

FUNKTIONELLE ANALYSE VON DICKKOPF IM SEEIGEL
STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Wirtschaftsbiochemiker
Alexander Kühn

aus Berlin



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

April, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Analyse des Vertebratengenoms von Herrn Prof. Dr. Hans Lehrach am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Lehrach
Abt. Analyse des Vertebratengenoms
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Claudia Miech
FB Biologie, Chemie und Pharmazie
Freie Universität Berlin

Disputation am:

meiner Liebe

Euch find ich, Euch allein mit jenem Reiz umfängen,
Der stets von neuem weckt ein nimmermüd Verlangen.

M. Proust, Die Gefangene

Danksagung

Für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in seiner Abteilung des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik sowie deren Begutachtung möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans Lehrach danken. Frau Prof. Dr. Claudia Miech, die sich so kurzfristig zur Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit bereit erklärt hat, möchte ich ebenfalls danken.

Für die Betreuung während der PhD-Zeit, die inspirierenden Diskussionen und kritischen Anregungen möchte ich Dr. Albert Poustka und Dr. Georgia Panopoulou herzlichst danken. Ohne ihre fachliche Hilfe wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Für die angenehme Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft während meiner PhD-Zeit möchte ich weiterhin allen Mitgliedern und Ehemaligen meiner Arbeitsgruppe danken: Lena Braun, Udo Georgi, Christian Hoffmann, Dr. Andrew Hufton, Susanne Mathia, Dimitra Nousdili, Jana Taencyk und Vesna Weise. Danken möchte ich meinen Kollegen im Stazione Zoologica Napoli, die mir das Injizieren von Seeigeleiern und etliche andere Tipps im Umgang mit Seeiegeln zeigten sowie meine in Neapel verbrachte Zeit unvergesslich gemacht haben: Rossella Annunziata, Dr. Maria Arnone, Francesca Rizzo, Montserrat Serra und Paola Squarzoni.

Des Weiteren danke ich den vielen mehr oder weniger netten Kolleginnen und Kollegen am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, insbesondere der Abteilung LH. Sie haben meinen Aufenthalt an diesem Institut zu einer wunderbaren Zeit in meinem Leben gemacht. Ich hoffe, wir werden auch weiterhin noch viele feuchtfröhliche Abende/Nächte miteinander verbringen.

Außerdem danke ich meinen unzähligen Freunden außerhalb des Instituts, deren namentliche Erwähnung den Rahmen bei Weitem sprengen würde. Viele von ihnen begleiten mich schon etliche Jahre meines Lebens. Ohne sie (und Alkohol) wäre es oftmals unmöglich gewesen, den Stress und die Misserfolge im Labor zu bewältigen. Besonderer Dank gilt auch den fleißigen und unermüdlichen Korrekturlese-Sklaven. Ich hoffe, ihr habt etwas gelernt und seid nun ebensolche Seeigel-Experten wie ich einer bin.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir mit ihrer Unterstützung und ihrem grenzenlosen Vertrauen nach zwei Studiengängen noch das Leben eines PhD-Studenten ermöglicht haben. Nicht unerwähnt bleiben soll auch meine Zwillingsschwester, die noch immer der Mensch ist, der mich schon am längsten auf dieser Welt ertragen muss. Dies wird wohl auch immer so bleiben.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
SYMBOLVERZEICHNIS	XIV
ZUSAMMENFASSUNG	XV
ABSTRACT	XVI
1. EINLEITUNG	1
1.1 DER SEEIGEL	1
1.1.1 Der Seeigel als Modellorganismus	1
1.1.2 Embryogenese des Seeigels	4
1.2 MOLEKULARE ORGANISATOREN	7
1.2.1 Der Spemann-Organisator	7
1.2.2 Der Kopfororganisator Dickkopf	9
1.3 DER WNT-SIGNALWEG	12
1.3.1 Allgemeines	12
1.3.2 Der kanonische Wnt-Signalweg	13
1.3.3 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege	14
1.3.4 Regulation des Wnt-Signalwegs durch Dkk1	15
1.3.5 Der Wnt-Signalweg und die Endomesoderm-Entwicklung	16
1.4 DAS SEROTONERGE SYSTEM	19
1.4.1 Allgemeines	19
1.4.2 Die Rolle von Serotonin während der Embryogenese	21
1.4.3 Bildung von serotonergen Zellen im Seeigelembryo	22
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
2. MATERIAL	25
2.1 CHEMIKALIEN, ENZYME UND DNA/RNA-LÄNGENMARKER	25
2.2 KITS, PUFFER UND MEDIEN	28
2.3 VEKTOREN UND ZELLEN	30
2.4 ANTIKÖRPER	31
2.5 OLIGONUKLEOTIDE	31
2.5.1 DNA-Oligonukleotide	31
2.5.2 Morpholino-Oligonukleotide	34
2.6 GERÄTE UND ZUBEHÖR	35

3. METHODEN	37
3.1 ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE METHODEN	37
3.1.1 Haltung der Seeigel	37
3.1.2 Embryonengewinnung	37
3.1.3 Kultivierung von Seeigelembryonen	37
3.1.4 Mikroinjektion von Seeigeleiern	38
3.1.5 Fixierung der Embryonen	39
3.1.6 Haltung und Zucht des Zebrafärblings	40
3.1.7 Mikroinjektion von Zebrafärblingsembryonen	40
3.1.8 Screening der injizierten Zebrafärblingsembryonen	41
3.2 MIKROBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	41
3.2.1 Bakterienkulturen	41
3.2.2 Herstellung elektrokompenter Zellen	42
3.2.3 Transformation von Plasmiden	42
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	43
3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	43
3.3.2 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	45
3.3.3 Gelelektrophorese und Quantifizierung von DNA/RNA	46
3.3.4 Restriktionsverdau	46
3.3.5 Reverse und <i>in vitro</i> Transkription	47
3.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
3.3.7 Sequenzierung	52
3.3.8 Klonierung	53
3.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	55
3.4.1 Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung (WISH)	55
3.4.2 Doppel-WISH	56
3.4.3 Immunohistochemie	57
3.4.4 Simultane WISH und Immunohistochemie	57
3.5 BIOINFORMATISCHE METHODEN	58
3.5.1 Phylogenetische Analyse	58

4. ERGEBNISSE	59
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER DICKKOPF-GENE	59
4.1.1 Analyse der Dickkopf-Proteinsequenzen	59
4.1.2 Phylogenetische Analyse der Dickkopf-Gene	60
4.1.3 Expressionsmuster und -profile der Dickkopf-Gene	62
4.2 FUNKTIONSANALYSE VON <i>SPDKK1</i>	64
4.2.1 Regulation von <i>SpDkk1</i> durch Lithium und Zink	64
4.2.2 Überexpressions- und Depletionsexperimente	65
4.3 SPDKK1 UND DER WNT/ β -CATENIN-SIGNALWEG	71
4.4 SPDKK1 UND DAS ENDOMESODERM-GRN	74
4.4.1 Regulation der Kernel-Gene durch <i>SpDkk1</i>	74
4.4.2 <i>SpDkk1</i> und die Endomesoderm-Spezifizierung	75
4.4.3 <i>SpDkk1</i> und der Delta/Notch-Signalweg	77
4.5 REGULATION VON NERVENZELLEN DURCH SPDKK1	78
4.5.1 Expression von Serotonin	78
4.5.2 Regulation serotonerger Zellen durch <i>SpDkk1</i>	80
4.5.3 Expression und Regulation von SynaptotagminB	83
4.6 SPDKK1 UND DAS APIKALE EKTODERM	84
4.6.1 Identifizierung weiterer apikal exprimierter Gene	84
4.6.2 Regulation serotonerger Zellen durch verschiedene Gene	94
4.6.3 GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen	97
4.7 ANALYSE DES SPDKK1-PROMOTORS	106
5. DISKUSSION	109
5.1 IDENTIFIZIERUNG UND EVOLUTION DER DICKKOPF-GENE	109
5.2 EXPRESSION DER DICKKOPF-GENE	111
5.3 FUNKTION VON SPDKK1	114
5.3.1 <i>SpDkk1</i> und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg	114
5.3.2 <i>SpDkk1</i> und das Endomesoderm-GRN	116
5.4 DIE DICKKOPF-GENE UND DAS NERVENSYSTEM	120
5.4.1 Expression von Serotonin und SynaptotagminB	120
5.4.2 Regulation der Nervenzellen durch die Dickkopf-Gene	122

5.5 DAS APIKALE EKTODERM	126
5.5.1 Identifizierung apikal exprimierter Gene	126
5.5.2 Regulation der Bildung von serotonergen Zellen	129
5.5.3 GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen	132
5.6 REGULATION VON SPDKK1	135
5.7 AUSBLICK	137
6. LITERATURVERZEICHNIS	141
7. ANHANG	161
7.1 PROTEINSEQUENZEN UND DATENBANK-ZUGRIFFSNUMMERN	161
7.2 KLON-LISTE FÜR WISH-SONDEN / SEQUENZ-IDs	161
7.3 qPCR-DATEN	162
7.4 PROMOTOR-SEQUENZEN	171
LEBENS LAUF	XVII
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: „Isolations- und Transplantationsexperimente von Hörstadius.“	2
Abb. 2: „Phylogenetische Stellung des Seeigels innerhalb der <i>Bilateria</i> .“	3
Abb. 3: „Embryonalentwicklung des Seeigels.“	5
Abb. 4: „Territorien sowie deren Entstehung während der Embryogenese.“	7
Abb. 5: „Wirkmechanismus des Organisators.“	8
Abb. 6: „Funktion von Dkk1 in verschiedenen Organismen.“	10
Abb. 7: „Schematische Darstellung der alternativen Wnt-Signalwege.“	12
Abb. 8: „Regulation der Wnt-Signalwege durch Dkk1.“	15
Abb. 9: „Bedeutung von β -Catenin für die Embryonalentwicklung.“	17
Abb. 10: „Das Endomesoderm-GRN und die Kernel-Gene.“	18
Abb. 11: „Biosynthese von Serotonin.“	20
Abb. 12: „Verbindung zwischen dem Wnt- und dem Nodal-Signalweg.“	22
Abb. 13: „Struktureller Aufbau der Dickkopf-Proteine.“	59
Abb. 14: „Phylogenetischer Stammbaum der Dickkopf-Proteine.“	61
Abb. 15: „Expression von <i>SpDkk1</i> .“	62
Abb. 16: „Expression von <i>SpDkk3</i> .“	63
Abb. 17: „Expression von <i>SpDkk1</i> in Li- bzw. Zn-behandelten Embryonen.“	64
Abb. 18: „Funktion von <i>SpDkk1</i> ermittelt durch Perturbationsexperimente.“	66
Abb. 19: „Expression verschiedener endomesodermaler Markergene.“	67
Abb. 20: „Expression verschiedener ektodermaler Markergene.“	68
Abb. 21: „Regulation diverser Markergene durch <i>SpDkk1</i> -MASO-Injektion.“	69
Abb. 22: „Regulation diverser Markergene durch <i>SpDkk1</i> -mRNA-Injektion.“	70
Abb. 23: „ <i>SpDkk1</i> und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.“	72
Abb. 24: „ <i>SpDkk1</i> ist Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.“	73
Abb. 25: „Regulation der Kernel-Gene durch <i>SpDkk1</i> und Cadherin.“	74
Abb. 26: „Regulation endomesodermaler Gene durch <i>SpDkk1</i> .“	76
Abb. 27: „Expression und Funktion von <i>SpNotch</i> “	77
Abb. 28: „Nachweis von serotonergen Zellen.“	78
Abb. 29: „Expression von <i>SpAadc</i> und <i>SpTph</i> .“	79
Abb. 30: „Kokalisation von Serotonin und <i>SpAadc</i> bzw. <i>SpTph</i> .“	79
Abb. 31: „Serotonin und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.“	81
Abb. 32: „Nachweis von Serotonin in <i>SpDkk1</i> -MASO-injizierten Embryonen.“	81

Abb. 33: „Nachweis von Serotonin in <i>SpDkk1</i> -mRNA-injizierten Embryonen.“	82
Abb. 34: „Nachweis von SynaptotagminB-positiven Zellen.“	83
Abb. 35: „Expression von <i>SpAlx</i> .“	84
Abb. 36: „Expression von <i>SpFez</i> .“	85
Abb. 37: „Expression von <i>SpFoxJ1</i> .“	86
Abb. 38: „Expression von <i>SpFoxQ2</i> .“	87
Abb. 39: „Expression von <i>SpGlass</i> .“	87
Abb. 40: „Expression von <i>SpHes</i> .“	88
Abb. 41: „Expression von <i>SpHnf6</i> .“	89
Abb. 42: „Expression von <i>SpMox</i> .“	90
Abb. 43: „Expression von <i>SpNkx2.1</i> .“	90
Abb. 44: „Expression von <i>SpPax2</i> .“	91
Abb. 45: „Expression von <i>SpProx1</i> .“	92
Abb. 46: „Expression von <i>SpSix3</i> .“	93
Abb. 47: „Expression von <i>Sp-sFrp1/5</i> .“	93
Abb. 48: „Einfluss von <i>SpDkk3</i> - und <i>Sp-sFrp1/5</i> auf serotonerge Zellen.“	95
Abb. 49: „Serotonin-Nachweis in unterschiedlich perturbierten Embryonen.“	96
Abb. 50: „Regulation von <i>SpAadc</i> und <i>SpTph</i> .“	97
Abb. 51: „Regulation apikal exprimierter Gene durch <i>SpDkk1</i> .“	98
Abb. 52: „Regulation apikal exprimierter Gene durch <i>SpDkk3</i> .“	99
Abb. 53: „Regulation apikal exprimierter Gene durch <i>Sp-sFrp1/5</i> .“	99
Abb. 54: „Regulation apikal exprimierter Gene durch <i>SpFoxQ2</i> .“	100
Abb. 55: „Regulation apikal exprimierter Gene durch <i>SpGlass</i> .“	101
Abb. 56: „Regulation apikal exprimierter Gene durch <i>SpMox</i> .“	101
Abb. 57: „Kokalisation von <i>SpTph</i> und verschiedenen Genen.“	102
Abb. 58: „Kokalisation von <i>SpFoxQ2</i> und verschiedenen Genen.“	103
Abb. 59: „GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen.“	105
Abb. 60: „Vergleich der Promotorbereiche von <i>DrDkk1</i> und <i>SpDkk1</i> .“	106
Abb. 61: „Expression des <i>DrDkk1</i> - und <i>SpDkk1</i> -Promotorbereichs.“	107
Abb. 62: „Expression der <i>DrDkk1</i> - und <i>SpDkk1</i> -Deletionskonstrukte.“	108

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
aiRNA	(engl.) anti-intron antisense RNA
AP	alkalische Phosphatase
BAC	(engl.) bacterial artificial chromosome
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BMP	(engl.) bone morphogenetic protein
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CIP	(engl.) calf Intestine alkaline phosphatase
dd	zweifach destilliert (engl. double distilled)
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	(engl.) fibroblast growth factor
FLU	Fluorescein
GRN	Genregulatorisches Netzwerk
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
LB	Luria Bertani
LEF	(engl.) lymphocyte enhancer factor-1
LMP	(engl.) low melting point
LPA	lineares Polyacrylamid
LRP5/6	(engl.) low density lipoprotein receptor-related protein 5/6
MASO	(engl.) morpholino-antisense substituted oligo nucleotide
MOE	(engl.) messenger RNA overexpression

MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NBT	4-Nitro-Blue-Tetrazolium
NJ	(engl.) neighbour joining
OD	optische Dichte
PABA	p-Aminobenzosäure (engl. p-aminobenzoic acid)
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung-Tween20 (engl. phosphate buffered saline-Tween20)
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PMC	primäre Mesenchymzelle (engl. primary mesenchyme cell)
POD	Peroxidase
qPCR	Quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodiumdodecylsulfate)
SMC	sekundäre Mesenchymzelle (engl. secondary mesenchyme cell)
TAE	TRIS- Acetat-EDTA
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung-Tween20 (engl. TRIS buffered saline-Tween20)
TCF	(engl.) T-cell factor
TE	TRIS-EDTA
TGF	(engl.) transforming growth factor
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Tyramid-Signalamplifikation
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen in Volumen
w/v	Gewicht in Volumen (engl. weight per volume)
WISH	(engl.) whole-mount <i>in situ</i> hybridisation
X-Gal	Bromo-4-Chlor-indoxyl- β -D-galactosid

Symbolverzeichnis

ΔC_T	Gegen den C_T -Wert von <i>SpUbiquitin</i> normalisierte C_T -Wert eines Gens
$\Delta\Delta C_T$	Differenz der normalisierten C_T -Werte zweier Gene
C_T	Schwellenwert-Zyklus (engl. cycle threshold)
n	Absolute Transkriptzahl eines Gens
R	Verhältnis des Expressionslevels eines Gens und dem von <i>SpZ12-1</i>
T_m	Schmelztemperatur

Zusammenfassung

In Vertebraten ist das *Dkk1*-Gen notwendig für die Kopfinduktion durch den Spemann'schen Organisator. Dabei beruht die induzierende Eigenschaft auf der Fähigkeit von *Dkk1*, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu inhibieren. Daneben existieren in Vertebraten noch drei weitere Dickkopf-Gene, deren Funktionen aber weitestgehend unbekannt sind. Wie die Sequenzierung des Seeigelgenoms gezeigt hat, besitzt der Seeigel zwei Dickkopf-Gene (*SpDkk1* und *SpDkk3*), über deren Funktionen aber bislang noch nichts bekannt ist. Lediglich das Expressionsmuster von *SpDkk1* ist bekannt und deutet darauf hin, dass *SpDkk1* an der Endomesoderm-Differenzierung sowie an der Bildung des apikalen Ektoderms beteiligt ist.

In dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Analysen belegen, dass die beiden bei der Genomanalyse identifizierten Dickkopf-Gene tatsächlich Mitglieder der Dickkopf-Familie sind. Außerdem wurde gezeigt, dass es sich bei diesen beiden Genen um die Ursprungsgene handelt, aus denen sich durch Genomduplikationen die weiteren Mitglieder der Vertebraten-Dickkopf-Gene entwickelt haben.

Des Weiteren konnte durch Überexpression und Depletion von *SpDkk1* bzw. *SpDkk3* sowie durch Promotoranalysen von *SpDkk1* gezeigt werden, dass *Dkk1* auch im Seeigel ein Inhibitor und zugleich ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. Aufgrund dieser Fähigkeit fungiert es als Regulator der Kernel-Gene und wirkt dadurch auf die Endomesoderm-Differenzierung des Seeigelembryos. Darüber hinaus ist *Dkk1* wie auch *Dkk3* an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt.

In einem WISH Screen wurden zudem 13 weitere Gene identifiziert, die während der Embryogenese im apikalen Ektoderm exprimiert werden. Unter ihnen befinden sich drei, die spezifisch in serotonergen Zellen exprimiert sind. Durch verschiedene Perturbations-experimente und anschließende qPCR-Analysen wurde ein GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen erstellt. Dabei zeigte sich, dass sich *Dkk1* an der Spitze dieses GRN befindet und durch Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren erheblichen Einfluss auf die Bildung von serotonergen Zellen hat. Auch *Dkk3* ist an der Regulation von serotonergen Zellen beteiligt, allerdings ist dessen Einfluss innerhalb des GRN auf eine kleinere Anzahl von Genen begrenzt.

Dies zeigt, dass *Dkk1* bereits im Seeigel ein wichtiges Organisator-Molekül ist, das in der Endomesoderm-Differenzierung und der Neurogenese involviert ist. Außerdem ist nicht nur seine Eigenschaft zur Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs evolutionär konserviert, sondern auch die Fähigkeit, anteriore Strukturen zu induzieren.

Abstract

In vertebrates the Dkk1 gene is necessary for head induction by the Spemann organizer. The inductive capacity is based on the ability of the Dkk1 protein to inhibit the wnt/ β -catenin signaling pathway. Furthermore there are three additional dickkopf genes in vertebrates, whose functions are still unknown. As shown by genome sequencing, two different dickkopf genes exist in the sea urchin genome (*SpDkk1* and *SpDkk3*). Neither the functions of these are known so far. Only the expression pattern of *SpDkk1* is available and indicates that *SpDkk1* is involved in the differentiation of the endomesoderm and the formation of the apical ectoderm.

The phylogenetic analysis performed for this thesis revealed that both identified sea urchin dickkopf genes are indeed members of the dickkopf family and that they are the ancestor genes from which the different vertebrate dickkopf genes were evolved by genome duplications.

Furthermore gain-of-function and loss-of-function studies of *SpDkk1* and *SpDkk3* as well as promoter analysis of *SpDkk1* demonstrate that also sea urchin Dkk1 is an inhibitor of the

wnt/ β -catenin signaling pathway and a target of this pathway at the same time. Due to this ability Dkk1 acts as a regulator of the kernel genes and thereby affects the endomesoderm differentiation of the sea urchin embryo. Apart from that Dkk1 as well as Dkk3 participate in the formation of serotonergic cells.

In a WISH screen 13 other genes were identified, which are expressed in the apical ectoderm during sea urchin embryogenesis. Among them are three genes, which are specifically expressed in serotonergic cells. By different genetic perturbation experiments followed by qPCR analysis a GRN for the apical ectoderm and serotonergic cells was generated. Thus it appears that Dkk1 acts at the top of the GRN for the apical ectoderm and serotonergic cells and that Dkk1 has an important influence on the formation of serotonergic cells by regulating several transcription factors. Also Dkk3 is involved in the regulation of serotonergic cells, but its influence is limited to only a few genes.

Overall the results showed that already in the sea urchin Dkk1 is an important organizer molecule that participates in the differentiation of endomesoderm and neurogenesis. It is not only its ability to inhibit the wnt/ β -catenin signaling pathway which is evolutionary conserved, but also its ability to induce anterior structures.

1. Einleitung

1.1 Der Seeigel

1.1.1 Der Seeigel als Modellorganismus

Der Seeigel ist bereits seit mehr als hundert Jahren ein begehrtes Studienobjekt. Bereits 1876 zeigte Oskar Hertwig den Vorgang der Befruchtung beginnend mit der Fusion von Spermien und Eizellen an ihnen auf (Hertwig, 1876). Isolationsexperimente von Hans Driesch zeigten, dass noch eine einzelne Zelle des 4-Zell-Stadiums fähig ist, eine komplette Larve auszubilden (Driesch, 1891). Damit wurde zum ersten Mal Regulation während der Embryonalentwicklung beschrieben. Wenig später bewies Theodor Boveri an mit zwei Spermien befruchteten Seeigeleiern, dass die Chromosomen Träger der Erbinformationen sind (Boveri, 1908). Besondere Bedeutung hatten die Experimente von Sven Hörstadius (Abb. 1). Er trennte verschiedene Lagen des Seeigelembryos und beobachtete deren weitere Entwicklung. Seine Beobachtungen lieferten die ersten Beweise für einen vegetalisierenden Gradienten, der im unbefruchteten Ei seinen Ursprung hat und für die Ausbildung der embryonalen Achsen verantwortlich ist (Hörstadius, 1939). Zudem sind durch lineage tracing-Experimente die Schicksale vieler Zellen während der Embryonalentwicklung aufgeklärt worden (Abb. 1, B; Cameron *et al.*, 1987; siehe Kapitel 1.1.2). Neben der historisch bedingt gut erforschten Embryonalentwicklung des Seeigels, sind es vor allem laborpraktische Gründe, die den Seeigel zu einem beliebten Modellorganismus gemacht haben.

Zum einen sind nahezu unbegrenzte Mengen an Material verfügbar. Seeigel können in großer Zahl aus dem Meer gefischt werden und über längere Zeit in Aquarien gehalten werden. Durch Elektroschock oder Injektion von KCl können sie dann zu jeder Zeit künstlich zur Ei- bzw. Spermienabgabe gebracht werden. Dabei laichen Weibchen bis zu 50 Millionen Eier auf einmal ab. Diese können zeitgleich befruchtet und synchron zur Entwicklung gebracht werden. Das macht die Isolierung praktischer unbegrenzter Mengen an RNA zu jedem erdenklichen Zeitpunkt der Entwicklung bis zur Pluteus-Larve möglich. Ebenso ist die Präparation großer Mengen von Protein möglich, wodurch diese in nativer Form biochemisch analysiert werden können. Zum anderen ermöglicht die absolute Transparenz der Embryonen deren genaue Beobachtung während der Embryonalentwicklung. Seeigelembryonen sind daher hervorragend dazu geeignet, die zeitliche und räumliche Expression von Genen durch whole mount *in situ* Hybridisierung (WISH) zu untersuchen und Zellmigrationen wie z.B. während der

Gastrulationsvorgänge (Hardin, 1996) durch Einsatz fluoreszierender Farbstoffe am lebenden Organismus zu beobachten (Arnone *et al.*, 1997). So lassen sich auch *cis*-regulatorische Kontrollelemente durch Injektion von Reportergenkonstrukten in Eizellen untersuchen (Makabe *et al.*, 1995) sowie funktionelle Genanalysen durch mRNA-Überexpression (MOE) mittels Injektion von synthetischer mRNA bzw. durch Knock-Down mittels Injektion von spezifischen antisense-Morpholino-Oligonukleotiden (MASO) durchführen (Howard *et al.*, 2001). Durch die einfache Handhabung der Embryonen ist weiterhin die Möglichkeit unzähliger Manipulationen der Embryonen gewährleistet. So können einzelne Mikromere (Fink, 1985), primäre Mesenchymzellen (PMCs) (Ettensohn, 1987), Ektoderm und Endoderm (McClay&Marchase, 1979) im großen Stil isoliert werden. Zudem sind durch unzählige leicht durchführbare operative Methoden, wie das Hinzufügen überzähliger Zellen zum Embryo (Wray&McClay, 1988) oder die Mikromanipulation von einzelnen Blastomeren, weitere Möglichkeiten gegeben, um entwicklungsbiologischen Fragestellungen nachzugehen.

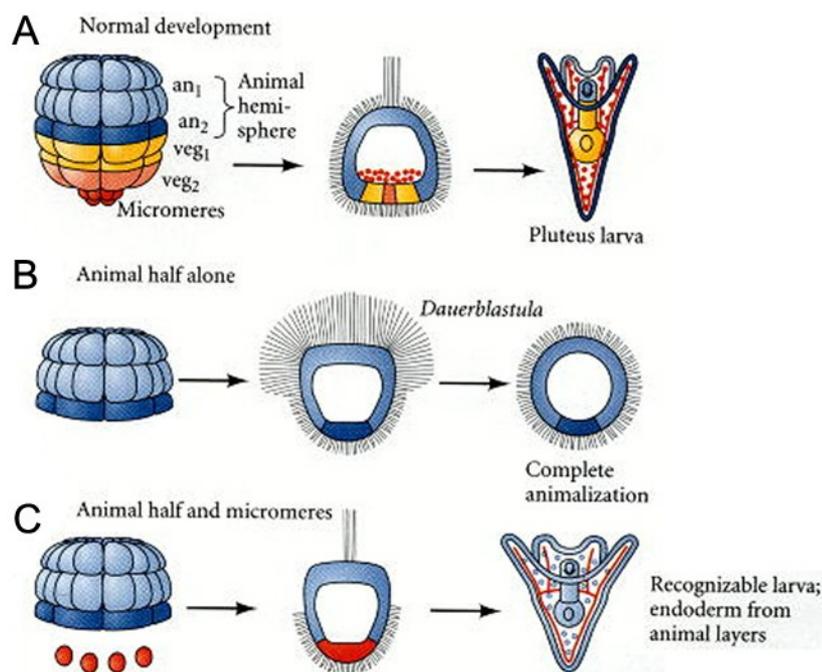


Abb. 1: „Isolations- und Transplantationsexperimente von Hörstadius.“

Die Mikromeren besitzen induzierende Eigenschaften (A-C, Gilbert, 2003): Ein 64-Zell-Embryo entwickelt eine Blastula und später eine Pluteus-Larve, dabei können Ektoderm, Mesoderm und Endoderm unterschieden werden (A). Eine isolierte animale Hälfte entwickelt keine Pluteus-Larve, sondern eine Dauerblastula, die lediglich aus Ektoderm besteht (B). Transplantiert man Mikromere an die animale Hälfte, so wird eine normale Pluteus-Larve gebildet (C).

Weiterhin sind mannigfaltige Manipulationen mit Chemikalien möglich. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Manipulationen haben Behandlungen mit Chemikalien den

Vorteil, dass sich durch einfache Zugabe der entsprechenden Chemikalie in das Seewasser eine große Anzahl von Embryonen gleichzeitig perturbieren lässt. So lässt sich die Gastrulation durch Kultivierung der Seeigelembryonen in β -Aminopropionitril-haltigen Seewasser inhibieren (Wessel, 1987), durch Zugabe von NiCl_2 erreicht man die Inhibition der Expression dorsal-spezifischer Gene (Hardin *et al.*, 1992) und durch Behandlung mit SDS zwingt man die Seeigelembryonen zur Exogastrulation (Coffman&McClay, 1990). Besonders gut verstanden sind die Behandlungen mit Lithium und Zink. Während Lithium die vegetal-animale-Differenzierung durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs und damit die Bildung von Endomesoderm auf Kosten des Ektoderms verstärkt (Ghiglione *et al.*, 1993; Poustka *et al.*, 2007; siehe Kapitel 1.3.2 und 1.3.5), führt die Behandlung mit Zink zu animalisierten Embryonen. Bei diesen Embryonen wird die Endomesoderm-Differenzierung komplett blockiert. Lediglich die Bildung von PMCs bleibt unberührt (Nemer, 1986; Poustka *et al.*, 2007; Shepherd *et al.*, 1983). Eine weitere Eigenschaft von Zink ist die Fähigkeit zur Induktion der Differenzierung von serotonergen Zellen im Seeigelembryo (Poustka *et al.*, 2007; siehe Kapitel 1.4.3). Ein Nachteil des Seeigelsystems ist jedoch, dass aufgrund der langen Generationszeiten keine genetischen Untersuchungen wie Mutantanalyse möglich sind.

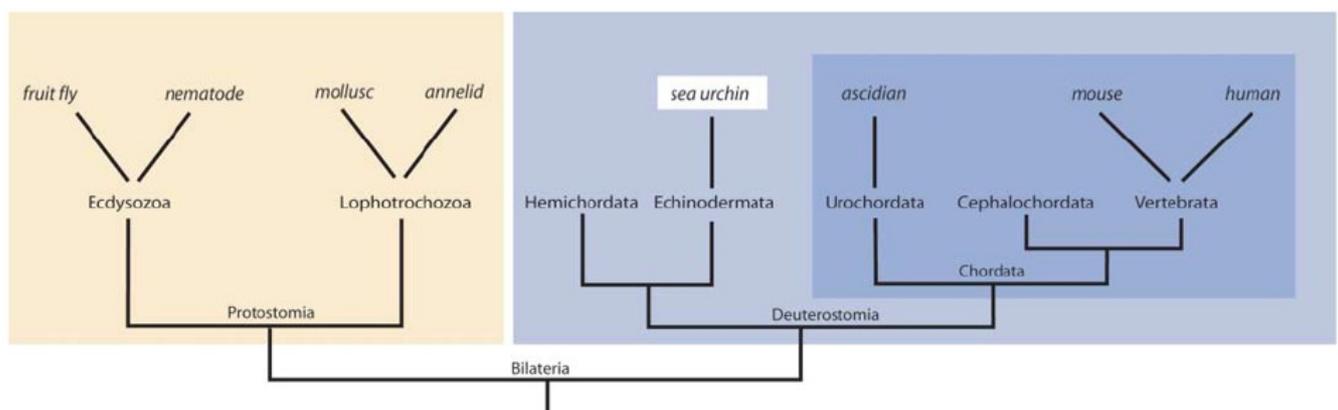


Abb. 2: „Phylogenetische Stellung des Seeigels innerhalb der *Bilateria*.“

Der Seeigel gehört zum Stamm der *Echinodermata*. Diese bilden zusammen mit den *Chordata* und *Hemichordata* innerhalb der *Bilateria* den Überstamm der *Deuterostomia* (Sodergren *et al.*, 2006).

Des Weiteren ist der Seeigel aufgrund seiner phylogenetischen Stellung als Modellorganismus interessant. Als Echinodermaten haben sie während der Embryonalentwicklung viele Merkmale, wie z.B. die Entstehung des larvalen Mundes (siehe Kapitel 1.1.2), mit den Chordaten gemeinsam. Daher wird angenommen, dass die Echinodermaten, obwohl sie zu den Invertebraten zählen, mit den Chordaten von

einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Zusammen mit den Chordaten und Hemichordaten gehören sie daher zum Überstamm der *Deuterostomia* (Abb. 2; Turbeville *et al.*, 1994) und sind damit dem Menschen deutlich näher verwandt als etwa die Fruchtfliege oder der Fadenwurm. Somit kann der Seeigel als Organismus betrachtet werden, der dem Prototyp eines Vorläufers der *Deuterostomia* sehr nahe kommt, und man nimmt daher an, dass alle Gene der Vertebraten auch im Seeigel identifiziert werden können (Davidson *et al.*, 1995; Holland, 1988; Poustka *et al.*, 2003). Zudem ist das Genom des Seeigels nicht von den Genomduplikationen betroffen, die im Laufe der Evolution der Vertebraten stattgefunden haben (Sidow, 1996). Obwohl sich die Aufgaben dieser duplizierten, orthologen Gene während der Evolution geändert haben, scheint ihre Grundfunktion erhalten worden zu sein, d.h. ein Transkriptionsfaktor im Menschen ist auch im Seeigel einer. Das Erforschen der Grundfunktionen von Genen im Seeigel liefert demnach erste Erkenntnisse der Vorgänge auch in menschlichen Zellen, insbesondere bei der Untersuchung von Vorgängen während der frühen Embryonalentwicklung (Miklos *et al.*, 1996). Neue Möglichkeiten wurden zudem durch die Entzifferung des Genoms des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* eröffnet. So wurden unter den etwa 23000 im Genom des Seeigels identifizierten Genen viele Gene ausgemacht, die bisher nur in Vertebraten bekannt waren, unter ihnen auch einige Gene, die beim Menschen als Auslöser von Krankheiten bekannt sind. Auch bei den für die Wahrnehmung zuständigen Genen wurden viele unerwartete Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Seeigel gefunden. Des Weiteren hat die Genom-Sequenzierung gezeigt, dass die Seeigel ein erstaunlich komplexes Immunsystem besitzen. Sie verfügen über ein riesiges Arsenal von Abwehrkörpern, um Eindringlinge unschädlich zu machen. Von diesem Fund erhofft man sich nun neue Möglichkeiten zur Bekämpfung von Krankheitserregern und neuen antibiotischen Wirkstoffen (Sodergren *et al.*, 2006).

1.1.2 Embryogenese des Seeigels

Das Ei des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* hat einen Durchmesser von etwa 80 µm, ist asymmetrisch und weist eine Polarität auf. Die gegenüberliegenden Pole werden als animaler und vegetaler Pol bezeichnet (Abb. 3, A). Zudem ist es dotterarm, wobei der Dotter gleichmäßig verteilt ist (isolecithal). Wie für Echinodermaten üblich, weist der Seeigel radial-holoblastische Furchungsteilungen auf. Die ersten Teilungen folgen schnell aufeinander ohne wesentliche Änderung des Gesamtvolumens. Dabei liegen die ersten beiden

Teilungsebenen meridional zur animal-vegetalen Achse und sind rechtwinklig zueinander, so dass vier gleich große Blastomere entstehen (Abb. 3, B). Die dritte Zellteilung verläuft äquatorial und bildet ein vegetales und ein animales Quartett von Zellen (Abb. 3, C). Bei der vierten Zellteilung teilen sich die animalen Blastomere meridional und bilden acht gleichgroße Zellen, die Mesomere. Die vegetalen Blastomere hingegen teilen sich ungleichmäßig und horizontal. Dabei entstehen vier große, die Makromere, und vier kleine Zellen, die Mikromere (Abb. 3, D). Damit spiegelt sich die Polarität der Eizelle in der unterschiedlichen Größe der Furchungszellen wider. Bei der fünften Furchung teilen sich die acht Mesomeren äquatorial in zwei animale Ringe, an₁ und an₂. Die vier Makromere teilen sich meridional und formen einen Ring von acht Makromeren unterhalb von an₂. Die Mikromere teilen sich asymmetrisch in einen Ring großer Mikromere unterhalb der Makromere und einen Ring kleiner Mikromere, der am vegetalen Pol des Embryos lokalisiert ist (Abb. 3, E). Bei der sechsten Furchung teilen sich alle Zellen äquatorial

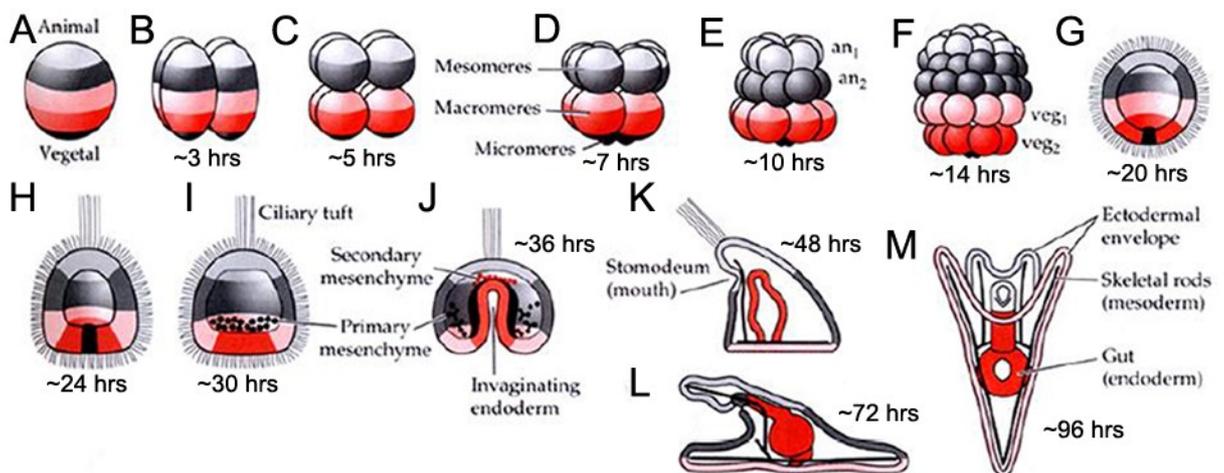


Abb. 3: „Embryonalentwicklung des Seeigels.“

Schematische Darstellung verschiedener Stadien der Embryogenese des Seeigels (A-M, Gilbert 1994): Eizelle (A), Cleavage-Stadien (B-F), Blastula-Stadien (G-I), Gastrula-Stadium (J), Prism-Larve (K) und Pluteus-Larve (L+M). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-L) bzw. ventrale Ansicht (M).

und bilden den 64-Zell-Embryo. Die fünf dabei zu unterscheidenden Ringe von Zellen bestehen aus aus 16 an₁- und 16 an₂-Zellen, den von den Makromeren stammenden acht veg₁- und acht veg₂-Zellen sowie den 16 Mikromeren (Abb. 3, F). Durch die nächste meridionale Teilung entsteht eine Hohlkugel, die Blastula. Sie besteht aus einer einzelligen Schicht um ein zentrales Blastocoel und ist an der Oberfläche mit Cilien besetzt (Abb. 3, G). Mit Hilfe der Cilien beginnt der Embryo zu rotieren, und er synthetisiert das sogenannte hatching enzyme, das den Verdau der Befruchtungs-

membran ermöglicht. Der Embryo schlüpft und ist fortan freischwimmend. Am animalen Pol wird ein Büschel von langen Cilien, das sogenannte apical tuft, gebildet. Es ist das vordere Ende des schwimmenden Embryos. Des Weiteren elongieren die Zellen an der vegetalen Seite, der Embryo flacht am vegetalen Pol ab und bildet die Vegetalplatte (Abb. 3, H). Die Mikromere im Zentrum der Vegetalplatte beginnen in das Blastocoel einzuwandern und bilden die PMCs. Damit ist 24 Stunden nach der Befruchtung das Mesenchymblastula-Stadium erreicht (Abb. 3, I). Mit dem Invaginieren der Zellen der Vegetalplatte in das Blastocoel beginnt die Gastrulation und die Bildung des Archenterons (Urdarm). Die Öffnung des Archenteron am vegetalen Bereich wird Blastoporus genannt. Die PMCs haben sich in einem Ring um den Archenteron angeordnet. Während der Elongation zum animalen Pol wandern vom Archenteron aus die sekundären Mesenchymzellen (SMCs) aus dessen Spitze. Am Ende der Gastrulation flacht die orale Seite des Embryos ab, das Archenteron beugt sich zu dieser und formt den larvalen Mund. Zudem hat sich der Urdarm in Ösophagus, Darm und Magen gegliedert sowie durch seitliche Ausstülpungen die larvalen Coelomsäckchen geformt. Die Prism-Larve ist gebildet (Abb. 3, K). Drei Tage nach der Befruchtung ist dann die Pluteus-Larve entstanden. Sie besitzt zwei lange postorale und zwei kurze anterolaterale Arme, die aus den ektodermalen Epithelien gewachsen sind (Abb. 3, L+M). Im weiteren Verlauf werden weitere Arme und Cilien geformt, bis die achtarmige, freischwimmende und fressende Larve gebildet ist. Anschließend kommt es zur Metamorphose, während der im Inneren der Larve drastische Umgestaltungen stattfinden. Während die Organe der Larve nach und nach zurückgebildet werden, entwickeln sich die Strukturen und Organe des adulten Seeigels. Unter anderem beginnt sich das Echinus-Rudiment, durch die Fusion von invaginiertem Ektoderm mit dem anterioren Teil des linken Coeloms (Hydrocoel) zu bilden und die linke Seite der Pluteus-Larve wird zur zukünftigen Oralseite des pentamer radiärsymmetrischen adulten Tieres (Smith *et al.*, 2008). Nach etwa drei Jahren ist der Seeigel geschlechtsreif und kann sich fortpflanzen (Czihak, 1975).

Bereits im 128-Zellen-Blastula-Stadium (Abb. 3, F) sind im Wesentlichen alle Territorien des Embryos gebildet (Davidson *et al.*, 1998): das aborale (dorsale) und das orale (ventrale) Ektoderm - getrennt durch das Cilienband, die Vegetalplatte (Endomesoderm), die PMCs, die kleinen Mikromeren und das Endoderm (Abb. 4, A). Zudem sind durch lineage tracing mittels Injektion fluoreszenter Farbstoffe viele Details über die Herkunft einzelner Zellen der späteren Pluteus-Larve bekannt (Cameron *et al.*, 1987). So entwickeln sich aus den Zellen der animalen Hälfte (an1 und an2)

später die Zellen des aboralen und oralen Ektoderms sowie neuronale Zellen (Abb. 4, B). Die veg1- und die veg2-Schicht hingegen steuern Zellen für das Ektoderm und das Endomesoderm bei. Das Endomesoderm setzt sich aus den PMCs, die später die

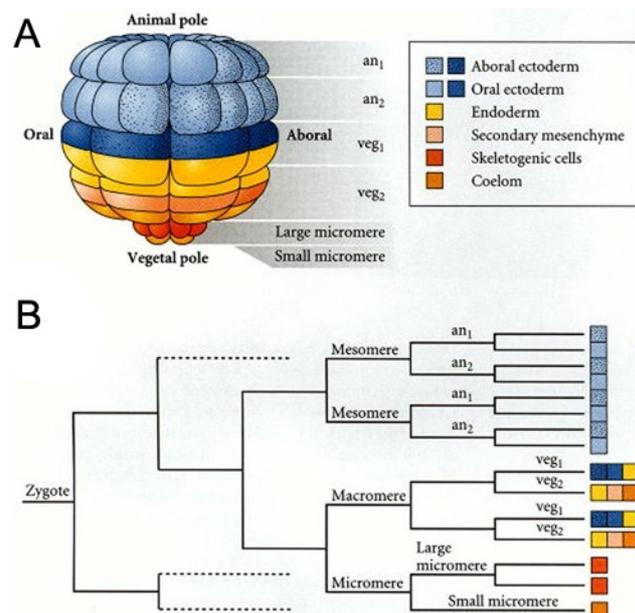


Abb. 4: „Territorien sowie deren Entstehung während der Embryogenese.“

Bereits im frühen Blastulastadium sind im Wesentlichen alle Territorien des Embryos gebildet (A, Gilbert, 2003): orales und aborales Ektoderm (blau), Endoderm (gelb), sekundäre Mesenchymzellen (rosa), primäre Mesenchymzellen (dunkelorange) und Coelomzellen (orange). Die einzelnen Zellschicksale während der Embryonalentwicklung des Seeigels sind von der Eizelle bis zum 64-Zell-Stadium detailliert untersucht (B, Gilbert, 2003).

Skelettzellen bilden, und Zellen der Vegetalplatte, aus der sich die SMCs und die Darmzellen entwickeln, zusammen. Aus den kleinen Mikromeren sowie einigen Zellen der Vegetalplatte werden in der weiteren Embryonalentwicklung die Coelomsäckchen gebildet (Abb. 4, B).

1.2 Molekulare Organisatoren

1.2.1 Der Spemann-Organisator

Eine zentrale Frage der Entwicklungsbiologie der Wirbeltiere befasst sich mit der Anlage der embryonalen Achsen, d.h. Kopf-Schwanz- (anterior-posterior) und Rücken-Bauch- (dorsal-ventral) Achse. Hierbei spielt der sogenannte Spemann-Organisator eine herausragende Rolle. Bereits in den Zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnten Hans Spemann und Hilde Mangold durch Transplantationsexperimente zeigen, dass eine kleine Region im sich entwickelnden Embryo für die Induktion der Körperachse essentiell ist (Spemann&Mangold, 1924).

Sie transplantierten verschiedene Bereiche einer frühen Gastrula in das ventrale Ektoderm einer anderen Gastrula (Abb. 5, A). Mit Ausnahme der Urmundlippe entwickelten sich die verschiedenen Bereiche gemäß ihrer neuen Umgebung zur Epidermis. Die Urmundlippe hingegen verhielt sich weiterhin nicht nur wie eine Urmundlippe, sondern initiierte auch die Gastrulation und Embryogenese des umliegenden Gewebes (Abb. 5, B) und führte zur Entwicklung eines zweiten Embryos, Kopf an Kopf mit dem ersten. (Abb. 5, C). Der transplantierte Organisator ist demnach in der Lage, in einem Embryo einen kompletten sekundären Embryo zu induzieren und somit die Achsenanlagen zu duplizieren. Weiterführende Arbeiten zeigten, dass es regionale Unterschiede innerhalb der Urmundlippe gibt. So führt die Transplantation

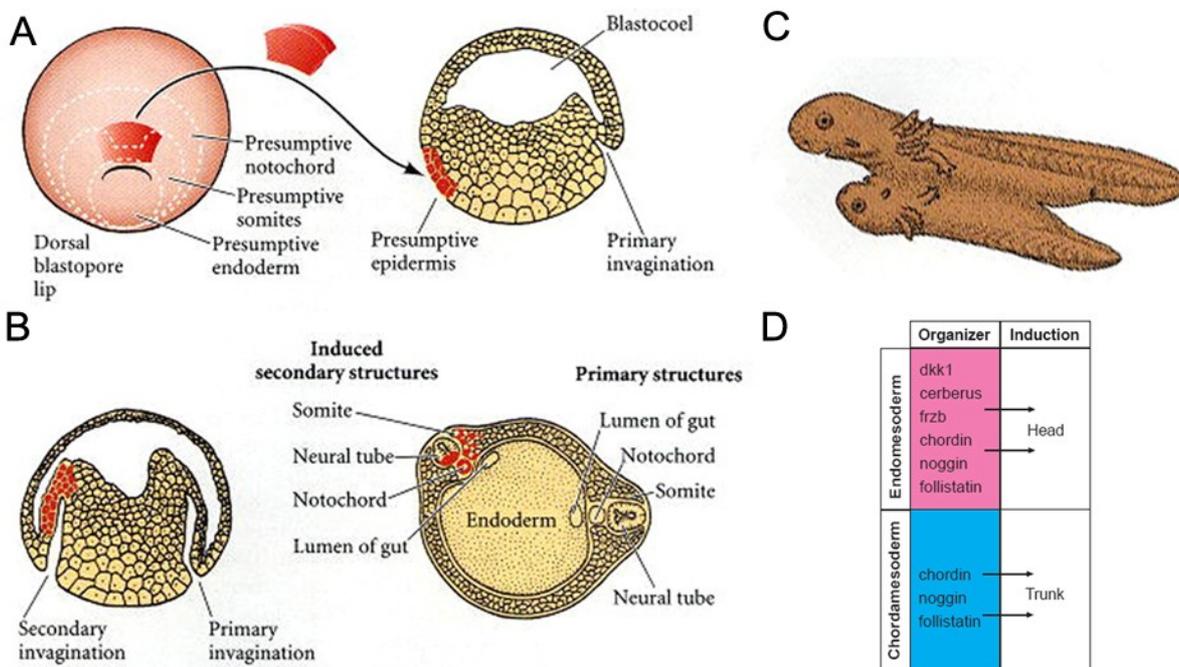


Abb. 5: „Wirkmechanismus des Organisators.“

Transplantationsexperiment von Spemann (A-C, Gilbert, 2000): Die Urmundlippe einer frühen Gastrula wird in die Region, die normalerweise ventrales Ektoderm bildet, einer zweiten Gastrula transplantiert (A). Das transplantierte Gewebe invaginiert, bildet einen zweiten Archenteron (B) und später eine komplette zweite Körperachse (C). Arbeiten auf molekularer Ebene haben gezeigt, dass der Organisator Proteine sezerniert, die für die Bildung von Kopf- bzw. Rumpfstrukturen verantwortlich sind (D, Niehrs *et al.*, 2001).

einer bestimmten Region der Urmundlippe (das Endomesoderm, das später die Prechordalplatte bildet) zur Bildung von Kopfstrukturen, während die Transplantation einer anderen Region der Urmundlippe, das Chordamesoderm, zur Induzierung von Rumpfstrukturen führt (Mangold, 1933; Spemann, 1931). Mittlerweile sind Organisatorbereiche auch in anderen Vertebraten wie Huhn (Izpisua-Belmonte *et al.*,

1993), Maus (Beddington, 1994) und Zebrafisch (Shih&Fraser, 1996) gefunden und die Transplantationsexperimente von Spemann und Mangold in diesen Modellorganismen (Pera&Kessel, 1997; Thomas&Beddington, 1996; Zoltewicz&Gerhart, 1997) verifiziert worden. Mittlerweile wird die Wirkungsweise des Organisators auch auf molekularer Ebene verstanden. Ein wichtiger Schritt war dabei die Identifizierung von Goosecoid, einem spezifisch im Organisatorgewebe exprimierten Transkriptionsfaktor (Cho *et al.*, 1991), der zum ersten Mal die Visualisierung des Organisators ermöglichte. In der Folge wurden noch weitere Transkriptionsfaktoren im Organisator entdeckt, und es wurde klar, dass der Spemann-Organisator aus einer Vielzahl verschiedener Zellen zusammengesetzt ist, die von einer Unmenge von Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden. Unter anderem regulieren diese auch die Produktion verschiedener sezernierter Proteine, wie Frzb-1 (Leysn *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997), Cerberus (Piccolo *et al.*, 1999) oder Chordin (Piccolo *et al.*, 1996), die die induzierende Aktivität des Organisators vermitteln (de Robertis *et al.*, 1997; Harland&Gerhart, 1997; Nieto, 1999). Weiterführende Arbeiten an diesen sezernierten Proteinen haben gezeigt, dass sie wirksame Inhibitoren von zwei wichtigen Signalwegen sind: dem BMP- bzw. dem Wnt-Signalweg (siehe Kapitel 1.3). Diese Signalwege sorgen neben anderen dafür, dass aus einer befruchteten Eizelle ein lebensfähiger Organismus entsteht, der aus hoch spezialisierten Geweben und Organen besteht, indem sie die Differenzierung, Wachstum und Position der embryonalen Zellen koordinieren (Brivanlou&Darnell Jr., 2002). Dabei stellte sich heraus, dass der zentrale molekulare Wirkmechanismus der Rumpfinduktion in Amphibien die Inhibition des BMP-Signalwegs ist (Harland&Gerhart, 1997), während zur Induktion von Kopfstrukturen daneben noch die Inhibition des Wnt-Signalwegs nötig ist (Abb. 5, D; Niehrs *et al.*, 2001).

1.2.2 Der Kopforganisor Dickkopf

Dkk1 ist erstmals in *Xenopus* als sezerniertes Protein identifiziert worden, das notwendig und auch ausreichend für die Induktion der Kopfbildung ist. In der frühen Gastrula eines *Xenopus*-Embryos ist Dkk1 im Spemann Organisor exprimiert und später in der prospektiven Prächordalplatte. Wird die Funktion des Dkk1-Proteins in *Xenopus*-Embryonen blockiert, entwickeln diese keine Köpfe bzw. zeigen Microcephalie (Abb. 6, A). Eine Überexpression von Dkk1 hingegen führt zu Embryonen mit verkürzten Rumpfen und vergrößerten Köpfen (Glinka *et al.*, 1998). Später wurde in Zebrafisch- und Mausembryonen gezeigt, dass auch in diesen

Dkk1 im Speman Organisator exprimiert ist (del Barco Barrantes *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2000; Shinya *et al.*, 2000) und ebenfalls essentiell für die Bildung von Kopfstrukturen ist (Abb. 6, B+C). Zudem zeigen Expressionstudien in Mäusen, dass Dkk1 in der späten Embryonalentwicklung an der Entwicklung von Extremitäten und Zähnen beteiligt ist (Grotewold *et al.*, 1999; Monaghan *et al.*, 1999). Wie außerdem Promotorstudien gezeigt haben, kann die Expression von Dkk1 durch p53 induziert werden. Dkk1 ist demnach an der Tumorsuppression durch p53 beteiligt (Wang *et al.*, 2000). Zudem verstärkt genotoxischer Stress, induziert durch UV oder chemotherapeutische Reagenzien, ebenfalls die Expression von Dkk1 (Shou *et al.*, 2002). Durch weitere funktionelle Studien konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Dkk1, die Bildung von Kopfstrukturen zu induzieren, darauf beruht, dass Dkk1 als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungiert (Fedi *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; Krupnik *et al.*, 1999; siehe Kapitel 1.3.4). Zudem ist Dkk1 nicht nur ein wirksamer Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, sondern auch Zielgen dieses Signalwegs (Chamorro *et al.*, 2005; Niida *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2000).

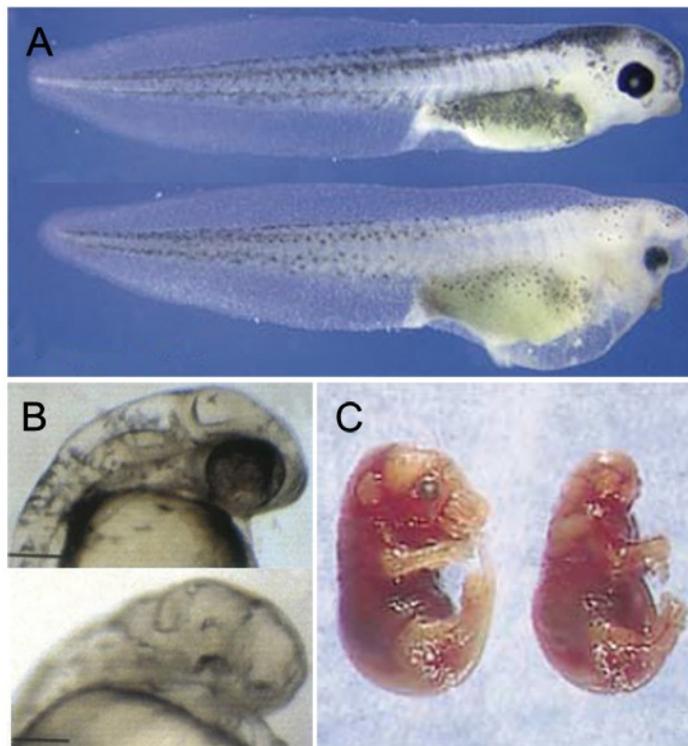


Abb. 6: „Funktion von Dkk1 in verschiedenen Organismen.“

Wird die Funktion des Dkk1-Proteins in Embryonen blockiert, so bilden diese im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (A-C, oben bzw. links) keine normalen Kopfstrukturen: *Xenopus*-Embryonen (A, Glinka *et al.*, 1998), Zebrafährblings-embryonen (B, Caneparo *et al.*, 2007) und Mausembryonen (C, Mukopadhyay *et al.*, 2001).

Neben Dkk1 wurden in Mensch und Maus noch vier weitere Proteine, Dkk2, Dkk3, und Dkk4 (Krupnik *et al.*, 1999) sowie Soggy, ein dem Dkk3 verwandtes Protein (Straussberg *et al.*, 2002), der Dickkopf-Familie identifiziert. Einzelne Mitglieder der Dickkopf-Familie wurden mittlerweile auch in Invertebraten wie *Amphioxus*, *Ciona* und *Hydra* identifiziert (Fedders *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007). In Nematoden und Fliegen wurden bislang noch keine Proteine der Dickkopf-Familie gefunden. Die einzelnen Mitglieder der Dickkopf-Familie unterscheiden sich allerdings hinsichtlich ihrer Fähigkeit, den Wnt-Signalweg zu inhibieren und damit in ihrer biologischen Wirkung. So wird Dkk2 eher eine den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivierende Wirkung zugesprochen (Wu *et al.*, 2000). Unter bestimmten physiologischen Bedingungen kann Dkk2 aber auch synergistisch zu Dkk1 wirken (Brott & Sokol, 2002; Wu *et al.*, 2000). Dkk3 hingegen ist nicht fähig, den Wnt-Signalweg zu inhibieren, sondern scheint mit dem FGF- und Nodal-Signalweg in Verbindung zu stehen (Krupnik *et al.*, 1999; Mao & Niehrs, 2003; Pinho & Niehrs, 2007). Studien in *Ciona* und *Hydra* legen nahe, dass Dkk3 eine Rolle bei der Bildung von Nervenzellen spielt (Imai *et al.*, 2004; Fedders *et al.*, 2004). Dkk4 besitzt wie Dkk1 Aktivität als Wnt-Antagonist und kann in seiner Wirkung nicht von diesem unterschieden werden (Diep *et al.*, 2004; Katoh & Katoh, 2005; Krupnik *et al.*, 1999). Das dem Dkk3 verwandte Protein Soggy ist wie Dkk3 ebenfalls nicht in der Lage, den Wnt-Signalweg zu inhibieren (Krupnik *et al.*, 1999). Das Protein ist im Akrosom von Spermien lokalisiert und scheint mit der Spermatogenese assoziiert zu sein (Kaneko & DePamphilis, 2000; Kohn *et al.*, 2005).

Alle Proteine der Dickkopf-Familie (abgesehen von Soggy) sind strukturell ähnlich aufgebaut. Sie haben eine N-terminale Signalsequenz und zwei charakteristische Cystein-reiche Domänen (Dickkopf- bzw. Colipase-Domäne), die jeweils zehn konservierte Cysteinreste besitzen. Besonders die Colipase-Domäne ist in allen Mitgliedern der Dickkopf-Familie hoch konserviert. Die beiden Domänen werden durch eine Linker-Region voneinander getrennt (Glinka *et al.*, 1998). Während die Länge dieser Linker-Region in Dkk1-, Dkk2-, und Dkk4-Proteinen zwischen 40 und 55 Aminosäuren variiert, besitzt sie in Dkk3-Proteinen stets eine Länge von 12 Aminosäuren (Krupnik *et al.*, 1999).

1.3 Der Wnt-Signalweg

1.3.1 Allgemeines

Der Wnt-Signalweg ist ein evolutionär stark konservierter Signalweg. Er ist essentiell für die normale Embryonalentwicklung, indem er eine Reihe grundlegender zellulärer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Polarisierung, Adhäsion und morphogenetische Zellbewegungen steuert und damit eine wichtige Rolle bei der Gewebe- und Organentwicklung spielt (Wodarz&Nusse, 1998). Zudem spielt er eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren im Menschen (Lustig&Behrens, 2003). Aktiviert wird der Wnt-Signalweg durch Wnt-Proteine, einer entwicklungs-geschichtlich hochgradig konservierten Gruppe von Cystein-reichen, sezernierten Glykoproteinen. Inzwischen sind mehr als 100 Wnt-Gene in verschiedenen Organismen isoliert worden und auch viele andere Komponenten des Wnt-Signalwegs, wie die Frizzled-Rezeptoren, sowie Zielgene dieses Signalwegs, wie der Transkriptionsfaktor Twist (Howe *et al.*, 2003) oder das Signalmolekül BMP4 (Kim *et al.*, 2002), sind identifiziert worden (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>).

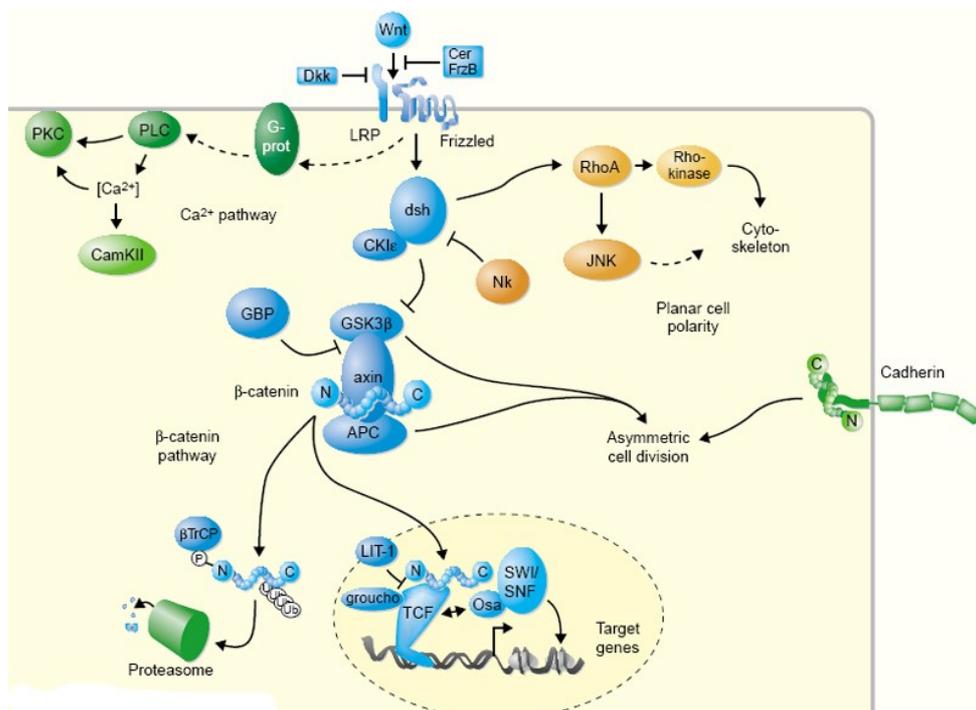


Abb. 7: „Schematische Darstellung der alternativen Wnt-Signalwege.“

Durch Wnt-Moleküle werden unterschiedliche Wnt-Signalwege: der kanonische Wnt-Signalweg bzw. Wnt/β-Catenin-Signalweg (blau), der Wnt/PCP-Signalweg (orange) und der Wnt/Ca²⁺-Signalweg (grün) aktiviert (Huelsken *et al.*, 2001).

Im Menschen sind bislang 16 verschiedene Wnt-Proteine und zehn verschiedene Frizzled-Rezeptoren identifiziert worden, von denen elf bzw. vier auch im Seeigel

gefunden wurden (Croce *et al.*, 2006). Die verschiedenen Wnt-Proteine sind hinsichtlich ihrer biologischen Funktion jedoch nicht identisch. Je nach Kombination von Wnt-Protein und Frizzled-Rezeptor an der Zelloberfläche können drei verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. Neben dem zuerst entdeckten und am besten untersuchten kanonischen Wnt-Signalweg oder Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Abb. 7, blau; siehe Kapitel 1.3.2) sind mittlerweile noch zwei weitere nicht-kanonische Wnt-Signalwege beschrieben. Zum einen der Wnt/PCP-Signalweg oder Wnt/JNK-Signalweg (Abb. 7, orange; siehe Kapitel 1.3.3) und zum anderen der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg (Abb. 7, grün; siehe Kapitel 1.3.3).

Dementsprechend wurden die Wnt-Proteine traditionell in kanonische (z.B. Wnt1, Wnt3a, Wnt8 und Wnt8b) und nicht-kanonische Wnts (z.B. Wnt4, Wnt5a und Wnt11) eingeteilt. Als Maßstab diente dabei das Vermögen, Brustdrüsenepithelzellen morphologisch zu transformieren sowie sekundäre Körperachsen in *Xenopus*-Embryonen zu induzieren (Du *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1994). Neueste Studien zeigen aber, dass diese Klassifizierung nur bedingt aufrecht zu erhalten ist. So konnte für Wnt5a, das bisher zu den nicht-kanonischen Wnt-Proteinen gezählt wurde (Kühl, 2004), gezeigt werden, dass es bei Interaktion mit dem Rezeptor Frizzled4 auch den kanonischen Wnt-Signalweg über β -Catenin aktivieren kann (Mikels&Nusse, 2006) bzw. zusammen mit dem Korezeptor LRP6 sekundäre Körperachsen induzieren kann (Bejsovec, 2000).

