

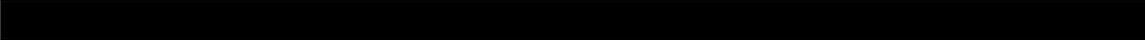
Klonierung und Charakterisierung von *Dickkopf* im Seeigel: der Kopforganisor in einem kopflosen Tier

Dem Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie der
Freien Universität Berlin vorgelegt als

DIPLOMARBEIT
von Alexander Kühn



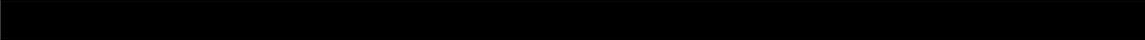
April 2005, Berlin



Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe "Evolution and Development" der Abteilung "Vertebrate Genome Analysis" des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik, Berlin in der Zeit vom 1. Oktober 2004 bis 1. April 2005 unter der Betreuung von Dr. A. J. Poustka und Dr. G. Panopoulou angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach
Department Vertebrate Genome Analysis
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin

Prof. Dr. Volker Erdmann
Institut für Biochemie
Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin



Die Gewißheit

Ob ich morgen leben werde,
Weiß ich freilich nicht:
Aber, wenn ich morgen lebe,
Daß ich morgen trinken werde,
Weiß ich ganz gewiß.

- G. E. Lessing

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.

Herrn Prof. Dr. Volker Erdmann danke ich ebenfalls für die Begutachtung meiner Arbeit.

Für ihr Vertrauen, die hervorragende Betreuung sowie anregende Diskussionen und Ideen möchte ich Albert Poustka und Georgia Panopoulou herzlichst danken. Sie waren maßgeblich am Gelingen der Arbeit beteiligt. Ich hoffe, ihre Förderung, Geduld und ihre Vermittlung von Wissen auf dem Gebiet der molekularen Genetik (und Django Reinhardts) waren nicht vergebens. Sicherlich unvergesslich jedoch werden die Bowling-Abende bleiben.

Großer Dank gilt Vesna Weise ohne deren Geduld, Unterstützung und Zuverlässigkeit diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft danke ich allen anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe: Detlef Groth, Christoph Wiegrefe, Maryam Zadeh-Khorasani und Christoph Seifert.

Danken möchte ich auch Hannah Müller für erholsame Pausen mit Zigaretten und aufmunternden Worten sowie Serguei Baranov für hilfreiche Tipps.

Seong-Ji, Yasmin, Felix, Huan und Fredi danke ich für viele schöne gemeinsame Stunden während des Studiums, horizontweiternde Diskussionen bei Raucherpausen, alkoholreiche und unterhaltsame Nächte sowie beim Tilgen von Tippfehlern in dieser Arbeit.

Für Ablenkung vom Forscher-Alltag, fachfremde Gespräche und Motivation möchte ich Denise, Fabian, Andreas und Martin danken, ohne die ich wahrscheinlich schon als licht- und menschen scheues Laborwesen auf der Erde wandeln würde.

Besonderer Dank gilt auch Beatrice, die mir während der Zeit der Diplomarbeit, stets Ruhepol war, an dem ich Kraft schöpfen konnte.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir mit ihrer Unterstützung und ihrem grenzenlosen Vertrauen das Studium ermöglicht haben und mir stets die Freiheit ließen, die ich brauchte.

Dank gilt auch meiner Zwillingsschwester, die mich von allen Menschen schon am längsten ertragen muß.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
I. EINLEITUNG	1
1. DER SEEIGEL	1
1.1 Der Seeigel als Modellorganismus	3
1.2 Bedeutung des Seeigels in der Evolution der Deuterostomen	5
2. ENTWICKLUNG DES SEEIGELEMBRYOS	6
2.1 Beeinflussung der Embryonalentwicklung durch Chemikalien	9
3. DER SPEMANN'SCHE ORGANISATOR	10
4. DER WNT-SIGNALWEG	12
4.1 Der Wnt-Signalweg während der Embryogenese	14
4.2 Regulation des Wnt-Signalwegs durch Dickkopf	15
5. PROTEINE DER DICKKOPF-FAMILIE	16
5.1 Struktureller Aufbau der Dickkopf-Proteine	16
5.2 Funktion der Dickkopf-Proteine	17
6. FRAGESTELLUNG	19
II. MATERIAL	20
1. CHEMIKALIEN, ENZYME, RADIOAKTIVE ISOTOPE UND ZELLEN	20
2. DNA-LÄNGENMARKER, VEKTOREN UND PRIMER	22
3. KITS, LÖSUNGEN UND MEDIEN	25
4. GERÄTE UND ZUBEHÖR	28
5. DATENBANK-ZUGANGSNUMMERN	29
III. METHODEN	30
1. SEEIGELHALTUNG UND EMBRYONENGEWINNUNG	30
2. FIXIERUNG DER EMBRYONEN FÜR DIE WMISH	31
3. GELELEKTROPHORESE UND PHOTOMETRISCHE MESSUNG	31
3.1 Agarose-Gelelektrophorese	31
3.2 Photometrische DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung	32
4. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	32
4.1 Amplifizierung von DNA	32
4.2 Aufreinigung von PCR-Produkten	33
5. EXTRAKTION GENOMISCHER DNA	34
6. FILTERHYBRIDISIERUNG	34
6.1 Probedesign	34
6.2 Probenmarkierung	36
6.3 Hybridisierung	36
6.4 Entfernung der Probe	37
7. PLASMID-DNA-PRÄPARATION	37
8. SEQUENZIERUNG	37
8.1 Sequenzierung mittels "primer walking"	37
8.2 Sequenzanalyse	39
9. PHYLOGENETISCHE ANALYSE	39
10. RNA-ISOLIERUNG	40
11. cDNA-SYNTHESE	41

12. QUANTITATIVE “REAL-TIME” PCR	41
12.1 Primerdesign	41
12.2 QRT-PCR mittels SYBRGreen	42
12.3 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	43
13. TOPO-KLONIERUNG	44
13.1 Amplifikation der WMISH-Konstrukte	44
13.2 TOPO-Ligation und Transformation	44
13.3 Analyse der DNA-Konstrukte	45
14. HERSTELLUNG VON RNA-SONDEN	45
14.1 Linearisierung von Plasmid-DNA	45
14.2 Aufreinigung des DNA-Verdaus	45
14.3 <i>In vitro</i> -Transkription	46
15. “WHOLE-MOUNT” <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	46
15.1 Prä-Hybridisierung	47
15.2 Hybridisierung	47
15.3 Post-Hybridisierung	47
15.4 Photodokumentation	48
16. KLONIERUNG	48
16.1 Amplifikation und Restriktionsverdau der Expressionskonstrukte	48
16.2 Restriktionsverdau und Aufreinigung des Expressionsvektors	49
16.3 Ligation	50
16.4 Herstellung elektrokompenter Zellen	51
16.5 Elektroporation	51
16.6 Analyse der DNA-Konstrukte	52
IV. ERGEBNISSE	53
1. NUKLEOTID- UND AMINOSÄURESEQUENZ	53
2. PROTEIN-“ ALIGNMENT”	55
3. PHYLOGENETISCHE ANALYSE	57
4. EXPRESSION VON <i>DICKKOPF</i>	58
4.1 Quantitative “real-time” PCR	58
4.1.1 Expressionsprofil von <i>Z12</i>	58
4.1.2 Expressionsprofil von <i>Dickkopf</i>	58
4.2 “Whole-mount” <i>in situ</i> Hybridisierung	59
4.2.1 Vergleich der Hybridisierungssonden	59
4.2.2 Expressionsmuster von <i>Dickkopf</i>	60
5. LITHIUM- UND-ZINK-“MUTANTEN”	63
5.1 Phenotyp der Lithium- und Zink-“Mutanten”	63
5.2 Expressionsmuster von <i>Dickkopf</i> in Lithium- und Zink-“Mutanten”	64
5.3 Regulation von <i>Dickkopf</i> durch Lithium und Zink	66
6. EXPRESSIONSKONSTRUKTE	67
V. DISKUSSION	68
1. CHARAKTERISIERUNG VON <i>DICKKOPF</i>	68
2. PHYLOGENETISCHE ANALYSE	69
3. EXPRESSION VON <i>DICKKOPF</i>	70
4. EINFLUSS VON LITHIUM UND ZINK	72
5. AUSBLICK	74
VI. LITERATURVERZEICHNIS	76

Zusammenfassung

Der Spemann-Organisator ist ein Gewebe mit wirksamer Kopf-Induktionsfähigkeit in Amphibienembryonen. *Dickkopf-1* ist im *Xenopus* Embryo im Kopforganisator exprimiert, und Injektion von *Dickkopf-1*-mRNA in Verbindung mit BMP-Antagonisten sowie von anti-*Dickkopf-1*-Antikörpern haben gezeigt, dass *Dickkopf-1* nötig ist, um Kopfstrukturen zu bilden.

In dieser Arbeit wurde ein *Dickkopf*-Gen im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* isoliert. Das Seeigel-Gen codiert für ein Protein mit 339 Aminosäuren und zwei cysteinreichen Domänen, welche für Proteine der *Dickkopf*-Familie charakteristisch sind. In phylogenetische Untersuchungen wird das isolierte Gen eindeutig in die Familie der *Dickkopf*-Proteine platziert. Weitere Untersuchungen der genomischen Seeigeldatenbank lieferten keine Hinweise auf weitere *Dickkopf*-Gene Im Seeigelgenom.

Während des Blastula-Stadiums ist *Dickkopf* in der Vegetalplatte des Embryos exprimiert. Mit Beginn der Gastrulation findet man die Expression von *Dickkopf* im invaginierenden Endomesoderm und zusätzlich im apikalen Ektoderm. In den späten Gastrula-Stadien ist die Expression von *Dickkopf* auf den Vorderdarm und das apikale Ektoderm beschränkt. In den Pluteus-Larven findet man die Expression von *Dickkopf* im apikalen Ektoderm, in den sich entwickelnden Armen und im Mund. QRT-PCR-Studien zeigten, dass die Expression von *Dickkopf* in mit Lithium behandelten Embryonen im Vergleich zu normal entwickelten Embryonen siebenfach erhöht ist.

Dies deutet darauf hin, dass *Dickkopf* auch im Seeigel nötig ist, um anteriore Strukturen zu bilden. Während der frühen Embryogenese scheint es in der Endomesoderm-Spezifizierung involviert zu sein und später in der Bildung des larvalen Mundes, dem anteriorsten Bereich im Seeigelembryo und vergleichbar mit den Köpfen der Vertebraten. Darüber hinaus ist es anscheinend noch in der Differenzierung von sensorischen Zellen beteiligt. Darauf deuten auch Expressionsmuster von *Dickkopf-3*-Genen, einem weiteren Mitglied der *Dickkopf*-Familie, aus anderen Organismen. Diese vielfältigen Funktionen von *Dickkopf* legen nahe, dass es sich bei dem isolierten Gen, um das Ursprungsgen handelt, aus dem sich durch Genomduplikationen die verschiedenen Vertebraten *Dickkopf*-Gene entwickelt haben.

Abstract

The Spemann organizer in amphibian embryos is a tissue with potent head-inducing activity. *Dickkopf-1* in *Xenopus* is expressed in the head organizer. Co-injection of *Xenopus Dickkopf* mRNA with BMP antagonists as well as injections of anti-Dickkopf-1-antibodies indicate that Dickkopf-1 is necessary for head induction.

During this diploma thesis a *Dickkopf* homolog was isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. The sea urchin *Dickkopf* encodes a protein of 339 amino acids that contains two cysteine-rich domains, which are highly conserved within Dickkopf proteins. Phylogenetic analysis clearly places the sea urchin gene into the family of Dickkopf-proteins. There is no evidence of other *Dickkopf* genes in the sea urchin genome.

During the blastula stage *Dickkopf* is expressed in the vegetal plate of the embryos. At the beginning of gastrulation, *Dickkopf* is expressed in the invaginating endomesoderm as well as in the apical ectoderm. In the later gastrula-stages expression of *Dickkopf* is restricted to the foregut and the apical ectoderm. In the pluteus-larva *Dickkopf* is expressed in the apical ectoderm, the elongating arms as well as in the stomodeum. QRT-PCR-studies revealed that *Dickkopf* is sevenfold upregulated in lithium-treated embryos in comparison to normal developed embryos.

This suggests that also in the sea urchin Dickkopf is necessary to form anterior structures. During early embryogenesis it may be essential for the endomesodermal specification and later for the formation of the larval mouth, the most anterior region in the sea urchin embryo that is comparable to head structures in vertebrates. Finally the sea urchin Dickkopf seems to function in differentiation of sensory cells. This result was supported by the expression patterns of *Dickkopf-3* genes, another member of the family of Dickkopf-proteins, of further organisms. These diverse functions of Dickkopf suggest that the isolated gene is the ancestor gene from which the different vertebrate *Dickkopf* genes were evolved by genome duplications.

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BLAST	(engl.) basic local alignment search tool
BMP	(engl.) bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CIP	engl. Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CRD	cysteinreiche Domäne
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	zweifach destilliert (engl. double distilled)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithio-1,4,-threitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
LDL	(engl.) low density lipoprotein
LEF	(engl.) lymphocyte enhancer factor-1
LMP	(engl.) low melting point
LPA	lineares Polyacrylamid
LRP5/6	(engl.) LDL receptor-related protein 5/6

MCS	(engl.) multiple cloning site
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NBT	4-Nitro-Blue-Tetrazolium
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
PABA	p-Aminobenzosäure-Natriumsalz
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCP	(engl.) planar cell polarity
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PMC	primäre Mesenchymzelle (engl. primary mesenchyme cell)
QRT-PCR	Quantitative "real-time" PCR
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodiumdodecylsulfate)
sFRP	(engl.) secreted Frizzled-related protein
SMC	sekundäre Mesenchymzelle (engl. secondary mesenchyme cell)
TCF	(engl.) T-cell factor
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UTR	untranslatierte Region (engl. untranslated region)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen in Volumen
w/v	Gewicht in Volumen (engl. weight per volume)
WIF-1	(engl.) Wnt inhibition factor-1
WMISH	(engl.) whole-mount <i>in situ</i> hybridisation
X-Gal	Bromo-4-Chlor-indoxyl-β-D-galactosid

I. Einleitung

1. Der Seeigel

Der Seeigel ist Mitglied der großen Gruppe der marinen Invertebraten und gehört zum Phylum der Echinodermaten (Abb. 1), zu dem u.a. auch Seegurken, Seesterne und Seelilien gehören (Kato & Schroeter, 1985; Turgeon *et al.*, 1988).

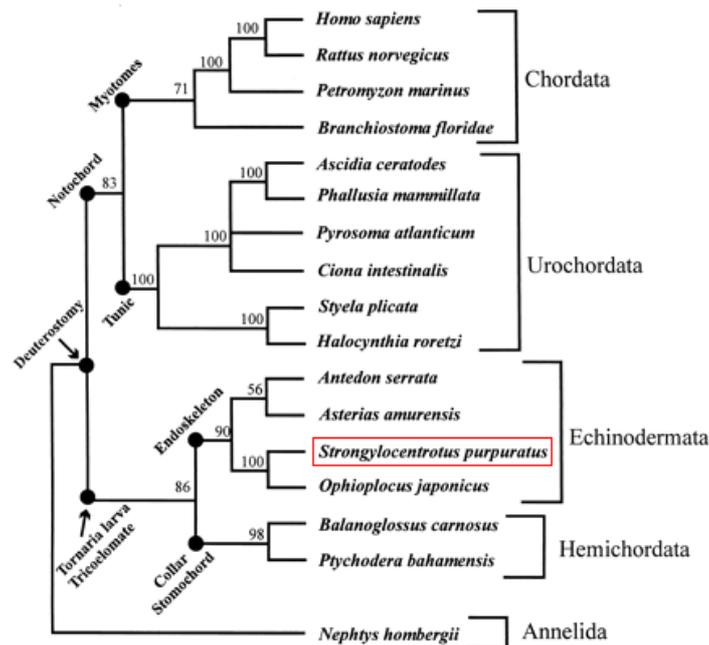


Abb. 1: "Phylogenetischer Stammbaum der Deuterostomen: der Seeigel (rot markiert) gehört zum Phylum der Echinodermaten und zur großen Gruppe der Deuterostomen. Abbildung übernommen aus (Cameron *et al.*, 2000)."

Seeigel haben keinen Kopf - es gibt kein vorn und hinten. Unten befindet sich der Mund, oben der After. Sie bestehen aus einer harten Kalkschicht, die von einer dünnen Epithelschicht umgeben ist. In den meisten Fällen wird die Körperoberfläche von zahlreichen Typen beweglicher, mit kugelförmigen Gelenkköpfen auf den Skelettplatten inserierender Stacheln besetzt. Die Stacheln werden von Muskeln gehalten, wodurch es einigen Arten ermöglicht wird, auf ihren langen Stacheln wie auf Stelzen zu laufen. Zudem besitzen einige Arten Giftdrüsen. Der Körper enthält das Darmsystem und die Fortpflanzungsorgane, sowie das für Echinodermaten charakteristische Ambulakralsystem, ein mit Flüssigkeit gefülltes Röhrenwerk: es besteht aus einem den Schlund umfassenden Ringkanal und fünf davon strahlig abgehenden Radiärkanälen, die unter Kalkplatten (Ambulakralplatten) liegen und mit zahlreichen Saugscheiben tragenden Füßchen besetzt sind, die dem

Nahrungserwerb und der Fortbewegung, besonders auf senkrechten Strecken, dienen (Abb. 2). Besonders wichtig ist aber, dass durch sie die Atmung der Seeigel erfolgt. Zudem sind auch spezielle Greiforgane ausgebildet, die als dreiklappige, bewegliche Pedicellarien (Parker & Kalvaas, 1992; Kato & Schroeter, 1985) den Skelettpanzer vor der Besiedlung durch sessile Tiere schützen und dem Greifen von Futter dienen. Neben dem After befindet sich die Genitalöffnung, durch die Eier oder Spermien in großer Zahl ins Meerwasser abgegeben werden, und die Madreporenplatte, durch die gelöste Stoffe ausgeschieden werden. Die Seeigel besitzen ein zentrales Nervensystem mit Sinneszellen. Sie haben keine Augen, ebenso fehlt ihnen ein Herz. Der Seeigel hält sich mit seinen zahlreichen Röhrenfüßchen am Boden fest. Mit seinem kompliziert gebauten Zahn- und Kauapparat, der pyramidenförmigen "Lanterne des Aristoteles", raspelt er Algen vom Untergrund ab, er ernährt sich aber auch von Aas und kleinen festsitzenden Tieren. Sie bewohnen alle Meere und kommen in flachen Küstengewässern bis in sehr großen Tiefen vor. Die meisten Seeigel bevorzugen harten, felsigen Grund, viele Arten sind im Korallenriff zu finden.

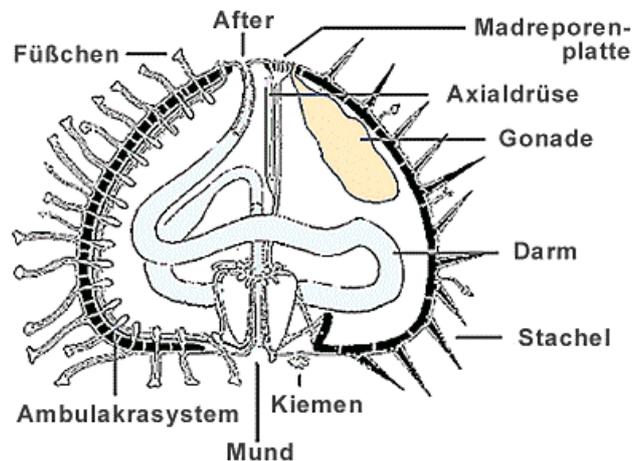


Abb. 2: "Bauplan von Seeigeln: charakteristisch ist das Ambulakralgefäßsystem, ein mit Flüssigkeit gefülltes Röhrenwerk."

Seeigel werden nach ca. zwei Jahren geschlechtsreif, die Vermehrung erfolgt getrenntgeschlechtlich. Ei- und Samenzellen werden in großen Mengen ins Wasser abgegeben. Das Zusammentreffen von Spermium und Eizelle wird aber nicht dem Zufall überlassen, sondern durch chemische Kommunikation unterstützt. Die Eizellen entlassen ein kleines Peptid (Resact) ins Wasser, das den Spermien als chemische Spur dient, die sie zur Eizelle dirigiert. Aus dem befruchteten Ei geht eine

freischwimmende, planktische, bilateral-symmetrische Larve hervor, der Pluteus. Der Körper der Larve wird in einer anschließenden Metamorphose zum bodenlebenden, radiärsymmetrischen und völlig anders gestalteten Adultus transformiert (Parker & Kalvass, 1992).

1.1 Der Seeigel als Modellorganismus

Bereits 1876 diente der Seeigel als Studienobjekt. Oskar Hertwig zeigte den Vorgang der Befruchtung beginnend mit der Fusion von Spermium und Eizelle an ihnen auf (Hertwig, 1876). Nur wenig später fand Hans Driesch heraus, dass eine einzelne Zelle des 4-Zell-Stadiums noch fähig ist, eine komplette Larve auszubilden (Driesch, 1891), womit zum ersten Mal Regulation während der Embryonalentwicklung beschrieben wurde. Anfang des 20. Jahrhunderts konnte durch Theodor Boveri an durch zwei Spermien befruchteten Seeigeleiern die Bedeutung von Chromosomen für die Entwicklung gezeigt werden. Dies bewies, dass die Chromosomen Träger der Erbinformation sind (Boveri, 1908). Besondere Bedeutung hatten die Experimente von Sven Hörstadius, der verschiedene Lagen des Seeigelembryos voneinander trennte und deren weitere Entwicklung beobachtete (Abb. 3). Damit warf er als Erster die Idee von einem vegetalisierenden Gradienten auf, der im unbefruchteten Ei seinen Ursprung hat und Einflüsse auf die embryonalen Achsen ausübt (Hörstadius, 1939).

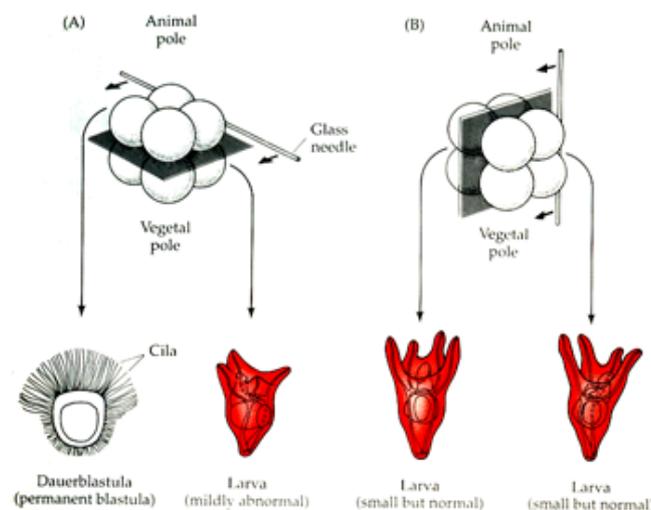


Abb 3.: "Hörstadius' Trennungsexperimente: werden die vier animalen Blastomere von den vegetalen getrennt, entwickelt sich eine Dauerblastula und eine verkleinerte Larve mit vergrößertem Darm (A); trennt man die Blastomere entlang der vegetalen-animalen Achse, entstehen verkleinerte, aber ansonsten normale Larven (B). Abbildung übernommen aus (Gilbert, 1994)."

Neben der historisch bedingt gut erforschten Entwicklung bietet der Seeigel zudem weitere Vorzüge als Modellorganismus: es sind nahezu unbegrenzte Mengen an Material verfügbar. Die sich entwickelnden Embryonen mit ihrer Transparenz und synchroner Entwicklung gewährleisten eine einfache Handhabung. Ferner besteht die Möglichkeit unzähliger Manipulationen, wie z.B. der Isolierung einzelner Zellen oder der Behandlung mit Chemikalien während der Embryonalentwicklung.

So können Seeigel in großer Zahl aus dem Meer gefischt und leicht über lange Zeiträume im Aquarium gehalten werden. Durch Elektroschock oder Injektion von 0,5 M KCl-Lösung können sie dann jederzeit künstlich zur Ei- und Spermienabgabe gebracht werden, wobei ein Weibchen, bei denen die Eier bis zu 2/3 des Gewichts ausmachen können, bis zu 100 Millionen Eier auf einmal ablaicht. Die benötigte Menge an Eiern kann zeitgleich befruchtet und Millionen von Embryonen können synchron zur Entwicklung gebracht werden. Dies ermöglicht die Isolierung praktisch unbegrenzter Mengen an RNA zu jedem erdenklichen Zeitpunkt der Entwicklung bis zur Pluteus-Larve. Ebenso ist die Präparation von Proteinen in großen Mengen möglich, wodurch diese in nativer Form biochemisch analysiert werden können.

Die absolute Transparenz der Embryonen ermöglicht deren genaue Beobachtung während der Embryonalentwicklung. Seeigelembryonen sind daher gut geeignet, um die räumliche und zeitliche Expression von Genen durch "whole-mount" *in situ* Hybridisierung zu untersuchen. Besonders gut sind daher Zellmigrationen zu beobachten. Insbesondere für die Untersuchung der Gastrulationsvorgänge ist das System sehr wertvoll (Hardin, 1996). Diese Vorgänge können durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen sogar am lebenden Organismus beobachtet werden (Arnone *et al.*, 1997).

Zu den mannigfaltigen experimentellen Möglichkeiten zählen die direkt im Embryo durchführbaren Manipulationen mit Chemikalien, die die Untersuchung epigenetischer Einflüsse auf die Entwicklung erlauben (siehe I.2.1): dazu zählen die Inhibition der Gastrulation durch Inkubation mit β -Aminopropionitril (Wessel, 1987), Animalisierung durch Inkubation von Eiern in NaSCN sowie deren Vegetalisierung durch LiCl (McClay, 1996), Inhibition der Expression dorsalspezifischer Gene durch Zugabe von NiCl (Hardin *et al.*, 1992) und die Exogastrulation durch SDS (Coffman & McClay, 1990).

Weiterhin ist die Isolierung von Mikromeren (Fink, 1985), primären Mesenchymzellen (Ettensohn, 1987), Ektoderm und Endoderm (McClay & Marchase,

1979) im großen Stil möglich. Des Weiteren ermöglichen die unzähligen leicht durchführbaren operativen Methoden, wie das Hinzufügen überzähliger Zellen zum Embryo (Wray & McClay, 1988) oder Mikromanipulationen an Blastomeren weitere einzigartige Möglichkeiten. Schließlich lassen sich cis-regulatorische Kontrollelemente durch eine Injektion von Reportergenkonstrukten in Eizellen untersuchen (Makabe *et al.*, 1995) oder funktionelle Genanalysen durch Injektion von "antisense"-Morpholinokonstrukten (Howard *et al.*, 2001) bzw. durch Überexpression durch Injektion von mRNA durchführen.

