

Carboxypeptidase Z und Lix1 in der Embryogenese der Vertebraten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation von

Carsten Möller
geboren am 26.10.1972 in Lingen

2003

Diese Arbeit wurde von Januar 2000 bis Juni 2003 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Eichele angefertigt.

Referent: **Prof. Dr. W. H. Müller**

Abteilung für Physiologische Chemie,
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: **Prof. Dr. G. Eichele**

Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie,
Hannover

Tag der Promotion: 08.07.2003

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gregor Eichele für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die fruchtbaren Diskussionen und Anregungen, für seine stete Anteilnahme am Fortgang dieser Arbeit sowie für die exzellenten Arbeitsbedingungen, die er an unserem Institut geschaffen hat.

Prof. Dr. W. H. Müller danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung und der Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Dr. E. C. Swindell danke ich für die Einführung in die experimentelle Entwicklungsbiologie.

Dr. M. Leitges und Ursula Braun danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei der ES-Zellkultur. Dr. M. Leitges und Friederike Kruse danke ich insbesondere für ihre Unterstützung bei der Erstellung der Knockout-Mauslinie.

Prof. Dr. A. Kispert danke ich für die Bereitstellung der Wnt-exprimierenden Zelllinien und seiner Wnt-Konstrukte sowie für seine fruchtbaren Diskussionen.

Ich möchte mich besonders bei Nadine Naujokat, Anja Schönfeld und Hans-Otto Bader für die ausgezeichnete Pflege meiner Mäuse sowie ihre Zusammenarbeit bedanken, ohne die die Etablierung der CPZ^{-/-}-Mauslinie sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Auch wenn sie an späterer Stelle nochmals vorkommen, bin ich meinen beiden fleißigen Korrekturlesern Axel Visel und Dr. Henrik Oster einen besonderen Dank schuldig.

Für ihre technische Unterstützung danke ich Kornelia Maslo, Christine Zwingmann, Heike Krause, und Murat Yaylaoglu.

Dr. G. Alvarez-Bolado danke ich für seine Hilfe bei den neuroanatomischen Analysen.

Dank gilt auch den Beteiligten der betriebssportlichen Leibesertüchtigungen am Dienstag sowie am Donnerstagabend: Sönke Friedrichsen, Henrik Oster, Axel Visel, Markus Hückel, Tarik Hessabi, Alexander Prokscha, Frank Sacher, Daniel Brauer, Roland Rabeler, Uwe Herzig, Andreas Riechel, Aravind Sekhar, Jens Mittag, Marei Warnecke und Judit Oldekamp. Sie alle haben zu dem hervorragendem Arbeitsklima beigetragen, das ich an unserem Institut genießen durfte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei Birgit für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der letzten drei Jahre bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol pro Liter
AER	apikale ektodermale Leiste
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalovirus
CP	Carboxypeptidase-Domäne
CPZ	Carboxypeptidase Z
CRD	Cystein-reiche Domäne
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dig	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	embryonaler Tag
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Farad
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FRP	<i>Frizzled related Protein</i>
HA	Hämagglutinin

HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HH	Hamburger Hamilton Stadium
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
k.o.	<i>knock-out</i>
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton
kJ	Kilo-Joule
M	Mol pro Liter
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MRF	myogenetische Regulationsfaktoren
n	Anzahl
NaOAc	Natrium-Acetat
NBT	4-Nitro-Blue-Tetrazolium-Chlorid
P	postnataler Tag
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer, salzhaltig
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenium = pH-Wert
PSM	präsomitisches Mesoderm
PVA	Polyvinylalkohol
RFLP	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
Snc	Substantia nigra pars compacta
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
Std.	Stunden
TBS	Tris-Puffer, salzhaltig
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminoethan
UV	ultraviolett
V	Volt
VTA	<i>ventral tegmental area</i>
WMSIH	<i>whole mount in situ</i> -Hybridisierung
z.B.	zum Beispiel
ZPA	Zone der polarisierenden Aktivität

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT	3
1. EINLEITUNG.....	5
1.1 Carboxypeptidase Z und ihre Protein-Familie.....	5
1.1.1 Der MC-Klan der Metallopeptidasen	5
1.1.2 Carboxypeptidase Z.....	9
1.2 Somiten und ihre Differenzierung	11
1.2.1 Somitogenese.....	11
1.2.2 Die dorsoventrale Differenzierung der Somiten.....	12
1.3 Die Gliedmaßenentwicklung in Vertebraten - Übersicht	16
1.4 Die Gliedmaßenidentität und Lix1, ein neues Gen mit unbekannter Funktion	18
1.5 Der Wnt/Wingless-Signaltransduktionsweg	20
1.5.1 Extrazelluläre Modifikation der Wnt-Signaltransduktion	21
1.5.2 Die intrazelluläre Transduktion des Wnt-Signals.....	22
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	23

2. MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1 Behandlung und Haltung der Versuchstiere	24
2.2 <i>In situ</i>-Hybridisierung mit Embryonen.....	25
2.2.1 <i>In vitro</i> -Transkription	25
2.2.1.1 Herstellung der cDNA-Vorlage	25
2.2.1.2 Synthese der RNA-Sonden	26
2.2.2 WMISH mit Mäuseembryonen.....	27
2.2.3 WMISH mit Hühnerembryonen	29
2.3 <i>In situ</i>-Hybridisierung auf Gewebeschnitten (ISH)	31
2.4 Mikromanipulationen am Hühnerembryo	33
2.5 Retrovirale Überexpression im Hühnerembryo.....	33
2.6 Skelettpräparationen von Hühnerembryonen.....	33
2.7 Gerichtete Mutagenese.....	33
2.8 Isolierung der vollständigen cDNA-Sequenz von CPZ aus der Maus.....	34
2.9 Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien	35
2.10 Cokultivierungstest zur Detektion von Wnt-Aktivität	36
2.10.1 Cokultivierung.....	36
2.10.2 Präparation von RNA aus Zellen.....	36
2.10.3 Quantitative RT-PCR (Q-PCR).....	37
2.11 Immunopräzipitation	39
2.12 Isolierung und Charakterisierung des murinen CPZ Genlokus.....	40
2.13 Herstellung des Targetingvektors.....	41
2.14 Herstellung der rekombinanten embryonalen Stammzellen	42
2.14.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	42
2.14.2 Gewinnung und Wachstums-Inhibierung von embryonalen Fibroblasten.....	42
2.14.3 Transfektion, Selektion und Isolierung von rekombinanten ES-Zellen	42
2.14.4 Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen.....	43
2.14.5 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	43
2.14.6 Southern Blot-Analyse.....	44
2.14.7 PCR-basierendes Genotypisieren	44
2.15 Northern Blot-Analyse	45

3. ERGEBNISSE.....	46
3.1 Isolierung des murinen Homologes der Carboxypeptidase Z (CPZ)	46
3.2 Analyse von CPZ im Hühnerembryo	49
3.2.1 Expressionsanalyse von <i>cCPZ</i> in der frühen Embryogenese des Huhns.....	49
3.2.2 Ablationsexperimente im Hühnerembryo.....	51
3.2.3 Ektopische Expression von <i>cCPZ</i> im Hühnerembryo	52
3.3 <i>In vitro</i>-Analyse von CPZ.....	56
3.3.1 Kokultivierungsexperimente mit CPZ-exprimierenden Zellen.....	56
3.3.2 <i>In vitro</i> -Interaktionsstudien von CPZ mit Wnt4.....	59
3.4 Untersuchungen zu CPZ in der Maus	62
3.4.1 Expressionsanalyse von <i>CPZ</i> in der Maus.....	62
3.4.2 Herstellung eines mutierten Alleles für das CPZ-Gen in der Maus	66
3.4.2.1 Charakterisierung des genomischen Lokus des CPZ-Gens in der Maus	66
3.4.2.2 Herstellung des Targetingvektors	67
3.4.2.2 Etablierung der CPZ-defizienten Mauslinie	69
3.5 Expressionsanalyse von <i>Lix1</i> in der Embryogenese der Maus	73
4. DISKUSSION	79
4.1 Die Expression von <i>Lix1</i> in der Embryogenese der Maus.....	81
4.2 Die CPZ-Homologe.....	82
4.3 CPZ und der Wnt-Signaltransduktionsweg	83
4.3. Experimentelle Beweise für eine Beteiligung von CPZ am extrazellulären Wnt-Signaltransduktionsweg	83
4.3.2 Potentielle Funktionsweisen von CPZ.....	86
4.4 Die ektopische Expression von CPZ	88
4.5 Die native Funktion von CPZ.....	89
4.5.1 CPZ im Hühnerembryo.....	89
4.5.2 CPZ in der Maus	91
4.5.3 Etablierung der CPZ-defizienten Mauslinie	93
5. LITERATURVERZEICHNIS	96

Zusammenfassung

Die Embryonalentwicklung wird durch verschiedene Klassen konservierter Proteine reguliert. Sie können als sezernierte Morphogene dienen, für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich sein, als Transkriptionsfaktoren fungieren oder an anderen Prozessen beteiligt sein. In den letzten Jahren konnten viele einzelne Signalwege durch Isolierung von Rezeptorkomplexen und intrazellulären Transduktionskomponenten aufgelöst werden. Eine wichtige Herausforderung bleibt allerdings, das Zusammenspiel und die Regulation dieser Signalwege aufzuklären sowie die Identifizierung neuer Gene und ihre Einordnung in biologische Prozesse. In dieser Arbeit wurden die beiden Gene Carboxypeptidase Z (CPZ) und Lix1 mit Hinblick auf ihre Funktion in der Embryonalentwicklung untersucht.

Die Metallo-carboxypeptidasen sind eine Gruppe von Enzymen, die das Abspalten C-terminaler Aminosäuren von Substraten katalysieren. Sie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Mitglieder der Carboxypeptidase A (CPA)-Unterfamilie sind an der unspezifischen Degradierung von Proteinen beteiligt. Der CPE-Unterfamilie hingegen wird eher eine regulatorische Funktion durch die Prozessierung ihrer Substrate zugeschrieben, z.B. bei der Sezernierung bioaktiver Neuropeptide. CPZ, ein Mitglied der letztgenannten Unterfamilie, ist eine aktive Carboxypeptidase mit einem pH-Optimum im neutralen Bereich. Es wurde eine Lokalisation im sekretorischen Apparat der Zelle sowie in der Extrazellulärmatrix beschrieben. Eine einzigartige strukturelle Eigenschaft von CPZ besteht darin, dass sie neben der Carboxypeptidase-Domäne über eine N-terminale Cystein-reiche Domäne (CRD) verfügt. Dies ist eine Proteindomäne, die in vielen anderen entwicklungsbiologisch relevanten Proteinen zu finden ist.

In dieser Arbeit wurde neben der Isolierung der murinen cDNA-Sequenz von CPZ ihre Expression während der Embryogenese des Huhnes und der Maus untersucht und durch verschiedene Ansätze ein Einblick in die bisher unbekannte Funktion dieses Enzyms gewonnen. Während CPZ im Huhn eine transiente Expression in dem Teil der Somiten zeigt, aus dem sich die Wirbelsäule bildet, sowie in der apikalen ektodermalen Leiste (AER), einer Struktur, die das proximo-distale Wachstum der Gliedmaße reguliert, ist die CPZ-Expression in der frühen Embryonalentwicklung der Maus auf die Gliedmaßenanlage beschränkt. Später sind Transkripte in den sich bildenden Plexi Choroidei, dem Pericard, den Schneidezähnen sowie dem inneren Ohr zu sehen. In beiden Organismen stellen die Expressionsareale von CPZ komplementäre wie überlappende Domänen mit Mitgliedern des Wnt-Signalweges dar. In Überexpressionsstudien im Hühnerembryo konnte gezeigt werden, dass CPZ die dorso-ventrale Differenzierung der Somiten auf transkriptionelle wie morphogenetische Weise beeinflussen kann: Dermamyotomale Überexpression von CPZ resultierte in einer Aufregulierung des Transkriptionsfaktors *Pax3* sowie in einer Dymorphogenese der Rippen und des Skapulaschaftes. In einem *in vitro*-System konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre CPZ die Wnt4-abhängige Induktion des Gens *Cdx1* in embryonalen Stammzellen verstärkt. Sowohl die Änderung der Somitendifferenzierung im Hühnerembryo als auch die Verstärkung des Wnt-Signals im *Cdx1*-

Induktionstest waren von der katalytischen Aktivität von CPZ abhängig. In beiden Systemen war eine katalytisch inaktive Form von CPZ ohne Effekt. Parallel wurde während dieser Studien eine Mauslinie etabliert, die über ein CPZ-Nullallel verfügt. Die CPZ^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen offensichtlich veränderten Phänotyp, das CPZ-Allel wird entsprechend der Mendelschen Regeln vererbt. Das Ausbleiben eines skelettalen Phänotyps ist wahrscheinlich durch das unterschiedliche Expressionsmuster von CPZ während der frühen Embryonalentwicklung begründet: In der Maus ist CPZ nicht in den Somiten exprimiert. Diese Mauslinie liefert eine hervorragende Grundlage zur zukünftigen *in vivo*-Analyse der Funktion von CPZ. Durch Immunopräzipitation konnte schließlich gezeigt werden, dass CPZ mit Wnt4 interagieren kann und dass diese Interaktion über die CRD von CPZ vermittelt wird. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diese funktionellen Resultate den ersten Beleg dafür liefern, dass CPZ eine Komponente des extrazellulären Wnt-Signalweges ist.

Lix1 (*limb expression 1*) ist ein neues Gen bisher unbekannter Funktion mit keiner Homologie zu anderen Genen. Orthologe von Lix1 sind in den Organismen Huhn, Maus, *Drosophila*, Zebrafisch und Mensch bekannt. Im Hühnerembryo wurde eine transiente Expression von Lix1 in den Anlagen der Hinter-, jedoch nicht der Vordergliedmaße, den Rhombomeren 3 und 5 und den Vorläufergeweben des Gesichtes beschrieben. Die Restriktion der Expression auf eine der beiden Gliedmaßenanlagen teilt Lix1 mit einer kleinen Gruppe von Proteinen, denen eine Funktion bei der Bestimmung der Gliedmaßenidentität zugeschrieben wird. Die Expressionsanalyse in der Maus ergab, dass Lix1-Transkripte im Gegensatz zum Hühnerembryo in den Anlagen beider Gliedmaßen zu finden sind. Während die Expression in den Vorläufern des Gesichtes mit der im Hühnerembryo vergleichbar ist, ist sie während der Entwicklung des Nervensystems in der Maus ungleich komplexer: Beginnend am Embryonaltag 8 ist Lix1 in den neuronalen Vorläufern des zentralen Nervensystems aktiv und zeigt in diesen Expression z.T. bis in das adulte Stadium hinein. Besonderes auffällig ist hierbei die Expression in Schicht 5 des sich entwickelnden Cortex, in der Substantia nigra pars compacta, in einzelnen Nuklei des Hirnstammes, in den dorsalen Wurzelganglien sowie in Motoneuronen des Rückenmarks. Das hoch spezifische Expressionsmuster in diesen Strukturen läßt Lix1 als ein sehr potentes Markergen bei der entwicklungsbiologischen Analyse des Nervensystems erscheinen.

Schlagworte: Carboxypeptidase Z, Somiten, Sklerotom, Rippen, Skapula, Wnt, Cystein-reiche Domäne, CRD, AER, Lix1, Substantia nigra, Cortex, Cortexschicht 5, dorsale Wurzelganglien, Gliedmaßenanlage.

Abstract

Embryonic development is organized by a complex interplay of different classes of conserved proteins. These can act as morphogens or transcription factors, transduce intracellular signaling cascades or may be involved in other processes like cell adhesion. Over the past years many signaling pathways have been unravelled via isolation of receptor complexes and novel signaling components. Nevertheless, a challenge that remains to be solved is the interplay of the different cascades, their regulation, the isolation of unknown genes, and the determination of their biological function. This study focuses on two genes, *Lix1* and carboxypeptidase Z (CPZ), and their role in vertebrate ontogenesis.

Metalloproteases comprise a family of enzymes that hydrolytically cleave the C-terminal amino acid residue of their substrate proteins. They can be divided into two subfamilies: Members of the carboxypeptidase A (CPA)-subfamily are involved in unspecific degradation of proteins. Members of the CPE-family, in contrast, are ascribed to be “regulatory” enzymes, e.g. for the secretion of bioactive neuropeptides. CPZ is a member of the latter subfamily. It is enzymatically active and is localized to the secretory pathway and the extracellular matrix. A unique feature of CPZ is its bipartite composition of two protein domains: the carboxypeptidase domain and an N-terminal cystein-rich domain (CRD). CRDs are found in many embryologically important proteins and are implicated in binding secreted proteins of the Wnt-family.

In this study, the murine cDNA sequence of CPZ was isolated. After description of the expression pattern of *CPZ* in the chicken as well as in the murine embryo, several approaches were chosen to unravel the so far unknown function of CPZ. In the chicken embryo, *CPZ* is expressed in the somitic progenitors that later on form the axial skeleton as well as in the apical ectodermal ridge (AER). In contrast, the murine embryo shows expression restricted to the limb bud in the early stages of development. Later on, transcripts are detected in the choroid plexi, the pericard, the incisors, and in the inner part of the ear. In both organisms CPZ exhibits complementary as well as overlapping expression domains with members of the Wnt-signaling pathway. Overexpression studies demonstrated that CPZ is able to influence differentiation of the somites in the chicken embryo: Dermamyotomal overexpression of CPZ resulted in an ectopic expression of the transcription factor *Pax3* in the hypaxial part of the dermamyotome and in dysmorphogenesis of the scapula blade and ribs. *In vitro* CPZ could be shown to specifically enhance the Wnt4-based induction of the reporter gene *Cdx1* in embryonic stem cells. The effects resulting from overexpression in the chicken embryo as well as the enhancement of Wnt4-signaling are dependent on the catalytic activity of CPZ. In both systems a mutated version of CPZ bearing an inactivating amino acid substitution was not functional. In parallel, a mouse line was established that bears a CPZ-null allele. *CPZ*^{-/-}-mice are viable and show no obvious abnormal phenotype, the CPZ-allele is transmitted according to Mendelian laws. The absence of a skeletal phenotyp may be the result of the divergent expression pattern of *CPZ* in the early stages of development: In the murine embryo *CPZ* is not expressed in the somites. Nevertheless, this mouse line may serve as a powerful tool to further study the *in vivo* function of CPZ. Finally, coimmunoprecipitation experiments demonstrated that CPZ can interact with Wnt4 and that this

interaction is mediated by the CRD of CPZ. In summary, this study provides the first experimental evidence for CPZ being a component of the extracellular Wnt-signaling pathway.

