

Naomi Sophie Stierle
Dr. med.

Investigating the Role of Evi in Mouse Embryo Mesoderm Segmentation

Fach/ Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Michael Boutros

Ein wesentliches Merkmal der Embryonalentwicklung ist die enge zeitliche und räumliche Koordination von Zellen. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel hiervon ist die Entstehung von Somiten aus dem präsomitischen Mesoderm, aus dem sich schließlich der metamerische Aufbau der Wirbelsäule ergibt. Auf molekularer Ebene wird die Strukturierung des präsomitischen Mesoderms von einem komplexen System von Signalgradienten, oszillierender Genaktivität und Zellsynchronisation koordiniert.

Einer der essentiellen Signalwege der Somitogenese ist der Wnt/ β - Catenin Signalweg, dessen Aktivität im präsomitischen Mesoderm entlang der anteroposterioren Achse gradiert ist. Während die funktionelle Bedeutung des Wnt/ β - Catenin Signalwegs in diesem Zusammenhang bereits nachgewiesen wurde, bleibt die Frage offen, wie der Wnt Gradient überhaupt erst entsteht. Insbesondere ist in diesem Gewebe ungeklärt, welche Rolle die Sekretion des Wnt Liganden spielt und wie Zellen mittels Wnt kommunizieren.

Ein Ansatz zur Beantwortung dieser Fragen besteht in der experimentellen Manipulation von Evi. Evi ist ein unerlässliches Protein der Wnt Sekretionsmaschinerie, welches Wnt Liganden vom Golgi- Apparat zur Plasmamembran eskortiert. Da Evi nicht- redundant ist und für die Sekretion aller bekannten Wnt Liganden (außer eines *Drosophila* Wnt Liganden) benötigt wird, verhindert sein konditionelles Gen- Knockout die Sekretion aller Wnt Liganden im Zielgewebe, während gleichzeitig die Fähigkeit der Zellen auf Wnt Signale zu reagieren erhalten bleibt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle von Evi in der Segmentierung des präsomitischen Mesoderms genau zu charakterisieren, um Evi möglicherweise als Ansatzpunkt für die Adressierung oben genannter Fragen einzusetzen.

Zu diesem Zweck habe ich zunächst untersucht, ob Evi im postimplantations Mausembryo (Entwicklungstag 8.5- 10.5) und insbesondere im präsomitischen Mesoderm exprimiert wird. Hierbei zeigte sich, dass *Evi* mRNA Transkripte in den Somiten und im präsomitischen Mesoderm in von posterior nach anterior absteigender Konzentration vorhanden sind. Das Expressionsmuster der *Evi* mRNA innerhalb des Mausembryos deckt sich mit bekannten Stellen hoher Wnt Signalaktivität und ähnelt jenem von Wnt- Zielgenen. Dies lässt vermuten, dass *Evi* selbst ein transkriptionelles Zielgen des Wnt Signalweges sein könnte.

Um herauszufinden ob Evi für die Somitogenese erforderlich ist, setzte ich ein konditionelles Gen- Knockout ein, welches es ermöglicht Evi speziell in Zellen mesodermalen Ursprungs auszuschalten. Die hieraus resultierenden Mutanten, genannt T- *Evi*^{CKO}, zeigten ab dem achten Tag der Embryonalentwicklung eine eingeschränkte Ausbildung der anteroposterioren Körperachse, ein verformtes Neuralrohr und Defekte in der Segmentierung, wodurch sie Wnt Funktionsverlustmutanten ähneln. Weiterhin habe ich die T- *Evi*^{CKO} Mutante mittels mRNA- *in situ*- Hybridisierung auf molekularer Ebene untersucht. Hierbei ergab sich eine starke

Abschwächung der Expression von Wnt-Zielgenen, ein Aussetzen gradierter Aktivität des Wnt Signalwegs im präsomitischen Mesoderm sowie die unregelmässige Expression von Polarisationsmarkern der Somiten. Die Analyse des Effekts der T- Evi^{CKO} Mutation auf die Expression von *lunatic fringe*, einem zyklisch exprimierten Gen der Segmentierungsuhr, zeigte, dass diese mit steigendem Alter der Mutanten zunehmend unregelmässiger wurde.

Um die unmittelbaren Effekte der Mutation auf die Dynamik der Segmentierungsuhr zu untersuchen, setzte ich einen genetisch kodierten Fluoreszenzreporter für *lunatic fringe* in Kombination mit Echtzeit- Bildgebung ein. Am Embryonaltag achteinhalb untersuchte Mutanten zeigten Oszillationen der Segmentierungsuhr, welche ich mittels Echtzeit Bildgebung quantifizieren konnte. Diese Oszillationen erloschen schließlich jedoch in allen analysierten Mutanten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Evi im präsomitischen Mesoderm exprimiert wird, eine unverzichtbare Rolle in dessen Entstehung und Segmentierung spielt und für die Funktion der Segmentierungsuhr unabdingbar ist. Meine Ergebnisse bezüglich der kritischen Funktion von Evi während der Somitogenese in Verbindung mit einer etablierten Methode für die Beobachtung des Beginns des Phänotyps in Echtzeit, könnten die Grundlage neuer experimenteller Ansätze bilden, um grundlegende Fragen bezüglich der Rolle der Wnt Sekretion in der Somitogenese und der interzellulären Kommunikation mittels Wnt im präsomitischen Mesoderm zu beantworten.