Ein großer Nachteil des Seeigelsystems ist jedoch, dass aufgrund der langen Generationszeiten keine genetischen Untersuchungen wie Mutantanalyse möglich sind.

1.2 Bedeutung des Seeigels in der Evolution der Deuterostomen

Die Echinodermaten haben während der Embryonalentwicklung viele Merkmale mit den Chordaten gemeinsam, wie z.B. die Art der Entstehung des larvalen Mundes (siehe I.2). Auf Grund dieser Tatsache nimmt man an, dass sie, obwohl sie zu den Invertebraten zählen, mit den Chordaten von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Sie gehören daher mit den Chordaten und Hemichordaten zu der Großgruppe der Deuterostomen (Turbeville *et al.*, 1994).

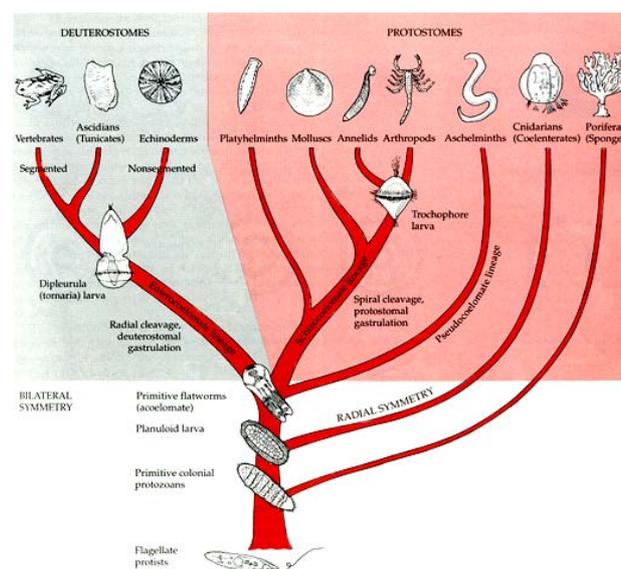


Abb. 4: "Phylogenetischer Stammbaum des Tierreichs: er illustriert die Stellung der Echinodermaten zur Basis der Deuterostomen. Abbildung übernommen aus (Gilbert, 1994)."

Der Seeigel kann daher als ein Organismus betrachtet werden, der dem Prototyp eines Vorläufers der Deuterostomen sehr nahe kommt (Abb. 4). Man nimmt daher an, dass alle Gene der Deuterostomen, die der Vertebraten wie Mensch, Maus und Fisch eingeschlossen, Vorläufergene haben, die im Seeigel identifiziert werden können (Davidson *et al.*, 1995; Holland, 1988; Poustka, 2001). Sein Genom wird daher als Urgenom der Deuterostomen-Vertebratenlinie verwendet.

Des Weiteren ist der Seeigel vor den zwei Genomduplikationen entstanden, die im Laufe der Evolution der Vertebraten stattgefunden haben (Sidow, 1996). So findet man Gene, die im *Drosophila*-Genom nur einmal vorkommen, im Vertebratengenom oft als vier, manchmal nur als zwei oder drei Homologe. Oftmals haben sich die Aufgaben dieser orthologen Gene im Laufe der Evolution geändert, die Grundfunktion bleibt allerdings anscheinend erhalten, 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).

2. Entwicklung des Seeigelembryos

Das Seeigelei ist dotterarm, wobei der Dotter gleichmäßig verteilt ist (isolecithal). Der Seeigel weist die für Echinodermaten typische radial-holoblastische Furchungsteilungen auf. Bis zur Blastula verlaufen die Zellteilungen synchron. Die ersten beiden Teilungsebenen liegen in den meisten Seeigel-Arten meridional zur animalen-vegetalen Achse und sind rechtwinklig zueinander. So entstehen vier gleich große Blastomeren (Abb. 5, B). Die dritte Zellteilung ist äquatorial und trennt die beiden Pole voneinander; es entsteht ein vegetales und ein animales Quartett von Zellen (Abb. 5, C). Die vierte Teilung hingegen verläuft anders: die vier Zellen des animalen Rings teilen sich in acht gleich große Blastomere, den sogenannten Mesomeren, während sich die Zellen des vegetalen Rings ungleichmäßig in vier große, die Makromeren, und vier kleine Zellen, die Mikromere, teilen (Abb. 5, D). 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. 5, E).

Bei der sechsten Furchung teilen sich alle Zellen äquatorial und bilden den 64-Zell-Embryo, bestehend aus fünf zu unterscheidenden Ringen, welche aus 16 an₁-, 16 an₂-, 8 veg₁- und 8 veg₂-Zellen sowie 16 Mikromeren (Abb. 5, F) zusammengesetzt sind. Die siebte Teilung verläuft meridional durch alle Zellen und bildet das 128-Zellen-Blastula-Stadium (Gilbert, 1994).

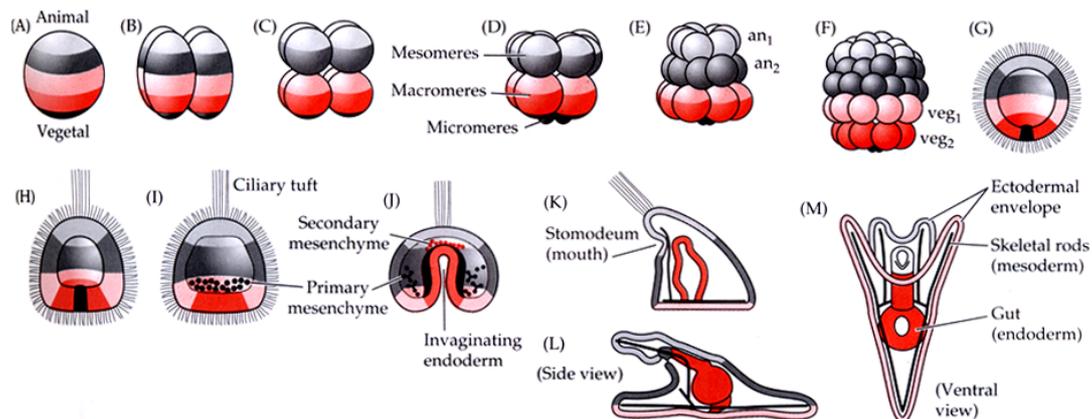


Abb. 5: "Embryonalentwicklung des Seeigels: Cleavage-Stadien (A-F), Blastula-Stadien (G-I), Gastrula-Stadien (J,K), Pluteus-Larve (L,M). Abbildung übernommen aus (Gilbert, 1994)."

Bereits hier sind im Wesentlichen alle Territorien des Embryos gebildet (Davidson *et al.*, 1998): das aborale (dorsale) und das orale (ventrale) Ektoderm - getrennt durch das "ciliated band", die Vegetalplatte (Endomesoderm), die primären Mesenchymzellen, die kleinen Mikromeren und das Endoderm (Abb. 6).

Die frühe Blastula besteht aus einer einzelligen Schicht um ein zentrales Blastocoel. Alle Zellen besitzen die selbe Größe und sind an der Oberfläche mit Cilien besetzt (Abb. 5, G). Während des Blastula-Stadiums kommt es zu weiteren Zellteilungen, die Zellschicht expandiert und dünnt sich aus. Die Zellen der vegetalen Seite elongieren, der Embryo flacht am vegetativen Pol ab (Abb. 5, H). Die Cilien sorgen dafür, daß der Embryo innerhalb der Befruchtungsmembran rotiert. Kurz danach synthetisieren die Zellen der animalen Hälfte das sogenannte "hatching enzyme" (im *Strongylocentrotus purpuratus* synthetisieren es außer den Mikromeren alle Zellen), welches den Verdau der Befruchtungsmembran ermöglicht: der Embryo schlüpft und ist fortan freischwimmend.

Die Gastrulation beginnt mit der Einwanderung der primären Mesenchymzellen (PMCs) in das Blastocoel (Abb. 5, I). Während die PMCs im vegetalen Bereich des

Blastocoels einen Ring bilden, wandern die Vegetalplattenzellen ein und bilden das Archenteron (Urdarm). Die Öffnung des Archenteron am vegetalen Bereich wird Blastoporus genannt. Während der Elongation zum animalen Pol wandern vom Archenteron aus die sekundären Mesenchymzellen (SMCs) aus dessen Spitze, befestigen sich und ziehen das Archenteron an die zukünftige orale Ektodermseite (Abb. 5, J), wo das Archenteron in deuterostomentypischer Weise durchbricht und sekundär die Mundöffnung (Abb. 5, K) bildet. Zuvor haben sich bereits durch seitliche Urdarmdachausstülpungen die larvalen Coelomsäckchen abgegliedert (Gilbert, 1994).

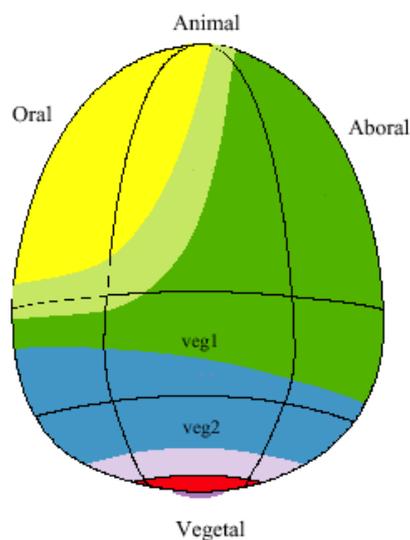


Abb. 6: "Territorien des Seeigelembryos: orale Ektoderm (gelb), aborale Ektoderm (grün), "ciliated band" (hellgrün), Mesoendoderm (hellviolett), primäre Mesenchymzellen (rot), kleine Mikromere (violett) und Endoderm (blau). Abbildung übernommen von (Davidson *et al.*, 1998)."

Anschließend wachsen die ektodermalen Epithelien noch zu zwei langen postoralen und zwei kürzeren anterolateralen Armen aus. Die bilaterale, freischwimmende, aus ca. 1800 Zellen bestehende Pluteus-Larve ist gebildet (Abb. 5, L, M). Im weiteren Verlauf werden weitere Arme und Cilien gebildet und nach ungefähr zwei Wochen - abhängig von Temperatur, Futterangebot und Art - beginnt sich das Echinus-Rudiment durch die Fusion von invaginiertem (linken) Ektoderm mit dem anterioren Teil des linken Coeloms (Hydrocoel) zu bilden. Die linke Seite der Pluteus-Larve wird zur zukünftigen Oralseite des pentamer radiärsymmetrischen adulten Tieres (Czihak, 1975). Über die Entstehung des Rudiments, und welche Zellen im Detail dazu beitragen, ist nicht sehr viel bekannt.

2.1 Beeinflussung der Embryonalentwicklung durch Chemikalien

Die Embryonalentwicklung des Seeigels kann auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst werden. Dabei sind die Behandlungen mit Lithium, Zink und Nickel die bestverstandenen, um das Schicksal der Zellen zu ändern (Abb. 7).

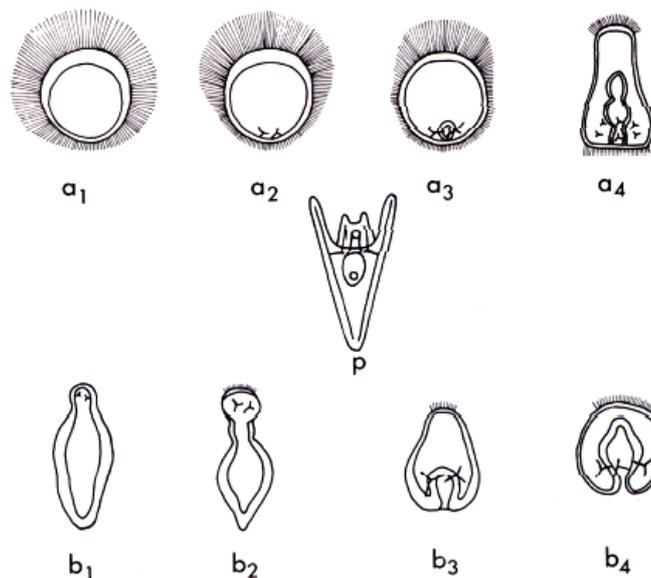


Abb. 7: "In der Entwicklung modifizierte Embryonen: verschiedene Grade der Animalisierung durch Zink (a1 bis a3), verschiedene Grade der Vegetalisierung durch Lithium (b1 bis b4), durch Nickel radialisierter Embryo (a4) und eine normale Pluteus-Larve (p) zum Vergleich. Abbildung übernommen aus (Czihak, 1975)."

Während Lithium die vegetal-animale-Differenzierung ändert und die Bildung von Endomesoderm auf Kosten des Ektoderms verstärkt (Ghiglione *et al.*, 1993), beeinflusst Nickel die zweite Embryonalachse, die oral-aboral-Differenzierung, was zu radial symmetrischen Embryonen führt, bei denen das aborale Ektoderm stark reduziert, d.h. der größte Teil des embryonalen Ektoderms oral ist. Zweitens fehlen den durch Nickel radialisierten Embryonen einige SMCs, während die Endoderm-Entwicklung weitestgehend normal verläuft (Hardin *et al.*, 1992). Zink hingegen ist das am stärksten animalisierende Agens und führt zu einer kompletten Blockierung der Endomesoderm-Differenzierung (Nemer, 1986; Shepherd *et al.*, 1983). Zink-behandelte Embryonen gleichen einer Dauerblastula, wie sie sich aus einer isolierten animalen Blastomere entwickelt (Hörstadius, 1939).

Allen drei Behandlungen liegen molekulare Mechanismen zu Grunde, weswegen sich diese "Mutanten" dazu eignen, um erste Informationen über die Funktion von Genen zu erhalten (Poustka, 2001). Im Detail aufgeklärt ist jedoch nur die Wirkung von Lithium.

3. Der Spemann'sche Organisator

In Transplantationsexperimenten an Amphibien zeigten Hans Spemann und Hilde Mangold, dass die Urmundlippe die einzige selbstdifferenzierende Region in der frühen Gastrula ist (Spemann & Mangold, 1924). Sie transplantierten verschiedene Bereiche einer frühen Gastrula in das ventrale Ektoderm einer anderen Gastrula. 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 und führte zur Entwicklung eines zweiten Embryos, Kopf an Kopf mit dem ersten. (Abb. 8).

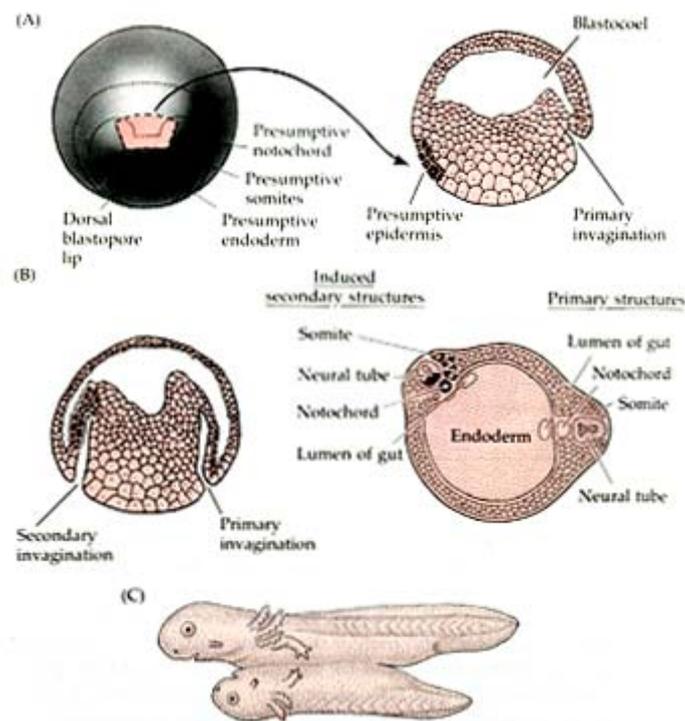


Abb. 8: "Selbstdifferenzierung der Urmundlippe: die Transplantation der Urmundlippe in einer frühen Gastrula in das Ektoderm einer zweiten frühen Gastrula (A) führt zur Bildung einer zweiten Achse (B) und damit zur Bildung eines zweiten Embryos (C). Abbildung übernommen aus (Gilbert, 1994)."

Aufgrund dieser induzierenden Wirkung bezeichnete Spemann diesen Bereich als Organisator. Weitere Experimente zeigten regionale Unterschiede der Urmundlippe. So führt die Transplantation der Prechordalplatte zur Bildung von Kopfstrukturen, während die Transplantation des Chordamesoderms zur Induzierung von Rumpfstrukturen führt (Mangold, 1933).

Mittlerweile sind nicht nur Organisatorbereiche in anderen Vertebraten wie Zebrafisch (Shih & Fraser, 1996), Maus (Beddington, 1994) und Huhn (Izpisua-Belmonte *et al.*, 1993) gefunden worden und die Transplantationsversuche Mangolds bei Huhn (Pera & Kessel, 1997), Frosch (Zoltewicz & Gerhart, 1997) und Maus (Thomas & Beddington, 1996) verifiziert worden, sondern auch etliche Gene wie *gooseoid* (De Robertis *et al.*, 1994) identifiziert worden, die eine Aufklärung der Wirkungsweise des Organisators auf molekularer Ebene ermöglichen.

Arbeiten an BMP-Antagonisten wie Noggin, Chordin und Follistatin offenbarten, dass der zentrale molekulare Mechanismus der Rumpfinduktion in Amphibien in der Inhibition des BMP-Signalwegs liegt (Harland & Gerhart, 1997). Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der molekularen Wirkungsweise der Kopfinduktion war die Identifizierung von Cerberus, eines Proteins, das vollständige ektopische Köpfe induzieren kann (Bouwmeester *et al.*, 1996). Cerberus wird im anterioren Endoderm exprimiert und agiert als Inhibitor des BMP- und Wnt-Signalswegs (Piccolo *et al.*, 1999). Zusammen mit der Entdeckung, dass der Wnt-Antagonist *Frzb*, ebenfalls exprimiert im Kopforganisator, in Verbindung mit BMP-Inhibitoren ebenfalls Köpfe induziert, führte zum sogenannten Zwei-Inhibitoren Modell (Abb. 9).

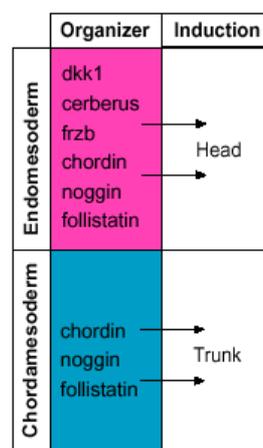


Abb. 9: "Zwei-Inhibitoren Modell: Rumpfbildung benötigt die Inhibition des BMP-Signalwegs, zur Bildung des Kopfes hingegen ist zusätzlich noch die Inhibition des Wnt-Signalwegs nötig. Abbildung übernommen aus (Niehrs *et al.*, 2001)."

Im Seeigel sind es die großen Mikromere, die autonom determiniert sind. Isoliert man diese aus einem Embryo und lässt man sie isoliert wachsen, so entwickeln sie sich zu Skelettzellen. Zudem besitzen sie, wie die dorsale Urmundlippe, induzierende Eigenschaften. Transplantiert man sie an die animale Seite einer

Blastula, so entwickeln sie sich nicht nur zu Skelettzellen, sondern sind auch in der Lage eine zweite Seite für die Gastrulation zu induzieren (Abb. 10). Zellen, die sich normalerweise zu Ektodermzellen entwickelt hätten, werden zu Endoderm “umprogrammiert” und bilden einen zweiten Darm (Ransick & Davidson, 1993).

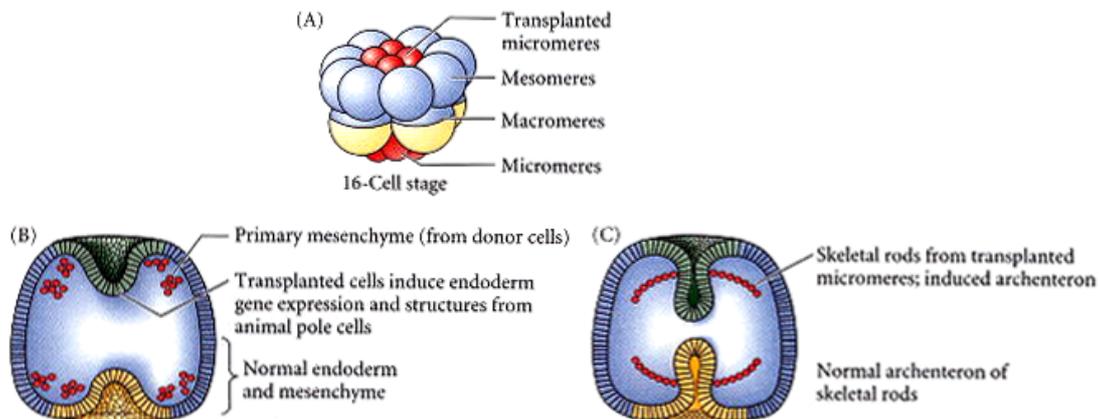


Abb. 10: “Transplantation von Mikromeren: die Mikromere der Seeigel besitzen wie die Urmundlippe induzierende Eigenschaften. Die an die animale Seite einer Blastula (A) transplantierten Mikromere entwickeln sich zu PMCs (B) und induzieren einen zweiten Darm (C). Abbildung übernommen aus (Gilbert, 2003).“

Das Signalmolekül, das verantwortlich für die Spezifizierung der Mikromere und deren induzierende Eigenschaft auf benachbarte Zellen ist, scheint β -Catenin zu sein (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 (siehe I.4.1). Diese Akkumulation ist autonom und findet auch dann statt, wenn die Mikromere vom restlichen Embryo getrennt werden. Mikromere aus Embryonen, bei denen die Anreicherung von β -Catenin im Nukleus, z.B. durch Cadherine, verhindert wurde, besitzen keine induzierenden Eigenschaften mehr (Logan *et al.*, 1999).

4. Der Wnt-Signalweg

Die Entwicklung von Geweben und Organen im Embryo wird kontrolliert durch das Zusammenspiel mehrerer Signalwege, die untereinander in Verbindung (“cross-talk“) stehen und für die Lage sowie das Schicksal einer Zelle verantwortlich sind. Einer der wichtigsten Signalwege ist dabei der Wnt-Signalweg, unter anderem weil er eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren im Menschen spielt (Lustig & Behrens, 2003).

Seit der Identifizierung des ersten Wnt-Liganden wurden eine Reihe weiterer Homologe identifiziert. So kennt man inzwischen 19 unterschiedliche humane und murine *Wnt*-Gene, in *Drosophila* wurden bislang sieben *Wnt*-Gene beschrieben. Insgesamt sind bisher nahezu 100 *Wnt*-Gene isoliert worden. Alle *Wnt*-Gene codieren für Proteine mit Signalsequenz und einem nahezu unveränderlichen Muster von 23 Cysteinresten.

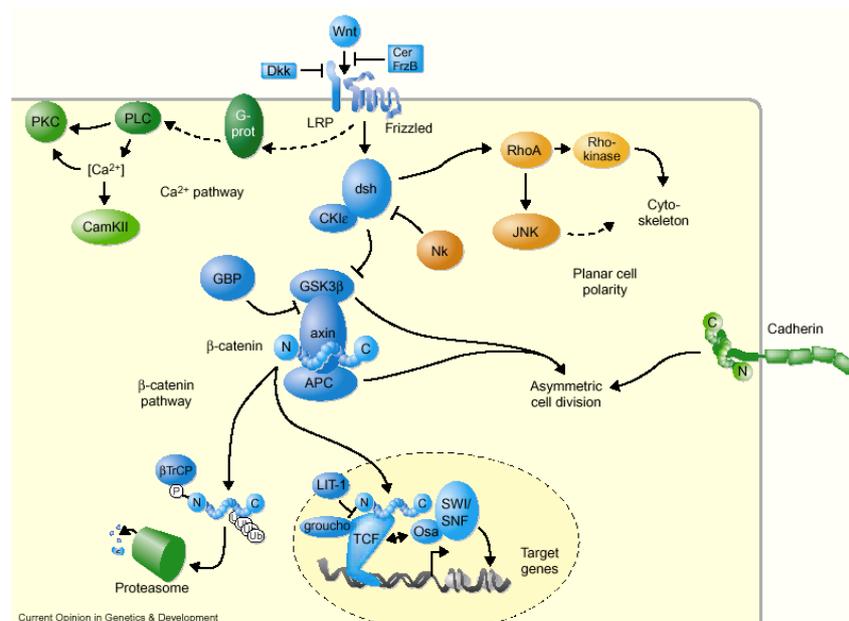


Abb. 11: "Modell der Wnt-induzierten Signalübertragung: der klassische (kanonische) Wnt/ β -Catenin-Signalweg (blau), der PCP-Signalweg (orange) und der Ca^{2+} -Signalweg (grün). Abbildung übernommen von (Huelsen *et al.*, 2001)."

Die sekretierten Glykoproteine der konservierten Wnt-Familie können in den parakrinen Zielzellen drei verschiedene Signalkaskaden aktivieren (Huelsen *et al.*, 2001): den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg, der über ein trimeres G-Protein zu einem erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und zur Aktivierung der Proteinkinase C und der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II führt (siehe Abb. 11, grün), den "planar cell polarity (PCP)"-Signalweg, der die Organisation und den Aufbau des Zytoskeletts über die kleinen GTPasen Rho und Rac und damit die planare Zellpolarität reguliert (Abb. 11, orange) und den klassischen oder kanonischen Wnt-Signalweg, der die cytosolische Konzentration des transkriptionsaktivierenden β -Catenin und so die Expression von Zielgenen steuert (Abb. 11, blau).

Je nachdem, ob sie vorzugsweise den klassischen Wnt-Signalweg aktivieren oder im Allgemeinen über den PCP- oder Ca^{2+} -Signalweg agieren, unterscheidet man transformierende und nicht-transformierende *Wnt*-Gene.

4.1 Der Wnt-Signalweg während der Embryogenese

Der Wnt-Signalweg spielt eine besonders wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung sowohl von Vertebraten als auch Invertebraten, wo er notwendig ist, um die anterior-posteriore Achse zu etablieren.

Zentrale Bedeutung innerhalb dieses Signalwegs hat die Regulation des zytosolischen β -Catenin-Spiegels und die Interaktion von β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren. Der zytosolische β -Catenin-Spiegel wird durch Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β), einer zytoplasmatischen Serin-/Threonin-Kinase, im Komplex mit APC und Axin kontrolliert. GSK3 β phosphoryliert zytosolisches β -Catenin und markiert es so für die Ubiquitinierung und die anschließende Degradierung durch das Proteasom (Hamada *et al.*, 1999; Aberle *et al.*, 1997).