Lix1 (*limb expression 1*) is a novel gene with unknown function and no homology to other proteins. Orthologues of *Lix1* exist in chicken, mouse, drosophila, zebrafish, and in human. In the chicken embryo, a transient expression of *Lix1* in the developing hindlimb bud, but not forelimb bud, as well as in rhombomers 3 and 5 and in facial progenitors has been described. The restricted expression of *Lix1* to one of the limb precursors is shared by a small group of genes that have been implicated in defining limb identity. Expression analysis in the murine embryo showed that, in contrast to the avian embryo, *Lix1* transcripts are detectable in both fore- and hindlimb. Whereas expression in the facial primordia in the mouse is comparable to the chicken embryo, expression in the nervous system is much more complex: starting at embryonic day 8, *Lix1* is active in the progenitors of the nervous system and shows expression in part of these structures up to the adult stages. Most prominent expression is seen in layer 5 of the developing cortex, in the substantia nigra pars compacta, in several nuclei of the brain stem, the dorsal root ganglia, and in motor neurons of the spinal cord. This highly specific expression pattern makes *Lix1* a powerful marker gene for developmental analysis of the nervous system.

Keywords: carboxypeptidase Z, somite, sclerotome, scapula, rib, Wnt, cysteine-rich-domain, CRD, AER, *Lix1*, substantia nigra, cerebral cortex, cortical layer 5, dorsal root ganglia, limbs.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Carboxypeptidase Z und ihre Protein-Familie

Der Abbau und die proteolytische Modifikation von Proteinen und Peptiden ist ein essentieller Bestandteil zahlreicher biochemischer Prozesse, die von der einfachen Bereitstellung von Oligo-Peptiden und Aminosäuren im Verdauungstrakt bis hin zu transkriptioneller Regulation, Neurotransmission sowie der Hormonregulation reichen. Unter den Protein-degradierenden Enzymen gehören die Metallopeptidasen zu den Hydrolasen, in denen der nukleophile Angriff auf die zu spaltende Peptidbindung durch ein Wassermolekül vollzogen wird. Dieses Wassermolekül wird hierbei durch ein divalentes Metall-Kation aktiviert, meist durch ein Zink-Ion, zuweilen auch durch ein Kobalt- oder Mangan-Ion (Barret et al., 1998). Im aktiven Zentrum der Metallopeptidasen werden diese Metall-Ionen gewöhnlich durch drei Aminosäuren koordiniert: Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Lysin. Neben diesen koordinierenden Resten wird zumindest eine weitere Aminosäure gebraucht, in der Regel ein Glutamatrest, welcher bei der Katalyse wahrscheinlich als Elektronenakzeptor dient (Mock & Stanford, 1996). Die Metallopeptidasen lassen sich nach Anzahl der benötigten Metallionen, der Proteinsequenz sowie der Katalyseform in acht Gruppen, sogenannte Klane, einteilen.

1.1.1 Der MC-Klan der Metallopeptidasen

Der MC-Klan der Metallopeptidasen besteht aus einer Gruppe von Metallo-carboxypeptidasen, in denen das katalytische Zink-Kation von zwei Histidin- und einem Glutamatrest koordiniert wird. Dieser Gruppe sind bis jetzt wenigstens 14 Proteine zugeordnet worden, von denen Homologe in den meisten Säugetieren identifiziert werden konnten. Neben den koordinierenden Aminosäuren sind bei diesen Peptidasen für die

Katalyse noch ein Argininrest, der vermutlich das Oxyanion des Übergangszustandes stabilisiert, und ein weiterer Glutamatrest (s.o.) (Barret et al., 1998b) essentiell. Die Mitglieder des MC-Klans der Metallo-carboxypeptidasen werden entsprechend ihrer Eigenschaften in zwei Unterfamilien eingeteilt:

Die CPA/B-Unterfamilie der Metallo-carboxypeptidasen

Die Mitglieder der CPA/B-Unterfamilie sind ungefähr 34-36 kD große Proteine und werden im Allgemeinen als unspezifisch degradierende Carboxypeptidasen betrachtet. Sie werden als inaktive Zymogene hergestellt, deren Aktivierung die proteolytische Entfernung bestimmter Sequenzabschnitte erfordert (Auld, 1998). Bekannteste Vertreter dieser Familie sind Carboxypeptidase A (CPA) und Carboxypeptidase B (CPB). Beide Enzyme werden im Pankreas exprimiert. Sie haben ein pH-Optimum im neutralen Bereich, und ihre Funktion ist die Degradierung von Peptiden im Verdauungstrakt im Anschluss an die Spaltung der Substrate durch Pepsin, Chymotrypsin und Trypsin. Während CPA höchste Aktivität gegenüber aliphatischen und aromatischen Aminosäureresten zeigt (Auld, 1998), katalysiert CPB am effektivsten die Abspaltung basischer Reste (Aviles und Vendrell, 1998). Der CPA/B-Unterfamilie werden des Weiteren Carboxypeptidase A2 (CPA2), ein weiteres pankreatisches Enzym, Mastzellen-Carboxypeptidase A (MC-CPA), welche den Abbau von Proteinen und Peptiden durch Mastzellen vermittelt (Springman, 1998), sowie Carboxypeptidase U (CPU) zugeordnet, ein in der Leber synthetisiertes Protein, von dem angenommen wird, bei der Regulation der Fibrinolyse mitzuwirken (Hendriks, 1998).

Die CPN/E-Unterfamilie der Metallo-carboxypeptidasen

Im Gegensatz zu den Mitgliedern der CPA/B-Unterfamilie variieren die Mitglieder der CPN/E-Unterfamilie in Bezug auf pH-Optimum und Proteingröße (Fricker, 1998; Fricker, 1998b; Skidgel, 1998) (siehe Abbildung 1) und werden eher als „regulatorische“ Carboxypeptidasen bezeichnet. Sie werden direkt als funktionelle Proteine produziert, die proteolytisch nicht mehr aktiviert werden müssen. Daneben enthalten die CPN/E-Carboxypeptidasen eine C-terminale Proteindomäne, die den CPA/B-Carboxypeptidasen fehlt. Es handelt sich hierbei um eine 80 Aminosäuren umfassende Sequenz, welche ein so genanntes β -barrel bilden könnte, wie es u.a. in dem Protein Transthyretin gefunden worden ist (Gomis-Ruth et al., 1999; Aloy et al., 2001). Die Funktion dieser Domäne ist bisher nicht bekannt.

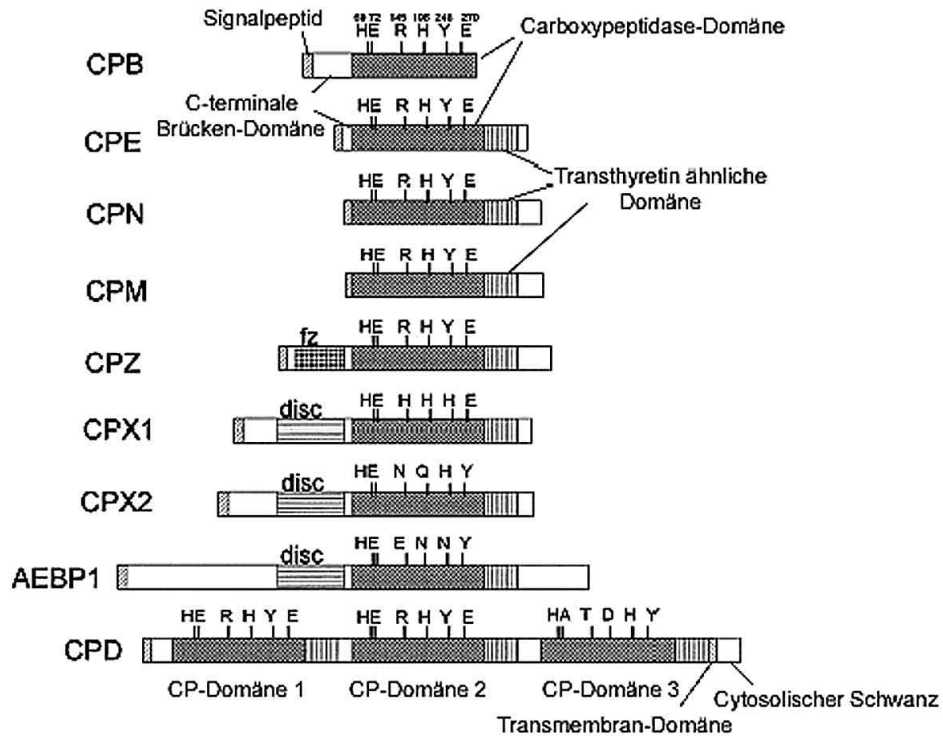


Abbildung 1: Vergleich der Metallo-carboxypeptidasen der CPE/N-Unterfamilie mit einem typischen Vertreter der CPA/B-Unterfamilie, CPB. Alle Mitglieder verfügen im Gegensatz zu CPB über eine C-terminale Transthyretin-ähnliche Domäne. Sie unterscheiden sich untereinander durch die Anzahl ihrer Carboxypeptidase-Domänen, durch spezifische an die Carboxypeptidase-Domäne angrenzende Sequenzen sowie durch unterschiedliche Ausstattung ihrer katalytischen Domänen, welche die Enzymaktivität beeinflussen. Details im Text. Aus: Reznik und Fricker, 2001.

Carboxypeptidase E (CPE)

Carboxypeptidase E (CPE) ist der bekannteste und wahrscheinlich am besten studierte Vertreter dieser Subfamilie. CPE, alternativ auch als CPH oder Proenkephalin-Konvertase bezeichnet, wurde bei der Suche nach einer Carboxypeptidase isoliert, die für die Abspaltung C-terminaler Lysin- und Argininreste von Vorläuferproteinen neuroendokriner Peptide verantwortlich ist (Fricker & Snyder, 1982). Die meisten dieser Peptide werden als Vorläuferproteine synthetisiert, die einer proteolytischen Aktivierung bedürfen. In einem ersten Schritt werden diese Vorläufer durch so genannte Prohormon-Konvertasen an Schnittstellen gespalten, die eine basische Aminosäure beinhalten (Zhou et al., 1999). Diese basischen Aminosäuren müssen anschließend von einer Carboxypeptidase entfernt werden, um das biologisch aktive Peptid zu erzeugen. Die Prozessierung der neuroendokrinen Peptide findet im sekretorischen Apparat der Zelle statt. Ihrer biologischen Funktion entsprechend hat

CPE ein pH-Optimum bei pH 5-6, besitzt eine sehr hohe Spezifität für die Abspaltung von basischen Aminosäuren und ist in vielen neuroendokrinen Geweben exprimiert (Fricker, 1998). Sie besitzt aber ansonsten keine einschränkende Substrat-Spezifität. Deshalb wurde angenommen, dass CPE an der Biosynthese der meisten neuroendokrinen Peptidhormone beteiligt ist (Fricker, 1988). Diese Vermutung wird durch die so genannte Cpe^{fat}/Cpe^{fat} -Mauslinie bestätigt (Naggert et al., 1995). Diese spontan aufgetretene Mutation führt zu einer Aminosäuresubstitution im CPE-Gen, resultierend in einer Inaktivierung des Enzyms. Dementsprechend wurden für die Cpe^{fat}/Cpe^{fat} -Mauslinie reduzierte Niveaus vollständig prozessierter Neuropeptide nachgewiesen (Rovere et al., 1996; Udipi et al., 1997). Dennoch muss es eine Carboxypeptidase geben, welche die fehlende CPE-Aktivität in dieser Mauslinie zum Teil substituiert.

Carboxypeptidase M (CPM) und Carboxypeptidase N (CPN)

Für Carboxypeptidase M (CPM) und Carboxypeptidase N (CPN) wurde ebenfalls eine Rolle bei der Biosynthese von Peptidhormonen postuliert. Im Gegensatz zu CPE sind die beiden Proteine allerdings extrazellulär lokalisiert. CPM findet man hauptsächlich in der Lunge und der Plazenta. Sie ist in beiden Geweben über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker an die Zellmembran gebunden (Skidgel, 1998). Des Weiteren wurde CPM auch in Blutgefäßen sowie auf weissen Blutkörperchen nachgewiesen (Skidgel, 1998). CPN wird in der Leber sezerniert und zirkuliert im Plasma als 280 kD-Komplex bestehend aus zwei Kopien des aktiven Proteins und einem 83 kD Glykoprotein (Skidgel and Erdos, 1998). Als Funktion für CPM und CPN wurde die Inaktivierung vasoaktiver Peptide vorgeschlagen (Reznik & Fricker, 2001).

Carboxypeptidase D (CPD)

Carboxypeptidase D (CPD) wurde erstmals in der Ente als ein 180 kD großes Protein isoliert, welches an Partikel von Hepatitis B-Viren bindet (Kuroki et al., 1995). CPD besteht aus drei vollständigen Carboxypeptidase-Domänen (siehe Abb. 1), gefolgt von einer Transmembran-Domäne und einem cytoplasmatischen Schwanz von 60 Aminosäuren (Fricker, 1998b). Die ersten beiden Carboxypeptidase-Domänen von CPE sind aktiv, haben aber unterschiedliche katalytische Eigenschaften (Novikova et al., 1999), wohingegen die dritte keine enzymatische Aktivität aufweist. CPD ist im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert und wird auch über sekretorische Vesikel an die Zellmembran transportiert (Varlamov & Fricker, 1998). Aufgrund seiner Lokalisation, seiner enzymatischen Eigenschaften und seiner breiten Gewebeverteilung wurde für CPD eine prozessierende Funktion bei der Reifung von Rezeptoren und Wachstumsfaktoren im Anschluss an die Katalyse der Endopeptidasen des Trans-Golgi-Netzwerks vorgeschlagen (Fricker, 1998).

CPX1, CPX2 und AEBP1

CPX1, CPX2 und AEBP1 bilden eine Gruppe in der CPE/N-Unterfamilie, die sich von den anderen Metallo-carboxypeptidasen unterscheidet. Zum einen ist ihre Aminosäuresequenz-Homologie untereinander höher als gegenüber den anderen Mitgliedern, zum anderen enthalten sie eine N-terminale Domäne, die Ähnlichkeit zu dem Protein Discoidin aufweist. CPX1 und CPX2 sind inaktiv gegenüber Standardsubstraten (Lei et al., 1999; Xin et al., 1998b); für AEBP1 wurde eine Carboxypeptidase-Aktivität sowie eine Funktion als Transkriptionsfaktor beschrieben (He et al., 1995), wobei die enzymatische Aktivität dieses Enzyms noch diskutiert wird (Reznik & Fricker, 2001). Allen drei Mitgliedern dieser Gruppe fehlt einer oder mehrere der katalytisch notwendigen Aminosäurereste (siehe Abb.1)

1.1.2 Carboxypeptidase Z - ein neues Enzym mit einzigartiger Struktur und unbekannter Funktion

Carboxypeptidase Z wurde als eines der jüngsten Mitglieder dieser Proteinfamilie durch *in silico*-Analyse und anschließende RT-PCR isoliert. Motivation dieser Untersuchungen war die Isolierung einer Carboxypeptidase, die die fehlende CPE-Aktivität in der Cpe^{fat}/Cpe^{fat}-Mauslinie partiell substituieren kann. Wie spätere *in vitro* Experimente zeigten, ist eine solche Rolle von CPZ unwahrscheinlich (s.u.). Bis zu Beginn der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente waren die humane CPZ sowie das Homolog in der Ratte beschrieben (Song & Fricker, 1997; Xin et al., 1998a). CPZ stellt in der Familie der Metallo-carboxypeptidasen eine Besonderheit dar, da sie neben dem Signalpeptid zur Sekretion in das Endoplasmatische Retikulum und der Carboxypeptidase-Domäne eine N-terminale Cystein-reiche Domäne (CRD) besitzt. Diese CRD von CPZ besitzt eine Homologie von 23-29% zur Cystein-reichen Domäne der so genannten Frizzled-Rezeptoren (Song & Fricker, 1997). In diesen Proteinen dient diese nach den Rezeptoren als Frizzled-Domäne bezeichnete extrazelluläre Proteinsequenz als Bindungsdomäne für die Wnt/Wingless-Signalmoleküle (s.u.). Des Weiteren findet man Frizzled-Domänen im Kollagen Typ XVIII (Rehn und Pilhajaniemi, 1995) und Smoothened, das ebenfalls ein Transmembranprotein und Teil des Rezeptorkomplexes für das Signalmolekül *sonic hedgehog* ist (Masiakowski & Yancopoulos, 1998). Obwohl die Frizzled-Domäne von CPZ eine gewisse Divergenz im Vergleich mit den anderen genannten Frizzled-Domänen besitzt, enthält sie doch alle 10 charakteristischen Cystein-Reste an konservierten Positionen und weist auf Aminosäure-Ebene nur minimale

Insertionen und Lücken im Vergleich zu den anderen Frizzled-Domänen auf (Song & Fricker, 1997). Die Carboxypeptidase-Domäne von CPZ enthält alle für die Koordination des Zink-Kations, für die Substratbindung und für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste an konservierter Position. Sie weist 49% Homologie zur Proteinsequenz der Carboxypeptidase-Domäne von CPE auf (Song & Fricker, 1997). Diese Ähnlichkeit ist vergleichbar mit der anderer Mitglieder der CPE/N-Unterfamilie untereinander. Rekombinant exprimiertes CPZ ist gegenüber Standard-Carboxypeptidase-Substraten aktiv und besitzt ein pH-Optimum von 7-8, was den Bedingungen im extrazellulären Raum entspricht. Des Weiteren wird CPZ - wie die anderen aktiven Carboxypeptidasen - durch komplexierende Reagenzien wie EDTA oder EGTA sowie gegen das aktive Zentrum gerichtete Carboxypeptidase-Inhibitoren an der Katalyse behindert (Novikova & Fricker, 1999; Song & Fricker, 1997). CPZ ist in Zellkultursystemen sowie in humanem Plazentagewebe im sekretorischen Zellapparat sowie in der extrazellulären Matrix lokalisiert (Novikova et al., 2000). Diese Lokalisation, die hohe Affinität zu Heparin (Novikova & Fricker, 1999) und das neutrale pH-Optimum deuten auf eine endogene Rolle von CPZ in der Extrazellulärmatrix (*extracellular matrix* - ECM) hin. Eine funktionelle Analyse von CPZ lag bis zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.

