

Charakterisierung des Vertebraten-Gens *four-jointed x1*
(*fx1*) und Analyse des planaren
Zellpolaritätssignalwegs (PCP-Signalweg)

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Rebecca Rock
aus
Haßloch

Würzburg 2005

Eingereicht am:.....
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:.....
2. Gutachter:.....
der Dissertation

1. Prüfer:.....
2. Prüfer:.....
3. Prüfer:.....
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Mit dem Zweifel wächst das Wissen.

(Gerhard Kocher)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung.....	6
Summary.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Der planare Zellpolaritätssignalweg.....	10
1.2 Augenentwicklung in Drosophila.....	12
1.3 Der Notch-Signalweg.....	12
1.4 Der PCP-Signalweg bei der Innenohrentwicklung von Vertebraten.....	13
1.5 Neuralrohrschluss.....	14
1.6 Fat, Dachsoos und Four-jointed in Drosophila.....	15
1.6.1 Interaktion auf Proteinebene.....	15
1.6.2 Regulation der Expression.....	16
1.6.3 Phänotypen von Ft-, Ds- und Fj-Mutanten.....	17
1.7 Fat, Dachsoos und Four-jointed in Vertebraten.....	17
1.7.1 Homologe von Fat.....	17
1.7.2 Homologe von Dachsoos.....	18
1.7.3 Homologe von Four-jointed.....	18
1.8 Zielsetzung.....	18
2 Material.....	20
2.1 Plasmid-Vektoren.....	20
2.2 Oligonukleotide.....	20
2.3 Bakterienstämme.....	22
2.4 cDNA-Expressionsbibliothek.....	22
2.5 Eukaryotische Zelllinien.....	22
2.6 Mausstämme.....	22
2.7 Enzyme und Kits.....	23
2.8 Antikörper.....	23
2.9 Chemikalien.....	23
2.10 Zellkulturmedien und Seren.....	23
2.11 Puffer und Lösungen.....	23
3 Methoden.....	24
3.1 Präparation von genomischer DNA aus Gewebe.....	24
3.2 Agarose-Gelelektrophorese mit SB-Puffer.....	24
3.3 Real-Time-PCR.....	24
3.3.1 Reverse Transkription.....	25
3.3.2 Real-time-PCR.....	25
3.4 Zellkulturtechniken.....	25
3.4.1 Kultivierung und Lagerung.....	25

3.4.2	Transfektion von Säugerzellen mit Calciumphosphat	26
3.4.3	Transfektion von Säugerzellen durch Elektroporation.....	26
3.4.4	Infektion von Insektenzellen mit Baculoviren	27
3.5	Reporterassays.....	27
3.5.1	Lyse von transfizierten Zellen für die Reporterassays	27
3.5.2	Luziferase-assay	27
3.5.3	β -Galaktosidase-assay	28
3.6	Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie	28
3.6.1	Reinigung von His-Fusionsproteinen.....	28
3.6.2	Cross-linking	28
3.6.3	Tandem-Affinitätschromatographie.....	29
3.7	Analyse von Proteinen	30
3.7.1	Western-Blotting	30
3.7.2	Aktivitätsbestimmung von alkalischer Phosphatase	31
3.8	Präparation von Mausembryonen.....	31
3.9	Herstellung von Gewebeschnitten.....	31
3.9.1	Cryoschnitte	31
3.9.2	Paraffinschnitte.....	31
3.10	<i>In situ</i> Affinitätslokalisation.....	32
3.10.1	Färbung ganzer Embryonen	32
3.10.2	Färbung auf Cryoschnitten	33
3.10.3	Expressionsklonierung	33
3.11	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	34
3.11.1	Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Proben	34
3.11.2	Hybridisierung von ganzen Mausembryonen	35
3.11.3	Hybridisierung von Zebrafisch-Embryonen.....	37
3.11.4	Hybridisierung von Paraffinschnitten	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Das <i>four-jointed</i> -Gen in verschiedenen Spezies	40
4.2	Die Expression von <i>fxl</i> in der Maus	42
4.3	Die Expression von <i>fxl</i> im Zebrafisch	45
4.4	Regulation der Expression von <i>fxl</i>	46
4.5	Analyse der Fjx1-Knock-out-Mäuse.....	46
4.6	Lokalisierung der Fjx1-Bindungsstellen	47
4.7	Identifizierung eines postulierten Fjx1-Rezeptors	50
4.7.1	Expressionsklonierung	50
4.7.2	Coimmunpräzipitation.....	52
4.8	Identifizierung der Dachsous- und Fat-Homologen in der Maus.....	55
4.9	Expression der <i>dachsous</i> - und <i>fat</i> -Homologen in der Maus	59
4.10	Identifikation von Fjx1-ähnlichen Proteinen.....	66
4.11	Expression der <i>fxl</i> -ähnlichen Gene.....	69

5	Diskussion	73
6	Literaturverzeichnis.....	80
	Anhang	85

Abkürzungsverzeichnis

ϵ_{xxx}	molarer Extinktionskoeffizient bei xxx nm
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonia]-1-propansulfonathydrat
CNBr	Cyanogenbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hPIAP	menschliche plazentale alkalische Phosphatase
IL-3	Interleukin-3
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
NTA	Nitriloessigsäure
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pNPP	4-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
rlu	relative light unit
rpm	Umdrehungen pro Minute

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
Sarcosyl	N-Lauroylsarcosin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	sezernierte alkalische Phosphatase
Sulfo-SBED	Sulfosuccinimidyl[2-6-(biotinamido)-2-(<i>p</i> - azzidobenzamido)-hexanoamido]ethyl-1,3'- dithiopropionat
TEV	Tabacco Etch Virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Das *four-jointed (fj)* Gen in *Drosophila* ist zum einen am proximo-distalen Längenwachstum der Extremitäten beteiligt, zum anderen spielt es auch eine Rolle in dem in neuerer Zeit verstärkt untersuchten planaren Zellpolaritätssignalweg (PCP-Signalweg). Über das in der Maus identifizierte homologe *ffx1* Gen ist dagegen vergleichsweise wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher die nähere Charakterisierung von *ffx1* sowie die Identifizierung möglicher Interaktionspartner. Durch RNA *in situ* Hybridisierung wurde zunächst das räumliche und zeitliche Expressionsmuster von *ffx1* in Embryonen und adulten Organen untersucht. Dabei zeigte sich, dass *ffx1* in allen Stadien vor allem im Gehirn, aber auch in epithelialen Strukturen verschiedener Organe exprimiert war. Obwohl die Expression von *ffx1* ebenso wie die von *fj* über den Notch-Signalweg reguliert wird, konnte im Gegensatz zu *Drosophila* jedoch keine Regulation von *ffx1* über den Wnt- und/oder den JAK/STAT-Signalweg nachgewiesen werden.

Da *Fj* in *Drosophila* zumindest teilweise sezerniert wird und nicht-zellautomome Effekte zeigt, wurde ein *Fjx1*-Rezeptor gesucht. Mit Hilfe eines *Fjx1*-AP Fusionsproteins konnten Bindungsstellen überlappend bzw. angrenzend zu Regionen mit *ffx1*-Expression gefunden werden. Beispielsweise zeigten in der embryonalen Lunge und der Niere sowohl die *in situ* Hybridisierung (*ffx1*-Expression) als auch die Inkubation mit dem Fusionsprotein (Lokalisation des Bindungspartners) Färbung in epithelialen Strukturen, während im adulten Gehirn die Färbungen in jeweils benachbarten Schichten des Hippocampus und des Kleinhirns detektiert wurden. Durch Expressionsklonierung bzw. Coimmunpräzipitation konnte der Rezeptor jedoch nicht identifiziert werden.

Aufgrund der Tatsache dass *fj* in *Drosophila* in enger Beziehung zu *dachsous (ds)* und *fat (ft)* steht, wurden die homologen Gene in der Maus gesucht und deren Expressionsmuster analysiert. In Embryonalstadien war *dchs1* komplementär zu *ffx1* in mesenchymalen Geweben zu finden, ähnlich der Situation in *Drosophila*, wo *fj* und *ds* in gegenläufigen Gradienten exprimiert sind. Das homologe Gen von *ft*, *fat-j*, war hingegen nicht ubiquitär exprimiert, sondern wie *dchs1* im Mesenchym. Ergänzend dazu wurden die *fat-like (ftl)* Homologen, *fat1-3*, epithelial detektiert. Die Expression in adulten Organen wurde mit Real-Time-PCR untersucht, die zeigte, dass alle Gene (*fj*, *ds* und *fat* Homologe) relativ stark im adulten Gehirn zu finden sind. Mit Hilfe von RNA *in situ* Hybridisierungen konnten die Gene im Riechhirn, im Hippocampus und im Kortex des Großhirns sowie in der Körnerschicht des Kleinhirns lokalisiert werden.

Um Hinweise auf die Funktion von *Fjx1* zu erhalten, wurde in Datenbanken nach Proteinen mit ähnlicher Aminosäuresequenz gesucht, die eventuell Auskunft über mögliche Proteindomänen geben sollten. Bei den gefundenen fünf Mausproteinen handelte es sich jedoch um hypothetische bzw. noch nicht untersuchte Proteine, so dass Rückschlüsse auf die Funktion von *Fjx1* nicht möglich waren. Die Expression dieser Gene war nach Datenbankangaben entweder sehr spezifisch, beschränkt auf ein bestimmtes Gewebe (z.B.

Milchdrüse oder Nebenniere) oder schwach und dafür ubiquitär, was sich auch durch eine schwache, einheitliche Färbung in der RNA *in situ* Hybridisierung bestätigte.

Die Proteinstruktur von Fjx1 und der Fjx1-ähnlichen Proteine sowie die Art der konservierten Reste geben Grund zu der Annahme, dass es sich um (sezernierte) Glykosyltransferasen handeln könnte, was durch die zumindest zeitweise Lokalisation von Fjx1 im Golgi-Apparat bestärkt wird. Auch die in *Drosophila* gefundenen Ergebnisse sprechen für eine derartige Funktion von Fj, obwohl auch hier noch keine konkreten biochemischen Belege vorliegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Konservierung des in *Drosophila* entdeckten Fj/Ds/Ft-Signalwegs in Vertebraten hin, wenn auch der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen den Proteinen noch nicht geklärt ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

Summary

The *four-jointed* (*ff*) gene in *Drosophila* is on the one hand involved in proximodistal growth of leg and wing; on the other hand it plays a role in the more recently investigated planar cell polarity (PCP) pathway. In contrast, little is known about the homologous mouse gene *ffx1*. Therefore, the aim of this thesis was to further characterize *ffx1* and to identify potential binding partners. The temporal and spacial expression pattern of *ffx1* was analyzed by RNA *in situ* hybridization on embryos and adult organs. This revealed that *ffx1* is predominantly expressed in the brain at all stages investigated and additionally in epithelial structures of various organs. Similar to the *Drosophila* gene *ff* the expression of *ffx1* is Notch dependent, but in contrast to *Drosophila* no regulation via the Wnt or JAK/STAT signaling pathway was found.

In view of the fact that in *Drosophila* Fj is at least partially secreted and has some cell non-autonomous effects, a Fjx1 receptor was looked for. Using a Fjx1-AP fusion protein Fjx1 binding sites could be detected in regions overlapping with or adjacent to *ffx1* expression, respectively. As an example, staining of epithelial structures in embryonic lung and kidney was found by *in situ* hybridization (*ffx1* expression) as well as with the AP fusion protein (localization of the interaction partner). In the adult brain *ffx1* and Fjx1 binding sites were located in adjacent layers of the hippocampus and the cerebellum. Nevertheless, it was not possible to identify the postulated Fjx1 receptor by expression cloning or coimmunoprecipitation.

Due to the fact, that *ff* in *Drosophila* is closely connected with *dachsous* (*ds*) and *fat* (*ft*), the homologous mouse genes were searched for and their expression patterns were analyzed. In embryos, *dchs1* was expressed complementary to *ffx1* in mesenchymal tissues, similar to the situation in *Drosophila* where *ff* and *ds* are expressed in opposing gradients. Unlike *ft*, the homologous *fat-j* gene is not expressed ubiquitously, instead, it is found in mesenchymal tissue similar to *dchs1*. To complete the expected ubiquitous expression, the *fat-like* (*ftl*) homologs, *fat1-3*, were detected in epithelial structures. In adult organs expression was investigated by real time PCR, which revealed all genes (*ff*, *ds* and *fat* homologs) to be strongly expressed in the adult brain. By RNA *in situ* hybridization the expression was localized to the olfactory bulb, the hippocampus, the cerebral cortex and the granular layer of the cerebellum.

To gain information about the function of Fjx1, databases were searched for proteins with a similar amino acid sequence, which should help to identify functional protein domains. Five related mouse proteins were found, but as all proteins were only hypothetical and not investigated so far, it was not possible to draw conclusions about the function of Fjx1. According to database information the expression of the *ffx1*-related genes was either very specific, restricted to a single tissue (mammary gland or adrenal gland) or the expression was weak, but ubiquitous. This weak ubiquitous expression was confirmed by a weak uniform staining on RNA *in situ* hybridizations.

The protein structure of Fjx1 and the Fjx1-related proteins and the kind of conserved residues led to the assumption that these proteins could be (secreted) glycosyltransferases. This hypothesis is supported by the fact that Fjx1 is at least temporarily located in the Golgi apparatus and by recently published results from *Drosophila*, although there is no biochemical evidence so far.

The results of this work suggest that the Fj/Ds/Ft signaling pathway identified in *Drosophila* is conserved in vertebrates, although the mechanism of the interaction between these proteins remains completely unknown and has to be elucidated by further investigations.

1 Einleitung

Die Entwicklung von der befruchteten Eizelle zum fertigen Organismus ist ein sehr komplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von Genen beteiligt ist. So müssen sich beispielsweise aus der Eizelle die Körperachsen ausbilden; im sich entwickelnden Rumpf und den Gliedmaßen erfolgt Segmentierung, Zellen wandern und/oder differenzieren aus. An diesen Prozessen sind die unterschiedlichsten Signalwege beteiligt. Bei der Orientierung der Zellen im Raum wie z.B. der Polarisierung von Epithelien, der Zellteilung während der Gastrulation oder der morphogenetischen Zellwanderung beim Neuralrohrschluss scheint vor allem der erst in den letzten fünf Jahren untersuchte planare Zellpolaritätssignalweg eine zentrale Rolle zu spielen (Kiefer, 2005).

1.1 Der planare Zellpolaritätssignalweg

Der planare Zellpolaritätssignalweg (PCP-Signalweg) ist einer von drei bislang bekannten Signalwegen, die über einen Frizzled (Fz) Rezeptor bzw. einen dazugehörigen Wnt-Liganden verlaufen, weshalb die Signalwege auch als Wnt/Fz-Signalwege bezeichnet werden (Abb. 1). Der am längsten bekannte Wnt/Fz-Signalweg ist der so genannte klassische oder kanonische Weg, der über β -Catenin verläuft. Wird Frizzled, das bei diesem klassischen Signalweg den Corezeptor LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) benötigt, durch Wnt aktiviert, erfolgt eine Aktivierung von Dishevelled (Dsh). Dieses inhibiert dann seinerseits den so genannten β -Catenin-Abbaukomplex. Der Komplex, der unter anderem aus den Proteinen APC (adenomatous polyposis coli), Axin und GSK-3 (glycogen synthetase kinase 3) besteht, trägt normalerweise dazu bei, dass β -Catenin phosphoryliert und in Folge dessen über den Ubiquitin-Proteasom Signalweg abgebaut wird. Nicht phosphoryliertes β -Catenin hingegen transloziert in den Zellkern, wo es an Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF-Familie (lymphoid-enhancing factor/T cell factor) bindet und dadurch die Genexpression aktiviert (Moon et al., 2002).

Der nicht-klassische Wnt/Fz-Signalweg über Calcium verläuft über heterotrimere G-Proteine (GTP-bindende Proteine), die bei Aktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen führt. Dadurch werden Calcium-sensitive Proteine wie die Proteinkinase C (PKC) und CamKII (Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II) aktiviert, die durch Phosphorylierung anderer Proteine eine Zellantwort hervorrufen. Inwieweit Dishevelled, das in den anderen Wnt/Fz-Signalwegen eine zentrale Rolle spielt, beteiligt ist, ist nicht eindeutig geklärt. Vermutlich findet hier eine Überlappung mit dem PCP-Signalweg statt, da beide Signalwege durch die gleichen Proteine stimuliert werden können (Veeman et al., 2003; Wang and Malbon, 2003).

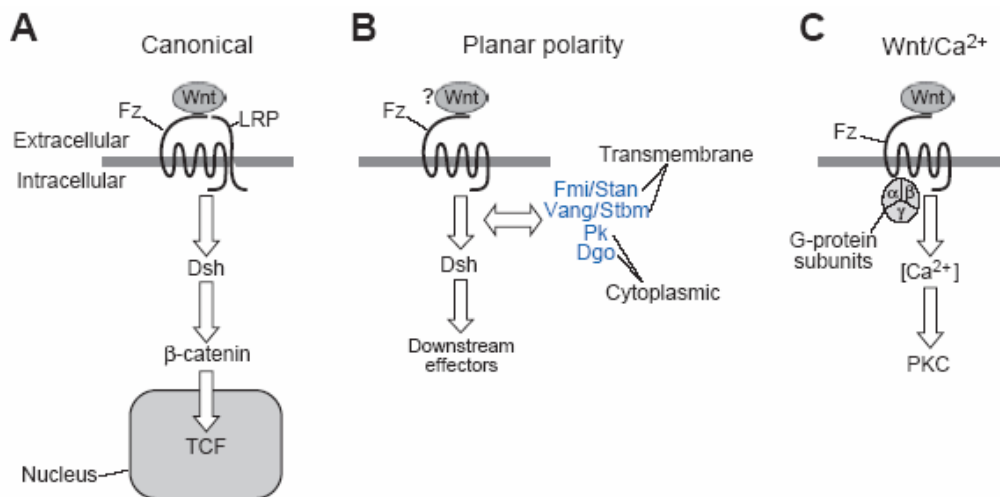


Abb. 1: Klassische und nicht-klassische Wnt/Fz Signalwege (aus Strutt, 2003)

(A) Vereinfachte Darstellung des klassischen (kanonischen) Wnt Signalwegs. Eine zentrale Rolle spielt hier die Inhibierung des Abbaus von β -Catenin im Cytoplasma durch Dsh. (B) Der PCP-Signalweg ist β -Catenin unabhängig, wirkt aber ebenfalls über Dsh. In *Drosophila* wurde bislang noch kein Wnt-Ligand für diesen Signalweg identifiziert. (C) Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg stimuliert vermutlich über heterotrimere G-Proteine die PKC. Inwieweit Dsh bei diesem Signalweg eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt, jedoch wird auch eine Überlappung mit dem PCP Signalweg vermutet.

Der PCP-Signalweg wurde ursprünglich in *Drosophila* entdeckt, ist aber auch in Vertebraten konserviert. In *Xenopus* und Zebrafisch wird dieser Signalweg, wie auch der Wnt/Ca²⁺-Signalweg, über Wnt11 und Wnt5a aktiviert, während in *Drosophila* bislang kein entsprechender Ligand für den PCP-Signalweg gefunden wurde. Die Aktivierung von Frizzled führt ungeachtet dessen unter Beteiligung von Dishevelled zu einer komplexen Umverteilung von Proteinen innerhalb der Zelle, so dass sich zwischen zwei benachbarten Zellen eine Polarität aufbaut. Die Umverteilung der Proteine erfolgt dabei durch Bildung von Multiproteinkomplexen, weshalb der PCP-Signalweg kein einfacher linearer Signalweg ist. Während beispielsweise im *Drosophila*-Flügel Frizzled und Dishevelled am distalen Rand der Zelle lokalisiert sind, findet man Flamingo/Starry night (Fmi/Stan) und Diego (Dgo) in Folge der Polarisierung am distalen und proximalen Rand. Van Gogh/Strabismus (Vang/Stbm) und Prickle (Pk) hingegen sind ausschließlich auf der proximalen Seite der Zelle zu finden. Der genaue Mechanismus der Polarisierung ist nicht bekannt. Die Auswirkungen der Polarisierung sind jedoch besonders anschaulich bei der exakten Ausrichtung der Härchen auf dem *Drosophila*-Flügel (Strutt, 2003; Veeman et al., 2003).

Neben dem oben beschriebenen Dishevelled abhängigen PCP-Signalweg, der gleichbedeutend mit einer zellautonomen Funktion von Frizzled ist, gibt es auch noch eine Dishevelled unabhängige Funktion von Frizzled, die nicht-zellautonom ist und somit weiträumige Auswirkungen für die planare Polarität hat. Vermutlich spielen bei dieser nicht-zellautonomen Frizzled-Aktivität zwei nicht-klassische Cadherine, Dachsous (Ds) und Fat (Ft), sowie Four-jointed (Fj), ein TypII-Transmembranprotein, eine Rolle für die Aktivierung von Frizzled (vgl. 1.6.1) (Strutt and Strutt, 2002).

1.2 Augenentwicklung in Drosophila

Am besten untersucht ist der PCP-Signalweg bei der Augenentwicklung in Drosophila. Das adulte Auge von Drosophila besteht aus ca. 800 Ommatidien. Ommatidien sind Cluster aus 20 Zellen, darunter acht Photorezeptorzellen. Die Ommatidien besitzen eine asymmetrische trapezförmige Form, die durch die relative Lage der Photorezeptorzellen R3 und R4 zustande kommt (Abb. 2). Da R3 normalerweise die äquatoriale Zelle und R4 die polare Zelle ist, existieren auf der dorsalen und ventralen Hälfte des Auges zwei spiegelsymmetrische Formen (Tomlinson and Struhl, 1999).

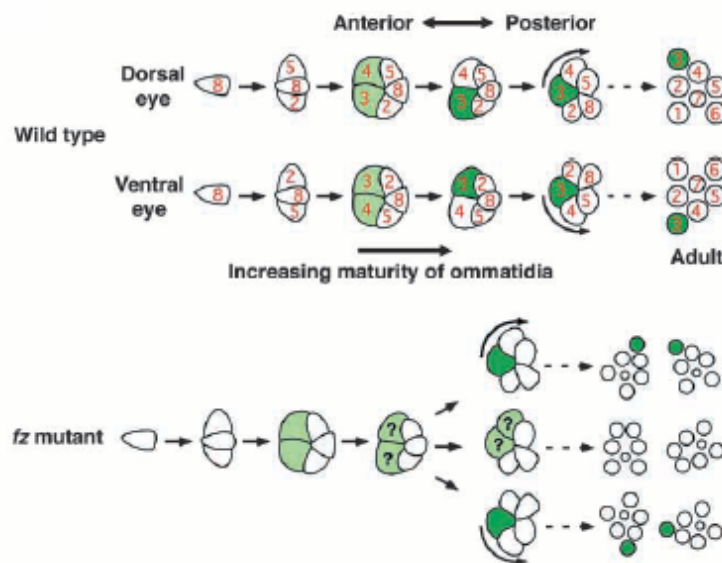


Abb. 2: Ommatidienentwicklung (aus Strutt, 2003)

Die Entwicklung der Ommatidien beginnt symmetrisch. Nach der Festlegung der Photorezeptoren R3 und R4, die durch Frizzled-Aktivität in R3 erfolgt, drehen sich die Ommatidien um 90° vom Äquator weg, so dass dorsal und ventral zwei spiegelsymmetrische Formen entstehen. Fehlt Frizzled, erfolgt die Wahl von R3/R4 zufällig, ebenso wie der Winkel der Rotation.

Zu Beginn der Ommatidienentwicklung sind dorsale und ventrale Seite jedoch identisch. Die Entwicklung beginnt posterior und schreitet mit Wandern der morphogenetischen Furche nach anterior fort. Nachdem die späteren Photorezeptorzellen R3 und R4 in Kontakt getreten sind, entscheidet sich das Schicksal der Ommatidien. Die Photorezeptorzelle mit der höheren Frizzled-Aktivität wird zu R3, welches normalerweise die äquatoriale Zelle ist. Durch Rotation um 90° weg vom Äquator entstehen so die beiden spiegelsymmetrischen Ommatidienformen (Strutt et al., 2002; Yang et al., 2002).

1.3 Der Notch-Signalweg

Neben dem Wnt/Fz-Signalweg ist an der Determination von R3 und R4 auch der Notch-Signalweg beteiligt. Zum einen wird durch den Wnt/Fz-Signalweg die Expression des Notch-Liganden *delta* (*dl*) in der R3 Zelle aktiviert, zum anderen wird vermutlich Notch (N) direkt durch Dishevelled inhibiert, das an den intrazellulären Teil des Rezeptors binden kann

(Axelrod et al., 1996; Das et al., 2002). Durch einen Rückkopplungsmechanismus von Delta auf Notch wird das Signal zur R3/R4 Spezifikation weiter verstärkt. Delta aktiviert dabei Notch in der R4 Zelle, das wiederum die Expression von *delta* in R4 inhibiert (Fanto and Mlodzik, 1999). Das Notch-Signal wird durch den Transkriptionsfaktor Suppressor of Hairless (Su(H)) übermittelt (Abb. 3). Da Notch nicht nur in der planaren Polarität eine Rolle spielt, zeigen Notch-Mutanten nicht nur ähnliche Phänotypen wie Fz-Mutanten, sondern haben darüber hinaus auch Defekte durch fehlerhafte Proliferation (Go et al., 1998).

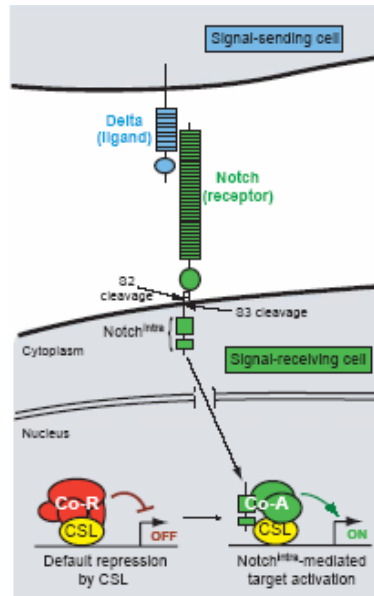


Abb. 3: Schema des Notch-Signalwegs (aus Lai, 2004)

Nach Aktivierung von Notch durch seinen Liganden Delta wird der intrazelluläre Teil des Rezeptors abgespalten und wandert in den Zellkern. Dort bindet er an einen Transkriptionsfaktor aus der CSL-Familie (CBF1 in Vertebraten, Su(H) in Drosophila, LAG1 in *C. elegans*). Unter Beteiligung verschiedener Cofaktoren wird so aus dem Repressor ein Aktivator für die Expression der Notch-Zielgene.

1.4 Der PCP-Signalweg bei der Innenohrentwicklung von Vertebraten

In Vertebraten ist der PCP-Signalweg an der Entwicklung des Innenohrs beteiligt. Ähnlich wie die Härchen auf dem Drosophilaflügel und -körper existieren im Innenohr von Vertebraten kleine Härchen, die so genannten Stereocilien, die exakt in eine Richtung ausgerichtet sind. Die Stereocilien sind die mechanosensitiven Organellen der sensorischen Haarzellen, die für die Schallwahrnehmung beim Hören notwendig sind. Obwohl bei Vertebraten noch nicht bekannt ist, welcher molekulare Mechanismus der Ausrichtung der Härchen zu Grunde liegt, wird vermutet, dass es Ähnlichkeiten zum Drosophila PCP-Signalweg gibt (Kelley, 2003). Mausmutanten homologer PCP-Gene wie z.B. von *Celsr1* (*flaming/starry night*) und *Vangl2* (*Strabismus/Van Gogh*) zeigen willkürlich orientierte Stereocilien (Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003). Auch der Notch-Signalweg spielt bei der Entwicklung des Innenohrs eine Rolle. Hier fällt besonders auf, dass bei Mutationen in Genen dieses Signalwegs neben der fehlerhaften Orientierung auch eine veränderte Anzahl von Haarzellen auftritt. Existieren normalerweise drei Reihen äußerer und eine Reihe innerer

Haarzellen, die durch den Schneckengang (ductus cochlearis) getrennt sind, so haben Jagged1-Mutanten nur zwei Reihen äußerer Haarzellen, während Jagged2-Mutanten zwei Reihen innerer und vier Reihen äußerer Haarzellen haben (Kiernan et al., 2001; Lanford et al., 1999).

1.5 Neuralrohrschluss

Die zweite Region, bei der der PCP-Signalweg in Vertebraten eine Rolle spielt, ist der Neuralrohrschluss während der Embryonalentwicklung. Beim Menschen wie auch in der Maus entwickelt sich das Neuralrohr aus der Neuralplatte, deren Bildung durch den Chorda-Mesoderm-Komplex im Ektoderm induziert wird. Die Neuralplatte richtet sich an den Seiten zu Neuralwülsten auf, die die so genannte Neuralrinne begrenzen. Während der weiteren Entwicklung wölben sich die Neuralwülste zu Neuralfalten auf, die sich dorsomedial annähern und miteinander verwachsen und so das Neuralrohr bilden. Die Auffaltung der Neuralplatte und der nachfolgende Neuralrohrschluss finden nicht zeitgleich über die gesamte Länge des Embryos statt, sondern beginnen an unterschiedlichen Initiationsstellen und setzen sich von da aus in eine oder beide Richtungen fort. Durch diesen Mechanismus hat sich das Neuralrohr an einigen Stellen schon geschlossen, während an anderen Stellen, die Neuralrinne noch geöffnet ist. Die Lage der Initiationsstellen, insbesondere Initiationsstelle 2 (Abb. 4A), ist unterschiedlich bei Mensch und Maus, und unterscheidet sich sogar bei verschiedenen Mausstämmen etwas. Neuralrohrschlussdefekte, wie Anenzephalie und Spina bifida, treten auf, wenn sich das Neuralrohr in einer der Regionen nicht oder nur teilweise schließt (Abb. 4B, C). Dabei liegt die Ursache dieses Defekts selten in einer fehlerhaften Fusion der Neuralfalten, sondern zumeist in einer fehlerhaften Initiation der Neuralplattenauffaltung (Harris and Juriloff, 1999).

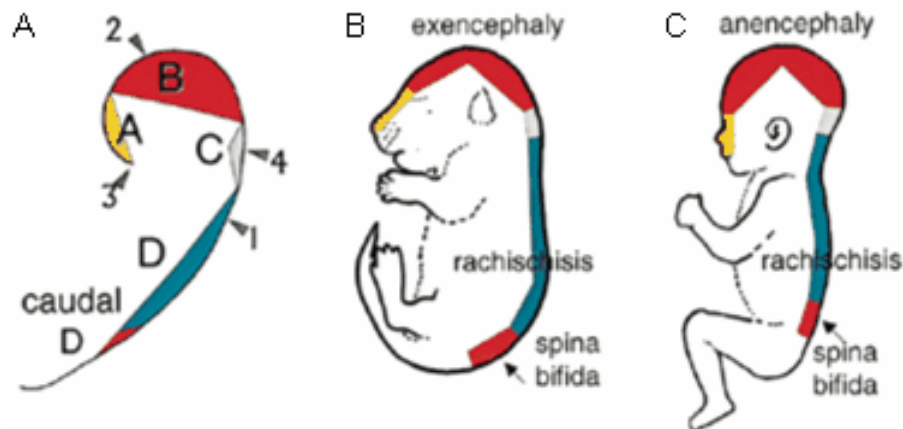


Abb. 4: Regionen des Neuralrohrschlusses (aus Juriloff and Harris, 2000)

(A) Mausembryo Tag 9. Die Initiationsstellen für den Neuralrohrschluss (1-4), von wo aus sich die Auffaltung der Neuralplatte in der entsprechenden Zone (A-D) wellenartig fortsetzt, sind mit Pfeilen markiert. (B) Mausfötus. Die Regionen, in denen Neuralrohrdefekte auftreten, entsprechen den Auffaltungszonen. (C) Menschlicher Fötus. Wie bei der Maus existieren auch beim Menschen entsprechende Regionen für häufige Neuralrohrdefekte. Treten die Defekte in der Region B auf, kommt es zur Exencephalie bzw. zur Anencephalie. Entsprechende Fehlentwicklungen in Region D führen zur Spina bifida, bei der sich nur ein kleiner Teil des Neuralrohrs nicht schließt, bzw. zur Rachischisis, bei der das Neuralrohr über die gesamte Länge der späteren Wirbelsäule geöffnet bleibt.

Der molekulare Mechanismus, der zu den Neuralrohrschlussdefekten führt, ist nicht bekannt. Bei Mäusen mit Mutationen in Genen des PCP-Signalwegs treten jedoch entsprechende Neuralrohrdefekte auf, wie z.B. bei *Celsr1*-, und *Vangl2*-Mäusen (Curtin et al., 2003; Torban et al., 2004). In *Xenopus* und Zebrafisch führen Mutationen in PCP-Genen ebenfalls zur unvollständigen Schließung des Neuralrohrs. Im Gegensatz zu Maus und Mensch ist hier jedoch bekannt, dass der Defekt durch fehlerhafte konvergierende Ausdehnung verursacht wird. Unter konvergierender Ausdehnung versteht man hier die gerichteten Zellbewegungen während der Gastrulation, durch die sich das Neuralrohr bildet. Während sich die Zellen in mediolateraler Richtung aufeinander zubewegen und so die Neuralgrube verschmälern, dehnt sich der Embryo in anterior-posteriorer Richtung aus und verlängert so die Körperachse. Die aktive Zellbewegung findet im Mesoderm statt, überträgt sich aber passiv auf die epithelialen Zellen, die letztendlich das Neuralrohr bilden (Keller, 2002). Obwohl konvergierende Ausdehnung in Mensch und Maus noch nicht gezeigt wurde, wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet, da sowohl in der Maus als auch in Zebrafisch und *Xenopus* Mutationen von Genen im PCP-Signalweg zu einer verkürzten Körperachse mit verbreiteter Bodenplatte und nicht geschlossenem Neuralrohr führen (Copp et al., 2003).