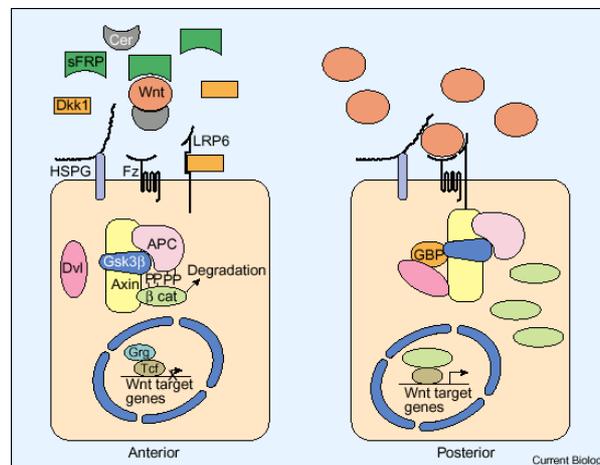


Abb. 12: "Etablierung der anterior-posterioren Achse durch den Wnt-Signalweg: in anterioren Zellen (links) wird die Expression von Wnt-Zielgenen durch Wnt-Antagonisten verhindert, in posterioren Zellen kommt es aufgrund fehlender Wnt-Antagonisten zur Aktivierung der Zielgene (rechts). Abbildung übernommen aus (Yamaguchi, 2001)."

In posterioren Zellen binden Wnt-Moleküle extrazellulär an Rezeptoren in der Zellmembran, den so genannten Frizzled-Rezeptoren, welche zur Familie der 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren gehören. Daraus resultiert die Aktivierung eines zytoplasmatischen Proteins: Dishevelled. Im aktiven Zustand hemmt dieses

Protein die GSK3 β . Eine Phosphorylierung des β -Catenin unterbleibt und es kommt zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Dadurch dringt β -Catenin in den Zellkern ein und bindet an Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie, welche in Verbindung mit Korepressoren wie Groucho wirksame Repressoren von *Wnt*-Zielgenen sind (siehe Abb. 12, rechts). Im Komplex mit β -Catenin jedoch aktivieren sie die Transkription der selben *Wnt*-Gene, die sie zuvor noch reprimierten (Eastman & Grosschedl, 1999).

In anterioren Zellen in Vertebraten sorgen reichlich vorhandene sezernierte Inhibitoren der Wnt-Moleküle wie sFRP (secreted Frizzled-related protein), Cerberus, WIF-1 (Wnt inhibition factor-1) und Dickkopf-1 dafür, dass zytosolisches β -Catenin im Multiproteinkomplex mit GSK3 β , APC und Axin vorliegt und dort durch GSK3 β aufgrund nicht aktiven Dishevelleds phosphoryliert und degradiert wird. Die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren liegen zusammen mit Korepressoren vor und somit unterbleibt die Transkription von *Wnt*-Zielgenen (Abb. 12, links).

4.2 Regulation des Wnt-Signalwegs durch Dickkopf

Wnt-Antagonisten können in zwei große funktionale Gruppen geteilt werden: die sFRP-Familie und die Dickkopf-Familie. Die Antagonisten der sFRP-Familie, zu denen die Familien der sFRPs, WIF-1 und Cerberus gehören, binden direkt an Wnts und verhindern, dass diese an den Wnt-Rezeptor binden (Abb. 13, b). Der Wnt-Rezeptor bleibt demnach inaktiviert und damit werden sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Signalwege inhibiert (Kawano & Kypta, 2003).

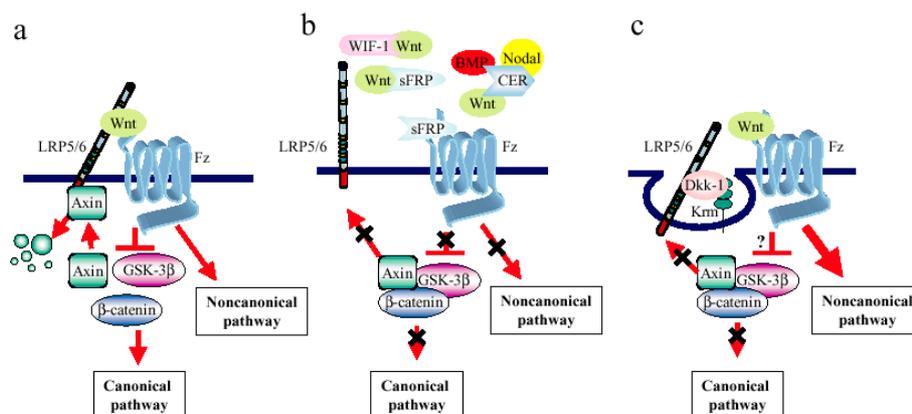


Abb. 13: "Regulation des Wnt-Signalwegs: Aktivierung des kanonischen und des PCP-Signalwegs durch Wnt (a), Inaktivierung derselben durch Antagonisten wie sFRP und WIF-1 (b) und gezielte Inaktivierung des kanonischen Signalwegs durch Dickkopf (c). Abbildung übernommen von (Kawano & Kypta, 2003)."

Antagonisten der Dickkopf-Familie hingegen besitzen keine Fähigkeit zur Bindung von Wnts. Sie inhibieren den Wnt-Signalweg, indem sie an den LRP5/6 (LDL receptor-related protein 5/6)-Korezeptor des Wnt-Rezeptorkomplexes binden und mit einem weiteren Membranprotein, Kremen, einen ternären Komplex bilden (Rothbächer & Lemaire, 2002). Der Korezeptor LRP5/6 wird durch Endozytose von der Plasmamembran entfernt und kann nicht mehr zur Stabilisierung von β -Catenin (durch Bindung an Axin) beitragen (Mao *et al.*, 2001). Dies führt zur Degradierung von zytosolischem β -Catenin und damit zur spezifischen Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs (Abb. 13, C). Die nicht-kanonischen Signalwege werden von den Antagonisten der Dickkopf-Familie - soweit bekannt aus Studien in Vertebraten - nicht beeinflusst.

5. Die Proteine der Dickkopf-Familie

Mitglieder der Dickkopf-Familie wurden inzwischen in Mensch, Maus und Ratte, Huhn, Kaninchen, Frosch, Zebrafisch, *Ciona* und *Hydra* identifiziert. In Maus, Ratte und Menschen besteht die Dickkopf-Familie aus fünf Mitglieder: Dickkopf-1 bis Dickkopf-4 und ein einzigartiges Dickkopf-3-verwandtes Protein, genannt Soggy (Strausberg *et al.*, 2002), während man im Huhn bislang lediglich drei Mitglieder, Dickkopf-1 bis Dickkopf-3 (Sawada *et al.*, 1996), im Frosch nur zwei, Dickkopf-1 und Dickkopf-2 (Glinka *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000), und in Zebrafisch (Hashimoto *et al.*, 2000), Kaninchen (Idkowiak *et al.*, 2004), *Ciona* und *Hydra* (Fedders *et al.*, 2004) bislang jeweils nur ein Protein der Dickkopf-Familie isolieren konnte (Dickkopf-1 im Zebrafisch und Kaninchen, Dickkopf-3 in *Ciona* und *Hydra*). In Nematoden und Fliegen wurden bislang keine Proteine der Dickkopf-Familie gefunden.

5.1 Struktureller Aufbau der Dickkopf-Proteine

Alle Proteine der Dickkopf-Familie besitzen eine N-terminale Signalsequenz und - abgesehen von Soggy - zwei charakteristische cysteinreiche Domänen (CRD1, Dickkopf-Domäne genannt, und CRD2, Colipase-Domäne genannt), getrennt durch eine Linker-Region variabler Länge, mit jeweils zehn konservierten Cysteinresten (Glinka *et al.*, 1998). Insbesondere die CRD2 ist in allen Mitgliedern der Dickkopf-Familie hoch konserviert. Die Positionen der Cysteinreste dieser Domäne sind den Positionen der Cysteinreste der Proteine der Colipase-Familie sehr ähnlich, was auf

eine konservierte Funktion schließen läßt (Aravind *et al.*, 1998). Colipasen vereinfachen die Interaktion von Lipasen und Lipidmicellen, weswegen man annimmt, dass die CRD2 es den Dickkopf-Proteinen ermöglicht, mit Lipiden zu interagieren und somit Wnt-Funktionen zu regulieren. Denn von Wnt-Proteinen ist bekannt, dass sie dicht mit der Zelloberfläche assoziiert bleiben (Smolich *et al.*, 1993). Eine Wechselwirkung mit den Membranlipiden könnte Wnt/Dickkopf-Interaktionen vereinfachen.

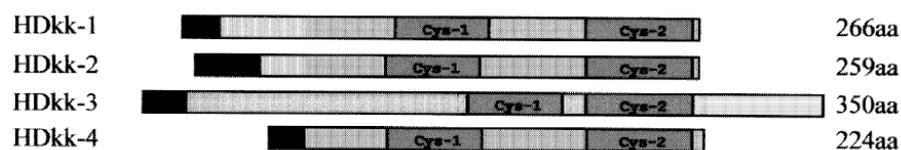


Abb. 14: "Schematischer Vergleich des strukturellen Aufbaus der humanen Dickkopf-Proteine: N-terminale Signalsequenz (schwarz), Dickkopf-Domäne (Cys-1) und Colipase-Domäne (Cys-2). Abbildung übernommen von (Fedders *et al.*, 2004)."

Die Linker-Region zwischen den beiden cysteinreichen Domänen hingegen ist höchst variabel und besitzt bei Dickkopf-1, -2 und -4 eine Länge von 40 bis 55 Aminosäuren, während sie bei Dickkopf-3 stets eine Länge von 12 Aminosäuren besitzt (Krupnik *et al.*, 1999).

Der C-terminale Bereich ist bei Dickkopf-1, -2 und -4 mit drei Aminosäuren (eine Ausnahme bildet Dickkopf-4 im Menschen, dort sind es sechs) sehr kurz, bei den Dickkopf-3-Proteinen hingegen ist der C-terminale Bereich mit 65 bis 73 Aminosäuren (eine Ausnahme bildet Dickkopf-3 in der *Hydra*, dort sind es lediglich acht Aminosäuren) wesentlich länger (Abb. 14).

5.2 Funktion der Dickkopf-Proteine

Das bestuntersuchte Mitglied der Dickkopf-Familie ist Dickkopf-1. Überexpression von Dickkopf-1 in Verbindung mit Injektion eines BMP-Antagonisten induziert komplette zweite Achsen inklusive Kopf im Froschembryo (Abb. 15, A). Injektionen von Anti-Dickkopf-Antikörpern zwecks Protein-"Knock-downs" hingegen führen zu Microcephalie bzw. zu Embryonen ohne Kopf (Abb. 15, B), wohingegen Überexpression von Dickkopf-1 in Embryonen von Frosch und Zebrafisch zu verkürzten Rumpfen und vergrößerten Köpfen (Glinka *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2000) führt. In allen Spezies, in denen Dickkopf-1 bisher isoliert wurde, konnte

nachgewiesen werden, dass es den Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibiert (Fedi *et al.*, 1999; Krupnik *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000). Zudem wird Dickkopf-1 stets im jeweiligen Organisatorbereich exprimiert. Jedoch ist Dickkopf-1 nicht nur ein wirksamer Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, sondern selber auch Zielgen eben dieses Signalwegs (Shinya *et al.*, 2000; Niida *et al.*, 2004). Des Weiteren scheint Dickkopf-1 auch eine Rolle in der Tumorsuppression durch p53 zu spielen. Der Dickkopf-1-Promoter besitzt ein "p53-responsive element" und die Expression von Dickkopf-1 kann durch p53 induziert werden (Wang *et al.*, 2000). Zudem verstärkt genotoxischer Stress, induziert durch UV oder chemotherapeutische Reagenzien, ebenfalls die Expression von Dickkopf-1 (Shou *et al.*, 2002).

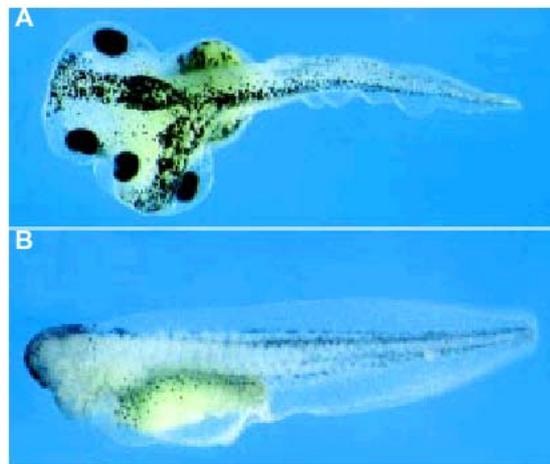


Abb. 15: "Kopfinduktion durch Dickkopf-1: injiziert man *Xenopus*-Embryonen Dickkopf-1-mRNA zusammen mit mRNA eines BMP-Antagonisten wird ein kompletter zweiter Kopf gebildet (A). Injektionen von anti-Dickkopf-1-Antikörpern führt zu Embryonen ohne Kopf (B). Abbildung übernommen aus (Niehrs *et al.*, 2001)"

Im Gegensatz zu Dickkopf-1 ist Dickkopf-2, obwohl es auch die Fähigkeit besitzt, LRP5/6 und Kremen zu binden, kein wirksamer Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Darüberhinaus haben Versuche im Frosch mit ektopischer Expression von Dickkopf-2 gezeigt, dass es den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren kann (Wu *et al.*, 2000). Dickkopf-3 hingegen scheint keine - weder aktivierende noch inhibierende - Rolle beim Wnt-Signalweg zu spielen und ist auch nicht fähig LRP5/6 oder Kremen zu binden (Mao *et al.*, 2001). Dickkopf-4 besitzt ebenfalls Aktivität als Wnt-Antagonist und kann in seiner Wirkung nicht von Dickkopf-1 unterschieden werden. Soggy besitzt lediglich mit den Dickkopf-3-Proteinen in der N-terminalen Domäne Sequenzähnlichkeit, ist spezifisch in sich entwickelnden

Spermatozyten exprimiert und scheint eine Rolle in der Spermatogenese zu spielen (Kaneko & DePamphilis, 2000).

6. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch im Seeigel (*Strongylocentrotus purpuratus*) Homologe der Dickkopf-Gene vorhanden sind, um diese ggf. zu isolieren und zu sequenzieren.

Des Weiteren sollte mittels *in situ* Hybridisierung das Expressionsmuster sowie durch quantitative "real-time"-PCR ein Expressionsprofil der Dickkopf-Gene bestimmt werden, um erste Informationen über deren Funktion während der Embryogenese des Seeigels zu erhalten.

Darüberhinaus sollten Lithium- und Zink-"Mutanten" hergestellt werden und ebenfalls *in situ* Hybridisierungs- und "real-time"-PCR-Studien durchgeführt werden, um eine eventuelle Involvierung der isolierten Dickkopf-Gene in bekannten Signalwegen aufzudecken.

Zudem sollten die Proteinsequenzen bestimmt werden, um durch Vergleich mit den bereits bekannten Dickkopf-Proteinen Aussagen über die evolutionäre Entwicklung von Dickkopf-Proteinen machen zu können.

II. Material

1. Chemikalien, Enzyme, Radioaktive Isotope und Zellen

Chemikalien

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
• Agarose	Invitrogen	#15510-019
• Ampicillin	Sigma	#A9393
• Anti-Digoxigenin-AP	Roche	#1093274
• BCIP	Sigma	#B8503
• BD-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-11-dUTP	Roche	#1277073
• Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	#1.06585.5000
• DMF	Merck	#1.03053.1000
• dNTPs	Pharmacia	#27-2035
• DTT	Sigma	#D9779
• EDTA	Sigma	#E4378
• Ethanol	Merck	#1.00986.2500
• Ethidiumbromid	Sigma	#E1510
• 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
• Kanamycin	Sigma	#K4000

• Lithiumchlorid	Merck	#1.05679.0250
• LMP-Agarose	Roth	#6351.1
• LPA	Sigma	#5-6575
• Magnesiumchlorid	Merck	#1.05833.1000
• Magnesiumsulfat	Merck	#1.05886.1000
• 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
• RNA Storage Solution	Ambion	#7000
• RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega	#N2511
• Salzsäure	Merck	#1.09057.1000
• Schafsserum	Sigma	#S2263
• SDS	Merck	#8.22050.2500
• Streptomycin	Sigma	#S1277
• TRIS	Merck	#1.08382.0500
• Trizol	Gibco BRL	#15596-018
• Tween 20	Sigma	#P9416
• X-Gal	Sigma	#B9146
• Zinksulfat	Fluka	#83265

Enzyme

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
• Calf Intestine Alkaline Phosphatase	New England Biolabs	#M0290S
• DNA Polymerase I (Klenow)	New England Biolabs	#M0210S

• TURBO DNase	Ambion	siehe Kits
• EcoRI / EoRI Puffer	New England Biolabs	#R0101S / #B0101S
• PstI / NEB3 Puffer	New England Biolabs	#R0140S / #B7003S
• T4 DNA Ligase / T4 DNA Ligase Puffer	New England Biolabs	#M0202S / #B0202S
• M-MLV Reverse Transkriptase / Reverse Transkriptase Puffer	Promega	#M531A
• RNase A	Quiagen	siehe Kits
• Sp6 Polymerase	Roche	#810274
• Taq DNA Polymerase	Stratagene	#600131
• XbaI / NEB2 Puffer	New England Biolabs	#R0145S / #B7002S

Radioaktive Isotope

Name	Vertreiber
• α - ³² P-dATP	Amersham

Zellen

Name	Genotyp	Vertreiber
• E. coli 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</i> g Z Tn10]	Gibco BRL
• E. coli 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. DNA-Längenmarker, Vektoren und Primer

DNA-Längenmarker

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

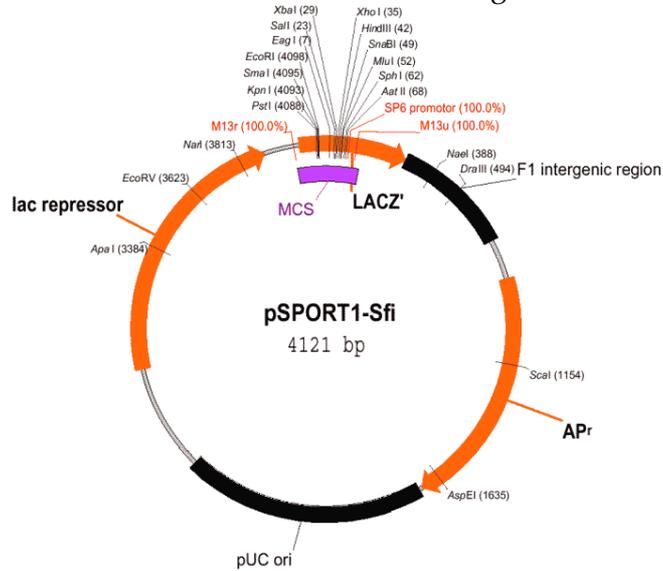
Vektoren

Name

Vertreiber

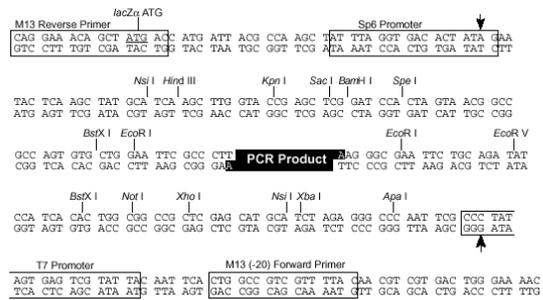
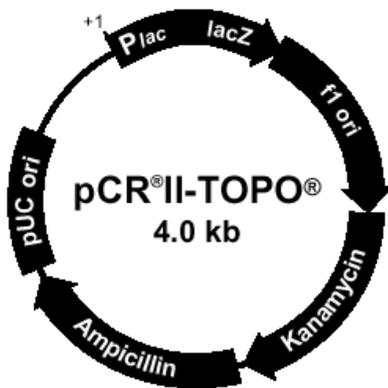
- pSport1-Sfi

Life Technologies

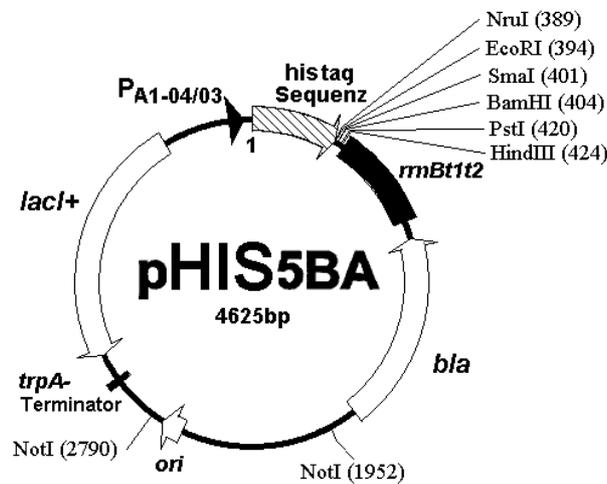


- pPCR II-TOPO

Invitrogen



- pHis5BA



Primer für die Filterhybridisierung

Name	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
SpDkk_FW	TTgTTCTTTCTAgCTCgCCAg	56
SpDkk_REV	gCCTCAATATCggCTTgTTCC	58

Primer für die Sequenzierung

Name	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
M13-FW	TgTAgggggAAAgCggTCgACCgCATTATCg	65
M13-REV	CCCCAggCTTTACACTTTATgCTTCCggCTCg	65
pHis5BA-FW	gAgTgTTgACTTgTgAgCgg	49
pHis5BA-REV	gggACCACCgCgCTACTgCCgCCAggC	49
Dkk_REV2	CCAAGTCAgggAATATACATCAAAG	49
Dkk_in_FW	CACATTTTggACCAgAgATgTTg	48
Dkk_in_REV	gAgAAgCTCTTCgACCTCgC	51
Dkk_in_REV2	CCATgCAAAATgCAGAgATgAg	48
Dkk_in_REV3	gTATgTCATgTgATAATggTCAcg	49
Dkk_in_REV4	gCgTCAAAACCTTTTCgATTTTgg	49
Dkk_in_REV5	gTAATTATCACCTTggCAATggC	48
Dkk_in_REV6	AgCgTTTCTCTCTACCTgCC	49
Dkk_in_REV7	gggTTgAgCCTCgAATCCTg	51

Primer für die QRT-PCR

Name	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
QPCRMito_FW	ACTCTCTCCTCggAgCTATA	47
QPCRMito_REV	gTATAATTTTgCgTATTCggC	44
QPCRZ12_FW	AgTCgTCCAGCCATgTCTTT	47
QPCRZ12_REV	AAgCACACCTCgCACCTATC	49
QPCRDkkCRD1_FW	CAGAAAgTCgCATCgTCgTTg	49
QPCRDkkCRD1_REV	TTTgCACggCAGTgTTgTAgg	49
QPCRDkk_FW	AAgCACCgATCAAgTggCA	46
QPCRDkk_REV	TCgACCggAAgCgACAgTAAT	49

Primer für die Herstellung der "antisense"-RNA-Sonden

Name	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
Dkk_5pr_FW	gAACTACGAgTTACTCATgCg	47
Dkk_5pr_REV	ATCggAACTgATgggggATg	49
Dkk_3pr_FW	TggTgAgATgCGAATggTATg	47
Dkk_3pr_REV	TTACgTCACACACTggTCATC	47

Primer für die Herstellung der Expressionskonstrukte

Name	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
all_EcoRI_FW	gTgAATTCATggCggCTCCTTCTgCAATTTTA	57
all_PstI_REV	TgACTgCAgTCATAATACAgTAACTggCTggC	58
cterm_EcoRI_FW	TAgAATTCAAgAAACgCgATCgTCTCACggAT	57
nterm_PstI_REV	ATTCTgCAgTCATgTgAACggTTCTCTCCTC	58
dom_EcoRI_FW	gAgAATTCAGAACACTggTgCTATgTgAggCA	58
dom_PstI_REV	AAACTgCAgTCAGAAATCggAACTgATgggg	58

3. Kits, Lösungen und Medien**Kits**

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
• QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden	#27106
• QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden	#28106
• QIAexII [®] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden	#20021
• TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen	#K460001
• TURBO DNA-free [®] Kit	Ambion	#1907
• SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystem	#4309155

Lösungen für die Filterhybridisierung1x TM

250 mM TRIS - HCl (pH 8.0)

25 mM MgCl₂

50 mM β-Mercaptoethanol

2x RP

438 mM HEPES (pH 6.6)

43,8% TM (v/v)

0,26 mg/ml BSA

à 0,08 mM dCTP, dGTP, dTTP

0,05 OD/ml Hexanukleotide

Church-Puffer250 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2)

5% SDS (w/v)

1 mM EDTA

Waschpuffer20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2)

0,1% SDS (w/v)

1 mM EDTA

Stripping-Puffer20 mM Na₂HPO₄

0,1% SDS (w/v)

Lösungen für die WMISHkünstliches Seewasser

0,5 M NaCl

0,01 M KCl

0,02 M MgCl

0,03 M MgSO₄

0,01 M CaCl

0,0025 M NaHCO₃Färbelösung

0,1 M TRIS - HCl (pH 9.5)

0,1 M NaCl

0,05 M MgCl₂

10% DMF (v/v)

4,5 µl/ml NBT

3,5 µl/ml BCIP

Blockierlösung 1

0,1 M MOPS (pH 7.0)

0,5 M NaCl

0,1% Tween20 (v/v)

10 mg/ml BSA

Fixierlösung

0,1 M MOPS (pH 7.0)

0,5 M NaCl

0,1% Tween20 (v/v)

4% PFA (w/v)

Blockierlösung 2

0,1 M MOPS (pH 7.0)

0,5 M NaCl

0,1% Tween20 (v/v)

1 mg/ml BSA

10% Schafsserum (v/v)

Antikörperlösung

0,1 M MOPS (pH 7.0)

0,5 M NaCl

0,1% Tween20 (v/v)

1 mg/ml BSA

10% Schafsserum (v/v)

1:2000 Anti-DIG-Antikörper (v/v)

AP Puffer (pH 9.5)

0,1 M TRIS - HCl (pH 9.5)

0,1 M NaCl

0,05 M MgCl₂

0,1% Tween20 (v/v)

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)

Sonstige Lösungen1x TAE

40 mM TRIS – Acetat (pH 7.5)

1 mM EDTA

1x TE

10 mM TRIS - HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

Gelladepuffer

4 mM TRIS – Acetat (pH 8.0)

0,2 mM EDTA

0,25% Bromphenolblau (w/v)

50% Glycerin (v/v)

10x PCR-Puffer

350 mM TRIS – Acetat (pH 9.0)

150 mM TRIS – HCl (pH 9.0)

500 mM KCl,

15 mM MgCl₂

1% Tween20 (v/v)

1x TEN9

50 mM TRIS-HCl (pH 9.0)

0,1 M EDTA

0,1 M NaCl

Medien

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
<ul style="list-style-type: none"> LB Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) 	QBio-Gene	#3001-032

- | | | |
|--|-----------|-----------|
| <ul style="list-style-type: none"> • LB Agar
(10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Bacto-Agar) | QBio-Gene | #3001-232 |
| <ul style="list-style-type: none"> • 2YT Medium
(16 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) | QBio-Gene | #3012-032 |
| <ul style="list-style-type: none"> • 2YT Agar
(16 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Bacto-Agar) | QBio-Gene | #3012-232 |

SOC Medium

20 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

20 mM Glucose

10 mM MgSO₄

10 mM MgCl₂

4. Geräte und Zubehör

Geräte

Name	Hersteller
• Brutschrank	Heraeus
• Confocal-Mikroskop	Zeiss
• Elektroporator	Biorad
• Heizblock	Eppendorf
• Magnetrührer	Heidolph
• Mikroskop	Leica
• pH-Meter	Mettler Toledo
• Phosphor Imager-Platten	Molecular Dynamics
• PhosphorImager SI	Molecular Dynamics
• Photometer	Amersham
• Präzisionswaage	Mettler Toledo
• Schüttler	New Brunswick Scientific
• Speed Vac	Savant

- Thermocycler MJ Research Incorporated
- Tischzentrifuge Eppendorf
- Ultrazentrifuge Beckman Coulter
- UV-Illuminator Alpha Innotech
- Vortexer Bender & Hobein

Zubehör

Name	Hersteller / Vertreiber	Katalog-Nr.
• 1L Filter System	Corning Incorporated	#431098
• 24 Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporated	#3524
• ABI Prism Optical 96-Well Reaction Plates	Applied Biosystems	#4306737
• ABI Prism Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems	#4311971
• Gene Pulser Cuvettes	Biorad	#165-2089
• Polyethyleneimin-Papier	Macherey Nagel	#801052

5. Datenbank-Zugangsnummern

Protein	Zugangs-Nr.	Protein	Zugangs-Nr.
• HsDkk1	AAF02674.1	• MmDkk1	NP_034181.2
• HsDkk2	AAF02675.1	• MmDkk2	NP_064661.2
• HsDkk3	AAF02676.1	• MmDkk3	NP_056629.1
• HsDkk4	AAF02677.1	• MmDkk4	NP_663567.1
• HsSoggy	BAB12400.1	• MmSoggy	NP_056604.2
• GgDkk1	XP_421563.1	• XlDkk1	AAC02427.1
• GgDkk2	XP_420494.1	• XlDkk2	CAC17815.1
• GgDkk3	NP_990456.1	• DrDkk1	AAD22461.1
• HmDkk3	AAQ91437.1	• CiDkk3	ci0100149464

III. Methoden

1. Seeigelhaltung und Embryongewinnung

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.