1.2 Somiten und ihre Differenzierung

Das auffälligste und namengebende Charakteristikum der Klasse der Vertebraten ist die Wirbelsäule, welche aus Knorpel oder aus Knochen besteht. Die Wirbelsäule entwickelt sich während der Ontogenese aus metamerem Gewebe mesodermalen Ursprungs, den Somiten. Bei diesen handelt es sich um epitheliale Kugeln, die paarweise das Neuralrohr flankierend aus dem paraxialen Mesoderm entstehen. Dieser Prozess beginnt in der Kopfreion und setzt sich von anterior nach posterior fort. Jede Spezies hat dabei eine bestimmte Anzahl von Somiten und eine spezifische Geschwindigkeit, mit der sie gebildet werden. Das Ursprungsgewebe der Somiten, das paraxiale Mesoderm, entsteht durch Zellwanderung während der Gastrulation. Dieser Prozess wird in zwei Phasen unterteilt: In der primären Gastrulation wandern die mesodermalen Zellen über den Primitivstreifen ein und bilden dann z.B. im Huhn ca. alle 90 Minuten ein neues Paar Somiten. In einer zweiten Phase, der sekundären Gastrulation, entstehen caudal des 27. Paares alle Somiten aus präsomitischen Mesoderm (PSM), das sich aus dem dorsomedialen Teil der Schwanzanlage formiert (Christ et al., 1998; Stockdale et al., 2000). Dieses PSM wird prinzipiell durch den Hensenschen Knoten gebildet.

1.2.1 Somitogenese

Als Somitogenese bezeichnet man den Prozess, in dem aus dem rostralen Ende des PSM zeitlich synchron zwei epitheliale Somiten zu beiden Seiten der Körperachse knospen. Für die Somitogenese wurde 1976 erstmals das so genannte „clock and wavefront“-Modell vorgeschlagen (Cooke & Zeeman, 1976). Dieses Modell beschreibt einen zellulären Oszillator, der im Zusammenspiel mit einer das PSM bei konstanter Geschwindigkeit durchlaufenden molekularen Welle interagiert, um die zeitlich synchrone Bildung der Somiten zu ermöglichen. Durch Arbeiten in Maus, Huhn und Zebrafisch konnten in den letzten Jahren Gene isoliert werden, die entsprechende Eigenschaften vorweisen. Sie interagieren in einem komplexen Zusammenspiel und bestätigen dieses Modell weitestgehend (zur Übersicht siehe: Gossler & Hrabe de Angelis, 1998; Pourquie, 2001; Saga & Takeda, 2001). Die Gene *c-hairy 1*, *c-hairy 2* und *lunatic fringe* zeigen im Hühnerembryo ein zeitlich wie räumlich oszillierendes Expressionsmuster (Aulehla & Johnson, 1999; Forsberg et al., 1998; McGrew et al., 1998; Palmeirim et al., 1997) und werden durch Komponenten des Notch/Delta-Signaltransduktionsweges reguliert (Jouve et al., 2000). Die oszillierende Expression von *c-hairy 1* und *lunatic fringe* entlang des präsomitischen Mesoderms hat eine Frequenz von 90 min. Pro Expressionswelle von *c-hairy 1*, die von caudal nach rostral propagiert, wird ein Somit gebildet.

Das präsomitische Mesoderm wird hinsichtlich seines Expressionmusters, seiner Kompetenz zur Segmentierung, und dem Vorhandensein von rostrocaudaler Polarität (s.u.) in zwei Zustände unterteilt (Saga & Takeda, 2001): Die Region I, gewöhnlich die caudalen zwei Drittel der PSM, zeigt hinsichtlich molekularer und zellulärer Eigenschaften keine Spezifität, wohingegen die Zellen der Region II, der rostrale Teil der PSM, bereits rostrocaudale Polarität aufweisen und segmentierungskompetent sind. Der Übergang des sich ständig nachbildenden PSM vom undifferenziertem Zustand der Region I in den reiferen Zustand der Region II wird wahrscheinlich über den FGF-Signaltransduktionsweg reguliert, wobei ein Konzentrationsgradient von FGF-Faktoren das PSM im unreiferen Zustand hält (Dubrulle et al., 2001; Sawada et al., 2001).

1.2.2 Die dorsoventrale Differenzierung der Somiten

Die Somiten stellen das Ursprungsgewebe des axialen Skelettes, der Skelettmuskulatur sowie der dorsalen Haut des Rumpfes dar. Kurz nach der Knospung aus dem präsomitischen Mesoderm unterteilt sich der epitheliale Somite in zwei Kompartimente: Der ventrale Teil des Somiten verliert seinen epithelialen Charakter und bildet das mesenchymale Sklerotom. Der dorsale Teil behält seinen epithelialen Charakter bei und bildet das so genannte Dermamyotom (siehe Abb. 2) (Übersichtsartikel: Brent & Tabin, 2002; Christ et al., 2000). Die Entwicklung der Somiten steht unter Einfluss benachbarter Gewebe. Für die *chorda dorsalis*, das Neuralrohr, das Ektoderm sowie für laterales Mesodermgewebe sind induzierende bzw. inhibierende Einflüsse auf die Somiten-Differenzierung nachgewiesen worden. Diese werden durch verschiedene Signalmoleküle vermittelt.

Das Sklerotom

Aus dem mesenchymalen Sklerotom bildet sich das axiale Skelett der Vertebraten, wobei zwischen der Entwicklung des medialen und des lateralen Anteils des Sklerotoms unterschieden wird. Das ventromediale Sklerotom bildet die Wirbelkörper, die Bandscheiben, die Neuralbögen und den proximalen Teil der Rippen (Huang et al., 1994; Olivera-Martinez et al., 2000). Das dorsomediale Sklerotom bildet den Wirbelbogen, aus dem ventrolateralen Teil des Sklerotoms entsteht der distale Teil der Rippen (Huang et al., 2000b; Huang et al., 2000b), wobei ein Beitrag dermamyotomaler Zellen zum distalen Bereich der Rippen diskutiert wird (Kato & Aoyama, 1998) (siehe Abb.2 e). Nach der Auflösung der epithelialen Struktur umwandern die Zellen des Sklerotoms die *chorda dorsalis* und das Neuralrohr, bevor sie in ihre finalen Strukturen differenzieren.

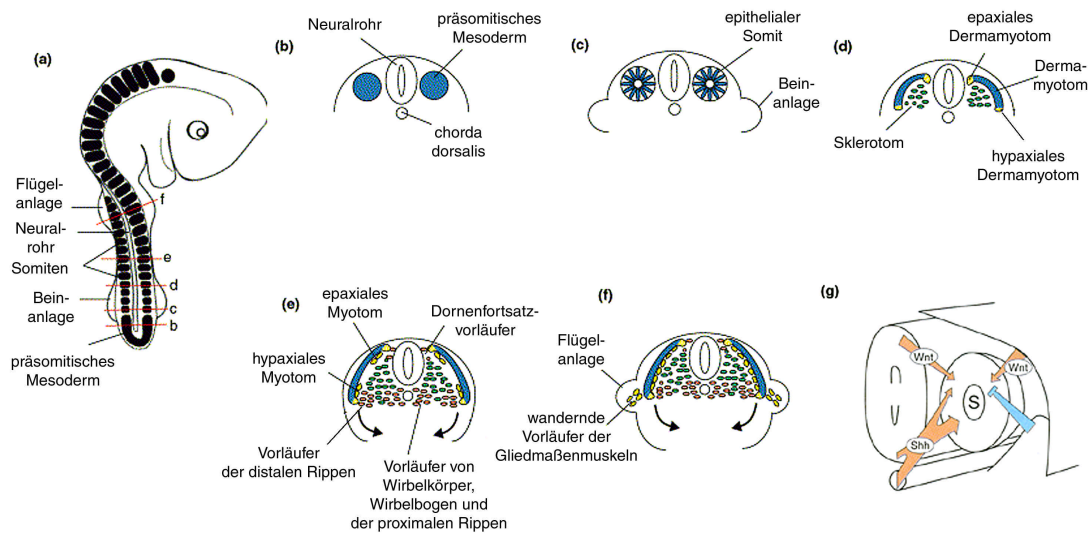


Abbildung 2: Übersicht über die Entwicklung der Somiten in einem drei Tage alten Hühnerembryo (28 Somiten). (a) Die Somiten (schwarz) knospen am cranialen Ende des präsomitischen Mesoderms, welches zu beiden Seiten des Neuralrohrs lokalisiert ist. Dieser Vorgang vollzieht sich in einem kranio-caudalen Gradienten. (b-f) Transversale Schnitte durch den Embryo aus (a) in der jeweils angegebenen axialen Ebene. (b) Schnitt auf Höhe des präsomitischen Mesoderms. (c) Schnitt durch den frisch gebildeten epithelialen Somiten. (d) Durch das benachbarte Gewebe induziert teilt sich der Somit in seine zwei Kompartimente: das epitheliale Dermamyotom (blau), aus dem die dorsale Haut des Rumpfes sowie der Skelettmuskulatur entsteht, und das mesenchymale Sklerotom (grün), aus dem das axiale Skelett gebildet wird. Am epaxialen und hypaxialen Ende des Dermamyotoms wandern Zellen unter dieses Gewebe und bilden das Myotom (gelb), siehe auch (e). (e) Das epaxiale Myotom differenziert in die Skelettmuskeln des Rückens; die Zellen des hypaxialen Myotoms und Dermamyotoms umschließen den ventralen Teil des Rumpfes und bilden die sog. Rumpfwand und die abdominalen Muskeln. Ventromediale Zellen des Sklerotoms differenzieren zu Wirbelkörpern, Wirbelbögen und zum proximalen Teil der Rippen, wohingegen dorsomediale Zellen des Sklerotoms den Dornenfortsatz bilden. Die Beteiligung ventrolateraler Sklerotomzellen am distalen Teil der Rippen ist beschrieben worden, wird allerdings noch widersprüchlich diskutiert (siehe Text). (f) Auf Höhe der Flügelanlage wandern Zellen des hypaxialen Dermamyotoms in dieses Gewebe und bilden die Muskulatur der Gliedmaße. (g) Die Differenzierung der Somiten wird durch Signalmoleküle aus benachbarten Geweben positiv wie negativ reguliert: *sonic hedgehog* (Shh) aus der *chorda dorsalis* und dem ventralen Neuralrohr induziert die Ausbildung des Sklerotoms und die initiale Expression dermyotomaler Transkriptionsfaktoren, wohingegen das Dermamyotom in erster Linie durch Wnt-Moleküle aus dem Ektoderm und dem dorsalen Neuralrohr beeinflusst wird. Verändert aus: Brent und Tabin, 2002, sowie Tajbakhsh und Buckingham, 2000.

Die Induktion und Differenzierung des Sklerotoms wird in erster Linie durch Signale des ventralen Neuralrohrs sowie der *chorda dorsalis* kontrolliert (zur Übersicht siehe Dockter, 2000). Das Signalmolekül *sonic hedgehog* (Shh), welches in beiden dieser Strukturen exprimiert wird, ist für diesen Prozess essentiell (Fan & Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994). Der BMP-Inhibitor *noggin*, nur in der *chorda dorsalis* exprimiert, ist ebenfalls an der Sklerotom-Induktion beteiligt. Beide Signalmoleküle sind in der Lage, die für das

Sklerotom typischen *paired-box*-Transkriptionsfaktoren Pax1 und Pax9 zu induzieren (McMahon et al., 1998; Muller et al., 1996). Mäusen, bei denen Shh durch gezielte Mutagenese inaktiviert worden ist, fehlen die meisten der aus dem Sklerotom entstehen Strukturen, wie z.B. die gesamte Wirbelsäule und Teile der Rippen (Chiang et al., 1996). Da *noggin* k.o.-Mäuse eine verzögerte *Pax1*-Induktion zeigen, *noggin* allein *Pax1* induzieren kann und die oben beschriebene Shh k.o.-Maus eine anfängliche *Pax1*-Expression zeigt, die dann aber nicht beibehalten wird, wird angenommen, dass *noggin* die *Pax1*-Expression induziert und Shh für die Beibehaltung dieser Expression verantwortlich ist (Dockter, 2000). Pax1-defizienten Mäusen fehlen die Wirbelkörper und die Bandscheiben. Sie zeigen zudem eine veränderte Morphologie der *chorda dorsalis* (Wallin et al., 1994). Dieser Effekt kann nur partiell durch Pax9 kompensiert werden (Peters et al., 1999). Es wird angenommen, dass Pax1 und Pax9 zusammen ausreichend sind, die chondrogene Differenzierung des Sklerotoms zu induzieren (Rodrigo et al., 2003). Weitere Gene, deren Expression für das Sklerotom charakteristisch ist, sind *Twist* (Fuchtbauer, 1995), *scleraxis* (Cserjesi et al., 1995) und *Bapx1/Nkx3.2* (Murtaugh et al., 2001; Tribioli & Lufkin, 1999). Neben den Signalmolekülen Shh und Noggin wurde BMP-4 (*bone morphogenetic protein-4*) eine Funktion bei der Sklerotom-Differenzierung zugeschrieben. Obwohl es die ventrolaterale Differenzierung inhibiert, wurde gezeigt, dass es in den dorsomedialen Strukturen, die kein *Pax1* exprimieren und aus denen der Wirbelbogen entsteht, die Transkriptionsfaktoren *Msx1* und *Msx2* induziert (Monsoro-Burq et al., 1996; Watanabe et al., 1998). Es wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem sklerotomale Zellen durch Shh die Kompetenz zur Chondrogenese erhalten, und dass diese dann durch BMP-Moleküle induziert wird (Murtaugh et al., 1999; Brent & Tabin, 2002). *Bapx1* könnte ein Transkriptionsfaktor sein, der diesen Prozess vermittelt (Murtaugh et al., 2001).

Während ihrer Reifung durchlaufen die Sklerotome eine Entwicklung, die man im allgemeinen als „Neugliederung“ bezeichnet (Ebner, 1888 und 1892). Resultat dieser Neugliederung ist, dass jedes Sklerotom zur Bildung der rostralen Hälfte und der caudalen Hälfte des benachbarten Wirbelkörpers beiträgt (Übersichtsartikel: Brand-Saberi & Christ, 2000; Christ et al., 1998). Ein Unterschied zwischen rostraler und caudaler Hälfte der Sklerotome zeigt sich schon früher in der Embryonalentwicklung und manifestiert sich u.a. durch die Tatsache, dass Zellen aus der Neuralleiste und Axone nur die rostrale Hälfte der Sklerotome durchdringen (Keynes & Stern, 1984).

Das Dermamyotom

Das Dermamyotom ist das entwicklungsbiologische Vorläufergewebe für die Skelettmuskulatur und die Haut der Rückenpartie. An seiner epaxialen Grenze wandern Zellen unter das Dermamyotom und bilden das epaxiale Myotom, aus dem die

Rückenmuskulatur entsteht (Denetclaw et al., 1997). Das zentrale Dermamyotom verliert seine epitheliale Struktur und bildet dann die Haut des Rückens. Das Schicksal des hypaxialen Dermamyotoms variiert mit der axialen Lokalisation: Auf Höhe der Gliedmaßenanlage wandern die Zellen in das laterale Mesoderm und bilden anschließend die Gliedmaßenmuskulatur (Chevallier et al., 1977). Auf axialer Höhe zwischen den zukünftigen Gliedmaßen wandern die Zellen unter das Dermamyotom und bilden mit diesem zusammen die Abdominalmuskulatur und die so genannte Rumpfwand (Cinnamon et al., 1999; Denetclaw & Ordahl, 2000).

Für die Bildung sowie die Differenzierung des Dermamyotoms sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren charakteristisch und notwendig. Zu ihnen zählen die *paired box* Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 sowie die Gruppe der so genannten myogenischen Regulationsfaktoren (MRF - *myogenic regulatory factors*), die von den Genen MRF-4, Myf-5, MyoD, und myogenin gebildet wird. Alle MRF-Gene können Muskeldifferenzierung in Nicht-Muskel Gewebe induzieren und besitzen im Dermamyotom z.T. ein leicht divergentes Expressionsmuster (für eine Übersicht siehe: Borycki & Emerson, 2000; Weintraub et al., 1991). Genetische Studien haben ein kompliziertes Zusammenspiel dieser Faktoren gezeigt. Da der Transkriptionsfaktor MyoD sowohl von der Expression von Pax3 als auch von Myf-5 abhängig ist, wurde postuliert, dass er in zwei getrennten Transduktionswegen einmal von Myf-5 und einmal von Pax3 induziert wird. Die alleinige Eliminierung von Pax3 beeinträchtigt die Epithelbildung des Dermamyotoms, beim gleichzeitigen Ausschalten von Pax3 und Myf-5 fehlen die Muskeln der Rumpffregion komplett (Tajbakhsh et al., 1997).

Die Induktion und Differenzierung des Dermamyotoms wird ebenfalls durch benachbarte Gewebe reguliert: Die Bildung des medialen Teils des Dermamyotoms hängt von den Signalmolekülen Wnt1 und Wnt3a aus dem dorsalen Neuralrohr ab (Dietrich et al., 1997; Fan & Tessier-Lavigne, 1994; Munsterberg & Lassar, 1995; Munsterberg et al., 1995). Das laterale Dermamyotom benötigt Wnt4, Wnt6 und Wnt7, die im Ektoderm exprimiert werden (Dietrich et al., 1997; Fan et al., 1997; Fan & Tessier-Lavigne, 1994). Die frühe Expression von MyoD und Myf-5 im epaxialen Dermamyotom wird von Shh reguliert (Dietrich et al., 1997; Munsterberg & Lassar, 1995; Borycki et al., 1998; Pownall et al., 1996) (siehe Abb. 2 g). Das laterale Mesoderm induziert durch die Sekretion von BMP-4 die Expression von Pax3, wohingegen eher mediale Gene wie Myf-5 und MyoD durch BMP-4 inhibiert werden (Pourquie et al., 1995; Pourquie et al., 1996).