1.3.2 Der kanonische Wnt-Signalweg

Innerhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs hat die Regulation des zytosolischen β -Catenin-Spiegels und die Interaktion von β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren eine zentrale Bedeutung. Daher wird dieser auch als Wnt/ β -Catenin-Signalweg bezeichnet. Der zytosolische β -Catenin-Spiegel wird durch die Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β), einer zytoplasmatischen Serin-/Threonin-Kinase, im Komplex mit APC und Axin kontrolliert. Ist der kanonische Wnt-Signalweg inaktiv, liegt die GSK3 β in ihrer dephosphorylierten aktiven Form und phosphoryliert APC und Axin. Der Komplex aus GSK3 β , APC und Axin bindet zytosolisches β -Catenin, phosphoryliert es und markiert es so für die Ubiquitinierung. Das ubiquitinierte β -Catenin wird anschließend durch das Proteasom degradiert (Abb. 7, blau; Aberle *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1999). Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erfolgt durch die Bildung eines ternären Ligand/Rezeptor-Komplexes, der

sich aus dem Wnt-Protein, einem Rezeptor der Frizzled-Familie (Bhenot *et al.*, 1996; Yang-Snyder *et al.*, 1996) sowie dem Korezeptor LRP5/6 zusammen setzt (Bejsovec, 2000, Tamai *et al.*, 2000). Dies führt zum einen zur Aktivierung des multifunktionellen zytoplasmatischen Proteins Dishevelled, das im aktiven Zustand die GSK3 β hemmt, und zum anderen zu einer Bindung zwischen dem Korezeptor LRP5/6 und Axin, das dadurch vom Degradationskomplex fern gehalten wird (Abb. 8, A; Tamai *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von β -Catenin unterbleibt, und es kommt zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Es gelangt in den Zellkern und bindet dort an Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie, die in Verbindung mit Korepressoren wie Groucho bislang als wirksame Repressoren von Wnt-Zielgenen fungierten. Ein Komplex von diesen und β -Catenin jedoch führt zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Abb. 7, blau; Eastman&Grosschedl, 1999; Kühl&Wedlich, 1997). In vielen Organismen findet dieser Signalweg bei der Achsenbildung und der Endoderm-Differenzierung Anwendung (Croce&McClay, 2006; Imai *et al.*, 2000; Wikramanayake *et al.*, 1998; siehe Kapitel 1.3.5).

1.3.3 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

Der Wnt/PCP-Signalweg

Die Aktivierung des Wnt/PCP-Signalweges erfolgt über die Bindung von Wnt-Proteinen an einen Rezeptor der Frizzled-Familie sowie an den Korezeptor Knypek (Veeman *et al.*, 2003). Die Signalweiterleitung erfolgt wie beim kanonischen Wnt-Signalweg über das Protein Dishevelled. In diesem Fall jedoch wird Dishevelled an die Zellmembran rekrutiert, wo sich Daam1 anlagert. Von diesem Komplex können zwei unabhängige, parallele Wege eingeschlagen werden. Im ersten Fall bindet RhoA an den Dishevelled/Daam1-Komplex und wird dadurch aktiviert (Habas *et al.*, 2001). Dies führt zur Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase Rock und schließlich zur Aktivierung von Zielgenen dieses Signalwegs (Winter *et al.*, 2001). Der zweite mögliche Weg führt zur Aktivierung von Rac und/oder Cdc42 (Fanto *et al.*, 2000; Veeman *et al.*, 2003), die auf bisher nicht geklärte Weise den JNK-Signalweg und dadurch Zielgene des Signalwegs aktivieren (Abb. 7, orange; Boutros *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2005). Der Wnt/PCP-Signalweg wird für die Bildung bzw. Reorganisation des Cytoskeletts sowie für Zellbewegungen wie der convergent extension während der Gastrulation benötigt (Heisenberg *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2003; Wallingford *et al.*, 2002).

Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg

Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg wird ebenfalls durch Bindung von Wnt-Proteinen an einen Rezeptor der Frizzled-Familie aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt bei diesem allerdings vom Frizzled-Rezeptor über heterotrimere G-Proteine (Slusarski *et al.*, 1997). Durch diese wird die Phospholipase C aktiviert, die für die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus den intrazellulären Speichern sorgt. Dies hat zur Folge, dass Ca²⁺-abhängige Kinasen, wie die PKC (Sheldahl *et al.*, 1999), die CamKII (Kühl *et al.*, 2000; Kühl *et al.*, 2000) und die Calcn (Saneyoshi *et al.*, 2002) aktiviert werden (Abb. 7, grün). Über NF-AT und andere Transkriptionsfaktoren wird dann die Transkription von Zielgenen dieses Signalwegs aktiviert (Wang&Malbon, 2003). Dieser Signalweg ist oftmals bei der Regulation von Zelladhäsionen und der Koordinierung von Zellbewegungen beteiligt (Killian *et al.*, 2002; Kohn&Moon, 2005; Winklbauer *et al.*, 2001). Des Weiteren scheint der Wnt/Ca²⁺-Signalweg bei der Ausbildung von Muskeln in adulten Tieren eine Rolle zu spielen (Chin *et al.*, 1998; Delling *et al.*, 2000; Naya *et al.*, 2000).

1.3.4 Regulation des Wnt-Signalwegs durch Dkk1

Es sind eine ganze Reihe extrazellulärer Moleküle wie Cerberus (Piccolo *et al.*, 1999), WIF-1 (Hsieh *et al.*, 1999) und Frzb-1 (Leyns *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997) beschrieben worden, die den Wnt/β-Catenin Weg inhibieren. Während Cerberus und

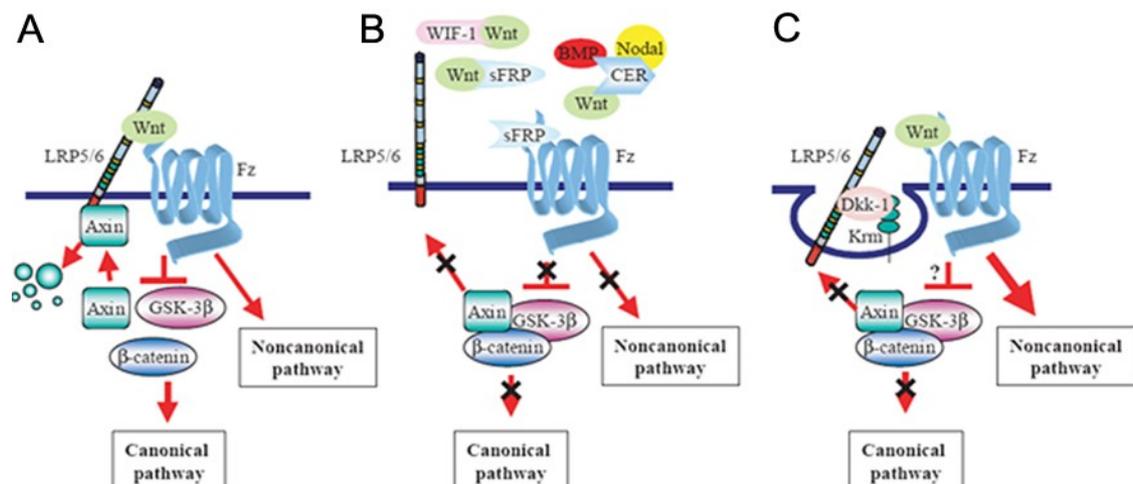


Abb. 8: „Regulation der Wnt-Signalwege durch Dkk1.“

Durch Wnt-Moleküle werden der kanonische und die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege aktiviert (A). Durch Wnt-Antagonisten der sFrp-Familie werden sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege (B), durch Dkk1 hingegen nur der kanonische Wnt-Signalweg (C) inhibiert (Kawano&Kypta, 2003).

WIF direkt an Wnt-Proteine binden und dadurch die Rezeptoraktivierung verhindern, können FzrBs nicht nur den Liganden, sondern auch die Frizzled-Rezeptoren binden und mit diesen einen nicht-funktionellen Komplex bilden (Bafico *et al.*, 1999). Dadurch werden sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege inhibiert (Abb. 8, B). Der Mechanismus der Inhibierung des Wnt-Signalwegs durch Dkk1 unterscheidet sich von allen anderen bisher bekannten Wnt-Antagonisten. Die antagonistische Wirkung erfolgt durch Bindung von Dkk1 an den Korezeptor LRP5/6 (Bafico *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2001; Semenov *et al.*, 2001). Zusammen mit Kremen wird ein ternärer Komplex gebildet, der durch Endozytose für die Entfernung von LRP5/6 von der Plasmamembran sorgt (Rothbacher&Lemaire, 2002). LRP5/6 kann somit nicht mehr zur Stabilisierung von β -Catenin beitragen (Mao *et al.*, 2001). Dies führt zur Degradierung von zytosolischem β -Catenin und damit zur spezifischen Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs (siehe Kapitel 1.3.2). Da die Frizzled-Rezeptoren weiterhin Wnt-Proteinen zur Verfügung stehen, sind die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege von Dkk1 nicht beeinflusst (Abb. 8, C; Zorn, 2001).

1.3.5 Der Wnt-Signalweg und die Endomesoderm-Entwicklung

Die großen Mikromere im Seeigelembryo sind autonom determiniert. Isoliert man diese aus einem Embryo und lässt sie isoliert wachsen, so entwickeln sie sich zu Skelettzellen. Zudem besitzen sie induzierende Eigenschaften. Entsprechend der dorsalen Urmundlippe (siehe Kapitel 1.2.1) können sie, transplantiert auf einen zweiten Embryo, eine zweite Seite für die Gastrulation induzieren. Dabei werden Zellen, die sich normalerweise zu Ektodermzellen entwickelt hätten, zu Endoderm umprogrammiert und bilden einen zweiten Darm (Ransick&Davidson, 1993). Verantwortlich für die Spezifizierung der Mikromere und deren induzierende Eigenschaft ist das Signalmolekül β -Catenin (Ettensohn&Sweet, 2000). Während der normalen Seeigelentwicklung reichert sich β -Catenin im Nukleus der Zellen an, die später Endoderm und Mesoderm bilden, und wirkt dort als Genaktivator. Unter anderem wird zusammen mit maternal vorliegendem Blimp1 und OTX die Expression Wnt8 aktiviert (Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). Wnt8 wiederum führt zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in den benachbarten Zellen und damit zur Anreicherung von β -Catenin im Zellkern dieser Zellen (Emily-Fenouil *et al.*, 1998; Minokawa *et al.*, 2005; siehe Kapitel 1.3.2).

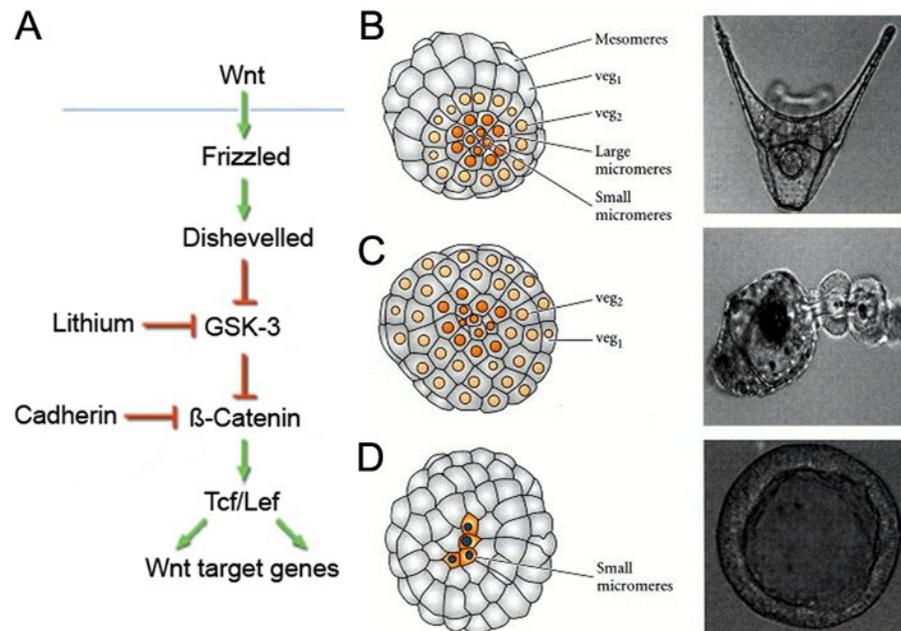


Abb. 9: „Bedeutung von β -Catenin für die Embryonalentwicklung.“

Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs und dessen Perturbation durch Cadherin und Lithium (A, Meijer *et al.*, 2003) sowie die Folgen dieser Perturbationen auf die Entwicklung des Seeigelembryos (B-D, Gilbert, 2003): normale Entwicklung zur Pluteus-Larve (B), Aktivierung des Signalwegs führt zur Akkumulation von β -Catenin und damit zu Embryonen, die vermehrt Endomesoderm bilden und daher oftmals exogastrulieren (C), Inhibition des Signalwegs führt zu *Dauerblastulae* (D).

Stört man den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, so hat das erhebliche Folgen für die Embryonalentwicklung des Seeigels. Neben anderen sind Cadherin (Logan *et al.*, 1999) und Lithium (McClay, 1996; Vonica *et al.*, 2000) wirksame Reagenzien, um den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu perturbieren (Abb. 9, A). Lithium agiert als Aktivator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, indem es die GSK3 β inhibiert und damit β -Catenin freisetzt, das dann in Nukleus wandert und Zielgene aktiviert (siehe Kapitel 1.3.2). Folglich führt die Behandlung mit Lithium zu Embryonen mit im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Abb. 9, B) vermehrtem endomesodermalem Gewebe auf Kosten von ektodermalem Gewebe (Abb. 9, C; Poustka *et al.*, 2007). Cadherin hingegen schaltet den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aus, indem es an β -Catenin bindet und somit dessen Akkumulation im Zellkern verhindert. Dementsprechend besitzen mit *Cadherin*-RNA injizierte Embryonen weder Endoderm noch Mesoderm, sondern bilden eine Dauerblastula (Abb. 9, D; Logan *et al.*, 1999; Poustka *et al.*, 2007).

Der aktivierte Wnt-Signalweg führt zum einen dazu, dass ein Netzwerk von Genen aktiviert wird, das für die Spezifizierung von PMC und später für deren Differenzierung zu Skelettzellen zuständig ist (Davidson *et al.*, 2002). Eine zentrale Rolle innerhalb

dieses Netzwerks spielt das Gen *pmar1*. Dieses Gen wirkt in den Mikromeren und den Nachfolgerzellen als Repressor des Gens *hesc*, das in allen übrigen Zellen als Repressor von PMC-spezifisierenden Genen wirkt, und somit für die Aktivierung von PMC-spezifischen Genen wie *delta* und *tbrain* sorgt (Oliveri *et al.*, 2002, Oliveri *et al.*, 2003; Revilla-i-Domingo *et al.*, 2007). Zum anderen führt die Aktivierung des Wnt-Signalwegs zur Aktivierung eines Netzwerks von Genen, das für die Bildung von

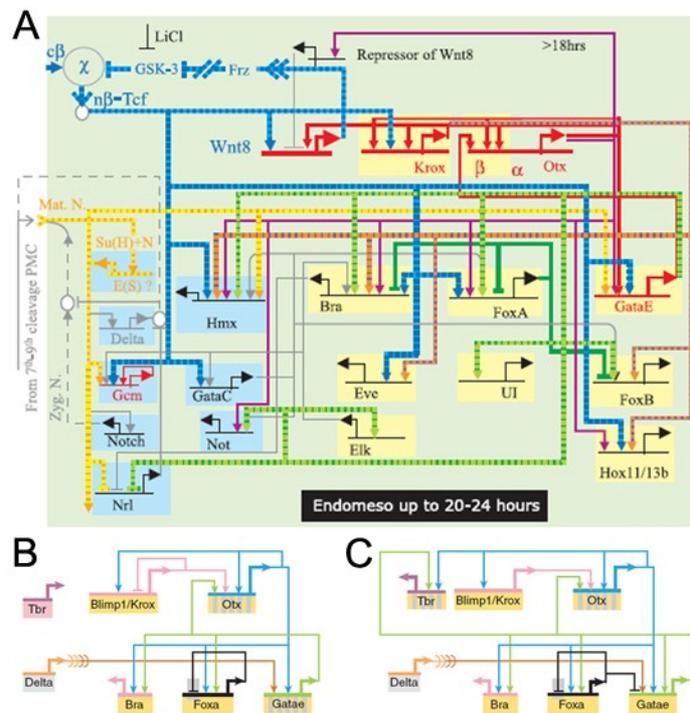


Abb. 10: „Das Endomesoderm-GRN und die Kernel-Gene.“

Der Wnt/β-Catenin-Signalweg (blau) ist essentiell für die Bildung von PMCs sowie für die Bildung von Mesoderm (blau unterlegte Gene) und Endoderm (gelb unterlegte Gene). Für die Bildung von Mesoderm des Weiteren noch Signale von den PMCs sowie vom Endoderm nötig. Bislang unbekannt ist der Repressor von Wnt8 (lila), der die Endomesodermbildung stoppt (A, Davidson *et al.*, 2002). Innerhalb des GRN spielen die Kernel-Gene eine wichtige Rolle (B+C, Davidson&Erwin, 2006). Diese sind evolutionär stark konserviert, wie ein Vergleich zwischen Seeigel (B) und Seestern (C) zeigt.

endomesodermalem Gewebe verantwortlich ist (Abb. 10, A). Von entscheidender Bedeutung für die Endomesoderm-Spezifizierung innerhalb dieses Netzwerks ist ein Set von Schlüsselgenen (Kernel-Gene), bestehend aus *blimp1*, *otx*, *bra*, *foxa*, *gatae* (Davidson&Erwin, 2003; Livi&Davidson, 2006; Yuh *et al.*, 2004). Diese Kernel-Gene sowie deren Regulation sind innerhalb eines Phylums stark konserviert (Abb. 10, B+C), und eine Störung innerhalb dieses Kerns hat erhebliche Folgen für die Entwicklung des Embryos (Davidson&Erwin, 2006; Hinman&Davidson, 2007; Hinman *et al.*, 2007). Neben dem Wnt/β-Catenin-Signalweg und den Kernel-Genen ist der Delta/Notch-

Signalweg für die Bildung der SMCs von Bedeutung. Das in den Mikromeren und in deren Nachfolge-Zellen aktivierte Delta sorgt über den Notch-Rezeptor in Nachbarzellen dafür, dass Gene aktiviert werden, die für die Differenzierung zu mesodermalem Gewebe, wie Pigmentzellen und Muskelzellen nötig sind (Ruffins&Ettensohn, 1996; Sweet *et al.*, 2000; Sweet *et al.*, 2002). Folglich führt eine Überexpression von Notch zu Embryonen, die eine Extrusion aufgrund von vermehrtem mesodermalem Gewebe zeigen, und eine Inhibierung des Delta/Notch-Signalwegs durch Injektion einer inaktiven Form des Notch-Rezeptors zu Embryonen, die keine SMCs mehr besitzen (Sherwood&McClay, 1999). Embryonen, denen die Mikromere entfernt wurden und somit kein Delta exprimieren, bilden ebenso keine mesodermalen Strukturen (McClay *et al.*, 2000).

Noch ist nicht bekannt, welche Faktoren dafür sorgen, dass die Endomesoderm-Differenzierung beendet wird (Abb. 10, A). Dass das Ausschalten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs aber essentiell für die korrekte Embryonalentwicklung ist, zeigen Versuche, in denen dieser Signalweg künstlich aktiviert wurde (Abb. 9, A+C). Bisher wurde nur ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs gefunden, die Nemo-like Kinase. Diese wird durch den Delta-Notch-Signalweg während des Blastula-Stadiums aktiviert und sorgt daher nur in den mesodermalen Zellen für die Herunterregulierung von Tcf und damit zur Inaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Roettinger *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde basierend auf Untersuchungen *cis*-regulatorischer Elemente in den Promotorbereichen von *blimp1* vorgeschlagen, dass die Inaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf der Autorepression von Blimp1 beruht (Livi&Davidson, 2007; Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). Funktionelle Studien, die diese Theorie bestätigen, wurden aber bisher noch nicht durchgeführt.

1.4 Das serotonerge System

1.4.1 Allgemeines

Serotonin wurde erstmals 1948 als das substituierte Indolderivat 5-Hydroxytryptamin (5-HT) isoliert und identifiziert (Rapport *et al.*, 1948). Das biogene Monoamin gehört zu den ältesten Botenstoffen und ist sowohl im Tierreich als auch im Pflanzenreich weit verbreitet (Fischer, 1971; Smith, 1971) und besitzt dort vielfältige Aufgaben, wie die Kontraktion der glatten Muskulatur (Ormsbee&Fondacaro, 1985), der Blutgerinnung (Holland, 1976) oder der T-Zell-vermittelten Immunantwort (Finocchiaro *et al.*, 1988). Zudem erfüllt es zahlreiche Funktionen als Gewebshormon.

Eine bedeutende Rolle kommt Serotonin als Neurotransmitter im Nervensystem zu (Twarog&Page, 1953).

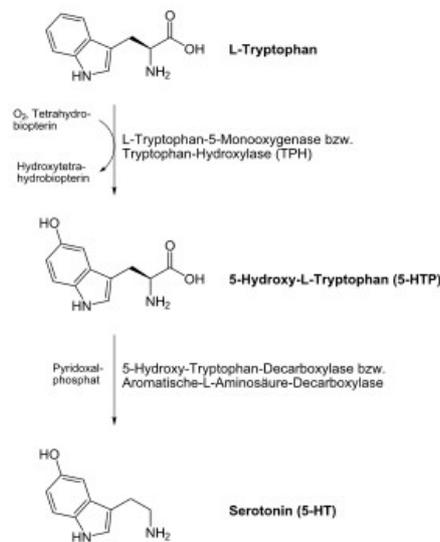


Abb. 11: „Biosynthese von Serotonin.“

Serotonin wird in zwei Schritten aus der Aminosäure Tryptophan aufgebaut. Zunächst setzt die TPH in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Tryptophan in die nicht-proteinogene Aminosäure 5-Hydroxytryptophan um. Anschließend wird diese durch die AADC zu Serotonin decarboxyliert (http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Serotonin_Biosynthese.svg).

Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet. In einem ersten Syntheseschritt wird Tryptophan durch die Tryptophan-Hydroxylase (TPH) in die nicht-proteinogene Aminosäure 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert. Im Folgenden Schritt wird 5-HTP durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu Serotonin decarboxyliert (Abb. 11). In Vertebraten gibt es zwei verschiedene TPHs. Die eine sorgt für die Bildung von Serotonin im Gehirn, während die andere für die Serotonin-Synthese im Darm zuständig ist (Walther *et al.*, 2003). Hauptsächlich findet die Bildung von Serotonin in Vertebraten jedoch im Gehirn statt (Chung *et al.*, 2001). Die TPH konnte bisher nur im Seeigel *Hemicentrotus pulcherrimus* isoliert werden. Dort wird sie im apikalen Ektoderm exprimiert (Yaguchi&Katow, 2003). Allerdings zeigt die Genomanalyse des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus*, dass auch diese Seeigelart sowohl die TPH als auch die AADC besitzt (Burke *et al.*, 2006).

Ein wichtiger Bestandteil des serotonergen Systems ist zudem die große Familie der membrangebundenen 5-HT-Rezeptoren. Sie vermitteln die vielfältigen Wirkungen des Serotonins. In Vertebraten sind bisher 18 verschiedene Serotonin-Rezeptoren identifiziert worden, die gemäß ihrer Strukturhomologie und ihrem

Effektormechanismus in sieben Unterfamilien sortiert werden (Adayev *et al.*, 2005). Sechs von diesen gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren und eine zur Unterfamilie der Liganden gesteuerten Ionenkanäle (Hoyer *et al.*, 1994; Hoyer&Martin, 1997; Humphrey *et al.*, 1993). Des Weiteren spielt der hochaffine plasmamembranständige Serotonin-Transporter (SERT) eine wesentliche Rolle innerhalb des serotonergen Systems. Er sorgt dafür, dass das in den synaptischen Spalt abgegebene Serotonin wieder ins Zytosol der Zelle gelangt bzw. bei überschüssigem Serotonin aus der Zelle heraus transportiert und auf diese Weise die Dauer und Stärke der Signaltransduktion bestimmt. Er besitzt zwölf Transmembrandomänen und ist strukturell mit den beiden anderen Monoamintransportern, dem Dopamin- und dem Noradrenalintransporter, verwandt (Siegel *et al.*, 1994). Im Seeigel wurden bislang ein Serotonin-Transporter sowie vier Serotonin-Rezeptoren identifiziert (Burke *et al.*, 2006). Während der Embryogenese sind sie im Darm, in einigen SMCs und im apikalen Ektoderm exprimiert (Buznikov *et al.*, 2005).

1.4.2 Die Rolle von Serotonin während der Embryogenese

In Vertebraten kann Serotonin schon in Embryonen detektiert werden bevor überhaupt Neuronen nachgewiesen werden können. Dabei spielt es eine Rolle bei der Zellteilung und -differenzierung sowie der Morphogenese (Buznikov *et al.*, 1996; Burden&Lawrence, 1973). Des Weiteren konnte es in den Reproduktionsorganen von Mäusen und Ratten nachgewiesen werden (Vesela *et al.*, 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Serotonin-Synthese zu verringerter Produktion von Spermien führt (Aragon *et al.*, 2005). An Embryonen von Amphibien wurde gezeigt, dass Serotonin wichtig für die Adhäsion von Blastomeren und die Zellbewegungen während der Gastrulation ist (Hämäläinen&Kohonen, 1989) und in Mausembryonen für die Entwicklung der Extremitäten und des Herzes (Bhasin *et al.*, 2004; Nebigil *et al.*, 2000). Auch in Invertebraten wie Echinodermaten, Insekten und Würmern kann Serotonin noch vor der Ausbildung von Neuronen nachgewiesen werden (Buznikov *et al.*, 2005). Im Seeigel spielt Serotonin eine wichtige Rolle bei der Gastrulation. Zum einen scheint es die Gastrulation an sich zu initiieren (Carroll *et al.*, 2008; Scully *et al.*, 2008) und zum anderen scheint es für die korrekte Verteilung der SMCs verantwortlich zu sein (Buznikov *et al.*, 2005).

1.4.3 Bildung von serotonergen Zellen im Seeigelembryo

Serotonerge Zellen sind während der Embryogenese des Seeigels erstmals in der späten Gastrula im apikalen Ektoderm detektierbar (Bisgrove&Burke, 1987; Nakajima *et al.*, 2004; Yaguchi *et al.*, 2000). Über die Entstehung sowie die Regulation der Differenzierung der serotonergen Zellen ist bislang nur wenig bekannt. Die Bildung von serotonergen Zellen scheint aber eng mit der Etablierung der oralen-aboralen-Achse in Verbindung zu stehen (Yaguchi *et al.*, 2006). Ein wichtiger Signalweg ist hierbei der Nodal-Signalweg. Nodalsignale im oralen Ektoderm sorgen über den Transkriptionsfaktor Smad2/3 dafür, dass sich keine serotonergen Zellen im apikalen Ektoderm bilden, das nahe am oralen Ektoderm liegt (Abb. 12, A). Im apikalen Ektoderm, das dem aboralen Ektoderm zugewandt ist und nicht mehr im Einflussbereich von Nodalsignalen liegt, können sich weiterhin serotonerge Zellen bilden (Abb. 12, A; Yaguchi *et al.*, 2006).

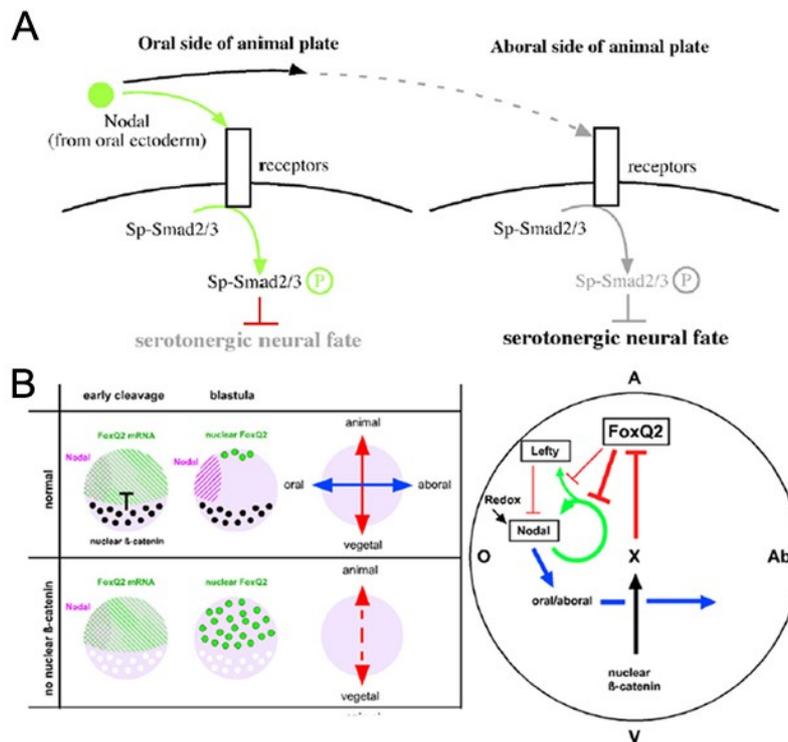


Abb. 12: „Verbindung zwischen dem Wnt- und dem Nodal-Signalweg.“

Nodal-Signale vermittelt durch Smad2/3 sorgen dafür, dass keine serotonergen Zellen gebildet werden (A, Yaguchi *et al.*, 2006). Vermittelt durch FoxQ2 wird der Nodal-Signalweg u.a. durch den Wnt/β-Catenin-Signalweg kontrolliert (B, Yaguchi *et al.*, 2008).

Des Weiteren scheint auch der Wnt/β-Catenin-Signalweg eine Rolle bei der Spezifizierung von serotonergen Zellen zu spielen. Wird der Wnt/β-Catenin-Signalweg

z.B. durch Injektion von *Cadherin*- (Davidson *et al.*, 2002; Logan *et al.*, 1999) oder GSK3 β -mRNA (Emily-Fenouil *et al.*, 1998) geblockt, entstehen Embryonen, die keine serotonergen Zellen mehr besitzen (Yaguchi *et al.*, 2006). Der gleiche Effekt wird auch erzielt, wenn man die animalen Blastomere isoliert und weiterentwickeln lässt (Wikramanayake *et al.*, 1995). Wie neueste Studien gezeigt haben, verhindert die Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Repression des Transkriptionsfaktors FoxQ2, das für die Repression von Nodalsignalen zuständig ist. Folglich kommt es zur Herunterregulierung von Nodalsignalen und damit zur vermehrten Bildung von serotonergen Zellen (Abb. 12, B; Yaguchi *et al.*, 2008). Zu einer erhöhten Anzahl von serotonergen Zellen führt auch die Behandlung mit Zink. Obwohl der genaue Mechanismus der Wirkungsweise von Zink noch unbekannt ist, konnte gezeigt werden, dass viele Gene, die im apikalen Ektoderm exprimiert werden, durch Zink aktiviert werden. Es ist daher anzunehmen, dass zumindest einige von ihnen an der Spezifizierung von serotonergen Zellen beteiligt sind (Poustka *et al.*, 2007).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktionen sowie die Regulation des Kopforanisors *Dkk1* während der Embryogenese des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* zu charakterisieren. Dies soll durch Überexpressions- (gain-of-function) sowie Depletionsexperimente (loss-of-function) mittels Mikroinjektion von mRNAs bzw. von spezifischen MASOs in Seeigeleier erfolgen. Die Überexpressions- bzw. Depletionsphenotypen sollen zunächst durch WISH von gewebspezifischen antisense-RNA-Sonden grob charakterisiert werden, und die Ergebnisse mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) validiert werden. Wie durch *in situ* Experimente gezeigt wurde, ist *SpDkk1* während des Blastula-Stadiums in der Vegetalplatte und während des Gastrula-Stadiums hauptsächlich im apikalen Ektoderm exprimiert. Diese Lokalisation der Expression legt nahe, dass *SpDkk1* an der Endomesoderm-Differenzierung sowie an der Neurogenese beteiligt ist. Daher soll in dieser Arbeit die Funktion von *SpDkk1* insbesondere in diesen beiden Entwicklungsstadien detailliert untersucht werden.

Die Differenzierung des Endomesoderms während der Embryonalentwicklung des Seeigels ist bereits sehr gut untersucht. So ist bekannt, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Schlüsselrolle in der Endomesoderm-Entwicklung spielt, indem er die für die Differenzierung des Endomesoderms benötigten Gene aktiviert. Bislang wurden mehr als 40 an der Endomesoderm-Entwicklung beteiligte Gene identifiziert und

basierend auf Perturbationsexperimenten in einem endomesoderm-spezifischen genregulatorischen Netzwerk (GRN) miteinander verknüpft (siehe Kapitel 1.3.5). Mit Hilfe der qPCR soll daher in *SpDkk1*-MASO- bzw. -mRNA-injizierte Seeigelembryonen im Blastula-Stadium untersucht werden, ob *Dkk1* auch im Seeigel als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungiert. Das für die Endomesodermspezifizierung vorhandene GRN soll anschließend auf der Grundlage der neu gewonnenen Daten modifiziert bzw. erweitert werden.

Während die Differenzierung des Endomesoderms gut analysiert ist, ist die Entwicklung des apikalen Ektoderms, welches verschiedene Nervenzelltypen beherbergt, im Seeigel noch nahezu unerforscht (siehe Kapitel 1.4.3). Daher soll die Nervenzellentwicklung in wildtypischen sowie *SpDkk1*-MASO- bzw. -MOE-Embryonen mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren untersucht werden. Des Weiteren sollen mit Hilfe von in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Seeigel-cDNA-Bibliotheken in einem whole mount *in situ* Screen weitere Gene identifiziert werden, welche im apikalen Ektoderm exprimiert sind und damit potentielle Regulatoren der Neurogenese sind. Mittels Knock-Down dieser Gene durch Injektion von spezifischen MASOs und anschließender immunhistochemischer Verfahren soll dann untersucht werden, ob sie tatsächlich bei der Differenzierung von neuronalem Gewebe mitwirken. Anschließend sollen durch qPCR-Analysen die gegenseitige Regulation dieser putativen neuroregulatorischen Gene aufgeklärt, sowie deren zeitliche Expressionsprofile erstellt werden. Basierend auf diesen Daten sollen funktionelle Zusammenhänge zwischen den einzelnen Genen aufgedeckt und in einem dynamischen GRN zusammengefasst werden.

Um zu untersuchen wie der Kopforganisator *Dkk1* im Seeigel reguliert wird, soll zudem der Promotorbereich von *SpDkk1* genauer analysiert werden. Durch Sequenzvergleiche von Promotorbereichen des *Dkk1*-Gens verschiedener Organismen sollen konservierte regulatorische Elemente identifiziert werden. Diese konservierten Bereiche sollen anschließend in einem geeigneten Expressionssystem auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Außerdem sollen innerhalb dieser Promotorbereiche einzelne Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert werden und durch Deletionsanalysen detaillierter charakterisiert werden.

2. Material

2.1 Chemikalien, Enzyme und DNA/RNA-Längenmarker

Chemikalien

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Agarose	Invitrogen	#15510-019
Ampicillin	Sigma	#A9393
BCIP	Sigma	#B8503
BigDye-Terminator-Mix		
Betaine	Sigma	#B2629
Bromphenolblau	Merck	#1.08122.0025
BSA	Roth	#8076.1
Calciumchlorid	Merck	#1.02382.1000
Chloroform	Merck	#1.02431.2500
DEPC	Sigma	#D5758
DIG-RNA Labelling Mix	Roche	#1277073
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	#1.06585.5000
DMF	Merck	#1.03053.1000
DNazol	Invitrogen	#10503-027
dNTPs	Pharmacia	#27-2035
EDTA	Sigma	#E4378
Ethanol	Merck	#1.00986.2500
Ethidiumbromid	Sigma	#E1510
FLU-RNA Labelling Mix	Roche	#11685619910
Formamid	Fluka	#47671
Glucose	Merck	#1.08342.2500
Glycerin	Merck	#1.04093.100
Glycin	Merck	#1.04201.1000
HEPES	Calbiochem	#391338
Hexanukleotid-Primer	Applied Biosystems	#N808-0127
Isopropanol	Merck	#1.09634.2500
Kaliumchlorid	Merck	#1.04936.1000

2. Material

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Kanamycin	Sigma	#K4000
Lithiumchlorid	Merck	#1.05679.0250
LMP-Agarose	Invitrogen	#15517-014
LPA	Sigma	#5-6575
Magnesiumchlorid	Merck	#1.05833.1000
Magnesiumsulfat	Merck	#1.05886.1000
Methylenblau	Merck	#1.15943.0025
Natriumacetat	Merck	#1.06268.1000
Natriumchlorid	Merck	#1.06400.1000
Natriumhydrogencarbonat	Merck	#1.06328.1000
Natriumhydroxid	Merck	#1.06495.1000
NBT	Sigma	#N6876
MOPS	Sigma	#M3183
o-Phosphorsäure	Merck	#1.00573.1000
PABA	Sigma	#A6928
PCI	Invitrogen	#15593-031
Penicillin	Sigma	#P3032
PFA	Sigma	#P6148
Phenolrot	Sigma	#P0290-100ML
Protaminsulfat	Sigma	#P4380
Rhodamin	Sigma	#R9379
RNA Storage Solution	Ambion	#7000
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega	#N2511
Salzsäure	Merck	#1.09057.1000
Schafserum	Sigma	#S2263
SDS	Merck	#8.22050.2500
Streptomycin	Sigma	#S1277
Tricaine	Sigma	#A5040-5G
TRIS	Merck	#1.08382.0500
Trizol	Gibco BRL	#15596-018

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Tween 20	Sigma	#P9416
Wasserstoffperoxid	Merck	#108597
X-Gal	Sigma	#B9146
Zinksulfat	Fluka	#83265
Zitronensäure	Sigma	#C8532

Enzyme

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Bgl2 / NEB3 Puffer	New England Biolabs	#R0144S / #B7003
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP)	New England Biolabs	#M0290S
EcoR1 / EoR1 Puffer	New England Biolabs	#R0101S / #B0101S
Kpn1 / NEB1 Puffer	New England Biolabs	#R0142S / #B7001S
M-MLV Reverse Transkriptase / Reverse Transkriptase Puffer	Promega	#M531A
Not1 / NEB3 Puffer	New England Biolabs	#R0189S / #B7003S
Pronase E	Sigma	#P69111G
Proteinase K	Roche	#03115801001
RNase A	Qiagen	#19101
RNasin RNase Inhibitor	Promega	#N2511
Sal1 / Sal1 Puffer	New England Biolabs	#R0138S / #B0138S
Sp6 RNA Polymerase	Roche	#810274
T4 DNA Ligase / T4 DNA Ligase Puffer	New England Biolabs	#M0202S / #B0202S
T7 RNA Polymerase / Transkriptions-Puffer	Roche	#881767
Taq DNA Polymerase / Transkriptions-Puffer	Stratagene	#600131
TURBO DNase	Ambion	#1907

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Xba1 / NEB2 Puffer	New England Biolabs	#R0145S / #B7002S
Xma1 / NEB4 Puffer	New England Biolabs	#R0180S / #B7004S

DNA/RNA-Längenmarker

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
100 bp DNA ladder	New England Biolabs	#N3231S
1 kb DNA ladder	Stratagene	#201115
RiboRuler RNA ladder	Fermentas	#SM1821

2.2 Kits, Puffer und Medien

Kits

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
JBL Nitrit-Test	Welke	#80246
JBL Phosphat-Test	Welke	#80244
mMESSAGE mMACHINE T3 Kit	Ambion	#AM1348
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	#27106
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	#28106
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	#20021
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen	#K460001
TURBO DNA-free Kit	Ambion	#1907
SYBRGreen PCR Master Mix	Applied Biosystem	#4309155
TSA Plus Fluorescence Kit	Perkin Elmer	#NEL753001KT

Puffer

Sämtliche Lösungen, die für Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden zuvor mit DEPC behandelt. Dazu wurden die Lösungen mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, über Nacht gut gemischt und anschließend autoklaviert.

Antikörperlösung	0,1 M MOPS (pH 7.0), 0,5 M NaCl, 0,1% Tween20 (v/v), 1 mg/ml BSA, 10% Schafserum (v/v), 1:2000 Anti-DIG/FLU-AP/POD-Antikörper (v/v)
------------------	---

AP-Puffer (pH 9.5)	0,1 M TRIS-HCl (pH 9.5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl ₂ , 0,1% Tween20 (v/v)
Blockierlösung 1	0,1 M MOPS (pH 7.0), 0,5 M NaCl, 0,1% Tween20 (v/v), 10 mg/ml BSA
Blockierlösung 2	0,1 M MOPS (pH 7.0), 0,5 M NaCl, 0,1% Tween20 (v/v), 1 mg/ml BSA, 10% Schafserum (v/v)
E3-Puffer	5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl ₂ , 0,33 mM MgSO ₄ , 0,03 M Methylenblau
Färbelösung	0,1 M TRIS-HCl (pH 9.5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl ₂ , 10% DMF (v/v), 4,5 µl/ml NBT, 3,5 µl/ml BCIP
Fixierlösung	0,1 M MOPS (pH 7.0), 0,5 M NaCl, 0,1% Tween20 (v/v), 4% PFA (w/v)
Gelladepuffer	4 mM TRIS-Acetat (pH 8.0), 0,2 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau (w/v), 50% Glycerin (v/v)
Inaktivierungspuffer	0,1 M Glycine, 0,1% Tween20 (v/v)
Künstliches Seewasser	0,5 M NaCl, 0,01 M KCl, 0,02 M MgCl ₂ , 0,03 M MgSO ₄ , 0,01 M CaCl ₂ , 2,5 mM NaHCO ₃
MOPS-Hybridisierungspuffer	70% Formamid (v/v), 0,1 M MOPS (pH 7.0), 0,5 M NaCl, 0,1% Tween20 (v/v), 1 mg/ml BSA
MOPS-Waschpuffer	0,1 M MOPS (pH 7.0), 0,5 M NaCl, 0,1% Tween20 (v/v)
PBST-Puffer	0,15 M NaCl, 0,08 M Na ₂ HPO ₄ , 0,02 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7.34), 0,1% Tween20 (v/v)
PCR-Puffer (10x)	350 mM TRIS-Acetat (pH 9.0), 150 mM TRIS-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 1% Tween20 (v/v)
TAE-Puffer	40 mM TRIS-Acetat (pH 7.5), 1 mM EDTA
TBST-Puffer	50 mM TRIS-Acetat (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween20 (v/v)
TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

Medien

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
LB Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl)	QBio-Gene	#3001-032

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
LB Agar (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Bacto-Agar)	QBio-Gene	#3001-232
SOC Medium (20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂)	-	-

2.3 Vektoren und Zellen

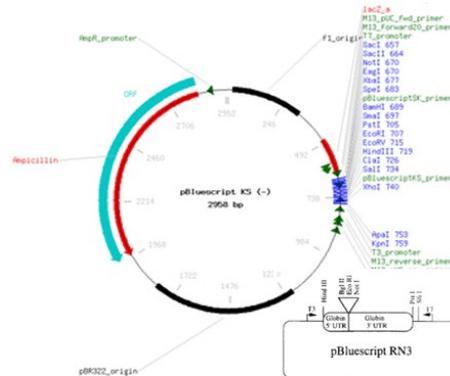
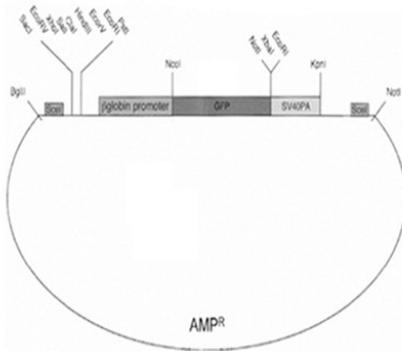
Vektoren

Name / Hersteller

Name / Hersteller

β-Globin/GFP Vektor

pBlueskript RN3

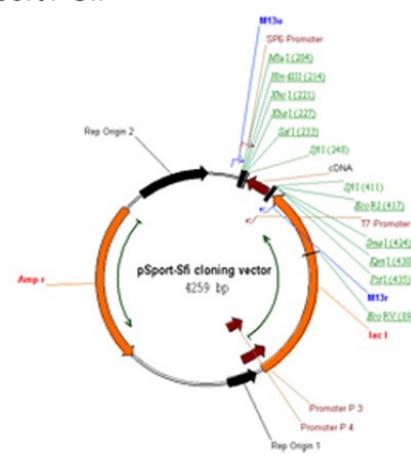
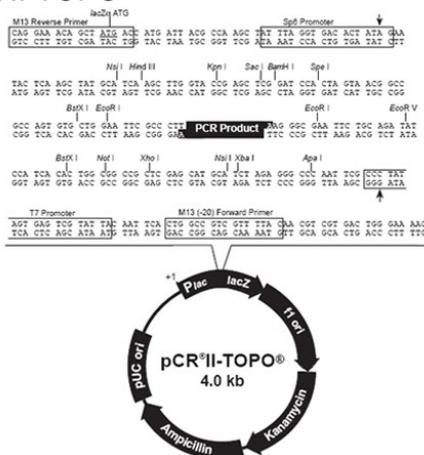


Dr. G. Elgar
(Center for Genomic Research, Cambridge)

Dr. I. Arnone
(Stazione Zoologica, Napoli)

pCR II-TOPO

pSport1-Sfi



Invitrogen

Life Technologies

Zellen

Name	Genotyp	Vertreiber
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ⁺ , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdr17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI g</i> ZTn10]	Gibco BRL
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

2.4 Antikörper

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
Anti-1E11/Synaptotagmin (Mouse)	Dr. R. D. Burke	University of Victoria
Anti-Digoxigenin-AP	Roche	#11093274910
Anti-Digoxigenin-POD	Roche	#11207733910
Anti-Fluorescein-POD	Roche	#11426346910
Anti-Mouse(IgG)-Alexa594	Molecular Probes	#A11032
Anti-Rabbit(IgG)-Alexa488	Molecular Probes	#A11034
Anti-Rabbit(IgG)-Alexa594	Molecular Probes	#A11037
Anti-Rabbit(IgG)-HRP	Promega	#W401B
Anti-Serotonin (Rabbit)	Sigma	#S5545

2.5 Oligonukleotide

2.5.1 DNA-Oligonukleotide

Sämtliche Primer für die qPCR wurden mit dem von Applied Biosystems gelieferten Programm Primer Express generiert. Alle übrigen Primer wurden mit Hilfe des Programms primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) designt. Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) bezogen.

Sequenzierungsoligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'
M13	fwd GTAAAACGACGGCCAG rev CAGGAAACAGCTATGAC
pRN3-SEQ	fwd GCTTGCTTGTTCTTTTTGCAG rev ACTCCATTCTGGGTGTTCTTG

Oligonukleotide zur Klonierung spezifischer cDNA / Promotorbereiche

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	
Dkk1OE	fwd TTAGATCTGGAT TTAGACGCTCAGAATGG rev AGCGGCCCGCCAAGTCATCAGAAGGATCATGG	Bgl2 Not1
Dkk1PSU	fwd TTCCCCATCTATTGGTTACTGTG rev GCATGAGTAACTCGTAGTTCATTG	- -
Dkk1PSU-TL	fwd AAGGTACCATTCAAGGCTGAACTTCC rev AAGGTACCGTTCAAGGCTGAACTTCTG	Kpn1 Kpn1
Dkk1PZF	fwd AATTAATAAACAGGCCGCAAC rev TTATTCCTTGAATTGTAGGATGTATTC	- -
Dkk1PZF-TL	fwd AAGGTACCGCGCGTATAAATGAAGC rev AAGGTACCCATGAGCTGTCTGTCTATCAGTG	Kpn1 Kpn1
Dkk3S	fwd CTTTTGGACGGACGAAGGAC rev TCAAGCAATACCGTTTTGGA	- -
FoxQ2OE	fwd CGGGAA TTCCTCTGCGTCAGTTTGCTCAG rev AAAGCGGCCGCGACATGGCTAGCGTGATCCT	EcoR1 Not1
β -Globin/GFP	fwd GGAAGGCCATCCAGCCTC rev GTGCCACCTGACGTCTAAG	- -
ShhPZF	fwd AGCGGAGTTGGGATATTTATTA rev TGGGACTATTATCTGTACTCAATGG	- -

Oligonukleotide für die qPCR

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Produktgröße / T _m	
Aadc	fwd TACATGATCGGGTTCGGTGCT rev GATGACCTCCCAGGCATACGT	102 bp	80 °C
Alx	fwd ACCCACCCTCCGTACCATG rev CTCGGGCTATCTCTTCCCG	104 bp	80 °C
Blimp1	fwd GACGACGAAGGCAAGTTGATC rev TTGAGACGTTTCGTCCATGG	102 bp	80 °C
Brachyury	fwd TGGCAGTATCTCCCTCCTCG rev CCACATGCTGCCGTATTGACT	103 bp	83 °C
Delta*	fwd ACGGAGCTACATGCCTGAAC rev TCACAATGGACCGAATCAGA		
Dkk1	fwd CAGAAAGTCGCATCGTCGTTG rev TTTGCACGGCAGTGTGTAGG	122 bp	81 °C
Dkk3	fwd CAGCGATAAGATGTGCGGC rev TGGCAATGTCCGTCTCGTC	105 bp	83 °C

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Produktgröße / T _m	
Endo16*	fwd GACCGAACGCCGATATAAGA rev GCCATCGTCCCTTTAGTTCA		
Eve	fwd GGAGCATGCAGACATCGACAT rev TGGCCACCGCTCTTAACCT	101 bp	80 °C
Fez	fwd ACCCCACCGTTGTCATGAAT rev CGCAGAACTCGCATATGAATG	107 bp	81 °C
FoxA*	fwd CCAACCGACTCCGTATCATC rev CGTAGCTGCTCATGCTGTGT		
FoxJ1	fwd CAAGCAGACCATGCCAAAGAA rev GGGACGCAGGCTTGTAGCT	107 bp	82 °C
FoxQ2	fwd AACGCTTCCCGTTCTTCAAAG rev CTCCGCTACGTCCAGCCTT	102 bp	80 °C
GataE	fwd TGGCTGGCTACTCGCCATAT rev CGTCCTGCAAAGTTTCCTCC	106 bp	82 °C
Glass	fwd GGGTACGCATGTGTGTCTTCA rev TCAGGCTGCGAACCTCAA	119 bp	80 °C
Goosecoid*	fwd CCCCTACACTGGCTGCCCGATGA rev GCGGGCTAGTAGGTCCATGTGA		
Hes	fwd CCAGAACAGGGCGAGTCAA rev GATGCTCTCGCAATTGGACAT	102 bp	80 °C
Hex	fwd ACTGCAAAGTGGGCGAGTTC rev CAGCACCATAAACACGAAGCA	104 bp	82 °C
Hnf6*	fwd AACGGCTACGACCAATTCAC rev GATGAGGGTGTCCCGATAGA		
Mox	fwd TGAAATGGAAACGCTGCAAA rev GCTAGAGCTTCCGGGTGGTA	101 bp	81 °C
Nkx2.1	fwd CCATTTGTCACCAGTCGCCT rev TCCCCCTGTATTACCCCTC	101 bp	83 °C
Nodal*	fwd GACATCACCAAGATCGTCAAACAG rev ATTCTTGTCGTGGTCAGCTTCT		
Notch*	fwd ACGGAGCCAAGCCTAAGAA rev TCGTCACAGGCAACGAATAA		
OTX	fwd AGCCACGCCCTGCTAAGAA rev GCCGGGCTCCAAATACTGTT	148 bp	82 °C
P19	fwd CAACCCACCGAAGCTGAGAT rev TTCCTGTAGAGCTGGAGCCG	101 bp	82 °C
Pax2	fwd GACGGGCTGGAAGAAACGT rev GCTGGACAACAAGGCACTGAA	104 bp	82 °C

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Produktgröße / T _m	
Pmar1*	fwd GCGTTCAACGACAACCCAGTA rev GGTTGATGAGCAGAGCTTGA		
Prox1	fwd AAGGTTACAGGGATTCCGGAGC rev TTGTGGTGGATACGTGCAAGA	102 bp	80 °C
sFrp1/5	fwd TGCGCTTTCCTCGTTTCCT rev ACCGGTTAACGATGGCGTATA	101 bp	82 °C
Six3	fwd CCTACCGACCCTCTGCTTCTC rev AGGACCACAAAATCGGGC	101 bp	81 °C
SynB	fwd AGGCGATACCGACTCCGTTA rev CATGACACCCACATTGAGCTTT	100 bp	79 °C
Tbx6	fwd CGACCATAATCCTTTCGCCA rev TCCTCGTCCAGCTCATCCA	108 bp	82 °C
Tcf/Lef	fwd GCGAATGCTGGTTACCCAA rev CCTCCCCGAGTCGTAGAGGT	103 bp	82 °C
Tph	fwd CACAGTATGTCCGCCACTCCT rev GCAAACTTCTGTCTGCGAGC	103 bp	81 °C
Ubiquitin*	fwd CACAGGCAAGACCATCACAC rev GAGAGAGTGCGACCATCCTC		
Wnt8*	fwd TGTCGTTTCATTCAAGCCATC rev TATCACTCGCCATTGTTCA		
Z12-1*	fwd AGTCGTCCAGCCATGTCTTT rev AAGCACACCTCGCACCTATC		

*Bereits publizierte qPCR-Primer (<http://sugp.caltech.edu/resources/methods/q-pcr.php>).

2.5.2 Morpholino-Oligonukleotide

Sämtliche Morpholino-Oligonukleotide wurden von Gene-Tools (<http://www.gene-tools.com>) auf Basis der eingeschickten mRNA-Sequenz gegen die ATG-Start-Site designiert und von dort bezogen.

Morpholino	Sequenz 5'-3'
Alx-MO	TAGGAGGAACAACGACCGCCGTCAT
Control-MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA
Dkk1-MO	TCCTTCCTTCTAAAATCGTTGGTAG
Dkk3-MO	CGGTGTCCATAATCCGAACCATCTC
FoxJ1-MO	CGGTTGCGACTTTGGCAGCAGCCAT
FoxQ2-MO	GTTGTCAATGCTGAATAAAGTCATG

Morpholino	Sequenz 5'-3'
Glass-MO	ATGGAGTGTTCCATCATAGCGATTG
Mox-MO	AGTGAGTGTTCCATCATAGCGATTG
sFrp1/5-MO	CACCACCAACACTCGCTCAATCATG
Six3-MO	GGCGATGTTTCTGTCTCCGTCCAAA

2.6 Geräte und Zubehör

Geräte

Name	Hersteller
Brutschrank BK700	Heraeus
Elektrophorese-Kammer	Stratagene
Elektroporator	Biorad
Heizblock	Eppendorf
Magnetrührer	Heidolph
Microinjektor FemtoJet	Eppendorf
Micropipette Puller P-97	Sutter Instruments
Mikroskop LSM510	Zeiss
Mikroskop mit Injektor	Leica
Nanodrop	Nanodrop
pH-Meter	Mettler Toledo
Präzisionswaage	Mettler Toledo
Schüttler	New Brunswick Scientific
Speed Vac	Savant
Thermocycler	MJ Research Inc.
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
UV-Illuminator	Alpha Innotech
Vortexer	Bender & Hobein

Zubehör

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
1L Filter System	Corning Inc.	#431098
15 ml Plastikröhrchen	Corning	#430791
24-Well Cell Culture Platte	Corning Inc.	#3524
50 ml Plastikröhrchen	Greiner	#227261
50 mm Petrischalen	BD Biosciences	#351016
90 mm Petrischalen	Greiner	#633180
96-Well Culture Platte	Greiner	#650185
ABI Prism Optical 96-Well Reaction Plates	Applied Biosystems	#4306737
ABI Prism Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems	#4311971
Deckgläschen	Menzel-Gläser	#BB020020A1
diverse Bechergläser	VWR	
diverse Reaktionsgefäße	Eppendorf	
Gene Pulser Cuvettes	Biorad	#165-2089
Glaskapillare mit Filament	Sutter Instruments	#BF100-78-10
Microloader	Eppendorf	#5242956.003
MicroSpin G-50 Columns	Amersham	#27-5330-01
Objektträger	Menzel-Gläser	#AA0000102E

3. Methoden

3.1 Entwicklungsbiologische Methoden

3.1.1 Haltung der Seeigel

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Seeigel stammen aus Caltech's Kerckhoff Marine Biological Laboratory, Kalifornien, USA. Die Seeigel wurden in mit künstlichem Seewasser gefüllten, geschlossenen Aquarien gehalten. Die Aquarien waren in einem 5 °C Kälteraum aufgestellt und wurden durch eine Standard-Aquariumheizung auf 10 °C erwärmt. Als Futter für die Seeigel diente die Rotalge *Palmaria palmata* sowie die Braunalge *Laminaria saccharina*, welche beide aus der Nordsee bezogen wurden (Fa. Sylter Algenfarm). Die Wasserqualität wurde regelmäßig mittels Nitrit- und Phosphat-Tests überprüft und ggf. ein Wasserwechsel durchgeführt.

3.1.2 Embryonengewinnung

Zum Ablachen wurden adulten Seeigeln 0,75 bis 1 ml einer 0,5 M KCl-Lösung in beide Coelomhöhlen injiziert. Dies ruft die Kontraktion der Gonadenmuskulatur hervor. Die Weibchen, zu erkennen an den orange-gefärbten, in großen Mengen austretenden Eiern, wurden auf mit gefiltertem Seewasser gefüllte 50 ml-Bechergläser gesetzt. Nachdem sich die Eier abgesetzt hatten, wurden sie dreimal mit gefiltertem Seewasser gewaschen. Bei Männchen wurde die austretende weiße Samenflüssigkeit mit einer Pasteurpipette gesammelt und in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert. Dort konnten sie bei 4 °C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

3.1.3 Kultivierung von Seeigelembryonen

Die Samenflüssigkeit wurde mindestens tausendfach in Seewasser verdünnt. Die Eier wurden in den zur Sammlung verwendeten Bechergläsern mit der verdünnten Samenflüssigkeit befruchtet und geschwenkt. Nach einer Minute wurde eine Probe unter dem Mikroskop betrachtet und wenigsten 100 Eier gezählt. Waren mehr als 10% der Eier nicht befruchtet - befruchtete Eier waren an der sich abhebenden Befruchtungsmembran zu erkennen - so wurden die Eier verworfen, da eine synchrone Entwicklung aller Embryonen nicht gewährleistet war.

Die befruchteten Eier wurden bis zu einer Dichte von 1 bis 2×10^7 Eier/l in einem mit gefiltertem Seewasser gefüllten Becherglas gezüchtet. Bei Kulturen, die länger als 15 Stunden gezüchtet wurden, wurden Penicillin (20 U/ml) und Streptomycin (50 g/ml)

hinzugefügt. Die Kulturen wurden bei 16 °C unter ständigem Rühren gehalten. Wurden die Seeigel mit Lithium bzw. Zink behandelt, wurde den Kulturen im Furchungstadium LiCl (30 mM Endkonzentration) bzw. ZnSO₄ (500 µM Endkonzentration) hinzugefügt. Wurden diese Kulturen länger als 21 Stunden gezüchtet, wurde das LiCl bzw. ZnSO₄ herausgewaschen, indem die Embryonen am Boden gesammelt wurden, das LiCl- bzw. ZnSO₄-haltige Seewasser vorsichtig abgenommen und durch frisches künstliches Seewasser ausgetauscht wurde. Nachdem sich die Embryonen wieder am Boden abgesetzt hatten, wurde das Seewasser wieder abgenommen und erneut durch frisches Seewasser ersetzt.

3.1.4 Mikroinjektion von Seeigeleiern

Um die Seeigel-Embryonen während des Injektionsvorgangs in einer festen Position zu halten, wurden zunächst speziell beschichtete Petrischalen hergestellt. Dazu wurde eine 1%ige Protaminsulfat-Lösung hergestellt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Dann wurden die Deckel von 60 mm-Petrischalen mit der Protaminsulfat-Lösung überzogen und für eine Minute inkubiert. Dann wurde die Protaminsulfat-Lösung abgegossen, die beschichteten Schalen mit H₂O dd gespült, anschließend an der Luft getrocknet und bis zur Verwendung bei RT gelagert. Frische Seeigeleier bzw. Spermien wurden wie bereits beschrieben gewonnen (siehe Kapitel 3.1.2). Die frischen Seeigeleier wurden für ein bis zwei Minuten in Zitronensäure-Lösung (3,5 mM Zitronensäure in Seewasser) inkubiert, anschließend zweimal mit Seewasser gewaschen und dann in PABA-Lösung aufgenommen (50 mg PABA auf 150 ml Seewasser). Die beschichteten Platten wurden mit PABA-Lösung gefüllt und die Seeigeleier anschließend mit Hilfe von ausgezogenen Pasteurpipetten in einer Linie aufgereiht. Die auf den Platten fixierten Seeigeleier wurden dann durch Zugabe einiger Tropfen verdünnter Spermien-Lösung befruchtet. Nach Ausbildung der Befruchtungsmembran wurde mit der Injektion begonnen. Dazu wurden zunächst spezielle Injektionskapillaren mit Hilfe des Micropipette Puller und folgenden Einstellungen hergestellt:

Komponente	Einstellung
Heat	585
Pull	150
Velocity	100
Time	150

Anschließend wurden die Kapillaren vorsichtig gebrochen und mit folgender Injektionslösung gefüllt:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Rhodamin (2 %)	0,4 %	2 µl
Salzlösung (1 M KCl)	1,2 M	1,2 µl
Morpholino (1 mM) / mRNA (1 µg/µl)	~ 100-500 µM / ~ 100-500 ng	1-5 µl* / 1-5 µl*
H ₂ O dd		1,8-5,8 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		10 µl

*Abhängig von der gewünschten Morpholino- bzw. mRNA-Endkonzentration

Für die Injektion bediente man sich eines Mikroinjektors mit kalibrierbarer, zeit- und druckgesteuerter Injektion im Nanoliter-Bereich. Der Mikroinjektor wurde so eingestellt, dass das Injektionsvolumen etwa 1/20 eines Eivolumens betrug. Mittels eines Mikromanipulators wurden die Injektionskapillaren stufenlos für die Injektion positioniert. Nach Beendigung der Injektion wurde die PABA-Lösung gegen frisches Antibiotika-haltiges Seewasser ausgetauscht und die Embryonen wie bereits beschrieben kultiviert (siehe Kapitel 3.1.3).

3.1.5 Fixierung der Embryonen

Um die Embryonen für die WISH zu fixieren, wurden sie in 200 ml-Portionen gesammelt, auf 53 µm Nitexmembranen konzentriert bzw. bei kleineren Kulturen mit der Pipette in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt, zweimal mit gefiltertem künstlichem Seewasser gewaschen und anschließend 10 ml Fixierlösung (bzw. 1 ml bei kleineren Kulturen) hinzugegeben. Die Embryonen wurden zwei- bis dreimal aufgewühlt und dann bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen dreimal mit MOPS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen Schritt für Schritt (jeweils eine Waschung mit 25%- bzw. 50%igem Ethanol, anschließend zwei Waschungen mit 70%igem Ethanol) dehydriert. Die fixierten Embryonen wurden dann bei -20 °C in 70%igem Ethanol gelagert.

Wurden die Embryonen für immunhistochemische Untersuchungen fixiert, wurden sie mit einer Pipette in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt, zweimal mit gefiltertem künstlichen Seewasser gewaschen und anschließend entweder 1 ml Fixierlösung hinzugegeben, zwei- bis dreimal aufgewühlt und dann bei RT für 15 Minuten inkubiert (Nachweis von Serotonin), oder 1 ml 100%iger eiskalter Methanol hinzugegeben, zwei- bis dreimal aufgewühlt und dann für zehn Minuten auf Eis inkubiert (Nachweis von SynaptotagminB).

3.1.6 Haltung und Zucht des Zebrabärblings

Die Haltung der Zebrabärblinge erfolgte in einem geschlossenen Aquariumsystem bei 27 °C. Sämtliche Wasserwerte wurden regelmäßig kontrolliert. Als Futter diente herkömmliches Flockenfutter oder Larven des Salinenkrebse *Artemia salina*. Am Vorabend von Injektionstagen wurden die Zebrabärblinge paarweise in Ablaikkammern umgesetzt, wobei Männchen und Weibchen mit einem Gitter getrennt wurden. Am nächsten Morgen wurden die Gitter entfernt und das natürliche Paarungsritual erfolgte. Etwa 30 Minuten nach der Verpaarung wurden die Eier geerntet und mit E3-Puffer gewaschen.

3.1.7 Mikroinjektion von Zebrabärblingsembryonen

Um die Zebrabärblingsembryonen während der Injektion in einer festen Position zu halten, wurden zunächst spezielle Agarose-Platten hergestellt. Dazu wurden pro Injektionsplatte 0,5 g Agarose in 50 ml E3-Puffer gelöst. Anschließend wurden die Petrischalen zur Hälfte mit der Agaroselösung gefüllt. Nach Erhärten der Agarose wurden die Platten mit einer dünnen Schicht Agarose bedeckt und darin Schablonen mit mehreren länglichen Kerben positioniert. Nach dem Trocknen der zweiten Agarose-Schicht und dem Entfernen der Schablone wurden die Zebrabärblingseier mittels Pasteurpipette in die Kerben eingebracht und anschließend gleichmäßig ausgerichtet. Die Injektion erfolgte mit speziellen Injektionskapillaren, die mit Hilfe des Micropipette Pullers und folgenden Einstellungen hergestellt wurden:

Komponente	Einstellung
Heat	550
Pull	80
Velocity	120
Time	120

Die Injektionskapillaren wurden mit der Injektionslösung, die sich wie folgt zusammensetzte, gefüllt:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Phenolrot (100 %)	10 %	1 µl
β-Globin/GFP PCR-Produkt (250 ng/µl)	250 ng	1 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	~ 750-1250 ng	1-8 µl*
H ₂ O dd		0-7 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		10 µl

*Abhängig von der Konzentration des aufgereinigten PCR-Produkts

Die Injektion der Lösung erfolgte in den Dottersack der Embryonen. Mit Hilfe des Mikroinjektors FemtoJet wurde der Druck für die Injektion in Abhängigkeit zu dem

Öffnungsdurchmesser der Injektionskapillaren so geregelt, dass ein konstantes Injektionsvolumen von etwa 1/20 des Embryonenvolumens gewährleistet war. Nach der Injektion wurden die Embryonen für 24 bis 36 Stunden bei 27 °C in Petrischalen in E3-Puffer inkubiert. Zusätzlich wurden nichtinjizierte Zebrabärblingsembryonen als Kontrolle unter gleichen Bedingungen inkubiert.

