wnt-Unterfamilien zugeordnet werden konnten (Kusserow et al., 2005; Guder et al., 2006; Lee et al., 2006). Die Expression dieser Liganden und weiterer Komponenten des Wnt-Signalwegs legen nahe, dass sie eine Rolle in der Achsendetermination haben. Die Vielzahl der *Wnt*-Gene wirft jedoch die Fragen auf, wieso ein Tier mit einem dermaßen simplen Körperbauplan wie *Nematostella* diese benötigt und welche Funktionen sie erfüllen.

Für eine grobe Einteilung in Liganden der kanonischen Wnt/ β -Catenin- und nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalkaskade wurden die Gene in heterologen Systemen getestet. Die Aktivierung des kanonischen Wegs wurde dafür in Zellkultur mit dem TOP-Flash-Reporter und in *Xenopus laevis* in Achseninduktionsassays getestet. Das PCP-Verhalten der *Nematostella* Wnt-Gene wurde ebenfalls in *Xenopus* durch den Einfluss auf die konvergente Extension in Keller-Explantaten nach Überexpression und in „Rescue“-Versuchen nach *XlWnt5a*- oder *XlWnt11*-Depletion untersucht (Rigo-Watermeier et al., 2011). Durch die hohe Konservierung der Sequenzinformation der *Nematostella*-Liganden und klare Einteilung in die verschiedenen Wnt-Unterfamilien war von einer ähnlichen Funktion wie in Bilateriern auszugehen.

Die Erstellung einer Kinetik der *Wnt*-Expression in *Nematostella* selbst und der Vergleich mit den bekannten räumlichen Expressionsmustern (Kusserow et al., 2005; Guder et al., 2006; Lee et al., 2006) sollte helfen, die *Wnt*-Gene entwicklungsbiologischen Ereignissen zuzuordnen. Mit dem „Knockdown“ von *NvWnt3* und *NvWnt11* wurden zwei in Bilateriern prototypisch kanonische bzw. nicht-kanonische *Wnts* in *Nematostella* untersucht. Dabei wurde versucht, anhand von Morphologie und veränderter Genexpression der injizierten Tiere die endogene Funktion zu bestimmen. Weitere Versuche mit dem GSK3 β -Inhibitor Alsterpaullone oder dem JNK-Inhibitor Sp600125 dienten dabei als Vergleich für eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin- bzw. Hemmung des Wnt/PCP-Signalwegs.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acetanhydrid	Riedel-de-Haen; Seelze (Deutschland)
Agar	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Agarose	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
Ampicillin	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim (Deutschland)
Bromphenolblau	Serva; Heidelberg (Deutschland)
BM Purple	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim (Deutschland)
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraction V	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri (USA)
5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck; Darmstadt (Deutschland)
Dinatrium-EDTA	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva; Heidelberg (Deutschland)
Dimethylformamid	Serva; Heidelberg (Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Serva; Heidelberg (Deutschland)
Ethanol	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri (USA)
Ethidiumbromid	Serva; Heidelberg (Deutschland)
Fötale Kälbersereum (FCS)	PAA Laboratories GmbH; Pasching (Austria)
Formaldehyd	Merck; Darmstadt (Deutschland)
Eisessig	Merck; Darmstadt (Deutschland)

Material und Methoden

Glycerin	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Hefeextrakt	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
Hefe-RNA	Boehringer (Roche Diagnostics); Mannheim (Deutschland)
Heparin	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
HEPES	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure (HCl)	VWR International; West Chester, Pennsylvania (USA)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva; Heidelberg (Deutschland)
Isopropanol	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Methanol	J. T. Baker; Phillipsburg, New Jersey (USA)
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim (Deutschland)
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	J. T. Baker; Phillipsburg, New Jersey (USA)
Natriumacetat-Trihydrat	Merck; Darmstadt (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International; West Chester, Pennsylvania (USA)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva; Heidelberg (Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	J. T. Baker; Phillipsburg, New Jersey (USA)
Tris	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
Triton X-100	Merck; Darmstadt (Deutschland)
Trypton	AppliChem; Darmstadt (Deutschland)
Tween 20	Roth; Karlsruhe (Deutschland)
Xylencyanol	Serva; Heidelberg (Deutschland)

3.1.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg/ml Ampicillin in sterilem Aqua bidest.

Sterilfiltrieren.

6x DNA-Ladepuffer:

0,09% Bromphenolblau

0,09% Xylencyanol

60% Glycerin

60 mM EDTA pH 8

50 x Denhardt's:

1% Polyvinylpyrrolidon

1% Ficoll 400

1% BSA

in sterilem Aqua bidest. Sterilfiltrieren.

0,5 M EDTA:

186,12 g EDTA in 800 ml sterilem Aqua bidest verdünnen und auf pH 8 mit NaOH einstellen. Ad 1l steriles Aqua bidest. Autoklavieren.

EtBr-Stammlösung:

10 mg/ml in sterilem Aqua bidest.

Arbeitskonzentration: 100 ng/ml

10x HeBS

1,36 M NaCl

0,05 M KCl

7 mM Na₂HPO₄

0,2 M HEPES

1% Glukose

In sterilem Aqua bidest. Auf pH 7,1 mit NaOH einstellen,

1x HeBS

10x HeBS 1:10 (v/v) in sterilem Aqua bidest verdünnen und auf pH 7,12 mit NaOH einstellen. Sterilfiltrieren.

Hefe-RNA:

10 mg/ml Hefe-RNA in sterilem Aqua bidest.

Heparin:

10 mg/ml in sterilem Aqua bidest.

Hybridisierungspuffer:

50% Formamid

5 x SSC

0,2 mg/ml Hefe-RNA

0,1% Tween20

1% SDS

1 x Denhardt's

0,1 mg/ml Heparin

in sterilem Aqua bidest.

IPTG-Stammlösung:

1 M in sterilem Aqua bidest.

LB-Medium:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Ad 1l steriles Aqua bidest. Autoklavieren.

LB-Agar-Platten:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar

Material und Methoden

Ad 1l steriles Aqua bidest. Autoklavieren. Auf 50°C abkühlen lassen und entsprechendes Antibiotikum und gegebenenfalls X-Gal und IPTG zugeben. Medium sanft mischen und in sterile Petrischalen (Ø 9,4 cm) gießen.

Für LB-Amp-Platten 100 µg/ml Ampicillin und für LB-AXI-Platten zusätzlich 40 µg/ml X-Gal und 0,2 M IPTG zugeben.

100x Mg-Lösung:

0,1 M MgCl₂

4,5 M β-Mercaptoethanol

Sterilfiltrieren.

0,1 M Natriumphosphatpuffer:

41 ml 0,2 M Na₂HPO₄

9 ml 0,2 M NaH₂PO₄

50 ml steriles Aqua bidest.

Autoklavieren.

***Nematostella*-Medium:**

541,6 g Meersalz (TropicMarin) in 50l Aqua bidest lösen und pH auf 7,5-8 einstellen.

NTMT:

100 mM NaCl

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)

50 mM MgCl₂

0,1% Tween20

1x ONPG-Lösung:

4 mg/ml ONPG in 0,1M Natriumphosphatpuffer pH 7,5.

Sterilfiltrieren.

10x PBS:

1,5 M NaCl

0,08 M Na₂HPO₄

0,02 M NaH₂PO₄

Autoklavieren.

1x PBT:

100 ml 10x PBS in 900 ml sterilem Aqua bidest verdünnen und 1 ml Tween20 zugeben.

SOB-Medium:

20 g Trypton

5 g Hefeextrat

2 ml 5M NaCl

1,25 ml 2M KCl

Ad 1l steriles Aqua bidest Autoklavieren.

20x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

in 900 ml sterilem Aqua bidest Auf pH 7 einstellen. Ad 1l steriles Aqua bidest. Autoklavieren.

50x TAE:

242 g Tris

100 ml 0,5 M EDTA pH 8

57,1 ml Eisessig

Ad 1l steriles Aqua bidest.

Transformationspuffer:

3 g PIPES

2,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

18,6 g KCl

950 ml Aqua bidest zugeben und pH auf 6,7 mit KOH einstellen. 10,9g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ zugeben und auf 1l mit Aqua bidest auffüllen. Sterilfiltrieren (\varnothing 0.2-0.22 microm)

X-Gal-Stammlösung:

20 mg/ml in Dimethylformamid.

3.1.3 Bakterien

DH5 α : F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ dlacZ Δ M15
 Δ (lacZYA-argF)U169 hsdR17(r_K-m_K) λ -

3.1.4 Enzyme

Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finzymes (Thermo Fisher Scientific); Vantaa (Finnland)
EuroTaq Polymerase	BioCat GmbH; Heidelberg (Deutschland)
SP6 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim (Deutschland)
T7 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim (Deutschland)
DNaseI, RNase-free	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim (Deutschland)
RNaseOUT (RNase-Inhibitor)	Invitrogen GmbH; Darmstadt (Deutschland)
SuperScriptIII Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH; Darmstadt (Deutschland)
T4 DANN-Ligase	Promega GmbH; Mannheim (Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot (Deutschland) und New England Biolabs GmbH; Frankfurt am Main (Deutschland)

3.1.5 Geräte

Autoklave/Dampfsterilisator Typ W	Holzner Medizintechnik GmbH; Nußloch (Deutschland)
-----------------------------------	---

Material und Methoden

Tischzentrifuge Heraeus Biofuge pico	Heraeus Instruments (Thermo Fisher Scientific); Waltham, Massachusetts (USA)
Zentrifuge Beckman GS-6KR (Schwenkrotor)	Beckman Coulter GmbH; Krefeld (Deutschland)
Zentrifuge Sorvall RC5C (Rotoren: GS-3, GSA, SA-600 and SS-34)	Sorvall Instruments (Thermo Fisher Scientific); Hamburg (Deutschland)
-20°C-Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH; Biberach an der Riss (Deutschland)
-80°C-Gefrierschrank Forma -86C ULT	Thermo Electron Corporation (Thermo Fisher Scientific); Waltham, Massachusetts (USA)
Geldokumentationssystem GelJetImager	Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen (Deutschland)
Schüttelinkubator Multitron Standard Inkubator Typ B50	Infors HT; Bottmingen (Schweiz) Memmert GmbH + Co. KG; Schwabach (Deutschland)
Konfokales Inversionsmikroskop Nikon A1R with Nikon Eclipse Ti Fluoreszenzinversionsmikroskop	Nikon Instruments Europe B.V.; Kingston, Surrey (England)
Nikon Eclipse 80i (camera: Nikon Digital Sight DS-U1)	Nikon Instruments Europe B.V.; Kingston, Surrey (England)
Magnetrührer Typ MR1	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG; Kelheim (Deutschland)
Real-Time PCR Detektor Chromo4	BioRad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Thermozykler DNA Engine	BioRad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Thermozykler GeneAmp PCR system 2400	Perkin Elmer; Rodgau (Deutschland)
Thermozykler MyCycler	BioRad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Thermozykler PalmCycler CG1-96	Corbett Research; Cambridge (England)

Material und Methoden

pH-Meter Digital-pH-Meter 646 (pH-electrode: Mettler Toledo inLab 417) Pipetten 2 µl, 20 µl, 200 µl and 1000 µl	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG; Berlin (Deutschland) Gilson Inc.; Middleton, Wisconsin (USA)
Netzgerät für DNA-Gele Gene Power Supply GPS 200/400 Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer SmartSpecPlus	Pharmacia (GE Healthcare life sciences); Uppsala (Schweden) Peqlab; Erlangen (Deutschland) BioRad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Heizschüttler Thermomixer comfort (Deutschland)	Eppendorf AG; Hamburg
Ultrazentrifuge L8-55 (Schwenkrotor: SW 40) UV-Transilluminator chromato-Vue TM-20 Vortexer Typ REAX-1	Beckman Coulter GmbH; Krefeld (Deutschland) UVP; San Gabriel, California (USA) Heidolph Elektro GmbH & Co. KG; Kelheim (Deutschland)
Wasserbad JULABO Typ A6/U3	JULABO Labortechnik GmbH; Seelbach (Deutschland)
Wassersystem für ultrareines Aqua bidest, MilliQ	Millipore GmbH; Schwalbach (Deutschland)
Wassersystem für die Tierkultur, Elix	Millipore GmbH; Schwalbach (Deutschland)

3.1.6 Primer

Alle Primer wurden von Eurofins/MWG/Operon (Ebersberg; Deutschland) bezogen.

Primer für die Klonierung der *Nematostella* Wnt-Liganden

NvWntA

WntA_fwd08Bam: 5' gtagaggatccatggctgtctccgttcagctca 3'

WntA_rev08Xho: 5' ggggtgctcgagttatcggcatcgatactcggtc 3'

Material und Methoden

NvWnt1

NWnt1_genfwd_BAM 5' gcggatccgcagaccatgcaacgattcagc 3'
Wnt1_Orf_Xho_rev 5' cattctcgagatgattataagcagttac 3'

NvWnt2

Wnt2_Orf_Eco_fwd 5' gcgaattccgccgcataagttccgc 3'
Wnt2_Orf_Xba_rev 5' gccttctagaagcagcgactaaataccgggat 3'

NvWnt3

3RACE_943-970 5' gctctgctgcgggcgtggccacaatc 3'
3RACE_973-1000 5' gcaagcgaaaattaccaggaattgtaac 3'
3RACE_1004-1030 5' gtattcaagtgggttggaagtcaag 3'
NWnt3_fwd_Bam_ORF 5' ggatccgagaaacgcggcatcatgagag 3'
NWnt3_rev_Xba_ORF 5' tctagagctggattattacaagttagatgtaacc 3'

NvWnt4

N28_genfwd_ECO 5' gaattcgttcaataatgatcgcac 3'
N28_genrev_XHO 5' ctcgaggatatttgggtggtatttgc 3'

NvWnt5

Wnt5_fwd08Eco 5' tacttgaattcatggcttacctcgttttcc 3'
Wnt5_rev08Xba 5' ggacatctagactaattacagatatgcgtggtgac 3'
NWnt5_fwd_Eco_ORF 5' gaattccatggcttacctcgtttt 3'
NWnt5_rev_Xho_ORF 5' ctcgagttatcagactgggacaatgac 3'

NvWnt6

Wnt6_5RACE08-1 5' cccttggtcgtctcattgcatgtcc 3'
Wnt6_5RACE08-2 5' agtgtgtcttgatgcggctgctgacg 3'
Wnt6_5RACE09-1 5' ttcacaacaccagtgaaacctgcac 3'
Wnt6_5RACE09-2 5' gagctcacagccccagtc 3'
Wnt6_5RACE09-3 5' ctgccagccttccggcttta 3'

Material und Methoden

NvWnt7a

Wnt7a_5RACE08-1 5' ctgccgacttcggtgtgtggcgatt 3'
Wnt7a_5RACE08-2 5' ttttagagcccgtctccagcgcgttc 3'
Wnt7a_5RACE09-1 5' tagacagttgcgcgcttgc 3'
Wnt7a_5RACE09-2 5' gcgtgacgcacgaagcagat 3'
Wnt7a_5RACE09-3 5' ccggcactgctctttgacca 3'

NvWnt7b

Wnt7b_fwd08Eco 5' gcaatgaattcatggctaaatggtgctttgcga 3'
Wnt7b_rev08Xba 5' gccgctctagattactgacacgtgtggaccata 3'
NWnt7_fwd_Eco_ORF 5' gaattcgatacgaatacaaacatggctaaatgg 3'
NWnt7_rev_Xho_ORF 5' ctcgagctactgccgcccgcctttac 3'

NvWnt8a

Wnt8a_5RACE08-1 5' gcgcacacatttcgtaacagcaacca 3'
Wnt8a_5RACE08-2 5' cttaacagctttgcgcccacagcgt 3'
Wnt8a_5RACE09-1 5' cagcaaccaatttcttgactcg 3'
Wnt8a_5RACE09-2 5' cggtgcaaacacacgggaag 3'
Wnt8a_5RACE09-3 5' gccgtggcacttgactgtt 3'

NvWnt8b

Wnt8b_5RACE08-1 5' cgcctttctcccgacctcgtgtgt 3'
Wnt8b_5RACE08-2 5' ttttctgctttgtccttggcagggca 3'
Wnt8b_5RACE09-1 5' cctggctacgcatcgggttt 3'
Wnt8b_5RACE09-2 5' gcaacgacactcccgttca 3'
Wnt8b_5RACE09-3 5' gaccgcctttctcccgacct 3'

NvWnt10

Wnt10_fwd08Eco 5' gagttgaattcgacatggatttcagaggatttgtg 3'
Wnt10_rev08Xba 5' gggtttctagattaactgcagatactaacagttg 3'

NvWnt11

N35_genfwd_ECO 5' gaattcgatgtactctttgtttggc 3'
N35_genrev_2_XHO 5' ctcgaggacgtaagtaatctgacc 3'

Material und Methoden

NvWnt16

3RACE_1749-1774	5' gaactctagtgggggtggacgggtgtg 3'
3RACE_1780-1807	5' ctgtgctgtggcagcgggtacaacacgc 3'
3RACE_1811-1831	5' cggtgccgagcgttcattcgtgtcattg 3'
Wnt16_Orf_Bam_fwd	5' gtaaggatccaatatgttgaccggaccgtc 3'
Wnt16_Orf_Xho_rev	5' gcgtctcgagatagtctatttacaagtatacc 3'

Primer für die semiquantitative Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

NvWntA

RTWntAfw	5' ccgttcagtcataaccttag 3'
RTWntArev	5' cctgaaagacctgtgctgtg 3'

NvWnt1

RTWnt1fw	5' gcgatcctcttagtggcatg 3'
RTWnt1rev	5' gctgtgagccgaacaattcc 3'

NvWnt2

RTWnt2fw	5' gaaaacggaatctcattgggtgg 3'
RTWnt2rev	5' gacgaaagccgtctcgcg 3'

NvWnt3

RTWnt3fw	5' gctggatcgagcggaggctg 3'
RTWnt3rev	5' acggaatgcgagcgcctg 3'

NvWnt4

RTWnt4fw	5' cgagttgtaatggcttc 3'
RTWnt4rev	5' cgtgtccctccattgatag 3'

NvWnt5

RTWnt5fw	5' gcttacctcgttttccacg 3'
RTWnt5rev	5' gaggagatcgcgatgtcag 3'

Material und Methoden

NvWnt6

RTWnt6fwd 5' cacgtctataactcagttcgg 3'

RTWnt6rev 5' cgttcgcctttattgtccac 3'

NvWnt7a

RTWnt7afwd 5' cacaagccctcccttcgc 3'

RTWnt7arev 5' ggtgagtgctagaccagtc 3'

NvWnt7b

RTWnt7bfwd 5' gttcttaaatgcgaacgaacgc 3'

RTWnt7brev 5' cgacgatgtacgcgggc 3'

NvWnt8a

RTWnt8afwd 5' gacagccttcgtacacag 3'

RTWnt8arev 5' gtggcacttgactgttg 3'

NvWnt8b

RTWnt8bfwd 5' gcatggcataagcgcggc 3'

RTWnt8brev 5' gcaactcccactgatacc 3'

NvWnt10

RTWnt10fwd 5' cagatccactccaagggattc 3'

RTWnt10rev 5' gaacgctgtctcacggaac 3'

NvWnt11

RTWnt11fwd 5' gtcctttgcctgtcattttgg 3'

RTWnt11rev 5' caciaaacgcagcctctgg 3'

NvWnt16

RTWnt16fwd 5' ccttggtgtgggactg 3'

RTWnt16rev 5' ggctgactctttgtgcgc 3'

Primer für die quantitative *Real-Time* PCR (qPCR)

NvActivin

NvActivin_qRT_5 5' tccagaaattgcacatggat 3'

NvActivin_qRT_3 5' tctgtcgcgatttagagtg 3'

NvBMP2/4

NvBmp2/4_qRT_5 5' acagtgacctccgcagaact 3'

NvBmp2/4_qRT_3 5' gtctcccattccaggcagta 3'

NvBrachyury

NvBra_qRT_5 5' aaccttcaccgtcaacgac 3'

NvBra_qRT_3 5' tgacttggctgtcctctgtg 3'

NvCadherin1

NvCad1-qRT_5: 5' ggagatgacgtgggagactt 3'

NvCad1-qRT_3: 5' cgtagcggtagatgtgcagt 3'

NvCadherin2

NvCad1-qRT_5: 5' acgggttacattatgaatatcatcg 3'

NvCad1-qRT_3: 5' attgtcattaatgttcaccacattg 3'

NvChordin

NvChd_qRT_5 5' aatgctgtgggtcccagttc 3'

NvChd_qRT_3 5' gctgaacgccgattagtagc 3'

NvEF1 α

NvEF1a_qRT_5 5' gggtgcctcttcgcttaccact 3'

NvEF1a_qRT_3 5' cggtcctggctttaggacac 3'

NvFGFa1

FGFa1_qRT_5: 5' ttcacttcgagatgcaatca 3'

FGFa1_qRT_3: 5' cggttctaagtgaccgtctc 3'

Material und Methoden

NvFGFRa1

FGFRa_qRT_5: 5' tggaaattctggctaagtcg 3'
FGFRa_qRT_3: 5' tagcacgacgactctgtgaa 3'

NvForkhead

Fkh_qRT_5 5' ggaatgcggaatatgttcg 3'
Fkh_qRT_3 5' tgcatactgctcaccttgc 3'

NvSnailA

NvSnailA_qRT_5: 5' ctcccgagagagtggaaaat 3'
NvSnailA_qRT_3: 5' ctagtcacttcagccgggta 3'

NvSnailB

NvSnailB_qRT_5: 5' acgaactcataccggtgaaa 3'
NvSnailB_qRT_3: 5' cacgtcagaatgcgtctgta 3'

NvTCF

TCF3_qRT_5 5' cccagctcctcctcctaate 3'
TCF3_qRT_3 5' aatttgctgtctcgctccatcat 3'

NvWntA

WntA_qRT_5' 5' gcccaattactacgcaagaa 3'
WntA_qRT_3' 5' ttcttcttaccgcttacc 3'

NvWnt1

Wnt1_qRT_5' 5' agagaaaccgcattcacgta 3'
Wnt1_qRT_3' 5' ataccgctggtcacaagaac 3'

NvWnt2

Wnt2_qRT_5' 5' ggcacagctgtactcgaat 3'
Wnt2_qRT_3' 5' tttcttttccggttttcc 3'

Material und Methoden

NvWnt3

Wnt3_qRT_5' 5' ccacctcaagggtgaagtacg 3'

Wnt3_qRT_3' 5' ggcttttgaaatggctgta 3'

NvWnt4

Wnt4_qRT_5' 5' tcgatggagctactgaggtc 3'

Wnt4_qRT_3' 5' caccaggtccatttgagtgt 3'

NvWnt5

Wnt5_qRT_5' 5' tcgctctcaagagaaaggaa 3'

Wnt5_qRT_3' 5' caccagctcgtctcttgttt 3'

NvWnt6

Wnt6neu_qRT_5' 5' accgcatcaagacacacttt 3'

Wnt6neu_qRT_3' 5' taggcggcttcactgtactc 3'

NvWnt7a

Wnt7a_qRT_5' 5' cgcgcaactgtctacctatc 3'

Wnt7a_qRT_3' 5' tgcagtagttaggcgaatcc 3'

NvWnt7b

Wnt7b_qRT_5' 5' gaagcttcgagctctgtacg 3'

Wnt7b_qRT_3' 5' ccttaacgacgatgtacgc 3'

NvWnt8a

Wnt8a_qRT_5' 5' tgcaacgacaatgtcaagtt 3'

Wnt8a_qRT_3' 5' ttgttgcaaatggatgac 3'

NvWnt8b

Wnt8b_qRT_5' 5' tggatcagtgaggagttgct 3'

Wnt8b_qRT_3' 5' gcttcgctgtgctgtatfff 3'

Material und Methoden

NvWnt10

Wnt10neu_qRT_5' 5' tctgccaaatTTTGGactc 3'

Wnt10neu_qRT_3' 5' cgTTTcactcaaggTcgTt 3'

NvWnt11

Wnt11_qRT_5' 5' gaggaacacaaatcgatgg 3'

Wnt11_qRT_3' 5' atgacacctgcagtTgaact 3'

NvWnt16

Wnt16neu_qRT_5' 5' Tgtcttcaaaaacccgatgt 3'

Wnt16neu_qRT_3' 5' ccatcgctcgTactTgaact 3'

3.2 Entwicklungsbiologische Methoden in *Xenopus laevis*

3.2.1 Induktion der Oogenese und in vitro Fertilisation

Die Oogenese wird in weiblichen *Xenopus laevis* durch Injektion von humanen Choriongonadotropin (HCG) subkutan in den dorsalen Lymphsack induziert. Für eine Eiablage nach 14 bis 16 Stunden werden 900 Einheiten des Hormons injiziert. Die Eiablage wird durch sanften Druck auf die Lendenregion des Weibchens stimuliert. Aus der Kloake austretende Eier werden in einer Petrischale aufgefangen. Ein Weibchen sollte nicht mehr als viermal zur Eiablage stimuliert werden; zwischen den Stimulationen sollte mindestens eine Stunde liegen. Bis zur folgenden Induktion sollten mindestens drei Monate vergehen.

Die unmittelbar auf die Eiablage folgende *in vitro* Fertilisation stellt eine gleichmäßige Befruchtung und damit eine möglichst synchrone Entwicklung sicher. Dazu wird ein Stück des Froschhodens in 1x MBSH mazeriert. 100 µl der entstandenen Suspension werden mit 900 µl sterilem Aqua bidest. auf das Gelege gegeben. Nach einer kurzen Inkubation in der Spermienlösung werden die Eier mit 0.1x MBSH überschichtet. Eine erfolgreiche Befruchtung äußert sich nach einer halben Stunde durch eine Rotation der pigmentierten, animalen Seite nach oben.

3.2.2 Entfernen der Gallerthülle

Ist die animale Rotation erfolgt, werden die Zygoten in 2% Cysteinlösung (pH 8,2) unter optischer Kontrolle maximal 5 min geschwenkt. Haften keine Zygoten mehr aneinander, wird das Cysteinchlorid mehrmals mit 0.1x MBSH ausgewaschen.

3.2.3 Mikroinjektion von *Xenopus laevis*

Zur ektopischen Überexpression bestimmter Gene wird *in vitro* transkribierte mRNA mit einer zur Hohlneedle mechanisch ausgezogenen Glaskapillare appliziert. Dabei werden das Volumen durch den Gasdruck und die Injektionszeit auf einem Eichgitter aus der Elektronenmikroskopie eingestellt, bis der austretende Tropfen die gewünschte Größe hat. In dieser Arbeit wurden für den Achseninduktionsassay im Vierzellstadium beide ventralen Blastomere in der Marginalzone injiziert. Sowohl Injektion als auch weitere Entwicklung der Embryonen findet in 0.1x MBSH statt.

3.2 Entwicklungsbiologische Methoden in *Nematostella vectensis*

3.3.1 Tierhaltung von *Nematostella vectensis*

Adulte *Nematostella vectensis* werden nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von bis zu 30 Tieren in Schalen mit einem Liter *Nematostella*-Medium (entsprechend 1/3 künstlichem Meerwasser) bei pH 7,5 - 7,8 und 18°C Wassertemperatur im Dunkeln gehalten. Die Tiere erhalten alternierend einmal oder zweimal in der Woche frisch geschlüpfte Salinenkrebslarven von *Artemia salina*. Das Medium wird einen Tag nach der Fütterung durch frisches ersetzt.

3.3.2 Induktion der Gametogenese und in vitro Fertilisation

Spermatogenese und Oogenese werden bei *Nematostella vectensis* durch Lichtgabe und durch Erhöhung der Temperatur auf 26°C induziert. Durchschnittlich sind nach einer Induktionsdauer von 14 h erste Eipackete bei Weibchen zu finden, das Medium der männlichen Tiere zeigt eine leicht milchige Trübung, was auf eine Freisetzung der Spermien schließen lässt. Die eigentliche Befruchtung kann nun entweder in einer Petrischale erfolgen oder direkt durch Umsetzen der Eipackete in die Schalen der induzierten Männchen. Eine Inkubationszeit von 30 min in der Spermienlösung ist dabei ausreichend.

3.3.3 Entfernen der Gallerthülle

Zur Vereinzelung der Zygoten werden die Eipackete nach der Befruchtung von der Gallerthülle befreit. Dies geschieht durch Behandlung mit 30 ml 4% Cysteinlösung in *Nematostella*-Medium pH 7,5 - 7,8 für maximal 30 min auf einem Kreisschüttler unter optischer Kontrolle. Haben sich die Zygoten aus der Gallerte gelöst, werden sie zur Entfernung des verbliebenen Cysteinchlorids mehrmals mit *Nematostella*-Medium gewaschen.

3.3.4 Mikroinjektion

Durch die Mikroinjektion von *in vitro* transkribierter mRNA oder von Expressionsplasmiden können Gene überexprimiert werden. Andererseits kann man durch Injektion von Morpholinos die Translation von Genen stören. *Nematostella*-

Zygoten werden vor ihrer ersten Zellteilung mit mRNA-, Plasmid- oder Morpholino-Lösung in 0,25 mM Tris-HCl pH 8 mit 1 mg/ml Alexa568- bzw. Rhodamin-Dextran Fluoreszenzfarbstoffen injiziert. Dabei dient eine Femtotip (Eppendorf), eine ausgezogene Glaskapillare zur Applikation und eine CustomTip-Haltekapillare (Eppendorf) der Fixierung einzelner Zygoten. Das Volumen der Injektionslösung wird durch Veränderung des Gasdrucks und der Injektionsdauer am FemtoJet-Mikroinjektor (Eppendorf) mithilfe der Farbstoffe am Fluoreszenzmikroskop so eingestellt, dass es etwa einem Fünftel des Volumens der Zygote entspricht.