1.3 Die Gliedmaßenentwicklung in Vertebraten - Übersicht

Die Gliedmaßenentwicklung der Wirbeltiere ist eines der am besten beschriebenen Modelle zur Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen, die während der Embryogenese die Ausbildung von Mustern regulieren. Die Gliedmaßenanlage wird zuerst als kleine Knospe sichtbar, die aus dem Embryo herausragt und aus morphologisch einheitlichem Mesenchym besteht, welches von einer ektodermalen Schicht umschlossen ist. Mit fortschreitender Embryogenese wächst diese Anlage, wobei sich die skelettalen Strukturen von proximal nach distal bilden: der Stylopod als das dem Rumpf nächstem Element (Humerus oder Femur), der Zeugopod (Radius und Ulna oder Tibia und Fibula) und der Autopod (Karpale und Metakarpale bzw. Tarsale und Metatarsale und die Phalangen). Die Entwicklung der Gliedmaßen vollzieht sich auch entlang ihrer anderen Achsen: von anterior nach posterior („Daumen Richtung kleiner Finger“) und von dorsal nach ventral („Handrücken Richtung Handfläche“) (zur Übersicht siehe: Capdevila & Izpisua Belmonte, 2001; Niswander, 2003). Die Initiierung der Gliedmaßenausbildung sowie die beschriebene Differenzierung wird durch verschiedene organisierende Gewebe reguliert und soll im Folgenden kurz beschrieben werden (der Aspekt der Gliedmaßenidentität wird unter 1.4 behandelt).

Induzierung der Gliedmaßenausbildung und die proximo-distale Differenzierung

Die Differenzierung entlang der proximo-distalen Achse wird durch eine ektodermale Verdickung am distalen Ende der Gliedmaßenanlage reguliert, der so genannten apikalen ektodermalen Leiste (AER - *apical ectodermal ridge*). Mitglieder der Familie der FGF-Signalmoleküle (FGF - *fibroblast growth factor*) sind die essentiellen Faktoren der AER und können diese im Falle einer Ablation ersetzen (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993). Die Notwendigkeit von FGF-Signalen aus der AER wurde jüngst durch genetische Manipulationen in der Maus untermauert: Das konditionale Ausschalten von FGF-4 und FGF-8 während der gesamten Gliedmaßenentwicklung führt zum vollständigen Ausbleiben skelettaler Strukturen (Sun et al., 2002). Es sind wenigstens vier Mitglieder dieser Familie in der AER exprimiert mit teilweise redundanter Funktion (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2000). Ablationsexperimente der AER führten in den 70er Jahren zur Etablierung des so genannten „*progress zone*“-Modells: Die „*progress zone*“, das der AER direkt unterliegende Mesenchym, wird durch diese in einem undifferenzierten Zustand gehalten. Zellen, die die „*progress zone*“ mit zunehmender distaler Entwicklung verlassen, beginnen zu differenzieren. Je später sie den undifferenzierten Zustand verlassen, desto distalere Strukturen bilden sie (Summerbell et al., 1973). Neuere Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die proximo-distale Spezifizierung schon früher beginnt (Dudley et al., 2002; Sun et al., 2002).

Die Induktion der Gliedmaßenbildung wird durch ein Zusammenspiel von Mitgliedern der Familie der Wnt- (s.u.) und der FGF-Signalmoleküle bestimmt. *Wnt2b*- und *Wnt8c*-Transkripte sind während der Embryogenese des Huhns im lateralen Mesoderm (durch den Einfluss von FGF-8 aus dem intermediären Mesoderm) auf Höhe der Flügel- bzw. Beinanlage lokalisiert und induzieren im darüber gelegenen Gliedmaßen-Mesenchym die Expression von *FGF-10* (Kawakami et al., 2001). FGF-10 wiederum induziert die Expression von *FGF-8* im Ektoderm der Gliedmaße (Min et al., 1998), wobei dieser Prozess im Huhn durch *Wnt3a* als Morphogen vermittelt wird (Kawakami et al., 2001). In der Maus wird die Transduktion der Gliedmaßenanlageninitiierung anstelle von *Wnt3a* durch *Wnt3* vermittelt (Barrow et al., 2003). Hierbei ist allerdings noch unklar, wie das Signal von *Wnt3*, welches im gesamten Ektoderm der Gliedmaßenanlage exprimiert ist, auf den ventralen Teil des Ektoderms beschränkt bleibt. Interessanterweise konnte in den gleichen Experimenten gezeigt werden, dass *Wnt3* für die Induktion von Genen essentiell ist, die die dorso-ventrale Differenzierung beeinflussen (Barrow et al., 2003).

Die anterior-posteriore Differenzierung der Gliedmaße

Die anterior-posteriore Differenzierung der Gliedmaße wird durch eine posteriore Zellpopulation, die sogenannte Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA), reguliert. Transplantiert man Zellen der ZPA an das anteriore Ende einer Hühnergliedmaßenanlage, kommt es zur Duplikation von Autopod-Elementen, wobei die Vollständigkeit dieser Duplikation von der Anzahl der transplantierten Zellen abhängt (Tickle, 1981). Die Morphogene *Shh* (s.o.) (Riddle et al., 1993) und Retinsäure (Helms et al., 1994; Tickle et al., 1982) können ZPA-Zellen in diesem Duplikationstest konzentrationsabhängig imitieren. Weitere Untersuchungen führten zu dem Modell, dass Retinsäure über das Homöoboxgen *Hoxb8* *Shh* in der ZPA induziert (Lu et al., 1997), welches dann als das ZPA-Morphogen agiert. Alternativ wurde vorgeschlagen, dass *Shh* das Gewebe der Gliedmaßenanlage nur für die antero-posteriore Differenzierung empfänglich machen könnte und dass BMP-2, ein Molekül, das durch *Shh* in der ZPA induziert wird, dann als das eigentliche Morphogen eingreift (Drossopoulou et al., 2000). Neuere Studien in der Maus haben allerdings gezeigt, dass auch in kompletter Abwesenheit von *Shh* Finger bzw. Zehen gebildet werden können und dass *Shh* einen postulierten endogenen polydaktylen Phänotyp über einen Konzentrationsgradienten unterdrückt (Litingtung et al., 2002).

Die dorso-ventrale Differenzierung der Gliedmaße

Die dorso-ventrale Differenzierung der Gliedmaße wird durch das umschließende Ektoderm reguliert. Im dorsalen Ektoderm exprimiertes Wnt7a induziert die Expression des Transkriptionsfaktors Lmx1 im darunterliegenden Mesenchym und ist für die dorsale Differenzierung notwendig (Parr & McMahon, 1995). Der Transkriptionsfaktor Engrailed-1 (EN-1), der im ventralen Ektoderm exprimiert ist, reprimiert die Expression von Wnt7a in diesem Gewebe und verhindert die Ausbildung dorsaler Strukturen an der Unterseite der Gliedmaße (Loomis et al., 1996). Die Expression von ventralem EN-1 wird durch BMP-Signaltransduktion vermittelt, die in der Maus wiederum von ventralem Wnt3 abhängig ist (Ahn et al., 2001; Barrow et al., 2003; Pizette et al., 2001).

Die Interaktion der organisierenden Gewebe während der Gliedmaßenentwicklung

Die Proliferation und Differenzierung in der Gliedmaßenentwicklung wird durch das Zusammenspiel der oben beschriebenen organisierenden Gewebe koordiniert. Bekanntestes Beispiel für eine solche Interaktion ist die Abhängigkeit der Induktion von Shh in der ZPA durch FGF-Signale aus der AER (Laufer et al., 1994; Sun et al., 2002). Shh in der ZPA und FGF-4 in der AER beeinflussen sich gegenseitig positiv über eine Rückkopplungsschleife, wobei die Signaltransduktion von Shh zur AER über den BMP-Inhibitor Gremlin vermittelt wird (Zuniga et al., 1999). Die anterior-posteriore Differenzierung ist ebenfalls auf Signale aus dem dorsalen Ektoderm angewiesen (Parr & McMahon, 1995). BMP-Signalmoleküle sind sowohl an der Induktion ventraler Strukturen beteiligt als auch an der Induktion der AER (Barrow et al., 2003; Pizette et al., 2001) und sind in der späten Gliedmaßenentwicklung für die Regression der AER notwendig (Pizette & Niswander, 1999).

1.4 Die Gliedmaßenidentität und Lix1, ein neues Gen mit unbekannter Funktion

Lix1 (*Limb expression-1*) ist ein kürzlich beschriebenes Gen bisher unbekannter Funktion. Es kodiert für ein Protein mit einer Länge von ca. 280 Aminosäuren, deren C-terminalen 100 Reste wahrscheinlich eine so genannte *coiled coil*-Struktur ausbilden, eine Struktur, für die Protein-Protein Interaktionen impliziert werden (Swindell et al., 2001). Homologe von Lix1 wurden für Mensch, Maus, Huhn, *Drosophila* und Zebrafisch identifiziert (Swindell et al., 2001, und E. C. Swindell, persönliche Kommunikation). In Mensch und Maus wurde Lix2, ein zusätzliches Homolog von Lix1, gefunden (Swindell et al., 2001). Das auffälligste Charakteristikum von Lix1 ist, dass es in der Embryogenese des Hühnchens während der

Gliedmaßenentwicklung transient in der sich bildenden Beinanlage exprimiert ist, jedoch in der Flügelanlage nicht aktiviert wird. Damit reiht es sich in eine kleine Gruppe bisher identifizierter Gene ein, die bei der Gliedmaßenentwicklung unterschiedliche Expression zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen zeigen: Pitx1 und Tbx-4 sind selektiv in der Beinanlage exprimiert und bestimmen die Identität der Beinanlage (Rodriguez-Esteban et al., 1999; Szeto et al., 1999), Tbx-5 ist selektiv in der Vordergliedmaße exprimiert und bestimmt dort die Identität (Rodriguez-Esteban et al., 1999). Die drei Gene kodieren alle für Transkriptionsfaktoren. Es wurde gezeigt, dass Tbx-4 unter der Regulation von Pitx1 steht (Szeto et al., 1999) .

Weitere Expressionsareale von Lix1 während der Embryogenese des Huhns sind die Rhombomere 3 und 5, das Mesenchym des Pharynx und des Darmrohrs sowie die Vorläufergewebe des Gesichtes (Swindell et al., 2001).

1.5 Der Wnt/Wingless-Signaltransduktionsweg

Der Wnt/Wingless-Signaltransduktionsweg stellt eines der wichtigsten evolutionär konservierten Signalsysteme dar und ist in verschiedenen Tierklassen an zahlreichen entwicklungsbiologischen Prozessen maßgeblich beteiligt (s.o.) (zur Übersicht: Cadigan & Nusse, 1997; Wodarz & Nusse, 1998). Wnt-Proteine bilden eine Familie von extrazellulären Signalmolekülen, von denen im Menschen bisher 19 verschiedene Mitglieder identifiziert worden sind (für eine aktualisierte Übersicht siehe: www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html). Sie besitzen alle ein Molekulargewicht zwischen 39-46 kD und haben ein hoch konserviertes Muster von 23 oder 24 Cystein-Resten.

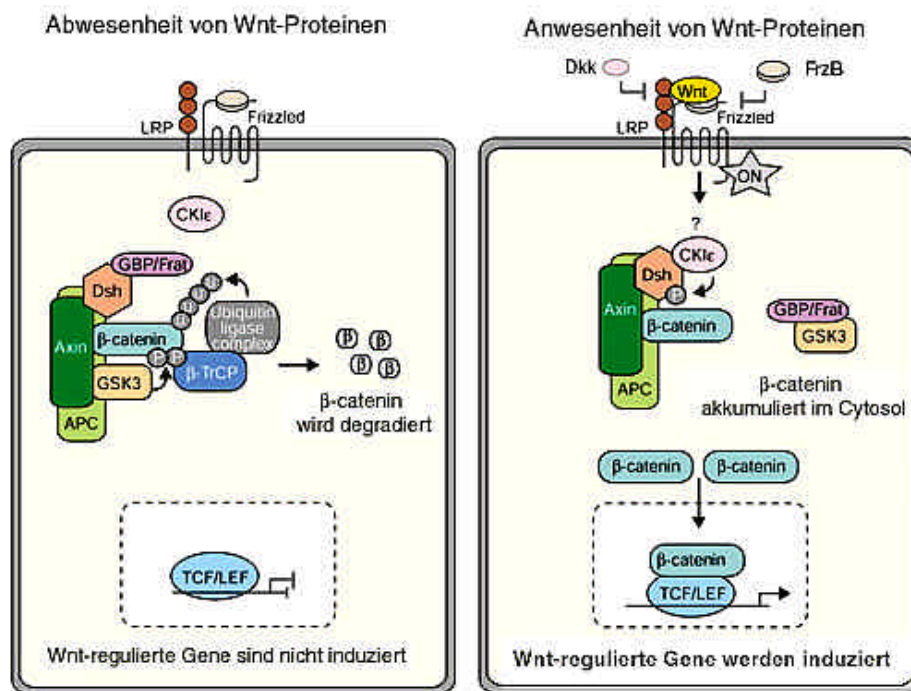


Abbildung 3: Der Wnt/β-Catenin Signaltransduktionsweg. Links: In Abwesenheit der Wnt-Proteine vermittelt ein intrazellulärer Multi-Protein-Komplex, der u.a. die Proteine Axin, APC und Dsh beinhaltet, die Phosphorylierung von β-Catenin durch GSK-3. Phosphoryliertes β-Catenin wird ubiquitiniert und über den Proteasom-Komplex abgebaut. Rechts: Sind Wnt-Proteine präsent, wird Dsh aktiviert (möglicherweise über eine Phosphorylierung durch CKIε) und inhibiert die Phosphorylierung von β-Catenin durch GSK-3. β-Catenin akkumuliert daraufhin im Cytosol, tritt in den Zellkern ein und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren der Lef/TCF-Familie. Dieser Komplex leitet dann die Expression der Zielgene ein. Extrazellulär wird das Wnt-Signal durch die so genannten Frizzled-Transmembranproteine vermittelt, die mit LRPs einen Rezeptorkomplex bilden. Die extrazelluläre Wnt-Signaltransduktion wird zusätzlich durch sezernierte Inhibitoren wie Dkk und Frzb moduliert (für Details siehe Text). Verändert aus: Miller, 2002.

1.5.1 Extrazelluläre Modifikation der Wnt-Signaltransduktion

Die Aufnahme und Transduktion des Wnt-Signals beinhaltet das Binden der Wnt-Proteine an einen Rezeptorkomplex aus zwei Proteinen verschiedener Familien von Transmembranrezeptoren: zum einen Mitglieder der so genannten Frizzled-Rezeptoren, zum anderen den LDL-Rezeptoren verwandte Proteine (*LRP-LDL receptor related proteins*) (Bejsovec, 2000; Pandur & Kuhl, 2001). Die Frizzled-Rezeptoren bestehen weitestgehend aus einer siebenfachen Transmembran-Domäne, die denen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ähnlich ist, und einer extrazellulären Cystein-reichen Domäne (CRD). Die CRD der Frizzled-Rezeptoren vermittelt die Interaktion der Wnt-Proteine mit diesen Rezeptoren (Bhanot et al., 1996). Es wurde vorgeschlagen, dass Frizzled-Rezeptoren zusammen mit LRP-Transmembranproteinen (in Vertebraten LRP-5 und LRP-6, in *Drosophila* das homologe Protein *arrow*) und den Wnt-Proteinen einen ternären Komplex bilden, der dann die interzelluläre(n) Signalkaskade(n) initiiert (s.u.) (Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000) (siehe Abb.3).

Neben den Frizzled- und LRP-Rezeptoren haben auch Proteoglykane der Zelloberfläche einen Einfluss auf die extrazelluläre Wnt/Wingless-Signaltransduktion. In *Drosophila* wurde gezeigt, dass verschiedene Gene der Proteoglykan- und Glypikan-Familie sowie Proteine, die an der Proteoglykan-Synthese beteiligt sind, den Wnt-Signalweg beeinflussen (Binari et al., 1997; Hacker et al., 1997; Haerry et al., 1997; Lin & Perrimon, 1999; Tsuda et al., 1999). Obwohl die genaue Wirkungsweise der Proteoglykane des Extrazellulärraums nur teilweise definiert ist, wird angenommen, dass durch sie die lokalen Konzentrationsgradienten der Wnt-Signalmoleküle beeinflusst werden (Miller, 2002). Diese Annahme wird durch eine Studie untermauert, die zeigt, dass die Heparansulfat-abhängige Wnt-Signaltransduktion im Hühnchen durch einen Heparansulfat-abbauenden Prozess reguliert wird (Dhoot et al., 2001).

Des Weiteren werden die Wnt-Signale durch eine Reihe von sezernierten Proteinen inhibiert (siehe Abb.3). Zu diesen zählen die so genannten FRPs (*Frizzled-related proteins* – Frizzled ähnliche Proteine, auch Frzb), WIF-1 (*Wnt-inhibitory factor* – Wnt inhibierender Faktor), Cerberus (Cer) und Dickkopf (Dkk). FRPs bestehen aus einer CRD und einer C-terminalen Netrin-ähnlichen Domäne. Sie interagieren direkt mit den Wnt-Proteinen über die CRD und verhindern so das Binden an den eigentlichen Rezeptorenkomplex (s.o.) (zur Übersicht siehe: Moon et al., 1997; Bafico et al., 1999; Lin et al., 1997). Auch die beiden Inhibitoren WIF-1 und Cer interagieren direkt mit den Wnt-Proteinen und verhindern so deren Rezeptorbindung, wobei sie sich allerdings strukturell von den Frizzled-Rezeptoren und den FRPs unterscheiden und keine CRD besitzen (Hsieh et al., 1999; Piccolo et al., 1999). Dkk bindet nicht an die

Wnt-Moleküle, sondern an die extrazelluläre Domäne der LRPs (s.o.). Hierdurch wird die Initiierung der Wnt-Signaltransduktion verhindert (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001).