Zum Ablachen wurden adulten Seeigeln 0,5 ml einer 0,5 M KCl-Lösung in beide Coelomhöhlen injiziert. Die Weibchen, zu erkennen an den orang-gefärbten in großen Mengen austretenden (hervorgerufen durch Kontraktion der Gonadenmuskulatur) Eiern, wurden auf mit Millipore 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.

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 wenigstens 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.

Sollten Embryonen der Furchungsstadien gewonnen werden, so wurden die Eier in Gegenwart von 1,88 mM PABA befruchtet und dann kultiviert. Die Embryonen der gewünschten Stadien wurden dann durch 70 µm Nitex-Membranen gefiltert, wobei die Embryonen aus der Befruchtungsmembran, welche an der Nitex-Membran hängenblieb, herausschlüpften.

Die befruchteten Eier wurden bis zu einer Dichte von 1 - 2 x 10⁷ 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.

Zur Herstellung der Lithium- bzw. Zink-“Mutanten“ wurden zu den Kulturen LiCl (30 mM Endkonzentration) bzw. ZnSO₄ (500 µM Endkonzentration) hinzugefügt. Bei

“Mutanten“-Kulturen, die länger als 21 Stunden gezüchtet wurden, wurde das LiCl bzw. ZnSO₄ rausgewaschen, indem die Embryonen am Boden gesammelt wurden, das LiCl- bzw- ZnSO₄-haltige Seewasser vorsichtig abgenommen und durch frisches Seewasser ausgetauscht wurde. Nachdem sich die Embryonen wieder am Boden abgesetzt hatten, wurde das Seewasser wieder abgenommen und erneut durch frisches Seewasser ersetzt.

2. Fixierung der Embryonen für die WMISH

Die Embryonen wurden in 200 ml-Portionen gesammelt, entweder durch vorsichtiges Zentrifugieren abgesetzt oder auf 53 µm Nitexmembranen konzentriert und zweimal mit gefiltertem Seewasser bei 4 °C gewaschen. Es wurde möglichst viel Seewasser entfernt und 10 ml Fixierlösung, 1:1 verdünnt mit Seewasser, welches 4% PFA (w/v) enthielt, hinzugegeben. Die Embryonen wurden zwei- bis dreimal aufgewühlt und dann für zwei Stunden bzw. über Nacht, abhängig vom Embryostadium, 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. Wenn die Embryonen anfangen zu aggregieren, so wurden sie durch Auf- und Abpipetieren mit einer Pasteurpipette wieder getrennt. Die fixierten Embryonen wurden bei 4 °C in 70%igem Ethanol gelagert.

3. Gelelektrophorese und photometrische Messung

3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Somit kann überprüft werden, ob z.B. eine PCR erfolgreich war, d.h. ein Konstrukt erwarteter Größe auf dem Gel sichtbar ist.

Die Trennung der Nukleinsäuren erfolgt über die Wanderungsgeschwindigkeit in der netzartigen Gelmatrix, welche durch Agarose, ein Polysaccharid, gebildet wird. Diese hängt zum einen von der absoluten Masse zum anderen auch von der Form (superhelikal, offen etc.) der Nukleinsäuren ab. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wird die Agaroselösung mit Ethidiumbromid versetzt, welches mit den Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert und somit eine

Detektion ermöglicht. Zur Größen- und Mengenreferenz wird ein DNA-Längenmarker definierter Größe und Menge verwendet.

0,5 g Agarose wurden in 50 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und vollständig gelöst. Anschließend wurde die Agaroselösung mit 5 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt, in die Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm gezogen und das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutragenden Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, in die Taschen pipettiert und eine Spannung von 20 V angelegt, wobei die Nukleinsäuren zur Anode wandern. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNA bzw. RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Kamera-Systems dokumentiert.

3.2 Photometrische DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

UV-Licht wird von DNA und RNA aufgrund der zyklisch konjugierten π -Elektronen ihrer Pyrimidin- und Purinbasen absorbiert. Das Absorptionsmaximum liegt bei Nukleinsäuren bei 260 nm. Anhand der Absorption lässt sich daher die DNA-Konzentration einer Lösung bestimmen, wobei eine A_{260} von eins einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Des Weiteren lässt das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} (Absorptionsmaximum von Proteinen) auf die Reinheit einer Nukleinsäurelösung schließen. Es sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte die Messung der OD mit Hilfe des NanoDrops®. Dieses Gerät benötigt im Gegensatz zu herkömmlichen Photometern lediglich 1 µl einer Nukleinsäurelösung. Als Leerwert diente DNA- und RNA-freies Wasser.

4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.1 Amplifizierung von DNA

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 – 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 - 80 °C statt. Durch Auswahl von "forward"- und "reverse"-Primer wird eine definierte Sequenz amplifiziert.

Für die Amplifizierung von DNA für die Filterhybridisierung wurden zu 50 µl PCR-Mix 1 µl ungefähr 50 ng genomische DNA hinzugefügt. Als Vorlage für die Amplifizierung der Expressionskonstrukte diente ungefähr 1 ng entsprechender Plasmid-DNA. Der PCR-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

PCR Mastermix (50 µl):

- 1,67 µl "forward"-Primer (5 pmol/µl)
- 1,67 µl "reverse"-Primer (5 pmol/µl)
- 0,50 µl dNTPs (10 mM)
- 15,03 µl Betaine (5 M)
- 0,50 µl Taq DNA Polymerase (10 U/µl)
- 5,00 µl 10x PCR Buffer
- 25,63 µl ddH₂O

Der Thermocycler wurde benutzt, um folgendes Programm durchzuführen:

- 30 sec bei 96 °C
- 3 min 30 sec bei 65 °C
- 29 Zyklen:
 - 25 sec bei 96 °C
 - 3 min 30 sec bei 65 °C

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel (siehe III.3.1) überprüft.

4.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits: fünf Volumen von PB-Puffer wurden zu einem Volumen des PCR-

Ansatzes gegeben und gemischt. Die Probe 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. Die Säule wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß 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.

5. Extraktion genomischer DNA

Gefrorene Seeiglembryonen wurden mit flüssigem Stickstoff gemischt, in einen vorgekühlten Mörtel überführt und mit einem ebenfalls vorgekühlten Pistill zermahlen. Zu dem entstandenen Pulver wurden unter ständigem Rühren langsam 40 ml 1x TEN9-Puffer gegeben. RNase wurde zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt und die Lösung für 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden Proteinase K (Endkonzentration: 1 mg/ml) und SDS (Endkonzentration: 1%) hinzugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 50 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Proteine wurden durch zweimaliges Waschen mit gleichem Volumen Phenol und anschließender Waschung mit gleichem Volumen Chloroform entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol und Natriumacetat (Endkonzentration 100 mM) präzipitiert, um einen Plastikstab gespult, mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 100 µl 1x TAE-Puffer gelöst.

6. Filterhybridisierung

6.1 Probendesign

In der genomischen Seeigeldatenbank des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik (http://www.molgen.mpg.de/~ag_seaurchin/) wurde nach einer Sequenz gesucht, welche eine hohe Homologie zu der Sequenz des murinen Dickkopf-1-Gens (NM_010051.2, siehe II.5) besitzt. Innerhalb des gefundenen Contigs wurde nach dem längsten ORF gesucht und Primer (SpDkk_FW und SpDkk_REV, siehe II.2) generiert, die diesen Bereich abdeckten. Der längste gefundene ORF ist 579 bp lang, die Probe ist 559 bp lang und deckt nahezu den gesamten ORF ab (Abb. 16).

```

1      gaaacaataaccgcatcgctcaacttcccattttcacacggttaaaatagaatattaccgt      60
61     tagaatgaccacaatctattgcaagaactatacaatacgcgctgggtatataatattctgg      120
121    actatatagagggttatgacaaaatttaacaaacggttggattagagactaatacagatttt      180
181    tatggttaaggggtgtggctctgggaagccattaaatcttttgagccgtgttctgaagcca      240
241    aattccttgaacaatgacacaggagagggccatttgccaaggtgataattacaagaaataga      300
301    ttttccgatgtcattaaatcatcactttcacctcttttgctttcattttgaatctaata      360
361    aactattgatttaacggctatttcttgtaataagagtggtcctaacttcattgccagttc      420
421    ctaacccttccaagctcagctgtgtatcatcgatattcgaatgttccggttagccattaa      480
481    tttatgattcgaacaaggtttcagggaaaaggtaaaacgcagatattactactttcaacgc      540
541    aaagcataaaaacgcataacttatttttttttaataaaaccaaaccacaaaacacaaacag      600
601    ggaaaatatctcgcatttcaacaggaaattaagttcggcagtaaatgtaaacaaggaaat      660
661    tgtgaatcggttgattctcagatcggacatattgatagatttatagcttaagataaccaag      720
721    ttaagaaaaaagaaactaaaaaggaaaaaacaaaacacaaaatcgaaaaggttttgac      780
781    gcaaaggtgtcactttcaatgttccaagaataacttttgatcaaaaagtgacactatac      840
841    tcggccttatcatgactgtaagcgactacaaaaatacatatctcgaaaacagtttcata      900
901    ttaatgttgcacctaaagtctgtgcattgtaacgaattttacgaaggataatacgaaca      960
961    agtataagctttaagcatgcaatacagcctcatgtctattccgataaatcctctaattt      1020
1021   aagtataattgggtacataaatataacaaaattaaaacgaaccgctcgtaagaactgattac      1080
1081   tatagctcttactggaatcataaataatttttaaatcataaacaaaatcgttttcgaata      1140
1141   tgggtgtaacatcgatatagaaatatcttaccgctgttatgtacaaaacagaaaataata      1200
1201   catattctcaaatataagggtactatataattgctccataacaattagaaatcaaactgaa      1260
1261   tttactgttggcatggatacaacatggttcacgtgacctttatcacatgacatacaacatg      1320
1321   ttcacgtgaccagtatcacatgacataacgtgattgagagttgggttatataacttaaatc      1380
1381   aatagagagatatcacatgattgatgtgttacgtcacacactggtcatccacgccacat      1440
1441   gaatacaatgataagttttacatgtgcactgccttaaacgtcagtgatataattcatatct      1500
1501   gaatacagatttcaatctcttagaatttaacatcgattttgatatacacttattatcatt      1560
1561   tttgccagtgcaattttcgaggctagatgccctgatataagattgatgcaaatataaacat      1620
1621   aaacataactaacgttacgtgtctcataaataataaccatgattaataaattaagtacaat      1680
1681   agttgtgaaaatatccttttatataaattaagtgttttggttggttatcatgaaatgctata      1740
1741   ttaaatacaaaactgtgactaataaagccagaatcttacccttaatacattagagaaagt      1800
1801   tacttcttacttagattttctcatctctgcattttgcatggtcgcactggaagacctgca      1860
1861   gttaaatgacatcgcaatatgaccctctgtattatcgattagttaaacagataccataa      1920
1921   ctcagctcatcatgaccgacaagcactctctataactcgtttgctttctccataaccgca      1980
1981   ccaatcatattttatctatttttcataaagtggaacaatcgagcgagatttttcgaatg      2040
2041   gcgacactgcttgaggagattttaagagcggcgacagacagggagaggttcggcagtgaa      2100
2101   acggcttcatcaaggagttgggtttacttttccaattagcgatgtctgactgttccgact      2160
2161   ccccgtaaagggtctggcgcccgctctatgattgtcttctcatcatattcggattatcc      2220
2221   tctcatcattttgcgcaagatgctcatcataccattcgcacatctcaccatcttgctacctc      2280
2281   atcaagtcatacagaaggatcatggtgatcataatacaggttaactggctggcctcaatatc      2340
2341   ggcttgttccggttcgcgtaatttcggttgtgtcctgtacgcccgtgctttcaatttctc      2400
2401   gcgacactgcttgaggagattttaagagcggcgacagacagggagaggttcggaagcgttctcgc      2460
2461   tgattccgcccagagaggtagccaaggaggtcgcctgcttcttctgctcggaaagcggcgaat      2520
2521   cttttcgaccggaagcgacagtaaatctctcgcgctgtgacaaggtttcacctgtgcagc      2580
2581   gccctctccgccaactcgttccgtgctggtgccaactcgaatcggctgcttgaacggttggca      2640
2641   gacgtggaggcggcgttcgggaacagaatcgcgcttgcaaggagagaccttgcaaacactc      2700
2701   gcatcgctggaagacatccgtgagacgatcgcgcttcttgggtgcagatgtccccctcttc      2760
2761   caqcatcggcttacacattttggaccagagatgttgaacgcagcacaacaaacgctcctcga      2820
2821   cgatacagatgaagaacactgctcacctggcgagctagaaagaacaaaaaaaaaaaaaa      2880
2881   aaacattgattaagaaaaacagacaggaaactcgagttcagaggggtgtcgatttccgaaa      2940
2941   gcccccaa      2948

```

Abb. 16: "Nukleotidsequenz von Contig50680: innerhalb befindet sich ein ORF, der große Homologie zu murinem Dickkopf-1 zeigt (unterstrichen). Ein Teil dieses Bereichs diente als Sonde (blau)."

Nach Amplifizierung der Probe per PCR (siehe III.4.1) aus genomischer Seeigel-DNA wurde die Probe mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits aufgereinigt (siehe III.4.2).

6.2 Probenmarkierung

Die Markierung der per PCR erhaltenen Probe von ungefähr 600 bp Länge erfolgte durch "random primed labeling" (Feinberg & Vogelstein, 1983). Bei dieser Methode wird die DNA-Probe zunächst denaturiert, und anschließend werden kurze Oligonukleotide, welche zufällig an die DNA hybridisieren, hinzugefügt. Dann wird mittels Klenow-Polymerase α - ^{32}P -dATP in die kopierte DNA durch Verlängerung der Hexanukleotidprimer eingebaut.

Ungefähr 100 ng der zu markierenden DNA wurde in einem Endvolumen von 30 μl mit ddH₂O verdünnt, zum Denaturieren für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die DNA-Lösung wurde falls nötig mit ddH₂O auf ein Volumen von 20 μl gebracht und das gleiche Volumen 2x RP-Puffer hinzugefügt. Dann wurden 1 μl α - ^{32}P -dATP (3,000 Ci/mmol) und 2 μl E.coli DNA Polymerase I (10 U/ μl) hinzugefügt und der Reaktionsansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde überprüft, indem 1 μl der Reaktion auf Polyethylenimine-Papier übertragen wurde. Das Chromatographie-Papier wurde anschließend vertikal in ein mit 0,75 M KH₂PO₄-Puffer (pH 3.5) gefüllten Becher gestellt. Nachdem die Laufmittelfront genügend weit gelaufen war, wurde das Papier luftgetrocknet, in Saran-Folie eingewickelt und für 20 Minuten auf Phosphoimager-Platten exponiert.

6.3 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurden die DNA-Membranen bei 65 °C für 20 Minuten in Church-Puffer vorhybridisiert. Dazu wurden jeweils zehn Filter in mit 50 ml Church-Puffer gefüllten Schalen schüttelnd inkubiert. Die Probe wurde mit 10 μl 5 M NaOH-Lösung denaturiert. Der Puffer wurde entfernt und durch frischen Church-Puffer, der die markierte, denaturierte Probe enthielt, ausgetauscht. Die Filter wurden über Nacht bei 65 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal kurz bei RT und zweimal für 20 Minuten bei 65 °C mit 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 0,1% SDS gewaschen.

Anschließend wurden die Filter in Saran-Folie eingewickelt und über Nacht auf Phosphor-Imager-Platten exponiert. Die Platten wurden gescannt und mit dem Image Quant Programm ausgewertet.

6.4 Entfernung der Probe

Die Probe wurde wieder von den Filtern entfernt, indem die Filter zweimal für jeweils 30 Minuten bei 65 °C mit Stripping-Puffer gewaschen wurden. Nach der Probenentfernung wurden die Filter in 1x TE-Puffer bei 4 °C gelagert.

7. Plasmid-DNA-Präparation

Bakterien wurden aus der Bibliothek bzw. von der Agarplatte gepickt und in 5 ml Ampicillinhaltigem (0,2%) LB-Flüssigmedium überführt. Die Bakterienkulturen wurden dann bei 37 °C über Nacht in einem Schüttelinkubator kultiviert.

Die Kulturen wurden für 10 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 Eppendorfgefäß überführt. 250 µl P2-Puffer wurden hinzugefügt und die Eppendorfgefäße vier- bis sechsmal geschwenkt. Die Eppendorfgefäße wurden für 10 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-Eppendorfgefäß 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 DNA wurde bis zur weiteren Benutzung bei 4 °C gelagert.

Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde mittels Agarosegels bzw. photometrisch (siehe III.3.1 und III.3.2) bestimmt.

8. Sequenzierung

8.1 Sequenzierung mittels "primer walking"

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 Sequenzgelelektrophorese durch Anregung mit Laserlicht detektiert werden.

Beim "primer walking" wird ein spezifischer Primer, der eine bekannte Sequenz in der flankierenden DNA bindet, benutzt, um einen ersten Sequenzierlauf in die interessierende DNA-Region zu starten. Die Sequenzierdaten vom anderen Ende des ersten Laufs werden verwendet, um einen zweiten spezifischen Primer zu generieren. Dieser Vorgang so oft wiederholt, bis die gesamte gesuchte Sequenz bekannt ist.

Für eine 10 µl Sequenzierreaktion wurden 100 - 150 ng aufgereinigter Plasmid-DNA als Vorlage verwendet. Zur Vorlage wurden 2 µl Primer (10 pmol/µl) und 2 µl BD Terminator Mix hinzugefügt und der Reaktionsansatz mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt.

Der Thermocycler wurde benutzt, um folgendes Programm durchzuführen:

1 min bei 96 °C

35 Zyklen:

20 sec bei 96 °C

4 min 10 sec bei 60 °C

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 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.

8.2 Sequenzanalyse

Die Sammlung, Verarbeitung und Zusammenfügen der Nukleotidsequenzen wurde mit Hilfe des Staden Assembly Trace Editing Software Packages (Bonfield *et al.*, 1995) durchgeführt. Diese Software beinhaltet Werkzeuge zum Zusammenfügen, Analysieren und Vergleichen von DNA-Sequenzen. Primer wurden mit Hilfe des Primer Selection-Algorithmus OSP (Hillier & Green, 1991), ebenfalls im Softwarepaket enthalten, generiert.

Um die Verbindung einer Sequenz zu einem Gen zu untermauern, wurden die Daten mit dem Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1990) analysiert. Für die Ableitung der Aminosäuresequenz aus der Nukleotidsequenz wurde der ORF Finder, bereitgestellt von NCBI, benutzt. Der ORF Finder ist ein Analysewerkzeug, mit dem sich alle ORFs innerhalb einer Sequenz finden lassen. Die ORFs wurden mit Hilfe des universellen genetischen Codes identifiziert. Das Programm Bioedit diente zur graphischen Darstellung der Nukleotid- und der Aminosäuresequenz.

9. Phylogenetische Analyse

Zur Durchführung der phylogenetischen Analyse wurden neben der von uns bestimmten Dickkopf-Amionosäuresequenz noch weitere Aminosäuresequenzen von Proteinen der Dickkopf-Familie aus anderen Organismen herausgesucht (siehe II.5). Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Proteine der Dickkopf-Familie wurden anschließend mit Hilfe des Programms ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) aligniert.

Die angeglichenen Proteinsequenzen wurden dann unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei, 1987) ebenfalls mittels ClustalX phylogenetisch untersucht. Beim Neighbour-Joining-Verfahren handelt es sich um ein Distanzverfahren, das auf Evolutionsmodellen bzw. Aminosäure-Substitutionsmatrizen basiert. Bei Distanzverfahren werden unter Zuhilfenahme von

Evolutionsmodellen die evolutionären Distanzen zwischen allen Sequenzpaaren eines multiplen Alignments 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. Das Bootstrap-Verfahren ist der am häufigsten verwendete Wiederfindungswahrscheinlichkeitstest. Die Basis des Bootstraps ist der originale Datensatz, von dem 1000 Pseudoreplikate angelegt werden. 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. Für die graphische Auswertung des Stammbaums wurde das Programm Njplot (Perrière & Gouy, 1996) verwendet.

10. RNA-Isolierung

Die Embryonen wurden in einem RNase freien Falcongefäß in 20 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, 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol hinzugefügt, für 15 Sekunden geschüttelt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben ausbalanciert und für 25 Minuten bei 10000 g und 4 °C im JA-12 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues RNase-freies Falcongefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol pro ml Trizol hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln wurde die Probe für weitere 10 Minuten bei RT inkubiert und erneut für 10 Minuten wie beschrieben zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde mit 75%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für 10 Minuten luftgetrocknet und in 1 ml RNA Storage Solution aufgelöst. Die Unversehrtheit der RNA wurde per Gelelektrophorese analysiert und die Konzentration spektrometrisch bestimmt (siehe III.3.1 und III.3.2).

Die gewonnene RNA wurde mit dem TURBO DNA-free[®] Kit behandelt, um sie von DNA-Verunreinigungen zu befreien. Dazu wurden $10\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA mit $5\text{ }\mu\text{l}$ TURBO DNase Buffer und $1\text{ }\mu\text{l}$ DNase versetzt, der Reaktionsansatz mit ddH_2O auf $50\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden $5\text{ }\mu\text{l}$ DNase Inactivation Reagent hinzugefügt, der Ansatz für zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend bei 13000 rpm zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand

wurde abgenommen, erneut die Konzentration bestimmt (siehe III.3.2) aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

11. cDNA-Synthese

Mit Hilfe der reversen Transkriptase und Hexanukleotid-Primern bzw. PolyT-Primern kann RNA in DNA umgeschrieben werden. Als Matrize dient Gesamt-RNA, als Produkt entsteht schließlich ein DNA/RNA-Doppelstrang, welcher anschließend in einer PCR (siehe III.12) als Matrize verwendet werden kann.

Für die Synthese von cDNA wurden zu $1\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA (DNA-frei) $1\text{ }\mu\text{l}$ Hexanukleotid-Primer ($45\text{ U}/\mu\text{l}$) und $2\text{ }\mu\text{l}$ dNTPs (10 mM) hinzugefügt, der Reaktionsansatz mit H_2O DEPC auf $10\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt und für 10 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsansätze auf Eis gestellt und $4\text{ }\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase-Puffer (5x), $4\text{ }\mu\text{l}$ MgCl_2 (25 mM), $0,5\text{ }\mu\text{l}$ RNase-Inhibitor ($20\text{ U}/\mu\text{l}$) und $1,5\text{ }\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase ($200\text{ U}/\mu\text{l}$) hinzugefügt. Anschließend wurde für eine weitere Stunde bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zuletzt wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ H_2O DEPC hinzugefügt und die cDNA bis zur Benutzung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

12. Quantitative real-time PCR

12.1 Primerdesign

Alle Primer für die QRT-PCR wurden mit dem von Applied Biosystems gelieferten Programm Primer Express generiert. Als Referenzgen diente mitochondriale rRNA (QPCRMito_FW und QPCRMito_REV, siehe II.2), die konstant während der Embryogenese vorliegt (Flowers *et al.*, 2004). Zum spezifischen Nachweis von *Dickkopf*-mRNA wurde ein Primerpaar kreiert, das spezifisch einen Teil der *Dickkopf*-Domäne amplifiziert (QPCRDkkCRD1_FW und QPCRDkkCRD1_REV, siehe II.2). Da es sich bei dieser Domäne um einen cysteinreichen Bereich handelt und eine unspezifische Amplifikation anderer cysteinreicher Gene nicht auszuschließen war, wurde ein zweites Primerpaar als Kontrolle designt, welches einen Bereich am Ende des codierenden Bereichs des *Dickkopf*-Gens amplifiziert (QPCRDkk_FW und QPCRDkk_REV, siehe II.2). Um die absolute Anzahl von *Dickkopf*-mRNA berechnen zu können, wurde ein Primerpaar für den Transkriptionsfaktor Z12 (QPCRZ12_FW und QPCRZ12_REV, siehe II.2), für den für

einige Embryonalstadien die absoluten Transkriptzahlen bekannt sind (Wang *et al.*, 1995; Minokawa *et al.*, 2004), hergestellt.