1.6 Fat, Dachous und Four-jointed in Drosophila

1.6.1 Interaktion auf Proteinebene

Da für die Aktivierung des PCP-Signalwegs in *Drosophila* kein entsprechender Frizzled-Ligand gefunden wurde, wurde ein Morphogen X postuliert, das in einem für die Etablierung der planaren Polarität notwendigen Gradienten exprimiert sein sollte (Lawrence et al., 2002).

Inzwischen geht man aber davon aus, dass nicht ein einzelnes Protein für die Aktivierung von Frizzled verantwortlich ist, sondern die komplexe Interaktion dreier Proteine (Abb. 5B). Diese Proteine sind die beiden atypischen Cadherine Fat (Ft) und Dachshaus (Ds) sowie das zumindest teilweise sezernierte TypII-Transmembranprotein Four-jointed (Fj) (Rawls and Wolff, 2003).

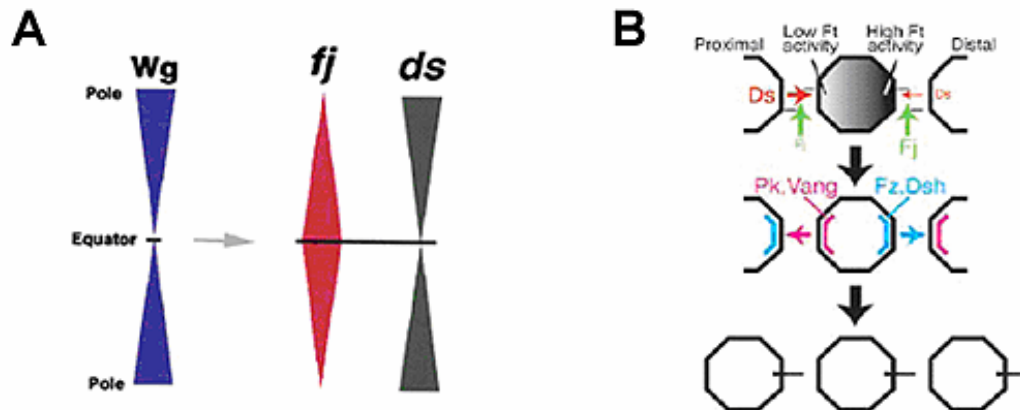


Abb. 5: Der PCP-Signalweg mit Fat, Ds und Fj (aus Yang et al., 2002 und Matakatsu and Blair, 2004)

(A) Vereinfachte Darstellung der Expression von *fj* und *ds* im sich entwickelnden Drosophila-Auge: Die Expression beider Gene ist von Wg abhängig. (B) Ds bindet an Ft der benachbarten Zelle und inhibiert dessen Aktivität. Fj hingegen verhindert diese Inhibition. Durch hohe Ds-Konzentrationen auf einer Seite der Zelle und hohe Fj-Aktivität auf der anderen Seite wird Fat in der Zelle polarisiert, was wiederum zu einer polarisierten Fz-Aktivität in der Zelle führt. Der Aktivierung von Fz folgt eine komplexe Umverteilung verschiedenster Proteine unter Bildung von Multiproteinkomplexen, die letztendlich zur polarisierten Ausrichtung der Zelle (Ommatidien im Auge) bzw. einer Zellstruktur (Härchen auf Flügel oder Körper) führt.

Ds und *fj*, die in einem gegenläufigen Gradienten exprimiert sind, beeinflussen die Aktivität von Ft, welches in den Imaginalscheiben von Auge und Flügel ubiquitär exprimiert ist (Abb. 5). Dabei bindet Ds an Ft und inhibiert dessen Aktivität. Fj hingegen verhindert diese Inhibition. Die Gradienten von Ds und Fj führen so zu einer polarisierten Lokalisierung von Ft in der Zelle, die sich auf die Aktivität von Fz auswirkt (Matakatsu and Blair, 2004).

1.6.2 Regulation der Expression

Die Regulation der Expression von *ft*, *ds* und *fj* ist sehr komplex und ist Bestandteil mehrerer Rückkopplungsmechanismen, die zumeist über *fj* verlaufen. Obwohl Fj auf Proteinebene oberhalb von Ds agiert, scheint es keinen Einfluss auf dessen Expression zu haben. Vielmehr werden vermutlich beide Gradienten, *fj* und *ds*, über den Wnt-Signalweg etabliert (Abb. 5A). Dabei aktiviert Wingless (Wg) eher dFrizzled2 (dFz2) als Fz selbst und induziert so die Expression von *ds*, während es die Expression von *fj* inhibiert (Yang et al., 2002). Neben dem Wnt-Signalweg spielen zumindest was die Expression von *fj* betrifft noch zwei weitere Signalwege eine Rolle, nämlich der Notch- und der JAK/STAT-Signalweg. Beide Signalwege aktivieren die Expression von *fj* (Yang et al., 2002). Darüber hinaus ist Fj an verschiedenen

Rückkopplungsmechanismen beteiligt. So wird beispielsweise die Expression der Notch-Liganden Delta (Dl) und Serrate (Ser) durch Fj induziert (Buckles et al., 2001). Wie bereits erwähnt ist *dl* auch ein Zielgen des Wnt/Fz-Signalwegs (Das et al., 2002). Zusätzlich zur Rückkopplung auf den Notch-Signalweg besteht eine Rückkopplung von Fj auf seine eigene Expression. Diese verläuft vermutlich über Ds und Ft. Fehlen Ds oder Ft, resultiert daraus eine verminderte bzw. eine erhöhte *ff*-Expression (Yang et al., 2002).

1.6.3 Phänotypen von Ft-, Ds- und Fj-Mutanten

Ft-, Ds- und Fj-Mutanten zeigen entsprechend ihrer Zugehörigkeit zum PCP-Signalweg Defekte in der Ommatidienrotation sowie bei der Orientierung der Flügel- und Körperhäuschen. Die Auswirkungen beim Fehlen der Proteine sind jedoch unterschiedlich gravierend. Während Ft-Aktivität für die korrekte Ausbildung der planaren Polarität unbedingt erforderlich zu sein scheint, hat Fj nur einen sehr geringen Einfluss, insbesondere wenn dieses komplett fehlt (Matakatsu and Blair, 2004). Stört man jedoch den Gradienten von Fj durch überexprimierende Klone oder Klone, die kein *ff* exprimieren, sind die Effekte deutlich stärker (Schweisguth, 2004). Im Gegensatz dazu ist die Expression von *ds* in Form eines Gradienten nicht notwendig, vielmehr genügt auch eine einheitlich hohe Expression, um in Ds-Mutanten wieder eine korrekte planare Zellpolarität herzustellen (Matakatsu and Blair, 2004).

Neben den Defekten durch fehlerhafte planare Zellpolarität zeigen Ft-, Ds- und Fj-Mutanten auch ein verändertes Längenwachstum in Flügel und Bein. Mutationen in *ds* und *ff* verursachen ein vermindertes Wachstum, das im Bein mitunter durch die Fusion zweier tarsaler Segmente mit dem Verlust des dazwischen gelegenen Gelenks verbunden sein kann (Rodriguez, 2004; Villano and Katz, 1995). Dagegen führt *ft* zu übermäßigem Wachstum (Garoia et al., 2000). Vermutlich spielen hier jedoch andere Signalwege als der PCP-Signalweg eine Rolle. Während *ds* mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht wird, ist *ff* Teil des Notch-Signalweg (Rauskolb and Irvine, 1999; Rodriguez, 2004). Über die Regulation von *ft* in Bein und Flügel gibt es derzeit keine Untersuchungen.

1.7 Fat, Dachsaus und Four-jointed in Vertebraten

Auch in Vertebraten wurden Homologe der Gene, *fat*, *dachsaus* und *four-jointed* identifiziert, diese sind aber zum Teil nur sehr schlecht charakterisiert. Ob eine Verbindung zum PCP-Signalweg besteht, ist daher noch nicht geklärt.

1.7.1 Homologe von Fat

Bislang sind vier fat-ähnliche Gene bekannt: *fat*, *MEGF1/fat2*, *fat3* und *fat-j*, die alle in der Ratte identifiziert wurden sowie *mfat1* in der Maus und *hFAT* im Menschen (Cox et al., 2000; Dunne et al., 1995; Hong et al., 2004; Mitsui et al., 2002; Nakayama et al., 2002; Ponassi et al., 1999). *Fat*, *mfat1* und *hFAT* entsprechen dabei dem gleichen Gen in verschiedenen Spezies (Tanoue and Takeichi, 2004). Alle *fat*-Homologe besitzen 34 Cadherin-Domänen, mehrere EGF-Motive, eine bzw. zwei LamininA G-Domänen sowie eine

Transmembrandomäne. Während der Embryonalentwicklung ist *fat1*-Expression vor allem in den Extremitätenknospen, den Kiemenbögen, den sich bildenden Somiten sowie verschiedenen Teilen des Gehirns zu finden (Cox et al., 2000). *Fat1*-Knock-out-Mäuse sterben kurz nach der Geburt an einem Nierendefekt, teilweise treten jedoch auch embryonale Fehlbildungen des Vorderhirns (Holoprosenzephalie) und der Augen (Anophthalmia) auf (Ciani et al., 2003). *Fat2* dagegen ist in der Ratte ausschließlich im adulten Kleinhirn exprimiert (Nakayama et al., 2002). Von *Fat3* ist lediglich die Lokalisation des Proteins in der embryonalen Ratte bekannt, welches in allen Teilen des Gehirn sowie im Neuralrohr zu finden ist (Mitsui et al., 2002). Die Expression von *fat-j* wurde mit RT-PCR untersucht, bei der sich eine ubiquitäre Expression des Gens in adulten Organen zeigte (Hong et al., 2004).

1.7.2 Homologe von Dachsous

Von Dachsous existieren vermutlich zwei Homologe, die beide im Menschen gefunden wurden. Zum einen ist dies FIB1/KIAA1773, das wie Ds in *Drosophila* 27 Cadherin-Domänen und eine Transmembrandomäne besitzt, zum anderen CDH-J, das nach derzeitigen Vorhersagen nur 21 Cadherin-Domänen hat (Hong et al., 2004; Matsuyoshi and Imamura, 1997; Nakajima et al., 2001). Northern Blot-Analysen bzw. RT-PCR zeigten dabei, dass KIAA1773 in adulter Lunge und dem Riechhirn von Ratten und CDH-J im Großhirn und Testis vom Menschen exprimiert ist.

1.7.3 Homologe von Four-jointed

Vom *Drosophila* Gen *ffj* gibt es nur ein bekanntes Homologes, nämlich *ffx1*, das im Menschen ursprünglich als *3K*-Gen identifiziert wurde (Ashery-Padan et al., 1999; Thate et al., 1995). Wie das *Drosophila* Protein zeigt *Fjx1* keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, weshalb über die Funktion des Proteins nichts bekannt ist. Lediglich ein Signalpeptid konnte im Vertebraten-Homolog identifiziert werden. Die Expression des Gens wurde ausschließlich im Gehirn beschrieben, wo sie embryonal in der Neuralplatte beginnt und während der gesamten Entwicklung bis zum adulten Gehirn andauert. Hauptsächlich findet man dabei *ffx1* embryonal im Telencephalon und Tectum bzw. adult in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns sowie im Hippocampus (Ashery-Padan et al., 1999).

1.8 Zielsetzung

Viele der in *Drosophila* identifizierten Signalwege sind auch in Vertebraten konserviert. Aufgrund einer größeren Anzahl von Genen sind hier die Signalwege jedoch häufig weitaus komplexer. Dennoch ist ein detailliertes Verständnis der Signalwege auch hier von großer Bedeutung, da viele der Signalwege bei der Embryonalentwicklung, Tumorentstehung, etc. eine Rolle spielen. Zum Beispiel ist der in *Drosophila* identifizierte PCP-Signalweg in Vertebraten beim Neuralrohrschluss und an der Innenohrentwicklung beteiligt. Inzwischen ist auch bekannt, dass das Gen *four-jointed* zusammen mit *fat* und *dachsous* zumindest in *Drosophila* Teil dieses Signalwegs ist. Inwieweit die drei Gene in Vertebraten eine Rolle spielen, wurde jedoch bislang nicht untersucht.

Ziel der Arbeit war die nähere Charakterisierung von *ffx1*, dem Vertebraten-Homolog des Drosophila-Gens *four-jointed*, sowie die Identifizierung möglicher Interaktionspartner, die aufgrund der Sezernierung und nicht-zellautonomen Funktion von Fj zu vermuten sind.

Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus alkalischer Phosphatase und Fjx1 sollten in der Maus zunächst mögliche Bindungspartner lokalisiert werden und diese anschließend durch Expressionsklonierung identifiziert werden. Alternativ sollte auch eine Identifizierung der Interaktionspartner durch Copräzipitation mit getagtem Fjx1 (epitopmarkiertem Protein) versucht werden. Die räumliche und zeitliche Lokalisierung des postulierten Fjx1-Rezeptors sollte außerdem mit dem Expressionsmuster von *ffx1* verglichen werden. Ebenso waren die Expressionsmuster von möglichen *fat*- und *dachsous*-Homologen in der Maus zu untersuchen. Inwieweit *ffx1*, ebenso wie *ff*, Teil des PCP-Signalwegs ist, sollte durch Untersuchen von Fjx1-Knock-out-Mäusen auf mögliche Defekte im Neuralrohr und Innenohr festgestellt werden.

Hinweise auf die Funktion von Fjx1 sollte darüber hinaus durch die Suche von Fjx1-ähnlichen Proteinen mit Hilfe von Datenbanken erhalten werden. Gleichzeitig sollte dabei festgestellt werden, ob es Spezies mit mehr als einem Fjx1-Homologen gibt.

2 Material

2.1 Plasmid-Vektoren

Klonierungsvektoren

pBluescript II KS (+)	Stratagene, La Jolla, CA
pCS2+	Expressionsvektor mit SP6-Promotor (Rupp et al., 1994)
pIRES2-EGFP	Clontech, Palo Alto, USA
pFastBac HT (B)	Invitrogen, Karlsruhe

Vektoren für Reporterassays

pLuc	Expressionsvektor für Luziferase-Reportergen-Konstrukt, ohne Promotor (Altschmied and Duschl, 1997)
pLuc-fjx	Sall-BssHII-Fragment (Promotorregion) der <i>fjx1</i> -cDNA in pLuc Sall/BglII
pLacZ	Expressionsvektor für lacZ mit CMV-Promotor (Maier and Gessler, 2000)
XBC 24	Expressionsvektor für konstitutiv aktives β -Catenin (Xenopus) (Yost et al., 1996)

Vektoren für Fusionsproteine

pBS-GM3K-EN2	EcoRI-NotI-Fragment der <i>fjx1</i> -cDNA in pBS EcoRI/NotI
APtag2	Expressionsvektor für Fusionsprotein mit hPIAP (Flanagan et al., 2000)
APtag4	Expressionsvektor für SEAP (Flanagan et al., 2000)
pAcGP67B-TH	Vektor für Baculovirus-System mit Signalpeptid und His-Tag (von J. Nickel)
pAcGP67-Lig	Vektor für Baculovirus-System mit Signalpeptid und His-Tag (von J. Nickel)
pBS 1761	Vektor für Fusionsproteine mit Protein A und CBP (Cellzome AG, Heidelberg)
pIgplus	Expressionsvektor für Fusionsprotein mit Fc (von A. Wizenmann)

2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech GmbH (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.

Sequenzierprimer für Expressionsklonierung

pEAK-for	GGATCTTGGTTCATTCTCAA
----------	----------------------

pEAK-rev CTGGATGCAGGCTACTCTAG

Primer zur Genotypisierung der *fjx1*-Knock-out-Mäuse

GM3K-3' ATGGACTGCATCTCCCAAAG
 mfjx-seq CCACGCTCAGCTGCTACA
 NeoC GAAGAACGAGATCAGCAGCC

Primer für Klonierungen von RNA *in situ* Proben

zf-fjx-BamHI cgcggatccATTGAGCAGCGGGTGTCT
 zf-fjx-EcoRI ccggaattcGCACAGTTTAATATGTTTGTAACGAC
 mdachsous-IC-BamHI cgcggatccGCCGATAGCCAGTAGCTCTTT
 mdachsous-IC-EcoRI ccggaattcTAGATGCGCAGCTCTGTGTC
 mds2-IC-XhoI ccgctcgagtgtgatccaaattgactg
 mds2-IC-BamHI-2 ctcgatcccaagcatgtgcttctct
 mfatj-BamHI cgcggatccAAACAGTTCGAAGCCACAC
 mfatj-EcoRI ccggaattcAGCTGCCCACTTTTACCTT
 mfat1-IC-EcoRI ccggaattcACTTCACAGCACGCTGACAC
 mfat1-IC-XhoI ccgctcgagCACCTTCAACCCCGAGTCTA
 mfat2-IC-EcoRI ccggaattcATCTGAGCCCTCGTAGTTGG
 mfat2-IC-XhoI ccgctcgagCATTGAGCTCGATCCCCTTA
 mfat3-IC-EcoRI ccggaattcTGTGCCCTGGTTCATGTTTA
 mfat3-IC-XhoI ccgctcgagACAAGGGCCTGGATGTACTG
 20614-real-EcoRI CCGGAATTcagctgaaggtgcaagagt
 20614-XhoI CCGCTCGAGcagttccacttggggatcaa
 25854-real-XbaI TGCTCTAGAcagatgcagctgtagagca
 25854-XhoI CCGCTCGAGcaactggetcaaattccaca
 27955-real-EcoRI CCGGAATTCggagcttctgtcttaagtgttg
 27955-XhoI CCGCTCGAGaaccaaggttggtgaacgac
 33557-real-EcoRI CCGGAATTCagacagccgtgcaatgat
 33557-XhoI CCGCTCGAGcagcaggtgtgctgtag
 38233-real-EcoRI CCGGAATTCatctgcagcgactgaacag
 38233-XhoI CCGCTCGAgctgaggacctgcagaaatc

Primer für Real-Time-PCR

mds-real-ex14 GGGGACTCAATGGACAGCTA
 mds-real-ex15 TATCTGCAGCTGGAATGCTG
 mds2-real-ex26neu ACACAGAGGGTTCCGTCATC
 mds2-real-ex27neu GGGAAAGGATCCGGTAAGAA
 mfatj-real-ex18 AGGACTTTGGTGGCATTGAG
 mfatj-real-ex19 GGGTCTGTTTTGGAGATGGA
 mfat1-real-ex25 CTAAGAAGCCCCTGGAGGAA

mfat1-real-ex26	TCAGGAGCAGCCAAAGATTC
mfat2-real-ex21	cttctgtagctgccctcac
mfat2-real-ex22	gtccccagtcctctctta
mfat3-real-ex20	atgcaatgtgtgggctatga
mfat3-real-ex21	gcgcagagctagcttgaagt
GM3K-real	caggctgttctttccaag
GM3K-3'	atggactgcatctccaaag
mHPRT-qPCR-alt5'	GCCCCAAAATGGTTAAGGTT
mHPRT-qPCR-alt3'	CAAGGGCATATCCAACAACA

2.3 Bakterienstämme

E. coli DH5 α	genereller Klonierungsstamm (Sambrook et al., 1989)
E. coli JM110	dam ⁻ dcm ⁻ Stamm zur Gewinnung nicht methylierter Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989)

2.4 cDNA-Expressionsbibliothek

Adulte Mausgehirn cDNA-Expressionsbibliothek im pEAK12-Vektor (DH10B-Zellen) EdgeBioSystems (MoBiTec), Göttingen

2.5 Eukaryotische Zelllinien

HEK 293	Adenovirus 5-immortalisierte Linie humaner embryonaler Nierenzellen (ATCC# CRL-1573)
293-pBPSTR-GM3K	HEK 293-Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pBPSTR-GM3K zur Expression von <i>fx1</i>
293T	HEK 293-Zellen, die das SV-40 T-Antigen exprimieren
BaF	Maus Pre-B Lymphozyten
BaF-Hm9	BaF-Zellen, stabil transfiziert mit chimerem Rezeptor EGFR/Xmrk (Morcinek et al., 2002)
Sf9	Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i> , geeignet für die Verwendung mit dem Baculovirus-Expressionssystem (ATTC# CRL-1711)

2.6 Mausstämme

Fjx1-Knock-out-Mäuse	A. Vortkamp, Berlin
C57Bl/6-Mäuse	Charles River, Sulzfeld oder Harlan Winkelmann, Borcheln
CD-1-Mäuse	Charles River, Sulzfeld oder Harlan Winkelmann, Borcheln

2.7 Enzyme und Kits

Alle nicht gesondert aufgeführten Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen: MBI, St. Leon-Rot; Amersham Pharmacia, Freiburg; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Macherey-Nagel, Düren; Clontech, Palo Alto, USA.

Super Signal

Chemilumineszenzdetektionskit	Pierce, Rockford, Illinois
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TEV-Protease	Invitrogen, Karlsruhe

2.8 Antikörper

Anti-GM3K ^{Sac-COOH}	BioScience, Göttingen
Anti-rabbit-POD	BioRad, München

2.9 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern, Medien und Reaktionslösungen wurden in p. a. Qualität von Roth GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

BM Purple (AP-Substrat)	Roche, Mannheim
Bradford-Lösung	BioRad, München
Calmodulin Affinity Resin	Stratagene, La Jolla, CA
CHAPS	Roche, Mannheim
Chelex 100 resin	BioRad, München
CNBr-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
FITC	BioRad, München
IgG-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Sulfo-SBED	Pierce, Rockford, Illinois
SybrGreen	Cambrex, Apen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

2.10 Zellkulturmedien und Seren

DMEM mit GlutaMaxI	Gibco, Karlsruhe
RPMI mit GlutaMaxI	Gibco, Karlsruhe
TC-100 Medium	Gibco, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin oder PAA, Cölbe
Lammserum	Gibco, Karlsruhe

2.11 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook et al. (1989) oder Ausubel (1988) hergestellt.

3.3.1 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA werden 2 µg Gesamt-RNA mit dem Revert Aid first-strand cDNA synthesis kit der Firma MBI Fermentas und einem Oligo(dT)-Primer gemäß den Angaben des Herstellers revers transkribiert und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

3.3.2 Real-time-PCR

PCR-Ansatz:

- 2 µl cDNA
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer
- 0,75 µl Sybr Green (1:20.000 verdünnt)
- 5 nM FITC
- 0,2 µM Primer 1
- 0,2 µM Primer 2
- 0,25 mM dNTPs
- 2,25 U Taq
- ad 25 µl Wasser

PCR-Programm:

1. 3 min 94°C
2. 15 sec 94°C
3. 1 min 60°C (oder andere Annealingtemperatur)
- Wiederholung der Schritte 2 und 3 40 x
5. 1 min 95°C
6. 10 sec 50°C
- Wiederholung des Schritts 6 45 x, dabei Erhöhung der Temperatur um jeweils 1°C

Zusätzlich zur Schmelzkurve, die während Schritt 6 erstellt wird, werden alle PCR-Produkte im Agarosegel analysiert. Eventuell gebildete Primer-Dimere werden so festgestellt, da die Fluoreszenz der Primer-Dimere das gemessene Expressionslevel des untersuchten Gens verfälscht. Zum Vergleich mehrerer Proben untereinander, z.B. um die Expression eines Gens in verschiedenen Organen zu ermitteln, werden Konzentrationsunterschiede in der eingesetzten cDNA durch Normierung auf ein Haushaltsgen wie beispielsweise HPRT ausgeglichen. Nach Möglichkeit werden die Primer über Exon-Intron-Grenzen gelegt, um eine falsche Bestimmung des Expressionslevels durch Verunreinigung von genomischer DNA auszuschließen.

3.4 Zellkulturtechniken

3.4.1 Kultivierung und Lagerung

HEK 293, 293T und 293-pBPSTR-GM3K Zellen werden in DMEM mit GlutaMAX-I, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, BaF und BaF-Hm9 Zellen in RPMI mit GlutaMAX-I, 5% FCS, 5% IL-3 (Überstand einer

stabil exprimierenden Zelllinie), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung von Sf9 Zellen erfolgt in TC-100 Medium mit 10% FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 28°C ohne CO₂. Zur längerfristigen Lagerung werden ca. 10⁷ Zellen pro ml Einfriermedium (30% FCS, 10% DMSO und 60% Medium) langsam auf -196°C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.4.2 Transfektion von Säugerzellen mit Calciumphosphat

CaCl ₂ /HEPES (pH 6,95):	100 mM HEPES 500 mM Calciumchlorid
2 x HBS (pH 7,05): (für Transfektion)	50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid 1,5 mM di-Natriumhydrogenphosphat
10 x HBS (pH 7,0): (für AP-Proteine)	1,5 M Natriumchlorid 200 mM HEPES

Am Tag vor der Transfektion werden 10⁶ Zellen auf einer 10 cm-Schale (für Zellfärbungen wurde die Schale vorher mit Gelatine beschichtet) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wird das Medium gewechselt. Für die Transfektion werden 8 - 10 µg DNA in 250 µl Wasser, 250 µl CaCl₂/HEPES-Lösung und 500 µl 2 x HBS gemischt, für 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 8 h bei 37°C und 5% CO₂ wird das Medium gewechselt und die Zellen für 48 Stunden weiter kultiviert. Nach dieser Zeit werden die Zellen oder die Überstände der transienten Transfektionen geerntet. Die Überstände der mit den AP-Konstrukten transfizierten Zellen werden mit Natriumazid bis zu einer Endkonzentration von 0,05% und 0,1 Volumen 10 x HBS gemischt und bei 4°C gelagert. Die Expressionsanalyse der transfizierten Konstrukte erfolgt durch Western-Blotting.

3.4.3 Transfektion von Säugerzellen durch Elektroporation

BaF und BaF-Hm9 Zellen werden mittels Elektroporation transfiziert. Dazu wird eine Zellsuspension mit 10⁷ Zellen pro ml in Hungermedium (RPMI mit GlutaMAX-I, 5% FCS, und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) hergestellt. Pro Transfektionsansatz werden 350 µl dieser Zellsuspension benötigt, die mit 20 µg DNA in 50 µl Hungermedium gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert werden. Die Elektroporation erfolgt mit 200 V und 1950 µF. Anschließend werden die Zellen noch einmal kurz auf Eis gestellt und dann 1:100 im entsprechenden Medium verdünnt und ausgesät. Die Stimulation von STAT5 bzw. STAT1, 3 und 5 erfolgt in Hungermedium mit 5% IL-3 (Überstand einer stabil exprimierenden Zelllinie) bzw. Hungermedium mit 50 ng/ml EGF. Als Negativkontrolle für die Reporterassays werden die Zellen in Hungermedium ohne Zusätze kultiviert.

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität werden 20 µl des Zelllysats mit 350 µl Luziferase-assay-Puffers gemischt und im Luminometer analysiert. Nach automatischer Injektion von 200 µl Luziferin-Lösung wird die Lichtemission in rlu (relative light units) über einen Zeitraum von 10 sec gemessen.

3.5.3 β -Galaktosidase-assay

Für die Auswertung der Reporter-assays werden die Zellen mit einem Vektor (pLacZ) cotransfiziert, der das β -Galaktosidase-Gen enthält, um eine Standardisierung der Transfektionseffizienz zu ermöglichen.

β -Gal-Mix:	1 mM Kaliumchlorid
	1 mM Magnesiumchlorid
	55 mM β -Mercaptoethanol
	60 mM di-Natriumhydrogenphosphat
	40 mM Natriumdihydrogenphosphat
ONPG-Lösung:	2 mg/ml ONPG
	60 mM di-Natriumhydrogenphosphat
	40 mM Natriumdihydrogenphosphat

Zur Bestimmung der Enzymaktivität werden 30 µl des Zelllysats mit 500 µl β -Gal-Mix und 100 µl ONPG-Lösung gemischt und bei 37°C inkubiert. Für den Nullabgleich bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung werden 30 µl reine Lysis-Lösung in gleicher Weise behandelt. Die Reaktion wird mit 250 µl 1 M Natriumcarbonat gestoppt und die exakte Inkubationszeit notiert. Durch Messen der Absorption im Spektralphotometer bei 420 nm wird über das Lambert-Beersche Gesetz die umgesetzte Substratmenge und daraus die Enzymaktivität berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{420} beträgt 4,72 mM⁻¹·cm⁻¹.

3.6 Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie

Proteine, die mit einer bestimmten kurzen Aminosäuresequenz, einem so genannten Tag, fusioniert sind, können mit Hilfe dieses Tags affinitätsgereinigt werden.

3.6.1 Reinigung von His-Fusionsproteinen

His-getagtes Protein wird mit Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen unter nativen Bedingungen aus Zellen oder Zellkulturüberstand nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.6.2 Cross-linking

RIPA-Puffer:	150 mM Natriumchlorid
	100 mM Tris-HCl pH 7,4
	2% NP-40
	1% Natriumdeoxycholat

0,2% SDS

NP-40-Lysis-Puffer: 150 mM Natriumchlorid
 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 1% NP-40

Aufgereinigtes Fjx1-Protein wird unter Lichtausschluss mit einer frisch angesetzten Lösung Sulfo-SBED in DMSO für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Dabei wird der Cross-Linker kovalent an das Protein gebunden. Überschüssiges Sulfo-SBED wird durch Zugabe 13 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 pro ml Proteinlösung geblockt. Mit Hilfe eines Zellsiebs wird aus adultem Mausgehirn eine Einzelzellsuspension hergestellt, die immer noch unter Lichtausschluss für 2 Stunden auf Eis mit dem Fjx1-Protein inkubiert wird. Nachdem der Protein-Zellmix für 15 min auf Eis mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden, werden die Zellen in RIPA-Puffer oder NP-40-Lysis-Puffer mit Proteinaseinhibitoren lysiert und z.T. mit Ultraschall behandelt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellreste wird der Überstand für die weitere Aufreinigung des Komplexes verwendet.

3.6.3 Tandem-Affinitätschromatographie

Die Tandem-Affinitätschromatographie beruht auf der sequentiellen Aufreinigung eines Proteinkomplexes unter möglichst schonenden, d.h. physiologischen Bedingungen, mit Hilfe zweier aufeinander folgender Tags. Als besonders geeignet in Hefe hat sich dabei die Verwendung eines ProteinA-Tags gefolgt von einer TEV-Schnittstelle und einem Calmodulin-bindenden Tags erwiesen.

IPP150: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
 150 mM Natriumchlorid
 0,1% NP-40

TEV-Schneidepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0
 150 mM Natriumchlorid
 0,1% NP-40
 0,5 mM EDTA
 (1 mM DDT)

IPP150 CBB: 10 mM β-Mercaptoethanol
 10 mM Tris-HCl pH 8,0
 150 mM Natriumchlorid
 1 mM Magnesiumacetat
 1 mM Imidazol
 2 mM Calciumchlorid
 0,1% NP-40

IPP150 CEB:	10 mM β -Mercaptoethanol
	10 mM Tris-HCl pH 8,0
	150 mM Natriumchlorid
	1 mM Magnesiumacetat
	1 mM Imidazol
	2 mM EGTA
	0,1% NP-40

Zur Aufreinigung des quervernetzten „Fjx1-Rezeptor-Komplexes“ wird das Lysat 1:4 mit IPP150 verdünnt und 2 Stunden bei 4°C mit voräquilibrierter IgG-gekoppelter Sepharose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit IPP150 und einmaligem Waschen mit TEV-Schneidepuffer wird der an die Matrix gebundene Komplex durch zweistündige Inkubation mit TEV-Enzym in TEV-Schneidepuffer bei 16°C eluiert. Das Eluat wird 1:4 mit IPP150 CBB verdünnt, dem zur Titration des im TEV-Schneidepuffer enthaltenen EDTAs 3 μ l 1 M Calciumchlorid pro ml IgG-Eluat zugesetzt wird. Dieser Mix wird für 1 Stunde bei 4°C mit der Calmodulin-Matrix inkubiert und anschließend die Matrix dreimal mit IPP150 CBB gewaschen. Die Elution des Komplexes erfolgt mit IPP150 CEB in mehreren Fraktionen, die mit SDS-PAGE analysiert werden.

3.7 Analyse von Proteinen

3.7.1 Western-Blotting

Transferpuffer (pH 8,3):	25 mM Tris-Base
	150 mM Glycin
	10% Methanol

PBT:	1 x PBS
	0,1 % Tween 20

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden zunächst mit Hilfe einer semi-dry-Elektroblot-Kammer (Biometra) auf eine Cellulosenitrat-Membran übertragen. Der Transfer erfolgt bei 5 mA/cm² für 30 min bei 4°C mit Transferpuffer. Zum Absättigen der freien Bindungsstellen auf der Membran wird der Blot in 5% Trockenmilch in PBT bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBT (1 x 15 min, 2 x 5 min) wird der Blot für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper inkubiert. Der GM3K-Antikörper wird dazu in einer 1:500-Verdünnung in PBT eingesetzt, kommerzielle Antikörper entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach erneutem Waschen (1 x 15 min, 2 x 5 min) mit PBT wird der Blot mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBT (3 x 10 min) erfolgt der Nachweis der Protein-Antikörper-Komplexe mit einem Chemiluminiszenz-Detektionssystem nach Protokoll des jeweiligen Herstellers (Amersham Pharmacia, Pierce).