1.5.2 Die intrazelluläre Transduktion des Wnt-Signals

Wnt-Signale können intrazellulär durch wenigstens drei verschiedene Transduktionskaskaden weitergeleitet werden: den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg oder den so genannten Wnt/Polaritäts-Signalweg (zur Übersicht siehe: Huelsken & Birchmeier, 2001; Kuhl et al., 2000b; Miller, 2002). Unterschiedliche Kombinationen von Wnt-Proteinen und Frizzled-Rezeptoren können diese Signalwege selektiv ansprechen und ermöglichen so eine individuelle zelluläre Reaktion.

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist der am intensivsten beschriebene: In Abwesenheit der Wnt-Proteine vermittelt ein intrazellulärer Multi-Protein-Komplex, der u.a. die Proteine Axin, APC (*adenomatous polyposis coli protein*) und Dishevelled (Dsh) beinhaltet, die Phosphorylierung von β -Catenin durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3). Phosphoryliertes β -Catenin wird ubiquitiniert und über den Proteasom-Komplex abgebaut. Unter Einfluss der Wnt-Bindung wird Dsh durch den Rezeptorkomplex aktiviert (möglicherweise über eine Phosphorylierung mittels Casein-Kinase I ϵ (CKI ϵ)) und inhibiert die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3. Dieses akkumuliert daraufhin im Cytosol, tritt in den Zellkern ein und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren der Lef/TCF-Familie. Dieser Komplex initiiert dann die Transkription der entsprechenden Zielgene (siehe Abb.3) (zur Übersicht siehe: Miller, 2002; Wodarz & Nusse, 1998).

Der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg führt final zur intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen unter Beteiligung von Phospholipase C, Proteinkinase C sowie Calmodulin-abhängiger Kinase II und ist mit der Ventralisierung und der Regulation konvergenter Extensionsbewegungen im Krallenfrosch in Verbindung gebracht worden (Kuhl et al., 2000a; Wallingford et al., 2001). Verschiedene Studien haben vorgeschlagen, dass unterschiedliche Klassen von Wnt-Molekülen existieren, die entweder durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg oder durch den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg transduzieren, wobei auch eine Präferenz der Frizzled-Rezeptoren für den einen oder anderen Weg postuliert worden ist (Kuhl et al., 2000b).

Der Wnt/Polaritäts-Signalweg reguliert die planare Zellpolarität in *Drosophila* über Beeinflussung der Cytoskelettorganisation. Die Beteiligung der Proteine Dsh (s.o.), Drok (*Drosophila rho-associated kinase*), JNK (*Jun N-terminal kinase*) sowie Myosin II und Myosin VIIA an diesem Signalweg wurde nachgewiesen (zur Übersicht siehe: Adler & Lee, 2001). In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass durch diese Signalkaskade gerichtete Zellbewegungen während der Gastrulation kontrolliert werden (Heisenberg et al., 2000; Wallingford et al., 2000).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Carboxypeptidase Z (CPZ) ist ein neues Mitglied der CPE/N-Unterfamilie der Metallo-carboxypeptidasen. Sie unterscheidet sich von anderen Carboxypeptidasen durch eine N-terminale Cystein-reiche Domäne (CRD). Dies ist eine Proteindomäne, welche in vielen extrazellulären Proteinen zu finden ist, die an entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt sind (siehe Einleitung). In unserer Arbeitsgruppe wurde das CPZ-Homolog aus dem Huhn (cCPZ) bei der Suche nach an der Musterbildung in der Embryogenese des Huhns beteiligten Genen isoliert (E.C. Swindell und G. Eichele, nicht veröffentlichte Daten).

Die vorliegende Arbeit soll einen Einblick in die biologische Funktion von CPZ geben. Hierzu soll das murine Homolog von CPZ isoliert werden. Nach Bestimmung des Expressionsmusters in den beiden Modellorganismen Huhn und Maus soll durch Überexpressionsuntersuchungen im Hühnerembryo ein Einblick in den möglichen Einfluss von cCPZ während der Embryogenese gewonnen werden. Ausgehend von diesen Resultaten soll CPZ dann über *in vitro*-Systeme einem extrazellulären Regulationsprozess zugeordnet werden. Parallel zu diesen Experimenten war ein Ziel dieser Dissertationsarbeit die Etablierung einer Mauslinie, die über ein mutiertes CPZ-Nullallel verfügt.

Lix1 (*Limb expression-1*) ist ein neues Gen bisher unbekannter Funktion mit Homologen in Huhn, Maus, dem Menschen, *Drosophila* und Zebrafisch. Wie cCPZ wurde Lix1 auf der Suche nach neuen Genen, die an der Musterbildung in der Hühnerembryogenese beteiligt sein können, identifiziert (s.o.). In der vorliegenden Arbeit sollte neben der oben beschriebenen Charakterisierung von CPZ das Expressionsmuster von Lix1 während der Embryogenese der Maus bestimmt werden, um Hinweise zu erhalten, an welchen biologischen Prozessen Lix1 beteiligt ist.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Behandlung und Haltung der Versuchstiere

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Bundes-Tierschutzgesetzes durchgeführt (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) and 8 (§119)). Zur Analyse von Expressionsmustern sowie zur Herstellung der genetisch modifizierten Mauslinie wurden die Mausstämme 129/ola und NMRI verwendet (siehe unten).

Für die Experimente mit Hühnerembryonen wurden befruchtete White Leghorn Eier von der Firma Lohmann, Deutschland, bezogen. Die Eier wurden bei 80% Luftfeuchtigkeit und 38°C inkubiert und nach entsprechender Zeit geöffnet. Die Bestimmung der Entwicklungsstufen der Hühnerembryonen erfolgte nach Hamburger und Hamilton, 1951. Sie werden im weiteren Verlauf als “HH Stadium” angegeben.

2.2 *In situ*-Hybridisierung mit Embryonen (*Whole mount in situ*-Hybridisierung (WMISH))

Die *in situ*-Hybridisierung mit Mäuseembryonen wurde durchgeführt wie in Knecht und Harland und Parr et al. beschrieben (Knecht & Harland, 1997; Parr et al., 1993). Hühnerembryonen wurden nach Albrecht et al., 1997, behandelt. Mäuseembryonen entsprechender Entwicklungsstadien wurden freipräpariert und über Nacht in 4%PFA bei 4°C fixiert, wohingegen Hühnerembryonen über Nacht in MEMFA (siehe unten) fixiert wurden. Zur Aufbewahrung wurden die fixierten Embryonen über eine Konzentrationsreihe in 90% Methanol überführt und bei –20°C gelagert.

2.2.1 *In vitro*-Transkription

2.2.1.1 Herstellung der cDNA-Vorlage

Die Vorlagen für die Herstellung der Sonden wurden mittels RT-PCR aus mRNA amplifiziert, die entweder aus Hühner- oder Mäuseembryonen gewonnen worden war (cDNA-Synthese sowie die anschließende PCR-Reaktion wurden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt). Generell wurde der gesamte cDNA Bereich der gewünschten Gene amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO, Invitrogen, USA, gemäß den Herstellerangaben subkloniert und entsprechend der Orientierung der Insertion linearisiert.

Primer:

Pax1 (Huhn):

Forward 5'ATGGAGCACACGTACGGGGAGGTG3'

Reverse 5'CTAGGAGGAGGAGGCTGGGATCG3'

Myf5 (Huhn):

Forward 5'ATGGAGGTGATGGACAGCTGCCAGTTCTCC3'

Reverse 5'TCATAGCGCCTGGTAGGTCCGTCGGGG3'

MyoD (Huhn):

Forward 5'ATGGACTTACTGGGCCCATGGAAATGACG3'

Reverse 5'TTATAGCACTTGGTAGATTGGATTGCTGC3'

myogenin (Huhn)

Forward 5' ATGGAGCTCTTTGAGACCAACCCTTAC3'

Reverse 5' TCAGTTTTGGACCCGCTCCTCTGGGAACG3'

Pax3 (Huhn):

Forward 5' ATGACCACGCTGGCCGGGGCCGTG3'

Reverse 5' TTATGCGATATCTGGCTTCAGATAATG3'

Bei den *in situ*-Hybridisierungen mit den Genen Lix1, cCPZ und CPZ wurden verschiedene cDNA-Fragmente als Vorlagen zur Sondenpräparation verwendet, entweder die gesamten cDNA-Sequenzen oder Teilbereiche. In allen Fällen war das Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung gleich (die cDNA für Lix1 ist unter dem Genbank-Eintrag AF351204 zu finden, die für cCPZ unter dem Eintrag AF351205). Für Wnt4 wurde ein Konstrukt als Vorlage eingesetzt, welches die komplette cDNA enthielt. Dieses war freundlicherweise von A. Kispert zur Verfügung gestellt worden. Die Expressionsdaten zu sFRP-2 wurden einer öffentlichen Datenbank entnommen (www.genepaint.org).

2.2.1.2 Synthese der RNA-Sonden

Ansatz (alle Reagenzien von Roche, Schweiz)

1.5 µg linearisierte Vektor-DNA oder PCR-Produkt
8 µl Dig-label mix (2.5 mM rATP/rCTP/rGTP, 1.6 mM rUTP, 0.9 mM dig-11-rUTP)
2 µl 10x Transkriptionspuffer
2 µl 0.1 M DTT
0.5 µl RNasin
1 µl RNA-Polymerase
x µl RNase-freies Wasser (bis zu einem Volumen von 20 µl)

Durchführung

Nach einer dreistündigen Inkubation des oben aufgeführten Ansatzes bei 37°C wurde die DNA-Vorlage durch die Zugabe von 2 µl DNase I (Roche, Schweiz) und eine weitere Inkubationszeit von 20 min bei 37°C zerstört. Danach wurde das Reaktionsvolumen mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) auf 100 µl erhöht und die RNA durch Zugabe von 10 µl 3M Na-Acetat, pH 4.8 und 300 µl Ethanol gefällt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Niederschlag in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte

eine Resuspension der RNA in 23 μ l DEPC-behandeltem Wasser. 2 μ l davon dienten der photometrischen Konzentrationsbestimmung, 1 μ l wurde auf einem Agarose-Gel auf Degradation überprüft. Für die WMISH mit Mäuseembryonen wurde die RNA-Sonde auf eine finale Konzentration von 100 ng/ μ l in DEPC-Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert. Für die WMISH mit Hühnerembryonen wurde die RNA in Hybridisierungsmix (siehe unten) auf 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 WMISH mit Mäuseembryonen

Durchführung

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT). Inkubationsschritte bei höheren Temperaturen wurden in einem Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Embryonen wurden in Glasgefäßen mit einem mit Teflon beschichteten Deckel behandelt. Die Protokollpunkte wurden sequenziell vollzogen.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Embryonen wurden durch eine MeOH/PBT-Reihe in reines PBT (0.1% Tween-20 in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4)) überführt: 75%, 50%, 25% MeOH/PBT für je 10 min, danach zweimal 10 min in PBT. Daraufhin erfolgte eine Bleichung der Embryonen in 6% H_2O_2 in PBT für eine Stunde bei RT. Die Embryonen wurden anschließend dreimal 5 min in PBT gewaschen. Sie wurden dann mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (Roche, Schweiz) in PBT für eine Dauer entsprechend ihres Entwicklungsstadiums behandelt (E8.5 for 1 min, E9.5 for 4 min, E10.5 for 7 min, E11.5 for 10 min). Danach erfolgte ein zweifacher Waschschrift in 2 mg/ml Glycin in PBT, jeweils 10 min bei RT. Die Embryonen wurden dreimal für 5 min mit PBT gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd in PBT für 20 min bei RT. Daraufhin wurde 1 ml Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 4.5), 50 $\mu\text{g/ml}$ Hefe tRNA, 1% SDS, 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin) zugegeben und für 5 min geschüttelt. Der Prähybridisierungspuffer wurde durch 2 ml frischen Prähybridisierungspuffer ersetzt, gefolgt durch eine Inkubation von zwei Stunden im Wasserbad bei 70°C . Nach dieser Prähybridisierungsinkubation wurde der Überstand durch 1-2 ml Prähybridisierungspuffer ersetzt, der 1 $\mu\text{g/ml}$ der RNA-Sonde enthält. Die Embryonen wurden so bei 70°C über Nacht inkubiert.

Post-Hybridisierung und Antikörper-Inkubation

Nach einer Entfernung des Hybridisierungsmixes wurden die Embryonen dreimal für 30 min in einer vorgewärmten Lösung I (50% Formamid, 5x SSC pH 4.5, 1% SDS, in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 70°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Nach drei Inkubationen in TNT (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.1 % Tween-20) für 5 min bei RT wurden die Embryonen zweimal 30 min mit 100 µg/ml RNase in TNT bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Embryonen nach einem kurzen Waschschrift für 5 min in TNT : Lösung II (1:1) bei RT dreimal für 30 min in Lösung II (50% Formamid, 2x SSC pH 4.5, 0.2% SDS, in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 65°C inkubiert. Parallel wurde die Antikörperlösung hergestellt. Hierzu wurden 1 mg Embryopuder (Trockensubstanz aus E10.5-E12.5 alten Mäuseembryonen) in ein 50 ml Gefäß eingewogen und 0.5 ml MAB/Block (s.u.) zugesetzt. Nach kurzem Vortexen wurde die Suspension für 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 5 µl Schafserum und 0.4 µl Anti-Dig-Peroxidase-Konjugat (Roche, Schweiz) wurde die Antikörperlösung für eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm wurde der unlösliche Teil der Lösung sedimentiert. Der Überstand wurde durch die Zugabe von 1% Schafserum in MAB/Block (2% Roche Blockingreagenz in 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 2 mM Levamisol, pH 7.5) auf 2 ml verdünnt. Der beschriebene Ansatz wurde für ein einzelnes Probengefäß eingesetzt, ein entsprechend größerer Ansatz bei höherem Bedarf. Nach der Inkubation in Lösung II wurden die Embryonen dreimal 5 min in MAB (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 2 mM Levamisol (Sigma, Deutschland) pH 7.5, frisch hergestellt) bei RT inkubiert. Bevor die Embryonen über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung unter leichtem Schwenken inkubiert wurden, wurden sie für 2-3h in MAB/Block bei RT präinkubiert.

Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden dreimal für 10 min bei RT in MAB gewaschen. Anschließend erfolgte eine stündliche Erneuerung der MAB-Lösung (über den ganzen Tag). Über Nacht wurden die Embryonen dann bei 4°C in MAB geschwenkt.

Färbereaktion und Lagerung

Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen dreimal 10 min bei RT mit NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) gespült. Die Färbereaktion erfolgte anschließend in BM-Purple (Roche, Schweiz), 2 mM Levamisol. Die Gefäße wurden dabei durch Aluminiumfolie vor Sonneneinstrahlung geschützt. Die Reaktion wurde solange

vollzogen, bis das Signal erkennbar war, maximal über Nacht. Gestoppt wurde die Färbereaktion durch dreimaliges Waschen in PBT, pH 4.5, jeweils für 5 min bei RT. Die Embryonen wurden entweder in dieser Lösung bei 4°C gelagert, in 80% Glycerin/PBT überführt und bei -80°C gelagert oder zur Anfertigung von Schnitten in 90% Methanol transferiert.

2.2.3 WMISH mit Hühnerembryonen

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Embryonen wurden durch eine MeOH/PBT-Reihe in PBT überführt: 75%, 50%, 25% MeOH/PBT für jeweils 10 min, danach zweimal für 10 min in PBT. Nach der Rehydrierung wurden die Embryonen in eine kleine Petrischale gegeben und der Überstand durch Proteinase K-Lösung ausgetauscht (5 µg/ml in PBT). Die Dauer dieser Behandlung hing vom Alter der Embryonen ab (für HH Stadium 4-8 ungefähr 4-5 min, für HH Stadium 9-13 ca. 10 min, bei älteren Embryonen wurde die Inkubationszeit um eine Minute pro HH Stadium verlängert). Die Embryonen wurden dann mit TEA-Puffer (0.1 M TEA, pH 8) dreimal für je 2 min gespült. Danach wurde der Überstand entfernt und durch jeweils 5 ml TEA-Puffer ersetzt, der 15 µl Essigsäure-Anhydrid enthielt (Essigsäure-Anhydrid wurde durch gründliches Schütteln aufgelöst). In dieser Acetylierungslösung wurden die Embryonen unter leichtem Schwenken für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl Essigsäure-Anhydrid wurden die Embryonen für weitere 5 min geschwenkt. Den Petri-Schalen wurden jeweils 50 µl 10% Tween-20, 500 µl 1 M TEA, pH 8, und 15 µl Essigsäure-Anhydrid zugesetzt, gefolgt von einer weiteren 5 minütigen Inkubation. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Embryonen mit 500 µl 1 M TEA gespült. Daraufhin wurden sie 4 mal für je 2 min mit PBT gewaschen. Es erfolgte eine Fixierung in 4% PFA in PBT für 30 min bei RT (die weiteren Protokollpunkte wurden wieder in den Glasgefäßen mit Teflon-beschichteten Deckeln vollzogen). Die Embryonen wurden zweimal kurz mit PBT gespült und dann 5 min in 100 mM Glycin geschwenkt. Nach dreifachem kurzen Waschen in PBT wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und durch 2 ml Hybridisierungsmix (50% Formamid, 5x SSC, 1 mg/ml Heparin, 1x Denhardt's solution (Eppendorf, Deutschland), 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 5 mM EDTA) ersetzt. Die Embryonen wurden solange im Hybridisierungsmix inkubiert, bis sie sich in diesem abgesetzt hatten (dies konnte je nach Größe bis zu 45 min dauern).

Anschließend wurde die oberste Schicht der Flüssigkeit entfernt (zurückbleibendes PBT) und die Gefäße 10 min auf dem Schüttler geschwenkt. Der Überstand wurde durch 2 ml frischen

Hybridisierungsmix ersetzt und die Embryonen für 4 Stunden bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dieser Präinkubation wurden die Gefäße für 5 min bei RT gekühlt. Der Überstand wurde dann durch 1.5 ml Hybridisierungsmix ersetzt, der 30 µl der oben beschriebenen Sonden-Stammlösung enthielt. Die Embryonen wurden so bei 65°C über Nacht im Wasserbad inkubiert.