12.2 QRT-PCR mittels SYBRGreen

Mit Hilfe der quantitativen "real-time" PCR ist es möglich, Aussagen über Ausgangs-DNA-Mengen zu machen. Es wird eine PCR durchgeführt, bei der aus Gesamt-RNA synthetisierte cDNA (siehe III.11) 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.

Für die Quantifizierung wurden zu 2 μ l cDNA-Lösung jeweils 1,5 μ l spezifischer "forward"- und "reverse"-Primer (5 μ M) und 12,5 μ l SYBRGreen-Mix hinzugefügt und die Reaktionsansätze mit DNA- und RNA-freiem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Alle Reaktionsansätze wurden in ABI Prism Optical 96-Well Reaction Plates durchgeführt und die Platten anschließend mit den ABI Prism Optical Adhesive Covers verklebt. Für die Standardkurve wurde unverdünnte cDNA-, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 und 1:1024 verdünnte cDNA-Lösungen verwendet. Es wurden pro Verdünnung und Primerpärchen jeweils Triplikate gemessen.

Der ABI 7900HT wurde benutzt, um folgendes Programm durchzuführen:

2 min bei 50 °C

10 min bei 95 °C

40 Zyklen:

15 sec bei 96 °C

1 min bei 65 °C

15 sec bei 95 °C

15 sec bei 65 °C

15 sec bei 95 °C

Die Analyse der QRT-PCR (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 (III.3.1) und durch Aufnahme einer Dissoziationskurve.

12.3 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes "housekeeping Gen" oder ribosomale RNA bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Eine zusätzliche Optimierung erfolgt, indem man die unterschiedlichen "real-time" PCR Effizienzen der untersuchten Faktoren berücksichtigt.

Mit Hilfe der Standardkurven wurden zunächst die Effizienzen wie folgt berechnet:

$$E = 10^{-1 / \text{Steigung der Standardkurve}}$$

Um die absolute Anzahl von *Dickkopf*-mRNA zu bestimmen, wurden die für *Z12* und *Dickkopf* erhaltenen C_T -Werte zunächst gegen die mitochondriale rRNA normalisiert:

$$\Delta C_T (Z12) = C_T (Z12) - C_T (rRNA) \text{ bzw.}$$

$$\Delta C_T (\text{Dickkopf}) = C_T (\text{Dickkopf}) - C_T (rRNA)$$

Mit Hilfe der Effizienzen wurde nun das Verhältnis der Transkriptzahl von *Z12* und *Dickkopf* berechnet:

$$R (\text{Dickkopf}/Z12) = E (\text{Dickkopf})^{\Delta C_T (\text{Dickkopf})} / E (Z12)^{\Delta C_T (Z12)}$$

Die absolute Anzahl der *Dickkopf*-mRNA ließ sich wie folgt berechnen:

$$n (\text{Dickkopf}) = R (\text{Dickkopf}/Z12) * n (Z12)$$

War für ein Stadium die absolute Anzahl der *Z12*-Transkripte nicht bekannt (*u*), so wurde sie wie folgt mit Hilfe der bekannten Stadien (*b*) berechnet:

$$n (u) = n (b) * E (u)^{\Delta C_T (u)} / E (b)^{\Delta C_T (b)}$$

13. TOPO-Klonierung (Herstellung von Sondenkonstrukten)

13.1 Amplifikation der WMISH-Konstrukte

Für die *in situ* Hybridisierung sollten neben der gesamten Gensequenz auch kürzere Genbereiche als Sonde dienen, da großen Sonden oftmals zu viel Hintergrund führen. Deswegen wurden zwei verschiedene Primerpaare designt, mit denen unterschiedliche Genbereiche amplifiziert werden konnten. Ein Primerpaar (Dkk_5pr_FW und Dkk_5pr_REV, siehe II.2) deckte den 5'-UTR-Bereich des Gens ab, ein anderer den 3'-UTR-Bereich des Gens (Dkk_3pr_FW und Dkk_3pr_REV, siehe II.2). Des Weiteren wurde das Primerpaar, welches der Herstellung des Expressionskonstruktes für das Gesamtprotein (siehe III.16.1) diene, benutzt, um den codierenden Bereich abzudecken. Die Amplifikation erfolgte aus Plasmid-DNA mittels PCR (siehe III.4.1). Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (siehe III.4.2).

13.2 TOPO-Ligation und Transformation

Taq-Polymerase-amplifizierte PCR-Produkte besitzen aufgrund der terminalen Transferaseaktivität der Taq-Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin am 3'-Ende. Der pCR II-TOPO-Vektor dagegen besitzt ein 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.

Für die TOPO-Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen benutzt: Zu je 4 µl aufgereinigten PCR-Produkts wurden 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und 1 µl TOPO-Vektor (10 ng/µl) hinzugefügt, der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Jeweils 2 µl eines TOPO-Klonierungsansatzes wurden zu 50 µl 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 250 rpm inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen auf Kanamycin- (0,2%) und 0,3%-X-Gal-haltigen (um Blau/Weiss-Screening zu ermöglichen) LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

13.2 Analyse der DNA-Konstrukte

Von jeweils vier als qualitativ positiv identifizierten Klonen (weisse bzw. hellblaue Kolonien) wurde die DNA-Sequenz des Zielgens und seiner Flanken mittels Sequenzierung bestimmt, um die Orientierung der Insert zu bestimmen. Hierzu dienten zwei Sequenzierprimer (M13FW und M13REV, siehe II.2), welche vor bzw. hinter der MCS des TOPO-Vektors liegen. Die Sequenzierung und anschließende Analyse erfolgte wie bereits beschrieben (siehe III.8).

14. Herstellung von RNA-Sonden

14.1 Linearisierung von Plasmid-DNA

Die Plasmide wurden mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert. Die Schnittstelle von *EcoRI* befindet nahe des 5'-Endes der MCS des pSport1-Sfi-Vektors bzw. des pCR II-TOPO-Vektors (siehe II.2).

Zur Linearisierung des pSport1-Sfi-Vektors wurden zu 2 µg Plasmid-DNA 1 µl *EcoRI* (20 U/µl) und 2 µl *EcoRI*-Puffer, zur Linearisierung des pCR II-TOPO-Vektors wurden 1 µl *XbaI*, 2 µl BSA (1 mg/ml) und 2 µl NEB2-Puffer hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und die Reaktionen für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

14.2 Aufreinigung des DNA-Verdaus

Die Aufreinigung des DNA-Verdaus erfolgte mittels eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1, v/v). Zum Restriktionsansatz wurde gleiches Volumen des PCI-Gemisches hinzugefügt, mit einem Vortexer gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und Natriumacetat bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M hinzugegeben. Zwei Volumen eiskalten 100%igen Ethanol wurden hinzugefügt und anschließend bei 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet für 5 Minuten luftgetrocknet und in 20 µl Natriumcitrat-Lösung (1 mM) aufgenommen.

14.3 *In vitro*-Transkription

Um Kontamination mit RNasen zu verhindern wurde, wann immer möglich, mit Wegwerf-Plastikware gearbeitet. RNase-freies Wasser wurde hergestellt, indem zweifach destilliertes Wasser mit 0,01% (v/v) DEPC gemischt, über Nacht gerührt und anschließend zum Entfernen von DEPC autoklaviert wurde. Sämtliche anderen im folgenden benutzten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.

DIG-markierte "antisense"-RNA-Proben wurden nach folgender Prozedur synthetisiert: Zu 1 - 2 µg linearisierter, gereinigter Plasmid-DNA wurden 2 µl 10x DIG RNA Labeling Mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) and 1 µl Sp6 Polymerase (20 U/µl) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit H₂O DEPC auf 20 µl aufgefüllt, gemischt, kurz zentrifugiert und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die RNA wurde gefällt, indem 100 µl H₂O DEPC, 10 µl 4 M Lithiumchlorid, 300 µl 100% Ethanol hinzugefügt wurden und mindestens für 2 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 10 Minuten wurde der Überstand wieder verworfen, das Pellet für 5 Minuten luftgetrocknet und in 20 µl Natriumcitrat-Lösung (1 mM) gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde mittels Agarosegels (siehe III.3.1) abgeschätzt und zu einer finalen Konzentration von 50 ng/µl in MOPS-Hybridisierungspuffer verdünnt.

15. "Whole-mount" *in situ* Hybridisierung

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 "whole-mount" *in situ* Hybridisierung 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 "whole-mount" *in situ* Hybridisierung wurde ein 50 °C-Brutschrank sowie 1,5 ml Eppendorfgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit DPEC-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 Eppendorfgefäßen in einem Volumen von 1 ml und RT durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben.

15.1 Prä-Hybridisierung

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.

15.2 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde der MOPS-Hybridisierungspuffer durch MOPS-Hybridisierungspuffer, welcher die markierte RNA-Probe mit einer Endkonzentration von 0,125 ng/ μ l enthielt, ersetzt und die Embryonen für eine Woche bei 50 °C inkubiert.

15.3 Post-Hybridisierung

Die Embryonen wurden fünf Mal mit MOPS-Waschpuffer gewaschen und dann für drei Stunden in MOPS-Hybridisierungspuffer bei 50 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Anschließend 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 ausgetauscht und die Embryonen bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Nach der Antikörperinkubation wurden die Embryonen über einen Zeitraum von 12 - 24 Stunden fünf Mal 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.

15.4 Photodokumentation

Die Embryonen wurden zunächst mit einem Leica MZ 8 Stereomikroskop analysiert und die Expressionsmuster schließlich mit dem Zeiss LSM 510 Confokalmikroskop und der AxioVision Viewer Software von Carl Zeiss dokumentiert. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop® bearbeitet.

16. Klonierung (Herstellung von Expressionskonstrukten)

16.1 Amplifikation und Restriktionsverdau der Expressionskonstrukte

Es wurden insgesamt vier verschiedene Expressionskonstrukte hergestellt. Ein Konstrukt sollte die Expression des gesamten Proteins (Dkk_all) ermöglichen, ein Konstrukt lediglich die Expression der Dickkopf-Domäne (Dkk_dom) und je ein Konstrukt für den N- (Dkk_nterm) bzw. C-terminalen Bereich (Dkk_cterm). Dazu wurden vier verschiedene Primer-Paare designt (siehe II.2), um die entsprechenden Bereiche zu amplifizieren. Die "forward"-Primer besaßen jeweils als Linker eine EcoRI-Schnittstelle und die "reverse"-Primer als Linker eine PstI-Schnittstelle, um einen gerichteten Einbau in den Vektor zu ermöglichen. Die Amplifikation erfolgte aus Plasmid-DNA mittels PCR (siehe III.4.1). Das PCR-Produkt wurde anschließend gereinigt (siehe III.4.2) und enzymatisch mit EcoRI und PstI verdaut.

Zu jeweils 2 µg Amplifikat wurden 2 µl EcoRI (20 U/µl), 2 µl PstI (20 U/µl), 8 µl BSA (1 mg/ml) und 8 µl EcoRI-Buffer hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 80 µl aufgefüllt und die Reaktion für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden sämtliche Restriktionsansätze nach der Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Methode aufgereinigt (siehe III.14.2), per Gelelektrophorese überprüft und photometrisch die Konzentration der einzelnen geschnittenen Amplifikate bestimmt (siehe III.3).

16.2 Restriktionsverdau und Aufreinigung des Expressionsvektors

Um einen gerichteten Einbau der Insertmoleküle zu gewährleisten, wurde der Expressionsvektor pHis5BA (siehe II.2) mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und PstI geschnitten.

Zu 10 µg Vektor-DNA wurden 2 µl EcoRI (20 U/µl), 2 µl PstI (20 U/µl), 8 µl BSA (1 mg/ml) und 8 µl EcoRI-Buffer hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 80 µl aufgefüllt und die Reaktion für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Um bei der später folgenden Ligation eine Eigenligation des Vektors zu verhindern, wurden nach dem Verdau des Vektors dessen Enden mit Hilfe des Enzyms CIP dephosphoryliert. Nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsansatzes (75 °C für 20 Minuten), wurde 1 µl CIP (10 U/µl) hinzugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert.

Zur Aufreinigung (Entfernung von Protein-Kontaminationen aus der PCR- bzw. Restriktionsreaktion sowie Trennung von ungeschnittenen Vektor) des geschnittenen Expressionsvektors wurde eine LMP-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, und das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe des QIAexII® Gel Extraction Kits aus dem Gel isoliert. Dazu wurde die gesuchte DNA-Bande sauber mit einem Skalpell aus dem Gel unter schwacher UV-Bestrahlung (zu starke Bestrahlung kann Strangbrüche verursachen und die Qualität der DNA beeinträchtigen) ausgeschnitten, das Gewicht des Gelstücks in vortarierten Eppendorfgefäßen bestimmt und das dreifache Volumen QX1-Puffer hinzugegeben. Dann wurden 30 µl einer Suspension von Silica-Microbeads (QIAexII) hinzugegeben und 10 Minuten bei 50 °C unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Die Partikel wurden abzentrifugiert (30 Sekunden, 13000rpm) und mit je 500µl QX1-Puffer gewaschen, um restliche Agarosekontamination zu beseitigen. Die Partikel wurden nochmals abzentrifugiert und mit je 500 µl PE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Trägermaterial an der Luft

getrocknet, bis die Partikel weiß erschienen. Zur Elution der DNA wurden die Beads zweimal in je 20 µl ddH₂O resuspendiert und nach Zentrifugation (30 Sekunden, 13000 rpm) der wässrige Überstand, der die DNA enthält, abgenommen. Die Überstände wurden vereinigt, die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe III.3.2) und bis zur Benutzung bei 4 °C gelagert.

16.3 Ligation

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit dem Enzym DNA-Ligase. DNA-Moleküle mit komplementären einzelsträngigen Enden können über diese Basenpaarung eingehen. Sie werden deshalb als kohäsiv oder klebrig bezeichnet. Über diese Enden können die DNA-Moleküle durch die DNA-Ligase fest verbunden werden, wobei die DNA-Ligase die Bildung neuer Phosphodiesterbrücken katalysiert. Da Basenpaarung nur zwischen komplementären Sequenzen möglich ist, können von einem Restriktionsenzym erzeugte kohäsive Enden nicht mit den von einem anderen Enzym erzeugten Enden paaren, es sei denn, dieses andere Enzym erzeugt die gleichen klebrigen Enden. Doch zwei beliebige, von demselben Enzym erzeugte Fragmente können, ungeachtet ihrer unterschiedlichen Herkunft, miteinander "verkleben".

Um unerwünschte Nebenreaktion wie Zyklisierung von Vektor- und Insertmolekülen zu vermeiden, sollte das Insertmolekül im fünffachen molaren Überschuß vorliegen. Daher wurden die Konzentrationen der geschnittenen und aufgereinigten PCR-Amplifikate sowie die Konzentration des geschnittenen und aufgereinigten Vektors bestimmt (siehe III.3.2) und die Stoffmenge berechnet. Es ergaben sich daraus folgende Ligationsansätze:

6,0 µl pHis5BA
3,0 µl Dkk_all
2,0 µl T4 DNA Ligase
2,0 µl Ligase-Puffer
7,0 µl ddH₂O

6,0 µl pHis5BA
1,0 µl Dkk_nterm
2,0 µl T4 DNA Ligase
2,0 µl Ligase-Puffer
9,0 µl ddH₂O

6,0 µl pHis5BA
2,0 µl Dkk_cterm
2,0 µl T4 DNA Ligase
2,0 µl Ligase-Puffer
8,0 µl ddH₂O

6,0 µl pHis5BA
1,5 µl Dkk_domain
2,0 µl T4 DNA Ligase
2,0 µl Ligase-Puffer
8,5 µl ddH₂O

Als Negativkontrolle wurde außerdem ein Ansatz durchgeführt, bei dem anstelle der Insert-Lösung ddH₂O eingesetzt wurde. Alle Ligationsansätze wurde über Nacht bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden sämtliche Ligationsansätze nach der Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Methode aufgereinigt (siehe III.14.2). 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 ddH₂O aufgenommen.

16.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen

50 ml 2YT Medium wurden mit einer Einzelkolonie von E. coli XL1-Blue für eine Übernachtskultur inokuliert. Am folgenden Tag wurde ein Liter 2YT 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 - 0,50 (entspricht der frühesten 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 schockgefroren und bis zur ihrer Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

16.5 Elektroporation

Die Elektroporation dient der Erzeugung von Löchern in biologischen Membranen, um DNA in lebende Zellen/Bakterien einzuschleusen. Durch die Pulse eines sich entladenden Kondensators wird kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, das in Zellwänden Löcher hervorruft, die sich sofort wieder schließen. Fremd-DNA kann durch diese Öffnungen in Bakterien-, Pflanzen- und sogar Säugetierzellen eingeführt werden.

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu 40 μl Zellen jeweils 1 μl aufgereinigten Ligationsansatzes hinzugefügt. Außerdem wurde zur Kontrolle der Transformation 1 μl des ungeschnittenen Vektors (identische Konzentration wie in den Ligationsansätzen) zu 40 μl elektrokompenter Zellen gegeben. Die DNA-Zell-Gemische wurden in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt, die Küvetten in die Elektroporationskammer gestellt und der Elektroporator wie folgt eingestellt:

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 Eppendorfgefäß überführt und zur Regeneration für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen auf Ampicillinhaltigen (0,2%) LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

16.6 Analyse der DNA-Konstrukte

Von Kolonien potentieller Transformanten wurden Plasmid-DNA-Präparationen (siehe III.7) durchgeführt, mittels EcoRI und PstI verdaut (siehe III.14.1) und auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei den positiven Klone waren jeweils zwei Banden (linearisierter Vektor und herausgeschnittenes Insert) erkennbar.

Von jeweils zwei beim Verdau als qualitativ positiv identifizierten Klonen wurde die DNA-Sequenz des Zielgens und seiner Flanken mittels Sequenzierung bestimmt, um die Klone auf eventuelle Reselasterverschiebungen durch Punktmutationen zu überprüfen. Hierzu dienten zwei Sequenzierprimer (pHis5BA-FW und pHis5BA-REV, siehe II.2), welche vor bzw. hinter der MCS des Expressionsvektors liegen. Die Sequenzierung und anschließende Analyse erfolgte wie bereits beschrieben (siehe III.8).

IV. Ergebnisse

1. Nucleotid- und Aminosäuresequenz

In der genomischen Seeigeldatenbank wurde eine Contig gefunden, von dem ein ca. 600 bp langer Bereich eine hohe Homologie zum murinen *Dickkopf-1*-Gen aufwies. Durch Einsatz definierter Primer wurde dieser Bereich mittels PCR aus

1	gacacaccgtacgataactactcaatgaactacgagttactcatgctgcgctctagcaactctccgcagttcaattatcaacaaaat	90
91	tttcagaagcagtgaaattacctttcgaagaggtgcgctgaaattttactctctccagttcaaaggttggtgaaagtttagaagcctgca	180
181	accttgctactctgttctcggaggacttactgcatatcaatagagtcacatgaaaaattggctacatcactcaatcggactagaaaacg	270
271	cttttgctttgaagagaattgtttaacggaccatacctcggctcaacttttgcgacaagaaggcagctgcattgctcgcggagcaaa	360
361	ctgggtaattgtagttccaagtaccggcggctctccttgaacttggggcttttacgaatttctgcaactaccaacgatttagaag	450
451	gaaggaatttaggatttagacgctcagaatggcggctctcctgcaattttaaaacacctgtgtcagtaactgtgtgttatgtgtcttt	540
	M A A P S A I L K Y L L S V L V C Y V L F	
541	cgccgttccaagtccaggaatatacatcaaaagcaggagcagcaggcagagggggagcagaggacaagggggaggacaaccaggcga	630
	A V P S Q G I Y I K D R S S R Q R G S E R T R G R D N P G D	
631	tgatacctcggtaggaaaggagagagaacccgttcacaaagcaactggctatgtgagggcagacaggagtgcccgtacaagactata	720
	D T S V E E R R R E P F T R T L V L C E A D R E C P Y K Y Y	
721	ctgccacagcggcggggcccaactcatgtctcaggtgcagaagctcgcacatcgttggcatagaaacaagatgtgttccaggggaaa	810
	C H S G E G H K S C L R C A A A T C T T A A C T G A G A A A G C T C G C C A G G T G A G C A G T G T T C T T C A T C T G T A T C G T G C G A	
811	cacgtgtgtcagtggtcgtcgtcaccatcagttccgattcagcagggcctacaacaccgcctgcaaaactcagagtcggaagttaa	900
	T C V D G R C I P H Q F R F D E A Y N T A V Q N F E S E V N	
901	cgaggaggagagatccttcaggacaccaagtttaactgagaaaagctcggcaggtgagcagtggttcttccatctgtatcgtgcga	990
	E E E E S I L Q D T K F K L R K A R Q G E Q C S S S V S C E	
991	ggacggtttgtgctcgcctcaacatctcgttccaaaatgtgtaagcagctgctggaagagggggacatctgcaccaagaacgcgatcg	1080
	D G L C C A Q H L W S K M C K P M L E E G D I C T K R D R	
1081	tctcacggatgtctccagcagtcgagtgctcgcgaaggtctctcctgcaagcggattctgttcccgaacgcgcctccacgtctgcca	1170
	L T D V F Q R C E C S Q G L S C K R D S V P E R R L H V C Q	
1171	agccgctcaagcagcctttgacgggagtcggaacagtcagacatcaacttaactggaaaagtaaacccaactcctgtcaccagcgcgagag	1260
	A V K H R S S G T S T E R G G G E G A A Q G E T L S Q R E R	
1261	attactgtcgttccggtcgaaaagatccgaccgcttcgagcaagaacagcggcgacctccttggctacctctcggcggaatcaggcga	1350
	L L S L P V E K I R P L P S K N D G D L L G Y L S A E S G E	
1351	gaagctcctcgcactcgcggcagagggcaggggtgatgagggggcgtcggcgagaaaatgaaaagcagggcgtacagggacacaac	1440
	K L F D L A G R G E R W M M G R S A E K L K G T A Y R D T T	
1441	cgaaaatcagcgaacgaaacagcagatattgagggcagcagtaactgtattatgaccatcctcctgtgagctatgattgatgtgt	1530
	E I T R T E Q A D I E A S Q L T V L *	
1531	agcaagatggtgagatgcgaatggtatgatgagcactcttgcgcaaatgatgagaagataatccgactatgatgaggaagacaatcatag	1620
1621	gacggcgcagcagcctttgacgggagtcggaacagtcagacatcaacttaactggaaaagtaaacccaactcctgtcaccagcgcgagag	1710
1711	tgccgaactcctcctgtctgtcgcgctctttaaactcctcctcaagcagtgctgcacctgaaaaatctcgtcgtgattgtccactttat	1800
1801	gaaaaatagataaaaaatgatgattggtgcggtatggagaaaagcaaacaggttatagagagtcgcttctcgtgcatgatgagctgagttatg	1890
1891	gtatctgttttaactaaatcgataatacagagggctcatttgcgagtcatttaactgcaggtctccagtcgaccatgcaaaatgcaga	1980
1981	gatgagaaaatctaagtaagaagtactttctctatgatgaggggtaagatctctggctttatagtcacagttttgtattcaaatagca	2070
2071	tttcatgataaccaaaaaacacttgattatataaaaggatattttcaactattgtacttaatttataatcatggtatataatttatg	2160
2161	agacagctaacgttagttatgtttatgttttaatttgcaaaatcttaactggggcagctagcctcgaaaaatgcaactgggaaaaatgata	2250
2251	ataagtgatatacaaaagtcgatgttaaatctcaagaaaatgaaatctgctatcagatataaatatcactgacggtttaaaggcagtgca	2340
2341	atgtaaaactatcattgtattcatgtggcgtggatgaccagtggtgacgtaacaacatcaatcatgtgatattctctattgatttaa	2430
2431	gtataaaccoccatcctcaatcagttatgtcagtgatcagctgtaacaatgttattgtatgtcagtgatgataatgctgcaaacat	2520
2521	gttgatccatccacagtaaaatcagtttgatttcaattgttatggagcaatataatagtaaccttatattgagaatattgatatttt	2610
2611	tcttggttgacataaacagggtaagatatttctatagctgatttcaaacacatttcgaaaaccattttgtttatgatttaaaaattatt	2700
2701	tatgttccagtaagctatagtaactcagttctcagcaggttcgcttttaattttgttatatttatgtacaacttacttaaaatgaag	2790
2791	aggatttctggaatagacatgaggtgatttgcatgcttaagcagctgactgttctgtattatcctcacaataatctgtaaacatgca	2880
2881	agacttttaggtaacaactaatatgaaactgttccgaatatgtattttgtagtcgcttacagtcagatgataaggccagtgatg	2970
2971	tcactttttgacaaaagttattcttggcaaaatgaaagtgcacaccttgcctcaaaaacttttcgattttggtgttttggtttttcc	3060
3061	tttttagtttcttttttcttaacttggttatcttaagctataaatctatcaatattgctcagatctgagaatcaacgattcaaaaacttt	3150
3151	gtttacatttactgcgaacttaattcctgtgaaatgcgagatatttccactgttttggtttttggtttatataaaaaagata	3240
3241	agttatgctgtttttgcttgcgttaaaagttagtaaaactgcgttttaccttttctgaaaccttttctgaaatcataaaatgaatggcta	3330
3331	acggaaactcgaatcagatgatacagctgagcttggaaaggggttaggaaactgggcaatgaagtttaggaaactctattacaagaaa	3420
3421	tagcccttaaatcaatagttatttagattcaaaatgaaagaggtgaaagtgatgctttaatgacatcagcattatctattctt	3510
3511	gtaattatcaccttggcaatggcctctcctgtgctattgttcaggaatttggcttcagaacacggctcaaaaagatttaattggcttccag	3600
3601	agccacacccttaaccataaaaaatcgtattagctctcaactcaaacggtttgtaaaattttggctacaaccttatatagtcagaatgttg	3690
3691	tataccacgcttattgtatagttggtgcaatagattggtcagttcaatgaggttaaatctctattagaaactggtgtaagggaaagttga	3780
3781	gagatgaggttattgtttcagaataaatacccccgttttctgcatgtaggctaagtggagcgtttctctcactcctgcaaatgtga	3870
3871	ctgtctgacaactcggacacacccttaattctcgtcaccggtctaccgtggaattgtgggtgctcgttcgaagccccctcccccccc	3960
3961	aaaaaaagttaaacttaagccccgtatttgcgaatagagctggtcatttaagaggttaaatctcttctcaaaaacttatataaattatca	4050
4051	aacgacatattaaatggtatgatattgttattatgtaataataggcagctactccatcaaatatgaattacaacggactggaataaaaa	4140
4141	aaaaaaagccctctggggagaagcaaaatcgggataaagatcaactacgtttttcatttttttctctcaatgggtgctggttat	4230
4231	aaattgggtgacatttacgaggaaaaatgtgtcgtttcaactagagctgctgattttaaatacaacactgacaatacaatgccccactttgt	4320
4321	ttgctcggcgtatttggacaacattgcaacgacaatcaggcaatgcttaaaatgcgaaaagtaggcaacacgggttgagcctcgaatcctg	4410
4411	tttattttgacaattctgagtcacagggatattgcttggagaataatccgatgtggttttagggcttcttataaacgaaatccgca	4500
4501	ggctgttttggcgtttcctcgcaagtttggcatttggcctctcctcagctcctcgtggttaggattacagcgaacatgggaga	4590
4591	ggagaggacgcaatttaaagtcaccgcatacaatgcagcgttctcgtcagattttttaaataagaaatcgcagtgcaatggctat	4680
4681	ggaattttgatcataatcatcttctggaatgaggtctgaaataacgaaataaacatcagcaatgaaaaaataaaaaa 4763	

Abb. 17: "Nukleotidsequenz der Dickkopf-cDNA und die abgeleitete Proteinsequenz: der ORF des isolierten Klons besitzt zwei cysteinreiche Domänen, CRD1 (blau) und CRD2 (rot)."

genomischer DNA des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* amplifiziert. Dieses PCR-Fragment wurde anschließend durch "random primed labeling" radioaktiv mit α - ^{32}P -dATP markiert und diente als Sonde, um eine "full-length"-cDNA-Bibliothek zu überprüfen. Die Hybridisierung lieferte einen positiven Klon mit einem ca. 5 kb großen Insert. Der cDNA-Klon wurde mittels "primer walking" vollständig sequenziert.