3.1.8 Screening der injizierten Zebrabärblingsembryonen

Etwa 24 Stunden nach der Injektion wurden zunächst alle abnormal entwickelten Embryonen aussortiert und alle übrigen dechorioniert. Dazu wurden die Embryonen in 10 ml-Bechergläser überführt, der E3-Puffer vollständig entfernt und schließlich mit 5 ml Protease-Lösung (0,4 mg/ml Endkonzentration) für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen vorsichtig mit einer Pasteurpipette auf und ab bewegt, um den Dechorionierungsprozess zu unterstützen. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und die Embryonen zweimal mit E3-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen mit Tricaine betäubt und mit Hilfe des Mikroskops LSM510 ausgezählt und das Expressionsmuster fotografisch dokumentiert.

3.2 Mikrobiologische Standardmethoden

3.2.1 Bakterienkulturen

Das Animpfen von Bakterienstämmen erfolgte entweder aus einer vorhandenen Flüssigkultur, einer Plattenkultur oder einer Bakteriendauerkultur. Die Anzucht einer Flüssigkultur erfolgte in LB-Medium, welches das für das selektive Wachstum erforderliche Antibiotikum (100 µg/ml Endkonzentration) enthielt. Die Kultur wurde dann bei 37 °C über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 225 rpm kultiviert. Plattenkulturen wurden auf LB-Agar, welcher ebenfalls das erforderliche Antibiotikum (100 µg/ml Endkonzentration) enthielt, angelegt. Etwa 200 µl einer Bakterienkultur wurden mit Hilfe eines Spatels ausplattiert und die Agarplatte über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Um eine Blau-Weiss-Selektionierung zu ermöglichen, wurde den Agarplatten 0,3% X-Gal hinzugefügt. Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierzu wurde den Bakterienkulturen Glycerin hinzugefügt (10% Endkonzentration). Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* XL1-Blue für eine Übernachtskultur inokuliert. Am folgenden Tag wurde ein Liter LB-Medium, welches zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, mit 10 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C für ca. zwei Stunden bei 250 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,25 bis 0,50 (entspricht der frühen bis mittleren logarithmischen Wachstumsphase) erreicht war. Anschließend wurde die Kultur für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Jeweils 200 ml der Kultur wurden in einem vorgekühlten Rotor bei 4000 g für 15 Minuten bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, die Zellen im restlichen Glycerin resuspendiert und in 40 µl Portionen aliquotiert. Die Aliquots wurden in einem Ethanol-Trockeneisbad gefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

3.2.3 Transformation von Plasmiden

Elektroporation

Bei der Elektroporation wurden die elektrokompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Dann wurden zu je 40 µl Zellen 1 µl eines aufgereinigten Ligationsansatzes (siehe Kapitel 3.3.8) hinzugefügt. Außerdem wurde zur Kontrolle der Transformation 1 µl des ungeschnittenen Vektors (identische Konzentration wie in den Ligationsansätzen) zu 40 µl elektrokompetenter Zellen gegeben. Die DNA-Zell-Gemische wurden in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt, die Küvetten in die Elektroporationskammer gestellt und der Elektroporator wie folgt eingestellt:

Komponente	Einstellung
Widerstand	200 Ω
Spannung	1,68 kV
Kapazität	25 µF

Nach Auslösen des Pulses wurden sofort 960 µl SOC-Medium auf die Zellen in der Küvette gegeben und mit der Pipette gut gemischt. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend zur Regeneration bei 37 °C und 250 rpm für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Anzucht der Bakterien auf Agarplatten (siehe Kapitel 3.2.1).

Hitzeschock

Bei der Hitzeschock-Transformation wurden die chemischkompetenten *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Zu jeweils 2 µl eines TOPO-Klonierungsansatzes (siehe Kapitel 3.3.8) wurden 50 µl chemischkompetenter Zellen gegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden bei 42 °C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Dann wurden 250 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben, mit der Pipette gut gemischt und zur Regeneration für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen wie bereits beschrieben auf Agarplatten gezüchtet (siehe Kapitel 3.2.1).

3.3 Molekularbiologische Standardmethoden

3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA

Etwa 15 ml einer Bakterienkultur wurden für zehn Minuten bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Plasmid-DNA-Präparation wurde der QIAprep spin Miniprep Kit verwendet. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. 250 µl P2-Puffer wurden hinzugefügt und die Eppendorf-Gefäße vier- bis sechsmal geschwenkt. Die Eppendorf-Gefäße wurden für zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep spin Säule, platziert in einem 2-ml Sammelgefäß, gegeben. Die Gefäße wurden für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert, um restlichen Waschpuffer zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß platziert und 30 µl EB-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einminütiger Inkubation wurde für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3) und bis zur weiteren Benutzung bei 4 °C gelagert.

Isolierung von genomischer DNA

Gefrorene Seeigel- bzw. Zebrabärblingsembryonen wurden mit flüssigem Stickstoff gemischt, in einen vorgekühlten Mörtel überführt und mit einem ebenfalls vorgekühlten Pistill zermahlen. Zu den homogenisierten Zellen wurde 2 ml DNazol hinzugefügt, die entstandene Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend für zehn Minuten bei RT und 10000 g zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde

abgenommen und die DNA durch Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol für 5 Minuten präzipitiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 4000 g für 2 Minuten pelletiert und das Pellet anschließend zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Nach kurzer Lufttrocknung wurde das Pellet in 0,2 ml 8 mM NaOH aufgenommen und durch Zugabe von 0,1 M HEPES auf einen pH-Wert von sieben eingestellt. Die Konzentration der isolierten genomischen DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3) und bis zur Benutzung bei 4 °C gelagert.

Isolierung von Gesamt-RNA

Die Embryonen wurden in einem RNase-freien Eppendorf-Gefäß in 1 ml Trizol gelöst, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Benutzung bei -80 °C gelagert. Für die RNA-Isolierung wurde die Probe bei 60 °C in einem Wasserbad aufgetaut, 100 µl Chloroform hinzugefügt, durch Vortexen gut gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Gefäße wurden dann für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, die obere Phase abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 500 µl eines PCI-Gemisches hinzugefügt. Es wurde erneut gut gemischt und für zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für zehn Minuten luftgetrocknet und in 20 µl RNA Storage Solution aufgelöst. Die Unversehrtheit der RNA wurde per Gelelektrophorese analysiert und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3).

Die gewonnene Gesamt-RNA wurde mit dem TURBO DNA-free Kit wie folgt behandelt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um sie von DNA-Verunreinigungen zu befreien:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
TURBO DNase-Puffer (10 x)	1 x	2 µl
DNase (2 U/µl)	0,04 U	1 µl
Gesamt-RNA	~ 1-10 µg	1-47 µl*
H ₂ O DEPC		0-46 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		50 µl

* Abhängig von der Gesamt-RNA-Konzentration

Nach der Inkubation wurden 5 µl DNase Inactivation Reagent hinzugefügt, der Ansatz für zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend bei 13000 rpm zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde abgenommen, die Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3), aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.2 Fällung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Fällung von DNA/RNA

Die DNA wurde durch Zugabe von Natriumacetat (0,3 M Endkonzentration) und zwei Volumina eiskalten 100%igen Ethanols gefällt. Anschließend wurde bei 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet für 5 Minuten luftgetrocknet und dann in 20 µl Natriumcitrat-Lösung (1 mM) aufgenommen.

Die RNA wurde gefällt, indem zu den Reaktionsansätzen 100 µl mit DEPC behandeltes Wasser, 10 µl 4 M LiCl, 300 µl 100% Ethanol hinzugefügt wurden und mindestens für zwei Stunden bei -4 °C inkubiert wurde. Die Lösung wurde dann bei 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für zehn Minuten wurde der Überstand wieder verworfen, das Pellet für 5 Minuten luftgetrocknet und in 20 µl Natriumcitrat-Lösung (1 mM) gelöst.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Aufreinigung eines Restriktionsansatzes erfolgte mit Hilfe eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-(PCI)-Gemisches (25:24:1, v/v). Zum Restriktionsansatz wurde das gleiche Volumen des PCI-Gemisches hinzugefügt, mit einem Vortexer gemischt und anschließend für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend wie zuvor beschrieben gefällt.

MicroSpin G-50 Säulen

Mittels *in vitro* Transkription hergestellte mRNA (siehe Kapitel 3.3.5) wurde mit Hilfe von MicroSpin G-50 Säulen von störenden Nukleotiden aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen zunächst gevortext und dann für eine Minute bei 3500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die mRNA-Lösung auf das Säulenbett pipettiert, die beladene Säule in ein frisches Eppendorf-Gefäß gesetzt und für weitere zwei Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert.

3.3.3 Gelelektrophorese und Quantifizierung von DNA/RNA

Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA- bzw. RNA-Fragmente wurden je nach Größe in 1 bis 2%igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurden 0,5 bis 1 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und vollständig gelöst. Die Agaroselösung wurde mit 5 µl einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) versetzt, in die Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm gezogen und das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Gelladepuffer versetzt, in die Taschen pipettiert und eine Spannung von 20 V angelegt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA bzw. RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Kamera-Systems dokumentiert. Die Größen- sowie die Mengenbestimmung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten erfolgte über Vergleich der Laufstrecken mit geeigneter DNA- bzw. RNA-Längenmarker (siehe Kapitel 2.1).

Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von wässrigen DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde photometrisch bei 260 nm mit Hilfe des Nano Drop bestimmt. Dabei wurde jeweils 1 µl der zu prüfenden Nukleinsäure-Lösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und die OD_{260} bestimmt. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA und etwa 20 µg/ml bei Oligonukleotiden. Als Leerwert diente DNA- und RNA-freies Wasser.

3.3.4 Restriktionsverdau

Die Plasmide wurden mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme (siehe Kapitel 7.2), entsprechender Puffer und ggf. unter Zugabe von BSA linearisiert. Ein Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Restriktionspuffer (10 x)	1 x	2 µl
BSA (1 mg/ml)	2 µg	2 µl
Enzym		1 µl
Plasmid-DNA	~ 1-5 µg	1-15 µl*
H ₂ O dd		0-14 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		20 µl

* Abhängig von der Konzentration der Plasmid-DNA

Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend wie bereits beschrieben aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.2) und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.3) überprüft.

3.3.5 Reverse und *in vitro* Transkription

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription wird RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die anschließend zur Analyse per PCR (siehe Kapitel 3.3.6) herangezogen werden kann. Die DNA-freie Gesamt-RNA wurde zunächst wie folgt denaturiert:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
dNTPs (10 mM)	2 mM	2 µl
Hexanukleotid-Primer (50 µM)	5 µM	1 µl
DNA-freie Gesamt-RNA	~ 0,25-1 µg	1-7 µl*
H ₂ O DEPC		0-6 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		10 µl

* Abhängig von der Gesamt-RNA-Konzentration

Nach der Inkubation wurden die Reaktionsansätze sofort auf Eis gestellt und folgender Reaktionsmix hinzugefügt:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Reverse Transkriptase-Puffer (5 x)	1 x	4 µl
Salzlösung (25 mM MgCl ₂)	5 mM	4 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	10 U	1,5 µl
RNasin RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 U	0,5 µl
denaturierter Reaktionsansatz		10 µl
Gesamtvolumen pro Ansatz		20 µl

Anschließend wurde für zwei Stunden bei 42 °C inkubiert. Zuletzt wurden 20 µl H₂O DEPC hinzugefügt und die cDNA bis zur Benutzung bei -20 °C gelagert.

Herstellung von RNA-Sonden für die WISH

Bei *in situ* Hybridisierungsanalysen wurden die Transkripte der zu untersuchenden Gene mittels DIG- bzw. FLU-markierter einzelsträngiger antisense RNA-Sonden detektiert (siehe Kapitel 3.4.1). Die Herstellung der markierten RNA-Sonden erfolgte von linearisierter Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.3.4) mit Hilfe der Sp6- bzw. T7-Polymerase, je nach Orientierung der cDNA-Fragmente (siehe Kapitel 7.2), und DIG- bzw. FLU-markierter Uracilnukleotide:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
DIG-/FLU-RNA Labelling Mix (10 x)	1 x	2 µl
Transkriptions-Puffer (10 x)	1 x	2 µl
RNasin RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 U	1 µl
Sp6/T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	1 U	1 µl
linearisierte Plasmid-DNA	~ 1 µg	1-14 µl*
H ₂ O DEPC		0-13 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		20 µl

* Abhängig von der Konzentration der linearisierten Plasmid-DNA

Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und die RNA anschließend wie bereits beschrieben gefällt (siehe Kapitel 3.3.2), die RNA-Konzentration sowie deren Unversehrtheit mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.3) bestimmt, zu einer finalen Konzentration von 50 ng/µl in MOPS-Hybridisierungspuffer verdünnt und bei -20 °C bis zur Benutzung gelagert.

Herstellung synthetischer mRNA

Die für die Mikroinjektion benötigte sense mRNA wurde mit Hilfe des mMESSAGe mMACHINE T3 Kit wie folgt von linearisierter Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.3.4) hergestellt:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
NTP/CAP (2 x)	1 x	10 µl
Transkriptions-Puffer (10 x)	1 x	2 µl
Enzym-Mix (10 x)	1 x	2 µl
linearisierte Plasmid-DNA	~ 1 µg	1-6 µl*
H ₂ O DEPC		0-5 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		20 µl

* Abhängig von der Konzentration der linearisierten Plasmid-DNA

Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, zum Verdau der DNA-Vorlage DNase (2 U/µl Endkonzentration) hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die synthetisierte mRNA wie bereits beschrieben über Micro Spin G-50 Säulen (siehe Kapitel 3.3.2) aufgereinigt, die Konzentration mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.3) bestimmt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Herkömmliche PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Standardmethode, die die präparative wie auch analytische Amplifikation von Nukleinsäuren erlaubt. Zunächst wird durch eine

Temperaturerhöhung auf 96 °C der Doppelstrang thermisch zu einzelsträngiger DNA denaturiert. Im zweiten Schritt wird der Reaktionsansatz auf 50 bis 65 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur kommt es zur spezifischen Hybridisierung der Primer an ihre Komplementärsequenzen auf der Matrize. Nach der Hybridisierung der Primer erfolgt die Synthese von doppelsträngiger DNA von 5' nach 3', ausgehend von den hybridisierten Primern durch die verwendete, thermoresistente Taq-DNA-Polymerase. Die Elongation findet bei Temperaturen von 65 bis 80 °C statt. Durch Auswahl von zwei spezifischen Primern (fwd und rev; siehe Kapitel 2.5.1) wird eine definierte Sequenz amplifiziert. Eine PCR-Reaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von Plasmid-DNA setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Primer fwd (5 µM)	150 nM	1,5 µl
Primer rev (5 µM)	150 nM	1,5 µl
dNTP (10 mM)	0,1 mM	0,5 µl
PCR-Puffer (10 x)	1 x	5 µl
Betaine (5 M)	1,5 M	15 µl
Taq DNA Polymerase (10 U/µl)	0,1 U	0,5 µl
Plasmid-DNA	~ 1 ng	1-5 µl*
H ₂ O dd		21-25 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		50 µl

* Abhängig von der Konzentration der Plasmid-DNA

Der Thermocycler wurde benutzt, um folgendes Programm durchzuführen:

Schritt	T (°C)	t (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	30	1
Denaturierung	96	25	} 30
Hybridisierung	60	10	
Elongation	60	240	
Abkühlung	4	∞	1

Eine PCR-Reaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von genomischer bzw. von cDNA setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Primer fwd (5 µM)	200 nM	2 µl
Primer rev (5 µM)	200 nM	2 µl
dNTP (10 mM)	0,2 mM	1 µl
PCR-Puffer (10 x)	1 x	5 µl
Betaine (5 M)	1,5 M	15 µl
Taq DNA Polymerase (10 U/µl)	0,1 U	1 µl
genomische DNA / cDNA	~ 150 ng	1-5 µl*
H ₂ O dd		19-23 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		50 µl

* Abhängig von der Konzentration der genomischen bzw. cDNA

In diesem Fall wurde der Thermocycler benutzt, um folgendes Programm durchzuführen:

Schritt	T (°C)	t (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	30	} 40
Hybridisierung	55	30	
Elongation	60	240	
Abkühlung	4	∞	1

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Dazu wurden zu einem Volumen des PCR-Ansatzes fünf Volumina PB-Puffer gegeben und gemischt. Das Gemisch wurde dann auf eine in einem 2 ml-Gefäß sitzende QIAquick-Säule gegeben und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 0,75 ml PE-Puffer hinzugefügt und erneut für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde wiederum verworfen und die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und 30 µl EB-Puffer in die Mitte der QIAquick Membran pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation wurde die Säule wiederum für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel (siehe Kapitel 3.3.3) überprüft.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Mit Hilfe der qPCR ist es möglich, Aussagen über Ausgangs-DNA-Mengen zu machen. Es wird eine PCR durchgeführt, bei der aus Gesamt-RNA synthetisierte cDNA (siehe Kapitel 3.3.5) als Vorlage und ein fluoreszierender Farbstoff (z.B. SYBRGreen) verwendet wird, um die Reaktion verfolgen zu können. Der Fluoreszenz-Farbstoff lagert sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA ein. Die Menge an Produkt wird nach jedem Zyklus gemessen. Der Zyklus, bei dem eine bestimmte Produktmenge überschritten wird (threshold), steht im logarithmischen Verhältnis zur Ausgangsmenge. Mit diesem sogenannten C_T - (cycle threshold) Wert und einer Eichreihe kann über einen weiten Bereich absolut quantifiziert werden.

Die Quantifizierung erfolgte in mit ABI Prism Optical Adhesive Covers verklebten ABI Prism Optical 96-Well Reaction Platten. Es wurden pro Verdünnung und Primerpärchen jeweils Triplikate gemessen. Eine PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Primer fwd (5 µM)	0,3 µM	0,6 µl
Primer rev (5 µM)	0,3 µM	0,6 µl
SYBRGreen PCR Mastermix (2 x)	1 x	5 µl
verdünnte cDNA*		2 µl
H ₂ O dd		1,8 µl
Gesamtvolumen pro Ansatz		10 µl

*Abhängig von der bei der cDNA-Synthese eingesetzten Menge Gesamt-RNA

Die Durchführung der qPCR erfolgte im ABI 7900HT unter Verwendung folgenden Programms:

Schritt	T (°C)	t (s)	Zyklen
	50	120	1
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	96	15	
Hybridisierung	65	10	} 40
Elongation	65	50	
Denaturierung	95	15	1
Hybridisierung	65	15	1
Denaturierung	95	15	1

Die Analyse der qPCR (Bestimmung des C_T-Werts, Steigung der Standardkurve) erfolgte mit Hilfe der von Applied Biosystems gelieferten Software SDS 2.1. Die Überprüfung, ob das gewünschte Produkt amplifiziert wurde, erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.3) und durch Aufnahme einer Dissoziationskurve. Die Berechnung der Transkriptzahlen zur Erstellung der zeitlichen Expressionsprofile verschiedener Gene sowie die Bestimmung der Regulation einzelner Gene in perturbierten Embryonen erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode unter Verwendung bekannter Transkriptzahlen des Transkriptionsfaktors *SpZ12-1* und dem Referenzgen *SpUbiquitin* (Kühn, 2005; Minokawa *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1995) wie folgt:

Normalisierung der C_T-Werte und Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -wertes

$$\Delta C_T(\text{SpZ12}) = C_T(\text{SpZ12}) - C_T(\text{SpUbiquitin})$$

$$\Delta C_T(\text{SpGenXY}) = C_T(\text{SpGenXY}) - C_T(\text{SpUbiquitin})$$

$$\Delta\Delta C_T(\text{SpZ12/SpGenXY}) = \Delta C_T(\text{SpZ12}) - \Delta C_T(\text{SpGenXY})$$

Berechnung der Ratio R und der absoluten Transkriptzahl n

$$R(\text{SpGenXY/SpZ12} - 1) = 1,96^{\Delta\Delta C_T(\text{SpZ12/SpGenXY})}$$

$$n(\text{SpGenXY}) = R(\text{SpGenXY/SpZ12}) * n(\text{SpZ12})$$

Die Fehler der absoluten Transkriptzahlen sowie die Fehler der Regulationsdaten sind in den zeitlichen Expressionsprofilen bzw. in den Regulationsgrafiken dargestellt

als Durchschnittsfehler der Standardabweichung basierend auf mindestens zwei qPCR-Messungen auf unabhängig voneinander hergestellten cDNA-Batches (siehe Kapitel 7.3).

3.3.7 Sequenzierung

Das Prinzip der Cycle-Sequencing-Methode ist ähnlich dem der PCR: Anhand von DNA-Matrizen (z.B. Plasmid-DNA) werden in einer zyklischen, enzymatischen Reaktion *in vitro* DNA-Fragmente erzeugt. Reaktionskomponenten sind Nukleotide, Polymerase, Reaktionspuffer, Matrizen-DNA und ein Primer. Anders als bei der PCR sind außer dNTPs auch Dideoxy-Nukleotide (ddNTPs) vorhanden, nach deren Einbau die Strangsynthese abgebrochen wird. Da zu jedem Zeitpunkt der Strangsynthese der Zufall entscheidet, ob ein normales (dNTP) oder ein modifiziertes Nukleotid (ddNTP) eingebaut wird, entstehen insgesamt DNA-Fragmente jeder Länge, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit einem ddNTP enden. An die ddNTPs sind entsprechend ihrer Basen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden, welche bei der automatischen Sequenz-Gelelektrophorese durch Anregung mit Laserlicht detektiert werden. Eine Sequenzierreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Primer (10 µM)	2 µM	2 µl
BigDye Terminator Mix (5 x)	1 x	2 µl
Plasmid-DNA	~ 125 ng	1-6 µl*
H ₂ O dd		0-5 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		10 µl

* Abhängig von der Konzentration der Plasmid-DNA

Der Thermocycler wurde benutzt, um folgendes Programm durchzuführen:

Schritt	T (°C)	t (s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	60	1
Denaturierung	96	20	} 25
Hybridisierung	60	10	
Elongation	60	240	
Abkühlung	4	∞	1

Zur Aufreinigung wurden zu jeder Reaktion 25 µl 100% Ethanol hinzugefügt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jeweils 100 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und erneut für 30 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, wiederum jeweils 100 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und für weitere 30 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in einer Speed vac für 10 Minuten getrocknet und der Servicegruppe für Sequenzierungen in unserem Institut zum Sequenzieren mit dem ABI PRISM® 377 DNA Sequenzierautomaten übergeben. Der ABI PRISM® 377 DNA Sequenzierautomat analysiert automatisch mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Moleküle. Nachdem die Proben auf das Systemgel gegeben wurden, findet automatisch eine Gelelektrophorese, Laserdetektion und Computeranalyse statt.

3.3.8 Klonierung

Herkömmliche Klonierung

Etwa 10 µg Vektor-DNA wurden mit entsprechenden Enzymen wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.3.4) linearisiert. Um eine Eigenligation des Vektors zu verhindern, wurden nach dem Verdau des Vektors dessen Enden mit Hilfe des Enzyms CIP dephosphoryliert. Dazu wurde nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsansatzes (75 °C für 20 Minuten) 1 µl CIP (10 U/µl) hinzugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Um evtl. noch vorhandenen ungeschnittenen Vektor vom geschnittenen Expressionsvektor zu trennen, wurde eine LMP-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits aus dem Gel isoliert. Dazu wurde die gesuchte DNA-Bande sauber mit einem Skalpell aus dem Gel unter schwacher UV-Bestrahlung ausgeschnitten, das Gewicht des Gelstücks in vortarierten Eppendorf-Gefäßen bestimmt, das dreifache Volumen QG-Puffer hinzugegeben, ordentlich gemischt und für 10 Minuten bei 50 °C unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Das Gemisch wurde dann auf eine in einem 2 ml-Gefäß sitzende QIAquick-Säule gegeben und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 500 µl QG-Puffer hinzugefügt und erneut für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 0,75 ml PE-Puffer hinzugefügt und die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Durchfluß wurde wiederum verworfen und die Säule erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und 30 µl EB-Puffer in die Mitte der QIAquick Membran pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation wurde die Säule wiederum für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der aufgereinigte Vektor wurde mittels Agarosegel überprüft sowie die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3) und bis zur Benutzung bei 4 °C gelagert.

Die zu klonierenden Genbereiche wurden mittels PCR und geeigneten Primern, die Linker mit geeigneten Restriktionsschnittstellen besaßen (siehe Kapitel 2.5.1), amplifiziert und aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.6). Anschließend wurden die Fragmente mit entsprechenden Enzymen verdaut (siehe Kapitel 3.3.4), die Restriktionsansätze nach der PCI-Methode aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.2), per Gelelektrophorese überprüft und photometrisch die Konzentration der einzelnen geschnittenen Amplifikate bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3). Der präparierte Vektor und das entsprechende Insert wurden dann in einer Ligationsreaktion, die sich wie folgt zusammensetzte, zusammengefügt:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
T4 DNA Ligase Puffer (10 x)	1 x	2 µl
T4 DNA Ligase (20 U /µl)	1 U	1 µl
präparierte Vektor-DNA	~ 50 ng	1-16 µl*
präpariertes PCR-Produkt	5 x n(Vektor)	1-16 µl*
H ₂ O dd		0-15 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		20 µl

* Abhängig von den Konzentrationen der Vektor-DNA und der PCR-Produkte

Als Negativkontrolle wurde außerdem ein Ansatz durchgeführt, bei dem anstelle der Insert-Lösung H₂O dd eingesetzt wurde. Alle Ligationsansätze wurden über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden sämtliche Ligationsansätze nach der PCI-Methode aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.2). Zusätzlich wurde bei der Fällung jedoch zu jedem Ansatz 3 µl 0,5% LPA hinzugefügt, um eine vollständige Fällung der geringen Menge DNA zu gewährleisten. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden jeweils in 3 µl H₂O dd aufgenommen und bis zur Transformation (siehe Kapitel 3.2.3) bei -20 °C gelagert.

TOPO-Klonierung

Bei der TOPO-Klonierung macht man sich zu Nutze, dass durch die Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte aufgrund der terminalen Transferaseaktivität der Taq-Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin am 3'-Ende besitzen. Dementsprechend besitzt der pCR II-TOPO-Vektor einen 3'-Desoxythymidin-Überhang, und liegt linearisiert mit kovalent gebundener Topoisomerase I an den 3'-Enden vor. Dies ermöglicht eine einfache und effiziente Ligation des PCR-Inserts mit dem Vektor. Ein TOPO-Klonierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
Salzlösung (1,2 M NaCl / 0,06 M MgCl ₂)	0,2 M / 0,01 M	1 µl
pCRII Vektor (10 ng/µl)	10 ng	1 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt		1-4 µl*
H ₂ O dd		0-3 µl*
Gesamtvolumen pro Ansatz		6 µl

* Abhängig von der Konzentration des PCR-Produkts

Anschließend wurde der Ansatz für 5 bis 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz wie bereits beschrieben transformiert (siehe Kapitel 3.2.3).

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Whole-mount *in situ* Hybridisierung (WISH)

Die *in situ* Hybridisierung ist eine wichtige Methode, die die Lokalisation von Nukleinsäuren in z.B. Gewebeproben erlaubt. Im Gegensatz zum Southern- oder Northern-Blot wird bei der *in situ* Hybridisierung das Hybridisierungssignal nicht an einer Membran visualisiert, sondern direkt innerhalb eines biologischen Präparats. Bei der WISH dient ein ganzer Organismus (z.B. ein Embryo) als Vorlage für die Hybridisierung. Sie wird vor allem zur Detektion von mRNA benutzt, um örtliche und zeitliche Expressionsmuster zu untersuchen. Die Visualisierung von Genexpressionsmustern in Embryonen ist eine bedeutende Technik für die molekulare Analyse der Embryonalentwicklung. Solche Muster werden exakt aufgedeckt durch *in situ* Hybridisierung gegen mRNA. Diese Technik wird bereits seit 1980 sowohl in der Zell- als auch Entwicklungsbiologie benutzt und ist aufgrund ihrer Sensitivität und der schnellen Produktion von spezifischen Proben von geklonter DNA oder durch Synthese von Oligonukleotiden weit verbreitet.

Für die WISH wurde ein 50 °C-Brutschrank sowie 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit DEPC behandeltem Wasser präpariert und autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen (z.B. MOPS-Lösungen) wurden mit Hilfe des 1L-Filter-systems steril filtriert. Alle Waschungen wurden in Eppendorf-Gefäßen in einem Volumen von 1 ml und RT durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben. Wurden injizierte Embryonen verwendet, wurde die WISH aufgrund der geringen Anzahl der Embryonen in 96-Well-Platten und in einem Volumen von 200 µl durchgeführt. Die dehydrierten in 70%igem Ethanol gelagerten Embryonen wurden dreimal mit MOPS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Lösung zweimal durch MOPS-Hybridisierungspuffer ausgetauscht und die Embryonen über Nacht bei 50 °C

vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Für die Hybridisierung wurde der MOPS-Hybridisierungspuffer durch MOPS-Hybridisierungspuffer, welcher die DIG- bzw. FLU-markierte RNA-Probe (0,25 ng/µl Endkonzentration) enthielt, ersetzt und die Embryonen für eine Woche bei 50 °C inkubiert. Die Embryonen wurden anschließend fünfmal mit MOPS-Waschpuffer gewaschen und dann für drei Stunden in MOPS-Hybridisierungspuffer bei 50 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Daraufhin erfolgten drei Waschungen mit MOPS-Waschpuffer. Die Embryonen wurden in Blockierlösung 1 für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Blockierlösung 2 ersetzt und für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde durch Antikörperlösung (Anti-DIG/FLU-AP-Antikörper) ausgetauscht und die Embryonen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurden die Embryonen über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden fünfmal mit MOPS-Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Embryonen wurden dann für jeweils 5 Minuten mit AP-Puffer gewaschen, anschließend der AP-Puffer durch Färbelösung ersetzt und die Embryonen in eine 24-Well-Platte überführt. Die Platte wurde im Dunkeln gelagert und die Farbreaktion regelmäßig überprüft. Nach vollständiger Farbentwicklung wurde die Reaktion gestoppt, indem zweimal mit MOPS-Waschpuffer gewaschen wurde. Zur Stabilisierung der Embryonen wurden diese anschließend in MOPS-Fixierpuffer über Nacht inkubiert. Nach Inkubation wurde zweimal mit MOPS-Waschpuffer, anschließend mit 25% Glycerin/MOPS-Waschpuffer und 50% Glycerin/MOPS-Waschpuffer gewaschen. Bis zur Photodokumentation wurden die Embryonen bei 4 °C in 50% Glycerin/MOPS-Waschpuffer gelagert.

3.4.2 Doppel-WISH

Die Doppel-WISH ermöglicht die gleichzeitige Detektion zweier verschiedener mRNA. Die Durchführung entspricht der der einfachen WISH (siehe Kapitel 3.4.1) in 96-Well-Platten mit folgenden Modifikationen unter Verwendung des TSA Plus Fluorescence Kits: Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten RNA-Sonde (0,25 ng/µl Endkonzentration) und einer FLU-markierten RNA-Sonde (0,5 ng/µl Endkonzentration). Nach Inkubation mit der Antikörperlösung (Anti-DIG-POD-Antikörper) bei 4 °C über Nacht wurde dreimal für 15 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit einer Cy2-Färbelösung (1:400 in TSA Working Solution) für 15 Minuten gefärbt. Dann wurden die Embryonen fünfmal für jeweils 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Dann folgte die Inaktivierung des ersten

Antikörpers durch Inkubation in 1% H₂O₂/TBST-Puffer für 5 Minuten, gefolgt von einer Waschung mit TBST-Puffer und einer Inkubation in der Inaktivierungslösung für 5 Minuten. Nach der Inaktivierung wurden die Embryonen über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden fünfmal mit TBST-Puffer gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C erneut in Antikörperlösung (Anti-FLU-POD-Antikörper) inkubiert. Die Detektion der zweiten RNA-Probe erfolgte gemäß der ersten, jedoch mit einer Cy3-Färbelösung (1:400 in TSA Working Solution). Nach den fünf Waschungen mit TBST-Puffer wurden die Embryonen mit 25% Glycerin/TBST-Puffer und anschließend mit 50% Glycerin/TBST-Puffer gewaschen und darin bis zur Photodokumentation bei 4 °C gelagert.

3.4.3 Immunohistochemie

Alle Waschungen wurden in 96-Well-Platten in einem Volumen von 200 µl und RT durchgeführt. Die fixierten Embryonen (siehe Kapitel 3.1.5) wurden dreimal mit PBST-Puffer gewaschen und zum Blocken in 5% Schafsserum/PBST-Puffer für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper. Zum Nachweis von Serotonin wurde der Anti-Serotonin-Antikörper (1:1000 in PBST-Puffer), zum Nachweis von Synaptotagmin der Anti-1E11-Antikörper (1:10 in PBST-Puffer) verwendet. Nach der Primärantikörperinkubation folgten drei Waschungen mit PBST-Puffer und die Inkubation eines entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (1:400 in PBST-Puffer) für zwei Stunden. Nach Inkubation wurde dreimal mit PBST-Puffer gewaschen, anschließend mit 25% Glycerin/PBST-Puffer und 50% Glycerin/PBST-Puffer gewaschen. Bis zur Photodokumentation wurden die Embryonen bei 4 °C in 50% Glycerin/PBST-Puffer gelagert.

3.4.4 Simultane WISH und Immunohistochemie

Die Durchführung entspricht der des herkömmlichen immunologischen Nachweises (siehe Kapitel 3.4.3). Anstelle eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers wird jedoch ein entsprechender HRP-gekoppelter Antikörper benutzt. Die Visualisierung erfolgte wie die Doppel-WISH mit Hilfe des TSA Plus Fluorescence Kits. Alle Waschungen wurden in 96-Well-Platten in einem Volumen von 200 µl und RT durchgeführt. Die fixierten Embryonen (siehe Kapitel 3.1.5) wurden dreimal mit PBST-Puffer gewaschen und zum Blocken in 5% Schafsserum/PBST-Puffer für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht mit

dem Primärantikörper. Nach der Primärantikörperinkubation folgten drei Waschungen mit PBST-Puffer und die Inkubation eines entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:400 in PBST-Puffer) für zwei Stunden bei RT. Anschließend wurde dreimal für 15 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und mit einer Cy2-Färbelösung (1:400 in TSA Working Solution) für 15 Minuten gefärbt. Dann wurden die Embryonen fünfmal für jeweils 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Um die spätere *in situ* Hybridisierung zu erleichtern, wurden die Embryonen mit Proteinase K (1 µg/ml Endkonzentration) behandelt und für 20 Minuten in 4% PFA/TBST-Puffer inkubiert. Anschließend folgte eine wie oben beschriebene *in situ* Hybridisierung (siehe Kapitel 3.4.2). Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG- bzw. FLU-markierten RNA-Sonde (1 µg/µl Endkonzentration). Die Detektion erfolgte mit einer Cy3-Färbelösung (1:400 TSA Working Solution). Die Lagerung der Embryonen bis zur Photodokumentation fand wiederum bei 4 °C in 50% Glycerin/PBST-Puffer statt.

3.5 Bioinformatische Methoden

3.5.1 Phylogenetische Analyse

Mit Hilfe des Programms ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) wurden die Aminosäuresequenzen der Dickkopf-Proteine aus verschiedenen Organismen (siehe Kapitel 7.1) aligniert und anschließend unter Verwendung der neighbour joining (NJ)-Methode (Saitou&Nei, 1987) phylogenetisch untersucht. Beim NJ-Verfahren handelt es sich um ein Distanzverfahren, das auf Evolutionsmodellen bzw. Aminosäure-Substitutionsmatrizen basiert. Dabei werden unter Zuhilfenahme von Evolutionsmodellen zwischen allen Sequenzpaaren eines multiplen Alignments die evolutionären Distanzen ermittelt. Die erhaltene Distanzmatrix bildet die Grundlage der Baumkonstruktion. Um die statistische Aussagekraft des phylogenetischen Stammbaums zu maximieren, wurde das Bootstrap-Verfahren (Felsenstein, 1992) angewendet. Der originale Datensatz bildet die Basis des Bootstraps. Von diesem werden 1000 Pseudoreplikate angelegt. Indem Spalten des originalen Alignments zufällig ausgewählt und neu zusammengestellt werden, wird ein neues Pseudoreplikat gebildet. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der ursprüngliche Datensatzumfang erreicht ist. Die graphische Auswertung des Stammbaums erfolgte unter Verwendung des Programms Njplot (Perrière&Gouy, 1996).

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Dickkopf-Gene

4.1.1 Analyse der Dickkopf-Proteinsequenzen

Sowohl die abgeleitete Proteinsequenz des in einer früheren Arbeit isolierten *SpDkk1*-Klons (Kühn, 2005) als auch die vorhergesagte Sequenz des Dkk3-Proteins (siehe Kapitel 7.1) wurden auf charakteristische Merkmale der Dickkopf-Familie (siehe Kapitel 1.2.2) hin untersucht. Zum einen wurde mit Hilfe des Programms SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>) nach N-terminalen Signalsequenzen gesucht und zum anderen mittels Sequenzalignment mit bekannten Proteinen der Dickkopf-Familie nach konservierten Bereichen gesucht.

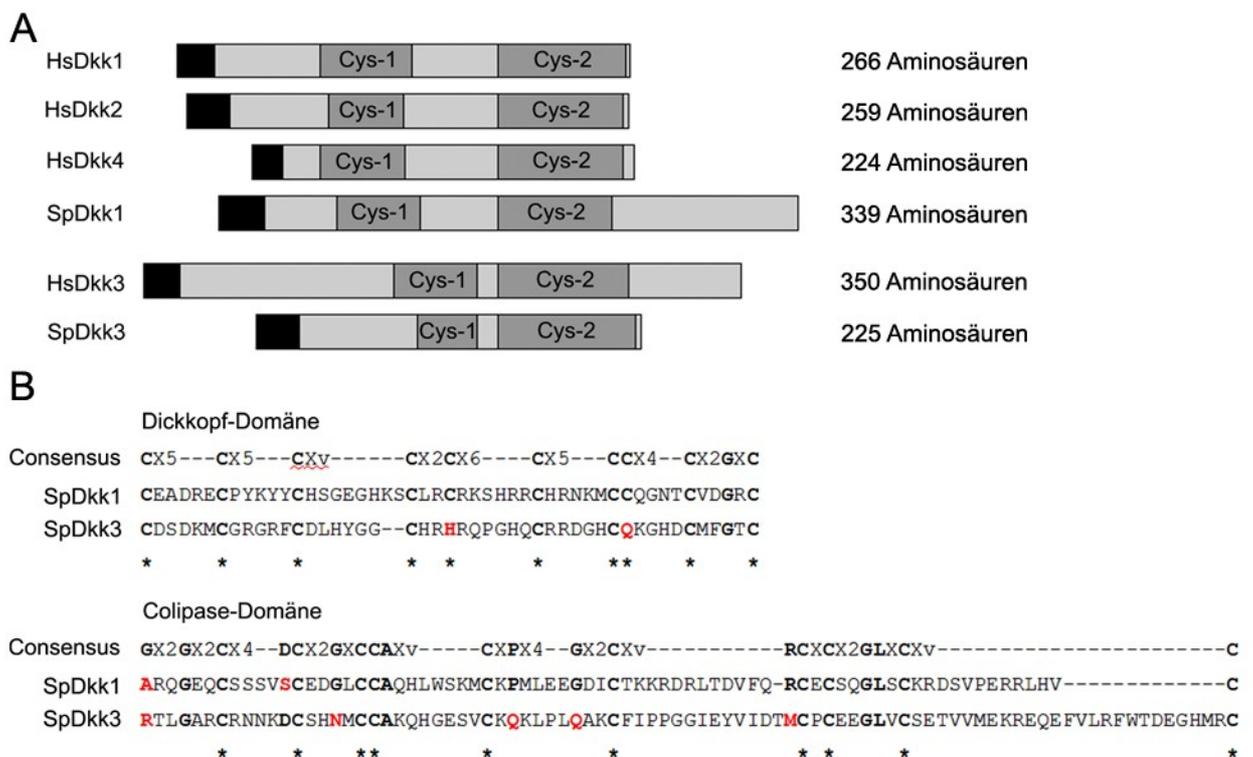


Abb. 13: „Struktureller Aufbau der Dickkopf-Proteine.“

Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der humanen (Hs: *Homo sapiens*) und der Seeigel- (Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*)-Dickkopf-Proteine (A). Dickkopf-Proteine sind charakterisiert durch eine N-terminale Signalsequenz (schwarz) und zwei Cystein-reiche Domänen (dunkelgrau, Cys-1/Cys-2). Vergleich der Cystein-reichen Domänen mit den Consensus-Sequenzen der Dickkopf (Cys-1)- und Colipase (Cys-2)-Domäne (B), von der Consensus-Sequenz abweichende Aminosäuren sind rot dargestellt. Wichtigstes Merkmal der beiden Domänen sind die jeweils zehn konservierten Cysteinreste (*).

Das Programm SignalP findet in beiden Proteinsequenzen eine N-terminale Signalsequenz. Innerhalb der Dkk1-Sequenz befindet sich nach dem Glycin an der 27. Position eine proteolytische Schnittstelle zum Abtrennen des Signalpeptids und in der

Dkk3-Sequenz nach dem Alanin an der 25. Position (Abb. 13, A). Mit Hilfe des Sequenzalignments lassen sich in beiden Proteinsequenzen jeweils zwei konservierte Bereiche (Cys-1 und Cys-2) identifizieren (Abb. 13, A). In der Dkk1-Sequenz ist der erste konservierte Bereich 49 Aminosäuren lang und reicht von der 70. bis zur 118. Position und der zweite konservierte Bereich ist 67 Aminosäuren lang und reicht von der 164. bis zur 230. Position (Abb. 13, A). Beide konservierten Domänen besitzen jeweils zehn Cysteinreste. Weiterhin ist die erste konservierte Domäne identisch mit der Consensus-Sequenz für die Dickkopf (Cys-1)-Domäne und die zweite nahezu identisch mit der Consensus-Sequenz für die Colipase (Cys-2)-Domäne (Abb. 13, B; Glinka *et al.*, 1998; Kühn, 2005). Die Region zwischen den beiden Domänen ist 45 Aminosäuren lang. In der Proteinsequenz von Dkk3 befindet sich die erste konservierte Domäne zwischen der 83. und der 129. Position und ist demnach 47 Aminosäuren lang, und die zweite Domäne hat eine Länge von 81 Aminosäuren und liegt zwischen der 142. und der 222. Position (Abb. 13, A). Die erste konservierte Domäne in der Dkk3-Sequenz ist ebenfalls nahezu identisch mit der Consensus-Sequenz für die Dickkopf-Domäne. Anstelle des fünften Cysteinrestes findet man jedoch einen Histidinrest und anstelle des achten Cysteinrestes einen Glutaminrest (Abb. 13, B). Die zweite konservierte Domäne wiederum ähnelt stark der Consensus-Sequenz für die Colipase-Domäne. Man findet alle zehn beschriebenen Cysteinreste (Abb. 13, B; Glinka *et al.*, 1998). An fünf Positionen findet man jedoch von der Consensus-Sequenz abweichende Aminosäuren. An der ersten Stelle der konservierten Domäne befindet sich ein Argininrest anstatt eines Alaninrests, an der 16. Position befindet sich ein Asparaginrest anstelle eines Glycinrests, das Prolin an der 30. Position ist durch ein Glutamin ersetzt, an der 35. Position befindet sich ein Glutaminrest anstelle eines Glycinrests und an der 52. Position liegt anstelle eines Arginins ein Methionin vor (Abb. 13, B). Im Gegensatz zur Linker-Region in der Proteinsequenz von Dkk1 besteht die Region zwischen den beiden konservierten Domänen in der Sequenz von Dkk3 lediglich aus 12 Aminosäuren.

4.1.2 Phylogenetische Analyse der Dickkopf-Gene

Um die phylogenetische Beziehung zwischen Dkk1 und Dkk3 aus dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* und anderen Proteinen der Dickkopf-Familie in anderen Organismen zu untersuchen, wurde ein Stammbaum unter Verwendung der vollständigen Proteinsequenzen (siehe Kapitel 7.1) mit Hilfe des NJ-Verfahrens (siehe Kapitel 3.5.1) erstellt.

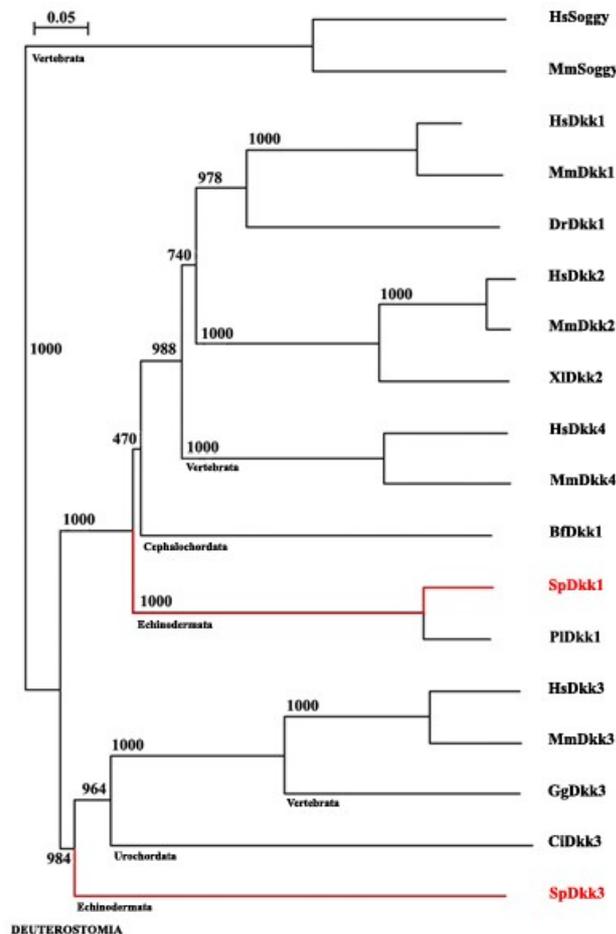


Abb. 14: „Phylogenetischer Stammbaum der Dickkopf-Proteine.“

Phylogenetischer Vergleich der Seeigel-Proteinsequenzen (Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*) von Dkk1 und Dkk3 (rot) mit den Sequenzen von weiteren Proteinen der Dickkopf-Familie (Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Dr: *Danio rerio*; Xi: *Xenopus laevis*; Bf: *Branchiostoma floridae*; Pl: *Paracentrotus lividus*; Gg: *Gallus gallus*; Ci: *Ciona intestinalis*) innerhalb des Überstammes der Deuterostomia. Die Proteinsequenzen von humanem und murinem Soggy dienten als Fremdgruppe.

Der Stammbaum (Abb. 14) zeigt, dass sich die Familie der Dickkopf-Proteine in drei Untergruppen spaltet. Die eine Gruppe beinhaltet lediglich die Soggy-Proteine, eine weitere umfasst sämtliche Dkk3-Proteine und die dritte Gruppe schließlich die Dkk1-, Dkk2- und Dkk4-Proteine. Diese spaltet sich später in die Gruppe der Dkk1- und Dkk2-Proteine sowie die Gruppe der Dkk4-Proteine. Zuletzt teilen sich auch die Dkk1- und Dkk2-Proteine in getrennte Gruppen auf. Die Dkk1-Proteine aus den beiden Seeigelarten (Abb. 14, rot) werden in die Gruppe der Dkk1-, Dkk2- und Dkk4-Proteine einsortiert. Innerhalb dieser Gruppe liegen sie noch vor dem Dkk1-Protein von Amphioxus und damit noch vor der weiteren Auftrennung der Gruppe in die einzelnen Dkk1-, Dkk2- und Dkk4-Gruppen. Auch in der Gruppe der Dkk3-Proteine liegt Dkk3 aus dem Seeigel (Abb. 14, rot) direkt am Ursprung.

4.1.3 Expressionsmuster und -profile der Dickkopf-Gene

In einer früheren Arbeit wurde ein *SpDkk1*-cDNA-Klon isoliert. Mit Hilfe dieses cDNA-Klons wurde eine antisense RNA-Hybridisierungssonde hergestellt und mit dieser durch WISH das Expressionsmuster von *SpDkk1* ermittelt sowie durch qPCR ein zeitliches Expressionsprofil erstellt (Kühn, 2005). Zudem wurde ein ca. 500 bp-großes Fragment von *SpDkk3* mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (Dkk3S, siehe Kapitel 2.5.1) von genomischer DNA amplifiziert. Mit diesem Fragment wurde eine weitere antisense RNA-Hybridisierungssonde hergestellt und mittels WISH wurde das Expressionsmuster während der Embryogenese und durch qPCR ein zeitliches Expressionsprofil von *SpDkk3* bestimmt.

Expression von SpDkk1

Eine spezifische Expression von *SpDkk1* kann erstmalig im frühen Blastula-Stadium (12 Stunden nach der Befruchtung) in der Vegetalplatte, aus der das spätere Endomesoderm entsteht, eines Embryos detektiert werden (Abb. 15, A). Auch im späten Blastula-Stadium bleibt die Expression von *SpDkk1* auf diesen Bereich beschränkt (Abb. 15, B). Mit Beginn der Gastrulation (23 Stunden nach der Befruchtung) ist die Expression von *SpDkk1* nicht nur im invaginierenden Endomesoderm zu finden, sondern auch schwach im apikalen Ektoderm (Abb. 15, C). Mit voranschreitender Gastrulation wird die Expression von *SpDkk1* im apikalen Ektoderm stärker, die Expression im Endomesoderm begrenzt sich dagegen auf die Darmspitze (Abb. 15, D). In der Prism-Larve (56 Stunden nach der Befruchtung) ist

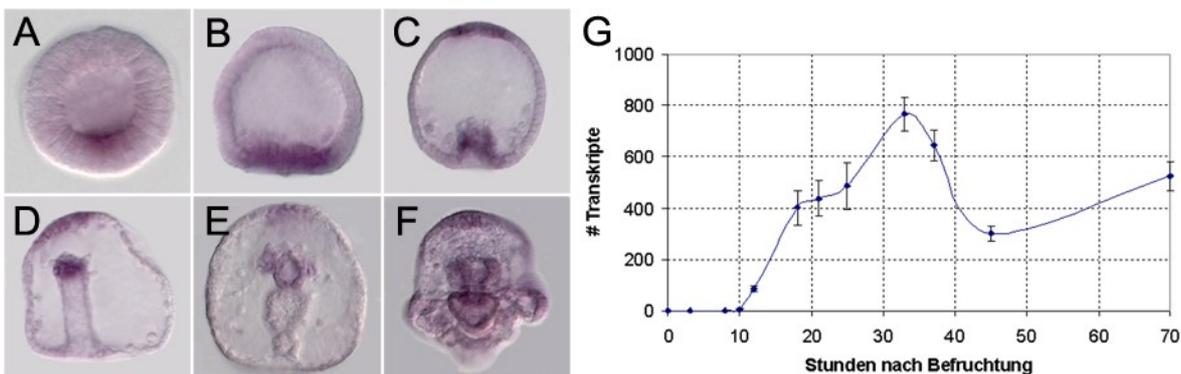


Abb. 15: „Expression von *SpDkk1*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpDkk1* in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Strongylocentrotus purpuratus* (A-F, Kühn, 2005): Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), frühes Gastrula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), Prism-Larve (E) und Pluteus-Larve (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpDkk1* (G).

SpDkk1 weiterhin in der Darmspitze, die wenig später mit dem oralen Ektoderm die Mundöffnung bildet, und im apikalen Ektoderm exprimiert (Abb. 15, E). In der Pluteus-Larve findet man neben der Expression am Mund sowie im apikalen Ektoderm der Larve eine schwache Expression in den sich entwickelnden Armen (Abb. 15, F). Übereinstimmend mit dem Ergebnis der WISH sind durch qPCR das erste Mal *SpDkk1*-Transkripte 12 Stunden nach der Befruchtung detektierbar (ca. 80 Transkripte pro Embryo, Abb. 15, G). In den folgenden Stunden steigt die Anzahl der Transkripte stark auf etwa 400 Transkripte pro Embryo an. Bis 24 Stunden nach der Befruchtung bleibt die Anzahl relativ konstant und steigt anschließend weiter, bis sie 33 Stunden nach der Befruchtung einen Höchststand von 800 Transkripten pro Embryo erreicht. Mit Ende der Gastrulation (45 Stunden nach der Befruchtung) sinkt die Anzahl der *SpDkk1*-Transkripte auf etwa 300 pro Embryo. Danach steigt die Anzahl der Transkripte wieder kontinuierlich an. In der Pluteus-Larve können mittels qPCR ca. 500 Transkripte detektiert werden (Abb. 15, G).

Expression von *SpDkk3*

Ein eindeutiges Signal kann zum ersten Mal in der frühen Blastula (12 Stunden nach der Befruchtung) im apikalen Ektoderm detektiert werden. Während der gesamten Embryonalentwicklung bleibt die Expression von *SpDkk3* auf diesen Bereich beschränkt (Abb. 16. B-F).

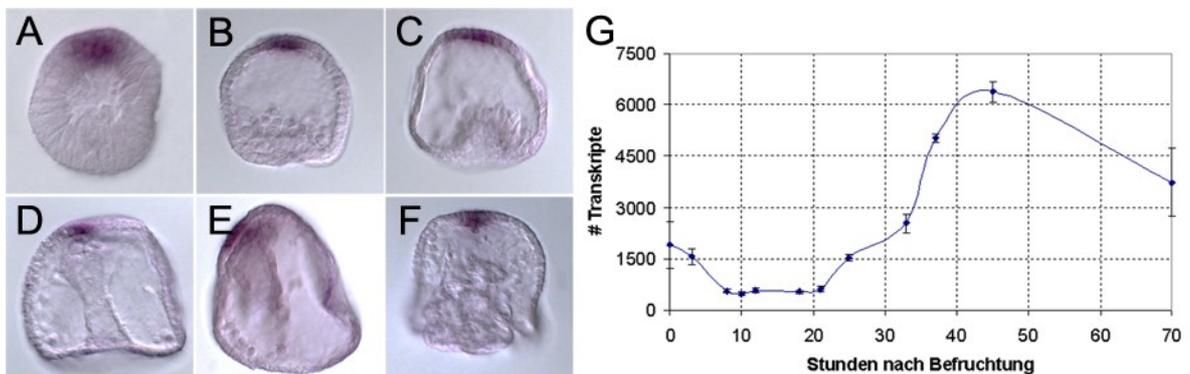


Abb. 16: „Expression von *SpDkk3*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpDkk3* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), frühes Gastrula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), spätes Gastrula-Stadium (E) und Pluteus-Larve (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpDkk3* (G).

Obwohl mittels WISH vor der frühen Blastula kein Signal detektiert werden kann, zeigt die qPCR-Analyse, dass *SpDkk3* maternal exprimiert wird. So finden sich ca. 2000 Transkripte in einer unbefruchteten Eizelle (Abb. 16, G). Anschließend sinkt die

Transkriptzahl auf etwa 500 mRNA-Moleküle pro Embryo ab. 21 Stunden nach der Befruchtung steigt die *SpDkk3*-Transkriptzahl wieder an, bis 45 Stunden nach der Befruchtung ein Maximum von 6000 Transkripten pro Embryo erreicht wird. Im weiteren Verlauf sinkt die Anzahl der *SpDkk3*-mRNA-Moleküle auf etwa 3750 Transkripte pro Embryo (Abb. 16, G).

4.2 Funktionsanalyse von *SpDkk1*

4.2.1 Regulation von *SpDkk1* durch Lithium und Zink

Die Expression von *SpDkk1* im endomeso- und ektodermalem Gewebe deutet darauf hin, dass *SpDkk1* an der Etablierung der animal-vegetalen Achse beteiligt ist. Daher wurde die Expression von *SpDkk1* mittels WISH als auch qPCR sowohl in vegetalisierten als auch animalisierten Embryonen untersucht, um zu prüfen, ob *SpDkk1* an der Achsenbildung des Embryos beteiligt ist. Vegetalisierte Embryonen können durch Behandlung mit Lithium hergestellt werden. In vegetalisierten Embryonen ist das endomesodermale Gewebe auf Kosten von ektodermalem Gewebe stark vermehrt. Dabei werden sowohl PMCs als auch SMCs normal geformt, aber nicht ordnungsgemäß orientiert. Eine Behandlung mit Zink führt dagegen zu vermehrtem ektodermalem Gewebe auf Kosten von Endoderm und SMCs. Die Bildung von PMCs bleibt in mit Zink behandelten Embryonen unbeeinflusst (siehe Kapitel 1.1.1).

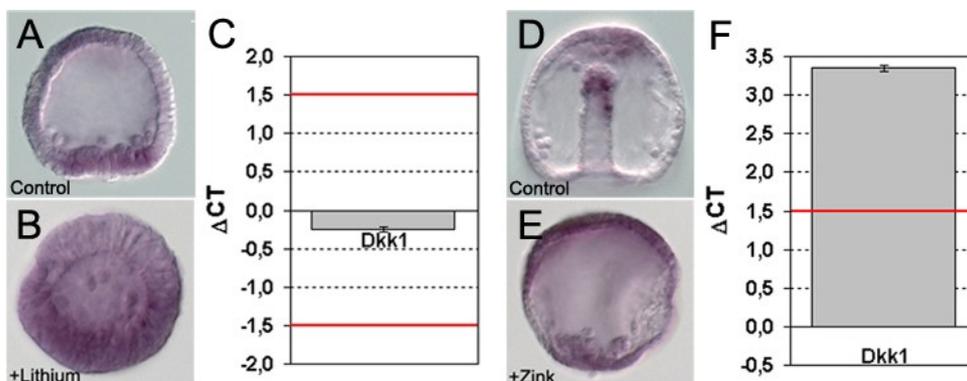


Abb. 17: „Expression von *SpDkk1* in Li- bzw. Zn-behandelten Embryonen.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpDkk1* in Li- (B) bzw. Zn-behandelten Embryonen (E) im späten Blastula- (A, B) bzw. im Gastrula-Stadium (D, E) sowie unbehandelte Kontroll-Embryonen (A, D) in entsprechenden Entwicklungsstadien. Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, B, D, E). Mittels qPCR ermittelte Änderung des Expressionslevels von *SpDkk1* in Li- (C) bzw. Zn-behandelten Embryonen (F) im späten Blastula- bzw. im Gastrula-Stadium.

Während die Expression von *SpDkk1* in einer späten Kontroll-Blastula sowohl im animalen Pol als auch in der Vegetalplatte präsent ist (Abb. 17, A), ist die animale Expression von *SpDkk1* in mit Lithium behandelten Embryonen verloren gegangen. Die

vegetale Expression von *SpDkk1* dagegen ist stark vergrößert und überzieht fast die Hälfte des Embryos (Abb. 17, B). In mit Zink behandelten Embryonen im Gastrula-Stadium ist die endodermale Expression von *SpDkk1* weitestgehend nicht detektierbar, die animale Expressionsfläche hingegen stark vergrößert (Abb. 17, D). WISH in unbehandelten Kontrollembryonen im Gastrula-Stadium zeigt Expression von *SpDkk1* im apikalen Ektoderm sowie an der Spitze des sich invaginierenden Darmrohrs (Abb. 17, E). Die Auswirkungen von Behandlungen mit Lithium bzw. Zink auf die Expression von *SpDkk1* wurde auch quantitativ mittels qPCR untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus normal entwickelten Embryonen im späten Blastula-Stadium (20 Stunden nach der Befruchtung) bzw. aus normal entwickelten Embryonen im Gastrula-Stadium (38 Stunden nach der Befruchtung) sowie aus mit Lithium behandelten 20 Stunden alten Embryonen bzw. mit Zink behandelten 38 Stunden alten Embryonen isoliert und anschließend mittels qPCR untersucht. Obwohl das Expressionsmuster von *SpDkk1* in mit Lithium behandelten Embryonen verändert ist (Abb. 17, A+B), zeigt die qPCR, dass die Anzahl der *SpDkk1*-Transkripte in mit Lithium behandelten Embryonen im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Embryonen unverändert bleibt (Abb. 17, C). In mit Zink behandelten Embryonen hingegen offenbart die qPCR einen starken Anstieg des Expressionslevels von *SpDkk1*. Es lassen sich durch qPCR zehnmal mehr *SpDkk1*-Transkripte detektieren wie in unbehandelten Kontroll-Embryonen (Abb. 17, F).

4.2.2 Überexpressions- und Depletionsexperimente

Da *SpDkk1* in endomesodermalem und apikal-ektodermalem Gewebe exprimiert wird und die Expression von *SpDkk1* sowohl durch Lithium als auch Zink verändert werden kann, liegt es nahe, dass *SpDkk1* eine Rolle bei der Etablierung der animal-vegetalen-Achse des Seeigelembryos spielt. Um detailliertere Informationen über die Funktion von *SpDkk1* zu erhalten, wurde zum einen durch Injektion eines *SpDkk1*-spezifischen MASO die Gentranslation verhindert und zum anderen die Genexpression von *SpDkk1* durch Injektion künstlicher *SpDkk1*-mRNA erhöht.

Im Vergleich zu einer Kontroll-MASO-injizierten Gastrula (Abb. 18, A) führt die Injektion des *SpDkk1*-spezifischen MASO zu Embryonen mit verbreitertem Darmrohr (Abb. 18, B). In einigen Fällen ist das Endoderm so stark vergrößert, dass die Embryonen eine Exogastrulation zeigen (Abb. 18, C). Im Vergleich zu Kontroll-injizierten Gastrula-Embryonen (Abb. 18, E) ist bei Embryonen, die durch *SpDkk1*-Überexpression perturbiert wurden, der Darm fast gar nicht entwickelt und ihnen fehlen SMCs. Die PMCs hingegen sind weiterhin sichtbar (Abb. 18, F). Manche der *SpDkk1*-

Überexpressions-Embryonen sind sogar vollständig animalisiert (Abb. 18, G) und ähneln einer Dauerblastula. Eine gleichzeitige Injektion von *SpDkk1*-mRNA und *SpDkk1*-MASO führt zu Embryonen (Abb. 18, D), die von Kontroll-injizierten Embryonen (Abb. 18, A+E) nicht zu unterscheiden sind. Eine Koinjektion von *SpDkk1*-mRNA und Kontroll-MASO hingegen führt zu Embryonen, die den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen gleichen (Abb. 18, H).



Abb. 18: „Funktion von *SpDkk1* ermittelt durch Perturbationsexperimente.“

Kontroll-MASO- (A) bzw. Kontroll-injizierte Embryonen im Gastrulastadium (E) sowie *SpDkk1*-MASO- (B, C) bzw. *SpDkk1*-MOE-Phänotypen (F, G) zu entsprechenden Zeitpunkten. Simultane Injektion von *SpDkk1*-mRNA und *SpDkk1*-MASO (D) bzw. von *SpDkk1*-mRNA und Kontroll-MASO (H). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-H).

Um die *SpDkk1*-mRNA- bzw. *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen genauer charakterisieren zu können, wurden Hybridisierungssonden gegen verschiedene endomesodermale (Abb. 19) und verschiedene ektodermale Markergene (Abb. 20) hergestellt.

SpEndo16 wird im Blastula-Stadium in der Vegetalplatte um den sich bildenden Blastoporus exprimiert (Abb. 19, A+B). Mit Beginn und während der Gastrulation findet man die Expression von *SpEndo16* im Darmrohr (Abb. 19, C+D). In der Prism-Larve (56 Stunden nach Befruchtung) wird deutlich, dass die Expression von *SpEndo16*, sobald sich das Darmrohr weiter in Vorder-, Mittel- und Hinterdarm gliedert, auf den Mitteldarm beschränkt ist (Abb. 19, E). *SpP19* wird spezifisch in den PMCs exprimiert. Im frühen Blastula-Stadium ist die Expression von *SpP19* bereits in der Vegetalplatte detektierbar (Abb. 19, F). Während der gesamten Embryonalentwicklung bleibt *SpP19* nur in den PMCs exprimiert (Abb. 19, G-I). *SpTbx6* wird im frühen Blastula-Stadium ebenfalls in der Vegetalplatte exprimiert (Abb. 19, J). Später wird *SpTbx6* in den SMCs exprimiert, die von der Darmspitze ins Innere des Embryos wandern (Abb. 19, K+L).