3.7.2 Aktivitätsbestimmung von alkalischer Phosphatase

Über die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase kann die Konzentration der AP-Proteine im Zellkulturüberstand bestimmt werden.

2 x AP-Substratpuffer: 18 mM pNPP
 1 mM Magnesiumchlorid
 2 M Diethanolamin pH 9,8

Der nach der Transfektion geerntete Zellkulturüberstand wird zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatasen 20 min bei 65°C erhitzt. 5 - 20 µl des so behandelten Zellkulturüberstands werden mit 1 x HBS auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und mit 400 µl 2 x AP-Substratpuffer gemischt. Anschließend wird die Absorption der Lösung bei 405 nm gemessen und die Zeit zwischen Zugabe des 2 x AP-Substratpuffers und der Absorptionsmessung notiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt zum einen durch eine Eichgerade mit CIP, zum anderen durch die Berechnung der umgesetzten Substratmenge über das Lambert-Beersche Gesetz. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{405} beträgt 17,7 mM⁻¹·cm⁻¹.

3.8 Präparation von Mausembryonen

Für die Präparation von Mausembryonen eines bestimmten Stadiums werden Mäuse über Nacht verpaart und die Weibchen auf einen Vaginalplug kontrolliert. Der Zeitpunkt der Plugkontrolle wird als Embryonaltag 0,5 (E 0,5) gerechnet. Trächtige Weibchen werden durch Begasen mit CO₂ getötet. Der Uterus wird in kaltes PBS überführt und die Embryonen herauspräpariert.

3.9 Herstellung von Gewebeschnitten

3.9.1 Cryoschnitte

Mausorgane und -embryonen für die *in situ* Affinitätslokalisierung werden direkt nach der Präparation kurz in PBS gewaschen und anschließend in Tissue Tec OCT-Compound in Aluförmchen eingefroren. Das Einfrieren erfolgt in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan, um mögliche Wasserkristallbildung durch langsames Einfrieren zu vermeiden. Die Blöckchen können nach dem Einfrieren bei -80°C gelagert werden. Für Färbungen werden im Cyrostat 10 – 20 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf SuperFrost/Plus-Objektträger aufgezogen werden. Nach dem Antrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur werden die Objektträger bei -80°C gelagert.

3.9.2 Paraffinschnitte

Für Paraffinschnitte wird das Gewebe über Nacht in 4% PFA fixiert, anschließend zweimal 10 min in PBS und einmal 10 min in 0,9%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Entwässerung des Gewebes durch eine ansteigende Isopropanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%,

95%, 2 x 100%) für jeweils 2 h wird das Gewebe über Isopropanol/Chloroform (1:1) in Chloroform als Intermedium überführt. Bei 60°C wird das Gewebe solange in einem Gemisch aus Chloroform/Paraffin (1:1) in einem offenen Gefäß inkubiert, bis das Chloroform vollständig verdunstet ist. Anschließend wird das flüssige Paraffin noch dreimal gewechselt bevor das Gewebe in Blöckchen eingebettet und bei 4°C gelagert wird. Mit einem Mikrotom werden 4–6 µm dicke Schnitte angefertigt, die im 37°C Wasserbad gestreckt und auf Polysine-Objektträger aufgezogen werden. Nach dem Trocknen bei 42°C werden die Objektträger bei 4°C aufbewahrt.

3.10 *In situ* Affinitätslokalisierung

Die *in situ*-Affinitätslokalisierung in Embryonen mit einem Ligand-Fusionsprotein bietet die Möglichkeit, die Lokalisation des entsprechenden Bindungspartners zu detektieren. Das als Sonde eingesetzte Protein wird dabei mit einer hitzestabilen alkalischen Phosphatase fusioniert, mit deren Hilfe dann die Farbreaktion durchgeführt wird (Flanagan and Cheng, 2000; Flanagan et al., 2000).

3.10.1 Färbung ganzer Embryonen

Die Färbung ganzer Embryonen erfolgt bis maximal zum Stadium E 10,5, da bei älteren Embryonen das Fusionsprotein nicht mehr in tiefere Gewebeschichten eindringen kann.

HBAH (pH 7,0):	5,4 mM Kaliumchlorid 0,3 mM di-Natriumhydrogenphosphat 0,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat 4,2 mM Natriumbicarbonat 1,3 mM Calciumchlorid 0,5 mM Magnesiumchlorid 0,6 mM Magnesiumsulfat 137 mM Natriumchlorid 5,6 mM D-Glucose 0,5 mg/ml BSA 0,1% Natriumazid
Aceton/Formalin:	65% Aceton 8% Formalin 20 mM HEPES pH 7,0
10 x HBS (pH 7,0):	1,5 M Natriumchlorid 200 mM HEPES
AP-Färbepuffer:	100 mM Natriumchlorid 5 mM Magnesiumchlorid

100 mM Tris-HCl pH 9,5

Die Embryonen werden einmal mit HBAH gespült und dann für 2 h bei Raumtemperatur mit dem AP-Fusionsprotein bzw. sezernierter alkalischer Phosphatase inkubiert. Ungebundenes Fusionsprotein wird durch wiederholtes Waschen mit eiskaltem HBAH/0,1% Tween 20 (4 x 5 min bei Raumtemperatur, 4 x 1 h bei 4°C, 1 x über Nacht bei 4°C) entfernt. Die Embryonen werden für 2 min mit Aceton/Formalin fixiert und zum Entfernen überschüssiger Fixierlösung dreimal für 5 min mit 1 x HBS gewaschen. Zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatasen werden die Embryonen in 1 ml 1 x HBS pro Embryo für 30 min auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis werden die Embryonen 5 min mit AP-Färbepuffer mit 10 mM Homoarginin inkubiert und anschließend mit BM Purple (Roche) mit 1 mM Levamisol im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Farbreaktion durch Spülen mit 1 x PBS/10 mM EDTA gestoppt und die Embryonen über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Anschließend können die Embryonen in 1 x PBS/10 mM EDTA im Dunkeln bei 4°C gelagert werden.

3.10.2 Färbung auf Cryoschnitten

Das Einbettmedium wird durch Abkratzen vom Objektträger und Waschen für 5 min mit HBAH entfernt. Die Schnitte werden 2 h bei Raumtemperatur mit dem AP-Protein inkubiert und anschließend viermal 2 min mit HBAH gewaschen. Nach der Fixierung der Schnitte mit Aceton/Formalin für genau 90 sec, werden die Schnitte sechsmal 2 min mit 1 x HBS gewaschen und dann 30 min in HBS bei 67°C inkubiert. Nach dem Abkühlen werden die Schnitte einmal 5 min mit AP-Färbepuffer und einmal mit AP-Färbepuffer mit 10 mM Homoarginin inkubiert, bevor mit BM Purple (Roche) mit 1 mM Levamisol gefärbt wird. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Farbreaktion durch Spülen mit 1 x PBS/10 mM EDTA gestoppt und die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

3.10.3 Expressionsklonierung

3.10.3.1 Präparation der DNA-Pools

TB-Medium:	12 g/l Pepton
	24 g/l Hefeextrakt
	4 ml/l Glycerin
	0,17 M Kaliumdihydrogenphosphat
	0,72 M di-Kaliumhydrogenphosphat

Für die erste Runde der Expressionsklonierung werden ca. 1500 Klone (Titer der cDNA-Bank bekannt) pro 14,5 cm LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Klone werden mit 2 ml TB-Medium mit Ampicillin abgelöst und nach Zugabe von weiteren 12 ml vorgewärmtem TB-Medium mit Ampicillin für 2 – 3 Stunden bei 37°C geschüttelt. 500 µl der so angezogenen Bakterienkultur werden für einen Glycerinstock verwendet und aus der restlichen Kultur wird die DNA mit dem NucleoBond-Kit (Macherey und Nagel)

isoliert. Jeweils 5 µg der so isolierten Plasmid-DNA werden für die Transfektion auf 6 cm-Schalen verwendet. Vom Glycerinstock des positiven Pools wird der Titer bestimmt und für die zweite Runde der Expressionsklonierung werden ca. 200 – 250 Klone pro 10 cm LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Klone mit TB-Medium mit Ampicillin werden die Klone in 15 ml TB-Medium mit Ampicillin bei 37°C für 5 - 7 Stunden angezogen, bevor erneut ein Glycerinstock gemacht und DNA isoliert wird. Die dritte Runde der Expressionsklonierung wird mit 30 Klonen pro Platte durchgeführt, wobei die abgelösten Klone über Nacht bei 37°C in TB-Medium mit Ampicillin geschüttelt werden. Für die nachfolgenden Runden werden die Glycerinstocks so ausgestrichen, dass Einzelklone in 96-well-Platten angeimpft werden können. Klone mehrerer Wells werden in 15 ml TB-Medium mit Ampicillin gepoolt und für 6 – 8 Stunden bei 37°C angezogen.

3.10.3.2 Färbung der transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen werden einmal mit eiskaltem HBAH gewaschen und für 90 min mit dem AP-Protein inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit eiskaltem HBAH für jeweils 5 min werden die Zellen für genau 15 sec mit Aceton/Formalin fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimal 5 min mit 1 x HBS gewaschen und dann 100 min bei 65°C in 1 x HBS inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Zellen einmal 5 min mit AP-Färbepuffer inkubiert und anschließend unter Lichtausschluss mit BM Purple (Roche) gefärbt. Nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität wird die Färbung mit 1 x PBS/10 mM EDTA gestoppt und unter dem Mikroskop analysiert.

3.11 RNA *in situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der RNA *in situ* Hybridisierung kann das zeitliche und räumliche Expressionsmuster von Genen untersucht werden. Die Methode beruht auf der Bindung von Digoxigenin-markierter antisense-RNA (Markierung am UTP) an die entsprechende mRNA und anschließendem immunhistochemischem Nachweis (Henrique et al., 1995).

3.11.1 Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Proben

Für die antisense RNA-Sonde wird zunächst die jeweilige cDNA in Vektoren mit T3-, T7- oder SP6-Promotor kloniert. 10 µg der Plasmid-DNA werden am 5' -Ende der cDNA mit einem Restriktionsenzym linearisiert, Phenol/Chloroform gereinigt und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Anschließend werden 1 – 2 µg dieser linearisierten DNA mit folgendem Ansatz *in vitro* transkribiert:

- 1 – 2 µg linearisierte Plasmid-DNA
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 2 µl Digoxigenin-labeling Mix
- 0,8 µl RNase-Inhibitorenmix
- 1,2 µl RNA-Polymerase
- ad 20 µl DEPC-Wasser

Die Transkription erfolgt zwei Stunden bei 37°C. Durch Zugabe von 1 µl DNase und weiterer Inkubation bei 37°C für 15 min wird die DNA-Matrize abgebaut. 2 µl der RNA-Probe werden durch Gelelektrophorese überprüft. Der restliche Transkriptionsansatz wird mit Ammoniumacetat/Ethanol gefällt, in 70%igem Ethanol gewaschen und in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Probe wird 1:10 in Hybridisierungspuffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.11.2 Hybridisierung von ganzen Mausembryonen

Alle Lösungen, die vor oder während der Hybridisierung mit der RNA-Probe verwendet werden, werden mit DEPC-Wasser angesetzt oder mit DEPC behandelt.

PBT:	1 x PBS 0,1 % Tween 20
Proteinase K-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8
Proteinase K:	10 mg/ml Proteinase K-Puffer
20 x SSC (pH 5):	3 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumcitrat
RIPA-Puffer:	0,1% SDS 150 mM Natriumchlorid 1% NP-40 0,5% Natriumdeoxycholat 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH 8
Hybridisierungspuffer:	50% deionisiertes Formamid 1,3 x SSC 5 mM EDTA 0,5% CHAPS 100 µg/ml Heparin 0,2% Tween 20
TBST:	140 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 25 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1% Tween 20
NTE:	500 mM Natriumchlorid

	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	5 mM EDTA
MAB (pH 7,5):	100 mM Maleinsäure 150 mM Natriumchlorid
Blockinglösung:	10% Blocking-Reagens (Roche) in MAB
NTMT:	10 mM Natriumchlorid 50 mM Magnesiumchlorid 0,1% Tween 20 100 mM Tris-HCl pH 9,5

Über Nacht in 4% PFA fixierte Mausembryonen werden zweimal 10 min mit PBT gewaschen und durch eine aufsteigende Methanolreihe (25%, 50%, 75% Methanol/PBS und 100% Methanol) für jeweils 15 min entwässert. Die Embryonen werden über Nacht bei -20°C gelagert und dann durch eine absteigende Methanolreihe rehydriert. Nach zweimal 10-minütigem Waschen mit PBT werden die Embryonen eine Stunde in 6% Wasserstoffperoxyd/PBT gebleicht und anschließend dreimal 10 min mit PBT gewaschen. Zur Permeabilisierung des Gewebes werden die Embryonen je nach Stadium mit 10 µg/ml

Proteinase K behandelt:	E 9,5	2 min
	E 10,5	6 min
	E 11,5	10 min
	E 12,5	15 min
	E 13,5	20 min
	E 14,5	25 min

Nach erneutem Waschen mit PBT (3x 5 min), RIPA (3x 5 min) und PBT (3x 5 min) werden die Embryonen für 20 min mit 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd fixiert. Die Prähybridisierung erfolgt bei 70°C in Hybridisierungspuffer mit 100 µg/ml tRNA für 1-3 Stunden, nachdem die Embryonen jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit Hybridisierungspuffer/PBT (1:1) und Hybridisierungspuffer gewaschen wurden. Die bereits 1:10 verdünnte RNA-Probe wird 3 min bei 80°C denaturiert und in einer Endverdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Hybridisierung der Embryonen erfolgt über Nacht bei 70°C. Zur Entfernung von nicht gebundener RNA-Sonde werden die Embryonen dreimal 30 min mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei 70°C gewaschen, 15 min bei Raumtemperatur in NTE inkubiert und anschließend mit 20 µg/ml RNase A und 100 U RNase T1 in NTE für eine Stunde bei 37°C behandelt. Nach erneutem 30-minütigem Waschen mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer und Hybridisierungspuffer/TBST (1:1) bei 70°C werden die Embryonen nach zweimaligem Spülen mit TBST bei Raumtemperatur zweimal 30 min mit MAB/0,1% Tween 20 gewaschen. Anschließend werden die Embryonen eine Stunde bei Raumtemperatur mit

2% Blockinglösung und 20% inaktiviertem Schafserum in MAB/0,1% Tween 20 geblockt. Gleichzeitig wird der Digoxigenin-Antikörper in 1% Blockinglösung und 20% inaktiviertem Schafserum in MAB/0,1% Tween 20 (Verdünnung 1:2000) bei 4°C vorinkubiert. Die Antikörperlösung wird kurz abzentrifugiert und der Überstand über Nacht bei 4°C auf die Embryonen gegeben. Nach intensivem Waschen mit MAB/0,1% Tween 20 (mindestens 5x 30 min, 5x 60 min), werden die Embryonen zweimal 10 min mit NTMT und einmal 10 min mit NTMT/2 mM Levamisol gewaschen. Die Färbung erfolgt unter Lichtausschluss mit BM Purple (Roche) mit 1 mM Levamisol und 0,1% Tween 20 bis zur gewünschten Intensität. Nach Waschen in PBT werden die Embryonen über Nacht in 4% PFA fixiert und bei Bedarf mit Glycerin/PBS (1:1) geklärt. Die Lagerung der Embryonen erfolgt bei 4°C in PBS bzw. 85% Glycerin/PBS.

3.11.3 Hybridisierung von Zebrafisch-Embryonen

Zf-Hybridisierungspuffer:	50% deionisiertes Formamid
	5 x SSC
	50 µg/ml Heparin
	5 mg/ml Torula-RNA
	0,1% Tween 20
Zf-Färbepuffer:	100 mM Natriumchlorid
	50 mM Magnesiumchlorid
	20 mM Tris-HCl pH 9,5
	0,1% Tween 20

Über Nacht in 4%PFA fixierte Zebrafisch-Embryonen werden viermal 5 min mit PBT gewaschen, das Chorion entfernt und die Embryonen in Methanol überführt. Nach 5 min wird das Methanol gewechselt und die Embryonen bei -20°C über Nacht gelagert. Durch eine absteigende Methanolreihe (75%, 50%, 25% Methanol in PBT) für jeweils 5 min werden die Embryonen rehydriert und abschließend noch zweimal 5 min mit PBT gewaschen. Die Proteinase K-Behandlung (5 µg/ml) erfolgt je nach Stadium der Embryonen:

<10 Somiten	2-3 min
10-20 Somiten	3-4 min
24-32 Somiten	5-6 min
40-50 hpf	10-15 min

Die Embryonen werden zweimal kurz mit Glycin/PBT (2 mg/ml) gespült, für 20 min in 4% PFA fixiert und anschließend fünfmal 5 min mit PBT gewaschen. Nach 1 – 8 Stunden Prähybridisierung mit Zf-Hybridisierungspuffer bei 65°C werden die Embryonen über Nacht bei 65°C mit der denaturierten, 1:100 in Zf-Hybridisierungspuffer verdünnten RNA-Sonde hybridisiert. Die Embryonen werden mit vorgewärmten Lösungen jeweils 30 min mit 50%Formamid/2 x SSC/0,1% Tween 20, anschließend mit 2 x SSC/0,1% Tween 20 und zuletzt zweimal mit 0,2 x SSC/0,1% Tween 20 bei 65°C gewaschen. Die Embryonen werden

für eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBT mit 5% Schafserum geblockt und anschließend für 2 Stunden mit präabsorbiertem Digoxigenin-Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung in PBT bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen für 20 min mit PBT und zweimaligem Waschen mit Zf-Färbepuffer mit 1 mM Levamisol werden die Embryonen unter Lichtausschluss mit BM Purple (Roche) mit 0,1% Tween 20 gefärbt. Wenn die gewünschte Farbintensität erreicht ist, werden die Embryonen dreimal 5 min mit PBT gewaschen, über Nacht in 4% PFA fixiert und in PBT bei 4°C gelagert.

3.11.4 Hybridisierung von Paraffinschnitten

Tris/Glycin-Puffer:	0,1 M Tris 0,1 M Glycin
Hybridisierungsmix:	0,11 µg/ml tRNA RNA-Probe 1:100 in Hybridisierungspuffer
Waschlösung:	0,5 x SSC 20% Formamid

Die Paraffinschnitte werden für 30 min auf 68°C erhitzt und durch zweimal 10-minütiges Waschen in Chloroform deparaffinisiert. Anschließend werden die Schnitte zweimal 5 min mit 100% Ethanol gewaschen und über eine absteigende Ethanolreihe (95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%) für jeweils 2 min rehydriert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 5 min werden die Schnitte 30 min mit 4% PFA fixiert, erneut mit PBS gewaschen (2x 5 min) und dann für 10 min mit Proteinase K (10 µg/ml) behandelt. Die Schnitte werden 5 min in PBS gewaschen und dann erneut für 30 min in 4% PFA fixiert. Anschließend werden die Schnitte zweimal 5 min mit PBS, zweimal 2 min mit 2 x SSC und zweimal 15 min mit Tris/Glycin-Puffer gewaschen. Die Hybridisierung erfolgt mit jeweils 60 µl denaturiertem Hybridisierungsmix pro Objektträger über Nacht bei 70°C im Wasserbad in einer Feuchtkammer. Nach der Hybridisierung werden die Schnitte dreimal 20 min mit 5 x SSC bei Raumtemperatur und einmal 40 min mit vorgewärmter Waschlösung bei 60°C gewaschen. Die Waschlösung wird gewechselt und auf 37°C abgekühlt, bevor die Schnitte für 15 min mit NTE, 30 min mit 10 µg/ml RNase A in NTE und weitere 15 min mit NTE jeweils bei 37°C inkubiert werden. Nach erneutem Waschen mit Waschlösung bei 60°C für 30 min und 2 x SSC bei Raumtemperatur werden die Schnitte mit 1% Blockinglösung in MAB/0,1% Tween 20 für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Gleichzeitig wird der Digoxigenin-Antikörper in 1% Blockinglösung in MAB/0,1% Tween 20 (Verdünnung 1:5000) bei 4°C vorinkubiert. Die Antikörperlösung wird kurz abzentrifugiert und der Überstand über Nacht auf die Schnitte gegeben. Nach gründlichem Waschen mit TBST (4x 10 min, 3x 20 min) werden die Schnitte zweimal 10 min mit NTMT und einmal 10 min mit NTMT/2 mM Levamisol gewaschen. Die Färbung erfolgt für mehrere Tage unter Lichtausschluss mit BM Purple (Roche) mit 2 mM Levamisol und 0,1% Tween 20 bis zur

gewünschten Intensität. Die Farbreaktion wird durch zweimaliges Waschen mit NTMT für 15 min und 10-minütiges Waschen mit PBS gestoppt, bevor die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt werden.

Die *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitte wurde von Nina Schumacher bzw. Sabrina Schrauth durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Das *four-jointed*-Gen in verschiedenen Spezies

Das *four-jointed*-Gen wurde erstmals in *Drosophila* beschrieben (Tokunaga and Gerhart, 1976). Aber auch in Mensch und Maus wurde bereits ein homologes Gen identifiziert, das in Vertebraten als *ffx1* bezeichnet wird (Ashery-Padan et al., 1999; Thate et al., 1995). Durch Datenbankrecherchen wurden im Verlauf dieser Arbeit weitere Homologe in Ratte, Schimpanse, Zebrafisch, Medaka, Fugu, *Xenopus* und *Anopheles* identifiziert. Das *Xiphophorus-ffx1*-Gen wurde von B. Klamt aus einer Cosmidbank isoliert. In Nichtvertebraten wie *C. elegans* oder *Ciona intestinalis* wurde dagegen kein *four-jointed*-Gen gefunden.

Es gab in keiner der Spezies, die ein *ffx1*- bzw. *ff*- Gen besitzen, Hinweise auf ein weiteres homologes Gen; sogar Fische, die sehr häufig Genduplikation zeigen, haben nur eine Kopie (Abb. 6). Das *four-jointed*-Gen ist in allen untersuchten Spezies ein Einzelexon-Gen und kodiert für Proteine mit 380-580 Aminosäuren (Abb. 7).

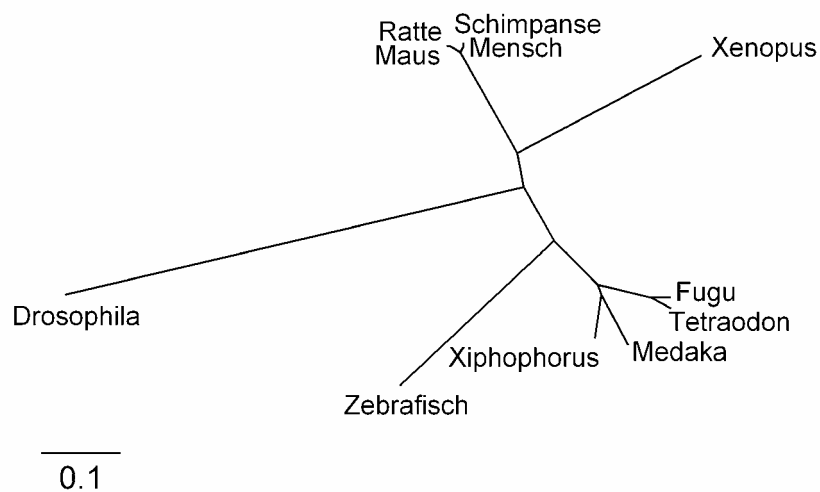


Abb. 6: Konservierung von *Fjx1*

In allen untersuchten Spezies wurde *Fjx1*/*Fj* nur einmal gefunden. Selbst in Fischen gibt es keine Anzeichen für eine Genduplikation.

In *Drosophila* und *Anopheles* ist *Fj* ein TypII-Transmembranprotein, das zumindest in *Drosophila* teilweise sezerniert wird (Villano and Katz, 1995). Es wird jedoch vermutet, dass die Sezernierung für die Funktion des Proteins nicht von Bedeutung ist, sondern dass es sich bei *Fj* um ein Golgi-Protein handelt (Strutt et al., 2004).

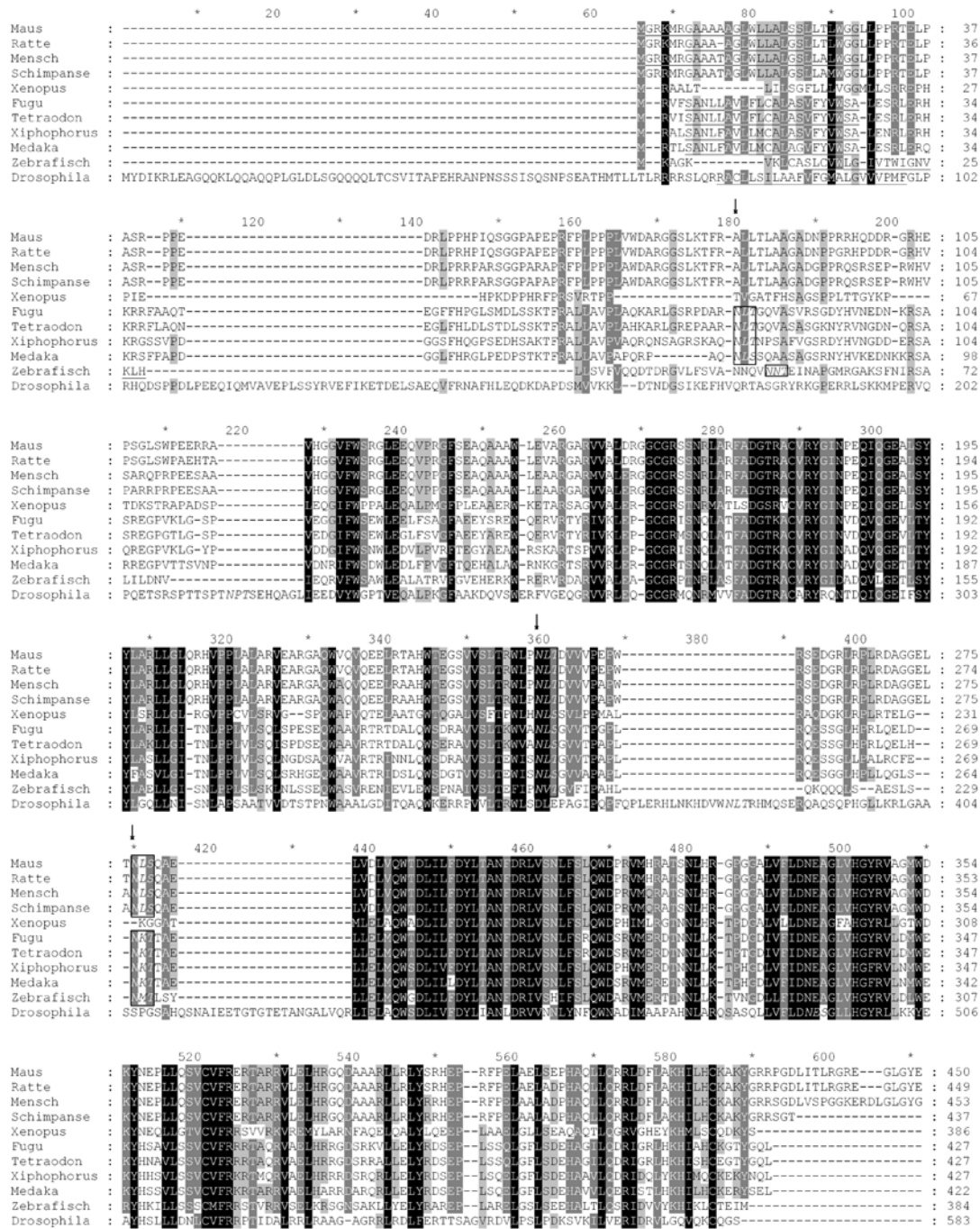


Abb. 7: Sequenzvergleich von Fjx1 in verschiedenen Spezies

Mit Ausnahme von Fj, das ein klassisches TypII-Transmembranprotein ist, besitzen alle Fjx1-Proteine ein Signalpeptid bzw. eine Transmembrandomäne mit einem sehr kurzen intrazellulären N-Terminus (entsprechende Sequenzen sind unterstrichen). Die konservierten Glykosylierungsstellen sind umrandet und mit einem Pfeil markiert.

Dem Fjx1-Protein in Vertebraten fehlt der intrazelluläre Teil. Stattdessen besitzen die Fjx1-Proteine ein Signalpeptid, das allerdings von entsprechenden Programmen (http://ccb.imb.uq.edu.au/golgi/golgi_predictor.shtml) auch als Golgi-Lokalisationssignal gedeutet wird. A. Heinrich konnte zeigen, dass in Zellkultur stabil exprimiertes Maus-Fjx1

nahezu vollständig sezerniert wird (Heinrich, 1999), obwohl in den stabil exprimierenden Zelllinien Fjx1 ebenfalls im Golgi-Apparat nachgewiesen werden kann (Abb. 8).

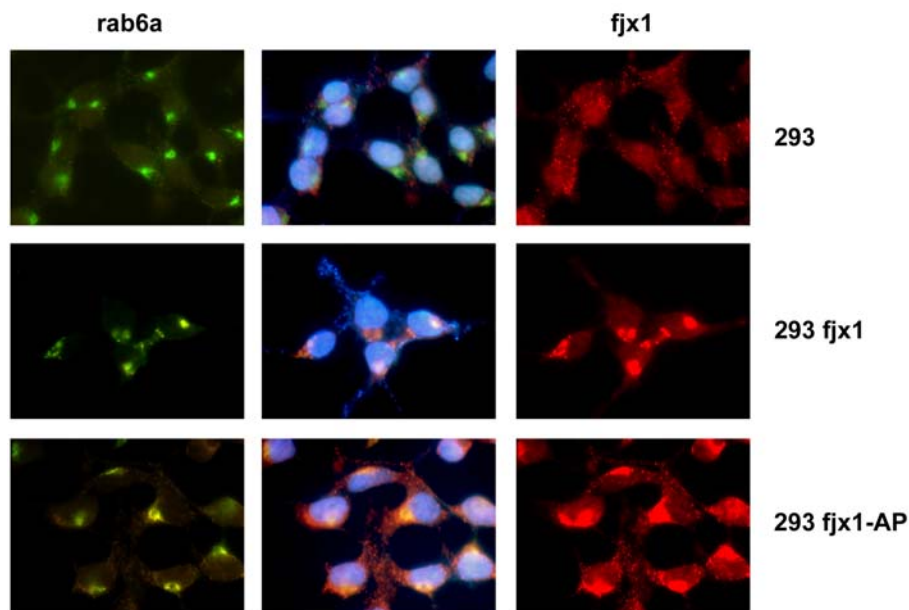


Abb. 8: Lokalisation von Fjx1 im Golgi-Apparat

Antikörperfärbungen zeigen, dass Fjx1 (rot) in den stabil exprimierenden Zelllinien (293 fjx1 und 293 fjx1-AP) mit dem Golgi-Marker rab6a (grün) colokalisiert sind. Die Überlagerung der beiden Bilder in der mittleren Spalte enthält zusätzlich noch die DAPI-Färbung zum Anfärben der Kerne (blau).

Bereits früher wurde gezeigt, dass das Maus-Fjx1 glykosyliert ist und dass N-terminal ca. 70 Aminosäuren durch proteolytische Prozessierung abgespalten werden, so dass das sezernierte Protein eine Länge von etwa 380 Aminosäuren hat (Heinrich, 1999; Rock, 2000).

Der Sequenzvergleich zeigt, dass besonders der C-terminale Bereich des Proteins zwischen den verschiedenen Spezies konserviert ist, was darauf hindeutet, dass vermutlich dieser Teil des Proteins für die Funktion von Fjx1 verantwortlich ist. Der konservierte Bereich gliedert sich in zwei Blöcke, die zwei funktionelle Domänen vermuten lassen (Abb. 7). Da es jedoch außer Fj und Fjx1 keine bekannten Proteine mit ähnlicher Struktur gibt, lässt sich anhand der Aminosäuresequenz keine Aussage über die Funktion von Fj/Fjx1 treffen.