Die Sequenzierung lieferte eine exakte Länge von 4763 bp. Die cDNA dieses Klons beinhaltet einen ca. 500 bp langen 5'-UTR-Bereich, einen ORF, der für ein Protein mit 339 Aminosäuren codiert, und einen ca. 3000 bp langen 3'-UTR-Bereich (Abb. 17). Das Protein besitzt zwei cysteinreiche Domänen. Die erste cysteinreiche Domäne (CRD1) besteht aus 49 Aminosäuren, beginnt an Position 49 und endet bei Position 118 (Abb. 17, blau). Die zweite (CRD2) besteht aus 54 Aminosäuren und reicht von Position 164 bis zur Position 217 (Abb. 17, rot). Beide Domänen besitzen jeweils zehn Cysteinreste. Die Linker-Region zwischen den beiden cysteinreichen Bereichen besteht aus 45 Aminosäuren und die C-terminale Bereich hinter der zweiten cysteinreichen Domäne aus 109 Aminosäuren.

Consensus-Sequenz der Dickkopf-Domäne:

CXv-----CX2CX6----CX5---CCX4--CX2GXC

CRD1: **CHSGEGHKSCLRCRKRSHRRCHRNKMCCQGNTCVDGRC**

Consensus-Sequenz der Colipase-Domäne:

GX2GX2CX4--DCX2GXCCA~~X~~v-----CXPX4--GX2CXv-----RCXCX2GLXC

CRD2: **ARQGEQCSSSVS**C**EDGL**C**CAQHLWSKMCKPML**E**EGDI**C**TKKRDRRLTDV**F**Q**R**CE**S**Q**L**SC**

Abb. 18: "Sequenzvergleich: Vergleich der Sequenzen der cysteinreichen Domänen des isolierten Klons mit den Consensus-Sequenzen der Dickkopf- und der Colipase-Domäne."

Ein Vergleich der Sequenzen der beiden cysteinreichen Domänen des isolierten Klons mit den Consensus-Sequenzen für die Dickkopf- und Colipase-Domäne der Proteine der Dickkopf-Familie (Glinka *et al.*, 1998) zeigt, dass der erste cysteinreiche Bereich des isolierten Klons vollkommen mit der Consensus-Sequenz, die für die Dickkopf-Domäne gefunden wurde, übereinstimmt (Abb. 18). Die zweite cysteinreiche Domäne ist nahezu identisch mit der Consensus-Sequenz der Colipase-Domäne. Abweichungen findet man lediglich an zwei Positionen. An der ersten Position findet man in der Seeigelsequenz ein Alanin anstelle eines Glycins. An der

vierten konservierten Position in der Consensus-Sequenz befindet sich ein Aspartatrest, während man in der vorhergesagten Proteinsequenz des isolierten Klons ein Serinrest findet (Abb. 18, rot).

Eine BLAST-Suche unter Verwendung der vorhergesagten Proteinsequenz lieferte das Dickkopf-2-Homolog aus Huhn. Des Weiteren wurde mit Hilfe der ermittelten vollständigen Sequenz des Dickkopf-Gens erneut die genomische Seeigeldatenbank durchsucht. Es konnten keine weiteren Dickkopf-Gene im Seeigelgenom identifiziert werden.

2. Protein-“Alignment“

Sowohl die Sequenz der Dickkopf-Domäne als auch die Sequenz der Colipase-Domäne wurde verglichen mit der Sequenz der Dickkopf-Domäne bzw. Colipase-Domäne von Dickkopf-1 bis 4 von Mensch (Hs) und Maus (Mm), von Dickkopf-1 bis 3 aus Huhn (Gg), von Dickkopf-1 und 2 aus Frosch (Xl), von Dickkopf-1 aus Zebrafisch (Dr) und von Dickkopf-3 aus *Hydra* (Hm) und *Ciona* (Ci) und die Sequenzidentitäten berechnet.

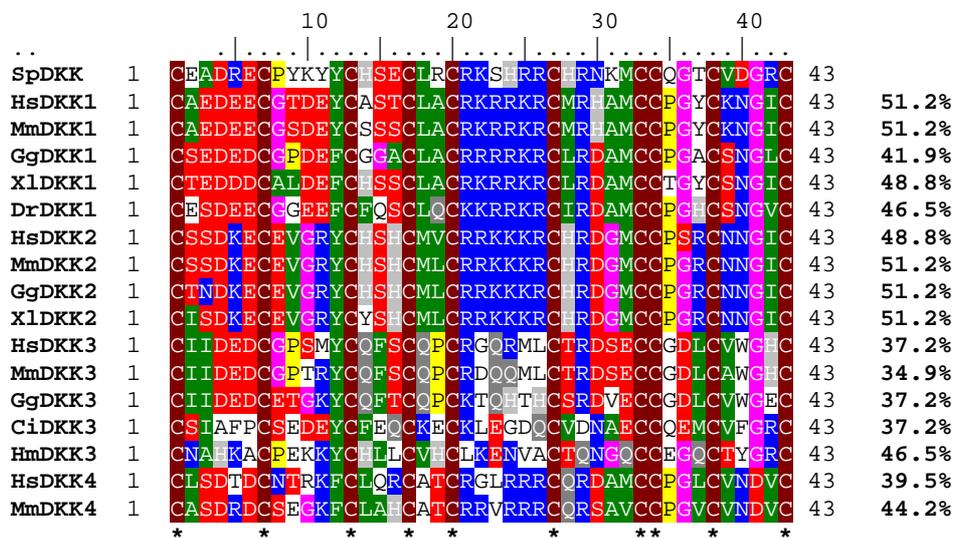


Abb. 19: “Sequenzalignment: Vergleich der Dickkopf-Domäne von Dickkopf-Proteinen verschiedener Spezies. In allen Spezies findet man die konservierten Cysteinreste (*)“

Ein Vergleich der Dickkopf-Domänen (Abb. 19) zeigt, dass die Dickkopf-Domäne aus dem Seeigel der Dickkopf-Domäne von Dickkopf-2 aus Huhn, von Dickkopf-1 aus Mensch und Maus und von Dickkopf-2 aus Maus und Frosch mit jeweils 51,2% Übereinstimmung am ähnlichsten ist. Insgesamt zeigen alle Dickkopf-1 und -2

Proteine große Ähnlichkeit mit Seeigel-Dickkopf. Mit knapp über 40% Übereinstimmung besitzen die Dickkopf-4-Proteine schon weniger Ähnlichkeit zu Dickkopf im Seeigel. Am wenigsten Ähnlichkeit jedoch hat die Dickkopf-Domäne aus Seeigel zur Dickkopf-Domäne der verschiedenen Dickkopf-3-Vertreter (Übereinstimmung <40%, mit Ausnahme von *Hydra*: 46,5%).

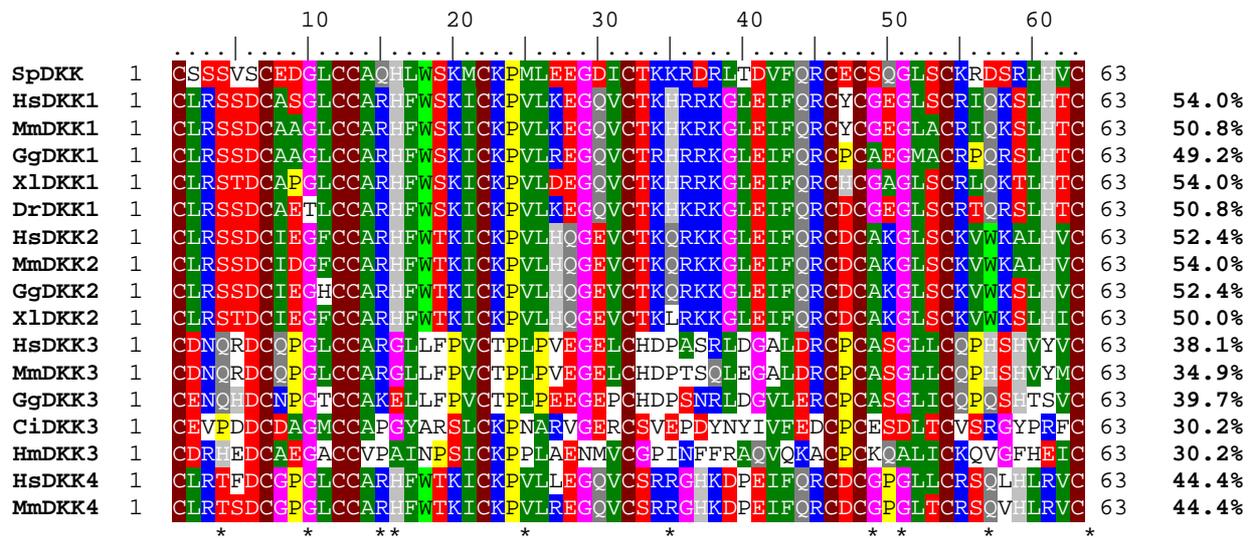


Abb. 20: "Sequenzalignment: Vergleich der Colipase-Domäne von Dickkopf-Proteinen verschiedener Spezies. In allen Spezies findet man die konservierten Cysteinreste (*) "

Auch beim Vergleich der verschiedenen Colipase-Domänen (Abb. 20) findet man, dass die Colipase-Domäne aus dem Seeigel-Dickkopf die geringste Ähnlichkeit zu den Colipase-Domänen der Dickkopf-3-Proteine besitzt (Übereinstimmung <40%). Die größte Übereinstimmung findet man zwischen der Colipase-Domäne aus Dickkopf aus Seeigel und humanem Dickkopf-1, Dickkopf-1 aus Frosch und murinem Dickkopf-2 mit jeweils 54% Übereinstimmung. Mit ca. 45% Übereinstimmung liegen auch beim Vergleich der Colipase-Domäne die Dickkopf-4-Proteine zwischen den Dickkopf-1 und -2-Proteinen (ca. 50% Übereinstimmung) und den Dickkopf-3-Proteinen. Die prozentuale Übereinstimmung in der Colipase-Domäne ist durchschnittlich höher als die Übereinstimmung innerhalb der Dickkopf-Domäne.

3. Phylogenetische Analyse

Um die phylogenetische Beziehung zwischen Dickkopf aus Seeigel und den anderen Proteinen der Dickkopf-Familie zu untersuchen, wurde ein Stammbaum unter Verwendung der vollständigen Proteinsequenzen (siehe II.5) erstellt.

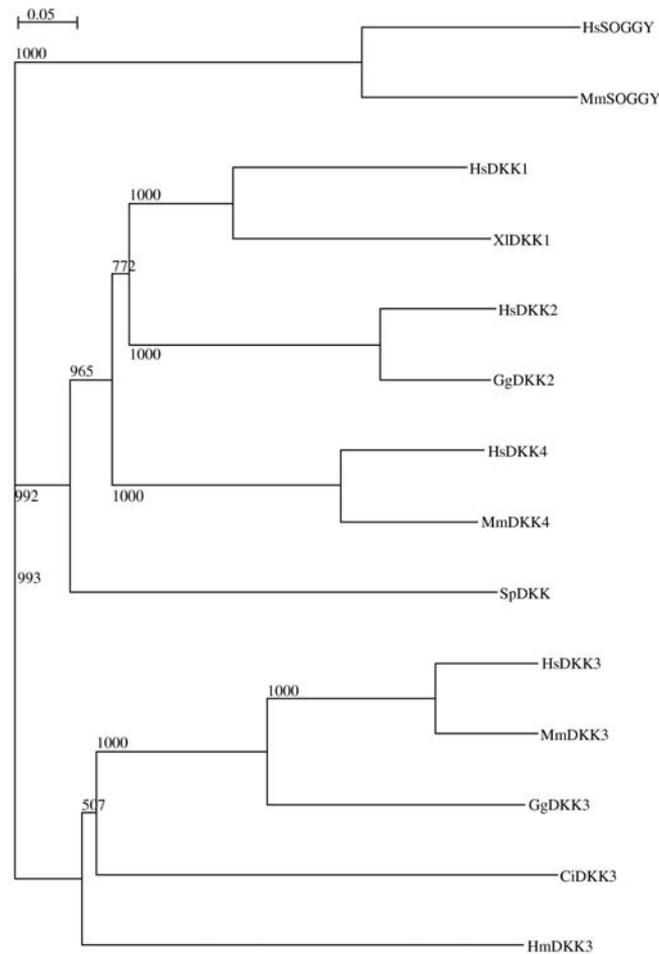


Abb. 21: "Phylogenetischer Stammbaum der Dickkopf-Proteine: Dickkopf aus dem Seeigel wird eindeutig der Gruppe der Dickkopf-1, -2 und -4-Proteine zugeordnet."

Der Stammbaum (Abb. 21) zeigt, dass sich die Familie der Dickkopf-Proteine in drei Untergruppen spaltet. Die eine Gruppe beinhaltet lediglich die Soggy-Proteine, eine weitere umfasst sämtliche Dickkopf-3-Proteine und die dritte Gruppe schließlich die Dickkopf-1, -2 und -4-Proteine. Diese spaltet sich später in die Gruppe der Dickkopf-1 und -2 sowie die Gruppe der Dickkopf-4-Proteine. Zuletzt teilen sich auch die Dickkopf-1 und Dickkopf-2-Proteine in getrennte Gruppen auf. Der Seeigel-Dickkopf wird in die Gruppe der Dickkopf-1, -2 und 4-Proteine eingruppiert. Innerhalb dieser Gruppe aber ist er keiner weiteren Untergruppe zuzuordnen.

4. Expression von *Dickkopf*

4.1 Quantitative “real-time“ PCR

4.1.1 Expressionsprofil von *Z12*

Für den Transkriptionsfaktor *Z12* sind für einige Embryonalstadien die absolute Anzahl der mRNA-Moleküle pro Embryo bekannt: 2300 im unbefruchteten Ei, 2100 in 3 h-Embryonen, 1600 in 12 h-, 18 h- und 70 h-Embryonen, 1900 in 21 h- und 37 h-Embryonen sowie 1200 Transkripte in 45 h-Embryonen. Mittels QRT-PCR wurden die absoluten Zahlen der weiteren Embryonalstadien – 8 h, 10 h, 21 h und 33 h – berechnet (siehe III.12.3).

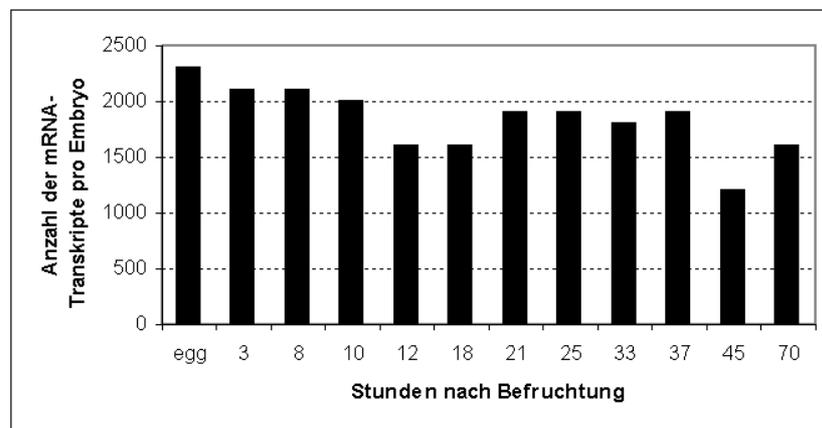


Abb. 22: “Zeitliches Expressionsprofil von *Z12*: der Transkriptionsfaktor ist maternal exprimiert und liegt während der gesamten Embryonalentwicklung relativ konstant vor.”

Der Transkriptionsfaktor *Z12* kann während der gesamten Embryonalentwicklung mittels QRT-PCR detektiert werden. Er ist schon vor der Befruchtung in signifikanten Mengen präsent und liegt später in allen Stadien in etwa konstanten Mengen vor (Abb. 22). Die höchste Anzahl an *Z12*-mRNA findet man im unbefruchteten Ei (2300), die geringste Zahl in 45 h-Embryonen (1200).

4.1.2 Expressionsprofil von *Dickkopf*

Mit Hilfe der bekannten Mengen an *Z12*-mRNA konnten ebenfalls mittels QRT-PCR die absoluten Zahlen der *Dickkopf*-Transkripte in den verschiedenen Embryonalstadien ermittelt werden (siehe III.12.3).

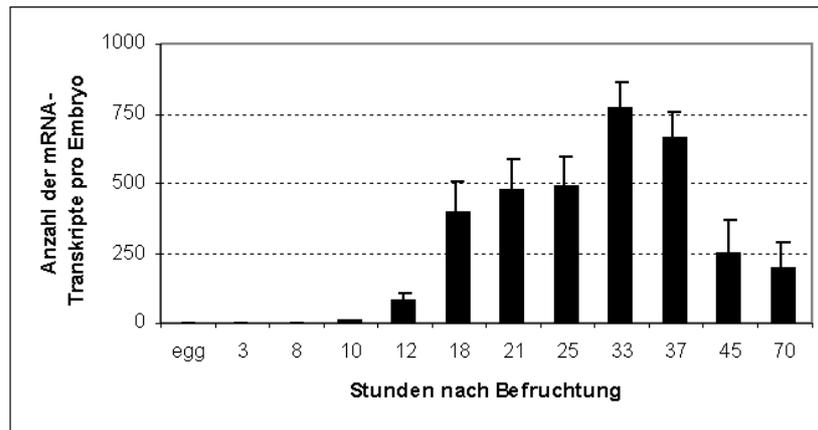


Abb. 23: "Zeitliches Expressionsprofil von *Dickkopf*: in 10 h-Embryonen ist zum ersten Mal mRNA mittels QRT-PCR detektierbar, die maximale Anzahl von Transkripten findet man in 33 h-Embryonen."

Zum ersten Mal kann *Dickkopf*-mRNA in 10 h-Embryonen detektiert werden. Eine deutliche Anzahl von *Dickkopf*-mRNA-Transkripten lassen sich in 12 h-Embryonen messen, ca. 80 Transkripte. Mit Beginn der Gastrulation, 18 h-Embryonen, steigt die Anzahl der mRNA-Moleküle stark auf etwa 400 Transkripte an. Von da an wächst die Anzahl der mRNA-Transkripte kontinuierlich an und erreicht in 33 h-Embryonen mit ungefähr 800 Transkripten ihr Maximum. Anschließend fällt die Zahl wieder ab, 70 h-Embryonen findet man noch ca. 200 Transkripte (Abb. 23).

4.2 "Whole-mount" *in situ* Hybridisierung

4.2.1 Vergleich der Hybridisierungssonden

Um das Expressionsmuster von *Dickkopf* während der Embryogenese des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* zu bestimmen, wurden vier verschiedene Hybridisierungssonden hergestellt, die unterschiedliche Bereiche des *Dickkopf*-Gens abdeckten. Eine Sonde deckte das gesamte Gen ab (ca. 4800 bp), eine weitere lediglich den codierenden Bereich des Gens (ca. 1200 bp), eine Sonde enthielt den 5'UTR sowie einen Teil der codierenden Sequenz (ca. 800 bp) und die vierte Sonde war komplementär zu einem 800 bp-langen Bereich des 3'UTRs (Abb. 24).



Abb. 24: "Schematischer Aufbau von *Dickkopf*: der codierende Bereich mit der *Dickkopf*-Domäne (hellgrau) und der *Colipase*-Domäne (dunkelgrau) wird durch das Rechteck repräsentiert. WMISH-5'UTR, -CDS, -3'UTR und -LONG: die vier verschiedenen Hybridisierungssonden."

Alle vier Hybridisierungssonden wurden für die WMISH verwendet, um eventuelle Kreuzreaktionen mit anderen Genen, die für cysteinreiche Regionen codieren, ausschließen zu können. Für den Vergleich der Hybridisierungssonden wurde die WMISH zunächst auf einen Pool von fixierten Embryonen (bestehend aus frühen und späten Blastula- als auch Gastrula-Embryonen sowie der Pluteus-Larve) durchgeführt. Alle Hybridisierungssonden lieferten das selbe Expressionsmuster.

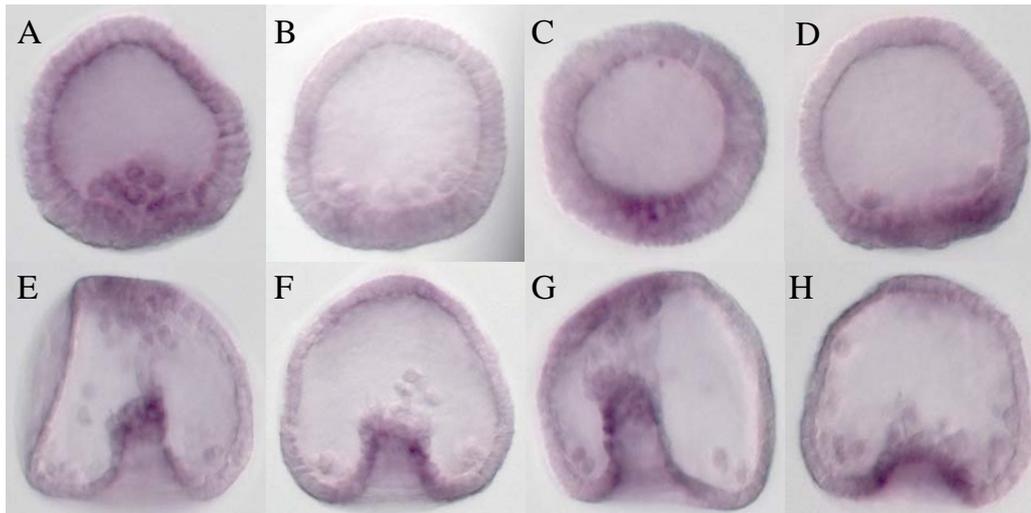


Abb. 25: "Vergleich der vier Hybridisierungssonden: spätes Blastula- (A,B,C,D) und frühes Gastrula-Stadium (E,F,G,H), animale Seite oben. WMISH-LONG- (A,E), WMISH-CDS- (B,F), WMISH-5'UTR- (C,G) und WMISH-3'UTR-hybridisierte Embryonen (D,H)."

Unterschiede zwischen den verschiedenen Sonden zeigen sich jedoch in der Signalstärke und im Hintergrund. Die Hybridisierungssonde, die das gesamte Gen abdeckt (WMISH-LONG), liefert zwar eine gute Signalstärke, allerdings ist auch viel Hintergrund, besonders in der späten Blastula, zu finden (Abb. 25, A,E). Die Sonde, die lediglich den codierenden Bereich, abdeckt (WMISH-CDS), zeigt wenig Hintergrund, liefert aber auch nur ein schwaches Signal (Abb. 25, B,F). Die beiden anderen Sonden (WMISH-5'UTR und WMISH-3'UTR) lieferten beide gute Signalstärken bei wenig Hintergrundbildung (Abb. 25, C,D,G,H).

4.2.2 Expressionsmuster von *Dickkopf*

Da die WMISH-5'UTR-Hybridisierungssonde zum optimalen Verhältnis von Signal und Hintergrundverhältnis führte, wurde sie verwendet, um das Expressionsmuster von *Dickkopf* in weiteren Embryonalstadien zu bestimmen. Dazu wurden 3 h-, 5 h-, 7 h-, 10 h-, 12 h-, 14 h-, 18 h-, 20 h-, 23 h-, 27 h-, 30 h-, 33 h-, 36 h-, 41 h-, 46 h-, 62 h- und

90 h-Embryonen sowie unbefruchtete Eier fixiert. Ein signifikantes Signal über dem Hintergrund kann mittels WMISH zum ersten Mal in 12 h-Embryonen detektiert werden. In diesem Stadium ist die Expression von *Dickkopf* in der Vegetalplatte lokalisiert (Abb. 26, A,B). Während des gesamten Blastula-Stadiums bleibt die Expression in der Vegetalplatte, aus der das spätere Mesoderm entsteht, begrenzt (Abb. 26, C-F). Dieses Expressionsmuster bleibt auch im Mesenchymblastulastadium erhalten (Abb. 26, G,H).