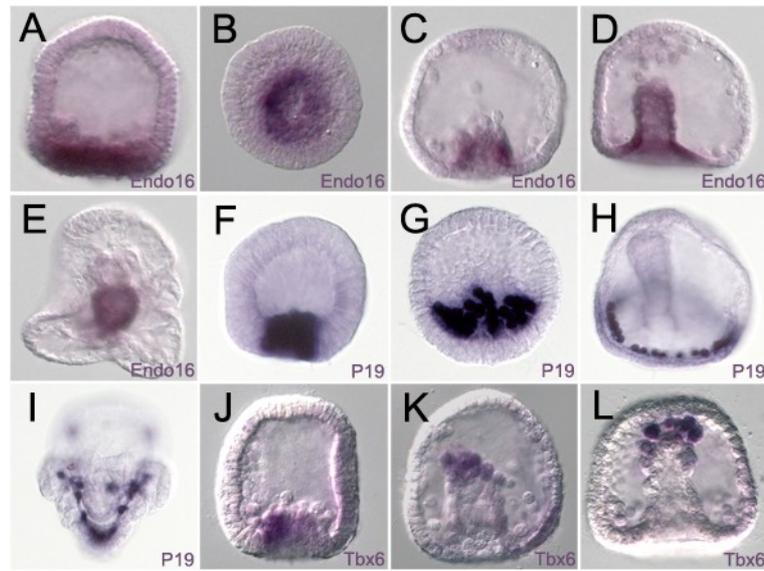


Abb. 19: „Expression verschiedener endomesodermaler Markergene.“

Mit Hilfe der WISH ermittelte Expressionsmuster von *SpEndo16* (A-E), *SpP19* (F-I) und *SpTbx6* (J-L) in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (F), spätes Blastula-Stadium (A, B, G), frühes Gastrula-Stadium (J, J), Gastrula-Stadium (D, K), spätes Gastrula-Stadium (H, L), Prism-Larve (E) und Pluteus-Larve (I). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, C-L) bzw. vegetale Ansicht (B).

SpFoxQ2 wird ausschließlich im apikalen Ektoderm exprimiert. Bereits im frühen Blastula-Stadium kann mittels WISH *SpFoxQ2*-Expression im apikalen Ektoderm detektiert werden (Abb. 20, A+B). In der weiteren Embryonalentwicklung bleibt die Expression von *SpFoxQ2* auf diesen Bereich beschränkt (Abb. 20, C+D). *SpGsc* wird im Blastula- und Gastrula-Stadium spezifisch im oralen Ektoderm des Embryos exprimiert (Abb. 20, E-H). In der Pluteus-Larve findet man die Expression von *SpGsc* um das Stomodeum herum sowie eine schwache Expression in den sich entwickelnden Armen (Abb. 20, I). Die Expression von *SpHnf6* kann mittels WISH erstmalig im frühen Gastrula-Stadium lokalisiert detektiert werden. *SpHnf6* ist dort im sich manifestierenden Cilienband, welches orales und aborales Ektoderm voneinander trennt, exprimiert (Abb. 20, J+K). Auch in der späten Gastrula ist die Expression von *SpHnf6* dort zu finden (Abb. 20, L).

Mittels WISH und der spezifischen Markersonden wurden die *SpDkk1*-Überexpressions- als auch die *SpDkk1*-Depletionsembryonen näher charakterisiert und die Resultate der WISH mittels qPCR validiert. Sowohl die WISH- als auch die qPCR-Analyse erfolgte in Embryonen im Gastrula-Stadium (45 Stunden nach der Befruchtung).

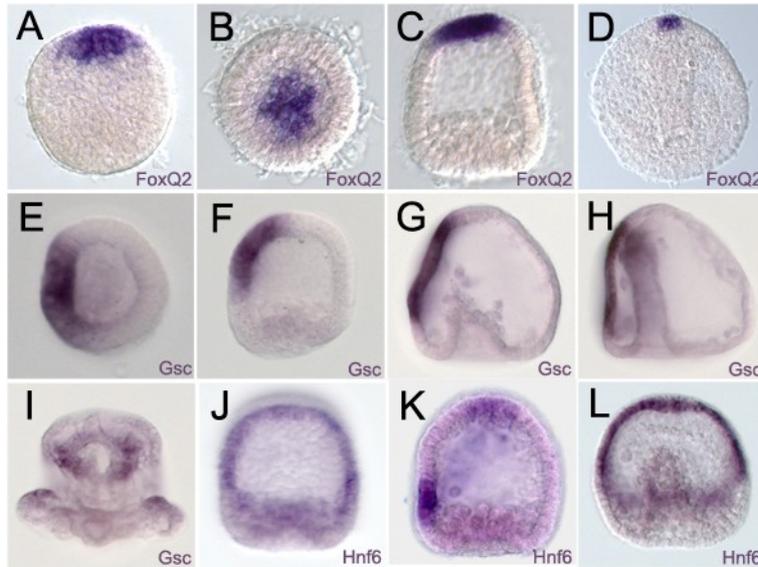


Abb. 20: „Expression verschiedener ektodermaler Markergene.“

Mit Hilfe der WISH ermittelte Expressionsmuster von *SpFoxQ2* (A-D), *SpGsc* (E-I) und *SpHnf6* (J-L) in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A, B, E), spätes Blastula-Stadium (C, F, J, K), frühes Gastrula-Stadium (G), Gastrula-Stadium (D, L), spätes Gastrula-Stadium (H) und Pluteus-Larve (I). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, C-I, K) bzw. animale Ansicht (B) oder orale Ansicht mit animaler Seite oben (J, L).

Die WISH mit der *SpEndo16*-spezifischen Sonde verdeutlicht die Vergrößerung des Endoderms in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen. Im Vergleich zu den Kontroll-MASO-injizierten Embryonen (Abb. 21, A1) ist die Expression von *SpEndo16* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen erhöht (Abb. 21, A2). Die qPCR validiert diesen Befund. Im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen ist das Expressionslevel von *SpEndo16* in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen ungefähr um das Achtfache erhöht (Abb. 21, A3). Die WISH mit der *SpP19*-spezifischen Sonde zeigt, dass die Entwicklung von PMCs durch die Inhibierung der Translation von *SpDkk1* nicht beeinflusst wird. Die Expression von *SpP19* in den Wildtyp-Embryonen (Abb. 21, B1) ist nicht von der in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen zu unterscheiden (Abb. 21, B2). Ebenso bleibt das durch qPCR ermittelte Expressionslevel von *SpP19* unverändert (Abb. 21, B3). Die WISH mit der *SpFoxQ2*-spezifischen Sonde offenbart, dass *SpDkk1*-MASO-injizierte Embryonen kein apikales Ektoderm besitzen. Während man in den Wildtyp-Embryonen *SpFoxQ2* im apikalen Ektoderm exprimiert findet (Abb. 21, C1), kann keinerlei Expression bzw. nur eine sehr schwache Expression von *SpFoxQ2* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen nachgewiesen werden (Abb. 21, C2). Laut qPCR-Analyse sinkt im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen die Anzahl der *SpFoxQ2*-Transkripte in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen auf ein

Drittel (Abb. 21, C3). *SpHnf6*-Transkripte können sowohl in den Wildtyp-Embryonen als auch in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen detektiert werden. Während *SpHnf6* in den Kontroll-Embryonen jedoch im Cilienband exprimiert wird (Abb. 21, D1), findet man *SpHnf6* in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im animalen Bereich exprimiert (Abb. 21, D2). Das Expressionslevel von *SpHnf6* wird laut qPCR-Analyse durch die Injektion von *SpDkk1*-MASO nicht beeinflusst (Abb. 21, D3).

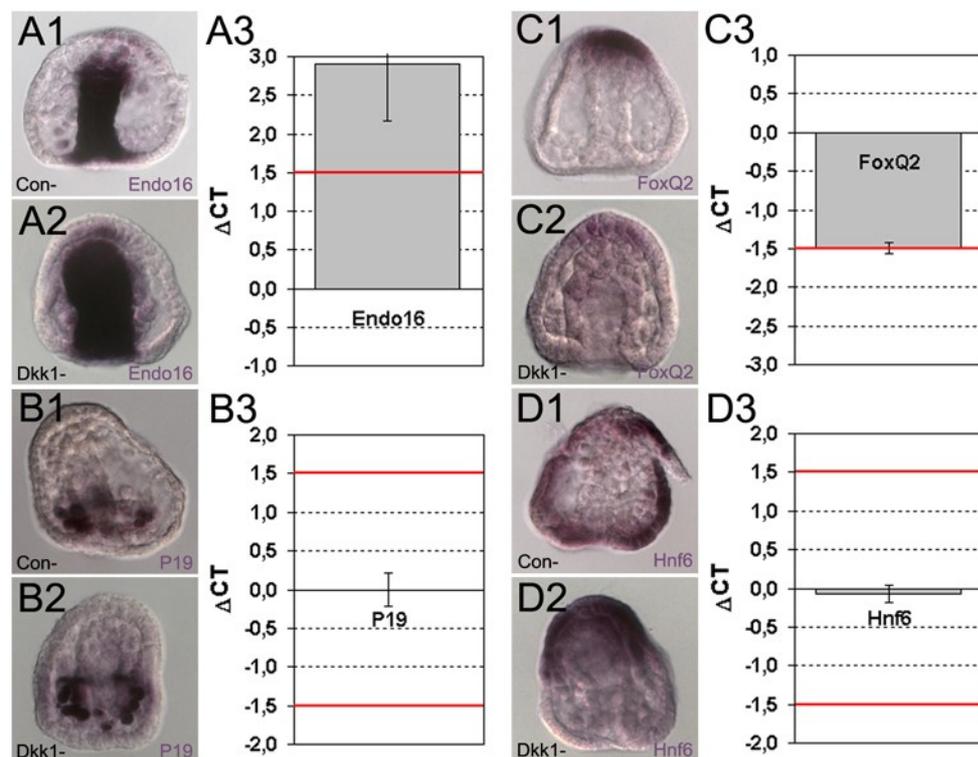


Abb. 21: „Regulation diverser Markergene durch *SpDkk1*-MASO-Injektion.“
Durch WISH ermittelte Expressionsmuster verschiedener Marker-Gene in Kontroll-MASO-injizierten (A1-D1) und *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen (A2-D2) im Gastrula-Stadium: *SpEndo16* (A), *SpP19* (B), *SpFoxQ2* (C), *SpHnf6* (D). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A1-D1, A2-D2). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Marker-Gene in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Gastrula-Stadium (A3-D3).

In mit *SpDkk1*-mRNA injizierten Embryonen hingegen wird durch die WISH mit der *SpEndo16*-spezifischen Sonde deutlich, dass im Gegensatz zu den Wildtyp-Embryonen (Abb. 22, A1) kein Darm bzw. nur ein Darmansatz gebildet wird (Abb. 22, A2). Dementsprechend findet man mittels qPCR in den Überexpressions-Embryonen nur ungefähr ein Drittel der *SpEndo16*-Transkripte, die man in den Kontroll-injizierten Embryonen findet (Abb. 22, A3). Die Bildung von PMCs wird auch durch eine Überexpression von *SpDkk1* nicht beeinflusst. Die Expression von *SpP19* findet in den Kontroll-injizierten Embryonen (Abb. 22, B1) wie auch in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen statt (Abb. 22, B2). Auch das Expressionslevel von

SpP19 bleibt von der Perturbation, wie durch qPCR gezeigt, unberührt (Abb. 22, B3). Durch WISH mit der *SpTbx6*-spezifischen Sonde wird verifiziert, dass *SpDkk1*-mRNA-

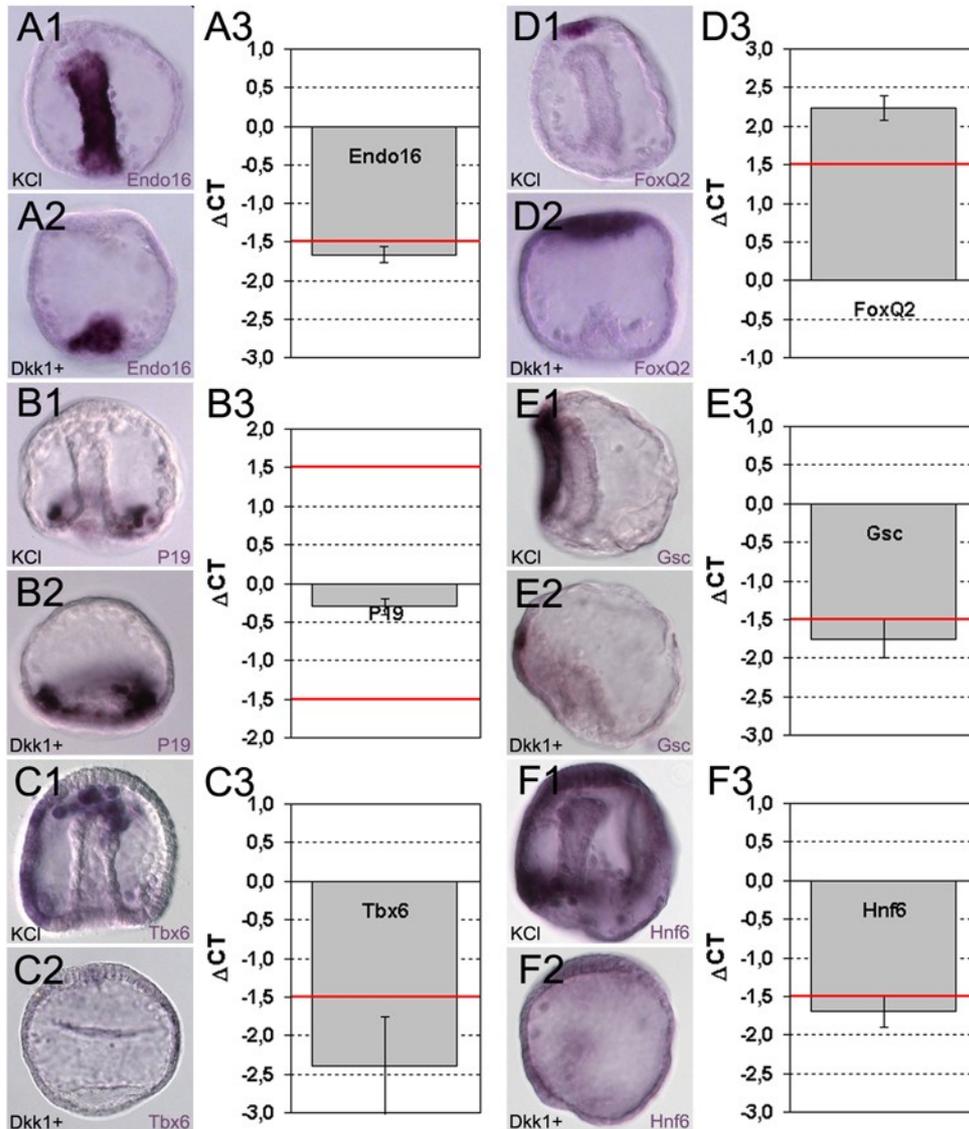


Abb. 22: „Regulation diverser Markergene durch *SpDkk1*-mRNA-Injektion.“
Durch WISH ermittelte Expressionsmuster verschiedener Marker-Gene in Kontroll-injizierten- (A1-F1) und *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen (A2-F2) im Gastrula-Stadium: *SpEndo16* (A), *SpP19* (B), *SpTbx6* (C), *SpFoxQ2* (D), *SpGsc* (E), *SpHnf6* (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A1-F1, A2-F2). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Marker-Gene in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im Gastrula-Stadium (A3-F3).

injizierte Embryonen keine SMCs bilden. Während man in Kontroll-injizierten Embryonen Expression von *SpTbx6* in den SMCs findet (Abb. 22, C1), ist mittels WISH in den Überexpressions-Embryonen keine Expression von *SpTbx6* festzustellen (Abb. 22, C2). Mittels qPCR findet man in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen nur ca. ein Sechstel der *SpTbx6*-Transkripte, die man in den Kontroll-injizierten

Embryonen findet (Abb. 22, C3). Die Expression von *SpFoxQ2* im apikalen Ektoderm in Wildtyp-Embryonen (Abb. 22, D1) ist in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen stark verbreitet (Abb. 22, D2), und auch das Expressionslevel von *SpFoxQ2* ist in den Überexpressions-Embryonen etwa um das Fünffache erhöht (Abb. 22, D3). Die WISH mit der *SpGsc*-spezifischen Sonde zeigt, dass das orale Ektoderm in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen verloren gegangen ist. Während man in den Wildtyp-Embryonen deutlich die Expression von *SpGsc* auf der oralen Seite erkennt (Abb. 22, E1), ist die Expressionsfläche von *SpGsc* in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen stark verringert (Abb. 22, E2). Das Expressionslevel ist dementsprechend von *SpGsc* etwa um das Vierfache verringert (Abb. 22, E3). WISH mit der *SpHnf6*-spezifischen Sonde zeigt, dass *SpHnf6* in Kontroll-injizierten Embryonen im Cilienband exprimiert wird (Abb. 22, F1), in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen hingegen nicht mehr exprimiert wird (Abb. 22, F2). Die qPCR-Analyse validiert dieses Ergebnis. In den Überexpressions-Embryonen ist das Expressionslevel von *SpHnf6* im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen stark gesenkt (Abb. 22, F3).

4.3 *SpDkk1* und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass *Dkk1* als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungiert. Es wurde zudem gezeigt, dass *Dkk1* selbst ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist (siehe Kapitel 1.2.2). Um zu untersuchen, ob auch *SpDkk1* ein Teil des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Seeigeln ist, wurde der *SpDkk1*-Überexpressions- und der *SpDkk1*-Depletions-Phänotyp mit Phänotypen von Seeigelembryonen verglichen, die mit den Wnt/ β -Catenin-Signalweg störenden Substanzen behandelt wurden. Darüber hinaus wurden die Veränderungen der Expressionslevel von bekannten Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im Blastula-Stadium (20 Stunden nach der Befruchtung) mittels qPCR gemessen.

Cadherin-mRNA-injizierte Embryonen zeigen im Gegensatz zu nicht-injizierten Kontroll-Embryonen im Gastrula-Stadium (Abb. 23, A) keinerlei endomesodermale Strukturen (PMCs, SMCs, Endoderm). Dafür ist das apikale Ektoderm bei ihnen stark vergrößert und verdickt (Abb. 23, C). *SpDkk1*-mRNA-injizierte Embryonen ähneln den *Cadherin*-mRNA-injizierten Embryonen. Im Gegensatz zu diesen besitzen die *SpDkk1*-mRNA-injizierte Embryonen jedoch keine PMCs und auch das apikale Ektoderm ist bei ihnen nicht so ausgeprägt verstärkt (Abb. 23, B). Auch die MASO-Phänotypen von bekannten Zielgenen (*SpBra*, *SpTcf/Lef*, *SpWnt8*) des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

(Abb. 23, D-F) ähneln dem *SpDkk1*-MOE-Phänotypen sehr stark. Um zu prüfen, ob diese Zielgene durch *SpDkk1* reguliert werden, wurden mittels qPCR die Expressionslevel dieser Gene in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen gemessen. Die Expressionslevel von allen drei Zielgenen sind in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen stark verringert. *SpBra* ist etwa sechsfach herunterreguliert, *SpTcf/Lef* und *SpWnt8* sind ca. vierfach schwächer exprimiert (Abb. 23, G). Die künstliche Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, hervorgerufen durch die Behandlung mit Lithium, führt dagegen zu Embryonen, die Exogastrulation aufweisen (Abb. 24, C). *SpDkk1*-MASO-injizierte Embryonen (Abb. 24, B) weisen eine große Ähnlichkeit mit diesen Embryonen auf. *SpDkk1* scheint demnach auch im Seeigel als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu fungieren.

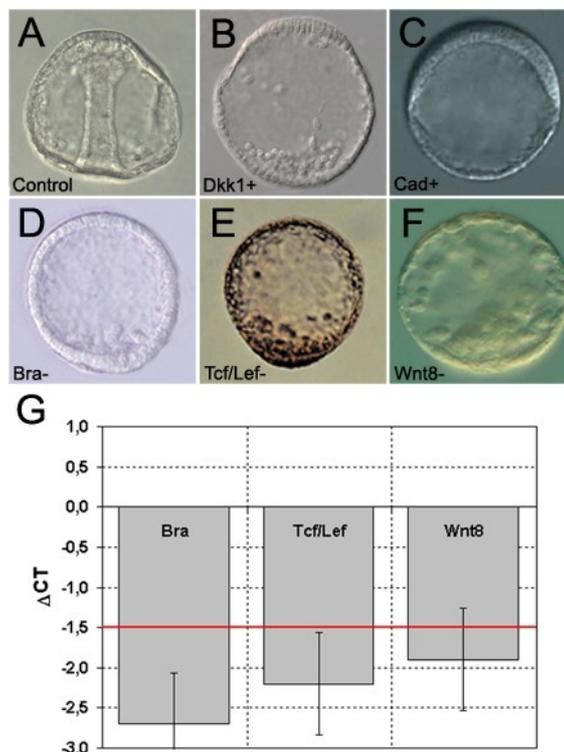


Abb. 23: „*SpDkk1* und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.“

Vergleich des *SpDkk1*-MOE-Phänotypen mit dem *Cadherin*-mRNA-injizierten-Phänotyp und MASO-Phänotypen verschiedener Wnt/ β -Catenin-Zielgene. Nicht-injizierte Kontroll-Gastrula (A), *SpDkk1*-injizierte Gastrula (B), *Cadherin*-mRNA-injizierte Gastrula (C, Logan *et al.*, 1999), *SpBra*-MASO-injizierte Gastrula (D, Rast *et al.*, 2002), *SpTcf/Lef*-MASO-injizierte Gastrula (E, Huang *et al.*, 2000), *SpWnt8*-MASO-injizierte Gastrula (F, Wikramanayake *et al.*, 2004). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel der Wnt/ β -Catenin-Zielgene in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im späten Blastula-Stadium (G).

Um zu prüfen, ob *SpDkk1* selbst ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist, wurde die Expression von *SpDkk1* während der Endomesoderm-Entwicklung in Embryonen,

in denen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Lithium-Behandlung aktiviert wurde, mit Hilfe der qPCR untersucht. Da *SpDkk1* anscheinend, wie zuvor untersucht, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibiert, d.h. ein Knock-Out von *SpDkk1* ebenfalls zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führen sollte, wurde außerdem mittels qPCR das Expressionlevel von *SpDkk1* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen gemessen und mit dem in Kontroll-Embryonen verglichen.

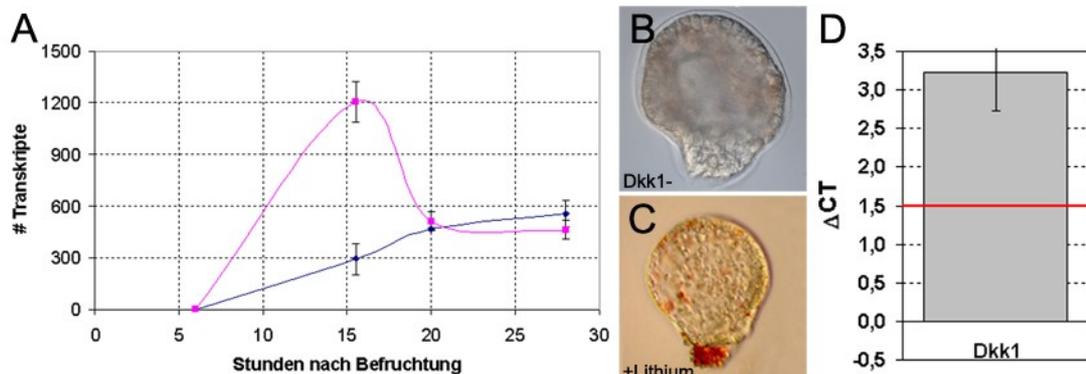


Abb. 24: „*SpDkk1* ist Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.“

Mit Hilfe der qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpDkk1* in unbehandelten (A, blau) und Li-behandelten Embryonen (A, pink) während der Endomesoderm-Differenzierung (A). Vergleich des *SpDkk1*-MASO-Phänotyps (B) mit einem Li-behandelten Embryo (C) zwei Tage nach Befruchtung. Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (B-C). Mittels qPCR ermittelte Änderung des Expressionslevels von *SpDkk1* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Blastula-Stadium (D).

Während die Zahl der *SpDkk1*-Transkripte in unbehandelten Embryonen kontinuierlich auf etwa 600 Transkripte pro Embryo 28 Stunden nach der Befruchtung anwächst, ist bei den mit Lithium behandelten Embryonen 16 Stunden nach der Befruchtung die Anzahl der *SpDkk1*-Transkripte vierfach höher als bei den Kontroll-Embryonen nach 16 Stunden nach Befruchtung (Abb. 24, A). In der Folge sinkt die Transkriptzahl in den mit Lithium behandelten Embryonen wieder, erreicht 20 Stunden nach Befruchtung wieder das normale Level der Kontroll-Embryonen und entwickelt sich anschließend auf dem selben Level wie in den unbehandelten Kontroll-Embryonen (Abb. 24, A). Auch in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen ist das Expressionslevel von *SpDkk1* im Vergleich zu dem in den Kontroll-Embryonen deutlich erhöht. Die Anzahl der *SpDkk1*-Transkripte ist etwa zehnfach erhöht (Abb. 24, D).

4.4 *SpDkk1* und das Endomesoderm-GRN

4.4.1 Regulation der Kernel-Gene durch *SpDkk1*

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist während der Embryogenese des Seeigels für die Entwicklung des Endomesoderms von entscheidender Bedeutung. Durch diesen wird ein Set von Schlüsselgenen (Kernel-Gene) - *SpBlimp1*, *SpOTX*, *SpBra*, *SpFoxA*, *SpGataE* und *SpTBrain* - aktiviert, das essentiell für die Entwicklung von endomesodermalen Strukturen ist und evolutionär starke Konservierung aufweist. Störungen innerhalb dieses Sets von Genen führen zu katastrophalen strukturellen Veränderungen im Embryo (siehe Kapitel 1.3.5). Daher wurden diese Schlüsselgene isoliert, ihre Expressionsmuster mittels WISH bestimmt und ihre Regulation durch *SpDkk1* mit Hilfe der qPCR in Embryonen im Blastula-Stadium untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Daten anderer Studien, in denen die Regulation der Kernel-Gene durch Cadherin untersucht wurde (<http://sugp.caltech.edu/endomes/qpcr.html>), verglichen.

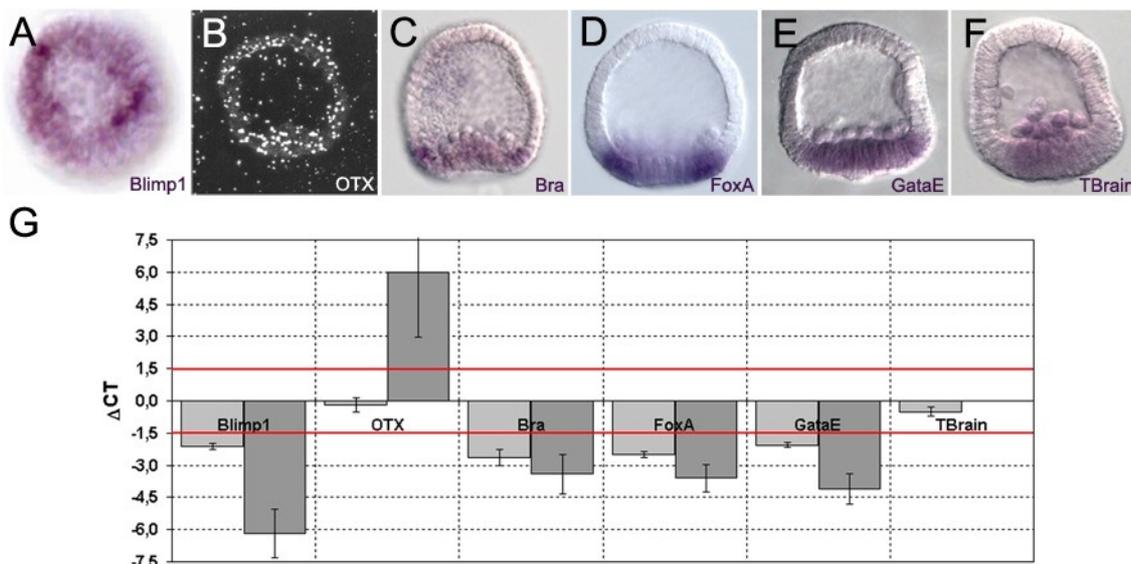


Abb. 25: „Regulation der Kernel-Gene durch *SpDkk1* und Cadherin.“

Durch WISH ermittelte Expressionsmuster der Kernel-Gene *SpBlimp1* (A, Smith *et al.*, 2007), *SpOTX* (B, Li *et al.*, 1997), *SpBra* (C), *SpFoxA* (D), *SpGataE* (E) und *SpTBrain* (F) im späten Blastula-Stadium. Vegetale Ansicht (A, B) bzw. laterale Ansicht mit animaler Seite oben (C-F). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel der Kernel-Gene in *SpDkk1*- (hellgrau) bzw. *Cadherin*-mRNA-injizierten Embryonen (dunkelgrau) im späten Blastula-Stadium (G).

Wie die WISH-Analyse zeigt, sind wie erwartet alle Kernel-Gene in der Vegetalplatte in Embryonen im Blastula-Stadium exprimiert (Abb. 25, A-F). Die Expression von *SpBlimp* und *SpFoxA* bildet einen Ring um den Blastoporus (Abb. 25, A+D). *SpBra* und

SpGataE sind in der gesamten Vegetalplatte exprimiert (Abb. 25, C+E). *SpTBrain* ist sowohl in der Vegetalplatte als auch in den einwandernden PMCs exprimiert (Abb. 25, F). Die Expression von *SpOTX* ist nicht nur auf die Vegetalplatte beschränkt, sondern im gesamten Embryo zu finden (Abb. 25, B). Die qPCR-Analyse dieser Gene in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen zeigt, dass die Expressionslevel aller Kernel-Gene in den perturbierten Embryonen im Vergleich zu Kontrollembryonen deutlich herunterreguliert sind (Abb. 25, G). Lediglich die Expressionen von *SpOTX* und *SpTBrain* werden durch die *SpDkk1*-Überexpression nicht beeinflusst. Durch Cadherin werden die meisten der Kernel-Gene ebenfalls nach unten reguliert (Abb. 25, G). Im Vergleich zur Regulation durch *SpDkk1* werden die Expressionslevel der Kernel-Gene jedoch durch Cadherin wesentlich stärker gesenkt. Eine Ausnahme bildet *SpOTX*, dessen Expression in *Cadherin*-mRNA-injizierten Embryonen sehr stark ansteigt, aber durch *SpDkk1*-mRNA-Injektion, wie bereits erwähnt, nicht beeinflusst wird. Über die Regulation von *SpTBrain* durch Cadherin ist bislang noch nichts bekannt.

4.4.2 *SpDkk1* und die Endomesoderm-Spezifizierung

Anschließend wurden die Folgen der Deregulation der Kernel-Gene durch *SpDkk1* auf die Entwicklung des Endomesoderms untersucht. Hierzu wurden verschiedene endomesodermale Gene identifiziert, deren Expressionsmuster mittels WISH bestimmt und deren Regulation durch *SpDkk1* in *SpDkk1*-mRNA- als auch *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen mit Hilfe der qPCR ermittelt.

Alle isolierten endomesodermalen Gene sind im Blastula-Stadium in der Vegetalplatte exprimiert (Abb. 26). *SpDelta* und *SpPmar1* (Abb. 26, A+J) sind bereits im Furchungsstadium in den PMC-Vorläuferzellen exprimiert. Im Gegensatz zu den anderen Genen ist *SpHnf6* allerdings im ganzen Embryo exprimiert und nicht nur in der Vegetalplatte (Abb. 26, G). *SpEndo16* und *SpEve* sind in den Endoderm-Vorläuferzellen exprimiert (Abb. 26, C+D). *SpHex*, *SpP19* und *SpTbx6* sind in den Mesoderm-Vorläuferzellen exprimiert (Abb. 26, E,H,K). Das Expressionsmuster dieser drei Gene im späteren Gastrula-Stadium zeigt, dass *SpP19* nur in den PMCs exprimiert ist (Abb. 26, I), *SpTbx6* hingegen spezifisch in den SMCs (Abb. 26, L) und *SpHex* sowohl in den PMCs als auch in den SMCs exprimiert wird (Abb. 26, F). Die qPCR-Analyse zeigt, dass die Expressionslevel der endomesodermalen Gene in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Blastula-Stadium (20 Stunden nach Befruchtung) tendenziell steigen und in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im Blastula-Stadium tendenziell sinken (Abb. 26, M). Allerdings sind die Expressionslevel

von keinem der endomesodermalen Gene in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen signifikant verändert. Auffallend ist jedoch, dass sämtliche Gene, die spezifisch in PMCs exprimiert sind (*SpDelta*, *SpHnf6*, *SpP19*, *SpPmar1*), die geringste Änderung des Expressionslevels in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen aufweisen. Sowohl die Gene, die spezifisch im Endoderm

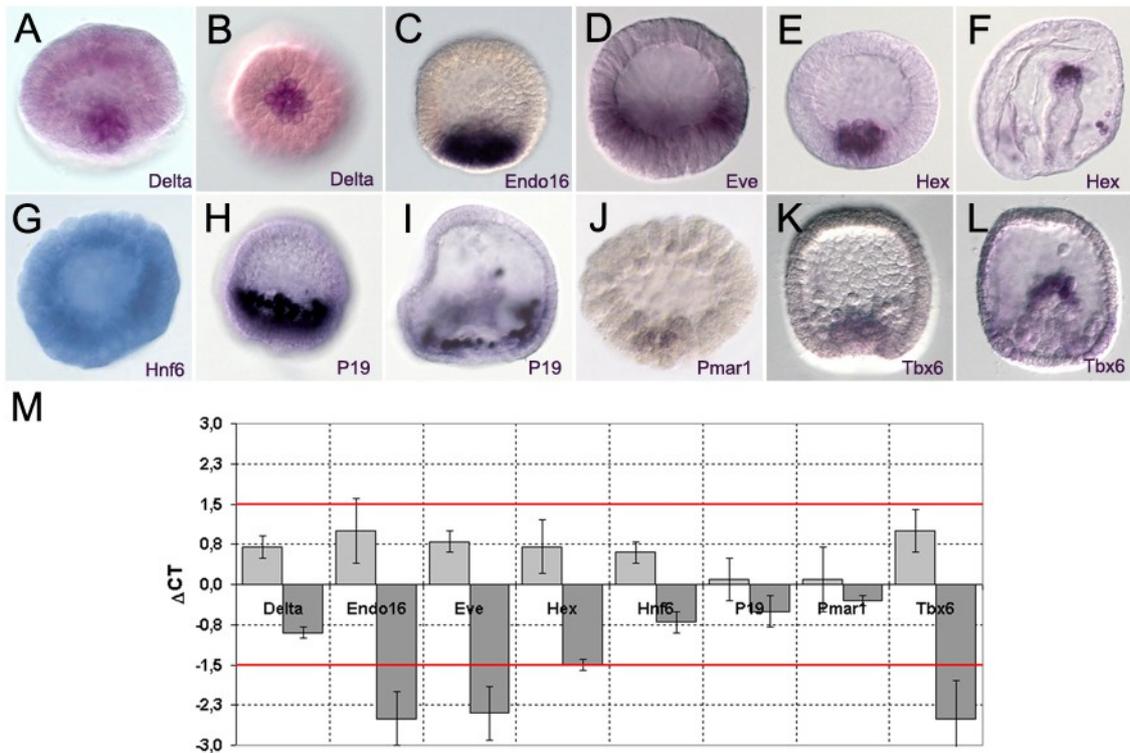


Abb. 26: „Regulation endomesodermaler Gene durch *SpDkk1*.“

Durch WISH ermittelte Expressionsmuster der endomesodermalen-Gene *SpDelta* (A, B), *SpEndo16* (C), *SpEve* (D), *SpHex* (E, F), *SpHnf6* (G, Otim *et al.*, 2004), *SpP19* (H, I), *SpPmar1* (J, Oliveri *et al.*, 2002) und *SpTbx6* (K, L) in verschiedenen Entwicklungsstadien: Furchungsstadium (A, J), Blastula-Stadium (B-E, G), spätes Blastula-Stadium (H, K), Gastrula-Stadium (F, I, L). Vegetale Ansicht (B) bzw. laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, C-L). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel der verschiedenen endomesodermalen Gene in *SpDkk1*-MASO- (hellgrau) bzw. *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen (dunkelgrau) im späten Blastula-Stadium (M).

exprimiert sind (*SpEndo16*, *SpEve*), als auch die Gene, die spezifisch in den SMCs exprimiert sind (*SpTbx6*), werden stärker durch die *SpDkk1*-MASO-Injektion beeinflusst. Das Maß der Änderung des Expressionslevels von *SpHex*, dessen Expression man in PMCs und SMCs findet, liegt zwischen dem der PMC-spezifischen und dem der Endoderm- bzw. SMC-spezifischen Gene. Die Expressionslevel der PMC-spezifischen Gene werden auch durch eine Überexpression von *SpDkk1* nicht signifikant beeinflusst (Abb. 26, M). Allerdings werden die Endoderm- und SMC-spezifischen Gene deutlich herunterreguliert in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen.

SpEndo16, *SpEve* und *SpTbx6* sind in den Überexpressions-Embryonen etwa fünffach schwächer exprimiert als in den Wildtyp-Embryonen. Die Expressionsänderung von *SpHex* liegt wiederum zwischen der von PMC-spezifischen und der von Endoderm- bzw. SMC-spezifischen Gene. In diesem Fall ist die Abschwächung der Expression von *SpHex* knapp über der Signifikanzgrenze (Abb. 26, M).

4.4.3 *SpDkk1* und der Delta/Notch-Signalweg

Obwohl die Expression von *SpDelta*, das über den Notch-Rezeptor die Bildung von SMCs triggert (siehe Kapitel 1.3.5) in *SpDkk1*-perturbierten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen unverändert ist, besitzen die *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen dennoch keine SMCs (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.4.2). Expressionsanalysen von *SpNotch* haben gezeigt, dass *SpNotch* während des Blastula-Stadiums in der Vegetalplatte und später während der Gastrulation im Darmrohr exprimiert ist (Abb. 27, A+B). Funktionsanalysen von *SpNotch* haben des Weiteren gezeigt, dass die Inhibierung der Gentranslation von *SpNotch* zu Embryonen führt, die keine SMCs bilden, sich ansonsten aber normal entwickeln (Abb. 27, C+D). Daher wurde mittels qPCR überprüft, ob die Expression von *SpNotch* durch *SpDkk1* beeinflusst wird.

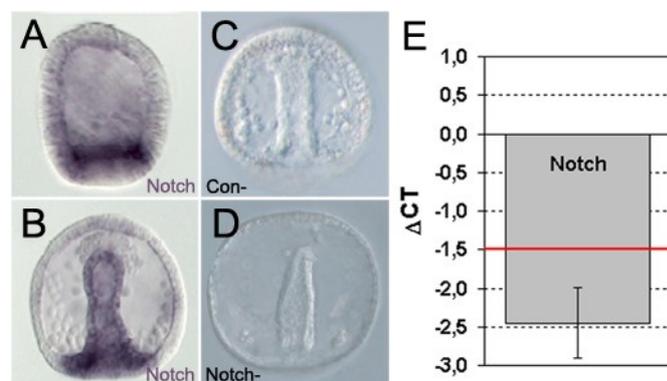


Abb. 27: „Expression und Funktion von *SpNotch*“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpNotch* im spätem Blastula- (A, Walton *et al.*, 2006) sowie Gastrula-Stadium (B, Walton *et al.*, 2006). Vergleich einer Kontroll-MASO-injizierten Gastrula (C, Davidson *et al.*, 2002) und einem *SpNotch*-MASO-injizierten Embryo (D, Davidson *et al.*, 2002) zum entsprechenden Zeitpunkt. Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D). Mittels qPCR ermittelte Änderung des Expressionslevels von *SpNotch* in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im spätem Blastula-Stadium (E).

Wie die qPCR-Untersuchung zeigt, ist die Expression von *SpNotch* in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen deutlich herunterreguliert. So sind im Blastula-Stadium in den Überexpressions-Embryonen nur noch etwa ein Fünftel der *SpNotch*-Transkripte zu finden (Abb. 27, E).

4.5 Regulation von Nervenzellen durch *SpDkk1*

4.5.1 Expression von Serotonin

Um den Einfluss einer Perturbation der Genexpression von *SpDkk1* auf die Bildung oder Verteilung von serotonergen Zellen zu untersuchen, wurden zunächst Wildtyp-Embryonen auf Serotonin hin untersucht. Des Weiteren wurden die Gene der beiden an der Bildung von Serotonin beteiligten Enzyme, *SpAadc* und *SpTph* (siehe Kapitel 1.4.1), isoliert und ihre Expressionsmuster mit Hilfe der WISH sowie ihre Expressionsprofile mittels qPCR erstellt.

Mit Hilfe immunologischer Verfahren ist Serotonin erstmals in Embryonen im späten Gastrula-Stadium (48 Stunden nach der Befruchtung) nachweisbar. Vier bis sechs Zellen im apikalen Ektoderm sind Serotonin-positiv (Abb. 28, A). Auch in der Prism-Larve (56 Stunden nach der Befruchtung) sind nicht mehr als vier bis sechs Zellen im apikalen Ektoderm serotoninhaltig (Abb. 28, B). In der Pluteus-Larve (72 Stunden nach der Befruchtung) sind ebenfalls vier bis sechs Zellen Serotonin-positiv. Diese befinden sich wiederum im apikalen Ektoderm oberhalb des Stomodeums (Abb. 28, C).

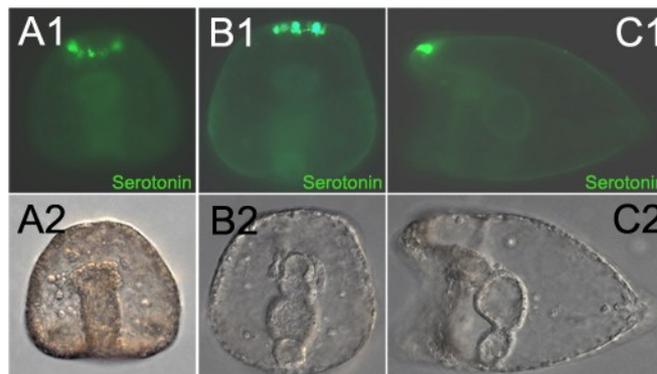


Abb. 28: „Nachweis von serotonergen Zellen.“

Nachweis von serotonergen Zellen mittels Antikörperfärbung (A1-C1) in verschiedenen Entwicklungsstadien: spätes Gastrula-Stadium (A), Prism-Larve (B) und Pluteus-Larve (C). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-C).

Sowohl *SpAadc* als auch *SpTph* sind in vier bis sechs einzelnen Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert, beginnend mit dem späten Gastrula-Stadium (48 Stunden nach der Befruchtung). Die Expressionsmuster der beiden Enzyme bleiben in den folgenden Entwicklungsstadien konstant (Abb. 29, A-D). Mittels qPCR sind erstmals 24 Stunden nach der Befruchtung Transkripte der *SpAadc* und der *SpTph* detektierbar (jeweils ca. 100 Transkripte pro Embryo). Einen starken Anstieg der Expression der beiden Enzyme kann man 33 Stunden nach Befruchtung beobachten. 45 Stunden nach der Befruchtung ist das Maximum der Anzahl der mRNA-Moleküle der beiden Enzyme von ca. 3000 pro Embryo erreicht. Die Anzahl der *SpAadc*-Transkripte bleibt dann relativ

konstant, während die Anzahl der *SpTph*-mRNA-Moleküle kontinuierlich abnimmt. 70 Stunden nach der Befruchtung sind nur noch ca. 2000 *SpTph*-Transkripte detektierbar (Abb. 29, E).

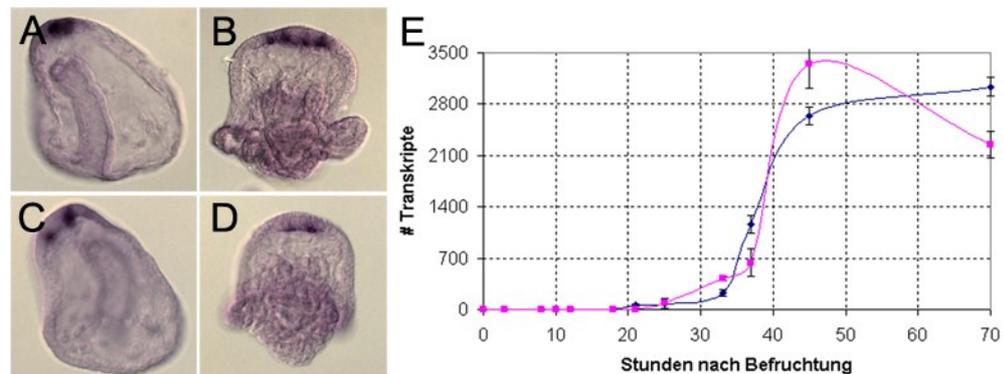


Abb. 29: „Expression von *SpAadc* und *SpTph*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpAadc* (A-B) und *SpTph* (C-D) im späten Gastrula-Stadium (A+C) und der Pluteus-Larve (B+D). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpAadc* (E, blau) und *SpTph* (E, pink).

Um zu untersuchen, ob die mit Hilfe des immunologischen Nachweises als Serotonin-positiv getesteten Zellen auch Serotonin-produzierende Zellen sind, wurde der immunologische Nachweis von Serotonin und die WISH der beiden Enzyme simultan durchgeführt.

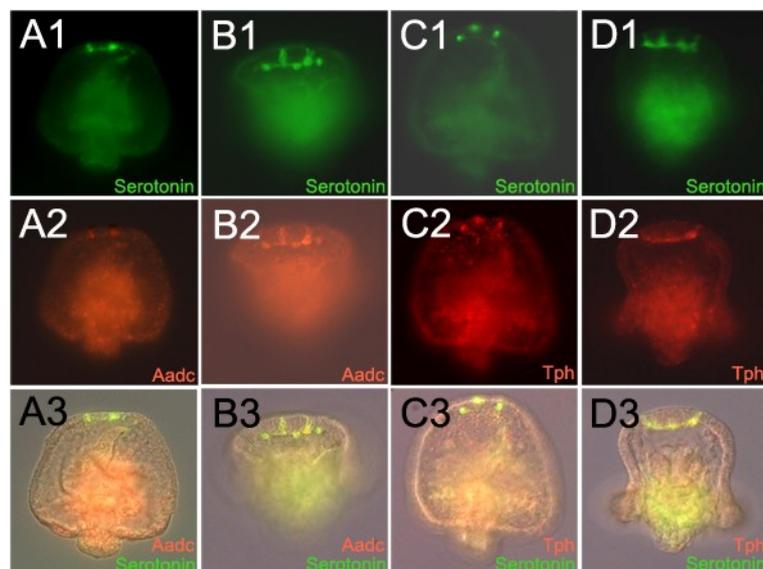


Abb. 30: „Kokalisation von Serotonin und *SpAadc* bzw. *SpTph*.“

Nachweis von serotonergen Zellen (A1-D1) sowie von *SpAadc* (A2, B2) und *SpTph* (C2, D2) in der Prism- (A, C) als auch Pluteus-Larve (B, D). Serotonin-positive Zellen exprimieren sowohl *SpAadc* als auch *SpTph* (A3-D3). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D).

Wie bereits gezeigt, sind sowohl in der Prism- (Abb. 30 A1+C1) als auch in der Pluteus-Larve (Abb. 30, B1+D1) vier bis sechs serotonerge Zellen im apikalen Ektoderm detektierbar. Ebenso sind, wie bereits gezeigt, sowohl *SpAadc* (Abb. 30, A2+B2) als auch *SpTph* (Abb. 30, C2+D2) in einzelnen Zellen im apikalen Ektoderm der Prism- (Abb. 30, A+C) und auch Pluteus-Larve (Abb. 30, B+D) exprimiert. Die Überlagerung der Fluoreszenz-Signale zeigt, dass alle Zellen, die positiv auf Serotonin getestet werden, sowohl die *SpAadc* als auch die *SpTph* exprimieren, d.h. Serotonin-produzierende Zellen sind.

4.5.2 Regulation serotonerger Zellen durch *SpDkk1*

Folgende Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass *SpDkk1* während der Embryogenese des Seeigels an der Spezifizierung von serotonergen Zellen beteiligt ist:

- die Bildung von Serotonin findet in Vertebraten hauptsächlich im Gehirn statt (siehe Kapitel 1.4.1) und *Dkk1* wurde in *Xenopus* als sezerniertes Signalmolekül beschrieben, das ausreichend ist, um die Bildung von Kopfstrukturen in Embryonen zu induzieren (siehe Kapitel 1.2.2),
- serotonerge Zellen und die an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind ebenso wie *Dkk1* im apikalen Ektoderm von Seeigelembryonen exprimiert (siehe Kapitel 4.1.3 und 4.5.1),
- den Wnt/ β -Catenin-Signalweg beeinflussende Substanzen haben Auswirkungen auf die Bildung von Serotonin im Seeigelembryo (siehe Kapitel 1.4.3) und *SpDkk1* wirkt als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (siehe Kapitel 4.3),
- mit Zink behandelte Embryonen besitzen wesentlich mehr serotonerge Zellen (Kapitel 1.1.1 und 1.4.3) und *SpDkk1* ist in diesen Embryonen stark hochreguliert (siehe Kapitel 4.2.1).

Daher wurden serotonerge Zellen in verschiedenen perturbierten Embryonen detektiert und anschließend sowohl *SpDkk1*-MASO- als auch *SpDkk1*-mRNA-injizierte Embryonen auf serotonerge Zellen hin untersucht und die Expression der beiden Enzyme an Hand der qPCR in diesen perturbierten Embryonen analysiert.

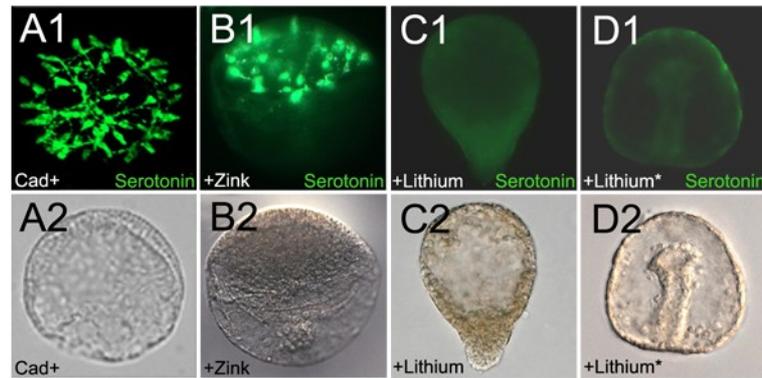


Abb. 31: „Serotonin und der Wnt/β-Catenin-Signalweg.“

Nachweis von Serotonin (A1-D1) in *Cadherin*-mRNA-injizierten (A, Yaguchi *et al.*, 2006) und Zn- (B, Poustka *et al.*, 2007) bzw. Li-behandelten Embryonen (C, D) drei Tage nach der Befruchtung. Zugabe von Lithium erfolgte vor Beginn der Endomesoderm-Differenzierung (C) und nach Ende der Endomesoderm-Differenzierung (D); Animale Ansicht (A). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (B-D).

Sowohl in *Cadherin*-mRNA-injizierten (Abb. 31, A) als auch in mit Zink behandelten Embryonen (Abb. 31, B) ist das apikale Ektoderm wie erwartet stark vergrößert. Außerdem ist es stark mit serotonergen Zellen angereichert. Im Gegensatz dazu findet man in Lithium-behandelten Embryonen (Abb. 31, C) keinerlei Serotonin-positive Zellen. Selbst Embryonen, die erst 24 Stunden nach der Befruchtung mit Lithium behandelt wurden, zeigen keine serotonergen Zellen (Abb. 31, D). Im Vergleich zu den bereits während des Furchungsstadiums mit Lithium behandelten Embryonen zeigen diese eine normale Darmentwicklung und keine Exogastrulation.

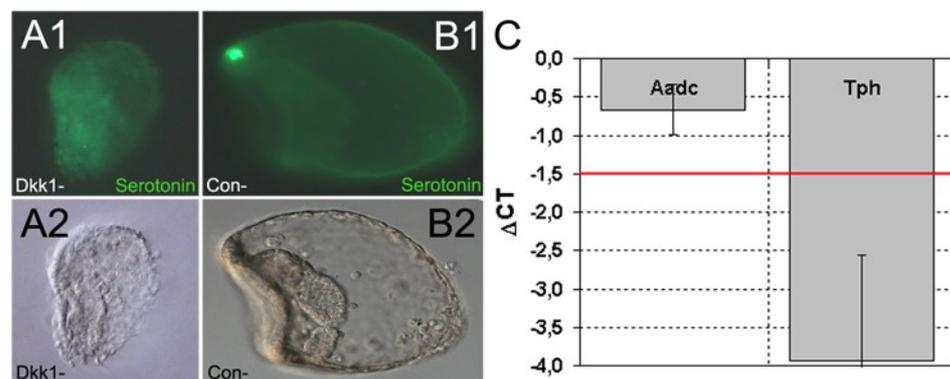


Abb. 32: „Nachweis von Serotonin in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen.“

Nachweis von Serotonin (A1, B1) in *SpDkk1*-MASO-injizierten (A) und in Kontroll-MASO-injizierten Pluteus-Larven (B); Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, B). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel von *SpAadc* und *SpTph* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Gastrula-Stadium (C).

Immunohistochemische Lokalisation von serotonergen Zellen in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen (72 Stunden nach der Befruchtung) offenbart, dass diese

Embryonen ebenso wie die mit Lithium behandelten Embryonen (Abb. 32, C) keinerlei serotonerge Zellen besitzen (Abb. 32, A). Auch morphologisch sehen sie dem mit Lithium behandelten Phänotypen sehr ähnlich (siehe Kapitel 4.3). Kontroll-MASO-injizierte Pluteus-Larven hingegen sind von nicht-injizierten Pluteus-Larven nicht zu unterscheiden und besitzen serotonerge Zellen im apikalen Ektoderm oberhalb des Stomodeums (Abb. 32, B). Ein Vergleich der Expressionslevel der beiden Enzyme in *SpDkk1*-MASO- und Kontroll-MASO-injizierten Embryonen mittels qPCR zeigt, dass die Anzahl der *SpAadc*-Transkripte nahezu unverändert bleibt, das Expressionslevel von *SpTph* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen jedoch etwa sechszehnfach herunterreguliert ist (Abb. 32, C).

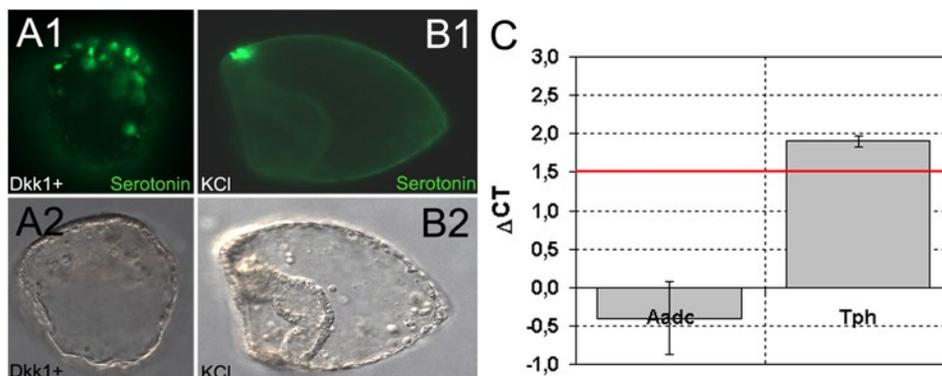


Abb. 33: „Nachweis von Serotonin in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen.“ Nachweis von Serotonin (A1, B1) in *SpDkk1*-mRNA-injizierten (A) und in KCl-Kontroll-injizierten Pluteus-Larven (B); Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, B). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel von *SpAadc* und *SpTph* in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im Gastrula-Stadium (C).

Im Gegensatz zu den *SpDkk1*-Depletionsphänotypen besitzen die *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen eine expandierte Apikalplatte, die mit deutlich mehr serotonergen Zellen angereichert ist (Abb. 33, A). Sie weisen eine starke Ähnlichkeit zu den *Cadherin*-mRNA-injizierten (Abb. 33, A) und den mit Zink behandelten Embryonen (Abb. 33, B) auf (siehe Kapitel 4.3). Kontroll-injizierte Embryonen, welche von Wildtyp-Embryonen nicht zu unterscheiden sind, zeigen dagegen eine normale Anzahl sowie eine normale Verteilung von Serotonin-positiven Zellen (Abb. 33, B). Die Analyse der Expressionslevel von *SpAadc* und *SpTph* in *SpDkk1*-mRNA-injizierten-Embryonen zeigt, dass eine Überexpression von *SpDkk1* zu einer Erhöhung der *SpTph*-Transkripte führt, während sie keinen Einfluss auf das Expressionslevel von *SpAadc* hat (Abb. 33, C).

4.5.3 Expression und Regulation von SynaptotagminB

Neben serotonergen Zellen besitzen Seeigelembryonen auch noch einen weiteren Typen von Nervenzellen: SynaptotagminB-positive Zellen. Um zu überprüfen, ob *SpDkk1* auch einen Einfluss auf die Bildung von SynaptotagminB hat, wurde zunächst mittels Immunfärbung SynaptotagminB in Wildtyp-Embryonen nachgewiesen und anschließend der Einfluss von *SpDkk1* auf die Expression von SynaptotagminB mit Hilfe der qPCR untersucht.

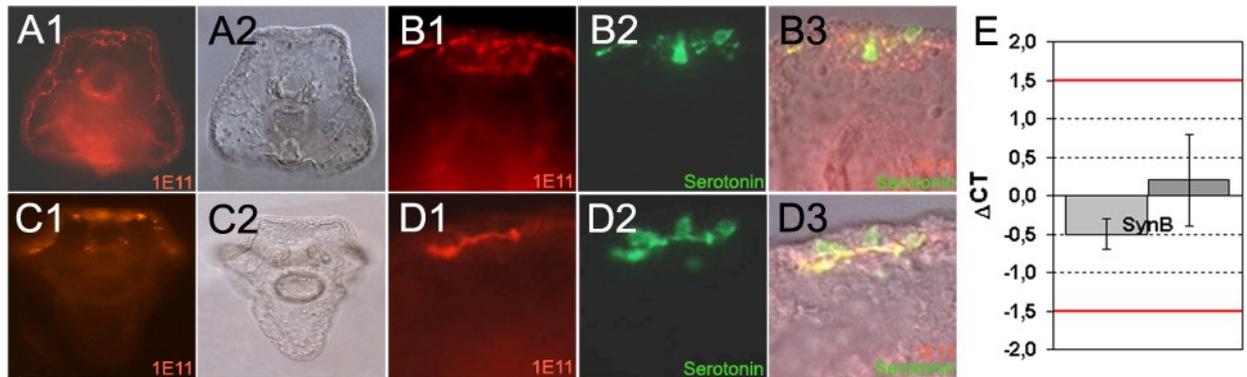


Abb. 34: „Nachweis von SynaptotagminB-positiven Zellen.“

Nachweis von SynaptotagminB (1E11) mittels Antikörperfärbung in der Prism- (A, B) und der Pluteus-Larve (C, D). Serotonerge Zellen (B2, D2) exprimieren kein SynaptotagminB (B1, D1), lediglich die Ganglien sind sowohl Serotonin- als auch SynaptotagminB-positiv (B3, D3). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, C), Vergrößerung des apikalen Ektoderms (B, D). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel von *SpSynB* in *SpDkk1*-MASO- (hellgrau) bzw. *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen (dunkelgrau) im Gastrula-Stadium.

Mittels immunohistochemischer Verfahren ist SynaptotagminB das erste Mal in der Prism-Larve (56 Stunden nach der Befruchtung) detektierbar. Es ist dort im Cilienband, im apikalen Ektoderm sowie an den oralen Ganglien exprimiert (Abb. 34, A). Die gleichzeitige Detektion von Serotonin und SynaptotagminB zeigt, dass Serotonin-positive Zellen SynaptotagminB-negativ sind, lediglich die Zellganglien im apikalen Ektoderm sind sowohl Serotonin- als auch SynaptotagminB-positiv (Abb. 34, B). Auch in der Pluteus-Larve ist SynaptotagminB an eben diesen Stellen im Embryo exprimiert (Abb. 34, C). Wiederum sind, abgesehen von den Ganglien der serotonergen Zellen, sämtliche Serotonin-positive Zellen SynaptotagminB-negativ (Abb. 34, D). Die qPCR-Analyse zeigt, dass weder eine Überexpression von *SpDkk1* durch Injektion von *SpDkk1*-mRNA noch eine Inhibierung der Translation von *SpDkk1* durch Injektion von *SpDkk1*-MASO einen Einfluss auf die Expression von SynaptotagminB haben (Abb. 34, E).

4.6 *SpDkk1* und das apikale Ektoderm

4.6.1 Identifizierung weiterer apikal exprimierter Gene

Insgesamt wurden mittels WISH elf verschiedene Transkriptionsfaktoren sowie neben *SpDkk1* und *SpDkk3* (siehe Kapitel 4.1) ein weiteres Signalmolekül identifiziert, die alle entweder nur im apikalen Ektoderm, neben anderen Regionen auch im apikalen Ektoderm oder in einzelnen Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert sind (Poustka *et al.*, 2007). Die detaillierten Expressionsmuster sowie -profile sind im Folgenden dargestellt. Die Sequenzen der einzelnen identifizierten Gene können mit Hilfe der Genomdatenbank (<http://goblet.molgen.mpg.de/cgi-bin/seaurchin-genombase.cgi>) sowie der GLEAN3-IDs (siehe Kapitel 7.2) eingesehen werden. Des Weiteren sind im Abschnitt „Blasts“ der Genomdatenbank die Homologe der Gene in anderen Organismen aufgeführt. Außerdem wurde *SpNkx2.1*, ein Gen, dessen Expressionsmuster bereits publiziert ist (Takacs *et al.*, 2004), in die Gruppe der apikal exprimierten Gene aufgenommen und weitergehend untersucht.

Expression von SpAlx

SpAlx ist mittels WISH bereits im frühen Blastula-Stadium (12 Stunden nach der Befruchtung) im apikalen Ektoderm detektierbar (Abb. 35, A). Die Expression von *SpAlx* bleibt bis zum frühen Gastrula-Stadium (etwa 24h nach der Befruchtung) auf diesen Bereich beschränkt (Abb. 35, B+C). Mit fortschreitender Gastrulation und

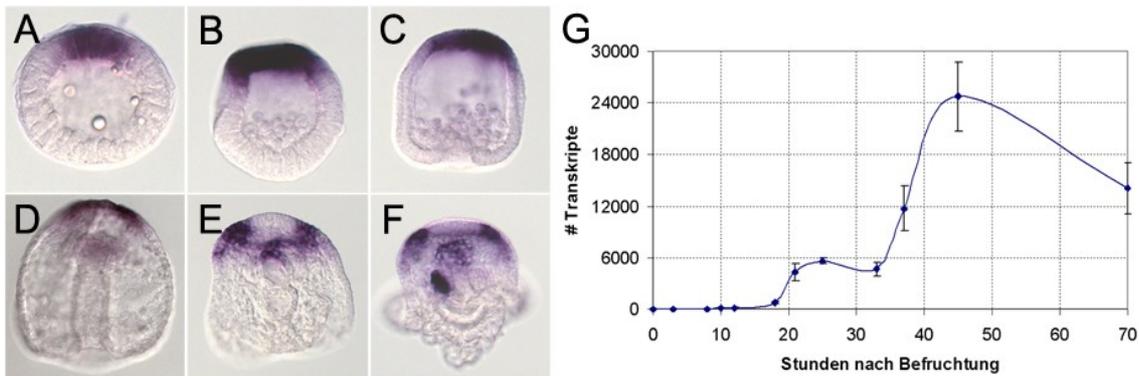


Abb. 35: „Expression von *SpAlx*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpAlx* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), frühes Gastrula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), Prism-Larve (E) und Pluteus-Larve (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpAlx* (G).

Entwicklung des Darmrohrs verschwindet die Expression von *SpAlx* im Zentrum des apikalen Ektoderms (Abb. 35, D). Dieses Expressionsmuster bleibt sowohl in der

Prism- (Abb. 35, E) als auch in der Pluteus-Larve (Abb. 35, F) bestehen. Zusätzlich zur Expression am Rande des apikalen Ektoderms ist in der Pluteus-Larve *SpAlx* noch im Coelom sowie schwach im Stomodeum detektierbar (Abb. 35, F). Mittels qPCR sind bereits im späten Furchungsstadium (Acht Stunden nach der Befruchtung) *SpAlx*-Transkripte detektierbar (Abb. 35, G). Bis zum Blastula-Stadium bleibt die Anzahl der *SpAlx*-Transkripte aber relativ gering, steigt dann auf 600 Transkripte pro Embryo an. Nach 33 Stunden nach der Befruchtung bleibt das Expressionslevel von *SpAlx* auf diesem Niveau und steigt dann bis zum späten Gastrula-Stadium (45 Stunden nach der Befruchtung) auf einen Höhepunkt von 24000 Transkripten pro Embryo. Anschließend sinkt das Expressionsniveau von *SpAlx*. In der Pluteus-Larve können immer noch etwa 15000 Transkripte pro Embryo festgestellt werden (Abb. 35, G).

