

**Untersuchungen zur Regulation des Epithel-Mesenchym-  
Übergangs (EMT) während der Mesoderm-Morphogenese  
von *Drosophila melanogaster***

Inaugural Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Sirin Otte  
aus Damaskus/Syrien

November 2007

**Aus dem Institut für Genetik  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Referent : PD Dr. H. Arno J. Müller**

**Koreferent: Prof. Dr. Rüdiger Simon**

**Tag der mündl. Prüfung: 14.12.2007**

Für meine Eltern  
und Andreas

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Epithel-Mesenchym-Übergang (EMT)</b>	<b>2</b>
1.1.1	Was versteht man unter EMT?	2
1.1.2	EMT-Grundlegende Forschung in der Tumorbilogie	2
1.1.3	Organisation des Epithelgewebes	3
1.1.3.1	Zelladhäsion im Epithel	3
1.1.3.2	Zellpolarität	6
<b>1.2</b>	<b>Embryogenese und Tumorprogression</b>	<b>9</b>
1.2.1	Regulatorische Netzwerke der EMT	9
1.2.2	EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese in der Maus	13
<b>1.3</b>	<b>Mesoderm-Morphogenese von <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>15</b>
1.3.1	Phase 1: Invagination	15
1.3.2	Phase 2: Epithel-Mesenchym-Übergang	16
1.3.3	Phase 3: Migration	17
<b>1.4</b>	<b>FGF-vermittelte Zellwanderungsprozesse während der Embryogenese</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Sonstige Materialien	21
<b>2.2</b>	<b>Gentechnische Methoden</b>	<b>22</b>
2.2.1	Fliegenzucht	22
2.2.2	Das Gal4/UAS-System	23
2.2.3	EP-vermittelter Überexpressionsscreen in <i>Drosophila</i>	25
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
2.3.1	Kultivierung von Bakterien	27
2.3.1.1	Bakterienstämme	27
2.3.1.2	Vektoren	27
2.3.2	Transformation hitzekompetenter Bakterien	28
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	29
2.3.3.1	Plasmid-"Midi"-Präparation	29
2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.3.5.1	Standard-PCR	31
2.3.5.2	Oligonukleotide	31
2.3.6	Gelelektrophorese	32
2.3.7	Restriktionsverdau	32
2.3.8	Reinigung von PCR-Produkten	33
2.3.9	DNA Analyse	33
2.3.10	Detektion von RNA	33
2.3.10.1	Erstellung von RNA-Sonden	33
2.3.10.2	Markierung der anti-sense RNA-Sonde	33
2.3.10.3	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	34
<b>2.4</b>	<b>Histologische Methoden</b>	<b>35</b>
2.4.1	Fixierung von Embryonen	35
2.4.1.1	Formaldehydfixierung	35
2.4.1.1.1	Schnelle und effiziente Massenfixierung von Embryonen	35
2.4.1.1.2	Fixierung von Embryonen für die Elektronenmikroskopie	36
2.4.1.1.2.1	Glutaraldehydfixierung	36
2.4.1.1.2.2	X-Gal-Färbung	37
2.4.1.1.2.3	Nachfixierung mit Osmium	37
2.4.2	Antikörperfärbungen an Embryonen	38
2.4.2.1	Immunfluoreszenz	38
2.4.2.2	Immunmarkierung mit Enzym-gekoppelten Antikörpern	39
2.4.2.2.1	HRP-(Peroxidase) Färbung mit Verstärkersystem	39
2.4.2.2.2	AP (alkalische Phosphatase) Färbung	40

2.4.2.3	Verwendete Antikörper .....	40
2.4.3	Dauerpräparate von Embryonen.....	41
2.4.3.1	Einbettung in Araldit .....	41
2.4.3.2	Querschnitte von Embryonen .....	42
2.4.3.2.1	Semi-Dünnschnitte für die Photolichtmikroskopie.....	42
2.4.3.2.2	Ultra-Dünnschnitte für die Elektronenmikroskopie .....	42
2.4.4	In situ-Hybridisierung .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Eine Rolle des FGF-Signalweges im Epithel-Mesenchym Übergang (EMT) in der Mesoderm-Morphogenese .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Mesodermspezifische Funktion von Htl.....	44
3.1.2	Das mitotische Programm ist für die korrekte Abfolge der frühen Mesoderm-Morphogenese entbehrlich.....	46
3.1.3	Redundante Regulation der EMT durch Htl und Stg.....	49
3.1.4	Funktion von Htl während des EMTs .....	51
3.1.5	Expression von <i>snail</i> Transkripten in <i>htl</i> homozygoten Embryonen während der frühen Mesoderm-Morphogenese .....	53
3.1.6	Htl und Mitosen sind für die Regulation der ZA erforderlich.....	56
3.1.7	Die Funktion von Htl in Bezug auf die epitheliale Zellpolarität in der Mesoderm-Morphogenese .....	64
<b>3.2</b>	<b>Funktionsanalyse über die Beteiligung des RHO-GEF Pebble während des EMTs in der frühen Embryogenese .....</b>	<b>67</b>
3.2.1	Mesodermspezifische Funktion von Pbl.....	67
3.2.2	Funktion von Pbl während des EMTs.....	69
3.2.3	Pbl ist für die Herunterregulierung epithelialer Zell-Zellkontakte nicht erforderlich .....	70
<b>3.3</b>	<b>Misexpressions-Screen zur Identifizierung neuer Gene die eine Rolle in der Mesoderm-Morphogenese spielen .....</b>	<b>74</b>
3.3.1	Fehlexpression von EP(2)627 .....	77
3.3.2	Fehlexpression von EP(2)2374 .....	79
3.3.3	Fehlexpression von EP(2)2607 .....	80
3.3.4	Fehlexpression von EP(2)2028.....	81
3.3.5	Zusammenfassung des Misexpressionsscreen.....	83
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
<b>4.1</b>	<b>EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese.....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Die Funktion der FGF-Signalkaskade während des EMTs .....	85
4.1.2	Htl und Stg sind für den Verlust epithelialen Zellcharakters während der EMT erforderlich .....	86
<b>4.2</b>	<b>Weitere potentielle Faktoren, die EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese regulieren .....</b>	<b>90</b>
4.2.1	Die Funktion von Pbl in Hinblick auf den Htl-Signalweg während der EMT... ..	90
4.2.2	Misexpressions-Screen zur Identifizierung neuer Gene, die die frühe Mesoderm-Morphogenese in <i>Drosophila</i> regulieren.....	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Summary .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>104</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>107</b>

# 1. Einleitung

Schon seit vielen Jahrzehnten setzen sich Entwicklungsbiologen mit dem Thema auseinander, wie aus einer einzelnen Zelle ein komplexes und vielzelliges Lebewesen entsteht. Der Fokus dieser Fragestellung ist darauf gerichtet, wie aus einer befruchteten, radialsymmetrischen Eizelle innerhalb eines schnellen Frühentwicklungsprozesses ein Embryo entsteht, der eine anteriore (lat. vordere) und eine posteriore (lat. hintere) Polarität (Kopf- und Hinterleib), eine Dorsal- und Ventralseite (Rücken und Bauch), sowie eine linke und rechte Körperseite aufweist. Durch die rasante Entwicklung der Genetik und Molekularbiologie der letzten drei Jahrzehnte, konnte gezeigt werden, dass der Bauplan jedes Lebewesens in den Genen festgelegt ist. Aufgrund dieser Erkenntnis ergab sich eine erweiterte Fragestellung, die sich darauf konzentriert, welche Gene in der Festlegung des Körperaufbaus involviert sind und wie diese verschiedenen Entwicklungsprozesse gesteuert werden. Höhere Organismen besitzen vermutlich 15 bis  $50 \times 10^3$  Gene, deren Aktivität von hierarchisch untereinander verschalteten Kontrollgenen gesteuert und koordiniert werden muss. Obwohl die genetische Information innerhalb einer Zelle abgelesen wird, tauschen Zellen auch Genprodukte untereinander aus, um einen Organismus aufzubauen. Hierbei reagieren die Zellen auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen mit der Aktivierung stimuluspezifischer, zellulärer Programme, wie Proliferation, Differenzierung, Zellmigration, Zelladhäsion und Apoptose. Unter den aufgezählten Prozessen zählt die Zellbeweglichkeit mit zu den wichtigsten zellulären Eigenschaften, für die die Zellen allerdings bestimmte Bedingungen erfüllen müssen. Zunächst müssen sich die Zellen aus dem umliegenden Gewebe, z.B. aus einem epithelialen Gewebeverband, lösen, wobei sie ihre Polarität und die adhäsiven Wechselwirkungen zu ihren Nachbarzellen aufgeben. Dieser Vorgang wird als Epithel-Mesenchym-Übergang (engl.: **Epithelial-Mesenchymal-Transition**; Abk. im Folgenden: EMT) bezeichnet. Der mesenchymale Zustand ermöglicht es den Zellen zu wandern. Dieser Prozess muss während der Entwicklung präzise reguliert sein, um die Differenzierung zu Zellen und Geweben bestimmter Funktion zu ermöglichen. Welche Bedeutung der zeitlichen und räumlichen Regulation der EMT im Organismus zukommt, wurde in Krebszellstudien

erkannt. Daher ist es wichtig zu verstehen, welche Signale die EMT initiieren und wie diese koordiniert werden.

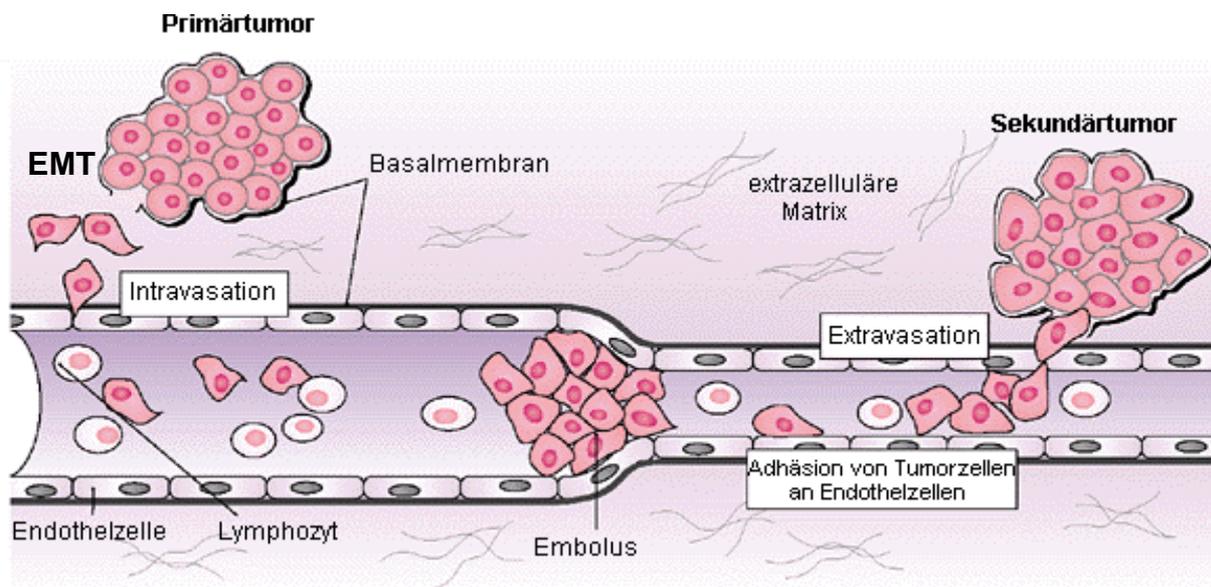
## **1.1 Epithel-Mesenchym-Übergang (EMT)**

### **1.1.1 Was versteht man unter EMT?**

Epitheliale Zellen sind über verschiedene Zellkontakte miteinander verbunden und weisen eine apikal-basale Zellpolarität auf (Knust und Bossinger, 2002). Während der Embryonalentwicklung können Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, indem sie ihre Zellkontakte auflösen und Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin herunterregulieren (siehe Kapitel 1.1.3.1). Dadurch wird ein mesenchymaler Zustand erreicht, der es den Zellen ermöglicht, zu wandern. Sowohl der Epithel-Mesenchym-Übergang, als auch der umgekehrte Vorgang, bei dem sich die mesenchymalen Zellen wieder in einem Zellverband integrieren, sind wichtige Prozesse für die normale Entwicklung eines Organismus (Montell, 2003).

### **1.1.2 EMT- Grundlegende Forschung in der Tumorbiologie**

Nicht nur bei der Morphogenese, sondern auch bei der Metastasierung von Tumoren kommt es zu einem dem EMT ähnlichen Phänotypwechsel, bei dem die Tumorzellen ihre zellspezifischen Eigenschaften verändern oder verlieren und damit die Fähigkeit zur Migration erlangen. Bösartige Zellen solider Tumoren können unter Umständen anatomische Grenzen überschreiten, sie wachsen "invasiv" in das umgebende Gewebe ein oder bilden Tochtergeschwülste, die Metastasen. Metastasierung ist ein spezielles Phänomen bei Krebserkrankungen. Es bedeutet, dass sich Zellen des Primärtumors aus ihrem Zellverband lösen und in umliegendes Gewebe migrieren. Dadurch können Tumorzellen über den Blut- und Lymphstrom verbreitet werden, wodurch sie in entferntere Organe gelangen, sich dort ansiedeln und teilen können. Es entstehen Organmetastasen, die als Tochtergeschwülste (Sekundärtumor) des ursprünglichen Tumors weiter metastasieren können (Abb. 1; Krebsinformationsdienst (KID), Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 2001).



**Abbildung 1: Metastasierung:** Einige Zellen des Primärtumors erlangen die Fähigkeit, sich aus ihrem Zellverband zu lösen (EMT) und durchdringen die extrazelluläre Matrix und die Endothelschicht eines Blut- oder Lymphgefäßes (Intravasation). Diese Tumorzellen können dann aggregieren und sich in Kapillaren als Emboli festsetzen. Von dort beginnen die Extravasation und das Einwandern in das Sekundärgewebe. Der Sekundärtumor, die Metastase, entwickelt sich nach Stimulus durch Wachstumsfaktoren und Vaskularisation (Roche, Lexikon Medizin, 1999)

EMT ist somit eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung, weil dadurch die Tumorzellen die Fähigkeit erhalten, zu wandern und sich auf andere Organe auszubreiten. Solange eine Krebserkrankung örtlich begrenzt bleibt, sind die Heilungschancen besser, als nach der Ausbreitung des Tumors auf mehrere Organe des Körpers (Eckart, W. U., 2000). Aus diesen Gründen ist es von großer wissenschaftlicher und medizinischer Bedeutung, die Genetik und Biochemie der EMT zu analysieren, um so der Ausbreitung bösartiger Tumore in Zukunft entgegenwirken zu können.

### 1.1.3 Organisation des Epithelgewebes

#### 1.1.3.1 Zelladhäsion im Epithel

Epitheliale Zellverbände grenzen eine Vielzahl von Geweben gegen die äußere Umgebung ab und bilden die Grenzflächen zwischen biologischen Kompartimenten.

Die geordnete Struktur epithelialer Gewebe beruht auf sehr engen Kontaktstellen zwischen zwei benachbarten Epithelzellen, sogenannten adhärenen Zellkontakten, die sich zwischen zwei Epithelzellen ausbilden. Die Zellkontakte werden von Zelladhäsionsproteinen hergestellt, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Sie haben zwei grundlegende Aufgaben: 1) Den Zusammenhalt von Geweben und 2) die Kommunikation von Zellen miteinander zu ermöglichen.

Epithelzellen besitzen eine apikale Seite, die in direktem Kontakt zum Außenmilieu steht, sowie eine basolaterale Seite, die zum Inneren des Organismus gerichtet ist. Diese Kompartimentierung von Epithelzellen in apikal und basolateral wird unter anderem durch die polare Verteilung von Proteinen in der Plasmamembran deutlich. Verschiedene Zellverbindungen sind für die Aufrechterhaltung dieser unterschiedlichen Membrankompartimente erforderlich (Eaton and Simons, 1995; Drubin and Nelson, 1996). Zum einen bilden die „tight junctions“ eine parazelluläre Diffusionsbarriere im Vertebratenepithel, indem sie den Fluss von Molekülen durch den interzellulären Raum zwischen den Epithelzellen verhindern. Zusätzlich verhindern „tight junctions“, dass Membrankomponenten direkt zwischen apikalen und basolateralen Bereichen durch Diffusion ausgetauscht werden und halten dadurch die Polarität der Epithelzellen von Vertebraten aufrecht (Matter, 2000). Die Zelladhäsion im Epithel wird durch Cadherine vermittelt. Cadherine lokalisieren basal zur „tight junction“ in der Zonula adherens (**ZA**) (Tepass, 1999; Steinberg und McNutt, 1999). Cadherine sind Transmembranproteine, die durch Interaktion mit  $\beta$ -catenin und  $\alpha$ -catenin die Adhäsion benachbarter Zellen vermitteln. Cadherine besitzen 5 extrazelluläre ‚Cadherin-Repeat‘-Domänen, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne, die p120-Catenin und  $\beta$ -catenin bindet (Daniel und Reynolds, 1997). Das epitheliale E-Cadherin ist wahrscheinlich das bestuntersuchte Cadherin und für die Entwicklung und Funktion der Epithelien von zentraler Bedeutung. E-Cadherin vermittelt die Zelladhäsion im Epithel und trägt sowohl zur Erhaltung der Zellpolarität, als auch zur Signaltransduktion während der embryonalen Morphogenese und im adulten Gewebe bei. Eine Fehlfunktion von E-cadherin wurde in vielen menschlichen Tumoren beobachtet (Kumar et al., 2005; Nakajima et al., 2004; Pecina-Slaus, 2003). Die intrazelluläre Domäne des E-Cadherins besitzt eine stark phosphorylierte Region, die für die Bindung von  $\beta$ -catenin essentiell ist (Steinberg und McNutt, 1999; Yap et al., 1997; Provost und Rimm, 1999). Während man bisher davon ausgegangen ist, dass Cadherine direkt über  $\alpha$ -catenin an das

Aktinzytoskelett binden, wurde in neueren Studien gezeigt, dass  $\alpha$ -catenin nicht gleichzeitig an den Cadherin- $\beta$ -catenin Komplex und das Aktinzytoskelett binden kann. Das gegenseitige Ausschließen dieser Bindung wurde anhand des allosterischen Verhaltens von  $\alpha$ -Catenin erklärt: das  $\alpha$ -Catenin Monomer bindet vorzugsweise an den Cadherin- $\beta$ -Catenin Komplex, während das  $\alpha$ -Catenin Homodimer an die Aktinfilamente bindet (Nelson und Weis, 2006). Die Regulation dieser verschiedenen molekularen Konformationen des Cadherin/Catenin-Komplexes und deren Interaktion mit dem Aktinzytoskelett sind für die Vermittlung der Zell-Zellkontakte und für die normale Zellphysiologie essentiell.

Von diesen Interaktoren besitzt  $\beta$ -Catenin eine zusätzliche Funktion im Wnt/Wingless- (Wnt/Wng-) Signalweg durch transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen. Dies geschieht in Zusammenarbeit mit einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die als T-cell factors (TCFs) oder auch lymphocyte enhancer binding factors (LEFs) bekannt sind. Wnt-vermittelte und über  $\beta$ -catenin verschaltete Signale sind unter anderem während der Embryonalentwicklung der Segmentpolarität in *Drosophila*, der Ausbildung der Körperachse in *Xenopus* und der Mesoderm-Induktion in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) beteiligt (siehe Kapitel 1.1.3.3).

Eines der wohl bestuntersuchten Modellsysteme in der Regulation von epithelialer Zelladhäsion und Zellpolarität ist die Taufliege *Drosophila melanogaster*. Die Entwicklung von *Drosophila*, insbesondere die Entstehung und Aufrechterhaltung von Epithelien, ist genauestens beschrieben. Daher stellt *Drosophila* ein geeignetes Modellsystem dar, um Aspekte der Zellpolarität in verschiedenen Geweben zu untersuchen.

Wie oben beschrieben, wird die Zelladhäsion im Vertebratenepithel durch den Cadherin-Catenin Komplex vermittelt. Im *Drosophila* Epithel werden die homologen Proteine DE-Cadherin,  $D\alpha$ -catenin und  $\beta$ -Catenin (Armadillo) ebenfalls für die Ausbildung und den Erhalt der Zelladhäsion benötigt (Peifer et al., 1991; Peifer et al., 1992). Der *Drosophila* Cadherin/Catenin Zelladhäsionskomplex ist in der ZA von Epithelzellen lokalisiert (Müller und Wieschhaus, 1996; Oda et al., 1994; Oda et al., 1993).

Im *Drosophila* Embryo bilden sich während der Zellularisierung zunächst so genannte „spot adherens junctions“ (SAJ) entlang der lateralen Membran aus, die den Adhäsionskomplex aus DE-Cadherin (Shotgun, Shg),  $D\alpha$ -Catenin und Armadillo

enthalten (Grawe et al., 1996; Müller und Wieschhaus, 1996; Tepass et al., 1996; Oda et al., 1994). Nach der Zellularisierung erfolgt die Gastrulation, die die Invagination des Mesoderms sowie schnelle morphologische Veränderungen während der Keimstreifenausstreckung beinhaltet (siehe Kapitel 1.3). Während der Gastrulation verschmelzen die punktförmigen SAJ zur ZA, die den Zellaplex gürtelförmig umschließt. Dieser Prozess geht einher mit der Ausbildung epithelialer Zellpolarität und dem Zusammenspiel apikaler und basolateraler Membrandomänen (Tepass, 2002).

Zelladhäsionsmoleküle umfassen eine Reihe von Glykoproteinen und Glykolipiden, die in die Plasmamembran integriert sind, sowie zytoplasmatische Proteine, die mit den Transmembranproteinen assoziiert sind. Die Transmembranproteine können nicht nur Zelladhäsion vermitteln, sondern unter anderem ebenfalls als Rezeptoren fungieren und Signale von außen ins Innere der Zelle weiterleiten. Zelladhäsionsmoleküle vermitteln sowohl Kontakte zwischen Zellen, als auch zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM). Dieser Kontakt zur ECM über Zell-Substrat-Kontakte an der basalen Plasmamembran wird über Integrine, heterodimere Transmembranrezeptoren, die in verschiedener Weise mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen, erreicht (Hynes, 1992). Nach Bindung der Integrine an die ECM wird Aktin mithilfe von Adaptoren, wie zum Beispiel Talin oder  $\alpha$ -actinin, an die Integrine rekrutiert. Die Integrin-Aktin-Interaktion führt dann zu einer Aggregation der Integrine und zur Ausbildung von fokalen Adhäsionsstellen (focal adhesion sites, **FAs**). Diese FAs sind Verankerungs- und Schaltstellen der Zelle und leiten Integrin vermittelte Signale weiter, um u.a. so Zellpolarität und gerichtet Zellwanderung zu regulieren.

### **1.1.3.2 Zellpolarität**

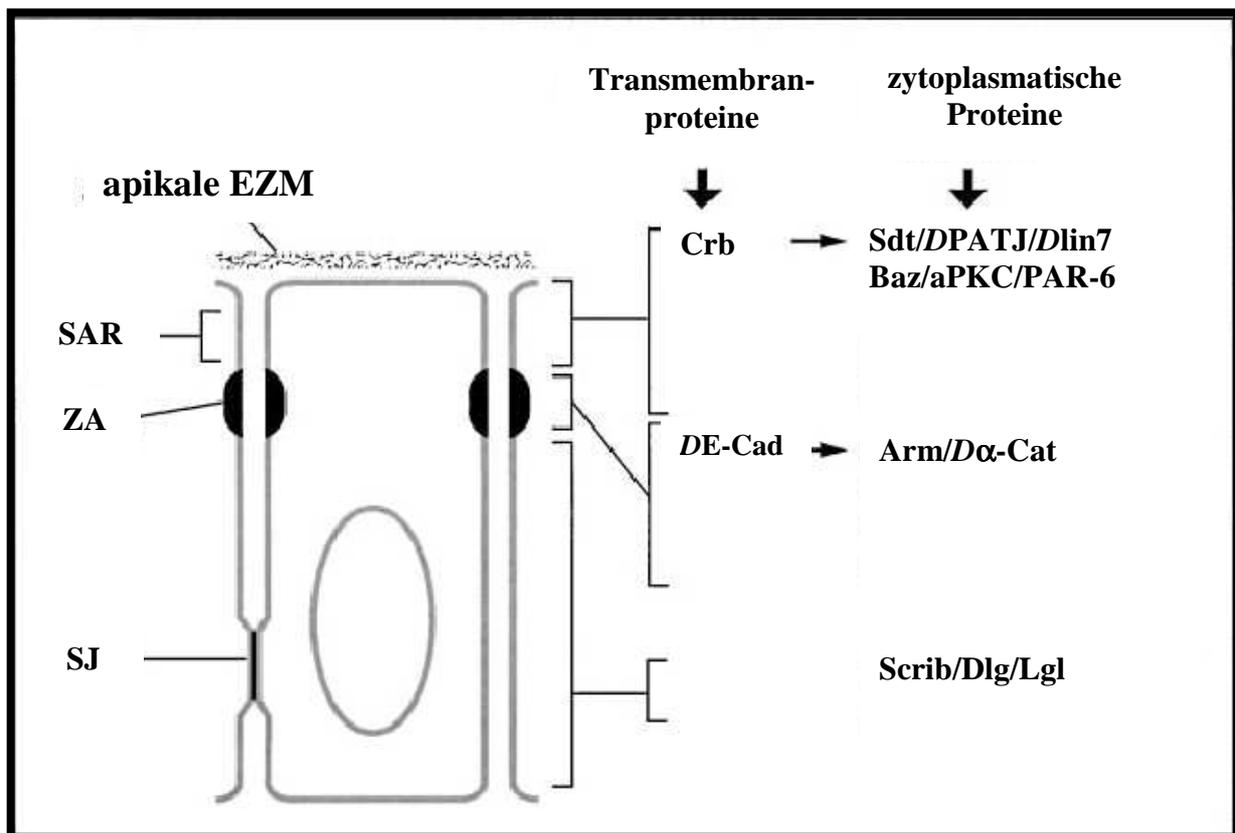
Die Ausbildung von Zellpolarität spielt bei vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle, da sie häufig die Grundlage für gerichtete Sekretion, Signalübertragung und lokales Zellwachstum bildet (Knust and Bossinger, 2002; Margolis and Borg, 2005). Zellpolarität ist aber nicht nur auf der Ebene der einzelnen Zelle wichtig. Oft ist Zellpolarität die Voraussetzung für asymmetrische Zellteilungen und damit verbunden für das Festlegen unterschiedlicher Zellschicksale (Wodarz et al., 2005). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die molekularen Grundlagen

für die Ausbildung und Funktion der Zellpolarität in verschiedenen Organismen konserviert sind (Hülkamp, 2003).

Wie oben beschrieben, wird die Zelladhäsion in adhärennten Zellkontakten über den Cadherin/Catenin Proteinkomplex vermittelt, der im Bereich der Zonula adherens (ZA) akkumuliert. In *Drosophila* wird für die Lokalisation des Cadherin/Catenin Komplexes und zur Ausbildung der ZA unter anderem die Expression der Gene *bazooka (baz)*, *stardust (sdt)* und *crumbs (crb)* benötigt (Grawe et al., 1996; Müller and Wieschhaus, 1996). Baz und Crb regulieren Zellpolarität und die Lokalisation der ZA im Zusammenspiel mit mehreren anderen Proteinen, die im Baz und im Crb Proteinkomplex organisiert sind. Im Baz-Komplex sind neben dem Par-3 Homolog Baz drei weitere zytoplasmatische Proteine organisiert: DaPKC, CDC42 und *Dm-Par-6*. Letztere stellen Homologe zu Tight Junctions assoziierten Proteinen in Vertebraten dar (Kuchinke et al., 1998, Petronczki und Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). Der Baz-Komplex wird früh, während der Entstehung des zellulären Blastoderms (Zellularisierung), lokalisiert und initiiert die Identität der apikalen Membrandomäne, wo Baz am Aufbau einer funktionalen ZA beteiligt ist (Müller und Wieschhaus, 1996; Harris und Pfeifer, 2004). In den späteren Entwicklungsstadien kontrolliert Baz die Zellpolarität, wobei sich zeigte, dass Baz (zelltypspezifisch) synergistisch mit dem Crb Proteinkomplex für die Erhaltung der Polarität benötigt wird. Der Crb Proteinkomplex besteht aus Crb, Sdt, dem „*Drosophila* Protein Associated with Tight Junctions“ (DPATJ) und *DLin7* (Tepass et al., 1990; Bachmann et al., 2001; Bachmann et al., 2004). *crb* oder *sdt* mutante Embryonen können keine ZA aufbauen und zeigen reduzierte Zelladhäsion (Müller und Wieschhaus 1996, Tepass, 1996; Grawe et al., 1996).

Der Crb-Komplex kolokalisiert mit Baz in der subapikalen Region (SAR) (siehe Abb. 2) (Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001; Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Als SAR bezeichnet man den unmittelbar apikal an der ZA gelegenen Bereich der Plasmamembran in den Epithelzellen von *Drosophila*. Sie korrespondiert in ihrer Position und in einigen funktionellen Aspekten mit der „Tight Junction“ in Vertebraten (Müller, 2000; Johnson und Wodarz, 2003). Während Baz eine initiale Rolle in der Etablierung der apikalen Membrandomäne und dem Aufbau der ZA zukommt, spielt der Crb Komplex eher eine Funktion in der Etablierung der ZA und der Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Dabei agieren die apikalen Crb- und Baz Proteinkomplexe antagonistisch zu lateral lokalisierten Proteinen, wie z.B. den

Tumorsuppressorproteinen Scribble (Scrib), Discs large (Dlg) und Lethal giant larvae (Lgl). Nullmutanten von *dlg*, *scrib* oder *lgl* zeichnen sich ebenfalls durch einen Verlust der ZA aus. Die Wechselwirkung dieser drei Protein-Komplexe (Baz-, Crb- und Scrib-Komplex) ist somit für die Ausbildung der apiko-basalen Polarität und Lokalisation der ZA im apikalen Bereich verantwortlich (Bilder and Perrimon, 2000; Bilder et al., 2001; Tanentzapf und Tepass, 2002).



**Abbildung 2: Regulation der Zellpolarität in *Drosophila***

In der *Drosophila* Epithelzelle sind die Proteine, die den apikalen Bereich der Plasmamembran regulieren, im Bereich der Zonula Adherens (ZA) und der subapikalen Region (SAR) lokalisiert. Die ZA beinhaltet das Transmembranprotein **DE-Cad**, das mit den cytoplasmatischen Proteinen **D $\alpha$ -Cat** und Armadillo (**Arm**) einen Proteinkomplex bildet. Der Baz-Komplex (**Baz/aPKC/PAR-6**) ist für die Lokalisierung des Transmembranproteins Crumbs erforderlich, das sich apikal zum **DE-Cad**-Komplex befindet. Die cytoplasmatische Domäne von Crumbs (**Crb**) bindet Stardust (**Sdt**), das wiederum an **DPATJ** und **DLin7** bindet.

Der Crb-Komplex co-lokalisiert mit Baz in der **SAR** und beide wirken antagonistisch zu Proteinen, die im Bereich der Septate Junction (**SJ**) lokalisiert sind, wie z.B. die Tumorsuppressoren **Scrib**, **Dlg** und **Lgl**. Das Zusammenspiel apikaler und lateraler Determinanten lokalisiert die ZA im apikalen Bereich.

## 1.2 Embryogenese und Tumorprogression

### 1.2.1 Regulatorische Netzwerke der EMT

Die Entwicklung der Körperanlagen mit ihren Organen wird durch eine Vielzahl komplexer Regelmechanismen gesteuert, die einem streng kontrollierten Ablauf folgen. Zu Beginn dieser Ereignisse steht die Mesenchymbildung, ein Vorgang, der Ähnlichkeiten zur Metastasierung von Tumoren aufweist. Mithilfe neuer Untersuchungen sollen regulatorische Netzwerke aufgedeckt werden, die Mesenchymbildung und Gewebedifferenzierung kontrollieren.

Ein wichtiger Schritt bei der Entstehung eines neuen Organismus ist die Bildung der embryonalen Rumpfanlage. Sie entsteht aus einem mehrschichtigen primitiven Epithel aus pluripotenten, sich teilenden Stammzellen. Unter Einfluss verschiedener Signalkaskaden (Wnt/ $\beta$ -Catenin, der TGF- $\beta$ 1 und der FGF- Signalweg), werden bestimmte Zellen induziert, sich aus ihrem epithelialen Zellverband zu lösen und mesenchymale Eigenschaften anzunehmen (Kato, 2006). Dabei werden sie beweglich und beginnen sich zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren. Die Vorgänge sind entscheidend für die Ausbildung des dritten Keimblatts und die Organisation von Geweben während der Embryogenese.

Über das Verständnis der embryonalen Vorgänge hinaus erwarten die Wissenschaftler von diesen Untersuchungen wichtige Hinweise über die Entstehung und Metastasierung von Tumoren epithelialen Ursprungs (Kapitel 1.1.2).

Bei der EMT kommt es zu drastischen Veränderungen in den Zellen. Epitheliale und adhäsive Verbindungen werden aufgelöst, das Zytoskelett wird umorganisiert, wobei aus kortikalem Aktin Stressfasern entstehen, die Zellen verlieren ihre apikal-basolaterale Polarität und die Expression mesenchymaler Gene wird induziert (Huber et al., 2005). Gesteuert wird dieser Prozess in den meisten Zellen durch Kooperation des TGF- $\beta$  Signalweges mit onkogenem Ras (Lehmann et al., 2000; Janda et al., 2002) oder Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Aktivierung von Ras, die abwärts der aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen erfolgt, kommt eine wichtige Vermittlerrolle zur Induzierung der EMT zu. Untersuchungen an humanen Brustkrebszelllinien haben gezeigt, dass der Ras/Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) Signalweg eine sehr wichtige Rolle bei der Induzierung der EMT spielt, aber auch die transiente

Aktivierung von Src, Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) und Rac beeinflusst bestimmte Aspekte der EMT (Vincent-Salomon and Thiery, 2003). Ras begünstigt die Aktivierung von kleinen GTPasen der Rac- und Rho-Familie über PI3K. Diese beiden Proteine regulieren die adherenten Verbindungen, die Myosin- Phosphorylierung und die Aktin-Streißfasern, führen so zu Änderungen in der Organisation des Zytoskeletts und können somit zu den Zellformveränderungen während der EMT beitragen (Teng et al., 2007; Edme et al., 2002; Thiery, 2002).

TGF- $\beta$  kommt eine Doppelfunktion in der Tumorgenität. In der frühen Phase vermittelt er Wachstumsrepression und Apoptose, aber in der späteren Phase der Tumorgenität, stehen erhöhte TGF $\beta$ -Signal über Autokrine- oder Paracrine-Stimulation in Verbindung mit Krebsprogression, der Metastisierung (Christofori, 2006; Muraoko-Cook et al., 2005). Diese autokrine Faktoren beinhalten den "Transforming growth factor  $\beta$ " TGF- $\beta$ 1, „Hepatocyte growth factor“ (HGF), „Fibroblast growth factors“ (FGF), „epithelial growth factor (EGF) und die „insulin-like growth factors 1 und 2“ (IGF). Die aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivieren Effektoren, wie die Proteine der Src Familie und Ras (Boyer et al., 2000; Thiery, 2002). Src phosphoryliert wichtige Adhäsionsproteine (Foc, Cas und Paxillin) des Zytoskeletts und vermittelt somit die Umordnung der Zellform und deren Adhäsion. Dies ist ein entscheidender Effekt, der letztendlich EMT und Migration fördert, wobei das aber im Gegensatz zu TGF- $\beta$  kontextabhängig und nicht universal ist (Huber et al., 2005).

Zusätzlich wird die kleine GTPase Rho A durch die TGF $\beta$  Stimulation aktiviert und ist ein essentieller Faktor für die TGF $\beta$ -vermittelte EMT. Die Expression von dominant-negativ mutantern RhoA blockiert alle morphologischen und molekularen Eigenschaften der EMT (Bhowmick et al., 2001).

Es sind noch zahlreiche weitere Signalkaskaden an der Umstrukturierung der Zellen beteiligt, die z. T. wiederum durch TGF- $\beta$  induziert werden können. So zum Beispiel der Wnt-Signalweg, der den Transkriptionsrepressor Snail stabilisiert (Yook et al., 2005) und die Repression und den Abbau von E-Cadherin bewirkt. Die Unterdrückung von E-Cadherin durch Snail spielt daher eine wichtige Rolle bei der Bildung von Mesenchym aus epithelialen Zellverbänden.

GSK-3 $\beta$  kann Snail an zwei verschiedenen Stellen phosphorylieren und somit blockieren, da die Phosphorylierung sowohl zur Ubiquitinierung und nachfolgendem Abbau führen kann, als auch zum Export aus dem Kern. Außerdem kann GSK-3 $\beta$

Snail auf transkriptioneller Ebene inhibieren. Während der EMT wird die Kinase bei EMT durch einen aktiven Wnt-Signalweg gehemmt.

Der Wnt (Wingless, INT)-Signaltransduktionsweg reguliert die Transkription zahlreicher Zielgene, deren Transkripte während der Embryogenese von Bedeutung sind. In der adulten Phase hingegen führt eine verstärkte Aktivierung vieler Wnt Zielgene in die Tumorprogression.

Der Wnt-Signaltransduktionsweg wird durch eine Abfolge von Protein-Proteininteraktion und Phosphorylierungsereignissen bestimmt, die die Transkription der Zielgene regulieren.

Wnt wurde abgeleitet von dem *Drosophila*-Protein Wingless (kodiert vom Gen *wg*), einem wichtigen Protein der Embryonalentwicklung und dem Protoonkoprotein INT-1 (Wnt-1) aus der Maus (Sharma und Chopra, 1976). Aus der humanen Wnt-Familie wurde Wnt-1 umfangreich untersucht. Es ist ein Protoonkoprotein und nimmt Einfluss auf die Entwicklung des Nervensystems. WNT-2, WNT-5A, WNT-7B werden in humanen Brustkarzinomen stark exprimiert (Dale et al., 1996; Huguet et al., 1994; Lejeune et al., 1995).