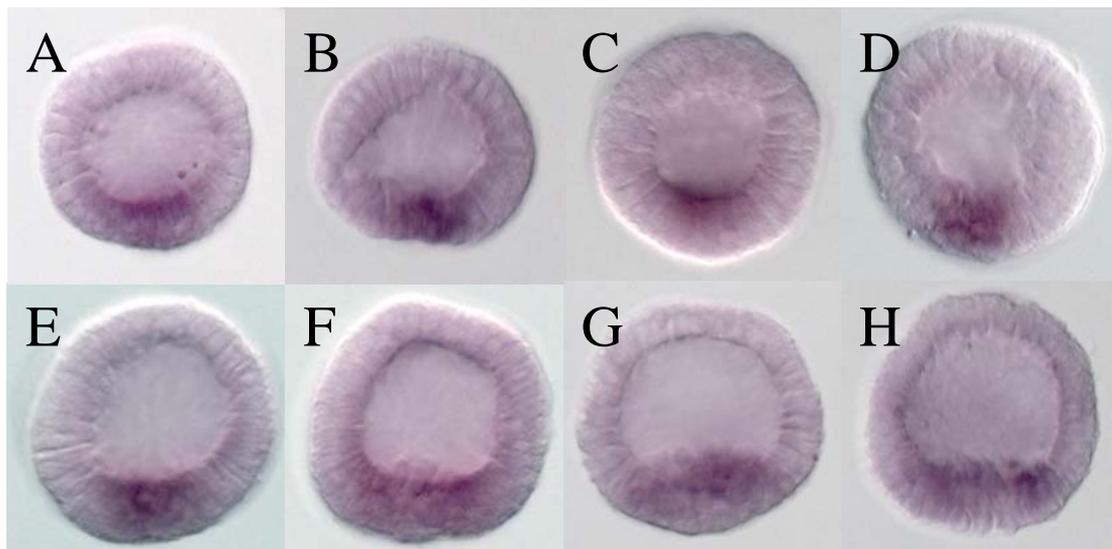


Abb. 26: "Expression von *Dickkopf* in den Blastula-Stadien: 12 h-Blastula (A,B), 14 h-Blastula (C,D), 18 h-Blastula (E,F) und 20 h-Blastula (G,H), animale Seite oben"

Mit Beginn der Gastrulation und der Invagination des Endomesoderms, ca. 23 h nach der Befruchtung, ist *Dickkopf* nicht nur im sich invaginierenden Mesoderm exprimiert, sondern auch schwach im apikalen Ektoderm. (Abb. 27, A,B). In 27 h-Embryonen, bei denen sich der Blastoporus gebildet hat, findet man die Expression von *Dickkopf* im Archenteron. Am apikalen Ektoderm bleibt das Signal schwach (Abb. 27, C). Eine vegetale Ansicht zeigt deutlich den Blastoporus und die Expression von *Dickkopf* um diesen (Abb. 27, D). Mit fortschreitender Bildung des Darmrohres (30 h-Embryonen) wird deutlich, dass sich die Expression von *Dickkopf* auf den Vorderdarm beschränkt. Inzwischen wird auch die Expression im apikalen Ektoderm stärker (Abb. 27, E). Eine Sicht aus der vegetalen Perspektive beweist, dass *Dickkopf* nicht mehr in den Zellen um den Blastoporus, welche nun endodermale Zellen sind, exprimiert ist, sondern nur noch an der Darmspitze (Abb. 27, F).

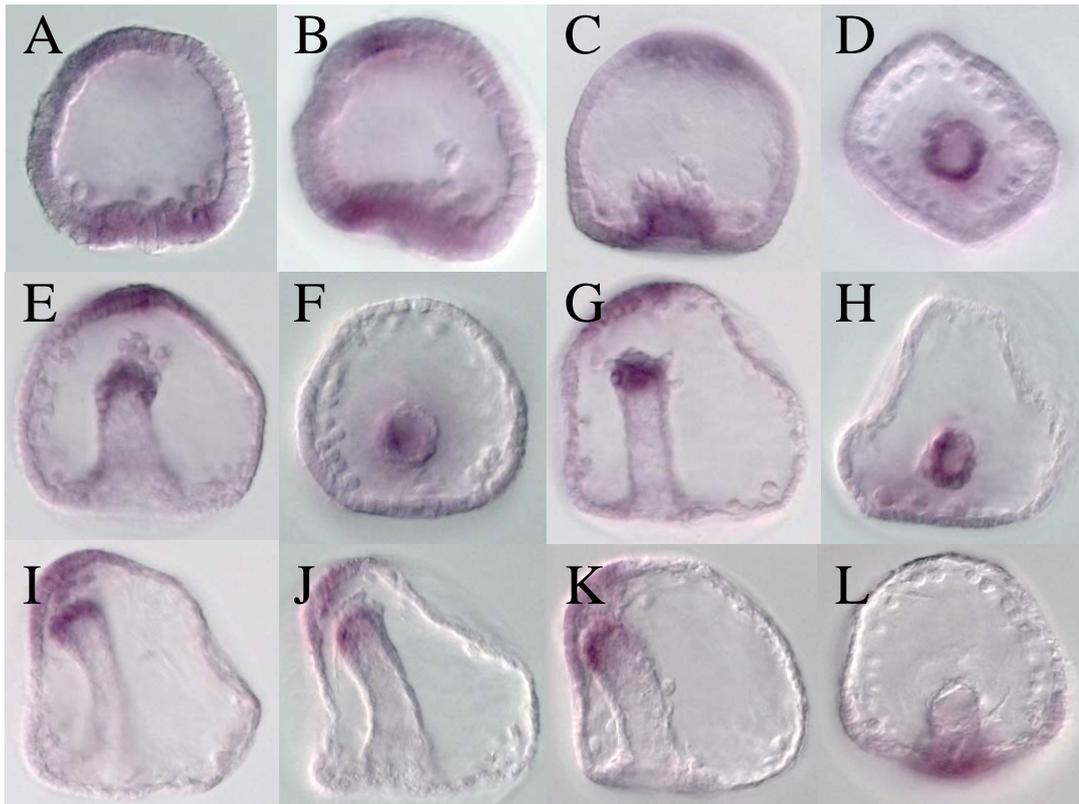


Abb. 27: "Expression von *Dickkopf* in den Gastrula-Stadien: 23 h-Gastrula (A,B), 27 h-Gastrula (C,D), 30 h-Gastrula (E,F), 33 h-Gastrula (G,H), 36 h-Gastrula (I,J) und 41 h-Gastrula (K,L), animale Seite oben, D, F, H und L vegetale Ansicht."

In der Prism-Larve ist *Dickkopf* weiterhin in der Darmspitze, welche wenig später mit dem oralen Ektoderm die Mundöffnung bildet, und im apikalen Ektoderm exprimiert (Abb. 28, A,B).

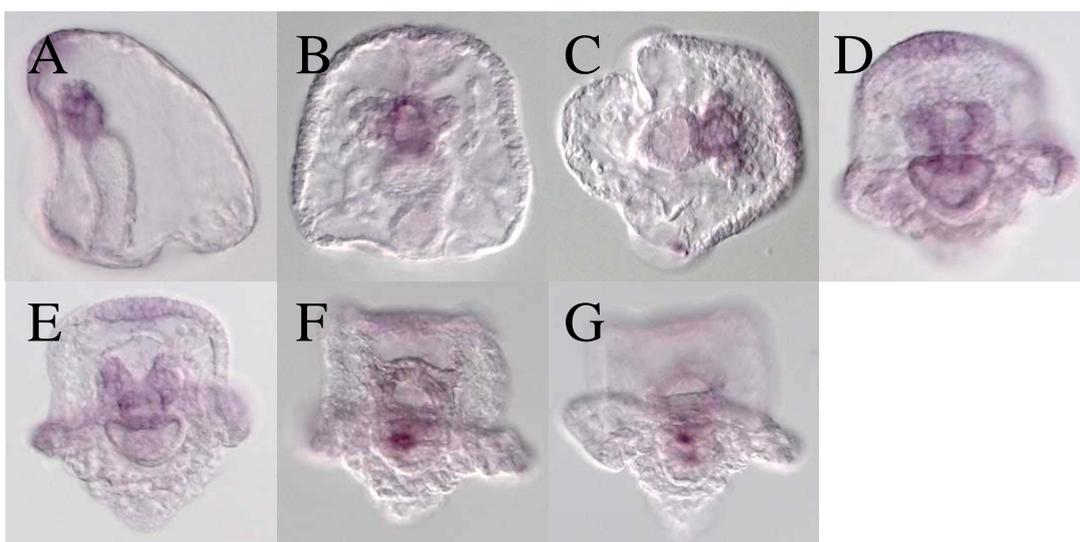


Abb. 28: "Expression von *Dickkopf* in den Prism- und Pluteus-Stadien: 46 h-Prism-Larve (A,B), 62 h-Pluteus-Stadium (C,D,E) und 90 h-Pluteus-Larve (F,G), animale Seite oben."

In den Pluteus-Larven findet man neben der Expression am Mund der Larve noch eine schwache Expression in den sich entwickelnden Armen (Abb. 28, C-E). In den 90 h-Pluteus-Embryonen findet man zusätzlich inmitten des Embryos einen kleinen nicht weiter charakterisierten Bereich hoher Expression (Abb. 27, F,G).

5. Lithium- und Zink-“Mutanten“

5.1 Phenotyp der Lithium- und Zink-“Mutanten“

Im mittleren Blastula-Stadium, dem Zeitpunkt der Endomesoderm-Spezifikation, kann zum ersten Mal die Expansion endomesodermaler Territorien ohne molekulare Marker beobachtet werden. Ein Vergleich von normal entwickelten Embryonen (Abb. 29, A) mit Lithium-“Mutanten“ (Abb. 29, B) zeigt deutlich die Expansion der Vegetalplatte. In Zink-“Mutanten“ (Abb. 29, C) hingegen kann keine Bildung der Vegetalplatte beobachtet werden.

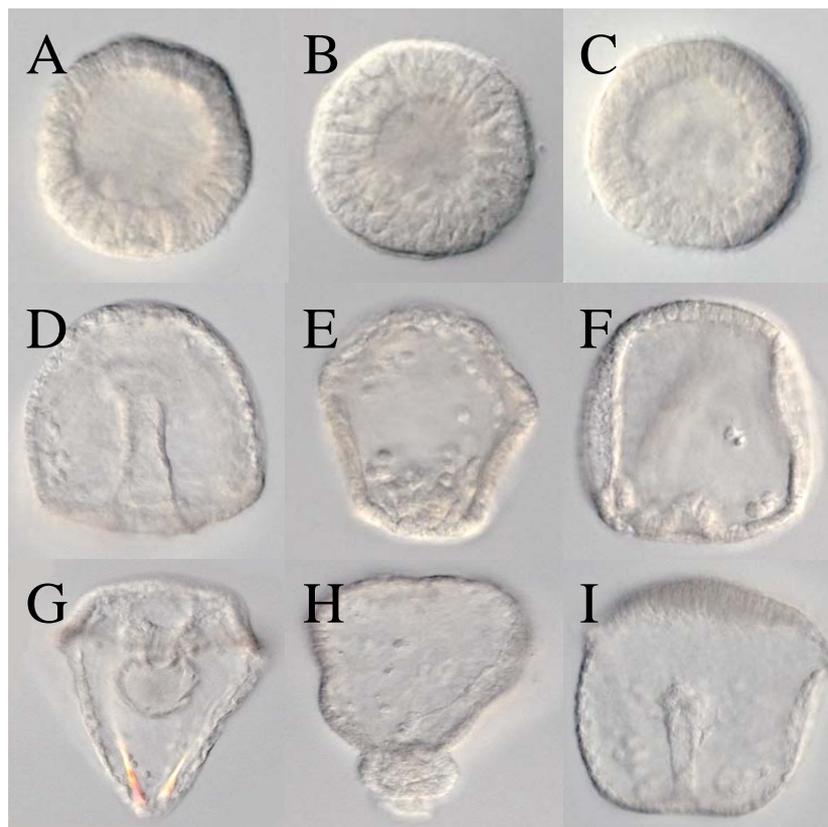


Abb. 29: “Vergleich von normal entwickelten und “Mutanten“-Embryonen: Blastula- (A,B,C), Gastrula- (D,E,F) und Pluteus-Stadium (G,H,I). Normal entwickelte Embryonen (A,D,G), in 30 mM LiCl kultivierte Embryonen (B,E,H) und mit 500 μ M ZnSO₄ behandelte Embryonen (C,F,I), animale Seite oben.”

Besonders deutlich werden die Veränderungen in den 36 h-Gastrulastadien. Während sich in den unbehandelten Embryonen ein Darm vollständig gebildet hat (Abb. 29, D), beginnt die Zink-“Mutante“ (Abb. 29, E) gerade mit der Darmbildung. In der Lithium-“Mutante“ ist der Darm stark vergrößert (Abb. 29, F) und als dieser kaum erkennbar. Nach 62 h hat sich unter normalen Bedingungen die Pluteus-Larve gebildet (Abb. 29, G). In den mit Lithium behandelten Embryonen sind ektodermale Strukturen auf die animale Hälfte beschränkt. Der Rest der Embryonen besteht aus endodermaler Zellmasse (Abb. 29, H). Die Zink-“Mutante“ zeigt vergrößerte ektodermale Strukturen und einen stark verkleinerten Darm (Abb. 29, I).

5.2 Expressionsmuster von *Dickkopf* in Lithium- und Zink-“Mutanten“

Um die einzelnen Territorien der Lithium- bzw. Zink-“Mutanten“ besser identifizieren zu können, wurde als molekularer Marker *Endo16* verwendet. Das Gen *Endo16* ist spezifisch in endodermalem Gewebe exprimiert (Ransick & Davidson, 1993). Im späten Blastula-Stadium findet man die Expression von *Endo16* im Endoderm (Abb. 30, A). Eine Ansicht von der vegetalen Seite zeigt deutlich, dass die Expression auf den endodermalen Ring um den vegetalen Pol beschränkt ist (Abb. 30, B). Während der frühen Gastrulation wird *Endo16* im sich invaginierenden Endoderm exprimiert (Abb. 30, C,D).

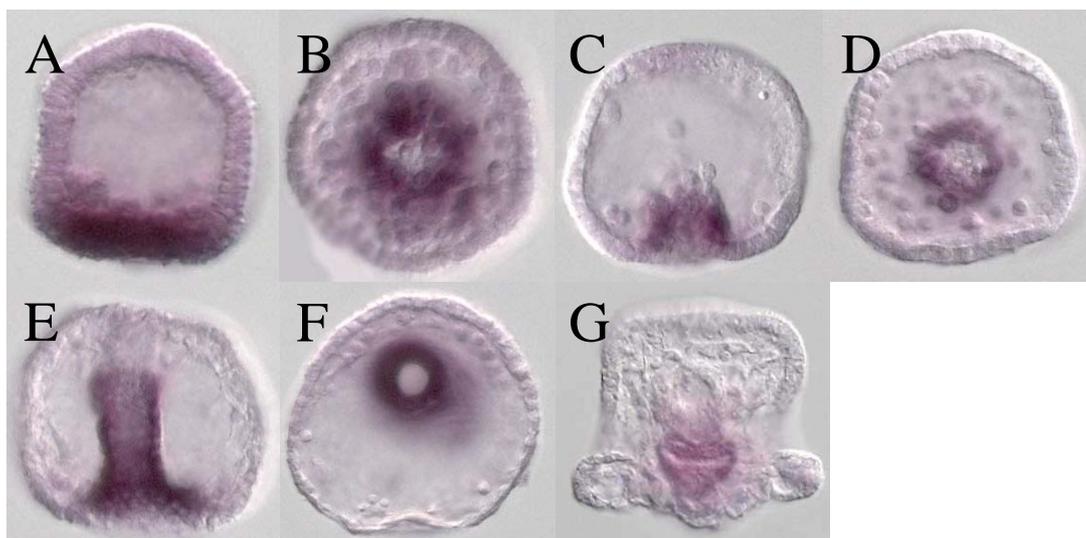


Abb. 30: “Expression des Endoderm-Markers *Endo16*: 20 h-Blastula (A,B), 27 h-Gastrula (C,D), 33 h-Gastrula-Stadium (E,F) und Pluteus-Larve (G), animale Seite oben, A, D und F vegetale Ansicht.”

Im weiteren Verlauf der Gastrulation bleibt die Expression von *Endo16* auf den Darm beschränkt (Abb. 30, E,F) und auch in der Pluteus-Larve kann *Endo16* noch im Darmbereich detektiert werden (Abb. 30, G).

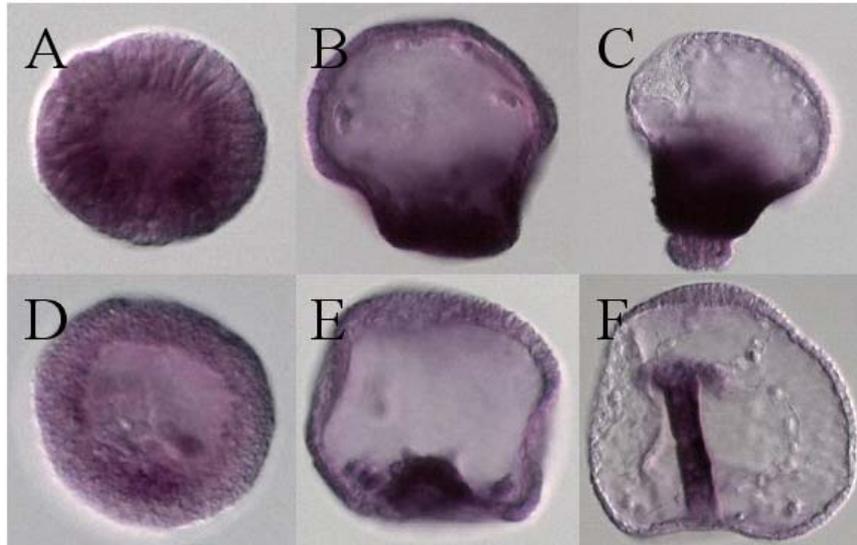


Abb. 31: "Expression von *Endo16* in "Mutanten"-Embryonen: mit 30 mM LiCl behandelte 21 h- (A), 36 h- (B) und 62 h-Embryonen (C) sowie mit 500 μ M ZnSO₄ behandelte 21 h- (D), 36 h- (E) und 62 h-Embryonen (F), animale Seite oben."

Die WMISH mit einer *Endo16*-Probe zeigt deutlich den Einfluss von Lithium und Zink auf die Schicksale der einzelnen Zellen. Im Vergleich zur Expression von *Endo16* in normal entwickelten 21 h-Embryonen ist der exprimierte Bereich in den Lithium-"Mutanten" deutlich vergrößert (Abb. 31, A), während in den Zink-"Mutanten" kaum Expression von *Endo16* wahrgenommen werden kann (Abb. 31, D). In den älteren Embryonen wird die phenotypische Analyse der Lithium- und Zink-"Mutanten" durch die Expression von *Endo16* bestätigt. Sie offenbart eindeutig die Expansion endodermalen Bereichs (Abb. 31, B,C). In den Zink-"Mutanten" hingegen sind endodermale Strukturen gegenüber normal entwickelten Embryonen stark vermindert (Abb. 31, E,F).

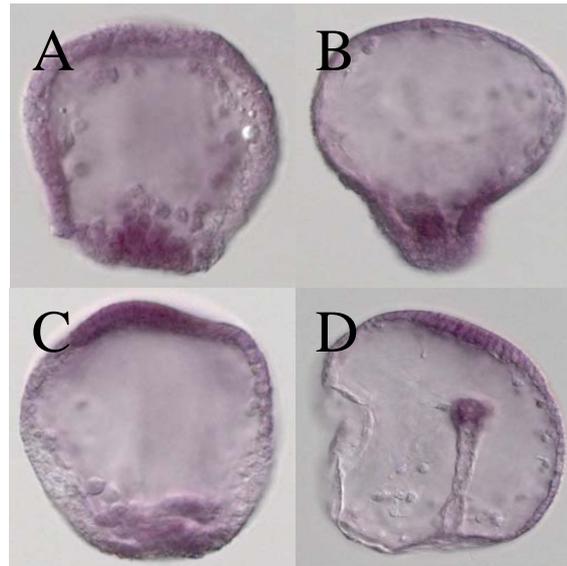


Abb. 32: "Expression von *Dickkopf* in "Mutanten"-Embryonen: mit 30 mM LiCl behandelte 36 h- (A) und 62 h-Embryonen (B) sowie mit 500 μ M ZnSO₄ behandelte 36 h- (C) und 62 h-Embryonen (D), animale Seite oben."

In den mit Lithium behandelten Embryonen ist Expression von *Dickkopf* im Endomesoderm sichtbar (Abb. 32, A,B). Ein Vergleich mit *Endo16*-markierten Lithium-"Mutanten" (Abb. 31, B,C) offenbart jedoch, dass der Expressionsbereich von *Dickkopf* kleiner ist als der von *Endo16*. Während man die Expression von *Dickkopf* in normal entwickelten Embryonen auch im apikalen Ektoderm detektieren kann (Abb. 27, A-L), ist in den Lithium-"Mutanten" in diesem Bereich keine Expression von *Dickkopf* detektierbar. Anders in den Zink-"Mutanten" (Abb. 32, C,D). Hier ist der Bereich der Expression im apikalen Ektoderm im Vergleich zum Bereich in den normal entwickelten Embryonen (Abb. 27, A-L) vergrößert. Expression von *Dickkopf* findet sich zudem im endomesodermalen Bereich (Abb. 32, C). Dieser ist aber kleiner als der Bereich in den Lithium-"Mutanten" (Abb. 32, A). In den 62 h-Zink-"Mutanten" ist *Dickkopf* ebenso wie in den unbehandelten 36 h-Embryonen (Abb. 27, G) in der Darmspitze exprimiert.

5.3 Regulation von *Dickkopf* durch Lithium und Zink

Um die Auswirkungen von Lithium- bzw. Zinkbehandlung auf Expression von *Dickkopf* auch quantitativ zu untersuchen, wurden QRT-PCR-Studien durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus normal entwickelten 21 h-Embryonen sowie aus mit Lithium bzw. Zink behandelten 21 h-Embryonen isoliert und anschließend QRT-PCRs durchgeführt.

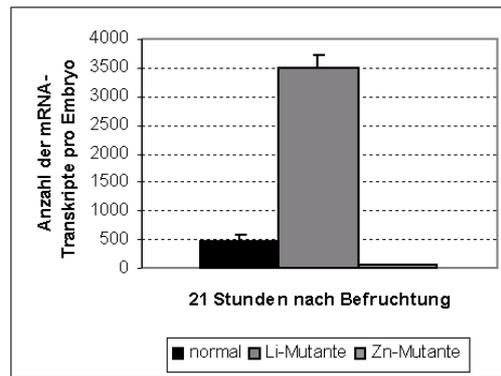


Abb. 33: "Vergleich des Expressionslevels von *Dickkopf* in normal entwickelten und "Mutanten"-Embryonen: QRT-PCR-Analysen zeigen eine 7-fach erhöhte Expression von *Dickkopf* in Lithium-"Mutanten". In Zink-"Mutanten" findet man *Dickkopf*-mRNA nur in geringen Mengen."

Mit ca. 3500 Transkripten findet man in den 21 h-Lithium-"Mutanten" ungefähr die siebenfache Menge an *Dickkopf*-Transkripten wie in den unbehandelten Embryonen. In den Zink-"Mutanten" hingegen ist die Anzahl der *Dickkopf*-mRNA sehr gering (Abb. 33).

6. Expressionskonstrukte

Verschiedene Abschnitte des codierenden Bereichs des *Dickkopf*-Gens wurden in einen Expressionsvektor kloniert, um anschließend die Expression des Dickkopf-Proteins bzw. Teile von diesem zu ermöglichen.

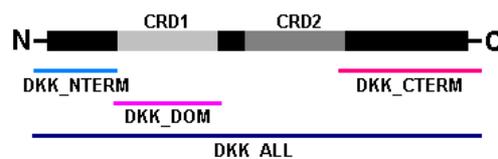


Abb. 34: "Schematischer Aufbau des Dickkopf-Proteins: die Dickkopf-Domäne (hellgrau) und die Colipase-Domäne (dunkelgrau). Dkk_all, Dkk-nterm, Dkk_dom und Dkk_cterm: die verschiedenen Expressionskonstrukte."

Ein Konstrukt sollte die Expression des N-terminalen Bereichs (64 Aminosäuren) von Dickkopf ermöglichen, ein weiteres die Expression der Dickkopf-Domäne (60 Aminosäuren) und ein drittes deckte den C-terminalen Bereich (143 Aminosäuren) des Proteins ab. Ein Konstrukt schließlich sollte die Expression des gesamten, 339 Aminosäure-großen Dickkopf-Proteins ermöglichen (Abb. 34). Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde nicht durchgeführt.

V. Diskussion

1. Charakterisierung von *Dickkopf*

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch im Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* Homologe der *Dickkopf*-Gene vorhanden sind. Dazu wurde ein aus genomischer DNA amplifiziertes Fragment, welches zuvor in der genomischen Seeigeldatenbank als ein Bereich mit hoher Homologie zu murinem *Dickkopf-1*-Gen identifiziert wurde, als Sonde verwendet, um eine "full-length"-cDNA-Bibliothek zu screenen.

Dieses Screening lieferte lediglich einen positiven Klon. Die cDNA dieses Klons enthielt einen ORF, der für ein Protein mit 339 Aminosäuren codiert. Analysen der Proteinsequenz zeigten, dass dieses Protein zwei cysteinreiche Domänen, in denen jeweils zehn Cysteinreste vorhanden sind, besitzt. Diese beiden cysteinreichen Domänen sind charakteristisch für Proteine der *Dickkopf*-Familie. In allen *Dickkopf*-Proteinen sind die Positionen der 20 Cysteinresten innerhalb der beiden Domänen konserviert. Zu dem sind die beiden gefundenen Domänen identisch bzw. nahezu identisch mit der für die *Dickkopf*- bzw. Colipase-Domäne der bisher in anderen Organismen identifizierten *Dickkopf*-Proteine gefundenen Consensus-Sequenz (Glinka *et al.*, 1998). Demnach handelt es sich bei diesem isolierten Klon um ein *Dickkopf*-Gen. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die gefundene Proteinsequenz bei der phylogenetischen Analyse eindeutig in die Familie der *Dickkopf*-Proteine gruppiert wird (siehe V.2).

Die Linker-Region zwischen den beiden Domänen ist mit 45 Aminosäuren in etwa so lang wie für *Dickkopf-1*, -2 und -4-Proteine aus anderen Organismen beschrieben. Die C-terminale Region hingegen zeigt bezüglich ihrer Länge mehr Ähnlichkeit zu den bereits gefundenen *Dickkopf-3*-Proteinen (Krupnik *et al.*, 1999). Eine BLAST-Suche lieferte als Ergebnis *Dickkopf-2* aus Huhn. Ein Vergleich der Sequenz der *Dickkopf*- bzw. der Colipase-Domäne aus dem Seeigel mit den entsprechenden Sequenzen aus weiteren Organismen zeigt, dass sowohl die *Dickkopf*- als auch die Colipase-Domäne von *Dickkopf* aus Seeigel am besten mit den entsprechenden Domänen der *Dickkopf-1* und -2-Proteine übereinstimmen. Die geringste Ähnlichkeit zeigen sie zu den *Dickkopf-3*-Proteinen. Dies zeigt auch der erstellte phylogenetische Stammbaum. *Dickkopf* aus dem Seeigel wird zusammen mit den anderen *Dickkopf-1*, -2 und -4-Proteinen in einen Ast des Baumes gruppiert. Sowohl die *Dickkopf-3*-

Proteine als auch die Soggy-Proteine bilden jeweils einen getrennten Ast (siehe V.2). Da die gefundene Proteinsequenz einige Merkmale mit den Dickkopf-1, -2 und -4-Proteinen sowie mit den Dickkopf-3-Proteinen teilt, kann das isolierte Gen nicht eindeutig klassifiziert werden. Sicher ist lediglich, dass es nicht für Soggy codiert, da Soggy-Proteine keine cysteinreiche Domänen enthalten.