3.3.5 Embryonenpflege und –reifung

Die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen lässt sich durch Inkubation bei 18°C oder bei Raumtemperatur steuern. So entwickeln sich Embryonen bei Raumtemperatur wesentlich schneller als bei 18°C. Das Kulturmedium wird täglich gewechselt, abgestorbene Embryonen und unbefruchtete Eier werden entfernt. Desweiteren erlaubt die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bei der Injektion uninjizierte und leckende Embryonen auszusortieren. Da der Mangel an morphologischen Anhaltspunkten eine genaue Einteilung der Entwicklungsstadien erschwert, wird meist der Zeitpunkt nach der Befruchtung oder eine grobe Einteilung nach Blastula, früher bis später Gastrula, Planula, Metamorphosestadium und Primärpolypen verwendet. Im gewünschten Stadium werden die Embryonen entweder für eine Ganzkeimfärbung oder Immunfluoreszenzfärbungen fixiert oder für RNA-Extraktion bei –80°C weggefroren.

3.3.6 Ganzkeimfärbung (In situ-Hybridisierung)

Die *In situ*-Hybridisierung ermöglicht spezifische mRNA-Sequenzen in Zellen von Geweben oder ganzen Organismen (Ganzkeimfärbung) zu lokalisieren und so das räumliche und zeitliche Expressionsmuster eines Gens zu verfolgen. Dazu wird eine Digoxigenin-markierten RNA-Sonde verwendet die komplementär an die gesuchte mRNA bindet. Diese markierte RNA-Sonde wiederum lässt sich mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase darstellen, der das Substrat NBT/BCIP (Tetrazolium-Salz/5-Brom-4-Chlor-3-idoly-Phosphat) oder BMPurple (Roche) zu einem blauen Präzipitat umsetzt.

Sofern nicht anders angegeben, finden alle Schritte bei Raumtemperatur statt. Die Embryonen werden im gewünschten Stadium mit eiskalten 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBT für eine Stunde fixiert und darauf dreimal mit PBT gewaschen. Nach Überführung in Methanol lassen sich die Embryonen bis zu 3 Monate bei -20°C lagern. Über eine absteigende Alkohol-Reihe werden die fixierten Embryonen mit jeweils 75% (v/v), 50% (v/v) und 25% (v/v) Methanol in PBT rehydratisiert und mit dreimaligem Waschen mit PBT für je 5 min von Alkoholresten befreit. Die Embryonen werden 20 min mit 4% PFA in PBT nachfixiert und fünfmal 5 min mit PBT gewaschen. Zur Vorbereitung der Hybridisierung werden die Embryonen 10 min bei Raumtemperatur mit Hybridisierungspuffer inkubiert. Nach Erneuern des Hybridisierungspuffers werden die Embryonen zwei Stunden bei 55°C und einer Geschwindigkeit von 650 rpm auf einem Heizschüttler inkubiert. Kurz vor der Hybridisierung wird die markierte RNA-Sonde für 5 min in Hybridisierungspuffer bei 65°C denaturiert, ehe der Hybridisierungspuffer abgenommen und durch die Sonde ersetzt wird. Sowohl Dauer (1 - 4 Tage) als auch Temperatur ($40 - 65^{\circ}\text{C}$) und Sondenkonzentration ($0,1 - 2 \text{ ng}/\mu\text{l}$) können während der Hybridisierung variiert werden, um entweder die Färbung zu verstärken oder den Hintergrund zu minimieren. Um ungebundene Sondenmoleküle zu entfernen, werden die Embryonen nach der Hybridisierung mit vorgewärmten Hybridisierungspuffer zehn Minuten bei 65°C gewaschen und in einer absteigenden Reihe von 75% (v/v), 50% (v/v) und 25% (v/v) Hybridisierungspuffer in 2x SSC für jeweils 30 min bei 65°C auf einem Heizschüttler bei 650 rpm in 2x SSC umgepuffert und anschließend dreimal mit PBT bei Raumtemperatur gewaschen. Die Embryonen werden nun entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Blockierungspuffer (1% blocking solution in PBT) äquilibriert, bevor sie mit der Antikörperlösung (Antidigoxigenin-AK/alkalische Phosphatase-Konjugat 1:3000 in Blockierungspuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Ungebundener Antikörper wird durch drei jeweils 30 min Waschschrte mit PBT entfernt. Danach wird zweimal mit NTMT gewaschen und die Embryonen werden in 24 well plates überführt, um sie während der folgenden Färbereaktion besser optisch kontrollieren zu können. Hierzu wird das NTMT abgenommen und durch eine NBT/BCIP-Lösung in NTMT oder das gebrauchsfertige BM purple-Reagenz (beide Roche) ersetzt. Die Farbreaktion erfolgt nun innerhalb 30 min bis 12 h bei Raumtemperatur oder 6 h bis zwei Tagen bei 4°C im Dunkeln und wird gelegentlich am Binokular kontrolliert. Ist die gewünschte Farb-

intensität erreicht, wird die Reaktion abgestoppt, indem die Embryonen dreimal für je 5 min mit PBT gewaschen werden. Leichte Hintergrundfärbung kann optional durch Behandlung mit Ethanol für 20 min bis zwei Stunden entfernt werden. Abschließend werden die Embryonen dreimal mit PBS gewaschen, ehe sie zur Dokumentation in 50% Glycerin in PBS aufgenommen und auf Objektträger montiert werden.

3.3.7 Fluoreszenzfärbung mit Phalloidin

Phalloidin ist ein toxisches Cyclopeptid aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*, das irreversibel an filamentöses Actin bindet. Durch Konjugation mit Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich so Zellgrenzen darstellen.

Sofern nicht anders angegeben finden alle Schritte bei Raumtemperatur statt. Die Embryonen werden im gewünschten Stadium mit eiskalten 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS für eine Stunde fixiert und darauf 3x mit PBS gewaschen. Eine zehnmütige Behandlung mit dem Detergenz 0,5% TritonX-100 in PBS permeabilisiert die Embryonen und erleichtert die Aufnahme in Zellen. Danach wird zweimal mit PBS gewaschen, die Embryonen kommen für eine halbe Stunde in Blockierungslösung (5% normal goat serum in PBT), bevor sie eine Stunde in einem Phalloidin/DAPI-Gemisch (Phalloidin 1:200 und DAPI 1:1000 in Blockierungslösung) inkubiert werden. Abschließend werden die Embryonen dreimal in PBT und zweimal in PBS für jeweils 5 min gewaschen, ehe sie zur Dokumentation in 90% Glycerin in PBS aufgenommen und auf Objektträger montiert werden.

3.4. Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Bakterielle Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen, meist palindromischen Sequenzen, wobei an den Schnittstellen glatte oder überhängende Enden entstehen. Für Restriktionsanalysen werden zwei bis drei Einheiten Restriktionsendonuklease pro μg DNA und ein Zehntel Volumen des entsprechenden, zehnfach konzentrierten Puffers bei der optimalen Reaktionstemperatur über Nacht in einem Gesamtvolumen von 20 μl inkubiert.

3.4.2 Fällung von DNA und RNA

Nukleinsäuren lassen sich aus Lösungen isolieren, indem man der Lösung das doppelte Volumen absolutes Ethanol sowie ein Zehntel-Volumen 3M Natriumacetat-Lösung pH 5.2 zugibt. Der Ansatz wird nach kurzem Durchmischen für mindestens eine Stunde bei -80°C gefällt. Die präzipitierten Nukleinsäuren werden für 30 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Präzipitat wird mit dem Doppelten des Ausgangsvolumen 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für weitere 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das verbliebene Präzipitat bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in einem geeigneten Volumen sterilen Aqua bidest. resuspendiert.

Alternativ lassen sich Nukleinsäuren auch mit Isopropanol fällen. Dabei wird der Lösung das 0.7-fache des Ausgangsvolumens an Isopropanol zugegeben. Die Fällung erfolgt bei Raumtemperatur ohne Wartezeit. Die präzipitierten Nukleinsäuren werden für 20 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Präzipitat mit dem Doppelten des Ausgangsvolumen 70% (v/v) Ethanol gewaschen und weiter wie oben verfahren.

3.4.3 Isolierung von Gesamt RNA

Zur Isolierung wird RNeasy Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben verwendet und in Teilen modifiziert. Embryonen und Zygoten von *Nematostella* werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Nachdem sich die Tiere auf dem Gefäßboden absetzen wird das Medium abgenommen und mit frischem *Nematostella*-Medium ersetzt. Dies wird fünfmal wiederholt, ehe die Tiere in 350 μl 1% Mercaptoethanol in RLT-Puffer (Quiagen) mit einem Vortexschüttler lysiert werden. Sind die Tiere komplett gelöst, werden 350 μl 70%iges Ethanol zugegeben und durch Pipettieren durchmischt. Das Gemisch wird auf eine Säule aus dem RNeasy Kit gegeben und 15 s bei 10000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen und 350 μl RW1-Puffer (Quiagen) werden auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert, der Durchfluß wird verworfen. Die Säule wird nun 15 min mit 80 μl DnaseI-Lösung (10 u DnaseI in RDD-Puffer (Rnase-free Dnase Set; Quiagen)) inkubiert. Darauf wird zweimal mit 350 μl RW1-Puffer (Quiagen) gegeben, wie oben zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Dieser Waschschrift wird zweimal mit 500 μl RPE-Puffer

(Quiagen) wiederholt. Mit einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm wird die Säule von Pufferresten befreit und 15 min getrocknet. Abschließend wird die RNA mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser in ein frisches Reaktionsgefäß durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 min eluiert.

3.4.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wird bis zu 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10,5 µl eingesetzt. Die RNA wird zusammen mit 0,25 µl Random Hexamer (100 ng/µl), 0,25 µl Oligo-d(T)-Primer (50 µM) und 1 µl 10 µM dNTP-Mix 5 min bei 60°C erhitzt und sofort mit Eiswasser gekühlt. Separat wird ein Enzymmix aus 4 µl 5x Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl „SuperScript III Reverse Transkriptase“ (Invitrogen) angesetzt. Dieser Enzymmix wird zu dem denaturierten RNA-Primer-Gemisch gegeben und der Gesamtansatz 10 min bei 25°C inkubiert. Danach erfolgt die enzymatische cDNA-Synthese zwei Stunden bei 50°C und wird durch einen finalen Inkubationsschritt von 15 min bei 70°C gestoppt. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen wird für jeden Ansatz auch ein Parallelansatz ohne Reverse Transkriptase pipettiert, aus dem in einer anschließenden PCR kein DNA-Fragment amplifiziert werden darf. Die cDNA kann entsprechend verdünnt sofort verwendet oder bei – 20°C gelagert werden.

3.4.5 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

Geladene Nukleinsäuren, beispielsweise DNA-Fragmente, wandern in einem elektrischen Feld proportional ihrer Größe durch eine Agarosematrix. Dabei wandern Moleküle umso schneller durch die Agarosematrix, je kleiner sie sind. Für ein Flachbettgel werden 1-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer gelöst. Wenn die Suspension auf etwa 50°C abgekühlt ist, wird sie in eine vorbereitete Gelform gegossen, in der sie im Verlauf der weiteren Abkühlung aushärtet. Um Geltaschen für die Probenaufnahme auszusparen, wird ein Kamm in der Form positioniert. Nach dem Aushärten des Gels werden die Proben mit Ladepuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und in die Geltaschen gegeben. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 80 bis 110 V werden RNA- und DNA-Fragmente aufgetrennt, da sie als mehrfach negativ geladene Polyanionen auf die Anode zu wandern. Die ungefähre Laufstrecke in der Agarosematrix lässt sich durch das im Ladepuffer enthaltene Phenolblau

abschätzen. Ist die gewünschte Laufstrecke erreicht, wird das Gel fünf Minuten mit 0,01% Ethidiumbromid in destilliertem Wasser inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser für fünf Minuten gewaschen. Das mit Nukleinsäuren interkalierte Ethidiumbromid kann nun mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm oder 254 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Lichtemission wird mit dem Intas GDS-System aufgenommen und in digitaler Form gespeichert. Die Größenzuordnung der DNA-Banden erfolgt durch den Laufstreckenvergleich mit parallel auf dem Gel aufgetrennten Größenstandards.

3.4.6 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente werden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus der Gelmatrix herausgeschnitten und mit Hilfe des Wizard[®] SV Gel and PCR Clea-Up System (Promega) wird die DNA entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Das ausgeschnittene Gelstück wird in 10 µl Membrane Binding Solution pro 100 mg Gel für 10 min bei 50 - 65°C auf einem Heizschüttler geschmolzen. Das im Puffer enthaltene Guanidinisothiocyanat verringert die Hydrathülle der DNA und ermöglicht ihr an eine Silika-Matrix zu adsorbieren. Während der einminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm passieren Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid und Farbstoffe die Matrix, während DNA zurückgehalten wird. Der Durchfluss wird verworfen. Die Membran wird durch Zugabe von 700 µl Membrane Wash Solution und einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm gewaschen, der Durchfluss verworfen. Dies wird mit 500 µl Membrane Wash Solution für fünf Minuten wiederholt. Die Membran wird eine Minute trocken zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Anschließend setzt man die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß und gibt 40 µl steriles Aqua bidest. direkt auf die Silica-Membran. Nach ein bis zwei Minuten wird die DNA durch Zentrifugation eluiert.

3.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden werden durch Schließen der Phosphatbrücken in der DNA enzymatisch ligiert.

Ein Reaktionsansatz hat ein Gesamtvolumen von 10 µl. Zu einem linearisierten Vektorplasmid wird das zu insertierende Fragment im drei- bis siebenfachen molaren

Überschuss zugegeben. Für die Ligation werden 1 µl 10x T4-Ligationspuffer und 1 µl (10 U) T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligation erfolgt bei 18°C über Nacht.

3.4.8 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zellen des *E. coli*-Stamms DH5α werden über Nacht in 5 ml antibiotikafreiem LB-Medium bei 37°C und 225 rpm angeimpft. 50 µl dieser Übernachtskultur werden in 50 ml SOB aufgenommen und bei 18°C über Nacht inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm von 0,4-0,6 erreicht ist. Darauf wird die Zellsuspension in einem zehnmütigen Schritt bei 4°C und 3700 rpm in einer Zentrifuge mit Schwenkrotor pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 17 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Nach zehn Minuten auf Eis wird die Suspension wie oben pelletiert. Das Pellet wird in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert, mit 0,3 ml DMSO versetzt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. 1 ml dieser Bakteriensuspension wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit flüssigem Stickstoff zehn Minuten gefroren. Nachdem die Suspension auf Eis aufgetaut ist, wird sie zu je 50 µl aliquotiert und zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.4.9 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

2 bis 4 µl einer Plasmid-DNA-Lösung werden in 50 µl DH5α-Bakteriensuspension aufgenommen und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Während einem 45 Sekunden langen Hitzeschock bei 42°C nehmen die Bakterien die fremde DNA auf. Durch anschließende Inkubation von zwei Minuten auf Eis wird die Transformationseffizienz erhöht. Nach der Inkubation auf Eis wird 450 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und eine Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 300 µl dieses Ansatzes werden auf einer LB-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.4.10 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA

Bei dieser Methode wird Plasmid-DNA nach selektiver Fällung chromosomaler DNA durch die Adsorption an eine Affinitätsmatrix mit einem hohen Reinheitsgrad gewonnen. Mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

(Promega) und des Plasmid Midi bzw. Maxi Kits (Qiagen) wird die Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Allen Systemen gemein ist die alkalische Lyse unter denaturierenden Bedingungen. Dabei wird die Zellmembran durch Zugaben von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen. Die Zugabe einer hoch salzhaltiger Acetatlösung bewirkt, dass SDS präzipitiert und mit denaturierten Proteinen, zellwandgebundener chromosomaler DNA und Zelltrümmern Komplexe bildet. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert unter diesen Bedingungen und bleibt in Lösung, wodurch sie in einem Zentrifugationsschritt von dem Präzipitat getrennt werden kann. Durch Adsorption an eine Silika-Membran unter Hochsalzbedingungen werden die Plasmide in einer Säule zurückgehalten und können so in mehreren Waschschritten mit ethanolhaltigen Puffern von RNA, Proteinen und weiteren Verunreinigungen befreit werden. Die Plasmide können unter Niedrigsalzbedingungen entweder direkt mit Wasser eluiert oder in einem weiteren Fällungsschritt mit Isopropanol konzentriert werden, bevor die DNA in Wasser gelöst wird.

3.4.11 *In vitro* Transkription

Mit dem mMESSAGE mMACHINE[®] Transkription Kit (Ambion) lässt sich aus einer DNA-Matrize, einem PCR-Produkt oder einem linearisierten Plasmidvektor, durch *in vitro* Transkription synthetische mRNA für die Mikroinjektion herstellen. Dabei muss vor dem zu transkribierenden Zielgen ein geeigneter Phagen-Promotor liegen, der von der entsprechenden RNA-Polymerase (Sp6, T3 oder T7) erkannt wird.

Für die mRNA-Synthese werden in einem 20 µl Ansatz 1 µg linearisierte DNA-Matrize mit 10 µl 2x NTP/Cap, 2 µl 10x Transkriptionspuffer und 2 µl RNA-Polymerase (Sp6, T3 oder T7) zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die DNA-Matrize wird in einen fünfzehnminütigen Inkubationsschritt mit 1 µl TURBO DNase bei 37°C aus dem Ansatz entfernt.

Nach dem DNase-Verdau wird die mRNA durch Lithiumchloridpräzipitation gereinigt. Dabei wird der 20 µl Ansatz mit 30 µl Nuklease freiem Wasser und 30 µl LiCl Precipitation Solution (7,5 M LiCl, 50 mM EDTA) durchmischt und 30 Minuten bei -20°C inkubiert, wodurch die RNA präzipitiert. So kann die RNA in einer fünfzehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen werden. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei

4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Qualität der erhaltenen RNA-Lösung wird durch Gelelektrophorese überprüft, die Konzentration gemessen und bei –80°C gelagert.

3.4.12 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Sequenzen durch die Wahl von spezifischen, die Sequenz flankierenden Primerpaaren exponentiell amplifizieren. Die eingesetzten DNA-Polymerasen richten sich dabei nach dem weiteren Verwendungszweck des amplifizierten Fragments. So wird für eine analytische PCR Euro*Taq* Polymerase (Euro Clone) verwendet, da sie schnell arbeitet und diese Anwendung keine Fehlerkorrektur erfordert. Bestimmte Anwendungen wie z.B. die Klonierung bedingen jedoch die Verwendung der *proofreading* „Phusion High Fidelity“ DNA Polymerase (Finnzymes).

Ein Reaktionsansatz enthält 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 0,75 µl 50 mM MgCl₂, 0,25 µl Polymerase (entsprechend 1,25 Einheiten), je 1 µl der entsprechenden Primer (10 µM) und 1 µl DNA-Matrize. Der Ansatz wird in 0,2 ml Reaktionsgefäßen mit sterilem Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen eingestellt.

Das Standard-PCR-Programm im Thermozykler beginnt mit der Denaturierung der DNA-Matrize für zwei Minuten bei 94°C. Die folgenden Zyklen beginnen ebenfalls mit einem 30-sekündigen Denaturierungsschritt bei 94°C, gefolgt von der Primerbindung an die einzelsträngige DNA-Matrize für 30 Sekunden bei 50°C - 65°C (entsprechend der Schmelztemperatur der Primerpaare) und einem abschließenden Elongationsschritt bei 72°C, wobei die Dauer von der Länge des erwarteten Amplikons und der Schnelligkeit der eingesetzten Polymerase abhängt. Die Gesamtzyklenzahl kann zwischen 20 und 40 variiert werden. Nach dem letzten Zyklus wird in einem terminalen Elongationsschritt für fünf Minuten bei 72°C die Reaktion vervollständigt.

3.4.13 Quantifizierung der Expressionsstärke mittels *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR beruht auf der Methode der gewöhnlichen Polymerase-Kettenreaktion und ermöglicht die direkte Quantifizierung der

amplifizierten DNA durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit doppelsträngiger DNA interkalieren. Dabei verstärkt sich die Fluoreszenzintensität proportional zu der Menge des Amplikons.

3.4.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE erfolgt die Trennung der Proteine im elektrischen Feld in einem denaturierenden Puffer. Durch die Zugabe von SDS (sodium dodecyl sulfate), einem anionischen Detergenz, und β -Mercaptoethanol werden die Proteine zu einer gestreckten Polypeptidkette entfaltet. SDS maskiert die Eigenladung eines Proteins, die Strecke, die ein Protein im elektrischen Feld durch die Polyacrylamidmatrix zurücklegt, wird lediglich vom Molekulargewicht des Proteins abhängig. Dabei wandern kleine Proteine weiter im Gel als große. Als relative Größenmarker dienen Proteine mit einem definierten Molekulargewicht.

Die Proteintrennung erfolgt in der bereits erwähnten Polyacrylamidmatrix. Ein Polyacrylamidgel wird gegossen, das bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese aus einem Sammelgel und einem Trenngel für die Separation besteht. Das Sammelgel besitzt eine große Porenweite und ist sauer. Die Proteine werden im Sammelgel in einer Zone geringerer Leitfähigkeit durch die schneller wandernden Chloridionen und dem langsameren Glycin gehalten. So werden die Proteine bei ihrer Passage durch das Sammelgel aufkonzentriert und die Trennschärfe erhöht. Das Trenngel ist basisch und besitzt verglichen zum Sammelgel eine geringere Porenweite und eine höhere Salzkonzentration. An der Grenze zum Trenngel werden die großen Proteine zunächst zurückgehalten bis die Glycin-Ionen, die durch den hohen pH-Wert ionisiert werden, vorbeigewandert sind. Im Trenngel werden die Proteine dann entsprechend ihrer molekularen Größe getrennt. Nach der Auftrennung werden Proteinbanden im Trenngel durch Anfärbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 12%iges Trenngel verwendet. Dabei werden für einen 10 ml-Ansatz 4 ml 30% Acrylamid, 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8) und 0,1 ml SDS (10%) sowie 3,3 ml Aqua bidest. gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 4 μ l TEMED und 100 μ l 10% (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet. Dieser Ansatz wird bis auf dreiviertel der Höhe zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Aqua bidest. überschichtet. Während das Trenngel polymerisiert, wird ein 5%iges

Sammelgel angesetzt. 2 ml dieses Sammelgels bestehen aus 0,33 ml 30% Acrylamid, 0,25 ml 0,5M Tris (pH 6,8) und 0,02 ml SDS (10%) sowie 1,4 ml Aqua bidest. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Wasser abgegossen, Flüssigkeitsreste mit einem Filterpapier abgetupft. Bevor das Sammelgel auf das Trenngel gegossen wird, wird die Polymerisation mit 2 µl TEMED und 20 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet. Um Proben aufzutragen, wird ein Kamm für die Ladetaschen in das Sammelgel eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ausgehärtet ist, wird der Kamm gezogen und die entstandenen Taschen gründlich mit Elektrophoreselaufpuffer gespült. Das zwischen den Glasplatten eingespannte Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Elektrophoreselaufpuffer gefüllt. Die Taschen werden mit den Proteinproben beladen und eine Spannung von 60 V angelegt. Sobald die Lauffront in das Trenngel eingetreten ist, wird die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wird gestoppt, nachdem die Lauffront das Gelende erreicht hat.

Nach der Auftrennung werden im Trenngel Proteinbanden durch Anfärbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht oder das Trenngel für die Proteinanalyse durch Western Blot weiterverwendet.

3.4.15 Coomassiefärbung

Das Trenngel wird für 20 Minuten in eine Coomassie-Färbelösung gelegt und danach in Coomassie-Entfärbelösung unter optischer Kontrolle entfärbt, bis Proteinbanden deutlich erkennbar werden.

3.4.16 Proteinanalyse mittels Western Blot

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden beim Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran quantitativ transferiert und immunochemisch detektiert. Dazu werden sechs 3 MM Filterpapierstücke und die Nitrocellulosemembran in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und mit zwei Faserpolstern fünf Minuten in 1x Elektrophorese-Puffer und 10% Methanol äquilibriert. Die Bestandteile werden wie folgt zu einem Sandwich zusammengebaut und in eine eisgekühlte Blotapparatur eingesetzt:

Kathode

ein Faserpolster

drei Filterpapiere

Trenngel

Nitrocellulosemembran

drei Faserpolster

ein Faserpolster

Anode

Um eine gute Transfereffizienz zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Bestandteilen befinden. Der Transfer erfolgt für 90 Minuten bei 111 Volt und 0.3-0.4 Ampère. Danach wird die Nitrocellulosemembran einige Minuten mit einer Ponceau S-Färbelösung gefärbt und mit Aqua bidest. wieder abgewaschen, bis die Proteinbanden des Molekulargewichtsmarkers mit einem Kugelschreiber markiert werden können. Freie Proteinbindungsstellen der Membran werden anschließend 30 min mit 10% Magermilchpulver in PBS blockiert. Danach wird die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen, bevor sie bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper (anti-myc 9E10 unverdünnt) inkubiert wird. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper zurückgewonnen und für eine eventuelle Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Membran wird dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und anschließend mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (1:20 000 in PBS verdünnt) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit folgen ebenfalls drei zehnmünütige Waschschrirte mit PBST. Zum Nachweis der gesuchten Proteine wird die katalytische Aktivität der Peroxidase ausgenutzt. Diese setzt ein Substrat um, das aus zwei Lösungen aus dem ECL+plus Western Blotting Detection System-Kit besteht, die im Verhältnis 1:40 gemischt werden. Die dabei entstehende Chemilumineszenz beruht auf der Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol und kann durch die Beleuchtung von Photopapier Diese dokumentiert werden.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung humaner Cervix-Karzinom-Zellen (HEK293-T)

Die Zellen werden bei 37°C unter 7% CO₂ in DMEM-Komplettmedium für humane Zellen in 50 ml Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen kultiviert. Um konfluente Zellen zu vereinzeln, wird das Medium abgesaugt und durch 1 ml Trypsin/EDTA ersetzt. Durch leichtes Klopfen der Gewebekulturflaschen unter optischer Kontrolle an einem inversen Mikroskop lässt sich der Ablösevorgang beschleunigen. Sind die Zellen vereinzelt, werden sie in 20 ml frischem Medium aufgenommen und auf vier neue Gewebekulturflaschen verteilt.

3.5.2 Kalziumphosphat-Transfektion von Kulturzellen

Eine modifizierte Kalziumphosphatmethode nach Gorman (1985) wird angewandt, um transient transfizierte HEK293-Zellen für die Reporter-Gen-Assays zu erhalten. Dabei wird die Fähigkeit der Zellen ausgenutzt, Kalziumphosphatkristalle zu phagozytieren, um kopräzipitierte Plasmid-DNA in die Zellen einzubringen. Um von den Zellen aufgenommen zu werden, ist die richtige Größe der Präzipitate entscheidend. Präzipitate in geeigneter Größe bilden sich allerdings nur bei einem pH-Wert zwischen 6,9 und 7,5. Ein Tag vor der Transfektion werden die Zellen semikonfluent auf 50 ml Gewebekulturflaschen ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion wird das Medium abgenommen und durch exakt 5 ml frisches Medium pro Gewebekulturflasche ersetzt. Dadurch wird der Stoffwechsel der Zellen angeregt und gleichzeitig ihre Kompetenz erhöht, DNA-Präzipitate aufzunehmen. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wird in 1 ml 1x HeBs verdünnt. Für die Bildung der Präzipitate wird unter gleichmäßigem Rühren langsam 50 µl 2,5 M CaCl₂ zupipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasmid-HeBs-CaCl₂-Gemisch wird vollständig zu den Zellen in die Zellkulturflaschen gegeben. Unter dem inversen Mikroskop lässt sich nach kurzer Zeit ein flockiger Niederschlag auf den Zellen und den Flaschenböden beobachten. Nach einer vierstündigen Inkubation wird das Medium gewechselt und überschüssige Präzipitate werden so entfernt. Die Zellen werden 48 Stunden nach Zugabe der DNA-Präzipitate geerntet.

3.5.3 Reporteragen-Assay im Zellkultursystem

Der transiente Transfektions-Assay läßt quantitative Aussagen über den Einfluss von Faktoren auf einen untersuchten Promotor zu. Dazu wird ein Reporteragen unter die Kontrolle des jeweiligen Promotors gestellt. Verbreitete Reporterogene sind Enzyme, deren katalytische Aktivität durch die Umsetzung eines Substrats gemessen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der verschiedenen *Nematostella* Wnt-Liganden auf den TOPFlash-Reporter untersucht. Dieser besteht aus einem basalen Promotor und mehreren Tcf-Bindestellen, die das Enzym Luziferase kontrollieren. Um die Promotoraktivität in Relation zur Transfektionseffizienz zu setzen, wird neben dem TOPFlash-Vektor ein β -Galaktosidase-Konstrukt kotransfiziert, bei dem das β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalovirus-(CMV-)Promotors steht. Anhand dieses zweiten Konstrukts werden die einzelnen Ansätze normalisiert.

Zwei Tage nach der Transfektion werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen werden die Zellen in 250 ml 1x Reporter Lysis Buffer (Promega) für 30 min auf einem Schüttler inkubiert, ehe das Zell-Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wird und die Zellen mit flüssigem Stickstoff weiter aufgeschlossen werden. Nach Auftauen des Lysats wird es gevortext und 15 s bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird weiterverwendet, das Pellet verworfen.