4.2 Die Expression von *fjx1* in der Maus

Um Hinweise auf die Funktion von Fjx1 zu erhalten, wurde zunächst das Expressionsmuster von *fjx1* mit RNA *in situ* Hybridisierung in der Maus untersucht. Dabei wurden sowohl ganze Embryonen als auch Paraffinschnitte von älteren Embryonen und adulten Organen hybridisiert. Die früheste *fjx1*-Expression war im Stadium E 9,5 in den sich entwickelnden Extremitätenknospen und im Gehirn zu finden (nicht gezeigt). Die Expression im Gehirn, die bereits früher beschrieben wurde (Ashery-Padan et al., 1999), blieb während der gesamten Entwicklung bestehen. Im Stadium E 12,5 zeigte sich hier *fjx1*-Expression vor allem im Telenzephalon (Endhirn), um die Ventrikel, im Dienzephalon (Zwischenhirn) und im verlängerten Rückenmark; zusätzlich dazu war im Stadium E 14,5 *fjx1* im Riechhirn

exprimiert. Weitere neurale Expression von *ffx1* wurde im Neuralrohr, hier vor allem in der Ependymalschicht, sowie in verschiedenen Ganglien, wie z.B. den Spinalganglien, dem Trigeminalganglion, dem Ganglion vestibulocochleare und dem Ganglion glossopharyngeus detektiert. Darüber hinaus wurde eine Expression von *ffx1* im olfaktorischen Epithel sowie im Epithel des sich entwickelnden Gehörgangs gefunden (Abb. 9).

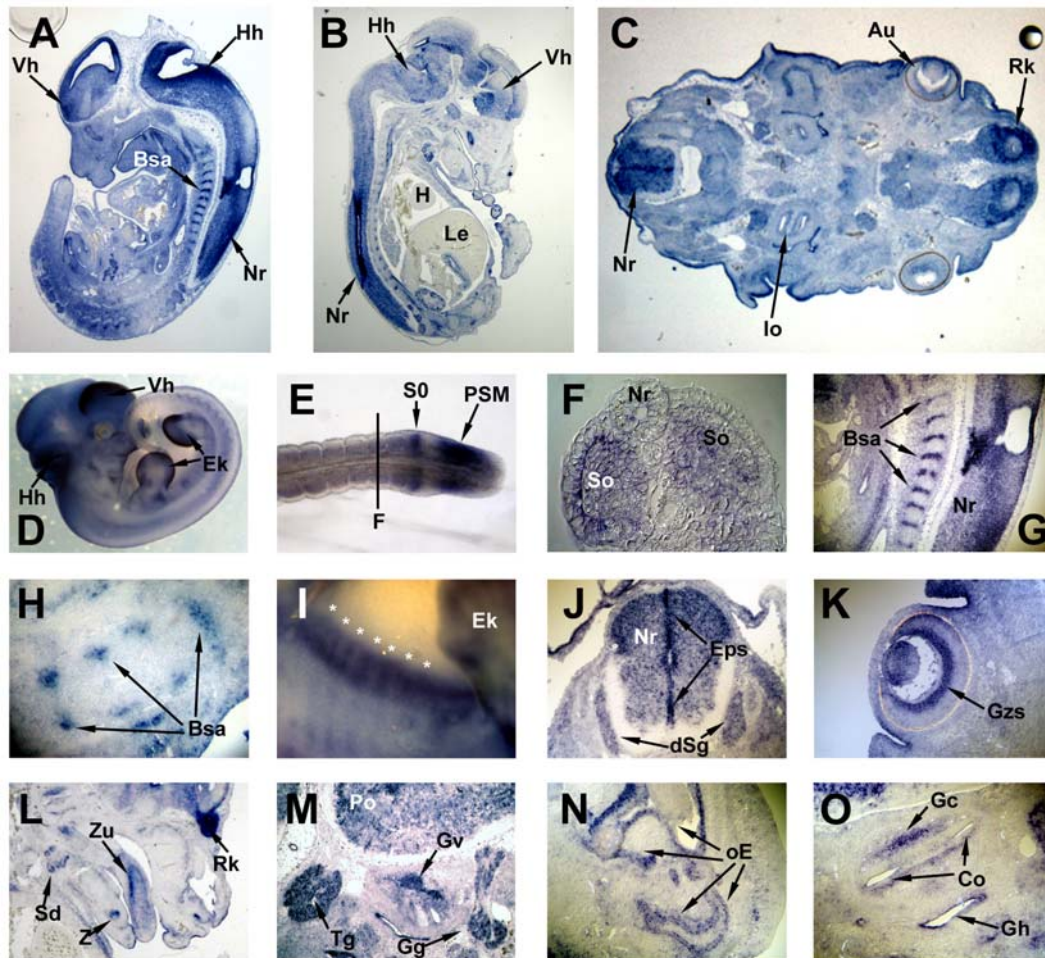


Abb. 9: Expression von *ffx1* während der Embryonalentwicklung

ffx1 zeigte in der Embryonalentwicklung ein spezifisches, räumlich begrenztes Expressionsmuster (E 11,5 (D), E 12,5 (A) und E 14,5 (B, C)). Während der Somitogenese war *ffx1* im PSM und den Somiten des Stadiums E 11,5 exprimiert (E, F), ebenso wie in daraus resultierenden Strukturen, wie z.B. den Bandscheiben im Stadium E 12,5 (G) und E 14,5 (H) sowie in regelmäßigen Streifen (*) im sich schließenden Brustkorb des Stadiums E 12,5 (I). Desweiteren wurde *ffx1* auch in sehnartigen Strukturen gefunden, wie z.B. in der Zunge (L) und den Gliedmaßen (siehe auch Abb. 10K) im Stadium E 14,5. Im gleichen Stadium war *ffx1* auch im Neuralrohr (J), in verschiedenen Ganglien (J, M) und in der Ganglienzellschicht des Auges (K) exprimiert. Auch im olfaktorischen Epithel (N) und in epithelialen Zellen des Innenohrs (O) war *ffx1* exprimiert. Abk.: Au, Auge; Bsa, Bandscheibenanlagen; Co, Cochlea; dSg, dorsale Spinalganglien; Ek, Extremitätenknospen; Eps, Ependymalschicht; Gc, Ganglion cochleare; Gg, Ganglion glossopharyngeus; Gh, Gehörgang; Gv, Ganglion vestibulocochleare; Gzs, Ganglienzellschicht; H, Herz; Hh, Hinterhirn; Io, Innenohr; Le, Leber; Nr, Neuralrohr; oE, olfaktorisches Epithel; Po, Pons; PSM, präsomitisches Mesoderm; Rk, Riechkolben; S0, Somit 0; Sd, Speicheldrüse; So, Somit; Tg, Trigeminalganglion; Vh, Vorderhirn; Z, Zahn; Zu, Zunge.

Auch die bereits erwähnte Expression in den Extremitätenknospen, die von E 9,5 bis E 11,5 in der Randleiste (AER: apical ectodermal ridge) vorhanden war, blieb während der Entwicklung bestehen. Ab dem Stadium E 12,5 beschränkte sich die *ffx1*-Expression auf Regionen, die die Gelenke von Ellenbogen und Fingern umgeben, und war später ausschließlich in den Gelenken zu finden sowie in Gewebe, das sich vermutlich zu Sehnen entwickelt. Diese Expression in den Sehnen zeigte sich auch in der Zunge, wo *ffx1* im Stadium E 14,5 in der Zungensehnenplatte detektiert wurde (Abb. 10J, K; Abb. 9L).

Ferner zeigte sich eine Expression von *ffx1* in der Schwanzregion von Embryonen des Stadiums E 11,5. Hier war *ffx1* im präsomitischen Mesoderm zu finden. Besonders auffällig war dabei ein konstant exprimierender schmaler Streifen in den sich neu bildenden Somiten. In der weiteren Entwicklung der Somiten konnte *ffx1* nur noch im Sklerotom nachgewiesen werden. Abgeleitet von dieser Expression in den Somiten ist vermutlich die spätere Expression von *ffx1* in den sich entwickelnden Bandscheiben im Stadium E 14,5. Ebenso charakteristisch war die Expression von *ffx1* im Bereich des sich entwickelnden Brustkorbs von Embryonen im Stadium E 12,5 und E 13,5, wo *ffx1* in schmalen regelmäßigen Streifen detektiert wurde (Abb. 9).

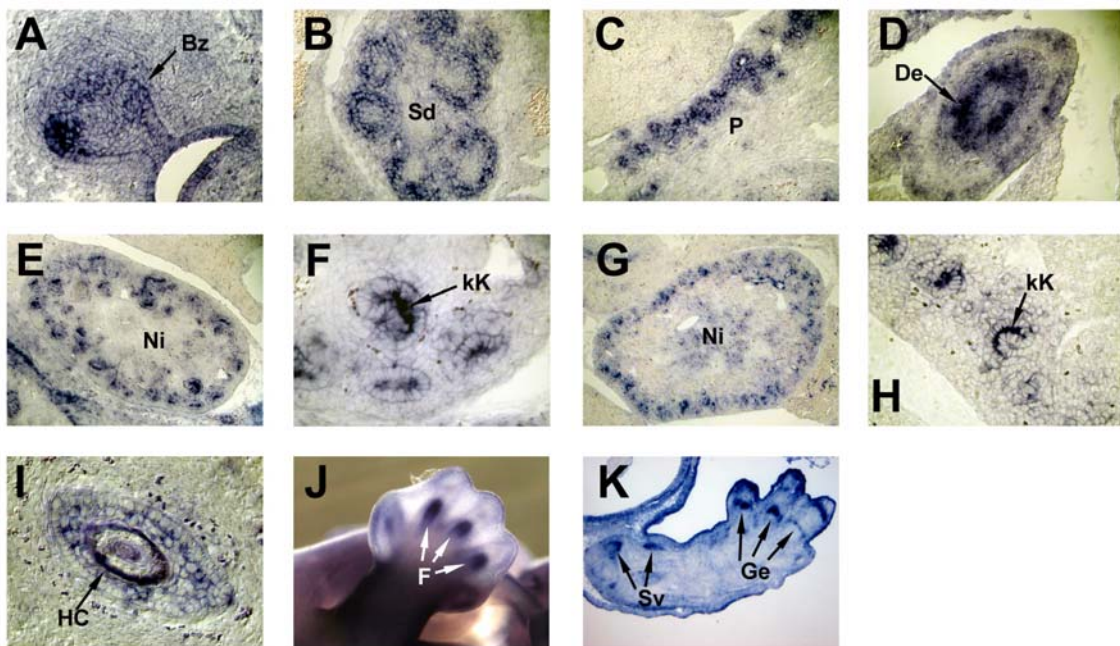


Abb. 10: *Fjx1*-Expression in Epithelien

In Organen, die sich durch epitheliale-mesenchymale Interaktion entwickeln, war *ffx1* in den epithelialen Bereichen exprimiert. Beispiele hierfür sind Pankreas (C), Darm (D), Speicheldrüse (B) und Niere im Stadium E 14,5 (E, F) und E 17,5 (G, H). Auch in den Zahnknospen im Stadium E 14,5 (A) und den Barthaarfollikeln im Stadium E 16,5 (I) war die epitheliale Expression von *ffx1* erkennbar. Zusätzlich war *ffx1*-Expression auch in den sich entwickelnden Gelenken der Embryonalstadien E 13,5 (J) und E 14,5 (K) zu finden. Abk.: Bz, Backenzahn; De, Darmepithel; F, Finger; Ge, Gelenke; HC, Haar-Cuticula; kK, kommaförmiger Körper; Ni, Niere; P, Pankreas; Sd, Speicheldrüse; Sv, Sehnenvorläufer.

Eine zusätzliche Funktion scheint *ffx1* bei epithelialen-mesenchymalen Interaktionen zu haben. So wurde beispielsweise *ffx1*-Expression in der Epithelschicht der sich entwickelnden Zahnknospen und den Barthaarfollikeln im Stadium E 13,5 gefunden. Weitere epitheliale Expression zeigte sich in den Stadien E 12,5 und E 14,5 im Pankreas, im Thymus, der Speicheldrüse, ebenso wie im Darmendoderm und den Komma- und S-förmigen Körpern der sich entwickelnden Niere (Abb. 10). Keine Expression von *ffx1* konnte hingegen in der Leber und im Herzen gefunden werden.

Die Expression von *ffx1* im adulten Gehirn wurde im Vergleich zu den potentiellen Interaktionspartnern untersucht und wird entsprechend unter 4.6 beschrieben, ebenso wie die Expressionsanalyse in adulten Organen, die durch Real-Time-PCR untersucht wurde und in 4.8 beschrieben wird.

4.3 Die Expression von *ffx1* im Zebrafisch

Da das *ffx1*-Gen nicht nur in der Maus, sondern auch in vielen anderen Vertebraten konserviert ist, wurde aus Zebrafisch-cDNA eine *ffx1*-Probe kloniert und für whole mount *in situ* Hybridisierungen von Zebrafischen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass nicht nur das *ffx1*-Gen in den verschiedenen Spezies konserviert ist, sondern auch die Expressionsmuster starke Ähnlichkeiten aufwiesen. So war auch im Zebrafisch *ffx1* im Gehirn und den Somiten exprimiert (Abb. 11). Jedoch war die Expression in den Somiten insbesondere in früheren Stadien deutlich stärker als in vergleichbaren Stadien in der Maus.

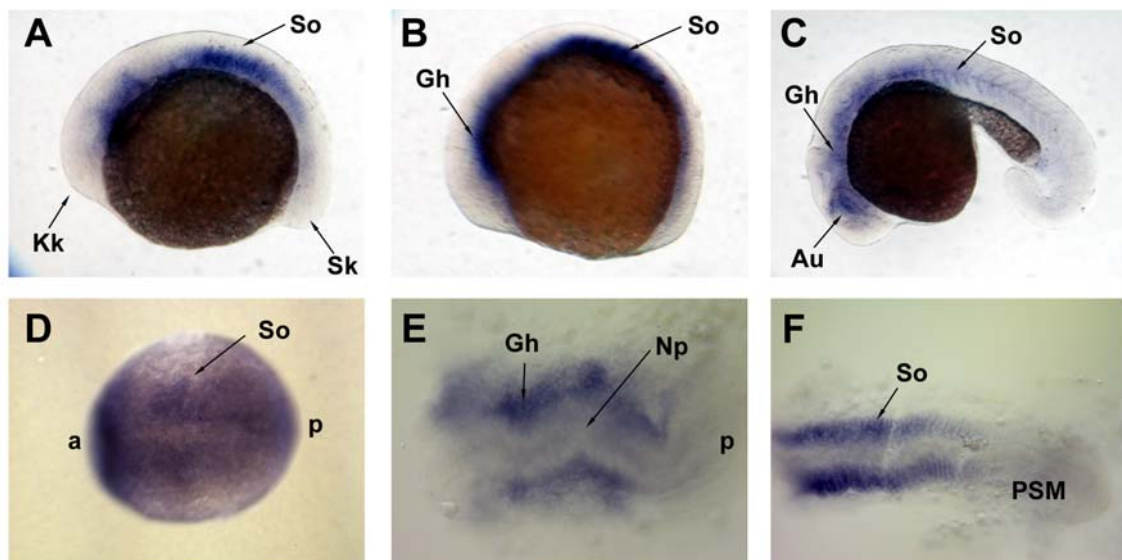


Abb. 11: Expression von *ffx1* im Zebrafisch

Während der Segmentierungsphase (10-24 hpf) war *ffx1* konstant im Gehirn und in den Somiten exprimiert. Gezeigt ist die fortschreitende Entwicklung in der Seitenansicht (A-C) und der Dorsal-Ansicht (D, 2-3; E und F, 8-10 Somitenstadium). Abk.: a, anterior; Au, späteres Auge; Gh, Gehirn; Kk, Kopfknospe; Np, Neuralplatte; p, posterior; PSM, Präsomitiches Mesoderm; Sk, Schwanzknospe; So, Somiten.

4.4 Regulation der Expression von *ffx1*

Bereits früher wurde gezeigt, dass nicht nur die Expression von *ff* in *Drosophila* durch den Notch-Signalweg reguliert wird, sondern auch das homologe Mausgen (Rock, 2000). Da *ff* jedoch auch Zielgen des Wnt-Signalwegs und des JAK/STAT-Signalwegs ist, sollte getestet werden in wieweit dieses auch auf *ffx1* zutrifft. Die mögliche Regulation der *ffx1*-Expression über den Wnt-Signalweg sollte durch Kotransfektion eines *ffx1*-Luziferasekonstrukts mit einem durch Mutation konstitutiv aktiven β -Catenin gezeigt werden. Das Luziferasekonstrukt, das bereits für die Transfektionsexperimente mit konstitutiv aktivem Notch verwendet wurde, enthält ein Luziferase-Gen hinter der Promotorregion des *ffx1*-Gens (Rock, 2000). Es konnte jedoch weder in *cos7* und 293T noch in 3T3 Zellen ein Einfluss von β -Catenin auf die *ffx1*- bzw. Luziferase-Expression gezeigt werden. Eine Regulation von *ffx1* über den PCP-Signalweg von Wnt (Fz) (vgl. Abb. 1) kann mit dieser Art von Transfektionsexperiment nicht getestet werden. Da bislang der Signalweg noch nicht vollständig aufgeklärt ist, ist auch eine gezielte Aktivierung dieses Signalwegs nicht möglich, was eine Untersuchung der Regulation der *ffx1*-Expression erschwert.

Auch eine JAK/STAT-abhängige Expression von *ffx1* war nicht feststellbar. Da es kein entsprechendes Kotransfektionsexperiment wie im Falle von Notch und dem β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg gibt, wurde das *ffx1*-Luciferasekonstrukt in BaF-Hm9 Zellen transfiziert. In dieser Zelllinie kann durch Stimulation mit IL-3 bzw. mit EGF die Expression von STAT5 bzw. STAT1, 3 und 5 angeschaltet werden, was jedoch keinen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität hatte. Eine Regulation der *ffx1*-Expression über den β -Catenin-abhängigen Wnt- bzw. den JAK/STAT-Signalweg konnte also für das Vertebratengen nicht gezeigt werden.

4.5 Analyse der *Fjx1*-Knock-out-Mäuse

Die Funktion von *Fjx1* in der Maus sollte anhand von Knock-out-Mäusen, die von A. Vortkamp zur Verfügung gestellt wurden, untersucht werden. Bei diesen Mäusen ist das *ffx1*-Gen durch ein β -Galactosidase-Gen ersetzt, so dass der *ffx1*-Promotor die Expression von β -Gal anstelle von *ffx1* reguliert. LacZ-Färbungen und RNA *in situ* Hybridisierungen mit einer LacZ-Probe auf *Fjx1*-Knock-out-Mäuse, bestätigten das in 4.2 gefundene Expressionsmuster (nicht gezeigt).

Die Entwicklung der *Fjx1*-Knock-out-Mäuse verläuft weitgehend normal. Gelenkfehlbildungen, die aufgrund des Phänotyps von *fj*-Mutanten in *Drosophila* erwartet wurden, bestätigten sich nicht. Die Mäuse sind lebensfähig und fertil und werden entsprechend der Mendelschen Verteilung geboren.

Aufgrund der Beteiligung von *Fj* in *Drosophila* am PCP-Signalweg und der Konservierung des PCP-Signalwegs bei der Innenohrentwicklung von Vertebraten, wurden die Innenohren der Knock-out-Mäuse von M. Kelley auf mögliche Veränderungen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei neugeborenen Knock-out-Mäusen die Anzahl der äußeren Haarzellen verändert war. Anstelle der normalerweise vorhandenen drei Reihen äußerer Haarzellen,

besaßen die Mäuse stellenweise vier Reihen, ähnlich wie verschiedene andere Mutanten des Notch-Signalwegs (Abb. 12).

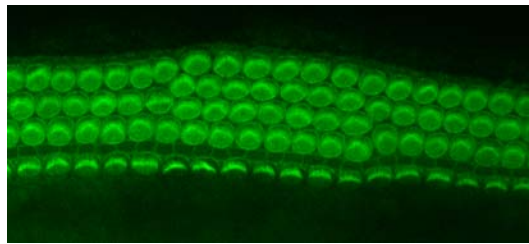


Abb. 12: Innenohrdefekt von Fjx1-Knock-out-Mäusen

Die Innenohren von neugeborenen Fjx1-Knock-out-Mäusen hatten an manchen Stellen eine zusätzliche Reihe äußerer Haarzellen, was durch eine Phalloidin-Färbung offensichtlich wurde (Bild, M. Kelly).

Embryonal konnte durch eine LacZ-Färbung des Innenohrs gezeigt werden, dass *ffx1* asymmetrisch in der Cochlea (Schnecke) exprimiert war. Die Färbung durch X-Gal war nur auf einer Seite des Epithels zu detektieren, etwas entfernt vom sensorischen Epithel (Information M. Kelly).

4.6 Lokalisierung der Fjx1-Bindungsstellen

Aufgrund der Sezernierung von Fj und der nicht-zellautonomen Funktion des Proteins in *Drosophila*-Mosaikmutanten wurde ein Fj-Rezeptor postuliert. Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus alkalischer Phosphatase und Fjx1, das in 293T-Zellen exprimiert wurde, sollte in der Maus ein entsprechender Rezeptor lokalisiert und identifiziert werden.

Die verwendete Methode beruht darauf, dass Fjx1 bei der Inkubation des Gewebes mit dem Fusionsprotein an den postulierten Rezeptor bindet und dass nach der Fixierung die Bindungsstellen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden können.

Die Lokalisierung mit der AP-Färbung erfolgte in ganzen Embryonen des Stadiums E 10,5 sowie auf Cryoschnitten von älteren Embryonen und adulten Organen. Als Negativkontrolle wurde sezernierte alkalische Phosphatase ohne Fusionsteil (SEAP) eingesetzt, um eine Bindung des Fjx1-Fusionsproteins über den AP-Teil auszuschließen. Mit Ausnahme der Färbung in den sich entwickelnden Knochen wurden mit der Negativkontrolle keine oder nur unspezifische Färbungen erhalten.

Ähnlich der Expression von *ffx1* wurden Fjx1-Bindungsstellen hauptsächlich in neuronalem Gewebe detektiert. Im Stadium E 10,5 zeigte sich mit dem Fjx1-AP-Fusionprotein eine Färbung im Telenzephalon (Endhirn) und im Tectum (Mittelhirndach). Zusätzlich dazu wurden in späteren Stadien Fjx1-Bindungsstellen in der Medulla, der Brücke und im Rückenmark gefunden. Auch in allen peripheren Nerven wurde mit dem Fusionsprotein eine spezifische Färbung beobachtet (Abb. 13).

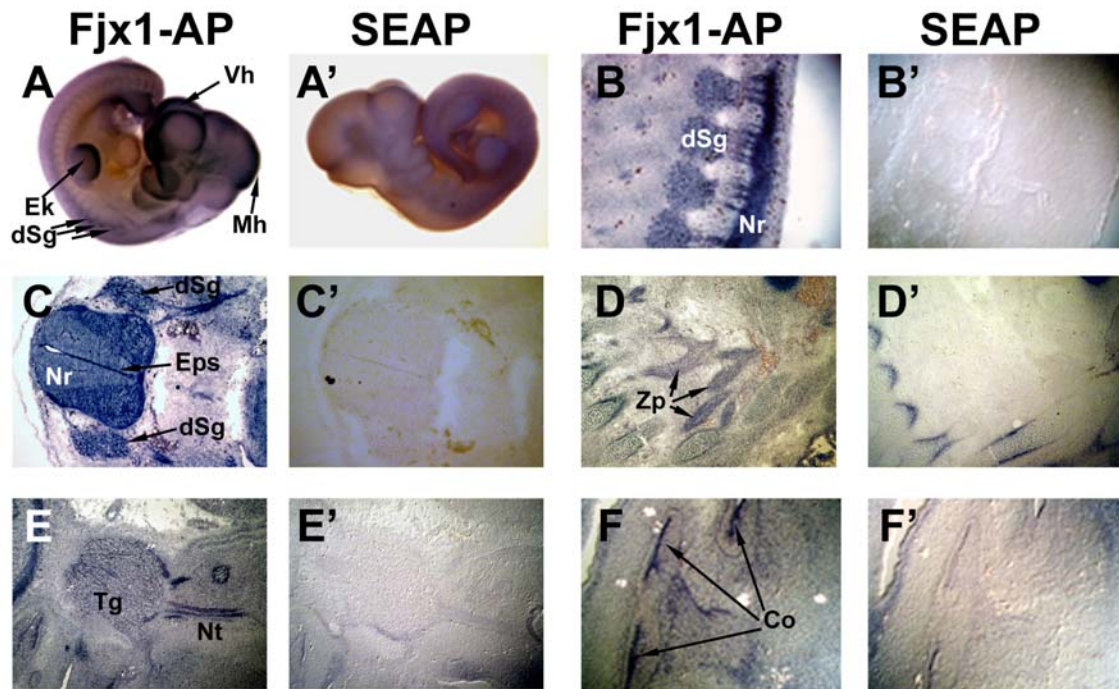


Abb. 13: Lokalisation der Fjx1-Bindungsstellen mit Hilfe eines AP-Fusionsproteins

Die als Negativkontrolle verwendete sezernierte alkalische Phosphatase wird jeweils im Vergleich gezeigt (Strichmarkierung des Bildbuchstabens). Während der Embryogenese wurden Fjx1-Bindungsstellen im Gehirn und den Extremitätenknospen des Stadiums E 10,5 (A), den Spinalganglien und Nervenfasern der Stadien E 13,5 (B) und E 14,5 (C), dem Zervikalplexus (D), dem Trigeminalganglion und -nerv (E) sowie im Epithel des Innenohrs (F) durch das Fjx1-AP Protein angefärbt. Färbungen mit SEAP wurden ausschließlich durch endogene alkalische Phosphatasen im Knochen verursacht, wie beispielsweise in D'. Abk.: Co, Cochlea; dSg, dorsale Spinalganglien; Ek, Extremitätenknospen; Eps, Ependymalschicht; Mh, Mittelhirn; Nr, Neuralrohr; Nt, Nervus trigeminus; Tg, Trigeminalganglion; Vh, Vorderhirn; Zp, Zervikalplexus.

Ebenso wie *fjx1* wurde auch der postulierte Rezeptor in den Epithelzellen verschiedener Organe lokalisiert, wie z.B. im Innenohr, der Lunge und in der Niere. Im Embryonalstadium E 14,5 wurden Fjx1-Bindungsstellen im inneren Epithel der Cochlea (Schnecke) und des Sacculus' gefunden, ebenso wie in den Nervenfasern (Abb. 13F). Entsprechende Expression von *fjx1* wurde in den dazugehörigen Ganglien festgestellt. Auch in der Lunge überlappten die Expression von *fjx1* und der postulierte Rezeptor teilweise. Während *fjx1* in der RNA *in situ* Hybridisierung hier nur sehr schwach und zum Teil etwas diffus detektiert wurde, waren die Fjx1-Bindungsstellen mit dem AP-Fusionsprotein eindeutig um die Bronchien herum lokalisiert. In der Niere, wo *fjx1*-Expression ausschließlich in den komma- und S-förmigen Körpern gefunden wurde, wurde mit dem Fjx1-AP-Fusionsprotein zusätzliche Färbung in den Sammelrohren detektiert (Abb. 14). Spätere Embryonalstadien (ab E 17,5) zeigten eine Färbung in den Tubuli, die sich aus den komma- und S-förmigen Körpern entwickeln.

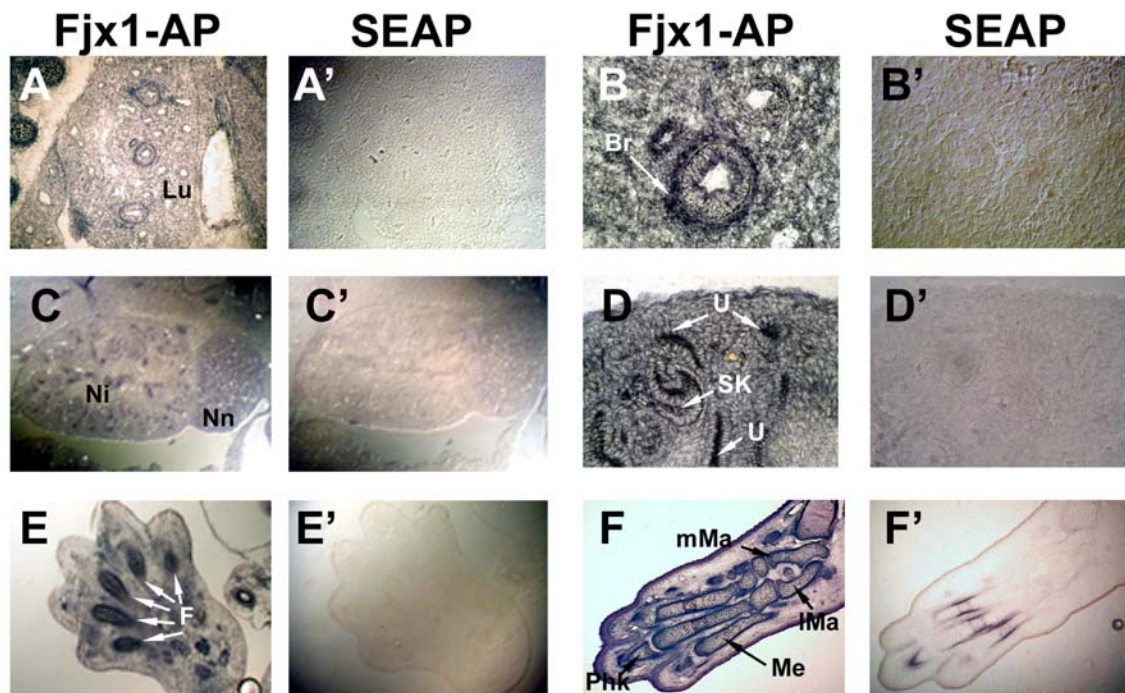


Abb. 14: Lokalisation des postulierten Rezeptors in mesenchymalem Gewebe

Im Embryonalstadium E 14,5 konnte mit dem Fjx1-AP Fusionsprotein Bindungsstellen in der Lunge (A, Vergrößerung in B) und der Niere (C, Vergrößerung in D) angefärbt werden. Während der Extremitätenentwicklung wurden Fjx1-Bindungsstellen im Gewebe gefunden, das die sich entwickelnden Knochen umgibt, sowohl im Stadium E 14,5 (E) als auch im Stadium E 18,5 (F). Die Kontrollfärbung mit SEAP ist jeweils zu Vergleich gezeigt (Strichmarkierung des Bildbuchstabens). Abk.: Br, Bronchus; F, Finger; lMa, lateraler Malleolus; Lu, Lunge; Me, Metatarsalia; mMa, medialer Malleolus; Ni, Niere; Nn, Nebenniere; Phk, Phalangealknochen (phalangeal bone); SK, S-förmiger Körper; U, Ureter.

Durch die endogenen alkalischen Phosphatasen von Knochen, die nur sehr schwer hitzeinaktivierbar sind, war es schwierig, mit dem Fusionsprotein entsprechende Bindungsstellen für das in den Extremitäten gefundene Fjx1 zu detektieren. Eindeutig konnte jedoch der postulierte Rezeptor im Stadium E 10,5 in den Extremitätenknospen nachgewiesen werden. Im Embryonalstadium E 14,5 konnte in den meisten Fällen ebenfalls eine eindeutige Färbung in dem an die Knochen angrenzenden Gewebe beobachtet werden, während in älteren Stadien die endogenen alkalischen Phosphatasen die Färbung deutlich beeinflussen. Im Gegensatz zur *in situ* Hybridisierung mit *ffx1* war in den Gelenken keine Färbung mit dem Fusionsprotein festzustellen (Abb. 14).

In adulten Organen wurde der postulierte Fjx1-Rezeptor vor allem im Gehirn gefunden. Wie bereits bekannt ist, ist *ffx1* im adulten Gehirn hauptsächlich in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns, dem Riechhirn sowie im Stratum pyramidale des Hippocampus exprimiert (Ashery-Padan et al., 1999). Genau angrenzend an diese Regionen der *ffx1*-Expression wurden die Fjx1-Bindungsstellen mit dem Fusionsprotein gefunden, nämlich im Kortex des Kleinhirns bzw. im Stratum radiatum/oriens des Hippocampus (Abb. 15).

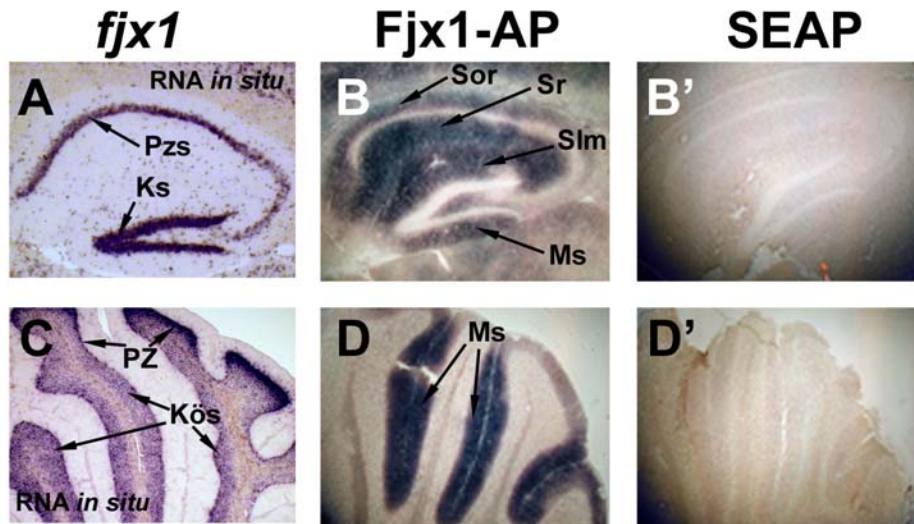


Abb. 15: Lokalisation des postulierten Rezeptors im adulten Gehirn

Im adultem Gehirn wurden mit dem Fjx1-Fusionsprotein hauptsächlich Regionen angefärbt, die in direkter Nachbarschaft zu Geweben mit *fjx1*-mRNA Expression (A, C) lagen, wie z.B. im Hippocampus (B) und im Kleinhirn (D) (Negativkontrollen in B' und D'). Abk.: KöS, Körnerschicht des Kleinhirns; Ks, Körnerschicht; Ms, Molekularschicht; PZ, Purkinje-Zellen; Pzs, Pyramidenzellschicht; SIm, Stratum lacunosum-moleculare; Sor, Stratum oriens; Sr, Stratum radiatum.