Expression von *SpFez*

Mittels WISH ist eine schwache Expression von *SpFez* erstmalig im frühen Gastrula-Stadium im apikalen Ektoderm detektierbar (Abb. 36, A). Mit fortschreitender Gastrulation wird deutlich, dass *SpFez* in einzelnen Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert wird (Abb. 36, B+C). Auch in der Pluteus-Larve bleibt die Expression von *SpFez* auf einzelne Zellen im apikalen Ektoderm beschränkt (Abb. 36, D). In Übereinstimmung mit den WISH-Ergebnissen ist die Expression von *SpFez* mittels

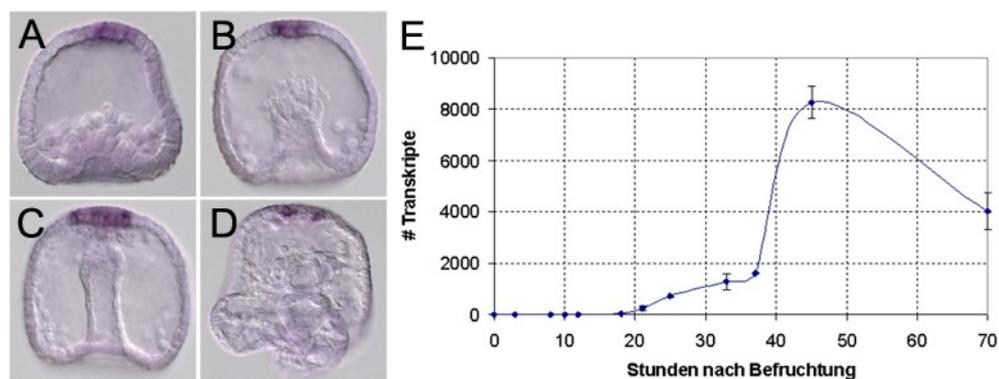


Abb. 36: „Expression von *SpFez*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpFez* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Frühes Gastrula-Stadium (A), Gastrula-Stadium (B), spätes Gastrula-Stadium (C) und Pluteus-Larve (D). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpFez* (E).

qPCR-Analyse erstmals 18 Stunden nach der Befruchtung detektierbar (Abb. 36, E). Von da an steigt die Anzahl der *SpFez*-Transkripte langsam an, bis sie 37 Stunden nach der Befruchtung ca. 2000 Transkripte pro Embryo erreicht. In den folgenden Stunden steigt die Anzahl der *SpFez*-Transkripte steil auf ein Maximum von 8000 pro

Embryo und sinkt anschließend wieder kontinuierlich auf etwa 4000 Transkripte pro Pluteus-Larve (Abb. 36, E).

Expression von *SpFoxJ1*

SpFoxJ1 ist während der gesamten Embryogenese im apikalen Ektoderm des Embryos exprimiert (Abb. 37, A+B). Mittels WISH kann die Expression von *SpFoxJ1* in der frühen Gastrula gezeigt werden. Durch qPCR sind *SpFoxJ1*-Transkripte bereits im späten Furchungsstadium (Acht Stunden nach der Befruchtung) nachweisbar (Abb. 37, C). Die Anzahl der Transkripte steigt dann auf etwa 4000 pro Embryo im Blastula-Stadium, sinkt anschließend, steigt mit Beginn der Gastrulation wieder, um

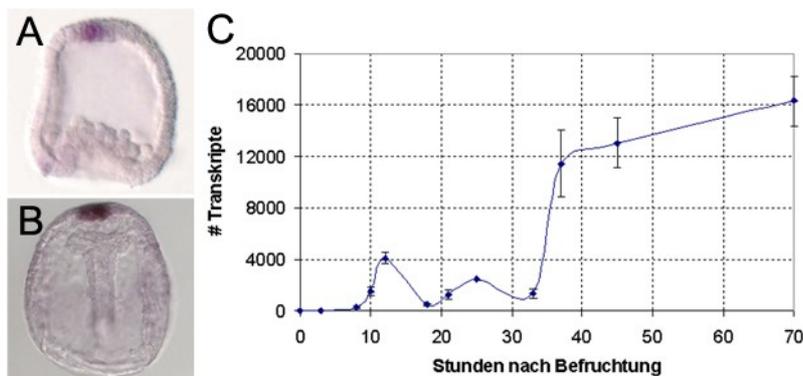


Abb. 37: „Expression von *SpFoxJ1*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpFoxJ1* im frühen (A) und spätem Gastrula-Stadium (B). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-B). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpFoxJ1* (C).

anschließend auf wenige Transkripte pro Embryo abzusinken. 33 Stunden nach der Befruchtung springt die Anzahl der *SpFoxJ1*-Transkripte dann innerhalb weniger Stunden auf 12000 pro Embryo. Von da an steigt die Transkriptzahl langsam weiter an und erreicht in der Pluteus-Larve ein Maximum von ca. 16000 pro Embryo (Abb. 37, C).

Expression von *SpFoxQ2*

Die Expression von *SpFoxQ2* ist bereits in der frühen Blastula mittels WISH detektierbar (Abb. 38, A). Während der gesamten Embryonalentwicklung bleibt *SpFoxQ2* im apikalen Ektoderm des Embryos exprimiert (Abb. 38, B-F). Mit fortschreitender Entwicklung des Embryos wird die Region im apikalen Ektoderm, in der *SpFoxQ2* exprimiert wird, immer kleiner. Durch qPCR sind erstmals acht Stunden nach der Befruchtung *SpFoxQ2*-Transkripte nachweisbar (Abb. 38, G). Bis 20 Stunden nach der Befruchtung bleibt die Anzahl der *SpFoxQ2*-mRNA-Moleküle relativ konstant

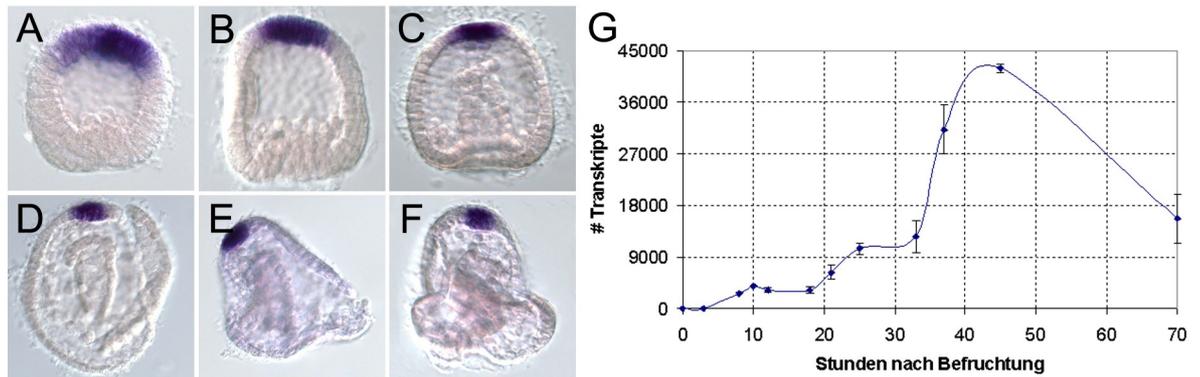


Abb. 38: „Expression von *SpFoxQ2*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpFoxQ2* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), frühes Gastrula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), spätes Gastrula-Stadium (E) und Pluteus-Larve (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpFoxQ2* (G).

bei etwa 3000 pro Embryo. Mit Beginn der Gastrulation steigt das Expressionslevel von *SpFoxQ2* dann auf etwa 10000 Transkripte pro Embryo. 33 Stunden nach der Befruchtung steigt die Zahl der *SpFoxQ2*-Transkripte dann sprunghaft auf ein Maximum von ca. 45000 pro Embryo an. Mit Ende der Gastrulation (45 Stunden nach der Befruchtung) sinkt die Zahl wieder. In der Pluteus-Larve sind dann noch etwa 18000 Transkripte zu finden (Abb. 38, G).

Expression von *SpGlass*

SpGlass ist mittels WISH erstmals in Embryonen im Gastrula-Stadium als kleiner Spot im apikalen Ektoderm detektierbar (Abb. 39, A). Im weiteren Verlauf der Gastrulation

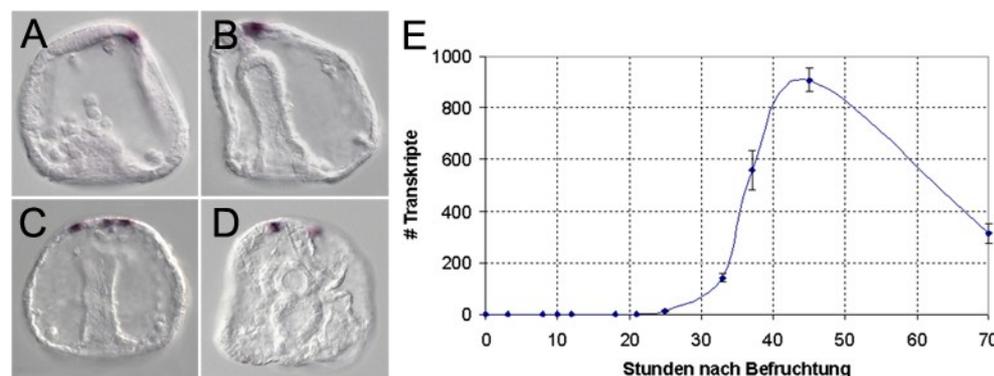


Abb. 39: „Expression von *SpGlass*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpGlass* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Frühes Gastrula-Stadium (A), Gastrula-Stadium (B, C) und Prism-Larve (D). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, B, D), orale Ansicht mit animaler Seite oben (C). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpGlass* (E).

wird deutlich, dass *SpGlass* in vier bis sechs Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert wird (Abb. 39, B+C). Die Expression von *SpGlass* bleibt auch in der Prism-Larve auf einzelne Zellen im apikalen Ektoderm beschränkt (Abb. 39, D). Übereinstimmend mit den WISH-Ergebnissen sind *SpGlass*-Transkripte mittels qPCR erstmals 25 Stunden nach der Befruchtung detektierbar (Abb. 39, E). Bis zum Ende der Gastrulation (45 Stunden nach der Befruchtung) steigt die Anzahl der *SpGlass*-Transkripte schnell auf etwa 1000 pro Embryo an. Anschließend sinkt das Expressionsniveau von *SpGlass* wieder und in der Pluteus-Larve sind nur noch ca. 300 Transkripte zu finden (Abb. 39, E).

Expression von *SpHes*

Die Expression von *SpHes* ist mittels WISH erstmals im apikalen Ektoderm einer Gastrula detektierbar (Abb. 40, A). Mit fortschreitender Gastrulation ist die Expression von *SpHes* zusätzlich auch im Vorderdarm sowie im Cilienband wahrnehmbar (Abb. 40, B). Sowohl in der Prism- (Abb. 40, C) als auch in der Pluteus-Larve (Abb. 40, D) bleibt *SpHes* im Ciliendband und im Vorderdarm exprimiert. Expression

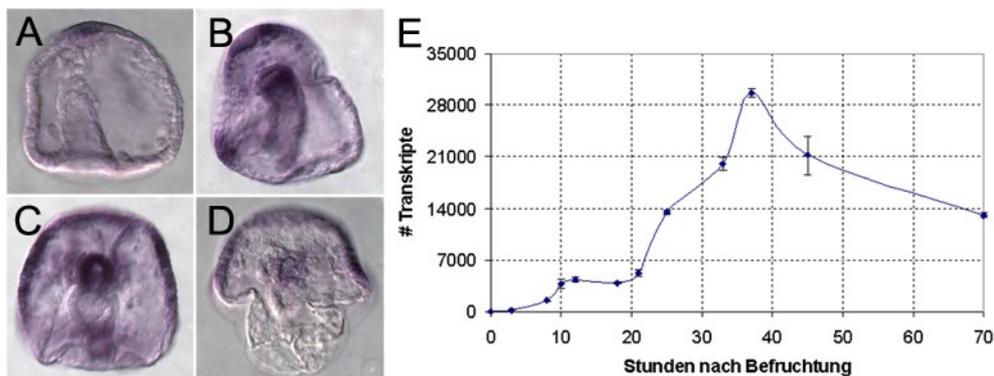


Abb. 40: „Expression von *SpHes*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpHes* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Gastrula-Stadium (A), spätes Gastrula-Stadium (B), Prism-Larve (C) und Pluteus-Larve (D). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpHes* (E).

von *SpHes* im apikalen Ektoderm ist in der Prism-Larve nur noch sehr schwach und in der Pluteus-Larve gar nicht mehr detektierbar (Abb. 40, C+D). Mit Hilfe der qPCR sind bereits in der Eizelle *SpHes*-Transkripte detektierbar (Abb. 40, E). Nach den Furchungsstadien bleibt die Anzahl der *SpHes*-Transkripte relativ konstant bei etwa 4000 Molekülen pro Embryo. Mit Ende des Blastula-Stadiums (20 Stunden nach der Befruchtung) steigt das Expressionsniveau von *SpHes* stark an und erreicht 33 Stunden nach der Befruchtung ein Maximum von 30000 Transkripten pro Embryo

(Abb. 40, E). Anschließend sinkt die *SpHes*-Transkriptanzahl wieder langsam ab und in der Pluteus-Larve bleiben 14000 Transkripte detektierbar (Abb. 40, E).

Expression von SpHnf6

Expression von *SpHnf6* ist in Embryonen im Gastrula-Stadium mittels WISH im Cilienband zu finden (Abb. 41, A+B; Poustka *et al.*, 2004). Dieses Expressionsmuster bleibt sowohl während des Prism- (Abb. 41, C) als auch des Pluteus-Larvenstadiums (Abb. 41, D) erhalten. Die qPCR zeigt, dass *SpHnf6* bereits maternal exprimiert wird. Bis 21 Stunden nach der Befruchtung liegt die Anzahl der *SpHnf6*-Transkripte relativ

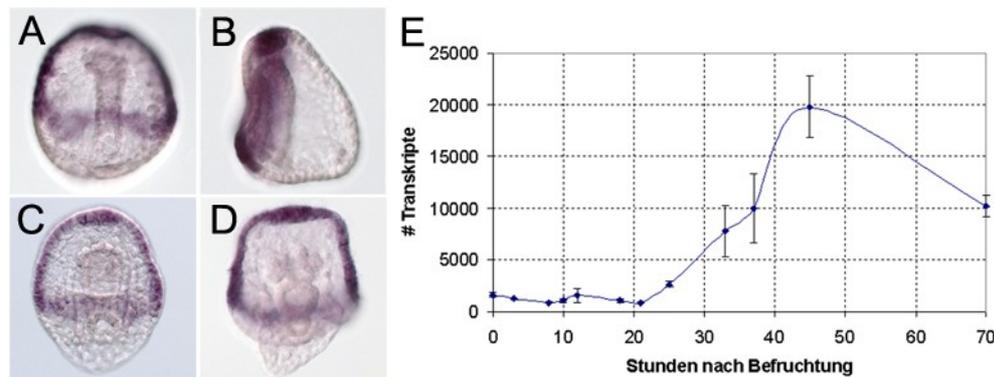


Abb. 41: „Expression von *SpHnf6*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpHnf6* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Spätes Gastrula-Stadium (A, B), Prism-Larve (C) und Pluteus-Larve (D). Animal-laterale Ansicht (A, C, D) und laterale Ansicht mit animaler Seite oben (B). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpHnf6* (E).

konstant zwischen 1000 und 1500 pro Embryo (Abb. 41, E). Anschließend steigt das Expressionsniveau steil auf ein Maximum von etwa 20000 Transkripten pro Embryo an (45 Stunden nach der Befruchtung). Bis zum Pluteus-Larvenstadium sinkt die Anzahl der *SpHnf6*-Transkripte dann wieder auf etwa 10000 pro Embryo (Abb. 41, E).

Expression von SpMox

SpMox wird in Embryonen im Gastrula-Stadium in einzelnen Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert (Abb. 42, A+B). Die Expression von *SpMox* ist auch in der Prism- (Abb. 42, C) sowie in der Pluteus-Larve (Abb. 42, D) auf einzelne Zellen im apikalen Ektoderm beschränkt. Mittels qPCR ist die Expression von *SpMox* erstmals im Gastrula-Stadium (33 Stunden nach der Befruchtung) detektierbar (Abb. 42, E). Von

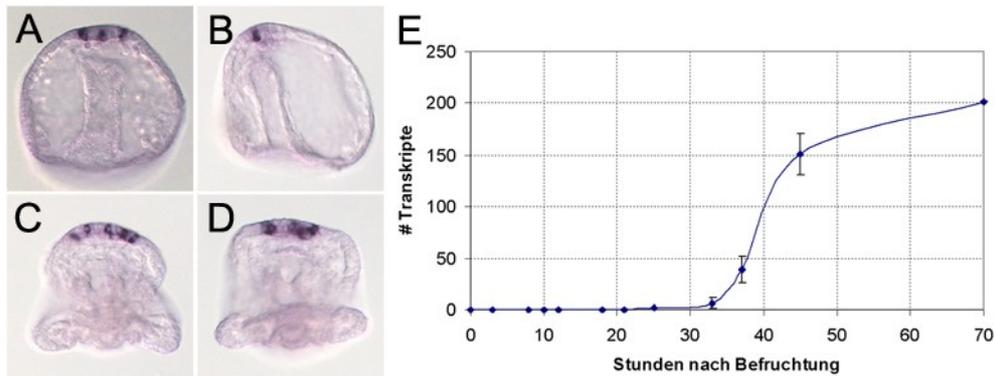


Abb. 42: „Expression von *SpMox*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpMox* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Spätes Gastrula-Stadium (A, B), Prism-Larve (C) und Pluteus-Larve (D). Orale (A) bzw. laterale Ansicht mit animaler Seite oben (B-D). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpMox* (E).

diesem Zeitpunkt an steigt die Zahl der *SpMox*-Transkripte kontinuierlich an, 45 Stunden nach der Befruchtung sind etwa 150 Transkripte pro Embryo zu finden und erreicht in der Pluteus-Larve ein Maximum von 200 Transkripten (Abb. 42, E).

Expression von Nkx2.1

Wie eine Expressionsstudie von *SpNkx2.1* gezeigt hat (Tacaks *et al.*, 2004), ist eine Expression von *SpNkx2.1* mittels WISH erstmals im späten Blastula-Stadium im apikalen Ektoderm detektierbar (Abb. 43, A). Während der gesamten Embryogenese bleibt *SpNkx2.1* im apikalen Ektoderm des Seeigelembryos exprimiert (Abb. 43, B-D). In der späten Gastrula ist zudem noch eine Expression von *SpNkx2.1* in der Darmspitze zu beobachten (Abb. 43, C). Übereinstimmend mit den bereits

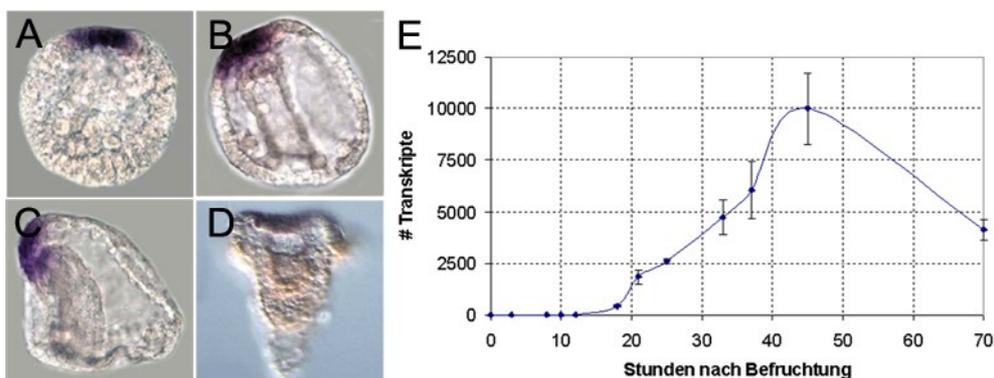


Abb. 43: „Expression von *SpNkx2.1*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpNkx2.1* in verschiedenen Entwicklungsstadien (A-D, Tacaks *et al.*, 2004): Spätes Blastula-Stadium (A), Gastrula- bzw. spätes Gastrula-Stadium (B, C) und Pluteus-Larve (D); Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpNkx2.1* (E).

durchgeführten Expressionsstudien können *SpNkx2.1*-Transkripte mittels qPCR erstmals im späten Blastula-Stadium (18 Stunden nach der Befruchtung) gemessen werden (Abb. 43, E). Anschließend steigt die Anzahl der *SpNkx2.1*-Transkripte kontinuierlich an und erreicht 45 Stunden nach der Befruchtung mit 10000 Molekülen pro Embryo seinen Höhepunkt. Bis zur Pluteus-Larve sinkt das Expressionslevel dann wieder auf 70 Transkripte (Abb. 43, E).

Expression von SpPax2

Eine Expression von *SpPax2* wird mittels WISH erstmals in Embryonen im Gastrula-Stadium erkennbar. Dort ist *SpPax2* schwach im Cilienband exprimiert. Eine starke Expression von *SpPax2* findet man lediglich im apikalen Ektoderm (Abb. 44, A). In der Pluteus-Larve wird *SpPax2* auch im Cilienband stark exprimiert, die stärkste Expression findet man aber weiterhin im apikalen Ektoderm des Embryos (Abb. 44, B).

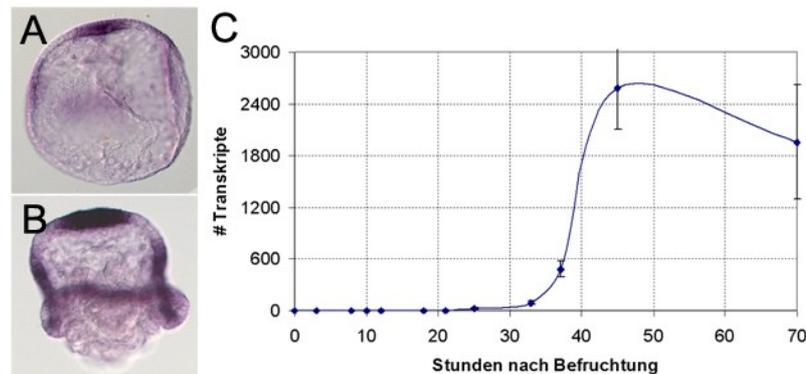


Abb. 44: „Expression von SpPax2.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpPax2* im späten Gastrula-Stadium (A) und der Pluteus-Larve (B). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, B). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpPax2* (C).

SpPax2-Transkripte sind mittels qPCR ebenfalls während des Gastrula-Stadiums 33 Stunden nach der Befruchtung detektierbar (Abb. 44, C). Anschließend steigt die Anzahl der Transkripte rasant und erreicht 45 Stunden nach der Befruchtung ein Maximum von 2500 pro Embryo. In der Pluteus-Larve finden sich noch ca. 1900 Transkripte (Abb. 44, C).

Expression von SpProx1

Expression von *SpProx1* kann mittels WISH erstmalig in den SMC-Vorläuferzellen in der Vegetalplatte von Embryonen im Blastula-Stadium detektiert werden (Abb. 45, A+B). In der frühen Gastrula ist *SpProx1* im invaginierenden Darm und in den sich bereits einwandernden SMCs exprimiert (Abb. 45, C). Mit fortschreitender

Gastrulation beschränkt sich die Expression von *SpProx1* auf die SMCs (Abb. 45, D). Sowohl in der Prism- (Abb. 45, E) als auch in der Pluteus-Larve (Abb. 45, F) findet man *SpProx1* in einzelnen Zellen im Ektoderm exprimiert. Laut qPCR-Analyse ist *SpProx1* maternal exprimiert. Während der Cleavage- und der Blastula-Stadien ist die Anzahl der *SpProx1*-Transkripte allerdings gering. Im späten Blastula-Stadium sind kaum noch Transkripte detektierbar (Abb. 45, G). Mit Beginn der Gastrula steigt das

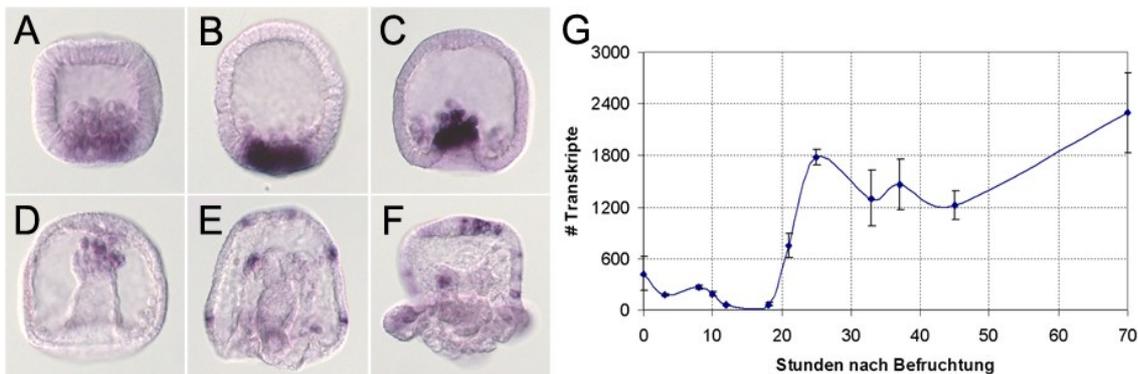


Abb. 45: „Expression von *SpProx1*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpProx1* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), frühes Gastrula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), Prism-Larve (E) und Pluteus-Larve (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpProx1* (G).

Expressionsniveau auf etwa 1800 Transkripte pro Embryo an. Anschließend sinkt die Transkriptanzahl ein wenig und verharrt dann relativ konstant bis zum Ende der Gastrulation (45 Stunden nach der Befruchtung) bei etwa 1500 Transkripten pro Embryo. Bis zum Pluteus-Larvenstadium steigt die Anzahl der *SpProx1*-Transkripte wieder an und erreicht 70 Stunden nach der Befruchtung ein Maximum von 2400 Transkripten pro Embryo (Abb. 45, G).

Expression von SpSix3

Wie die WISH-Analyse zeigt, wird *SpSix3* erstmalig in der animalen Hälfte einer frühen Blastula exprimiert (Abb. 46, A). Bereits im späten Blastula-Stadium ist die Expression von *SpSix3* an der apikalen Spitze des Ektoderms nicht mehr vorhanden, lediglich ein Expressionsring um den apikalen Pol ist noch sichtbar. Zusätzlich ist noch eine schwache Expression von *SpSix3* in der Vegetalplatte detektierbar (Abb. 46, B). Im Gastrula-Stadium (Abb. 46, C) und in der Prism-Larve (Abb. 46, D) ist *SpSix3* in einzelnen Zellen im Ektoderm sowie im Endoderm exprimiert. Die qPCR zeigt, dass

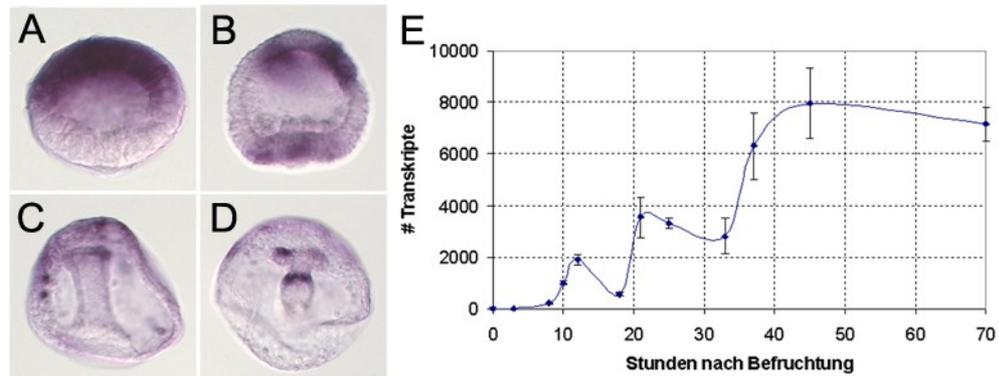


Abb. 46: „Expression von *SpSix3*.“

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *SpSix3* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), Gastrula-Stadium (C) und Prism-Larve (D). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-D). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *SpSix3* (E).

SpSix3 bereits maternal exprimiert wird (Abb. 46, E). Nach 21 Stunden nach der Befruchtung liegt das Expressionsniveau von *SpSix3* bei 4000 Transkripten pro Embryo. Im spätes Gastrula-Stadium (45 Stunden nach der Befruchtung) ist das maximale Expressionslevel von *SpSix3* mit ca. 8000 Transkripten pro Embryo erreicht. Bis zur Pluteus-Larve bleibt das Expressionslevel von *SpSix3* relativ konstant (Abb. 46, E).

Expression von *Sp-sFrp1/5*

Die Expression von *Sp-sFrp1/5* ist erstmals mittels WISH in Embryonen im Blastula-Stadium detektierbar. *Sp-sFrp1/5* ist dort schwach im apikalen Ektoderm exprimiert (Abb. 47, A). Die Expression bleibt in der spätes Blastula (Abb. 47, B), während der

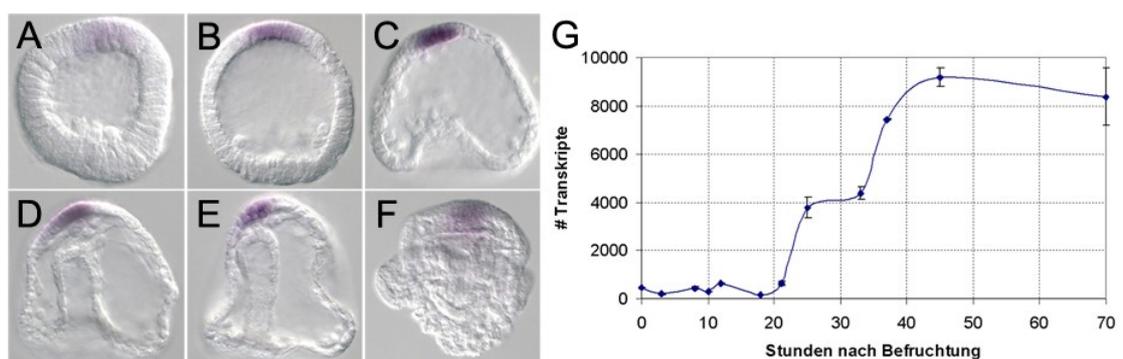


Abb. 47: "Expression von *Sp-sFrp1/5*."

Mit Hilfe der WISH ermitteltes Expressionsmuster von *Sp-sFrp1/5* in verschiedenen Entwicklungsstadien: Blastula-Stadium (A), spätes Blastula-Stadium (B), frühes Gastrula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), spätes Gastrula-Stadium (E) und Pluteus-Larve (F). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F). Mittels qPCR ermitteltes zeitliches Expressionsprofil von *Sp-sFrp1/5* (G).

Gastrulation (Abb. 47, C-E) und in der Pluteus-Larve (Abb. 47, F) auf das apikale Ektoderm beschränkt. Die qPCR-Analyse offenbart, dass *Sp-sFrp1/5* bereits maternal exprimiert ist. Innerhalb der ersten 25 Stunden nach der Befruchtung pendelt die Anzahl der Transkripte zwischen 150 und 600 pro Embryo (Abb. 47, G). Anschließend steigt die Anzahl der *Sp-sFrp1/5*-Transkripte schnell auf etwa 4000 pro Embryo, bleibt auf diesem Niveau bis 33 Stunden nach der Befruchtung und steigt dann weiter auf ein Maximum von etwa 10000 Transkripten pro Embryo 45 Stunden nach der Befruchtung. In der Pluteus-Larve sind dann noch etwa 8000 Transkripte detektierbar (Abb. 47, G).

4.6.2 Regulation serotonerger Zellen durch verschiedene Gene

Da *SpDkk3* und *Sp-sFrp1/5* ebenso wie *SpDkk1* Signalmoleküle sind, die im apikalen Ektoderm exprimiert sind, stellte sich die Frage, ob auch diese beiden Gene an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt sind. Um das zu überprüfen, wurden spezifische MASOs synthetisiert (siehe Kapitel 2.5.2) und Embryonen mit diesen injiziert. Diese wurde anschließend für drei Tage kultiviert und anschließend mittels immunologischer Verfahren auf Serotonin-positive Zellen hin untersucht. Des Weiteren wurde an Hand der qPCR der Einfluss der Perturbationen von *SpDkk3* oder *Sp-sFrp1/5* auf die Expression der an der Biosynthese von Serotonin beteiligten Enzyme untersucht.

Sowohl *SpDkk3*-MASO- als auch *Sp-sFrp1/5*-MASO-injizierte Embryonen bilden drei Tage nach der Befruchtung im Gegensatz zu Kontroll-MASO-injizierten Embryonen (siehe Kapitel 4.5.2) keine normal entwickelten Pluteus-Larven aus (Abb. 48, A2+B2). Die *SpDkk3*-MASO-injizierten Embryonen bilden keinen drei-gliedrigen Darm. Es fehlt ihnen die Mundöffnung und sie besitzen keine serotonergen Zellen (Abb. 48, A1+A2). Übereinstimmend mit dem Befund, dass *SpDkk3*-MASO-injizierte Embryonen keine serotonergen Zellen mehr besitzen, zeigt die qPCR, dass das an der Serotonin-Biosynthese beteiligte Enzym *Tph* in den perturbierten Embryonen etwa fünffach herunterreguliert ist (Abb. 48, A3). Das andere an der Biosynthese beteiligte Enzym *Aadc* weist hingegen keine signifikante Änderung im Expressionslevel auf (Abb. 48, A3). Die *Sp-sFrp1/5*-MASO-injizierten Embryonen besitzen zwar serotonerge Zellen, allerdings ist das apikale Ektoderm stark vergrößert. Außerdem ist der Mund nicht vollständig ausgebildet und auch der Darm scheint nicht korrekt ausgebildet zu sein (Abb. 48, B1+B2). Übereinstimmend mit dem positiven Serotonin-Nachweis zeigt die qPCR-Analyse, dass die Expressionslevel der beiden Enzyme in den *Sp-sFrp1/5*-perturbierten Embryonen unverändert sind (Abb. 48, B3).

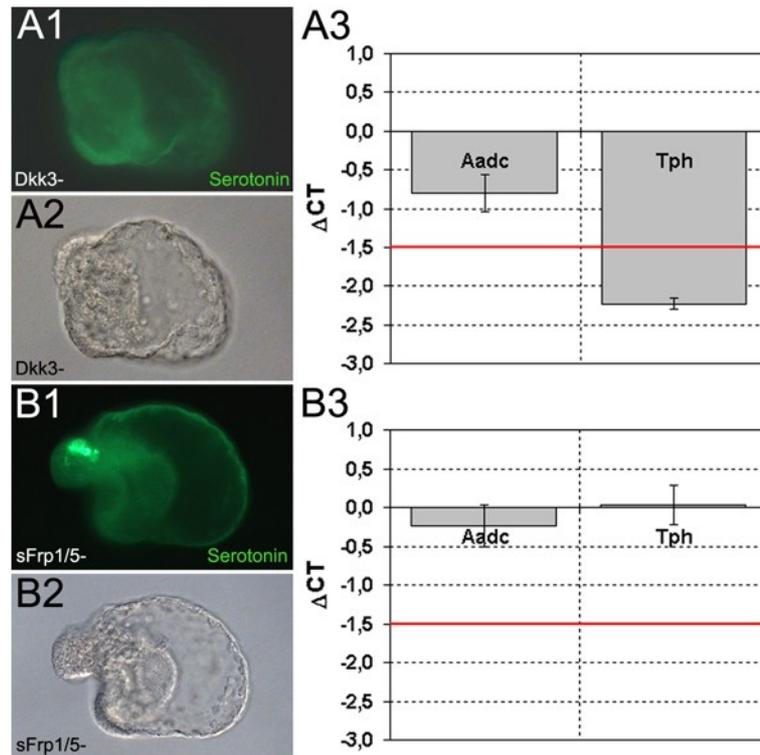


Abb. 48: „Einfluss von *SpDkk3*- und *Sp-sFrp1/5* auf serotonerge Zellen.“
 Nachweis von Serotonin (A1, B1) in *SpDkk3*-MASO-injizierten (A1, A2) bzw. *Sp-sFrp1/5*-MASO-injizierten Pluteus-Larven (B1). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A, B). Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel von *SpAadc* und *SpTph* in *SpDkk3*-MASO-injizierten (A3) bzw. *Sp-sFrp1/5*-MASO-injizierten Embryonen im Gastrula-Stadium (B3).

Darüberhinaus wurden für sechs der zuvor identifizierten apikal-exprimierten Transkriptionsfaktoren ebenfalls spezifische MASOs synthetisiert (siehe Kapitel 2.5.2), um zu testen, ob sie an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt sind. Für den Transkriptionsfaktor *SpFoxQ2* wurde außerdem synthetische mRNA hergestellt, um Überexpressionsstudien durchzuführen.

SpAlx-MASO-, *SpFoxJ1*-MASO-, *SpFoxQ2*-MASO-, *SpGlass*-MASO-, und *SpSix3*-MASO-injizierte Embryonen bilden drei Tage nach der Befruchtung Pluteus-Larven, die morphologisch nicht von Kontroll-MASO-injizierten Embryonen (siehe Kapitel 4.5.2) zu unterscheiden sind (Abb. XX, A2-C2,E2+G2). Die immunologische Detektion von Serotonin zeigt jedoch, dass lediglich *SpAlx*-MASO-, *SpFoxJ1*-MASO- und *SpSix3*-MASO-injizierte Embryonen auch, ebenso wie Wildtyp- bzw. Kontroll-MASO-injizierte Pluteus-Larven, serotonerge Zellen im apikalen Ektoderm oberhalb des Stomodeums besitzen (Abb. 49, A1+B1+G1). *SpFoxQ2*-MASO und *SpGlass*-MASO-injizierte Embryonen hingegen bilden im Gegensatz zu Kontroll-MASO-injizierte Embryonen (siehe Kapitel 4.5.2) keine serotonergen Zellen (Abb. 49, C1+E1). *SpMox*-MASO-

injizierte Embryonen sind im Vergleich zu Kontroll-MASO-injizierten Embryonen morphologisch stark verändert. Sie bilden keinen Darm und scheinen eine symmetrische oral-aborale Achse zu bilden (Abb. 49, F2). Des Weiteren bilden die *SpMox*-MASO-injizierten Embryonen keine serotonergen Zellen (Abb. 49, F1). Eine Überexpression von *SpFoxQ2* führt zu Embryonen, die keinen Darm und ein verdicktes apikales Ektoderm ausbilden (Abb. 49, D2). Sie gleichen morphologisch *Cadherin*-mRNA-injizierten Embryonen und besitzen ebenso wie diese eine deutlich größere Anzahl von serotonergen Zellen, wie der immunologische Nachweis zeigt (Abb. 49, D1; siehe Kapitel 4.5.2).

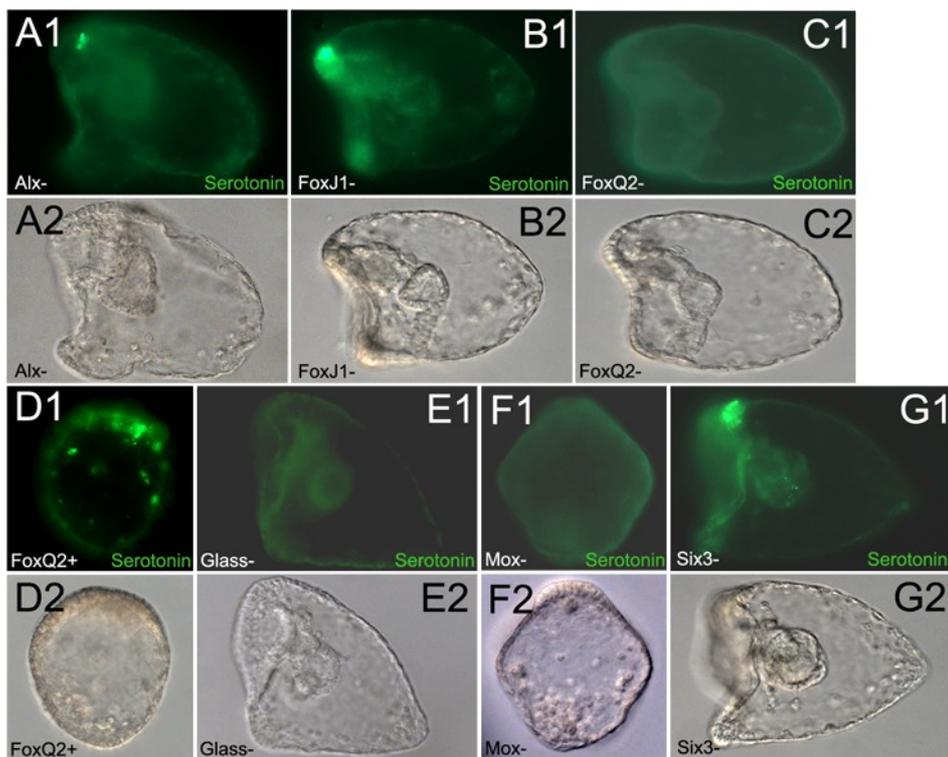


Abb. 49: „Serotonin-Nachweis in unterschiedlich perturbierten Embryonen.“
Nachweis von Serotonin (A1-G1) in unterschiedlich perturbierten Pluteus-Larven: *SpAlx*-MASO- (A), *SpFoxJ1*-MASO- (B), *SpFoxQ2*-MASO- (C), *SpFoxQ2*-mRNA- (D), *SpGlass*-MASO- (E), *SpMox*-MASO- (F) und *SpSix3*-MASO-injiziert (G). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-G).

In einer früheren Studie (Takacs *et al.*, 2004) konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Translation von *SpNkx2.1* keinerlei sichtbaren Folgen für die Entwicklung der Embryonen hat. Drei Tagen nach der Befruchtung sind die *SpNkx2.1*-MASO-injizierten Embryonen morphologisch nicht von Kontroll-injizierten Embryonen zu unterscheiden, und sie besitzen ebenso wie Wildtyp-Embryonen serotonerge Zellen.

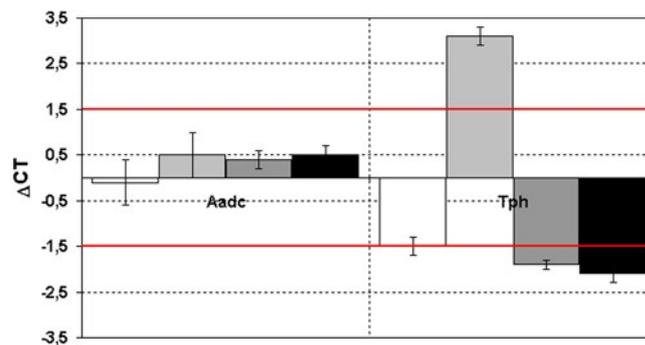


Abb. 50: „Regulation von *SpAadc* und *SpTph*.“

Mittels qPCR ermittelte Änderung der Expressionslevel von *SpAadc* und *SpTph* in *SpFoxQ2*-MASO- (weiss), *SpFoxQ2*-mRNA- (hellgrau), *SpGlass*-MASO- (dunkelgrau) und *SpMox*-MASO-injizierten Embryonen (schwarz) im Gastrula-Stadium.

Um sicherzustellen, dass die *SpFoxQ2*-MASO-, *SpGlass*-MASO- sowie *SpMox*-MASO-injizierten Embryonen wirklich Serotonin-negativ sind, bzw. tatsächlich mehr serotonerge Zellen in den *SpFoxQ2*-mRNA-injizierten Embryonen vorhanden sind, wurden die Expressionslevel der beiden an der Serotonin-Biosynthese beteiligten Enzyme (siehe Kapitel 4.5.1) in den perturbierten Embryonen mittels qPCR gemessen. In allen injizierten Embryonen ist das Expressionslevel der *SpAadc* im Vergleich zu Kontroll-Embryonen unverändert (Abb. 50). Das Expressionslevel von *SpTph* ist hingegen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen deutlich verändert. So sind in den *SpFoxQ2*-Überexpressionsembryonen etwa achtfach so viele *SpTph*-Transkripte zu finden wie in den Kontroll-Embryonen. Im Gegensatz dazu, sind in den drei MASO-injizierten Embryonen die *SpTph*-Expressionslevel deutlich verringert (Abb. 50).

4.6.3 GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen

Während die Endomesodermentwicklung des Seeiglembryos relativ gut untersucht ist, d.h. viele daran beteiligte Gene und deren Interaktionen untereinander bekannt sind (siehe Kapitel 1.3.5), ist bisher weitgehend unbekannt, welche Gene an der Bildung des apikalen Ektoderms sowie an der Spezifizierung von serotonergen Zellen beteiligt sind und wie diese miteinander interagieren. Nachdem mit Hilfe der WISH potenzielle Gene identifiziert wurden (siehe Kapitel 4.6.1) und durch immunologische Verfahren die Beteiligung einzelner Gene an der Bildung von serotonergen Zellen gezeigt wurde (siehe Kapitel 4.6.2), sollte anschließend geklärt werden, wie diese Gene untereinander interagieren. Daher wurde mittels qPCR

untersucht, welchen Einfluss die Überexpression bzw. die Inhibierung der Translation eines Gens auf die Expression der übrigen apikal exprimierten Gene hat.

Regulation durch *SpDkk1*

In *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Gastrula-Stadium sind sieben der fünfzehn in dieser Arbeit identifizierten Gene herunterreguliert (Abb. 51, A). Alle anderen Gene weisen keine signifikante Änderung in ihren Expressionsniveaus auf. Am stärksten betroffen sind *SpAlx* und *SpMox*, deren Transkriptanzahl nur noch etwa ein Achtel der Transkripte beträgt, die man in Wildtyp-Embryonen findet. Die Änderung der Expressionslevel von *SpFoxQ2* und *SpNkx2.1* liegen knapp an der Signifikanzgrenze. Deren Expressionsniveaus sind aber immer noch etwa dreifach niedriger als in Kontroll-Embryonen (Abb. 51, A).

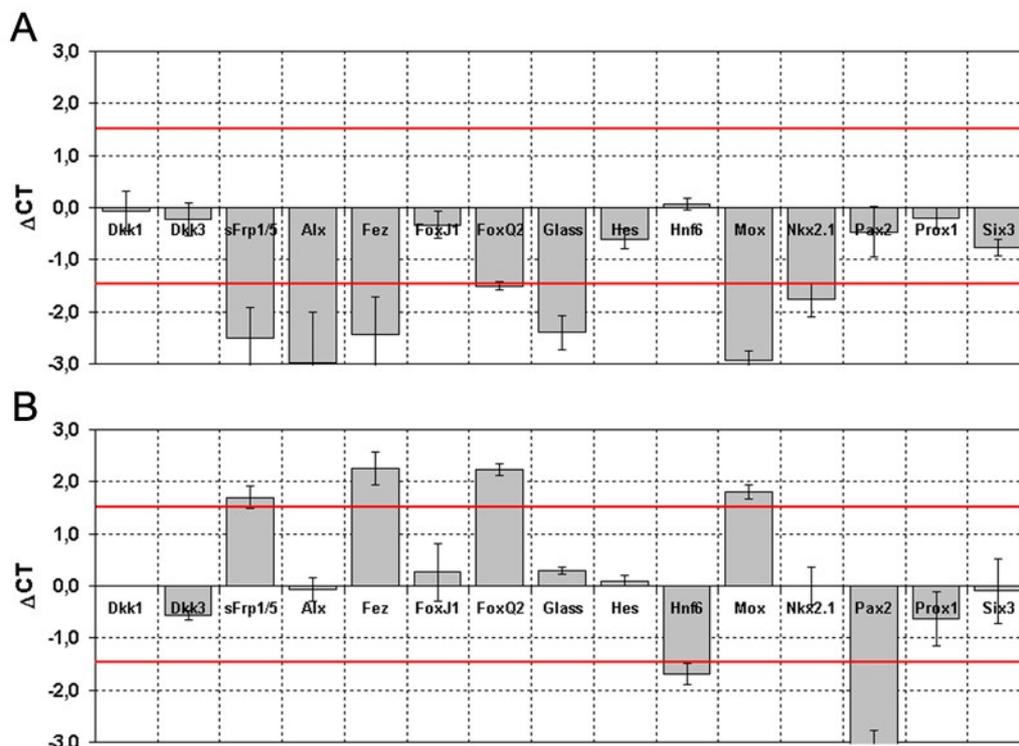


Abb. 51: „Regulation apikal exprimierter Gene durch *SpDkk1*.“

Mittels qPCR ermittelte Regulation apikal exprimierter Gene im Gastrula-Stadium durch *SpDkk1*. Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Gene herbeigeführt durch *SpDkk1*-MASO- (A) bzw. *SpDkk1*-mRNA-Injektion (B).

Im Gegensatz dazu findet man in *SpDkk1*-Überexpressionsembryonen vier Gene hochreguliert und lediglich zwei herunterreguliert. (Abb. 51, B). Alle übrigen Gene zeigen keine signifikante Veränderung in ihren Transkriptzahlen. Am stärksten ist *SpPax2* reguliert, die Anzahl der *SpPax2*-Transkripte ist in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen mehr als achtfach geringer als in Kontroll-Embryonen (Abb. 51).

Regulation durch *SpDkk3*

Durch die Injektion von *SpDkk3*-MASO wird lediglich die Expression von *SpDkk3* und von *SpMox* beeinflusst (Abb. 52). Während jedoch die *SpDkk3*-Transkriptzahl in *SpDkk3*-MASO-injizierten Embryonen fast fünffach ansteigt, führt die Inhibierung der Gentranslation von *SpDkk3* zu einer Reduzierung der *SpMox*-Transkripte (Abb. 52).

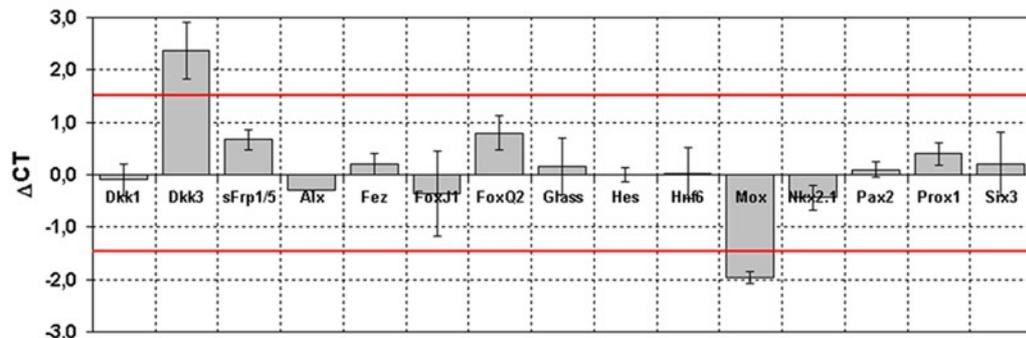


Abb. 52: „Regulation apikal exprimierter Gene durch *SpDkk3*.“

Mittels qPCR ermittelte Regulation apikal exprimierter Gene im Gastrula-Stadium durch *SpDkk3*. Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Gene herbeigeführt durch *SpDkk3*-MASO-Injektion.

Regulation durch *Sp-sFrp1/5*

Wie die qPCR-Analyse zeigt, wird keines der apikal exprimierten Gene durch die Inhibierung der Translation von *Sp-sFrp1/5* signifikant beeinflusst. Lediglich die Anzahl der eigenen Transkripte wird durch die *Sp-sFrp1/5*-MASO-Injektion etwa vervierfacht (Abb. 53).

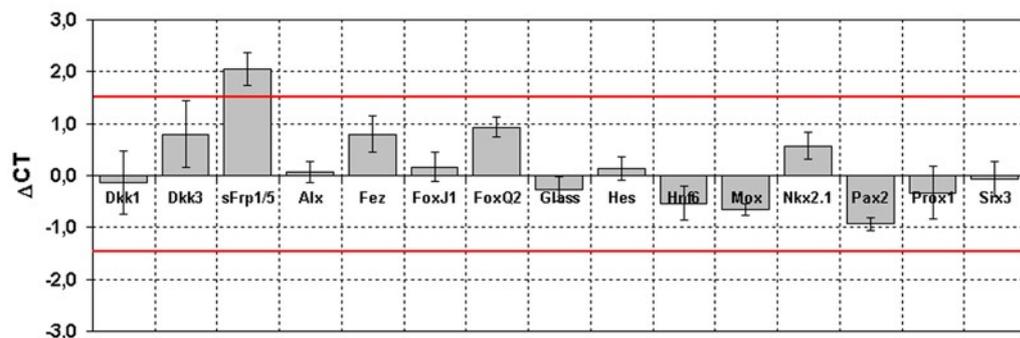


Abb. 53: „Regulation apikal exprimierter Gene durch *Sp-sFrp1/5*.“

Mittels qPCR ermittelte Regulation apikal exprimierter Gene im Gastrula-Stadium durch *Sp-sFrp1/5*. Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Gene herbeigeführt durch *Sp-sFrp1/5*-MASO-Injektion.

Regulation durch *SpFoxQ2*

In den *SpFoxQ2*-MASO-injizierten Embryonen findet man *SpFoxQ2* und *SpGlass* im Vergleich zu Kontroll-Embryonen etwa sechsfach hochreguliert. *Sp-sFrp1/5* und *SpFez* sind knapp signifikant herunterreguliert und *SpMox* deutlich herunterreguliert. Alle übrigen Gene werden durch die *SpFoxQ2*-MASO-Injektion nicht beeinflusst (Abb. 54, A).

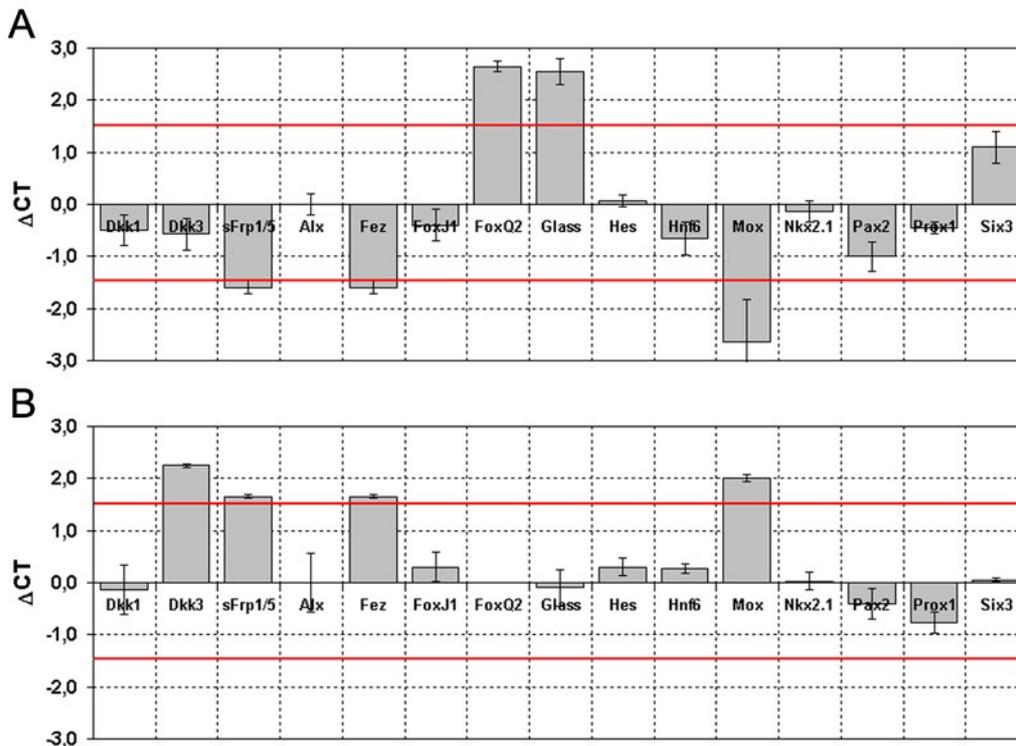


Abb. 54: „Regulation apikal exprimierter Gene durch *SpFoxQ2*.“

Mittels qPCR ermittelte Regulation apikal exprimierter Gene im Gastrula-Stadium durch *SpFoxQ2*. Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Gene herbeigeführt durch *SpFoxQ2*-MASO- (A) bzw. *SpFoxQ2*-mRNA-Injektion (B).

In *SpFoxQ2*-Überexpressionsembryonen hingegen sind die Expressionslevel von *SpDkk3*, *Sp-sFrp1/5*, *SpFez* und *SpMox* höher als in Kontroll-Embryonen. Ansonsten kann keine Regulation festgestellt werden (Abb. 54, B).

Regulation durch SpGlass

In den *SpGlass*-MASO-injizierten Embryonen ist das Expressionsniveau von *SpDkk3* und *SpPax2* höher als in den Kontroll-Embryonen, während die Anzahl der *SpFez*-Transkripte in den *SpGlass*-MASO-injizierten niedriger ist als in den Kontroll-Embryonen (Abb. 55).

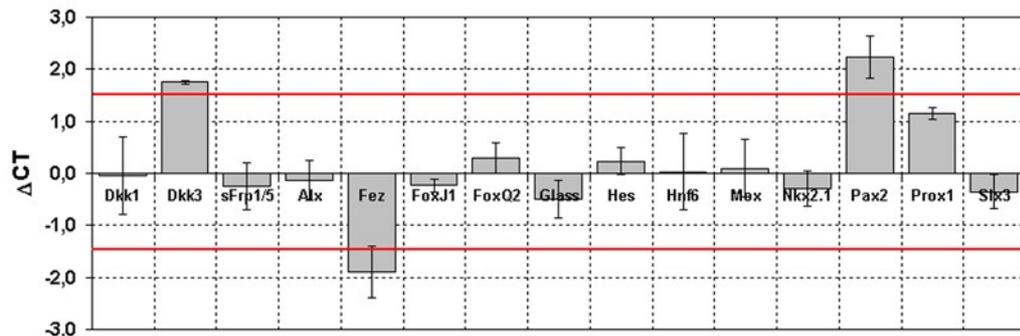


Abb. 55: „Regulation apikal exprimierter Gene durch *SpGlass*.“

Mittels qPCR ermittelte Regulation apikal exprimierter Gene im Gastrula-Stadium durch *SpGlass*. Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Gene herbeigeführt durch *SpGlass*-MASO-Injektion.

Regulation durch SpMox

In *SpMox*-MASO-injizierten Embryonen sind die Expressionslevel von *SpAlx*, *SpFez*, *SpGlass*, *SpMox* und *SpPax2* im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen niedriger. Allerdings sind die Verringerungen der Transkriptzahlen von *SpAlx* und *SpFez* nur knapp signifikant. Alle übrigen Gene werden durch *SpMox* nicht signifikant reguliert (Abb. 56).

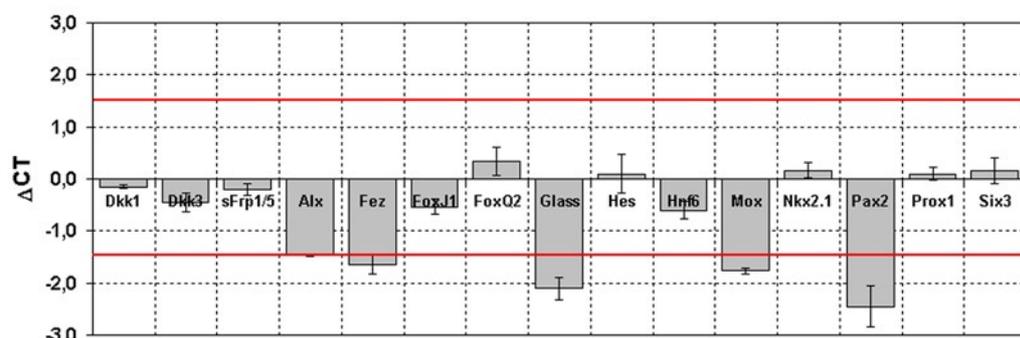


Abb. 56: „Regulation apikal exprimierter Gene durch *SpMox*.“

Mittels qPCR ermittelte Regulation apikal exprimierter Gene im Gastrula-Stadium durch *SpMox*. Änderung der Expressionslevel der verschiedenen Gene herbeigeführt durch *SpMox*-MASO-Injektion.

Des Weiteren wurden Doppel-WISH-Analysen durchgeführt, um zu prüfen, ob diese Regulationen durch direkte oder indirekte Interaktionen zustande kommen. Da dabei insbesondere die Bildung serotonerger Zellen im Vordergrund stand, wurde zunächst untersucht, ob einzelne Transkriptionsfaktoren in Serotonin-positiven Zellen exprimiert werden. Da *SpFoxQ2* ein für die Organisation des apikalen Ektoderms wichtiger Transkriptionsfaktor ist (siehe Kapitel 1.4.3), wurde anschließend geprüft, ob die beim Screen identifizierten Transkriptionsfaktoren mit *SpFoxQ2* kolokalisieren.

SpFez, *SpGlas* und *SpMox* sind ebenso wie *SpTph* in einigen wenigen Zellen im apikalen Zellen exprimiert (siehe Kapitel 4.5.1 und 4.6.1). Die simultane Detektion von *SpTph* und *SpFez* zeigt, dass sämtliche Zellen, die *SpTph* exprimieren auch *SpFez* exprimieren (Abb. 57, A). Dasselbe gilt für die beiden Transkriptionsfaktoren *SpGlass* und *SpMox* (Abb. 57, C+D). Die Zellen, die *SpFoxQ2* und *SpPax2* exprimieren, sind Serotonin-negativ. Die *SpTph*-exprimierenden Zellen liegen allerdings sehr nahe zu den *SpFoxQ2*- bzw. *SpPax2*-positiven Zellen (Abb. 57, B+E).

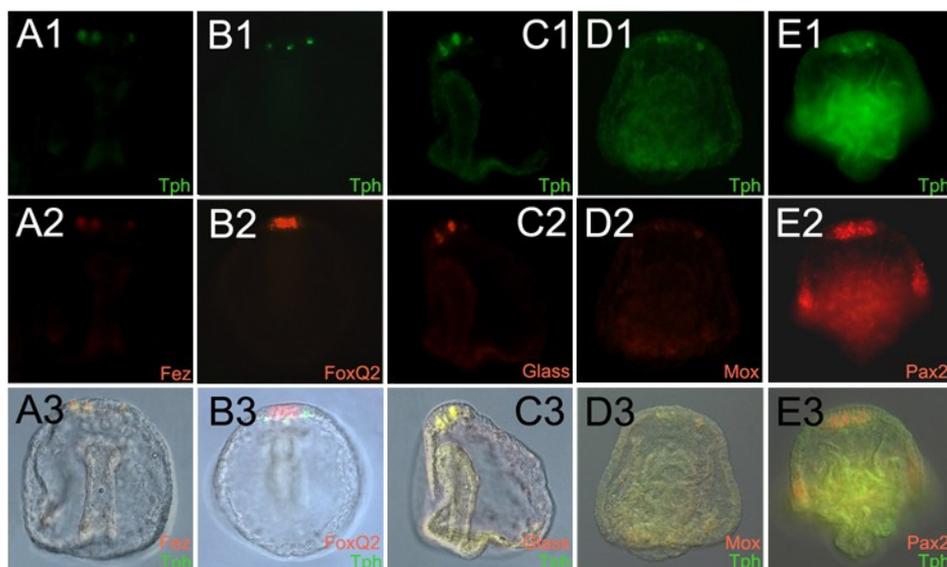


Abb. 57: „Kokolisierung von *SpTph* und verschiedenen Genen.“

Simultaner Nachweis von *SpTph* (A1-E1) und *SpFez* (A2), *SpFoxQ2* (B2), *SpGlass* (C2), *SpMox* (D2) bzw. *SpPax2* (E2) in verschiedenen Entwicklungsstadien: späte Gastrula (A-C), Prism-Larve (D) und Pluteus-Larve (E). Überlagerungen der jeweiligen Expressionsmuster (A3-E3). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-E).

Die gleichzeitige Detektion von *SpFoxQ2* und *SpAlx* zeigt, dass im späten Blastula-Stadium der Expressionsort von *SpFoxQ2* identisch mit dem von *SpAlx* ist (Abb. 58, A). Im weiteren Verlauf der Entwicklung verschwindet die Expression von *SpAlx* im Zentrum des apikalen Ektoderms, wie bereits durch WISH-Analyse festgestellt (siehe Kapitel 4.6.1). Genau in diese Lücke fällt die Expression von *FoxQ2*.

Es findet sich keinerlei Überlappung der beiden Expressionsflächen (Abb. 58, B). Die Expression von *FoxQ2* und *FoxJ1* hingegen ist vollkommen identisch (Abb. 58, C). Die Expression von *SpHes* im apikalen Ektoderm ist ebenfalls identisch mit der von *SpFoxQ2*. Daneben findet man Expression von *SpHes* wie bereits beschrieben im Gastrula-Stadium im gesamten Cilienband (siehe Kapitel 4.6.1). Die Doppel-WISH zeigt deutlich, dass die Expression von *SpHes* im apikalen Ektoderm, markiert durch die Expression von *SpFoxQ2*, in der Pluteus-Larve verloren gegangen ist (Abb. 58, E). Die gleichzeitige Detektion von *SpHnf6* und *SpFoxQ2* zeigt, dass der Teil der Expression von *SpHnf6*, die im apikalen Ektoderm lokalisiert ist, identisch mit der Expressionsfläche von *SpFoxQ2* ist (Abb. 58, F). Ansonsten ist *SpHnf6* wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 4.6.1) im gesamten Cilienband exprimiert.