3.5.4 Messung von Luziferaseaktivität in Zell-Lysaten

20 μ l des Zell-Lysats werden mit 100 μ l Luciferase Assay Reagent (Promega) versetzt. Das in dem Luciferase Assay Reagent enthaltene Luziferin wird zu Oxyluziferin umgesetzt. Das emittierte Licht wird mit einem Luminometer detektiert und in relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) angegeben.

3.5.5 Nachweis von β -Galaktosidase in Zell-Lysaten

β -Galaktosidase wird indirekt durch die Umsetzung von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) nachgewiesen. Die Gelbfärbung durch das entstehende o-

Nitrophenol kann spektralphotometrisch gemessen werden. Dazu werden 60 µl Zell-Lysat mit 6 µl 100x Mg-Lösung, 132 µl ONPG-Lösung und 402 µl 0.1 M Natriumphosphat pH 7,5 versetzt und unter optischer Kontrolle bei 37°C inkubiert. Für den Nullwertabgleich am Spektralphotometer wird ein Ansatz mit 60 µl 1x Reporter Lysis Buffer anstelle des Zell-Lysats inkubiert. Sobald sich eine hinreichende Gelbfärbung des Reaktionsansatzes eingestellt hat, wird die ONPG-Umsetzung durch Zugabe von 1 ml 1 M NaHCO₃ gestoppt und die Adsorption bei 420 nm im Spektralphotometer gemessen.

3.5.6 Statistische Auswertung des Reporteragen-Assays

Transfektionsansatz wird in jedem Experiment als Vierfach-Bestimmung angesetzt und jedes Experiment mindestens zweimal wiederholt. Nach dem 3-Sigma-Test werden Werte einer Testreihe aus der Rechnung eliminiert, wenn sie um mehr als das Dreifache der Standardabweichung vom Mittelwert abweichen.

3.6 Mikroskopie

3.6.1 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

Präparate werden an einem Eclipse 80i Mikroskop (Nikon) ausgewertet und mit der DS-SMc Digitalkamera (Nikon) aufgenommen. Als Lichtquelle dient eine Halogenlampe für Durchlicht- und eine Quecksilberdampfampe für die Fluoreszenzmikroskopie.

3.6.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Präparate werden am einem invertierten Ti80 Mikroskop (Nikon) ausgewertet und mit dem A1R Laser Scanning System (Nikon) mit 32 Kanälen aufgenommen. Das System besitzt einen hochauflösenden Galvano-Scanner (bis zu 4096 x 4096 Pixel) und einen schnellen Resonanz-Scanner (30 Bilder pro Sekunde bei 512 x 512 Pixel). Die Fluoreszenz wird entweder durch eine Quecksilberdampfampe oder Laser mit Wellenlängen von 405 nm, 488/514 nm, 561 nm und 640 nm angeregt.

4 Ergebnisse

4.1 Heterologe Expression der *Nematostella* Wnt-Liganden

Um Rückschlüsse auf eine eventuelle, funktionelle Konservierung der *Nematostella* Wnt-Liganden im kanonischen Wnt-/ β -Catenin-Signalweg zu treffen, wurden einzelne Liganden sowohl im Zellkultursystem auf die Aktivierung des TOP-Flash Reporters als auch in *Xenopus laevis* auf die Induktion sekundärer Körperachsen getestet.

4.1.1 TOP-Flash Reporter-Assay im Zellkultursystem

Humane HEK293-T-Zellen wurden mit dem TOP-Flash Luziferase-Reporter, einem β -Galaktosidasekonstrukt unter der Kontrolle des Cytomegalovirus(CMV)-Promotors und den entsprechenden *Wnt*-Genen in pCS2+ kotransfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mit dem CMV- β -Galaktosidasekonstrukt normalisiert. Zur Bestimmung der Grundaktivität des Reporters wurden Zellen mit dem leeren pCS2+-Vektor als Null-Kontrolle transfiziert. In der statistischen Auswertung wurde der Nullkontrolle der Wert „1“ zugeordnet und die Ergebnisse für die verschiedenen *Wnts* als N-faches dieses Werts angegeben.

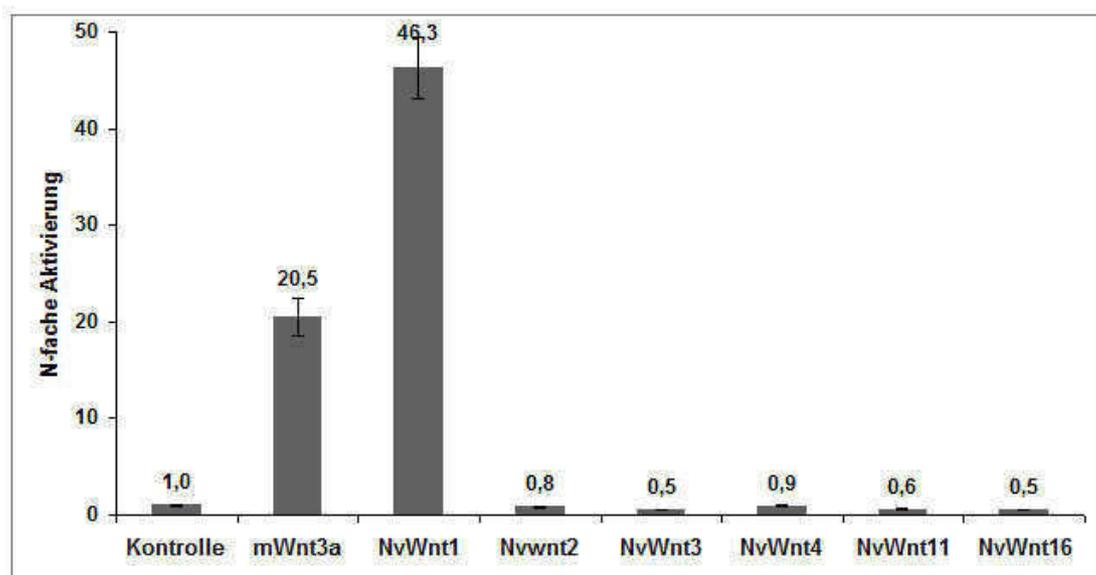


Abb.5 *NvWnt1* aktiviert den TOP-Flash Reporter: HEK293-T-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten und dem TOP-Flash Reporter transfiziert. Der leere pCS2+-Vektor dient als Null-Kontrolle und *mWnt3a* als Positiv-Kontrolle. Von den getesteten *Nematostella* Wnt-Genen aktiviert lediglich *NvWnt1* den Reporter. *NvWnt2* und *-4* zeigen keinen Effekt und *NvWnt3*, *-11* und *-16* wirken reprimierend. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Wie erwartet aktiviert die Positiv-Kontrolle, murines *Wnt3a* (*mWnt3a*), ein bekanntes kanonisches *Wnt*, den Reporter, und zwar um einen Faktor von 20 verglichen zur Kontrolle (Abb.5). Mit dem 46-fachen der Kontrolle wirkt *NvWnt1* sogar mehr als doppelt so stark aktivierend wie *mWnt3a* in diesem System. Weitere getestete *NvWnt*-Gene dagegen zeigen entweder keine Aktivierung des Promotors oder wirken eher reprimierend wie *NvWnt3*, *-11* und *-16*, deren Luziferase-Expression bei etwa der Hälfte der Nullkontrolle liegt.

4.1.2 Achseninduktionsassay in *Xenopus laevis*

Im Achseninduktionsassay wurden für jedes *Wnt* zwischen 45 und 165 *Xenopus* Embryonen im Vierzellstadium in beide ventralen Blastomeren 50pg, 500pg oder 1ng synthetische mRNA injiziert (Abb. 6) und im Neurula-Stadium die sekundär induzierten Neuralrinnen ausgezählt.

Genau wie im TOP-Flash Assay aktivieren 50pg *mWnt3a*-RNA den Wnt- β -Catenin-Signalweg und induzieren bei 63,8 % aller injizierten Embryonen die Ausbildung einer sekundären Körperachse (Abb.6). Mit höheren Konzentrationen treten für *mWnt3a* jedoch vermehrt Missbildungen wie offene Rücken und andere Gastrulationsdefekte auf, die weitere Aussagen zur Achseninduktion erschweren (Abb.6). Im Gegensatz zum Zellkultursystem induziert *NvWnt1* je nach Konzentration nur bei 1,8 und 4,4% aller Embryonen sekundäre Achsen. Dagegen zeigt *NvWnt3* im Frosch eine vielfach höhere Aktivität und induziert konzentrationsabhängig in 6,4 bis 20,6% aller Fälle eine Achsenduplikation. *Wnt4* und *-11* zeigen unabhängig der RNA-Konzentration keinen Effekt, jedoch treten hier tendenziell häufiger Gastrulationsdefekte auf (Abb.6). Dies deutet auf eine mögliche Funktion im nichtkanonischen Wnt-Signalweg hin, muss aber durch weitere Experimente untermauert werden.

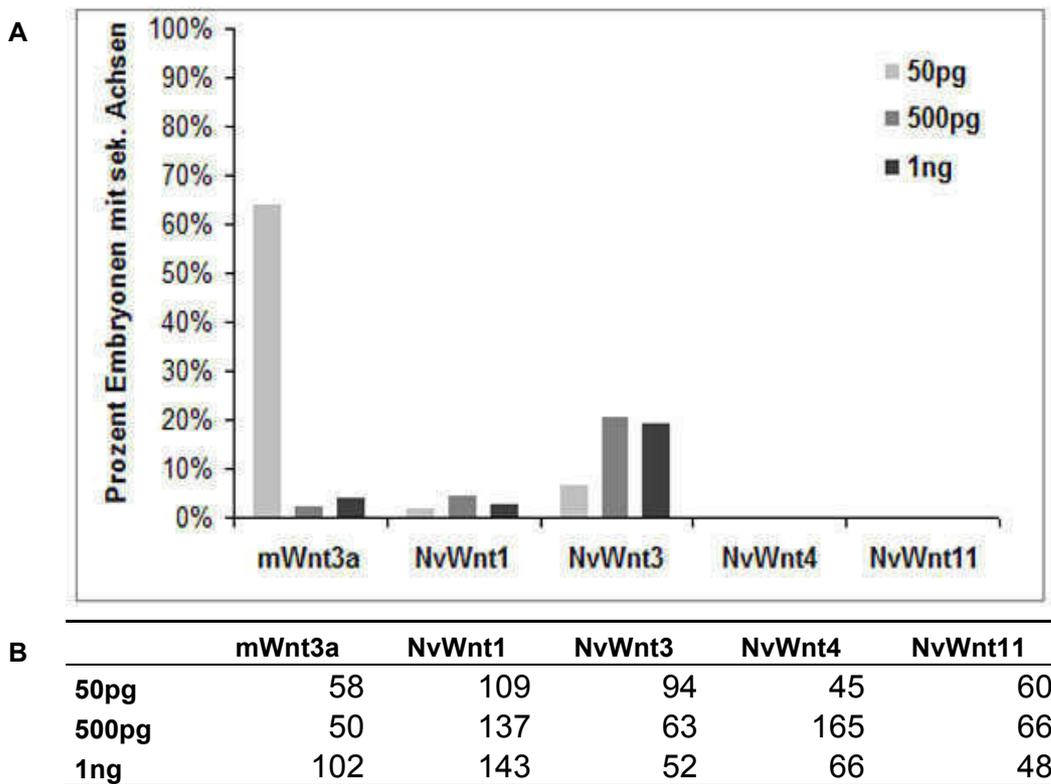


Abb.6 *NvWnt1* und *NvWnt3* induzieren sekundäre Achsen in *Xenopus*: **A** 50pg, 500pg und 1ng der angegebenen *Wnt*- RNA wurde in die ventralen Blastomeren von *Xenopus laevis* Embryonen im Vierzell-Stadium injiziert. Als Positiv-Kontrolle diente *mWnt3a*, das bei 50pg in 63,8% der Embryonen sekundäre Achsen induziert. Bei höheren Konzentrationen überwiegen für *mWnt3a* jedoch Gastrulationsdefekte. *NvWnt1* induziert nur in wenigen Embryonen, *NvWnt3* dagegen in bis zu 20,6% der Embryonen sekundäre Achsen. Für *NvWnt4* und -11 wurde keine induktive Aktivität festgestellt. **B** Tabellarische Auflistung der Anzahl der injizierten Embryonen.

4.2 Zeitliche Expressionsanalyse der *Nematostella* Wnt-Liganden

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich die konservierten Sequenzinformationen der *Nematostella* Wnt-Liganden auch in einer konservierten Funktion widerspiegeln. Um dabei einzelne *Wnt*-Gene zu identifizieren, die bereits früh eine Rolle in der Embryogenese von *Nematostella vectensis* spielen, wurden diese hier neben den bereits veröffentlichten *in situ*-Hybridisierungsmustern (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006; Guder et al., 2006) auch mit semiquantitativer und quantitativer RT-PCR untersucht.

4.2.1 Semiquantitative RT-PCR

Zur Erstellung einer Zeitreihe wurden zuerst unbefruchtete Eier für maternal deponierte Gene und 12, 24, 36 und 48 Stunden sowie drei und sieben Tage nach der Befruchtung Tiere für Blastula-, frühe bis späte Gastrula-, Planula- und Primärpolypenstadien abgesammelt. Aus den entsprechenden Stadien wurde GesamtRNA extrahiert und diese in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Konzentration wurde anhand des Haushaltsgens *Elongation Factor 1α (EF1α)* normalisiert.

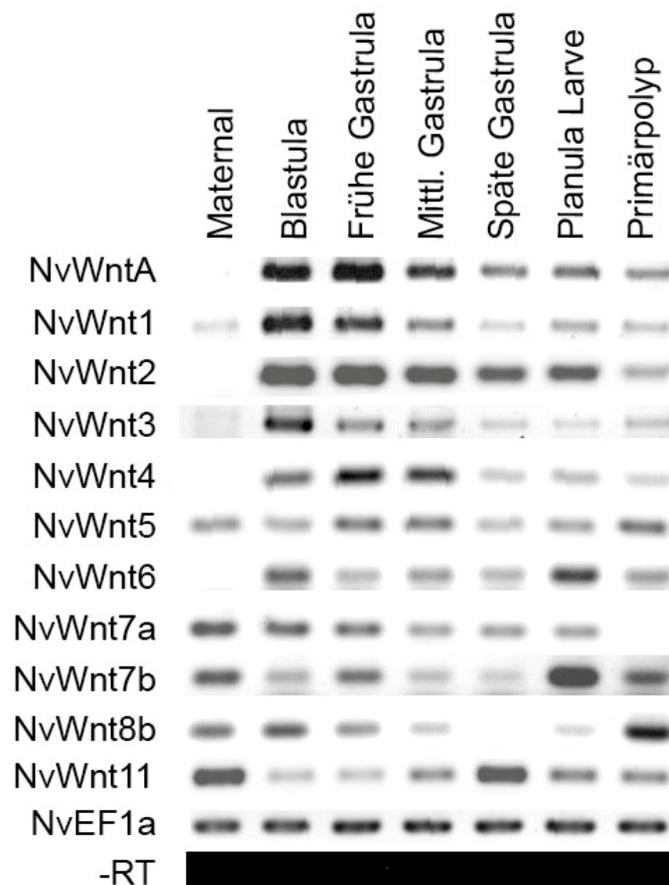


Abb.7 Zeitliche Expressionsanalyse der *Nematostella* *Wnt*-Gene mittels semiquantitativer RT-PCR: Viele *Wnt*-Gene wie *NvWnt5*, *-7a*, *-7b*, *-8b* und besonders *Wnt11* sind bereits maternal geladen. In der Blastula und frühen Gastrula wird das gesamte Set der Gene exprimiert, wohingegen die Expression der meisten Gene zur Planula hin schwächer wird. Die cDNAs aller Zeitwerte wurden für das Haushaltsgen *EF1α* kalibriert und eine genomische Kontamination durch einen Ansatz ohne Reverse Transkriptase ausgeschlossen.

Entsprechend den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierungs-Experimente von Kusserow (Kusserow et al., 2005) und Lee (Lee et al., 2006) zeigen die meisten analysierten *Wnt*-Gene eine starke Expression vor allem im Gastrulastadium, jedoch

sind einige Liganden wie *Wnt5*, *-7a*, *-7b*, *-8b* und *-11* bereits maternal geladen oder in der Blastula wie *WntA*, *-1*, *-2*, *-3*, *-4* und *-6* stark exprimiert (Abb. 7). Besonders *Wnt11* zeigt in diesem Experiment vor allem maternal eine hohe Transkriptmenge, während es in den frühen Embryonalstadien bis zur späten Gastrula eher schwach exprimiert ist. Die schwachen Banden in der ersten Spur von *Wnt1* und *-3* lassen zwar ebenfalls auf eine geringe maternale Transkriptmenge schließen, sind jedoch sehr schwach und kaum vom Hintergrund zu unterscheiden (vor allem im Fall von *Wnt3*). Für *Wnt8a* und *-16* ließen sich keine Primerpaare finden und für *Wnt10*, war die Transkriptmenge, zu gering, um ein verlässliches Ergebnis zu liefern.

4.2.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

In diesem Experiment wurden die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR validiert und mit der Methode der *Real-Time* PCR für die frühen Stadien bis zur späten Gastrula wiederholt. In der statistischen Auswertung der relativen Transkriptmenge in verschiedenen Stadien wurde für jedes Gen der Transkriptmenge im unbefruchteten Ei der Wert „1“ zugeordnet und die Werte der anderen Stadien als n-faches dieses Wertes angegeben. Für *Wnt10* wurden verschiedene Primerpaare für die qPCR getestet, jedoch war es mit ihnen entweder nicht möglich ein PCR-Produkt zu erhalten oder die Primer bildeten Dimere, welche in Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte und bei der Auftrennung auf einem Agarose-Gel auffielen.

In der qPCR ließ sich die maternale Deponierung der meisten Gene aus der semiquantitativen PCR bestätigen. So zeigen *Wnt5*, *-7a*, *-7b*, *-8a* und *-8b* eine mittlere bis hohe Transkriptionsmenge. Anders als in der semiquantitativen PCR konnte *Wnt6* und *-16* schon schwach maternal detektiert werden und *Wnt11* zeigt hier nur eine marginale bis schwache Expression (Abb. 8).

Während dem Blastulastadium sind fast alle *Wnt*-Gene stark exprimiert mit Ausnahme von *Wnt4*, dessen Expression erst mit der frühen Gastrula schwach einsetzt und sich darauf stetig bis zur späten Gastrula steigert. Besonders *Wnt8a*, *-11* und *-16* haben in diesem frühen Stadium ihr Maximum, während *Wnt8b* gleichbleibend stark exprimiert ist wie unbefruchteten Ei und *Wnt7b* insgesamt eine uniform hohe Expression in den frühen Stadien hat (Abb. 8).

In der frühen Gastrula ist das komplette Set der *Wnt*-Gene exprimiert. Während *Wnt7a*, *-8a*, *-8b*, *-11* und *-16* etwas schwächer exprimiert werden als in den Stadien

zuvor, erreichen *WntA*, -5 und -6 ihr höchstes Expressionslevel. Mit Ausnahme von *Wnt4* scheinen alle *Wnts* bereits vor oder mit Beginn der Gastrulation exprimiert und so möglicherweise an der Entstehung eines Organisationszentrums beteiligt zu sein. Geht man von einer gleichen Amplifikationseffizienz aller Primerpaare während der PCR-Reaktion aus, läßt sich die Transkriptmenge aller *Wnt*gene untereinander vergleichen. So scheint *Wnt8a* von allen *Wnt*-Genen am stärksten maternal exprimiert zu sein, gefolgt von *Wnt2* und *WntA*. In der Blastula haben *Wnt8a* und *Wnt2* die höchsten Transkriptmengen. Während *Wnt2* in allen frühen Stadien eine nahezu gleichermaßen hohe Expression hat, fällt die Expression von *Wnt8a* nach dem Blastulastadium wieder rapide ab. Insgesamt sind im Vergleich der einzelnen Gene untereinander nur *WntA*, -2, -4, -8a und wenn auch nur marginal *Wnt3* zu detektieren. Da jedoch die Amplifikationseffizienz der Primerpaare nicht ermittelt wurde und diese nicht in die Berechnung der absoluten Transkriptmengen einfließ, können die Transkriptmengen der *Wnt*-Gene zueinander nicht bewertet werden.

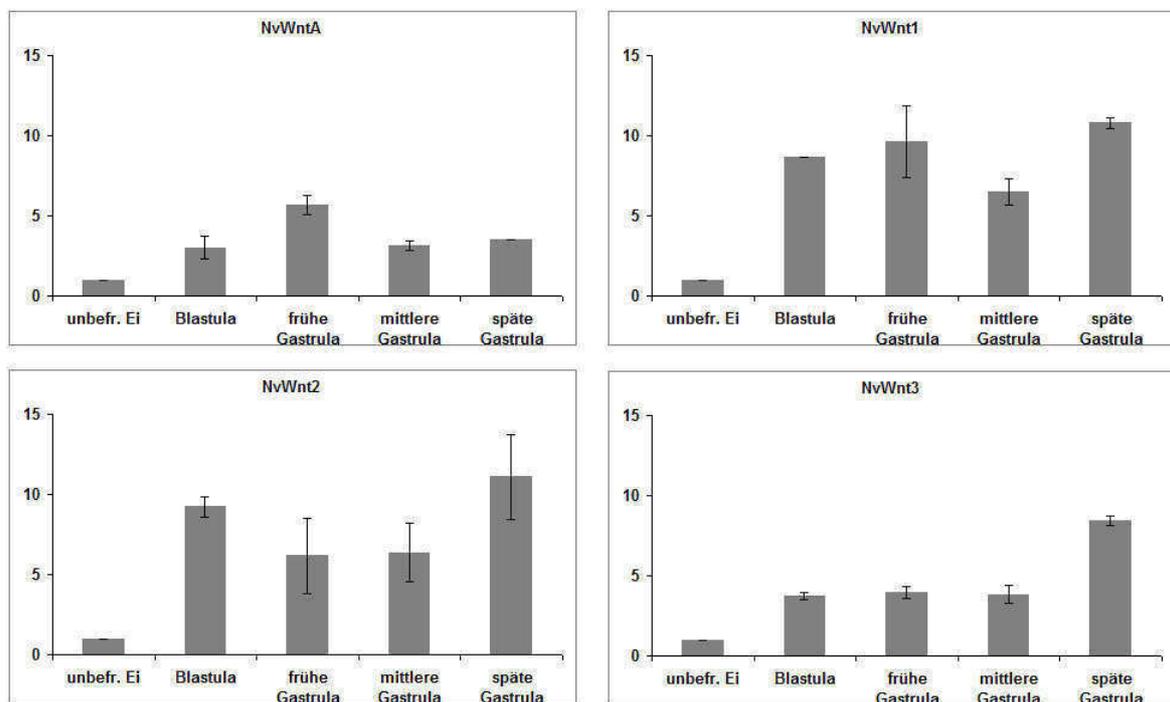


Abb.8 Zeitliche Expressionsanalyse der *Nematostella* *Wnt*-Gene mittels quantitativer RT-PCR: Die Ergebnisse decken sich mit denen der semiquantitativen RT-PCR und so scheinen unbefruchtete Eier mit *Wnt5*, -7a, -7b, -8a und -8b maternal beladen zu sein. Dagegen fällt die maternale Expression von *Wnt11* hier schwächer aus und *Wnt6* und -16 sind bereits maternal zu detektieren. Ebenfalls scheinen auch hier alle fast *Wnt*-Gene in der Blastula und frühen Gastrula exprimiert zu werden. Die cDNAs aller Zeitwerte wurden für das Haushaltsgen *EF1α* kalibriert und eine genomische Kontamination durch einen Ansatz ohne Reverse Transkriptase ausgeschlossen. Abbildung wird auf Seite 51 fortgesetzt.

Ergebnisse

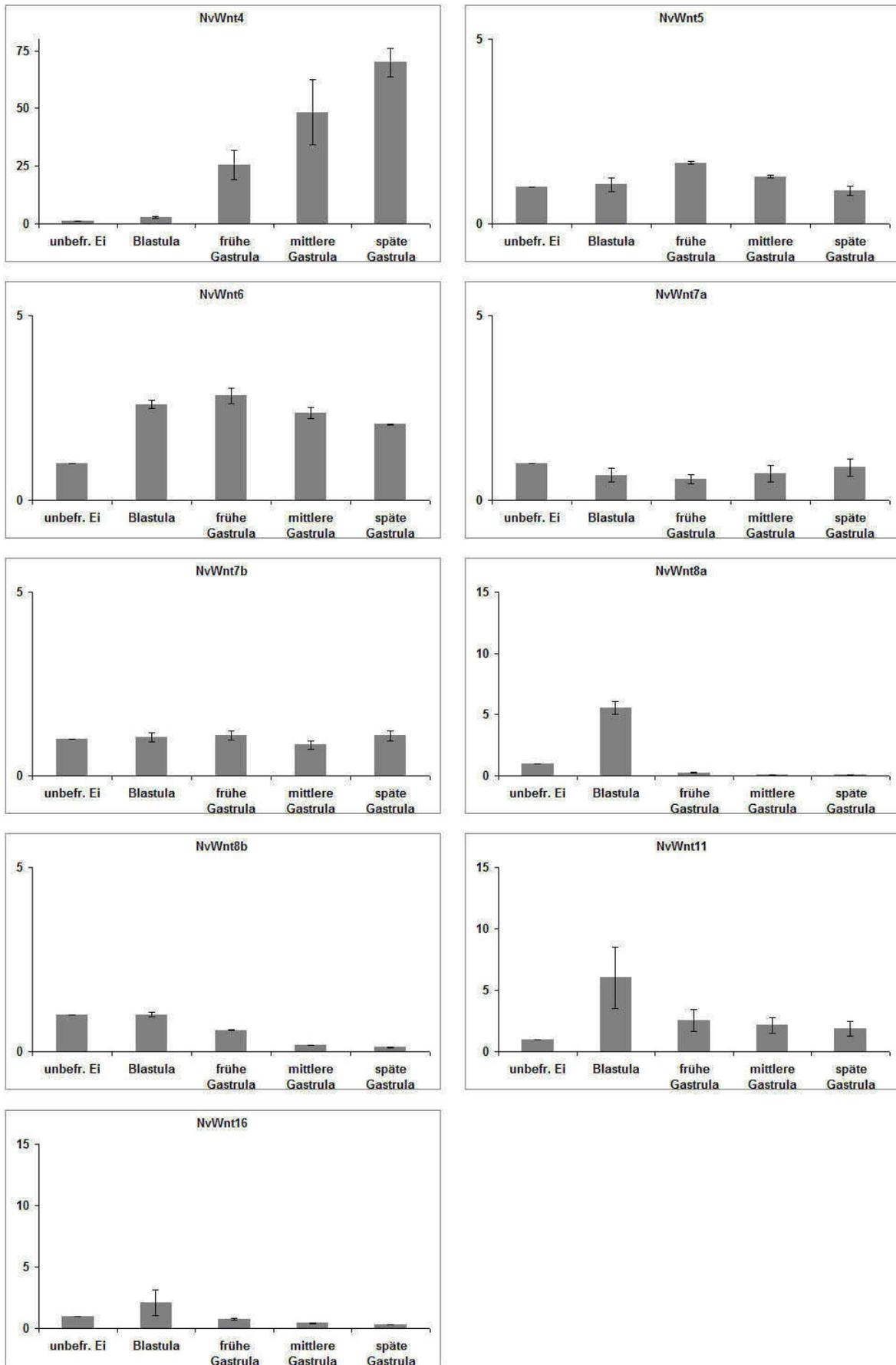


Abb.8 Zeitliche Expressionsanalyse der *Nematostella* Wnt-Gene mittels quantitativer RT-PCR (Fortsetzung): Siehe Seite 50

	Maternal	Blastula	Frühe Gastrula	Mittlere Gastrula	Späte Gastrula
NvWntA	-	++	+++	++	++
NvWntA*	-	+++	+++	++	+
NvWnt1	+/-	+++	+++	++	+++
NvWnt1*	-	+++	++	+	+/-
NvWnt2	-	+++	++	++	+++
NvWnt2*	-	+++	+++	+++	+++
NvWnt3	-	++	++	++	+++
NvWnt3*	-	+++	+	+	+
NvWnt4	-	-	+	++	+++
NvWnt4*	-	++	+++	+++	+
NvWnt5	++	++	+++	+++	++
NvWnt5*	++	+	+++	+++	+
NvWnt6	+	+++	+++	+++	++
NvWnt6*	-	+++	+	+	+
NvWnt7a	+++	++	++	++	+++
NvWnt7a*	+++	++	++	+	+
NvWnt7b	+++	+++	+++	+++	+++
NvWnt7b*	+++	+	+++	+	+
NvWnt8a	++	+++	+	-	-
NvWnt8a*	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
NvWnt8b	+++	+++	++	-	-
NvWnt8b*	++	+++	++	+	-
NvWnt11	+/-	+++	+	+	+
NvWnt11*	+++	+	+	++	+++
NvWnt16	+	+++	+	-	-
NvWnt16*	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.

Abb.9 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR: Für einen besseren Vergleich der Ergebnisse wurden diese in keine (-), schwache (+), mittlere (++) und starke (+++) Expression eingeteilt. *Wnt*-Gene ohne oder mit Stern (*) geben die Ergebnisse der quantitativen bzw. der semiquantitativen RT-PCR an. Für die semiquantitative RT-PCR von *Wnt8a* und *-16* liegen keine Daten (k.D.) vor.