Mit Hilfe der vollständigen Sequenz des isolierten wurde erneut die genomische Seeigeldatenbank durchsucht. Dabei konnten keine weiteren *Dickkopf*-Gene im Genom des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* identifiziert werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es kein weiteres *Dickkopf*-Gen im Seeigel gibt.

2. Phylogenetische Analyse

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit durch Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen neue Informationen über die evolutionäre Entwicklung von Dickkopf-Proteinen gewonnen werden. Hierfür wurde die gefundene Dickkopf-Sequenz mit den Proteinsequenzen weiterer Dickkopf-Proteine aus anderen Organismen verglichen und mit Hilfe des Neighbour-Joining-Verfahrens phylogenetisch analysiert.

Hierbei wird die entdeckte Dickkopf-Sequenz der Familie der Dickkopf-Proteine zugeordnet. Dabei befindet sich das Protein aus dem Seeigel im selben Ast mit den Dickkopf-1, -2 und -4-Proteinen aus anderen Organismen. Sowohl die Soggy-Proteine als auch die Dickkopf-3-Proteine bilden jeweils einen von den restlichen Dickkopf-Proteinen getrennten Ast. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem aus Seeigel isolierten Gen um ein Vorfahren handelt, aus dem sich später in der Vertebratenentwicklung durch Gen- oder Genomduplikation die *Dickkopf-1*, -2 und -4-Gene entwickelt haben. Die *Soggy*- sowie die *Dickkopf*-Gene scheinen sich unabhängig von den anderen drei Dickkopf-Proteinen entwickelt zu haben. Dies steht im Widerspruch zu der Theorie, dass alle vier Dickkopf-Proteine von einem Vorfahr abstammen (Fedders *et al.*, 2004). In dieser Hypothese wird das *Dickkopf-3*-Gen im Nesseltier *Hydra*, einem Radialia, als Ursprungsgen angesehen. Im Laufe der Evolution haben sich dann in den Vertebraten durch Genomduplikationen die weiteren *Dickkopf*-Gene gebildet. So zeigen *Dickkopf-1*, -2 und -3 in Mausembryonen ähnliche Expressionsmuster (Monaghan *et al.*, 1999) Da sowohl in *Drosophila melanogaster* als auch in *Caenorhabditis elegans* bisher keine *Dickkopf*-Gene identifiziert wurden, geht man davon aus, dass die *Dickkopf*-Gene während der Evolution der

Protostomia verloren gingen. Da Echinodermaten näher mit dem Reich der Radialia verwandt (siehe I.3) als Urochordaten bzw. Chordaten, würde man nach dieser Theorie allerdings erwarten, dass das aus *Strongylocentrotus purpuratus* isolierte *Dickkopf*-Gen im phylogenetischen Stammbaum zwischen *Dickkopf-3* aus *Hydra* und *Ciona* zu finden ist. Da die Proteinsequenz von *Dickkopf* aus dem Seeigel jedoch in einer Gruppe mit den *Dickkopf-1*, *-2* und *-4*-Proteinen gefunden wird und keine weiteren *Dickkopf*-Homologe im Genom gefunden wurden (siehe V.1), liegt es nahe, dass es sich bei dem *Dickkopf-3*-Gen aus *Hydra* nicht um das Ursprungsgen aller vier Vertebraten-*Dickkopf*-Gene handelt. Gestützt wird die Annahme, dass sich die *Dickkopf-3*-Gene als auch die *Dickkopf-1*, *-2* und *-4*-Gene unabhängig voneinander entwickelt haben, dadurch, dass in einem *Ciona*-Genom-Projekt ein weiteres *Dickkopf*-Gen gefunden wurde (Hino *et al.*, 2003). Dieses Gen zeigt große Homologie zu *Dickkopf-2*-Genen und wird in phylogenetischen Analysen ebenfalls in den *Dickkopf-1*, *-2* und *-4*-Ast gruppiert. Allerdings fehlt der vorgeschlagenen Proteinsequenz die erste cysteinreiche Domäne, weswegen eine Zugehörigkeit zur Familie der *Dickkopf*-Proteine nicht sichergestellt ist. Zudem sind Vorhersagen aus genomischen Sequenzen oftmals sehr unsicher. Ausserdem besitzen die *Dickkopf-1*, *-2* und *-4*-Proteine die Fähigkeit Kremen und LRP5/6 zu binden. Den *Dickkopf-3*-Proteinen fehlt diese Eigenschaft. Diese Tatsache legt ebenfalls nahe, dass die *Dickkopf-3*-Gene einen anderen Ursprung als die übrigen *Dickkopf*-Gene besitzen. Jedoch wurde noch nicht geprüft, ob auch das *Dickkopf*-Protein aus dem Seeigel die Eigenschaft, Kremen und LRP5/6 zu binden, besitzt.

3. Expression von *Dickkopf*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Expressionsprofils mittels QRT-PCR sowie die Bestimmung des zeitlichen Expressionsmusters von *Dickkopf* während der Embryogenese.

Die QRT-PCR-Analyse ergab, dass *Dickkopf* zum ersten Mal im frühen Blastula-Stadium (12 h-Embryonen) detektierbar ist. Expression von *Dickkopf* kann anschließend während der gesamten Embryogenese beobachtet werden. Die höchste Expression von *Dickkopf* findet man in der 33 h-Gastrula. Auch bei der WMISH wird Expression von *Dickkopf* zum ersten Mal in 12 h-Embryonen gefunden. Zu diesem Zeitpunkt findet man Expression von *Dickkopf* in der Vegetalplatte der Embryonen. Während des gesamten Blastula-Stadiums bleibt die Expression von *Dickkopf* auf

diesen Bereich beschränkt. Dieser Bereich im Seeigelmbyo ist wie bereits beschrieben (siehe I.3) für die Induktion endomesodermalen Gewebes verantwortlich. Dies deutet darauf hin, dass Dickkopf im Prozess der endomesodermalen Induktion involviert ist und dafür sorgt, dass keine überschüssigen mesodermale Zellen produziert werden (siehe V.4). Diese Funktion wird ebenfalls für Dickkopf-1 aus Kaninchen vermutet (Idkowiak *et al.*, 2004). Dieses Expressionmuster entspricht den Expressionsmustern von anderen *Dickkopf*-Genen in weiteren Organismen. Im Frosch wird *Dickkopf-1* ebenfalls in endomesodermalen Gewebe exprimiert (Kazanskaya *et al.*, 2000). Auch *Dickkopf-1*, -2 und -3 aus Maus sind sowohl in Mausembryonen als auch in adulten Mäusen in Geweben exprimiert, die von Mesenchymzellen abstammen (Monaghan *et al.*, 1999). Mit Beginn der Gastrulation wird *Dickkopf* im sich invaginierenden endomesodermalen Gewebe exprimiert.

Der Bereich des frühen sich invaginierenden Endomesoderms ist in Vertebraten als Kopforganisator-Bereich (anterior) bekannt (Gilbert & Saxen, 1993). Demnach scheint auch *Dickkopf* im Seeigel eine Aufgabe in der Induktion von anterioren Strukturen zu besitzen. Da Seeigel keinen Kopf besitzen (siehe I.1), stellt sich die Frage, welcher Bereich im Seeigelembryo mit der Kopf-Struktur in Vertebraten vergleichbar ist. Der Mund kann im Seeigelembryo als der anteriorste Bereich angesehen werden. Eine Aufgabe von Dickkopf könnte also die Bildung des larvalen Mundes sein. Denn mit voranschreitender Gastrulation wird deutlich, dass sich die Expression von *Dickkopf* auf den Vorderdarm beschränkt. Der Vorderdarm ist genau der Bereich, der später mit dem oralen Ektoderm verschmilzt und den Mund des Embryos bildet (siehe I.2). Auch *Dickkopf-1* wird sowohl in Frosch als auch in Maus im Vorderdarm exprimiert. Zudem wird vermutet, dass Dickkopf-1 u.a. an der Bildung von Zähnen und Gaumen der Maus eine Rolle spielt (Monaghan *et al.*, 1999). Es liegt daher nahe, dass Dickkopf an Interaktionen zwischen oralen Ektoderm und Endomesoderm während der Bildung des Mundes im Seeigelembryo beteiligt ist. Interessanterweise findet man in 33 h-Embryonen die höchste Anzahl von *Dickkopf*-Transkripten. Zu diesem Zeitpunkt sind sich orales Ektoderm und der Vorderdarm bereits sehr nahe und ein sezerniertes Protein wie Dickkopf könnte mit Rezeptoren an ektodermalen Zellen interagieren. Möglicherweise ist dies der Zeitpunkt, an dem die Induktionsvorgänge, die zur Bildung des Mundes nötig sind, beginnt.

Zusätzlich findet man die Expression von *Dickkopf* mit Beginn der Gastrulation im apikalen Ektoderm. Man glaubt, dass dieser Bereich zusammen mit dem "ciliated band" das Äquivalent des zentralen Nervensystems in Chordaten/Vertebraten ist, da verschiedene Studien zeigen, dass viele Gene, die an der Bildung des zentralen Nervensystems in Vertebraten beteiligt sind, im "ciliated band" und/oder im apikalen Ektoderm von Nicht-Chordaten Deuterostomen-Larven exprimiert sind (Poustka *et al.*, 2004). Expression verschiedener *Dickkopf*-Gene in Zellen des zentralen Nervensystems wurde auch in anderen Organismen gefunden. So wird *Dickkopf-3* in Seescheiden nicht nur in endodermalen Zellen, sondern eben auch in Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (Imai *et al.*, 2004). Auch in Nesseltieren wird *Dickkopf-3* in den Nematocyten, speziellen sensorischen Zellen im ektodermalen Gewebe, exprimiert (Fedders *et al.*, 2004). In Frosch und Zebrafisch wurde gezeigt, dass *Dickkopf-1* für die Bildung des anterioren Neuroektoderms nötig ist (Kazanskaya *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass *Dickkopf* wahrscheinlich auch an der Differenzierung von sensorischen Zellen im Seeigelembryo beteiligt ist.

In den späten Embryonalstadien findet man die Expression von *Dickkopf* ausserdem in den Bereichen der sich entwickelnden Arme. Die Expression in sich entwickelnden Extremitäten wurde auch für *Dickkopf-1*, *-2* und *-3* in späten Embryonalstadien der Maus gezeigt (Grotewold *et al.*, 1999). Möglicherweise besitzt auch *Dickkopf* noch eine Funktion in der späteren Seeigel-Larve.

4. Einfluss von Lithium und Zink

Mit der Herstellung von Lithium- bzw. Zink-"Mutanten" sollte aufgeklärt werden, ob *Dickkopf* in bekannte Signalwege involviert ist. Dazu wurden Embryonen in 30 mM LiCl bzw. 500 μ m ZnSO₄ kultiviert.

Phenotypische Analysen zeigten, dass die Behandlung mit LiCl zu einer Vegetalisierung der Embryonen (McClay, 1996) führt und die Behandlung mit ZnSO₄ zu einer Animalisierung (Nemer, 1986; Shepherd *et al.*, 1983). Dennoch stellt man fest, dass die älteren Lithium-"Mutanten", wenn auch verkleinerte, ektodermale Strukturen zeigen. Auch die älteren Zink-"Mutanten" zeigen einen verkleinerten Darm und bilden nicht wie erwartet eine Dauerblastula. Dies liegt daran, dass sowohl LiCl als auch ZnSO₄ nach 21 Stunden aus den Kulturen herausgewaschen wurde und die Embryonen danach anfangen sich zu erholen und sich normal zu

entwickeln. Dass Lithium-“Mutanten“ dennoch größtenteils aus endomesodermalen Gewebe und Zink-“Mutanten“ aus ektodermalen Gewebe bestehen, bestätigt die WMISH mit einer Probe, die spezifisch für *Endo16*, einem endodermalem Marker-Gen (Ransick & Davidson, 1993), ist.

Die WMISH auf die “Mutanten“-Embryonen mit einer *Dickkopf*-Probe bestätigt das Expressionsmuster, das in normal entwickelten Embryonen gefunden wurde (siehe V.3). So ist *Dickkopf* in den Lithium-“Mutanten“ ausschließlich in endomesodermalen Zellen exprimiert. Da ektodermale Strukturen größtenteils nicht gebildet wurde, detektiert man keine Expression von *Dickkopf* im apikalen Ektoderm. In Zink-“Mutanten“ hingegen findet man *Dickkopf* im apikalen Ektoderm exprimiert. Dieser Bereich der Expression ist im Vergleich zum Bereich in normal entwickelten Embryonen wie erwartet stark vergrößert. Da sich wie bereits erwähnt, die Zink-“Mutanten“ nach Herauswaschung von ZnSO_4 erholen und endomesodermales Gewebe bilden, findet man *Dickkopf* ebenso wie in den normal entwickelten Embryonen in der Darmspitze exprimiert.

Die QRT-PCR-Analyse der Lithium- bzw. Zink-“Mutanten“ zeigt, dass *Dickkopf* in den mit Lithium behandelten 21 h-Embryonen siebenfach höher exprimiert ist als in den unbehandelten Embryonen. Zink hingegen scheint *Dickkopf* zu reprimieren, da kaum *Dickkopf*-Transkripte in den Zink-“Mutanten“ mittels QRT-PCR detektierbar sind. Wie bereits beschrieben (siehe I.4.1) ist eine Aufgabe des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Etablierung der anterioren-posterioren Achse bzw. beim Seeigel der animalen-vegetalen-Achse. Wnt8 spielt dabei eine besondere Bedeutung (Angerer & Angerer, 2000). Wnt8 aktiviert den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und führt zur Akkumulation von zytosolischem β -Catenin, das dann in den Nukleus wandert und im Zusammenspiel mit dem TCF/LEF-Komplex (Vonica *et al.*, 2000) endomesoderm-spezifische Gene aktiviert. Lithium ist bekannt als wirksamer Inhibitor von GSK3 β (Emily-Fenouil *et al.*, 1998). Die Inhibition von führt dazu, dass β -Catenin auch bei Abwesenheit von Wnt-Signalen nicht degradiert wird. Lithium ahmt demnach die Wirkung von Wnt-Signalen nach. Da *Dickkopf* in den Lithium-“Mutanten“ hoch exprimiert ist, zeigt, dass *Dickkopf* Ziel des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. Dass die Expression durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs induziert durch Lithium erhöht wird, wurde bereits für das humane *Dickkopf-1*-Gen gezeigt (Niida *et al.*, 2004; Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). *Dickkopf* ist zudem im frühen Embryonalstadium in der Vegetalplatte exprimiert (siehe V.3) und in anderen

Organismen konnte gezeigt werden, dass Dickkopf-1 ein wirksamer Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist (siehe I.4.2). Die Tatsachen deuten darauf hin, dass *Dickkopf* als Feinregulator bei der Endomesoderm-Spezifikation wirkt: wird die Signalkaskade für die Endomesoderm-Spezifikation induziert, wird auch *Dickkopf* exprimiert. Dickkopf wirkt anschließend inhibierend auf diesen Signalweg und sorgt damit dafür, dass nicht zu viel endomesodermales Gewebe induziert wird. Wie wichtig die Regulation von Wnt-Signalen ist, zeigen Überexpressionsversuche von *Wnt8*. Wird Seeigelembryonen zusätzlich *Wnt8*-mRNA injiziert, entwickeln diese Embryonen mehrere Invaginationsstellen (Wikramanayake *et al.*, 2004). Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob auch Dickkopf im Seeigel die Fähigkeit zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs besitzt.

5. Ausblick

Eine eindeutige Klassifizierung des isolierten *Dickkopf*-Gens sowie dessen phylogenetische Einordnung und evolutionäre Entwicklung ist auf Grund fehlender Informationen über die Funktion von Dickkopf im Seeigel nicht möglich.

Die Identifizierung und Charakterisierung von weiteren *Dickkopf*-Genen in Organismen, die in der Evolution zwischen Vertebraten und Echinodermaten liegen, könnte neue Erkenntnisse über die Evolution der *Dickkopf*-Gene geben. Aus diesem Grund wird in der Arbeitsgruppe "Evolution and Development" bereits nach *Dickkopf*-Genen im Lanzettfischchen, dem nächsten Verwandten der Wirbeltiere, gesucht. Um die Involvierung von Dickkopf in den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu untermauern sowie eine eindeutige Klassifizierung zu ermöglichen, sollte untersucht werden, ob man auch im Seeigel die beiden an der Inhibition des Signalwegs beteiligten Rezeptoren Kremen und LRP5/6 identifizieren kann. Anschließende Proteinexpression von Dickkopf, Kremen und LRP5/6 würde Bindungsstudien, und damit eine genauere Charakterisierung von Dickkopf ermöglichen. Sollte Dickkopf keine Fähigkeit zur Bindung dieser beiden Rezeptoren besitzen, wäre eine nähere Verwandtschaft von *Dickkopf* mit den *Dickkopf-3*-Genen als mit den übrigen *Dickkopf*-Genen wahrscheinlicher (siehe V.2).

Die Bestimmung des Expressionsmusters sowie des Expressionsprofils von *Dickkopf* liefert zwar erste Anhaltspunkte für die Funktion von Dickkopf, doch sind funktionelle Analysen von Nöten, um diese zu validieren. Eine geeignete Methode ist die Injektion von spezifischen "antisense"-Morpholino-Oligonukleotiden, die

effektiv die Translation von *Dickkopf*-mRNA verhindern. Bereits am Phenotyp der injizierten Embryonen lässt sich oftmals die Funktion des so ausgeschalteten Proteins erkennen. Sollte Dickkopf z.B. wirklich an der Bildung des larvalen Mundes beteiligt sein (siehe V.3), zeigen diese Morpholino-“Mutanten” evtl. keinen Mund. Durch QRT-PCR-Studien kann weiterhin untersucht, ob bestimmte Gene in den Morpholino-“Mutanten” rauf- bzw. runterreguliert sind. Interessant sind dabei Gene, die im Wnt/ β -Catenin-Signalweg involviert sind. Sollte Dickkopf auch im Seeigel ein wirksamer Inhibitor dieses Signalwegs sein, so sollten Gene wie *Wnt8* in den Morpholino-“Mutanten” raufreguliert sein (siehe V.4). Ein für *Dickkopf*-mRNA spezifisches “antisense”-Morpholino-oligonukleotid wurde daher bereits designt. Ebenso aufschlussreich sind Injektionen von *Dickkopf*-mRNA, um die Auswirkungen der Überexpression von *Dickkopf* zu untersuchen.

Ein wichtiges Werkzeug bei der funktionellen Analyse sind Antikörper, mit denen der spezifische “Knock-out” eines Proteins ermöglicht wird. Da für die Herstellung von spezifischen Antikörpern das Vorhandensein von aufgereinigtem Protein bzw. von Proteinbereichen nötig ist, wurden bereits verschiedene Expressionskonstrukte, die die Expression des gesamten Dickkopf-Proteins sowie einzelner Domänen dieses Proteins ermöglichen, hergestellt. Der nächste Schritt besteht in der Expression und Aufreinigung von Dickkopf-Protein und in der Herstellung von Dickkopf-spezifischen Antikörpern. Damit wird nicht nur die funktionelle Analyse von Dickkopf-Protein im Seeigelembryo möglich, sondern auch die spezifische Lokalisierung von Dickkopf-Protein. Da es sich bei Dickkopf um ein sezerniertes Protein handelt, ist es möglich, dass der Wirkort von Dickkopf nicht mit dem Expressionsort von *Dickkopf*-mRNA, wie er durch die WMISH bestimmt wurde, übereinstimmt.

Die Erforschung der Funktion von Dickkopf im Seeigel steht also noch am Anfang und lässt eine Vielzahl interessanter Forschungsergebnisse erwarten.

VI. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., A. Bauer, *et al.* (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." Embo J **16**(13): 3797-804.
- Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Angerer, L. M. and R. C. Angerer (2000). "Animal-vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo." Dev Biol **218**(1): 1-12.
- Aravind, L. and 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.
- Beddington, R. S. (1994). "Induction of a second neural axis by the mouse node." Development **120**(3): 613-20.
- Bonfield, J. K., K. Smith, *et al.* (1995). "A new DNA sequence assembly program." Nucleic Acids Res **23**(24): 4992-9.
- Bouwmeester, T., S. Kim, *et al.* (1996). "Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer." Nature **382**(6592): 595-601.
- Boveri, T. (1908). "Zellenstudien VI: Die Entwicklung dispermer Seeigelleier. Ein Beitrag zur Befruchtungslehre und zur Theorie des Kerns." Jena Z Naturwiss **43**(1).
- Cameron, C. B., J. R. Garey, *et al.* (2000). "Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4469-74.
- Coffman, J. A. and 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.
- Czihak, G. (1975). "The Sea Urchin Embryo, Biochemistry and Morphogenesis." Springer-Verlag.
- Davidson, E. H., R. A. Cameron, *et al.* (1998). "Specification of cell fate in the sea urchin embryo: summary and some proposed mechanisms." Development **125**(17): 3269-90.
- Davidson, E. H., K. J. Peterson, *et al.* (1995). "Origin of bilaterian body plans: evolution of developmental regulatory mechanisms." Science **270**(5240): 1319-25.

De Robertis, E. M., A. Fainsod, *et al.* (1994). "The evolution of vertebrate gastrulation." Dev Suppl: 117-24.

Driesch, H. (1891). "Entwicklungsmechanische Studien. I. Der Wert der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermententwicklung. Experimentelle Erzeugung von Teil- und Doppelbindungen." Z wiss Zool **53**: 160-184.

Eastman, Q. and 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. and 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. and H. C. Sweet (2000). "Patterning the early sea urchin embryo." Curr Top Dev Biol **50**: 1-44.

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.

Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.

Felsenstein, J. (1992). "Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method." Genet Res **60**(3): 209-20.

Fink, R. D. and D. R. McClay (1985). "Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells." Dev Biol **107**(1): 66-74.

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." Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Gilbert, S.F. (2003). "Developmental Biology." Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Gilbert, S. F. and L. Saxen (1993). "Spemann's organizer: models and molecules." Mech Dev **41**(2-3): 73-89.
- 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.
- Gonzalez-Sancho, J. M., O. Aguilera, *et al.* (2005). "The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer." Oncogene **24**(6): 1098-103.
- Grotewold, L., T. Theil, *et al.* (1999). "Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development." Mech Dev **89**(1-2): 151-3.
- 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.
- 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 NiCl₂." Development **116**(3): 671-85.
- Harland, R. and 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.
- Hertwig, O. (1876). "Beiträge zur Kenntnis der Bildung , Befruchtung und Teilung des tierischen Eies." Gegenbaurs morphol Jahrb **1**: 374-434.
- Hillier, L. and P. Green (1991). "OSP: a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers." PCR Methods Appl **1**(2): 124-8.
- Hino, K., Y. Satou, *et al.* (2003). "A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VI. Genes for Wnt, TGFbeta, Hedgehog and JAK/STAT signaling pathways." Dev Genes Evol **213**(5-6): 264-72.
- Hörstadius, S. (1939). "The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods." Biol Rev **14**: 132-179.
- Holland, N.D., (1988). "Echinoderm Phylogeny and Evolutionary Biology." Clarendon press, Oxford, England.
- 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.
- Huelsken, J. and W. Birchmeier (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." Curr Opin Genet Dev **11**(5): 547-53.

- 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. 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 goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm." Cell **74**(4): 645-59.
- Kaneko, K. J. and 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.
- Kato, S. and Schroeter, S.C. (1985). "Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California." Marine Fisheries Review **47**(3): 1-20.
- Kawano, Y. and 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.
- Krupnik, V. E., J. D. Sharp, *et al.* (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." Gene **238**(2): 301-13.
- 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.
- Lustig, B. and 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.
- Mao, B., W. Wu, *et al.* (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." Nature **411**(6835): 321-5.
- McClay, D.R. (1996). Sea urchin embryology course manual of the Woods Hole Embryology course 1996.
- McClay, D. R. and 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.

- Miklos, G. L. and G. M. Rubin (1996). "The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms." Cell **86**(4): 521-9.
- 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.
- Monaghan, A. P., P. Kioschis, *et al.* (1999). "Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages." Mech Dev **87**(1-2): 45-56.
- 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.
- Niehrs, C., O. Kazanskaya, *et al.* (2001). "Dickkopf1 and the Spemann-Mangold head organizer." Int J Dev Biol **45**(1): 237-40.
- 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.
- Parker, D. and Kalvass, P. (1992). "Sea Urchins. In California's Living Marine Resources and Their Utilization." In W. L. Leet, C. M. Dewees, and C. W. Haugen (eds.), Sea Grant Extension Publication UCSGEP-91-12, Sea Grant Extension Program, Wildlife and Fisheries Biology Department, University of California, Davis, CA, pp. 41-43.
- Pera, E. M. and M. Kessel (1997). "Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate." Development **124**(20): 4153-62.
- Perriere, G. and M. Gouy (1996). "WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks." Biochimie **78**(5): 364-9.
- 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.
- Poustka, A.J. (2001). "The sea urchin embryo transcriptome: organising a basal deuterostome embryo." Paris-Lodron-Universität, Salzburg.
- 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.
- Ransick, A. and E. H. Davidson (1993). "A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo." Science **259**(5098): 1134-8.
- Ransick, A., S. Ernst, *et al.* (1993). "Whole mount in situ hybridization shows Endo 16 to be a marker for the vegetal plate territory in sea urchin embryos." Mech Dev **42**(3): 117-24.
- Rothbacher, U. and P. Lemaire (2002). "Creme de la Kremen of Wnt signalling inhibition." Nat Cell Biol **4**(7): E172-3.

Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.

Sawada, K., K. Agata, *et al.* (1996). "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." Int J Dev Biol **40**(3): 531-5.

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.

Shih, J. and 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.

Smolich, B. D., J. A. McMahon, *et al.* (1993). "Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface." Mol Biol Cell **4**(12): 1267-75.

Spemann, H. and Mangold, H. (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.

Thomas, P. and 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.

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.

Turgeon, D. D., A. B. Bogan, *et al.* (1988). "Common and Scientific Names of Aquatic Invertebrates from the United States and Canada." Special Publication 16, American Fisheries Society, Bethesda, MD.

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.

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, J., J. Shou, *et al.* (2000). "Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53." Oncogene **19**(14): 1843-8.

Wessel, G. M. and 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., 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.

Wray, G. A. and 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.

Yamaguchi, T. P. (2001). "Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning." Curr Biol **11**(17): R713-24.

Zoltewicz, J. S. and 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.