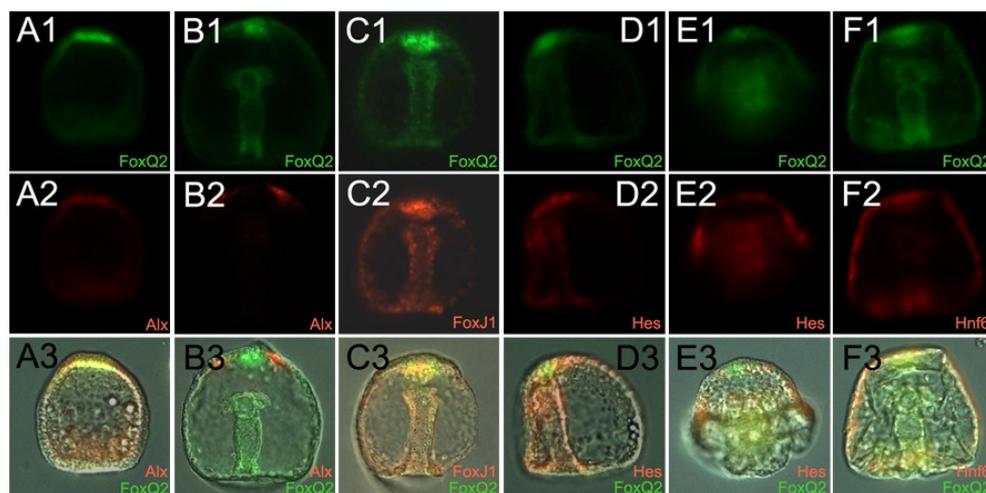


Abb. 58: „Kokolokalisation von *SpFoxQ2* und verschiedenen Genen.“
 Simultaner Nachweis von *SpFoxQ2* (A1-F1) und *SpAlx* (A2+B2), *SpFoxJ1* (C2), *SpHes* (D2+E2) und *SpHnf6* (F2) in verschiedenen Entwicklungsstadien: späte Blastula (A), späte Gastrula (B-D), Prism-Larve (F) und Pluteus-Larve (E). Überlagerungen der jeweiligen Expressionsmuster (A3-F3). Laterale Ansicht mit animaler Seite oben (A-F).

Basierend auf den mittels qPCR ermittelten zeitlichen Expressionsprofilen und den durch WISH gefundenen Expressionsmuster (siehe Kapitel 4.6.1) sowie den durch qPCR beobachteten Regulationsdaten wurde ein zeitlich-dynamisches GRN für das apikale Ektoderm einschließlich serotonerger Zellen unter Verwendung des Programmes Biotapestry (<http://www.biotapestry.org>) erstellt.

Insgesamt wurden drei Signalmoleküle - *SpDkk1*, *SpDkk3* und *Sp-sFrp1/5* - identifiziert, die im apikalen Ektoderm exprimiert sind. Daneben sind acht Transkriptionsfaktoren - *SpAlx*, *SpFoxJ1*, *SpFoxQ2*, *SpHes*, *SpHnf6*, *SpNkx2.1*, *SpPax2* und *SpSix3* - gefunden worden, deren Expression im apikalen Ektoderm lokalisiert ist sowie drei weitere Transkriptionsfaktoren - *SpFez*, *SpGlass*, *SpMox* - , die

spezifisch in serotonergen Zellen exprimiert sind. *SpFoxJ1*, *SpHes* sowie *SpSix3* sind zwar im apikalen Ektoderm exprimiert, stehen aber, soweit in dieser Arbeit untersucht, nicht mit den anderen Genen in Verbindung. Da vorangegangene Untersuchungen darauf hindeuten, dass die Wirkung von *SpDkk1* auf der Inhibition von Tcf/Lef beruht (siehe Kapitel 1.3.4 und 4.3), wurde der Transkriptionsfaktor Tcf/Lef in das GRN eingefügt. Interaktionen zwischen *SpDkk1* und *Sp-sFrp1/5*, *SpFoxQ2* und *Sp-sFrp1/5*, *SpFoxQ2* und *SpDkk3* sowie *SpGlass* und *SpDkk3* sind gestrichelt dargestellt, da keine Kolokalisationsdaten vorliegen und daher nicht sicher ist, ob eine direkte oder indirekte Interaktion vorliegt.

Da *Dkk3* als Signalmolekül beschrieben ist (siehe Kapitel 1.2.2) und daher wahrscheinlich nicht direkt für die Regulation anderer Gene verantwortlich ist, wurde ein Transkriptionsfaktor X hinzugefügt. Des Weiteren wurde die Regulation von *SpFez*, *SpGlass*, *SpMox* und *SpTph* durch *SpDkk1* nicht dargestellt, da diese wahrscheinlich über *SpFoxQ2* bzw. *SpMox* vermittelt wird. Die Interaktion zwischen *SpFoxQ2* und *SpMox*, *SpFoxQ2* und *SpFez*, *SpMox* und *SpPax2* sowie *SpGlass* und *SpPax2* sind, da diese Transkriptionsfaktoren nicht im selben Gewebe exprimiert sind (Abb. 59, A+B, D+E), indirekter Natur (Abb. 59, A). Maternal exprimiert sind lediglich *SpDkk3*, *SpHes*, *SpHnf6*, *Sp-sFrp1/5* und *SpSix3* (Abb. 59, B). Im Blastula-Stadium sind zudem noch *SpAlx*, *SpFoxJ1*, *SpFoxQ2* und *SpNkx2.1* aktiviert (Abb. 59, C). Im Gastrula-Stadium werden dann noch *SpDkk1*, *SpPax2* sowie sämtliche Transkriptionsfaktoren in den serotonergen Zellen aktiviert. Dementsprechend wird auch *SpTph* exprimiert und damit wird Serotonin gebildet. *SpSix3* hingegen ist im Gastrula-Stadium nicht mehr im apikalen Ektoderm exprimiert (Abb. 59, D). In der Prism-Larve sind noch *SpAlx* und *SpHes* deaktiviert (Abb. 59, E). Das GRN für das apikale Ektoderm während des Stadiums der Pluteus-Larve (Abb. 59, F) ist gegenüber dem GRN für das apikale Ektoderm während des Stadiums der Prism-Larve unverändert.

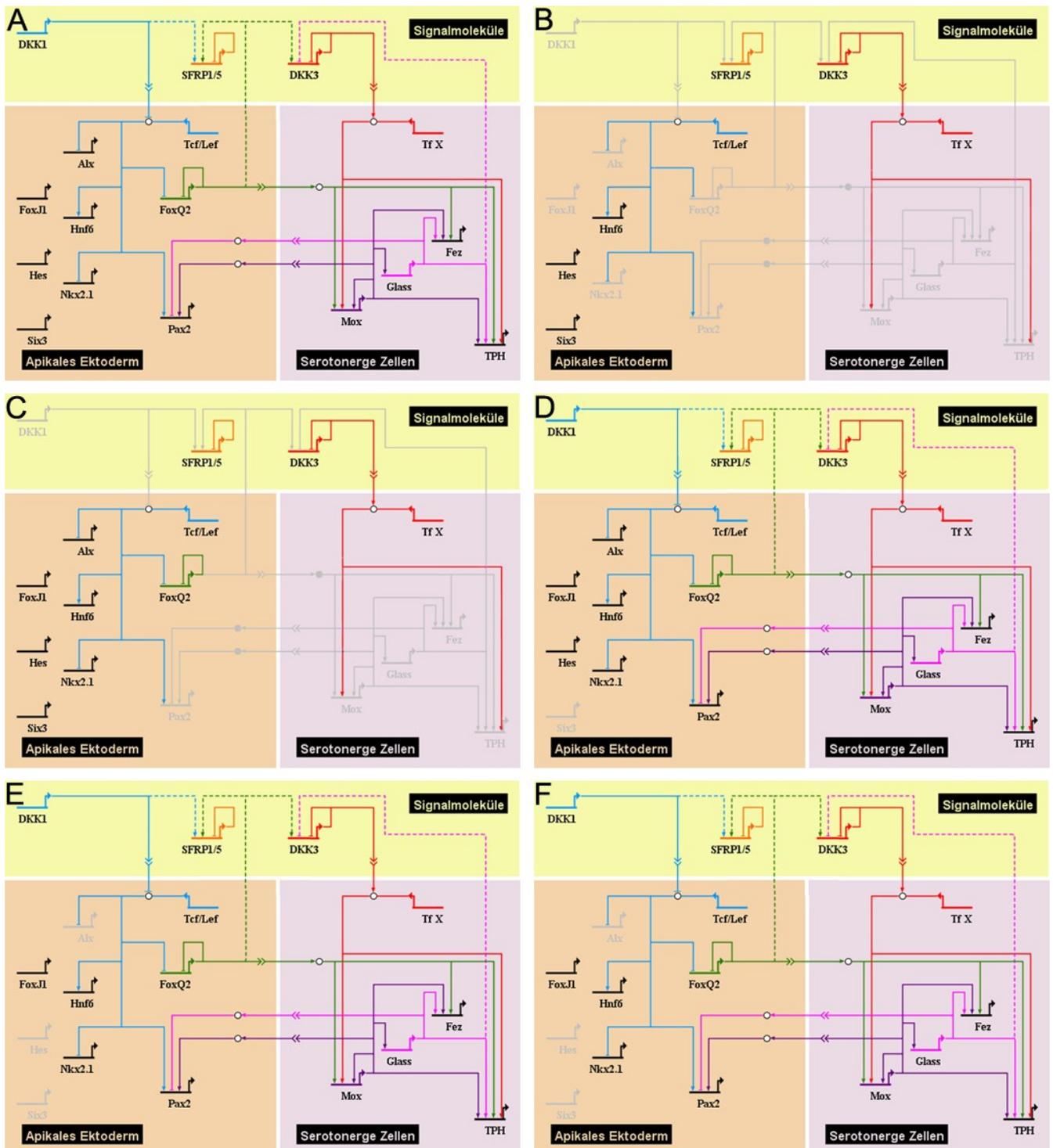


Abb. 59: „GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen.“

Mittels WISH und qPCR ermitteltes GRN (A) für das apikale Ektoderm (hellbraun) und serotonerge Zellen (hellgrau) zu verschiedenen Zeitpunkten: Eizelle (B), Blastula-Stadium (C), Gastrula-Stadium (D), Prism-Larve (E) und Pluteus-Larve (F). Signalmoleküle sowie Enzyme sind in Großbuchstaben dargestellt, bei den übrigen Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Gene, für die keine Perturbationsdaten vorliegen, sind in schwarz dargestellt. Indirekte Interaktionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

4.7 Analyse des *SpDkk1*-Promotors

Frühere Studien des *Dkk1*-Promotors im Zebrafisch haben gezeigt, dass innerhalb einer 750bp-großen Region upstream des Transkriptionsstartpunkts verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen liegen (Shinya *et al.*, 2000; siehe Kapitel 7.4). Es lassen sich drei FAST-1 (FoxH)-, eine Smad3- und zwei Tcf/Lef-Bindestellen (Abb. 60, B) finden.

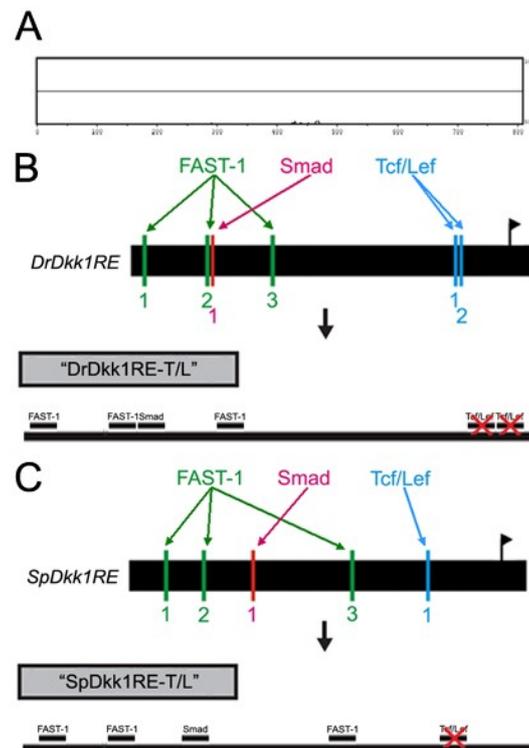


Abb. 60: „Vergleich der Promotorbereiche von *DrDkk1* und *SpDkk1*.“

Mittels rVISTA erstelltes Sequenzalignment des 750bp-Upstream-Bereichs von *DrDkk1* und *SpDkk1* (A). Schematische Darstellung des Promotorbereichs von *DrDkk1* (B, DrDkk1RE) mit Angabe einzelner vorhergesagter Transkriptionsfaktor-Bindestellen (Shinya *et al.*, 2000) und dessen Deletionskonstrukts (B, DrDkk1RE-T/L) sowie des Promotorbereichs von *SpDkk1* (C, SpDkk1RE) und dessen Deletionskonstrukts (C, SpDkk1RE-T/L).

Mit Hilfe der Seeigelgenom-Datenbank wurde die 750bp-große upstream des Transkriptionsstarts von *SpDkk1* liegende Region (siehe Kapitel 7.4) isoliert und mittels rVISTA (Loots&Ovcharenko, 2004; <http://rvista.dcode.org/>) ein Sequenz-Alignment hergestellt, um mögliche konservierte Bereiche aufzuspüren. Da die beiden keinerlei Homologien aufwiesen (Abb. 60, A), wurde die Seeigelsequenz direkt nach den Consensus-Sequenzen - TGT(G/T)(G/T)ATT für FAST-1 (FoxH) (Zhou *et al.*, 1998), GTCT für Smad3 (Shi *et al.*, 1998) und CTTG(A/T)(A/T) für Tcf/Lef (Travis *et al.*, 1991) - für die drei verschiedenen Transkriptionsfaktoren durchsucht. Abgesehen von einer Tcf/Lef-Bindestelle konnten alle anderen Transkriptionsfaktor-

Bindestellen auch in der Seeigelsequenz gefunden werden und zwar in der identischen Abfolge wie in der Sequenz des Zebrafischs (Abb. 60, C).

Um die Funktionalität der Promotorbereiche zu testen, wurden diese mittels PCR und den entsprechenden Primern (Dkk1PSU bzw. Dkk1PZF, siehe Kapitel 2.5.1) von genomischer DNA amplifiziert und mit Hilfe eines etablierten Reporterassays (Müller *et al.*, 1997; Woolfe *et al.*, 2005) in Zebrafischembryonen injiziert. Um die Funktionalität der Tcf/Lef-Bindestellen zu prüfen, wurden mittels PCR und den entsprechenden Primern (Dkk1PSU/Dkk1PSU-TL bzw. Dkk1PZF/Dkk1PZF-TL; siehe Kapitel 2.5.1) Deletionskonstrukte der beiden Regionen hergestellt (Abb. 60, B+C) und diese Deletionskonstrukte ebenfalls mit Hilfe des Reporterassays auf Funktionalität getestet. Als Positiv-Kontrolle diente eine gut charakterisierte regulatorische Sequenz des Ssh-Gens des Zebrafischs (Hufton *et al.*, 2009), welche ebenfalls mittels PCR und den entsprechenden Primern (SshPZF, siehe Kapitel 2.5.1) von genomischer DNA amplifiziert wurde.

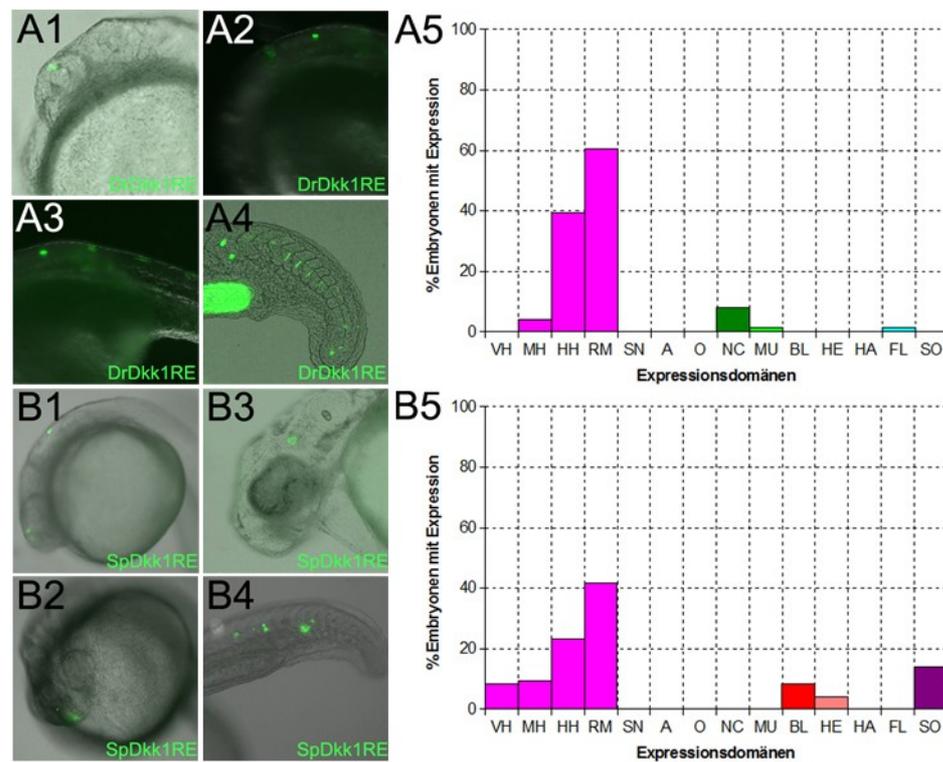


Abb. 61: „Expression des *DrDkk1*- und *SpDkk1*-Promotorbereichs.“

Expression des *DrDkk1*- (A1-A4) und des *SpDkk1*-Promotorbereichs (B1-B5) und deren statistische Verteilung (A3 bzw. B3) im Nervengewebe (pink; VH: Vorderhirn, MH: Mittelhirn, HH: Hinterhirn, RM: Rückenmark, SN: sonstiges Nervengewebe), sensorischen Organen (lila; A: Auge, O: Ohr), Notochord (dunkelgrün; NC), Muskelgewebe (hellgrün; MU), Blut (rot; BL), Herz (gelb; HE), Haut bzw. Flosse (hellblau; HA, FL: Flosse) oder sonstigem Gewebe (dunkelblau; SO).

Insgesamt zeigen 56% der etwa 100 mit der Zebrabärblings-Promotorregion injizierten Embryonen ein Signal, während lediglich 13% der ca. 200 mit der Seeigel-Promotorregion injizierten Embryonen ein Signal zeigten. Die Expressionsmuster der beiden Konstrukte sind sich allerdings sehr ähnlich. So wird sowohl das regulatorische Element des Seeiegels als auch des Zebrabärblings hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert (Abb. 61, A5+B5). 60% der mit der Zebrabärblings-Promotorregion injizierten Embryonen zeigen eine Expression im Rückenmark (Abb. 61, A2+A3) und ca. 40% im Hinterhirn (Abb. 61, A1). Daneben findet man noch Expression im Mittelhirn, Notochord (Abb. 61, A4), Muskelgewebe und in den Flossen (Abb. 61, A5). In den mit der Seeigel-Promotorregion injizierten Embryonen findet man bei etwa 40% eine Expression im Rückenmark (Abb. 61, B4) und bei 20% im Hinterhirn (Abb. 61, B3). Außerdem kann Expression im Vorderhirn (Abb. 61, B2), Mittelhirn (Abb. 61, B1), Blut, Herz und sonstigem Gewebe detektiert werden (Abb. 61, B5).

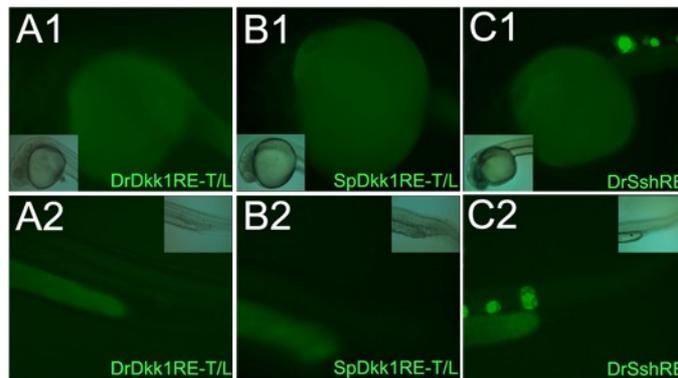


Abb. 62: „Expression der *DrDkk1*- und *SpDkk1*-Deletionskonstrukte.“

Expression der Deletionskonstrukte der Promotorbereiche von *DrDkk1* (A) und *SpDkk1* (B) sowie der Positiv-Kontrolle *DrSsh* (C) im anterioren (A1-C1) und im posterioren Bereich (A2-C2).

In keinem der 100 mit dem *DrDkk1RE-T/L*-Konstrukt injizierten Embryonen kann eine Expression festgestellt werden (Abb. 62, A1+A2). Auch von den 100 Embryonen, die mit dem *SpDkk1RE-T/L*-Konstrukt injiziert wurden, zeigt keiner eine Expression (Abb. 62, B1+B2). 60% der mit der Positivkontrolle injizierten Embryonen hingegen weisen wie erwartet eine spezifische Expression im Notochord auf (Abb. 62, C1+C2).

5. Diskussion

5.1 Identifizierung und Evolution der Dickkopf-Gene

Alle Mitglieder der Dickkopf-Familie zeichnen sich, abgesehen vom dem Dkk3 verwandeten Protein Soggy, durch zwei Cystein-reiche Domänen (Dickkopf- und Colipase-Domäne), in denen jeweils zehn Cysteinreste hochkonserviert angeordnet sind, sowie eine N-terminale Signalsequenz aus. Während von der zweiten Cystein-reichen Domäne von Dkk1, Dkk2 und Dkk4 in Vertebraten bekannt ist, dass sie den Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibiert, ist die Funktion der ersten Cystein-reichen Domäne bislang unbekannt (Li *et al.*, 2002). Des Weiteren sind viele andere extrazelluläre Proteine mit bisher unbekannter Funktion, wie die Colipase, gefunden worden, in denen nur eine Dickkopf-ähnliche Cystein-reiche Domäne präsent ist (Aravind&Koonin, 1998). Die Linker-Region zwischen den beiden Cystein-reichen Domänen variiert bei den Dkk1, Dkk2 und Dkk4 zwischen 40 und 55 Aminosäuren. In allen bisher isolierten Dkk3-Proteinen hingegen besitzt sie stets 12 Aminosäuren (siehe Kapitel 1.2.2). Die Genomanalyse des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* hat gezeigt, dass der Seeigel entgegen früherer Untersuchungen (Kühn, 2005) zwei Dickkopf-Gene besitzt. Dkk1 des Seeigels zeigt eine hohe Homologie zu Dkk1-, Dkk2- und Dkk4-Proteinen in Vertebraten und Dkk3 des Seeigels ist dem Dkk3-Protein in Vertebraten ähnlich (Croce *et al.*, 2006). Uneinigkeit besteht auch hinsichtlich der ersten Cystein-reichen Domäne in Dkk1. Obwohl die Analyse des Seeigelgenoms zeigt, dass Dkk1 des Seeigels lediglich die zweite Cystein-reiche Domäne besitzt (Croce *et al.*, 2006), konnte in einer anderen Studie ein cDNA-Klon isoliert werden, dessen Sequenzierung eindeutig gezeigt hat, dass Dkk1 des Seeigels sowohl die erste als auch die zweite konservierte Domäne enthält (Kühn, 2005). Da auch im Seeigel *Paracentrotus lividus*, eine dem *Strongylocentrotus purpuratus* sehr verwandte Seeigelart, Dkk1 identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 7.1) und dieses Protein beide Cystein-reiche Domänen besitzt, gilt es als gesichert, dass Dkk1 auch im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* beide Cystein-reiche Domänen enthält. Da beide Cystein-reiche Domänen sowohl im Dkk1- als auch Dkk3-Protein des Seeigels nahezu identisch mit den für die Dickkopf- bzw. Colipase-Domäne der bisher in anderen Organismen identifizierten Dickkopf-Proteine gefundenen Consensus-Sequenzen (Glinka *et al.*, 1998) sind, beide Proteine eine N-terminale Signalsequenz besitzen und auch die Länge der Linker-Sequenz den Erwartungen entspricht (siehe Kapitel 4.1.1), können die beiden im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* identifizierten Proteine daher eindeutig der Dickkopf-Familie zugeordnet werden.

Um neue Informationen über die evolutionäre Entwicklung von Dickkopf-Proteinen zu gewinnen, wurden die Aminosäuresequenzen der Dickkopf-Proteine des Seeigels mit den Aminosäuresequenzen weiterer Dickkopf-Proteine aus anderen Organismen innerhalb der *Deuterostomia* verglichen und mit Hilfe des NJ-Verfahrens phylogenetisch untersucht. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich der Stammbaum in drei verschiedene Äste gliedert. Ein Ast beinhaltet die Dkk1-, Dkk2-, und Dkk4-Proteine, ein Ast sämtliche Dkk3-Proteine und der dritte Ast ausschließlich die Dkk-ähnlichen Soggy-Proteine. Innerhalb der Dkk1/2/4-Gruppe sowie innerhalb der Dkk3-Gruppe befindet sich Dkk1 bzw. Dkk3 des Seeigels (bzw. der verschiedenen Seeigelarten) an der Wurzel des jeweiligen Astes. Anschließend findet man die Dickkopf-Proteine der Cephalo- bzw. Urochordaten und zuletzt die Dickkopf-Proteine der Vertebraten, die sich innerhalb der Dkk1/2/4-Gruppe zunächst in die Dkk1/2- und die Dkk4-Gruppe spalten, bevor auch noch die Dkk1- von den Dkk2-Proteinen getrennt werden (siehe Kapitel 4.1.2). Dieser Befund bekräftigt zum einen, dass die im Seeigel identifizierten Dickkopf-Proteine tatsächlich Mitglieder der Dickkopf-Familie sind. Zum anderen bestätigt er die Annahme, dass Echinodermaten am Beginn der Entwicklung der *Deuterostomia* stehen und den Vertebraten weniger verwandt sind als Cephalo- und Urochordaten und somit als *Urdeuterostomia* betrachtet werden können (Turbeville *et al.*, 1994; siehe Kapitel 1.1.1). Da innerhalb der Dkk3-Gruppe keine Dkk3-Proteinsequenz von Cephalochordaten und innerhalb der Dkk1/2/-Gruppe keine Proteinsequenz von Urochordaten vorhanden ist, ist es anhand des Stammbaums jedoch nicht möglich, den Verwandtschaftsgrad zwischen Cephalo- und Urochordaten sowie Vertebraten aufzuklären. Denn während frühere Studien die Cephalochordaten wie *Amphioxus* als nächsten Verwandten der Vertebraten zeigen (Turbeville *et al.*, 1994), weisen neuere Studien daraufhin, dass nicht die Cephalochordaten, sondern die Urochordaten wie *Ciona* die nächsten Verwandten der Vertebraten sind (Blair&Hedges, 2005; Dunn *et al.*, 2008). Obwohl in einem *Ciona*-Genomprojekt (Hino *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004) ein Protein vorhergesagt wurde, dessen Sequenz Ähnlichkeit zu Dickkopf-Proteinen der Dkk1/2/4-Gruppe zeigt, wurde es nicht in die phylogenetische Analyse miteinbezogen. Dem Protein fehlen innerhalb der stark konservierten ersten Cysteinreichen Domäne fünf Cystein-Reste und zudem ist die Länge der Linker-Region kürzer als in allen anderen bisher identifizierten Dickkopf-Proteinen der Dkk1/2/4-Gruppe (Croce *et al.*, 2006). Eine Zugehörigkeit dieses Proteins zur Dickkopf-Familie ist daher mehr als ungewiss. In den Cephalochordaten *Branchiostoma belcheri tsingtaunense* und *Branchiostoma floridae* konnten zwar Fragmente entdeckt werden, die hohe

Homologie zu Dkk3-Proteinen aufweisen (Guder *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), da die Sequenzen jedoch nicht vollständig sind, wurden diese ebenfalls nicht bei der phylogenetischen Untersuchung berücksichtigt.

Mit der Identifizierung von Dkk3 in *Hydra* wurde die These aufgestellt, dass es ursprünglich nur ein Dickkopf-Gen in *Eumetazoa* gab, aus dem durch Gen- bzw. Genomduplikation die vier verschiedenen Dickkopf-Gene in Vertebraten entstanden sind (Fedders *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass im Genom des Seeigels zwei Dickkopf-Gene identifiziert wurden, widerspricht dieser Theorie, da Genomduplikationen erst nach der Abspaltung der Vertebraten von den Cephalo- bzw. Urochordaten stattgefunden haben (Sidow, 1996). Vielmehr unterstützt dieser Befund die These, dass sich die Dkk1/2/4- und das Dkk3-Gen in den *Eumetazoa* unabhängig voneinander entwickelt haben (Del Barco Barrantes *et al.*, 2006). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass ein weiteres Mitglied der Dickkopf-Familie in *Hydra* (Augustin *et al.*, 2006) und *Nematostella* (Guder *et al.*, 2006) entdeckt wurde. Demnach sind die beiden Dickkopf-Gene bereits in *Cnidaria* vorhanden. Doch während sich das Dkk1/2/4-Gen später während der Entstehung der Vertebraten dupliziert hat und dadurch die Dkk1-, Dkk2- und Dkk4-Gene in Vertebraten entstanden sind, wurde das Dkk3-Gen im Laufe der Evolution nicht vervielfältigt. Da allerdings das Dkk1/2/4-Gen von *Hydra* nur die zweite Cystein-reiche Domäne besitzt (Augustin *et al.*, 2006) und das Dkk1/2/4-Gen von *Nematostella* kein Signalpeptid sowie eine im Vergleich zu den übrigen Dickkopf-Genen kürzere Linker-Region besitzt (Guder *et al.*, 2006), bleibt es fraglich, ob es sich tatsächlich um Mitglieder der Dickkopf-Familie handelt. Relativ sicher scheint hingegen zu sein, dass das/die Dickkopf-Gen(e) in *Protostomia* verloren gegangen ist/sind, da weder in *Insecta* noch in *Nematoda* Dickkopf-Gene identifiziert werden konnten (Croce *et al.*, 2006; Fedders *et al.*, 2004).

5.2 Expression der Dickkopf-Gene

Expression von *SpDkk1* ist erstmals in der frühen Blastula in der Vegetalplatte zu finden. Mit Beginn der Gastrula ist neben der Expression im Endomesoderm noch Expression im apikalen Ektoderm zu finden. Im Laufe der Gastrulation ist *SpDkk1* in der Darmspitze sowie weiterhin im apikalen Ektoderm exprimiert. In der Pluteus-Larve ist *SpDkk1* im Mundbereich, den sich entwickelnden Armen sowie im apikalen Ektoderm exprimiert (siehe Kapitel 4.1.3). Die Vegetalplatte des Seeigelembryos aber ist Ausgangspunkt der Induktion von endomesodermalen Gewebe und damit der Etablierung der animalen-vegetalen Achse im Embryo und kann daher als Äquivalent

des Organisator-Bereichs von Vertebraten angesehen werden. Damit entspricht dieses Expressionsmuster in vielerlei Hinsicht den Expressionsmustern von Dickkopf-Genen in anderen Organismen. So ist *Dkk1* sowohl in Embryonen des Zebrafischs als auch der Maus im Organisator-Bereich exprimiert (siehe Kapitel 1.2.2). Auch im *Amphioxus* ist *Dkk1* in der sich invaginierenden Vegetalplatte, also dem Bereich, der in Vertebraten als Organisator-Bereich definiert ist (Gilbert&Saxen, 1993; siehe Kapitel 1.2.1), exprimiert (Yu *et al.*, 2007). Die Vegetalplatte des Seeigelembryos ist, wie bereits erwähnt, Ausgangspunkt der Endomesoderm-Differenzierung im Seeigelembryo. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Wnt/ β -Catenin-Signalweg (siehe Kapitel 1.3.5). Da *Dkk1* in Vertebraten als Inhibitor dieses Signalwegs beschrieben wurde, macht, unter der Annahme, dass diese Funktion konserviert ist (siehe Kapitel 5.3.1), eine Expression von *SpDkk1* in diesem Gewebe Sinn und deutet weiterhin darauf hin, dass *Dkk1* im Seeigel an der Endomesoderm-Differenzierung beteiligt ist, wie es bereits für *Dkk1* in anderen Organismen gezeigt wurde (Idkowiak *et al.*, 2004; Kazanskaya *et al.*, 2000; siehe Kapitel 5.3.2). Auch die Expression von *SpDkk1* im apikalen Ektoderm ist mit bereits vorhandenen Informationen über *Dkk1* in Vertebraten vereinbar. So nimmt man an, dass das apikale Ektoderm zusammen mit dem Cilienband das Äquivalent des zentralen Nervensystems in Chordaten/Vertebraten ist, da verschiedene Studien zeigen, dass etliche Gene, die in Vertebraten in die Bildung des zentralen Nervensystems involviert sind, in Nicht-Chordaten-Larven (innerhalb der *Deuterostomia*) im apikalen Ektoderm und/oder Cilienband exprimiert sind (Burke *et al.*, 2006; Poustka *et al.*, 2004; siehe Kapitel 5.5.1). Demnach scheint *Dkk1* auch im Seeigel eine Rolle bei der Differenzierung von neuronalem Gewebe zu spielen, wie es bereits in *Xenopus*- und Zebrafischembryonen gezeigt werden konnte (Hashimoto *et al.*, 2000; Kazanskaya *et al.*, 2000). Neueste Studien im Seeigel haben zudem gezeigt, dass das apikale Ektoderm ein Gewebe ist, das Wnt-Signale antagonisieren kann (Wei *et al.*, 2009). Des Weiteren weist auch die Expression in den sich entwickelnden Armen und im Mundbereich der Pluteus-Larve auf eine konservierte Funktion von *Dkk1* hin. So konnte Expression von *Dkk1* auch in Mausembryonen während der späten Embryonalentwicklung in den sich entwickelnden Extremitäten sowie den Zähnen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.2.2).

Dass die Expression von *SpDkk1* sowohl in mit Lithium als auch mit Zink behandelten Embryonen verändert wird, bestärkt die These, dass die Funktion von *SpDkk1* konserviert ist. Beide Chemikalien haben erheblichen Einfluss auf die animale-vegetale Achse im Seeigelembryo. Während Lithium den Embryo vegetalisiert, führt eine Be-

handlung mit Zink zu animalisierten Embryonen (siehe Kapitel 1.1.1). Obwohl mittels qPCR keine Änderung des Expressionslevels von *SpDkk1* detektierbar ist, zeigt die WISH-Analyse deutlich, dass die Expression von *SpDkk1* im apikalen Ektoderm verloren gegangen ist, die vegetale Expression von *SpDkk1* jedoch verstärkt ist. Umgekehrt verhält es sich in den mit Zink animalisierten Embryonen (siehe Kapitel 4.2.1). Wie zuvor beschrieben, scheint *Dkk1* demnach an der Etablierung der animalen-vegetalen Achse im Seeigel-embryo beteiligt zu sein (siehe Kapitel 5.3.2). Da Lithium ein bekanntes, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivierendes Agens ist, kann geschlussfolgert werden, dass *SpDkk1* mit diesem in Verbindung steht (siehe Kapitel 5.3.1). Neben der Achsenbildung im Seeigelembryo scheint Zink auch einen Einfluss auf die Bildung von serotonergen Zellen zu haben (siehe Kapitel 1.4.3). Da die Expression von *SpDkk1* laut qPCR in mit Zink behandelten Embryonen stark hochreguliert ist und die Behandlung mit Zink zu vermehrter Bildung von serotonergen Zellen führt, bestätigt die auf Grund des Expressionsmusters von *SpDkk1* aufgestellte Annahme, dass *Dkk1* im Seeigel an der Entwicklung von neuronalem Gewebe beteiligt ist (siehe Kapitel 5.4.2). Das Expressionsmuster von *SpDkk1* sowie die veränderte Expression von *SpDkk1* in mit Lithium bzw. Zink behandelten Embryonen deuten also darauf hin, dass *Dkk1* auch im Seeigel als Organisator-Gen fungiert und als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (siehe Kapitel 5.3.1) an der Endomesoderm-Differenzierung (siehe Kapitel 5.3.2) sowie an der Bildung von Nervengewebe (siehe Kapitel 5.4.2) beteiligt ist und unterstützt somit die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse, dass *SpDkk1* Mitglied der Dickkopf-Familie ist (siehe Kapitel 5.1). Dass *SpDkk1* während der Embryonalentwicklung des Seeigels zwei verschiedene Aufgaben wahrnimmt, impliziert auch das zeitliche Expressionsprofil von *SpDkk1*. Passend zu den beiden Hauptexpressionsorten von *SpDkk1* (Vegetalplatte und apikales Ektoderm), findet man 12 Stunden und 21 Stunden nach der Befruchtung einen starken Anstieg der *SpDkk1*-Transkripte (siehe Kapitel 4.1.3).

Auch das Expressionsmuster von *SpDkk3*, das während der gesamten Embryogenese des Seeigels im apikalen Ektoderm, wo in der späteren Embryonalentwicklung sensorische Zellen wie serotonerge Zellen entstehen (siehe Kapitel 1.4.3), des Embryos exprimiert ist (siehe Kapitel 4.1.3), deckt sich mit den Expressionsmustern von den wenigen bisher in anderen Organismen identifizierten *Dkk3*-Genen. So ist *Dkk3* in Nesseltieren in Nematocyten, speziellen sensorischen Zellen im ektodermalen Gewebe, (Fedders *et al.*, 2004) und in *Amphioxus* ebenfalls im anterioren Ektoderm (Yu *et al.*, 2007) exprimiert. Im Menschen ist *Dkk3* in vielen verschiedenen Geweben

exprimiert, aber hauptsächlich in neuronalem Gewebe wie Gehirn und Rückenmark (Krupnik *et al.*, 1999). In Mausembryonen ist Dkk3 u.a. in den Augen exprimiert (Hackam *et al.*, 2004). Das Expressionsmuster von *SpDkk3* passt zudem zu der These, dass Dkk3 mit dem Nodal-Signalweg in Verbindung steht (siehe Kapitel 1.2.2). Denn Nodal-Signale sind an der Regulation von serotonergen Zellen, die im apikalen Ektoderm entstehen, beteiligt (siehe Kapitel 1.4.3). Unterstützt wird diese Vermutung durch funktionelle Studien von *SpDkk3* (siehe Kapitel 5.4). Das Expressionsmuster von *SpDkk3* unterstützt demnach die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse (siehe Kapitel 5.1), dass es sich bei *SpDkk3* um ein Gen der Dickkopf-Familie handelt.

5.3 Funktion von *SpDkk1*

5.3.1 Dkk1 und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Dkk1 ist erstmals in *Xenopus* als sezerniertes Signalmolekül beschrieben worden, das zusammen mit dem Korezeptor Kremen als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs fungiert. Diese Eigenschaft von Dkk1 konnte später auch in weiteren Vertebraten nachgewiesen werden und scheint damit die Hauptfunktion von Dkk1 zu sein (siehe Kapitel 1.2.2 bzw. 1.3.4). Mehrere Indizien sprechen dafür, dass bereits Dkk1 aus dem Seeigel, der innerhalb der Großgruppe der *Deuterostomia* weit entfernt von den Vertebraten ist, die Fähigkeit besitzt, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu inhibieren. Zum einen haben Alignments der Proteinsequenzen gezeigt, dass die Sequenz des Dkk1-Proteins vom Seeigel sämtliche Merkmale von Mitgliedern der Dickkopf-Familie aufweist. Insbesondere die zweite Cystein-reiche Domäne, welche für die inhibierende Eigenschaft verantwortlich ist, ist dabei stark konserviert (siehe Kapitel 5.1). Dies läßt darauf schließen, dass auch die Funktion von Dickkopf konserviert ist und auch Dkk1 aus dem Seeigel ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. Zum anderen deutet das Expressionsmuster von *SpDkk1* daraufhin, dass Dkk1 auch im Seeigel ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. So ist *SpDkk1* hauptsächlich in zwei Domänen exprimiert, von denen bekannt ist, dass sie dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg entgegenwirken können (siehe Kapitel 5.2). Des Weiteren wird die Expression von *SpDkk1* sowohl durch Behandlung mit Lithium als auch durch Zink beeinflusst (siehe Kapitel 4.2.1). Da diese beiden Chemikalien erheblichen Einfluss auf die Bildung der animalen-vegetalen Achse des Seeigelembryos haben und der Wnt-Signalweg entscheidend ist für die Bildung der animalen-vegetalen Achse, liegt es nahe, dass *SpDkk1* mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Verbindung steht (siehe Kapitel 5.2).

Die Perturbationsexperimente sprechen dafür, dass *Dkk1* auch im Seeigel ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist (siehe Kapitel 4.3). So ähnelt der *SpDkk1*-MOE-Phänotyp stark den Embryonen, die mit *Cadherin*-RNA injiziert wurden, und der *SpDkk1*-MASO-Phänotyp den Embryonen, die mit Lithium behandelt wurden. Sowohl *Cadherin* als auch Lithium sind gut untersuchte Wirkstoffe, die den Wnt/ β -Catenin-Signalweg hemmen bzw. aktivieren (siehe Kapitel 1.3.5). Die Charakterisierung der *SpDkk1*-Depletions- als auch -Überexpressions-Phänotypen mittels WMISH und qPCR bestätigen dies. So ist das apikale Ektoderm in *SpDkk1*-Überexpressions-Embryonen stark vergrößert, verdeutlicht durch die Expression des Markers *SpFoxQ2*, und das Endomesoderm stark vermindert, wie anhand der Marker *SpEndo16* und *SpTbx6* gezeigt. In *SpDkk1*-Depletions-Embryonen hingegen ist das apikale Ektoderm verringert und das Endomesoderm vermehrt (siehe Kapitel 4.2.2). Eine Überexpression von *SpDkk1* imitiert also die Wirkung des Wnt-Inhibitors *Cadherin*, während die Depletion von *SpDkk1* die Wirkung des Wnt-Aktivators Lithium nachahmt. Des Weiteren sind drei bekannte Wnt-Zielgene, *SpBra*, *SpTcf/Lef* und *SpWnt8* (Huang *et al.*, 2000; Rast *et al.*, 2002; Wikramanayake *et al.*, 2004) in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen stark herunterreguliert und tatsächlich führen Knock-Downs dieser Gene mittels spezifischer MASOs zum selben Phänotyp (siehe Kapitel 4.3). Außerdem wurde gezeigt, dass der Knock-Down von *SpKrl*, einem weiteren Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, nicht nur dazu führt, dass kein Endoderm gebildet wird, sondern auch, dass das Ektoderm umorganisiert wird und mehr aborales Ektoderm auf Kosten von oralem Ektoderm gebildet wird (Howard *et al.*, 2001). Wie WISH- und qPCR-Analysen zeigen, ist auch in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen das orale Ektoderm im Vergleich zu Kontroll-Embryonen stark verringert (siehe Kapitel 4.2.2). Eine Überexpression von *SpDkk1* verursacht also dieselben Störungen während der Embryonalentwicklung des Seeigels wie der Knock-Down einzelner Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Dass gleichzeitig diese Zielgene in den Überexpressions-Embryonen herunterreguliert sind, beweist, dass *Dkk1* auch im Seeigel ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist.

Auch der negative Feedback-Loop scheint evolutionär konserviert zu sein. Vergleicht man die Expression von *SpDkk1* in Wildtyp-Embryonen mit der Expression von *SpDkk1* in Embryonen, bei denen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg mittels Lithium aktiviert wurde, so sieht man eine deutliche höhere Anzahl von *SpDkk1*-Transkripten (siehe Kapitel 4.3). Des Weiteren ist die Expression von *SpDkk1* in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen stark erhöht (siehe Kapitel 4.3). Da die Expression von *SpDkk1* sowohl in

Embryonen, in denen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Lithium aktiviert wurde, als auch in Embryonen, in denen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Ausschalten des Inhibitors Dkk1 aktiviert wurde, gesteigert wird, deutet das darauf hin, dass Dkk1 auch im Seeigel, wie in anderen Organismen beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2), ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. Diese Vermutung wird auch durch die Analyse des Promotors von *SpDkk1* (siehe Kapitel 5.5) bestätigt.

Phylogenetische, Expressions- sowie funktionale Studien belegen deutlich, dass es sich bei *SpDkk1* um ein Gen der Dickkopf-Familie handelt. Des Weiteren liefern sie Beweise dafür, dass auch Dkk1 im Seeigel ein wirksamer Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und auch Zielgen dieses Signalwegs ist. Demnach ist diese Eigenschaft von Dkk1, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu inhibieren, keine von Vertebraten bzw. Chordaten erworbene Eigenschaft, sondern bereits in basalen *Deuterostomia* wie dem Seeigel vorhanden. Untersuchungen in *Hydra* haben gezeigt, dass Dkk1 diese Fähigkeit bereits den *Cnidaria* innewohnt (Guder *et al.*, 2006). Da eine eindeutige Zuordnung von Dkk1 aus *Hydra* zur Dickkopf-Familie, wie bereits erwähnt, nicht möglich ist (siehe Kapitel 5.1), kann nicht geklärt werden, ob diese Fähigkeit bereits schon früher vorhanden war oder sich erst mit der Entwicklung der *Deuterostomia* gebildet hat. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, ob Dkk1 auch im Seeigel, wie in Vertebraten beschrieben, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Verbindung mit dem Korezeptor Kremen inhibiert (siehe Kapitel 1.3.4), oder der Mechanismus der Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf eine völlig andere Art und Weise geschieht. Da bei der Genomanalyse des Seeigels jedoch ein Gen identifiziert wurde, das für den Korezeptor Kremen codiert (GLEAN3_25249), ist davon auszugehen, dass auch der Mechanismus der Wnt-Inhibierung konserviert ist und im Seeigel ebenso vonstatten geht wie in Vertebraten.

5.3.2 Dkk1 und das Endomesoderm-GRN

Für die Endomesoderm-Differenzierung im Seeigelembryo ist die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs von entscheidender Bedeutung. Dass es für die korrekte Entwicklung des Embryos unabdingbar ist, dass dieser exakt reguliert bzw. deaktiviert wird, zeigen Perturbationsexperimente, in denen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg künstlich aktiviert bzw. deaktiviert wurde. Daher wurde ein Inhibitor postuliert, der nach Vollendung der Endomesoderm-Differenzierung den

Wnt/ β -Catenin-Signalweg wieder deaktiviert (siehe Kapitel 1.3.5). Da Dkk1, wie zuvor gezeigt, ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist (siehe Kapitel 5.2.1) und außerdem wie WISH- und qPCR-Analysen gezeigt haben während des Blastula-Stadiums in ausreichender Zahl im Endomesoderm exprimiert ist (siehe Kapitel 4.1.3 und 5.2), liegt es nahe, dass Dkk1 für die Beendigung der Endomesoderm-Entwicklung im Seeigelembryo verantwortlich ist. Ein erstes Indiz dafür, dass *SpDkk1* an der Endomesoderm-Differenzierung beteiligt ist, ist, dass die Expressionslevel der Kernel-Gene (mit Ausnahme der Expressionslevel von *SpOTX* und *SpTBrain*) in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen herunterreguliert sind (siehe Kapitel 4.4.1). Diese Kernel-Gene sind für die Bildung des Endomesoderm essentiell, und es wurde gezeigt, dass eine Injektion von *Cadherin*-mRNA, indem es durch Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Aktivierung der Kernel-Gene verhindert, zu Embryonen führt, denen endomesodermale Strukturen fehlen (siehe Kapitel 1.3.5 und 4.4.1). Da die Überexpression von *SpDkk1* dieselben Effekte auf die Expression der Kernel-Gene wie eine Injektion von *Cadherin*-mRNA ausübt (mit Ausnahme des Expressionslevels von *SpOTX*), bestätigt zum einen erneut, dass Dkk1 im Seeigel ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist (siehe Kapitel 5.3.1) und zum anderen unterstützt es die These, dass *SpDkk1* die Endomesoderm-Entwicklung reguliert. Dass im Seeigel *SpTBrain* nicht durch Dkk1 reguliert wird, bestätigt zudem die Annahme, dass TBrain im Seeigel im Gegensatz zu TBrain im Seestern nicht an der Endomesoderm-Differenzierung beteiligt ist, sondern für die Spezifizierung von PMCs und deren Nachfolgezellen nötig ist (Davidson&Erwin, 2006; siehe Kapitel 1.3.5).

Die Folgen der Regulierung der Kernel-Gene durch *SpDkk1* werden durch WISH- und qPCR-Analysen deutlich. So wurde bereits gezeigt, dass im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen im Gastrula-Stadium *SpDkk1*-mRNA injizierte Embryonen mehr apikales Ektoderm und weniger Endomesoderm und *SpDkk1*-MASO-injizierte Embryonen weniger apikales Ektoderm und dafür mehr Endomesoderm besitzen (siehe Kapitel 5.3.1). Um zu verifizieren, dass Dkk1 im Seeigel an der Endomesoderm-Bildung beteiligt ist, wurden die Expressionslevel weiterer Gene, die spezifisch in PMCs, SMCs und/oder Endoderm exprimiert sind, in *SpDkk1*-mRNA- als auch *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen im Blastula-Stadium untersucht (siehe Kapitel 4.4.2). Wie erwartet führen die beiden Perturbationsexperimente zu entgegengesetzten Ergebnissen. Während eine Überexpression von *SpDkk1* zur Herunterregulierung der Expressionslevel von SMC- und Endoderm-spezifischen Genen führt, sind die Expressionslevel dieser Gene in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen hochreguliert.

Auffällig ist jedoch, dass die Änderungen der Expressionslevel in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen wesentlich niedriger ausfallen als in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Wirkung der Überexpression von *SpDkk1* schneller einsetzt als die Wirkung des *SpDkk1*-MASO und damit einen längeren und stärkeren Einfluss auf die Entwicklung des Seeigelembryos ausübt. Die Translation der injizierten *SpDkk1*-mRNA erfolgt relativ schnell (die Translationsrate im Seeigelembryo beträgt etwa zwei Moleküle pro mRNA-Molekül und Minute; Bolouri&Davidson, 2003), d.h. Dkk1 kann bereits sehr früh regulierend auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg wirken und die Differenzierung von endomesodermalen Gewebe verhindern. Ein Effekt des *SpDkk1*-MASO hingegen tritt erst ein, wenn *SpDkk1*-Transkripte vorhanden sind und die Translation beginnt, also erst etwa 12 Stunden nach der Befruchtung (siehe Kapitel 4.1.3). Die Analyse der Expressionsleveländerungen der PMC-, SMC- und endoderm-spezifischen Gene erfolgte jedoch bereits im Blastula-Stadium (etwa 20 Stunden nach der Befruchtung), d.h. während eine Überexpression von *SpDkk1* zu diesem Zeitpunkt bereits etwa 18 Stunden die Entwicklung des Seeigelembryos beeinflusst hat, hat die Injektion des *SpDkk1*-MASO gerade einmal acht Stunden Einfluss auf die Expression von Zielgenen ausüben können. Außerdem ist auch in unbehandelten Embryonen 20 Stunden nach der Befruchtung die Endomesoderm-Differenzierung noch nicht abgeschlossen, so dass möglicherweise einige der untersuchten Gene ohnehin noch nicht voll aktiviert sind und daher keine signifikante Änderung des Expressionslevels detektiert werden kann. Bestätigt wird diese Annahme dadurch, dass WISH- als auch qPCR-Analysen in Gastrula-Embryonen (45 Stunden nach der Befruchtung) zeigen, dass in *SpDkk1*-Depletionsembryonen *SpEndo16* im Vergleich zu Kontroll-Embryonen deutlich hochreguliert ist (siehe Kapitel 4.2.2), während die Expression von *SpEndo16* in Depletionsembryonen im Blastula-Stadium (20 Stunden nach der Befruchtung) nur geringfügig gesteigert ist (siehe Kapitel 4.4.2).

Des Weiteren ist ersichtlich, dass sich sowohl in den Überexpressions- als auch in den Depletions-Embryonen die Expression von keinem der PMC-spezifischen Gene verändert. Dieses Ergebnis wird durch die Charakterisierung der perturbierten Embryonen mittels WMISH und qPCR bestätigt. So werden sowohl in *SpDkk1*-mRNA- als auch *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen PMCs gebildet, wie anhand des PMC-Markers *SpP19* gezeigt (siehe Kapitel 4.2.2). Die Anwesenheit von PMCs in den Depletions-Embryonen ist plausibel, da der Effekt des *SpDkk1*-MASO, wie zuvor beschrieben, erst mit Vorhandensein von *SpDkk1*-Transkripten einsetzt. Zu diesem

Zeitpunkt hat auf Grund von maternalen Faktoren die Aktivierung der frühen PMC-Spezifizierungsgene bereits stattgefunden und ist damit unabhängig vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg geworden (Oliveri *et al.*, 2008; siehe Kapitel 1.3.5). Das Vorhandensein von PMCs in den Überexpressions-Embryonen hingegen scheint auf den ersten Blick unlogisch, da in *Cadherin*-mRNA-injizierten keine PMCs gebildet werden (Wikramanayake *et al.*, 2004; siehe Kapitel 1.3.5 und 4.3). Dieser Unterschied kann durch die unterschiedlichen Mechanismen der Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Dkk1 und Cadherin erklärt werden. Zwar werden beide injizierten mRNAs schnell genug translatiert (wie bereits erwähnt), so dass ausreichend funktionsfähiges Protein vorhanden ist, um den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu inhibieren, bevor die Aktivierung der frühen PMC-Spezifizierungsgene stattgefunden hat. Während Cadherin jedoch nach erfolgter Synthese sofort an β -Catenin binden kann und somit dessen Eintritt in den Zellkern und damit die Aktivierung von Zielgenen verhindern kann (siehe Kapitel 1.3.5), handelt es sich bei Dkk1 um ein sekretiertes Molekül. Nach erfolgter Translation muss Dkk1 erstmal aus der Zelle heraustransportiert werden, um dort gemeinsam mit dem Korezeptor Kremen an LRP5/6 zu binden und damit den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zum Erliegen zu bringen (siehe Kapitel 1.3.4). Dieser Prozess scheint demnach so zeitaufwendig zu sein, dass die Spezifizierung von PMCs bereits so weit fortgeschritten ist, dass sie unabhängig vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg geworden ist. Dieser Unterschied im Wirkmechanismus von Cadherin und Dkk1 erklärt auch, warum die Kernel-Gene durch eine Injektion von *Cadherin*-mRNA stärker reguliert werden als durch eine Injektion von *SpDkk1*-mRNA, obwohl beide als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungieren (siehe Kapitel 4.4.1). Dadurch ist auch zu erklären, dass die Herunterregulierung des Expressionslevels von *SpHex* nicht so stark ausfällt wie die des Expressionslevels von *SpTbx6*, aber stärker als die der Expressionenslevel der PMC-spezifischen Gene. Denn die Expression von *SpHex* kann sowohl in PMCs als auch SMCs beobachtet werden (Poustka *et al.*, 2007; siehe Kapitel 4.4.2).

Zunächst widersprüchlich scheint auch der Verlust der SMCs in *SpDkk1*-Überexpressions-Embryonen, da die Expression von *SpDelta*, das über den Notch-Rezeptor die Bildung von SMCs triggert (siehe Kapitel 1.3.5), in diesen Embryonen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen unverändert ist (siehe Kapitel 4.4.2). Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass auch bei unveränderter Expression von *delta* keine SMCs gebildet werden, wenn der Notch-Rezeptor nicht vorhanden ist (Davidson *et al.*, 2002). Daher wurde Expression von *SpNotch* in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen

mittels qPCR untersucht. Und tatsächlich ist die Expression von *SpNotch* in den Überexpressions-Embryonen im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen stark herunterreguliert (siehe Kapitel 4.4.3). Dieses Ergebnis wird zum einen durch das Expressionsmuster von *SpNotch* und zum anderen durch andere Arbeiten unterstützt. So ist *SpNotch* während der Embryogenese des Seeigels zunächst in der Vegetalplatte und später im Darmrohr exprimiert (Walton *et al.*, 2006; siehe Kapitel 4.4.3), d.h. in dem Gewebe, von dem bereits gezeigt wurde, dass es in *SpDkk1*-Überexpressions-Embryonen stark verringert bzw. ganz verloren gegangen ist (siehe Kapitel 4.2.2). Außerdem konnte durch verschiedene Perturbationsexperimente gezeigt werden, dass die Bildung von SMCs nicht nur eng mit dem Notch-Rezeptor verbunden ist, sondern die Bildung beider abhängig von nukleären β -Catenin ist (Angerer&Angerer, 2000). Sämtliche Untersuchungen hinsichtlich der Beteiligung von *SpDkk1* an der Endomesoderm-Differenzierung unterstreichen einmal mehr, dass *Dkk1* auch im Seeigel ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. Auf Grund dieser Eigenschaft ist *SpDkk1* an der Regulation der Kernel-Gene beteiligt und damit an der Differenzierung von endomesodermalem Gewebe. Durch Regulation der Expression des Notch-Rezeptors wirkt *SpDkk1* zu dem auf den Delta-Notch-Signalweg und beeinflusst somit die Bildung von SMCs. Damit wird auch die durch die Analyse des Expressionsmusters von *SpDkk1* aufgestellte These belegt, dass *Dkk1* auch im Seeigel, wie in anderen Organismen gezeigt, in der Endomesoderm-Spezifizierung involviert ist (siehe Kapitel 5.2). Keinen Einfluss jedoch hat *SpDkk1* auf die Bildung von PMCs.

5.4 Die Dickkopf-Gene und das Nervensystem

5.4.1 Expression von Serotonin und SynaptotagminB

Wie bereits in anderen Arbeiten an verschiedenen Seeigelarten gezeigt (Bisgrove&Burke, 1987; Buznikov *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 1993; Yaguchi *et al.*, 2000; siehe Kapitel 1.4.3), können serotonerge Zellen erstmals im apikalen Ektoderm in der späten Gastrula detektiert werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen im Seeigel *Hemicentrotus pulcherrimus* (Yaguchi&Katow, 2003) konnten im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* keine Serotonin-haltigen Zellen in den Coelomsäckchen detektiert werden (siehe Kapitel 4.5.1). Des Weiteren konnten die beiden an der Synthese von Serotonin beteiligten Enzyme, TPH und AADC, isoliert werden und deren Expressionsmuster mittels WISH sowie deren zeitliches Expressionsprofil mittels qPCR erstellt werden (siehe Kapitel 4.5.1) und somit die Ergebnisse der

Genomanalyse des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus*, in der das Vorhandensein der beiden Enzyme vorhergesagt wurde (Burke *et al.*, 2006), bestätigt werden. Wie bereits im Seeigel *Hemicentrotus pulcherrimus* gezeigt (Yaguchi&Katow, 2003), exprimieren auch im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* sämtliche im apikalen Ektoderm vorhandenen Serotonin-haltigen Zellen die TPH. Erstmals konnte auch die Expression von AADC in Seeigelembryonen gezeigt werden. Wie durch Doppel-WISH ermittelt, ist *SpAadc* ebenso wie *SpTph* in den serotonergen Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert (siehe Kapitel 4.5.1). Dass beide an der Biosynthese von Serotonin beteiligten Enzyme in denselben Zellen exprimiert werden, die auch Serotonin-positiv sind, deutet darauf hin, dass es sich bei den Serotonin-haltigen Zellen um Serotonin-produzierende Zellen handelt. Des Weiteren bestätigen die mittels qPCR bestimmten zeitlichen Expressionsprofile von *SpAadc* und *SpTph* (Expression beider Gene kann bereits 24 Stunden nach der Befruchtung detektiert werden; siehe Kapitel 4.5.1) die Vermutung, dass die Spezifizierung von neuronalen Zellen bereits vor der Gastrulation beginnt (Burke *et al.*, 2006).

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass das Blocken von vegetalen Signalen durch Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wie durch Injektion von *Cadherin*- (Logan *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2002) oder *GSK3 β* -mRNA (Emily-Fenouil *et al.*, 1998), durch Isolation der animalen Blastomeren (Wikramanayake *et al.*, 1995; Yaguchi *et al.*, 2006) oder durch Behandlung mit Zink (Poustka *et al.*, 2007) zu Embryonen führt, die keine normale Pluteus-Larve bilden, sondern eine Dauerblastula mit verdicktem animalen Ektoderm und erhöhter Anzahl serotonerger Zellen (siehe Kapitel 1.1.1, 1.4.3 und 4.5.2). Denn in mit Lithium, das bekanntlich den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert, behandelten Embryonen ist nicht nur wie bereits bekannt mehr endomesodermales Gewebe auf Kosten von animalen Ektoderm zu finden, sondern diese besitzen auch keinerlei serotonerger Zellen mehr. Damit gleichen sie Embryonen, in denen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Injektion einer stabilisierten *β -Catenin*-mRNA aktiviert wurde (Yaguchi *et al.*, 2006). Interessanterweise ist es ausreichend, wenn man die Embryonen erst 24 Stunden nach der Befruchtung mit Lithium behandelt, um die Bildung von serotonergen Zellen zu inhibieren. Da in diesem Embryonen die Endomesoderm-Differenzierung nicht beeinflusst wurde, bilden sie einen normalen Darm aus. Allerdings scheinen sie in ihrer Entwicklung im Stadium einer späten Gastrula stehen zu bleiben. Sie bilden keine Pluteus-Larve aus (siehe Kapitel 4.5.2). Dies impliziert, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg direkt an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt ist und die

Abwesenheit von serotonergen Zellen nicht daran liegt, dass auf Grund der Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs kein Endomesoderm gebildet wurde und der Embryo daher ohnehin schon stark in seiner Entwicklung gestört ist.

Außerdem konnte wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Burke *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2004) mit Hilfe immunohistochemischer Verfahren SynaptotagminB im Cilienband, im apikalen Ektoderm sowie an den oralen Ganglien der Prism- als auch der Pluteus-Larve nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5.3). SynaptotagminB ist in Vertebraten als Ca^{2+} -abhängiger Sensor beschrieben, der als Ein/Aus-Schalter für die Transmitterfreisetzung fungiert (Burke *et al.*, 2006; Chapman, 2002). Im Seeigel ist die genaue Funktion von SynaptotagminB bisher noch nicht bekannt. Zu dem konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die serotonergen Zellen im apikalen Ektoderm nicht SynaptotagminB-positiv sind, sondern lediglich die Zellganglien der Serotonin-haltigen Zellen auch SynaptotagminB exprimieren (Nakajima *et al.*, 2004; siehe Kapitel 4.5.1).

5.4.2 Regulation der Nervenzellen durch die Dickkopf-Gene

Während der Embryonalentwicklung von Vertebraten induziert Dkk1 die Kopfbildung, kann gemeinsam mit anderen Faktoren komplette zweite Körperachsen ausbilden und ist nötig, um neuronale Gene im anterioren und dorsalen Bereich von Vertebratengehirnen zu aktivieren (Guder *et al.*, 2006). Dieser Eigenschaft liegt die Fähigkeit von Dkk1 den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu inhibieren zu Grunde (Niehrs, 2004; siehe Kapitel 1.2.2). Während der frühen Entwicklung ist der Seeigelembryo Embryonen von Vertebraten allerdings sehr ähnlich (siehe Kapitel 1.1.1). Den anteriorsten Teil des Embryos bildet im Seeigel das apikale Ektoderm, aus dem eine sensorische Struktur, das apikale Organ, in der späteren Larve wird (Yaguchi *et al.*, 2006). Zu dem haben Microarray-Analysen gezeigt, dass viele Gene, die in anderen Organismen in neuronalem Gewebe exprimiert sind, im Seeigelembryo im apikalen Ektoderm und/oder Cilienband exprimiert sind (Burke *et al.*, 2006; Poustka *et al.*, 2004; siehe Kapitel 5.5.1). Daher kann dieser Bereich des Seeigelembryos entwicklungsgeschichtlich eventuell mit der anterioren Kopfstruktur von Embryonen der Vertebraten verglichen werden. Da eine Überexpression von *SpDkk1* zu Embryonen mit vergrößertem apikalem Ektoderm und eine Depletion von *SpDkk1* zu Embryonen ohne apikales bzw. mit weniger apikalem Ektoderm führt (siehe Kapitel 4.2.2 und 5.3.1), scheint Dkk1 auch im Seeigel die Fähigkeit zur Induktion anteriorer Strukturen zu haben.

Wie zuvor gezeigt, können im apikalen Ektoderm vier bis sechs serotonerge Zellen sowie SynaptotagminB-positive Nervenzellen detektiert werden (siehe Kapitel 5.4.1). Bereits das Expressionsmuster von *SpDkk1* sowie die veränderte Expressionsrate von *SpDkk1* in mit Zink behandelten Embryonen deuten darauf hin, dass *SpDkk1* an der Regulation von Nervenzellen beteiligt ist (siehe Kapitel 5.2). Tatsächlich führt eine Überexpression von *SpDkk1* zu Embryonen, die eine erhöhte Anzahl von serotonergen Zellen aufweisen, während in *SpDkk1*-MASO injizierten Embryonen keine serotonergen Zellen mehr nachgewiesen werden können (siehe Kapitel 4.5.2). Die These, dass *SpDkk1* direkt an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt ist, wird durch die zeitlichen Expressionsprofile von *SpAadc* und *SpTph* und dem Expressionsmuster von *SpDkk1* unterstützt. So können mittels qPCR erstmals etwa 24 Stunden nach der Befruchtung *SpAadc*- und *SpTph*-Transkripte detektiert werden, also kurz nachdem eine Expression von *SpDkk1* auch im apikalen Ektoderm sichtbar wird (siehe Kapitel 4.1.3 und 4.5.1). Serotonin wird in zwei Schritten aus der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert. Im ersten Schritt wird, katalysiert durch die TPH, Tryptophan in 5-HTP umgewandelt. Im zweiten Schritt wird dann durch die AADC Serotonin hergestellt (siehe Kapitel 1.4.1). Daher wurde der Einfluss von *SpDkk1* auf die Expression der beiden an der Biosynthese von Serotonin beteiligten Enzyme mittels qPCR analysiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der immunohistochemischen Untersuchungen, ist das Expressionslevel von *SpTph* in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen erhöht, während sie in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen verringert ist (siehe Kapitel 4.5.2). Die Expression von *SpAadc* ist weder in den Überexpressions- noch in den Depletions-Embryonen verändert. Da es sich bei dem von der TPH katalysierten Reaktionsschritt um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Biosynthese von Serotonin handelt (siehe Kapitel 1.4.1), ist es plausibel, dass nur die Expression von *tph* reguliert wird. Zudem weist es darauf hin, dass der Mechanismus sowie die Regulation der Biosynthese von Serotonin evolutionär konserviert ist. Denn auch in *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Expression der *tph* zu einem erhöhten Level an Serotonin führt (Tanis *et al.*, 2008).