Posthybridisierungs-Waschschritte und Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden unter folgenden Bedingungen in FSC (50% Formamid, 2x SSC, 0.1% CHAPS, 50 mM Glycin, pH 7.2) gewaschen: Einmal kurz bei RT, einmal 10 min auf dem Schüttler bei RT, einmal 20 min bei 65°C im Wasserbad, einmal 2 Std. bei 65°C im Wasserbad und einmal 4 Std. bei 65°C im Wasserbad. Danach erfolgten zwei Waschschritte in PBT.3 (0.3% Triton-X 100 in PBS) bei RT auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Embryonen für 1 Std. in BR/PBT.3 (2% w/v Blocking Reagenz (Roche, Schweiz) in PBT.3) bei RT auf dem Schüttler präinkubiert. BR/PBT.3 wurde dann entfernt und durch BR/PBT.3 ersetzt, der Anti-dig-AP Konjugat enthielt (1:2000). In dieser Lösung wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C geschwenkt.

Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion

Die Embryonen wurden am darauf folgenden Morgen zweimal bei RT in PBT.3 gespült. Anschließend wurden sie dreimal für je 20 min in PBT.5 (0.5% Triton-X100 in PBS) unter Schwenken gewaschen. Danach wurden die Embryonen zweimal für je 15 min in CT.3 (100mM Tris/HCl, pH 9.5, 150mM NaCl, 25 mM MgCl₂, 0.3% Triton-X 100) behandelt. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und durch 3 ml Färbelösung ersetzt (14 µl BCIP und 18 µl NBT (beide Roche, Schweiz) in 1 ml PVA/CT (10 % PVA, 100mM Tris/HCl, pH 9.5, 150mM NaCl, 25 mM MgCl₂)). Die Gefäße wurden mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt und so lange auf dem Schüttler inkubiert, bis die Embryonen eine ausreichende Färbung zeigten. Die Färbereaktion wurde durch kurzes Spülen in TE-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Embryonen für 30 min in MEMFA (0.1 M MOPS, pH7.2, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% Formaldehyd) bei RT fixiert. Nach zweiminütigem Spülen in 0.9% NaCl wurden die Embryonen dann in 90% Methanol überführt und so bei -20°C gelagert.

2.3 *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten (ISH)

In situ-Hybridisierung auf Gewebeschnitten wurde mit einem Robotor-unterstützten High throughput-Verfahren durchgeführt (Herzig et al., 2001).

Nach Fixierung für 2 Std. bei 4°C in PFA wurden jüngere Embryonen (bei Mäusen bis zu embryonalen Tag 10.5 (E10.5), bei Hühnerembryonen bis zu HH Stadium 24) über eine Ethanol-Reihe in Benzol überführt: 70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH, 96% EtOH, 100% EtOH, EtOH/Benzol (1:1) und 100% Benzol. Jeder Dehydrierungsschritt wurde für 5 min bei RT vollzogen. Final wurden die Embryonen in Paraffin überführt, je dreimal 5 min bei 61°C, und anschließend in eine geeignete Einbettungsform gegossen. Am darauffolgenden Tag wurden dann 10 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Leica, Deutschland) angefertigt, die dann entweder nach einer Entparaffinierung direkt für die ISH eingesetzt wurden oder bei 4°C gelagert werden konnten. Ältere Embryonen und Gehirngewebe wurden nach der Präparation direct in OCT (Sakura Finetec, Niederlande) eingebettet und eingefroren. Das Gewebe wurde dann mit einem Kryotom (Leica, Deutschland) mit einer Dicke von 20 µm geschnitten und bei -80°C gelagert. Nach Rehydrierung der Paraffin-Schnitte (oder Auftauen der Gefrier-Schnitte) wurde das Gewebe zweimal für 5 min in 0.25% Essigsäure-Anhydrid, 0.1 M Triethanolamin, pH 8.0, acetyliert. Anschließend wurden die Schnitte in der automatisierten ISH eingesetzt. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die Prozedur gegeben werden.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die in der Durchflusskammer eingespannten Gewebeschnitte wurde zuerst 6 mal für 5 min mit 0.6% Wasserstoffperoxid in Methanol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 6 mal mit PBT (0.05% Tween-20 in PBS) gespült (als Inkubationsvolumen wurden generell 300 µl eingesetzt). Die Schnitte wurden mit 0.05% Tween-20 in 0.2 N HCl behandelt, gefolgt von einem Waschschrift in PBT. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte 7 min lang mit Proteinase K-Puffer behandelt (die Proteinase K-Konzentration richtete sich hierbei nach der Beschaffenheit des behandelten Gewebes, bei embryonalem Gewebe z.B. 2 µg/ml; Proteinase K-Puffer: 0,05% Tween-20, 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH 8.0). Danach wurde 6 mal mit PBT gespült. Anschließend wurde das Gewebe zweimal für 10 min mit 4%PFA in PBT fixiert, gefolgt von 6 Waschschriften in PBT. Hieran schloss sich eine Präinkubation in Hybridisierungspuffer (Ambion, USA) für 30 min bei 65°C an. Final wurden die Schnitte über Nacht bei 60°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, der die RNA-Sonde (s.o.) in einer Konzentration von 100 ng/ml enthielt.

Posthybridisierungs-Waschschritte und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurde die unspezifisch gebundene Sonde durch jeweils 5 Inkubationen für 6 min bei 65°C mit Waschlösungen steigender Stringenz entfernt: 1. 5 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat, pH 7), 2. 1 x SSC, 3. 0.5 x SSC und final 0.1 x SSC, jeweils in 50% Formamid. Danach wurden die Schnitte mit 250 µl NTE gewaschen (0,05% Tween 20, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,6), gefolgt von 2 Inkubationsschritten in 20 mM Iodoacetamid in NTE für je 5 min bei RT (im weiteren Verlauf reduzieren sich die Inkubationsvolumina auf 250 µl). Die Kammern wurden dreimal mit NTE gespült. Die Gewebeschnitte wurden dann zweimal 30 min in Hitze-inaktiviertem Schafserum in TNT-Puffer (0,05% Tween 20 in 100 mM Tris/150mM NaCl, pH 7.6) inkubiert. Anschließend wurden die Kammern 8 mal mit NTE gespült. Nach zwei Inkubationen für 30 min in TNB blocking-Puffer (0,05% Tween 20 in 100mM Tris/150mM NaCl, 0.5% Blocking-Reagenz (PerkinElmer Lifesciences, USA), pH 7.6) (der TNB blocking-Puffer wurde vorher durch Filtrieren von festen Bestandteilen gereinigt), wurden die Kammern zweimal für 45 min mit Roche Anti-Dig-POD (verdünnt in TNB blocking-Puffer (1:500)) versetzt. Anschließend wurden die Schnitte 8 mal für 5 min mit TNT-Lösung gewaschen. Die Kammern wurden zweimal für 30 min bei RT mit Tyramide-Biotin (T/B) versetzt (T/B wurde für die anschließende Verwendung der Tyramid Signal Amplifikation (TSA, PerkinElmer Lifesciences) in NEN Amplifikations-Verdünnungs-Puffer verdünnt). Nach 8 Waschschritten in Maleat Wasch-Puffer (MWB) (100 mM Maleate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,5) wurden die Schnitte final zweimal 30 min mit Neutravidin-AP-Konjugat (Pierce, USA) inkubiert (1:600 Verdünnung in 1% Blocking-Reagenz (Roche, Schweiz) in MWB).

Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion

Ungebundener Antikörper wurde durch 8 Waschschritte mit MWB entfernt. Anschließend wurden die Schnitte durch 2 Inkubationen in TNT äquilibriert. Zur Färbung wurden die Kammern 3 mal 20 min lang mit Färbelösung versehen (BCIP (1:250), NBT (1:200) (beide Roche, Schweiz), 0.6 µg/ml Levamisol in TMN). Bei Bedarf wurde die Färbereaktion verlängert. Anschließend wurden sie 4 mal mit 0.05% Tween-20 in Wasser gespült, gefolgt von zwei Inkubationen in TNT. Die gefärbten Schnitte wurden mit 4%PFA/0.5%Glutardialdehyd in PBT für 20 min fixiert. Nach jeweils 4 Waschschritten in PBT und Wasser wurden die Objektträger dann aus den Durchflusskammern entfernt und über Nacht getrocknet. Zur Analyse und Lagerung wurden sie dann mit Wasser-basierendem Eindeckmedium eingedeckelt.

2.4 Mikromanipulationen am Hühnerembryo

Das paraxiale Mesoderm von HH Stadium 10 Hühnerembryonen wurde vom Neuralrohr und der *Chorda dorsalis* mittels einer elektrolytisch gespitzten Wolfram-Nadel getrennt. Nach einer anschließenden Inkubation von 12 bis 16 Std. wurden die Embryonen gesammelt und in der WMISH eingesetzt.

2.5 Retrovirale Überexpression im Hühnerembryo

Die vollständige-cDNA Sequenz von *cCPZ* und *cCPZ^{E469Q}* (s.u.) wurde über den Shuttle-Vektor pslax-13 in das Provirus RCAS-BPA eingefügt. Die Klonierung, Virusproduktion sowie die Aufreinigung des Virus' erfolgte wie beschrieben (Logan & Tabin, 1998). Die Viren wurden Hühnerembryonen im HH Stadium 10-12 in das präsomitische Mesoderm auf axialer Höhe der zukünftigen Flügelanlage (Chaube, 1959) injiziert. Die Embryonen wurden dann nach angegebenen Intervallen gesammelt (siehe Kapitel 3) und für die WMISH oder Skelettpräparationen eingesetzt.

2.6 Skelettpräparationen von Hühnerembryonen

Hühnerembryonen wurden am 10. Tag der Embryonalentwicklung gesammelt und in 5% TCA fixiert. Die Knorpelfärbung erfolgte mit 0.1% Alcian Blau in 1% HCl/70% EtOH über Nacht. Unspezifisch gebundener Farbstoff wurde durch mehrtägiges Waschen in 1% HCl/70% EtOH entfernt. Anschließend wurden die Embryonen in 100% EtOH über einen Zeitraum von 2 Tagen dehydriert (Ethanol wurde hierzu mehrfach erneuert). Die Visualisierung des Skelettes erfolgte dann durch Klärung des Embryonen in Methylsalicylat. Die Skelettpräparationen mit Mäusen wurde durchgeführt wie beschrieben (Mallo & Brandlin, 1997).

2.7 Gerichtete Mutagenese

Gerichtete Mutagenese wurde eingesetzt, um in die cDNA-Sequenzen von CPZ aus der Maus und aus dem Huhn Punktmutationen einzufügen, die bei der Proteinsynthese zu einer Aminosäuresubstitution führten. Die Mutagenese erfolgte unter Verwendung des QuikChange site directed mutagenesis Kits (Stratagene, USA) entsprechend den Herstellerangaben. In *cCPZ* wurde die Nukleotidsubstitution G1405 zu C eingefügt. Dies führte zu dem Austausch der Aminosäure Glu469 zu Gln.

Primer:

5'GCTTTGAAGTTACTGTGCAGGTAGGATGTG3',
 5'CACATCCTACCTGCACAGTAACTTCAAAGC3'.

Die entsprechende Substitution wurde auch in CPZ aus der Maus (s.u.) mit Hilfe folgender Primer eingefügt:

5'GCTTTGAGATCACCGTGCAACTGGGCTGTGTGAAGTTC3',
 5'GAACTTCACACAGCCCAGTTGCACGGTGATCTCAAAGC3'.

Dieser Basenaustausch resultierte in der Substitution von Glu477 durch Gln.

2.8 Isolierung der vollständigen cDNA-Sequenz von CPZ aus der Maus

PCR Reaktionsansatz

2 µl cDNA
5 µl 10x Pfx-buffer (Invitrogen, USA)
5 µl Enhancer-Lösung (Invitrogen, USA)
1.5 µl Forward-Primer (10 µM)
1.5 µl Reverse-Primer (10 µM)
1.5 µl dNTP-Mix (Roche, Schweiz)
1 µl MgSO ₄ (50mM)
0.5 µl Platinum Pfx Polymerase (Invitrogen, USA)
<u>32 µl H₂O</u>
Σ = 50 µl

PCR-Programm

Denaturierung	95°C	2 min
Amplifikation (35 Zyklen)	95°C	45 sec
	55°C-65°C	45 sec
	68°C	{(Länge PCR-Produkt)/1000}* min
Finale Verlängerung	68°C	10 min
	4°C	∞

Durchführung

Die gesamte RNA aus zwei E10.5 Mäuseembryonen wurde mit Hilfe von RNazol B (WAK Chemie, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Diese RNA diente als Vorlage für die cDNA-Synthese mit der Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Die reverse Transkription wurde wie dort angegeben durchgeführt. Ein internes 300 bp-Fragment der murinen cDNA-Sequenz wurde mit zwei degenerierten Primern

amplifiziert, die gegen den entsprechenden Bereich der humanen sowie Ratten-cDNA-Sequenz gerichtet waren (Song & Fricker, 1997; Xin et al., 1998a),

(5'CCCAGTACCTGTGCTC(C/T)GAGT3'; 5'CCGAATTTCTCTGTCACC(A/T)CAC3').

Durch RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) wurden dann mit diesem 300 bp Fragment als Ausgangssequenz der fehlende 3'-Bereich sowie weite Teile des 5'-Endes der cDNA Sequenz isoliert. Verwendet wurde hierzu das SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA). Das noch fehlende 5'-Ende wurde durch RT-PCR mit Hilfe eines degenerierten Forward-Primers amplifiziert, der gegen die 5'-Ende der humanen und Ratten Sequenz gerichtet war:

(5'CCCACCATGCC(A/G/C/T)(A/G/C/T)C(A/G/C/T)(A/G/C/T)CGCCGCTGCTGCTG(A/G/C/T)3'
5'GAAGGGGTAGGATACCACCAGGTCGCC3').

Die so isolierte cDNA ist unter dem Genbank-Eintrag AF356844 zu finden.

2.9 Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien

HEK-293 Zellen wurden mit Hilfe des Effectene Transfektionsreagenzes (Qiagen, Deutschland) nach einem Standardprotokoll mit linearisierten CPZ-Konstrukten transfiziert. Diese Konstrukte enthielten die vollständige cDNA-Sequenz der CPZ aus der Maus, entweder in der nativen Form oder mit der oben beschriebenen Punktmutation. Als Vektor diente pcDNA3.1/myc-HisA. Dieser verfügt über einen in eukaryotischen Zellen konstitutiv aktivierten CMV-Promotor und fügt den cDNA-Sequenzen C-terminal einen myc- und einen His-Tag an. Mithilfe des myc-Tags wurde die Expression von CPZ überprüft. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeteilt und von nun an in Selektionsmedium in 6-Loch-Zellkulturplatten gehalten (DMEM (Gibco), 10% FCS, and 1 mg/ml Geneticin (G418)). Wenn die so selektionierten Zellen eine hinreichende Konfluenz erreicht hatten, wurden sie aufgeteilt und anschließend mittels Western Blot-Analyse auf Expression von CPZ hin überprüft. Hierzu wurden Zelllysate auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und dann elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem Maus-anti-myc-Antikörper (Invitrogen, USA) und Meerrettich-Peroxidase-Anti Maus-Konjugat (Jackson Immunoresearch, USA) als Sekundär-Antikörper. Die Visualisierung wurde mit Hilfe des Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrats (Pierce, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis von CPZ im Zellmedium sowie in der extrazellulären Matrix (ECM) erfolgte wie beschrieben (Novikova et al., 2000).

2.10 Cokultivierungstest zur Detektion von Wnt-Aktivität

2.10.1 Cokultivierung

Folgendes Protokoll zur Cokultivierung wurde etabliert: CPZ-exprimierende HEK-293-Zellen oder normale HEK-293 Zellen wurden einen Tag vor Experimentbeginn konfluent in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag des Experimentes wurden diese Zellen dann mit 1mM EDTA in PBS von den Schalen gelöst. Die so behandelten Zellkulturschalen waren so mit einer ECM beschichtet, die entweder CPZ enthielt oder der Wildtyp HEK-293-ECM entsprach. Auf diese konditionierten Schalen wurden entweder CPZ exprimierende oder normale HEK-293-Zellen zusammen mit 3T3-Zellen gesät, die mit verschiedenen Wnt Molekülen stabil transfiziert waren (Kispert et al., 1998). Insgesamt wurde in jede Schale eine Gesamtzahl von $3 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät, um eine konfluente Bedeckung der Zellkulturschale zu erreichen, die Wnt- bzw. CPZ-exprimierenden Zellen wurden im Verhältnis 1:1 ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 4 – 6 Std. zur Adhäsion wurden murine ES Zellen wie beschrieben (Lickert et al., 2000) auf diese Feeder-Zellen gegeben. Abhängig von der Wnt-exprimierenden Zelllinie, die verwendet worden war, und dem Alter der ES Zellen wurden die Zellen 6 – 12 Std. cokultiviert. Die Induktion wurde durch Präparation der RNA aus der gesamten Zellpopulation gestoppt (s.u.).

2.10.2 Präparation von RNA aus Zellen

Nach hinreichender Cokultivierung wurden die Zellen zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Nach gründlicher Entfernung des Überstandes wurde auf jede Schale 1.2 ml RNazol B (WAK Chemie, Deutschland) gegeben und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Das Lysat wurde in ein RNase freies Eppendorfgefäß transferiert und nach Zugabe von 120 µl Chloroform kräftig geschüttelt und für 5 min auf Eis gekühlt. Die wässrige Phase (15 min, 13000 rpm) wurde in ein neues Gefäß gegeben, in das 660 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Durch 15 minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde dann die RNA gefällt. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 75% EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in 87 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit 1 µl dieser Lösung bestimmt; der Rest wurde durch Zugabe von 10 µl 10 x PCR-Puffer, 2 µl RNase Inhibitor (40U/µl) und 2 µl DNase I (RNase frei) und eine 30 minütige Inkubation bei 37°C von restlicher genomischer DNA befreit. Der Reaktionsansatz wurde dann mit Wasser auf 250 µl verdünnt. Die RNA wurde dann mit 250µl PIC (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) ausgeschüttelt, mit Chloroform von Phenolresten

befreit und dann durch Zugabe von 6,25 µl 3 M NaOAc und 750 µl Ethanol gefällt. Nach einem erneuten Waschschrift mit 75% EtOH wurde die RNA final zu einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-H₂O aufgenommen. Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter 2.8 beschrieben.