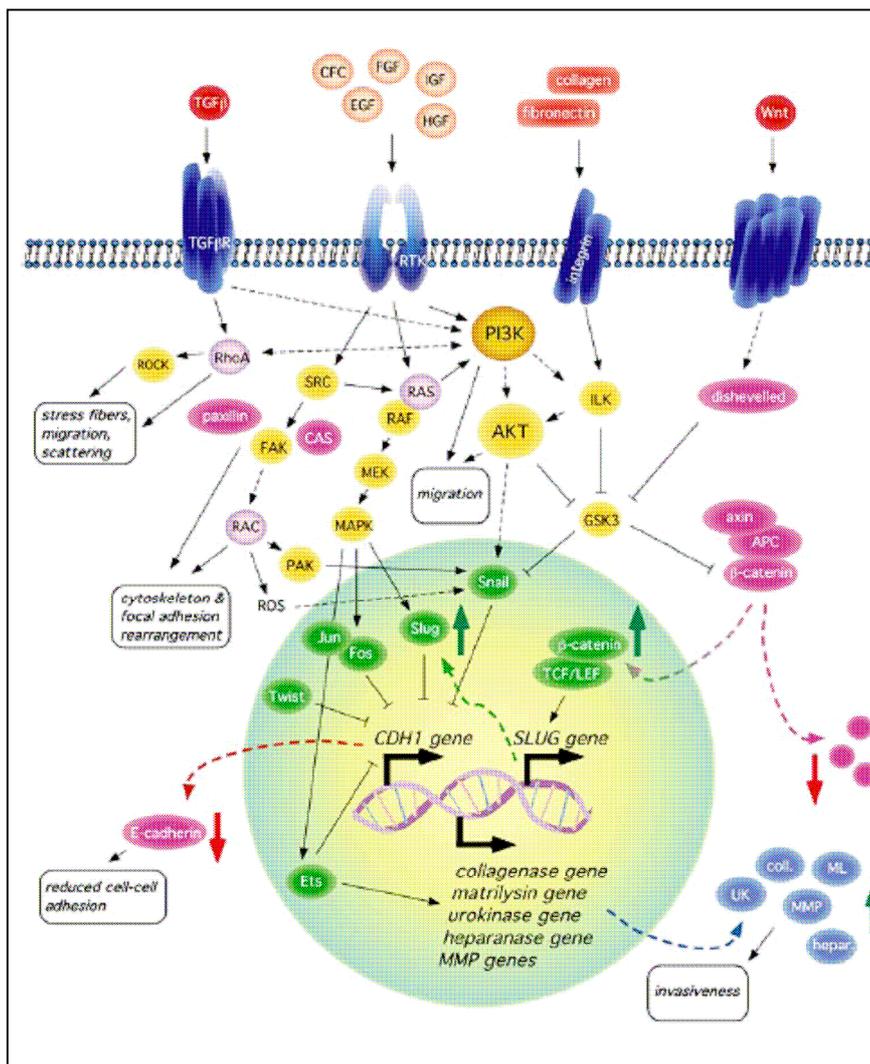
Der Wnt-Signaltransduktionsweg durch die Bindung von Wnt an dessen membranbeständigen Rezeptor Frizzled aktiviert. Ein bisher noch nicht genau verstandener Mechanismus inaktiviert dabei über das Protein Dishevelled die Ser/Thr Kinase Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Yanagawa et al., 1995). Dadurch wird die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin inhibiert und so der proteosomale Abbau des  $\beta$ -Catenins verhindert.  $\beta$ -Catenin akkumuliert daraufhin im Cytoplasma und verlagert sich in den Zellkern, wo es durch die Interaktion mit HMG-Box Proteinen der LEF/TCF-Familie die Rolle eines Transkriptionsaktivators übernimmt.

Für den Wnt-Signaltransduktionsweg wurden zahlreiche  $\beta$ -cat/TCF-abhängig regulierte Zielgene nachgewiesen: z.B. *myc* (Wang et al., 2002), *cyclin D1* (Pradeep et al., 2004), c-Jun (Chun et al., 2005). wobei verstärkte  $\beta$ -cat/Tcf4-abhängige Transkription zur Tumorprogression führen kann und die Menge an nukleärem  $\beta$ -cat die TCF-abhängige Transkription entscheidend reguliert. Ursache sind häufig die in den Wnt-Signaltransduktionsweg involvierten Proteine wie  $\beta$ -cat, APC, GSK3-beta und Axin. Zum Beispiel konnte in einer Vielzahl von Tumoren (Coloncarcinom, Melanom, Pilomatricom, hepatozelluläres Carcinom) eine gesteigerte Akkumulation von  $\beta$ -Catenin gezeigt werden, die aus Mutationen des APC Gens oder den GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsstellen von  $\beta$ -Catenin resultieren, was zu einer erhöhten Stabilität

von  $\beta$ -cat und somit zu einer höheren Menge an  $\beta$ -cat/Tcf4 im Zellkern führt (Sunfeldt et al., 2003).

Somit stellt die aberrante Aktivierung des Wnt Signalwegs einen Hauptmechanismus der onkogenen Transformation in verschiedenen Tumorarten dar.

Eine schematische Darstellung dieses regulatorischen Netzwerkes, das die EMT steuert, ist in Abbildung 3 zusammengefasst.



**Abbildung 3: Übersicht über die am EMT beteiligten Netzwerke**

Unter Einfluss verschiedener Signalkaskaden (Wnt/ $\beta$ -Catenin, der TGF- $\beta$ 1 und der FGF- Signalweg), werden bestimmte Zellen induziert, sich aus ihrem epithelialen Zellverband zu lösen und mesenchymale Eigenschaften anzunehmen.

**Details siehe Text.** Endpunkte der EMT sind eingekreist. RTK= Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Larue und Bellacosa, 2005)

### 1.2.2 EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese in der Maus

Der Verlust des epithelialen Phänotyps wird während der EMT hauptsächlich durch Veränderung in der Zelladhäsion gesteuert. Hier ist wiederum E-Cadherin bestimmend. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten E-Cadherin zu reduzieren. Auf transkriptioneller Ebene über die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist. Über die posttranskriptioneller Ebene wird die Menge an verfügbarem E-Cadherin über Phosphorylierung durch RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen), wie EGFR, IGFR und FGFR reguliert.

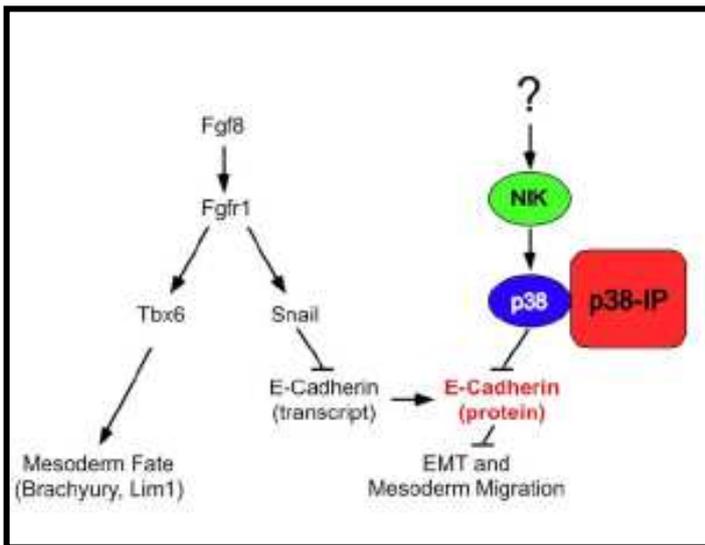
Ein gut untersuchtes Modellsystem, das zur Untersuchung der EMT genutzt wird, ist die frühe Mesoderm-Morphogenese des Mausembryos. Bei diesen Untersuchungen wurden zwei unabhängige Signalwege identifiziert (FGF/Snail und NIK/p38/p38-IP), die zur EMT beitragen können (Abb. 4). Interessanterweise führen beide Signalwege zu einer Regulation des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin. Zum einen wurde gezeigt, dass während der EMT E-cadherin transkriptionell reguliert wird, indem der FGF-Signalweg über FGF-R1 die Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *snail* steuert. Snail wiederum reprimiert direkt die Expression des *e-cadherin* Gens, und reduziert so die Level des E-Cad Proteins in der Zelle, was zu einer verminderten Zelladhäsion beiträgt (Cano et al., 2000). Da die Zellen während der EMT ihren epithelialen Charakter verlieren und die Zelladhäsion negativ reguliert wird, trägt die Unterdrückung von E-Cadherin durch Snail somit zur EMT bei (Bates et al., 2005; del Barrio und Nieto 2002; Carver et al., 2001).

Unabhängig von der FGF/Snail vermittelten transkriptionellen Regulation von E-Cad wird der Level des E-Cad Proteins zusätzlich posttranskriptionell reguliert. Für diese posttranskriptionelle Regulation wird die Aktivierung des NIK/Map4k4-Signalweg durch einen bis heute unbekanntem Faktor benötigt. Es wurde gezeigt, dass die MAP-Kinase p38 und das p38-Interacting Protein (p38-IP) für die negative Regulation des E-Cad Proteins essentiell sind.

P38-IP mutante Embryonen zeigten eine abnormale Entwicklung des Mesoderms. Eine Vielzahl von mesodermalen Zellen akkumulieren an der posterioren Seite des Embryos wodurch eine weitere Ausbreitung des Mesoderms unterdrückt wird. Auch die Expression von Snail und E-Cad wurde in diesen Mutanten genauer untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß *snail* normal exprimiert wird. Daraus lässt sich schließen, daß p38-IP nicht für die *snail* Expression benötigt wird. Da Snail ein transkriptioneller

Repressor von E-Cad ist, liegt die Vermutung nahe, dass die E-Cad Expression reprimiert wird. Dies ist jedoch nicht der Fall, da E-Cad an den Verbindungspunkten der Zellen in p38-IP mutanten Embryonen verbleibt. Somit scheint das E-Cad Protein transkriptionell und zusätzlich posttranskriptionell reguliert zu werden.

Das Zusammenspiel der FGF/Snail und der NIK/p38/p38-IP abhängigen E-Cad Regulation trägt somit zu einem normalen Ablauf der EMT bei (Zohn et al., 2006).



**Abbildung 4: Modell der Signaltransduktionswege, die E-Cadherin während der Mesodermmorphogenese in der Maus regulieren**

Zwei unabhängige Signalwege, **FGF/Snail** und **NIK/p38/p38-IP**, sind während der frühen Mesodermmorphogenese notwendig, um E-Cad zu regulieren und somit die EMT und letztendlich die Mesodermmigration zu ermöglichen. Zum einen wurde gezeigt, dass während der EMT E-Cad transkriptionell reguliert wird, indem der FGF-Signalweg über FGF-R1 die Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *snail* steuert. Unabhängig davon wird der Level des E-Cad Proteins über den NIK/Map4k4-Signalweg posttranskriptionell reguliert (Zohn et al., 2006).

### 1.3 Mesoderm-Morphogenese von *Drosophila melanogaster*

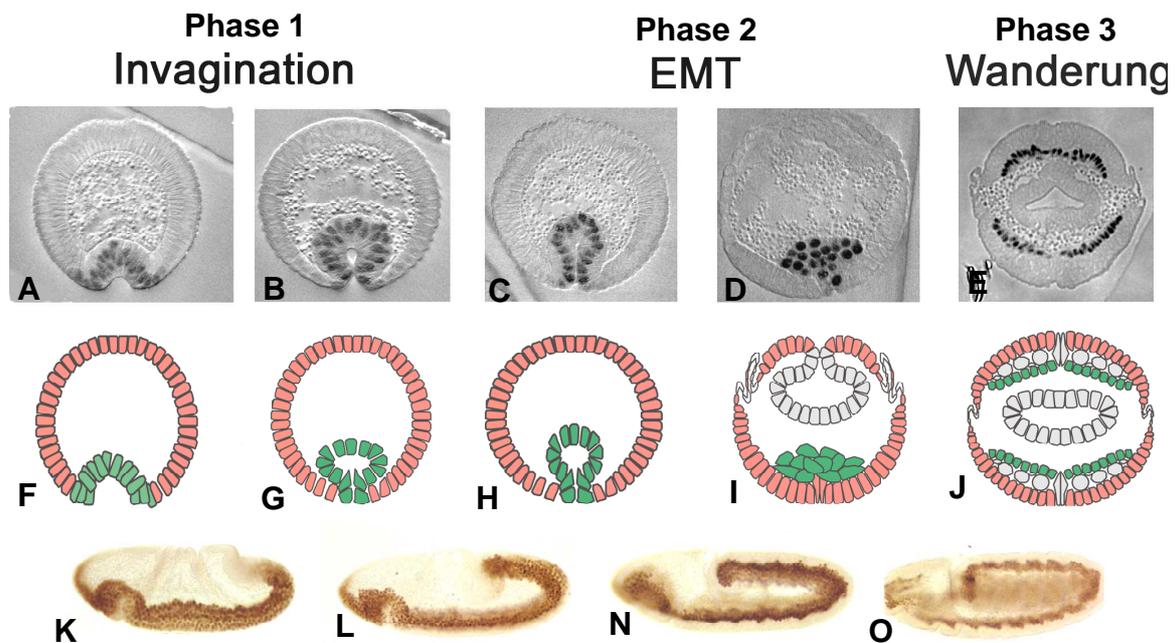
Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass einige der in der Maus für die Mesoderm-Morphogenese notwendigen Signalwege auch in anderen Modellorganismen wie *Drosophila* vorhanden sind und ebenfalls zur Mesoderm-Morphogenese beitragen. So sind an *Drosophila* mehrere Studien durchgeführt worden, die konservierte Signalwege identifiziert haben, welche für eine gerichtete Migration der Mesodermzellen benötigt werden (Schumacher et al., 2004; Gryzik und Müller 2004, Wilson und Leptin, 2000; Michelson et al., 1998b; Saigo et al., 1997; Krasnow et al., 1996; Shilo et al., 1996). Da EMT während der *Drosophila* Mesoderm-Morphogenese wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Wanderung des Mesoderms ist, sollten durch detaillierte Untersuchungen in dieser Arbeit Komponenten identifiziert werden, die für den EMT Prozess erforderlich sind. Daher wird im Folgenden zunächst die frühe Mesoderm-Morphogenese von *Drosophila* zusammenfassend erläutert.

In *Drosophila* bildet sich das Mesoderm aus einer ventralen Population von Zellen im einzelschichtigen Blastodermepithel (Costa et al., 1993). Der Prozess der Mesoderm-Morphogenese beinhaltet komplexe morphologische Abläufe, wie Zellkoordination, den Wandel von epithelialen zum mesenchymalen Zellcharakter und die Zellmigration. Der Ablauf der Mesoderm-Morphogenese lässt sich in 3 Phasen einteilen (Abb. 5).

#### 1.3.1 Phase 1: Invagination

Der erste Schritt der Mesoderm-Morphogenese ist die Invagination der präsumptiven Mesodermzellen (Stadium 6-7), wodurch eine mesodermale Röhre gebildet wird (Abb. 5 A-C und F-H). Die Expression der zygotischen Gene *twist (twi)* und *snail (sna)* ist für den Ablauf dieses Prozesses notwendig, denn in *twi* und *sna* mutanten Embryonen unterbleibt die Invagination des Mesoderms (Leptin und Grunewald, 1990). Die Expression von *twi* und *sna* erfolgt zuerst in einem schmalen Band von ventralen Zellen, die später die zentrale Population der Mesodermzellen darstellen (Leptin, 1991). Twist ist im Kern lokalisiert und agiert als transkriptioneller Aktivator, der für die Expression der meisten mesodermalen Gene notwendig ist. Der

Transkriptionsfaktor Snail reprimiert die Expression von ektodermalen Genen innerhalb des Mesodermprimordiums (Ip et al., 1992). Durch das Zusammenspiel beider Gene wird letztendlich die Invagination des ventralen Zellstreifens in das Innere des Embryos ermöglicht (Leptin, 1991).



**Abbildung 5: Phasen der Mesoderm-Morphogenese in *Drosophila***

(A-E) Querschnitte von Wildtyp-Embryonen gefärbt mit Antikörpern gegen das Twi-Protein (schwarz). (F-J) Schematische Darstellung der Mesoderm-Morphogenese in embryonalen Querschnitten. Die ektodermalen Zellen sind rosa und die mesodermalen Zellen grün eingefärbt. Alle Querschnitte sind so orientiert, dass die ventrale Seite nach unten weist (Modifiziert nach Knust und Müller, 1998). (K-O) Laterale Gesamtansicht auf Wildtyp-Embryonen, gefärbt mit Antikörpern gegen das Twist-Protein (braun). In Stadium 5 beginnen die Mesodermzellen mit der Invagination (A, F). In Stadium 6 (B, G) invaginiert das Mesoderm und bildet eine röhren-ähnliche Struktur, die in Stadium 7 (C, H) bestehen bleibt. Zu Beginn von Stadium 8 zerfällt diese Röhre (D, I), die Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter, durchlaufen mitotische Zellteilungen und beginnen sich in dorsal-lateraler Richtung auszubreiten, wobei sie eine einlagige Zellschicht bilden (E, J). Während der beschriebenen Gastrulationsvorgänge kommt es zu einer deutlichen Verlängerung des Keimstreifens (K-O).

### 1.3.2 Phase 2: Epithel-Mesenchym-Übergang

Im nächsten Schritt (Stadium 8) der Embryonalentwicklung, kommt es zur Abflachung der invaginierten Röhre aus Mesodermzellen. Dabei verlieren diese ihren epithelialen Charakter und werden zu mesenchymalen Zellen, die als Aggregat auf dem Ektoderm liegen bleiben. Gleichzeitig kommt es auch zur ersten mitotischen Zellteilung nach der Gastrulation (Bate et al., 1993; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Die Ektodermzellen behalten ihren epithelialen Charakter (Campos-Ortega

und Hartenstein, 1985), während die Mesodermzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die laterale Ausbreitung auf dem Ektoderm, die sich im Stadium 9 der Embryonalentwicklung fortsetzt (Abb. 5 D und I). Interessanterweise wird zu diesem Zeitpunkt die Expression von E-Cad im Mesoderm durch die Aktivität von Snail reprimiert, während Twist gleichzeitig die Expression von N-Cad in allen mesodermalen Zellen aktiviert (Oda et al., 1998). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob diese differentielle Expression von E- und N-Cad eine Auswirkung auf die EMT hat.

### **1.3.3 Phase 3: Migration**

Bis zum frühen Stadium 10 haben sich die Mesodermzellen auf dem Ektoderm ausgebreitet und liegen als einschichtiges Gewebe vor, das im Bereich der ventralen Mittellinie voneinander getrennt ist (Abb. 5 E und J). Während der beschriebenen Gastrulationsvorgänge kommt es zu einer deutlichen Verlängerung des Keimstreifens (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Irvine und Wieschaus, 1994). Die gleichzeitig stattfindende Wanderung der Mesodermzellen und die damit verbundenen Zellformveränderungen werden durch die Aktivität des FGF-Rezeptors Heartless (Htl) reguliert (siehe 1.4, Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Schumacher et al., 2004).

Die dorso-laterale Migration ist für die anschließende Differenzierung der Mesodermzellen essentiell. In *Drosophila* entstehen aus dem Mesoderm die somatische und viszerale Muskulatur, der Fettkörper, das larvale Herz und das somatische Gewebe der Gonaden. Die für die Differenzierung notwendigen, induktiven Signale gehen von den Ektodermzellen aus. So entstehen z. B. die Herzvorläuferzellen aus den dorsal positionierten Mesodermzellen durch die Induktion von Decapentaplegic (Dpp) und wingless (wg), das in den dorsalen Ektodermzellen expremiert wird (Frasch, 1995; Wu et al., 1995; Staehling et al., 1994). Die Differenzierung zu den beiden Mesodermderivaten wird durch die Expression von Even-Skipped (Eve), der früheste Marker für die Perikardialzellen, dargestellt. Nur die vollständige Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm stellt die Differenzierung zu den Mesodermderivaten sicher (Carmena et al., 1998; Halfon et al., 2000; Knirr und Frasch, 2001).

## 1.4 FGF-vermittelte Zellwanderungsprozesse während der Embryogenese

*htl* wird im embryonalen Mesoderm von *Drosophila* expremiert. In *htl* mutanten Embryonen ist der gerichtete Wanderungsprozess der mesodermalen Zellen gestört, was dazu führt, dass kein viszerales Mesoderm und kein Herzgewebe (daher der Name „heartless“) gebildet werden (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996). *htl* kodiert für einen FGF-Rezeptor, einer Klasse von Transmembranproteinen die zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören. Die Signaltransduktion durch FGF-Rezeptoren wird durch die FGF-Ligandenbindung initiiert. Diese Bindung führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zur intermolekularen Autophosphorylierung innerhalb des Rezeptordimers (Plotnikov et al., 1999). Durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten werden Bindestellen für Adaptorproteine mit Phosphotyrosin-Bindemodulen gewährleistet (Pawson und Scott, 1997). Dieser Vorgang führt zur Stimulation spezifischer Signaltransduktionsmoleküle, zu denen z.B. die kleine GTPase Ras und die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) zählt (Cobb und Goldsmith, 1995; Seger et al., 1992). MAPK ist ein entscheidender Faktor, der die Signale des FGF-Signalweges durch die Regulation der Genexpression umsetzt (Fantl et al., 1993; Van der Geer et al., 1994).

In *Drosophila* konnte ein weiteres Adaptorprotein diese Signalwegs identifiziert werden dessen Gen als *dof* (Downstream of FGF) bekannt ist (Michelson et al., 1998; Vincent et al., 1998; Imam et al., 1999). In *dof* mutanten Embryonen ist die Wanderung des Mesoderms gestört (Vincent et al., 1998). Die Proteinstruktur von Dof weist zwei Ankyrin-Wiederholungen, eine coiled-coil-Domäne sowie ein DBB-Motiv (Dof/BCAP/BANK) auf. Es konnte gezeigt werden, dass das DBB-Motiv für die FGF-abhängige Signaltransduktion notwendig ist und für eine effiziente Bindung an den Htl-Rezeptor ausreicht (Battersby et al., 2003; Wilson et al., 2004a). Als zelluläres Substrat von Heartless wird Dof nach der Rezeptoraktivierung phosphoryliert und rekrutiert das Protein Corkscrew (Csw) in diesen Komplex (Petit et al., 2004; Wilson et al., 2004a). Corkscrew ist ein Homolog von SHP-2 aus Vertebraten und besitzt ebenso wie SHP-2 zwei aminoternale SH2-Domänen und eine zentral gelegene katalytische Domäne (Saxton und Pawson, 1999). Eine der SH2-Domänen von Csw ist für die Bindung an Dof notwendig (Petit et al., 2004).

Weitere Gene die am FGF-vermittelten Signalweg in *Drosophila* beteiligt sind, sind *sugarless* und *sulfatless*. Beide Gene kodieren für Enzyme, die essentiell für die Biosynthese von Heparansulfat-Glukosaminoglykan (HSGAGs) sind (Lin et al., 1999). Diese HSGAGs bilden die Seitenketten von Heparan-Sulfat-Proteoglykanen (HSPGs). Es konnte gezeigt werden, dass die FGFs eine hohe Affinität zu HSPGs aufweisen und HSPG als Co-Rezeptoren der FGFR dienen können (Harmer 2006).

Der Htl Rezeptor kontrolliert die Zellformveränderungen während der Mesodermmigration (Schumacher et al., 2004). Diese Zellformveränderungen sind wahrscheinlich unabhängig von der Transkription neuer Gene, da das schmale Zeitfenster zwischen der Aktivierung der Kaskade und den morphogenetischen Bewegungen des Mesoderms die Synthese neuer Proteine nicht zulässt (Wilson und Leptin, 2000). Ein Faktor, der für die Htl abhängigen Zellformveränderungen benötigt wird, ist der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Pebble (*pbl*) (Schumacher et al, 2004). Es konnte bisher allerdings nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ob Pbl ausschließlich ‚downstream‘ des Htl-Rezeptors oder parallel des FGF-Signalwegs fungiert. Pbl ist für den korrekten Ablauf der Zytokinese in den postblastodermalen Zellen notwendig (Prokopenko et al., 1999) und darüber hinaus wurde es als eine essentielle Komponente im Htl-vermittelten Signalweg für die Mesodermmigration identifiziert (Schumacher et al., 2004).

Inwieweit der FGF-Signalweg oder andere Komponente der Mesodermmigration für die vorausgehenden EMT notwendig sind, ist noch nicht bekannt. Es ist ein Ziel dieser Arbeit, dies zu untersuchen.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit soll der Prozess der EMT in Mesodermzellen während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* auf zellulärer Ebene untersucht werden. Zu diesem Zweck werden zunächst der zeitliche Verlauf sowie die subzellulären und die ultrastrukturellen Veränderungen während der EMT in Wildtyp-Embryonen untersucht. Die Rekombination zweier bekannter Mutationen, sowie genetische und immunhistologische Experimente sollten dann zeigen, inwieweit der FGF-Signalweg oder anderen involvierte Gene für Komponenten der EMT kodieren.

In einem Teilprojekt sollte die Beteiligung des mesodermal expremierten Gens *heartless* für die EMT untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt stellt die Untersuchung der Beteiligung des *pebble* Gens in der EMT dar. Um den EMT-Prozess auf zellulärer Ebene zu analysieren, wird die Zelladhäsion in Mesodermzellen während der EMT durch die Verteilung von Cadherin, sowie die Zellpolarität an Hand des apikalen Markerproteins *DPATJ* im Wildtyp und den verschiedenen mutanten Embryonen untersucht. Gleichzeitig sollen elektronenmikroskopische Untersuchungen Hinweise darüber geben, wie EMT in der frühen Mesoderm-Morphogenese die Auflösung von Zellkontakten reguliert.

Um neue Gene zu identifizieren, die für die frühe Mesoderm-Morphogenese erforderlich sein könnten, wurde ein Überexpressions-Screen durchgeführt, der in dieser Arbeit beschrieben wird. Dazu wurde das GAL4-UAS-System in Verbindung mit EP-Zielelementen verwendet und eine Kollektion von 2800 unabhängigen EP-Insertionslinien durchforstet. Potentielle Kandidatengene, die die EMT steuern, wurden dabei auf Grund der durch die Überexpression erzeugten Letalität identifiziert. Mit einer phänotypischen Charakterisierung der Überexpression einiger Kandidaten wurde in dieser Arbeit begonnen.

Diese Experimente sollen Aufschluss darüber geben, welche Mechanismen die Veränderungen in der Genexpression, der Zelladhäsion und in der Zytoskelett-Organisation regulieren, die für die EMT erforderlich sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: *Acros* (Geel, Belgien), *Baker* (Deventer, Niederlande), *Biomol* (Hamburg), *Bio-Rad* (München), *Difco* (Detroit, USA), *Fluka* (Buchs, Schweiz), *Gibco/BRL Life Technologies* (Karlsruhe), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *Serva* (Heidelberg), *Sigma-Aldrich* (Steinheim).

Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Bidest-H<sub>2</sub>O angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

Restriktionsenzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden von folgenden Firmen bezogen: *MBI Fermentas* (St. Leon-Rot), *Boehringer/Roche Diagnostics* (Mannheim), *Promega* (Madison, USA).

Für die Präparation von Plasmid-DNA und für die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurden Kits von *Qiagen* (Hilden), *Macherey-Nagel* (Düren) oder *Promega* (Madison, USA) verwendet.

#### 2.1.2 Sonstige Materialien

UV-Spektrophotometer: Gene Quant II (*Pharmacia Biotech*, Cambridge, UK); Zentrifuge (*Heraeus biofuge fresco* und *pico*); PCR-Maschine (*MS Research MiniCycler*), Ultra-Mikrotom OM2 von *Reicher*;; Konfokales Lasermikroskop: Leica TCS NT (*Leica*, Heidelberg) and Zeiss 510Meta (*Zeiss*, Jena), Photolichtmikroskop: Zeiss Axiophot2 (*Zeiss*, Oberkochen), Zeiss Elektronenmikroskop 109 (*Zeiss*, Oberkochen)

Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS und Macromedia FreeHand MX bearbeitet. Text and Kalkulationen wurden mit Microsoft Office 2003 Students Edition erstellt.

## 2.2 Gentechnische Methoden

### 2.2.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte auf Standardmedium bei 18°C, RT und 25°C. Eiablagen wurden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit einem Tupfer Hefe versehen wurden.

#### Lösungen:

Standardmedium: 356g Maisschrot, 47,5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10%iges Nipagin, 22.5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup ⇒ mit 4.9l dH<sub>2</sub>O auffüllen

Eine Liste der Fliegenstämme (Balancer Chromosomen, mutante Fliegenstämme), die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

#### **Tabelle 1: Liste der Balancer-Chromosomen (Tabelle 1a) und Fliegenstämme (Tabelle 1b), die für diese Arbeit verwendet wurden**

Die EP-Linien, die vom Stock Center Szeged, Ungarn bestellt wurden, sind unter <http://expbio.bio.u-szeged.hu/fly/index.php> in der Kategorie „Collections-EP lines“ aufgelistet.

<b>Chromosom</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Referenz</b>
1.	<i>FM7</i>	Lindsley und Zimm, 1992
2.	<i>CyO</i>	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>MKRS</i>	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>TM6b</i>	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>TM3, P[ftz::LacZ]</i>	Lindsley und Zimm, 1992

**Tabelle 1a: Balancer-Chromosomen**

Bezeichnung	Bemerkung	Referenz
<i>htl</i> <sup>AB42</sup>	Punktmutation	Gisselbrecht et al., 1996
<i>pbl</i> <sup>3</sup>	Punktmutation	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
<i>stg</i> <sup>TM</sup>	Punktmutation	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
<i>twi::Gal4</i>	Mesodermaler Treiberstamm	Ranganayakulu et al., 1996

Tabelle 1b: Mutante und transgene Fliegenstämme

### 2.2.2 Das GAL4/UAS-System

Das GAL4/UAS-System ermöglicht eine zeitlich und räumlich beeinflussbare Genexpression in *Drosophila* (Brand und Perrimon, 1993). Unter dem Einfluss entwicklungs- und gewebespezifischer Enhancer wird in einem als „Aktivator“ bezeichneten Fliegenstamm der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 expremiert. In einem zweiten, „effector“ genannten Fliegenstamm, steht das zu untersuchende Gen unter dem Einfluss von UAS-Sequenzen (upstream activating sequences), den Bindungsstellen für GAL4. Durch Kreuzung von „Aktivator“- und „Effektor“-Stamm gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur GAL4/AUS vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Enhancer (siehe Abbildung 6).

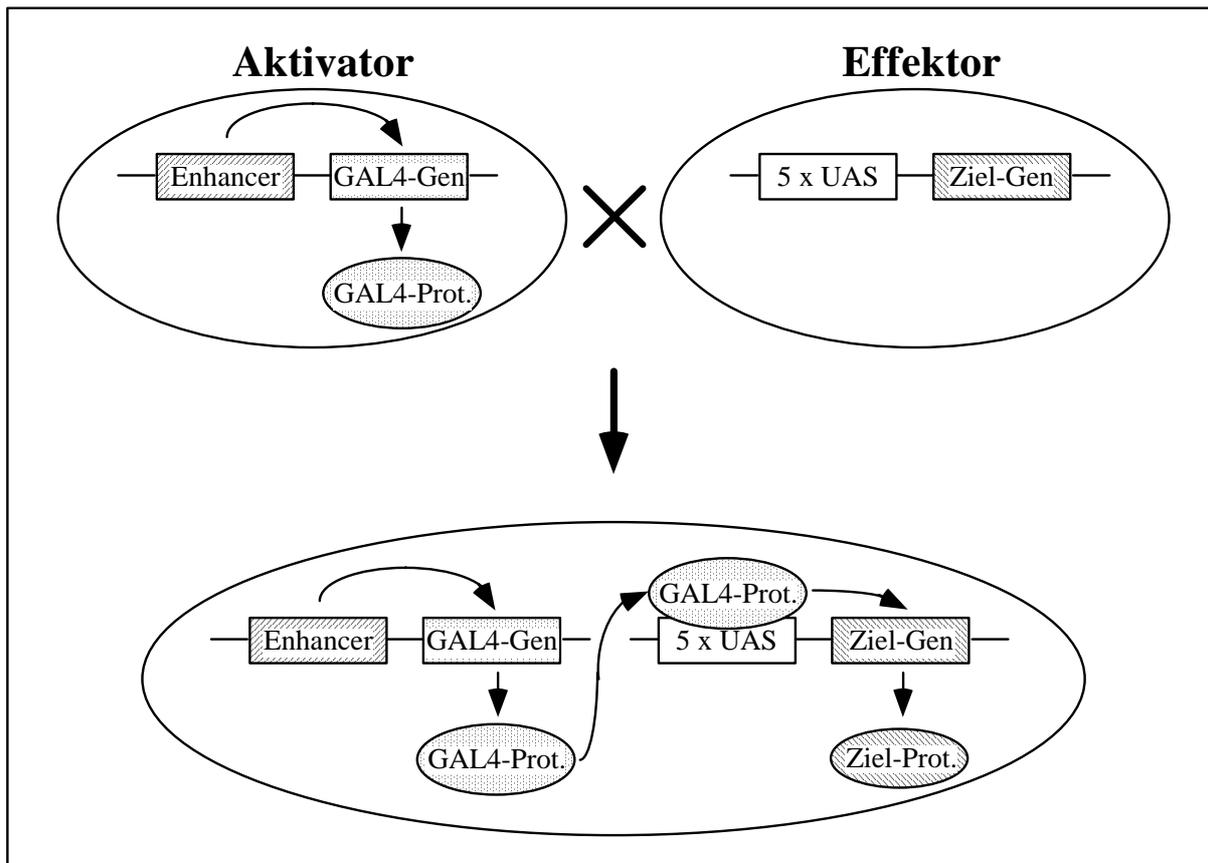
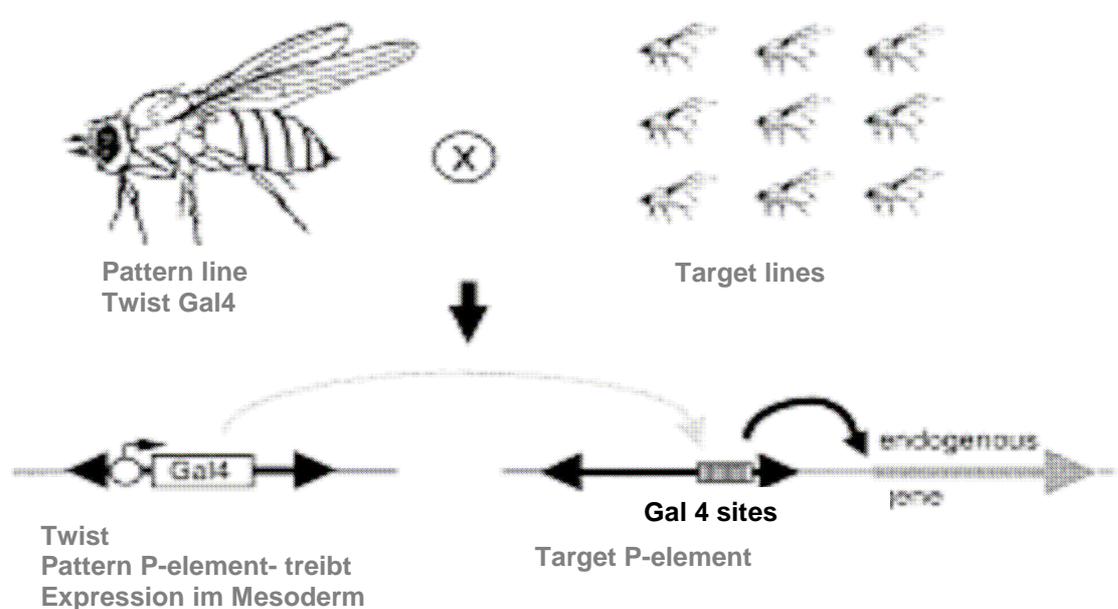


Abbildung 6: Schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems

### 2.2.3 EP vermittelter Überexpressionscreen in *Drosophila*

Ein spezielles P-Element, welches ein EP (Enhancer Promoter) trägt, ist so konstruiert, dass es die GAL4-abhängige Transkription eines dem P-Element benachbarten Gens bewirken kann (Roth et al, 1998). Dies ist in Abbildung 7 schematisch veranschaulicht. Etwa 2800 unabhängige EP Insertionslinien auf den Chromosom X, 2, und 3 sind beim Szeged *Drosophila* Stock Center (Ungarn) erhältlich. Die Insertionsorte aller dieser EP Linien sind zytologisch kartiert (siehe <http://expbio.bio.u-szeged.hu/fly/index.php>) und die Charakterisierung der gesamten Sammlung beinhaltet die Sequenzen der angrenzenden DNA. Diese Daten sind in der Datenbank von „Flybase“ ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)) verfügbar. Die 2800 bei Szeged erhältlichen EP Linien wurden für einen Überexpressionscreen in *Drosophila* verwendet, der Gene identifizieren sollte die in der frühen Mesodermmorphogenese involviert sind. Dazu wurden die EP Linien mit einem *twistGal4* Treiberstamm gekreuzt.



**Abbildung 7: Strategie des EP- Überexpressions-Screens**

Jede Ziellinie enthält ein einzelnes EP-Ziel-Element an einer bekannten Position im Genom. Gepaart mit Gal4-Fliegen erhalten die Nachkommen diese beiden Elemente. Das ermöglicht GAL4 die Bindung innerhalb des EP-Elements. Dadurch wird das Gen, das dem EP-Element direkt benachbart ist transkribiert (Rorth et al., 1998).

Alle Kreuzungen wurden bei 25°C durchgeführt und die EP Linien deren Überexpression im Mesoderm zu Letalität führten wurden weiter untersucht. Um zu testen ob die mesodermale Überexpression von Gen X mit *twi::GAL4* zu einem embryonalen Phänotyp führt bei dem die Mesodermmigration beeinträchtigt ist wurden Ablagen von den entsprechenden Linien ausgewertet. Um eine größere Menge an Embryonen zu fixieren, wurde nach dem Protokoll 2.4.1.1.1 vorgegangen. Die fixierten 5-7 Stunden alten Embryonen wurden anschließend mit dem Mesodermmarker Twist gefärbt und über Nacht-Ablagen mit dem Perikardialzellen-Marker Eve gefärbt (siehe 2.4.2.3, Tabelle 5). Von diesen Färbungen wurden Dauerpräparate angefertigt (siehe 2.4.3), die unter dem Photolichtmikroskop ausgewertet wurden.