Des Weiteren wird dadurch wiederum bestätigt, dass *SpDkk1* als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs agiert, da eine *SpDkk1*-Überexpression bzw. ein *SpDkk1*-Knock-Down, wie bereits bei der Endomesoderm-Differenzierung gezeigt (siehe Kapitel 5.3.2), auch hinsichtlich der Bildung von serotonergen Zellen die Wirkung einer *Cadherin*-mRNA-Injektion bzw. einer Behandlung von Lithium nachahmt. Dies

unterstützt zudem die Annahme, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg direkt an der Inhibierung der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt ist und eine Inhibierung dieses Signalwegs mit Beginn der Gastrulation nötig ist, damit serotonerge Zellen gebildet werden, wie zuvor aufgrund der Behandlung mit Lithium 24 Stunden nach der Befruchtung angenommen (siehe Kapitel 5.4.1). Auch unterstützen diese Daten die kürzlich aufgestellte These, dass eine Verbindung zwischen Wnt/ β -Catenin- und dem Nodal-Signalweg besteht. So wird vermutet, dass nukleäres β -Catenin die Expression von *SpFoxQ2* inhibiert, welches für die Repression von Nodal-Signalen sorgt. Diese wiederum sorgen dafür, dass keine serotonergen Zellen gebildet werden (Yaguchi *et al.*, 2006; Yaguchi *et al.*, 2008; siehe Kapitel 1.4.3). So führt eine Überexpression von *SpDkk1* zu einer erhöhten Expression von *SpFoxQ2* und folglich zu mehr serotonergen Zellen. Zwar wurde der Einfluss einer Überexpression von *SpDkk1* auf die Expression von Nodal, das im oralen Ektoderm exprimiert wird (Flowers *et al.*, 2004), nicht untersucht, doch deutet der Verlust des oralen Ektoderms in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen, verdeutlicht durch den Marker *SpGsc* (siehe Kapitel 4.2.2), darauf hin, dass auch das Expressionslevel von *SpNodal* deutlich verringert ist. Übereinstimmend mit dem Befund, dass das Expressionslevel von *SpGsc* in den Überexpressions-Embryonen herunterreguliert ist, ähnelt der Phänotyp von *SpGsc*-MASO-injizierten Embryonen (Angerer *et al.*, 2001) den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen (siehe Kapitel 4.2.2). Demnach ist *SpDkk1* durch Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt und nimmt durch die Regulation von *SpFoxQ2* Einfluss auf die Bildung der oralen-aboralen Achse des Seeigelembryos.

Die Bildung von SynaptotagminB-positiven Zellen wird durch *SpDkk1* hingegen nicht beeinflusst, wie die qPCR-Ergebnisse zeigen (siehe Kapitel 4.5.3). Damit hat *Dkk1* den entgegengesetzten Effekt auf die Bildung von neuronalen Zellen wie Chordin, einem weiteren vom Spemann-Organisator exprimierten sekretierten Protein. Perturbationsexperimente haben gezeigt, dass Chordin an der Bildung von SynaptotagminB-Zellen, aber nicht an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt ist (Bradham *et al.*, 2009). Dass die Bildung von SynaptotagminB-positiven Zellen durch *SpDkk1* nicht beeinflusst wird, stimmt teilweise überein mit den Ergebnissen der Charakterisierung der *SpDkk1*-MOE- und -MASO-Embryonen mit Hilfe des Markers *SpHnf6*, der spezifisch im Cilienband exprimiert wird, von dem angenommen wird, dass es das Äquivalent des zentralen Nervensystems in Vertebraten ist (Poustka *et al.*, 2004). Denn SynaptotagminB wird hauptsächlich im Cilienband exprimiert und das

Expressionslevel von *SpHnf6* wird in *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen ebenfalls nicht verändert, obgleich sich die Expressionsdomäne von *SpHnf6* in den Depletions-Embryonen deutlich von der in Kontroll-Embryonen unterscheidet (siehe Kapitel 4.2.2). Da keine Expression von *SpHnf6* in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen detektiert werden kann (siehe Kapitel 4.2.2), lässt hingegen eher darauf schließen, dass in den Überexpressions-Embryonen keine SynaptotagminB-positiven Zellen gebildet werden. Eine Erklärung dafür, dass dennoch keine Änderung des Expressionslevels von SynaptotagminB via qPCR festgestellt werden kann, ist, dass SynaptotagminB hauptsächlich im Cilienband exprimiert wird, aber auch im apikalen Ektoderm. Dieser Bereich ist, wie bereits gezeigt (siehe Kapitel 4.2.2 und 5.3.1), in den *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen stark vergrößert. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass *Dkk1* in *Xenopus* an der Bildung des anterioren Teil des zentralen Nervensystems beteiligt ist (Davidson *et al.*, 2002). Allerdings wurden weder die *SpDkk1*-Depletions- noch die *SpDkk1*-Überexpressions-Embryonen mittels immunohistochemischer Verfahren auf SynaptotagminB-positive Zellen hin untersucht, so dass diese Erklärung nicht verifiziert werden kann.

Auch *Dkk3* scheint, wie Expressionsanalysen in anderen Organismen gezeigt haben (siehe Kapitel 5.2), ebenfalls an der Bildung von Nervenzellen beteiligt zu sein, in dem es Einfluss auf den FGF- und Nodal-Signalweg nimmt (siehe Kapitel 1.2.2). Bereits das Expressionsmuster von *SpDkk3* deutet an, dass *Dkk3* auch im Seeigel eine Rolle bei der Bildung Nervenzellen spielt (siehe Kapitel 5.2). Bestätigt wird diese Annahme dadurch, dass ebenso wie in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen auch in den *SpDkk3*-MASO-injizierten Embryonen keine serotonergen Zellen mehr detektierbar sind. Wie im Falle von *SpDkk1* erfolgt in den *SpDkk3*-MASO-injizierten Embryonen keine Bildung von Serotonin auf Grund der Herunterregulierung der *tph*. Die Expression des ersten an der Synthese von Serotonin beteiligten Enzyms AADC wird wiederum durch die Perturbation nicht beeinflusst (siehe Kapitel 4.6.2). Im Gegensatz zu *SpDkk1* scheint *SpDkk3* aber keinen generellen Einfluss auf die Bildung des apikalen Ektoderms zu haben, da von den im apikalen Ektoderm exprimierten Genen lediglich *SpMox*, einem Transkriptionsfaktor, der spezifisch in den Serotoninproduzierenden Zellen exprimiert ist, durch *SpDkk3* reguliert wird (siehe Kapitel 4.6.2). Auf welche Art und Weise diese Regulation der serotonergen Zellen durch *SpDkk3* geschieht, d.h. ob auch im Seeigel *Dkk3* mit dem FGF- oder Nodal-Signalweg in Verbindung steht, sowie, ob auch die Expression von SynaptotagminB durch *SpDkk3* reguliert wird, wurde in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht.

5.5 Das apikale Ektoderm

5.5.1 Identifizierung apikal exprimierter Gene

Aus dem apikalen Ektoderm des Embryos entwickelt sich das apikale Organ der späteren Larve. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass viele Gene, die in anderen Organismen in neuronalem Gewebe exprimiert werden, im Seeigel im apikalen Ektoderm und/oder im Cilienband exprimiert werden (siehe Kapitel 5.4.2), wie in dieser Arbeit durch die Identifizierung und die Expressionsanalyse des Kopforgansators *Dkk1* sowie *Dkk3* (siehe Kapitel 5.2) und der beiden an der Biosynthese von Serotonin beteiligten Enzyme TPH und AADC (siehe Kapitel 5.4.1) bestätigt wurde. Während die Entstehung des Endomesoderms bereits sehr gut untersucht ist (siehe Kapitel 1.3.5), ist die über die Bildung des apikalen Ektoderm sowie die Bildung von serotonergen Zellen bislang wenig bekannt. Daher wurden in einem WISH-Screen nach weiteren im apikalen Ektoderm exprimierten Genen und damit potentiellen Akteuren bei der Bildung von serotonergen Zellen gesucht. Neben den bereits aufgeführten Genen konnten dabei 12 weitere Gene identifiziert werden. Bei elf von diesen Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, bei einem um ein Signalmolekül. Drei von den Transkriptionsfaktoren (*SpFez*, *SpGlass* und *SpMox*) sind während des Gastrula-Stadiums in einzelnen Zellen im apikalen Ektoderm exprimiert. *SpFoxJ1*, *SpFoxQ2*, *SpHnf6*, *SpPax2* und *Sp-sFrp1/5* sind während des Gastrula-Stadiums im apikalen Ektoderm exprimiert, *SpHnf6* und *SpPax2* sind jedoch nicht ausschließlich im apikalen Ektoderm exprimiert, sondern im gesamten Cilienband. *SpAlx* und *SpSix3* sind zwar in früheren Stadien im apikalen Ektoderm exprimiert, aber nicht mehr während des Gastrula-Stadiums (siehe Kapitel 4.6.1). Sie alle kommen daher als Mitwirkende bei der Differenzierung des apikalen Ektoderm bzw. der Bildung von serotonergen Zellen in Frage. Der Transkriptionsfaktor *SpProx1* ist zwar während der Embryonalentwicklung im Endomesoderm exprimiert, da eine Expression von *SpProx1* in der Prism- und Pluteus-Larve jedoch auch in bisher unbekanntem Zellen im apikalen Ektoderm und Cilienband gefunden werden kann, wurde auch dieser weitergehend untersucht ebenso wie der im apikalen Ektoderm exprimierte und bereits charakterisierte Transkriptionsfaktor *SpNkx2.1* (Takacs *et al.*, 2004).

Wie erwartet sind viele der hier identifizierten Gene in anderen Organismen in neuronalem Gewebe exprimiert. So ist ein *Drosophila*-Homolog von *SpAlx* im Gehirn von *Drosophila*-Embryonen exprimiert (Walldorf *et al.*, 2000), *SpFez*-Homologe sind im Vorderhirn von Maus-, *Xenopus*- und Zebrafischembryonen exprimiert

(Matsuo-Takasaki *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2000). Humane und murine Homologe von *SpFoxJ1* sind neben anderem Gewebe auch im Gehirn exprimiert (Murphy *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1998) und in Froschembryonen kann die Expression eines *Xenopus*-Homologs von *SpFoxJ1* im animalen Ektoderm gefunden werden (Pohl&Knochel, 2004). Ebenfalls im anterioren Ektoderm kann die Expression von *SpFoxQ2*-Homologen in *Drosophila* und *Amphioxus* gefunden werden (Lee&Frasch, 2004; Yu *et al.*, 2003). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung der Fliege ist das *SpFoxQ2*-Homolog zudem im Gehirn exprimiert (Lee&Frasch, 2004). Ein *Drosophila*-Homolog von *SpGlass* ist in Photorezeptoren von Fliegenembryonen exprimiert (Moses *et al.*, 1989). Während der Embryogenese von *Drosophila* sind *SpHes*-Homologe an der Segmentation und an der Bildung des peripheren Nervensystems (Carroll *et al.*, 1988; Fisher&Caudy, 1998) beteiligt. Ein weiteres *Drosophila*-Homolog ist zudem im zentralen Nervensystem von *Drosophila*-Embryonen exprimiert (Moore *et al.*, 2000). Auch in Maus, Huhn, Zebrafärbling und Frosch sind weitere *SpHes*-Homologe identifiziert worden. Die beiden im Zebrafärbling identifizierten Homologe sind im zentralen Nervensystem exprimiert, eines der beiden zudem noch in mesodermalem Gewebe (Leve *et al.*, 2001; Pasini *et al.*, 2001). Auch im *Xenopus*-Embryo sind die zwei identifizierten *SpHes*-Homologe sowohl im Mesoderm als auch zentralen Nervensystem exprimiert (Davis *et al.*, 2001). Die beiden im Huhn isolierten Homologe sind dagegen ausschließlich im Mesoderm exprimiert (Jouve *et al.*, 2000; Palmeirim *et al.*, 1997). Das einzige bisher in Maus gefundene Homolog ist laut Northern Blot-Analyse sowohl im Embryo als auch in Adulten in verschiedenen vom Endoderm und Mesoderm abgeleiteten Geweben als auch im zentralen Nervensystem exprimiert (Sasai *et al.*, 1992). Im *Amphioxus* hingegen konnten acht verschiedene *SpHes*-Homologe isoliert werden. Diese zeigen spezifische Expressionsmuster, deren Summe dem Expressionsmuster von *SpHes*-Homologen in Vertebraten entspricht (Minguillon *et al.*, 2003). In *Drosophila*, Seescheiden und Zebrafärblingen sind die *Hnf6*-Gene neural-spezifisch exprimiert (Hong *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2000; Sasakura&Makabe, 2001) und in Vertebraten kann die Expression von *Hnf6*-Homologen neben anderen Geweben auch im Mittelhirn und im Rückenmark gefunden werden (Haworth&Latinkic, 2009; Landry *et al.*, 1997; Rausa *et al.*, 1997). Ein Homolog von *SpNkx2.1* wurde erstmals in *Caenorhabditis* beschrieben. Dort ist es in neuronalem und mesodermalem Gewebe exprimiert (Harfe&Fire, 1998). In *Drosophila*-Embryonen ist die Expression eines *SpNkx2.1*-Homologs im Mundbereich, im vorderen Nervenstrang sowie im Gehirn zu finden (Zaffran *et al.*, 2000). Auch die Homologen

von *SpPax2* scheinen an der Neurogenese beteiligt zu sein. So ist die Expression von *pax2.1* im Zebrafisch während der Neurogenese unter anderem im Mittelhirn und im Auge zu finden (Krauss *et al.*, 1991). Und auch im *Amphioxus* ist ein *SpPax2*-Homolog in den Vorläuferzellen der Pigmentzellen der Augen exprimiert (Kozmik *et al.*, 1999). In *Ciona*-Embryonen sind sämtliche bisher identifizierten *SpPax2*-Homologe im zentralen Nervensystem exprimiert (Mazet *et al.*, 2003). Ein *SpProx1*-Homolog wurde erstmals in *Drosophila* beschrieben, wo es während der frühen Embryonalentwicklung in neuronalen Vorläuferzellen und später in den Augen der Fliegenembryonen exprimiert ist (Chu-Lagraff *et al.*, 1991; Vaessin *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2000). Auch in vielen anderen Organismen, wie Maus, Huhn, Zebrafisch und *Xenopus*, findet man die *SpProx1*-Homologe hauptsächlich in den Augen der Embryonen exprimiert (Glasgow&Tomarev, 1998; Mizuno *et al.*, 1999; Tomarev *et al.*, 1996; Tomarev *et al.*, 1998). Daneben findet man eine Expression der *SpProx1*-Homologe noch im zentralen Nervensystem und im Darm von Mausembryonen (Oliver *et al.*, 1993) sowie im zentralen Nervensystem und in Muskelzellen von Zebrafischembryonen (Glasgow&Tomarev, 1998). *Six3* scheint spezifische Aufgaben bei der Entwicklung des Auges zu haben. Die Expression von *SpSix3*-Homologen sind in Embryonen vom Zebrafisch (Seo *et al.*, 1998) ebenso wie in Embryonen von Fröschen (Zuber *et al.*, 1999) sowie Hühner- und Mausembryonen (Kawakami *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1995) in den Augen zu finden. Die humanen *SpSix3*-Homologe sind im Menschen sowohl im sich entwickelnden Auge als auch im adulten Auge exprimiert (Leppert *et al.*, 1999). In anderen Organismen nicht in neuralem Gewebe exprimiert sind hingegen Homologe von *SpMox*. Im *Amphioxus* ist das *SpMox*-Homolog in den Somiten exprimiert (Minguillon&Garcia-Fernandez, 2002), ebenso wie in Hühner- und Mausembryonen (Mankoo *et al.*, 1999; Rallis *et al.*, 2001), und scheint eine Rolle bei der Entwicklung von Muskelgewebe der Extremitäten zu spielen. Ein murines *SpMox*-Homolog wird allerdings auch in einzelnen Zellen im Gehirn von Mäusen exprimiert (<http://mouse.brain-map.org/brain/gene/79632234.html?ispopup=1>). Ebenfalls hauptsächlich in nicht-neuralem Gewebe exprimiert, sind die *Sp-sFrp1/5*-Homologe. Im Embryonen von *Xenopus* ist ein *Sp-sFrp1/5*-Homolog ebenso wie in Embryonen von Zebrafischen im Endoderm exprimiert (Pezeron *et al.*, 2006; Pilcher&Krieg, 2002). Weitere Homologe von *Sp-sFrp1/5* sind hingegen in neuralem Gewebe wie Gehirn und Auge von Embryonen des Zebrafisches exprimiert (Peng&Westerfield, 2006; Tendeng&Houart, 2006). Wie Northern Blot-Experimente gezeigt haben, ist humanes und murines *sfrp1* abgesehen von Lunge und Leber in sämtlichen Geweben exprimiert

(Finch *et al.*, 1997), besonders hohe Expression findet man im Herz (Jaspard *et al.*, 2000). Das humane und murine *sfrp5* hingegen ist hauptsächlich im Pankreas und in Fettgewebe exprimiert (Hu *et al.*, 1998). Daneben ist eine Expression von *sfrp5* aber auch im Auge zu finden (Chang *et al.*, 1999). In Mausembryonen konnte eine Expression der beiden Homologen während der Entwicklung der Extremitäten noch in Mesenchym-, Knorpel- und Muskelzellen der sich entwickelnden Hände gefunden werden (Witte *et al.*, 2009).

Das Ergebnis des WISH-Screens unterstützt somit die These, dass Gene, deren Homologe in anderen Organismen in neuralem Gewebe exprimiert werden, im Seeigelembryo im apikalen Ektoderm exprimiert werden. Denn alle in diesem WISH-Screen identifizierten Gene besitzen (abgesehen von *SpMox*) zumindest ein Homolog in einem anderen Organismus, das in neuralem Gewebe exprimiert ist. Dass im apikalen Ektoderm zudem serotonerge Zellen sowie die an der Biosynthese beteiligten Enzyme exprimiert werden (siehe Kapitel 4.5.1 und 5.4.1), impliziert, dass zumindest einige der hier identifizierten Gene an der Regulation von serotonergen Zellen beteiligt sind.

5.5.2 Regulation der Bildung von serotonergen Zellen

Um zu überprüfen, ob die beim WISH-Screen identifizierten Gene auch an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt sind, wurden für einige dieser Gene (*SpAlx*, *SpFoxJ1*, *SpFoxQ2*, *SpGlass*, *SpMox* und *Sp-sFrp1/5*) spezifische MASOs designt sowie synthetische mRNA für *SpFoxQ2* hergestellt. Die Depletions- sowie die Überexpressions-Embryonen wurden anschließend mittels immunohistochemischer Verfahren auf serotonerge Zellen hin untersucht (siehe Kapitel 4.6.2).

Obwohl sowohl *SpAlx*- als auch *SpFoxJ1*-Homologe in anderen Organismen in erster Linie im Gehirn exprimiert werden, hat ein Knock-Down dieser beiden Gene im Seeigelembryo keinen Einfluss auf die Bildung von serotonergen Zellen. Auch ansonsten scheinen sie keinen Einfluss auf die Entwicklung des Seeigelembryos zu haben (siehe Kapitel 4.6.2). Ob die verwendeten MASOs nicht wirksam sind oder nur keinen sichtbaren Einfluss haben, kann hier nicht eindeutig geklärt werden, so wurde z.B. nicht untersucht, ob diese Embryonen normale SynaptotagminB-positive Zellen bilden. Dass der Knock-Down eines Gens, das im apikalen Ektoderm exprimiert wird, nicht zwangsläufig zu sichtbaren Veränderungen im Embryo führen muss, zeigt der Knock-Down von *SpNkx2.1*. Obwohl die Funktionsfähigkeit und Spezifität des verwendeten MASOs mittels Rescue-Experimenten getestet wurde, konnten keine

sichtbaren strukturellen Veränderungen im Seeigelembryo festgestellt werden (Takacs *et al.*, 2004). Trotz identischer Expressionsmuster von *SpFoxQ2* und *SpFoxJ1* (und während der frühen Entwicklungsstadien auch von *SpAlx*; siehe Kapitel 4.6.3) sorgt der Knock-Down von *SpFoxQ2* dafür, dass keine serotonergen Zellen mehr gebildet werden. Ansonsten weist der *SpFoxQ2*-MASO-injizierte Embryo keine sichtbaren Veränderungen gegenüber den Kontroll-Embryonen auf. *SpFoxQ2*-mRNA-injizierte Embryonen hingegen ähneln morphologisch *Cadherin*-mRNA-injizierten Embryonen und besitzen ebenso wie diese eine erhöhte Anzahl von serotonergen Zellen. Dem Phänotypen entsprechend ist das Expressionslevel der *SpTph* in den *SpFoxQ2*-Depletionsembryonen herunterreguliert und in den *SpFoxQ2*-MOE-Embryonen hochreguliert (siehe Kapitel 4.6.2). Damit stimmen die Ergebnisse mit den Daten von bereits an *SpFoxQ2* durchgeführten Funktionsstudien überein (Yaguchi *et al.*, 2008). Wie bereits durch die Kolo-kalisation von Serotonin und der *SpGlass*-mRNA angedeutet (siehe Kapitel 4.6.3), ist *SpGlass* an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt. So führt ein Knock-Down von *SpGlass* zu Embryonen ohne serotonerge Zellen, und damit übereinstimmend ist das Expressionslevel von *SpTph* in diesen Embryonen stark herunterreguliert. Da der Embryo ansonsten morphologisch von Kontroll-Embryonen nicht zu unterscheiden ist (siehe Kapitel 4.6.2), scheint die Spezifizierung von serotonergen Zellen die ausschließliche Aufgabe von *SpGlass* zu sein. Dass das *Drosophila*-Homolog spezifisch in Photorezeptorzellen exprimiert wird (siehe Kapitel 5.5.1), impliziert, dass die Entwicklung von Augen in höheren Organismen ähnlich reguliert wird wie die Bildung von serotonergen Zellen im Seeigel. Da *SpMox* wie *SpGlass* in den serotonergen Zellen exprimiert wird (siehe Kapitel 4.6.3), ist es nicht überraschend, dass auch *SpMox* an der Regulation von serotonergen Zellen beteiligt ist und *SpMox*-MASO-injizierte Embryonen daher keine serotonergen Zellen mehr besitzen und das Expressionslevel der *SpTph* herunterreguliert ist. Überraschend hingegen ist, dass der Knock-Down von *SpMox* daneben noch weitere Folgen auf die Entwicklung des Embryos hat, wie der Endoderm-Bildung und die Etablierung der oralen-aboralen Achse (siehe Kapitel 4.6.2). Da wie die qPCR-Analyse zeigt, *SpMox*-Transkripte erst 33 Stunden nach der Befruchtung detektierbar sind, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Endoderm-Bildung normalerweise schon abgeschlossen ist, dürfte ein spezifischer *SpMox*-MASO keinen Einfluss auf die Endoderm-Entwicklung haben. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass der designte MASO nicht spezifisch ist, sondern neben der Translation von *SpMox* noch die Translation zumindest eines weiteren Gens verhindert. Da die Expression von Homologen von *SpSix3* in sämtlichen

Organismen wie das *Drosophila*-Homolog von *SpGlass* im Auge zu finden ist, ist es überraschend, dass ein Knock-Down von *SpSix3* keinerlei Effekt auf die Bildung von serotonergen Zellen hat. Dieser Befund passt jedoch zum Expressionsmuster von *SpSix3*. Denn bereits in der späten Blastula (24 Stunden nach der Befruchtung), also zu einem Zeitpunkt, an dem die Gene der beiden an der Biosynthese von Serotonin beteiligten Enzyme aktiviert werden, wird *SpSix3* bereits nicht mehr im apikalen Ektoderm exprimiert (Howard-Ashby *et al.*, 2006; siehe Kapitel 4.6.1). Da der *SpSix3*-MASO-injizierte Embryo sich auch ansonsten normal entwickelt (siehe Kapitel 4.6.2), scheint *SpSix3* auch keine Aufgaben bei der frühen Etablierung des apikalen Ektoderm zu haben. Da Patienten mit Mutationen im menschlichen *SpSix3*-Homolog an Holoprosencephalie leiden (Ribeiro *et al.*, 2006; Wallis *et al.*, 1999), und das apikale Ektoderm, wie bereits dargelegt (siehe Kapitel 5.4.2), der Kopfstruktur von Vertebraten vergleichbar ist, hätte man in den *SpSix3*-MASO-injizierten Embryonen eigentlich mit Defekten im apikalen Ektoderm gerechnet. Eine Erklärung ist, dass der gegen *SpSix3* gerichtete MASO nicht funktioniert. Diese Erklärung wird durch kürzlich durchgeführte Studien mit anderen gegen *SpSix3* designten MASOs gestützt. Mit diesem MASOs injizierte Embryonen bilden kein normales apikales Ektoderm und auch keine serotonergen Zellen. Eine Überexpression von *SpSix3* hingegen führt zu einer erhöhten Anzahl von serotonergen Zellen (Wei *et al.*, 2009). Da eine Überexpression des *SpSix3*-Homologs in *Xenopus* zu Embryonen mit vergrößerten Augen führt (Zuber *et al.*, 1999), unterstützt zudem die zuvor aufgestellte These, dass viele der in Vertebraten bzw. Fliegen an der Augenbildung beteiligten Gene im Seeigel an der Bildung von serotonergen Zellen verwickelt sind. Passend zur Beobachtung, dass Vertebraten-Homologe von *Sp-sFrp1/5* hauptsächlich in nicht-neuralem Gewebe exprimiert werden, hat ein Knock-Down von *Sp-sFrp1/5* keinen Einfluss auf die Bildung von serotonergen Zellen. Allerdings ist in diesen Embryonen die Entwicklung des Mundes und des Darmes stark gestört (siehe Kapitel 4.6.2). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Charakterisierung von *sfrp1*^{-/-} Mäusen. Diese entwickeln ebenfalls verkürzte Mägen (Matsuyama *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der Ähnlichkeiten der Expressionsmuster zwischen Homologen nicht leichtfertig auf konservierte Funktionen geschlossen werden darf. Sie zeigen aber auch, dass Vergleiche von Expressionsmustern durchaus nützlich sein können, um erste Anhaltspunkte über die Funktion eines Gens zu erhalten.

5.5.3 GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen

Das GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen zeigt deutlich, dass *SpDkk1* nicht an der frühen Bildung des apikalen Ektoderms beteiligt ist, da schon etliche andere Gene (*SpAlx*, *SpFoxJ1*, *SpFoxQ2*, *SpHex*, *SpHnf6*, *SpNkx2.1* und *SpSix3*) im apikalen Ektoderm exprimiert werden (siehe Kapitel 4.6.3), bevor eine Expression von *SpDkk1* im apikalen Ektoderm detektierbar ist. Dafür dass *SpAlx*, *SpFoxQ2*, *SpHnf6* und *SpNkx2.1* mit Beginn der Gastrulation tatsächlich durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und damit *SpDkk1* reguliert werden, sprechen mehrere Tatsachen. So wurde bereits, passend zu der Tatsache, dass Tcf/Lef, der Mediator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (siehe Kapitel 1.3.2), bereits maternal und auch im animalen Bereich des Embryos vorhanden ist (Huang *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2006), für *SpNkx2.1* gezeigt, dass dieser durch nukleäres β -Catenin inhibiert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *SpSix3* während der frühen Entwicklungsstadien auch als Antagonist des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wirkt und wahrscheinlich dadurch u.a. *SpAlx*, *SpFez*, *SpFoxQ2* und *SpNkx2.1* reguliert (Wei *et al.*, 2009). Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass diese Gene auch in den späteren Embryonalstadien durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und damit durch *SpDkk1* reguliert werden, zumal gezeigt werden konnte, dass eine Expression von Wnt-Molekülen auch in den späteren Stadien der Embryonalentwicklung des Seeigels zu finden ist (Croce *et al.*, 2006; Poustka *et al.*, 2007). Dass tatsächlich eine Regulation von *SpHnf6* durch *SpDkk1* existiert, wird durch die Ergebnisse von *SpHnf6*-Knock-Down-Experimenten unterstützt. So konnte gezeigt werden, dass *SpHnf6*-MASO-injizierte Embryonen mehr aborales Ektoderm auf Kosten von oralem Ektoderm bilden (Otim *et al.*, 2004). Diesen Effekt findet man auch in *SpDkk1*-mRNA-injizierten Embryonen, in denen das Expressionslevel von *SpHnf6* herunterreguliert ist (siehe Kapitel 4.2.2 und 5.3.1). Dagegen spricht allerdings, dass man in den *SpHnf6*-MASO-injizierten Embryonen die Expression von *SpNkx2.1* herunterreguliert gefunden hat (Otim *et al.*, 2004), während die Expression von *SpNkx2.1* in den *SpDkk1*-Überexpressions-Embryonen unverändert ist (siehe Kapitel 4.6.3). In einer anderen Arbeit wurde aber ebenfalls gezeigt, dass der Knock-Down von *SpHnf6* keinen Einfluss auf die Expression von *SpNkx2.1* hat (Dunn *et al.*, 2007), so dass davon ausgegangen werden kann, dass *SpHnf6* durch *SpDkk1* reguliert wird. Auch die Regulation von *SpFoxQ2* durch *SpDkk1* wird durch verschiedene andere Beobachtungen verifiziert. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression von *SpFoxQ2* durch nukleäres β -Catenin inhibiert wird (Yaguchi *et al.*, 2008). Des Weiteren zeigt eine Überexpression von *SpFoxQ2*

denselben Phänotypen wie eine Überexpression von *SpDkk1*, die bekanntlich zu einer Erhöhung des Expressionslevels von *SpFoxQ2* führt (siehe Kapitel 4.6.3) und viele Gene werden durch *SpFoxQ2*-MOE ebenso reguliert wie durch eine Überexpression von *SpDkk1* (*SpFez*, *SpMox* und *Sp-sFrp1/5*). Es liegt daher nahe, dass *SpFoxQ2* ein Mediator ist, der die Dkk1-Signale vermittelt und dementsprechend wurden Interaktionen zwischen *SpDkk1* und Genen, die auch eine Interaktion zu *SpFoxQ2* zeigten, als indirekt gewertet und nicht im GRN angezeigt. Dass die Expressionslevel von *SpAlx*, *SpGlass* und *SpNkx2.1* in den *SpDkk1*-MASO-injizierten Embryonen herunterreguliert sind, aber keine Änderung der Expression dieser Gene in den *SpDkk1*-MOE-Embryonen festgestellt werden kann, deutet darauf hin, dass *SpDkk1* bei der Regulation dieser Gene als Ein- und Aus-Schalter fungiert, aber nicht quantitativ-regulatorisch. Andererseits führt die Überexpression von *SpDkk1* zu einer Herunterregulierung der Expression von *SpHnf6* und *SpPax2*, während ein Knock-Down von *SpDkk1* keinen Effekt auf die Expression der beiden Gene hat. Dies kann dadurch erklärt werden, dass *SpHnf6* und *SpPax2* noch einen weiteren Regulator besitzen, der die Aufgaben von *SpDkk1* ersetzt, wenn *SpDkk1* nicht mehr vorhanden ist. Im Gegensatz zur Regulation von *SpAlx*, *SpGlass* und *SpNkx2.1* scheint *SpDkk1* in diesem Fall quantitativ-regulatorisch zu wirken.

Interessanterweise wird der Transkriptionsfaktoren *SpMox*, der nur in den serotonergen Zellen exprimiert wird und *SpTph* aktiviert, erst später exprimiert wird als *SpTph*, d.h. seine Aufgabe kann nicht die Spezifizierung von serotonergen Zellen sein, wie in einer anderen Arbeit vermutet (Poustka *et al.*, 2007). *SpMox* scheint vielmehr daran beteiligt zu sein, die Existenz von serotonergen Zellen aufrecht zu erhalten. Da ein Knock-Down von *SpMox* allerdings zu Embryonen ohne serotonerge Zellen führt, widerspricht dieser These. Allerdings wurde schon an anderer Stelle darauf hingewiesen, dass evtl. der *SpMox*-MASO nicht spezifisch wirkt (siehe Kapitel 5.5.2). *SpGlass* hingegen scheint an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt zu sein, da dieser Transkriptionsfaktor rechtzeitig exprimiert wird, um die Expression der beiden an der Biosynthese von Serotonin beteiligten Enzyme zu aktivieren und ein Knock-Down von *SpGlass* zu Embryonen ohne serotonerge Zellen führt (siehe Kapitel 4.6.3 und Kapitel 4.6.2). Zudem scheint *SpGlass* zu geeigneter Zeit dafür zu sorgen, dass die Bildung weiterer serotonerger Zellen unterbunden wird, wie durch die Inhibierung von *SpDkk3* durch *SpGlass* angedeutet. Da *SpFez* ebenfalls wie *SpGlass* und *SpMox* spezifisch in den serotonergen Zellen exprimiert wird (siehe Kapitel 4.6.3) und *SpFez*-Homologe im Vorderhirn exprimiert werden (siehe Kapitel 5.5.1), liegt die Vermutung

nahe, dass *SpFez* ebenfalls für die Bildung von serotonergen Zellen zuständig ist. Denn im Gegensatz zu *SpMox* ist *SpFez* bereits 18 Stunden nach der Befruchtung und damit noch früher als *SpGlass* exprimiert. Unterstützt wird diese These dadurch, dass in allen in dieser Arbeit durchgeführten Gen-Knock-Downs, die zu Embryonen ohne serotonerge Zellen führen, auch *SpFez* herunterreguliert ist. Demnach regulieren *SpDkk1*, *SpFoxQ2*, *SpGlass* und *SpMox* nicht direkt *SpTph*, sondern indirekt über *SpFez*. Eine Ausnahme bildet der Knock-Down von *SpDkk3*. In diesem Fall bleibt die Expression von *SpFez* unverändert. Dies legt nahe, dass sowohl *SpDkk3* als auch *SpFez* als Aktivoren der *SpTph* nötig sind (AND-Logik). Welche Aufgaben *SpDkk3* allerdings während der Cleavage- und Blastula-Stadien hat, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Denn die einzigen Gene, die durch *SpDkk3* reguliert werden, sind *SpMox* und *SpTph*, und diese werden, wie die zeitlichen Expressionsprofile zeigen, erst 33 Stunden bzw. 24 Stunden nach der Befruchtung exprimiert (siehe Kapitel 4.5.1 und 4.6.1). Des Weiteren kann nicht geklärt werden, ob *SpDkk3* in einem Feedforward-Loop sowohl *SpMox* als auch *SpTph* aktiviert, oder ein Effekt auf *SpTph* durch die Aktivierung von *SpMox* zustande kommt. Da es sich bei *SpDkk3* zudem nach bisherigen Erkenntnissen um ein Signalmolekül handelt, und *Dkk3* daher wahrscheinlich nicht direkt an der Regulation von Genen beteiligt ist, wurde in das GRN ein Transkriptionsfaktor X eingefügt, der als Mediator von *Dkk3*-Signalen dient (siehe Kapitel 4.6.3). Da in *Xenopus* gezeigt werden konnte, dass *Dkk3* benötigt wird, um normale Level von *Smad4*, dem Schlüsselmediator aller TGF β -Signalwege (Massague *et al.*, 2005), zu erhalten (Pinho&Niehrs, 2007), besteht die Möglichkeit, dass es sich beim hypothetischen Transkriptionsfaktor X um eine Komponente eines TGF β -Signalwegs handelt. In einer anderen Arbeit konnte an Prostatakrebs-Zelllinien gezeigt werden, dass *Dkk3* die c-Jun Kinase aktiviert (Abarzua *et al.*, 2005). Demnach könnte *Dkk3* ein Aktivator des Wnt/PCP-Signalwegs (siehe Kapitel 1.3.3) sein und der Transkriptionsfaktor X eine Komponente dieses Signalwegs. Auch die Funktion von *SpPax2* kann in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. *SpPax2* scheint aber eng mit der Regulation von serotonergen Zellen verbunden zu sein, da mit *SpMox* und *SpGlass* zwei in den serotonergen Zellen exprimierte Transkriptionsfaktoren regulierend auf die Expression von *SpPax2* wirken. Da nicht überprüft wurde, ob es sich bei den Zellen, in denen *SpProx1* in der Prism- und der Pluteus-Larve exprimiert wird, zumindest teilweise um serotonerge Zellen handelt, und das Expressionsmuster von *SpProx1* in den frühen Embryonalstadien eher darauf hinweist, dass es sich bei diesen Zellen um

eingewanderte Mesenchymzellen handelt, wurde *SpProx1* nicht in das GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen aufgenommen.

Des Weiteren bleibt allgemein bei der Aufstellung eines GRN zu beachten, dass es nicht zwangsläufig bedeutet, dass ein Gen nicht reguliert wird, wenn keine Änderung des Expressionslevels durch eine Perturbation festgestellt werden kann, da es möglich ist, dass ein Gen zwei Aktivatoren besitzt und der Ausfall von einem der beiden Aktivatoren durch den anderen kompensiert werden kann (OR-Logik).

5.6 Regulation von *SpDkk1*

Der Reporterassay zeigt deutlich, dass die ca. 750bp-große Zebraabärblings-Promotorregion funktional ist. So zeigen 56% der mit dem *DrDkk1*-Promotorbereich injizierten Embryonen eine Expression von GFP. Damit liegt diese Rate deutlich oberhalb der Signifikanzgrenze von 2%, die durch alleinige Injektion des β -Globin/GFP Vektors bestimmt wurde (Hufton *et al.*, 2009). Während die Expression von GFP im Mittel- und Hinterhirn mit dem Expressionmuster von *dkk1* übereinstimmt (Hashimoto *et al.*, 2000), ist die im Rückenmark gefundene Expression von GFP überraschend. Eine Erklärung ist, dass einige Regionen im Genom als Silencer oder Repressoren wirken, die die Aktivität von regulatorischen Elementen reprimieren. In diesem Reporterassay wurde jedoch nur ein kleiner Promotorbereich unabhängig vom genomischen Kontext getestet. So wurde auch in anderen Studien von regulatorischen Elementen gezeigt, dass diese oftmals eine Aktivität in Geweben zeigen, in denen das dazugehörige Gen gar nicht exprimiert wird (Woolfe *et al.*, 2005). Der Anteil der mit dem *SpDkk1*-Promotorbereich injizierten Embryonen, die eine Expression von GFP zeigen, ist mit 13% zwar deutlich geringer als der Anteil der mit dem *DrDkk1*-Promotorbereich injizierten Embryonen, die eine Expression von GFP zeigen, allerdings liegt dieser Anteil immer noch klar oberhalb der Signifikanzgrenze. Zudem liefert der Promotorbereich von *SpDkk1* dasselbe Expressionmuster wie der *DrDkk1*-Promotorbereich. Demnach ist der *SpDkk1*-Promotorbereich ebenfalls funktional, obwohl durch Sequenzalignments zwischen den Promotorbereichen von *SpDkk1* und *DrDkk1* keine konservierten Bereiche aufgespürt werden konnten (siehe Kapitel 4.7). Dies zeigt deutlich, dass einzelne Transkriptionsfaktor-Bindestellen ausreichend sind, um eine Genexpression zu aktivieren bzw. zu verstärken. Dass die Transkriptionsfaktor-Bindestellen umgebenden Sequenzen aber nicht vollkommen irrelevant sind, zeigt die unterschiedliche Expressionsrate der Promotorbereiche von *SpDkk1* und *DrDkk1* (siehe Kapitel 4.7).

Die Identifizierung von FAST-1-(FoxH) und Smad3-Bindestellen (beide Transkriptionsfaktoren sind Komponenten des Nodal-Signalwegs) sowie Tcf/Lef-Bindestellen (Komponente des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, siehe Kapitel 1.3.2), deutet an, dass die Expression von Dkk1 durch sowohl den Nodal- als auch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wird. Dass Dkk1 in einem negativen Feedback-Loop durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wird, konnte bereits in verschiedenen Organismen gezeigt werden (siehe Kapitel 1.2.2) und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass auch im Seeigel Dkk1 nicht nur Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist, sondern auch selber durch diesen reguliert wird (siehe Kapitel 4.3 und 5.3.1). Diese Vermutung wird durch den Funktionstest der Tcf/Lef-Bindestellen bestätigt. Eine Deletion der Tcf/Lef-Bindestellen in den Promotorbereichen von *SpDkk1* und *DrDkk1* führt in beiden Fällen dazu, dass keine Expression mehr zu finden ist (siehe Kapitel 4.7). Dies zeigt, dass ein aktivierter Wnt/ β -Catenin-Signalweg nötig ist, um die Expression von *SpDkk1* bzw. *DrDkk1* zu aktivieren. Allerdings wurden die anderen identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen nicht auf ihre Funktionalität hin untersucht, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob auch Nodal-Signale für die Expression von Dkk1 essentiell sind. Dafür, dass Nodal-Signale bei der Regulation von Dkk1 eine Rolle spielen, spricht die Tatsache, dass gezeigt werden konnte, dass bei der Bildung von serotonergen Zellen der Wnt-Signalweg mit dem Nodal-Signalweg in Verbindung steht (Yaguchi *et al.*, 2008; siehe Kapitel 1.4.3 und 5.4.2). Daneben haben weitere Studien gezeigt, dass TGF-Signale (zu denen auch Nodal gehört) auch bei der Endomesoderm-Differenzierung des Seeigels, bei der, wie bereits gezeigt, der Wnt/ β -Signalweg eine entscheidende Aufgabe hat (siehe Kapitel 1.3.5), eine Rolle spielen (Sethi *et al.*, 2009). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass *SpDkk1*, ein wichtiger Regulator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (siehe Kapitel 5.3), von Nodal-Signalen reguliert wird. Allerdings bleibt es ein Rätsel, warum im *SpDkk1*-Promotorbereich FAST-1 (FoxH)-Bindestellen zu finden sind, obwohl das diesen Transkriptionsfaktor codierende Gen im Seeigel nicht existiert, wie die Genomanalyse gezeigt hat. Möglicherweise übernimmt aber eine der beiden bisher nur im Seeigel identifizierten Gene der Forkhead-Klasse, *SpFoxX* und *SpFoxY*, die Aufgaben von *fast-1* (Tu *et al.*, 2006).

5.7 Ausblick

Obwohl gezeigt werden konnte, dass es sich bei *SpDkk1* um ein Gen handelt, das für ein Protein codiert, das nicht nur auf Sequenzebene (siehe Kapitel 5.1), sondern auch auf funktionaler Ebene eindeutig Mitglied der Dickkopf-Familie ist (siehe Kapitel 5.3 und 5.4), bleiben noch viele Fragen ungeklärt. So ist bisher, abgesehen von der Konservierung des negativen Feedback-Loops, wenig über die mechanistische Wirkung von Dkk1 im Seeigel bekannt. So ist zwar deutlich dargelegt worden, dass Dkk1 an der Endomesoderm-Differenzierung beteiligt ist, ob dies durch die spezifische Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Hilfe des Korezeptors Kremen geschieht wurde jedoch nicht untersucht (siehe Kapitel 5.3.1). Um mehr Details über die Funktionsweise von Dkk1 zu erhalten, könnten z.B. Embryonen mit *SpDkk1*-mRNA injiziert werden, in denen die Bereiche, die für die Cystein-reichen Domänen codieren, deletiert wurden, um herauszufinden, ob auch im Seeigel lediglich die zweite konservierte Domäne funktional ist. Detaillierte Informationen über den Wirkmechanismus der Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Dkk1 könnten durch simultane Injektion von *SpDkk1*-mRNA und anderen den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivierenden Substanzen (wie Lithium) bzw. durch simultane Injektion von *SpDkk1*-MASO und anderen den Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibierenden Substanzen (wie Cadherin erhalten). Um zu prüfen, ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg direkt an der Bildung von serotonergen Zellen beteiligt ist und Dkk1 im apikalen Ektoderm nötig ist, um diesen zu inhibieren (siehe Kapitel 5.4), müsste ein konditioneller Knock-Down von *SpDkk1* durchgeführt werden. Dieser müsste gezielt dafür sorgen, dass eine Translation von Dkk1 im apikalen Ektoderm verhindert wird. Sollte eine Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Bildung serotonerger Zellen wirklich nötig sein, würde ein konditioneller Knock-Down von *SpDkk1* zu Embryonen führen, die eine normale Endomesoderm-Entwicklung durchlaufen, und somit endomesodermale Strukturen aufweisen, aber keine serotonergen Zellen bilden. Phänotypisch müssten sie den nach 24 Stunden nach der Befruchtung mit Lithium behandelten Embryonen gleichen (siehe Kapitel 5.4.1). Eine Möglichkeit einen konditionellen Knock-Down herbeizuführen, bietet die anti-intron antisense RNA (aiRNA)-Methode (Smith&Davidson, 2008).

Auch das hier aufgestellte GRN für das apikale Ektoderm und serotonerge Zellen lässt noch viele Fragen offen und ist mit Sicherheit nicht vollständig. So wurden die *SpAlx*-, *SpFoxJ1*- und *SpSix3*-MASO-injizierten Embryonen bisher nur auf serotonerge Zellen hin untersucht, es wurde aber nicht analysiert, in wie weit die Expressionen der

anderen im apikalen Ektoderm exprimierten Gene durch diese Perturbationen beeinflusst werden. Des Weiteren stehen zum einen noch die Knock-Downs der bereits in dieser Arbeit identifizierten im apikalen Ektoderm exprimierten Gene (*SpFez*, *SpHes*, *SpHnf6*, *SpPax2*, *SpProx1*) aus, um auch deren Wirkung auf die Bildung von serotonergen Zellen und den Expressionen der in dieser Arbeit identifizierten Gene zu untersuchen, und zum anderen sind mittlerweile in anderen Arbeiten noch weitere Gene identifiziert worden, die ebenfalls im apikalen Ektoderm exprimiert werden (Burke *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2009), und daher potentielle Komponenten dieses GRN sind. Daneben hat sich gezeigt, dass einige der in dieser Arbeit verwendeten MASOs nicht einwandfrei funktionieren. Obwohl in zahlreichen Experimenten gezeigt wurde, dass mit Hilfe von MASOs ein wirksamer und spezifischer Gen-Knock-Down erzielt werden kann (Corey&Abrams, 2001), ist es ratsam MASOs auf ihre Funktionalität und Spezifität zu testen, da ansonsten nicht sichergestellt ist, ob der Knock-Down eines Gens keinen Wirkung hat oder der MASO unwirksam ist (wie im Fall des *SpSix3*-MASO, siehe Kapitel 5.5.2) bzw. ob etwaige beobachtete Folgen wirklich aufgrund des spezifischen Knock-Down eines Gens zustande kommen und nicht aufgrund des Knock-Downs mehrerer Gene (wie im Fall des *SpMox*-MASO, siehe Kapitel 5.5.2). Eine einfache Möglichkeit bietet das Design eines zweiten, vom ersten unterschiedlichen MASOs. Sollten beide MASOs denselben Phänotypen erzeugen, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt spezifisch ist. Weitere Möglichkeiten bestehen in der Durchführung von Rescue-Experimenten durch simultane Injektion des MASOs und synthetischer mRNA (wie im Fall von *SpDkk1* geschehen, siehe Kapitel) oder durch Testen der MASOs in *in vitro* Translationsystemen (Rentzsch *et al.*, 2008). Um zu prüfen, ob bestimmte Effekte direkter oder indirekter Natur sind, ist es zudem nötig, dass verschiedene Rescue-Experimente durchgeführt werden. Sollte *SpMox* z.B. nicht direkt die *SpTph* regulieren, sondern über den Transkriptionsfaktor *SpGlass* (siehe Kapitel 5.5.3), würde eine simultane Depletion von *SpMox* und Überexpression von *SpGlass* zu einem unveränderten Expressionslevel der *SpTph* führen. Sollte *SpMox* direkt als Regulator der *SpTph* wirken, würde auch bei gleichzeitiger Injektion von *SpGlass*-mRNA eine Depletion von *SpMox* zu einem verminderten Expressionslevel von *SpTph* führen. Um die in diesem GRN beschriebenen Gen-Interaktionen zu verifizieren, sollten zudem *cis*-regulatorische Analysen mit Hilfe eines BAC-Reporterassays durchgeführt werden (Smith, 2008).

Außerdem ist nahezu unbekannt, auf welche Art und Weise die Expression von *SpDkk1* reguliert wird. Zwar haben Promotorstudien gezeigt, dass Wnt/ β -Catenin-Signale essentiell für die Aktivierung der Expression von *SpDkk1* sind, doch wurde in dieser Promotorstudie nur ein sehr kleiner Bereich upstream von *SpDkk1* getestet (siehe Kapitel 5.6). Erfahrungsgemäß sind regulatorische Elemente aber auch noch sehr weit entfernt vom Transkriptionsstartpunkt und auch in intronischen Bereichen zu finden (Hufton *et al.*, 2009; Woolfe *et al.*, 2005), so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass Wnt/ β -Catenin-Signale nicht ausschließlich für die Regulation von *SpDkk1* zuständig sind. Eine gute Möglichkeit, um große regulatorische Bereiche auf Funktionalität zu testen, ist im Seeigel durch die Injektion von BACs, wie es z.B. für das Kernel-Gen *blimp1* geschehen ist (Smith *et al.*, 2007), gegeben.

Es gibt also noch viele Details über die Funktion von Dkk1 im Seeigel zu entdecken. Besonders die Aufklärung der Differenzierung des apikalen Ektoderms und der Bildung von serotonergen Zellen steht noch am Anfang und lässt eine Vielzahl interessanter Forschungsergebnisse erwarten. Zahlreichen weiteren Generationen ist also die Möglichkeit gegeben, sich auf diesem Gebiet den akademischen Grad des Doktors der Naturwissenschaften zu verdienen.

6. Literaturverzeichnis

- Abarzua, F., M. Sakaguchi, *et al.* (2005). "Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase." Cancer Res **65**(21): 9617-22.
- Aberle, H., A. Bauer, *et al.* (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J **16**(13): 3797-804.
- Adayev, T., B. Ranasinghe, *et al.* (2005). "Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion." Biosci Rep **25**(5-6): 363-85.
- Angerer, L.M. & R.C. Angerer (2000). "Animal-vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo." Dev Biol **218**(1): 1-12.
- Angerer, L.M., D.W. Oleksyn, *et al.* (2001). "Sea urchin goosecoid function links fate specification along the animal-vegetal and oral-aboral embryonic axes." Development **128**(22): 4393-404.
- Aragon, M.A., M.E. Ayala, *et al.* (2005). "Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development." Reproduction **129**(6): 717-27.
- Aravind, L. & E.V. Koonin (1998). "A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkopfs." Curr Biol **8**(14): R477-8.
- Arnone, M.I., L.D. Bogarad, *et al.* (1997). "Green Fluorescent Protein in the sea urchin: new experimental approaches to transcriptional regulatory analysis in embryos and larvae." Development **124**(22): 4649-59.
- Augustin, R., A. Franke, *et al.* (2006). "Dickkopf related genes are components of the positional value gradient in Hydra." Dev Biol **296**(1): 62-70.
- Bafico, A., A. Gazit, *et al.* (1999). "Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling." J Biol Chem **274**(23): 16180-7.
- Bafico, A., G. Liu, *et al.* (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**(7): 683-6.
- Beddington, R.S. (1994). "Induction of a second neural axis by the mouse node." Development **120**(3): 613-20.
- Bejsovec, A. (2000). "Wnt signaling: an embarrassment of receptors." Curr Biol **10**(24): R919-22.
- Bhasin, N., E. Kernick, *et al.* (2004). "Differential regulation of chondrogenic differentiation by the serotonin2B receptor and retinoic acid in the embryonic mouse hindlimb." Dev Dyn **230**(2): 201-9.

- Bisgrove, B.W. & R.D. Burke (1987). "Development of the nervous system of the pluteus larva of *Strongylocentrotus droebachiensis*." Cell Tissue Res **248**: 335-343.
- Blair, J.E. & S.B. Hedges (2005). "Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals." Mol Biol Evol **22**(11): 2275-84.
- Bolouri, H. & E.H. Davidson (2003). "Transcriptional regulatory cascades in development: initial rates, not steady state, determine network kinetics." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9371-6.
- Boutros, M., N. Paricio, *et al.* (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." Cell **94**(1): 109-18.
- Boveri, T. (1908). "Zellenstudien VI: Die Entwicklung dispermer Seeigeleier. Ein Beitrag zur Befruchtungslehre und zur Theorie des Kerns." Jena Z Naturwiss **43**(1).
- Brivanlou, A.H. & J.E. Darnell, Jr. (2002). "Signal transduction and the control of gene expression." Science **295**(5556): 813-8.
- Brott, B.K. & S.Y. Sokol (2002). "Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins." Mol Cell Biol **22**(17): 6100-10.
- Burden, H.W. & I.E. Lawrence, Jr. (1973). "Presence of biogenic amines in early rat development." Am J Anat **136**(2): 251-7.
- Burke, R.D., L.M. Angerer, *et al.* (2006). "A genomic view of the sea urchin nervous system." Dev Biol **300**(1): 434-60.
- Burke, R.D., L. Osborne, *et al.* (2006). "Neuron-specific expression of a synaptotagmin gene in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*." J Comp Neurol **496**(2): 244-51.
- Buznikov, G.A., R.E. Peterson, *et al.* (2005). "The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence." Neurochem Res **30**(6-7): 825-37.
- Buznikov, G.A., Y.B. Shmukler, *et al.* (1996). "From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development?" Cell Mol Neurobiol **16**(5): 537-59.
- Cameron, R.A., B.R. Hough-Evans, *et al.* (1987). "Lineage and fate of each blastomere of the eight-cell sea urchin embryo." Genes Dev **1**(1): 75-85.
- Caneparo, L., Y. L. Huang, *et al.* (2007). "Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek." Genes Dev **21**(4): 465-80.
- Carroll K.N., T.A. Scully, *et al.* (2008). "Role of serotonin in sea urchin embryo morphogenesis." Dev Biol **319**(2): 520.

- Carroll, S.B., A. Laughon, *et al.* (1988). "Expression, function, and regulation of the hairy segmentation protein in the *Drosophila* embryo." Genes Dev **2**(7): 883-90.
- Chamorro, M.N., D.R. Schwartz, *et al.* (2005). "FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development." EMBO J **24**(1): 73-84.
- Chang J.T., N. Esumi, *et al.* (1999). "Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium." Hum Mol Genet **8**(4): 575-83.
- Chapman, E.R. (2002). "Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 498-508.
- Chin, E.R., E.N. Olson, *et al.* (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type." Genes Dev **12**(16): 2499-509.
- Cho, K.W., B. Blumberg, *et al.* (1991). "Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid." Cell **67**(6): 1111-20.
- Chu-Lagraff, Q., D.M. Wright, *et al.* (1991). "The prospero gene encodes a divergent homeodomain protein that controls neuronal identity in *Drosophila*." Development Suppl **2**: 79-85.
- Chung, Y.I., D.H. Park, *et al.* (2001). "Immunochemical characterization of brain and pineal tryptophan hydroxylase." J Korean Med Sci **16**(4): 489-97.
- Coffman, J.A. & D.R. McClay (1990). "A hyaline layer protein that becomes localized to the oral ectoderm and foregut of sea urchin embryos." Dev Biol **140**(1): 93-104.
- Corey, D.R. & J.M. Abrams (2001). "Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development." Genome Biol **2**(5): REVIEWS1015.
- Croce, J.C. & D.R. McClay (2006). "The canonical Wnt pathway in embryonic axis polarity." Semin Cell Dev Biol **17**(2): 168-74.
- Croce, J.C., S.Y. Wu, *et al.* (2006). "A genome-wide survey of the evolutionarily conserved Wnt pathways in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*." Dev Biol **300**(1): 121-31.
- Czihak, G. (1975). "The Sea Urchin Embryo, Biochemistry and Morphogenesis." Springer-Verlag, Berlin.
- Davidson, E.H. & D.H. Erwin (2006). "Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans." Science **311**(5762): 796-800.
- Davidson, E.H., K.J. Peterson, *et al.* (1995). "Origin of bilaterian body plans: evolution of developmental regulatory mechanisms." Science **270**(5240): 1319-25.
- Davidson, E.H., J.P. Rast, *et al.* (2002). "A genomic regulatory network for development." Science **295**(5560): 1669-78.

- Davidson, E.H., J.P. Rast, *et al.* (2002). "A provisional regulatory gene network for specification of endomesoderm in the sea urchin embryo." Dev Biol **246**(1): 162-90.
- Davidson, G., B. Mao, *et al.* (2002). "Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning." Development **129**(24): 5587-96.
- Davis, R.L., D.L. Turner, *et al.* (2001). "Molecular targets of vertebrate segmentation: two mechanisms control segmental expression of *Xenopus hairy2* during somite formation." Dev Cell **1**(4): 553-65.
- De Robertis, E.M., S. Kim, *et al.* (1997). "Patterning by genes expressed in Spemann's organizer." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **62**: 169-75.
- del Barco Barrantes, I., G. Davidson, *et al.* (2003). "Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction." Genes Dev **17**(18): 2239-44.
- del Barco Barrantes I., A. Montero-Pedrazuela, *et al.* (2006). "Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice." Mol Cell Biol **26**(6): 2317-26.
- Delling, U., J. Tureckova, *et al.* (2000). "A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression." Mol Cell Biol **20**(17): 6600-11.
- Diep, D.B., N. Hoen, *et al.* (2004). "Characterisation of the Wnt antagonists and their response to conditionally activated Wnt signalling in the developing mouse forebrain." Brain Res Dev Brain Res **153**(2): 261-70.
- Driesch, H. (1891). "Entwicklungsmechanische Studien. I. Der Wert der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Teil- und Doppelbindungen." Z wiss Zool **53**: 160-184.
- Du, S.J., S.M. Purcell, *et al.* (1995). "Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos." Mol Cell Biol **15**(5): 2625-34.
- Dunn, E.F., V.N. Moy, *et al.* (2007). "Molecular paleoecology: using gene regulatory analysis to address the origins of complex life cycles in the late Precambrian." Evol Dev **9**(1): 10-24.
- Dunn, C.W., A. Hejnal, *et al.* (2008). "Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life." Nature **452**(7188): 745-9.
- Eastman, Q. & R. Grosschedl (1999). "Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 233-40.
- Emily-Fenouil, F., C. Ghiglione, *et al.* (1998). "GSK3beta/shaggy mediates patterning along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo." Development **125**(13): 2489-98.
- Ettensohn, C.A. & D.R. McClay (1987). "A new method for isolating primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo. Panning on wheat germ agglutinin-coated dishes." Exp Cell Res **168**(2): 431-8.

- Ettensohn, C.A. & H.C. Sweet (2000). "Patterning the early sea urchin embryo." Curr Top Dev Biol **50**: 1-44.
- Fanto, M., U. Weber, *et al.* (2000). "Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the Drosophila eye." Curr Biol **10**(16): 979-88.
- Fedders, H., R. Augustin, *et al.* (2004). "A Dickkopf-3-related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan Hydra." Dev Genes Evol **214**(2): 72-80.
- Fedi, P., A. Bafico, *et al.* (1999). "Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling." J Biol Chem **274**(27): 19465-72.
- Felsenstein, J. (1992). "Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method." Genet Res **60**(3): 209-20.
- Finch, P.W., X. He, *et al.* (1997). "Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6770-5.
- Fink, R.D. & D.R. McClay (1985). "Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells." Dev Biol **107**(1): 66-74.
- Finocchiaro, L.M., E.S. Arzt, *et al.* (1988). "Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway." J Interferon Res **8**(6): 705-16.
- Fischer, H. (1971). „Vergleichende Pharmakologie von Überträgersubstanzen in tiersystematischer Darstellung.“ Springer Verlag, Berlin.
- Fisher, A. & M. Caudy (1998). "The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions." Bioessays **20**(4): 298-306.
- Flowers, V.L., G.R. Courteau, *et al.* (2004). "Nodal/activin signaling establishes oral-aboral polarity in the early sea urchin embryo." Dev Dyn **231**(4): 727-40.
- Ghiglione, C., G. Lhomond, *et al.* (1993). "Cell-autonomous expression and position-dependent repression by Li⁺ of two zygotic genes during sea urchin early development." Embo J **12**(1): 87-96.
- Gilbert, S.F. (1994). "Developmental Biology." 4th Edition Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Gilbert, S.F. (2000). "Developmental Biology." 6th Edition Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Gilbert, S.F. (2003). "Developmental Biology." 7th Edition Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.

- Gilbert, S.F. & L. Saxen (1993). "Spemann's organizer: models and molecules." Mech Dev **41**(2-3): 73-89.
- Glasgow, E. & S.I. Tomarev (1998). "Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish." Mech Dev **76**(1-2): 175-8.
- Glinka, A., W. Wu, *et al.* (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." Nature **391**(6665): 357-62.
- Grotewold, L., T. Theil, *et al.* (1999). "Expression pattern of *Dkk-1* during mouse limb development." Mech Dev **89**(1-2): 151-3.
- Guder, C., S. Pinho, *et al.* (2006). "An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra." Development **133**(5): 901-11.
- Habas, R., Y. Kato, *et al.* (2001). "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein *Daam1*." Cell **107**(7): 843-54.
- Hackam, A.S., R. Strom, *et al.* (2004). "Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the *rd1* mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(9): 2929-42.
- Hamada, F., Y. Tomoyasu, *et al.* (1999). "Negative regulation of Wingless signaling by D-axin, a *Drosophila* homolog of axin." Science **283**(5408): 1739-42.
- Hamalainen M. & J. Kohonen (1989). „Studies on the effect of monoamine antagonists on the morphogenesis of the newt." Int J Dev Biol **33**(1):157-63.
- Hardin, J. (1996). "The cellular basis of sea urchin gastrulation." Curr Top Dev Biol **33**: 159-262.
- Hardin, J., J.A. Coffman, *et al.* (1992). "Commitment along the dorsoventral axis of the sea urchin embryo is altered in response to NiCl_2 ." Development **116**(3): 671-85.
- Harfe, B.D. & A. Fire (1998). "Muscle and nerve-specific regulation of a novel NK-2 class homeodomain factor in *Caenorhabditis elegans*." Development **125**(3): 421-9.
- Harland, R. & J. Gerhart (1997). "Formation and function of Spemann's organizer." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 611-67.
- Hashimoto, H., M. Itoh, *et al.* (2000). "Zebrafish *Dkk1* functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation." Dev Biol **217**(1): 138-52.
- Hashimoto, H., T. Yabe, *et al.* (2000). "Expression of the zinc finger gene *fez-like* in zebrafish forebrain." Mech Dev **97**(1-2): 191-5.
- Haworth K.E. & B. Latinkic (2009). "Expression of *Xenopus tropicalis* HNF6/Onecut-1." Int J Dev Biol **53**(1): 159-62.

- Heisenberg, C. P., M. Tada, *et al.* (2000). "Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation." Nature **405**(6782): 76-81.
- Hertwig, O. (1876). "Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Teilung des tierischen Eies." Gegenbaurs morphol Jahrb **1**: 374-434.
- Hinman, V.F. & E.H. Davidson (2007). "Evolutionary plasticity of developmental gene regulatory network architecture." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19404-9.
- Hinman, V.F., A. Nguyen, *et al.* (2007). "Caught in the evolutionary act: precise cis-regulatory basis of difference in the organization of gene networks of sea stars and sea urchins." Dev Biol **312**(2): 584-95.
- Hörstadius, S. (1939). "The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods." Biol Rev **14**: 132-179.
- Holland, J.M. (1976). "Serotonin deficiency and prolonged bleeding in beige mice." Proc Soc Exp Biol Med **151**(1): 32-9.
- Hong, S.K., C.H. Kim, *et al.* (2002). "Isolation and expression of a novel neuron-specific onecut homeobox gene in zebrafish." Mech Dev **112**(1-2): 199-202.
- Howard, E.W., L.A. Newman, *et al.* (2001). "SpKrl: a direct target of beta-catenin regulation required for endoderm differentiation in sea urchin embryos." Development **128**(3): 365-75.
- Howard-Ashby, M., S.C. Materna, *et al.* (2006). "Identification and characterization of homeobox transcription factor genes in *Strongylocentrotus purpuratus*, and their expression in embryonic development." Dev Biol **300**(1): 74-89.
- Howe, L.R., O. Watanabe, *et al.* (2003). "Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation." Cancer Res **63**(8): 1906-13.
- Hoyer, D., D.E. Clarke, *et al.* (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev **46**(2): 157-203.
- Hoyer, D. & G. Martin (1997). "5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome." Neuropharmacology **36**(4-5): 419-28.
- Hu, E., Y. Zhu, *et al.* (1998). "Tissue restricted expression of two human Frzbs in preadipocytes and pancreas." Biochem Biophys Res Commun **247**(2): 287-93.
- Huang, L., X. Li, *et al.* (2000). "Involvement of Tcf/Lef in establishing cell types along the animal-vegetal axis of sea urchins." Dev Genes Evol **210**(2): 73-81.
- Huelsken, J. & W. Birchmeier (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." Curr Opin Genet Dev **11**(5): 547-53.
- Hufton A., S. Mathia, *et al.* (2009). "Deeply conserved chordate regulatory sequences preserve genome synteny but do not drive gene duplicate retention." Submitted.