2.10.3 Quantitative RT-PCR (Q-PCR)

Um das Niveau der *Cdx1*-Induktion zu detektieren, wurden die Transkripte mittels PCR wie beschrieben quantifiziert (iCycler real-time PCR system, BIO-RAD) (Fruman et al., 2002). Das Haushalts-Gen *elongation factor 1 alpha (EF1a)* wurde verwendet, um die cDNA-Mengen zu normalisieren. Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) einem Standardprotokoll entsprechend angesetzt.

Primer:

EF1α-Forward 5'GTCCCCAGGACACAGAGACTTCA3'

EF1α-Reverse 5'AATTCACCAACACCAGCAGCAA3'

Cdx1-Forward 5'TACAGCCGGTACATCACTAT CCG3'

Cdx1-Reverse 5'CTGTTTCTTCTTGTTTACTTTGCGC3'

PCR-Reaktionsansatz

5 µl cDNA (1: 5 Verdünnung der cDNA-Stammlösung, s.o.)
 5 µl Primer-Mix (1.4 µM von Forward- und Reverse-Primer)
10 µl Sybr-Mix
 Σ= 20 µl

Um Abweichungen durch Pipettierfehler zu verringern, wurden die Reaktionsansätze durch Verwendung eines Mastermixes, der die Primer und den SYBR Green-Mix enthielt, vereinheitlicht. Dieser wurde dann auf die vorgelegte cDNA gegeben.

PCR-Programm

Denaturierung (3 mal)	94°C	3 min
Amplifikation (45 Zyklen)	94°C	30 sec
	60.8°C	30 sec
	72°C	30 sec
Denaturation	95°C	1 min
Temperatur-Rampe (90 mal)	50-95°C	10 sec, nach jedem Zyklus + 0.5°C
Final	4°C	

Die anfängliche Denaturierung reichte aus, um die hot-start-Taq-Polymerase des SYBR Green-Mixes zu aktivieren. Die DNA-Konzentration wurde während der Amplifikation und des Temperatur-Gradienten detektiert. Die Schmelzkurve der PCR-Produkte (Resultat des Temperatur-Gradienten) diente dazu, Reaktionen mit mehr als einem PCR-Produkt auszuschließen (in den beschriebenen Experimenten nicht der Fall).

Um statistische Abweichungen in den Cokultivierungs-Experimenten zu minimieren, wurde jede Cokultivierungs-Kombination als Duplikat angesetzt. Von jeder dieser beiden Gewebekulturschalen wurden dann zwei verschiedene cDNA-Stammlösungen angesetzt, die als Template für je zwei Q-PCR Experimente dienten. In jedem dieser Q-PCR-Experimente wurde jede PCR-Reaktion als Triplikat angesetzt (d.h. von jeder Cokultivierungskombination wurden insgesamt 24 Q-PCR Reaktionen angefertigt).

Das *Cdx1*-Expressionsniveau wurde durch das entsprechende *EFla*-Expressionsniveau normalisiert. Hierzu wurde für jedes der beiden Gene eine Verdünnungsreihe mit der gleichen Standard-cDNA-Stammlösung benutzt, um das jeweilige absolute Expressionsniveau zu bestimmen (für gewöhnlich wurde die cDNA-Stammlösung für die Verdünnungsreihe verwendet, von der die höchste *Cdx1*-Expression erwartet wurde. So wurde verhindert, dass die ermittelten Transkript-Konzentrationen ausserhalb der Werte der Verdünnungsreihe lagen). Sämtliche Reaktionen für einen PCR-Lauf wurden auf einer 96-Loch-Platte pipettiert. Die *Cdx1*-Expression in den experimentellen Ansätzen wurde mit dem basalen *Cdx1*-Expressionsniveau verglichen, welches in einem Kontrollansatz mit LacZ-exprimierenden NIH-3T3- und untransfizierten HEK-293-Zellen detektiert wurde (Lickert et al., 2000).

2.11 Immunopräzipitation

Einen Tag vor der Transfektion wurden $2.4 \cdot 10^6$ HEK-293 Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Diese Zellen wurden dann mit 4 µg eines Plasmidgemisches unter Zuhilfenahme des Effectene Reagenzes (Qiagen, Deutschland) entsprechend des vom Hersteller angegebenen Protokolls transfiziert. Das Plasmidgemisch enthielt 2.4 µg des Konstruktes pcDNA3.1-Wnt4-HA (Lescher et al., 1998) und 1.6 µg des zu untersuchenden Plasmides, entweder die Positivkontrolle pcDNA3.1-sFRP2-myc (Lescher et al., 1998) oder eines der im Ergebnisteil beschriebenen CPZ-Konstrukte. 24 Std. nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium erneuert. 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen und nach Zugabe von 350 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 50 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholat, 0.1% SDS) mit einem Spatel von der Schale getrennt und in ein Eppendorfgefäß gegeben (nach Zugabe des Lysis-Puffers wurden alle weiteren Schritte im 4°C-Raum auf Eis durchgeführt). Die Zellen wurden dann durch mehrmaliges Pressen erst durch eine 20 gauge-Spritze und dann durch eine 26 gauge-Spritze solange aufgeschlossen, bis die anfängliche Viskosität gewichen war. Das Lysat wurde dann 1 Std. auf Eis inkubiert und alle 10 min für 10 sec gevortext. Anschließend wurden ungelöste Zelltrümmer durch Zentrifugation vom Lysat getrennt (13000 rpm, 10 min, 4°C). Vom Überstand wurde dann ein Aliquot von 20 µl zur Western Blot-Analyse entnommen. Dem restlichen Lysat wurde monoklonaler Maus Anti-HA Antikörper (Babco, USA) in einer Verdünnung von 1:150 zugegeben und bei 4°C 6-8 Std. rotiert. Dann wurde 50 µl Protein-G-Agarose (Roche, Schweiz) zugegeben, die zuvor in Lysis-Puffer äquilibriert worden war. Das Lysat wurde anschließend bei 4°C über Nacht rotiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Protein-G-Agarose dreimal mit je 1 ml Lysis-Puffer gewaschen und nach kompletter Entnahme des flüssigen Überstandes in 30 µl SDS-Gel-Ladepuffer (0.1 M Tris, pH 8.9, 4% SDS, 2 mM EDTA, 0.1% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) Glycerin, 0.25 M DTT) für 10 min gekocht. Ungefähr die Hälfte dieses Volumens wurde auf einem 15% SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt (zusammen mit den zuvor entnommenen Aliquoten des unbehandelten Lysats). Die Proteine wurden dann elektrophoretisch auf eine Hybond C Extra Membran (Amersham, UK) übertragen. Die Membran wurde für 1 Std. bei RT in 5% Magermilchpulver in TBST (0.1% Tween-20 in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) vorinkubiert, anschließend 3 mal 10 min mit TBST gewaschen und dann mit monoklonalem Maus-anti-myc-Antikörper (Invitrogen, USA) in einer Verdünnung von 1:5000 für 1 Std. inkubiert. Nach 6 Waschschritten für je 5 min in TBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, Meerrettich Peroxidase-Anti-Maus-Konjugat (Jackson ImmunoResearch, USA) in einer Verdünnung von 1:20000. Nach weiteren 6 Waschschritten für je 5 min mit TBST wurden die Proteine visualisiert mit Hilfe des Supersignal West Piko

Maximum Sensitivity Substrates (bei den präzipitierten Proteinen) oder mit Hilfe des Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrates (bei den Lysaten und Überständen) (beide Pierce, USA).

2.12 Isolierung und Charakterisierung des murinen CPZ Genlokus

Eine genomische Maus-Cosmid-Filterbibliothek (Library 129/ola mouse cosmid, RZPD, Deutschland) wurde mit dem initialen 300 bp-Fragment der murinen CPZ-cDNA (siehe 2.8) getestet. Von den 8 detektierten Cosmid-Klonen erwies sich nur einer in einem Southern-Blot (siehe unten), getestet mit der CPZ-cDNA, als positiv. Dieser Klon, als MPM-6c121-E08689-Q4 bezeichnet, wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* verdaut. Die resultierenden Restriktionsfragmente wurden in den entsprechend verdauten Vektor pBluescript SK II + (Stratagene, USA) subkloniert. Diese Konstrukte wurden via Southern-Blot-Hybridisierung und anschließender Sequenzierung der Inserts analysiert. Hierbei kamen Primer zum Einsatz, die gegen unterschiedliche Bereiche der CPZ-cDNA-Sequenz gerichtet waren. Mit Hilfe dieser Informationen wurde dann eine Restriktionskarte des CPZ-Genlokus erstellt. Aufgrund des Restriktionsmusters des Lokus wurde das 5'-Ende der genomischen Sequenz nicht subkloniert (sowohl *EcoRI* als auch *HindIII* haben keine Schnittstelle in den ersten 13 kb). Das fehlende 5'-Ende wurde daher mittels eines Doppelverdaus mit *EcoRI* und *HindIII* und anschließender Subklonierung in den entsprechend präparierten Vektor pBluescript SK II + isoliert. Dieses Konstrukt, als Eco/Hind-HMW-69 bezeichnet, enthielt ca. 10 kb des CPZ-Genlokus, beginnend ungefähr 1 kb vor dem 2. Exon und 700 bp nach dem 7. Exon endend und diente als Ausgangspunkt für die Herstellung des Targetingvektors (s.u.) (die ersten 300 bp des Inserts von Eco/Hind-69 bestanden aus Cosmid-Sequenz; das 1. Exon und die benachbarten Intron-Bereiche waren nicht Bestandteil der Cosmid-Inserts). Folgende Primer wurden für die Analyse des Cosmid-Klons MPM-6c121-E08689-Q4 verwendet:

Shotgun1	5'GCCGCTGCTGCTGGCCGCGCTGGC3'
Shotgun2	5'GGCCTTTGCCGCCATCGACATGGC3'
Shotgun3	5'AGGCCAGCATGAACTGATGGAGCC3'
Shotgun4	5'GCCATCATGAAGGGCATAACAGACC3'
Shotgun5	5'GGCGGCGACCTGGTGGTATCCTAC3'
Shotgun6	5'GGAGACTTCTTCCCCGGGTTCCC3'
Shotgun6rev	5'GGGAACCCGGGGGAAGAAGTCTCC3'
Shotgun2rev	5'GCCATGTCGATGGCGGCAAAGGCC3'
Shotgun2b	5'GGAGAGCTGGATGTTGAGGAGGCC3'
Shotgun2c	5'TTCATGCTGGCCTGGGCGGCTCGAG3'

2.13 Herstellung des Targetingvektors

Der Shotgun-Klon *Eco/Hind-HMW-69* diente als Ausgangskonstrukt für die Herstellung des Targetingvektors. In einem ersten Schritt wurde durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NheI* die ersten 1.4 kb der Insertsequenz entfernt. Anschließend erfolgt nach Abbau der Restriktionsüberhänge mit dem Klenow-Fragment eine Religation (das resultierende Konstrukt wurde als *Eco/Hind-69-Eco/Nhe-Del* benannt). Das entfernte 1.4 kb-Fragment diente im Weiteren als Sonde, um den durch den Targetingvektor ins Genom eingefügten Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) zu detektieren. Nach dieser Deletion wurde in die *AgeI*-Schnittstelle des 3. Exons ein Oligonukleotidlinker eingefügt

(Linker-Sequenz: 5'CCGGCGAGGGATCCGCGGCCGCGGATCCCTCG3'). Dies erfolgte über den entsprechenden Restriktionsverdau des Konstruktes *Eco/Hind-69-Eco/Nhe-Del* und eine Ligation mit dem doppelsträngigen Primer nach Standardprotokoll. Der beschriebene Oligonukleotid-Linker fügte so in die Exon-Sequenz eine *NotI*-Schnittstelle ein, die von zwei *BamHI*-Schnittstellen benachbart sein sollte. Die *NotI*-Schnittstelle war hierbei für die nachfolgende Insertion der Selektionskassette vorgesehen, die *BamHI*-Schnittstellen sollten später zur Detektion des RFLP dienen. Durch einen Synthese-Fehler bei der Produktion des Oligonukleotids (MWG-Biotech, Deutschland) wurde allerdings nur eine einzelne *BamHI*-Schnittstelle 3' zur *NotI*-Schnittstelle in die Linker-Sequenz eingefügt. Bei erfolgreicher Insertion des Targetingvektors führte dies bei einem *BamHI*-Verdau der genomischen DNA und anschließender Souther-Blot Analyse mit dem oben beschriebenen 1.4 kb-Fragment zu einer Verlängerung des endogenen 3 kb-Fragments um die Länge der in die *NotI*-Schnittstelle insertierten Kassette (in dem beschriebenen Fall kam es zu einer Vergrößerung des endogenen Fragments um ca. 5 kb). Mit Hilfe der *NotI*-Schnittstelle wurde eine LacZ-Kassette in den Targetingvektor eingefügt. Diese LacZ-Kassette bestand sequentiell aus einem IRES-Element (*internal ribosomal entry site*), der bakteriellen β -Galactosidase cDNA (LacZ), einem PolyA-Signal und einem Neomycin-Resistenzgen (die beschriebene LacZ-Kassette wurde freundlicherweise von M. Leitges und A. Kispert zur Verfügung gestellt). In dieser LacZ-Kassette war die Neomycin-Resistenz von zwei *LoxP*-Rekombinase-Erkennungsstellen flankiert, die anschließend eine Deletion der Neomycin-Sequenz ermöglichte. Die so entstandenen Konstrukte wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf die richtige Orientierung des Inserts getestet. In der anschließenden Elektroporation zur Integration des Targetingvektors in das Genom der ES-Zellen kam das Konstrukt CPZ-LacZ-16 zum Einsatz.

2.14 Herstellung der rekombinanten embryonalen Stammzellen

2.14.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Embryonale Fibroblasten sowie ES-Zellen wurden bei gesättigter Luftfeuchtigkeit bei 37°C, 10% CO₂ in modifiziertem DMEM gehalten (15% FCS, 6*10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol, 1x MEM-nicht essentielle Aminosäuren, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM, Gibco). Die verwendete ES-Zelllinie ist ein Subklon der E14-Zelllinie (Hooper et al., 1987). Im allgemeinen wurden die ES-Zellen auf einem konfluenten Monolayer von wachstumsinhibierten embryonalen Fibroblasten in 6 cm Zellkulturschalen gehalten. Das Medium wurde jeden Tag erneuert und die Zellen alle 2-3 Tage aufgeteilt. Sowohl das Aufteilen als auch das Einfrieren und Auftauen der ES-Zellen wurde nach Standardverfahren vollzogen, mit der Ausnahme, dass der Trypsinisierungs-Schritt auf 10 min ausgedehnt wurde, um die ES-Zellen ausreichend zu vereinzeln.

2.14.2 Gewinnung und Wachstums-Inhibierung von embryonalen Fibroblasten

Embryonen einer Neomycin-resistenten Mauslinie wurden bei E14.5 aus dem Uterus präpariert. Nach der Entfernung des Kopfes und der Eingeweide wurde das restliche Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Zellen durch 30 minütiges Rühren bei RT mit Glaskugeln in Trypsin-Lösung vereinzelt. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Kulturmedium inaktiviert und die Zellsuspension auf 15 cm durchmessende gelatinisierte Gewebekulturschalen kultiviert. Konfluente Schalen wurden vor ihrem Einsatz als Feeder-Zellen in der ES-Zellkultur durch 2-3 stündige Behandlung mit Mitomycin-Lösung (13 µg/ml Zellkulturmedium) wachstumsinhibiert. Das Mitomycin wurde anschließend durch zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt. Die embryonalen Fibroblasten konnten dann nach Bedarf gesplittet werden.

2.14.3 Transfektion, Selektion und Isolierung von rekombinanten ES-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden die ES-Zellen passagiert. 3-4 Std vor der Elektroporation wurde das Kulturmedium erneuert. Zellen einer 6 cm-Schale wurden wie beschrieben vereinzelt (ca. 1*10⁷ Zellen) und in 800 µl PBS mit 10 µg linearisiertem Targetingvektor aufgenommen. Die Transfektion erfolgte in 0.4 cm-Elektroporationsküvetten bei einem elektronischen Puls von 250 V bei 500 µF mit einem Biorad Elektroporator. Die Zellen wurden dann in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und nach einer Inkubation bei RT für 5 min in fünf 10cm-Kulturschalen ausgesät (die Schalen waren mit einem Monolayer aus embryonalen Fibroblasten versehen). Nach 24 Std. Kultivierung wurde das Medium durch

Selektionsmedium ersetzt (150 µg/ml Geneticin in modifiziertem DMEM). Dies führte zu einer Selektion der Zellen, die den Targetingvektor in ihr Genom integriert hatten, und durch das so eingefügte Neomycin-Gen das Geneticin abbauen konnten. Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen, wobei täglich das Medium erneuert wurde. Im Anschluß wurden dann die gebildeten ES-Zellklone gepickt, mit Trypsin vereinzelt und über 2-3 Tage bis zu einer Konfluenz von ca. 70% in 96-Loch-Zellkulturplatten expandiert. Die so expandierten ES-Zellkolonien wurden dann zur Hälfte kryokonserviert. Die andere Hälfte wurde zur DNA-Präparation mit anschließendem Test auf homologe Insertion des Targetingvektors verwendet (s.u.).

2.14.4 Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen

Genomische DNA aus ES-Zellen wurde nach der Methode von Ramirez-Solis et al. isoliert (Ramirez-Solis et al., 1992). Wenn die ES-Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie einmal mit PBS gewaschen und in 50 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.2, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA) über Nacht bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die DNA wurde dann mit einem eiskalten Gemisch aus 1.5 ml 5 M NaCl und 100 µl EtOH abs. präzipitiert. Der Niederschlag (13000 rpm, 30 min, 4°C) wurde anschließend mit 70% EtOH gewaschen und dann in 30 µl TE-Puffer gelöst. Für einen Restriktionsverdau und anschließende Southern Blot-Analyse wurde die vollständige DNA verwendet.