4.7 Identifizierung eines postulierten Fjx1-Rezeptors

4.7.1 Expressionsklonierung

Die Isolierung des postulierten Fjx1-Rezeptors sollte zunächst durch Expressionsklonierung versucht werden. Beim Expressionsscreening wird zunächst cDNA aus einer größeren Anzahl von Expressionsplasmiden gepoolt, in eukaryotische Zellen transfiziert und getestet, ob der entsprechende Pool positiv ist, d.h. den gesuchten Rezeptor enthält (Abb. 16). Durch sukzessives Reduzieren der Poolgröße soll schließlich ein positiver Einzelklon identifiziert werden. Da aufgrund der Färbungen mit dem Fjx1-AP-Fusionsprotein eine starke Expression des postulierten Rezeptors im Gehirn zu erwarten war, wurde eine Expressions-cDNA-Bank aus adultem Mausgehirn der Firma EdgeBioSystems verwendet. Die cDNA-Bank war nicht amplifiziert und enthielt ca. $2,4 \times 10^6$ unabhängige Klone. Die durchschnittliche Insertgröße im Expressionsvektor betrug ca. 1,8 kb.

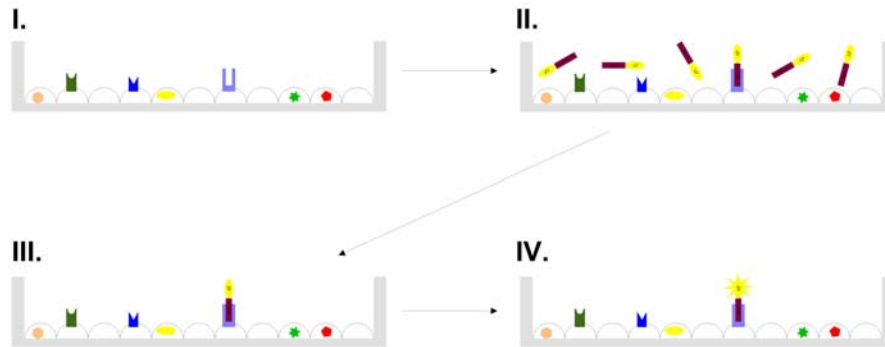


Abb. 16: Expressionsscreening

Die mit der Expressions-cDNA-Bank transfizierten Zellen (I.) werden mit dem AP-Fusionsprotein inkubiert (II.). Nach anschließendem Waschen und Fixieren (III.) werden nach Substratzugabe nur die Zellen gefärbt, die den entsprechenden Bindungspartner für das Fusionsprotein exprimieren (IV.).

Für die erste Runde des Screenings wurden Pools mit ca. 1500 Klonen gebildet und die daraus isolierte DNA in 293T Zellen transfiziert. Mit Hilfe des Fjx1-AP-Fusionsproteins sollten dann Zellen identifiziert werden, die den postulierten Fjx1-Rezeptor exprimieren. Färbungen mit der unfusionierten alkalischen Phosphatase (SEAP) sollten falschpositive Pools ausschließen. Falschpositive Pools sind bei dieser Art des Expressionsscreenings Pools, die alkalische Phosphatase oder AP bindende Proteine exprimieren. Die erste Runde des Screenings ergab einen positiven von insgesamt 114 getesteten Pools (Abb. 17). Dieser Pool wurde in kleinere Subpools zu ca. 200 Klonen aufgeteilt. Wiederum wurde bei 51 getesteten Pools dieser Größe ein positiver Pool identifiziert. Bei den nachfolgend getesteten 45 Subpools dieses Pools mit jeweils ca. 30 Klonen konnte erneut ein Pool identifiziert werden, der den Fjx1-Bindungspartner exprimiert. 256 Einzelklone dieses Pools wurden auf 96-well-Platten angeimpft und in Pools von acht bzw. zwölf Klonen getestet. In dieser Runde konnte kein positiver Pool identifiziert werden. Möglicherweise ging der positive Klon beim Amplifizieren für die DNA-Präparation des nächsten Subpools verloren. Es ist jedoch auch möglich, dass für die Bindung von Fjx1 an seinen Interaktionspartner mehrere Proteine (Cofaktoren) notwendig sind, die zusammen in der kleinsten Subpool-Größe nicht mehr vorhanden waren.



Abb. 17: Positiver Pool

Mit DNA der cDNA-Expressionsbank transfizierte 293T-Zellen, die mit dem Fjx1-AP Fusionsprotein gefärbt wurden. Die blauen Zellen zeigen an, dass der Fjx1-Bindungspartner exprimiert wird.

4.7.2 Coimmunpräzipitation

Eine alternative Methode, den postulierten Rezeptor zu identifizieren, war die Copräzipitation mit epitopmarkiertem Fjx1-Protein aus Mausgewebe. Nach Auftrennung im SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung sollte das gesuchte Protein durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Präzipitation wurde mit verschiedenen Fjx1-Konstrukten versucht. Dazu wurde zusätzlich ein trifunktionales Cross-linking-Reagenz (Sulfo-SBED) eingesetzt (Abb. 18). Zunächst wurde der Cross-Linker über den aktiven NHS-Ester mit dem Fjx1-Protein kovalent verknüpft. Nach Inkubation mit einer Gehirnzellsuspension, die mit Hilfe eines Einzelzellfilters aus adultem Mausgehirn (CD1- oder C57/Bl6-Mäuse) erhalten wurde, wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht das mit Fjx1 interagierende Protein ebenfalls kovalent an den Cross-Linker gebunden. Auf diese Weise wurde das unbekannte Protein gleichzeitig mit Biotin markiert, das dann entweder für eine Aufreinigung des unbekannten Proteins oder zum Nachweis im Western-Blot benutzt werden sollte. Das Fjx1-Protein kann unter reduzierenden Bedingungen abgespalten werden.

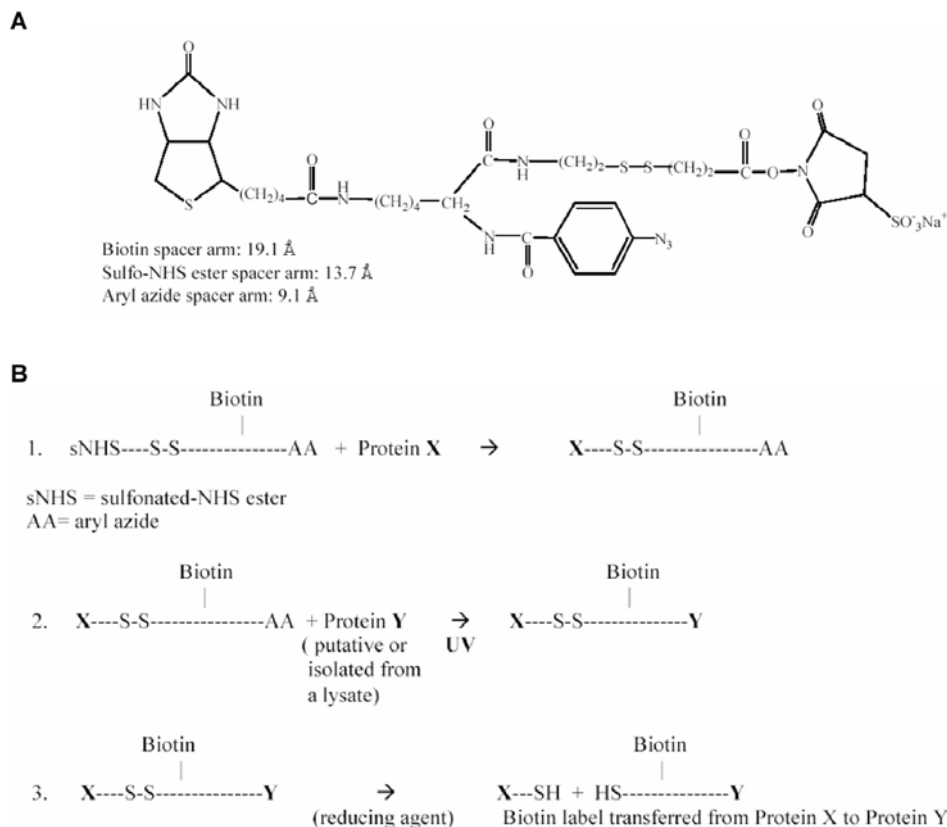


Abb. 18: Crosslinking mit dem trifunktionalen Cross-linking-Reagenz Sulfo-SBED (Bild, Pierce)

(A) Chemische Struktur des Cross-Linkers. (B) Der Cross-Linker wird zunächst in wässriger Lösung mit Protein X (Fjx1-Konstrukt) umgesetzt (1.). Nach Inkubation mit Protein Y (der unbekannte Fjx1-Rezeptor) werden durch UV-Bestrahlung die Proteine X und Y kovalent über den Cross-Linker verknüpft. Gleichzeitig wird das unbekannte Protein mit Biotin markiert (2.). Nach der Aufreinigung des gesamten Proteinkomplexes z.B. über Tags an Fjx1, kann die kovalente Bindung zwischen Fjx1 und seinem Interaktionspartner durch reduzierende Agenzien getrennt und der Rezeptor im SDS-PAGE analysiert werden.

Als Fjx1-Konstrukte wurden unter anderem verwendet: Fjx1-AP, Fjx1-Fc, TAP-Fjx1 und His-Fjx1, wovon die ersten drei Konstrukte in 293T-Zellen und das letzte Konstrukt in Sf9-Zellen exprimiert wurde (Abb. 19).

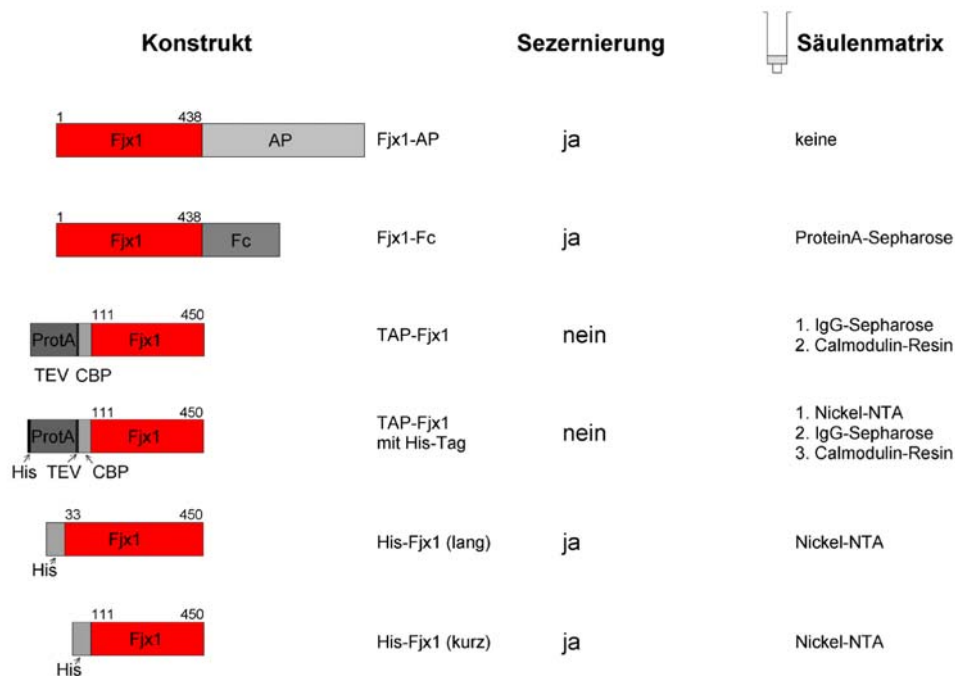


Abb. 19: Fjx1-Fusionsproteine für die Coimmunpräzipitation des Fjx1-Bindungspartners und potentielle Aufreinigungsstrategie

Die Zahlen über dem Fjx1-Fusionsteil geben die Aminosäuren an, die von Fjx1 im entsprechenden Konstrukt enthalten sind. Abk.: AP, alkalische Phosphatase; CBP, Calmodulin bindendes Protein; Fc, konstanter Teil eines Antikörpers; His, 6-8 Histidin-Reste; ProtA, ProteinA; TEV, Schnittstelle für TEV-Protease.

Fjx1-AP wurde wie bei den Färbungen auf Schnitten bzw. der Expressionsklonierung nur aufkonzentriert. Die Coimmunpräzipitation erfolgte mit Hilfe von kovalent an CNBr-Sepharose gekoppeltem AP-Antikörper. Im Vergleich mit der Immunpräzipitation (IP), bei der unfusionierte alkalische Phosphatase eingesetzt wurde, sollte auf dem Proteingel die zusätzliche Bande des postulierten Fjx1-Rezeptors ermittelt werden. Aufgrund der Größe des Fjx1-AP-Proteins (ca. 110 kD) war der Nachweis des Fjx1-Proteins im Western-Blot als Positivkontrolle für eine erfolgreiche IP schwierig. Im silbergefärbten SDS-PAGE war mit Hilfe des Fjx1-AP-Proteins keine eindeutige Bande des postulierten Fjx1-Rezeptors zu ermitteln (Abb. 20A).

Das Fjx1-Fc-Protein, das eine Fusion von Fjx1 mit dem konstanten Teil von Antikörpern ist, wurde über ProteinA-Sepharose aufgereinigt. Aufgrund von unvollständiger Sezernierung und der Verdünnung des sezernierten Proteins im Medium, konnte das Protein nicht in ausreichenden Mengen erhalten werden, da auch die Aufreinigung sehr ineffizient war (Nachweis im Western, aber nicht in der Silberfärbung) (nicht gezeigt).

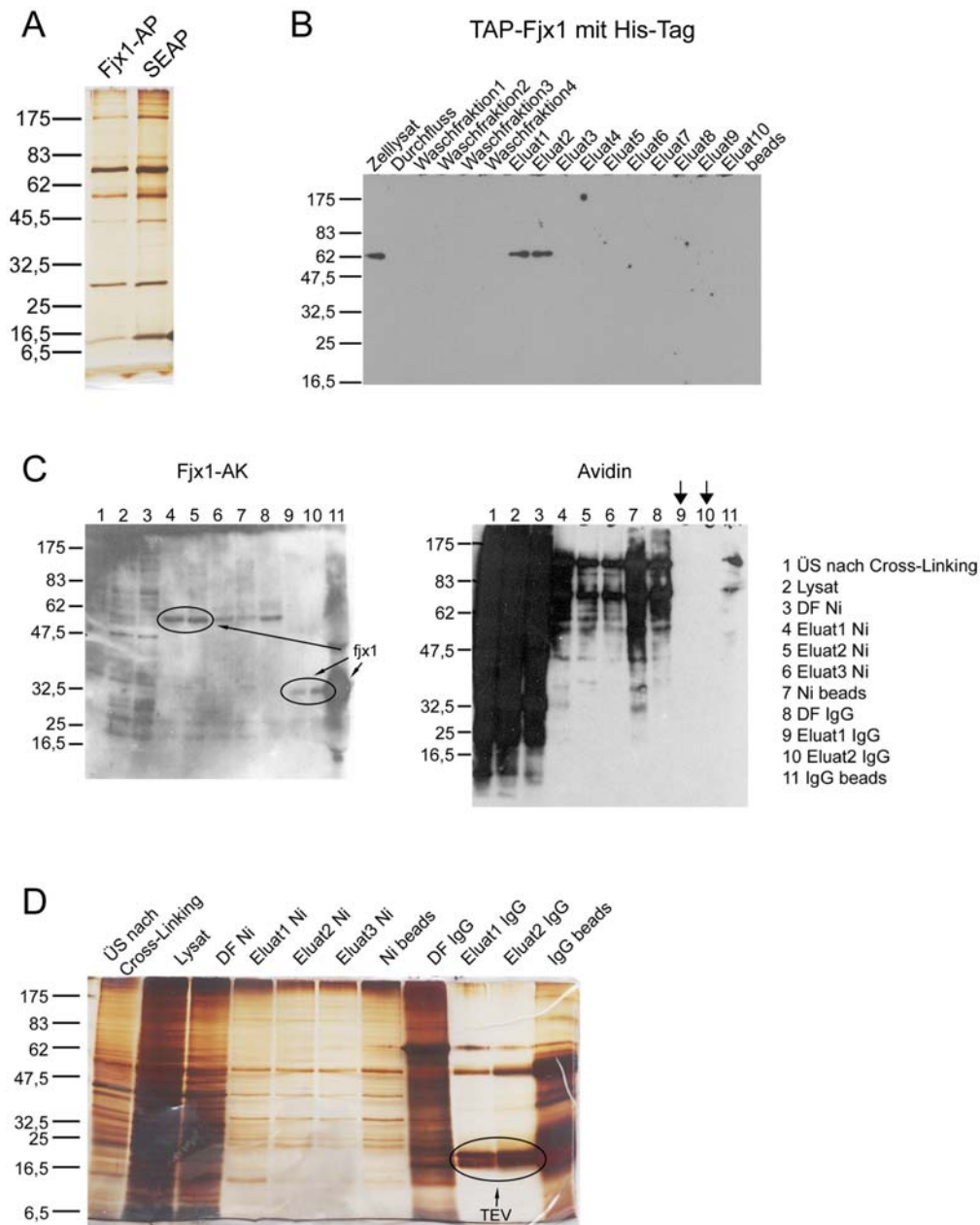


Abb. 20: Aufreinigung der verschiedenen Konstrukte und Coimmunpräzitationen des Fjx1-Bindungspartners

(A) Die Co-Immünpräzitation mit Fjx1-AP ergab im Vergleich zur IP mit SEAP keine zusätzliche Bande im silbergefärbten SDS-PA-Gel. (B) TAP-Fjx1 konnte durch einen zusätzlichen His-Tag am N-Terminus über eine Nickel-Säule aufgereinigt und für das Cross-Linking verwendet werden. (C) Bei der anschließenden Reaktion mit der Gehirnzellsuspension konnte im Western-Blot war zwar das Fjx1-Konstrukt sowohl im Eluat der Nickel-Säule (4 und 5) als auch im Eluat der IgG-Säule (9 und 10) detektiert werden, obwohl die Elution von der IgG-Säule sehr ineffizient war. Der theoretisch Biotin-markierte Bindungspartner konnte aber in den entsprechenden Fraktionen (Pfeile) mittels Avidin nicht nachgewiesen werden (unspezifische Banden bei 4 und 5; Kontrolle nicht gezeigt) (ÜS nach Cross-Linking: ÜS vor der Lyse der Gehirnzellen). (D) Die Konzentration des Fjx1-Konstrukts im Eluat der IgG-Säule war jedoch so gering, dass der Nachweis in der Silberfärbung nicht möglich war. Abk.: beads, Säulenmatrix; DF, Durchfluss; Ni, Nickel-NTA; TEV, TEV-Protease; ÜS, Überstand.

Das TAP-Fjx1-Protein wurde intrazellulär exprimiert, um eine Verdünnung durch das Zellkulturmedium zu vermeiden. Das Konstrukt enthielt für die Aufreinigung nach der TAP-Methode einen ProteinA-Tag gefolgt von einer TEV-Schnittstelle und einem CBP-Tag (Calmodulin binding protein) (Puig et al., 2001). Nach der Kopplung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an eine IgG-Säule kann so mit der TEV-Protease unter physiologischen Bedingungen das Protein eluiert werden, so dass anschließend aber noch der CBP-Tag für eine weitere Aufreinigung zur Verfügung steht. Auf diese Weise kann der Komplex in einer höheren Reinheit erhalten werden. Die Aufreinigung des Fjx1-Fusionsproteins ohne den quervernetzten Interaktionspartner sollte jedoch zunächst über den CBP-Tag erfolgen, um noch beide Tags für die Reinigung des Komplexes zu erhalten. Die Bindung an die Calmodulin-Säule erfolgte aber nur sehr ineffizient (Protein hauptsächlich im Durchfluss), so dass nicht genügend gereinigtes Fusionsprotein erhalten werden konnte (nicht gezeigt). Ein zusätzlicher His-Tag (8 Histidine) vor dem ProteinA-Tag erlaubte zwar die Aufreinigung des Fjx1-Fusionsproteins, jedoch konnte auch mit diesem Konstrukt der postulierte Rezeptor nicht präzipitiert werden. Möglicherweise war die in den 293T-Zellen produzierte Proteinmenge für das Crosslinking zu gering (Abb. 20B-D).

Um größere Proteinmengen zu erhalten, wurden Konstrukte für Sf9-Insektzellen kloniert. Es wurden zwei verschiedene Konstrukte erstellt, um eine eventuelle Abspaltung des N-terminalen His-Tags auszuschließen, da Fjx1 in 293-Zellen N-terminal prozessiert wird. Beide Konstrukte enthielten eine Signalsequenz gefolgt von sechs Histidinen. Im Anschluss daran folgte beim langen His-Fjx1-Konstrukt die komplette Fjx1-Sequenz ab der Spaltungstelle des Signalpeptids (ca. 415 AS), während das kurze His-Fjx1-Konstrukt nur den konservierten C-Terminus (ca. 340 AS) enthielt. Tatsächlich wurde das lange His-Fjx1-Protein teilweise prozessiert, obwohl der größte Teil des Proteins vermutlich aufgrund der starken Überexpression unprozessiert blieb. Die Aufreinigung beider His-Fjx1-Proteine über eine Nickel-Säule war jedoch ebenfalls ineffizient, da beide Proteine leicht aggregierten und deshalb nicht mehr von der Säule eluiert werden konnten (nicht gezeigt). Aufgrund dessen war es auch mit diesen Konstrukten nicht möglich, den postulierten Fjx1-Rezeptor zu identifizieren.

4.8 Identifizierung der Dachous- und Fat-Homologen in der Maus

Da Fj in *Drosophila* in einem Signalweg mit Ds und Ft vorkommt (Abb. 5), wurde nach homologen Genen von *ds* und *fat* in der Maus gesucht. Dabei wurden von Ds zwei Homologe gefunden, die im Menschen als FIB1/KIAA1773 und CDH-J publiziert wurden (Hong et al., 2004; Matsuyoshi and Imamura, 1997; Nakajima et al., 2001). Durch eine Datenbank-Suche konnten die entsprechenden homologen Mausgene gefunden werden, die im Folgenden als *dchs1* und *dchs2* bezeichnet werden. Die Proteine, die von diesen beiden Genen kodiert werden, haben eine Ähnlichkeit mit dem *Drosophila*-Protein von 49 bzw. 44%. Die intrazelluläre Domäne, die einzigartig in der Cadherin-Superfamilie ist und keine weiteren Strukturmodule enthält, zeigt eine Ähnlichkeit mit dem *Drosophila*-Protein von 40 bzw. 32%. Es sind jedoch mehrere sehr stark konservierte Bereiche enthalten, unter anderem eine

potentielle β -Catenin-Bindungsstelle (Abb. 21). Die Ähnlichkeit zwischen den beiden Dachsous-Homologen, Dchs1 und Dchs2, beträgt 47% über das gesamte Protein und 44% für die intrazelluläre Domäne. Beide Proteine haben wie auch das homologe Drosophila-Protein 27 extrazelluläre Cadherin-Motive (Abb. 22).

```

D-dachsous : WAFGLLAPRLVLCARAGFLFHHRSRMPRNVAKHLATDNAGVNTNSVYDLSAFDTPIRGSISGGAGAASGQFAPFK---YDETFPSGAHAG : 94
H-dachsous1 : GWVAASGVVVVLAIAAIVVIGVFRPSSKAEARPGEM-----SQAPLASSDLSLQKGR-----EPPSPFSEHLYHTLPSVGG--- : 74
M-dachsous1 : GWVAASGVVVVLAIAAIVVIGVFRPSSKAEARPGEM-----SQTAIASSSLQKGR-----EPPSPFSEHLYHTLPSVGG--- : 74
R-dachsous1 : GWVAASGVVVVLAIAAIVVIGVFRPSSKAEARPGEM-----SQTAIASSSLQKGR-----EPPSPFSEHLYHTLPSVGG--- : 74
H-dachsous2 : -SISLVVSEVLELILICILIVMLRHRKADPTINNYE-----EKKT-SSLADADLRVTR-----DASVLRKAFKTDCCSNEVV : 69
M-dachsous2 : -SISLVVSEVLELSEVCTILIVMLRHRKADPLHSYE-----EKKTSSPDADPKVTG-----AASLKAQGETAEVTRGVTG : 70
R-dachsous2 : FSSISLVVSEVLELSEVCTILIVMLRHRKADPLHSYE-----EKKTASPEADSRVTG-----ATSELKAGETAETVTRGLTG : 71
*****

D-dachsous : SSQAATT-----SELSSGS-EQSSSQRGSAE-DDGDEEIRMINENEGLHHRNGGAGAGSDDGHSISVNTQEYIARLGIWDHDFSGAGGGA : 180
H-dachsous1 : -PGAGG-----YPRGGLDPFSSSQRGSA--EAEDEEIRMINENE--RWASVSS--LAARFPPSGIQCFAGLSDTSCEPPAP----- : 148
M-dachsous1 : -PGAGG-----YPRGGLDPFSSSQRGSA--EAEDEEIRMINENE--RWASVSS--LAARFPPSGIQCFAGLSDTSCEPPAP----- : 148
R-dachsous1 : -PGAGG-----YPRGGLDPFSSSQRGSA--EAEDEEIRMINENE--RWASVSS--LAARFPPSGIQCFAGLSDTSCEPPAP----- : 148
H-dachsous2 : -VVDAT--EWLSLISINEKDIVNLYRHSNSGHCSEVDEGTHDEKIQIRINENE--YRKGSDSLLSDHESRPPSGIPRPSGOLS--QLSGET----- : 155
M-dachsous2 : -PEGVMAEAWLNLMVMEKDIHILFRHNSGHCSEVDEGTHDEKIQIRINENE--YRKGSDYLLSDQGSRPPSGIPRPSGOLS--QLSGET----- : 157
R-dachsous2 : -PEGVMAEAWLNLMVMEKDIHILFRHNSGHCSEVDEGTHDEKIQIRINENE--YRKGSDSLLSDGSSRPPSGIPRPSGOLS--QLSEET----- : 158

D-dachsous : SSMAGSSHMHLYHDCATARSIDITNLIYAKLNDVTCAGSETGSSADDAAGTAGSAGTIGTA--ITHGHVMSSYGEVFPVVPVWVGGSNVGG-SLSSI : 276
H-dachsous1 : -----RTWYKGRKAGLL-----PGAGATLYREEGPPATATAFVGGCGLS--PAPTGDYGFPPDGGP--CVAG-----ALTAI : 212
M-dachsous1 : -----RTWYKGRKAGLL-----PGAGATLYREEGPPATATAFVGGCGLS--PAPAGDYGFPPDGGP--CVAG-----ALTAI : 212
R-dachsous1 : -----RTWYKGRKAGLL-----PGAGATLYREEGPPATATAFVGGCGLS--PAPTGDYGFPPDGGP--CVAG-----ALTAI : 212
H-dachsous2 : -----RVMVTAE-----TAEASQTFEGEGDQEGECSTTCAQNNVLPOTVQKREAKESILADVKESEVFSGQDEVRCANLSIQ : 227
M-dachsous2 : -----RVMTSSE-----TAEASHMFEVGGEGECDDVIYQNNALS--LRREATAGVLESRES-FTSGSQEGRCVVFPSIQ : 225
R-dachsous2 : -----RVMTGSE-----TAEASHMFDGGVGEECTIYQNNTSS--RRREATAGVLESRES-FTSGNQEGRYSEPSIQ : 226

D-dachsous : VHSSEETGSYNWDYLLDNGFAYGELARVFEIARLKDETLSEHSGSGASSAKSHSSSHSAGAGSVVLKPPPSAPPT---HTEPPLITVAAPPEI : 370
H-dachsous1 : VAGEEELRGSYNWDYLLSWCPAQCELASVFEIARLKDEAR-----PCGPPAP-----GPPPLITVAAPPEI : 275
M-dachsous1 : VAGEEELRGSYNWDYLLSWCPAQCELASVFEIARLKDEAR-----PCGPPAP-----GPPPLITVAAPPEI : 275
R-dachsous1 : VAGEEELRGSYNWDYLLSWCPAQCELASVFEIARLKDEAR-----PCGPPAP-----GPPPLITVAAPPEI : 275
H-dachsous2 : TTSDDHCRDNHNNYLLSWERKFCQELASVENDIARLKDEHL-----HMGGIPREKKSFEVPPPLITVAAPPEI : 295
M-dachsous2 : MTSSDDVRCGSYNWDYLLSWERKFCQELASVENDIARLKDEHM-----QVEGIPHD-TSEVPPPLITVAAPPEI : 292
R-dachsous2 : TTSDDVRCGSHAWDYLLSWERKFCQELASVENDIARLKDEHS-----QVEGIPHD-TTEVPPPLITVAAPPEI : 293

D-dachsous : IMLFRPFP-HSLAPAHLP---RSPICHEASGSEFTSSAMSFSFSPSLSELRATRPSSISLIG-AGPPLHLPVSLPRHGHPQPSQRGNVGTNR : 460
H-dachsous1 : RSVPRKPPA-NTAARAIFFPASHRSPISHE--GSSS-SAMMSPFSFSPSLSELAARSFVWSPFGVAQCPASALSATESGLEPPDDTE--- : 360
M-dachsous1 : RSVPRKPPA-STAVARAIFFPASHRSPISHE--GSSS-SAMMSPFSFSPSLSELAARSFVWSPFGVAQCPASALSATESGLEPPDDTE--- : 360
R-dachsous1 : RSVPRKPPA-STAAARAIFFPASHRSPISHE--GSSS-SAMMSPFSFSPSLSELAARSFVWSPFGVAQCPASALSATESGLEPPDDTE--- : 360
H-dachsous2 : RQVPRRPPVNIQGVLPKFE--RSPIDYHL-GSS--PEGMPFNSFSPSLSELRATRPSSISLIG-RECELLGTHISGTCHELKAEDE--- : 377
M-dachsous2 : RQVPRRPPAITLQVLPKFE--RSPIDYHG-GSS--PEVMTFNSFSPSLSELRATRPSSISLIG-RECELLGTHISGTCHELKAEDE--- : 374
R-dachsous2 : RQVPRRPPVITLQVLPKFE--RSPIDYHG-GSS--PEAMTFNSFSPSLSELRATRPSSISLIG-RECELLGTHISGTCHELKAEDE--- : 375

```

Abb. 21: Konservierung der intrazellulären Domäne von Dachsous

Das Drosophila-Protein Ds besitzt in Vertebraten zwei Homologe. In der intrazellulären Domäne, die besonders charakteristisch ist und durch die sich das Protein eindeutig von anderen Cadherinen unterscheidet, fällt besonders die konservierte, potentielle β -Catenin-Bindungsstelle auf (Sequenz unterstrichen).

Zu dem Drosophila-Protein Fat sind in Säugern bislang vier ähnlich strukturierte Proteine bekannt, nämlich Fat-j sowie Fat1, 2 und 3 (Cox et al., 2000; Hong et al., 2004; Mitsui et al., 2002; Nakayama et al., 2002) (Abb. 22). Alle Fat-Proteine haben vermutlich 34 Cadherin-Motive in der extrazellulären Domäne. Teilweise besitzen die in der Datenbank (z.B. Ensembl) vorhergesagten Proteine jedoch weniger Cadherin-Motive, insbesondere die beiden Maus-Proteine Fat3 und Fat-j. Aufgrund der Größe der extrazellulären Domäne, die bei den Fat-Proteinen zwischen 12,5 kb im Falle von Fat2 und 13,5 kb bei Fat-j liegt, und dem Fehlen einer ausreichenden Anzahl von EST-Klonen, ist es schwierig, genaue Aussagen über die Struktur der wahrscheinlich unvollständig vorhergesagten Proteine zu machen. Vergleicht man jedoch die cDNA der Rattengene mit dem Mausgenom, erhält man sowohl für *fat-j* als auch für *fat3* Übereinstimmungen von ca. 94%. In Analogie zu den Rattenproteinen war es daher möglich, die entsprechenden vollständigen Mausproteine zu identifizieren.