4.3 β -Catenin-Abhängigkeit der *Nematostella* *Wnt*-Expression

Da viele der *Nematostella* *Wnt*-Gene sowohl räumlich als auch zeitlich sehr nahe exprimiert werden, wurde mit dem pharmakologischen GSK3 β -Inhibitor Alsterpaullone (ALP) getestet, inwieweit ihre Expression β -Catenin sensitiv ist und sich die einzelnen *Wnts* somit gegenseitig beeinflussen können. *Nematostella* Zygoten wurden dazu nach dem Entfernen der Gallerthülle mit verschiedenen ALP-Konzentrationen für 24 Stunden bis zur frühen Gastrula behandelt und die Auswirkung auf die Transkriptmenge mit quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit DMSO inkubierte Embryonen.

Ergebnisse

Ingesamt wird die *Wnt*-Expression bis auf *Wnt3* und *Wnt8b* durch ALP verstärkt (Abb.10). Dabei werden *Wnt8a*, *-7b* und *-2* mit einer zehnfachen bis sechsfachen Aktivierung besonders stark angeregt (Abb.10). Grenzwertig dagegen scheint der Effekt auf *WntA*, *-4* und *-11* mit einer Erhöhung der Transkriptmenge um etwa das zweieinhalbfache nach Behandlung mit 1 μ M ALP zu sein. Zwar führen schon 0,5 μ M ALP zu einer Verdopplung der Transkriptmenge bei *WntA* und *-11*, jedoch zeigt die DMSO-Kontrolle von *WntA* bereits eine fast eineinhalbfache Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Abb.10). Wendet man den zweiseitigen t-Test für diese Sonderfälle an, so erhält man bei einem Test der Ergebnisse für die unbehandelte bzw. der DMSO-Kontrolle gegen die Behandlung mit 1 μ M ALP p-Werte von $p=0,0219$ bzw. $p=0,0738$ für *WntA* (Abb.11). Dies zeigt, dass es bei *WntA* zu keinem signifikanten Anstieg kommt. Mit p-Werten für *Wnt4* und für *Wnt11* von $p=0,0023$ und $p=0,0002$ (gegen unbehandelt) sowie von $p=0,0016$ und $p=0,0001$ (gegen DMSO) zeigen diese beiden *Wnt*-Gene eine signifikante Erhöhung ihrer Expression durch die ALP-Inkubation (Abb.11).

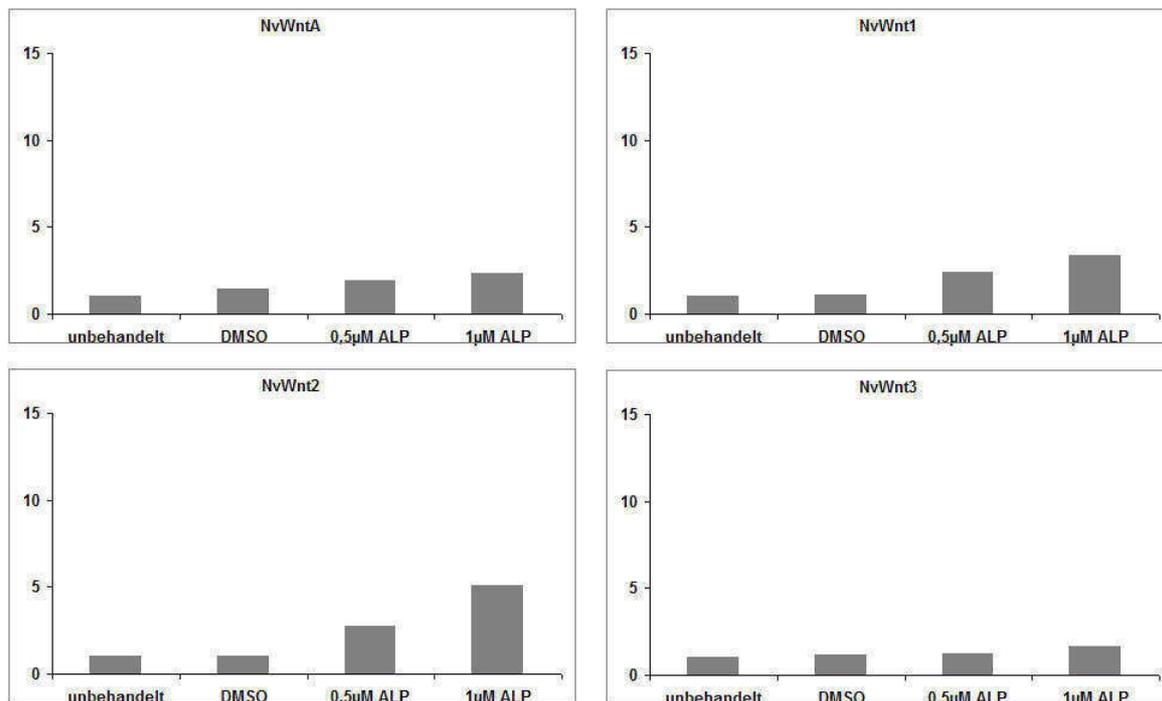


Abb.10 Einfluß von β -Catenin auf die Expression der *Nematostella* *Wnt*-Gene: *Nematostella* Embryonen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Alsterpaullone (ALP) behandelt und die Auswirkung auf die *Wnt*-Expression mittels qPCR bestimmt. Die Effekte werden hier als N-faches der unbehandelten Kontrolle angegeben. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Die Stabilisation von β -Catenin stimuliert die Expression der meisten *Wnts* stark. Das Transkriptlevel von *NvWnt2*, *-7b* und *-8a* fällt mit einer Steigerung um das fünf bis zehnfachen besonders stark aus. Die zweieinhalbfache Aktivierung von *NvWnt4* und *-11* ist schwach jedoch mit p-Werten unter 0,005 signifikant. Für *NvWntA*, *-3* und *-8b* lässt sich keine signifikante Veränderung der Transkriptmenge feststellen. Abbildung wird auf Seite 54 fortgesetzt.

Ergebnisse

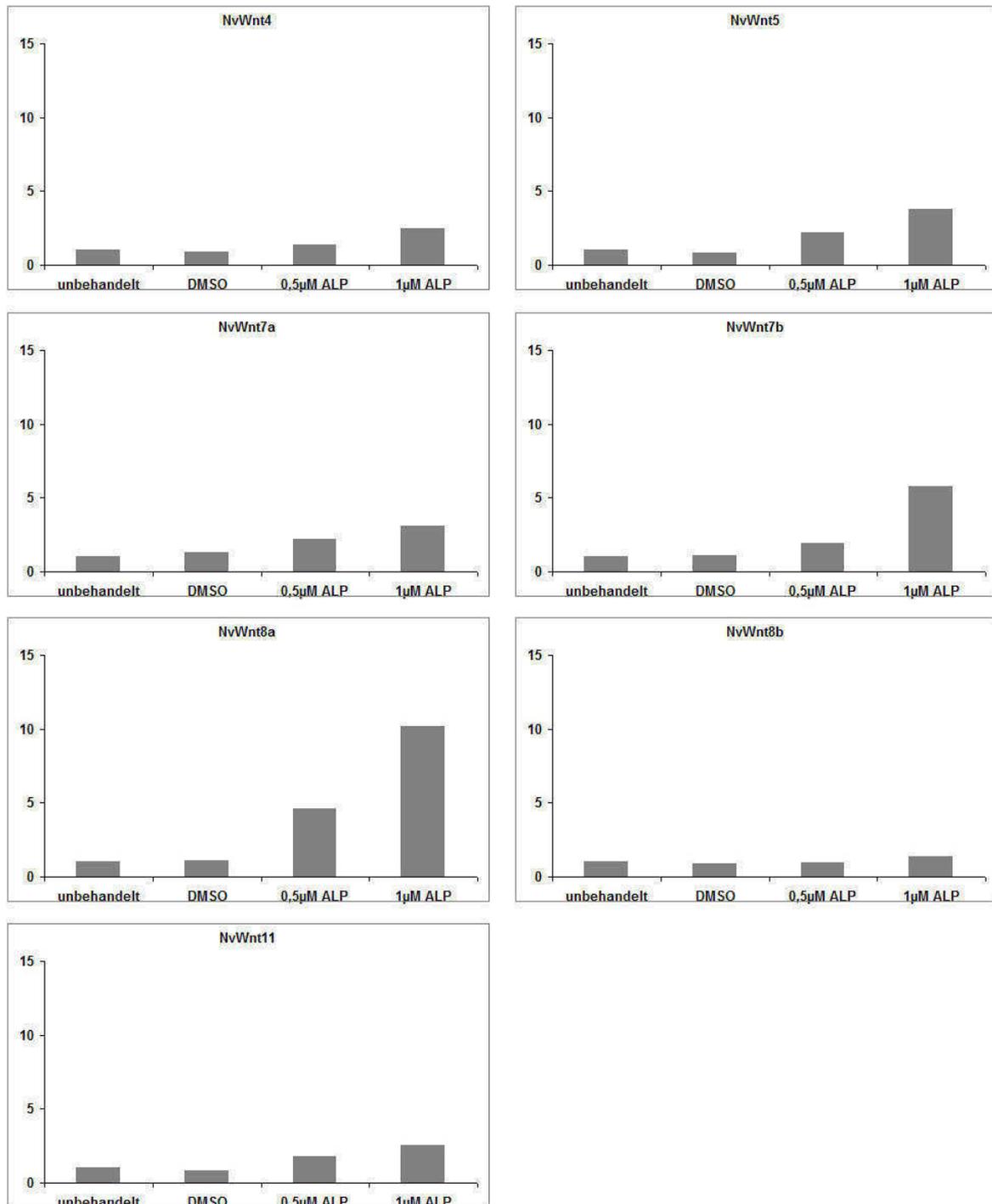


Abb.10 Einfluß von β -Catenin auf die Expression der *Nematostella* Wnt-Gene (Fortsetzung):
Siehe Seite 53

	WntA	Wnt1	Wnt2	Wnt3	Wnt4	Wnt5	Wnt7a	Wnt7b	Wnt8a	Wnt8b	Wnt11
Kontrolle	0,0219	0,0480	0,0000	0,1059	0,0023	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,2514	0,0002
DMSO	0,0738	0,0536	0,0000	0,2192	0,0016	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,1638	0,0001

Abb.11 Tabellarische Auflistung der p-Werte für die Behandlung mit 1µM Alsterpaullone:
Kontrolle gibt die p-Werte des zweiseitigen t-Tests für die Behandlung mit 1 µM ALP gegen unbehandelte Tiere an und DMSO gegen DMSO behandelte Tiere.

4.4 Pharmakologische Tests zum Wnt-Signalweg in *Nematostella*

4.4.1 Identifizierung von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs

Nach der Inkubation mit ALP war es möglich β -Catenin sensitive Gene mittels qPCR zu identifizieren. Als erfolgversprechende Kandidaten wurden bekannte Zielgene aus höheren Bilateriern wie *Brachyury (Bra)*, *Tcf*, *Chordin (Chd)* und *BMP2/4* getestet. Darüber hinaus wurden orale Gene wie *Forkhead (Fkh)*, exprimiert in der ektodermalen Blastoporuslippe, *Activin*, *SnailA* und *SnailB* als frühe, orale Endodermmarker untersucht. Aborale Ektodermmarker wie *Fibroblast Growth Factor a1 (FGFa1)* und den dazugehörigen Rezeptor *FGFRa1* wurden verwendet, um eventuelle Effekte auf das Zellschicksal oder eine Verschiebung der Musterung entlang der oral-aboralen Achse darzustellen. *Cadherin1* und -2 wurden auch getestet um etwaige Auswirkungen auf Effektoren des nichtkanonischen Wnt-/JNK-Signalwegs zu untersuchen.

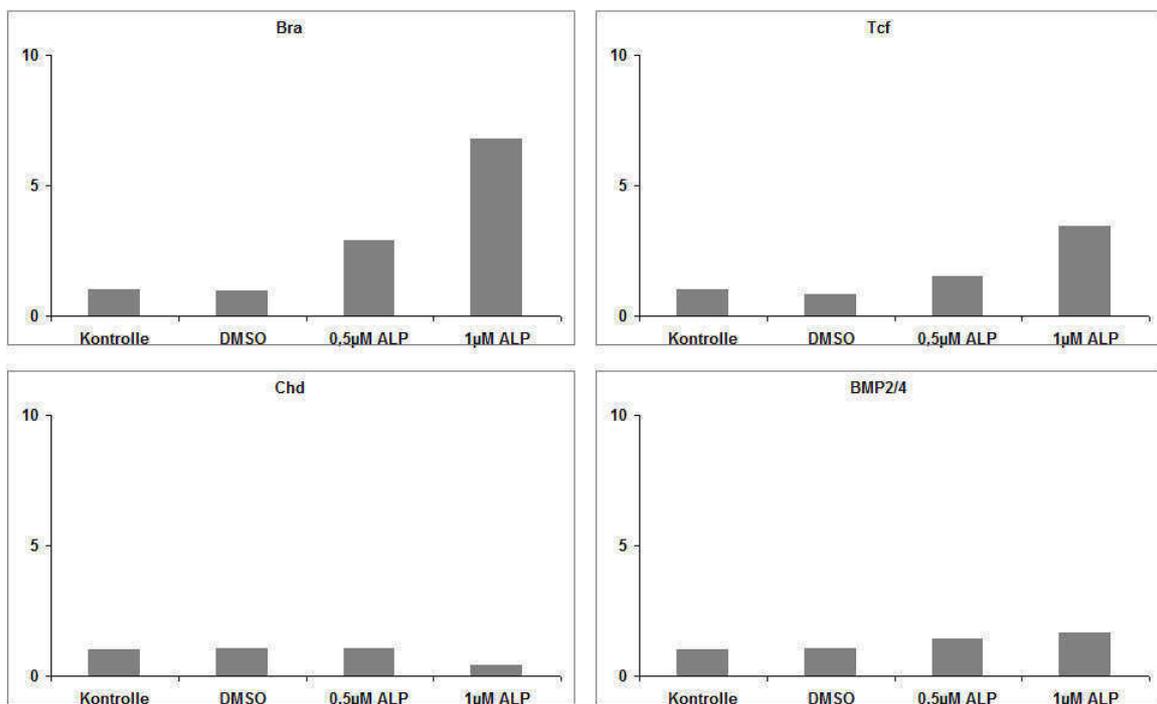


Abb.12 Einfluß von β -Catenin auf die Gen-Expression in *Nematostella*: *Nematostella* Embryonen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Alsterpaullone (ALP) behandelt und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Die Effekte werden hier als N-faches der unbehandelten Kontrolle angegeben. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Wie zu erwarten wird die Transkription aus Bilateriern bekannter Zielgene und Komponenten des Wnt-Signalwegs wie *Brachyury (Bra)*, *Tcf* und *BMP2/4*. Im Gegensatz zu Bilateriern wird *Chordin (Chd)* hier reprimiert. Abbildung wird auf Seite 56 fortgesetzt.

Ergebnisse

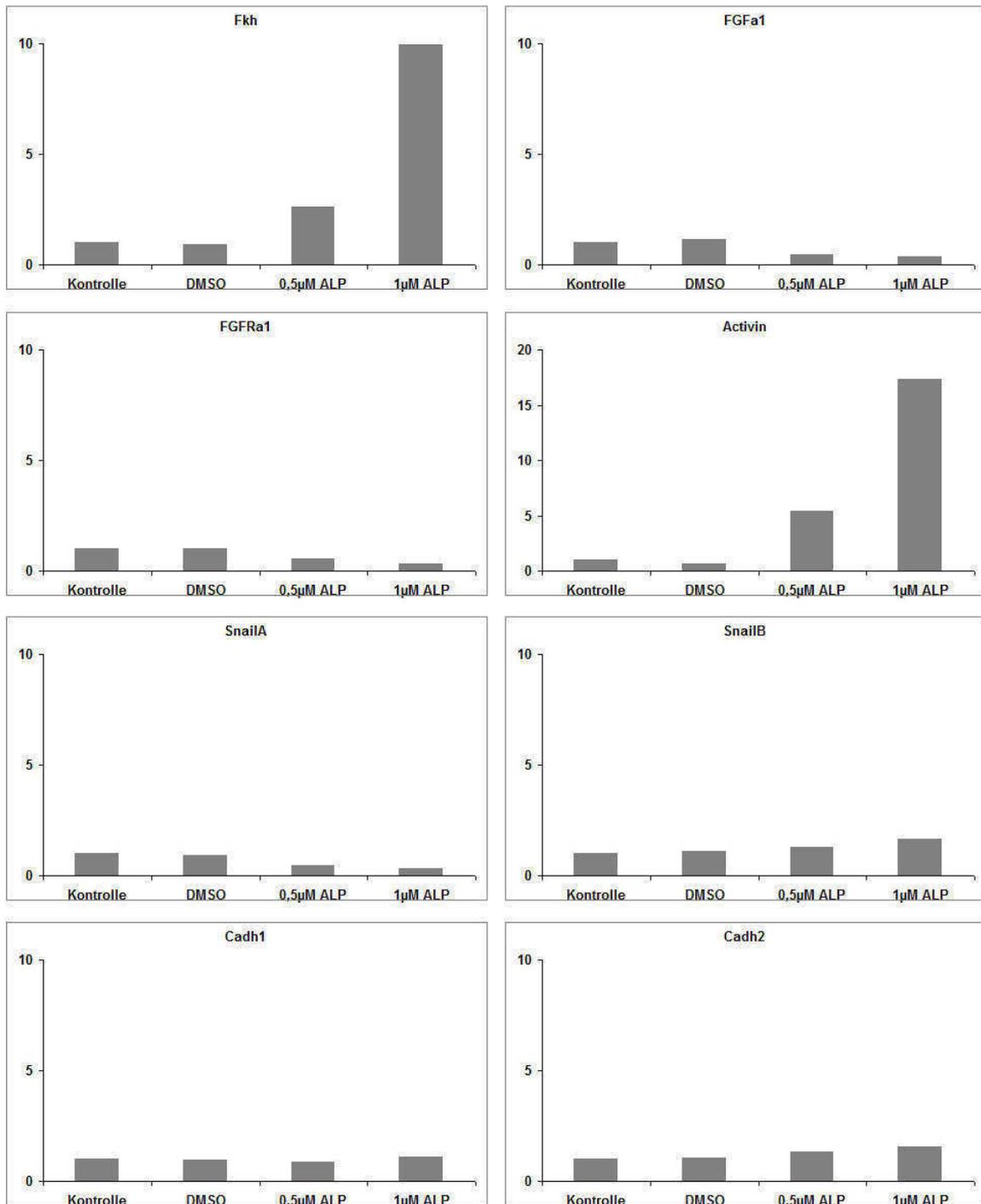


Abb.12 Einfluß von β -Catenin auf die Gen-Expression in *Nematostella* (Fortsetzung): Die Stabilisation von β -Catenin scheint außerdem die Musterung entlang der oral-aboralen Achse zu beeinflussen. So werden orale Marker wie *Fkh* und *Activin* induziert, während das aborale *FGFa1* und sein zugehöriger Rezeptor *FGFRa1* reprimiert werden. Der Endodermmarker *SnailA* wird durch 1 μ M ALP auf etwa ein Drittel der unbehandelten Kontrolle reprimiert. Die Expression von *SnailB* und der Zell-Adhäsionsmoleküle *Cadherin1* und -2 wird dagegen nicht beeinflusst.

Wie in höheren Bilateriern werden *Brachyury* und *Tcf* stark durch Stabilisierung von β -Catenin hier durch GSK3 β -Inhibition mit ALP angeregt (Abb.12). Die Aktivierung von *BMP2/4* fiel in ersten Experimenten schwach aus (Abb.12). Weitere Experimente mit einem breiteren Konzentrationsspektrum von ALP zeigten jedoch einen stärkeren positiven Effekt auf *BMP2/4* (Abb.13). Die Repression von *Chd* durch hohe Dosen von ALP lässt sich durch die Inhibition durch *BMP2/4* erklären (Abb.13). So inhibiert humanes BMP-Protein im Kulturmedium dosisabhängig die Expression von *Chd* (Abb.13). Dass *Chd* jedoch positiv durch β -Catenin reguliert wird, zeigt seine schwache Aktivierung durch geringe Konzentrationen von 0,25 μ M ALP (Abb.13).

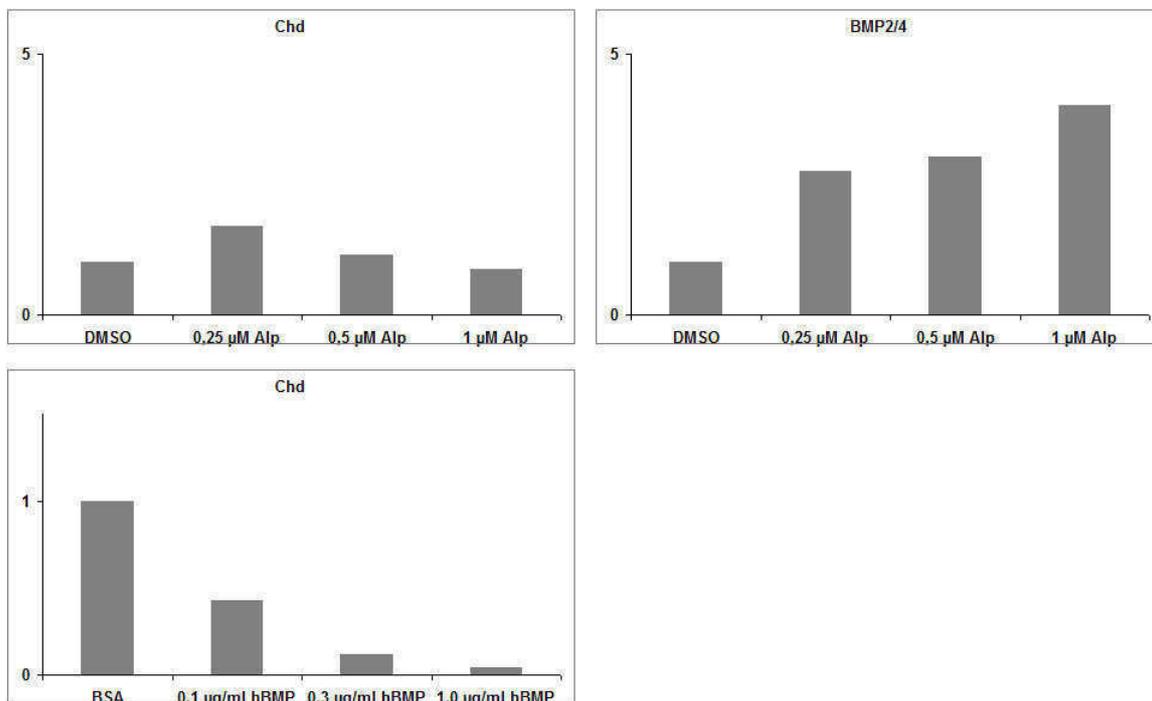


Abb.13 BMP reprimiert die Expression von *Chordin*: *Nematostella* Embryonen wurden mit den neben den bereits getesteten Konzentrationen auch mit 0,25 μ M Alsterpauflone (ALP) sowie den angegebenen Konzentrationen von humanen BMP-Protein (hBMP) behandelt und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Die Effekte werden hier als N-faches der Kontrolle angegeben. *Chordin* zeigt bei der geringen Dosis von 0,25 μ M ALP eine sehr schwache Aktivierung, während höhere Dosen reprimierend wirken, was mit der dosisabhängigen Induktion von *BMP2/4* zusammenhängt. So wirkt auch humanes BMP-Protein dosisabhängig reprimierend auf die *Chordin*-Expression.

Neben den bekannten Zielgenen aktiviert der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg stark das orale *Fkh* und reprimiert aborale Gene wie *FGFa1* und *FGFRa1* (Abb.12). Von den endodermalen Genen wird *Activin* mit dem 17-fachen der Kontrolle sehr stark durch ALP hochreguliert. *SnailA* und *SnailB* zeigen hier sehr unterschiedliche Effekte. Während die Expression von *SnailA* durch 1 μ M ALP auf etwa ein Drittel der

Kontrolle fällt, bleibt *SnailB* unverändert (Abb.12). Genauso zeigt ALP nahezu keine Auswirkung auf die Expression der *Cadherine* (Abb.12). Mit einer Erhöhung von *Cadherin2* um einen Faktor von lediglich 0,5 ist hier kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu erkennen.

4.4.2 Identifizierung von Zielgenen des Wnt-/JNK-Signalwegs

Analog zu den Experimenten mit ALP wurden Experimente mit dem pharmakologischen JNK-Inhibitor Sp600125 durchgeführt, um Veränderungen des nichtkanonischen Signalwegs zu analysieren. Obwohl die Haupteigenschaft des nichtkanonischen Wnt-Signalwegs hauptsächlich in Reorganisation des Cytoskeletts liegt, wurden die oben genannten Gene hier ebenfalls getestet, um Wechselwirkungen mit dem kanonischen Signalweg und eventuelle gegenteilige Effekte zur Aktivierung durch β -Catenin zu ermitteln.

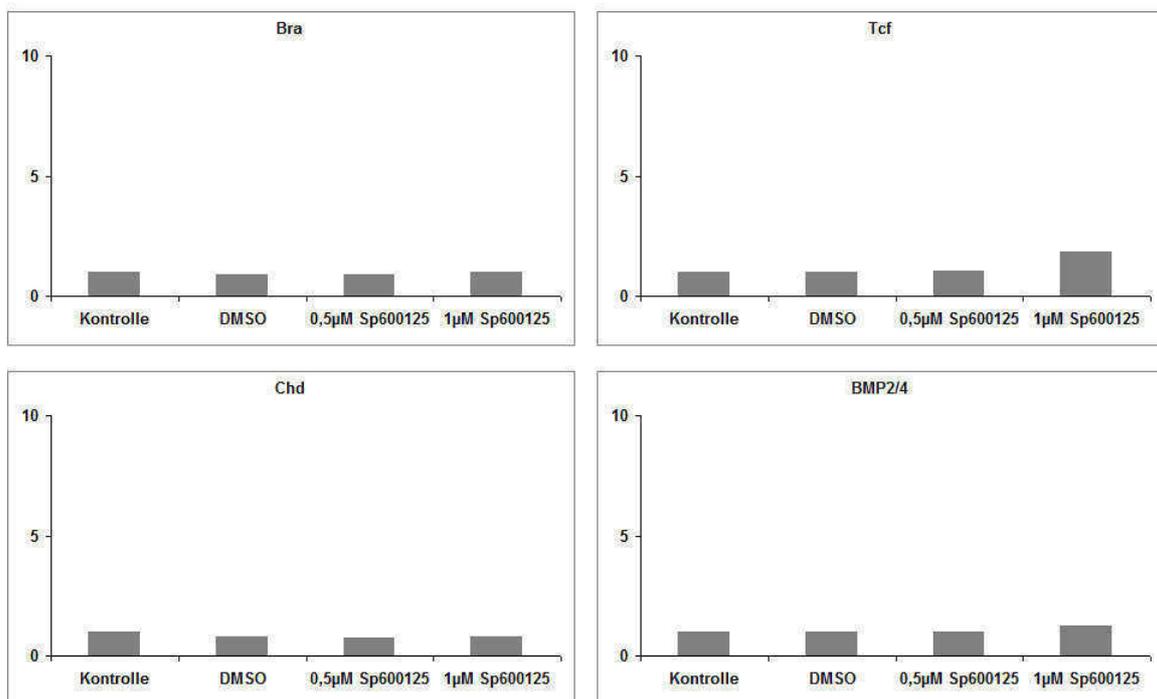


Abb.14 Einfluß von JNK auf die Gen-Expression in *Nematostella*: *Nematostella* Embryonen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des JNK-Inhibitors Sp600125 behandelt und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Die Effekte werden hier als N-faches der unbehandelten Kontrolle angegeben. Außer einer schwachen Aktivierung der *Tcf*-Expression um den Faktor 1,8 hat Sp600125 keinen weiteren Effekt auf die Regulation der auf dieser Seite abgebildeten Gene. Abbildung wird auf Seite 59 fortgesetzt.