- Humphrey, P.P., P. Hartig, *et al.* (1993). "A proposed new nomenclature for 5-HT receptors." Trends Pharmacol Sci **14**(6): 233-236.
- Hwang, S.G., S.S. Yu, *et al.* (2005). "Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway." FEBS Lett **579**(21): 4837-42.
- Idkowiak, J., G. Weisheit, *et al.* (2004). "Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo." Dev Genes Evol **214**(12): 591-605.
- Imai, K., N. Takada, *et al.* (2000). "(beta)-catenin mediates the specification of endoderm cells in ascidian embryos." Development **127**(14): 3009-20.
- Imai, K.S., K. Hino, *et al.* (2004). "Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks." Development **131**(16): 4047-58.
- Izpisua-Belmonte, J.C., E.M. De Robertis, *et al.* (1993). "The homeobox gene gooseoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm." Cell **74**(4): 645-59.
- Jaspard, B., T. Couffignal, *et al.* (2000). "Expression pattern of mouse sFRP-1 and mWnt-8 gene during heart morphogenesis." Mech Dev **90**(2): 263-7.
- Jouve, C., I. Palmeirim, *et al.* (2000). "Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm." Development **127**(7): 1421-9.
- Kaneko, K.J. & M.L. DePamphilis (2000). "Soggy, a spermatocyte-specific gene, lies 3.8 kb upstream of and antipodal to TEAD-2, a transcription factor expressed at the beginning of mouse development." Nucleic Acids Res **28**(20): 3982-90.
- Katoh, Y. & M. Katoh (2005). "Comparative genomics on DKK2 and DKK4 orthologs." Int J Mol Med **16**(3): 477-81.
- Kawakami, K., H. Ohto, *et al.* (1996). "Identification and expression of six family genes in mouse retina." FEBS Lett **393**(2-3): 259-63.
- Kawano, Y. & R. Kypta (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2627-34.
- Kazanskaya, O., A. Glinka, *et al.* (2000). "The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning." Development **127**(22): 4981-92.
- Kilian, B., H. Mansukoski, *et al.* (2003). "The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation." Mech Dev **120**(4): 467-76.
- Kim, J.S., H. Crooks, *et al.* (2002). "Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells." Cancer Res **62**(10): 2744-8.
- Kohn, A.D. & R.T. Moon (2005). "Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways." Cell Calcium **38**(3-4): 439-46.

- Kohn, M.J., K.J. Kaneko, *et al.* (2005). "DkkL1 (Soggy), a Dickkopf family member, localizes to the acrosome during mammalian spermatogenesis." Mol Reprod Dev **71**(4): 516-22.
- Kozmik, Z., N.D. Holland, *et al.* (1999). "Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region." Development **126**(6): 1295-304.
- Krauss, S., T. Johansen, *et al.* (1991). "Expression of the zebrafish paired box gene *pax[zf-b]* during early neurogenesis." Development **113**(4): 1193-206.
- Krupnik, V.E., J.D. Sharp, *et al.* (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." Gene **238**(2): 301-13.
- Kuhl, M. (2004). "The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements." Front Biosci **9**: 967-74.
- Kuhl, M., L.C. Sheldahl, *et al.* (2000). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*." J Biol Chem **275**(17): 12701-11.
- Kuhl, M., L.C. Sheldahl, *et al.* (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." Trends Genet **16**(7): 279-83.
- Kuhl, M. & D. Wedlich (1997). "Wnt signalling goes nuclear." Bioessays **19**(2): 101-4.
- Kühn, A. (2005). "Klonierung und Charakterisierung von Dickkopf im Seeigel: der Kopfforganisator in einem kopflosen Tier."
- Landry, C., F. Clotman, *et al.* (1997). "HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors." Dev Biol **192**(2): 247-57.
- Lee, H.H. & M. Frasch (2004). "Survey of forkhead domain encoding genes in the *Drosophila* genome: Classification and embryonic expression patterns." Dev Dyn **229**(2): 357-66.
- Leppert, G.S., J.M. Yang, *et al.* (1999). "Sequence and location of SIX3, a homeobox gene expressed in the human eye." Ophthalmic Genet **20**(1): 7-21.
- Leve, C., M. Gajewski, *et al.* (2001). "Homologues of *c-hairy1* (*her9*) and *lunatic fringe* in zebrafish are expressed in the developing central nervous system, but not in the presomitic mesoderm." Dev Genes Evol **211**(10): 493-500.
- Leyns, L., T. Bouwmeester, *et al.* (1997). "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer." Cell **88**(6): 747-56.
- Li, L., J. Mao, *et al.* (2002). "Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled." J Biol Chem **277**(8): 5977-81.

- Li, X., C.K. Chuang, *et al.* (1997). "Two Otx proteins generated from multiple transcripts of a single gene in *Strongylocentrotus purpuratus*." Dev Biol **187**(2): 253-66.
- Livi, C.B. & E.H. Davidson (2006). "Expression and function of blimp1/krox, an alternatively transcribed regulatory gene of the sea urchin endomesoderm network." Dev Biol **293**(2): 513-25.
- Livi, C.B. & E.H. Davidson (2007). "Regulation of spblimp1/krox1a, an alternatively transcribed isoform expressed in midgut and hindgut of the sea urchin gastrula." Gene Expr Patterns **7**(1-2): 1-7.
- Logan, C.Y., J.R. Miller, *et al.* (1999). "Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo." Development **126**(2): 345-57.
- Loots, G.G. & I. Ovcharenko (2004). "rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W217-21.
- Lustig, B. & J. Behrens (2003). "The Wnt signaling pathway and its role in tumor development." J Cancer Res Clin Oncol **129**(4): 199-221.
- Makabe, K.W., C.V. Kirchhamer, *et al.* (1995). "Cis-regulatory control of the SM50 gene, an early marker of skeletogenic lineage specification in the sea urchin embryo." Development **121**(7): 1957-70.
- Mangold, O. (1933). "Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen." Naturwissenschaften **21**: 761-766.
- Mankoo, B.S., N.S. Collins, *et al.* (1999). "Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development." Nature **400**(6739): 69-73.
- Mao, B. & C. Niehrs (2003). "Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling." Gene **302**(1-2): 179-83.
- Mao, B., W. Wu, *et al.* (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." Nature **411**(6835): 321-5.
- Massague, J., J. Seoane, *et al.* (2005). "Smad transcription factors." Genes Dev **19**(23): 2783-810.
- Matsuo-Takasaki, M., J.H. Lim, *et al.* (2000). "Cloning and expression of a novel zinc finger gene, Fez, transcribed in the forebrain of *Xenopus* and mouse embryos." Mech Dev **93**(1-2): 201-4.
- Matsuyama, M., S. Aizawa, *et al.* (2009). "Sfrp controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium." PLoS Genet **5**(3): e1000427.
- Mazet, F., J.A. Hutt, *et al.* (2003). "Pax gene expression in the developing central nervous system of *Ciona intestinalis*." Gene Expr Patterns **3**(6): 743-5.
- McClay, D.R. (1996). "Sea urchin embryology course manual."

- McClay, D.R. (2000). "Specification of endoderm and mesoderm in the sea urchin." Zygote **8 Suppl 1**: S41.
- McClay, D.R. & R.B. Marchase (1979). "Separation of ectoderm and endoderm from sea urchin pluteus larvae and demonstration of germ layer-specific antigens." Dev Biol **71**(2): 289-96.
- Meijer, L., A.L. Skaltsounis, *et al.* (2003). "GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins." Chem Biol **10**(12): 1255-66.
- Mikels, A.J. & R. Nusse (2006). "Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context." PLoS Biol **4**(4): e115.
- Miklos, G.L. & G.M. Rubin (1996). "The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms." Cell **86**(4): 521-9.
- Minguillon, C. & J. Garcia-Fernandez (2002). "The single amphioxus Mox gene: insights into the functional evolution of Mox genes, somites, and the asymmetry of amphioxus somitogenesis." Dev Biol **246**(2): 455-65.
- Minguillon, C., S. Jimenez-Delgado, *et al.* (2003). "The amphioxus Hairy family: differential fate after duplication." Development **130**(24): 5903-14.
- Minokawa, T., J.P. Rast, *et al.* (2004). "Expression patterns of four different regulatory genes that function during sea urchin development." Gene Expr Patterns **4**(4): 449-56.
- Minokawa, T., A.H. Wikramanayake, *et al.* (2005). "cis-Regulatory inputs of the wnt8 gene in the sea urchin endomesoderm network." Dev Biol **288**(2): 545-58.
- Mizuno, N., M. Mochii, *et al.* (1999). "Pax-6 and Prox 1 expression during lens regeneration from Cynops iris and Xenopus cornea: evidence for a genetic program common to embryonic lens development." Differentiation **65**(3): 141-9.
- Monaghan, A.P., P. Kioschis, *et al.* (1999). "Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages." Mech Dev **87**(1-2): 45-56.
- Moore, A.W., S. Barbel, *et al.* (2000). "A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10436-41.
- Moses, K., M.C. Ellis, *et al.* (1989). "The glass gene encodes a zinc-finger protein required by Drosophila photoreceptor cells." Nature **340**(6234): 531-6.
- Müller, F., D.W. Williams, *et al.* (1997). Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoters in zebrafish embryos. Mol Reprod Dev **47**(4): 404-412.
- Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, *et al.* (2001). "Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse." Dev Cell **1**(3): 423-34.
- Murphy, D.B., S. Seemann, *et al.* (1997). "The human hepatocyte nuclear factor 3/fork head gene FKHL13: genomic structure and pattern of expression." Genomics **40**(3): 462-9.

- Nakajima, Y., R.D. Burke, *et al.* (1993). „The structure and development of the apical ganglion in the sea urchin pluteus larvae of *S. droebachiensis* and *M. globulus*”. Develop Growth Differ **35**, 531–538.
- Nakajima, Y., H. Kaneko, *et al.* (2004). "Divergent patterns of neural development in larval echinoids and asteroids." Evol Dev **6**(2): 95-104.
- Naya, F.J., B. Mercer, *et al.* (2000). "Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo." J Biol Chem **275**(7): 4545-8.
- Nebigil, C.G., D.S. Choi, *et al.* (2000). "Serotonin 2B receptor is required for heart development." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9508-13.
- Nemer, M. (1986). "An altered series of ectodermal gene expressions accompanying the reversible suspension of differentiation in the zinc-animalized sea urchin embryo." Dev Biol **114**(1): 214-24.
- Nguyen, D.N., M. Rohrbaugh, *et al.* (2000). "The *Drosophila* homolog of *Onecut* homeodomain proteins is a neural-specific transcriptional activator with a potential role in regulating neural differentiation." Mech Dev **97**(1-2): 57-72.
- Niehrs, C. (2004). "Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer." Nat Rev Genet **5**(6): 425-34.
- Niehrs, C., O. Kazanskaya, *et al.* (2001). "Dickkopf1 and the Spemann-Mangold head organizer." Int J Dev Biol **45**(1): 237-40.
- Nieto, M.A. (1999). "Reorganizing the organizer 75 years on." Cell **98**(4): 417-25.
- Niida, A., T. Hiroko, *et al.* (2004). "DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway." Oncogene **23**(52): 8520-6.
- Oliver, G., A. Mailhos, *et al.* (1995). "Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development." Development **121**(12): 4045-55.
- Oliver, G., B. Sosa-Pineda, *et al.* (1993). "Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development." Mech Dev **44**(1): 3-16.
- Oliveri, P., D. M. Carrick, *et al.* (2002). "A regulatory gene network that directs micromere specification in the sea urchin embryo." Dev Biol **246**(1): 209-28.
- Oliveri, P., E.H. Davidson, *et al.* (2003). "Activation of *pmar1* controls specification of micromeres in the sea urchin embryo." Dev Biol **258**(1): 32-43.
- Oliveri, P., Q. Tu, *et al.* (2008). "Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(16): 5955-62.
- Ormsbee, H.S., 3rd & J.D. Fondacaro (1985). "Action of serotonin on the gastrointestinal tract." Proc Soc Exp Biol Med **178**(3): 333-8.
- Otim, O., G. Amore, *et al.* (2004). "SpHnf6, a transcription factor that executes multiple functions in sea urchin embryogenesis." Dev Biol **273**(2): 226-43.

- Palmeirim, I., D. Henrique, *et al.* (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." Cell **91**(5): 639-48.
- Pasini, A., D. Henrique, *et al.* (2001). "The zebrafish Hairy/Enhancer-of-split-related gene *her6* is segmentally expressed during the early development of hindbrain and somites." Mech Dev **100**(2): 317-21.
- Pelletier, G.J., S.L. Brody, *et al.* (1998). "A human forkhead/winged-helix transcription factor expressed in developing pulmonary and renal epithelium." Am J Physiol **274**(3 Pt 1): L351-9.
- Peng, G. & M. Westerfield (2006). "Lhx5 promotes forebrain development and activates transcription of secreted Wnt antagonists." Development **133**(16): 3191-200.
- Pera, E.M. & M. Kessel (1997). "Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate." Development **124**(20): 4153-62.
- Perriere, G. & M. Gouy (1996). "WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks." Biochimie **78**(5): 364-9.
- Pezeron, G., I. Anselme, *et al.* (2006). "Duplicate *sfrp1* genes in zebrafish: *sfrp1a* is dynamically expressed in the developing central nervous system, gut and lateral line." Gene Expr Patterns **6**(8): 835-42.
- Piccolo, S., E. Agius, *et al.* (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." Nature **397**(6721): 707-10.
- Piccolo, S., Y. Sasai, *et al.* (1996). "Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4." Cell **86**(4): 589-98.
- Pilcher, K.E. & P.A. Krieg (2002). "Expression of the Wnt inhibitor, sFRP5, in the gut endoderm of *Xenopus*." Gene Expr Patterns **2**(3-4): 369-72.
- Pinho, S. & C. Niehrs (2007). "Dkk3 is required for TGF-beta signaling during *Xenopus* mesoderm induction." Differentiation **75**(10): 957-67.
- Pohl, B.S. & W. Knochel (2004). "Isolation and developmental expression of *Xenopus* FoxJ1 and FoxK1." Dev Genes Evol **214**(4): 200-5.
- Poustka, A.J., D. Groth, *et al.* (2003). "Generation, annotation, evolutionary analysis, and database integration of 20,000 unique sea urchin EST clusters." Genome Res **13**(12): 2736-46.
- Poustka, A.J., A. Kuhn, *et al.* (2007). "A global view of gene expression in lithium and zinc treated sea urchin embryos: new components of gene regulatory networks." Genome Biol **8**(5): R85.
- Poustka, A.J., A. Kuhn, *et al.* (2004). "On the origin of the chordate central nervous system: expression of *onecut* in the sea urchin embryo." Evol Dev **6**(4): 227-36.

- Rallis, C., D. Stamatakis, *et al.* (2001). "Isolation of the avian homologue of the homeobox gene *Mox2* and analysis of its expression pattern in developing somites and limbs." *Mech Dev* **104**(1-2): 121-4.
- Ransick, A. & E.H. Davidson (1993). "A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo." *Science* **259**(5098): 1134-8.
- Rapport, M.M., A.A. Green, *et al.* (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization." *J Biol Chem* **176**(3): 1243-51.
- Rast, J.P., R.A. Cameron, *et al.* (2002). "brachyury Target genes in the early sea urchin embryo isolated by differential macroarray screening." *Dev Biol* **246**(1): 191-208.
- Rausa, F., U. Samadani, *et al.* (1997). "The cut-homeodomain transcriptional activator HNF-6 is coexpressed with its target gene HNF-3 beta in the developing murine liver and pancreas." *Dev Biol* **192**(2): 228-46.
- Rentzsch, F., J.H. Fritzenwanker, *et al.* (2008). "FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*." *Development* **135**(10): 1761-9.
- Revilla-i-Domingo, R., P. Oliveri, *et al.* (2007). "A missing link in the sea urchin embryo gene regulatory network: *hesC* and the double-negative specification of micromeres." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30): 12383-8.
- Ribeiro, L.A., K.B. El-Jaick, *et al.* (2006). "SIX3 mutations with holoprosencephaly." *Am J Med Genet A* **140**(23): 2577-83.
- Röttiger, E., J. Croce, *et al.* (2006). "Nemo-like kinase (NLK) acts downstream of Notch/Delta signalling to downregulate TCF during mesoderm induction in the sea urchin embryo." *Development* **133**(21): 4341-53.
- Rothbacher, U. & P. Lemaire (2002). "Creme de la Kremen of Wnt signalling inhibition." *Nat Cell Biol* **4**(7): E172-3.
- Ruffins, S.W. & C.A. Etensohn (1996). "A fate map of the vegetal plate of the sea urchin (*Lytechinus variegatus*) mesenchyme blastula." *Development* **122**(1): 253-63.
- Saitou, N. & M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* **4**(4): 406-25.
- Saneyoshi, T., S. Kume, *et al.* (2002). "The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos." *Nature* **417**(6886): 295-9.
- Sasai, Y., R. Kageyama, *et al.* (1992). "Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split." *Genes Dev* **6**(12B): 2620-34.

- Sasakura, Y. & K.W. Makabe (2001). "A gene encoding a new ONECUT class homeodomain protein in the ascidian *Halocynthia roretzi* functions in the differentiation and specification of neural cells in ascidian embryogenesis." Mech Dev **104**(1-2): 37-48.
- Scully T.A., K.N. Carroll, *et al.* (2008). "Serotonin synthesis is necessary for gastrulation in the sea urchin, *Lytechinus pictus*." Dev Biol **319**(2): 520.
- Semenov, M.V., K. Tamai, *et al.* (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." Curr Biol **11**(12): 951-61.
- Seo, H.C., Drivenes, *et al.* (1998). "Expression of two zebrafish homologues of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia." Mech Dev **73**(1): 45-57.
- Sheldahl, L.C., M. Park, *et al.* (1999). "Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner." Curr Biol **9**(13): 695-8.
- Sethi A.J., R.C. Angerer, *et al.* (2009). "Gene regulatory network interactions in sea urchin endomesoderm induction." PLoS Biol **7**(2): e1000029.
- Shepherd, G.W., E. Rondinelli, *et al.* (1983). "Differences in abundance of individual RNAs in normal and animalized sea urchin embryos." Dev Biol **96**(2): 520-8.
- Sherwood, D.R. & D.R. McClay (1999). "LvNotch signaling mediates secondary mesenchyme specification in the sea urchin embryo." Development **126**(8): 1703-13.
- Shi, Y., Y.F. Wang, *et al.* (1998). "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling." Cell **94**(5): 585-94.
- Shih, J. & S.E. Fraser (1996). "Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage." Development **122**(4): 1313-22.
- Shinya, M., C. Eschbach, *et al.* (2000). "Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate." Mech Dev **98**(1-2): 3-17.
- Shou, J., F. Ali-Osman, *et al.* (2002). "Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA." Oncogene **21**(6): 878-89.
- Sidow, A. (1996). "Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates." Curr Opin Genet Dev **6**(6): 715-22.
- Siegel, G.J., B.W. Agranoff, *et al.* (1994). "Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects." 6th Edition American Society for Neurochemistry, Philadelphia, PA.
- Slusarski, D.C., V.G. Corces, *et al.* (1997). "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling." Nature **390**(6658): 410-3.

- Smith, A.B. (2008). "Deuterostomes in a twist: the origins of a radical new body plan." Evol Dev **10**(4): 493-503.
- Smith, J. (2008). "A protocol describing the principles of cis-regulatory analysis in the sea urchin." Nat Protoc **3**(4): 710-8.
- Smith, J. & E.H. Davidson (2008). "A new method, using cis-regulatory control, for blocking embryonic gene expression." Dev Biol **318**(2): 360-5.
- Smith, J., E. Kraemer, *et al.* (2008). "A spatially dynamic cohort of regulatory genes in the endomesodermal gene network of the sea urchin embryo." Dev Biol **313**(2): 863-75.
- Smith, J., C. Theodoris, *et al.* (2007). "A gene regulatory network subcircuit drives a dynamic pattern of gene expression." Science **318**(5851): 794-7.
- Smith T.A. (1971). "The occurrence, metabolism and functions of amines in plants." Biol Rev Camb Philos Soc **46**(2): 201-41.
- Sodergren, E., G.M. Weinstock, *et al.* (2006). "The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*." Science **314**(5801): 941-52.
- Spemann, H. (1931). "Über den Anteil von Implantat und Wirtskeim an der Orientierung und Beschaffenheit der induzierten Embryonalanlage." Entwicklungsmech Org **123**: 390-517.
- Spemann, H. & H. Mangold (1924). "Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species." In B.H. Willier and J.M. Oppenheimer (eds.), *Foundations of Experimental Embryology*. Hafner, New York, pp. 144-184.
- Strausberg, R.L., E.A. Feingold, *et al.* (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16899-903.
- Sweet H.C., P.G. Hodor, *et al.* (1999). "The role of micromere signaling in Notch activation and mesoderm specification during sea urchin embryogenesis." Development **126**(23): 5255-5265.
- Sweet, H.C., M. Gehring, *et al.* (2002). "LvDelta is a mesoderm-inducing signal in the sea urchin embryo and can endow blastomeres with organizer-like properties." Development **129**(8): 1945-55.
- Takacs, C.M., G. Amore, *et al.* (2004). "Expression of an NK2 homeodomain gene in the apical ectoderm defines a new territory in the early sea urchin embryo." Dev Biol **269**(1): 152-64.
- Tamai, K., M. Semenov, *et al.* (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." Nature **407**(6803): 530-5.
- Tamai, K., X. Zeng, *et al.* (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." Mol Cell **13**(1): 149-56.

- Tanis, J.E., J.J. Moresco, *et al.* (2008). "Regulation of serotonin biosynthesis by the G proteins Galphao and Galphaq controls serotonin signaling in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **178**(1): 157-69.
- Tendeng, C. & C. Houart (2006). "Cloning and embryonic expression of five distinct *sfrp* genes in the zebrafish *Danio rerio*." Gene Expr Patterns **6**(8): 761-71.
- Thomas, P. & R. Beddington (1996). "Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo." Curr Biol **6**(11): 1487-96.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, *et al.* (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res **25**(24): 4876-82.
- Tomarev, S.I., O. Sundin, *et al.* (1996). "Chicken homeobox gene *Prox 1* related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina." Dev Dyn **206**(4): 354-67.
- Tomarev, S.I., R.D. Zinovieva, *et al.* (1998). "Characterization of the mouse *Prox1* gene." Biochem Biophys Res Commun **248**(3): 684-9.
- Travis, A., A. Amsterdam, *et al.* (1991). "LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]." Genes Dev **5**(5): 880-94.
- Turbeville, J.M., J.R. Schulz, *et al.* (1994). "Deuterostome phylogeny and the sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology." Mol Biol Evol **11**(4): 648-55.
- Twarog, B.M. & I.H. Page (1953). "Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination." Am J Physiol **175**(1): 157-61.
- Vaessin, H., E. Grell, *et al.* (1991). "*prospero* is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*." Cell **67**(5): 941-53.
- Veeman, M.T., J.D. Axelrod, *et al.* (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." Dev Cell **5**(3): 367-77.
- Vesela, J., P. Rehak, *et al.* (2003). "Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos." Physiol Res **52**(2): 223-8.
- Vonica, A., W. Weng, *et al.* (2000). "TCF is the nuclear effector of the beta-catenin signal that patterns the sea urchin animal-vegetal axis." Dev Biol **217**(2): 230-43.
- Walldorf, U., A. Kiewe, *et al.* (2000). "Homeobrain, a novel paired-like homeobox gene is expressed in the *Drosophila* brain." Mech Dev **96**(1): 141-4.
- Wallingford, J.B., S.E. Fraser, *et al.* (2002). "Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development." Dev Cell **2**(6): 695-706.

- Wallis, D.E., E. Roessler, *et al.* (1999). "Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly." Nat Genet **22**(2): 196-8.
- Walther, D.J., J.U. Peter, *et al.* (2003). "Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform." Science **299**(5603): 76.
- Walton, K.D., J.C. Croce, *et al.* (2006). "Genomics and expression profiles of the Hedgehog and Notch signaling pathways in sea urchin development." Dev Biol **300**(1): 153-64.
- Wang, D.G., R.J. Britten, *et al.* (1995). "Maternal and embryonic provenance of a sea urchin embryo transcription factor, SpZ12-1." Mol Mar Biol Biotechnol **4**(2): 148-53.
- Wang, H.Y. & C.C. Malbon (2003). "Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions." Science **300**(5625): 1529-30.
- Wang, J., J. Shou, *et al.* (2000). "Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53." Oncogene **19**(14): 1843-8.
- Wang, S., M. Krinks, *et al.* (1997). "Frzb-1, an antagonist of Wnt-1 and Wnt-8, does not block signaling by Wnts -3A, -5A, or -11." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 502-4.
- Wei, Z., R.C. Angerer, *et al.* (2006). "A database of mRNA expression patterns for the sea urchin embryo." Dev Biol **300**(1): 476-84.
- Wei, Z., J. Yaguchi, *et al.* (2009). "The sea urchin animal pole domain is a Six3-dependent neurogenic patterning center." Development **136**(7): 1179-89.
- Wessel, G.M. & D.R. McClay (1987). "Gastrulation in the sea urchin embryo requires the deposition of crosslinked collagen within the extracellular matrix." Dev Biol **121**(1): 149-65.
- Wikramanayake, A.H., B.P. Brandhorst, *et al.* (1995). "Autonomous and non-autonomous differentiation of ectoderm in different sea urchin species." Development **121**(5): 1497-505.
- Wikramanayake, A.H., L. Huang, *et al.* (1998). "beta-Catenin is essential for patterning the maternally specified animal-vegetal axis in the sea urchin embryo." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9343-8.
- Wikramanayake, A.H., R. Peterson, *et al.* (2004). "Nuclear beta-catenin-dependent Wnt8 signaling in vegetal cells of the early sea urchin embryo regulates gastrulation and differentiation of endoderm and mesodermal cell lineages." Genesis **39**(3): 194-205.
- Winklbauer, R., A. Medina, *et al.* (2001). "Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation." Nature **413**(6858): 856-60.
- Winter, C.G., B. Wang, *et al.* (2001). "Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton." Cell **105**(1): 81-91.

- Witte, F., J. Dokas, *et al.* (2009). "Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation." Gene Expr Patterns **9**(4): 215-23.
- Wodarz, A. & R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 59-88.
- Wong, G.T., B.J. Gavin, *et al.* (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." Mol Cell Biol **14**(9): 6278-86.
- Woolfe, A., M. Goodson, *et al.* (2005). "Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development." PLoS Biol **3**(1): e7.
- Wray, G.A. & D.R. McClay (1988). "The origin of spicule-forming cells in a 'primitive' sea urchin (*Eucidaris tribuloides*) which appears to lack primary mesenchyme cells." Development **103**(2): 305-15.
- Wu, W., A. Glinka, *et al.* (2000). "Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling." Curr Biol **10**(24): 1611-4.
- Xu, C., R.C. Kauffmann, *et al.* (2000). "Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye." Cell **103**(1): 87-97.
- Yaguchi, S., K. Kanoh, *et al.* (2000). "Initial analysis of immunochemical cell surface properties, location and formation of the serotonergic apical ganglion in sea urchin embryos." Dev Growth Differ **42**(5): 479-88.
- Yaguchi, S. & H. Katow (2003). "Expression of tryptophan 5-hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior." J Comp Neurol **466**(2): 219-29.
- Yaguchi, S., J. Yaguchi, *et al.* (2006). "Specification of ectoderm restricts the size of the animal plate and patterns neurogenesis in sea urchin embryos." Development **133**(12): 2337-46.
- Yaguchi, S., J. Yaguchi, *et al.* (2007). "Sp-Smad2/3 mediates patterning of neurogenic ectoderm by nodal in the sea urchin embryo." Dev Biol **302**(2): 494-503.
- Yaguchi, S., J. Yaguchi, *et al.* (2008). "A Wnt-FoxQ2-nodal pathway links primary and secondary axis specification in sea urchin embryos." Dev Cell **14**(1): 97-107.
- Yang-Snyder, J., J.R. Miller, *et al.* (1996). "A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway." Curr Biol **6**(10): 1302-6.
- Yu, J.K., N.D. Holland, *et al.* (2003). "AmphiFoxQ2, a novel winged helix/forkhead gene, exclusively marks the anterior end of the amphioxus embryo." Dev Genes Evol **213**(2): 102-5.
- Yu, J.K., Y. Satou, *et al.* (2007). "Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer." Nature **445**(7128): 613-7.

- Zaffran, S., G. Das, *et al.* (2000). "The NK-2 homeobox gene *scro* is expressed in pharynx, ventral nerve cord and brain of *Drosophila* embryos." Mech Dev **94**(1-2): 237-41.
- Zhou, S., L. Zawal, *et al.* (1998). "Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer." Mol Cell **2**(1): 121-7.
- Zoltewicz, J.S. & J.C. Gerhart (1997). "The Spemann organizer of *Xenopus* is patterned along its anteroposterior axis at the earliest gastrula stage." Dev Biol **192**(2): 482-91.
- Zorn, A.M. (2001). "Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs." Curr Biol **11**(15): R592-5.
- Zuber, M.E., M. Perron, *et al.* (1999). "Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2." Cell **98**(3): 341-52.

7. Anhang

7.1 Proteinsequenzen und Datenbank-Zugriffsnummern

Proteinsequenzen

Proteinsequenz SpDkk1

MAAPSAILKYLLSVLVLCYVLFFAVPSQGIYIKDRSSRQRGSERTRGRDNPGDDTSVEER
 RREPFTRTLVL**CEADRECPYKYYCHSGEGHK****SCLRCRKSHRCHR****NKMCCQGN****TCVDG**
RCIPHQFRFDEAYNTAVQNFESEVNEEEESILQDTKFKLRKARQGEQ**CSSSVSCEDGL**
CCAQHLWSKMCKPML**EEDI****CTKKRDRLTDVFQ****RCECSQGLSCKRDSV****PERRLHVCQA**
 VKHRSSGTSTERGGGEGAAQGETLSQRERLLSLPVEKIRPLPSKNDGDLGLYLSAESG
 EKLFDLAGRGERWMMGRSAEKLKGTAYRDTTEITRTEQADIEASQLTVL*

Proteinsequenz SpDkk3

MVRIMDTVILCVFALLTVVIDDANAYMWNNMWSGTHPQGRAPPEMVNDGPVNNGDLER
 EHPRNIQARLLLNETEARYYQDL**PCDSKMCGRGRFCDLHYGGCHRHRQ****PGHQCRDG**
HCQKGHDCMFGTCRATI**PERTLGARCRNNKDCSHNMCCA****KQHGESVCKQKLPLQAKCF**
IPGGIEYVIDTMCPCEEGLVCSETV**VMKREQEFVLRFWTDEGHMRCQAR***

Unterstrichen: N-terminale Signalsequenz; Fett: Dickkopf- bzw. Colipase-Domäne

Datenbank-Zugriffsnummern

HsDkk1 AAH01539; HsDkk2 AAH75077; HsDkk3 AAH07660; HsDkk4 AAF02677;
 HsSoggy Q9UK85; MmDkk1 AAH50189; MmDkk2 AAH96448; MmDkk3 AAH50934;
 MmDkk4 AAH18400; MmSoggy AAG21340; GgDkk3 NP_990456; XIDkk2 CAC17185;
 DrDkk1 AAI24129; CiDkk3 AK113327; BfDkk1 ABG34307; PIDkk1 Contig2966
 (<http://goblet.molgen.mpg.de/cgi-bin/webapps/paracentrotus2008.cgi>)

7.2 Klon-Liste für WISH-Sonden / Sequenz-IDs

Klon-ID	Gen	Glean3-ID	Info*
537REA_16I24	<i>SpAadc</i>	GLEAN3_19398	EcoR1 / Sp6
SpSMBLAS_141N1	<i>SpAlx</i>	GLEAN3_23177	Xma1 / Sp6
536REAsu2_5D8	<i>SpBra</i>	GLEAN3_13015	EcoR1 / Sp6
SpSMBLAS_32D15 / SpSMBLAS_55K2	<i>SpDkk1</i>	GLEAN3_03345	EcoR1 / Sp6
-	<i>SpDkk3</i>	GLEAN3_12506	-
536REAsu4_17C2	<i>SpDelta</i>	GLEAN3_16128	EcoR1 / Sp6
536REAsu2_5N1	<i>SpEndo16</i>	GLEAN3_11038	EcoR1 / Sp6
537REA_12J17	<i>SpEve</i>	GLEAN3_12253	EcoR1 / Sp6
537REA_15C23	<i>SpFez</i>	GLEAN3_27491	EcoR1 / Sp6
RUDIREA_29K17	<i>SpFoxA</i>	GLEAN3_06676	ExoR1 / Sp6
RUDIREA_13I13	<i>SpFoxJ1</i>	GLEAN3_27969	Sal1 / Sp6
537REA_3F18	<i>SpFoxQ2</i>	GLEAN3_19002	EcoR1 / Sp6

Klon-ID	Gen	Glean3-ID	Info*
RUDIREA_11C6	<i>SpGataE</i>	GLEAN3_12537	EcoR1 / Sp6
536REAsu2_5I1	<i>SpGlass</i>	GLEAN3_15362	Xba1 / T7
RUDIREA_9C8	<i>SpGsc</i>	GLEAN3_15982	EcoR1 / Sp6
RUDIREA_37D12	<i>SpHes</i>	GLEAN3_21608	EcoR1 / Sp6
SpSMBLAS_124N22	<i>SpHex</i>	GLEAN3_27215	Xma1 / Sp6
SpSMBLIT_50H5	<i>SpHnf6</i>	GLEAN3_16449	Xma1 / Sp6
SpSMBLAS_131A20	<i>SpMox</i>	GLEAN3_25486	Xma1 / Sp6
537REA_15K13	<i>SpP19</i>	GLEAN3_04136	EcoR1 / Sp6
RUDIREA_22J20	<i>SpPax2</i>	GLEAN3_00276	EcoR1 / Sp6
RUDIREA_15N17	<i>SpProx1</i>	GLEAN3_15984	EcoR1 / Sp6
536REAsu4_11O4	<i>Sp-sFrp1/5</i>	GLEAN3_11271	EcoR1 / Sp6
SpSMBLAS_47F18	<i>SpSix3</i>	GLEAN3_18908	EcoR1 / Sp6
621REA_6N24	<i>SpTBrain</i>	GLEAN3_25584	EcoR1 / Sp6
RUDIREA_29D1	<i>SpTbx6</i>	GLEAN3_20346	Sal1 / Sp6
536REAsu4_11F5	<i>SpTph</i>	GLEAN3_03725	Sal1 / Sp6

* Verwendete Enzyme zur Herstellung von antisense RNA-Sonden.

Die Nukleotid- und Proteinsequenzen der cDNA-Klone können mit Hilfe der Genomdatenbank und der entsprechenden Sequenz-IDs (<http://goblet.molgen.mpg.de/cgi-bin/seaurchin-genombase.cgi>) eingesehen werden.

7.3 qPCR-Daten

Zeitliche Expressionsprofile

Gen	Stadium	cDNA-Batch1	cDNA-Batch2	cDNA-Batch3
<i>SpAadc</i>	Eizelle	0	0	
	3 hrs	0	0	0
	8 hrs	0	0	0
	10 hrs	0	0	0
	12 hrs	0	0	0
	18 hrs	0	0	
	21 hrs	47	53	88
	25 hrs	77	81	
	33 hrs	147	181	330
	37 hrs	896	1174	1419
45 hrs	2761	2808	2357	
70 hrs	2890	2863		

Gen	Stadium	cDNA-Batch1	cDNA-Batch2	cDNA-Batch3
<i>SpAlx</i>	Eizelle	0	0	
	3 hrs	0	0	
	8 hrs	20	24	
	10 hrs	71	114	
	12 hrs	166	206	
	18 hrs	690	943	
	21 hrs	5402	3328	
	25 hrs	5282	5953	
	33 hrs	2979	5678	5368
	37 hrs	7980	16725	10559
	45 hrs	19163	32519	22513
	70 hrs	8780	18998	14452
	<i>SpDkk1</i>	Eizelle	0	0
3 hrs		0	0	
8 hrs		0	1	
10 hrs		0	8	(65)
12 hrs		74	99	
18 hrs		314	473	416
21 hrs		396	367	434
25 hrs		560	412	
33 hrs		698	832	(296)
37 hrs		725	591	615
45 hrs		329	270	
70 hrs		604	481	485
<i>SpDkk3</i>		Eizelle	2874	1383
	3 hrs	1337	1787	(108)
	8 hrs	610	525	495
	10 hrs	465	552	425
	12 hrs	581	509	637
	18 hrs	571	(3097)	478
	21 hrs	553	729	559
	25 hrs	1664	1476	1433
	33 hrs	2851	2525	2212
	37 hrs	4878	5144	(18275)
	45 hrs	6727	6432	5967
	70 hrs	2513	3702	4968
	<i>SpFez</i>	Eizelle	0	0
3 hrs		0	0	
8 hrs		0	0	
10 hrs		0	0	
12 hrs		0	0	
18 hrs		28	63	
21 hrs		179	334	
25 hrs		691	745	
33 hrs		967	1578	
37 hrs		1637	1574	
45 hrs		(4203)	8868	7629
70 hrs		4741	3320	(1733)

Gen	Stadium	cDNA-Batch1	cDNA-Batch2	cDNA-Batch3
<i>SpFoxJ1</i>	Eizelle	0	0	
	3 hrs	0	0	
	8 hrs	212	384	
	10 hrs	1178	1832	
	12 hrs	3671	4557	
	18 hrs	453	533	
	21 hrs	972	1616	
	25 hrs	2499	2437	
	33 hrs	1003	1696	
	37 hrs	9069	(3920)	13788
	45 hrs	15006	11110	
	70 hrs	13574	18998	16380
<i>SpFoxQ2</i>	Eizelle	0	0	
	3 hrs	0	0	
	8 hrs	2657	2781	
	10 hrs	4078	3821	
	12 hrs	2901	3620	
	18 hrs	2590	3816	
	21 hrs	5095	7650	
	25 hrs	9453	11515	
	33 hrs	8633	11003	18035
	37 hrs	32898	37976	23045
	45 hrs	41086	42727	(19654)
	70 hrs	19914	11460	(4745)
<i>SpGlass</i>	Eizelle	0	0	
	3 hrs	0	0	
	8 hrs	0	0	
	10 hrs	0	0	
	12 hrs	0	0	
	18 hrs	0	0	
	21 hrs	0	0	
	25 hrs	10	17	
	33 hrs	126	156	
	37 hrs	484	635	
	45 hrs	952	(2001)	863
	70 hrs	352	(1066)	276
<i>SpHes</i>	Eizelle	6	22	
	3 hrs	123	168	
	8 hrs	1378	1476	
	10 hrs	2832	4723	
	12 hrs	3943	4774	
	18 hrs	3753	3897	
	21 hrs	4397	4966	6291
	25 hrs	13138	13740	
	33 hrs	21089	17815	21089
	37 hrs	30574	(73680)	28750
	45 hrs	24763	17522	
	70 hrs	13587	12626	

Gen	Stadium	cDNA-Batch1	cDNA-Batch2	cDNA-Batch3
<i>SpHnf6</i>	Eizelle	1886	1369	
	3 hrs	1267	1188	
	8 hrs	832	930	
	10 hrs	824	1254	
	12 hrs	852	2228	
	18 hrs	859	1304	
	21 hrs	894	873	
	25 hrs	2930	2403	
	33 hrs	5239	6785	11234
	37 hrs	6603	13334	
	45 hrs	16784	22750	
	70 hrs	9444	11633	9522
	<i>SpMox</i>	Eizelle	0	0
3 hrs		0	0	
8 hrs		0	0	
10 hrs		0	0	
12 hrs		0	0	
18 hrs		0	0	
21 hrs		0	0	
25 hrs		0	0	
33 hrs		1	11	
37 hrs		52	26	
45 hrs		131	171	
70 hrs		202	202	
<i>SpNkx2.1</i>		Eizelle	0	0
	3 hrs	0	0	
	8 hrs	0	1	
	10 hrs	9	18	
	12 hrs	14	13	
	18 hrs	348	455	
	21 hrs	(590)	1504	2155
	25 hrs	2512	2717	
	33 hrs	3563	6352	4160
	37 hrs	3750	8515	5787
	45 hrs	6594	12108	11279
	70 hrs	3648	3599	5130
	<i>SpPax2</i>	Eizelle	0	0
3 hrs		0	0	
8 hrs		0	0	
10 hrs		0	0	
12 hrs		0	0	
18 hrs		0	0	
21 hrs		23	6	
25 hrs		43	11	
33 hrs		70	113	
37 hrs		580	389	
45 hrs		1635	3059	3042
70 hrs		1292	(4499)	2619

Gen	Stadium	cDNA-Batch1	cDNA-Batch2	cDNA-Batch3
<i>SpPax2</i>	Eizelle	0	0	
	3 hrs	0	0	
	8 hrs	0	0	
	10 hrs	0	0	
	12 hrs	0	0	
	18 hrs	0	0	
	21 hrs	23	6	
	25 hrs	43	11	
	33 hrs	70	113	
	37 hrs	580	389	
	45 hrs	1635	3059	3042
70 hrs	1292	(4499)	2619	
<i>SpProx1</i>	Eizelle	625	224	
	3 hrs	189	171	
	8 hrs	236	294	
	10 hrs	218	163	
	12 hrs	55	68	
	18 hrs	47	91	
	21 hrs	894	612	
	25 hrs	1694	1866	
	33 hrs	655	1573	1679
	37 hrs	902	1891	1598
	45 hrs	886	1414	1354
70 hrs	1713	3216	1957	
<i>SpSix3</i>	Eizelle	23	17	
	3 hrs	13	16	
	8 hrs	176	241	
	10 hrs	947	1040	
	12 hrs	1690	2087	
	18 hrs	498	629	
	21 hrs	(925)	4332	2775
	25 hrs	3094	3536	
	33 hrs	1468	3267	3710
	37 hrs	4020	8471	6398
	45 hrs	5285	9707	8882
70 hrs	5894	8054	7474	
<i>Sp-sFrp1/5</i>	Eizelle	(1043)	472	473
	3 hrs	246	175	175
	8 hrs	358	597	397
	10 hrs	309	(807)	317
	12 hrs	651	(1313)	596
	18 hrs	153	(949)	169
	21 hrs	526	776	649
	25 hrs	4354	4063	2960
	33 hrs	4075	4184	4869
	37 hrs	7423	7465	7423
	45 hrs	9069	8612	9879
70 hrs	7207	9571	(17992)	

Gen	Stadium	cDNA-Batch1	cDNA-Batch2	cDNA-Batch3
<i>SpTph</i>	Eizelle	0	0	(89)
	3 hrs	0	0	0
	8 hrs	0	0	0
	10 hrs	0	0	0
	12 hrs	0	0	(21)
	18 hrs	0	0	0
	21 hrs	12	2	0
	25 hrs	23	21	(212)
	33 hrs	(2972)	465	378
	37 hrs	501	399	1014
	45 hrs	2751	3894	3411
70 hrs	2092	2615	2030	

Werte in Klammern wurden in den Grafiken nicht berücksichtigt.

Genregulation ermittelt durch verschiedene Perturbationen

Gen	Perturbation	ΔC_T	Stadium
<i>SpAadc</i>	Dkk1 MASO	-0.6 / -0.0 / -1.4	45 hrs
	Dkk1 MOE	+0.6 / -1.4 / -0.4	45 hrs
	Dkk3 MASO	-0.8 / -0.3 / -1.3	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-1.3 / +0.5 / +0.4	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+1.0 / -0.7 / +1.1	45 hrs
	Glass MASO	(+3.6) / +0.6 / +0.1	45 hrs
	Mox MASO	+0.8 / (-4.2) / +0.2	45 hrs
	sFrp1/5	+0.4 / -0.4 / -0.7	45 hrs
<i>SpAlx</i>	Dkk1 MASO	-2.5 / -5.2 / -1.2	45 hrs
	Dkk1 MOE	-0.3 / +0.5 / -0.4	45 hrs
	Dkk3 MASO	-0.3 / -0.3 / (-2.3)	45 hrs
	FoxQ2 MASO	+0.2 / +0.3 / -0.5	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+1.2 / -0.0 / -1.2	45 hrs
	Glass MASO	+0.8 / -0.5 / -0.7	45 hrs
	Mox MASO	-1.4 / -1.5 / -1.5	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.6 / -0.1 / -0.3	45 hrs
<i>SpBlimp1</i>	Cadherin MOE*	-4.6 / -7.8	20 hrs
	Dkk1 MOE	(-0.6) / -2.3 / -1.9	20 hrs
<i>SpBra</i>	Cadherin MOE*	-4.7 / -2.1	20 hrs
	Dkk1 MOE	(-0.9) / -3.2 / -2.1	20 hrs
<i>SpDelta</i>	Dkk1 MASO	+0.3 / +1.0 / +0.7	20 hrs
	Dkk1 MOE	-1.1 / -0.9 / -0.6	20 hrs
<i>SpDkk1</i>	Dkk1 MASO	+4.0 / +3.7 / +2.0	20 hrs
		+0.5 / -1.0 / +0.3	45 hrs
	Dkk3 MASO	+0.6 / -0.2 / -0.7	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-0.2 / -0.1 / -1.2	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+0.3 / +0.6 / -1.3	45 hrs
	Glass MASO	-1.1 / +1.0 / (-1.9)	45 hrs

Gen	Behandlung	ΔC_T	Stadium
<i>SpDkk1</i>	Lithium	ne / ne	6 hrs
		+1.8 / +2.5	16 hrs
		+0.3 / -0.0	20 hrs
		-0.2 / -0.3	28 hrs
	Mox MASO	-0.2 / (+2.7) / -0.1	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.9 / -1.6 / +0.3	45 hrs
	Zink	+3.3 / +3.4	38 hrs
<i>SpDkk3</i>	Dkk1 MASO	-0.4 / -0.8 / +0.5	45 hrs
	Dkk1 MOE	-0.4 / -0.8 / -0.5	45 hrs
		+2.6 / +1.1 / +3.4	45 hrs
		-1.3 / -0.3 / -0.1	45 hrs
		+2.3 / (-0.4) / +2.2	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+1.8 / +1.7 / (-0.5)	45 hrs
	Glass MASO	-0.7 / (+2.2) / -0.2	45 hrs
	Mox MASO	-1.1 / +1.1 / +2.4	45 hrs
sFrp1/5 MASO			
<i>SpEndo16</i>	Dkk1 MASO	+2.4 / +0.2 / +0.5	20 hrs
		+3.3 / +4.2 / +1.2	45 hrs
	Dkk1 MOE	-2.9 / -3.3 / -1.2	20 hrs
		-1.8 / -1.4 / -1.8	45 hrs
<i>SpEve</i>	Dkk1 MASO	+1.3 / +0.5 / +0.7	20 hrs
	Dkk1 MOE	(-0.6) / -3.1 / -1.6	20 hrs
<i>SpFez</i>	Dkk1 MASO	-2.7 / -3.8 / -0.8	45 hrs
		(+0.6) / +2.7 / +1.8	45 hrs
		+0.5 / -0.3 / +0.4	45 hrs
		-1.3 / -1.7 / -1.8	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+1.7 / (-0.6) / +1.7	45 hrs
		(+2.1) / -2.6 / -1.2	45 hrs
		-1.4 / -1.9 / (-0.7)	45 hrs
		+1.4 / +1.0 / +0.0	45 hrs
<i>SpFoxA</i>	Cadherin MOE*	(-1.4) / -4.1 / -4.6 / -2.1	20 hrs
	Dkk1 MOE	(-1.0) / -2.7 / -2.3	20 hrs
<i>SpFoxJ1</i>	Dkk1 MASO	-0.7 / -0.6 / +0.3	45 hrs
		+1.3 / +0.5 / -1.0	45 hrs
		+1.0 / +0.2 / -2.3	45 hrs
		+0.3 / -1.0 / -0.5	45 hrs
	FoxQ2 MOE	-0.3 / +0.3 / +0.9	45 hrs
		+0.0 / -0.2 / -0.5	45 hrs
		-0.8 / -0.6 / -0.2	45 hrs
		+0.8 / +0.1 / -0.4	45 hrs
<i>SpFoxQ2</i>	Dkk1 MASO	-1.6 / -1.4 / (-0.8)	45 hrs
		+2.6 / +2.2 / +1.9	45 hrs
		+1.2 / +1.2 / +0.0	45 hrs
	Dkk1 MOE	(+0.9) / +2.5 / +2.8	45 hrs
		+1.0 / -0.2 / +0.1	45 hrs
		-0.3 / +0.8 / +0.5	45 hrs
		+1.4 / +0.7 / +0.7	45 hrs
<i>SpGataE</i>	Cadherin MOE*	-5.1 / -3.1	20 hrs
	Dkk1 MOE	-2.3 / -1.8 / -2.1	20 hrs

Gen	Behandlung	ΔC_T	Stadium
<i>SpGlass</i>	Dkk1 MASO	-2.8 / -2.8 / -1.6	45 hrs
	Dkk1 MOE	(-2.9) / +0.4 / +0.2	45 hrs
		+1.3 / -1.0 / +0.2	45 hrs
		(-0.2) / +2.2 / +2.9	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+0.8 / -0.4 / -0.7	45 hrs
	Glass MASO	(+2.1) / -1.0 / -0.0	45 hrs
	Mox MASO	-1.8 / (-0.3) / -2.4	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.2 / -0.8 / -0.2	45 hrs
<i>SpGsc</i>	Dkk1 MOE	-1.4 / -2.1 / (-0.0)	45 hrs
<i>SpHes</i>	Dkk1 MASO	-0.6 / -0.2 / -1.0	45 hrs
	Dkk1 MOE	-0.1 / +0.3 / +0.1	45 hrs
		+0.2 / -0.2 / (-3.9)	45 hrs
		-0.2 / +0.3 / +0.1	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+0.1 / +0.7 / +0.1	45 hrs
	Glass MASO	+0.8 / +0.2 / -0.3	45 hrs
	Mox MASO	-0.5 / +1.0 / -0.2	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.8 / -0.0 / -0.4	45 hrs
<i>SpHex</i>	Dkk1 MASO	+0.6 / +1.9 / -0.3	20 hrs
	Dkk1 MOE	-1.5 / -1.4 / -1.6	20 hrs
<i>SpHnf6</i>	Dkk1 MASO	+0.7 / +1.0 / +0.2	20 hrs
		-0.2 / +0.2 / +0.2	45 hrs
	Dkk1 MOE	-1.2 / -0.5 / -0.3	20 hrs
		-2.2 / -1.5 / -1.4	45 hrs
	Dkk3 MASO	-0.8 / -0.3 / +1.2	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-1.1 / -0.2 / (-1.7)	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+0.5 / +0.2 / +0.1	45 hrs
	Glass MASO	+1.3 / -1.7 / +0.5	45 hrs
	Mox MASO	-0.3 / -0.5 / -1.0	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.1 / -0.4 / -1.3	45 hrs
	<i>SpMox</i>	Dkk1 MASO	-2.7 / -2.8 / -3.3
Dkk1 MOE		(+0.1) / +2.0 / +1.6	45 hrs
Dkk3 MASO		-1.7 / -2.2 / -2.0	45 hrs
FoxQ2 MASO		-4.5 / -1.2 / -2.2	45 hrs
FoxQ2 MOE		+1.9 / (+0.5) / +2.1	45 hrs
Glass MASO		+1.2 / +0.2 / -1.1	45 hrs
Mox MASO		-1.7 / -1.7 / -1.9	45 hrs
sFrp1/5 MASO		(+3.1) / -0.8 / -0.5	45 hrs
<i>SpNkx2.1</i>	Dkk1 MASO	-2.3 / -2.0 / -1.0	45 hrs
	Dkk1 MOE	+0.5 / -0.9 / +0.4	45 hrs
	Dkk3 MASO	-0.2 / -0.1 / -1.0	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-0.0 / -0.6 / +0.2	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+0.3 / -0.4 / +0.2	45 hrs
	Glass MASO	-0.1 / -1.1 / +0.3	45 hrs
	Mox MASO	+0.4 / -0.2 / +0.3	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+1.2 / +0.3 / +0.2	45 hrs
<i>SpNotch</i>	Dkk1 MOE	-1.8 / -3.1 / (-0.6)	20 hrs
<i>SpOTX</i>	Cadherin MOE*	+10.3 / +1.7	20 hrs
	Dkk1 MOE	-1.0 / +0.0 / +0.4	20 hrs

Gen	Behandlung	ΔC_T	Stadium
<i>SpP19</i>	Dkk1 MASO	+1.1 / +0.1 / -0.8	20 hrs
		+0.3 / -0.3 / (+2.7)	45 hrs
	Dkk1 MOE	+0.1 / -0.9 / -0.8	20 hrs
		-0.4 / -0.1 / -0.1	45 hrs
<i>SpPax2</i>	Dkk1 MASO	-1.3 / -0.8 / +0.7	45 hrs
	Dkk1 MOE	-2.0 / -3.6 / -4.6	45 hrs
	Dkk3 MASO	+0.3 / -0.1 / (-2.3)	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-0.6 / (-3.7) / -1.4	45 hrs
	FoxQ2 MOE	-0.1 / -1.1 / +0.0	45 hrs
	Glass MASO	+3.2 / +1.9 / +1.6	45 hrs
	Mox MASO	-1.9 / -3.0 / (-0.7)	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	-0.9 / -0.7 / -1.2	45 hrs
<i>SpPmar1</i>	Dkk1 MASO	+0.9 / (+3.4) / -0.7	20 hrs
	Dkk1 MOE	-0.3 / -0.2 / (+1.9)	20 hrs
<i>SpProx1</i>	Dkk1 MASO	+0.1 / -0.7 / -0.0	45 hrs
	Dkk1 MOE	+0.6 / -1.5 / -1.0	45 hrs
	Dkk3 MASO	+0.7 / +0.1 / (-2.7)	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-0.6 / -0.3 / (-1.9)	45 hrs
	FoxQ2 MOE	-0.9 / -0.2 / -1.2	45 hrs
	Glass MASO	(+3.5) / +1.0 / +1.3	45 hrs
	Mox MASO	+0.2 / +0.3 / -0.2	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.9 / -0.9 / -1.0	45 hrs
<i>Sp-sFrp1/5</i>	Dkk1 MASO	-3.2 / -3.2 / -1.1	45 hrs
	Dkk1 MOE	+2.2 / +1.6 / +1.3	45 hrs
	Dkk3 MASO	+0.6 / +0.3 / +1.1	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-1.9 / -1.4 / -1.5	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+1.6 / (-0.5) / +1.6	45 hrs
	Glass MASO	+0.4 / (-3.3) / -0.9	45 hrs
	Mox MASO	-0.0 / -0.4 / -0.2	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+2.5 / (+1.1) / +1.6	45 hrs
<i>SpSix3</i>	Dkk1 MASO	-0.8 / -1.1 / -0.4	45 hrs
	Dkk1 MOE	+1.4 / -1.1 / -0.6	45 hrs
	Dkk3 MASO	-0.6 / +1.7 / -0.5	45 hrs
	FoxQ2 MASO	+1.7 / +1.2 / +0.4	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+0.2 / +0.1 / -0.2	45 hrs
	Glass MASO	(+6.7) / -0.8 / +0.1	45 hrs
	Mox MASO	(+2.2) / -0.2 / +0.5	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.5 / -0.7 / -0.0	45 hrs
<i>SpSynB</i>	Dkk1 MASO	-0.9 / -0.7 / +0.1	45 hrs
	Dkk1 MOE	-1.0 / +0.0 / +1.5	45 hrs
<i>SpTBrain</i>	Dkk1 MOE	-0.9 / -0.1 / -0.6	20 hrs
<i>SpTbx6</i>	Dkk1 MASO	+1.5 / -0.0 / +1.6	20 hrs
	Dkk1 MOE	-4.1 / -2.0 / -1.3	20 hrs
		-3.3 / -1.5 / (+0.2)	45 hrs
<i>Tcf/Lef</i>	Dkk1 MOE	-1.8 / -2.6 / (-0.3)	20 hrs

Gen	Behandlung	ΔC_T	Stadium
<i>Tph</i>	Dkk1 MASO	-7.0 / -1.2 / -3.6	45 hrs
	Dkk1 MOE	+2.0 / (+0.9) / +1.8	45 hrs
	Dkk3 MASO	-2.4 / -2.1 / -2.2	45 hrs
	FoxQ2 MASO	-1.3 / -1.3 / -2.0	45 hrs
	FoxQ2 MOE	+2.7 / (-0.1) / +3.4	45 hrs
	Glass MASO	-2.7 / -3.1 / (+0.3)	45 hrs
	Mox MASO	-2.3 / -2.4 / -1.6	45 hrs
	sFrp1/5 MASO	+0.3 / -0.6 / +0.4	45 hrs
<i>Wnt8</i>	Dkk1 MOE	(-0.9) / -1.0 / -2.8	20 hrs

Werte in Klammern wurden in den Grafiken nicht berücksichtigt.

*Bereits publizierte Daten (<http://supg.caltech.edu/endomes/qpcr.html>); ne = nicht exprimiert

7.4 Promotor-Sequenzen

Promotorbereich DrDkk1

TTTAAAATAGAAAAGCAATTAAATAAACAGGCCGCAACAATAAGAATACAATCACCAA
GACAAGAAATACAATTTACGACTTTAACACAATCATCATCTAAATAATAATTTATTAA
TGTTCCAATATCACAAAATATTCATAAAGGTGTTGATTTCGAGTAATGGGTCTATAG
TTCGGGTTTCCTTGGTCCGGAATCTCAACAAGATTGCTGTATTTAAATATAGAATAAC
TATTTTTATTATTTATTATTATGTATTTGTACTTGTTTATTCTATAAATAAATAAAGG
TTATTTTAAGTTACAAAATCCCACGAATATTACTGTTAAAAGATTGTTTTAGACTGAC
CATCAATAGCACTATAGCCAAAATATAGTTTCTCGGTTTTCTCTATAAAAATTCAAAGT
TGTATAATTCATCAGTGTAACTTTATATCACTTTGATTTTGCATGCAAAAATAAATA
AATAAATATTGGTAGCTTAATAAAAACCTGCCAATCCTACAGTCTCTATGAAGCTTCAT
CAAACATAAGCATACTTCGCACAGCTTTTCCCATCAAATAAGCACTATTACTGTGGTG
TCTGTTTGATGCCAGCTCATAAAGACGTGCATTCCTGATAGACAGACAGCTCATGAC
ACAACGCTTTGAAATTTTCATCCAGCCCTTTGTTGCTCACAGCAAGGGGCGGGAGCGCA
AACAAACCCGCGCGCGTATAAATGAAGCGGCTTTCGCTCATGAGGAACCACAGAAGAG
CTCCGCTCACCCAGGAATACATCCTACAATTC AAGGAATAACATGATGCACA

Promotorbereich SpDkk1

AAATCTATTTTGACAAATTTTGTATGAATTTCTTTCTAAAACATTCCCCATCTATT
GGTTACTGTGAATTTGACTCACATTATTGGAAGTATGCCAGTCCCTTTTTGGTGGGG
GGGGGGGGGCACTAGTCGCTTAGGGGCATCCGTATATTGAGTTATGGTGTATGTT
AACAGAAACCATCACGATTTATTTTGTATTTGAGATGCTAAATGAACTGCATAAAT
TCACTTAAAATATAAGACTTAATTAGGTAAAGTAATACTGTTTCGACTTTTGTATACT
TAACATGATTAAGGCTTTTGTAGAAAGATTTGATGATTAAGTAGTTGTAAGTATGT
CATCGTGAAGTTTTAAAAAAGTGGACGGTTGATAAAGCTTGAAAACCGAAGATAAAG
AAAAAATGATACCTCGACAGGAAAGAGAAGCATTCTTCGAATATACAGTAAAGTTAA
GATGTCAAAGTGACAAGATTATTTGGTGCTATTGGTTGTGGTTAGGGACTCTTAA
ATCGATCCGTTCCCATCCGTCCATTTTAAACAAAACAGAAGTTTGGCACTGAACAGTC
GAATGGAGAACACTTTGAAATAAGCGACGAATCGGAACGGGCTATTCAAGGCTGAACT
TCCGGATTGTTCTAAAACGGGCCGTGAGTGGTGGAAAATGTTTCGTGCGTGCGCCACT
GATTACAATAGAAATATTGAGCGATAGTATTGCAGACGACACTCACTCCTCCCCGACA
CACCGTACGATATACTACTCAATGAACTACGAGTTACTCATGCGCG

Schwarz unterlegt: identifizierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen; Unterstrichen: 5'UTR

Lebenslauf

Alexander Kühn

Helmstraße 8
10827 Berlin

Telefon: 030 / 818 21 873
Mobil: 0163 / 866 24 49
E-Mail: alexander.kuehn@web.de

Geburtsdatum: 18. Juni 1978
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule und Studium

- 06/07 **Diplom** in BWL für Naturwissenschaftler, Note: 3.4
- 04/07-06/07 **Diplomarbeit „Die Zuteilungsentscheidung bei Aktienplatzierungen“**
FernUniversität Hagen, Note: 3.0
- Seit 04/05 **Promotion „Funktionelle Analyse von *Dkk* im Seeigel“**
MPI für molekulare Genetik
- 03/05 **Diplom** in Biochemie, Note: 1.7
- 10/04-03/05 **Diplomarbeit „Klonierung und Charakterisierung von *Dkk* im Seeigel“**
MPI für molekulare Genetik, Note: 1.0
- 09/04 **Vordiplom** in BWL, Note: 3.7
- 04/03-06/07 **BWL für Naturwissenschaftler**, FernUniversität Hagen
- 06/02 **Vordiplom** in Biochemie, Note: 2.3
- 10/99-03/05 **Biochemie**, Freie Universität Berlin
- 10/97-03/98 1 Semester **Informatik**, Humboldt-Universität Berlin
- 05/97 **Abitur**, Note: 2.7
- 08/88-07/97 Altsprachliches Goethe-Gymnasium, Berlin-Wilmersdorf
- 08/84-07/88 Sternberg-Grundschule, Berlin-Schöneberg

Berufserfahrung

- 06/00-10/04 **MPI für molekulare Genetik**
Abteilung Lehrach, AG Evolution & Development
Studentische Hilfskraft
- 01/02-04/02 **UK Rudolf Virchow**
Abteilung Pathobiochemie, AG Geßner
Studentische Hilfskraft
- 07/99-01/00 **Laborzentrum Berlin**
Qualitätsmanagement
Studentische Hilfskraft
- 06/98-07/99 **Deutsches Herzzentrum Berlin**
Akutlabor
Zivildienstleistender
- 11/97-06/98 **Deutsches Herzzentrum Berlin**
Qualitätsmanagement
Studentische Hilfskraft

Praktika und Kurse

- 07/07 **Marine Genomics Europe (MGE)**
Evo-Devo meets Marine Genomics – Comparative functional analysis of gene regulatory networks in marine species
Stazione Zoologica “Anton Dohrn”, Neapel, Italien
- 10/05-11/05 **Stazione Zoologica “Anton Dohrn” (SZN)**
Abteilung Development & Differentiation, AG Arnone
Neapel, Italien
- 11/03 **Sociedad Argentina de Virologia (SAV)**
XIII. Curso Anual Diagnostico Virologico Rapido
ANLIS-INEI “Dr. Carlos G. Malbran”, Buenos Aires, Argentinien
- 08/03-09/03 **Johann Wolfgang Goethe-Universität (Biozentrum Frankfurt)**
Institut für Biochemie, AG Piehler
Frankfurt am Main, Deutschland
- 09/01-10/01 **Instituto Mexicano Del Seguro Social (IMSS)**
Centro De Investigacion Biomedica Occidente (CIBO), AG Lozano
Colonia Independencia Guadalajara, Mexiko

Publikationen

- 04/09 **Kühn C., Wierling C., Kühn A., Klipp E., Panopoulou G., Lehrach H., and Poustka A.J.**
Evaluation of Large Developmental Gene Regulatory Networks Using Random Parameters: Encompassing Data Limitations in the Sea Urchin Endomesoderm Network.
 BMC Systems Biology (submitted)
- 04/09 **Bradham C.A., Oikonomou C., Kühn A., Modell J.W., McClay D.R., and Poustka A.J.**
Chordin is required for neural but not axial specification in sea urchin embryos.
 Developmental Biology 295(1): 331 (2009)
- 07/07 **Kühn C., Poustka A.J., Kühn A., and Klipp E.**
Modeling Development: Spikes of the Sea Urchin.
 Genome Informatics 18(1), 75-84 (2007)
- 04/07 **Poustka A.J., Kühn A., Groth D., Weise V., Yaguchi S., Burke R.D., Herwig R., Lehrach H., and Panopoulou G.**
A global view of gene expression in lithium and zinc treated embryos: new components of gene regulatory networks
 Genome Biology 8(5): R85 (2007)
- 09/06 **Kühn A., Weise V., Panopoulou G., Lehrach H., and Poustka A.J.**
Identification and expression of Dickkopf in the sea urchin embryo.
 Developmental Biology of the Sea Urchin XVII
 MBL, Woods Hole, MA
- 04/05 **Poustka A.J., Kühn A., Weise V., Herwig R., Groth D., Panopoulou G., and Lehrach H.**
Genome wide gene expression profiling of vegetalised, radialised and animalised sea urchin embryos identifies signaling pathways, key regulators and novel territories.
 Developmental Biology of the Sea Urchin XVI
 MBL, Woods Hole, MA
- 07/04 **Poustka A.J., Kühn A., Weise V., Wellenreuther R., Lehrach H., and Panopoulou G.**
On the origin of the chordate central nervous system: expression of onecut in the sea urchin embryo.
 Evolution & Development 6:4, 227-236 (2004)

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die Diplomarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Berlin, den 13. April 2009

Alexander Kühn, Diplom-Wirtschaftsbiochemiker