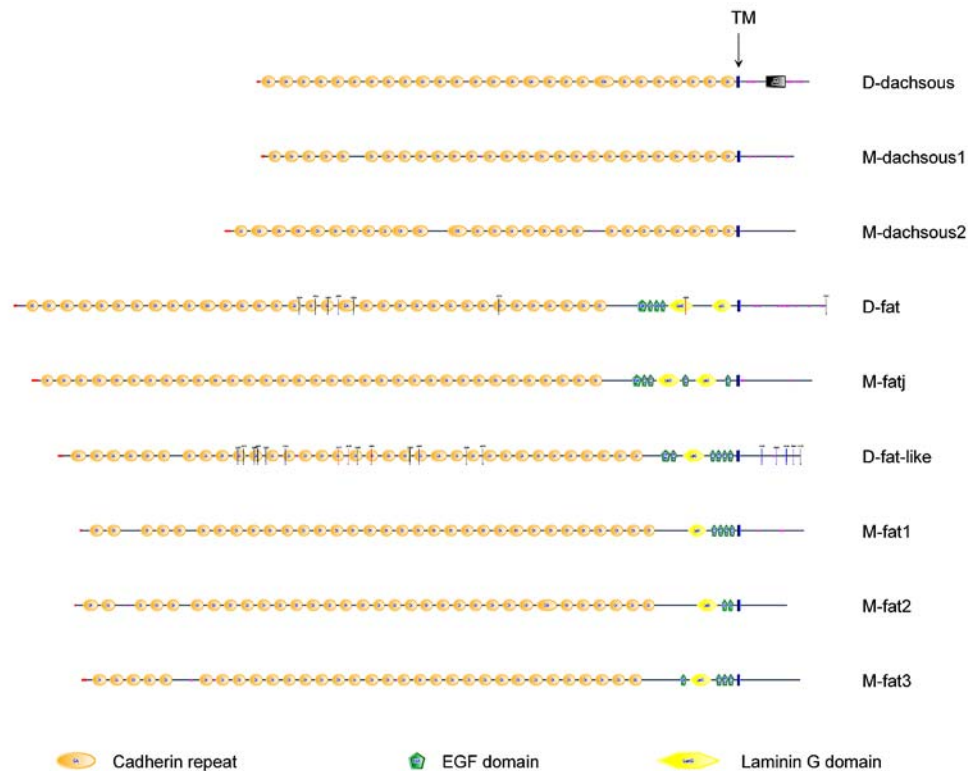


Abb. 22: Proteinstruktur von Ds, Ft und den homologen Mausproteinen

Die SMART-Analyse der Aminosäuresequenz zeigt die Ähnlichkeit der nicht-klassischen Cadherine. Während Ds und seine Homologen 27 Cadherin-Motive (orange) haben, besitzen alle bislang vollständig identifizierten Fat-Proteine 34 Cadherin-Motive, die jedoch aufgrund der zum Teil schlechten Konservierung nicht von der SMART-Software (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) erkannt werden, ebenso wenig wie die Transmembrandomäne (blau) von Fat-j, die von Hand eingezeichnet wurde. Die Fat-Proteine enthalten neben den Cadherin-Motiven noch zusätzlich Laminin G-Domänen (gelb) und EGF-Motive (grün) in variabler Anzahl.

Um die Verwandtschaft zwischen den Fat-Proteinen in Vertebraten und den beiden in *Drosophila* existierenden Fat-Proteinen, Fat (Ft) und Fat-like (Ftl), zu klären, wurde mit der Aminosäuresequenz der Transmembran- und intrazellulären Domäne ein Psi-Blast (<http://tux.embl-heidelberg.de/blast/>) durchgeführt. Beim Psi-Blast werden aus den Treffern der ersten Suche (erste Iteration) ein multiples Alignment gebildet, dessen Konsensussequenz für die weitere Suche verwendet wird. In der ersten Iteration ergab Ft nur mit Fat-j eine signifikante Übereinstimmung, das *Drosophila* Protein Ftl wurde in keiner der Iterationen gefunden.

Der entsprechende Psi-Blast mit Ftl ergab signifikante Übereinstimmungen mit Fat1 und Fat3 in der ersten Iteration, während Fat2 erst in der zweiten Iteration gefunden wurde. Ein Psi-Blast mit der Fat2-Sequenz erzielte jedoch Übereinstimmungen mit Fat1 und Fat3 in der ersten Iteration. Die *Drosophila*-Proteine Ft und Ftl wurden bei diesem Blast nicht gefunden. Für einen detaillierteren Vergleich der Sequenzen wurde eine Blast-Datenbank erstellt, die jeweils die Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne einschließlich der Transmembrandomäne der Proteine enthielt. Für die Datenbank wurden die beiden

Drosophila-Proteine, sowie die vier Vertebraten-Fat-Proteine jeweils von Maus, Mensch und Ratte verwendet. Zusätzlich wurde auch die Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne plus Transmembrandomäne von Ds und den beiden Vertebraten-Homologen, Dchs1 und 2, ebenfalls von Maus, Mensch und Ratte in die Blast-Datenbank mit aufgenommen. Der Vergleich der Sequenzen untereinander bestätigte zum einen, dass Dchs1 und 2 die nächsten Verwandten zum Drosophila-Protein Ds sind; zum anderen zeigte sich, dass Fat-j, die größte Homologie zu dem Drosophila-Protein Fat hat, während Fat1 und Fat3 eher verwandt zu Fat-like sind. Fat2 war hingegen nur in geringem Maße homolog zu einem der Drosophila-Proteine. Deutlich wurde jedoch eine Ähnlichkeit zu den beiden anderen Vertebraten-Proteinen Fat1 und Fat3 (Abb. 23).

Die größere Ähnlichkeit zwischen Ft und Fat-j bzw. Ftl und Fat1-3 zeigt sich auch in der Struktur der Proteine. Während Ft und Fat-j zwei Laminen G (LamG)- Domänen besitzen, haben Ftl und die vertebraten Proteine Fat1-3 nur eine LamG-Domäne. Bei der Anzahl der EGF-Motive gibt es jedoch keine Gemeinsamkeiten zwischen den Proteinen. Sie reicht von zwei EGF-Motiven in Fat2 bis hin zu sechs EGF-Motiven in Fat-j und Fat-like.

	D-dachsous	M-dachsous1	M-dachsous2	D-fat	M-fatj	D-fat-like	M-fat1	M-fat2	M-fat3
D-dachsous	0,00E+00								
M-dachsous1	1,00E-34 1,00E-34	0,00E+00							
M-dachsous2	4,00E-19 3,00E-19	7,00E-34 7,00E-34	0,00E+00						
D-fat	2,00E-07 2,00E-07	2,00E-05 3,00E-05	2,00E-05 4,00E-05	0,00E+00					
M-fatj	3,00E-06 4,00E-06	2,00E-05 3,00E-05	3,00E-05 4,00E-05	3,00E-27 3,00E-27	0,00E+00				
D-fat-like	1,60E+00 1,40E+00	2,40E+01 2,70E+01	7,60E-01 8,40E-01	2,90E+01 2,10E+01	1,00E+00 8,40E-01	0,00E+00			
M-fat1	2,10E+00 1,90E+00	2,80E+00 3,30E+00	8,50E+00 9,70E+00	7,00E-01 5,10E-01	1,20E-01 1,00E-01	3,00E-09 3,00E-09	0,00E+00		
M-fat2	3,00E-02 2,00E-02	5,60E-01 4,80E-01	1,30E+00 1,10E+00	3,50E+00 1,80E+00	1,30E+00 8,30E-01	1,40E+00 1,10E+00	5,00E-04 4,00E-04	0,00E+00	
M-fat3	1,80E-02 1,50E-02	1,30E+00 1,40E+00	2,20E+00 2,40E+00	1,20E+00 8,30E-01	2,09E+02 1,73E+02	3,00E-09 3,00E-09	2,00E-61 2,00E-61	1,50E-02 2,00E-02	0,00E+00

Abb. 23: E-Values der Blast-Datenbank

Vergleicht man die Sequenz der intrazellulären Domäne (einschließlich Transmembrandomäne) mit der Gesamtheit der in der Datenbank enthaltenen Sequenzen, wird die höchste Übereinstimmung (es zählt der längste Treffer) mit einer in der Datenbank enthaltenen Sequenz durch den kleinsten E-Value angezeigt. Der E-Value (Expect Value) ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der der Treffer durch Zufall entstanden ist. Durch Vergleich der ermittelten E-Values für alle Sequenzen ergeben sich drei Gruppen: Ds und seine beiden Homologen Dchs1 und Dchs2, Ft und das entsprechende homologe Fat-j sowie Ftl mit den Homologen Fat1 und Fat3. Fat2 besitzt kein homologes Drosophila-Protein, zeigt jedoch deutliche Ähnlichkeit mit Fat1 und Fat3.

4.9 Expression der *dachsous*- und *fat*-Homologen in der Maus

Um eine mögliche Interaktion zwischen *dchs*, *fat* und *ffx1* in der Maus zu untersuchen, wurden die Expressionsmuster der verschiedenen Gene mit RNA *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten von Mausembryonen verschiedener Stadien analysiert und verglichen. Für die Cadherine wurde der für die sehr charakteristische intrazelluläre Domäne kodierende Bereich als Hybridisierungssonde verwendet.

Da vor allem die Konservierung des in *Drosophila* entdeckten PCP-Signalwegs im Hinblick auf *ds*, *ff* und *fat* von Interesse war, wurde zunächst die Expression der direkten Homologen, d.h. *dchs1* und *dchs2* sowie *fat-j* und *ffx1* in Mausembryonen untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass *dchs2* nur eine sehr geringe embryonale Expression besitzt, die sich im Gehirn hauptsächlich auf die Rinde des Vorderhirns, das Mittelhirndach sowie die Brücke beschränkte. Die Expression von *dchs1*, *fat-j* und *ffx1* war deutlich breiter gefächert mit etlichen Überlappungen, was die Annahme einer Interaktion zwischen diesen Genen bestärkt.

Um eine Konservierung des PCP-Signalwegs im Hinblick auf *dchs1*, *fat-j* und *ffx1* in Vertebraten zu überprüfen, wurde zunächst die Expression im Neuralrohr und im Innenohr untersucht, da hier auch alle anderen bislang identifizierten Gene dieses Signalwegs, wie z.B. *Celsr1-3* und *Dvl1* und *2*, exprimiert sind.

Wie erwartet wurden auch *dchs1*, *fat-j* und *ffx1* im Neuralrohr gefunden, so dass in der Tat eine Beteiligung dieser Gene am PCP-Signalweg, der in Vertebraten bei der konvergierenden Ausdehnung und somit am Neuralrohrschluss eine Rolle spielt, vermutet werden kann (Abb. 24D-F).

Auch im Innenohr konnte eine Expression von *dchs1*, *fat-j* und *ffx1* gefunden werden. Die Lokalisation der Gene war hier jedoch deutlich unterschiedlich. Während *ffx1* wie bereits unter 4.2 beschrieben im Ganglion cochleare und im Epithel des sich entwickelnden Gehörgangs exprimiert war, waren *dchs1* und *fat-j* eher in den umliegenden Regionen exprimiert, wobei *fat-j* am stärksten zwischen der Cochlea und dem Felsenteil des Schläfenbeins zu finden waren (Abb. 24G-I).

Neben der schon länger bekannten Beteiligung von PCP-Genen an der Entwicklung des Neuralrohrs und des Innenohrs scheinen *dchs1*, *fat-j* und *ffx1* auch eine Rolle bei der mesenchymalen-epithelialen Interaktion zu spielen. So waren *dchs1* und *fat-j* häufig im Mesenchym verschiedener Organe zu finden, wie zum Beispiel in der Niere, der Lunge und im Darm. In den gleichen Organen war *ffx1* komplementär dazu in epithelialen Zellen exprimiert (vgl. auch 4.2) (Abb. 24). Dieses Expressionsmuster kann in Analogie zu der in *Drosophila* gefundenen Expression von *ds* und *ff* gesehen werden, die dort in entgegengesetzten Gradienten exprimiert sind.

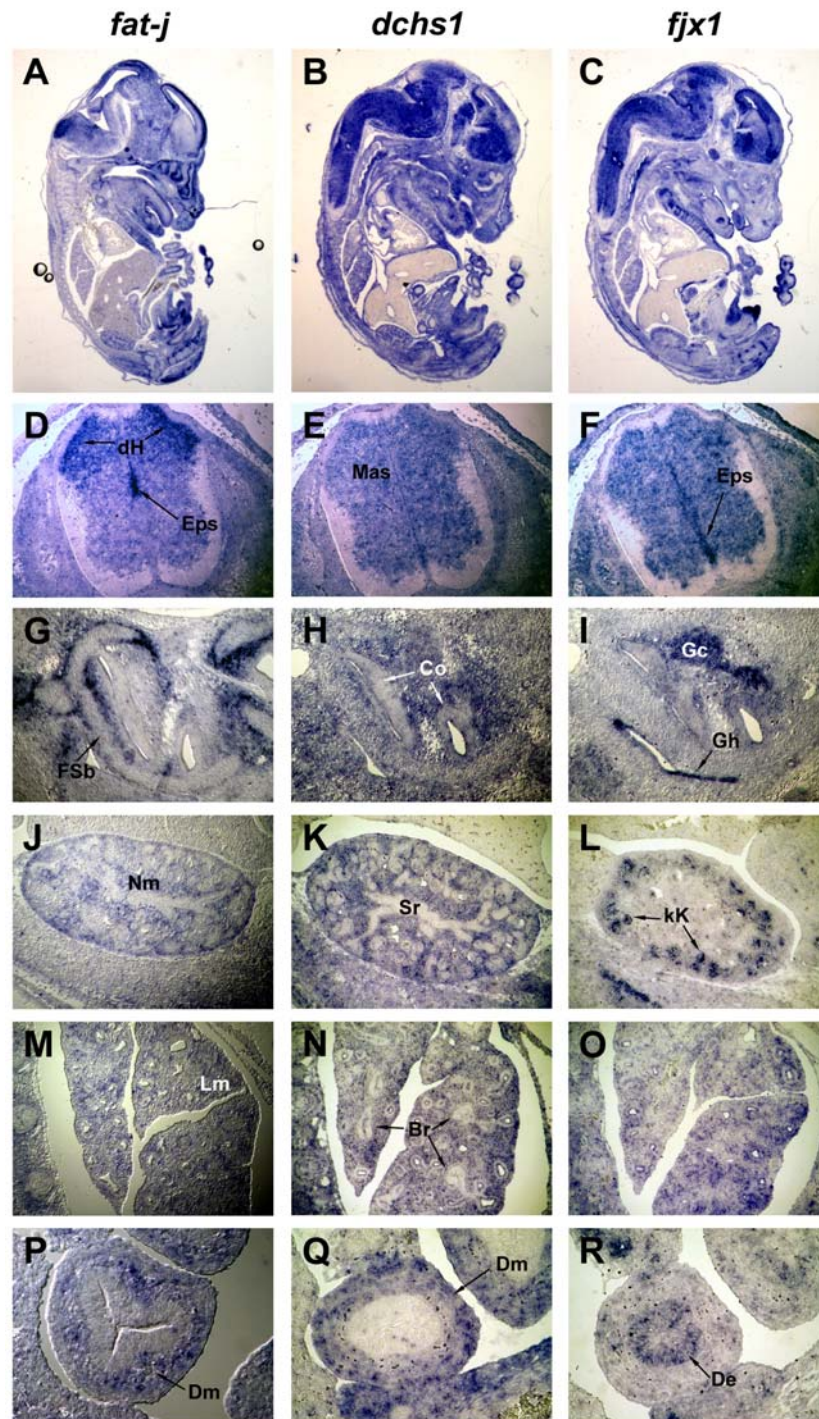


Abb. 24: Expression von *fat-j*, *dchs1* und *ffx1*

Im Embryonalstadium E 14,5 waren alle drei Gene, *fat-j* (A), *dchs1* (B) und *ffx1* (C) spezifisch exprimiert. Im Neuralrohr (D-F) waren *fat-j*, *dchs1* und *ffx1* zum größten Teil coexprimiert, während die Expression im Innenohr (G-I) deutlich unterschiedlich war. Hier waren *fat-j* und *dchs1* hauptsächlich in dem die Cochlea umgebenden Gewebe zu finden, wohingegen *ffx1* im Ganglion cochleare exprimiert war. In Organen mit mesenchymal-epithelialen Interaktionen, wie z. B. der Niere (J-L), der Lunge (M-O) oder dem Darm (P-R) waren *fat-j* und *dchs1* in den mesenchymalen Kompartimenten exprimiert und *ffx1* in den benachbarten epithelialen Strukturen. Abk.: Br, Bronchien; Co, cochlea; De, Darmepithel; Dm, Darmmesenchym; Eps, Ependymalschicht; FSb, Felsenbein des Schläfenbeins; Gc, Ganglion cochleare; Gh, Gehörgang; kK, kommaförmiger Körper; Lm, Lungenmesenchym; Nm, Nierenmesenchym; Mas, Mantelschicht; Sr, Sammelrohre.

Anders ist die Situation jedoch bei *ft*, das in *Drosophila* zumindest in den Imaginalscheiben ubiquitär exprimiert ist, wohingegen das homologe *fat-j* in der Maus ein räumlich begrenztes Expressionsmuster aufwies. Da während der Evolution häufig die Funktion eines Proteins von einem oder mehreren homologen Proteinen übernommen wird, also eine Umverteilung der Aufgaben stattfindet, wurden auch die Expressionsmuster der *ftl*-Homologen untersucht.

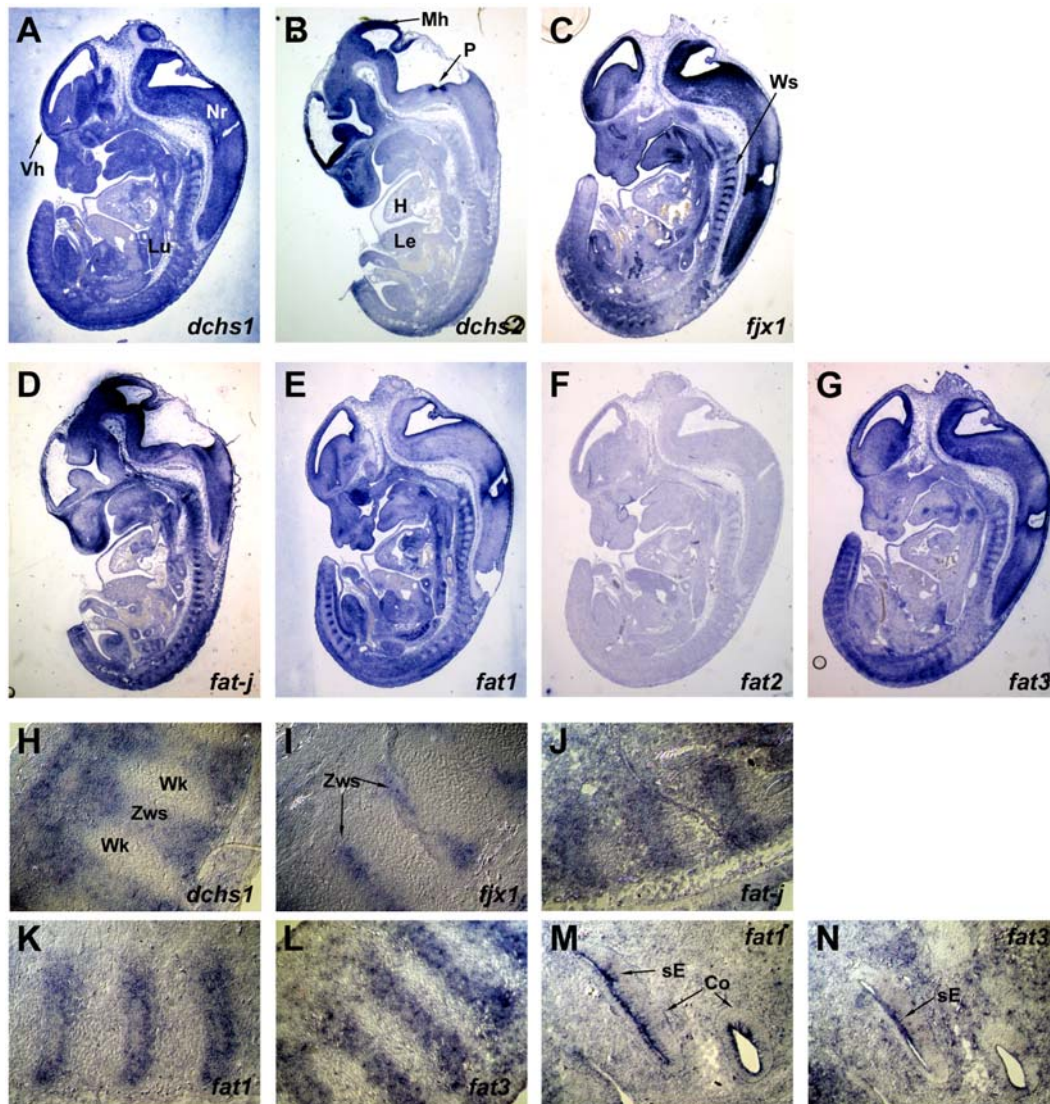


Abb. 25: Expression aller Homologen von *ds*, *ffx1* und *fat*

Mit Ausnahme von *fat2* waren alle homologen Mausgene von *ds*, *fat* und *ffx1* im Stadium E 12,5 hauptsächlich in verschiedenen Bereichen des Gehirns und des Neuralrohrs exprimiert (A-G). Zusätzlich waren *dchs1*, *ffx1*, *fat-j*, *fat1* und *fat3* in den sich entwickelnden Bandscheiben zu finden (H-L). Wie *fat-j* waren auch die *ftl*-Homologen, *fat1* (M) und *fat3* (N), im Innenohr von Embryonen des Stadiums E 14,5 exprimiert, jedoch im Gegensatz zu *fat-j* wurden diese im sensorischen Epithel detektiert. Abk.: Co, cochlea; H, Herz; Le, Leber; Lu, Lunge; Mh, Mittelhirn; Nr, Neuralrohr; P, pons; sE, sensorisches Epithel, Vh, Vorderhirn; Wk, spätere Wirbelkörper; Ws, spätere Wirbelsäule; Zws, Zwischenwirbelscheiben.

Teilweise wurde die Expression der *fat-like*-Homologen, *fat1-3*, schon früher publiziert, allerdings hauptsächlich in der Ratte (Cox et al., 2000; Mitsui et al., 2002; Ponassi et al., 1999). *Fat1* ist im Gegensatz zu *fat-j* im Epithel verschiedener Organe exprimiert, wie zum

Beispiel der Niere und der Lunge, aber auch im Darm und dem olfaktorischen Epithel. Neben der epithelialen Expression ist *fat1* auch in Muskeln, z.B. der Zunge, und der sich entwickelnden Wirbelsäule und den Rippen zu finden (Ponassi et al., 1999). Fat1-Knock-out-Mäuse sterben jedoch an einem Nierendefekt, der durch die Fusion von Podozyten und dem Verlust des Filtrationsschlitzes hervorgerufen wird (Ciani et al., 2003). Noch nicht gezeigt wurde, dass *fat1* auch im Innenohr, genauer gesagt im sensorischen Epithel der Cochlea exprimiert ist (Abb. 25M).

Im Gegensatz zu *fat1* wurde bei *fat2* keine embryonale Expression gefunden. *Fat3* war wie auch in der Ratte gezeigt im Neuralrohr und dem sich entwickelnden Gehirn exprimiert (Mitsui et al., 2002). Zusätzlich konnte es jedoch, ähnlich wie *fat1*, im sensorischen Epithel der Cochlea und in der sich entwickelnden Wirbelsäule detektiert werden (Abb. 25L, N).

Obwohl die Funktion von Fat1-3 auch in Homologie zu *Drosophila* Ftl gesehen werden kann, das in *Drosophila* an der Entwicklung von tubulären Strukturen beteiligt ist (Castillejo-Lopez et al., 2004), ist es jedoch wahrscheinlich, dass Fat1-3 auch im PCP-Signalweg agieren. Die ubiquitäre Expression von *ft* wäre demnach in Vertebraten in eine mesenchymale Expression von *fat-j* und eine epitheliale Expression von *fat1* und eventuell *fat3* aufgeteilt.

In adulten Organen wurde die Expression der homologen *dachsous*- und *fat*-Gene mit Real-Time-PCR untersucht. Dazu wurde RNA aus Mausorganen isoliert und 2 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. Unterschiede in der Menge an erhaltener cDNA wurden durch Normalisierung der Real-Time-PCR auf HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase), einem so genannten Haushaltsgen, ausgeglichen. Um die Expression der einzelnen Gene in den verschiedenen Organen zu vergleichen, wurde die höchste Expression jeweils auf 100% gesetzt. Mit Ausnahme von *dchs1* und *fat-j*, die die höchste Expression in der Lunge hatten, waren die anderen Gene, *fjx1*, *dchs2*, *fat1-3*, am stärksten im Gehirn exprimiert, mit *fjx1*, *dchs2* und *fat3* vor allem im Großhirn und *fat1* und *fat2* im Kleinhirn. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR bestätigten im Wesentlichen die bei Mensch und Ratte durch Northern Blot und RT-PCR gefundene Genexpression in adulten Organen. Während *dchs1* in fast allen Organen detektiert werden konnte, war *dchs2* so schwach exprimiert, dass außer im Großhirn eine Expression nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Ct-Werte im Bereich von Primerdimeren und Wasserkontrolle). *Fat-j* und *fat1* zeigten ebenso wie *dchs1* eine eher ubiquitäre Expression, wohingegen *fjx1*, *fat2* und *fat3* fast ausschließlich im Gehirn zu finden waren (Abb. 26).

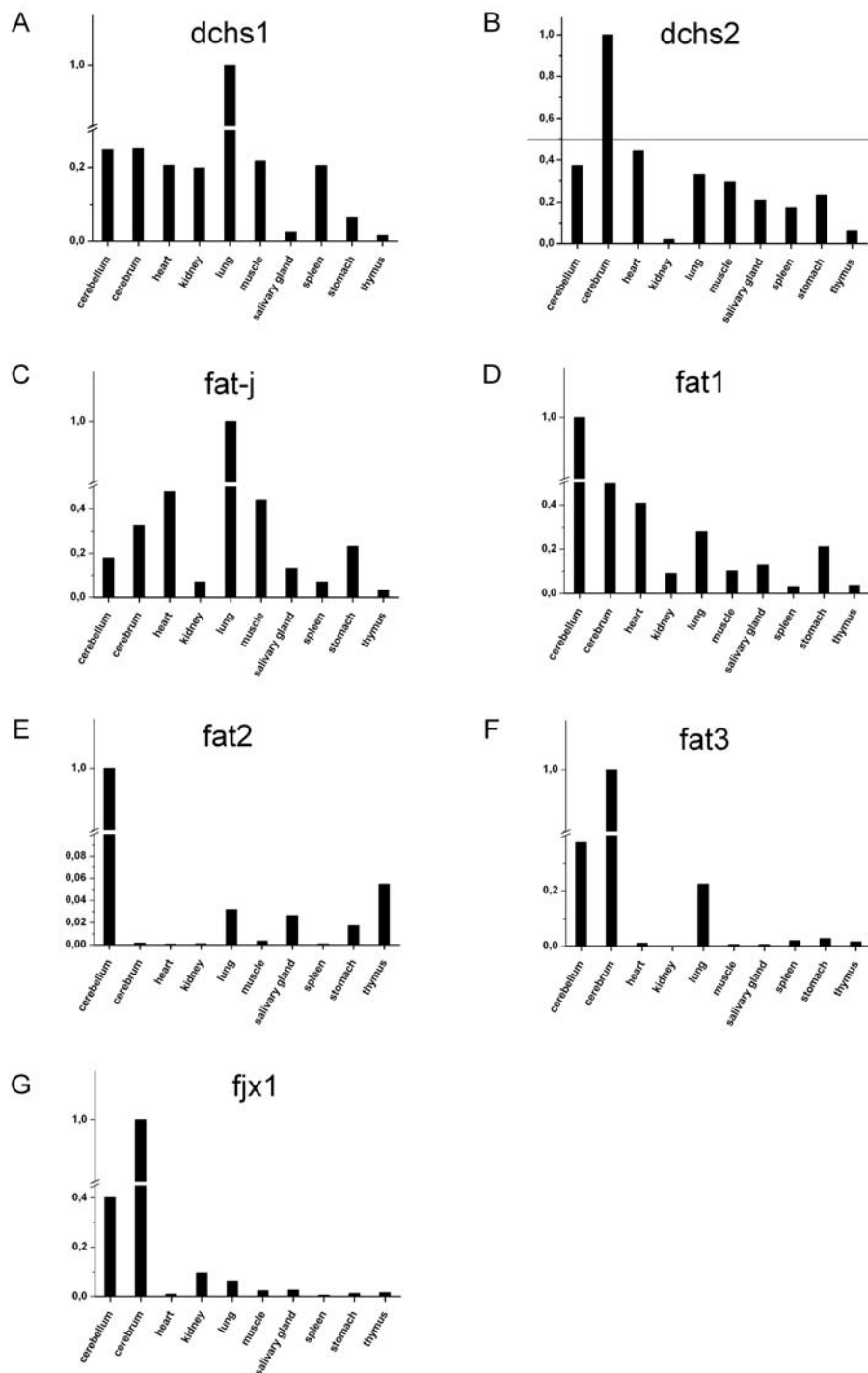


Abb. 26: Expressionslevel der Ds-, Fat- und Fj-Homologen in adulten Organen

Die Expression der Gene in adulten Organen zeigte im Gegensatz zur embryonalen Expression deutliche Unterschiede zwischen den Genen. Während *fat2*, *fat3* und *fjx1* fast nur im Gehirn detektiert wurden, waren *dchs1*, *fat-j* und *fat1* eher ubiquitär exprimiert, jedoch mit deutlichen Schwerpunkten, die für *dchs1* sowie *fat-j* in der Lunge und für *fat1* im Kleinhirn lagen. Die Expression von *dchs2* war im Allgemeinen sehr schwach, so dass zweifelsfrei nur eine Expression im Großhirn nachgewiesen werden konnte (Skala 1=100%).

Da nach den Ergebnissen der Real-Time-PCR alle Gene im adulten Gehirn exprimiert waren, wurde die räumliche Verteilung der Gene mit RNA *in situ* Hybridisierung untersucht. Die Expression fast aller Gene beschränkte sich dabei hauptsächlich im Kleinhirn auf die Körnerschicht und die Purkinje-Zellen, im Großhirn auf die Hirnrinde (Kortex) und den Hippocampus und im Riechhirn auf die Schicht der Glomeruli, die Mitralzellschicht und die Körnerschicht (Abb. 27). Lediglich in der Verteilung der Gene bestanden deutliche Unterschiede. So war *dchs1* am stärksten im Riechhirn exprimiert, während *dchs2* hauptsächlich im Kleinhirn zu finden war. Auch *fx1* war dort am stärksten exprimiert. Eine Ausnahme vom allgemeinen Expressionsmuster bildete *fat-j*, das im Kleinhirn nicht nur in der Körnerschicht, sondern auch im Mark eine deutliche Färbung zeigte, wobei die stärkste Expression von *fat-j* jedoch im Kortex und Hippocampus zu finden war. *Fat1* war wie *dchs1* am stärksten im Riechhirn exprimiert, wohingegen *fat2* fast ausschließlich im Kleinhirn detektiert wurde. *Fat3* wiederum war am stärksten im Kortex exprimiert. Aufgrund der deutlich verschiedenen Expressionschwerpunkte der Gene ist zu vermuten, dass die Gene vermutlich verschiedene Funktionen im Gehirn ausüben.

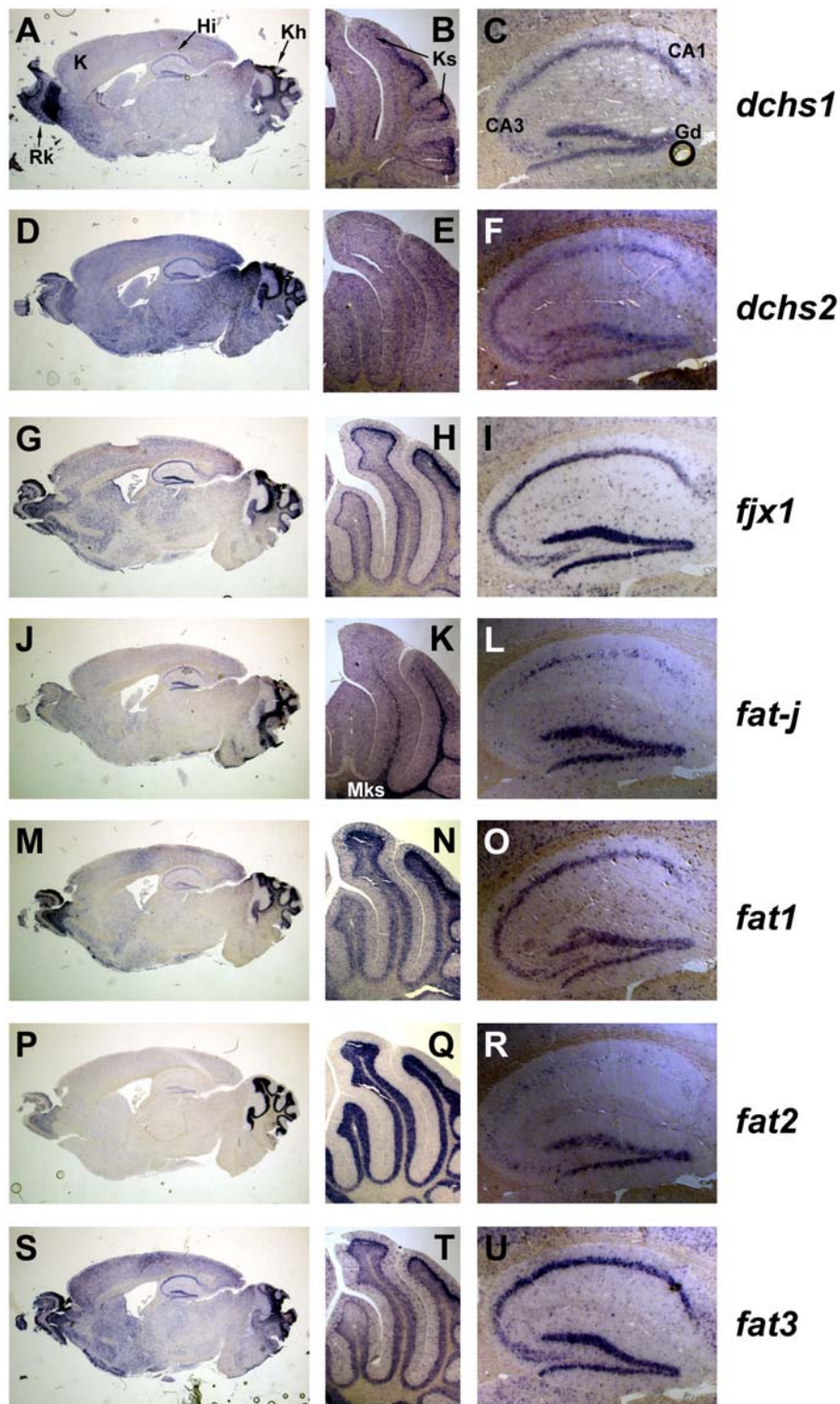


Abb. 27: Expression der *ds*, *fj* und *fat*-Homologen im adulten Gehirn

Im adulten Gehirn zeigten alle Gene Expression im Riechhirn, dem Kortex des Großhirns, dem Hippocampus sowie in der Körnerschicht des Kleinhirns. Dabei waren die Gene in den verschiedenen Regionen unterschiedlich stark exprimiert. Als einziges Gen wurde *fat-j* zusätzlich noch in der Marksicht des Kleinhirns detektiert. Abk.: Gd, Gyrus dentatus; Hi, Hippocampus; K, Kortex; Kh, Kleinhirn; Mks, Marksicht; Rh, Riechhirn.