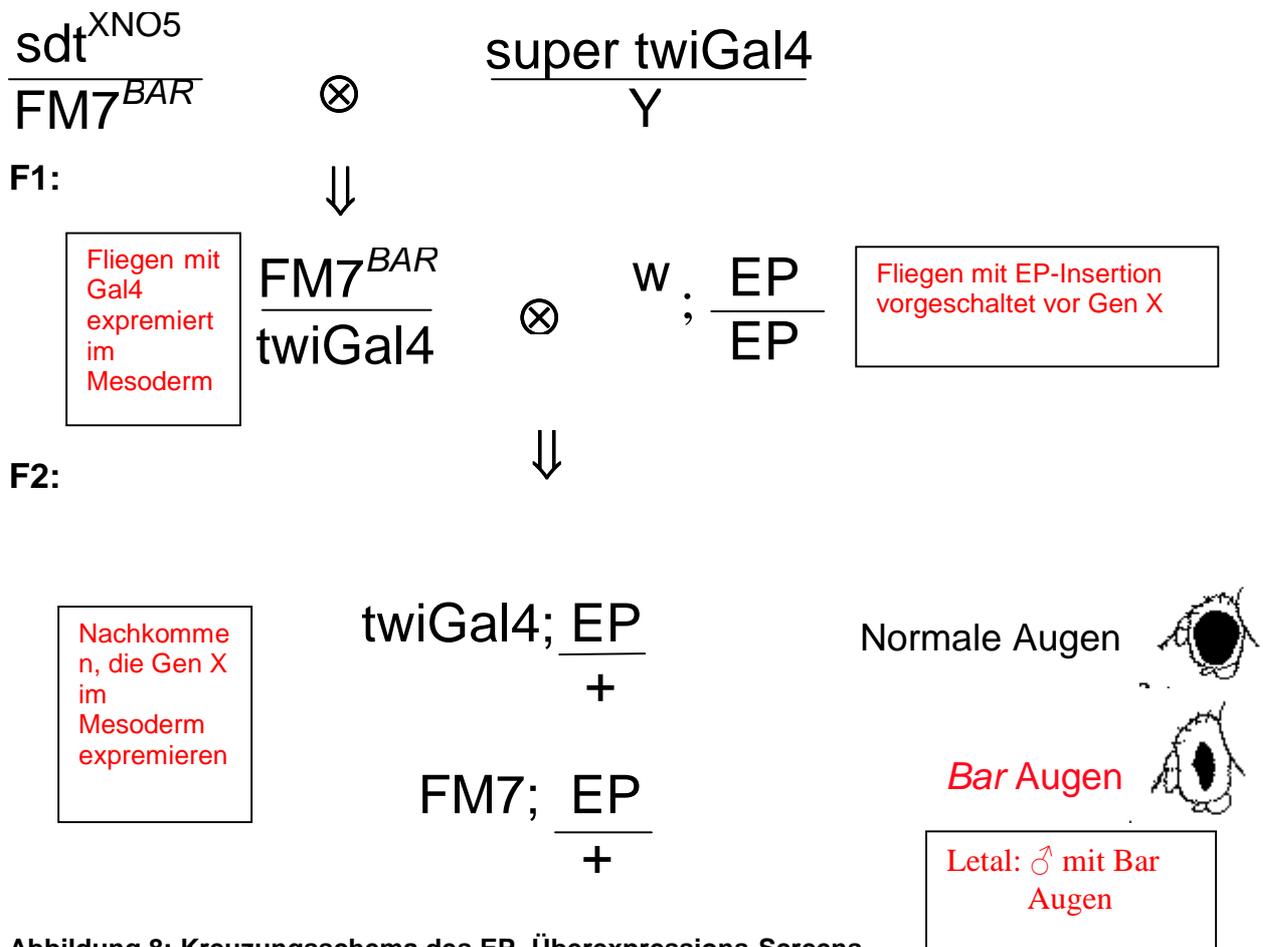


Abbildung 8: Kreuzungsschema des EP- Überexpressions-Screens

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium, dem gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt wurden (Sambrook et al., 1989).

LB-Medium: 1% Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5% NaCl → ad 1l H<sub>2</sub>O

Zur Herstellung von LB-Platten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Sowohl Flüssig- als auch Festmedien wurden zur Sterilisation bei 121°C für 20 min. autoklaviert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlung des Mediums auf 50°C. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C und 120 rpm auf dem Schüttler.

#### 2.3.1.1 Bakterienstämme

Für die Klonierung wurde *E.coli* DH5α mit dem Genotyp [F<sup>-</sup>, *lacZ*ΔM15, *recA1*, π<sup>-</sup>, *hsdR17*, *supE44*, Δ(*lacZYA*, *argF*)] verwendet.

#### 2.3.1.2 Vektoren

Für die Klonierung und Sequenzierung wurde der pCRII<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup>-Vektor von Invitrogen eingesetzt. Als Selektivmarker diente eine Ampicillinresistenz (siehe Abbildung 9: Vektorkarte mit Restriktionsschnittstellen).

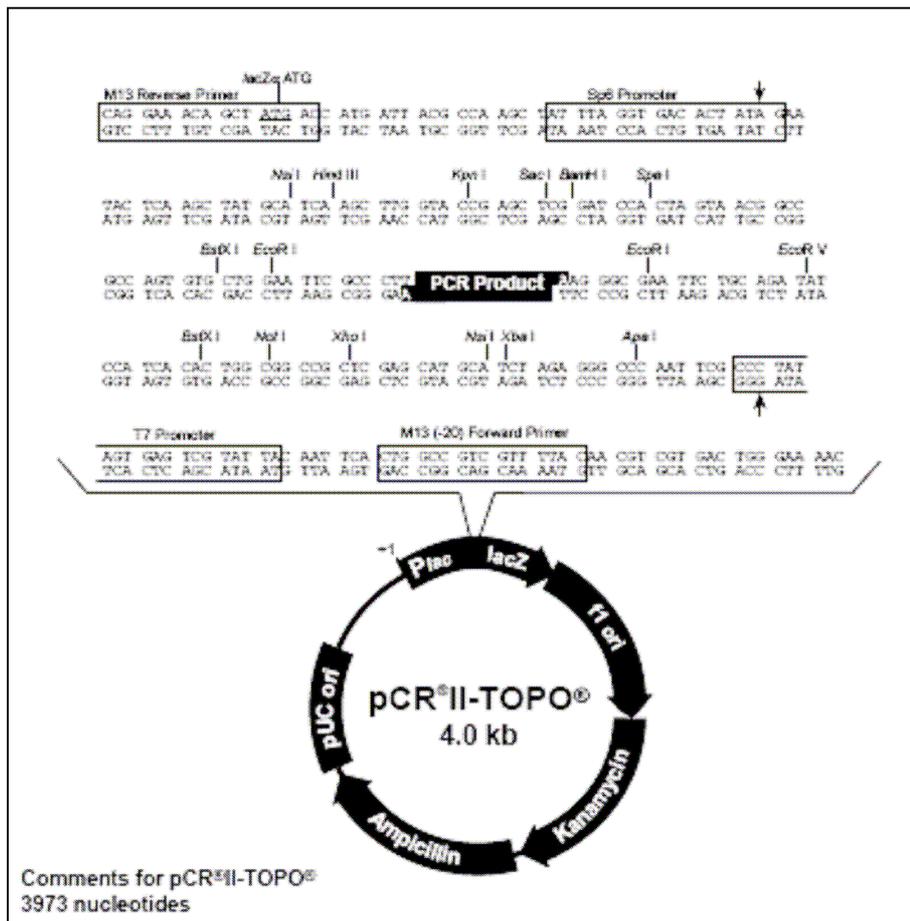


Abbildung 9: Vektorkarte von pCRII®-TOPO® mit Restriktionsschnittstellen

### 2.3.2 Transformation hitzekompetenter Bakterien

Bakterien sind in der Lage freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Man bezeichnet diesen Vorgang als Transformation. Da aber die Effizienz dieser Aufnahme nur sehr gering ist, werden Bakterien verschiedenen speziellen Behandlungen unterzogen um diese Aufnahmeeffizienz zu erhöhen. Vor der Transformation müssen die Bakterien auf die jeweils angewendete Methode vorbereitet werden.

Für die Transformation wurden DH5 $\alpha$ -*E.coli* auf Eis aufgetaut und für 30min mit dem zu transformierenden Plasmid inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gestellt und nach 2min 1ml LB-Medium zugegeben. Die transformierten Bakterien wurden 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Selektion der Transformanden wurde 200  $\mu$ l

Bakteriensuspension auf vorbereitete LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### **2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli**

#### **2.3.3.1 Plasmid-„Midi“-Präparation**

Um nach einer Transformation die Plasmid-DNA von Bakterienkolonien untersuchen und weiter verarbeiten zu können, werden Plasmide durch alkalische Lyse aus plasmidtragenden *E.coli* isoliert. Während die chromosomale DNA vollständig denaturiert wird, kann die Plasmid-DNA aufgrund ihrer supercoiled-Konformation bei einem neutralen pH-Wert wieder vollständig zu Doppelsträngen renaturieren.

Von den auf selektivem Nährboden gewachsenen Bakterienkolonien werden einzelne Klone gepickt und mit ihnen eine Übernachtskultur bei 37°C in je 1,5 ml LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Die Zellen werden am darauf folgenden Tag pelletiert (5min., 5000rpm) und anschließend in 4ml Puffer S1 resuspendiert. Das im Resuspensionspuffer enthaltene EDTA komplexiert  $Mg^{2+}$ -Ionen, die für die Aktivität von DNAsen benötigt werden. Dadurch wird ein Abbau der DNA verhindert.

Anschließend werden die resuspendierten Zellen mit 4ml Lysispuffer (S2) versetzt und vorsichtig durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Der Ansatz wird für 5 min. bei RT bis zur vollständigen Lyse der Zellen inkubiert. Durch Zugabe von 4ml Neutralisationspuffer (S3) wird die Plasmid-DNA renaturiert und die einzelsträngige chromosomale DNA, sowie die SDS-denaturierten Proteine, fallen aus. Eine 10-minütige Zentrifugation bei 11000 rpm pelletiert die Proteine und die chromosomale DNA. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA kann mit einer Pipette abgenommen werden.

Der isolierte Überstand wird mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol vermischt, wodurch die Nukleinsäuren ihre Hydrathülle verlieren. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (30 min, 13000rpm). Anschließend wird der Überstand verworfen und das Nukleinsäure-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, um die restlichen Salze und Isopropanol zu entfernen (Shapiro, 1981). Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 13000rpm) wird die DNA erneut pelletiert und unter Vakuum einige Minuten lang getrocknet. Zuletzt wird das Pellet in 120 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### Zusammensetzung der Puffer

Puffer S1: 50mM Tris/HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNase A  
(Lagerung bei 4°C)

Lysispuffer S2: 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Neutralisationspuffer S3: 3 M Kac PH 5,5

### **2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Im Agarosegel wurde die Konzentration der aufgetrennten DNA durch Vergleich der Bandenstärke mit dem Molekulargewichtsstandard abgeschätzt. Bei der GeneRuler™ 1kb DNA Leiter dient das 3kb Fragment als Referenz für 1µg DNA. Der Quotient  $OD_{260/280}$ , gemessen im Photometer, gibt Auskunft über die Reinheit der DNA-Probe.

### **2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Voraussetzung für den Einsatz von PCR-Methoden ist die Information über die Nukleotidsequenzen beiderseits des interessierenden DNA-Abschnittes und die Verfügbarkeit von geeigneten Oligonukleotiden. Die PCR besteht aus drei Schritten. Bei der Denaturierung wird die DNA durch Erhitzen auf 95°C aufgetrennt. Beim Annealing paaren sich die Primer mit der einzelsträngigen DNA, und bei der Elongation erfolgt die Synthese des Doppelstranges bei 72 °C, da hier die Taq-DNA-Polymerase ihr Optimum hat. Die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Diese Zyklen (Denaturierung, Annealing/Elongation) werden mehrmals wiederholt, wodurch winzige Mengen einer DNA-Sequenz um das Millionenfache amplifiziert werden können.

### 2.3.5.1 Standard PCR

Die PCR erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll in Tabelle 2. Für einen 50µl Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

**1 µl genomische DNA**  
**1 µl Forward-Primer (10µM)**  
**1 µl Reverse-Primer (10µM)**  
**10 µl dNTP-Mix (10 mM)**  
**10 µl Go-Taq-Puffer (5x)**  
**1 µl Go-Taq-Polymerase**  
**ad 26 µl dH<sub>2</sub>O**

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Denaturierung	5 min	95 °C
2 Denaturierung	30 sec	95 °C
3 Annealing	30 sec	55-60 °C
4 Elongation	je nach Primern 1,5 bis 4 min	72 °C
5 Finale Elongation	4 min	72 °C
6 Kühlung		4 °C
7 Ende		

Tabelle 2: Standard PCR-Programm

### 2.3.5.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide die während der PCR im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Seq Name	Seq 5' → 3'	Hersteller
<b>Snail for</b>	GAGCGGTCGGCAAAGGAT	Operon
<b>Snail rev</b>	GGCCGCCAACTACAAAAG	Operon

Tabelle 3: Zur PCR eingesetzte Oligonukleotide

### 2.3.6 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA ist durch das Phosphatrückgrat insgesamt negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung findet in einer Matrix (hier Agarose) statt, die wie ein Molekularsieb wirkt. Kleine Moleküle bewegen sich schneller hindurch als große. Agarose ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid, das sich unter anderem in TAE-Puffer (40 mM Tris-Ac, 1 mM EDTA, pH 8,0) beim Erhitzen löst und beim Erkalten zu einem Gel erstarrt. Bei einer Agarosekonzentration von 0,8 % liegt der Auftrennungsbereich linearer DNA bei ca. 0,5-10 kb. Vor dem Auftragen werden die DNA-Proben mit einem Blaumarker (0,09 % Bromphenolblau, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt, damit die Probe in die Tasche absinkt und eine Visualisierung im Gel erfolgen kann. DNA-Moleküle werden im Gel durch Ethidiumbromid sichtbar, das zwischen die Basenpaare interkaliert und durch Anregung im UV-Bereich fluoresziert. Die DNA-Moleküle werden in der Regel für ca. 20 min bei 110 V gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.3.7 Restriktionsverdau

Um DNA in Fragmente bestimmter Größe zu schneiden, werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die dadurch charakterisiert sind, dass sie die DNA an spezifischen palindromen Nukleotidsequenzen schneiden, wodurch je nach Enzym, entweder glatte Enden (blunt ends) oder kohäsive Enden (sticky ends) entstehen (Roberts & Macelis, 1996). Die Hydrolyse der DNA fand in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer statt. Der Verdau genomischer DNA erfolgte über Nacht und der von Plasmid-DNA für 2 h bei 37 °C. Der Erfolg der Restriktion wurde durch eine Gelelektrophorese überprüft.

Vektor	Wirt	Schnittstelle	Puffer	Verwendung	Hersteller
pCRII <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup>	DH5 $\alpha$	Eco RI	Puffer H	Ansequenzierung (siehe Anhang)	Fermentas
pCRII <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup>	DH5 $\alpha$	Hind III	Puffer B	Erstellung der anti- sense-Sonde	Fermentas

Tabelle 4: Verwendete Restriktionsenzyme

### 2.3.8 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Primern, überschüssigen Nukleotiden, Polymerasen und Salzen wurden die PCR-Produkte mit dem *PCR Clean-UP System Kit* von Promega aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die DNA in 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.3.9 DNA Analyse

Die DNA Sequenzierung erfolgte durch die Firma *SeqLab* (Göttingen). Die Sequenz-Analyse erfolgte mittels Lasergene von *DNASTAR, Inc.* (Madison, USA) (siehe Anhang).

### 2.3.10 Detektion von RNA

#### 2.3.10.1 Erstellung von RNA-Sonden

Die Erstellung von Sonden ist notwendig, um gezielt eine gesuchte Nukleotidsequenz in einem Gemisch von mRNA zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine RNA-Sonde erstellt, die spezifisch an Bereiche der snail mRNA bindet.

#### 2.3.10.2 Markierung der anti-sense RNA-Sonde

Für die Markierungsreaktion durch in vitro Transkription wird 1  $\mu$ g des verdauten Vektors eingesetzt und noch jeweils 1/10 Volumen 10x DIG-RNA-Labeling Mix (10

mM ATP, GTP, CTP; 6,5mM UTP; 3,5mM DIG-UTP; pH 7,5), 10x Transkriptionspuffer (400 mM Tris-Cl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 U RNase-Inhibitor; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM Dithiothreitol; 20 mM Spermidin) und T7-RNA-Polymerase (20 U/μl). Der Ansatz wird mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der Vektor durch Zugabe von 2 U DNase I (RNase-frei) für 15 min bei 37°C abgebaut. Abschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 2μl 0,2M EDTA, pH 8,0 und 0,5μl RNase-Inhibitoren gestoppt. Die Transkripte werden dann gefällt, in 20 μl DEPC-H<sub>2</sub>O (+ RNase-Inhibitor) aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 2.3.10.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

RNA-Moleküle werden wie DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Allerdings sind dafür denaturierende Bedingungen notwendig, da einzelsträngige RNA unter nativen Bedingungen Sekundärstrukturen ausbildet und somit das Laufverhalten beeinflusst wird. Als Denaturierungsmittel dienen hier Formaldehyd und deionisiertes Formamid. Die Carbonylgruppen des Formaldehyds bilden mit den freien Aminogruppen der Basen Aminale, die die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindern. Für das Gel wird 1,5 % Agarose in 1x MOPS (10x MOPS: 200 mM 3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure; 50 mM NaAc; 10 mM EDTA; auf pH 7 einstellen) unter Kochen gelöst und, nachdem die Lösung auf 70 °C abgekühlt ist, mit Formaldehyd auf eine Konzentration von 1,9 % eingestellt. Die RNA-Probe wird dann wie unten beschrieben präpariert. Der gesamte Ansatz wird für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Probe wird mit 3 μl des Blaumarkers (0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol; 10 mM EDTA, pH 7,5; 70 % Glycerin) gemischt und sofort aufgetragen. Der Gellauf für ein großes Gel dauert ca. 2-3 h bei 140 V. Als Laufpuffer wird 1x MOPS verwendet.

RNA-Probe: 3 μl RNA (eventuell + DEPC-H<sub>2</sub>O)  
2 μl Formaldehyd (37 %)  
1,5 μl 10x MOPS  
1 μl Ethidiumbromid (400 μg/ml)  
5 μl deionisiertes Formamid

## 2.4 Histologische Methoden

### 2.4.1 Fixierung von Embryonen

#### 2.4.1.1 Formaldehydfixierung

Embryonen im gewünschten Alter wurden dechorionisiert (ca. 3-5 min in 6,5 % Natriumhypochlorid) und anschließend gut mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurden die Embryonen in Szintillationsröhrchen mit 4ml Fixierlösung (4% Formaldehyd in PBS) und 4ml Heptan überführt und 25min auf dem Schüttler fixiert. Die untere Phase (wässrige Fixativ) wurde abgezogen, 4ml Methanol zugegeben und 30sec geschüttelt, wodurch sich bei den fixierten Embryonen die Vittellinmembran ablöst. Im Anschluss daran wurden die Embryonen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 3x mit Methanol gewaschen und in Methanol bei -20°C gelagert. Alternativ wurde Stefanini-Lösung zum Fixieren benutzt.

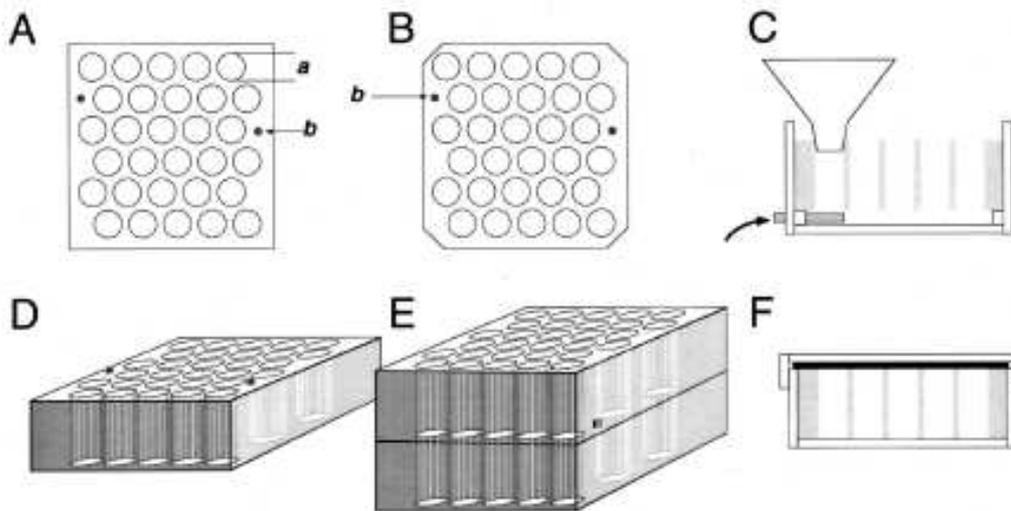
#### Lösungen

Stefanini-Lsg. : 4 % Formaldehyd, 75mM Pipes, 15% Pikrinsäure in H<sub>2</sub>O

10x PBS : 1,3 M NaCl; 70mM NaHPO<sub>4</sub>; 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### 2.4.1.1.1 Schnelle und effiziente Massenfixierungen von Embryonen

Die Embryonen wurden wie beschrieben in 2.4.1.1 fixiert, nur dass die Fixierungen in großen Plexiglasblöckchen mit 30 Vertiefungen pro Block (siehe Abbildung 10) erfolgte, um eine größere Menge von verschiedenen Fliegenstämmen gleichzeitig fixieren zu können.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Sammelblöcke**

Ein Sammelblock besteht aus zwei identischen asymmetrischen Blöcken (A, B), die durch Metallstifte miteinander verbunden werden können (E). Die Fliegen werden durch einen Trichter in die einzelnen Vertiefungen überführt (C). Die Vertiefungen sind mit einem Netz bespannt und wurden zur Stimulation der Eiablage mit Hefe bestrichen (Klämbt et al., 1997).

## 2.4.1.1.2 Fixierung von Embryonen für die Elektronenmikroskopie

### 2.4.1.1.2.1 Glutaraldehydfixierung

Embryonen im gewünschten Alter wurden dechorionisiert (ca. 3-5 min in 6,5 % Natriumhypochlorid) und anschließend gut mit  $H_2O$  gewaschen. Dann wurden die Embryonen in Szintillationsröhrchen mit 2,5 ml Fixierlösung überführt und 20 min „über Kopf“ fixiert. Im nächsten Schritt wurde das Heptan abgesaugt und die Embryonen mit einem Netz aus dem Fixativ herausgefischt, mit Phosphatpuffer gewaschen und mit einem Pinsel auf doppelseitigem Klebeband verteilt. Um eine Austrocknung der Embryonen zu vermeiden wurden diese erneut mit Phosphatpuffer benetzt. Mit einer Kanüle wurden die Embryonen mechanisch devitellinisiert („hand-peeling“) und mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Abschließend erfolgte zweimalig eine Waschung mit Phosphatpuffer.



### Lösungen:

Lösung A: 500 µl 4% Osmium + 500 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2

Lösung B: 100 µl 50 % Glutaraldehyd + 1,15 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2

**Lösung A und B werden kurz vor Gebrauch 1:1 miteinander gemischt**

## **2.4.2 Antikörperfärbungen an Embryonen**

### **2.4.2.1 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz ermöglicht die Detektion bestimmter Proteine in Zellen und Geweben. Grundlage dieser Methode ist die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an Antikörpermoleküle, die als hochspezifische Nachweisreagenzien selektiv an bestimmten zelluläre Strukturen binden. Dieses Verfahren eignet sich somit besonders für Lokalisationsstudien.

Die fixierten Embryonen wurden 3x mit PBT für jeweils 20 min. gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Blockierlösung für 45 min. bei RT gesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 5a) in Blockierlösung über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen 3x mit PBT jeweils für 20 min. gewaschen und mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 5b) in Blockierlösung für 2 Stunden bei RT inkubiert. Bei einigen Färbungen wurde in diesem Schritt DAPI (1:1000 von einer 1 mg ml<sup>-1</sup> Lösung) dazugegeben um die DNA zu färben. Nach weiteren 3 Waschschritten mit PBT für jeweils 20 min, wurden die Embryonen in Mowiol eingebettet, um eine Ausbleichung der Fluoreszenz während der konfokalen Mikroskopie zu vermeiden.

### Lösungen

PBT: 1 x PBS mit 0,1% Tween 20

Blockierlösung: 1xPBT + 10% NHS (Normal Horse Serum)

### 2.4.2.2 Immunmarkierung mit Enzym-gekoppelten Antikörpern

Die ersten Schritte entsprechen denen der Immunfluoreszenz wie unter 2.4.2.1 beschrieben.

#### 2.4.2.2.1 HRP-(Peroxidase) Färbung mit Verstärkersystem

Hierzu wurden Enzym markierte Sekundärantikörper (Tabelle 5b), die mit Biotin gekoppelt sind, verwendet. Nach der 2-stündigen Inkubation wurden die Embryonen 3x jeweils 20 min. mit PBT gewaschen. In dieser Zeit wurde das AB-Verstärkergemisch angesetzt und 30 min. bei RT inkubiert. Dabei wurden zu 1000 µl PBT, 10µl Lösung A + 10µl Lösung B gegeben und vermischt. Anschließend wurden die Embryonen im AB-Gemisch für 45 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgten 3 weitere Waschungen mit PBT. Während des letzten Waschschritts wurde DAB aufgetaut und eine 1:1 Mischung mit PBS hergestellt. Dieses Reaktionsgemisch wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt, auf die Embryonen gegeben und solange inkubiert bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Farbreaktion mit PBT gestoppt. Im Anschluss daran kann man eine AP-Färbung (siehe 2.4.2.2.2) durchführen oder die Embryonen als Dauerpräparat (siehe 2.4.3.1) einbetten.

#### Lösungen

DAB -Färbelösung: 800µl 1xPBT + 200µl DAB-Stock (vorher aktiviert mit 1-2µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

DAB-Stock: 1mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, *Aldrich*, Steinheim) in 1xPBS, gelagert bei -20°C

### 2.4.2.2.2 AP (alkalische Phosphatase) Färbung

Hierzu wurden Enzym markierte Sekundärantikörper (Tabelle 5b), die mit AP gekoppelt sind, verwendet. Die Embryonen wurden 2x jeweils 15 min. mit PBT und dann 2 x 10 min mit AP-Puffer gewaschen. In dieser Zeit wurde die AP-Färbelösung angesetzt, auf die gewaschenen Embryonen gegeben und solange inkubiert bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde. Anschließend wurde die Farbreaktion mit PBT gestoppt und ein Dauerpräparat (siehe 2.4.3.1) angefertigt.

#### Lösungen:

AP-Puffer: 100mM Tris pH 9,5; 50mM  $MgCl_2$ ; 100mM NaCl; 0,1% Tween 20

AP-Färbelösung: 1ml AP-Puffer + 3,4 $\mu$ l NBT + 3,0  $\mu$ l BCIP

### 2.4.2.3 Verwendete Antikörper

Für die Färbungen an den Embryonen wurden folgende Erst- und Zweitantikörper verwendet.

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Referenz
Neurotactin	Maus	1:20	Hortsch et al., 1990
DE-cadherin	Ratte	1:20	Uemura et al., 1996
$\beta$ -gal	Maus Kaninchen	1:1000 1:5000	Promega Cappel
Even Skipped	Maus	1:50	DSHB
twist	Kaninchen	1:100	S.Roth, Köln
DPATJ	Kaninchen	1:100	Richard et al., 2006

**Tabelle 5a: Verwendete Primärantikörper.**

Aufgelistet sind hier die verschiedenen Primärantikörper, die für Färbungen an Embryonen eingesetzt wurden.

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Ziege $\alpha$ Kaninchen	Biotin, Cy2, AP	1:200	Dianova
Ziege $\alpha$ Maus	Cy2, AP, Biotin, Alexa 647	1:200	Dianova
Ziege $\alpha$ Ratte	Cy3	1:200	Dianova

**Tabelle 5b: Verwendete Sekundärantikörper.**

Aufgelistet sind hier die verschiedenen Sekundärantikörper, die für die Färbungen an Embryonen eingesetzt wurden.

## 2.4.3 Dauerpräparate von Embryonen

### 2.4.3.1 Einbettung in Araldit

Die gefärbten Embryonen (siehe 2.4.2) wurden 3x 10 min mit PBT gewaschen und anschließend durch eine Alkoholreihe (jeweils 5 min mit 30%, 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol und 10 min mit 100% Aceton) entwässert. Die entwässerten Embryonen wurden in einem 1:1 Gemisch aus Araldit und Aceton über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen mit abgeschnittenen Pipettenspitze auf einem Objektträger überführt und mit einer Wimper orientiert. Das Aceton wurde über Nacht bei 65°C abgedampft und vorgehärtet. Die Embryonen wurden in 100% Araldit eingebettet und über Nacht bei 65°C ausgehärtet.

#### Herstellung von Araldit:

Araldit (50 g) :        27,175 g Durcupan Komponente A/M  
                           23,705 g Durcupan Komponente B  
                           Zusammen 1 Stunde über Kopf schütteln. Darauf dann:  
                           1,75 g Durcupan Komponente C  
                           1,00 g Durcupan Komponente D  
                           Zusammen nochmal eine Stunde im „Überkopfschüttler“  
                           inkubieren.

## 2.4.3.2 Querschnitte von Embryonen

### 2.4.3.2.1 Semi-Dünnschnitte für die Photolichtmikroskopie

Die Embryonen wurden wie in 2.4.3.1 beschrieben entwässert und in Araldit/Aceton über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen mit abgeschnittener Pipettenspitze in eine Kunststoffform gelegt, dabei senkrecht zur anterior-posterioren Achse ausgerichtet und mit 100% Araldit aufgefüllt. Pro Ausstülpung in der Form werden 2-3 Embryonen eingebettet. Das Araldit in den Formen wurden über Nacht bei 65°C polymerisiert. Am nächsten Tag wurden die Araldit-Blöckchen mit einem Mikrotom (Glasmesser) geschnitten, auf einem Objektträger aufgezogen und getrocknet. Für die Photolichtmikroskopie wurden 5µm dünne Schnitte (Semi-Dünnschnitte) angefertigt. Nach vollständiger Trocknung wurden die Schnitte in 100% Araldit eingebettet und anschließend mikroskopiert.

### 2.4.3.2.2 Ultra-Dünnschnitte für die Elektronenmikroskopie

Die Schneide-Prozedur ist analog den Semidünnschnitten (siehe 2.4.3.2.1). Die Embryonen im Aralditblock wurden mit einem Ultra-Mikrotom geschnitten, wobei die Schnittdicke ungefähr 50 Angstrom (5nm) entspricht und als Schneidewerkzeug ein Diamant verwendet wurde. Anschließend wurden die Schnitte auf Nickelnetze ausgelegt und mit Uranylacetat und Litiumchlorid kontrastiert. Dann kamen die Netze in eine Aufbewahrungsbox und konnten für die Elektronenmikroskopie verwendet werden.

## 2.4.4 In situ-Hybridisierung

DIG-markierte RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription mit Hilfe des DIG RNA Labeling Mix von *Roche Diagnostics*, Mannheim, nach Angaben des Herstellers gewonnen. Qualität und Quantität der RNA-Sonden wurden durch denaturierende Gelelektrophorese ermittelt (siehe molekularbiologische Methoden).

Bei der *in situ* Hybridisierung kommt es zu einer komplementären Basenpaarung zwischen markierter Sonde und der einzelsträngigen RNA in fixierten Embryonen. Die Embryonen wurden in einem Gemisch aus Natriumhypochlorid und H<sub>2</sub>O (1:1) ca. 5 min dechoronisiert, mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit 4%

Formaldehyd fixiert (siehe 2.4.1.1). Im Anschluss daran wurden die Embryonen nach der Methanolbehandlung zweimal mit Ethanol gewaschen und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Embryonen wurden dann in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Ethanol für 30 min inkubiert und kurz 5x mit Ethanol, 2x mit Methanol und 3x mit PBT gewaschen. Dann folgte ein zweiter Fixierungsschritt, wobei die Embryonen 25 min mit 5% Formaldehyd in PBS inkubiert wurden. Anschließend wurden die Embryonen erneut 5x kurz mit PBT gewaschen, kurz in einem 1:1 Gemisch aus PBT und Hybridisierlösung inkubiert und 3x in Hybridisierlösung gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 1 Stunde bei  $63^{\circ}\text{C}$  in Hybridisierlösung vorhybridisiert. 2  $\mu\text{l}$  der DIG markierte anti-sense RNA Sonde wurde für 5 min. bei  $63^{\circ}\text{C}$  in 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierlösung denaturiert. Anschließend wurden die Embryonen mit der anti-sense RNA Sonde enthaltenden Hybridisierlösung über Nacht bei  $63^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen 4x jeweils 15 min mit Hybridisierlösung bei  $63^{\circ}\text{C}$  und noch einmal kurz in einem 1:1 Gemisch aus Hybridisierlösung und PBT gewaschen. Danach wurden die Embryonen bei RT 4x mit PBT gewaschen und für 1 Stunde mit präabsorbierten DIG-Antikörper (1:2000, verdünnt mit PBT) inkubiert. Dann erfolgten 4 Waschschriffe für 15 min mit PBT und Waschschriffe für 3x 5 min mit NBT-Puffer. Abschließend wurden die Embryonen in einer Färbelösung inkubiert bis die erwünschte Farbtintensität erreicht wurde. Die Farbreaktion wurde mit PBT gestoppt. Wenn die Embryonen mit einem lacZ markierten Balancerchromosom ausgestattet waren, wurde zusätzlich noch eine anti- $\beta$ -Gal-Färbung durchgeführt (siehe 2.4.2.2) und ein Dauerpräparat angefertigt (siehe 2.4.3).

### Lösungen

Hybridisier-Lösung: 50% deionisiertes Formamid, 5xSSC, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  denaturierte Lachsspermien-DNA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Heparin, 0.1% Triton X-100

NBT-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Triton X-100

NBT: 75 mg/ml Nitroblau-Tetrazolium-Salz in DMF

BCIP: 50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Toluidin-Salz in DMF

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Eine Rolle des FGF-Signalweges im Epithel-Mesenchym-Übergang (EMT) in der Mesoderm- Morphogenese

Epitheliale Zellen sind über Zell-Zellkontakte miteinander verbunden und weisen eine apikal-basale Zellpolarität auf. Während der frühen Mesoderm-Morphogenese lösen sich die Mesodermzellen voneinander, verlieren ihren epithelialen Charakter, nehmen mesenchymale Eigenschaften an und erlangen dadurch die Fähigkeit zur Migration. Diesen Prozess bezeichnet man als EMT.

Die Mesodermwanderung in *Drosophila* wird durch die Aktivität des FGF-Rezeptors Heartless (*Htl*) und des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Pebble (*Pbl*) kontrolliert (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Schumacher et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese beiden Faktoren auch im EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese eine Rolle spielen, da dieser Prozess eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Wanderung des Mesoderms ist. Um Komponenten für die Regulation der EMT zu finden, wurden genetische und histologische Ansätze gewählt.

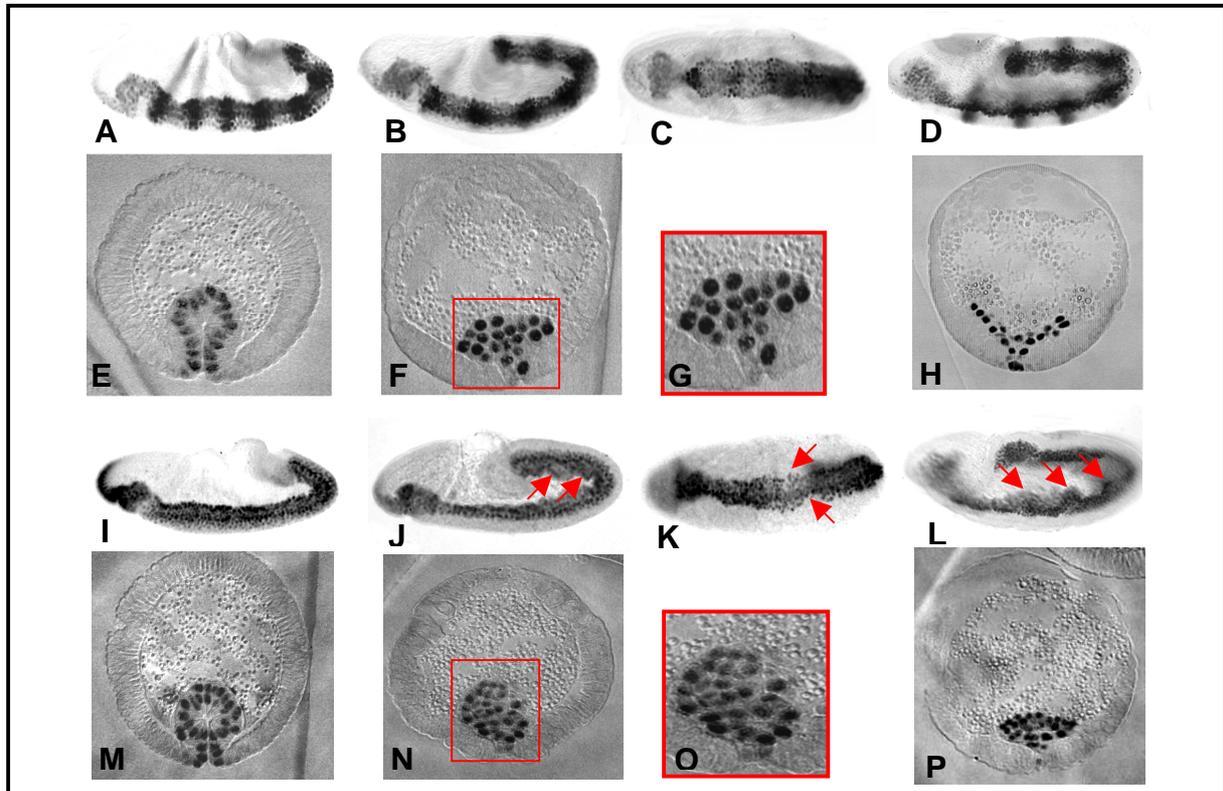
##### 3.1.1 Mesodermspezifische Funktion von *Htl*

Um die Funktion des Gens *htl* für die EMT zu untersuchen, wurden zunächst *htl* mutante Embryonen immunhistochemisch untersucht. Als immunologischer Marker, der es ermöglicht, Defekte während der Mesodermzellwanderung aufzudecken, wurde ein Antikörper gegen das Mesoderm spezifische Kernprotein Twi verwendet.