Ergebnisse

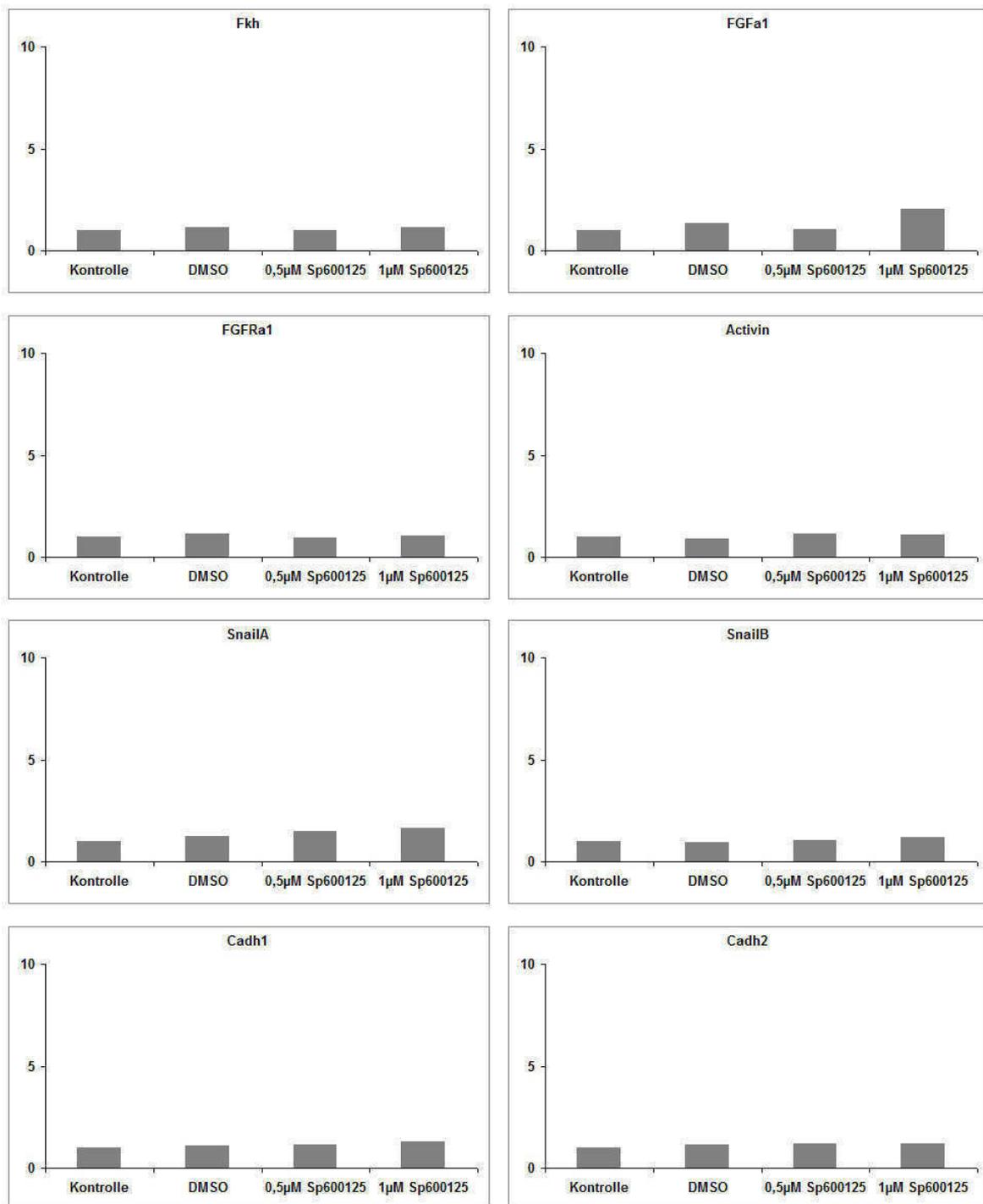


Abb.14 Einfluß von JNK auf die Gen-Expression in *Nematostella* (Fortsetzung): Die schwache Aufregulation der *FGFa1*- und *SnailA*-Expression ist verglichen zu DMSO behandelten Tieren nicht signifikant. Effekte auf weitere der hier abgebildeten Gene sind nicht zu erkennen.

Ingesamt zeigen die Versuche mit dem JNK-Inhibitor kaum Effekte auf die Regulation der getesteten Gene. Aus dem Set der kanonischen Wnt-Zielgene wurde nur *Tcf* leicht hochreguliert (Abb.14). Die anderen Gene dieses Sets waren praktisch unverändert, auch wenn *Chordin* verglichen zur unbehandelten Kontrolle leicht

reprimiert erscheint, besteht jedoch kein Unterschied zu den DMSO-behandelten Tieren (Abb.14). Der Vergleich der oralen und aboralen Marker zeigt, daß die JNK-Inhibition keinen nennenswerten Effekt auf das Zellschicksal hat und es wahrscheinlich zu keiner Verschiebung der oral-aboralen Musterung kommt. Das Expressionslevel von *FGFa1* ist nach Inkubation mit 1µM Sp600125 nur scheinbar erhöht (Abb.14), da die DMSO-Kontrolle ebenfalls ein stark erhöhtes Level zeigt und der zweiseitige t-Test mit einem p-Wert von 0,0416 keinen signifikanten Unterschied zeigt. Ebenfalls unbeeinflusst sind die endodermalen Marker *Activin*, *SnailA* und *SnailB* und die Zell-Adhäsionsmoleküle *Cadherin1* und *-2* (Abb.14).

4.5 Funktionelle Analyse von *Wnt3* in *Nematostella vectensis*

In dieser Arbeit wurde zur Analyse der Funktion von *NvWnt3* der „Knockdown“-Ansatz mit antisense Morpholino-Oligonukleotiden gegen den 5'-Bereich um das Startcodon gewählt. Als weiterer funktioneller Ansatz wurden Überexpressionsexperimente mit *NvWnt3*-mRNA durchgeführt, die aber wahrscheinlich auf Grund der Toxizität der mRNA nicht erfolgreich waren.

4.5.1 Phänotypen nach Injektion von *NvWnt3*-Morpholino

Morphologisch lassen sich die Morpholino injizierten Tiere während den frühen Stadien nicht von den Kontrollen unterscheiden (Abb.15). Ein sichtbarer Effekt ist erst zu erkennen, sobald sich die Kontrollen zu Primärpolypen entwickelt haben, während der Morpholino in 73,3% aller Tiere die Metarmorphose von der Planula zum Primärpolypen verhindert (Abb.15). Der Phänotyp ähnelt einer Dauerblastula, deren Blastocoel mit ungeordnetem Endoderm gefüllt ist, das sich deutlich vom darüberliegenden prospektiven Ektoderm unterscheidet. Durch die kugelrunde Form ist eine definierte Körperachse nicht zu erkennen, außerdem ist das Ektoderm der Tiere komplett bewimpert (Abb.15).

Um schwächere Effekte auf frühere Stadien auszuschließen, die den späten Phänotyp hervorrufen könnten, wurde filamentöses Actin in injizierten und Kontroll-Gastrulae mit fluoreszenzkonjugiertem Phalloidin dargestellt. Der „Knockdown“ von *Wnt3* scheint keinen Einfluß auf die Gastrulation zu haben. So bildet sich wie in der Kontrolle auch nach Injektion ein Blastoporus mit normalen Urmundlippen und das

Ergebnisse

Endoderm zeigt eine geordnete Organisation mit länglichen Zellen, die senkrecht zum Blastocoeldach ausgerichtet sind (Abb.15).

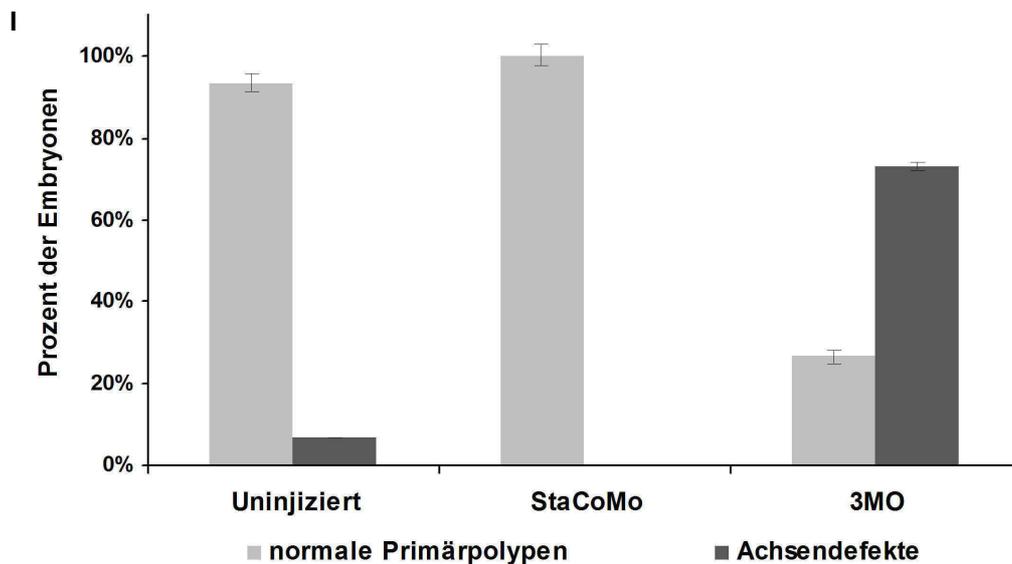
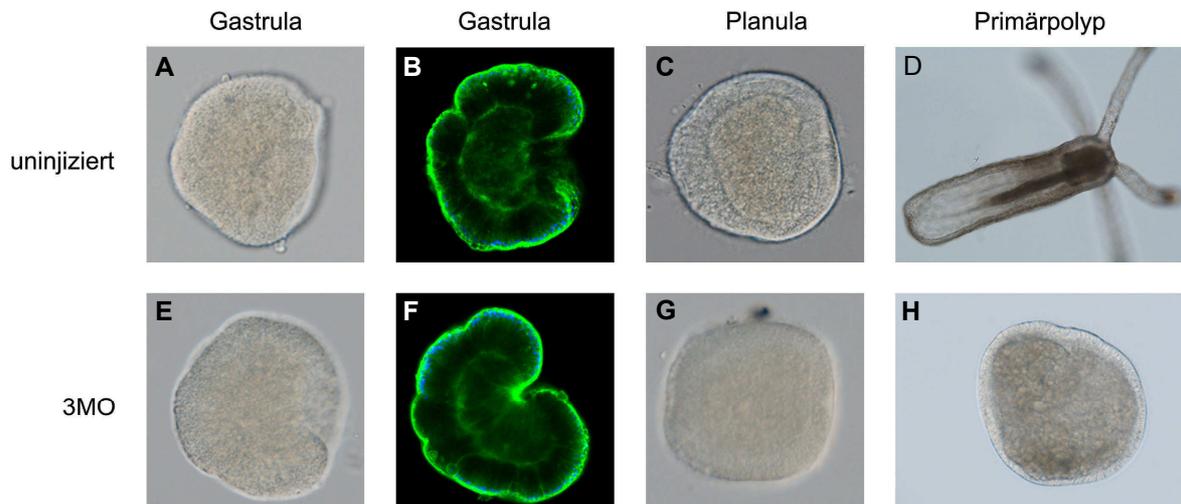


Abb.15 NvWnt3-Morpholino hat einen späten Effekt auf die Achsendetermination: *Nematostella* Eier wurden mit 500 μ M NvWnt3-Morpholino injiziert (E-H) und der Phänotyp mit uninjizierter Embryonen verglichen (A-D). Tiere sind mit dem oralen Pol nach rechts orientiert (A-H). In Gastrula- und Planula-Stadien lassen sich nach der Injektion (A-C) keine morphologischen Unterschiede zu uninjizierten Tieren feststellen (E-G). Auch in der Actin- und Zellkern-Färbung mit fluoreszenzkonjugiertem Phalloidin und DAPI zeigen injizierte Tiere (F) einen normalen Blastoporus, sowie ein geordnetes Endoderm wie in den Kontrollen (B). Während sich Kontroll-Tiere zu Primäpolypen entwickeln (D), verbleiben Morpholino injizierte Tiere in einem „Dauerblastula“-artigen Zustand (H), bei dem ungeordnetes Endoderm von komplett bewimperten Ektoderm umhüllt ist. In diesem Zustand läßt sich keine Körperachse erkennen. Dieser Phänotyp tritt mit einer Häufigkeit von über 70% aller injizierter Embryonen und ist damit nicht auf seltene natürlich vorkommende Entwicklungsdefekte bzw. Verletzungen durch die Injektion, wie die uninjizierte Kontrolle respektive die Injektion des Standardkontroll-Morpholinos (StaCoMo) zeigen, zurückzuführen (I).

4.5.2 Einfluß von *Wnt3* auf die Genregulation

Obwohl die Morpholino-Injektion in frühen Stadien zu keinen morphologischen Veränderungen führt, wurde versucht in Gastrulae frühe Effekte auf Wnt-Zielgenen und oral-aboraler Marker zu finden. Jedoch bleiben *Brachyury*, *Tcf*, *Chordin* und *BMP2/4* unbeeinflusst durch die Injektion und scheinen somit keine direkten Ziele von *Wnt3* zu sein (Abb.16). Mit einer Repression von *Fkh* um 30% scheint der Morpholino einen schwachen Einfluss auf die Musterung der Körperachse zu haben, auch wenn das aborale *FGFa1* und sein Rezeptor *FGFRa1* unverändert sind (Abb.16). Spätere Stadien (Planulae oder Metamorphose-Stadien) wurden nicht getestet.

Eine Kompensation des *Wnt3*-„Knockdowns“ durch andere Wnt-Liganden kann ausgeschlossen werden, da diese durch die Morpholino-Injektion unbeeinflusst sind (Abb.17). Zwar scheinen *Wnt8b* und *Wnt11* auf den ersten Blick im Vergleich zur uninjizierten Kontrolle reprimiert zu sein, jedoch ist die Injektion des Kontroll-Morpholinos auf dem selben Level, weshalb es sich wahrscheinlich um einen unspezifischen Effekt der Injektion handelt (Abb.17). Die Aktivierung von *Wnt3* um mehr als das dreieinhalbfache lässt zwar auf eine negative Autoregulation schließen, ist aber wahrscheinlicher mit einer Stabilisierung der RNA durch den Morpholino und somit einem Schutz vor der Degradation zu erklären (Abb.17).

Ergebnisse

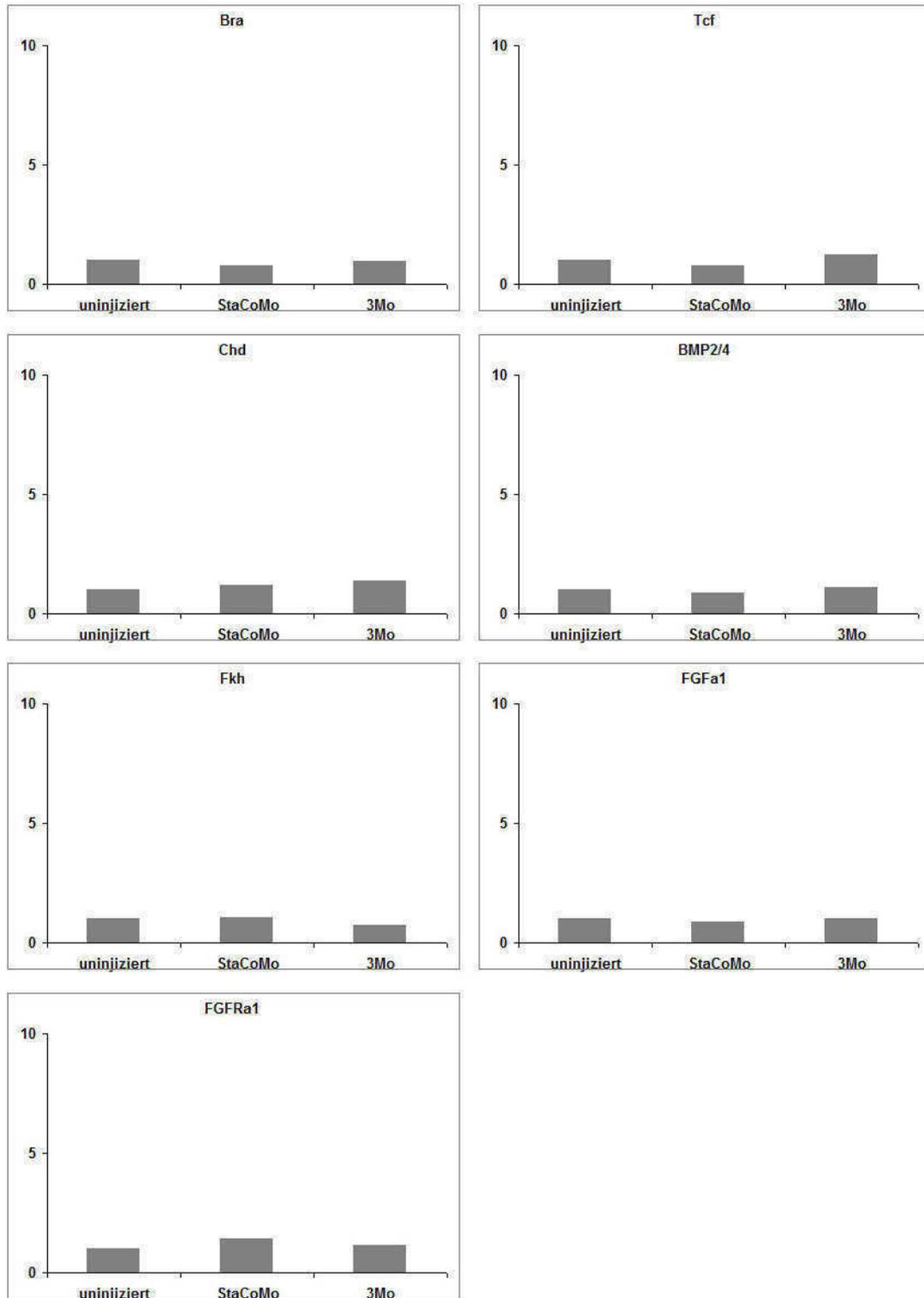


Abb.16 Einfluß des NvWnt3-Morpholinos auf die Gen-Expression in *Nematostella*: *Nematostella* Eier wurden mit 500 µM NvWnt3-Morpholino injiziert und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Unbehandelte und mit 500 µM Standard-Kontroll-Morpholino injizierte Tiere dienten als Kontrolle. Die Effekte werden hier als N-faches der uninjizierten Kontrolle angegeben. Lediglich *Forkhead* wird verglichen zu den Kontrollen um 30% reprimiert. Die Transkriptlevel weiterer Gene sind nahezu unverändert durch die Injektion.

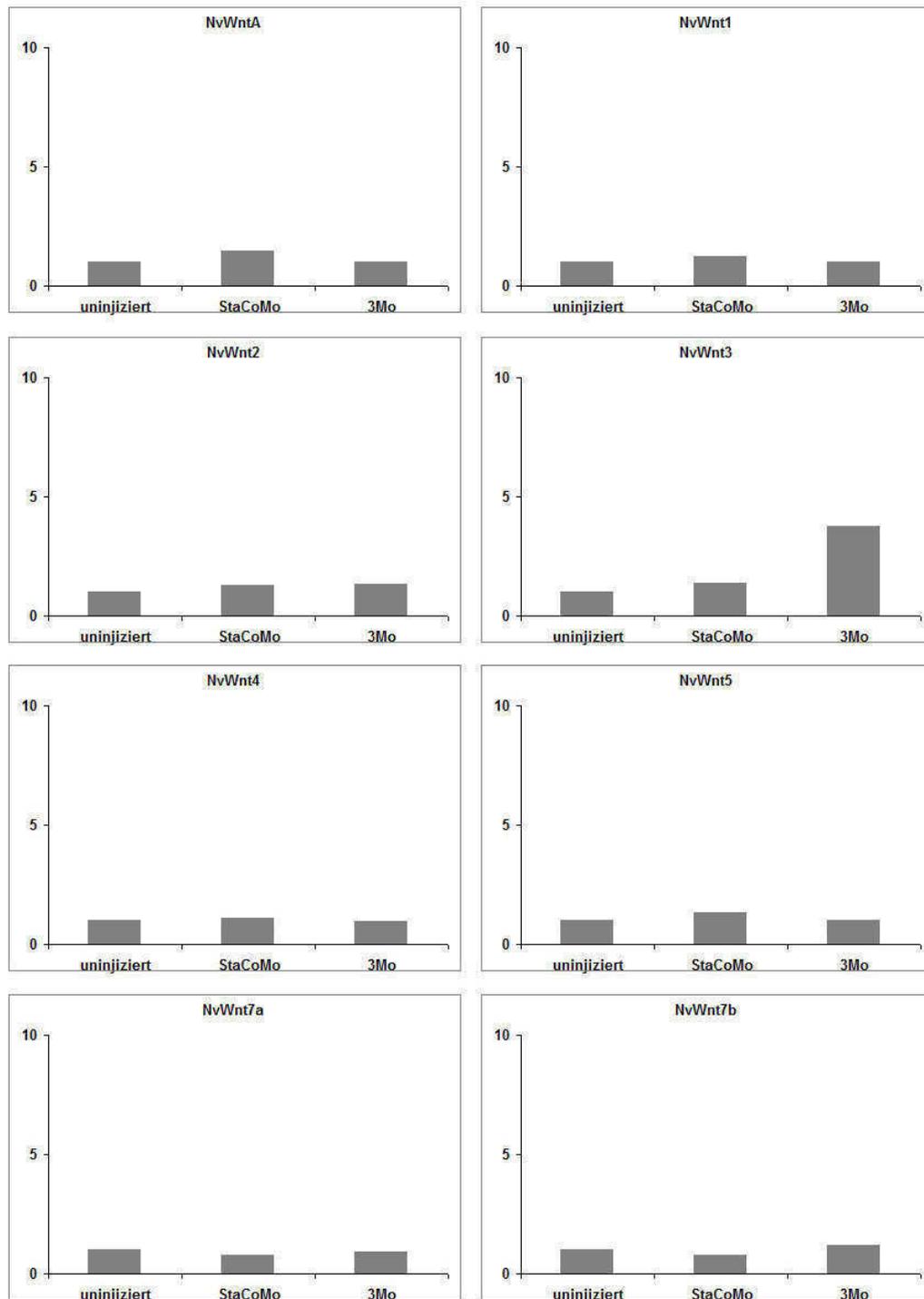


Abb.17 Einfluß des NvWnt3-Morpholinos auf die Expression weiterer *Nematostella* Wnt-Liganden: *Nematostella* Eier wurden mit 500 µM NvWnt3-Morpholino injiziert und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Uninjizierte und mit 500 µM Standard-Kontroll-Morpholino injizierte Tiere dienten als Kontrolle. Die Effekte werden hier als N-faches der uninjizierten Kontrolle angegeben. Der NvWnt3-Morpholino hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression anderer *Wnt*-Gene. Zwar ist das durch den Morpholino erhöhte Transkriptlevel von *NvWnt3* ein Hinweis auf eine negative Autoregulation, jedoch ist ein Degradationsschutz der RNA durch den Morpholino wahrscheinlicher. Abbildung wird auf Seite 65 fortgesetzt.

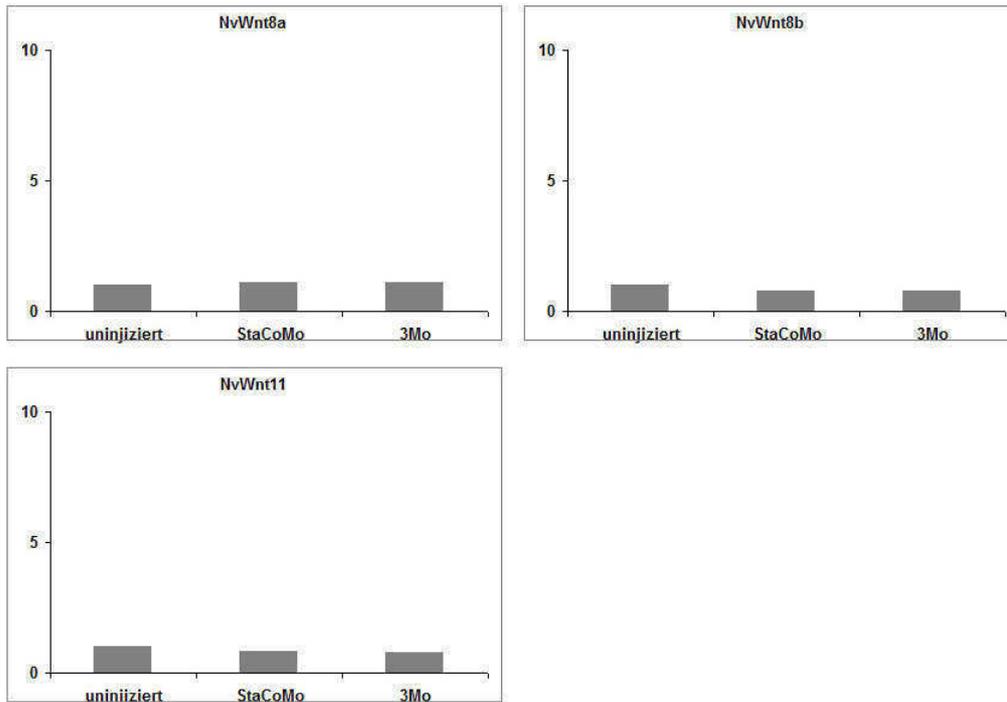


Abb.17 Einfluß des NvWnt3-Morpholinos auf die Expression weiterer *Nematostella* Wnt-Liganden (Fortsetzung): Siehe Seite 64.

4.6 Funktionelle Analyse von *Wnt11* in *Nematostella vectensis*

4.6.1 Frühe räumliche Expression von *NvWnt11*

Anders als in den Publikationen von Kusserow und Lee (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006) erscheint *NvWnt11* schon sehr stark während späten Teilungsstadien ubiquitär exprimiert zu sein, was sich auch mit den Ergebnissen der RT-PCR deckt (Abb.18). In der Blastula schwächt sich die Expression ab und beschränkt sich auf den prospektiven oralen Pol (Abb.18). Die endodermale Expression bleibt auch in den Gastrulastadien bestehen. So ist *Wnt11* in der invaginierenden Endodermplatte der frühen Gastrula und in sich anheftenden Endoderm der mittleren und späten Gastrula zu detektieren (Abb.18).



Abb.18 *In situ* Hybridisierung für *NvWnt11* in frühen Entwicklungsstadien: *NvWnt11* wird in Teilungsstadien ubiquitär im ganzen Embryo exprimiert (A). In der Blastula kommt es zum Symmetriebruch und *Wnt11* beschränkt sich auf die Seite des zukünftigen Blastoporus (B). *Wnt11* markiert auch in der frühen Gastrula den oralen Pol und wird in der invaginierenden Endodermplatte exprimiert (C). Die Expression im Endoderm bleibt in der mittleren und späten Gastrula bestehen (D-E).

4.6.2 Phänotypen nach Injektion von *NvWnt11*-Morpholino

Wie für *Wnt3* wurde hier der „Knockdown“-Ansatz gewählt. Anders als bei *Wnt3* führt die Injektion von *Wnt11*-Morpholino (11Mo) mit einem stark vergrößerten Blastoporus in der frühen Gastrula zu einem früh erkennbaren Phänotyp (Abb.19). Auf den ersten Blick mag dieser nicht so drastisch erscheinen. Dieser Effekt tritt bei etwa 50% aller mit dem Morpholino injizierten Tiere auf (Abb. 19). Bei höherer Konzentration fehlt in 40% der Embryonen der Blastoporus gegenüber 7-11 % der Kontrollen (7% bei 800 μ M StaCoMo und 11% bei 500 μ M StaCoMo). Daß es sich dabei um unbefruchtete Eier handelt, wurde ausgeschlossen, indem wenige Stunden nach der Injektion Embryonen ohne Anzeichen von Zellteilung aussortiert wurden. Damit scheint dieser Phänotyp dosisabhängig zu sein. Gegenüber der Vergrößerung des Blastoporus ist es auch der extremere Phänotyp.

Die Vergrößerung des Blastoporus in 11Mo-injizierten Tieren lässt sich durch Fluoreszenzfärbung des Aktinzytoskeletts mit Alexa568-konjugiertem Phalloidin sichtbar machen (Abb. 19). Während sich der Urmund in den Kontrollen schon fast geschlossen hat, bewirkt der *Wnt11*-Morpholino, dass sich das prospektive Endoderm noch kaum invaginiert hat. Anders als in den Kontrollen kommt es zu keiner apikalen Konstriktion der Zellen in der Blastoporuslippe und die Zellen des Ektoderms erscheinen insgesamt in apiko-basaler Richtung weniger gestreckt, sondern besitzen eine eher abgerundete Form.

Ergebnisse

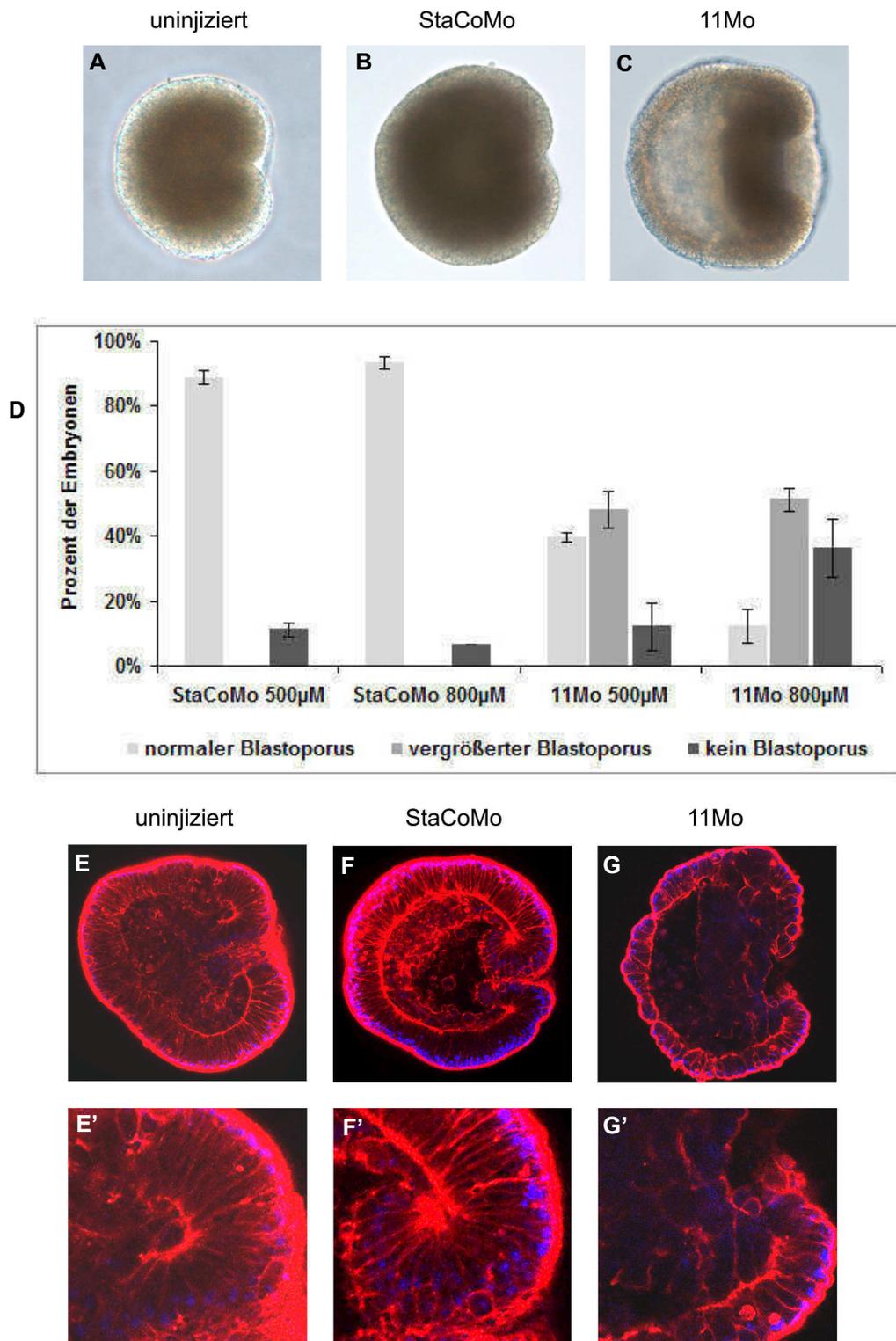


Abb.19 Gastrulationsdefekte nach Injektion des NvWnt11-Morpholino: Die Injektion des NvWnt11-Morpholinos resultiert in einem drastisch vergrößerten Blastoporus (**C**) verglichen zu uninjizierten (**A**) und Kontroll-Morpholino (StaCoMo) (**B**) injizierten Tieren. Dieser Phänotyp tritt unabhängig der injizierten Konzentration in etwa 50% aller Tiere auf (**D**). Dosisabhängig und der extremere Phänotyp ist dagegen das Ausbleiben der Blastoporusbildung, das sich in seiner Häufigkeit für 500 µM kaum von den Kontrollen unterscheidet, jedoch durch 800 µM Wnt11-Morpholino in 40% der Embryonen auftritt (Fehlerbalken geben den Standardfehler an) (**D**). Der Vergleich Wnt11-Morpholino injizierter Tiere (**G,G'**) zu den Kontrollen (**E-F, E'-F'**) verdeutlicht die starken Gastrulationsdefekte durch den Morpholino, die sich in Vergrößerungen der Blastoporuslippe (**E'-G'**) in verminderter apikaler Konstriktion und einer eher abgerundeten Form der Zellen äußert. Embryonen in **E-G** wurden mit fluoreszenzkonjugiertem Phalloidin und DAPI gefärbt.