4.10 Identifikation von Fjx1-ähnlichen Proteinen

Da Fjx1 keinerlei bekannte Strukturmodule enthält, die Hinweise auf die Funktion des Proteins geben, wurde in Kooperation mit J. Schultz nach verwandten Proteinen mit ähnlicher Struktur gesucht. Dabei konnte ein ganzer Stammbaum von Proteinen erstellt werden, die jedoch meist nur hypothetisch (Computervorhersagen) waren und deren Funktion ebenfalls nicht bekannt war. Unter anderem enthielt der Stammbaum neben Fj/Fjx1 noch zwei weitere *Drosophila*-Proteine, CG31145 und CG3631, sowie fünf Maus-Proteine, die in dieser Arbeit nach ihrer entsprechenden Ensembl-Nummer (ENSMUSG000000xxxxx) 20614, 25854, 27955, 33557 und 38233 benannt wurden (Abb. 28).

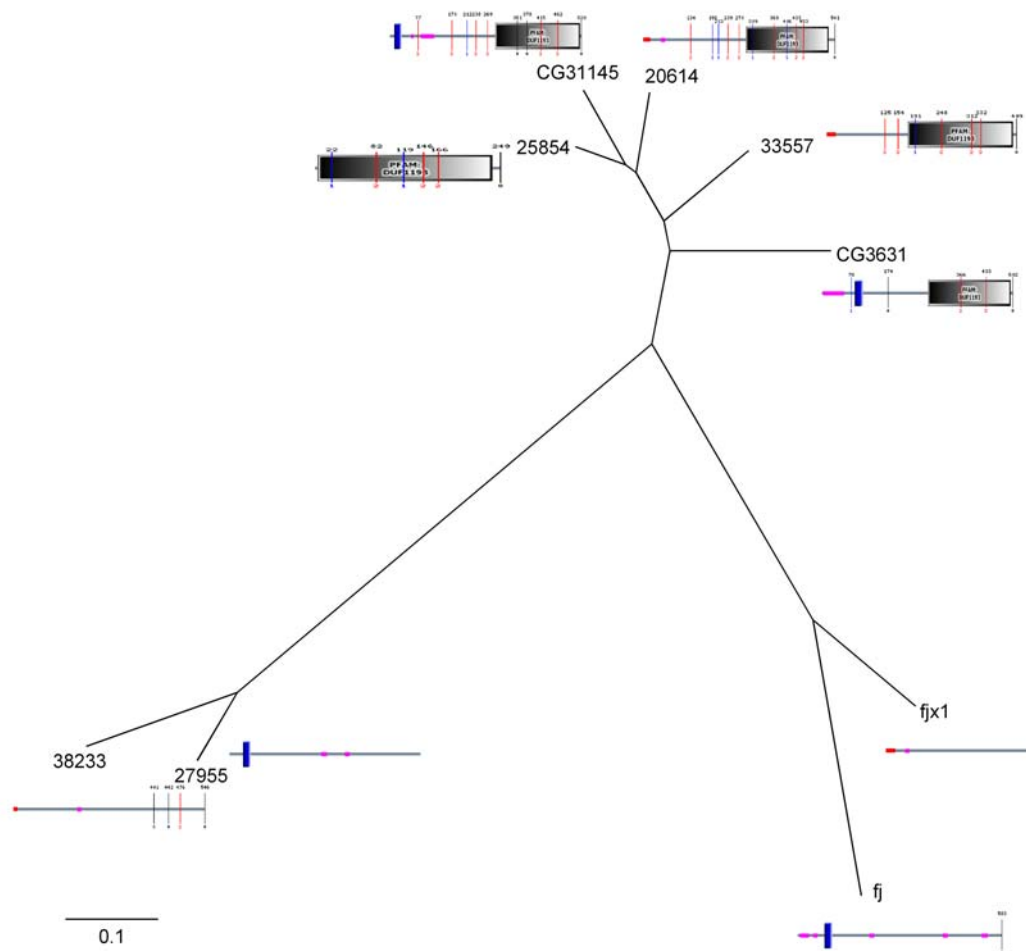


Abb. 28: Stammbaum der *fjx1*-ähnlichen Gene

Fjx1 und seine Verwandten lassen sich in drei Gruppen unterteilen: 1. Fjx1/Fj; 2. 27955 und 38233, die kein homologes *Drosophila*-Protein besitzen und 3. 20614, 2584 und 33557 sowie die beiden *Drosophila*-Proteine CG31145 und CG3631. Die letzte Gruppe zeichnet sich besonders durch die gemeinsame DUF1193-Domäne (domain of unknown function 1193) aus. Charakteristisch für diese Domäne sind zwei konservierte Motive, DRHHYE und QCC, sowie mehrere konservierte Cystein-Reste.

Im Gegensatz zu Fjx1 sind die Mausgene, die für diese Proteine kodieren, gespleißt. Wie Fj/Fjx1 haben die meisten Proteine entweder ein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne mit einem sehr kurzen N-Terminus, der in den meisten Fällen als intrazellulär vorhergesagt wird. Die Proteine lassen sich in drei Gruppen unterteilen, nämlich Fj/Fjx1; die beiden Mausproteine 27955 und 38233 sowie als letzte Gruppe die beiden Drosophila-Proteine GC31145 und GC3631 mit den Maushomologen 20614, 25854 und 33557 (Abb. 28). Die Proteine der letzten Gruppe besitzen alle eine so genannte DUF1193-Domäne (domain of unknown function 1193). Die Sequenzähnlichkeiten zwischen den Proteinen innerhalb der einzelnen Gruppen betragen zwischen 35 und 40%, während die Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen der verschiedenen Gruppen nur bei 20-25% liegen (Abb. 29). Es gibt nur sehr wenige Sequenzmotive, die allen Proteinen gemeinsam sind. Bei den konservierten Aminosäureresten handelt es sich häufig um die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat sowie um Arginin. Da bei Fj in Drosophila vermutet wird, dass das Protein eine Funktion im Golgi-Apparat hat, könnte es sich bei der gesamten Proteinfamilie um Glykosyltransferasen handeln. Dafür sprechen sowohl die Länge der Proteine (ca. 400-500 AS) als auch die Struktur (vermutlich TypII-Transmembranproteine) und die Art der konservierten Reste (Asp, Glu und Arg), da diese Aminosäuren in bekannten Glykosyltransferasen an der enzymatischen Aktivität beteiligt sind. Bisläng gibt es jedoch noch keine Hinweise auf mögliche Zucker-Donatoren und -Akzeptoren, so dass die tatsächliche Funktion der Proteine noch ungeklärt bleibt.

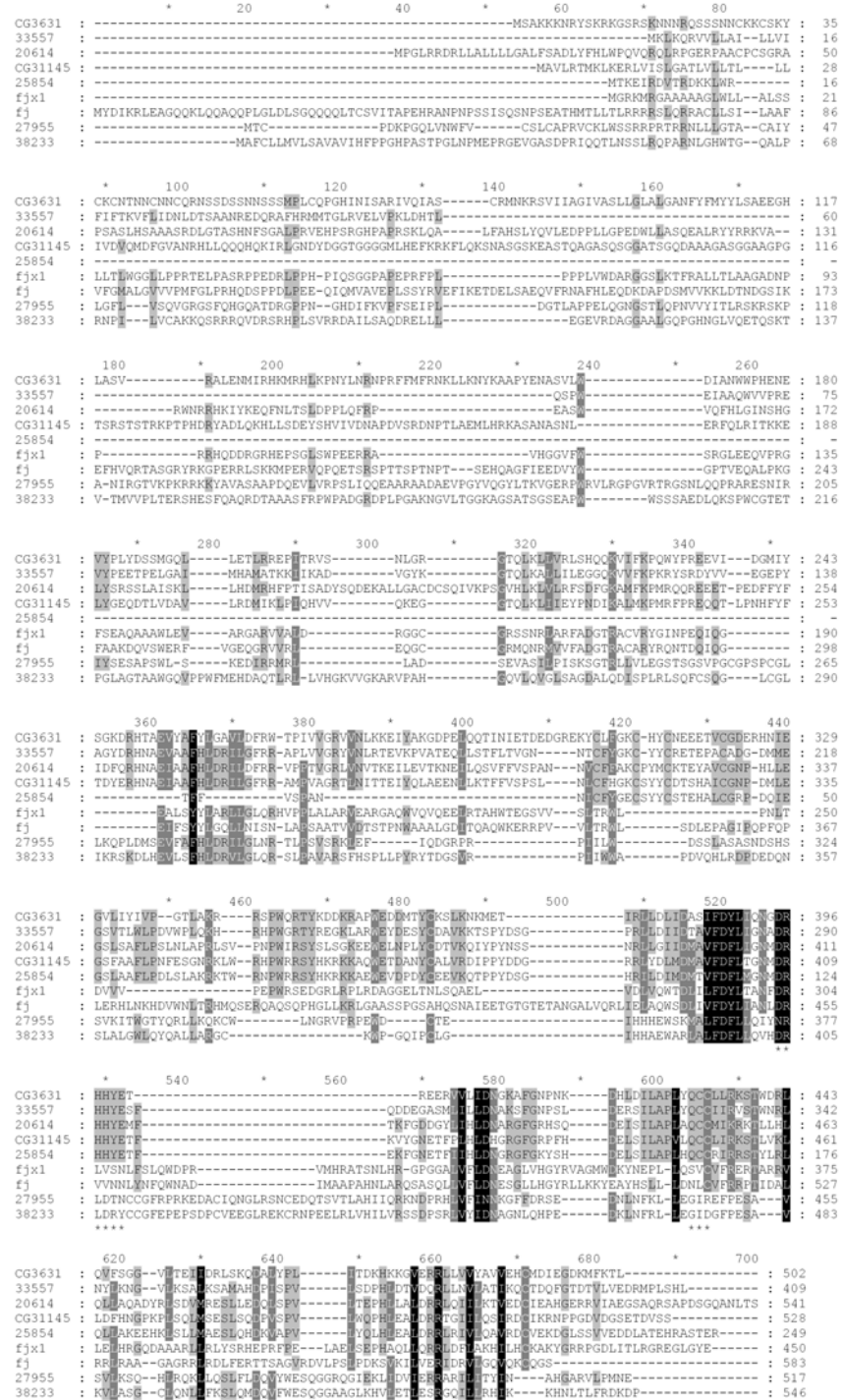


Abb. 29: Aminosäuresequenzvergleich zwischen Fjx1 und den Fjx1-ähnlichen Proteinen
 Mit Ausnahme einiger weniger stark konservierter Sequenzmotive enthalten die Proteine keine bekannten Proteindomänen. Die DUF1193-Domäne ist durch Sternchen unter der Sequenz gekennzeichnet. Besonders gut sind saure Reste, vor allem Aspartat (D), und Arginin-Reste (R) konserviert, was für eine enzymatische Funktion, wie beispielsweise bei Glykosyltransferasen, sprechen könnte.

4.11 Expression der *ffx1*-ähnlichen Gene

Um erste Hinweise über die Expression der *ffx1*-verwandten Gene zu erhalten, wurden zunächst die Datenbanken nach vorhandenen ESTs (Expressed Sequence Tags) bzw. nach Expressionsdaten von Micoarrays (high-density gene expression arrays) durchsucht. Dabei wurden vor allem die Datenbanken von TIGR (The Institute for Genomic Research) und GNF (The Genomics Institute of the Novartis Research Foundation) verwendet (Abb. 30). Das in der Datenbank beschriebene Expressionsmuster wurde dann mit dem Expressionsmuster aus RNA *in situ* Hybridisierungen verglichen. Die Hybridisierungen der fünf Mausgene erfolgte hierbei auf Schnitte verschiedener Embryonalstadien sowie auf Schnitte von adultem Gehirn, um eine mögliche funktionelle Verwandtschaft mit *ffx1* zu überprüfen (Abb. 31).

Laut Datenbank ist *20614* am stärksten in den Milchdrüsen exprimiert (mehr als das 10-fache des Medians), ist aber auch in Testis und Nabelschnur zu finden (Expression liegt über dem dreifachen Median). Bei der *in situ* Hybridisierung zeigte sich, dass das Gen embryonal nicht und im adulten Gehirn nur sehr schwach, hauptsächlich in den Purkinje-Zellen, exprimiert war.

Die Hauptexpression des Gens *25854* ist nach der GNF-Datenbank im Riechhirn und Milchdrüsen zu finden, aber auch im Uterus, in den Ovarien, in der Leber und im Riechepithel sowie in verschiedenen Bereichen des Gehirns, z.B. der Hypophyse, dem Hypothalamus, der Großhirnrinde und der Substantia nigra, ist eine deutliche Expression vorhanden. Bei der Hybridisierung des adulten Gehirns konnten die meisten in der Datenbank gefundenen Expressionsorte bestätigt werden. So war beispielsweise die Expression im Riechhirn am stärksten, hier vor allem in der Schicht der Glomeruli, der Mitralzellschicht und der Körnerschicht. Auch im Kortex und dem Hypothalamus so wie in den Purkinje-Zellen konnte *25854* nachgewiesen werden. Auch embryonal ist eine entsprechende Expression in den verschiedenen Teilen des Gehirns bereits vorhanden.

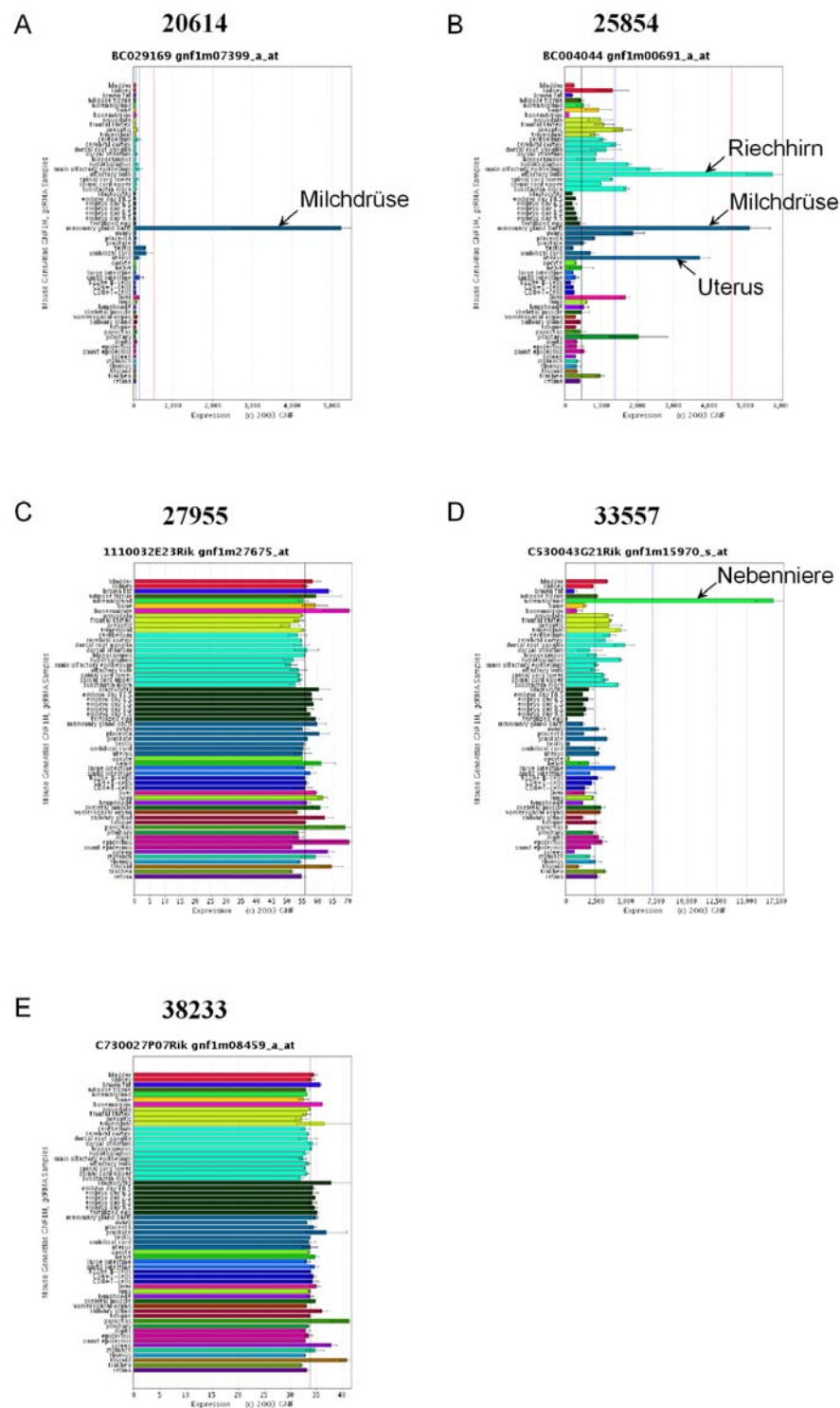


Abb. 30: Expression der *fxl*-verwandten Gene im Microarray (GNF-Datenbank)

Alle *fxl*-ähnlichen Gene zeigten auf dem Microarray Expression in einem oder mehreren Geweben. Die schwarze Linie markiert dabei den einfachen Median der Expression. Zu sehen ist, dass die Gene 27955 und 38233 ein gleich bleibendes Expressionslevel in allen Geweben besitzen. Die blaue Linie kennzeichnet den dreifachen Median, während die rote Linie den zehnfachen Median anzeigt. Deutlich erkennbar ist, dass das Gen 20614 fast ausschließlich in Milchdrüsen und 33557 hauptsächlich in der Nebenniere exprimiert ist. Im Gegensatz dazu ist 25854 in verschiedenen Geweben zu finden, jedoch mit deutlichen Unterschieden im Expressionslevel.

Das Gen 27955 ist laut GNF-Datenbank in keinem Gewebe spezifisch exprimiert, was auch in der *in situ* Hybridisierung zu beobachten war. Die Expression im adulten Gehirn war insgesamt sehr schwach und relativ homogen, mit Ausnahmen der Körnerschicht des Kleinhirns, wo keine Expression zu finden war. Embryonal war 27955 am stärksten im späteren Kortex exprimiert.

Die Expression von 33557 ist nach Angaben der GNF-Datenbank am stärksten in der Nebenniere. Bei der *in situ* Hybridisierung war embryonal kaum spezifische Expression sichtbar. Lediglich in der embryonalen Niere konnte 33557 verstärkt detektiert werden. Im adulten Gehirn zeigte sich eine eindeutige Färbung in den Purkinje-Zellen, in der Pyramidenzellschicht und der Körnerschicht des Hippocampus sowie in der Mitralzellschicht des Riechhirns. Eine schwache Expression war auch in der Großhirnrinde zu finden.

Das Gen 38233 zeigt wie 27955 laut GNF-Datenbank eine sehr homogene Expression in allen Geweben. In der *in situ* Hybridisierung war embryonal die Expression dementsprechend fast ubiquitär (keine Expression im Herzen), jedoch insgesamt sehr schwach. Im adulten Gehirn war 38233 besonders stark in der Markschicht des Kleinhirns sowie in der Pyramidenzellschicht und der Körnerschicht des Hippocampus exprimiert.

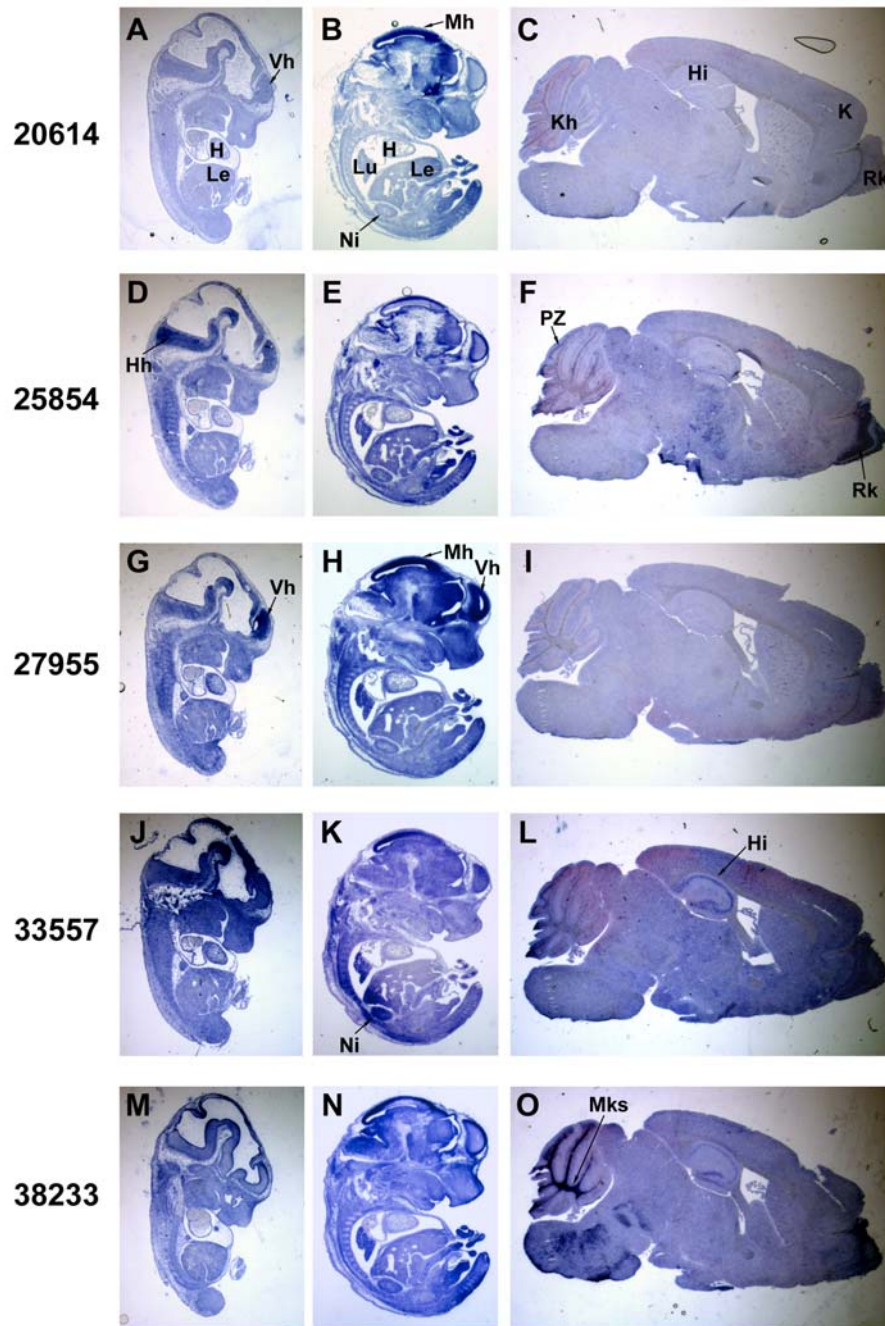


Abb. 31: Expression der *ffx1*-verwandten Gene (E 12,5; E 14,5 und adultes Gehirn)

Die Expression der *ffx1*-ähnlichen Gene war zum Teil in der *in situ* Hybridisierung nur sehr schwach oder unspezifisch. Vor allem das Gen *20614* war in den untersuchten Geweben kaum zu detektieren. Das Gen *25854* war deutlich in verschiedenen Teilen des embryonalen Gehirns wie auch im Riechkolben des adulten Gehirns sowie in den Purkinje-Zellen exprimiert. Das Gen *27955* war fast ausschließlich im embryonalen Vorderhirn zu finden. Das Gen *33557* war sowohl im embryonalen als auch im adulten Gehirn (im Hippocampus) und in embryonaler Niere exprimiert. Auch das Gen *38233* waren hauptsächlich im Gehirn, vor allem in der Markschrift des adulten Gehirns exprimiert. Abk.: H, Herz; Hh, Hinterhirn; Hi, Hippocampus; K, Kortex; Kh, Kleinhirn; Le, Leber; Lu, Lunge; Mh, Mittelhirn; Mks, Markschrift; Ni, Niere; PZ, Purkinje-Zellen; Rk, Riechkolben; Vh, Vorderhirn.

5 Diskussion

Viele der in *Drosophila* identifizierten Signalwege existieren auch in Vertebraten. Insbesondere Signalwege, die bei der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, blieben während der Evolution konserviert. Die Komplexität der Signalwege ist in Vertebraten jedoch oft deutlich höher, beispielsweise durch Genduplikation, was die exakte Aufklärung des Signalwegs häufig erschwert. Auch für den erst in jüngerer Zeit untersuchten planaren Zellpolaritätssignalweg, der in *Drosophila* einen maßgeblichen Einfluss auf die einheitliche Ausrichtung der Körper- und Flügelhärcchen sowie die ebenemäßige Rotation der Ommatidien hat, wurde ein entsprechender Signalweg bei Vertebraten gefunden. Dieser Signalweg ist am Vorgang der konvergierenden Ausdehnung und an der Orientierung der Haarzellen im Innenohr beteiligt.

Die Homologe dreier Gene, *four-jointed*, *fat* und *dachsous*, die in *Drosophila* Teil dieses Signalwegs sind, wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit in Vertebraten näher charakterisiert. Besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Charakterisierung von *ffx1* gelegt, dem Vertebratenhomologen von *four-jointed*.

Die Konservierung von *Four-jointed*

Das *ffx1*-Gen ist in Maus und Mensch schon seit längerem bekannt (Ashery-Padan et al., 1999; Thate et al., 1995). Durch die schnell wachsende Zahl ganz oder größtenteils abgeschlossener Genomprojekte war es im Verlauf dieser Arbeit möglich, auch in vielen anderen Spezies ein homologes Gen zu finden. Dabei fiel vor allem auf, dass *ffx1* fast ausschließlich in Vertebraten existierte und mit Ausnahme von *Drosophila* und *Anopheles* in keinem Nicht-Vertebraten zu finden war. Alle überprüften Vertebraten besaßen jeweils nur eine Kopie des Gens, d.h. es gab keine Hinweise auf eine eventuelle Genduplikation. Insgesamt zeigt dies deutlich, dass *ffx1* während der Evolution zwar konserviert, aber mit wenigen Ausnahmen nur in höher entwickelten Lebewesen (Wirbeltiere) erhalten wurde.

Im Unterschied zu *Drosophila* sind die von *ffx1* kodierten Proteine keine klassischen TypII-Transmembranproteine, sondern Proteine mit einem Signalpeptid bzw. Transmembranproteine mit einem sehr kurzen intrazellulären Bereich. Im Aminosäuresequenz-Vergleich zeigte sich, dass besonders der C-terminale Bereich der extrazellulären Domäne stark konserviert war, wohingegen sich der N-Terminus von Fjx1 auch innerhalb der Vertebratenproteine deutlich unterschied. Darüber hinaus wurde bereits früher gezeigt, dass Maus-Fjx1 zum größten Teil sezerniert und N-terminal proteolytisch prozessiert wird (Heinrich, 1999; Rock, 2000). Es ist daher anzunehmen, dass der C-Terminus der extrazellulären Domäne von Fjx1 für die Funktion des Proteins verantwortlich ist, obwohl dort mit einer SMART-Analyse keine Ähnlichkeit mit bekannten Proteindomänen gefunden wurde. Kürzlich wurde für *Drosophila*-Fj, das ebenfalls zumindest teilweise sezerniert wird, eine Funktion des Proteins im Golgi-Apparat vermutet (Strutt et al., 2004). Möglicherweise ist auch Fjx1 dort funktionell, da Fjx1 mit Immunfluoreszenzfärbungen im Golgi-Apparat

lokalisiert werden konnte, wenngleich es schwer abzuschätzen ist, welcher Anteil dem regulär notwendigen Transit exportierter Proteine entspricht.

Regulation der Expression von *four-jointed*

Die Expression von *ff* wird in *Drosophila* über ein komplexes Netz von Signalwegen reguliert. So wurde unter anderem gezeigt, dass die Expression von *ff* sowohl über den Notch-Signalweg als auch über den JAK/STAT-Weg positiv und über den Wnt-Signalweg negativ beeinflusst wird (Zeidler et al., 1999). Dass auch Maus-*ffx1* ein Zielgen des Notch-Signalwegs ist, wurde schon früher nachgewiesen (Rock, 2000). Ob eine Regulation von *ffx1* über den Wnt-Signalweg erfolgt, wurde in dieser Arbeit mit konstitutiv aktivem β -Catenin getestet. Hierbei war jedoch kein Einfluss auf die Expression von *ffx1* zu beobachten. Auch in *Drosophila* ist bislang nicht geklärt, ob die Expression von *ff* direkt über konstitutiv aktives Armadillo (das *Drosophila*-Homolog zu β -Catenin) oder nur indirekt über den Wg-Signalweg reguliert wird. Die Ergebnisse von *Drosophila* beruhen ausschließlich auf der Analyse von Mutanten bzw. Mosaikmutanten und nicht auf biochemischen Interaktionen. Es ist daher ebenfalls nicht genau bekannt, welcher Teil des Wg-Signalwegs (kanonisch, PCP oder Calcium) letztendlich für die Regulation von *ff* verantwortlich ist.

Durch die Transfektion mit konstitutiv aktivem β -Catenin wird nur die mögliche Regulation über den klassischen Wnt-Signalweg untersucht, nicht aber eine potentielle Beeinflussung der *ffx1*-Expression durch den PCP-Signalweg sowie den Calcium-abhängigen Wnt-Signalweg (Abb. 1). Eine Aktivierung von *ffx1* über die beiden letztgenannten Wege ist allerdings unwahrscheinlich, da beide Signalwege ausschließlich auf die Organisation des Aktin-Cytoskeletts wirken und nicht der Aktivierung von Genexpression dienen (Keller, 2002). Die Untersuchung der beiden nicht-klassischen Wnt-Signalwege ist überdies sehr schwierig, da beide Signalwege noch nicht vollständig aufgeklärt sind und daher eine gezielte Aktivierung zurzeit nicht möglich ist. Möglicherweise ist sogar *Fjx1* an der Aktivierung des PCP-Signalwegs beteiligt, wie aufgrund der Erkenntnisse über *Fj* in *Drosophila* vermutet werden kann. Eine Untersuchung der Expression von *ffx1* mit Hilfe von Contransfektionsexperimenten wäre daher nicht durchführbar.

Über den Mechanismus wie *ff* in *Drosophila* durch den JAK/STAT-Signalweg reguliert wird, ist ebenfalls wenig bekannt, obwohl es in *Drosophila* nur eine Janus Kinase (JAK) und ein STAT-Protein (Signal Transducer and Activator of Transcription) gibt. In Säugern dagegen existieren vier JAK (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2) und sieben STAT (1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6) Gene, so dass der Signalweg deutlich komplizierter ist. Je nach Aktivierung durch die verschiedenen JAK-Proteine, bilden die STAT-Proteine Homo- oder Heterodimere aus, die letztendlich die Expression von Zielgenen aktivieren können (Rawlings et al., 2004). Aufgrund der Komplexität des JAK/STAT-Signalwegs in Vertebraten ist es nicht möglich, mit einfachen Kontransfektionsexperimenten, die Regulation der *ffx1*-Expression durch diesen Signalweg zu überprüfen. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie, in der gezielt die Expression von STAT5 bzw. STAT1, 3 und 5 angeschaltet werden kann, zeigte keinen Effekt auf die Expression von *ffx1*. Im Zebrafisch wurde gezeigt, dass für STAT3 eine Verbindung

zum PCP-Wnt-Signalweg besteht (Miyagi et al., 2004). Da auch *ffx1* sehr wahrscheinlich Teil des PCP-Signalwegs ist, wäre am ehesten eine Regulation der *ffx1*-Expression über STAT3 zu erwarten, was sich jedoch nicht bestätigte. Insgesamt konnte also eine Regulation der Expression von *ffx1* in Analogie zu der in *Drosophila* gefundenen JAK/STAT-abhängigen Expression nicht gezeigt werden. Aufgrund der Komplexität des Signalwegs in Vertebraten kann diese aber auch nicht ausgeschlossen werden, zumal ohnehin nur die direkte Regulation der Expression von *ffx1* durch den JAK/STAT-Signalweg untersucht wurde. Eine indirekte Regulation von *ffx1* durch Gene, die primär vom JAK/STAT-Signalweg an- oder abgeschaltet werden, ist nur schwer zu überprüfen, da derzeit noch keine solchen Gene bekannt sind. Einschränkend sollte auch erwähnt werden, dass die Ergebnisse der JAK/STAT-Regulation von *ff* in *Drosophila* wie im Falle des Wnt-Signalwegs ausschließlich auf der Analyse von entsprechenden Mutanten und nicht auf biochemischen Interaktionsstudien beruhen.