Während der Gastrulation kommt es zu einer deutlichen Verlängerung des Keimstreifens. Da diese Vorgänge innerhalb einer Eihülle gleich bleibender Größe erfolgen, führt dies zu einer Streckung entlang der Dorsalseite des Embryos (Abb. 11 A, B, D). Die Keimstreifenausstreckung ist ein Indikator für die verschiedenen Stadien in der Embryogenese, die somit in bestimmte Phasen unterteilt werden können.

Der erste Schritt der Gastrulation ist die Internalisierung der präsumptiven Mesodermzellen, die durch die Invagination des Epithels ermöglicht wird. In Stadium 7 wird dadurch die mesodermale Röhre gebildet (Abb. 11 E). In Wildtyp-Embryonen beginnt die EMT nach Stadium 7. Dabei zerfällt die mesodermale Röhre, die Zellen

durchlaufen mitotische Zellteilungen (Abb. 11 F und G) und beginnen in dorso-lateraler Richtung zu wandern (Abb. 11 H). In dieser Phase befinden sich die Mesodermzellen als Aggregat auf dem ventralen Ektoderm.



**Abbildung 11: Defekte während der frühen Mesoderm-Morphogenese in  $htl^{AB42}$  mutanten Embryonen**

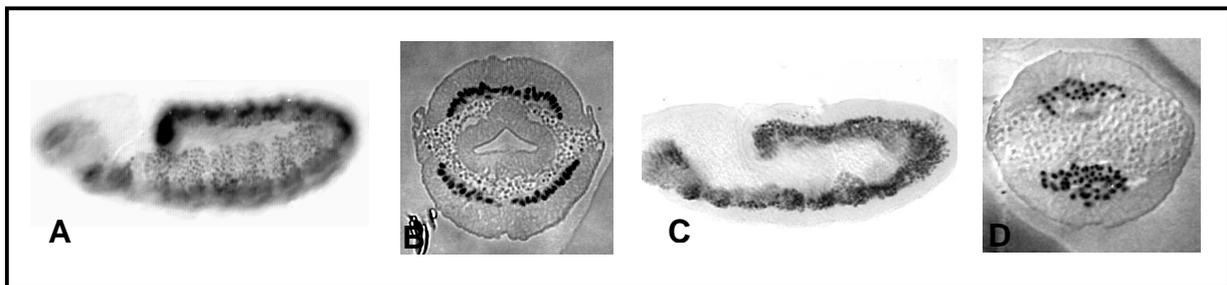
Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi (dunkelgrau) und gegen  $\beta$ -Galaktosidase (schwarz) gefärbt. (A, B und D) Laterale Gesamtansicht auf  $htl$  heterozygote Embryonen. Embryonen, die mindestens eine Wildtypkopie von  $htl$  tragen, zeigen eine schwarze Färbung in 7 segmentalen Streifen, die auf die Anwesenheit des TM3(*ftz::lacZ*) Balancerchromosoms zurückzuführen ist. (C) Ventrale Ansicht eines  $htl$  heterozygoten Embryo in Stadium 8. (E, F, G und H) Querschnitte von  $htl$  heterozygoten Embryonen.  $htl$  heterozygote Embryonen verhalten sich wie der Wildtyp. Im Wildtyp wird während der Gastrulation ([E]; Stadium 7) die mesodermale Röhre gebildet. Zu Beginn von Stadium 8 zerfällt diese Röhre [F, G (Vergrößerung)], die Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter, durchlaufen mitotische Zellteilungen und beginnen sich in dorsal-lateraler Richtung auszubreiten [H]. Während der beschriebenen Gastrulationsvorgänge kommt es zu einer deutlichen Verlängerung des Keimstreifens [A,B,D] und in Stadium 8 beginnen die Zellen langsam mit ihrer Ausbreitung [C]. (I, J und L) Laterale Ansicht auf Embryonen homozygot mutant für  $htl^{AB42}$ . (K) Ventrale Ansicht auf einen Embryo homozygot mutant für  $htl^{AB42}$  in Stadium 8. Die Pfeile heben Unregelmäßigkeiten in der Mesodermausbreitung von  $htl$  mutanten Embryonen hervor. (M, N, O und P) Querschnitte von Embryonen homozygot mutant für  $htl^{AB42}$ , Anterior ist links und dorsal ist nach oben gerichtet.

In Stadium 8 weisen  $htl$  mutante Embryonen Mesodermwanderungsdefekte auf (Abb. 11 J-L). Wie die ventrale Ansicht von  $htl$  mutanten Embryonen zeigt, ist die lineare Anordnung der invaginierten Mesodermzellen entlang der ventralen Mittellinie gestört. Die invaginierten Mesodermzellen scheinen sich in  $htl$  mutanten Embryonen beliebig zu einer der lateralen Seiten zu verteilen, wodurch eine „schlangenartige“

Struktur entsteht (vgl. Abb. 11 C mit K) (Schumacher et al., 2004). In Querschnitten von *htl* mutanten Embryonen dieses Stadiums (Abb. 11 O-P) wird ebenfalls deutlich, dass das Mesoderm nicht gleichmäßig auf beiden Seiten des Ektoderms verteilt ist. Zusätzlich scheint der Kontakt zwischen Ektoderm und Mesoderm gestört zu sein (Abb. 11 P).

Bis zum frühen Stadium 9 haben sich die wildtypischen Mesodermzellen auf dem Ektoderm ausgebreitet und liegen als einschichtiges Gewebe vor, das im Bereich der ventralen Mittellinie voneinander getrennt ist (Abb. 12 B).

In *htl* mutanten Embryonen im frühen Stadium 9 ist hingegen erkennbar, dass der Wanderungsprozess der Zellen gestört ist. Es hat zwar eine Ausbreitung stattgefunden, aber diese ist nicht vollständig und nur unregelmäßig, so dass das Mesoderm kein einschichtiges Gewebe bildet (Abb. 12 D).



**Abbildung 12: Mesodermwanderungsdefekte in *htl* mutanten Embryonen**

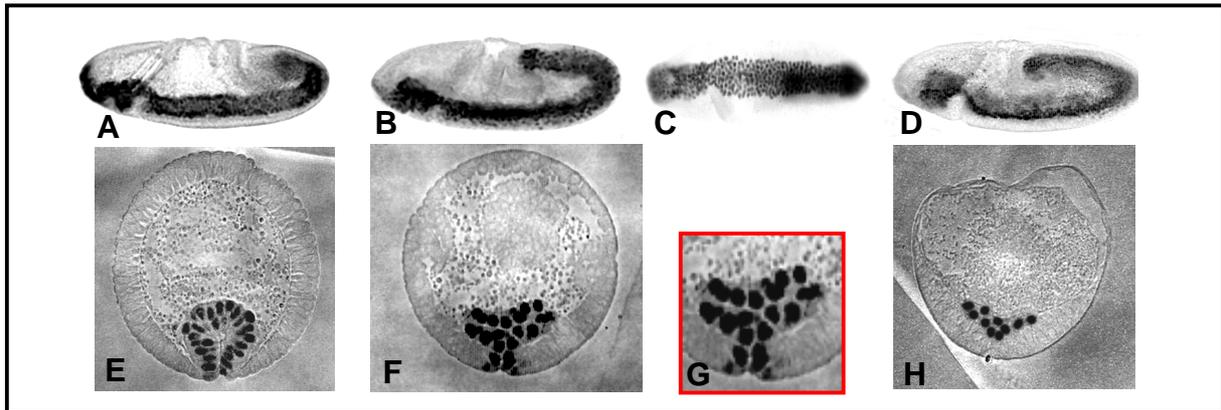
Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi gefärbt (grau/schwarz). (A) Gesamtansicht eines Wildtyp-Embryo. (B) Querschnitt von Wildtyp-Embryonen. (C) Gesamtansicht eines homozygoten *htl*<sup>AB42</sup> Embryo. (D) Querschnitt von *htl*<sup>AB42</sup> homozygot mutantern Embryo. ([A, B, C und D]; Stadium 9); Während im Wildtyp die mesodermalen Zellen als einschichtiges Gewebe vorliegen (B), verbleiben *htl*<sup>AB42</sup> mutante Mesodermzellen als Aggregat auf dem Ektoderm (D).

### 3.1.2 Das mitotische Programm ist für die korrekte Abfolge der frühen Mesoderm-Morphogenese entbehrlich

Wie oben gezeigt, vollziehen die Mesodermzellen in *htl* mutanten Embryonen anscheinend eine normale EMT und normale Zellteilungen kurz nach der Internalisierung; sie wandern dann allerdings nicht wie wildtypische Zellen nach dorsal. Somit kann man auf Grund dieser Ergebnisse keine direkte Funktion von Htl für die EMT ableiten. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass Htl im

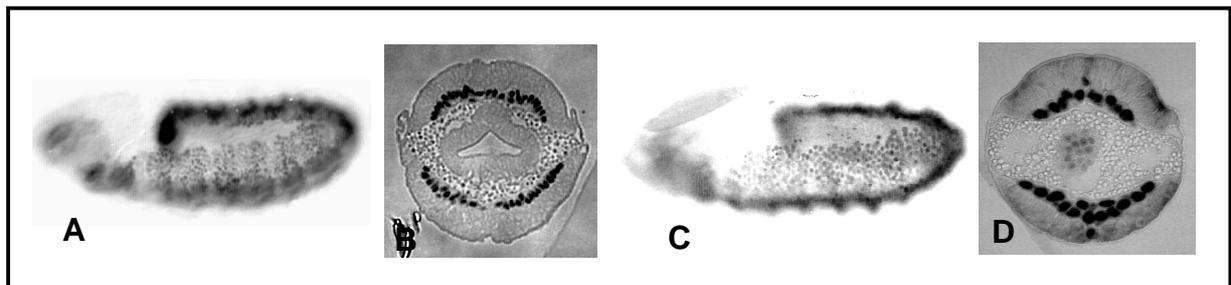
Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Prozessen die EMT reguliert und durch diesen redundant wirkende Mechanismus könnte der Phenotyp von *htl* mutanten Embryonen maskiert sein. Einer der potentiellen Mechanismen der redundant zu Htl die EMT regulieren könnte, ist die Mitose, die kurz nach der Invagination des Mesoderms stattfindet. Während dieser Phase lösen die Zellen ihre Zellkontakte untereinander auf. Somit könnte dieser durch die Mitose ausgelöster Prozess den Verlust der epithelialen Charakteristika in *htl* Mutanten auslösen. Um diese Frage zu untersuchen, wurde zunächst der Anteil des mitotischen Programms am Verlust der Zellkontakte/des epithelialen Charakters während des EMT analysiert.

Zu diesem Zweck wurde ein genetisches Werkzeug genutzt, um die Mitose in postblastodermalen Stadien zu inhibieren. In *Drosophila* Embryonen werden postblastodermale Zellteilungen durch die zygotische Expression der String (Cdc25) Phosphatase in der G2-Phase über die Cyclin/cdc2-Kinase aktiviert (Edgar and O'Farrell, 1990). In *string (stg)* mutanten Embryonen ist der Zellzyklus komplett blockiert, da alle Zellen in der G2-Phase vor Zyklus 14 arretieren, was zur embryonalen Letalität führt (Edgar und O'Farrell, 1989). Dennoch zeigen Embryonen, die homozygot für *stg* sind, eine normale Abfolge des EMTs (Abb. 13) und es erfolgt eine dorsolaterale Ausbreitung (Abb. 13 H). Und auch in späteren Stadien lassen sich in *stg* Mutanten keine Migrationsdefekte nachweisen (Abb. 14 C,D). Der einzig erkennbare Unterschied zum Wildtyp besteht darin, dass die einzelnen Mesodermzellen in *stg* mutanten Embryonen im späten Stadium 8, zum Beginn der Wanderung, eine größere Zellform aufweisen, da sie sich nicht teilen (vgl. Abb. 11 H).



**Abbildung 13: *stg* mutante Embryonen zeigen normale Mesodermmorphogenese.**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi (dunkelgrau) gefärbt. (A, B und D) Laterale Ansicht auf Embryonen homozygot mutant für *stg*<sup>7M</sup>, (C) Laterale Ansicht auf einen *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryo in Stadium 8. (E, F, G und H) Querschnitte von homozygoten *stg*<sup>7M</sup> Embryonen; *Stg*<sup>7M</sup> mutante Embryonen zeigen eine wildtypische Abfolge der EMT. Zu Beginn von Stadium 8 zerfällt diese Röhre [F, G (Vergrößerung)], die Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter und beginnen sich in dorsal-lateraler Richtung auszubreiten (H).



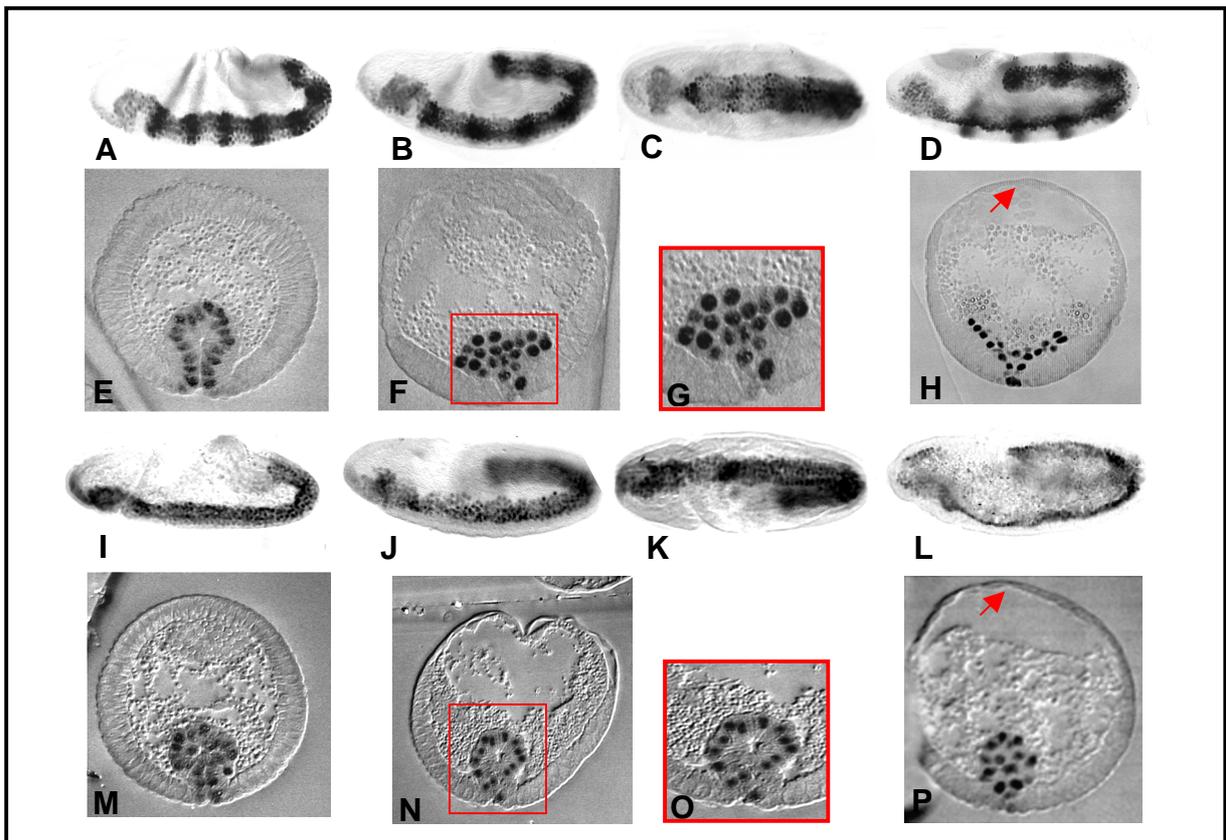
**Abbildung 14: Mesodermwanderung in *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi (dunkelgrau) gefärbt. (A) Laterale Ansicht auf einen Wildtyp-Embryo, (B) Querschnitt eines Wildtyp-Embryo, (C) Dorsale Ansicht auf einen homozygoten *stg*<sup>7M</sup> Embryo. (D) Querschnitt vom homozygoten *stg*<sup>7M</sup> Embryo. ([A, B, C und D]; Stadium 10). Auch die späteren Stadien weisen keine Wanderungsdefekte in *stg*-Mutanten auf.

Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die Mitose allein den Verlauf der EMT während der Mesoderm-Morphogenese nicht beeinträchtigt. Daraus lässt sich schließen, dass weitere Faktoren für den Verlust der epithelialen Charakteristika und zur Erlangung des mesenchymalen Charakters notwendig sein müssen. Wie oben erwähnt, ist Htl möglicherweise ein solcher Faktor, der potentiell die EMT steuert. Um eine potentielle redundante Funktion von Htl und Stg für die EMT zu untersuchen, wurde der EMT Phänotyp von *htl stg* Doppelmutanten analysiert.

### 3.1.3 Redundante Regulation der EMT durch *Htl* und *Stg*

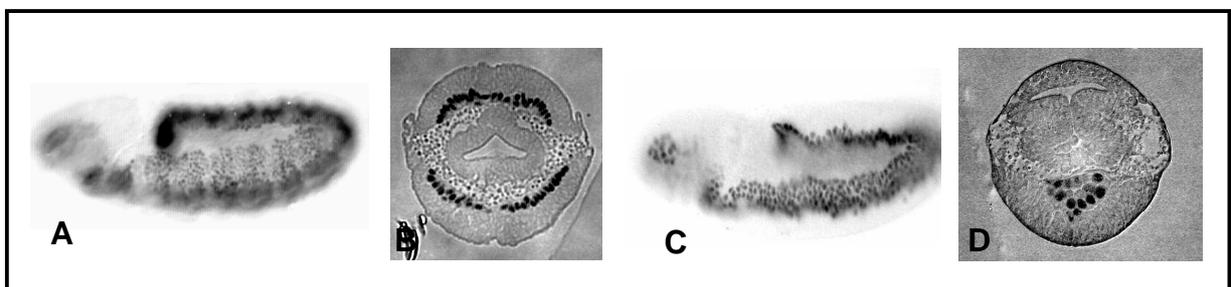
Um die Hypothese zu testen, ob *Htl* zusammen mit *Stg* die EMT reguliert, wurde die EMT in Embryonen untersucht, in denen sowohl der FGF-Signalweg als auch die Mitose unterbunden sind. Interessanterweise zeigen diese *htl stg* doppelt mutanten Embryonen einen Phänotyp (Abb. 15), der sich von den *stg* oder *htl* homozygoten Einzelmutanten deutlich unterscheidet (vgl. Abb. 11-14). Wie Querschnitte dieser doppelt mutanten Embryonen zeigen, bilden *htl stg* mutante Mesodermzellen in der ersten Phase der Mesodermwanderung, nach der Internalisierung, eine epitheliale Röhre (Abb. 15 E). Im Gegensatz zum Wildtyp-Embryo, in dem im frühen Stadium 8 die mesodermale Röhre zerfällt und die Zellen mesenchymalen Charakter annehmen (Abb. 15 F), zeigte sich hingegen in den *htl stg* mutanten Embryonen ein starker Defekt während der EMT. Die Mesodermzellen verblieben in der epithelialen Röhre und erlangten keinen mesenchymalen Charakter. Die Röhre blieb über das Stadium 8 hinaus bis zu einem Stadium, in dem *htl* oder *stg* mutanten Embryonen die Anordnung der Zellen in einer Röhre aufgelöst ist, bestehen (Abb. 15 N, O, P). Auch in älteren Embryonen zeigt sich, dass die Mesodermzellen im Stadium 9 immer noch als Aggregat auf dem Ektoderm vorliegen (Abb. 16 C,D).



**Abbildung 15: Blockade der EMT in *htl*, *stg* mutanten Embryonen**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen *Twi* (dunkelgrau) und gegen  $\beta$ -Galaktosidase (schwarz) gefärbt. (A, B und D) Laterale Ansicht auf heterozygote Embryonen. Embryonen, die mindestens eine Wildtypkopie der untersuchten Gene tragen, zeigen eine schwarze Färbung in 7 segmentale Streifen, die auf die Anwesenheit des *TM3(ftz::lacZ)* Balancerchromosoms zurückzuführen ist.

(C) Ventrale Ansicht auf einen Wildtyp-Embryo in Stadium 8. (E, F, G und H) Querschnitte von Wildtyp-Embryonen (I, J und L) Laterale Ansicht auf *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutante Embryonen. (K) Ventrale Ansicht auf einen *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryo in Stadium 8. (M, N, O und P) Querschnitte von *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen. (H und P); Stadium 8 spät; rote Pfeile markiert die Amnioserosa, die die offene Dorsalseite des Embryos bedeckt. *Htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutante Mesodermzellen verbleiben in Stadium 8 als epitheliale Röhre.



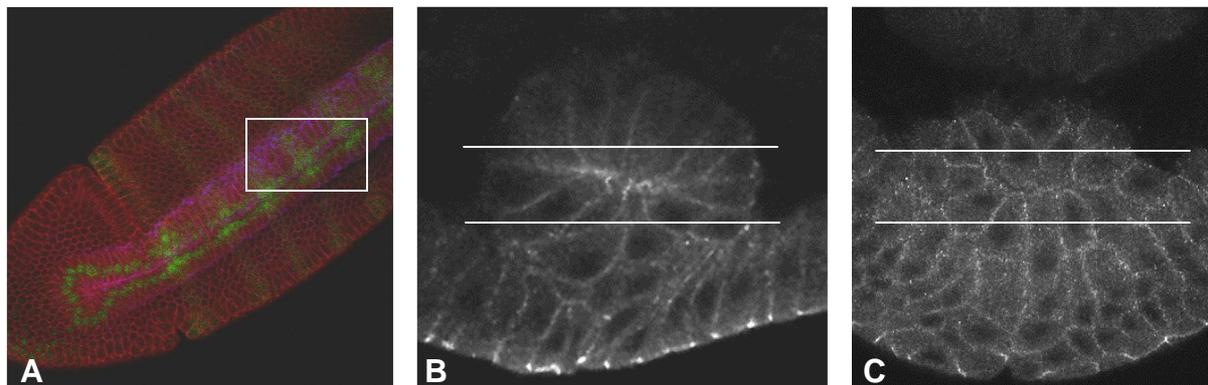
**Abbildung 16: Mesodermwanderungsdefekte in *Htl* *Stg*-Embryonen**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen *Twi* (dunkelgrau) gefärbt. (A) Dorsale Ansicht auf ein Wildtyp-Embryo (B) Querschnitt vom Wildtyp-Embryo. (C) Dorsale Ansicht auf ein homozygotes *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> Embryo. (D) Querschnitt vom homozygoten *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup>-Embryo. ([A, B, C und D]; Stadium 10); *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutante Embryonen verbleiben als Aggregat auf dem Ektoderm.

### 3.1.4 Funktion von Htl während des EMTs

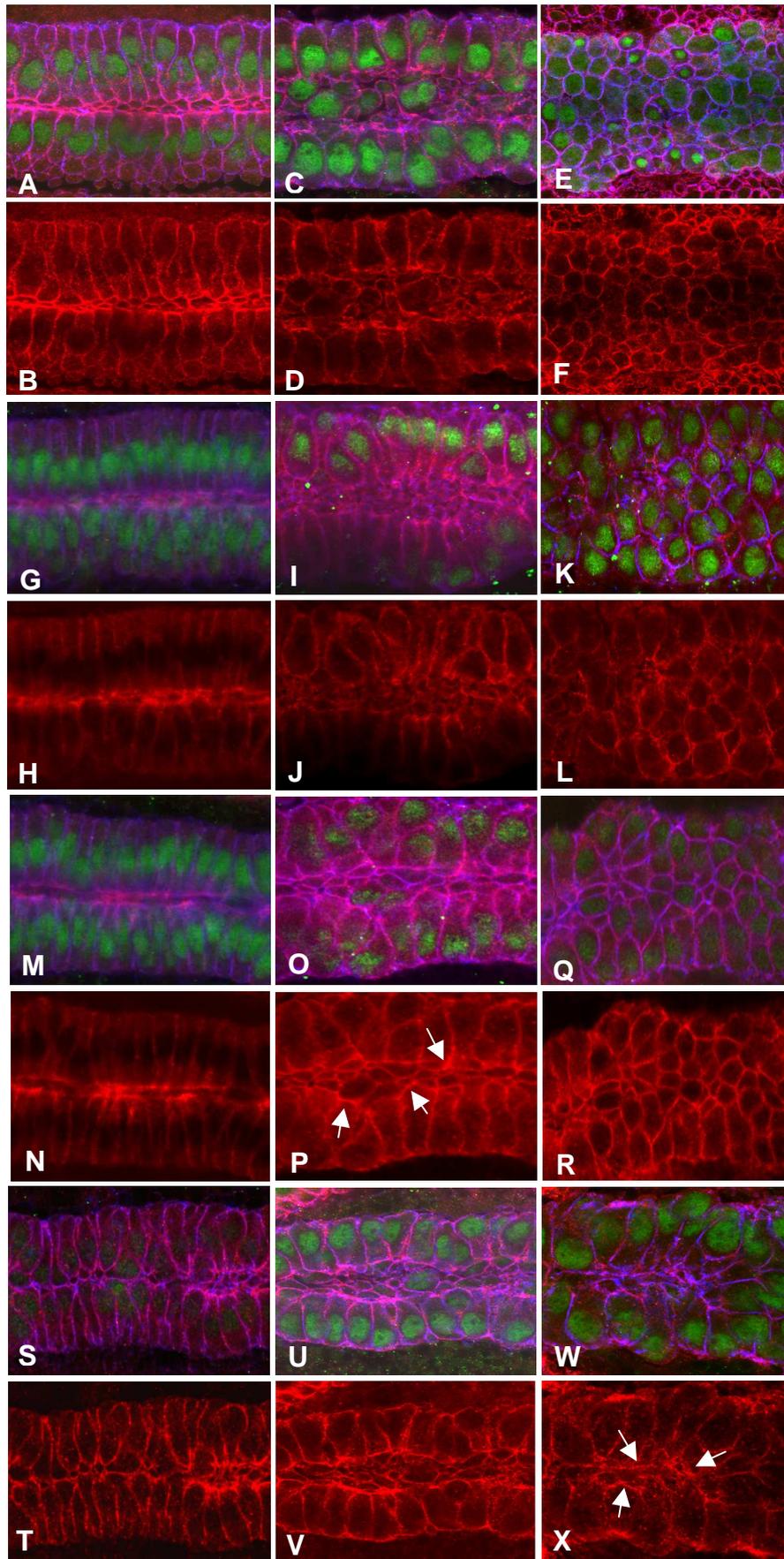
Auf zellulärer Ebene ist die Auflösung des epithelialen Charakters dadurch gekennzeichnet, dass z.B. Zelladhäsionsproteine nicht mehr an epithelialen Zellkontakten lokalisieren. Im *Drosophila* Embryo wird die Zelladhäsion in Epithelien durch  $D\alpha$ -Catenin, Armadillo und DE-Cadherin vermittelt.

Um zu untersuchen, ob in *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen der Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Charakter gestört ist, wurden die zellulären Vorgänge während der frühen Mesoderm-Morphogenese untersucht (Abb. 18). Dazu wurde zunächst die Verteilung von DE-Cadherin während der EMT in Wildtyp, *stg*, *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen mit Hilfe der optischen Sektionierung durch konfokale Lasermikroskopie verglichen (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17: Bereiche des Mesoderms, die für die konfokalen Untersuchungen verwendet wurden**

A) Ventrale Ansicht eines Wildtyp-Embryo. Bei den folgenden Untersuchungen wurde auf den mittleren Bereich des Mesoderms fokussiert (weiße Kästchen). In diesem Bereich des Mesoderms wurden in verschiedenen Fokusebenen Aufnahmen gemacht und Bildstapel erzeugt. (B, C) Anhand der Querschnitte von Wildtyp-Embryonen in Stadium 7 (B) und 8 (C) kann demonstriert werden, welche Fokusebene im Mesoderm untersucht wurde. Die weißen Balken markieren die verschiedenen Einstellungsebenen durch das Mesoderm.



**Abb. 18: *Htl* und *Stg* sind für den Verlust des epithelialen Zellcharakters im Mesoderm während der EMT erforderlich**

(A-F) Ventrale Ansicht von Wildtyp-Embryonen, (G-L) ventrale Ansicht von *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen, (M-R) ventrale Ansicht von *htl*<sup>AB42</sup> mutanten Embryonen, (S-X) ventrale Ansicht von *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen. ([A, D, G, J, M, P, S und V]; Stadium 7)

([B, E, H, K, N, Q, T und W]; Stadium 8 früh)

([C, F, I, L, O, R, V und X]; Stadium 8 spät)

[A-C; G-I; M-O; S-V]; Embryonen wurden mit anti-Twi (grün), anti-Neurotactin (blau) und anti-DE-Cadherin (rot) Antikörpern gefärbt.

(B, H, N und T) In Stadium 7 ist sowohl im Wildtyp, als auch in den *stg*, *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen DE-cadherin zunächst an den apikalen Zellgrenzen der mesodermalen Röhre konzentriert. (D, J) Im frühen Stadium 8 ist DE-Cadherin sowohl im Wildtyp als auch in *stg* mutanten Embryonen nur noch geringfügig an den apikalen Zellgrenzen konzentriert und (F, L) in spätem Stadium 8 verteilt sich DE-Cadherin entlang der Plasmamembran.

(N, P und R) In *htl*<sup>AB42</sup> mutanten Embryonen findet dieser Prozess verzögert statt.

(V) In *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> homozygoten Embryonen liegen die Mesodermzellen im frühen Stadium 8 noch eng im invaginierten Zustand zusammen und DE-Cadherin ist noch stark in den apikalen Zellgrenzen konzentriert. (Pfeile in X) Auch im späteren Stadium 8 liegen die Mesodermzellen noch im epithelialen Zellverband vor.

In Stadium 7 ist sowohl im Wildtyp, als auch in den *stg*, *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen *DE*-Cadherin zunächst an den apikalen Zellgrenzen der mesodermalen Röhre konzentriert (Abb. 18 B, H, N und T). Im frühen Stadium 8, in dem sich die invaginierte Röhre abflacht, ist *DE*-Cadherin sowohl im Wildtyp, als auch in *stg* mutanten Embryonen nur noch geringfügig an den apikalen Zellgrenzen konzentriert (Abb. 18 D, J). Im späteren Stadium 8, in dem die Röhre abgebaut wird und die Zellen sich in dorsolateraler Richtung ausbreiten, verteilt sich *DE*-Cadherin entlang der Plasmamembran (Abb. 18 F, L). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine Umverteilung der adhäsiven Zellkontakte der Mesodermzellen sowohl im Wildtyp, als auch in *stg* mutanten Embryonen stattfindet.

Im Gegensatz dazu ist *DE*-Cadherin in *htl* mutanten Embryonen im frühen Stadium 8 immer noch stark an den apikalen Zellgrenzen konzentriert (Pfeile in Abb. 18 P). Im weiteren Verlauf der Entwicklung (spätes Stadium 8) geht die apikale Lokalisierung von *DE*-Cadherin verloren und verteilt sich entlang der Plasmamembran (Abb. 18 R). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Verlust des epithelialen Charakters im Bezug auf *DE*-Cad Lokalisation in *htl* mutanten Embryonen zwar stattfindet, zeitlich aber leicht verzögert ist.

*Htl stg* mutante Embryonen weisen starke Defekte im Verlust der adhäsiven Zell-Zellkontakte auf. Im frühen Stadium 8 liegen die Mesodermzellen noch eng im invaginierten Zustand zusammen. *DE*-Cadherin ist stark in den apikalen Zellgrenzen konzentriert (Abb. 18 V). Auch in späteren Stadien, in denen die dorsolaterale Ausbreitung erfolgen sollte, liegen die Mesodermzellen noch in einem eng aneinanderliegendem Zellverband vor und scheinen diesen über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten (siehe Pfeile in Abb. 18 X).

Diese Beobachtungen sind gute Hinweise dafür, dass *htl* und *stg* zusammen für den Verlust epithelialen Zellcharakters im Mesoderm während der EMT erforderlich sind.

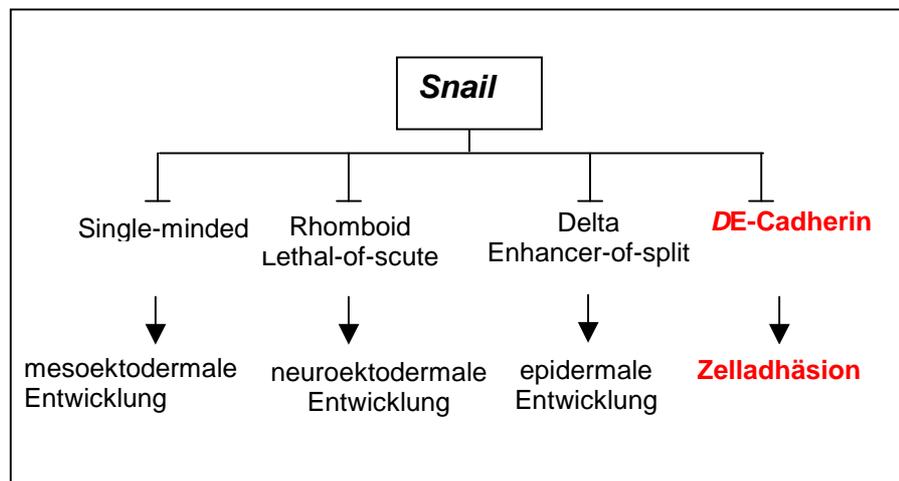
### **3.1.5 Expression von *snail* Transkripten in *htl* homozygoten Embryonen während der frühen Mesoderm-Morphogenese**

Wie oben gezeigt, geht der Verlust der epithelialen Charakteristika in den untersuchten *htl stg* mutanten Embryonen mit einer abnormalen Lokalisation von *DE*-Cadherin einher. Durch dieses Ergebnis stellt sich nun die Frage, ob *DE*-Cadherin

selbst direkt oder indirekt durch *Htl* und *Stg* reguliert wird, um die EMT zu ermöglichen. *DE-Cadherin* wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor *Snail* reguliert, sowie durch die Expression von Genen, die die apiko-basale Zellpolarität im Epithel steuern.

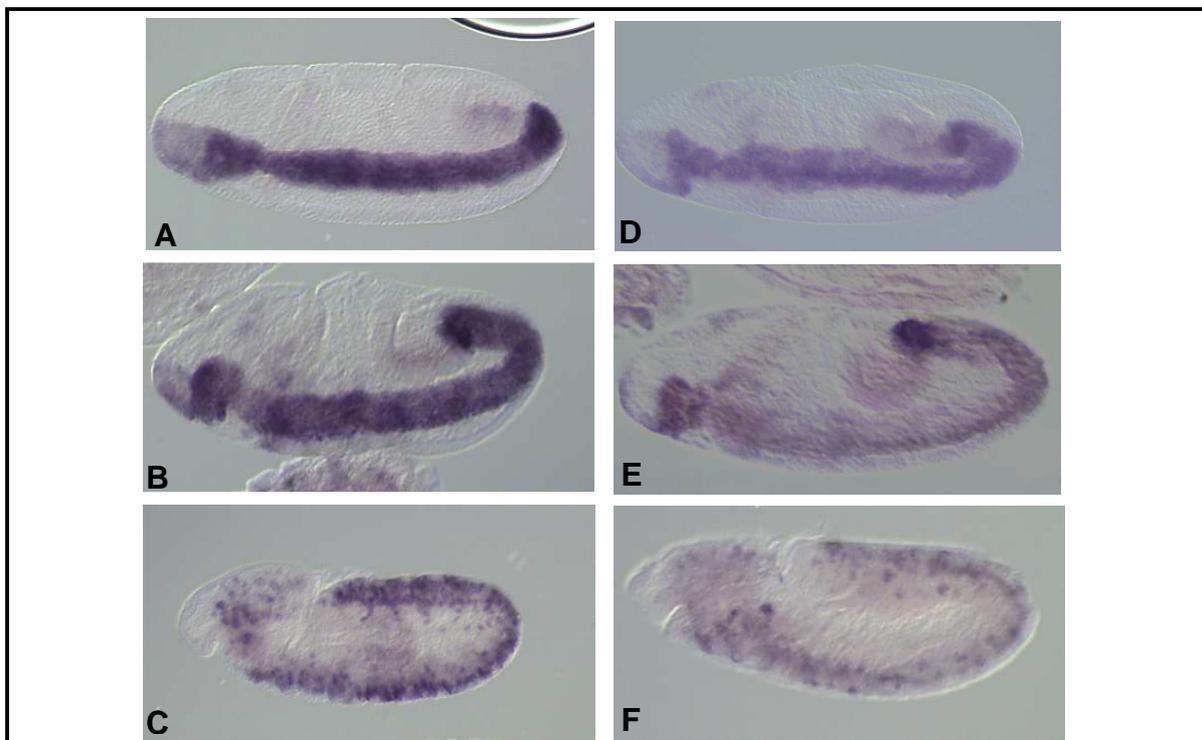
Zunächst wurde der mögliche Einfluss des Transkriptionsfaktors *Snail* auf *DE-Cadherin* während des EMT in *htl* mutanten Embryonen untersucht. *Snail* wird zu Beginn der Gastrulation im präsumptiven Mesoderm exprimiert, wo es die Expression einer Vielfalt von Genen im vorläufigen Mesoderm, wie z.B. *single-minded*, *rhomboid* und *Lethal-of-scute*, die in der mesoektodermalen und neuroektodermalen Entwicklung involviert sind unterdrückt (Abb. 19) (Ip et al., 1992). In *snail* Mutanten werden wenige oder gar keine mesodermalen Gewebe gebildet.