4.6.3 Einfluß von *Wnt11* auf die Genregulation

Nach Injektion von *Wnt11*-Morpholino wird die *Chordin*-Expression auf etwa ein Drittel der Kontrollen in der quantitativen RT-PCR reduziert (Abb.20). Dies spiegelt sich auch in einem deutlich schwächeren Signal der *in situ*-Hybridisierung (ISH) wieder (Abb.21). *Brachyury* zeigt in der ISH eine schwächere Expression und wurde in einzelnen qPCR-Experimenten reprimiert (Abb.21). Andere *Wnt*-Zielgene sind unbeeinflusst (Abb.20). Der orale Marker *Fkh* zeigt ein unverändertes Expressionsniveau genau wie der aborale *FGFRa1*-Rezeptor. Dagegen deutet die schwache Aktivierung von *FGFa1* eine leichte Verschiebung der oral-aboralen Musterung an (Abb.20). Von den endodermalen Genen wird *Activin* deutlich reprimiert, wohingegen die Expression der beiden *Snail*-Gene nicht erhöht scheint (Abb.20). Weitere qPCR-Experimente zeigen jedoch eine signifikante Verstärkung der *SnailA*-Expression. Genauso zeigt die ISH für *SnailA* eine stärkere Expression, die sich außerdem auch auf das Ektoderm des Embryos ausbreitet, wobei in Kontrollen lediglich das Endoderm ein Signal zeigt (Abb.21). Die deutlichste Aktivierung zeigt sich für *Cadherin1* und -2 um einem Faktor 2,5 respektive 3 (Abb.20).

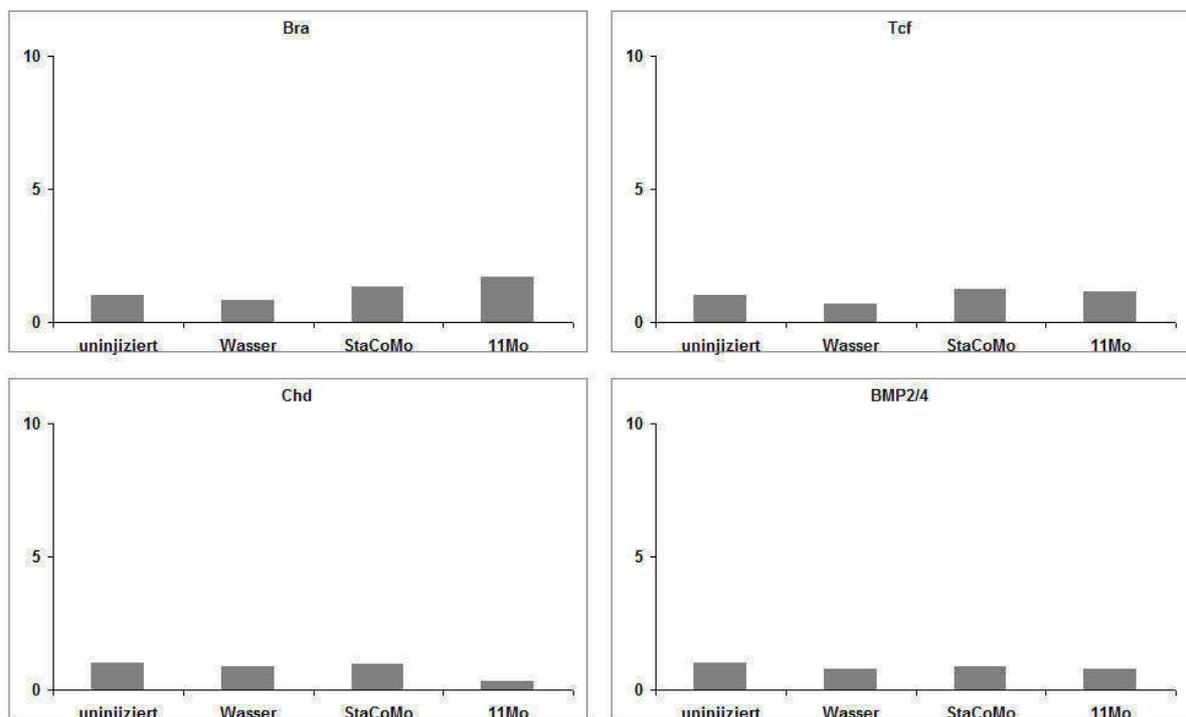


Abb.20 Einfluß des *NvWnt11*-Morpholinos auf die Gen-Expression in *Nematostella*: Abbildung wird auf Seite 69 fortgesetzt.

Ergebnisse

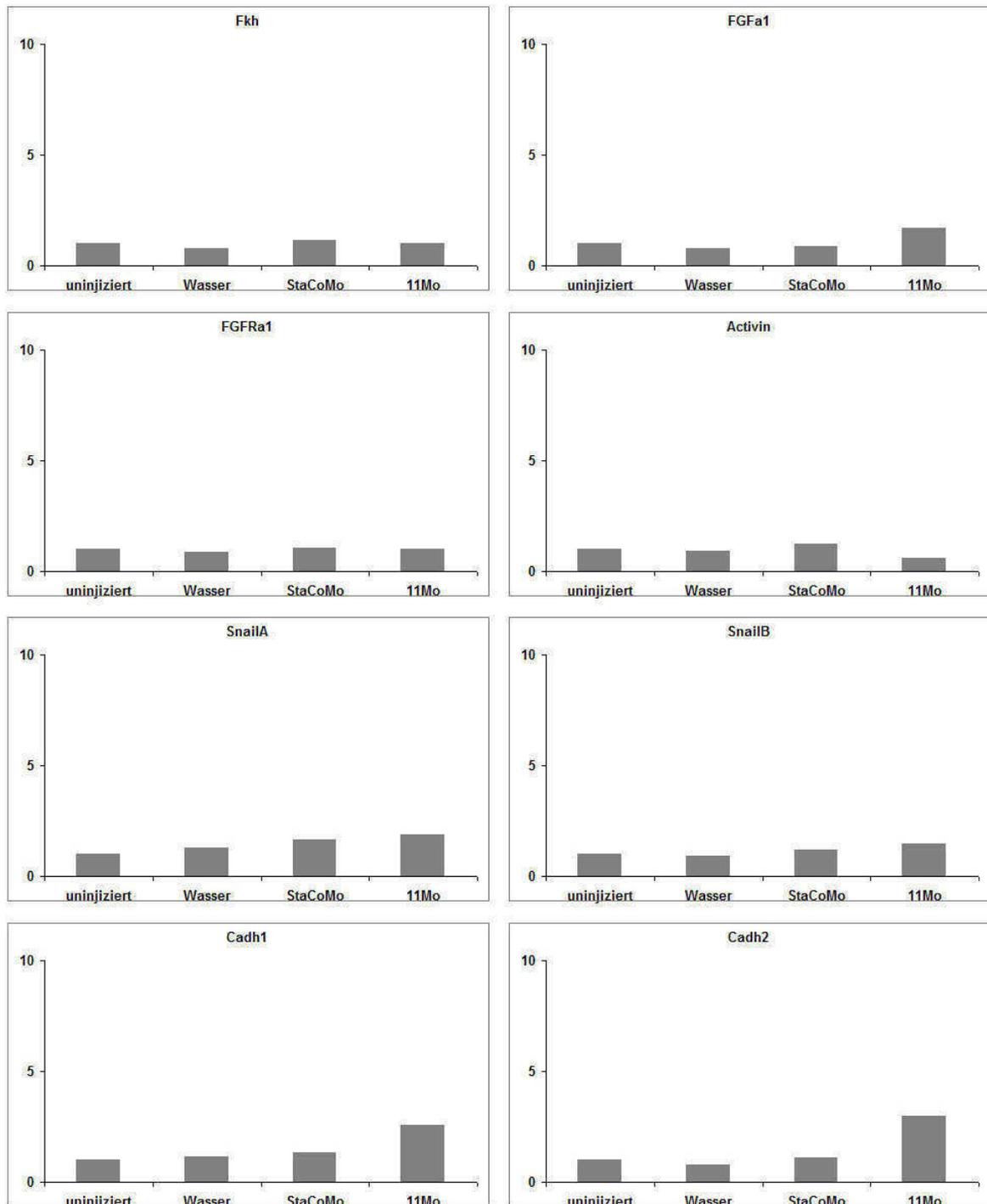


Abb.20 Einfluß des NvWnt11-Morpholinos auf die Gen-Expression in *Nematostella* (Fortsetzung): *Nematostella* Eier wurden mit 800 μ M NvWnt11-Morpholino injiziert und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Uninjizierte, mit Wasser und mit 800 μ M Standard-Kontroll-Morpholino injizierte Tiere dienen als Kontrolle. Die Effekte werden hier als N-faches der uninjizierten Kontrolle angegeben. Von den Wnt-Zielgenen und Komponenten des Wnt-Signalwegs wird lediglich *Chordin* sehr stark auf etwa ein Drittel der Kontrollen durch den Morpholino reprimiert. Der orale Endoderm-Marker *Activin* wird ebenfalls reprimiert und dafür das aborale *FGFa1* sowie sehr deutlich die beiden *Cadherine* aktiviert. Die weiteren getesteten Gene erscheinen hier unbeeinflusst.

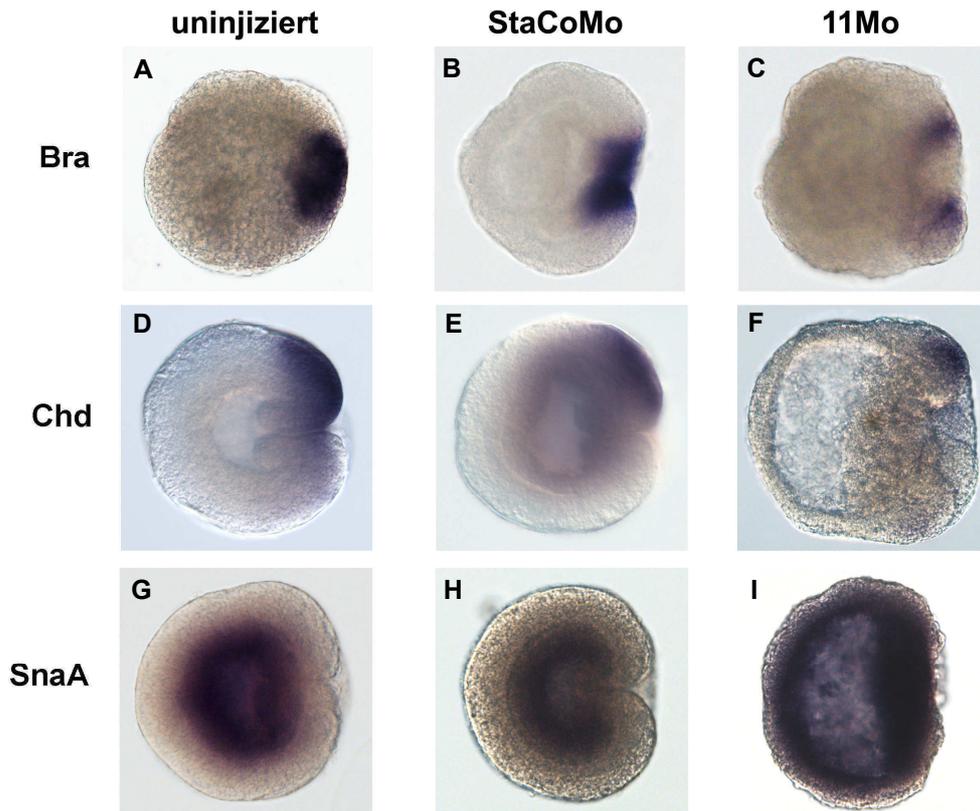


Abb.21 *In situ* Hybridisierung NvWnt11-Morpholino injizierter *Nematostella* Embryonen: Uninjizierte (A, D, G) und mit entweder 800 μ M Standard-Kontroll-Morpholino (B, E, H) oder NvWnt11-Morpholino (C, F, I) injizierte Tiere wurden auf die Expression von *Brachyury* (A-C), *Chordin* (D-F) und *SnailA* (G-I) in *in situ* Hybridisierungsexperimenten untersucht. Dabei resultiert der Wnt11-Morpholino in einem schwächeren Signal für *Brachyury* (C) und *Chordin* (F), während die Expression von *SnailA* nicht nur stärker wird, sondern sich außerdem auf das Ektoderm ausdehnt (I).

4.6.4 Kompensationsexperimente mit Alsterpaullone

Da sich teilweise konträre Effekte auf die Genexpression durch ALP-Behandlung bzw. durch Injektion von Wnt11-Morpholino einstellten, wurde hier getestet, inwieweit sich der Verlust von *Wnt11* durch Stabilisierung von β -Catenin kompensieren lässt. Dafür wurden Embryonen mit 800 μ molaren Wnt11- und Kontroll-Morpholino (StaCoMo; Standard Control Morpholino) injiziert und einer steigenden Konzentration von ALP ausgesetzt. Die resultierenden Phänotypen wurden nach 24 Stunden ausgezählt und die RNA für qRT-Experimente extrahiert.

Die Induktion von vergrößerten Blastoporen ließ sich in diesem Experiment in ca. 42% der Tiere der DMSO-Kontrolle replizieren (Abb.20). Schon die geringe Konzentration von 0,25 μ M ALP verringert das Auftreten dieses Phänotyps drastisch auf etwa 10%, wobei starke Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten

Ergebnisse

möglich sind, was die Länge des Fehlerbalkens erklärt (Abb.20). Bei Konzentrationen von 0,5 und 1 μM ALP verringert sich die Häufigkeit weiter auf etwa 6% (Abb.20). Eine Vergrößerung des Blastoporus in unter 3% aller StaCoMo-injizierten Tiere ist zu vernachlässigen.

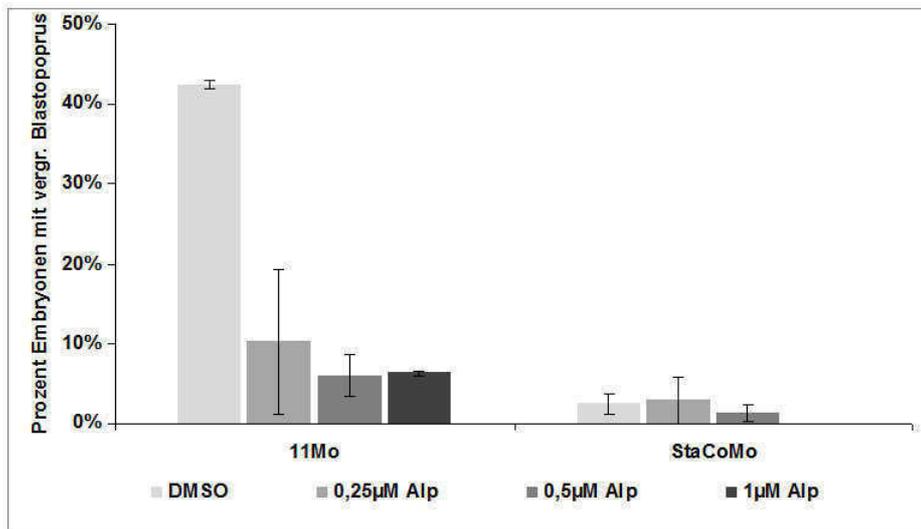


Abb.22 Alsterpaullone rettet den Phänotyp des NvWnt11-Morpholino: *Nematostella* Eier wurden mit 800 μM des entsprechenden Morpholinos injiziert, mit den angegebenen Konzentrationen an Alsterpaullone (ALP) inkubiert und auf das Auftreten vergrößerter Blastoporen untersucht. Bereits geringe Konzentrationen von 0,25 μM ALP reduzieren die Häufigkeit von 40% auf etwa 10% aller Embryonen. Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Neben dem Phänotyp war es auch möglich genregulatorische Effekte des Morpholino mit ALP zu kompensieren. So ist *Chordin* und *Activin* in der DMSO Kontrolle noch deutlich reprimiert (Abb.23), jedoch zeigt *Activin* bei 0,25 μM ALP schon eine starke Erhöhung des Expressionsniveau, fällt bei 0,5 μM wieder leicht ab und erreicht bei 1 μM ALP in etwa das Niveau der Kontrolle. Die Expression von *Chordin* dagegen ist schon bei 0,5 μM ALP kaum von der Kontrolle zu unterscheiden (Abb.23). Ähnlich ist es bei *FGFa1*. Nach einer anfänglichen Aktivierung durch den Morpholino verringert sich die Expression mit steigender ALP-Konzentration auf das Kontrollniveau (Abb.23).

Ergebnisse

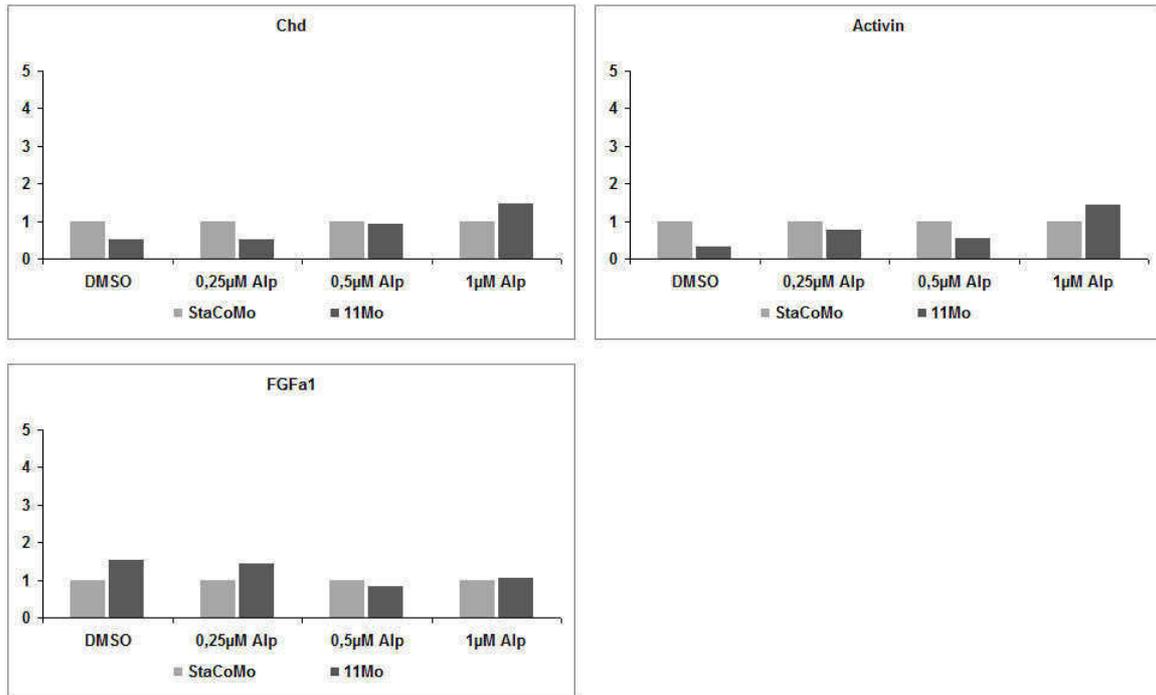


Abb.23 Alsterpaullone kompensiert die Effekte des NvWnt11-Morpholino auf die Genregulation: *Nematostella* Eier wurden mit 800 µM des entsprechenden Morpholinos injiziert, mit den angeben Konzentrationen an Alsterpaullone (ALP) inkubiert und die Auswirkung auf die Gen-Expression mittels qPCR bestimmt. Sowohl die Repression von *Chordin* und *Activin* als auch die Aufregulation von *FGFa1* durch den Wnt11-Morpholino wird durch ALP kompensiert.

5 Diskussion

Das große Repertoire an kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalkomponenten in *Nematostella vectensis* und die strukturelle Konservierung bis hin zu den Homologen höherer Vertebraten legen nahe, dass in *Nematostella* ebenfalls unterschiedliche Wnt-Signalwege existieren (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006; Guder et al., 2006). Dies wird weiter gestützt durch die Lokalisation einzelner *Wnt*-Gene in der frühen Embryonalentwicklung, die mit der Achsenbildung und morphogenetischen Bewegungen, wie der Bildung von Flaschenhalszellen, zusammenfallen (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006; Tamulonis et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die *Nematostella* Wnt-Liganden durch Expressionsanalysen und Versuche in heterologen Systemen genauer untersucht, um Rückschlüsse auf ihre Regulation und funktionelle Konservierung im kanonischen oder nicht-kanonischen Signalweg zu ziehen. Außerdem wurde die endogene Funktion von *NvWnt3* und *-11* durch „Knockdown“-Experimente charakterisiert.

5.1 *Nematostella* Wnt-Liganden aktivieren entweder den kanonischen oder nicht-kanonischen Signalweg in heterologen Systemen

Da in *Nematostella vectensis* etablierte Readout-Systeme für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweg fehlen, wurde dieser Fakt für eine erste Einteilung der *Nematostella* *Wnt*-Gene durch Reporterassays im Zellkultursystem und dem Achseninduktionsassay in *Xenopus laevis* umgangen, welche bereits von Guder et al. (2006) bei der Untersuchung des Wnt-Antagonisten Dickkopf1/2/4 aus *Hydra magnipapillata* verwendet wurden.

In den vorliegenden Ergebnissen (Abb.5 und 6) zeichnen sich große Unterschiede in den induktiven Fähigkeiten einzelner *NvWnts* ab. So induzieren nur *NvWnt1* und marginal auch *NvWnt3* sekundäre Achsen im Frosch (Watermeier et al., 2011). Im sensitiveren TOP-Flash-Assay dagegen zeigt *Wnt1* als einziges *Wnt* eine Aktivierung des Reporters, was das Auftreten von sekundären Achsen nach Injektion von *NvWnt3* in Frage stellt. So traten nach der Injektion von *NvWnt3* keine sekundären Achsen auf (Rigo-Watermeier et al., 2011). Möglicherweise handelt es sich bei den scheinbar duplizierten Achsen um Artefakte, hervorgerufen durch die Verletzung der

Embryonen mit der Injektionsnadel oder einer zu langen Dauer auf dem Schwenkschüttler während der Cysteinbehandlung. In Übereinstimmung mit den Daten aus dem TOP-Flash-Assay für *NvWnt1* wurde eine Duplikation der Achsen beobachtet (Rigo-Watermeier et al., 2011). Dies lässt darauf schließen, dass *Wnt1* als einziges der getesteten *Wnt*-Gene evolutiv in der Achsenbildung konserviert ist. Überraschenderweise scheint *Wnt3*, das bei *Hydra* in der frühen Regeneration beteiligt ist, auch bei *Nematostella* in der frühen Embryogenese keine Achseneffekte zu haben, was mit den ausbleibenden Achseneffekten in *Xenopus* übereinstimmen würde.

Außerdem zeigt die Arbeit von Rigo-Watermeier et al., dass *NvWnt5* und *NvWnt11* in *Xenopus* den nicht-kanonischen Signalweg bedienen. Interessanterweise sind jedoch die genauen Funktionen der beiden Liganden vertauscht, so dass *Wnt5*-RNA aus *Nematostella* die verminderte Elongation durch Injektion von *XIWnt11*-Morpholino in Frosch-Keller-Explantaten und *NvWnt11* verminderte Konstriktion durch den *XIWnt5*-Morpholino kompensiert.

	NvWnt1	NvWnt2	NvWnt3	NvWnt4	NvWnt5	NvWnt7b	NvWnt11	NvWnt16
TOP-Flash	+	-	-	-	-	-	-	-
Achsenind.	+	-	+/-	-	-	-	-	k.D.
PCP-Effekt	-	-	-	k.D.	+	k.D.	+	k.D.

Abb.24 Funktionelle Konservierung der *Nematostella* *Wnt*-Gene in heterologen Systemen:

Von den untersuchten *Wnt*-Genen aktiviert nur *NvWnt1* den kanonischen Signalweg im TOP-Flash Reporter Assay und bei der Induktion sekundärer Achsen in *Xenopus* verlässlich. *NvWnt3* zeigt dagegen keinen Effekt, obwohl seine Homologe in Bilateriern klassisch zu den kanonischen *Wnt*-Genen gezählt werden. *NvWnt5* und *-11* beeinflussen die planare Zellpolarität (PCP) in Keller-Explantaten mit *Xenopus laevis*. Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Rigo-Watermeier et al. (2011) dar. (+ steht für positive Effekte und – für keinen Effekt; Versuche, für die keine Daten vorliegen, sind mit k.D. gekennzeichnet)

Zwar geben diese Ergebnisse keinen endgültigen Aufschluss über die endogene Funktion der einzelnen *Wnt*-Gene in *Nematostella* selbst, da sie nicht den physiologischen Kontext widerspiegeln. So können die *Wnt*-Liganden in *Nematostella* andere Affinitäten zu ihren jeweiligen Rezeptoren und Korezeptoren aufweisen oder können die Rezeptoren selbst andere Signalwege als in z.B. Vertebraten vermitteln, wodurch sich das Endergebnis grundlegend unterscheiden könnte. Die bisherigen Daten weisen jedoch zumindest auf einen gemeinsamen Vorfahren der Metazoen hin, der bereits früh die Voraussetzungen für den

kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg mit sich brachte. Es ist anzunehmen, dass die Trennung der beiden Signalwege eine feinere Musterung der Achse und überhaupt erst komplexe, morphogenetische Zellbewegungen ermöglichte.

5.2 Frühe Expression der *Nematostella* Wnt-Liganden und die Achsenbildung

Wie in vielen Spezies definiert auch in *Nematostella vectensis* die Stabilisierung und Kernlokalisierung von β -Catenin den Blastoporus (Weaver und Kimelman, 2004). So ist ektopisch eingebrachtes β -Catenin anfänglich diffus in den Blastomeren der frühen Teilungsstadien verteilt, wird jedoch bereits im 32-Zellstadium auf einer Seite des Embryos degradiert, dagegen auf der gegenüberliegenden Seite stabilisiert und lokalisiert sich dort im Kern (Wikramanayake et al., 2003). Diese asymmetrische Lokalisation bleibt während des Blastulastadiums bestehen und definiert den Ort der Gastrulation. In der Gastrula und der Planula ist β -Catenin in den Nuclei des invaginierten Endoderms zu detektieren (Wikramanayake et al., 2003). Die Asymmetrie der β -Catenin-Kernlokalisierung wird wahrscheinlich durch *NvTcf* und *NvDishevelled* vermittelt. Die Transkripte beider Gene sind in frühen Stadien uniform verteilt, jedoch beschränkt sich die *NvTcf*-Expression bereits um das 16-Zellstadium auf eine Seite des Embryos. Anders als das ubiquitäre *Dishevelled*-Transkript ist das Protein in allen frühen Entwicklungsstadien animal lokalisiert und in der unbefruchteten Oozyte besonders am Kortex über dem weiblichen Pronukleus angereichert (Lee et al., 2007). Diese Ergebnisse weisen auf eine frühe Polarisierung entlang der animal-vegetativen Achse durch einen β -Catenin-Gradienten hin. Bislang war jedoch unklar, ob die kortikale Anreicherung von *Dishevelled* unabhängig von der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges geschieht, ähnlich dem Modell der kortikalen Rotation in *Xenopus laevis*, oder ob sie das Resultat einer solchen Aktivierung darstellt, wodurch *Dishevelled* in membrangebundenen Signalosomen stabilisiert wird (Billic et al., 2007). Die maternale Beladung mit *NvWnt5-*, *7a-*, *7b-*, *8b-* und *11-*Transkript in unbefruchteten Eiern, die in der semiquantitativen RT-PCR deutlich wird (Abb.XX), lässt die Möglichkeit zu, dass die lokale Stabilisation von *Dishevelled* durch eines oder mehrere dieser *Wnt*-Gene erfolgt und damit die Wnt-Liganden für den frühen Symmetriebruch in der Gastrulation verantwortlich sind.