Eine Untersuchung, ob weitere Signalwege an der Regulation von *fjx1* in Vertebraten konserviert sind, wie z.B. die Selbstregulation von *fjx1* unter Beteiligung von *Ds*- und *Ft*-Homologen oder eine Regulation via *Atrophin-1* (*Atro*-Homolog) oder *Scalloped*- und *Vestigial*-Homologe (*TEF-3* und/oder *TEF-1*, -5, -4; *Vgll2* und/oder *Vgll1*, *Vgll4*), könnte dazu beitragen, die Funktion von *Fjx1* besser zu verstehen. Jedoch sind diese Signalwege zurzeit nur sehr bruchstückhaft bekannt, was eine Überprüfung sehr schwierig macht (Cho and Irvine, 2004; Fanto et al., 2003).

Analyse der *Fjx1*-Knock-out-Mäuse

Da in *Drosophila* *Fj* als Teil des PCP-Signalwegs identifiziert wurde und in Vertebraten Homologe dieses Signalwegs an der Entwicklung des Innenohrs beteiligt sind, wurden von M. Kelly die Innenohren der *Fjx1*-Knock-out-Mäuse untersucht. Während bei Mäusen mit Mutationen in *vangl2* (*Drosophila* *van Gogh*) oder *celsr1* (*Drosophila* *flamingo*) die Haarzellen keine festgelegte Orientierung mehr besitzen (Curtin et al., 2003; Montcouquiol et al., 2003), war bei neugeborenen *Fjx1*-Knock-out-Mäusen zwar die Ausrichtung der Haarzellen völlig normal, jedoch war die Anzahl der äußeren Haarzellen an einigen Stellen erhöht. Eine solche Änderung in der Anzahl der Haarzellen ist typisch für Mutanten des Notch-Signalwegs (Hawkins and Lovett, 2004). So haben beispielsweise *Jagged2*-Knock-out-Mäuse eine erhöhte Anzahl an äußeren und inneren Haarzellen (Lanford et al., 1999), während Mäuse mit einer dominanten Missensmutation in *Jagged1* weniger äußere Haarzellen besitzen (Tsai et al., 2001). Diese Veränderung in den *Fjx1*-Knock-out-Mäusen legt die Vermutung nahe, dass *ffx1* Teil des Notch-Signalwegs ist, zum Beispiel über einen Rückkopplungsmechanismus via *Delta* oder *Jagged*. Bereits früher wurde gezeigt, dass die Expression von *ffx1* durch *Notch* reguliert wird (Rock, 2000).

Dass die Orientierung der Haarzellen unverändert ist, könnte verschiedene Ursachen haben und steht nicht im Widerspruch zu der Vermutung, dass *ffx1* ebenfalls ein Gen des PCP-Signalwegs ist. Auch in *Drosophila* zeigt *Fj* nur einen sehr milden Polaritätsphänotyp, da der Gradient von *Fj* mit dem gegenläufigen Gradienten von *Ds* zum Teil redundant ist (Simon, 2004). Zudem zeigen hauptsächlich die durch *Frizzled* aktivierten Gene starke

Polaritätsdefekte, während aufgrund des in *Drosophila* erstellten Modells Grund zur Annahme besteht, dass Fjx1 oberhalb von Frizzled im Signalweg agiert. Da in Zebrafisch und *Xenopus* der PCP-Signalweg durch die Liganden Wnt11 und Wnt 5a angeschaltet wird (Uemura and Shimada, 2003), ist möglicherweise die Aktivierung von Frizzled durch Fjx1 und Dchs1 in Vertebraten ein Alternativmechanismus, der zum Teil redundant mit der Wnt-Induktion ist.

Lokalisierung und Identifizierung der Fjx1-Bindungsstellen

Die Tatsache, dass Fjx1 sezerniert wird und Fj in *Drosophila* zum Teil nicht-zellautonome Effekte zeigt, gab Grund zu der Annahme, dass Fjx1 als Ligand für einen bislang noch nicht identifizierten Rezeptor fungiert. Mit Hilfe eines Fjx1-AP Fusionsproteins konnten spezifische Bindungsstellen in verschiedenen Organen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in ausgewachsenen Mäusen detektiert werden. Die Lokalisation dieser Bindungsstellen deckt sich in hohem Maße mit der durch *in situ* Hybridisierung gefundenen Expression von *ffx1*. In embryonalen Organen wie beispielsweise in der Niere, dem Innenohr oder der Lunge wurden sowohl Färbungen mit der *in situ* Probe als auch mit dem Fjx1-Protein gefunden. Teilweise gab es Überlappungen der Färbungen, wie z.B. in den Epithelien der Lunge und der Niere, teilweise wurden jedoch auch benachbarte Gewebe angefärbt. Im Innenohr beispielsweise war *ffx1* in den Ganglien exprimiert, während mit dem Fjx1-Fusionprotein Bindungsstellen in den peripheren Nerven detektiert wurden. Im adulten Gehirn waren die Expression von *ffx1* und die Lokalisation der Bindungsstellen auffallend komplementär. Zum Beispiel im Kleinhirn und im Hippocampus wurden jeweils benachbarte Zellschichten angefärbt (*ffx1* in der Neuronenschicht; Fjx1-Bindungsstellen im entsprechenden Faserteil). Diese Daten lassen vermuten, dass Fjx1 als Signal über kurze Strecken wirkt, z.B. auf benachbarte Zellen oder direkt angrenzendes Gewebe.

Die Identifikation des postulierten Fjx1-Rezeptors sollte aus adultem Mausgehirn erfolgen, da hier die Präsenz der Bindungsstellen für das Fjx1-AP Fusionsprotein besonders hoch war. Jedoch konnte weder durch Expressionsklonierung, noch durch Coimmunpräzipitation mit verschiedenen Fjx1-Konstrukten ein entsprechender Interaktionspartner isoliert werden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es natürlich prinzipiell möglich, dass Fjx1 nicht mit einem einzelnen Protein interagiert, sondern für die Bindung von Fjx1 an seinen postulierten Rezeptor verschiedenen Cofaktoren notwendig sind. Dies würde auch erklären, weshalb beim Expressionsscreening in Pools von nur wenigen Klonen keine Interaktion mit Fjx1 mehr nachgewiesen werden konnte, weil in diesen kleinen Pools (8-12 Klone) nicht mehr alle für die Bindung benötigten Proteine vorhanden waren. Der Verlust des positiven Klons in den ursprünglichen Pools könnte aber andererseits auch durch die Amplifikationsschritte zur Bildung der Subpools bedingt sein. Da für die DNA-Präparation die Klone für einige Stunden vermehrt wurden, könnte es sein, dass ein schlecht wachsender (positiver) Klon von anderen (negativen) Klonen überwachsen wurde und dadurch verloren ging.

Nach den neuesten Erkenntnissen über Fj in *Drosophila* kann eine Interaktion mit Dachshous und/oder Fat bzw. deren Homologen vermutet werden (Cho and Irvine, 2004). Da diese

Proteine extrem groß sind (ca. 5500 kD), könnte es sein, dass mit den verwendeten Methoden eine Isolation der Fjx1-Interaktionspartner nicht durchführbar war. Beispielsweise ist bei der Coimmunpräzipitation die Analyse so großer Proteine mit SDS-PAGE relativ problematisch. Möglicherweise hat Fjx1 wie auch Fj eine Funktion im Golgi-Apparat und interagiert dort am stärksten mit seinem Bindungspartner. Für die Identifikation des Fjx1-Interaktionspartners wurden jedoch Methoden zur Suche eines Zelloberflächenrezeptors verwendet, d.h. die Zellen wurden unter anderem nicht permeabilisiert, so dass nicht auszuschließen ist, dass aufgrund dessen die Identifikation des Fjx1-Bindungspartners nicht erfolgreich war.

In *Drosophila* wird vermutet, dass Fj hauptsächlich im Golgi-Apparat agiert und durch Modifikationen an Dachsous und/oder Fat die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen beeinflusst, ähnlich wie die Glykosyltransferase Fringe die Interaktion zwischen Delta und Notch verändert. Im Gegensatz zu Fringe konnte allerdings bei Fj noch keine enzymatische Aktivität gezeigt werden. Neben Fringe gibt es noch weitere Glykosyltransferasen, die zusätzlich zu ihrer Funktion im Golgi-Apparat sezerniert werden, was häufig mit einer proteolytischen Spaltung am N-Terminus gekoppelt ist. Die Struktur von Fjx1 sowie die N-terminale Prozessierung und die zumindest zeitweise Lokalisation im Golgi-Apparat deuten daher auf eine Verwandtschaft mit diesen Glykosyltransferasen hin. Einige der sezernierten Glykosyltransferasen können an die Zelloberfläche oder die Extrazelluläre Matrix binden und so Einfluss auf entsprechende Signalwege nehmen, wobei jedoch für die meisten dieser Glykosyltransferasen die Funktion der Proteine außerhalb des Golgi-Apparates noch nicht geklärt ist (Shur et al., 1998). Beispiele für sezernierte Glykosyltransferasen mit bekannter Funktion sind die β 1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase V, die neben der Glykosyltransferaseaktivität im Golgi-Apparat auch durch Bindung an der Zelloberfläche den FGF-Signalweg stimuliert (Saito et al., 2002), sowie die β 1,4-Galactosyltransferase, die durch extrazelluläre Bindung Zell-Zell-Adhäsion und Zellmigration beeinflusst (Hathaway, 2003).

Die Färbung mit dem Fjx1-AP-Fusionsprotein auf Mausgewebe lässt in Analogie dazu eine Funktion von Fjx1 in der Zell-Zell-Kommunikation vermuten, z.B. durch Bindung an Ft- oder Ds-Homologe, zusätzlich zu einer möglichen Rolle von Fjx1 im Golgi-Apparat. Es ist also durchaus möglich, dass es sich bei Fjx1 um eine sezernierte Glykosyltransferase handeln könnte.

Identifizierung und Expression der Dachsous- und Fat-Homologen in der Maus

Da Homologe zu Dachsous und Fat in der Maus noch nicht identifiziert wurden (Ausnahme Fat1), wurde in verschiedenen Datenbanken danach gesucht. Es zeigte sich, dass es in der Maus zwei Homologe von Ds, *Dchs1* und *Dchs2*, sowie vier Fat-Homologe gibt, wobei Fat-j vermutlich das direkte Homolog von Ft ist und Fat1-3 eher homolog zu Ftl sind. Ähnlich wie in *Drosophila* ist die Expression von *ffx1* und *dchs1* embryonal häufig komplementär. So findet man beispielsweise in der Lunge, der Niere und im Darm *ffx1* in epithelialen Strukturen, während *dchs1* im angrenzenden Mesenchym detektiert wurde. Embryonale Expression von *dchs2* war dagegen kaum nachweisbar. Im Gegensatz zu *Drosophila*, wo *ft* in

den Imaginalscheiben ubiquitär exprimiert ist, war *fat-j* nur räumlich begrenzt zu finden, nämlich wie *dchs1* im Mesenchym. Die Ftl-Homologen, insbesondere *fat1* und *fat3*, sind im Gegensatz dazu epithelial exprimiert. Geht man von einer Konservierung des in *Drosophila* gefundenen Signalwegs aus, ist anzunehmen, dass während der Evolution eine Umverteilung der Funktionen zwischen den Ft- und Ftl-Homologen stattgefunden hat. Eine solche Übertragung von Funktionen findet man häufig bei paralogenen Proteinen (Hurles, 2004). Die in *Drosophila* gefundene ubiquitäre Präsenz von Ft wird in Vertebraten also möglicherweise durch die Kombination verschiedener Fat-Proteine erreicht.

Die Expressionsmuster der Fat- und Ds-Homologen zeigen überdies große Übereinstimmungen mit den Expressionsmustern von anderen Genen des PCP-Signalwegs, wie z.B. den *flamingo*-Homologen *Celsr1-3* (Shima et al., 2002). Die Colokalisation der Fat-, Ds- und Fj-Homologen mit anderen Proteinen des PCP-Signalwegs spricht für eine Interaktion zwischen diesen Proteinen, was eine Konservierung des kompletten PCP-Signalwegs (einschließlich der Aktivierung durch Ds, Ft und Fj) sehr wahrscheinlich macht.

Identifikation und Expression der Fjx1-ähnlichen Proteinen

Um Hinweise auf die Funktion von Fjx1 zu erhalten, wurden verschiedene Datenbanken nach Proteinen mit ähnlicher Aminosäuresequenz durchsucht. Auf diese Weise wurden weitere fünf Maus- und zwei *Drosophila*-Proteine gefunden, deren Funktion jedoch ebenfalls noch nicht bekannt ist. Aufgrund der zumindest zeitweisen Lokalisation von Fjx1 im Golgi-Apparat und seiner entfernten strukturellen Ähnlichkeit zu Glykosyltransferasen (Proteinlänge, Transmembrandomäne mit sehr kurzem intrazellulären Teil, Prozessierung am N-Terminus) könnte es sich bei Fjx1 und dessen verwandten Proteinen, die durch Computerprogramme (http://ccb.imb.uq.edu.au/golgi/golgi_predictor.shtml) auch als Golgi-lokalisiert vorhergesagt werden, ebenfalls um Glykosyltransferasen handeln. Auch die große Anzahl an konservierten Arginin-Resten, die für die katalytische Aktivität von Glykosyltransferasen nötig sind (Kikuchi et al., 2003; Unligil and Rini, 2000), sprechen für eine vergleichbare Funktion von Fjx1 und den Fjx1-ähnlichen Proteinen. Bisher konnte jedoch keine Sequenzähnlichkeit mit Glykosyltransferasen irgendeiner bekannten Familie gefunden werden. Aber auch die bekannten Glykosyltransferasen weisen untereinander nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten auf. Das in Glykosyltransferasen häufig auftretende DXD-Motiv in der katalytischen Domäne kann durch Austausch der sauren Aminosäuren in einigen Familien auch zu DE, DXE oder EXD geändert sein (Kikuchi et al., 2003). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von Fj und Fjx1 in verschiedenen Spezies (Abb. 7), fällt auf, dass neben den bereits erwähnten Arginin-Resten besonders auch die Aspartat- und Glutamat-Reste sehr stark konserviert sind, was auf das Vorhandensein eines solchen Motivs hindeuten könnte. Da aufgrund der fehlenden Sequenzhomologien keine Rückschlüsse auf die Zucker-Donatoren und/oder -Akzeptoren gezogen werden können, wird ein biochemischer Nachweis der enzymatischen Funktion von Fjx1 bzw. den Fjx1-ähnlichen Proteinen äußerst schwierig. Für die Fjx1-ähnlichen Proteine ist nicht bekannt, welche Substrate durch diese potentiellen Enzyme modifiziert werden, da es sich bei allen Proteinen um bislang nicht untersuchte

(hypothetische) Proteine handelt. Im Falle von Fj/Fjx1, die am ehesten die Cadherine Ds und Ft bzw. deren Homologe modifizierten, wie aufgrund der Untersuchungen in *Drosophila* zu vermuten ist, wird die Analyse der Funktion durch die Größe der Cadherine (ca. 5000 AS) erschwert.

Insgesamt bleibt die Funktion von Fjx1 im PCP-Signalweg rätselhaft, wie auch der PCP-Signalweg im Allgemeinen noch nicht vollständig geklärt ist. Obwohl in *Drosophila* der Signalweg schon länger bekannt ist und deutlich mehr beteiligte Proteine identifiziert wurden als in Vertebraten, gibt es auch hier noch große Lücken, wie beispielsweise die Diskussion um das Vorhandensein des Faktors X zeigt, der für die Erklärung einiger Versuchsergebnisse in *Drosophila* benötigt wird (Kiefer, 2005). Im Gegensatz dazu wird der PCP-Signalweg in Vertebraten erst seit ca. fünf Jahren untersucht, wobei große Homologien zu *Drosophila* gefunden wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass auch die Beziehung zwischen Four-jointed, Dachsox und Fat konserviert sind, obwohl in Vertebraten über die Funktion dieser Proteine und deren Beteiligung am PCP-Signalweg noch nichts bekannt ist. Die vollständige Klärung des für die Entwicklung von Vertebraten wichtigen Signalwegs wird auch zukünftig von großem Interesse sein, zumal immer neue Vorgänge (z.B. Zellmotilität und Metastasen-Bildung) entdeckt werden, bei denen der PCP-Signalweg eine Rolle spielt.

6 Literaturverzeichnis

Altschmied, J. and Duschl, J. (1997). Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* **23**, 436-8.

Ashery-Padan, R., Alvarez-Bolado, G., Klamt, B., Gessler, M. and Gruss, P. (1999). Fjx1, the murine homologue of the Drosophila four-jointed gene, codes for a putative secreted protein expressed in restricted domains of the developing and adult brain. *Mech Dev* **80**, 213-7.

Ausubel, F. M. (1988). Current protocols in molecular biology. New York: Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.

Axelrod, J. D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. and Perrimon, N. (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science* **271**, 1826-32.

Brody, J. R. and Kern, S. E. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* **36**, 214-6.

Buckles, G. R., Rauskolb, C., Villano, J. L. and Katz, F. N. (2001). Four-jointed interacts with dachs, abelson and enabled and feeds back onto the Notch pathway to affect growth and segmentation in the Drosophila leg. *Development* **128**, 3533-42.

Castillejo-Lopez, C., Arias, W. M. and Baumgartner, S. (2004). The fat-like gene of Drosophila is the true orthologue of vertebrate fat cadherins and is involved in the formation of tubular organs. *J Biol Chem* **279**, 24034-43.

Cho, E. and Irvine, K. D. (2004). Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development* **131**, 4489-500.

Ciani, L., Patel, A., Allen, N. D. and ffrench-Constant, C. (2003). Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol* **23**, 3575-82.

Copp, A. J., Greene, N. D. and Murdoch, J. N. (2003). Dishevelled: linking convergent extension with neural tube closure. *Trends Neurosci* **26**, 453-5.

Cox, B., Hadjantonakis, A. K., Collins, J. E. and Magee, A. I. (2000). Cloning and expression throughout mouse development of mfat1, a homologue of the Drosophila tumour suppressor gene fat. *Dev Dyn* **217**, 233-40.

Curtin, J. A., Quint, E., Tsipouri, V., Arkell, R. M., Cattnach, B., Copp, A. J., Henderson, D. J., Spurr, N., Stanier, P., Fisher, E. M. et al. (2003). Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* **13**, 1129-33.

Das, G., Reynolds-Kenneally, J. and Mlodzik, M. (2002). The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the Drosophila eye. *Dev Cell* **2**, 655-66.

Dunne, J., Hanby, A. M., Poulson, R., Jones, T. A., Sheer, D., Chin, W. G., Da, S. M., Zhao, Q., Beverley, P. C. and Owen, M. J. (1995). Molecular cloning and tissue expression of FAT,

the human homologue of the *Drosophila* fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics* 30, 207-23.

Fanto, M., Clayton, L., Meredith, J., Hardiman, K., Charroux, B., Kerridge, S. and McNeill, H. (2003). The tumor-suppressor and cell adhesion molecule Fat controls planar polarity via physical interactions with Atrophin, a transcriptional co-repressor. *Development* 130, 763-74.

Fanto, M. and Mlodzik, M. (1999). Asymmetric Notch activation specifies photoreceptors R3 and R4 and planar polarity in the *Drosophila* eye. *Nature* 397, 523-6.

Flanagan, J. G. and Cheng, H. J. (2000). Alkaline phosphatase fusion proteins for molecular characterization and cloning of receptors and their ligands. *Methods Enzymol* 327, 198-210.

Flanagan, J. G., Cheng, H. J., Feldheim, D. A., Hattori, M., Lu, Q. and Vanderhaeghen, P. (2000). Alkaline phosphatase fusions of ligands or receptors as in situ probes for staining of cells, tissues, and embryos. *Methods Enzymol* 327, 19-35.

Garoia, F., Guerra, D., Pezzoli, M. C., Lopez-Varea, A., Cavicchi, S. and Garcia-Bellido, A. (2000). Cell behaviour of *Drosophila* fat cadherin mutations in wing development. *Mech Dev* 94, 95-109.

Go, M. J., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* 125, 2031-40.

Harris, M. J. and Juriloff, D. M. (1999). Mini-review: toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice. *Teratology* 60, 292-305.

Hathaway, H. J. (2003). Cell surface beta1,4-galactosyltransferase function in mammary gland morphogenesis: insights from transgenic and knockout mouse models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 421-33.

Hawkins, R. D. and Lovett, M. (2004). The developmental genetics of auditory hair cells. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 2, R289-96.

Heinrich, A. (1999). Charakterisierung des Vertebraten-Homolog des "four-jointed"-Gens aus *Drosophila melanogaster*. In *Physiological Chemistry I*, (ed. Wuerzburg: University of Wuerzburg).

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-90.

Hong, J. C., Ivanov, N. V., Hodor, P., Xia, M., Wei, N., Blevins, R., Gerhold, D., Borodovsky, M. and Liu, Y. (2004). Identification of new human cadherin genes using a combination of protein motif search and gene finding methods. *J Mol Biol* 337, 307-17.

Hurles, M. (2004). Gene duplication: the genomic trade in spare parts. *PLoS Biol* 2, E206.

Juriloff, D. M. and Harris, M. J. (2000). Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 9, 993-1000.

Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298, 1950-4.

Kelley, M. W. (2003). Cell adhesion molecules during inner ear and hair cell development, including notch and its ligands. *Curr Top Dev Biol* 57, 321-56.

- Kiefer, J. C.** (2005). Planar cell polarity: Heading in the right direction. *Dev Dyn*.
- Kiernan, A. E., Ahituv, N., Fuchs, H., Balling, R., Avraham, K. B., Steel, K. P. and Hrabe de Angelis, M.** (2001). The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3873-8.
- Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Gotoh, M. and Narimatsu, H.** (2003). Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 574-9.
- Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.
- Lanford, P. J., Lan, Y., Jiang, R., Lindsell, C., Weinmaster, G., Gridley, T. and Kelley, M. W.** (1999). Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* **21**, 289-92.
- Lawrence, P. A., Casal, J. and Struhl, G.** (2002). Towards a model of the organisation of planar polarity and pattern in the Drosophila abdomen. *Development* **129**, 2749-60.
- Maier, M. M. and Gessler, M.** (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 652-60.
- Matakatsu, H. and Blair, S. S.** (2004). Interactions between Fat and Dachshaus and the regulation of planar cell polarity in the Drosophila wing. *Development*.
- Matsuyoshi, N. and Imamura, S.** (1997). Multiple cadherins are expressed in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 355-8.
- Mitsui, K., Nakajima, D., Ohara, O. and Nakayama, M.** (2002). Mammalian fat3: a large protein that contains multiple cadherin and EGF-like motifs. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 1260-6.
- Miyagi, C., Yamashita, S., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Matsuda, M. and Hirano, T.** (2004). STAT3 noncell-autonomously controls planar cell polarity during zebrafish convergence and extension. *J Cell Biol* **166**, 975-81.
- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Kelley, M. W. (2003). Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* **423**, 173-7.
- Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M. and Perrimon, N.** (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644-6.
- Morcinek, J. C., Weisser, C., Geissinger, E., Scharl, M. and Wellbrock, C.** (2002). Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene* **21**, 1668-78.
- Nakajima, D., Nakayama, M., Kikuno, R., Hirosawa, M., Nagase, T. and Ohara, O.** (2001). Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs. *Brain Res Mol Brain Res* **94**, 85-95.
- Nakayama, M., Nakajima, D., Yoshimura, R., Endo, Y. and Ohara, O.** (2002). MEGF1/fat2 proteins containing extraordinarily large extracellular domains are localized to thin parallel fibers of cerebellar granule cells. *Mol Cell Neurosci* **20**, 563-78.

- Ponassi, M., Jacques, T. S., Ciani, L. and French Constant, C.** (1999). Expression of the rat homologue of the Drosophila fat tumour suppressor gene. *Mech Dev* **80**, 207-12.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-29.
- Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1999). Notch-mediated segmentation and growth control of the Drosophila leg. *Dev Biol* **210**, 339-50.
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M. and Harrison, D. A.** (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* **117**, 1281-3.
- Rawls, A. S. and Wolff, T.** (2003). Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the Drosophila eye. *Development* **130**, 1877-87.
- Rock, R.** (2000). Funktionsanalyse des "four-jointed x1"-Gens - eines Vertebraten-Homologs des Drosophila-Gens "four-jointed". In *Physiological Chemistry I*, (ed. Wuerzburg: University of Wuerzburg).
- Rodriguez, I.** (2004). The dachsous gene, a member of the cadherin family, is required for Wg-dependent pattern formation in the Drosophila wing disc. *Development* **131**, 3195-206.
- Rupp, R. A., Snider, L. and Weintraub, H.** (1994). Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* **8**, 1311-23.
- Saito, T., Miyoshi, E., Sasai, K., Nakano, N., Eguchi, H., Honke, K. and Taniguchi, N.** (2002). A secreted type of beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation: a novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferase activity. *J Biol Chem* **277**, 17002-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schweisguth, F.** (2004). [Genetic basis of planar polarity]. *Med Sci (Paris)* **20**, 424-30.
- Shima, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Chisaka, O., Takeichi, M. and Uemura, T.** (2002). Differential expression of the seven-pass transmembrane cadherin genes Celsr1-3 and distribution of the Celsr2 protein during mouse development. *Dev Dyn* **223**, 321-32.
- Shur, B. D., Evans, S. and Lu, Q.** (1998). Cell surface galactosyltransferase: current issues. *Glycoconj J* **15**, 537-48.
- Simon, M. A.** (2004). Planar cell polarity in the Drosophila eye is directed by graded Four-jointed and Dachsous expression. *Development* **131**, 6175-84.
- Strutt, D.** (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. *Development* **130**, 4501-13.
- Strutt, D., Johnson, R., Cooper, K. and Bray, S.** (2002). Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the Drosophila eye. *Curr Biol* **12**, 813-24.
- Strutt, H., Mundy, J., Hofstra, K. and Strutt, D.** (2004). Cleavage and secretion is not required for Four-jointed function in Drosophila patterning. *Development* **131**, 881-90.

- Strutt, H. and Strutt, D.** (2002). Nonautonomous planar polarity patterning in *Drosophila*: dishevelled-independent functions of frizzled. *Dev Cell* **3**, 851-63.
- Tanoue, T. and Takeichi, M.** (2004). Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *J Cell Biol* **165**, 517-28.
- Thate, C., Pongratz, J., Konig, A., Klamt, B., Tsaoussidou, S., Higgins, M., Shows, T., Jones, C. and Gessler, M.** (1995). CpG island clones for chromosome 11p--a resource for mapping and gene identification. *Mamm Genome* **6**, 421-5.
- Tokunaga, C. and Gerhart, J. C.** (1976). The effect of growth and joint formation on bristle pattern in *D. melanogaster*. *J Exp Zool* **198**, 79-95.
- Tomlinson, A. and Struhl, G.** (1999). Decoding vectorial information from a gradient: sequential roles of the receptors Frizzled and Notch in establishing planar polarity in the *Drosophila* eye. *Development* **126**, 5725-38.
- Torban, E., Kor, C. and Gros, P.** (2004). Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet* **20**, 570-7.
- Tsai, H., Hardisty, R. E., Rhodes, C., Kiernan, A. E., Roby, P., Tymowska-Lalanne, Z., Mburu, P., Rastan, S., Hunter, A. J., Brown, S. D. et al. (2001). The mouse slalom mutant demonstrates a role for Jagged1 in neuroepithelial patterning in the organ of Corti. *Hum Mol Genet* **10**, 507-12.
- Uemura, T. and Shimada, Y.** (2003). Breaking Cellular Symmetry along Planar Axes in *Drosophila* and Vertebrates. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 625-30.
- Unligil, U. M. and Rini, J. M.** (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 510-7.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D. and Moon, R. T.** (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5**, 367-77.
- Villano, J. L. and Katz, F. N.** (1995). four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in *Drosophila*. *Development* **121**, 2767-77.
- Wang, H. Y. and Malbon, C. C.** (2003). Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* **300**, 1529-30.
- Yang, C. H., Axelrod, J. D. and Simon, M. A.** (2002). Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the *Drosophila* compound eye. *Cell* **108**, 675-88.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D. and Moon, R. T.** (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10**, 1443-54.
- Zeidler, M. P., Perrimon, N. and Strutt, D. I.** (1999). The four-jointed gene is required in the *Drosophila* eye for ommatidial polarity specification. *Curr Biol* **9**, 1363-72.

Anhang

Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen

Publikationen

Rock, R., Schrauth, S., Gessler, M. (2005) Expression of mouse *dchs1*, *fjx1* and *fat-j* suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in Drosophila. Dev. Dyn. (in press).

Rock, R., Heinrich, A., Schumacher, N., Gessler, M. (2005) Fjx1: a Notch-inducible secreted ligand with specific binding sites in developing mouse embryos and adult brain. Dev. Dyn. (in revision)

Mees, A., Rock, R., Ciccarelli, F.D., Leberfinger, C.B., Borawski, J.M., Bork, P., Gessler, M., Kerkhoff, E. (2005) Very-KIND is a novel nervous system specific guanine nucleotide exchange factor for Ras GTPases. MODGEP (in press)

Posterbeiträge

14. Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (2001, Ulm)

International Symposium of the SFB 487 Molecular Physiology of the Synapse (2001, Würzburg)

DGZ (Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie)/GfE (Gesellschaft für Entwicklungsbiologie) - Jahrestagung (2003, Bonn)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rebecca Elisabeth Rock
Geburtstag: 28.09.1974
Geburtsort: Neustadt/Weinstraße
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981-1985 Grundschule Schillerschule Hassloch
1985-1994 Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium Neustadt/Weinstraße
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/1994-08/1996 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/1996 Diplomvorprüfung
10/1996-07/1999 Studium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
07/1997 Diplomprüfung
08/1999-05/2000 Diplomarbeit „Funktionsanalyse des *four-jointed x1*-Gens - eines Vertebraten-Homologs des Drosophila-Gens *four-jointed*“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg
seit 06/2000 Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Charakterisierung des Vertebraten-Gens *four-jointed x1* (*fx1*) und Analyse des planaren Zellpolaritätssignalwegs (PCP-Signalweg)“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Charakterisierung des Vertebraten-Gens *four-jointed x1 (fjx1)* und Analyse des planaren Zellpolaritätssignalwegs (PCP-Signalweg)“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Unterschrift
(Rebecca Rock)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit, die in der Zeit von Juni 2000 bis Juni 2005 am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Manfred Gessler angefertigt wurde, wäre ohne die Hilfe und Unterstützung von anderen nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund möchte ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Weise beigetragen haben, herzlich danke sagen. Ganz besonders danken möchte ich:

- Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse am Verlauf dieser Arbeit und seine freundliche Unterstützung durch hilfreiche Ratschläge bei allen auftretenden Problemen.
- Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt für die bereitwillige Übernahme des Gutachtens für die Fakultät Chemie und Pharmazie.
- der gesamten Arbeitsgruppe Gessler für das tolle Arbeitsklima, besonders
 - Conni, die bei allen Problemen im Labor immer ein offenes Ohr und viel Zeit für hilfreiche Diskussionen hatte.
 - Nina und Sabrina für die *in situ* Hybridisierungen.
 - Anja und Barbara für die Sequenzierungen.
 - Anja und Sabrina für alle geohrmarkten und genotypisierten Mäuse.
 - allen Kaffeetrinkern (Anja, Holger, Nina und Tine) für jede Tasse Kaffee, die ich nicht selber kochen musste (schmeckte fast immer besser).
 - der „Laborbesatzung“ in 215 (Christian, Conni, Steffi und Tine), dafür dass wir fast nie „organisatorische“ Probleme hatten.
 - den Notebook-Stammplatzinhabern im Denkraum (Holger und Steffi) für die netten und witzigen Diskussionen in den Laborpäuschen.
 - Steffi, die durch gemeinsame sportliche Aktivitäten für den nötigen Ausgleich zur Laborarbeit sorgte (Danke für die Ausdauer beim Überreden).
- meiner Oma für ihre Anteilnahme am Verlauf meines Studiums und die finanziellen Zuschüsse.
- nicht zuletzt meinen Eltern, die mir so selbstverständlich diese Ausbildung überhaupt ermöglichten und mich jederzeit und vorbehaltlos unterstützen.