*DE-Cadherin* zählt ebenfalls zu den Zielmolekülen, dessen Expression durch *Snail* reprimiert wird (Nieto, 2002; Oda et al., 1998). Somit korrelieren die *DE-Cadherin*- und *snail*- Expression im umgekehrten Verhältnis zueinander.



**Abbildung 19:** *Snail* ist der Transkriptionsrepressor von einer Vielzahl von Genen, die in der mesoektodermalen und neuroektodermalen Entwicklung von *Drosophila* involviert sind. Rhomboid-ähnliche Proteine sind einzigartige Proteasen, die in *Drosophila* den Epidermal Growth Faktor Rezeptor (EGFR) aktivieren, um die Differenzierung in verschiedenen Entwicklungsstadien zu regulieren (Freeman et al., 2000). *Lethal-of-scute* wurden als wichtige Regulatoren neuronal-differenzierender Zellen identifiziert (Ghysen und Richelle, 1979). *Snail* legt die dorsale Begrenzung der Ventralfurche fest. Direkt an der Grenze zur *snail* Domäne wird der mesoektodermale Marker *single-minded* exprimiert. Nach der Invagination der mesodermalen Vorläuferzellen, d.h., wenn sich die Ventralfurche schließt, treffen diese *single-minded* exprimierenden Zellen aufeinander (Kosman et al., 1991). Das Zelladhäsionsmolekül *DE-Cadherin* wird ebenfalls von *Snail* unterdrückt (Nieto et al., 2002).

Die vorherigen Ergebnisse haben klar gezeigt, dass *DE-Cadherin* in *htl* mutanten Embryonen im frühen Stadium 8 immer noch stark an den apikalen Zellgrenzen konzentriert ist. Um zu klären, ob die Expression von *sna* in *htl* mutanten Embryonen beeinträchtigt ist, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit einer antisense *sna*-RNA-Sonde durchgeführt. Die *in situ*-Hybridisierungen zeigten deutlich, dass die Expression von *sna* in *htl* mutanten Embryonen gestört ist (Abb. 20 D-F). Während der Invagination des wildtypischen Mesoderms kommt es innerhalb der gesamten mesodermalen Röhre zur Expression von *sna* (Abb. 20 A). Während der EMT erstreckt sich die Expression von *sna* entlang des Mesoderms und nimmt leicht an Intensität zu (Abb. 20 B und C). Zu diesem Zeitpunkt zeigten erste Beobachtungen in *htl* mutanten Embryonen, daß die Expression von *sna* reduziert ist (Abb. 20 D-F). Die RNA-Sonde detektierte nur einen schwachen Level von *sna* über den gesamten zeitlichen Verlauf des EMT. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen *Htl* und der Regulation der *sna* Expression im Mesoderm hindeuten. Die Fehlregulation von *sna* in *htl* Mutanten könnte zu einer erhöhten Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls *DE-Cadherin* beitragen, wodurch sich die beobachtete Verzögerung im Verlust des epithelialen Zellcharakters ableiten ließe.

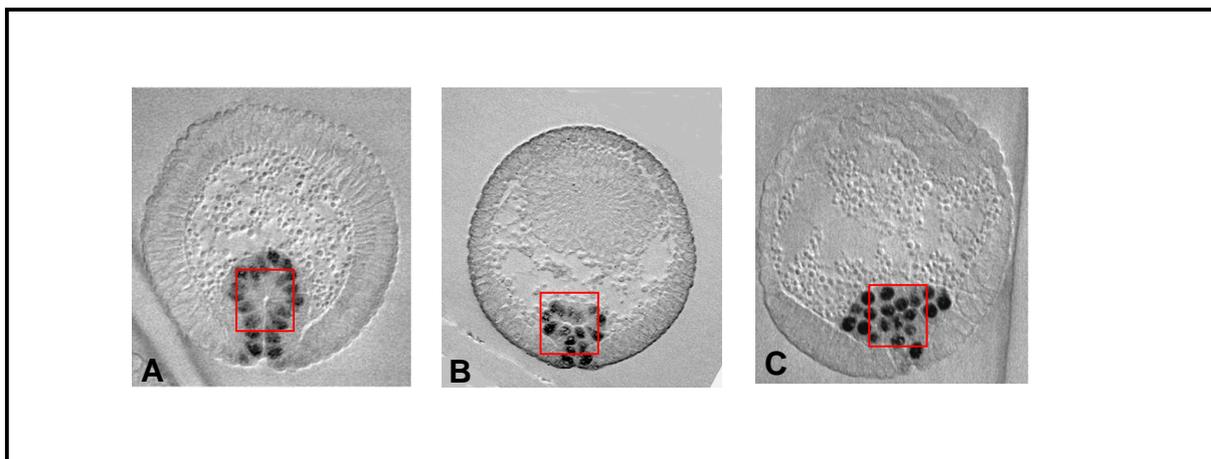


**Abbildung 20: Expression von *Snail* in *htl* mutanten Embryonen während der Mesoderm-Morphogenese**  
*In situ* Hybridisierungen an Embryonen mit der *Snail* antisense Sonde (A-F); die antisense Sonde ist der *Snail* mRNA komplementär und sollte daher an diese binden; (A-C) Laterale Gesamtansicht von Wildtyp-Embryonen im Stadium 6 (A), Stadium 7 (B) und späteren Stadium 8 (C). (D-F) Laterale Gesamtansicht von *htl*<sup>AB42</sup> mutanten Embryonen im Stadium 6 (D), Stadium 7 (E) und spätem Stadium 8 (F). (D) Die Invagination wird durch einen schwachen Proteinlevel an *sna* in *htl* mutanten Embryonen nicht beeinträchtigt. (A-D) Die Expression von *snail* ist in *htl* mutanten Embryonen deutlich reduziert.

### 3.1.6 *Htl* und Mitosen sind für die Herunterregulierung der ZA erforderlich

Die Lokalisierung von *DE-Cadherin* in *htl stg* mutanten Embryonen lässt vermuten, dass die Zellkontakte in der invaginierten Mesodermröhre nicht umverteilt bzw. nicht negativ reguliert werden, wie oben beschrieben. Die Zelladhäsion im Epithel wird über den Cadherin/Catenin Proteinkomplex vermittelt, der im Bereich der Zonula Adherens (ZA) akkumuliert. Die ZA befindet sich direkt basal zur subapikalen Region und lässt sich zweifelsfrei elektronenmikroskopisch visualisieren, da sie als Schlußleiste zwischen den Epithelzellen zu erkennen ist (Tepass und Hartenstein, 1994).

Während der Mesodermmorphogenese löst sich die ZA vor dem Zerfall der Mesodermröhre auf (Tepass und Hartenstein, 1994). Um zu testen, inwiefern die *htl stg* Mutation die Auflösung der ZA beeinträchtigt, wurde die Anwesenheit der ZA in *htl stg* Mutanten auf ultrastruktureller Ebene untersucht. Für diese Studien wurden Querschnitte von Wildtyp-, *stg*-, *htl*- und *htl stg* mutanten Embryonen im EMT-Stadium (Stadium 7-8 spät) angefertigt. Anhand von Semi-Dünnschnitten wurden die Stadien der Embryonen und die Position der ultrastrukturellen Aufnahmen bestimmt (Abb. 21).



**Abb. 21: Schematische Darstellung der Stadien, die für die EM-Aufnahmen verwendet wurden**  
(A-C) Semidünnschnitte von Wildtyp-Embryonen. (A) Stadium 7; (B) Stadium 8 früh; (C) Stadium 8 spät. Die roten Kästchen in den Abbildungen sollen schematisch veranschaulichen, in welcher Region des Mesoderms die EM-Aufnahmen gemacht wurden.

Im Wildtyp, wie auch in *stg*, *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen, sind die Mesodermzellen während des Gastrulationsstadium 7 (Röhrenstadium) eng mit ihren

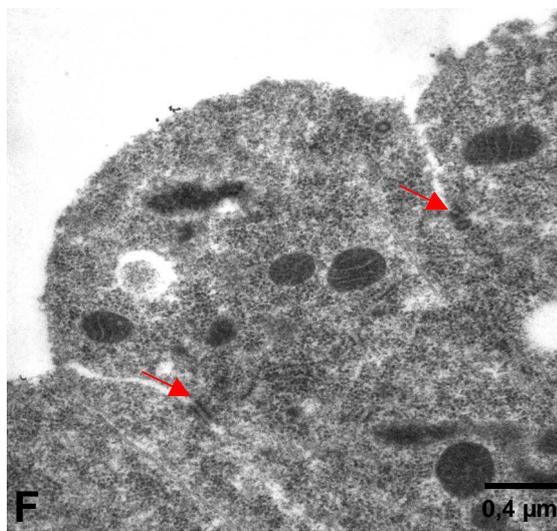
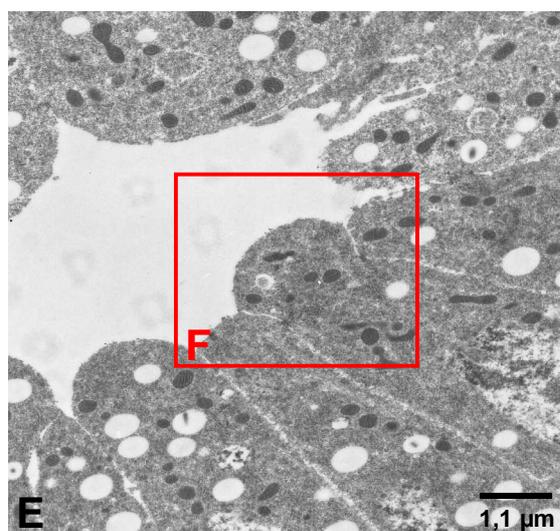
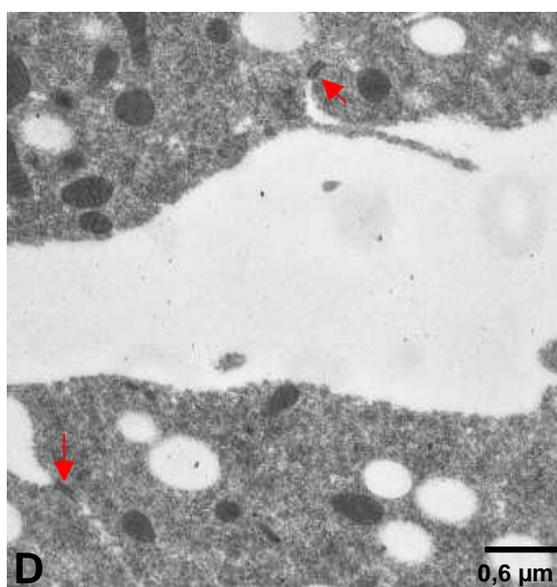
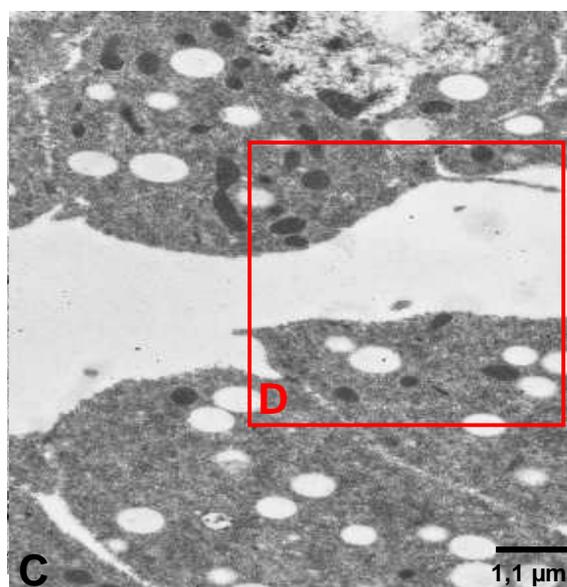
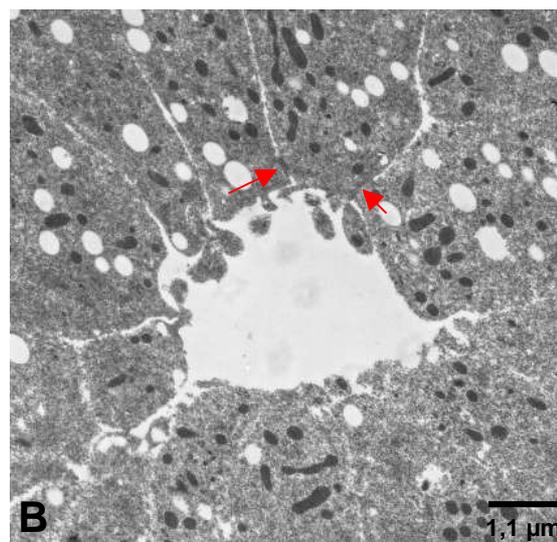
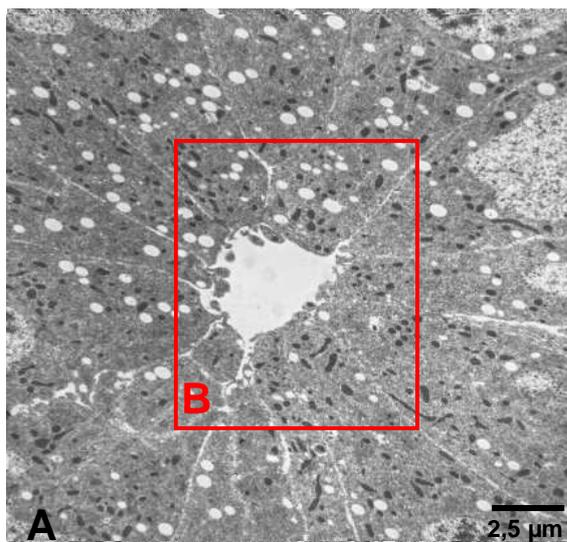
Nachbarzellen durch die ZA verbunden (Abb. 22 A-G). Wie oben erwähnt, lässt sich die ZA elektronenmikroskopisch visualisieren, da sie durch eine hohe Elektronendichte dunkler als die umliegenden Membranen ist (siehe Pfeile in den Abbildungen 22 B, D, F und G).

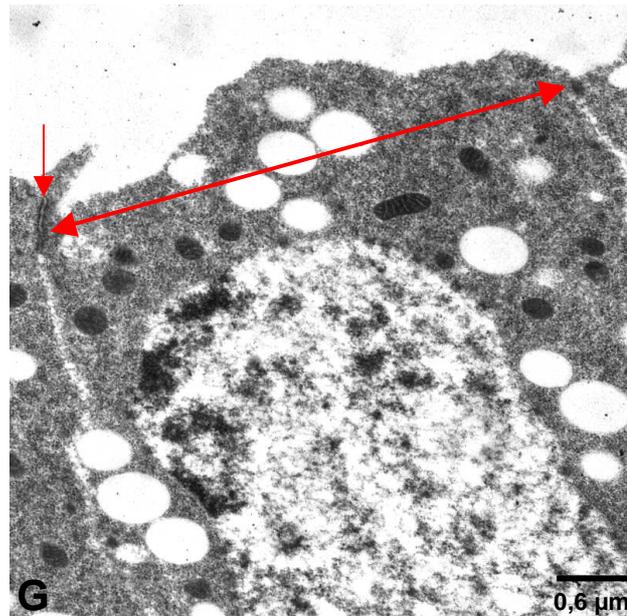
Im frühen Stadium 8, in der sich die invaginierte Röhre abgeflacht hat, ist sowohl im Wildtyp als auch in *stg* mutanten Embryonen, keine ZA mehr zu sehen (Abb. 23 A-C und Abb. 24 A, B). Im späten Stadium 8 sind die Zellverbindungen untereinander vollständig aufgelöst und die Zellen liegen im mesenchymalen Zustand vor (Abb. 23 D und Abb. 24 B).

In *htl* mutanten Embryonen findet der Vorgang der ZA-Auflösung verzögert statt (Abb. 25). Im frühen Stadium 8 sind die Mesodermzellen noch durch ZA miteinander verbunden (Abb. 25 A, B). Im späten Stadium 8 sind allerdings keine ZA in *htl* mutanten Embryonen zu detektieren (Abb. 25 C).

*htl stg* mutante Embryonen zeigen starke Defekte bei der Auflösung der ZA während der EMT (Abb. 26). Während in diesen mutanten Embryonen in Stadium 8 die mesodermalen Zellen noch im epithelialen Zellverband vorliegen, ist im Folgenden zu erkennen, dass diese eng miteinander verbunden sind. In *htl stg* mutanten Embryonen ist die ZA noch zu einem Zeitpunkt nachweisbar, zu dem im Wildtyp, sowie in *stg* mutanten Embryonen, keine ZA mehr identifiziert werden konnte (Abb. 26 A-D). Genau dieses Muster zeigte sich auch im späten Stadium 8, in dem die Mesodermzellen in den mutanten Embryonen noch im epithelialen Zustand vorliegen, die Membranen dicht aneinander sind und die ZA noch immer präsent ist (Abb. 26 E, F). Interessanterweise kann man in einigen *htl stg* mutanten Embryonen im Stadium 8 vesikel-ähnliche Strukturen in der Nähe der Plasmamembran und der ZA erkennen (grüner Pfeil in Abb. 26 B). Möglicherweise sind diese Vesikel an der Regulation der ZA beteiligt, die in den *htl stg* Mutanten verzögert abläuft.

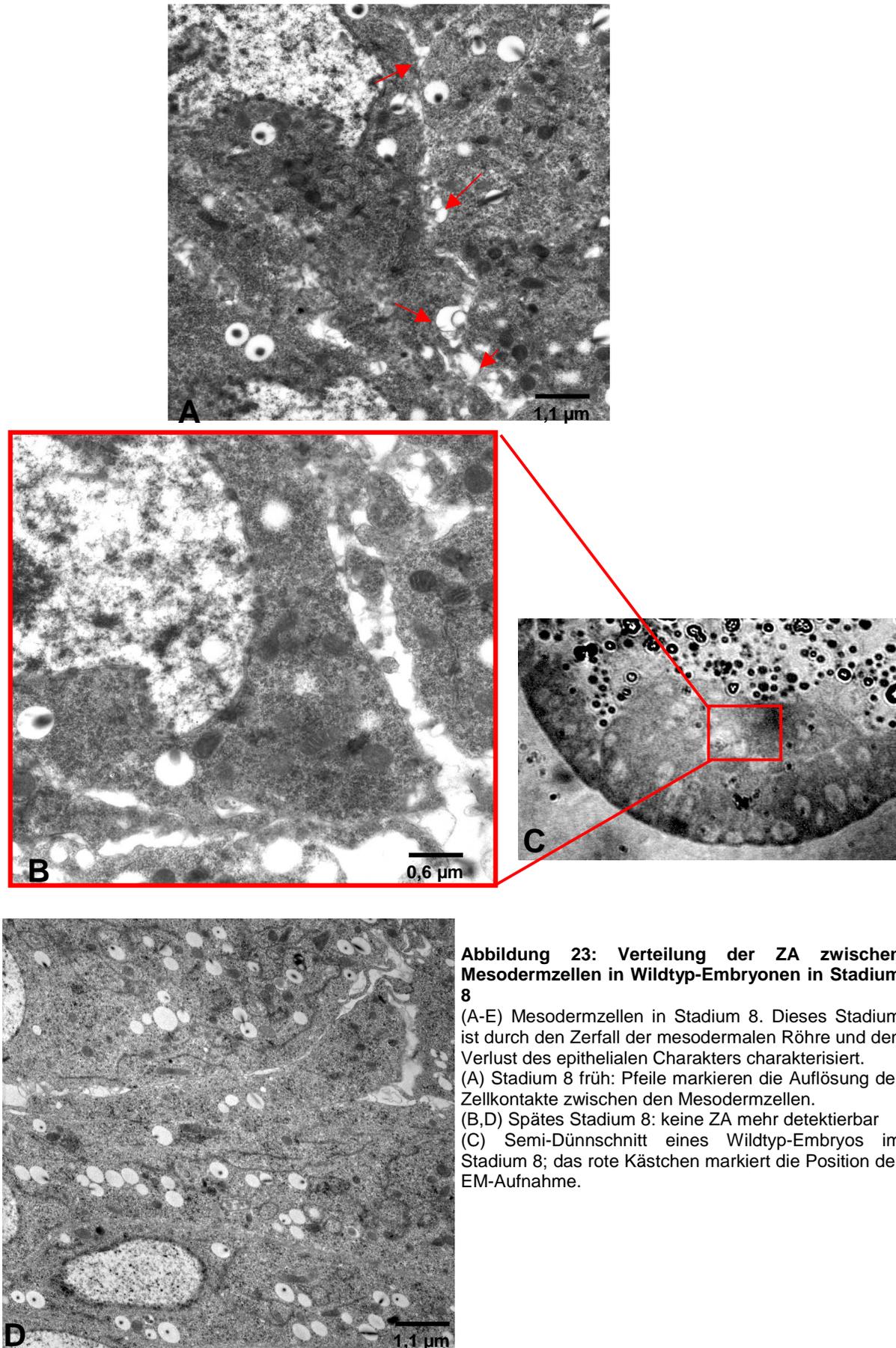
Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist in Tabelle 6 dargestellt. Die elektronenmikroskopischen Analysen geben Hinweise darauf, dass die Funktion von *Htl* zur Herunterregulierung von ZA während der EMT erforderlich ist.





**Abbildung 22: Verteilung der ZA zwischen wildtypischen und mutanten Mesodermzellen in Stadium 7.**

Wildtyp (A,B), *stg*<sup>7M</sup> mutante (C,D), *htf*<sup>AB42</sup> mutante (E,F) und *htf*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutante (G) Embryonen wurden fixiert und für die Transmissionselektronen-Mikroskopie präpariert. Die Zelladhäsion in adhärenen Zellkontakten wird über den Cadherin/Catenin Proteinkomplex vermittelt, der im Bereich der Zonula adherens (ZA) akkumuliert. Die ZA lässt sich elektronenmikroskopisch visualisieren, da sie durch eine hohe Elektronendichte dunkler als die umliegenden Membranen ist. (A-G) Stadium 7. (A) ZA zwischen den Mesodermzellen im Wildtyp; (B) Pfeile in der Vergrößerung zeigen gut ausgeprägte ZA an den apikalen Zellgrenzen der mesodermalen Röhre. (C) ZA zwischen den Mesodermzellen in *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen; (D) Pfeile in der Vergrößerung zeigen gut ausgeprägte ZA an den apikalen Zellgrenzen der mesodermalen Röhre. (E) ZA zwischen den Mesodermzellen in *htf*<sup>AB42</sup> mutanten Embryonen; (F) Pfeile in der Vergrößerung zeigen gut ausgeprägte ZA an den apikalen Zellgrenzen der mesodermalen Röhre. (G) ZA zwischen den Mesodermzellen in *htf*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen; Pfeile zeigen gut ausgeprägte ZA an den apikalen Zellgrenzen der mesodermalen Röhre.



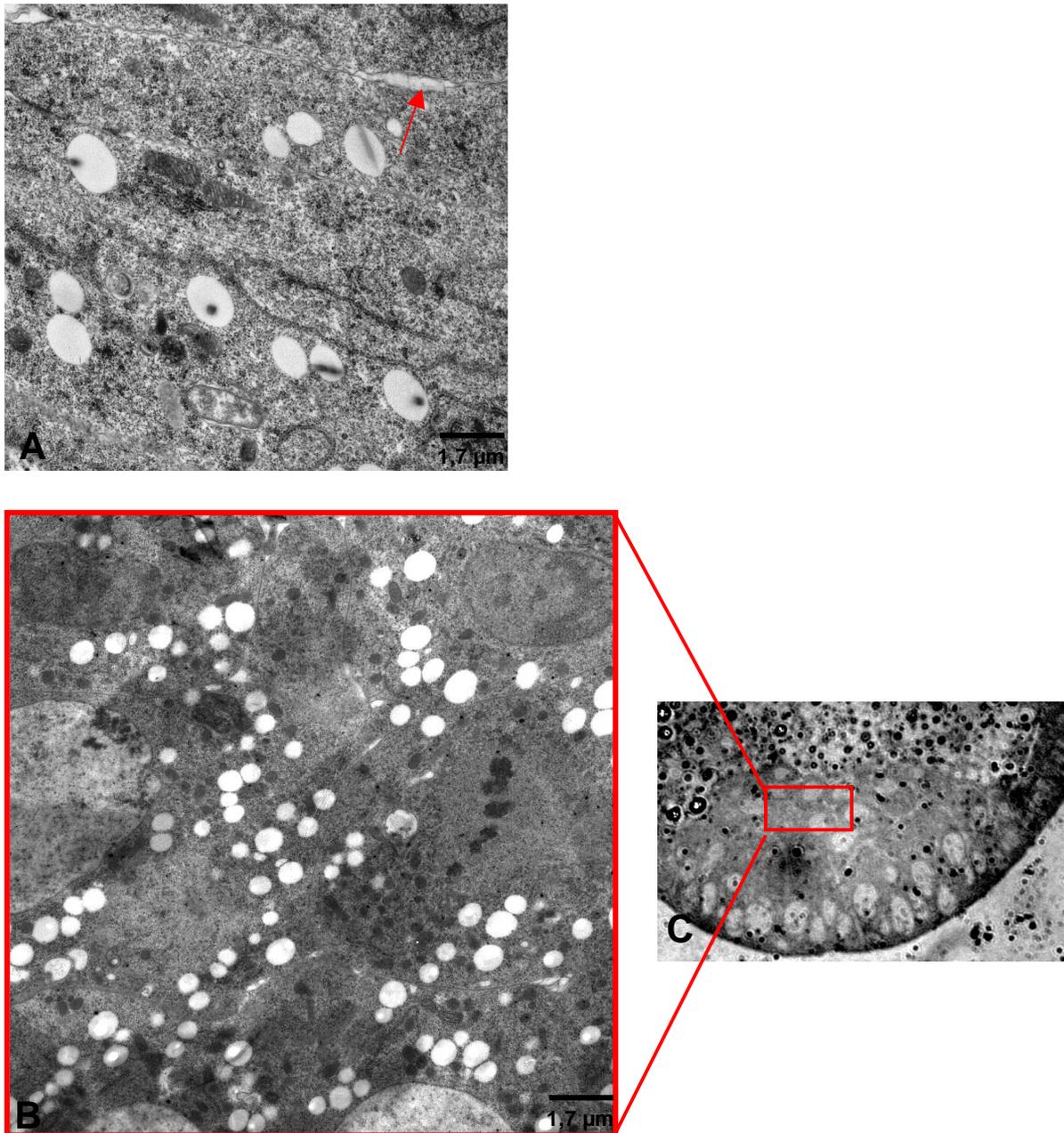
**Abbildung 23: Verteilung der ZA zwischen Mesodermzellen in Wildtyp-Embryonen in Stadium 8**

(A-E) Mesodermzellen in Stadium 8. Dieses Stadium ist durch den Zerfall der mesodermalen Röhre und den Verlust des epithelialen Charakters charakterisiert.

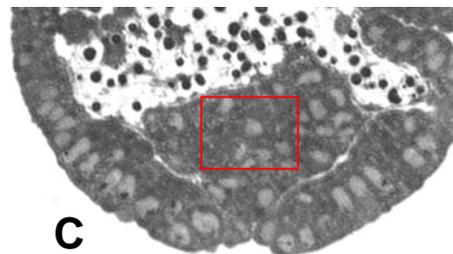
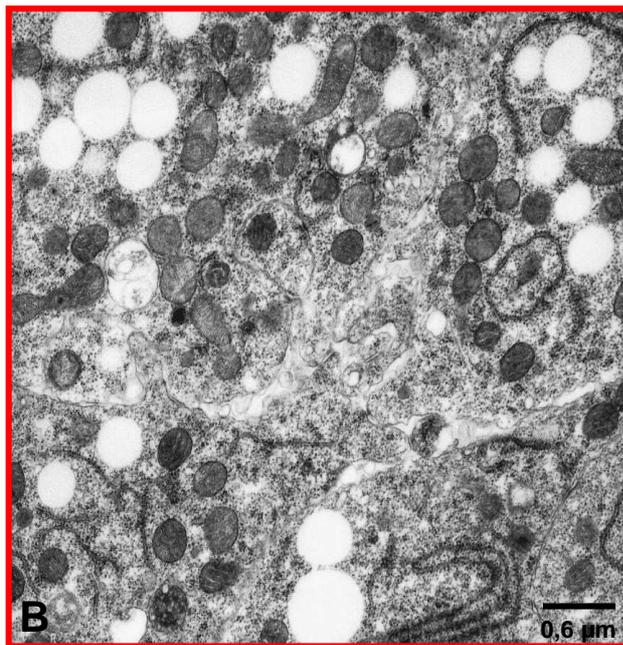
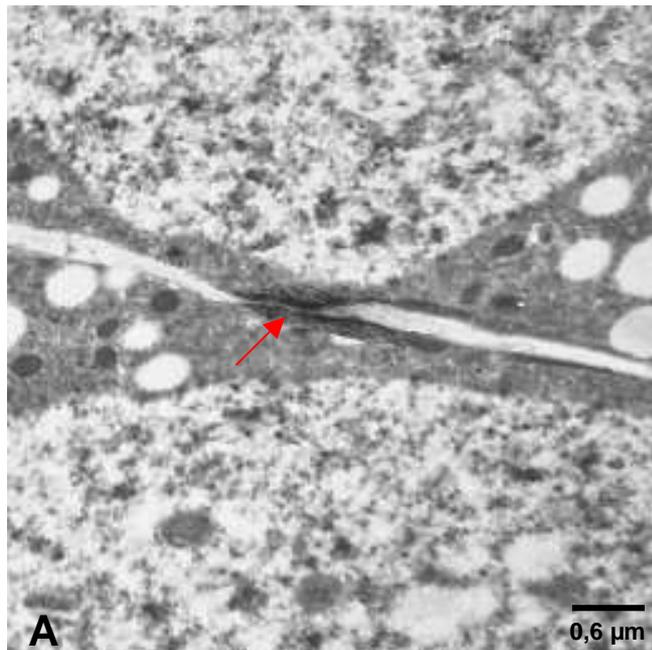
(A) Stadium 8 früh: Pfeile markieren die Auflösung der Zellkontakte zwischen den Mesodermzellen.

(B,D) Spätes Stadium 8: keine ZA mehr detektierbar

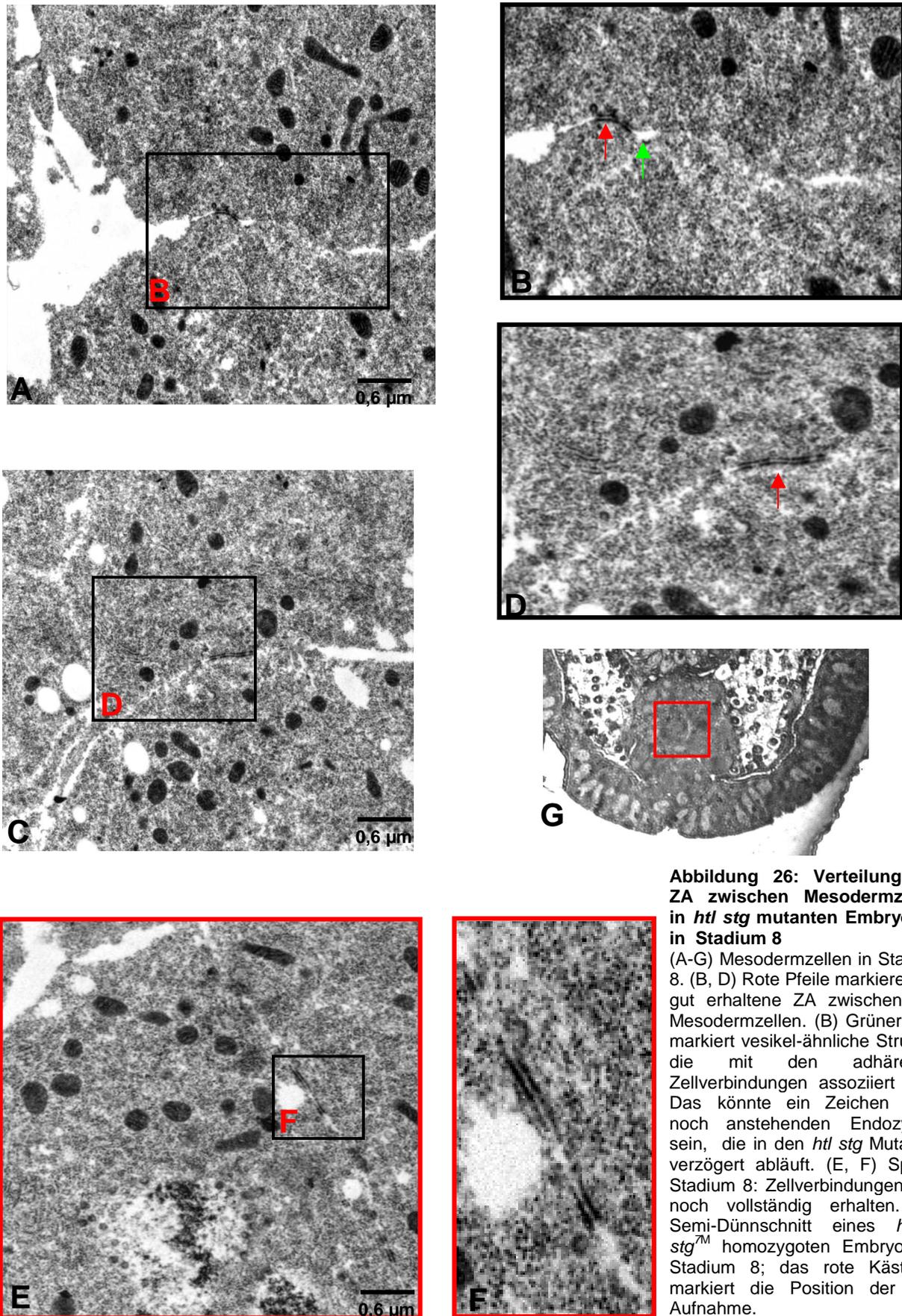
(C) Semi-Dünnschnitt eines Wildtyp-Embryos im Stadium 8; das rote Kästchen markiert die Position der EM-Aufnahme.



**Abbildung 24: Verteilung der ZA zwischen Mesodermzellen in *stg* mutanten Embryonen in Stadium 8**  
(A-C) Mesodermzellen in Stadium 8. Dieses Stadium ist durch den Zerfall der mesodermalen Röhre und den Verlust des epithelialen Charakters charakterisiert. (A) Die Mesodermzellen beginnen mit der Auflösung der Zellkontakte. (B) Spätes Stadium 8: Vollständige Auflösung der ZA. (C) Semi-Dünnschnitt eines *stg<sup>7M</sup>* homozygoten Embryos im Stadium 8; das rote Kästchen markiert die Position der EM-Aufnahme.



**Abbildung 25: Verteilung der ZA zwischen Mesodermzellen in *htl* mutanten Embryonen in Stadium 8**  
(A-C) Mesodermzellen in Stadium 8. (A) Pfeil markiert noch vorhandene ZA zwischen den Mesodermzellen. (B) Spätes Stadium 8: Auflösung der ZA zwischen den Mesodermzellen. (C) Semi-Dünnschnitt eines *htl*<sup>AB42</sup> homozygoten Embryos im Stadium 8; das rote Kästchen markiert die Position der EM-Aufnahme.



**Abbildung 26: Verteilung der ZA zwischen Mesodermzellen in *htl stg* mutanten Embryonen in Stadium 8**

(A-G) Mesodermzellen in Stadium 8. (B, D) Rote Pfeile markieren die gut erhaltene ZA zwischen den Mesodermzellen. (B) Grüner Pfeil markiert vesikel-ähnliche Struktur, die mit den adhärennten Zellverbindungen assoziiert sind. Das könnte ein Zeichen einer noch anstehenden Endozytose sein, die in den *htl stg* Mutanten verzögert abläuft. (E, F) Spätes Stadium 8: Zellverbindungen sind noch vollständig erhalten. (G) Semi-Dünnschnitt eines *htl<sup>AB42</sup> stg<sup>TM</sup>* homozygoten Embryos im Stadium 8; das rote Kästchen markiert die Position der EM-Aufnahme.

Gewebe	Genotyp	Zellverbindung	Stadium		
			7	8 früh	8 spät
Mesoderm	<i>Wildtyp</i>	ZA			
Mesoderm	<i>Stg<sup>7M</sup></i>	ZA			
Mesoderm	<i>Htl<sup>AB42</sup></i>	ZA			
Mesoderm	<i>Htl<sup>AB42</sup> Stg<sup>7M</sup></i>	ZA			

**Tabelle 6: Übersicht der Präsenz von adhärenenten Zellkontakten (ZA) der Mesodermzellen während der Gastrulation**

Das Auftreten von adherenten Zellkontakten (ZA) zwischen Mesodermzellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Gastrulation (Stadium 7-8 spät) mittels TEM untersucht. Die Balken zeigen subjektive Werte an, die das Auftreten der ZA zwischen den Zellen auf den Ultradünnschnitten widerspiegeln. Im Wildtyp und *stg<sup>7M</sup>* mutanten Embryonen konnte ab Stadium 8 früh keine ZA-Struktur zwischen den Zellen gefunden werden. In *htl<sup>AB42</sup>* mutanten Embryonen konnte erst ab dem späten Stadium 8 keine ZA mehr detektiert werden. Im Gegensatz dazu halten *htl<sup>AB42</sup> stg<sup>7M</sup>* mutante Embryonen ihre ZA über das Stadium 8 hinaus aufrecht.