Zwar wurden bislang bei *in situ*-Hybridisierungsexperimenten keine *Wnt*-Gene vor Einsetzen der Gastrulation detektiert (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006), jedoch könnte dies auf einer geringeren Sensitivität verglichen zu der RT-PCR-Methode beruhen.

Das Set der maternalen *Wnt*-Gene erinnert an die Situation in *Xenopus laevis*, in der *XWnt5A*, *-8b* und *-11* ebenfalls maternal exprimiert werden (Moon et al., 1993; Ciu et al., 1995; Ku und Melton, 1993). Dabei scheinen *XWnt5A* und *-11* synergistisch die dorsoventrale Achsenbildung zu initiieren (Tao et al., 2005; Cha et al., 2008). Ebenso ist das maternale *CheWnt3* für eine orale β -Catenin-Stabilisierung und die Achsenbildung in der Hydromeduse *Clytia hemispherica* verantwortlich. So verhindert ein Morpholino gegen *CheWnt3* die Gastrulation und Endodermentwicklung (Momose et al., 2008).

Aussagen über die Situation in *Hydra* erweisen sich als schwierig, da eine Embryothek die Untersuchung der frühen Entwicklung nach Abschluss der Gastrulation erschwert. Jedoch zeigten Versuche von Hobmayer et al. (2000), Technau et al. (2000) und Lengfeld et al. (2009), dass die Etablierung der Achse sowohl während der Kopfregeneration nach Amputation als auch in Aggregaten dissoziierter Hydrazellen eine frühe Expression von *HyWnt3* voraussetzen. Vor allem die *de novo* Expression von *HyWnt3* in Aggregaten und die dadurch bedingte Achsenbildung zeigen die instruktive Rolle von *HyWnt3* im Kopforganisator. In diesem Kontext wird die Funktion eines oder mehrerer Gene (*NvWnt5*, *-7a*, *-7b*, *-8b* und *-11*) als maternaler Achseninduktor immer wahrscheinlicher.

Das Auftreten aller untersuchten *Nematostella* *Wnt*-Gene in der Blastula deutet auf ein Signalzentrum hin, in dem möglicherweise alle *Wnts* exprimiert werden. Dies ist sehr ähnlich dem Hypostom von *Hydra*, in dem ebenfalls fast alle *Wnts* exprimiert werden (Lengfeld et al., 2009). Möglicherweise gewährleistet die Expression mehrerer *Wnts* ein robustes Organisationszentrum, um den Ort der Gastrulation zu definieren. Dieses Organisationszentrum wird später während des Fortschreitens der Gastrulation aufgefächert, bis man die sequentiellen, teilweise überlappenden Domänen in den Planularlarven erhält (Kusserow et al., 2005).

Neben der Möglichkeit einer redundanten Funktion könnte die Vielzahl an *Wnt*-Genen auch zu einer Feintuning der *Wnt*-Funktion führen. Beobachtungen in *Drosophila melanogaster*, bei denen nur die Deletion von *Wingless* (*Wg*) maßgeblich die Entwicklung beeinflusst, andere *Wnt*-Gene dagegen nur im Kontext einer *Wg*-

Kodeletion einen Effekt zeigen, geben ein Beispiel für solch ein Feintuning der Wnt-Funktion (Kozopas et al., 1998; Llimargas und Lawrence, 2001). Diese Idee wird weiterhin dadurch gestützt, dass in den heterologen Versuchen von den untersuchten *Wnts* nur *NvWnt1* in der Lage war, den kanonischen und *NvWnt5* und -11 dagegen den nicht-kanonischen Signalweg zu aktivieren (Rigo-Watermeier et al., 2011). Von unterschiedlichen Affinitäten zu den jeweiligen Rezeptoren und Korezeptoren ist also auszugehen, wodurch *Wnts* zwar um die Rezeptoren konkurrieren könnten, aber einer Vielzahl der *Wnt*-Gene lediglich die Rolle zufiele, das genaue Verhältnis in der Rezeptorbelegung eines putativ aktiven Liganden zu titrieren. Eine weitere Art der Regulation wäre die Bildung von oligomeren Wnt-Komplexen, wie sie z.B. durch die Interaktion von Wnt5- und Wnt11-Dimeren zu größeren Wnt5/11-Komplexen vorkommen, die in *Xenopus* eine stärkere Signalaktivität als *Wnt5* und -11 alleine zeigen (Cha et al., 2009). Auf diese Art könnte die Interaktion der verschiedenen Liganden miteinander, in der frühen Blastula die Region des aktiven Organisators genauer definieren und stärker auf den oralen Pol beschränken. In der Planula könnte die gestaffelte Expression der *Wnts* dazu beitragen, einen β -Catenin-Gradienten entlang der oral-aboralen Achse genauer zu spezifizieren. So könnte z.B. das orale *NvWnt1* als kanonisch aktives Morphogen agieren, wobei es entlang der Achse auf andere *Wnts* trifft, mit denen es entweder um die Rezeptoren konkurriert oder durch Komplexbildung in seinen Eigenschaften verändert wird.

5.3 Kinetik und Regulation der *Nematostella* Wnt-Expression

Grundsätzlich lassen sich vier Expressionskinetiken für die Wnt-Liganden unterscheiden (Abb.25). So zeigen *WntA*, -1, -2 und -6 keine maternale Expression. Jedoch besitzen diese Gene bereits in der Blastula ein hohes Transkriptlevel, das bis zur späten Gastrula beinahe unvermindert anhält. Das Verhalten von *Wnt5*, -7a und -7b ist dem der ersten Gruppe sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass hier schon maternal ein hohes Transkriptlevel vorliegt. Ebenfalls ähnlich ist die Expression von *Wnt8a*, -8b, -11 und -16. Sie zeigen fast alle eine schwache Expression im unbefruchteten Ei, mit Ausnahme von *Wnt8b* (Abb.7 und 8), das bereits hier sein Expressionsmaximum erreicht hat, und *Wnt16*, welches keine maternale Expression besitzt. Allen Genen dieser Gruppe ist jedoch gemein, dass die Transkriptlevel nach

dem Blastula-Stadium rapide abfallen. Dies deutet darauf hin, dass diese *Wnts* wahrscheinlich hauptsächlich und maßgeblich an der Etablierung des frühen β -Catenin abhängigen Organisators in der Blastula beteiligt sind. Die letzte Gruppe unterscheidet sich jedoch am stärksten von den restlichen Genen. *Wnt3* und *-4* sind nicht maternal exprimiert, jedoch steigt ihr Transkriptlevel stetig bis zur späten Gastrula.

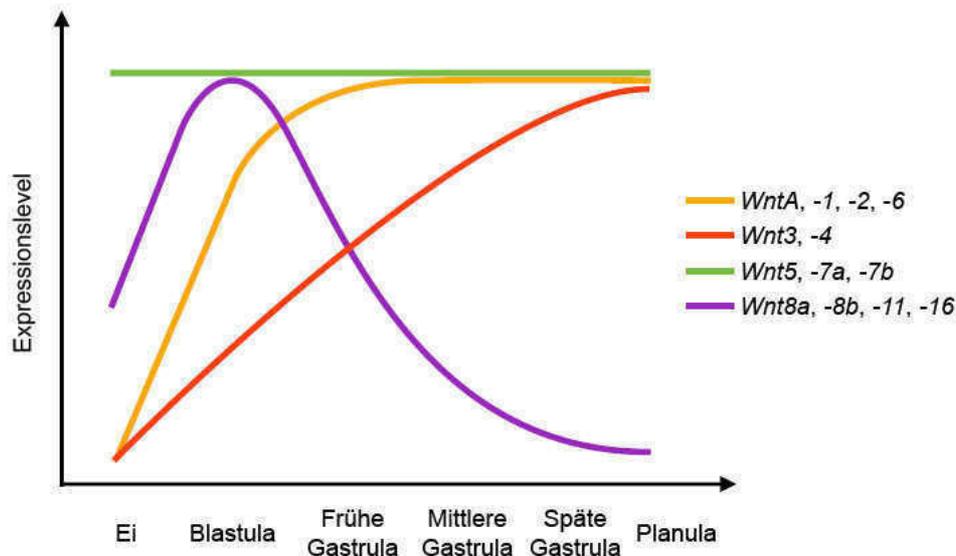


Abb.25 Schematische Darstellung der frühen Kinetik der *Nematostella* *Wnt*-Expression:

Die Expressionsverlauf einzelner *Wnt*-Gene lässt sich in vier Gruppen einteilen. *Wnt5, -7a* und *-7b* sind bereits maternal beladen und ihr Transkriptlevel bleibt bis zur Planula gleichförmig. *Wnt8a, -8b, -11* und *-16* sind bereits in unbefruchteten Eiern zu detektieren, ihre Transkription steigt jedoch in der Blastula und frühen Gastrula stark an und fällt danach wieder rapide ab. *WntA, -1, -2* und *-6* sind maternal nicht zu detektieren. Ihre Expression nimmt zur mittleren frühen Gastrula hin zu und verharrt auf diesem Level. Die Transkription von *Wnt3* und *-4* beginnt in der Blastula und nimmt zur Planula hin stetig zu.

Die Einteilung in vier distinkte Expressionstypen legt nahe, dass Gene mit ähnlicher Kinetik über ähnliche regulative Elemente in ihren Promotoren verfügen. Untersuchungen von Sullivan et al. (2007) zeigen ein hohes Maß an Konservierung der genomischen Organisation in *Nematostella*. So ist der *Wnt1-Wnt6-Wnt10*-Cluster, der aus *Drosophila melanogaster* bekannt ist, in *Nematostella* teilweise konserviert und *Wnt6* und *-10* sind hier nur etwa 4500 Nukleotide auf dem Chromosom voneinander entfernt. Außerdem wurde ein neuer syntenischer *Wnt5-Wnt7a/b*-Cluster entdeckt (Sullivan et al., 2007), der sich anscheinend auch in der Kinetik der Expression dieser Gene widerspiegelt, obwohl *Wnt5* und die Spleißformen von *Wnt7* in unterschiedlichen Keimblättern exprimiert werden. Jedoch

lässt sich die Ähnlichkeit vieler Kinetiken zu diesem Zeitpunkt ohne genaue Analyse der Promotorregionen der *Wnt*-Gene nicht erklären. Von großem Interesse wäre beispielsweise auch, welche Transkriptionsfaktoren und regulativen Elemente in den Promotoren die Keimblattspezifität bestimmen.

Viele Arbeiten der letzten Zeit sprechen für autoregulative Mechanismen in der Kontrolle der *Wnt*-Expression. Nakamura et al. (2011) konnten zeigen, dass *HyWnt3* seine eigene Expression direkt über die Stabilisierung von β -Catenin reguliert, ähnlich wie in *Drosophila melanogaster* (Heslip et al., 1997). Dies scheint auch der Fall für weitere *Wnt*-Liganden in *Hydra* zu sein, da die pharmakologische Stabilisation von β -Catenin zu einer erhöhten Transkription weiterer *Wnt*-Gene führt (Lengfeld et al., 2009). Außerdem gibt es in *Hydra* eine Abfolge der *Wnt*-Expression während der Kopfregeneration, die mit *Wnt3* beginnt. Das Vorhandensein von zwei bis fünf putativen LEF/TCF-Bindestellen in den Promotoren der elf *Hydra*-*Wnts* könnte *Wnt3* zu einem „Masterkontrollgen“ machen, das die konsekutive Expression weiterer *Wnts* induziert (Lengfeld et al., 2009). In *Nematostella* werden ebenfalls fast alle *Wnts* positiv durch Alsterpaullone beeinflusst, mit Ausnahme von *WntA*, -3 und -8b, deren Transkriptlevel sich durch die Inkubation nicht signifikant ändern. Die β -Catenin unabhängige Kinetik von *WntA*, -3 und -8b verdeutlicht eine Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren bei der Regulation dieser Gene. Desweiteren kann die schwache Sensitivität gegenüber β -Catenin entweder durch weniger oder mutierte LEF/TCF-Bindestellen bedingt sein, oder durch eine Repression mit nicht permissiven oder β -Catenin sensitiven Repressoren, deren Expression auch mit höheren β -Catenin-Konzentrationen steigt. Insgesamt lassen diese Ergebnisse jedoch eine β -Catenin abhängige Autoregulation der *Wnt*-Expression vermuten, die die Etablierung und vor allem die Aufrechterhaltung eines oralen Organisers ermöglichen. Die Vielzahl der maternalen Gene (*Wnt5*, -7a, -7b, -8b und -11) macht es schwierig, ähnlich wie in *Hydra* einem einzelnen Gen die Rolle des „Masterkontrollgens“ zuzuweisen. Interessante Kandidaten sind jedoch ausgehend von der Situation im Frosch *Wnt8b* als klassisch kanonisches Gen (Christian et al., 1993; Cui et al., 1995) oder *Wnt5* und -11, die maternal die dorsoventrale Achse induzieren (Tao et al., 2005; Cha et al., 2008). Da bislang keines dieser Gene genauer in *Nematostella* beschrieben wurde, ist ein *Wnt* unabhängiger Symmetriebruch in der Stabilisierung von β -Catenin nicht auszuschließen. *In silico* Analysen der Promotorregionen, sowie weitere „Knockdown“-Experimente wie in

dieser Arbeit für weitere *Wnts* werden wohl diese Fragen in Zukunft beantworten können.

Vergleicht man die β -Catenin-Empfindlichkeit mit der Lokalisation entlang der primären Achse der Planula, scheint es folgende Korrelation zu geben: Oral exprimierte Gene zeigen insgesamt eine schwächere Aktivierung durch Alsterpaullone-Inkubation als aborale Gene (Abb. 26). Dies würde es einem oralen Wnt-/ β -Catenin-Signalzentrum über einen Morphogengradienten ermöglichen, die Domänen oraler *Wnts* über ihre niedrige Sensitivität in ihrer Ausdehnung zu beschränken und gleichzeitig auch weiter aboral gelegene *Wnts* zu aktivieren. Auf der anderen Seite zeigen diese Ergebnisse, dass ein einzelner Morphogen-Gradient wie Wnt nicht alleine die gestaffelte Expression der Wnt-Liganden erklären kann (Kusserow et al., 2005; Guder et al., 2006), da sich sonst die Expressionsdomänen der meisten *Wnt*-Gene wie etwa *Wnt2* oder -8 vom oralen Signalzentrum, dem Ursprung des Morphogens, bis zu ihrem tatsächlichen aboralen Ende erstrecken würden. Die Beschränkung ihrer Expressionsdomänen kann also nur durch eine weitere Regulation gewährleistet werden (Abb. 26). Kürzlich wurde ein Beispiel für solch eine Regulation für den *Wnt3a*-Promotor in *Hydra* genauer untersucht (Nakamura et al., 2011). Dabei zeigte sich, dass der *Wnt3a*-Promotor nicht nur über LEF/TCF-Bindemotive, die es *Wnt3a* erlauben autoregulativ zu wirken, sondern auch über ein repressives Element verfügt, das die Expression von *Wnt3a* auf die Region des Kopforganisators begrenzt. Eine Deletion dieses repressiven Promotor-Elementes führte zu einer Verbreiterung der Expressionsdomäne. Die molekulare Natur des eigentlichen Repressors ist jedoch noch nicht geklärt.

Ähnliche Promotorstudien könnten Einsicht in die Genregulation der *Nematostella* Wnt-Liganden geben und neue Motive hervorbringen, die die Beschränkung auf das ekto- oder endodermale Keimblatt oder die gestaffelte Expression entlang der primären Achse in der Planula erklären. Ein *in silico* Vergleich der Bindemotive in den Promotoren zwischen etwa ekto- und endodermalen *Wnts* könnte auf erste Kandidaten hinweisen, die durch Mutations- und Deletionsstudien in transgenen *Nematostella*-Embryonen validiert werden müssten.

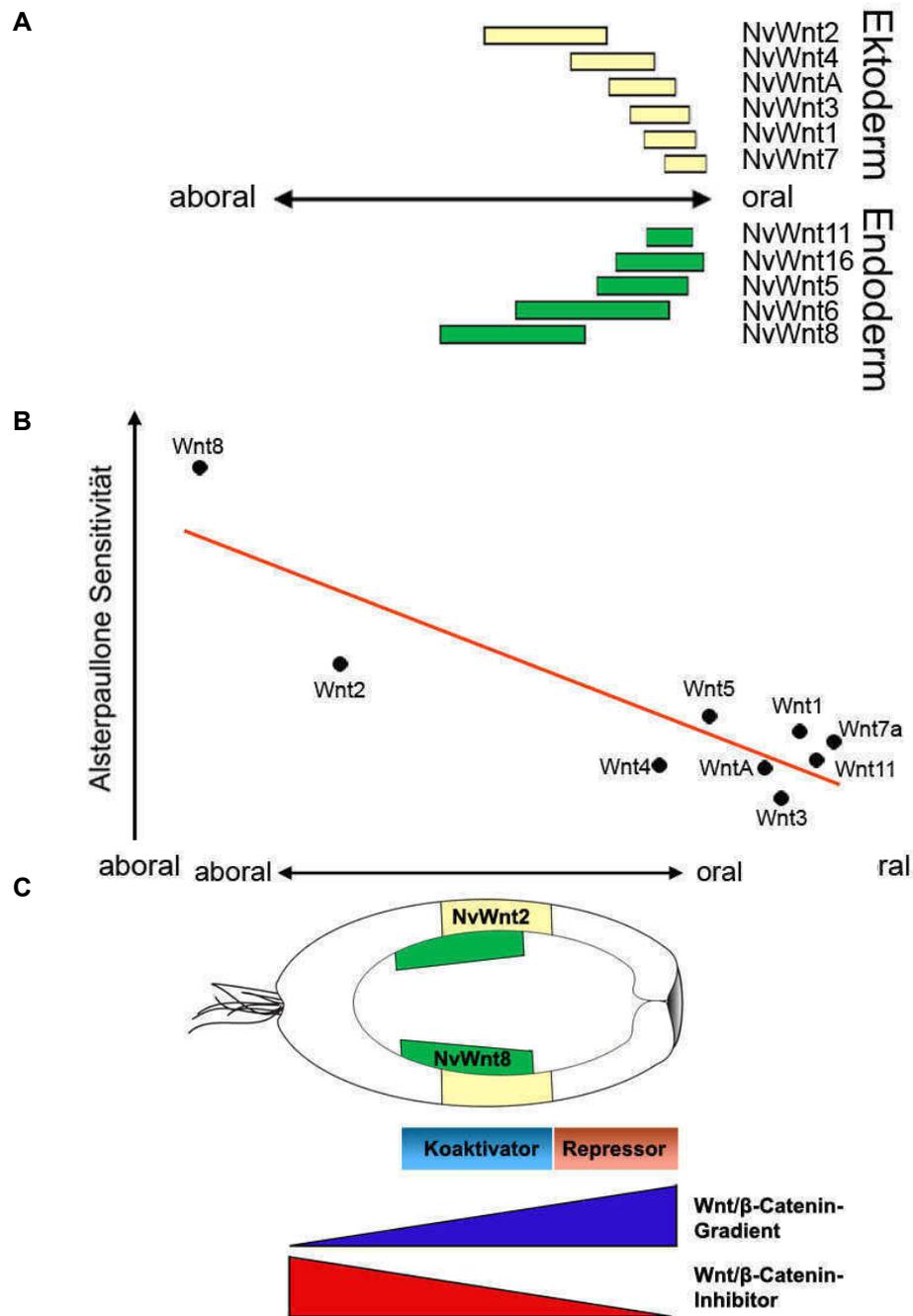


Abb.26 Regulation der *Nematostella* Wnt-Expressionsdomänen: **A** *NvWnt*-Gene zeigen eine von oral nach aboral gestaffelte Expression (Abbildung verändert nach Kusserow et al., 2005, Lee et al., 2006 und Guder et al., 2006). **B** Aborale Gene wie *Wnt2* und *-8* werden stärker als orale durch Alsterpaullone induziert. Die rote Regressionsgerade gibt die Zunahme der β -Catenin-Sensitivität der *Wnt*-Gene von oral nach aboral an. **C** Die aborale Begrenzung der *Wnt*-Gene lässt sich mit einem *Wnt*/ β -Catenin-Gradienten und einem gegenübergesetzten Inhibitor-Gradienten erklären. *NvWnt2* und *-8* werden in einem Streifen in der Mitte der Planula exprimiert. Um ihre Domänen nach oral hin abzugrenzen, muss ihre Expression entweder oral von einem Repressor (roter Kasten) oder einem permissiven Koaktivator (blauer Kasten) reguliert werden.

5.4 Wird die späte Funktion von *NvWnt3* in der Achsen-Determination durch den HNF3/FoxA-Transkriptionsfaktor *Forkhead* vermittelt?

Die *Wnt*-Gene aus *Nematostella* lassen sich eindeutig in 12 der 13 bestehenden *Wnt*-Subfamilien einordnen (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006; Guder et al., 2006; Lengfeld et al., 2009; Adamska et al., 2010). Es wäre dementsprechend anzunehmen, dass sich die homologen Sequenzen auch in homologen Funktionen niederschlagen, wie sie in höheren Modellorganismen wie Maus, Frosch oder Fliege bekannt sind. Dies scheint für *NvWnt1*, -5 und -11 der Fall zu sein, die entweder den kanonischen (*Wnt1*) oder den nicht kanonischen Signalweg (*Wnt5* und -11) in heterologen Systemen aktivieren können (Abb.24; Rigo-Watermeier et al., 2011). Jedoch aktivieren ein Großteil der getesteten Gene wie *NvWnt2*, -3, -7b nicht den kanonischen Wnt-Signalweg (Abb.24), wie es etwa für ihre Homologe in *Xenopus laevis* *XlWnt2A*, -3A und -7B gezeigt wurde (Landesmann et al., 1997; Wolda et al., 1993; J Brown, unveröffentlicht). Für *NvWnt8a* und -8b liegen derzeit keine Daten vor. Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass *NvWnt8a* und -8b direkte Homologe der bei *Xenopus* beschriebenen kanonischen *Wnt8A* und -8B aus Vertebraten (Christian et al., 1993; Cui et al., 1995) sind, würde man erwarten, dass *NvWnt8a* und -8b in heterologen Versuchen in *Xenopus* vergleichbar agieren.

Unter den kanonischen *Wnt*-Genen sticht besonders *NvWnt3* hervor, da seine Homologe in Bilateriern traditionell als kanonische *Wnts* klassifiziert werden (van Amerongen und Nusse, 2009) und *Wnt3* bei allen Protostomiern fehlt (Zitat). Dies wirft die Frage auf, ob sich *Wnt3* in Gegenwart seiner natürlichen Rezeptoren in *Nematostella* nicht doch wie ein kanonisches *Wnt* verhält.

Für die frühe Entwicklung scheint *Wnt3* keine achsenbildende Funktion zu haben. So ist nach der *Wnt3*-Depletion durch den Morpholino morphologisch kein Phänotyp zu erkennen, der auf eine Verminderung der Wnt/ β -Catenin-Signalaktivität schließen lässt (Abb. 15). *Nematostella*-Embryonen scheinen jedoch auch nach *Wnt3*-Morpholino-Injektion normal zu gastrulieren und ein normales Endoderm zu besitzen. Desweiteren lässt sich auch auf physiologischer Ebene keine Repression der Wnt-Zielgene wie *Brachyury*, *Tcf* und *Chordin* finden (Abb.16), welche jedoch eindeutig durch den GSK3 β -Inhibitor Alsterpaullone induziert werden.

Wenn dagegen der kanonische Signalweg durch die Überexpression von *Cadherin* oder eines dominant negativen β -*Catenin-Engrailed*-Konstrukt blockiert wird, findet keine Gastrulation statt (Lee et al., 2007; Wikramanayake et al., 2003). Schwächere Effekte treten nach Überexpression von *Axin* oder einen *Dishevelled-Dix*-Konstruktes auf, bei denen in der Gastrula kein Archenteron, sondern ein kompaktes Endoderm ohne jegliche Organisation zu sehen ist (Lee et al., 2007; Kumburegama et al., 2011). Sollte *NvWnt3* den kanonischen Signalweg aktivieren, wäre ein gegenteiliger Effekt von Morpholino und Alsterpaullone-Behandlung zu erwarten.

Obwohl *Wnt3* anders als bei *Hydra* kein „Masterkontrollgen“ (Lengfeld et al., 2009) der Achsenbildung im Embryo von *Nematostella* ist, hat es wahrscheinlich eine Funktion nach bzw. in der Metamorphose bei der Bildung des Kopfes in den Primärpolypen. So wird der orale Transkriptionsfaktor *Forkhead*, der durch β -Catenin aktiviert wird (Abb.12), durch den *NvWnt3*-Morpholino um 30% reprimiert wird (Abb.16). Dieser Effekt kann nicht durch eine Verschiebung des Zellschicksals entlang der oral-aboralen Achse erklärt werden, da die aboralen Gene *FGFa1* und *FGFRa1* unbeeinflusst bleiben. Im Gegensatz zu diesen moderaten Effekten des *NvWnt3*-Morpholino in frühen Stadien, treten in über 70% aller injizierten Tiere schwere Defekte auf, da eine Weiterentwicklung zum Primärpolypen durch den Morpholino verhindert wird. Die Tiere bleiben so über mehrere Tage in einem „Dauerblastula“-artigen Zustand, wobei sich jedoch mesenchymales, ungeordnetes Endoderm unter einer komplett bewimperten Ektodermsschicht erkennen lässt (Abb.15). Die kugelrunde Form und das Fehlen eines definierten Wimpernschopfs wie in der Planula deuten auf einen späten Verlust der Achsenspezifikation hin. Dies lässt sich wahrscheinlich durch die Repression von *Forkhead* erklären. Die *Forkhead*-Expression startet bereits in der Blastula, wo sie auf den prospektiven Blastoporus beschränkt ist. In der Gastrula ist *Forkhead* zuerst in der Blastoporuslippe und später im einwandernden Pharynxektoderm lokalisiert. Während in der Planula das Endoderm seine epitheliale Organisation verliert und mehr mesenchymalen Charakter annimmt, ist *Forkhead* dort weiterhin auf zwei parallele Domänen entlang der oral-aboralen Achse beschränkt. Während der Metamorphose zum Primärpolypen formt sich das endodermale Epithel erneut ausgehend von *Forkhead*-Domänen (Fritzenwanker et al., 2007). Dies und die Kolokalisation mit *NvWnt3* im pharyngealen Ektoderm machen *Forkhead* zu einem guten Kandidaten, um den späten Verlust der Achse und die mesenchymale

Organisation des Endoderms teilweise zu erklären (Fritzenwanker et al., 2007; Lee et al., 2006).

Auch die Expression von *Forkhead* in *Hydra* während der Knospung, der Kopfregeneration und im hypostomalen Organisationszentrum weisen auf eine Funktion in der Achsenbildung hin (Martinez et al., 1997). Außerdem werden in Bilateriern die *Forkhead*-Homologe im Organisator und später im Notochord und der ventralen Neuralplatte exprimiert (Ang and Rossant, 1994; Dirksen and Jamrich, 1992; Knöchel et al., 1992; Ruiz i Altaba and Jessell, 1992; Sasaki and Hogan, 1993). Funktionelle Studien mit Null-Mutanten in Mäusen (Cunliffe and Ingham, 1999; McMahon, 1994), sowie Experimente in *Xenopus laevis* (O'Reilly et al., 1995) und der Ascidie *Halocynthia roretzi* (Shimauchi et al., 2001) belegen eine Rolle *Forkheads* für die Mesodermbildung und axiale Musterbildung.