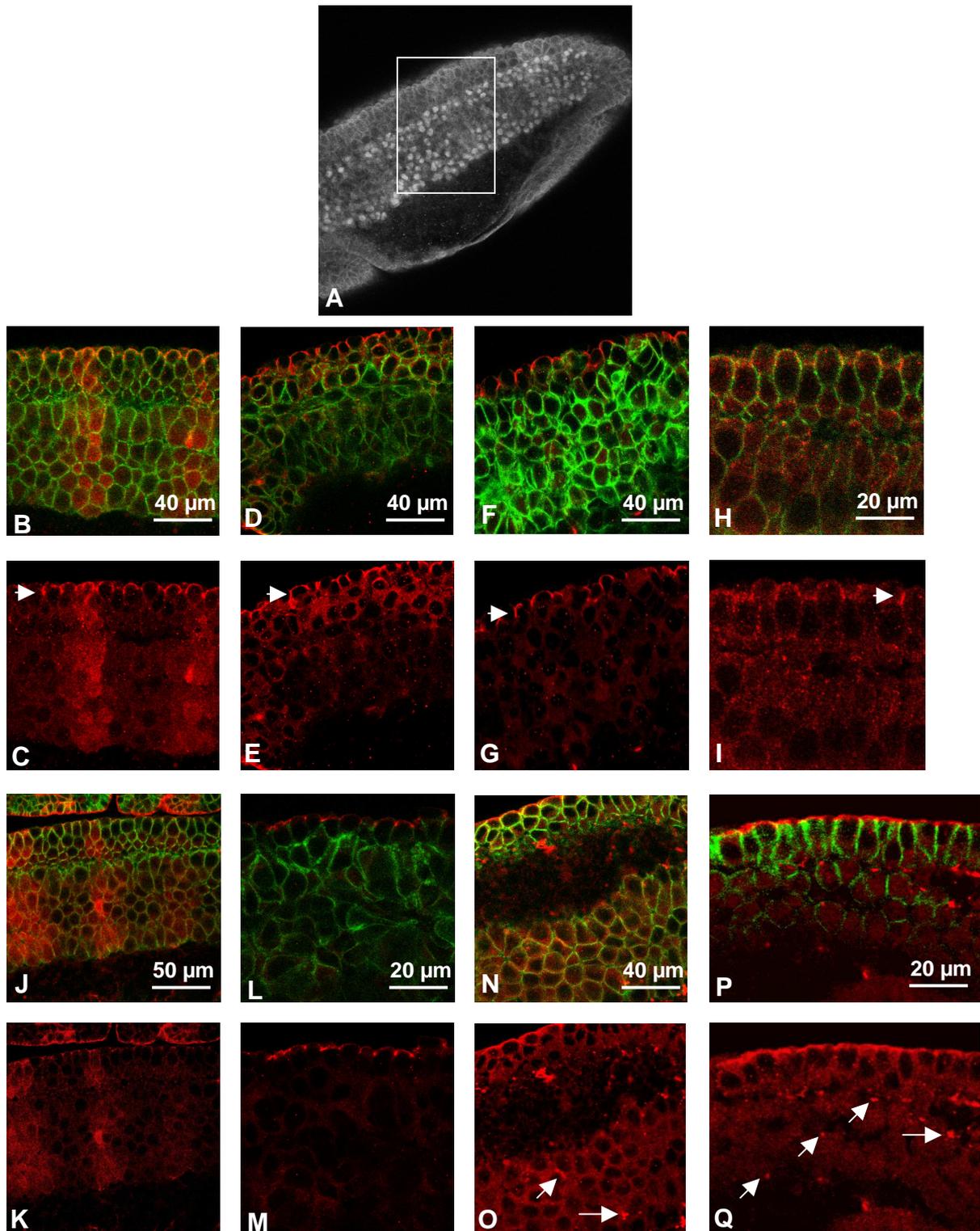
**Anwesenheit der ZA („Zonula Adherence“)**

 hoch  
 moderat  
 gering

### 3.1.7 Die Funktion von *Htl* in Bezug auf die Regulation epithelialer Zellpolarität in der Mesoderm-Morphogenese

Die oben gezeigten Daten konnten Evidenzen dafür liefern, dass in *htl* mutanten Embryonen die Adhäsion im Mesoderm fehlreguliert ist. Dies könnte zum einen durch eine veränderte Expression von *sna*, zum anderen aber durch die *htl* abhängige Änderung der apiko-basalen Zellpolarität verursacht sein.

In *Drosophila* wird die apiko-basale Zellpolarität von Epithelzellen im Embryo durch zwei Gruppen von Proteinkomplexen gesteuert, von denen eine Gruppe apikal und eine Gruppe basal zur ZA lokalisiert ist. Die apikalen Proteinkomplexe lokalisieren in der so genannten subapikalen Region (SAR), die apikal der ZA liegt. Diese Proteinkomplexe sind essentiell für den Aufbau epithelialer Polarität. Die einzelnen Komponenten der Proteinkomplexe können als Marker für intakte Zellpolarität verwendet werden. Um die Zellpolarität während des EMT zu untersuchen, wurde daher die Verteilung einer Komponente des Crumbs-Komplexes, *DPATJ*, in den verschiedenen Genotypen vor und während der EMT verglichen (Abb. 27).



**Abbildung 27: Htl ist für die Regulation epithelialer Zellpolarität in der Mesoderm-Morphogenese essentiell**

(A) Ventral seitliche Ansicht eines Ganzkörperembryos. Das weiße Kästchen markiert die Stelle des Embryos, die für diese Aufnahmen ausgewählt wurde, (B, C, J und K) Heterozygotes *htl*<sup>AB42</sup> Embryo (D, E, L und M) *stg*<sup>7M</sup> mutante Embryonen, (F, G, N und O) *htl*<sup>AB42</sup> mutante Embryonen, (H, I, P und Q) *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutante Embryonen. ([B-I]; Stadium 7 früh); (J-Q); Stadium 7 spät); [B, D, F, H, J, L, N und P]; Embryonen wurden mit Antikörper gegen anti-Neurotactin (grün) und anti-DPATJ (rot) gefärbt. [B, C, J und K]; Embryonen wurden mit Antikörper gegen β-Galaktosidase (rot) gefärbt. [C, E, G, I, K, M, O und Q]; Embryonen zeigten nur DPATJ Färbung. [C, E, G und I]; Pfeilspitzen zeigen auf die apikale Lokalisierung von DPATJ im Ektoderm. (O, Q) Pfeile in *htl*<sup>AB42</sup> als auch *htl*<sup>AB42</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen zeigen punktförmige Akkumulationen des DPATJ Proteins in einigen Mesodermzellen.

*DPATJ* bildet einen Proteinkomplex mit den Proteinen Crumbs und Stardust und ist im Ekto-derm in der SAR lokalisiert (siehe Pfeile in Abb. 27 C, E, G und I). Sowohl im Wildtyp, als auch in den mutanten Embryonen, findet man in den mesodermalen Zellen (Stadium 7 früh) *DPATJ* im Zytoplasma verteilt (Abb. 27 C, E, G und I). In der folgenden Phase (Stadium 7 spät) liegt sowohl in Wildtyp-Embryonen als auch in *stg* mutanten Embryonen eine membranassoziierte und zytoplasmatische Verteilung von *DPATJ* im Mesoderm vor (Abb. 27 J-M). Interessanterweise sind zu diesem Zeitpunkt sowohl in *htl* als auch *htl stg* mutanten Embryonen (Abb. 27 N-Q) punktförmige Akkumulationen des *DPATJ* Proteins in Mesodermzellen zu beobachten (Abb. 27 O und Q), während diese in *stg* mutanten Embryonen und im Wildtyp nicht zu erkennen sind. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Zellpolarität von Mesodermzellen in Abhängigkeit von Htl und Stg reguliert wird. Somit scheint Htl, vorausgehend zur mesodermalen Zellmigration, eine wichtige Funktion während der EMT einzunehmen.

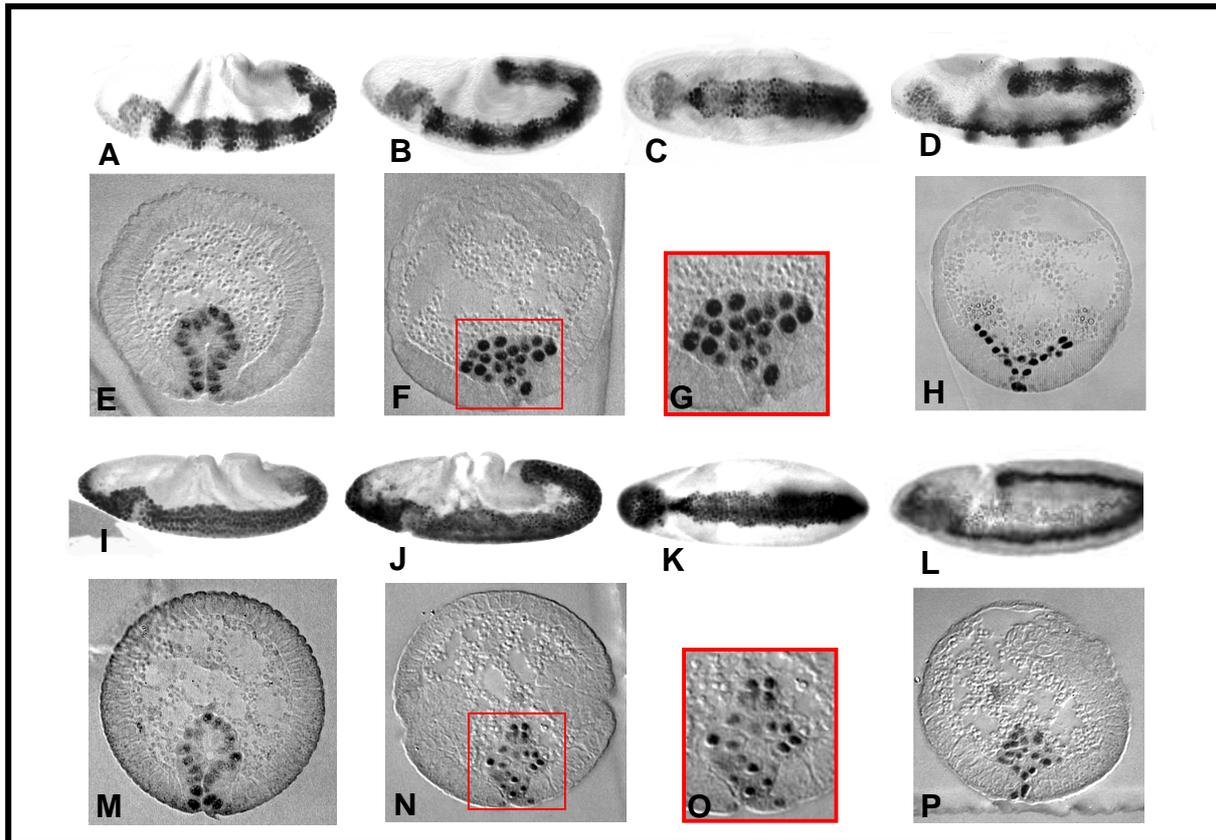
## 3.2 Funktionsanalyse zur Beteiligung des RHO-GEF Pebble während des EMTs in der frühen Embryogenese

### 3.2.1 Mesodermspezifische Funktion von Pbl

*Drosophila pebble (pbl)* kodiert für einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor („guanine-nucleotide-exchange factor“, GEF) der Rho-Familie kleiner GTPasen, der für die Zytokinese erforderlich ist (Miki et al., 1993; Prokopenko et al., 1999; Hime und Saint, 1992; Lehner 1992; Prokopenko et al., 1999; Salzberg et al., 1994). Weiterhin wurde *pbl* in einem genetischen Screen als wichtige Komponente der Mesoderm-Migration identifiziert (Gryzik und Müller, 2004). Um herauszufinden, ob die Defekte in der Mesoderm-Migration in *pbl* mutanten Embryonen auf Störungen während des EMTs zurückzuführen sind, wurde der Verlust des epithelialen Zellcharakters in der frühen Mesoderm-Morphogenese von *pbl* Mutanten untersucht.

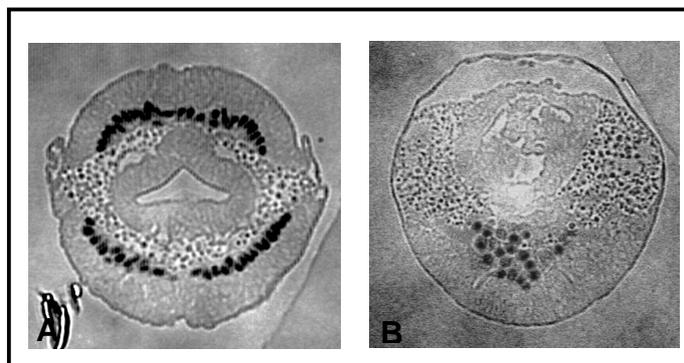
Die Invagination des Mesoderms verläuft in *pbl* mutanten Embryonen normal (Abb. 28 M). Im frühen Stadium 8, weisen *pbl* mutante Embryonen Defekte in der Mesoderm-Morphogenese auf. Die mesodermale Röhre scheint zu zerfallen, doch unterbleibt, ähnlich wie in *htl* mutanten Embryonen, die Herstellung des Kontaktes zum Ektoderm (Abb. 28 J, K, N und O). Im späteren Stadium 8 stehen die Mesodermzellen in direktem Kontakt zum Ektoderm und die dorso-laterale Migration des Mesoderms ist blockiert (Abb. 28 L, P).

In älteren Embryonen ist erkennbar, dass der mesodermale Verband als ein kompaktes Zellaggregat bestehen bleibt, was darauf schließen lässt, dass Pbl eine essentielle Rolle während der Mesodermmigration spielt (Abb. 29; Schumacher et al., 2004 ). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Pbl, ähnlich wie Htl, für den Verlust der epithelialen Charakteristika während der EMT notwendig ist, und somit eine der Zellmigration vorausgehende Funktion besitzt.



**Abbildung 28: Defekte während der frühen Mesoderm-Morphogenese in  $pbl^3$  mutanten Embryonen**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi (dunkelgrau) und gegen  $\beta$ -Galaktosidase (schwarz) gefärbt. (A, B und D) Laterale Gesamtansicht auf heterozygote Embryonen. Embryonen, die mindestens eine Wildtypkopie von  $pbl$  tragen, zeigen eine schwarze Färbung in 7 segmentale Streifen, die auf die Anwesenheit des  $TM3(ftz::lacZ)$  Balancerchromosoms zurückzuführen ist. (C) Ventrale Ansicht eines  $pbl^3$  heterozygoten Embryos in Stadium 8. (E, F, G und H) Querschnitte von heterozygoten Embryonen. (I, J und L) Laterale Ansicht auf Embryonen, homozygot mutant für  $pbl^3$ . (K) Ventrale Ansicht auf einen Embryo, homozygot mutant für  $pbl^3$  in Stadium 8. (M, N, O und P) Querschnitte von Embryonen homozygot mutant für  $pbl^3$ . (N und O) Die mesodermale Röhre scheint zu zerfallen, doch unterbleibt die Herstellung des Kontaktes zum Ektoderm. (L und P) Im späteren Stadium 8 stehen die Mesodermzellen in direktem Kontakt zum Ektoderm und die dorso-laterale Migration des Mesoderms ist blockiert.



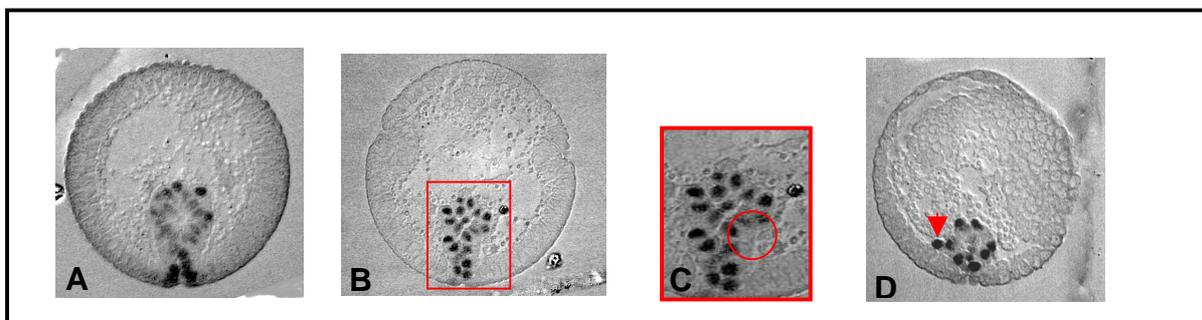
**Abbildung 29: Mesodermwanderungsdefekte in  $pbl^3$  mutanten Embryonen**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi (dunkelgrau) gefärbt. (A) Querschnitt eines Wildtyp Embryos. (B) Querschnitt vom homozygoten  $pbl^3$  Embryo. ([A und B]; Stadium 10);  $pbl^3$  mutante Mesodermzellen verbleiben als Aggregat auf dem Ektoderm.

### 3.2.2 Funktion von Pbl während des EMTs

Wie im Kapitel 3.1 gezeigt werden konnte, sind sowohl das mitotische Programm, als auch der Htl Signalweg in redundanter Weise für den EMT von Mesodermzellen notwendig. Da Pbl sowohl für die Zytokinese, als auch für die Htl abhängige Mesodermmigration benötigt wird, besteht die Möglichkeit, dass Pbl eine Funktion für die EMT hat, die bislang nicht gezeigt werden konnte. Um dies zu untersuchen wurde die EMT in *pbl* Einzelmutanten und *pbl stg* Doppelmutanten untersucht.

Untersuchungen an Embryonen, die doppelt mutant für *pbl* und *stg* sind, zeigen einen Phänotyp, der sich von den *pbl* homozygoten Einzelmutanten nicht unterscheidet (Abb. 30; vgl. Abb. 28). Die Querschnitte zeigen, dass in der ersten Phase der Mesodermwanderung die Mesodermzellen nach der Internalisierung eine epitheliale Röhre bilden (Abb. 30 E). In der nächsten Phase (Abb. 30 B) zerfällt die mesodermale Röhre, doch die Mesodermzellen weisen einen großen Abstand zum Ektoderm auf (Kreis in C). Im späteren Stadium 8 zerfällt die Röhre und die Mesodermzellen stellen einen direkten Kontakt zum Ektoderm her (Pfeil in D). Es findet in der weiteren Entwicklung jedoch keine Mesodermmigration statt.



**Abbildung 30: In *pbl*<sup>3</sup> *stg*<sup>7M</sup> mutanten Embryonen verläuft EMT wildtypisch**

Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twi (dunkelgrau) gefärbt. (A-D) Querschnitte von homozygoten *pbl*<sup>3</sup> *stg*<sup>7M</sup>-Embryonen. Die Querschnitte zeigen, dass in der ersten Phase der Mesodermwanderung (A) die Mesodermzellen nach der Internalisierung eine epitheliale Röhre bilden. (B) In der nächsten Phase scheinen sich die Zellen aus ihrem epithelialen Zellverband langsam zu lösen, doch die Zellen stellen noch keinen Kontakt zum Ektoderm her (Kreis in C). (D) Die Röhre zerfällt und die Mesodermzellen stellen einen direkten Kontakt zum Ektoderm her (Pfeil in D). In der weiteren Entwicklung findet keine Mesodermmigration statt.

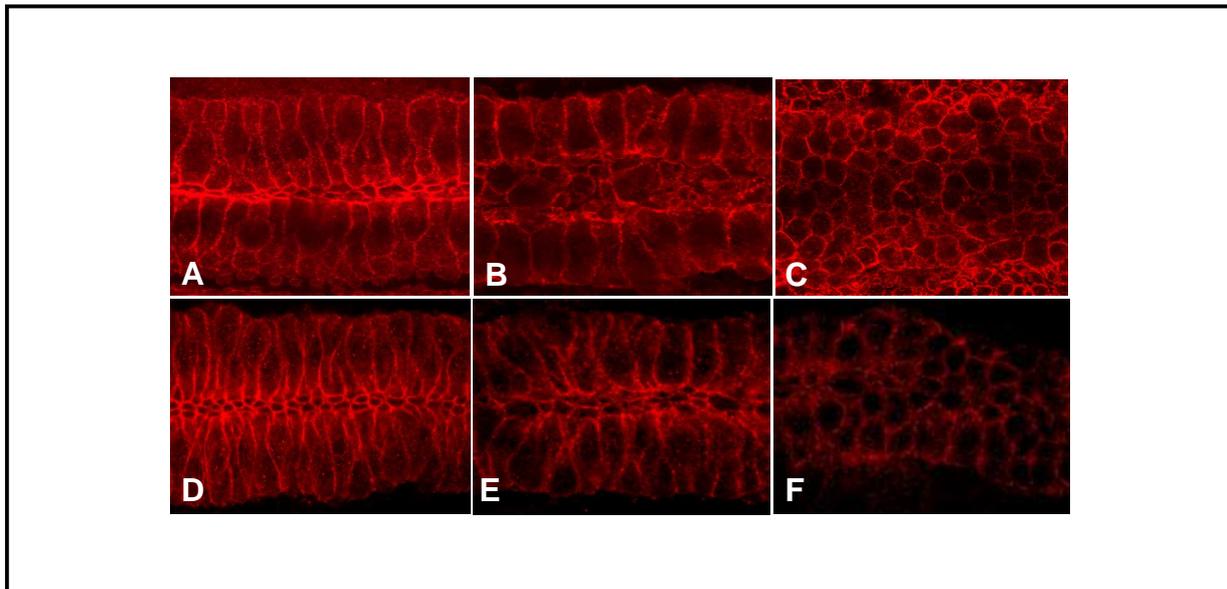
Es scheint, als ob in *pbl*, als auch in *pbl stg* mutanten Embryonen, deren Phänotyp sehr ähnlich ist, die Mesodermzellen ihren epithelialen Charakter verlieren, doch als Aggregat auf dem Ektoderm verbleiben. Um diese Beobachtung genauer zu verifizieren, sollten weitere Analysen bestätigen, dass in *pbl* mutanten Embryonen

der Verlust des epithelialen Zellcharakters nicht durch eine Fehlregulation von *DE*-Cadherin gestört ist.

### **3.2.3 Pbl ist für die Herunterregulierung epithelialer Zell-Zellkontakte nicht erforderlich**

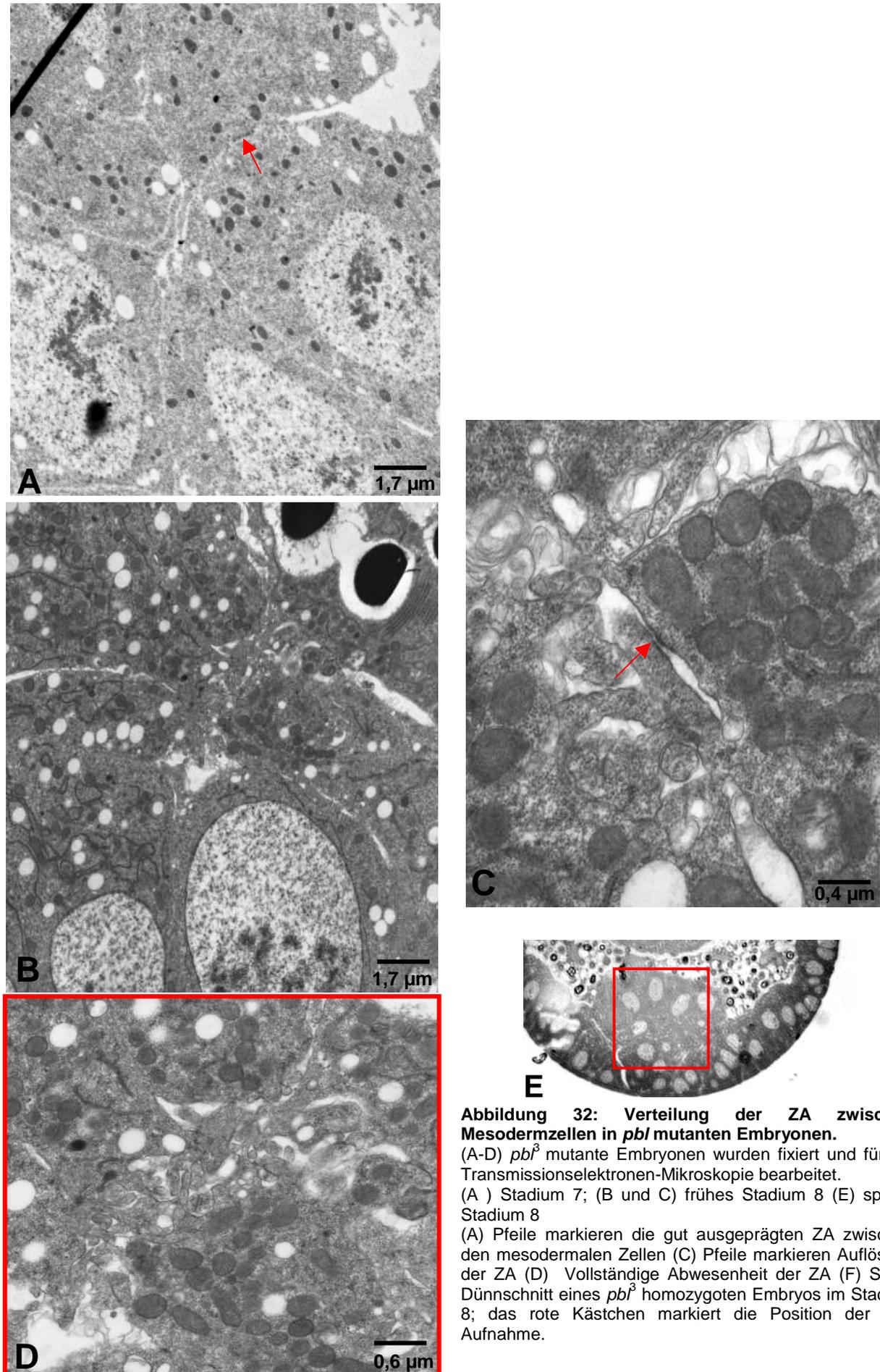
Es wurde bereits gezeigt, dass die Funktion von Pbl parallel oder downstream zur Funktion des FGF Rezeptors Htl ist (Schumacher et al., 2004). Wie oben gezeigt, ist *htl* in Kombination mit *stg* für die negative Regulation von epithelialen Charakteristika während des EMT notwendig. Ob dem *pbl* mutanten Phänotyp, ähnlich den *htl* Mutanten, eine Fehlregulation der epithelialen Zelladhäsion zu Grunde liegt, sollte daher im Folgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Verteilung von *DE*-cadherin während des EMT in Wildtyp-Embryonen und *pbl* mutanten Embryonen verglichen.

In Stadium 7 ist sowohl im Wildtyp, als auch in den *pbl* mutanten Embryonen, das epitheliale *DE*-Cadherin zunächst an den apikalen Grenzen der invaginierten Röhre konzentriert (Abb. 31 A und D). Im frühen Stadium 8 ist *DE*-Cadherin sowohl im Wildtyp, als auch in den *pbl* mutanten Embryonen nur noch geringfügig an den apikalen Zellgrenzen lokalisiert (Abb. 31 B und E) und verteilt sich in der nächsten Phase entlang der Plasmamembran (Abb. 31 C und F). Der einzig erkennbare Unterschied zum Wildtyp besteht darin, dass die Mesodermzellen in *pbl* Embryonen im späten Stadium 8, zum Beginn der Wanderung, enger beieinander liegen (vgl. Abb. 31 F). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass *pbl* mutante Mesodermzellen die apikalen Zellkontakte während des EMT ähnlich, wie beim Wildtyp, verlieren. Um diesen Sachverhalt genauer zu analysieren wurden elektronenmikroskopische Experimente durchgeführt.



**Abbildung 31: In *pbl* mutanten Embryonen ist die DE-cadherin Verteilung während des EMT wildtypisch**  
 Embryonen wurden mit anti-DE-Cadherin (rot) Antikörpern gefärbt. (A-C) Ventrale Ansicht von Wildtyp-Embryonen, (D-F) Ventrale Ansicht von *pbl*<sup>3</sup> mutanten Embryonen. ([A und D]; Stadium 7); ([B und E]; Stadium 8 früh); ([C und F]; Stadium 8 spät); (A, D) In Stadium 7 ist sowohl im Wildtyp, als auch in den *pbl* mutanten Embryonen, das epitheliale DE-cadherin zunächst an den apikalen Grenzen der invaginierten Röhre konzentriert. (E) Im frühen Stadium 8 ist DE-Cadherin in *pbl*<sup>3</sup> mutanten Embryonen nur noch geringfügig an den apikalen Zellgrenzen lokalisiert und (F) verteilt sich in der nächsten Phase entlang der Plasmamembran.

Wie die elektronenmikroskopische Untersuchungen von *pbl* mutanten Embryonen während der EMT zeigt, sind die Mesodermzellen im Stadium 7 durch die ZA mit ihren Nachbarzellen verbunden (siehe Pfeil Abb. 32 A). Im frühen Stadium 8, in dem sich die invaginierte Mesodermröhre abgeflacht hat, findet eine Auflösung dieser Zellkontakte statt und die Mesodermzellen lösen sich von ihren Nachbarzellen (siehe Pfeil Abb. 32 C). In der nächsten Phase (späten Stadium 8) sind die Zelladhäsionsverbindungen vollständig verschwunden (Abb. 32 E). Diese Beobachtungen bestätigen also die Hinweise (Abb. 31), dass die ZA, respektive die DE-Cadherin Verteilung, in *pbl* Mutanten wie im Wildtyp, negativ reguliert wird. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist in Tabelle 7 dargestellt.



**Abbildung 32: Verteilung der ZA zwischen Mesodermzellen in *pbl* mutanten Embryonen.**

(A-D) *pbl*<sup>3</sup> mutante Embryonen wurden fixiert und für die Transmissionselektronen-Mikroskopie bearbeitet.

(A) Stadium 7; (B und C) frühes Stadium 8 (E) spätes Stadium 8

(A) Pfeile markieren die gut ausgeprägten ZA zwischen den mesodermalen Zellen (C) Pfeile markieren Auflösung der ZA (D) Vollständige Abwesenheit der ZA (F) Semi-

Dünnschnitt eines *pbl*<sup>3</sup> homozygoten Embryos im Stadium 8; das rote Kästchen markiert die Position der EM-Aufnahme.

Gewebe	Genotyp	Zellverbindung	Stadium		
			7	8 früh	8 spät
Mesoderm	<i>Wildtyp</i>	ZA			
Mesoderm	<i>Pbl</i>	ZA			

**Tabelle 7: Übersicht der Präsenz von adhärenen Zellkontakten (ZA) der Mesodermzellen während der Gastrulation**

Das Vorhandensein von adherenten Zellkontakten (ZA) zwischen Mesodermzellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Gastrulation (Stadium 7-8 spät) mittels TEM untersucht. Die Balken zeigen subjektive Werte an, die das Auftreten der ZA zwischen den Zellen auf den Ultradünnschnitten widerspiegelt. Im Wildtyp und *pbl*<sup>3</sup> mutanten Embryonen konnte ab Stadium 8 früh keine ZA Struktur zwischen den Zellen gefunden werden

**Anwesenheit der ZA („Zonula adherence“)**

-  hoch
-  moderat
-  gering

### 3.3 Misexpressions-Screen zur Identifizierung neuer Gene, die eine essentielle Rolle in der Mesoderm-Morphogenese spielen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Misexpressions-Screen durchgeführt um neue Komponente zu identifizieren, die für die frühe Mesoderm-Morphogenese erforderlich sind. Dabei ist das sogenannte EP-Element (**E**nhancer **P**romoter) (Rorth, 1996) eingesetzt worden, ein spezielles P-Element-Transposon, das UAS-Sequenzen („upstream activating sequences“) enthält, die als Bindungsstellen für den Hefe-Transkriptionsvektor GAL4 dienen. Diese UAS-Stellen sind so konstruiert, dass eine die Integrationsstelle flankierende Transkriptionseinheit aktiviert werden kann, sobald GAL4 bindet. Die mesodermspezifische Expression von EP regulierten Transkriptionseinheiten wurde in dieser Arbeit durch Verwendung der Gal4-Treiberlinie *twist::Gal4* erreicht.

In dieser Kombination führt eine EP-Insertion, die selbst keinen Phänotyp erzeugt, durch Aktivierung oder Überexpression eines den UAS-Stellen nachgeschalteten Gens in 1 bis 3% der Fälle zur Letalität (Rorth et al., 1998).

Es wurde eine Kollektion von 2800 unabhängigen EP-Insertionslinien durchforstet. Dabei wurden Jungfrauen der *twist::Gal4*-Treiberlinie mit männlichen Fliegen der EP-Linien gekreuzt (s. Kapitel 2.2.3.1). Die Nachkommenschaft wurde auf Letalität hin überprüft, wobei 97 (3,5%) dieser EP-Linien Letalität durch *twi::Gal4*-induzierte Fehlexpression aufwiesen.

In Tabelle 8 sind die 97 Kandidaten aufgelistet, die als Kandidaten aus dem Screen von 2800 EP-Linien als positiv („letal“) identifiziert wurden (Tabelle 8).

<b>EP-Linie</b>	<b>Gen</b>
EP(x)0308	<i>ATP7</i>
EP(X)0395	<i>bifocal</i>
EP(x)0452	<i>Embryonic lethal abnormal vision (elav)</i>
EP(x)1203	<i>P(EP)</i>
EP(x)1217	<i>singed</i>
EP(x)1308	<i>highwire</i>
EP(x)1310	<i>P(EP)</i>
EP(X)1325	<i>CG3638</i>
EP(x)1326	<i>CG7502</i>
EP(x)1344	<i>P(EP)</i>
EP(x)1355	<i>Tis11 homolog</i>
EP(x)1360	<i>P(EP)</i>
EP(x)1394	<i>Beadex</i>

EP(x)1363	CG10777
EP(x)1488	CG10777
EP(x)1460	P(EP)
EP(x)1591	Adenine-nucleotide translocase 2/ Stress-sensitive B
EP(x)1579	rutabaga
EP(x)1569	Actin5C
EP(x)1601	Easily shocked

EP(2) 456	Dbr CG11371
EP(2)563	Kis (kismet)
EP(2)578	Traf 1
EP(2)587	Grp (grapes)
EP(2)611	P (EP)
EP(2)627	CG 3700
EP(2)633	Esg (escargot)
EP(2) 2009	
EP(2) 684	
EP(2) 2370	
EP(2)646	EP646 RPS13
EP(2)704	P (EP)
EP(2)757	CG 8446
EP(2)787	EP 787
EP(2)816	EP 816
EP(2)954	Bl (bancal)
EP(2)2002	Mef 2
EP(2)2028	CG 8841 garz (gartenzwerg)
EP(2)2083	P (EP)
EP(2)2099	CG 9894
EP(2)2111	Cam (Calmodulin)
EP(2)2131	Data not shown
EP(2)2146	Data not shown
EP(2)2181	Vkg (viking)
EP(2)2204	CG 14035
EP(2)2218	Sdc (syndecan)
EP(2)2275	Vimar (visceral mesodermal armadillo-repeats)
EP(2)2278	Bib (big brain) CG 13130
EP(2)2335	P (EP)
EP(2)2348	CG 9248
EP(2)2357	CG 6751
EP(2)2359	Shn (schnurri)
EP(2)2377	CG 6770
EP(2)2398	Lola (longitudinals lacking)
EP(2)2374	
EP(2)2636	
EP(2) 2396	
EP(2)2450	CG 14536
EP(2)2469	Kis (kismet)
EP(2)2472	Data not shown
EP(2)2491	Myo 31 DF (Myosin 31DF)
EP(2)2499	CG 6568
EP(2) 2607	Wun2
EP(2)2566	Grp (grapes)
EP(2)2582	Lea (leak)
EP(2)2586	CG 13434 I(2)05510
EP(2)2587	CG 13434 EP2587
EP(2)2516	CG 10433
EP(2)2597	CG 11070
EP(2)2645	Cam (Calmodulin)

EP(2)2635	<i>Aop (anterior open)</i>
EP(2)2649	<i>Data not shown</i>
EP(2)2629	<i>Tkv (thickveins)</i>
EP(2)2148	<i>SD02913</i>
EP(2)845	<i>Glutathione S transferase S1</i>
EP(2)1217	<i>singed</i>
EP(2)2478	<i>Poco pelo</i>
EP(3)411	<i>DanJ-like 1</i>
EP(3)440	<i>Laminin A</i>
EP(3)603	<i>Lk6</i>
EP(3)858	<i>How (held out wings)</i>
EP(3)1037	<i>CG31232</i>
EP(3)1049	<i>Sema-5C</i>
EP(3)1086	<i>CG6954</i>
EP(3)1119	<i>tribbles</i>
EP(3)3062	<i>tramtrack</i>
EP(3)3180	<i>E2F transcription factor</i>
EP(3)3201	<i>CG8036</i>
EP(3)3209	<i>E(spl) region transcript m7</i>
EP(3)3301	<i>CG18177</i>
EP(3)3312	<i>rho-like</i>
EP(3)3414	<i>Laminin A</i>
EP(3)3415	<i>pebble</i>
EP(3)3434	<i>CG5555</i>
EP(3)3531	<i>Twin of m4</i>

**Tabelle 8: Zusammenfassung der gezielt überexprimierten Gene**

In diesem Überexpressions-Screen wurden von 97 Genen, 4 Gene identifiziert, die eindeutige Defekte der Mesodermmorphogenese aufwiesen (rot markiert). Bei den restlichen letalen Kandidaten konnten entweder nur sehr schwache (grün markiert) oder keine Abnormalitäten (schwarz), die auf eine inkorrekte Mesodermmorphogenese zurückzuführen sind, detektiert werden.

Die Linien, in denen die *twi::Gal4* getriebene EP-Expression Letalität erzeugte, wurden phänotypisch näher untersucht. Um bei den positiven Kandidaten nachzuweisen, ob phänotypische Veränderungen der Mesodermmorphogenese im Embryo vorlagen, wurden Antikörperfärbungen gegen Twist durchgeführt. Anhand der Twi Markierung ist es möglich, Defekte in der Mesodermzellwanderung aufzudecken (Gryzik, 2005). Dabei konnten von 97 EP-Linien, 4 EP-Linien identifiziert werden, deren Überexpression zu eindeutigen Defekten der Mesodermmorphogenese führte (Tabelle 8 (rot markiert) und Abb. 34-37). Bei den restlichen letalen EP-Kandidaten konnten nach Überexpression mit *twi::Gal4* entweder nur sehr schwache (grün markiert), oder keine Abnormalitäten (schwarz) in der Mesodermmorphogenese beobachtet werden. Daher wurden im Folgenden nur die 4 EP Linien weiter analysiert, deren Expression zu Mesodermdefekten führte. Bei diesen Kandidaten erfolgte eine Antikörperfärbung gegen das Even Skipped (Eve) Protein. Die dorso-laterale Migration ist für die anschließende Differenzierung der Mesodermzellen essentiell. In *Drosophila* entstehen aus dem Mesoderm die somatische und viszerale Muskulatur, der Fettkörper, das larvale Herz und das

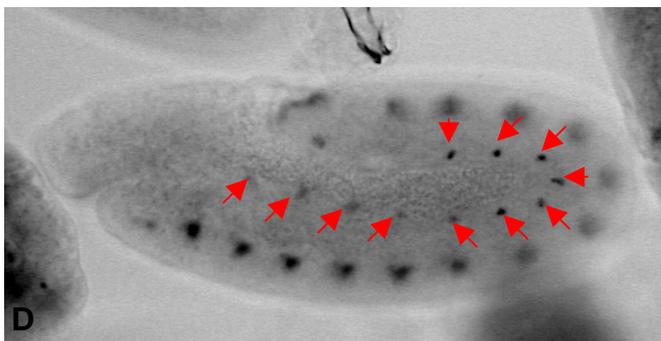
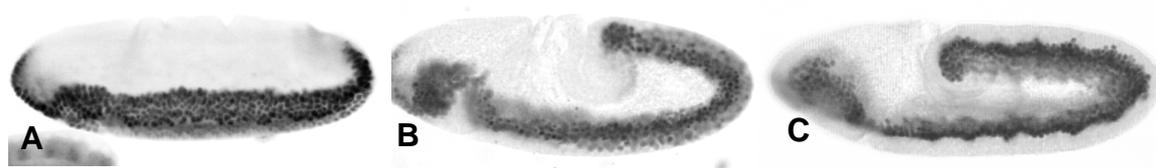
somatische Gewebe der Gonaden. Die für die Differenzierung notwendigen, induktiven Signale gehen von den Ektodermzellen aus. So entstehen z. B. die Herzvorläuferzellen aus den dorsal positionierten Mesodermzellen durch die Induktion von Decapentaplegic (Dpp) und wingless (wg), das in den dorsalen Ektodermzellen expremiert wird (Frasch, 1995; Wu et al., 1995; Staehling et al., 1994). Die Differenzierung zu den beiden Mesodermderivaten wird durch die Expression von Even-Skipped (Eve), dem frühesten Marker für die Perikardialzellen, dargestellt. Nur die vollständige Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm stellt die Differenzierung zu den Mesodermderivaten sicher was eine Nutzung von Eve als sekundären Marker für die korrekte Ausbreitung des Mesoderms ermöglicht. Im Wildtyp werden 22 Eve-positive Hemisegmente gezählt (Carmena et al., 1998; Halfon et al., 2000; Knirr und Frasch, 2001). Mutanten in denen die Mesodermmorphogenese fehlerhaft abläuft, sind durch unvollständige, oder sogar fehlende Eve-Expression gekennzeichnet.

Nachfolgend sind die 4 Kandidaten-Linien, die zugeordneten Kandidaten-Gene und ihre Lokalisation im Genom dargestellt.

### 3.3.1 Fehlexpression von EP(2)627

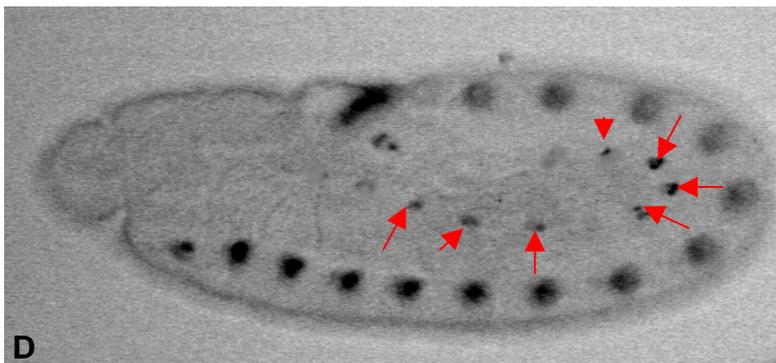
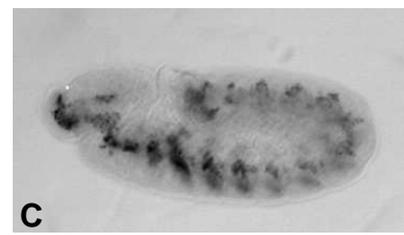
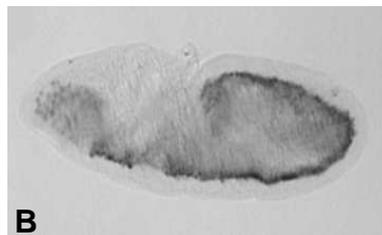
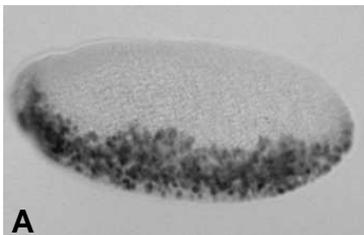
EP(2)627-Expression mit der *twi::Gal4* Treiberlinie führte zu embryonaler Letalität und zeigte einen starken Überexpressions-Phänotyp, der die Mesoderm-Morphogenese beeinträchtigt (Abb. 34). Schon im frühen Stadium 6 sind Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Mesodermzellen erkennbar (Abb. 34 A). In späteren Stadien (8 und 9) findet eine unvollständige Ausbreitung statt (Abb. 34 B, C). Eine weiterführende Analyse mit Antikörperfärbungen gegen das Eve-Protein bestätigte die Vermutung, dass Überexpression von EP(2)627 zur defekten Mesodermmorphogenese führt. In Wildtyp-Embryonen wird eve während Stadium 11 der Embryogenese in 11 Gruppen von Perikardialzellen expremiert (vgl. Abb. 33 D). Falls der Prozess der Wanderung nicht oder zu spät und unregelmäßig einsetzt, werden die Perikardialzellen nicht spezifiziert und exprimieren nur unvollständig oder gar kein eve. Durch Expression von EP(2)627 wird die Spezifizierung der eve-positiven Zellen beeinträchtigt (Abb. 34 D, Tabelle 9). Die unvollständige Ausbildung der dorsalen Mesodermderivate ist somit höchstwahrscheinlich eine Folgeerscheinung der gestörten Wanderung. Die EP-Insertion erfolgte in der Nähe des noch unbeschriebenen Gens *CG3700*. Es ist jedoch möglich, dass EP(2)627

tatsächlich nicht zur ektopischen Expression von *CG3700*, sondern eines anderen, der EP Insertion benachbarten Gens führt (Abb. 34 E). Diese Möglichkeit sollte in einem Kontrollexperiment getestet werden, bei dem *CG3700* mit Hilfe einer genspezifischen UAS-Linie im Mesoderm expremiert wird.



**Abbildung 33: Wildtyp-Embryonen**

(A-C) Laterale Gesamtansicht auf Wildtyp-Embryonen, gefärbt mit Twist Antikörpern (A) Stadium 6; (B) Stadium 8; (C) Stadium 9. (D) Laterale Gesamtansicht auf ein Wildtyp-Embryo in Stadium 11, gefärbt mit dem Antikörper gegen das Eve-Protein; EVE-positive Perikardialzellen sind mit Pfeilen markiert.

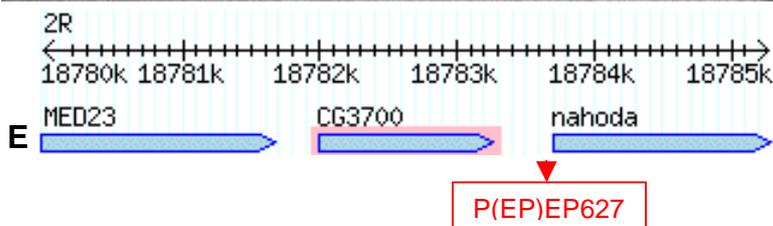


**Abbildung 34: Misexpressions-Phänotyp von EP(2)627-CG 3700**

(A-C) Laterale Gesamtansicht auf Embryonen, gefärbt mit Twist Antikörpern. (A) Stadium 6; (B) Stadium 8; (C) Stadium 9. (D) Laterale Gesamtansicht auf ein Wildtyp-Embryo in Stadium 11, gefärbt mit Eve Antikörper; Eve-positive Perikardialzellen sind mit Pfeilen markiert.

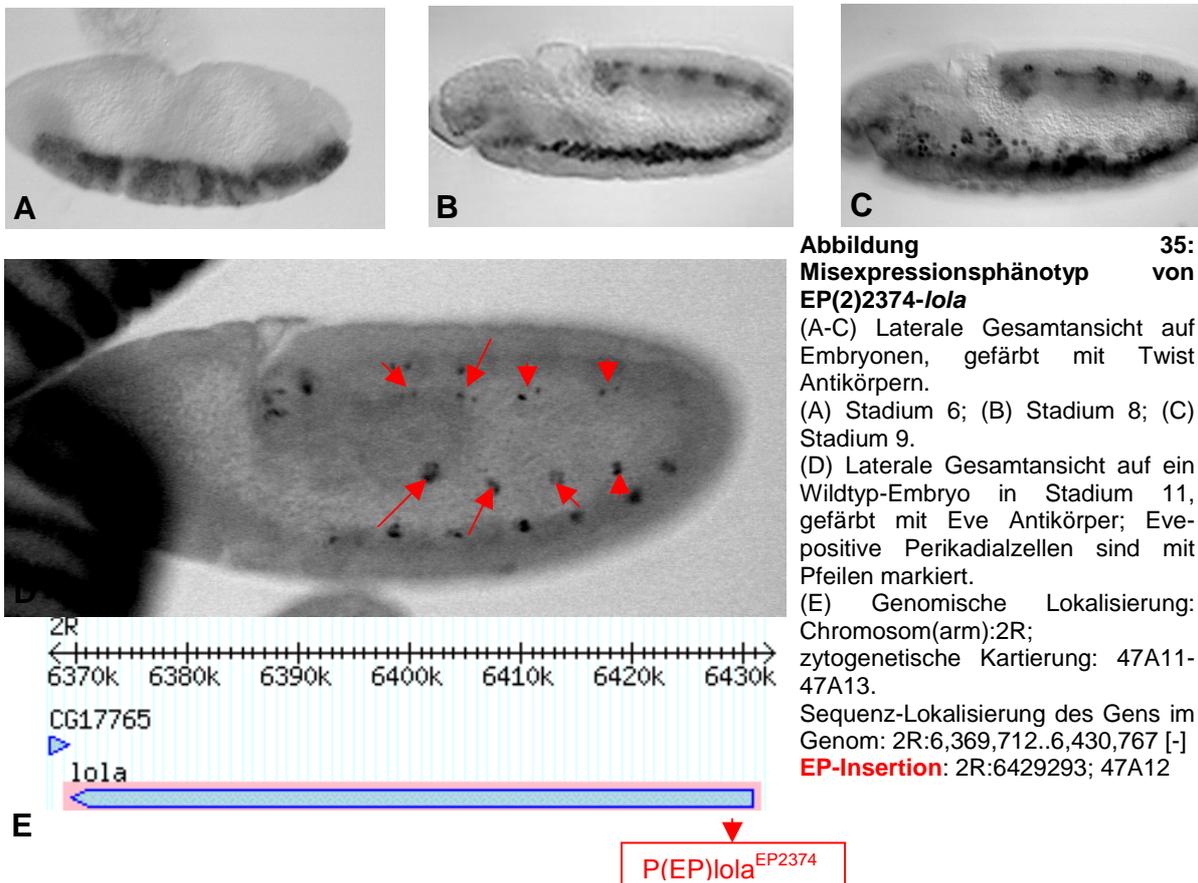
(E) Genomische Lokalisierung:  
Chromosom (arm): 2R  
Zytogenetische Kartierung: 59B4-59B4.  
Sequenz-Lokalisierung des Gens im Genom: 2R:18,781,986..18,783,269  
[+]

**EP-Insertion:** 2R:18783671; 59B4



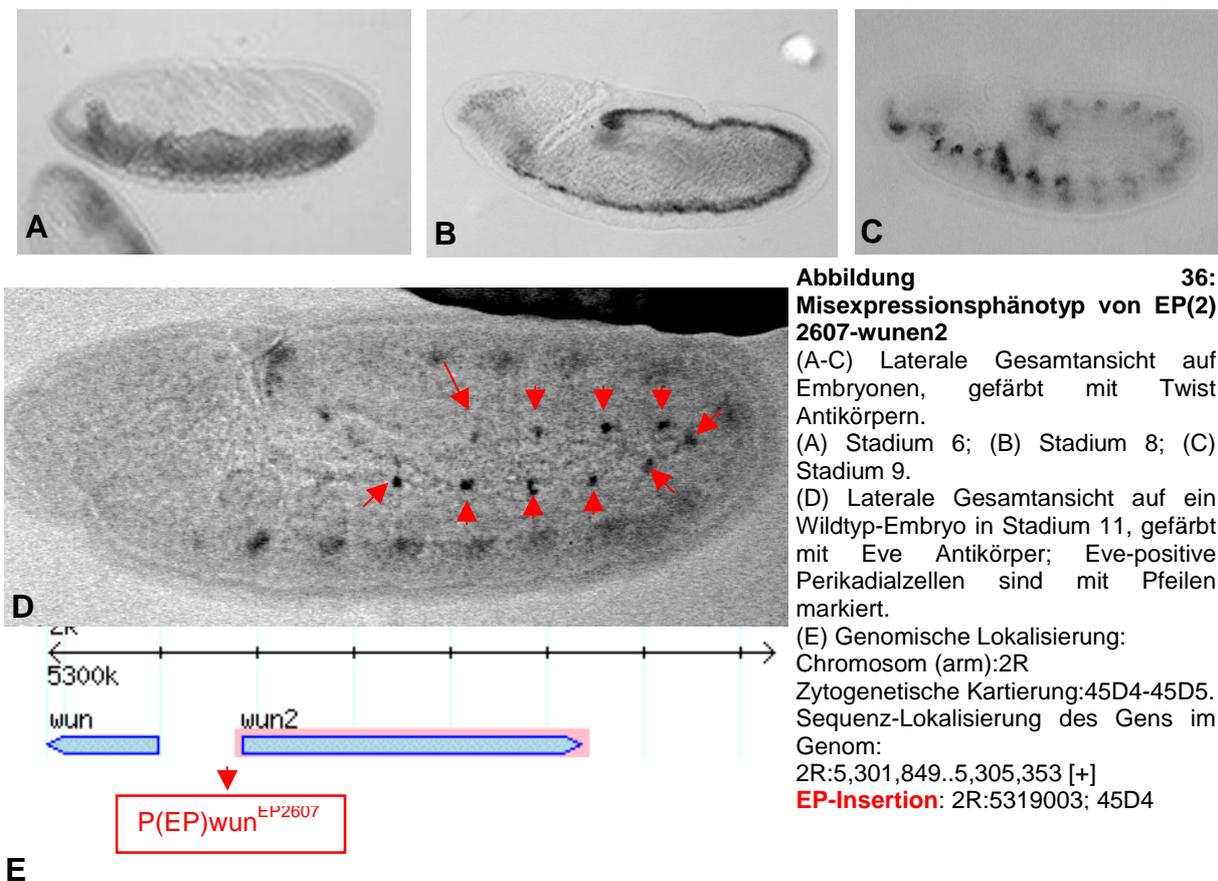
### 3.3.2 Fehlexpression von EP(2)2374

EP(2)2374-Expression mit der *twist::Gal4* Treiberlinie führte zu embryonaler Letalität und zeigt einen starken Überexpressions-Phänotyp, der die Mesoderm-Morphogenese betrifft (Abb. 35). In Stadium 6 zeigt sich eine Unregelmäßigkeit in der Invagination des Mesoderms (Abb. 35 A), die in den späteren Stadien einen Migrationsdefekt zur Folge hat (Abb. 35 B und C). Die defekte Mesodermmigration wird ebenfalls anhand der Zahl der Eve-positiven Perikardialzellen sichtbar. Überexpression durch EP(2)2374 führt im Durchschnitt zur Entwicklung 16 Eve-positiver Gruppen von Perikardialzellen im Gegensatz zu 22 Gruppen von Perikardialzellen im Wildtyp (Abb. 35 D; Tabelle 9). Die EP-Insertion erfolgte in der Nähe des Gen *lonitudinal lacking (lola)*. Interessanterweise wurden weitere EP-Insertionslinien (EP(2)2398, EP(2)2374, EP(2)2636, und EP(2) 2396) im Screen identifiziert, die in der gleichen genomischen Region inseriert sind wie EP(2)2374. Überexpression dieser Linien führt ebenfalls zu embryonaler Letalität und zu einer identischen Beeinträchtigung der Mesodermentwicklung. Generell muss allerdings mit Hilfe von UAS-Linien verifiziert werden, ob *lola* Expression tatsächlich zum beobachteten Defekt der Mesodermmigration führt.



### 3.3.3 Fehlexpression von EP(2)2607

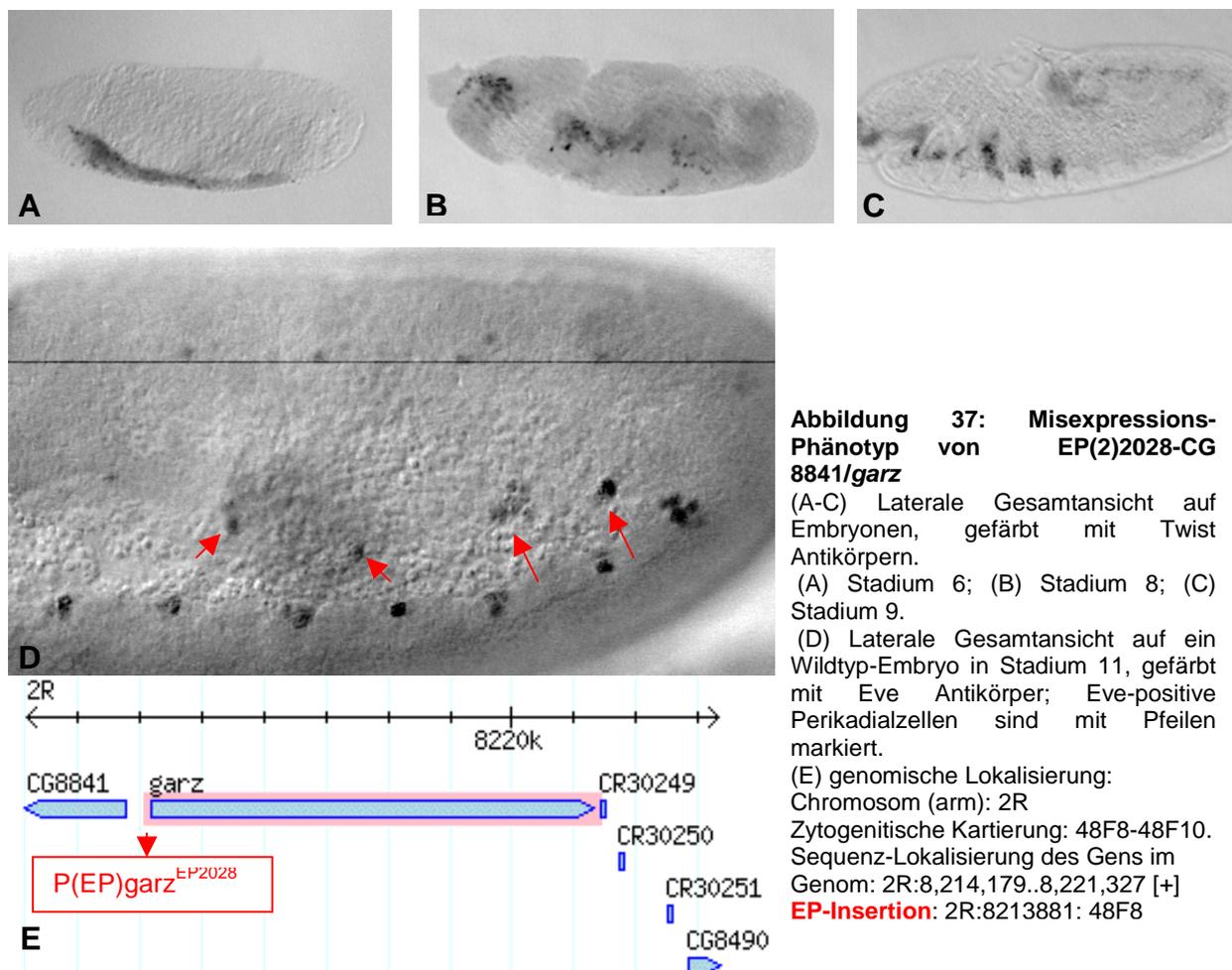
Die EP(2)2607-Expression mit der *twist::Gal4* Treiberlinie resultiert in einem schwächeren Überexpressions-Phänotyp, als die Expression der anderen 3 Kandidaten (Abb. 36). Im frühen Stadium 6 sind Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Mesodermzellen erkennbar (Abb. 36 A). Im Stadium 8 und 9 breiten sich die Mesodermzellen ungleichmäßig aus (Abb. 36 B, C). Wie Antikörperfärbungen gegen das Eve-Protein zeigten, ist die Determination der Eve positiven Zellgruppen durch Expression von EP(2)2607 nur leicht beeinträchtigt, da 20 Eve-positive Hemisegmente detektieren werden können (Abb. 36 D, Tabelle 9). Die EP-Insertion erfolgte in der Nähe der Gene *wunen* und *wunen2*. Interessanterweise sind sowohl *wunen2* als auch sein Nachbarn *wunen* in somatischen Zellen erforderlich, um die Migration der Keimzellen während der Entwicklung zu steuern (Lehmann, 2004).



### 3.3.4 Fehlexpression von EP(2)2028

Der stärkste Überexpressions-Phänotyp, der die Mesoderm-Morphogenese betrifft wird durch die Fehlexpression der Linie EP(2)2028 verursacht (Abb. 37). Schon im frühen Stadium 6 sind nur wenige Mesodermzellen detektierbar (Abb. 37 A). In den späteren Stadien 8 und 9 hat eine sehr unvollständige Ausbreitung stattgefunden. Auch hier sind deutlich reduzierte Mesodermzellen zu sehen (Abb. 37 B, C). Weiterhin können in Embryonen, in denen EP(2)2028 überexpressiert wurde, in Stadium 11 durch Eve Färbung im Durchschnitt nur 7 positive Hemisegmente identifiziert werden (Abb. 37 D, Tabelle 9). Die EP-Insertion erfolgte in der Nähe des Gens *gartenzwerg* (*garz*), dessen Genprodukt für die Herz- und Muskelentwicklung benötigt wird. Doch auch in diesem Fall ist es notwendig, mit Hilfe von UAS-Linien zu verifizieren, ob die *garz* Expression tatsächlich zum beobachteten Defekt der Mesodermmigration führt.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der EP Linie benachbarte Gene zur Mesodermentwicklung entscheidend beitragen.



Die Analyse der Überexpression von 2800 EP Linien mit Hilfe des *twi::Gal4* Treiberstammes hat somit zur Identifizierung von 4 Linien geführt, die potentielle Gene ansteuern, die in die Regulation der Mesodermmorphogenese involviert sein können. Wie erwähnt, sollte der Phänotyp der Überexpression der einzelnen potentiellen Kandidatengene durch UAS-Konstrukte weitergehend analysiert werden. Eine Zusammenfassung des Screens ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

## Zusammenfassung des Misexpressions-Screens

2800 EP Insertionslinien mit der Treiberlinie *twist:Gal4*:

**Letalität: 97 (3,5%)** : 4 Kandidaten zeigen eindeutige Mesodermmorphogenese-Defekte

EP Linie	Zytogen. Kartierung	Gene
EP(2) 627	59B4	<i>CG3700</i>
EP(2)2028	48F8	<i>gartenzwerg (garz)</i>
EP(2) 2398 2374 2396 2696	47A11	<i>longitudinals lacking (lola)</i>
EP(2) 2527 2607	45D4	<i>wunen2</i>

EP-Linie		Eve-positive Hemisegmente
	<b>Wildtyp</b>	<b>22</b>
<i>EP(2)</i> 2398 2374 2396 <b>2696</b>	<i>Longitudinals lacking (lola)</i>	<b>M=15,5 (S=1,5) (n=4)</b>
EP(2)2028	<i>Gartenzwerg (garz)</i>	M=7,2 (S=0,8) (n=3)
<b>EP(2)</b> 2527 2607	<i>Wunen2</i>	<b>20 (n=1)</b>
<b>EP(2)</b> 627	<i>CG3700</i>	<b>M=14,5 (S=1,5) (n=3)</b>

**Tabelle 9: Anzahl der Eve-positiven Mesodermzellen in den 4 letalen Kandidaten**

Die Anzahl der Eve-positiven Hemisegmente wurde in den Embryonen (Stadium 11) der 4 letalen Kandidaten bestimmt. Dabei sind der Mittelwert (M), Standardabweichung (S) und die Anzahl der ausgewerteten Embryonen (n) angegeben. Wie beobachtet wurde, zeigt die Überexpression der EP-Linie EP(2)2028 die stärkste Abnormalität in der Eve-Expression.

## 4. Diskussion

Die EMT ist ein wichtiger Prozess für die normale Entwicklung eines Organismus. Während der Embryonalentwicklung können z.B. Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, indem sie Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin negativ regulieren und dadurch die Zellkontakte (ZA) zwischen den Zellen entfernen. Es besteht die Vermutung, dass dadurch die Zellen erst die Eigenschaft erlangen können, das Gewebe zu verlassen und sich relativ frei durch den Organismus zu bewegen. In ihrem Zielgebiet angekommen, können sie sich zu verschiedenen Zellen, unter anderem wieder zu Epithelzellen, differenzieren. Eine Voraussetzung für die Migration ist die Polarisierung der Zelle. Epithelzellen haben eine apikale Seite, die dem Äußeren oder dem Lumen zugewandt ist, und eine basale Seite, welche mit dem darunter liegendem Gewebe verbunden ist. Die Polarität von Epithelzellen ist durch strukturelle und funktionelle Unterschiede von apikaler und basaler Membran geprägt. Dieser Polarisierungsprozess muss während der Entwicklung präzise festgelegt sein, um die Differenzierung zu Zellen und Geweben bestimmter Funktion zu ermöglichen. Welche Bedeutung der zeitlichen und räumlichen Regulation des EMT im Organismus zukommt, wurde unter anderem in Krebszellstudien erkannt. Bei der Metastasierung von Tumoren kommt es zu einem Phänotypwechsel, bei dem die Tumorzellen ihre zellspezifischen Eigenschaften verändern oder verlieren und damit die Fähigkeit zur Migration erlangen.

Mit dieser Arbeit sollte der Prozess des EMT in Mesodermzellen während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* auf zellulärer Ebene untersucht werden. Die Identifizierung von an Entwicklungsprozessen beteiligten Genen kann in *Drosophila* durch unterschiedliche Ansätze erfolgen. So können zum einen Genfunktionen durch Mutationen ausgeschaltet und auf der Basis des entstandenen Phänotyps Rückschlüsse auf die normale Funktion des Gens in der Entwicklung gezogen werden. Im Gegensatz zu Funktionsverlustmutationen kann die Funktion eines Gens auch durch gezielte ektopische Überexpression in einzelnen Zellen oder einem speziellen Gewebe untersucht werden. Diese Arbeit verwendete beide genetischen Ansätze für die Analyse von Genfunktionen während des EMT.

## 4.1 EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese

### 4.1.1 Die Funktion der FGF-Signalkaskade während des EMT

Der FGF-Rezeptor Heartless (Htl) wurde als essentielle Komponente für die Regulation der Mesodermmigration in *Drosophila* identifiziert (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Schumacher et al., 2004). FGFs stellen eine große Familie von Signalmolekülen dar, die an die Regulation von zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Differenzierung beteiligt sind (Szebenyi und Fallon, 1999). Aus verschiedenen Vertebraten Modellsystemen ist bekannt, dass der FGF-vermittelte Signalweg nicht nur für die Migration, sondern auch für den EMT z. B. während der frühen Mesoderm-Morphogenese der Maus, erforderlich ist (siehe unten). Somit stellte sich zum einen die Frage, ob der FGF-vermittelte Signalweg in *Drosophila* ebenfalls eine Rolle während der EMT spielt, zum anderen, welche molekularen Vorgänge ausgehend vom Htl/FGF Rezeptor zu Veränderungen auf zellulärer Ebene während der Mesoderm-Morphogenese und der EMT führen.

Die Hypothese, dass der Htl Signalweg während der Mesoderminvagination zum EMT beitragen könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Analyse von *htl* mutanten Embryonen auf zellulärer und ultrastruktureller Ebene untersucht. Dabei wurde berücksichtigt, dass kurz nach der Internalisierung der Mesodermzellen durch die ventrale Furche, Mitosen vollzogen werden, die die Zellzahl im Mesoderm erhöhen (Bate, 1993; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Diese Mitosen könnten ebenfalls Ursache für den Kontaktverlust, bzw. die Änderung von Zell-Zellverbindungen und der epithelialen Zellpolarität sein.

Wie diese Arbeit zeigt, wird EMT in *Drosophila* nicht ausschließlich durch den Einfluss des mitotischen Programms reguliert welches während der frühen Mesoderm-Morphogenese aktiviert wird, was in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten steht (Leptin und Grunewald, 1990). Hingegen zeigt diese Arbeit, dass sowohl das mitotische Programm als auch der Htl Signalweg in redundanter Weise für EMT erforderlich sind. Dabei scheinen Htl als auch Stg für die Regulation von epitheliale Cadherin notwendig zu sein, wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

#### 4.1.2 Htl und Stg sind für den Verlust epithelialen Zellcharakters während der EMT erforderlich

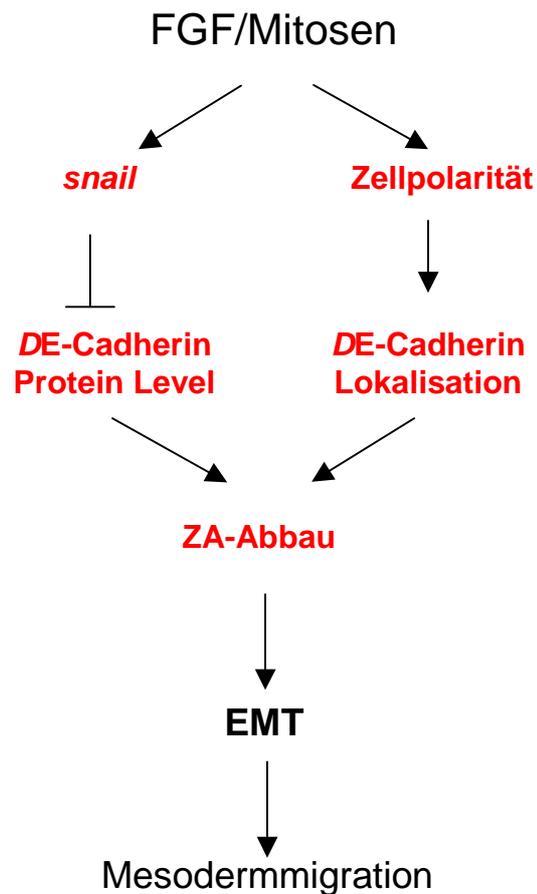
Im Epithel wird die Zelladhäsion sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten durch Cadherine vermittelt (Tepass, 1999; Steinberg und McNutt, 1999). Anhand zahlreicher Studien aus der Tumorforschung wurde gezeigt, dass EMT mit einer negativen Regulation von E-Cadherin korreliert, wobei der Verlust von E-Cadherin eine Zunahme der invasiven Wachstumspotenz von Tumorzellen mit sich bringt (Herzig et al., 2007; Cavallaro und Christofori, 2004; Birchmeier und Behrens, 1994). Weiter haben diese Studien ergeben, dass häufig eine reduzierte oder fehlende E-Cadherin Immunreaktivität mit Invasivität von Karzinomzellen einhergeht. Die Reexpression von E-Cadherin kann diese Invasivität inhibieren (Vleminckx et al., 1991). Eine direkte Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin einerseits und dem Differenzierungsgrad und der Invasion andererseits berichten beispielhaft Schipper et al. (1991). Die Expression von E-Cadherin bewirkt nicht nur eine starke Zell-Zelladhäsion, sondern induziert auch Veränderungen im Zellverhalten, wie z.B. reduzierte Zellwanderung, Wachstumsinhibition und die Modulation des Cytoskeletts. In dieser Arbeit werden Daten gezeigt, die vermuten lassen, dass während des EMT der frühen Mesoderm-Morphogenese in *Drosophila* ebenfalls die Lokalisation von DE-Cadherin moduliert wird und dass dieser Prozess in Abhängigkeit vom FGF-Signalweg und dem mitotischen Programm steht. Interessanterweise deuten die ultrastrukturellen Untersuchungen darauf hin, dass in *htl* mutanten Mesodermzellen bereits eine relativ schwächere negative Regulation der ZA im Vergleich zum Wildtyp erfolgt. Der epitheliale Charakter der *htl* mutanten Zellen geht verloren, allerdings geschieht dies mit einer etwas verzögerten Dynamik im Vergleich zu wildtypischen Embryonen. Gleichzeitig scheint der DE-Cadherin Proteinlevel im Vergleich zum Wildtyp in *htl* mutanten Zellen erhöht zu sein, was auf eine erhöhte Expression oder eine verminderte Degradation von DE-Cadherin zurückzuführen sein könnte. Diesen Effekt muss man in weiteren Studien quantifizieren in dem man Transkript- bzw. Proteinmengen von DE-Cadherin in identifizierten Mutanten durch quantitative RealTime PCR respektive Western Analyse misst und mit Wildtyp Embryonen vergleicht.

Eine der *htl* Mutante ähnliche leichte Verzögerung des EMT oder Änderungen im DE-Cadherin Proteinlevel lassen sich bei *stg* mutanten Embryonen nicht beobachten. Im

Gegensatz zu den Einzelmutanten weisen *htl stg* doppelt mutante Embryonen starke Defekte im Verlust der adhäsiven Zellkontakte auf, was den Zerfall der Mesodermröhre, die normalerweise im frühen Stadium 8 erfolgen sollte, stark zu verzögern scheint. *DE-Cadherin* ist zu diesem Zeitpunkt noch stark an den apikalen Zellgrenzen konzentriert. Die starke Inhibition des EMT hält bis zu späteren Entwicklungsstadien an. Die Beobachtung dieser Arbeit, dass der Transkriptionsfaktor *snail* in *htl* Mutanten vermindert exprimiert wird, lässt vermuten, dass dies zu erhöhter Transkription von *DE-Cadherin* und zur Aufrechterhaltung des epithelialen Charakters beiträgt (Nieto et al., 2002; Oda et al., 1998). Eine ähnliche Korrelation zwischen *Snail* und *E-Cadherin* wurde in Arbeiten zur frühen Mesoderm-Morphogenese in der Maus gezeigt. Dort wird *E-Cadherin* während der EMT transkriptionell reguliert (Zohn et al., 2006). Interessanterweise wird diese transkriptionelle Kontrolle von *E-Cadherin* durch den FGF-Signalweg, über FGF-R1 und durch Expression des Vertebraten Homologs von *snail* reguliert. Von *Snail* ist bekannt, dass es direkt die Expression des *E-cadherin* Gens reguliert und dadurch die Level des *E-cadherin* Proteins in der Zelle reduzieren kann. Diese Reduktion von zellulärem *E-Cadherin* trägt zu einer verminderten Zelladhäsion bei (Cano et al., 2000). Daher scheint die Unterdrückung von *E-Cadherin* durch *Snail* zum Verlust der Zelladhäsion und des epithelialen Charakter während der EMT in Vertebraten als auch in *Drosophila* beizutragen (Bates et al., 2005; del Barrio und Nieto 2002; Carver et al., 2001; diese Arbeit).

Wie die ultrastrukturellen Untersuchungen dieser Arbeit ergeben haben, scheint sich die Fehlregulation von *DE-Cadherin* in *htl stg* mutanten Embryonen direkt auf die Zellkontakte auszuwirken. Wie oben diskutiert, kann die ZA im Mesoderm möglicherweise durch Regulation der *E-Cadherin* Proteinlevel über *Snail* reguliert werden. Eine andere Möglichkeit, wie die Regulation der ZA während der EMT erfolgen könnte, ist über Proteine, die die apikal-basale Zellpolarität vermitteln. In *Drosophila* wird für die Lokalisation des *Cadherin/Catenin* Komplexes in der ZA, die Expression der Gene *bazooka* und *crumbs* benötigt (Grawe et al., 1996). Der *Crumbs* Proteinkomplex besteht aus *Crumb* (*Crb*), *Stardust* (*Sdt*), dem „*Drosophila* Protein Associated with Tight Junctions“ (*DPATJ*) und *DLin7* (Tepass et al., 1990; Bachmann et al., 2001; Bachmann et al., 2004). Es ist bekannt, dass der *Crb*-Komplex mit *Baz* in der subapikalen Region (SAR) co-lokalisiert und antagonistisch zu lateral lokalisierten Proteinen, wie z.B. den Tumorsuppressoren *Scribbled* (*Scrib*),

Discs large (Dlg) und Lethal Giant Larvae (Lgl) wirkt (Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001; Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Das Zusammenspiel apikaler und lateraler Determinanten lokalisiert die ZA im apikalen Bereich (Bilder and Perrimon, 2000; Bilder et al., 2001; Tanentzapf und Tepass, 2002). Die Daten dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass die Lokalisation von DPATJ in *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich ist. Auffällig ist, dass in den *htl* und *htl stg* mutanten Embryonen punktförmige Akkumulationen des DPATJ Proteins in Mesodermzellen zu sehen sind, während diese in *stg* mutanten Embryonen und im Wildtyp nicht zu erkennen sind. Hier könnte man vermuten, dass es sich möglicherweise um endozytische oder exocytotische Vesikel handelt, die angefärbt wurden. In einer Studie an humanen Zelllinien wurde die Endozytose als Hauptweg identifiziert, die an der Auflösung von adhäsiven E-Cadherin Dimeren beteiligt ist. Auch hier wurden Vesikel ähnliche Strukturen an der AJ durch Immunfluoreszenz Mikroskopie detektiert (Regina et al., 2006). Interessanterweise konnten auch auf ultrastruktureller Ebene in *htl stg* mutanten Embryonen Vesikel ähnliche Strukturen beobachtet werden, die mit der ZA assoziiert sind. Dies könnte ein Zeichen für eine verzögerte Internalisierung der ZA in *htl stg* mutanten sein. Um diese Hypothese zu testen, sollte an Embryonen, in denen die Endozytose blockiert ist, untersucht werden, wie sich die Umverteilung von DE-Cadherin verhält. Dieses kann zum Beispiel mit Hilfe einer temperatursensitive Mutation im *Drosophila*-Gen *shibire* (*shi*) getestet werden. *shibire* codiert für *Drosophila*-Dynamamin, welches für die Endozytose notwendig ist. Diese wird normal initiiert, aber die Abtrennung der bereits durch den Clathrin-Proteinkomplex eingeschnürten Vesikel von der Membran findet nicht statt. Die Beobachtungen dieser Arbeit lassen daher vermuten, dass Htl Teilaspekte der Zellpolarität reguliert, wobei die Beeinträchtigung des Polaritätsabbaus zum Erhalt des epithelialen Zellcharakters führt. Somit scheinen *htl* und *stg* sowohl über die Regulation von DE-Cadherin durch Snail, als auch durch die Regulation der Zellpolarität den normalen Ablauf des EMT zu regulieren. Abbildung 38 zeigt ein Modell, das diese Ergebnisse zusammenfasst.