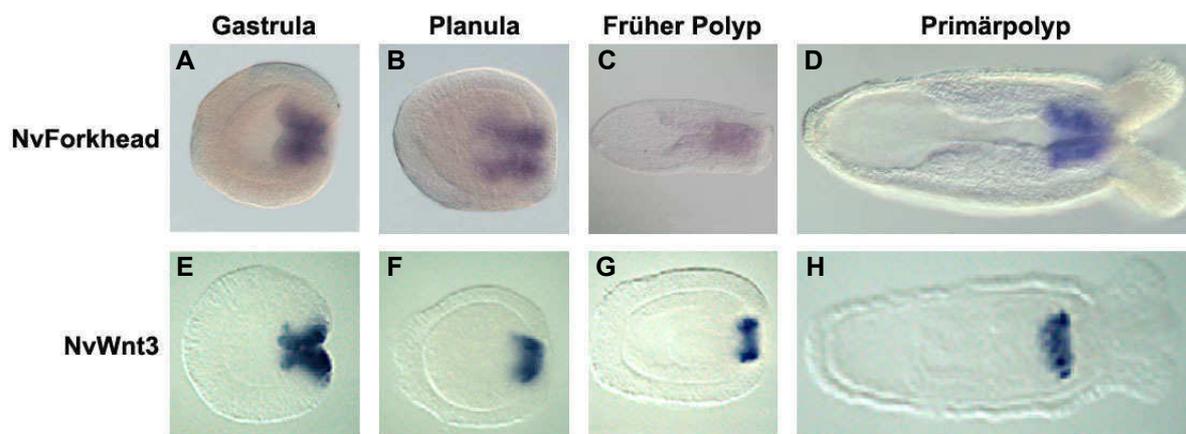


Abb.27 Die *NvWnt3*- und *NvForkhead*-Expression kolokalisieren in der *in situ* Hybridisierung: In der Gastrula werden sowohl *Wnt3* als auch *Forkhead* in der Blastoporuslippe und dem Pharynxektoderm exprimiert (A, E). In der Planula wird *Forkhead* in zwei Streifen im Endoderm entlang der oral-aboralen Achse exprimiert (B), die sich oral mit der *Wnt3*-Domäne überschneiden (F). Während der Metamorphose (C, G) und im Primäpolypen (D, H) werden beide Gene im pharyngalem Ektoderm exprimiert. (Bilder aus Lee et al., 2006 und Fritzenwanker et al., 2007)

Der Einfluss von *Wnt3* auf die Genregulation von *Forkhead* sowie achsenstimulierende Effekte von Alsterpaullone auf metamorphosierende Planularlarven (Guder et al., 2006) sprechen für eine Funktion von *NvWnt3* im kanonischen Signalweg und sie erklären den späten Phänotyp durch *NvWnt3*-Morpholinos. Anders als bei *NvWnt1* bleiben aber Effekte auf weitere Wnt-Zielgene aus. Dies spricht für eine weitaus komplexere Regulation durch Wnt/ β -Catenin im Organisator der Blastoporuslippe, bei der *Wnt3* möglicherweise eine Rolle in der Feinjustierung der Organisatoraktivität hat. In diesem Kontext wären Doppel-

„Knockdowns“ mit verschiedenen *Wnts* interessant, um zu sehen, ob sich synergistische Effekte auf Zielgene ergeben. Eine erste Vorentscheidung für geeignete *NvWnt*-Kandidaten könnte durch Kotransfektionen im TOP-Flash-Assay oder durch Koinjektionen im Achseninduktionsassay in heterologen Systemen mit *NvWnt1* erfolgen.

5.5 Die Expression von *NvWnt11* in der frühen Embryonalentwicklung

Die zeitlich-räumlichen Expressionsmuster von *NvWnt11*, die in dieser Arbeit gefunden wurden (Abb. 18), decken sich nur bedingt mit den bisher bei *in situ*-Hybridisierungsexperimenten beschriebenen Expressionsmustern (Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006). So zeigten Kusserow et al. (2005) bereits eine Expression in frühen Teilungsstadien, die sie ebenfalls durch RT-PCR nachweisen konnten. Wegen des Auftretens in vereinzelt Zellen ab der Blastula wurde eine Beteiligung von *Wnt11* in der Zelltyp-Spezifikation vermutet (Kusserow et al., 2005). Lee et al. (2006) dagegen beschrieben lediglich eine späte Expression von *NvWnt11*, die in Ektodermzellen um den Pharynx der Planula beginnt und sich im Primärpolypen auf das Endoderm der Tentakel verlagert. Die unterschiedlichen Expressionsmuster wurden erwähnt, jedoch nicht kommentiert (Lee et al., 2006).

Trotz der unterschiedlichen Beschreibungen in früheren Publikationen sind die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung aus mehreren Gründen hoch interessant. So konnte *Wnt11* auch in der RT-PCR bereits in unbefruchteten Eiern nachgewiesen werden (Abb. 7 und 8) und die Expression von *Wnt11* am prospektiven Blastoporus und in der invaginierenden Endodermplatte deckt sich mit den Effekten auf die Gastrulation durch die Morpholino vermittelte *Wnt11*-Depletion (Abb. 19).

Die verschiedenen Expressionsmuster lassen sich durch die höhere Sensitivität der PCR-Methode und durch die Verwendung unterschiedlicher Sonden für die *in situ*-Hybridisierung erklären. So ließ sich hier durch eine „Voll-Länge“-RNA-Sonde, die den kompletten kodierenden Bereich von *NvWnt11* abbildet, womöglich eine höhere Sensitivität erzielen.

5.6 Die duale Funktion von *NvWnt11* im kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg

Die Lokalisation von *NvWnt11* am Blastoporus während der Gastrulation und die nachgewiesene nicht-kanonische Funktion in den heterologen Experimenten zur Konstriktion und Elongation von Kellerexplantaten in *Xenopus* Embryonen (Rigo-Watermeier et al., 2011) deuten auf eine Funktion in der Regulation morphogenetischer Bewegungen nahe, wie sie in höheren Bilateriern zu finden ist. Die morphologischen Ergebnisse des *NvWnt11*-„Knockdowns“ stützen diese Interpretation, da es morphologisch zu einer Beeinträchtigung der Gastrulation durch den *NvWnt11*-Morpholino kommt. So bewirken geringe Dosen eine Vergrößerung des Blastoporus, wobei mikroskopisch im gesamten Embryo eine Disorganisation der Zellen auffällt, die sich im Fehlen von Flaschenhalszellen und einer verminderten apiko-basalen Streckung im Ektoderm äußert, wodurch die Zellen eher abgerundet als säulenförmig wie in den Kontrollen erscheinen. Weiterhin fällt auf, dass das Endoderm noch nicht an das Blastocoeldach angeheftet ist (Abb.19). Eine Veränderung in der Zell-Zell-Adhäsion und ein Einfluss auf die Zellmigration könnten zu den beobachteten Phänotypen führen. Die Notwendigkeit einer strikten Regulation der Zell-Zell-Adhäsion während der Gastrulation wurde in mathematischen Experimenten und Computermodellen für *Nematostella* postuliert, in denen erst die Verringerung der Zell-Adhäsion die Bildung von Flaschenhalszellen ermöglicht (Tamulonis et al., 2010). Die Beeinträchtigung der morphogenetischen Bewegungen während der Gastrulation weisen deutlich auf eine Rolle von *Wnt11* im nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalweg hin.

Hohe Dosen des *Wnt11*-Morpholinos blockieren außerdem in etwa einem Drittel aller Embryonen komplett die Invagination (Abb.19), was dazu führt, dass kein sichtbarer Blastoporus zu erkennen ist. Dabei entspricht der Effekt des Morpholinos dem „Knockdown“ des Strabismus-Rezeptors in *Nematostella*, einem Kernelement im Wnt/PCP-Signalweg (Kumburegama et al., 2011). Genauso tritt dieser Effekt jedoch auch nach einer Hemmung des kanonischen Signalwegs durch dominant negatives β -Catenin oder Cadherin auf (Lee et al., 2007; Wikramanayake et al., 2003), wobei zu beachten ist, dass Cadherin nicht nur β -Catenin bindet und damit aus dem cytosolischen Pool nimmt, sondern auch die Zell-Adhäsion über die Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett beeinflusst.

Für eine Beteiligung von *Wnt11* am kanonischen Signalweg spricht die starke Kolokalisation mit einer Vielzahl an Komponenten und Zielgenen des kanonischen Signalwegs wie nukleärem β -Catenin, *Tcf*, *Dishevelled* und *Brachyury* (Wikramanayake et al., 2003; Lee et al., 2006; Lee et al., 2007; Guder et al., 2006).

Bei einer Hemmung des kanonischen Signalwegs durch den *NvWnt11*-Morpholino ist auch eine Repression endodermaler Gene (Lee et al., 2007; Wikramanayake et al., 2003) sowie ein konträrer Effekt zur Behandlung mit Alsterpaullone zu erwarten. Dies scheint der Fall für die klassischen Wnt-Zielgene *Brachyury* und *Chordin* sowie für den Endoderm-Marker *Activin* zu sein (Abb.20). Ebenso lässt sich die Repression von *Chordin* und *Activin* durch die Stabilisierung von β -Catenin mit Alsterpaullone kompensieren (Abb.23). Diese Daten legen nahe, dass *NvWnt11* tatsächlich den kanonischen Signalweg bedient. Dies ist ähnlich zu *Xenopus*, wo *Wnt5* und *-11* als maternale Achsendeterminanten beschrieben wurden (Tao et al., 2005; Cha et al., 2008). Eine ähnliche Funktion wurde auch für *CheWnt3* aus *Clytia hemispherica* (Momose et al., 2008) beschrieben.

Neben der Repression oraler und endodermaler Gene wie *Brachyury*, *Chordin* und *Activin* zeigt sich mit der schwachen Aktivierung des aboralen *FGFa1* ein geringer Einfluss von *Wnt11* auf die oral-aborale Musterung (Abb.20). Zwar wird die Expression von *FGFa1* auch durch den JNK-Inhibitor Sp600125 aktiviert (Abb.14), was für eine Regulation über den Wnt/PCP-Signalweg spricht, jedoch lässt sich die Aktivierung von *FGFa1* durch den *Wnt11*-Morpholino auch durch eine zusätzliche Behandlung mit Alsterpaullone ausgleichen (Abb.23). Möglicherweise ist dies ein sekundärer Effekt, da Alsterpaullone zu einer allgemeinen Verlagerung der Achsenspezifikation zu Gunsten eines oralen Schicksals führt. Es ist also nicht möglich, die Regulation von *FGFa1* eindeutig dem kanonischen oder nicht-kanonischen Signalweg zuzuordnen. Seltsam erscheint auch die Erhöhung der *SnailA*-Transkription durch den Morpholino (Abb.20 und 21), da es sich bei *SnailA* um ein endodermales Gen handelt und für eine Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion durch ein dominant negatives, trunkiertes *Dishevelled*-Konstrukt (*Dsh-Dix*) ein Verlust der Endodermspezifikation sowie der *Snail*-Expression gezeigt wurde (Lee et al., 2007; Kumburegama et al., 2011). Andererseits führt die Behandlung mit Alsterpaullone zu einer starken Repression von *SnailA* (Abb.12). Zwar stehen die Daten für den *Wnt11*-Morpholino im Gegensatz zu den Ergebnissen für die *Dsh-Dix*-Injektion (Lee et al., 2007; Kumburegama et al., 2011), jedoch führt

Dsh-Dix zu einer umfassenderen Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und dadurch zu einer stärkeren Hemmung der Endodermspezifikation. So könnten in *Nematostella* durch *Dsh-Dix* bereits endodermale Gene inhibiert sein, die erst die Expression von *SnailA* ermöglichen. Dies wird weiterhin unterstützt durch die Tatsache, dass für *Snail*-Homologe höherer Bilaterier bislang noch keine direkte Regulation durch β -Catenin gezeigt wurde, sondern *Snail* z.B. durch *Twist* und *Dorsal* in *Drosophila melanogaster* reguliert wird (Leptin et al., 1991). Außerdem wird angenommen, dass in *Nematostella* *Snail* keine Rolle für die endodermale Identität spielt, sondern eher die Zell-Adhäsion und morphogenetische Bewegungen beeinflusst (Patzlaff und Technau, unveröffentlicht). Dies geschieht über eine positive Regulation der *Cadherine* (Patzlaff und Technau, unveröffentlicht), was sich auch in den qRT-Ergebnissen für den *Wnt11*-Morpholino widerspiegelt, in denen der Morpholino die Expression von *Cadherin1* und -2 um das zweieinhalb- bzw. dreifache erhöht (Abb.21).

Die erhöhte *Cadherin*-Expression wirft die Frage auf, ob dies nicht möglicherweise der Grund für die Repression der Wnt-Zielgene ist. So hemmt die Injektion von ektopischen *Cadherin* die Invagination und die Expression von *SnailA* (Lee et al., 2007; Kumburegama et al., 2011). Jedoch ist die Überexpression nicht mit einem um den Faktor 2,5 bis 3 erhöhten Transkriptlevel zu vergleichen, was zwar eine signifikante Erhöhung ist, sich aber verglichen zur Überexpression noch im physiologischen Bereich befindet. Außerdem führt der Morpholino, anders als die *Cadherin*-Überexpression, zu einer erhöhten *SnailA*-Expression. Dadurch lässt sich eine geringe Beteiligung des erhöhten Cadherin-Spiegels an der Genregulation nicht ausschließen, kommt jedoch als alleinige Erklärung nicht in Frage. Genauso wenig kann die Aktivierung von *Cadherin* allein für die morphologischen Effekte des Morpholinos verantwortlich sein, da eine Erhöhung der Zell-Zell-Adhäsion nicht durch die Stabilisierung von β -Catenin kompensiert werden kann (Abb.22).

Zusammenfassend ist von einer dualen Funktion von *Wnt11* im kanonischen wie nicht-kanonischen Wnt-Signalweg auszugehen. Hinweise darauf sind die Induktion endodermaler Gene und allgemein der Einfluss auf die Genregulation respektive die Beeinträchtigung morphogenetischer Prozesse während der Gastrulation. Eine Kopplung kanonischer und nicht-kanonischer Funktionen in *NvWnt11* scheint nicht unwahrscheinlich, da sich sowohl in *NvWnt5* und -11 Motive kanonischer Wnt-Sequenzen finden (Rigo-Watermeier et al., 2011). Darüber hinaus scheinen die nicht-

kanonischen *Wnt*-Gene aus den kanonischen *Wnt*-Genen entstanden zu sein, da bereits im Schwamm *Amphimedon queenslandica* drei *Wnt*-Gene sowie alle Kernkomponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu finden sind (Adamska et al., 2010) und Komponenten des nicht-kanonischen Signalwegs erst in Cnidariern auftreten (Guder et al., 2006; Lee et al., 2006; Kumburegama et al., 2011). Das Vorhandensein von *Wnt*-Genen sowie *Frizzled* und des Korezeptors *LRP* in Schwämmen sowie die späte Entstehung des Korezeptor *Strabismus/Van Gogh* ist wohl für den Übergang von kanonischer Funktion zu nicht-kanonischer Funktion verantwortlich. Möglicherweise handelt es sich bei *NvWnt11* genauso um eine Übergangsform, deren Funktion sich auch erst später in Bilateriern auf den nicht-kanonischen Signalweg beschränkte. Andererseits kann z.B. auch das nicht-kanonische *Wnt5A* aus *Xenopus* im Kontext bestimmter Rezeptoren den Wnt/ β -Catenin-Signalweg stimulieren (He et al., 1997; Umbhauer et al., 2000), wodurch die Entscheidung für den einen oder anderen Signalweg durch die Korezeptoren vermittelt wird.

6 Anhang

6.1 Literatur

Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, Larroux C, Degnan BM (2007): Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning. *PLoS One*. Oct 10;2(10):e1031.

Adamska M, Larroux C, Adamski M, Green K, Lovas E, Koop D, Richards GS, Zwafink C, Degnan BM (2010): Structure and expression of conserved Wnt pathway components in the demosponge *Amphimedon queenslandica*. *Evol Dev*. Sep-Oct;12(5):494-518.

van Amerongen R, Mikels A, Nusse R (2008): Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal*. Sep 2;1(35):re9.

van Amerongen R, Nusse R (2009): Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. Oct;136(19):3205-14.

Ang SL, Rossant J (1994): HNF-3 is essential for notochord formation in mouse development. *Cell*. Aug 26;78(4):561-74.

Ball EE, Hayward DC, Saint R, Miller DJ (2004): A simple plan – cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nat Rev Genet*. Aug;5(8):567-77.

Bejsovec A (2006): Flying at the head of the pack: Wnt biology in *Drosophila*. *Oncogene*. Dec 4;25(57):7442-9.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007): Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*. Jun 15;316(5831):1619-22.

Browne E (1909): The production of new hydrants by the insertion of small grafts. *J. Exp. Zool.* 7, 1-37.

Cartwright P, Halgedahl SL, Hendricks JR, Jarrard RD, Marques AC, Collins AG, Lieberman BS (2007): Exceptionally preserved jellyfishes from the Middle Cambrian. *PLoS One*. Oct 31;2(10):e1121.

Cha SW, Tadjuidje E, White J, Wells J, Mayhew C, Wylie C, Heasman J (2009): Wnt11/5a Complex Formation Caused by Tyrosine Sulfation Increases Canonical Signaling Activity. *Curr Biol*. Sep 29;19(18):1573-80.

Cha SW, Tadjuidje E, Tao Q, Wylie C, Heasman J (2008): Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in *Xenopus* axis formation. *Development*. Nov;135(22):3719-29.

Chiori R, Jager M, Denker E, Wincker P, Da Silva C, Le Guyader H, Manuel M, Queinnec E (2009): Are Hox genes ancestrally involved in axial patterning?

Evidence from the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *PLoS One*. 4(1):e4231.

Christian JL, McMahon JA, McMahon AP, Moon RT (1991): Xwnt-8, a *Xenopus* Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development*. Apr;111(4):1045-55.

Christian JL, Moon RT (1993): Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev*. Jan;7(1):13-28.

Croce JC, McClay DR (2008): Evolution of the Wnt pathways. *Methods Mol Biol*. 469:3-18.

Cui Y, Brown JD, Moon RT, Christian JL (1995): Xwnt-8b: a maternally expressed *Xenopus* Wnt gene with a potential role in establishing the dorsoventral axis. *Development*. Jul;121(7):2177-86.

Cunliffe VT, Ingham PW (1999): Switching on the notochord. *Genes Dev*. Jul 1;13(13):1643-6.

Darling JA, Reitzel AR, Burton PM, Mazza ME, Ryan JF, Sullivan JC, Finnerty JR (2005): Rising starlet: the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Bioessays*. Feb;27(2):211-21.

Dirksen ML, Jamrich M (1992): A novel, activin-inducible, blastopore lip-specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA-binding domain. *Genes Dev*. Apr;6(4):599-608.

Duffy DJ, Plickert G, Kuenzel T, Tilmann W, Frank U (2010): Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in *Hydractinia* metamorphosis and regeneration. *Development*. Sep;137(18):3057-66.

Fritzenwanker JH, Technau U (2002): Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Dev Genes Evol*. Mar;212(2):99-103.

Fritzenwanker JH, Saina M, Technau U (2004): Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial-mesenchymal transitions during embryonic and larval development of *Nematostella vectensis*. *Dev Biol*. Nov 15;275(2):389-402.

Fritzenwanker JH, Genikhovich G, Kraus Y, Technau U (2007): Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Dev Biol*. Oct 15;310(2):264-79.

Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degan BM, Rokhsar DS, Bartel DP (2008): Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. Oct 30;455(7217):1193-7.

Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein TW (2006): The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene*. Dec 4;25(57):7450-60.

- Guder C, Pinho S, Nacak TG, Schmidt HA, Hobmayer B, Niehrs C, Holstein TW (2006):** An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Development*. Mar;133(5):901-11.
- Hand C, Uhlinger KR (1992):** The culture, sexual and asexual reproduction, and growth of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Biol. Bull. Apr*;182, 169-176.
- He X, Saint-Jeannet JP, Wang Y, Nathans J, Dawid I, Varmus H (1997):** A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science*. Mar 14;275(5306):1652-4.
- Heslip TR, Theisen H, Walker H, Marsh JL (1997):** Shaggy and dishevelled exert opposite effects on Wingless and Decapentaplegic expression and on positional identity in imaginal discs. *Development*. Mar;124(5):1069-78.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW (2000):** WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature*. Sep 14;407(6801):186-9.
- Knöchel S, Lef J, Clement J, Klocke B, Hille S, Koster M, Knöchel W (1992):** Activin A induced expression of a fork head related gene in posterior chordamesoderm (notochord) of *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev*. Aug;38(2):157-65.
- Kohn AD, Moon RT (2005):** Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*. Sep-Oct;38(3-4):439-46.
- Kortschak RD, Samuel G, Saint R, Miller DJ (2003):** EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr Biol*. Dec 16;13(24):2190-5.
- Kozopas KM, Samos CH, Nusse R (1998):** DWnt-2, a *Drosophila* Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate. *Genes Dev*. Apr 15;12(8):1155-65.
- Kraus Y, Fritzenwanker JH, Genikhovich G, Technau U (2007):** The blastoporal organiser of a sea anemone. *Curr Biol*. Oct 23;17(20):R874-6.
- Ku M, Melton DA (1993):** Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development*. Dec;119(4):1161-73.
- Kühl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT (2000):** Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem*. Apr 28;275(17):12701-11.
- Kumburegama S, Wijesena N, Xu R, Wikramanayake AH (2011):** Strabismus-mediated primary archenteron invagination is uncoupled from Wnt/SZ-catenin-dependent endoderm cell fate specification in *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria): implications for the evolution of gastrulation. *Evodevo*. Jan 21;2(1):2.

- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW (2005):** Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*. Jan 13;433(7022):156-60.
- Landesman Y, Sokol SY (1997):** Xwnt-2b is a novel axis-inducing *Xenopus* Wnt, which is expressed in embryonic brain. *Mech Dev*. May;63(2):199-209.
- Lee PN, Kumburegama S, Marlow HQ, Martindale MQ, Wikramanayake AH (2007):** Asymmetric developmental potential along the animal–vegetal axis in the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled. *Dev Biol*. Oct 1;310(1):169-86.
- Lee PN, Pang K, Matus DQ, Martindale MQ (2006):** A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Semin Cell Dev Biol*. Apr;17(2):157-67.
- Lengfeld T, Watanabe H, Simakov O, Lindgens D, Gee L, Law L, Schmidt HA, Özbek S, Bode H, Holstein TW (2009):** Multiple Wnts involved in *Hydra* organizer formation and regeneration. *Dev Biol*. Jun 1;330(1):186-99.
- Leptin M (1991):** Twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev*. Sep;5(9):1568-76.
- Li F, Chong ZZ, Maiese K (2005):** Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res*. Oct;2(4):331-40.
- Llimargas M, Lawrence PA (2001):** Seven Wnt homologues in *Drosophila*: a case study of the developing tracheae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 4;98(25):14487-92.
- Logan CY, Nusse R (2004):** The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*.;20:781-810.
- Martinez DE, Dirksen ML, Bode PM, Jamrich M, Steele RE, Bode HR (1997):** Budhead, a Fork Head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in *Hydra*. *Dev Biol*. Dec 15;192(2):523-36.
- Matus DQ, Pang K, Marlow H, Dunn CW, Thomsen GH, Martindale MQ (2006):** Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 25;103(30):11195-200.
- Matus DQ, Thomsen GH, Martindale MQ (2006):** Dorso/ventral genes are asymmetrically expressed and involved in germ-layer demarcation during cnidarian gastrulation. *Curr Biol*. Mar 7;16(5):499-505.
- McMahon AP (1994):** Mouse development. Winged-helix in axial patterning. *Curr Biol*. Oct 1;4(10):903-6.

- McMahon AP, Moon RT (1989):** Ectopic expression of the protooncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*. Sep 22;58(6):1075-84.
- Mikels AJ, Nusse R (2006):** Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. Apr;4(4):e115.
- Miller DJ, Ball EE, Technau U (2005):** Cnidarians and ancestral genetic complexity in the animal kingdom. *Trends Genet*. Oct;21(10):536-9.
- Miller JR (2002):** The Wnts. *Genome Biol*.;3(1):REVIEWS3001.
- Momose T, Derelle R, Houliston E (2008):** A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development*. Jun;135(12):2105-13.
- Momose T, Houliston E (2007):** Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo. *PLoS Biol*. Apr;5(4):e70.
- Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J, Fraser S (1993):** Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development*. Sep;119(1):97-111.
- Nakamura Y, Tsiairis CD, Özbek S, Holstein TW (2011):** Autoregulatory and repressive inputs localize Hydra Wnt3 to the head organizer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 31;108(22):9137-42.
- Nusse R, Varmus HE (1982):** Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. Nov;31(1):99-109.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980):** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. Oct 30;287(5785):795-801.
- O'Reilly MA, Smith JC, Cunliffe V (1995):** Patterning of the mesoderm in *Xenopus*: dose-dependent and synergistic effects of Brachyury and Pintallavis. *Development*. May;121(5):1351-9.
- Philipp I, Aufschnaiter R, Oezbek S, Pontasch S, Jenewein M, Watanabe H, Rentzsch F, Holstein TW, Hobmayer B (2009):** Canonical and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan *Hydra*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 17;106(11):4290-5.
- Plickert G, Jacoby V, Frank U, Müller WA, Mokady O (2006):** Wnt signaling in hydroid development: formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning. *Dev Biol*. Oct 15;298(2):368-78.
- Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV, Jurka J, Genikhovich G, Grigoriev IV, Lucas SM, Steele RE, Finnerty JR, Technau U, Martindale MQ, Rokhsar DS**

- (2007):** Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*. Jul 6;317(5834):86-94.
- Rentzsch F, Anton R, Saina M, Hammerschmidt M, Holstein TW, Technau U (2006):** Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning. *Dev Biol*. Aug 15;296(2):375-87.
- Rigo-Watermeier T, Kraft B, Ritthaler M, Walkkamm V, Holstein T, Wedlich D (2011):** Functional conservation of *Nematostella* Wnts in canonical and noncanonical Wnt-signaling. *Biology Open*. 000, 1–10 im Druck
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987):** The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. Aug 14;50(4):649-57.
- Ruiz i Altaba A, Jessell TM (1992):** *Pintallavis*, a gene expressed in the organizer and midline cells of frog embryos: involvement in the development of the neural axis. *Development*. Sep;116(1):81-93.
- Sasaki H, Hogan BLM (1993):** Differential expression of multiple forkhead related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development*. May;118(1):47-59.
- Schambony A, Wedlich D (2007):** Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell*. May;12(5):779-92.
- Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT (1999):** Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-independent manner. *Curr Biol*. Jul 1;9(13):695-8.
- Shimauchi Y, Chiba S, Satoh N (2001):** Synergistic action of HNF-3 and Brachyury in the notochord differentiation of ascidian embryos. *Int J Dev Biol*. Jun;45(4):643-52.
- Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM (2010):** Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell*. Dec 23;143(7):1136-48.
- Tada M, Smith JC (2000):** *Xwnt11* is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development*. May;127(10):2227-38.
- Tamulonis C, Postma M, Marlow HQ, Magie CR, de Jong J, Kaandorp J (2010):** A cell-based model of *Nematostella vectensis* gastrulation including bottle cell formation, invagination and zippering. *Dev Biol*. Mar 1;351(1):217-28.
- Tao Q, Yokota C, Puck H, Kofron M, Birsoy B, Yan D, Asashima M, Wylie CC, Lin X, Heasman J (2005):** Maternal *wnt11* activates the canonical wnt signaling

pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. Mar 25;120(6):857-71.

Technau U, Steele RE (2011): Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development*. Apr;138(8):1447-58.

Umbhauer M, Djiane A, Goisset C, Penzo-Méndez A, Riou JF, Boucaut JC, Shi DL (2000): The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J*. Sep 15;19(18):4944-54..

Weaver C, Kimelman D (2004): Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*. *Development*. Aug;131(15):3491-9.

Wikramanayake AH, Hong M, Lee PN, Pang K, Byrum CA, Bince JM, Xu R, Martindale MQ (2003): An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature*. Nov 27;426(6965):446-50.

Wolda SL, Moody CJ, Moon RT (1993): Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol*. Jan;155(1):46-57.

Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994): Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol*. Sep;14(9):6278-86.

6.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas W. Holstein für die Möglichkeit, unter seiner Betreuung an einem interessanten und wirklich sehr vielseitigen Thema arbeiten zu dürfen. Dank seiner Unterstützung war es mir möglich, das Beste aus meiner Arbeit herauszuholen und sie endlich erfolgreich abzuschließen. Die Betreuung der Banyuls-Praktika sowie die dortigen Gipfel-Wanderungen bleiben unvergessen.

Bei Prof. Dr. Herbert Steinbeisser möchte ich mich herzlich bedanken für die Übernahme des Zweitreferates und seinen unkomplizierten fachlichen Beistand, auch ohne Termin.

Vielen Dank an Suat, Hiroshi, Mihaela, Anne und Barbara für viele Ratschläge, Tipps und Kniffe und ihr offenes Ohr zu jeder Zeit.

Für die Unterstützung, die angenehme, humorvolle Atmosphäre im Labor und außerhalb bin ich allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der AG-Holstein und Leuten, die ich durch die Arbeit kennenlernen durfte, sehr dankbar. Ihr seid zu zahlreich, um euch alle namentlich zu erwähnen. Ich bin froh, viele von Euch meine Freunde nennen zu können.

Tausend Dank an Dich, Sylvia, dass Du das Auf und Ab meiner Doktorarbeit schon seit einer gefühlten Ewigkeit mitmachst und einfach für mich da bist. 2012 wird super! Ono kurumalach.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung und das Korrekturlesen, aber vor allem ihrem Glauben an mich und den starken Rückhalt, den sie mir in schlechten Zeiten gaben.

6.3 Lebenslauf

persönliche Daten

Martin Ritthaler

* 02.02.1979
in Heidelberg

Auf der Gans 23
70374 Stuttgart

Familienstand:

ledig

Staatsangehörigkeit:

deutsch

Studium

Seit Februar 2006

Promotion an der Universität Heidelberg
Centre for Organismal Studies (COS) Heidelberg
Abteilung Molekulare Evolution und Genomik
Thema der Arbeit: „Funktionelle Konservierung der Wnt-
Liganden in *Nematostella vectensis*,“

2004-2005

Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe
Institut für Zoologie II
Thema der Arbeit: „Funktionelle Charakterisierung des
neuen Lef/Tcf-Bindepartners Hic-5“

2002

Vordiplom im Fach Biologie

1999-2005

Studium der Biologie an der Technischen Universität
Karlsruhe

Schulische Ausbildung

1989-1998 Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium, Stuttgart

1985-1989 Grundschule Sommerrain, Stuttgart

Publikationen

Ghogomu SM, van Venrooy S, Ritthaler M, Wedlich D, Gradi D (2006): HIC-5 is a novel repressor of lymphoid enhancer factor/T-cell factor-driven transcription. *J Biol Chem.* Jan 20;281(3):1755-64.

Rigo-Watermeier T, Kraft B, Ritthaler M, Wallkamm V, Holstein T, Wedlich D (2011): Functional conservation of Nematostella Wnts in canonical and noncanonical Wnt-signaling. *Biology Open.* 000, 1–10 im Druck