**Abbildung 38: Modell zur Regulation von EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese in *Drosophila***

Die vorliegende Arbeit schlägt zwei Signalwege vor, die eine wichtige Schlüsselfunktion zur Regulation von *DE-Cadherin* während der EMT spielen könnten. Zum einen die transkriptionelle Regulation über *snail* und zum anderen die Zellpolarität, die in Abhängigkeit der FGF-Signalkaskade zusammen mit dem mitotischen Programm reguliert werden muss, um einen normalen Ablauf der EMT zu gewährleisten.

Die präsentierten Daten liefern Hinweise dafür, dass die Regulation der EMT in Vertebraten und in *Drosophila* auf ähnliche Weise gesteuert wird. Aufgrund dieser Annahme könnte *Drosophila* als allgemeines Modellsystem für weiterführende in vivo Studien der EMT etabliert werden, um die molekularen Mechanismen des EMT während der Tumorentstehung besser verstehen zu können.

## 4.2 Weitere potentielle Faktoren, die EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese regulieren

Wie bereits im vorherigen Kapitel diskutiert, reguliert der FGF Signalweg die EMT während der frühen Mesoderm-Morphogenese in Abhängigkeit von *snail* und Zellpolaritätsfaktoren. Zusätzlich zur FGF/Snail abhängigen Transkriptionskontrolle von E-Cadherin wird der Level des E-Cadherin Proteins während der frühen Maus Mesoderm-Morphogenese posttranskriptionell reguliert. Für diese posttranskriptionelle Regulation wird die Aktivierung des NIK/Map4k4-Signalweg durch einen bisher unbekanntem Faktor benötigt. Es wurde gezeigt, dass die MAP-Kinase p38 und das p38-Interacting Protein (p38-IP) essentiell für die Regulation des E-cadherin Proteins sind. Das Zusammenspiel der FGF/Snail und der NIK/p38/p38-IP abhängigen E-Cadherin Regulation trägt zu einem normalen Ablauf der EMT bei und ermöglicht somit die Mesodermmigration während der späteren Mausmorphogenese (Zohn et al., 2006).

In *Drosophila* erfolgt während der frühen Mesoderm-Morphogenese ebenfalls die Aktivierung einer MAP-Kinase, allerdings in Abhängigkeit zur *htl* Expression (Cobb und Goldsmith 1995; Seger et al., 1992). Bisher ist nicht bekannt, ob die Aktivierung der MAP-Kinase während der Mesoderm-Morphogenese in *Drosophila* eine direkte oder eine indirekte Antwort auf das Htl Signal ist und es bleibt zu klären, ob sie Einfluss auf die EMT hat. Um die Interaktion mit dem Htl Signalweg und die Rolle während des EMT zu untersuchen, könnte z.B. die MAP Kinase Aktivierung in *htl stg* mutanten Embryonen analysiert werden. Es wäre möglich, dass ein parallel zur FGF-vermittelten Signalkaskade verlaufender Signalweg, wie im Beispiel des NIK-Signalwegs, die EMT reguliert.

### 4.2.1 Die Funktion von Pbl in Hinblick auf den Htl-Signalweg während der EMT

Wie bereits erwähnt, wird die Mesodermwanderung in *Drosophila* durch die Aktivität des FGF-Rezeptors Heartless (Htl) und des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Pebble (Pbl) kontrolliert (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Schumacher et al., 2004). Bisher ist jedoch unklar, ob der Pbl-Signalweg „downstream“ oder parallel zur FGF-Signalkaskade verläuft. Ein solcher Signalweg könnte sich beispielsweise durch verschiedene Adaptorproteine „downstream“ des aktivierten

FGF-Rezeptors abzweigen. In diesem Zusammenhang könnte Pbl eine Schlüsselfunktion spielen.

Das Pbl Protein wird im Mesoderm expremiert und wurde bereits in einem genetischen Screen als wichtige Komponente der Mesoderm-Migration identifiziert (Gryzik und Müller, 2004). Interessanterweise werden sowohl Htl als auch Pbl, zur Herstellung des Kontaktes der invaginierten Mesodermzellen zum Ektoderm in Phase 1 der Mesodermmigration benötigt. Daher erschien es möglich, dass Pbl ebenfalls zur Regulation des EMT beiträgt und funktionell downstream vom FGF Rezeptor agiert. In diesem Fall würde man in *pbl* mutanten Embryonen einen ähnlichen Verlauf der EMT während der Mesoderm-Morphogenese wie in *htl* Mutanten erwarten. Nun ist Pbl nicht nur für die Htl abhängige Mesodermmigration notwendig, sondern ebenfalls für die Zytokinese bei der Zellteilung. Somit besteht die Möglichkeit, dass die putative Funktion von Pbl für EMT in Abhängigkeit zur Zytokinese steht und unabhängig von seiner Funktion in der Zellmigration sein könnte. Die Untersuchungen an *pbl* und *pbl stg* mutanten Embryonen weisen allerdings darauf hin, dass Pbl nicht für den Verlust von adhäsiven Zellkontakten während des EMT erforderlich ist und die ZA in *pbl* Mutanten, wie im Wildtyp, negativ reguliert wird. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Pbl nicht für die Funktion des FGF- Signalwegs während der EMT benötigt wird und Htl somit unabhängig von Pbl während der EMT agiert.

#### **4.2.2 Misexpressions-Screen zur Identifizierung neuer Gene, die die frühe Mesoderm-Morphogenese regulieren**

Die Identifizierung von an Entwicklungsprozessen beteiligten Genen kann in *Drosophila melanogaster* durch unterschiedliche Ansätze erfolgen. Bei genetischen Ansätzen werden Genfunktionen durch Mutationen ausgeschaltet oder hyperaktiviert und auf der Basis des entstandenen Phänotyps Rückschlüsse auf die normale Funktion des Gens während der Entwicklung gezogen. Der in dieser Arbeit verwendete genetische Ansatz hat sich als schnelle und effektive Methode bewährt, um Regulatoren der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* zu suchen.

Um zu untersuchen, welche weiteren potentiellen Komponenten eine wichtige Funktion während der EMT übernehmen und möglicherweise downstream des FGF-

vermittelten Signalweges involviert sind, wurde ein EP vermittelter Überexpressions-Screen durchgeführt der in dieser Arbeit beschrieben wird. Die Methode der systematischen Überexpression von Genen hat sich in den letzten Jahren als ein sehr nützliches Werkzeug erweisen, um genetische Interaktionen in biologischen Prozessen zu studieren (Brand und Perrimon, 1993; Rorth, 1996; Rorth et al., 1998;). In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von bekannten als auch unbeschriebenen Genen identifiziert, bei denen die durch *twi::Gal4*-induzierte Fehlexpression Letalität in der Nachkommenschaft erzeugte. Aufgrund der häufigen Mehrfachverwendung von Proteinen bei Zellmigrationsprozessen in unterschiedlichen Geweben, konnte auch Gene identifiziert werden, die normalerweise nicht im Mesoderm expremiert werden, welche aber bei der Fehlexpression mit Faktoren und Prozessen der Mesoderm-Morphogenese in Wechselwirkung traten. Nichts desto trotz können diese Kandidaten Rückschlüsse auf die generellen Faktoren liefern, die für die Mesoderm-Morphogenese wichtig sein könnten.

In dieser Arbeit wurden speziell diejenigen Kandidatengene näher analysiert, deren Überexpression einen Defekt im frühen Embryo erzeugten. Kandidaten, die in späteren Stadien zu Letalität führen, wurden hingegen nicht berücksichtigt. Letztendlich konnten 4 neue Kandidatengene identifiziert werden, deren Überexpression Defekte in der frühen Mesoderm-Morphogenese bewirken. Bei den restlichen Kandidaten konnten entweder nur sehr schwache oder keine Abnormalitäten, die auf eine inkorrekte frühe Mesoderm-Morphogenese zurückzuführen sind, detektiert werden. Im Folgenden werden potentielle Funktionen der 4 Kandidatengene diskutiert.

### **EP(2)2607**

EP(2)2607-Expression mit der *twist::Gal4* Treiberlinie erzeugt einen Überexpressions-Phänotyp, der die frühe Mesoderm-Morphogenese betrifft. Die EP-Insertion erfolgte in der Nähe des Gens *wunen2*. *Wunen2* ist für die Keimbahnentwicklung in *Drosophila* erforderlich (Hanyu-Nakamura et al., 2004). Interessanterweise sind sowohl *wunen2* als auch das Nachbargen *wunen* in somatischen Zellen erforderlich, um die Migration der Keimzellen während der Entwicklung zu steuern (Lehmann, 2005). Somit sind sie Regulatoren der Zellmigration und man könnte erwarten, dass eine Überexpression dieser Gene zu

dem im frühen Mesoderm beobachteten Migrations-Phänotyp führt. Um zu verifizieren, ob EP(2)2607 tatsächlich zur ektopischen Expression von *wunen* oder *wunen2* und nicht eines Nachbargens führt, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. In diesem Kontrollexperiment wurde eine UAS-Linie verwendet, die die gezielte Expression von *wunen2* ermöglicht. Dabei zeigte sich, dass durch eine Überexpression mit Hilfe von UAS::*wunen2* keine Defekte der Mesoderm-Morphogenese erzeugt wurden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die EP-Linie EP(2)2607 die Expression eines Gens bewirkt das nicht mit *wunen2* identisch ist. Um herauszufinden, um welches Gen es sich dabei handelt, könnte zunächst anhand der genomischen Lokalisierung der EP-Linie EP(2) 2607 herausgefunden werden, welches Gen dem EP Element am nächsten liegt und dementsprechend durch das EP Element ektopisch expremiert werden könnte. Die potentiellen Kandidatengene sollten anschließend in einen UAS-Vektor kloniert werden, um transgene Fliegen zu erzeugen, die es ermöglichen die Funktion des Kandidatengens für die Mesoderm-Morphogenese durch gezielte Überexpression der einzelnen Gene zu analysieren. Ein potentieller Kandidat könnte *wunen1* sein, der sich in Nachbarschaft der EP Insertion befindet, wie oben diskutiert.

### **EP(2)2374**

Überexpression durch die EP Linie EP(2)2374 erzeugt einen starken Mesoderm-Morphogenesedefekt. Dieser Defekt wird wahrscheinlich durch Expression des potentiellen EP-Zielgens *longitudinals lacking (lola)* hervorgerufen, da Überexpression weiterer EP-Insertionslinien (EP(2)2398, EP(2)2374, EP(2)2636, und EP(2) 2396) die dem Gen *lola* zugeordnet werden, ebenfalls zu embryonaler Letalität und starken Mesoderm-Defekten führen. *lola* ist bekannt als Transkriptionsfaktor, der für die längs verlaufende Ausbreitung der Axone im zentralen Nervensystem von *Drosophila* erforderlich ist (Ginger et al., 1994; Madden et al., 1999; Goecke et al., 2003; Crowner et al., 2002). Bei der Entwicklung des Nervensystems senden einzelne Nervenzellen dazu Axone aus, die ihre jeweiligen Kommunikationspartner über teilweise sehr große Distanzen finden müssen. Die Orientierung der Axone wird während der Embryogenese durch eine Kombination von Faktoren, in der Regel Proteine, reguliert, die sich auf der Oberfläche anderer Zellen entlang des Weges zum Ziel hin bilden. Es wäre daher vorstellbar, dass *lola* in der frühen Embryogenese

primär eine Funktion in der Mesoderm-Morphogenese hat, bevor es sich in der weiteren Entwicklung am Aufbau des ZNS beteiligt ist.

## EP (2)2028

Der stärkste Mesoderm-Morphogenese Defekt, der in dieser Arbeit identifiziert wurde wird durch Fehlexpression mit Hilfe der Linie EP (2)2028 hervorgerufen. Die EP-Insertion lokalisiert in der Nähe des Gens *gartenzwerg* (*garz*). Es gibt einen Hinweis darauf, dass der *Drosophila* ArfGEF (Guanyl-Exchange Faktor) *Gartenzwerg* für die Herz- und Muskelentwicklung benötigt wird (Wang, 2006), was sich bei der Überexpression dieses Gens auch durch die geringe Anzahl von Eve-positiven Herzvorläuferzellen bemerkbar machte. Statt 22 positiven Hemisegmenten wurden im Durchschnitt nur 7 gezählt. Interessanterweise ist *Htl* ebenfalls an der Herzmuskelentwicklung beteiligt, und *htl* Mutanten zeigen einen ähnlichen Phänotyp im Bezug auf die Herzvorläuferzellen wie *garz* Mutanten. Auf Grund des jeweiligen mutanten Phänotyps kann man postulieren, dass *garz* downstream von *Htl* liegen könnte und *Htl* als negativer Regulator von *garz* fungiert. Diese Hypothese könnte man testen indem man die genetische Interaktion von *htl* und *garz* durch Erzeugung von Doppelmutanten untersucht. Man würde erwarten, dass der *htl* Phänotyp eventuell durch eine niedrigeren Level an *garz* Genprodukt modifiziert/verbessert wird, falls *Htl* und *garz* tatsächlich im gleichen Signalweg liegen und *garz* sich downstream von *Htl* befindet.

Generell ließe sich die genetische Interaktion der Kandidatengene mit dem *Htl* und/oder dem *Pbl* Signalweg durch einen Modifizierungsscreen an Hand des *Drosophila* Auges zeigen. Das *Drosophila* Auge besteht aus 800 Omatidien, die in einer invarianten Anordnung das Komplexauge bilden. Interessanterweise führt die ektopische Expression einer Proteindomäne von *Pbl*, der DH-PH Domäne, zu einer starken Verkleinerung des Komplexauges. Dieser Phänotyp wird durch Änderung der Gendosis von putativen Regulatoren der Mesoderm-Morphogenese modifiziert (A. van Impel, persönliche Mitteilung). Somit ließe sich die genetische Interaktion der Kandidatengene mit dem *Pbl* Signalweg durch gleichzeitige Expression der DH-PH Domäne und der EP Linie testen. Durch diesen Ansatz konnten bereits erste Evidenzen für eine genetische Interaktion der EP Linie, die wahrscheinlich die Expression des *gartenzwerg* Gens treibt, mit dem *Pbl* Signalweg gezeigt werden (A.

van Impel, persönliche Kommunikation). Eine ähnliche Modifikation des Pbl-DH-PH induzierten Augenphänotyps konnte durch gleichzeitige Expression der Kandidaten-Linie EP(2)627 erreicht werden. Somit stellt dieser genetische Ansatz eine gute Möglichkeit dar, die Interaktion aller gefundenen EP Linien mit Pbl zu testen. Um allerdings zu testen, ob die Kandidaten-Gene auch tatsächlich mit Pbl während der Mesoderm-Morphogenese interagieren, müssten Studien auf morphologischer und zellulärer Ebene im Embryo durchgeführt werden. Dazu lassen sich unter anderem die zellulären und ultrastrukturellen Marker verwenden, die in dieser Arbeit beschrieben wurden.

## 5. Zusammenfassung

Der Epithel-Mesenchym-Übergang ist ein wichtiger Prozess für die normale Entwicklung eines Organismus. Dieser Prozess muss während der Entwicklung präzise reguliert sein, um die Differenzierung zu Zellen und Geweben mit bestimmter Funktion zu ermöglichen.

Die Mesodermwanderung in *Drosophila melanogaster* wird durch die Aktivität des FGF-Rezeptors Heartless (Htl) und des Guanyl-Austausch-Faktors Pebble (Pbl) kontrolliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese beiden Faktoren auch im Epithel-Mesenchym-Übergang während der frühen Mesoderm-Morphogenese eine zentrale Rolle spielen. Die Identifizierung von Entwicklungsprozessen beteiligten Genen kann in *Drosophila* durch unterschiedliche Ansätze erfolgen. Bei genetischen Ansätzen werden Genfunktionen durch Mutationen ausgeschaltet und auf der Basis des entstandenen Phänotyps Rückschlüsse auf die normale Funktion des Gens in der Entwicklung gezogen.

In *Drosophila* bildet sich das Mesoderm aus einer ventralen Population von Zellen im einzelschichtigen Blastodermepithel. Der Prozess der Mesoderm-Morphogenese beinhaltet komplexe morphologische Abläufe, wie Zellkoordination, den Wandel von epithelialen zum mesenchymalen Zellcharakter und die Zellmigration. Gleichzeitig kommt es dabei auch zu ersten mitotischen Zellteilung nach der Gastrulation. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mitose allein den Verlauf der EMT während der Mesoderm-Morphogenese nicht beeinflusst. Daraus lässt sich schließen, dass weitere Faktoren für den Verlust der epithelialen Charakteristika und zur Erlangung des mesenchymalen Charakters notwendig sein müssen.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Htl, vorausgehend zur mesodermalen Zellmigration, eine wichtige Funktion während der EMT einnimmt. Die durchgeführten Untersuchungen auf zellulärer Ebene weisen darauf hin, dass sowohl der FGF vermittelte Signalweg, als auch Mitosen die Cadherin Lokalisation während der Mesoderm-Morphogenese regulieren. Die vorliegende Arbeit zeigt Evidenzen dafür, dass zwei Signalwege Schlüsselfunktionen bei der Regulation von DE-Cadherin während der EMT spielen: Zum einen die transkriptionelle Regulation von DE-Cadherin durch den Transkriptionsfaktor Snail, zum anderen die Regulation der Zellpolarität in Abhängigkeit von der FGF-Signalkaskade und des mitotischen Programms.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Pbl nicht für den Verlust des epithelialen Zellcharakters während der EMT erforderlich ist. Außerdem wurde festgestellt, dass Pbl, anders als Htl, nicht mit dem mitotischen Programm interagiert, um die EMT zu steuern. Somit präsentiert diese Arbeit eine Htl vermittelnde intrazelluläre Signalkaskade, die in den Mesodermzellen während des Übergangs vom epithelialen zur mesenchymalen Morphologie agiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein Überexpressions-Screen durchgeführt, der neue Regulatoren identifizierte, die an der Mesoderm-Morphogenese beteiligt sind und potentielle Faktoren in der Signaltransduktionskette zur Regulation der EMT darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit helfen dabei, die Vorgänge während der EMT-Regulation im Modellsystem *Drosophila melanogaster* und, übergreifend betrachtet, auch in anderen Organismen besser zu verstehen.

## 5.1 Summary

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is extremely important for normal embryonic development. In addition, these transitions are also important in wound healing, and tumor cells that develop from epithelial cells must transform into motile cells in order to metastasize. In this PhD thesis, the *Drosophila* embryo was used as a simple model system to investigate the genetic control of EMT during gastrulation. After internalization through the ventral furrow, the embryonic mesoderm cells lose their epithelial junctions, undergo mitosis, adhere and migrate on the basal surface of the ectodermal cells until they form a monolayer. Although the loss of epithelial characteristics might be a consequence of mitosis, embryos homozygously mutant for *string* (*stg*) in which mitosis is blocked, undergo normal EMT. Therefore, a second mechanism independent of the mitotic program has to be responsible for the loss of epithelial characteristics. This work shows that embryos doubly mutant for the *heartless* (*htl*)-FGF-(fibroblast-growth-factor) receptor and *stg* fail to undergo normal EMT. In *htl stg* double mutant embryos, the mesoderm cells maintain their epithelial monolayer configuration long after internalization. Thus, Htl is required for EMT prior to its previously described function for mesodermal cell migration. To analyze EMT on the cellular level, the distribution of the epithelial adherens junction marker DE-Cadherin was studied. This work shows that the FGF pathway and the mitotic program redundantly regulate DE-Cadherin localization during EMT. To investigate how altered DE-Cadherin localization in *htl stg* mutants affects regulation of the Zonula Adherence (ZA), electron microscopy was performed. These studies reveal that the ZA is still present in late stages of *htl stg* mutants further supporting the model that Htl and the mitotic program is necessary for downregulation of epithelial characteristics during wildtype EMT. Further more, this work presents two pathways which might regulate DE-Cadherin downstream of the FGF-pathway and the mitotic program: 1) the transcriptional regulation of DE-Cadherin by *snail* and 2) the regulation of cell polarity.

The *Drosophila* Rho-guanine-nucleotide exchange factor GEF Pebble (Pbl) is required for Htl dependent mesoderm migration. However, this work shows that Pbl is not required in combination with mitosis to regulate epithelial characteristics during EMT. These findings suggest that Htl regulates EMT via other downstream players. To identify such novel genes required for EMT and/or mesoderm morphogenesis in general, a gain-of-function screen was performed and the results are presented in this work. Several candidate fly lines were identified in the screen that might regulate mesoderm morphogenesis. The phenotypes of 4 candidate lines that affect early mesoderm morphogenesis were further analyzed. The genetic analysis of these lines and the networks controlling EMT will help to elucidate mechanisms of embryonic mesoderm formation.

## 6. Literaturverzeichnis

- Bachmann, A.; Schneider, M.; Theilenberg, E.; Grawe, F. and Knust, E.** 2001: "Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity" *Nature* **414** (6864) 638-43
- Bachmann, A.; Timmer, M.; Sierralta, J.; Pietrini, G.; Gundelfinger, E. D.; Knust, E. and Thomas, U.** 2004: "Cell type-specific recruitment of Drosophila Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97" *J Cell Sci* **117** (Pt 10) 1899-909
- Battersby, A.; Csiszar, A.; Leptin, M. and Wilson, R.** 2003: "Isolation of proteins that interact with the signal transduction molecule Dof and identification of a functional domain conserved between Dof and vertebrate BCAP" *J Mol Biol* **329**, 479-93
- Beiman, M.; Shilo, B. Z. and Volk, T.** 1996: "Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages" *Genes Dev* **10**, 2993-3002
- Bilder, D.** 2001: "PDZ proteins and polarity: functions from the fly" *Trends Genet* **17** (9) 511-9 Sep
- Bilder, D.; Perrimon, N.** 2000: "Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble" *Nature* **403** (6770) 676-80
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** 1997: "The embryonic development of *Drosophila melanogaster*" Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Cano, A.; Perez-Moreno, M.A.; Rodrigo, I.; Blanco, M.J.; del Barrio, M.G. and Nieto, M.A.** 2000: "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal-transitions by repressing E-cadherin expression" *Nat Cell Biol* **2**, 76-83
- Carver, E.A.; Jiang, R.; Lan, Y.; Oram, K.F. and Gridley, T.** 2001: "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal-transition" *Mol Cell Biol* **21**, 8184-8188
- Costa, M.; Sweeton, D. and Wieschaus, E.** 1993: "Gastrulation in *Drosophila*: Cellular mechanisms of morphogenetics movements" *Cold Spring Harbor Laboratory, NY; Cold spring Harbor Laboratory Press*
- Drubin, D. G. and Nelson, W. J.** 1996: "Origins of cell polarity" *Cell* **84** (3) 335-44
- Eaton, S. and Simons, K.** 1995: "Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization" *Cell* **82** (1) 5-8 Jul 14
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** 1990: "The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string" *Cell* **62**, 469-80

**Frasch, M.** 1995: "Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo" *Nature* **374**, 464-7

**Frasch, M.** 1999: "Intersecting signalling and transcriptional pathways in *Drosophila* heart specification" *Semin Cell Dev Biol* **10**, 61-71

**Gisselbrecht, S.; Skeath, J.B.; Doe, C. Q. und Michelson, A. M.** 1996: "*heartless* encodes a fibroblast growth receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo" *Genes Dev* **10**, 3003-17

**Grawe, F.; Wodarz, A.; Lee, B.; Knust, E. and Skaer, H.** 1996: "The *Drosophila* genes *crumbs* and *stardust* are involved in the biogenesis of adherens junctions" *Development* **122**, 951-9

**Gryzik, T. and Müller, H.A.** 2004: "FGF8-like1 and FGF-8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor Htl and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula" *Curr Biol* **14**, 659-67

**Harris, T. J and Peifer, M.** 2004: "Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*" *J Cell Biol* **167**, 135-47

**Hong, Y.; Stronach, B.; Perrimon, N.; Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** 2001: "*Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts" *Nature* **414**, 634-8

**Hutterer, A.; Betschinger, J.; Petronczki, M. and Knoblich, J. A.** 2004: "Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis" *Dev Cell* **6**, 845-54

**Imam, F.; Sutherland, D.; Huang, W. and Krasnow, M.A.** 1999: "stumps, a *Drosophila* gene required for fibroblast growth factor (FGF)-directed migrations, of tracheal and mesodermal cells" *Genetics* **152**, 307-318

**Ip, Y. T.; Park, R. E.; Kosman, D.; Yazdanbakhsh, K. and Levine, M.** 1992: "Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo" *Genes Dev* **6**, 1518-30

**Janda, E. and Lehmann K.** 2002: "Ras and TGF $\beta$  cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways" *The Journal of Cell Biology* **156** (2), 299-314

**Katoh, M.** 2006: "Cross-talk of WNT and FGF Signaling Pathways at GSK3 $\beta$  to Regulate beta-Catenin and SNAIL Signaling Cascades" *Cancer Biol Ther*, (5)

**Klein, T., Martinez Arias, A.** 1999: "The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in

Drosophila" *Development* **126**, 913—925

**Knust, E. and Müller, H.** 1998: "Drosophila morphogenesis: orchestrating cell rearrangements" *Curr Biol* **8**, R853-5

**Knust, E.; Bossinger, O.** 2002: "Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells" *Science* **298** (5600) 1955-9

**Kramps, T.; Peter, O.; Brunner, E.; Nellen, D.; Froesch, B.; Chatterjee, S.; Murone, M.; Zullig, S., and Basler, B.** 2002: "Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex" *Cell* **109**, 47—60

**Kuchinke, U; Grawe, F. and Knust, E.** 1998: "Control of spindle orientation in Drosophila by the PAR-3 –related PDZ-domain protein Bazooka" *Curr Biol* **8**, 1357-65

**Larue, L. and Bellacossa, A.** 2005: "Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3` kinase/AKT pathways" *Oncogene* **24**, 7443-7454

**Lawrence, P. A., Sanson, B. and Vincent, J. P** 1996: "Compartments, wingless and engrailed: patterning the ventral epidermis of Drosophila embryos" *Development* **122**, 4095-4103

**Leptin, M and Grunewald, B.** 1990: "Cell shape changes during gastrulation in Drosophila" *Development* **110**, 73-84

**Leptin, M.** 1991: "twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development" *Genes Dev* **5**, 1568-76

**Lin, X; Buff, E.M.; Perrimon, N. and Michelson, A. M.** 1999: "Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during Drosophila embryonic development" *Development* **126**, 3715-23

**McCartney, B. M.** 1999: "Drosophila APC2 is a cytoskeletally-associated protein that regulates wingless signaling in the embryonic epidermis" *J. Cell Biol.* **146**, 1303-18

**Michelson, A. M.; Gisselbrecht, S.; Zhoun, Y.; Baek, K.H. and Buff, E. M.** 1998: "Dual functions of the heartless fibroblast growth factor in development of the Drosophila embryonic mesoderm" *Dev Genet* **22**, 212-29

**Müller, H. A.; Wieschaus, E.** 1996: "armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in Drosophila" *J Cell Biol* **134** (1) 149-63

**Müller, H.-A. J.; Samanta, R. and Wieschaus, E.** 1999: "Wingless signaling in the Drosophila embryo: zygotic requirements and the role of the frizzled genes" *Development* **126**, 577-86

- Nieto, M. A.** 2002: "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors" *Nature Reviews Mol Cell Biol* **3**, 155-166
- Oda, H.; Tsukita, S. and Takeichi, M.** 1998: "Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation" *Dev Biol* **203**, 435-50
- Oda, H.; Uemura, T.; Harada, Y.; Iwai, Y.; Takeichi, M.** 1994: "A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion" *Dev Biol* **165** (2) 716-26
- Pecina-Slaus, N.** 2003: "Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells" *Cancer Cell International* **3**:17
- Petit, V.; Nussbaumer, U.; Dossenbach, C. and Affolter, M.** 2004: "Downstream-of-FGFR is a fibroblast growth factor-specific scaffolding protein and recruits Corkscrew upon receptor activation" *Mol Cell Biol* **24**, 3769-81
- Provost, E. and Rimm, D.L.** 1999: "Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex". *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 567-572
- Radisky, D. C.** 2005: "Epithelial-mesenchymal transition" *Journal of Cell Science* **118**, 4325-4326
- Santos, A. C. and Lehmann, R.** 2004: "Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond" *Curr Biol* **14**, R578-89
- Saxton, T. M. and Pawson, T.** 1999: "Morphogenetic movements at gastrulation require the SH2 tyrosine phosphatase Shp2" *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3790-5
- Schumacher, S.; Gryzik, T.; Tannebaum, S. and Müller, H. A.** 2004: "The RhoGEF Pebble is required for cell shape changes during cell migration triggered by the *Drosophila* FGF receptor Heartless" *Development* **131**, 2631-40
- Shishido, E.; Ono, N.; Kojima, T. and Saigo, K.** 1997: "Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS" *Development* **124**, 2119-28
- Staehling, H. K.; Hoffmann, F. M.; Baylies, M. K.; Rushton, E. and Bate, M.** 1994: "*dpp* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*" *Nature* **372**, 783-6
- Steinberg, MS and McNutt, PM** 1999: "Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions". *Curr Opin Cell Biol* **11**, 554–560
- Sutherland, D.; Samakovlis, C. and Krasnow, M. A.** 1996: "*Branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching" *Cell* **87**, 1091-101
- Tanentzapf, G.; Tepass, U.** 2003: "Interactions between the crumbs, lethal giant

larvae and bazooka pathways in epithelial polarization" *Nat Cell Biol* **5** (1) 46-52

**Tepass, U.** 1996: "Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*" *Dev Biol* **177** (1) 217-25

**Tepass, U.** 1999: "Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis" *Curr Opin Cell Biol* **11** (5) 540-8 Oct

**Tepass, U.; Hartenstein, V.** 1994: "Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm" *Development* **120** (3) 579-90

**Tepass, U.; Hartenstein, V.** 1994: "The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo" *Dev Biol* **161** (2) 563-96

**Tepass, U.; Theres, C. and Knust, E.** 1990: "crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia" *Cell* **61**, 787-99

**Thiery, J.** 2003.: "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies" *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 740-746

**Vincent, S.; Wilson, R.; Coelho, C.; Affolter, M. and Leptin, M.** 1998: "The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling" *Mol Cell* **2**, 515-25

**von Stein, W.; Ramrath, A.; Grimm, A.; Muller-Borg, M.; Wodarz, A.** 2005: "Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling" *Development* **132** (7) 1675-86

**Weis, W. I. and Nelson, W. J.** 2006: "Re-solving the Cadherin-Catenin-Actin Conundrum" *J. Biol. Chem* **281**, 35593-35597

**Wilson, R. and Leptin, M.** 2000: "Fibroblast growth factor receptor-dependent morphogenesis of the *Drosophila* mesoderm" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 891-5

**Wilson, R.; Battersby, A.; Csiszar, A.; Vogelsang, E. and Leptin, M.** 2004a: "A functional domain of Dof that is required for fibroblast growth factor signaling" *Mol Cell Biol* **24**, 2263-76

**Wilson, R.; Battersby, A.; Csiszar, A.; Vogelsang, E. and Leptin, M.** 2004a: "A functional domain of Dof that is required for fibroblast growth factor signaling" *Mol Cell Biol* **24**, 2263-76

**Wilson, R.; Vogelsang, E. and Leptin, M.** 2004b: "FGF signaling and the mechanism of mesoderm spreading in *Drosophila* embryos" *Development* **132**, 491-501

**Wodarz, A. and Nusse, R.** 1998: "Mechanisms of Wnt signalling in development" *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59-88

**Wodarz, A.; Grawe, F.; Knust, E.** 1993: "CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during *Drosophila* epithelial development" *Mech Dev* **44** (2-3) 175-87

**Wu, X.; Golden, K. and Bodmer, R.** 1995: "Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene *wingless*" *Dev Biol* **169**, 619-28

**Yang, Z.; Zhang, H. and Kumar, R.** 2005: "Regulation of E-cadherin" *Breast Cancer Online* **8** (3)

**Yap, AS; Brieher, WM and Gumbiner BM** 1997: "Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions". *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 119–146

**Yook, J.I.; Li, Ichiro, X.Y. and Stephen J. Weiss** 2005: "Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail" *J. Biol. Chem* **10**,1074

**Zohn, I.; Yingqiu, L.; Skoinik, E.; Anderson, K.; Han, J. and Niswander, L.** 2006: "p38 and a p38-Interacting Protein are critical for downregulation of E-Cadherin during mouse gastrulation" *Cell* **125**, 957-969

## 7. Anhang

### 7.1 Sequenzen

#### Ansequenzierung von *Snail*

CGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGA	60
GCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGCCGCGCAACTAC	120
AAAAGCTGCCCCGCTAAAGAAGCGCCCCATTGTCTTCGTGGAGGAGCGTCTGCCACAAACG	180
GAGGCCTTGGCCCTGACCAAGGACTCACAGTTTGCCAGGATCAGCCGCAGGATCTATCC	240
CTGAAACGGGGTCGCGACGAGGAGACCCAGGATTATCAGCAGCCGGAACCGAAACGTGAC	300
TATGTGCTGAACCTTTCAAAAACACCGGAAAGGAACTCCAGCTCTAGCTCCAACCTCTGC	360
CTGCTGTGCGCCGCCAGTGGAGGCCAGGATTACCTGCCACCGAAATCCATATGCGTGGA	420
CTAACGGCGGGAACAACGGGATATACCACCGCCACCCCCACCACGATTAATCCCTTCCAG	480
TCCGCCTTTGTGATGGCCGCCGGTTGCAATCCGATCTCTGCCCTGTGGAGCAGCTATCAG	540
CCCCATCTGGCCGCCTTCCCCTCGCCAGCCAGCTCGATGGCCTCGCCCCAGTCGGTCTAC	600
AGCTACCAGCAGATGACGCCGCCCTCCAGCCCCGGATCCGATCTGGAAACCGGTTCCGAG	660
CCAGAGGATCTTTCAGTGCGAAATGACATCCCACTGCCGGCTCTGTTCCACCTTTTCGAT	720
GAGGCCAAGTCCAGCAGCAGCGGTGCCAGTGTAAGCAGCTCATCGGGATACTCCTACTACT	780
CCGGCCATGAGTGCCTCGTTCGGCGAGTGTTGCCGCCAATCATGCCAAAACCTACCGCTTCA	840
GTGCGACGAGTGCAGAGNNKACTCCACCTCGATGGGCCTGTCNANCNCGTNAGTTCACTG	900
CCNGCNGCNGANNTATCAGGA	922

**Anhang 1:** Die durch TOPO klonierte cDNA von *Snail* hat eine Länge von 1,2 kb. Bei der Ansequenzierung wurden 922 bp durchsequenziert (Hot shot). Die Sequenzen zeigten, dass *Snail* in Richtung 3'→5' im TOPO-Vektor liegt (Reverse-Primer ist rot markiert).

## 7.2 Abkürzungen

α-...	anti-...
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ähnl.	ähnlich
amp	Ampicillin
Anz.	Anzahl
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Bal.	Balancer-Chromosom
Bez.	Bezeichnung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
Chr.	Chromosom
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
genom.	genomisch
h	Stunden
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
konz.	konzentriert
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
Lsg.	Lösung
m...	milli...(10 <sup>-3</sup> )
M	Molarität (mol/l)
min	Minuten
μ...	mikro...(10 <sup>-6</sup> )
mRNA	messenger-RNA
n...	nano...(10 <sup>-9</sup> )
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pot.	potentiell
Prom.	Promotor

---

rpm	revolutions per minute	(Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
sec	Sekunden	
St.-Lsg	Stamm-Lösung	
s.o.	siehe oben	
s.u.	siehe unten	
Tab.	Tabelle	
Taq	Thermophilus aquaticus	
TE	Tris-EDTA	
TEMED	Tetramethyl-Ethyldiamin	
Temp.	Temperatur	
U	Unit	
u.a.	unter anderem	
UV-Licht	ultraviolettes Licht	
ü.N.	über Nacht	
V	Volt	
vgl.	vergleiche	
verm.	vermutlich	
Vol.	Volumen	
wdh.	wiederholen	
ZNS	Zentralnervensystem	
z.B.	zum Beispiel	
z.T.	zum Teil	
z.Zt.	zur Zeit	

## **Danksagung**

*Diese Dissertation wurde im Institut für Genetik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Dr. H. Arno J. Müller angefertigt. Ihm möchte ich für die interessante Themenstellung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.*

*Ebenfalls recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Simon für die Übernahme des Gutachtens.*

*Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der AG Müller für die schöne Atmosphäre, die anregenden Diskussionen und den Zusammenhalt bedanken. Im Besonderen gilt mein Dank Thomas Kessler, Mirjana Kessler, Wibke Meyer, Annika Raupach, Thorsten Volkmann, Andreas van Impel und Anna Klingseisen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.*

*Allen Mitarbeitern der AG Knust, AG Bossinger und AG Simon im Institut für Genetik gilt mein herzlichster Dank für die jahrelange Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Ferdi Grawe für seine Hilfsbereitschaft im und auch außerhalb des Instituts bedanken.*

*Ebenfalls möchte ich mich bei allen meinen Freunden außerhalb des Labors bedanken, die neben der Promotion für viel Abwechslung gesorgt haben und immer für mich da waren.*

*Mein ausdrücklicher Dank gebührt meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studienzeit und Promotion immer unterstützt haben.*

*Meinem Mann Andreas danke ich für seine Liebe, Unterstützung und Geduld, die er mir in den letzten Jahren hat zukommen lassen.*

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Rüdiger Simon und Herrn Dr. H. Arno J. Müller betreut worden.

Sirin Otte

Düsseldorf, November 2007