2.14.5 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte in der Regel durch Southern Blot-Analyse. Dazu wurden 0.5-1 cm lange Schwanzbiopsien entnommen und in 400 µl Extraktions-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 1 mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 13000 rpm, RT). Die DNA wurde dann aus dem Überstand durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt (30 min, 13000 rpm, RT). Anschließend wurde die DNA mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und final in 200 µl TE-Puffer gelöst (2-10 Std. bei 55°C). Für den Restriktionsverdau wurden 10 µg DNA eingesetzt (in einem 100 µl Ansatz).

2.14.6 Southern Blot-Analyse

Southern Blot-Analyse wurde zur Untersuchung der genomischen Shotgun-Klone (s.o.) und zur Identifizierung des Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus, der durch die homologe Integration des Targetingvektors in den CPZ-Genlocus eingefügt worden war, durchgeführt. Im Anschluß an den Restriktionsverdau wurden die Fragmente auf einem 0.75% Agarosegel in 1x TAE (50x TAE-Puffer: 1 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA) und 0.1 mg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierte DNA wurde dann im Gel mit einem ausreichenden Volumen Denaturierungs-Puffer (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 40 min denaturiert und anschließend 2 x 20 min in Neutralisierungs-Puffer (0.5 M Tris/HCl, pH 7.0, 1.5 M NaCl) auf einen pH-wert von 7.0 äquilibriert. Der DNA-Tansfer auf die Nylon-Membran (Hybond N, Amersham, UK) erfolgte durch Kapillarkraft über Nacht. Anschließend wurde die DNA durch UV-Quervernetzung (3600 kJ) auf der Membran fixiert. Der Filter wurde dann für 3 Std. bei 65°C in der Prähybridisierungslösung (8 ml H₂O, 3 ml 20 x SSC, 3 ml MP-Mix (5% SDS, 5% Magermilchpulver in H₂O), 0.5 ml 10µg/ml Herings-Sperma-DNA (Roche, Schweiz)) präinkubiert und anschließend über Nacht bei 65°C mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde in Hybridisierungslösung hybridisiert (2.5 ml H₂O, 2 ml 20xSSC, 2 ml MP-Mix (s.o.), 0.5 ml 10µg/ml Herings-Sperma DNA, 4 ml Dextran-Sulfat-Lösung (50% Dextran-Sulfat w/v in H₂O)). Die radioaktive Markierung der cDNA wurde mit dem Rediprime Label Kit (Amersham, UK) nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Filter wurde ein vollständiger Reaktionsansatz zur Hybridisierung eingesetzt. Am folgenden Tag wurde die Membran durch dreimaliges Waschen bei 55°C für 30 min in Wasch-Puffer (0.1% SDS, 0.1xSSC in H₂O) von unspezifisch gebundener Sonde befreit. Die Hybridisierung wurde autoradiographisch analysiert.

2.14.7 PCR-basierendes Genotypisieren

Um die zeitliche Effizienz des Genotypisierens zu erhöhen und um das Genotypisieren mit Hilfe von kleinen Gewebebiopsien zu ermöglichen, wurde ein PCR-Programm etabliert, das die Detektion beider Allele in einem Reaktionsansatz erlaubt.

Reaktionsansatz:

0.5 µl genomische DNA (s.o.)
12.5 µl HotStartTaqMastermix Kit (Qiagen, Deutschland)
1.5µl Neo 2.1 (10 µM)
1.5 µl 3'one (10 µM)
0.5 µl 5'one (10 µM)
6.5 µl H₂O
Σ= 25 µl

PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	15 min
Amplifikation (40 Zyklen)	95°C	30 sec
	65°C	30 sec
	72°C	90 sec
Finale Extension	72°C	10 min
	4°C	∞

Diese PCR-Reaktion resultierte in der Amplifikation zweier Produkte: das erste mit einer Länge von 800 bp wurde von den Primern 5'one (5'TAGCTGGGTGCAGTTGCTTCAGAG3') und 3'one (5'ACGGATAGGATCCCTCGTGTGCAT3') amplifiziert und entspricht dem 3. Exon sowie benachbarten Intronsequenzen; das zweite Produkt mit einer Größe von ca. 1200 bp wurde von den Primern Neo2.1 (5'CCAGCCGGCCACAGTCG3') und 3'one (s.o.) gebildet und repräsentiert das 5'-Ende des Targetingvektors sowie einen Teil der Intronsequenz 3' zum 3. Exon.

2.15 Northern Blot-Analyse

Um die Effektivität der Deletion des CPZ-Gens zu analysieren, wurden E10.5 Embryos eines Wurfes aus einer Heterozygoten-Verpaarung gesammelt, genotypisiert und entsprechend des Genotyps präpariert: Zur Detektion der CPZ-Transkripte mittels RT-PCR wurden 2 Embryonen jedes Genotyps vereint und die RNA mit RNazol B (WAK Chemie, Deutschland) präpariert. Die RNA-Präparation, cDNA-Synthese sowie PCR wurde durchgeführt wie oben beschrieben (Primer: Shotgun1 und Shotgun6rev). Zur Detektion der CPZ-Transkripte mittels Northern Blot-Verfahren wurden 3 Embryonen jedes Genotyps vereint und die mRNA mit Hilfe von Dynabeads (Dyna, Norwegen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. 6 µg mRNA von jedem Genotyp wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (1.5% Agarose, 2.2 M Formaldehyd in DEPC-H₂O). Anschließend wurde das Gel einmal 15 min in DEPC-H₂O gewaschen, gefolgt von zwei Inkubationen in 10xSSC. Die RNA wurde dann in 10xSSC auf eine HybondXL-Membran (Amersham, UK) geblottet und durch UV-Quervernetzung auf der Membran immobilisiert. Die anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde in Ultrahyb (Ambion, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Als cDNA Sonde wurde für CPZ ein 1.2 kb-Fragment, welches sich aus einem Dopperverdau mit SacI und BamHI ergibt, eingesetzt. Dieses Fragment hybridisiert 3'terminal zur Insertionskassette. Bei beiden Verfahren wurde *EF1a* als Kontroll-Gen verwendet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Isolierung des murinen Homologes der Carboxypeptidase Z (CPZ) und Vergleich mit den CPZs anderer Spezies

Als Grundlage für die Isolierung des murinen CPZ-Homologes dienten die bereits beschriebenen cDNA-Sequenzen aus dem Menschen und der Ratte (Song & Fricker, 1997; Xin et al., 1998a). Mit einem degenerierten Primerpaar, welches gegen einen hoch konservierten Nukleotidsequenzabschnitt innerhalb der Carboxypeptidase-Domäne gerichtet war, wurde ein 300 bp Fragment amplifiziert. Als Vorlage diente bei dieser PCR cDNA, die aus 10.5 Tage alten Mäuseembryonen gewonnen worden war (im weiteren Verlauf E10.5 - Tag 10.5 post coitum). Ausgehend von diesem 300 bp-Fragment wurden dann das 3'-Ende und große Teile des 5'-Sequenzabschnittes der murinen CPZ-cDNA-Sequenz mittels RACE-PCR (*RACE-rapid amplification of cDNA-ends*) isoliert. Das fehlende 5'-Ende wurde durch RT-PCR mit Hilfe eines degenerierten Forward-Primers, gerichtet gegen die 5'-Ende der humanen und Ratten Sequenz, amplifiziert.

Die isolierte cDNA der Carboxypeptidase Z aus der Maus codiert für ein Protein mit einer Länge von 654 Aminosäuren (siehe Abb. 4). Wie alle anderen CPZs besteht sie aus einem Signalpeptid, einer Cystein-reichen Domäne, einer Carboxypeptidase-Domäne und einer C-terminalen Extension (im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Carboxypeptidase-Domäne nicht in Carboxypeptidase-Domäne und Transthyretin-ähnliche Domäne unterteilt, wie von Reznik und Fricker vorgeschlagen (Reznik & Fricker, 2001); die Bedeutung des zweitgenannten Sequenzabschnittes ist nicht bekannt und hat für die im Folgenden beschriebenen Experimente keine Relevanz).

Ergebnisse

Ratte	1	MPTPLLLAFLAFLAFLAFAAAYS--CSPGPDPSGKQRIAS ^{CRD} THSATCVDLHLR ^C TCADAA
Maus	1	MPTPLLLAFLAFLAFLAFAAARPS ^C SPGPDPSGKQRI ^V YTHSATCVDLHLR ^C TCADAA
Mensch	1	---MP ^C PPPLLL ^C LLLV ^C WVAARPG-----CE ^C FERN ^C PAAT ^C VDL ^C LR ^C TC ^C SDAA
Huhn	1	----M ^C VP ^C SL ^C LL ^C LL ^C TG ^C LFRAT ^C EP ^C AR ^C CE ^C TG ^C IT ^C LG ^C ---QCQ ^C IAQ ^C K ^C R ^C C ^C VD ^C LS ^C SS ^C CT ^C IV ^C T
CRD		
Ratte	59	YNHTSFET ^C PLEHRSWD ^C AVEAS ^C SEYILL ^C VLHFLLEG ^C CNPDLRLLG ^C CSVLAPRC ^C EGGHT ^C C
Maus	61	YNHTSFET ^C PLEHRSWD ^C VESS ^C SEYILL ^C VLHFLLEG ^C CNPDLRLLG ^C CSVLAPRC ^C EGGHT ^C C
Mensch	45	YNHTTFEN ^C LLQ ^C HRSWD ^C VEAS ^C SEYILL ^C SVLH ^C FLLEG ^C CNPDLRLLG ^C CSVLAPRC ^C EGG ^C N ^C VR
Huhn	53	YTQ ^C TM ^C EN ^C FLD ^C Q ^C SR ^C EV ^C TEYS ^C SEYILL ^C SVLH ^C N ^C LL ^C LEG ^C CNPDLRLLG ^C CSVLAP ^C CE ^C KD ^C VI
Ratte	119	RPCRRVCEGLREACQPAFDAIDMAWPYFLD ^C CTCYFAPEEEG ^C CYDPLE ^C QLRGELDVEEALF
Maus	121	RPCRHVCEGLREACQPAFDAIDMAWPYFLDCAQYFAPEEEG ^C CYDPLE ^C QLRGELDVEEALF
Mensch	105	RPCRHICEGLREVCQPAFDAIDMAWPYFLDCHRYFTREDEG ^C CYDPLEKLRGELADEALF
Huhn	113	KPCRHVCE ^N LK ^N CLSA ^N FD ^N AI ^N DM ^N AW ^N PY ^N FLD ^N CD ^N RF ^N FA ^N CE ^N EEG ^N CD ^N PL ^N AK ^N LRG ^N EL ^N AVEE ^N DL ^N F
Ratte	179	SGLPPTFIRFAHHSYAQMVRVLKRTAARCSQVAKTYSIGRSFEGKDLVVIEFSSRPGQHE
Maus	181	SGLPPTFIRFAHHSYAQMVRVLKRTAARCSQVAKTYSIGRSFEGKDLVVIEFSSRPGQHE
Mensch	165	SGLPPTFIRFAHHSYAQMVRVLKRTAARCSQVAKTYSIGRSFEGKDLVVIEFSSRPGQHE
Huhn	173	SDFEATFIRFAHHSYAQMVRVLKRTAARCSQVAKTYSIGRSFEGKDLVVIEFSSRPGQHE
Ratte	239	LMEPEVKLIGNIFGNEVAGREMLIYLAQYLCSEYLLGNPRIQRLNTRIHL ^C LP ^C SMNPDG
Maus	241	LMEPEVKLIGNIFGNEVAGREMLIYLAQYLCSEYLLGNPRIQRLNTRIHL ^C LP ^C SMNPDG
Mensch	225	LMEPEVKLIGNIFGNEVAGREMLIYLAQYLCSEYLLGNPRIQRLNTRIHL ^C LP ^C SINPDG
Huhn	233	LMEPEVKLIGNIFGNEVAGREMLIYLAQYLCSEYLLGNPRIQRLNTRIHL ^C LP ^C SINPDG
Carboxypeptidase-domäne		
Ratte	299	YEVAAAEGAGYNGWTSGRQNAQNLDLNFNFPDLTSEYYRLASTRGVRTDHIPI ^C SY ^C Y ^C W ^C W ^C G
Maus	301	YEVAAAEGAGYNGWTSGRQNAQNLDLNFNFPDLTSEYYRLASTRGVRTDHIPI ^C SY ^C Y ^C W ^C W ^C G
Mensch	285	YEVAAAEGAGYNGWTSGRQNAQNLDLNFNFPDLTSEYYRLASTRGVRTDHIPI ^C SY ^C Y ^C W ^C W ^C G
Huhn	293	YEVAAAEGAGYNGWTSGRQNAQNLDLNFNFPDLTSEYYRLASTRGVRTDHIPI ^C SY ^C Y ^C W ^C W ^C G
Ratte	359	KVAPETKAIMKWIQTIPFVLSASLEGGDLVVSYPFD ^C FSK ^C HP ^C HEE ^C KMF ^C SPT ^C PDEKMF ^C KLLA
Maus	361	KVAPETKAIMKWIQTIPFVLSASLEGGDLVVSYPFD ^C FSK ^C HP ^C HEE ^C KMF ^C SPT ^C PDEKMF ^C KLLA
Mensch	345	KVAPETKAIMKWIQTIPFVLSASLEGGDLVVSYPFD ^C FSK ^C HP ^C HEE ^C KMF ^C SPT ^C PDEKMF ^C KLLA
Huhn	353	KVAPETKAIMKWIQTIPFVLSASLEGGDLVVSYPFD ^C FSK ^C HP ^C HEE ^C KMF ^C SPT ^C PDEKMF ^C KLLA
Ratte	419	RAYADVHPMMDRSENRCGGNFKRGSIIINGADWYSFTGGMSDFNYLHTNCFEITV ^C ELGC
Maus	421	RAYADVHPMMDRSENRCGGNFKRGSIIINGADWYSFTGGMSDFNYLHTNCFEITV ^C ELGC
Mensch	405	RAYADVHPMMDRSENRCGGNFKRGSIIINGADWYSFTGGMSDFNYLHTNCFEITV ^C ELGC
Huhn	413	RAYADVHPMMDRSENRCGGNFKRGSIIINGADWYSFTGGMSDFNYLHTNCFEITV ^C ELGC
Ratte	479	VKFPPEEALYGLWQH ^C NKE ^C PLLN ^C FLEMVHRG ^C IKG ^C VVT ^C DK ^C Y ^C GK ^C PV ^C KNAR ^C I ^C IV ^C KGI ^C RHD ^C IT ^C TA
Maus	481	VKFPPEEALYGLWQH ^C NKE ^C PLLN ^C FLEMVHRG ^C IKG ^C VVT ^C DK ^C Y ^C GK ^C PV ^C KNAR ^C I ^C IV ^C KGI ^C RHD ^C IT ^C TA
Mensch	465	VKFPPEEALYGLWQH ^C NKE ^C PLLN ^C FLEMVHRG ^C IKG ^C VVT ^C DK ^C Y ^C GK ^C PV ^C KNAR ^C I ^C IV ^C KGI ^C RHD ^C IT ^C TA
Huhn	473	VKFPPEEALYGLWQH ^C NKE ^C PLLN ^C FLEMVHRG ^C IKG ^C VVT ^C DK ^C Y ^C GK ^C PV ^C KNAR ^C I ^C IV ^C KGI ^C RHD ^C IT ^C TA
Ratte	539	PDGDYWRLPPGSHIVIAQAPGYSKVMKRVTIPLRMK ^C RAG ^C RVDF ^C IL ^C PL ^C AT ^C GPK ^C NFL ^C PG ^C F
Maus	541	PDGDYWRLPPGSHIVIAQAPGYSKVMKRVTIPLRMK ^C RAG ^C RVDF ^C IL ^C PL ^C AT ^C GPK ^C NFL ^C PG ^C F
Mensch	525	PDGDYWRLPPGSHIVIAQAPGYAKV ^C IK ^C V ^C TI ^C PL ^C RMK ^C RAG ^C RVDF ^C IL ^C PL ^C GM ^C GPK ^C NFL ^C PG ^C F
Huhn	533	PDGDYWRLPPGSHIVIAQAPGYSKVMKRVTIPLRMK ^C RAG ^C RVDF ^C IL ^C PL ^C AT ^C GPK ^C NFL ^C PG ^C F
Ratte	599	SRALPRSLD--PQGAFLQIDFEP ^C PRARR ^C Q ^C P--ASGSKP ^C W ^C W ^C W ^C Y ^C FT ^C SLS ^C PHK ^C PR ^C W ^C LL ^C KY ^C --
Maus	601	SRALPRFQD--PQREFLQIDFEP ^C PRARR ^C Q ^C P--ASGSKP ^C W ^C W ^C W ^C Y ^C FT ^C SLS ^C PHK ^C PR ^C W ^C LL ^C KY ^C --
Mensch	585	RRTGPHDPLGGASSLGEAT ^C PP ^C DL ^C PRARR ^C Q ^C PSA ^C AGSKP ^C W ^C W ^C W ^C Y ^C FT ^C SLS ^C PHK ^C PR ^C W ^C LL ^C KY ^C --
Huhn	593	MEDLYDQYDP---LELFDPHAGACAR ^C GG ^C SQ ^C VRE ^C KP ^C W ^C W ^C W ^C Y ^C FT ^C SLS ^C PHK ^C PR ^C W ^C LL ^C KY ^C --

Abbildung 4: Sequenzvergleich der bekannten Homologe der Carboxypeptidase Z. Die CRD ist rot überlegt, die konservierten Cysteinreste sind rot markiert. Die Carboxypeptidase-Domäne ist gelb überlegt, die katalytisch wichtigen Reste sind gelb hervorgehoben. Der in den beschriebenen Experimenten mutierte, für die Katalyse essentielle Aminosäurerest Glu477 (Maus), bzw. Glu469 (Huhn), ist grün markiert. Identische Aminosäuren sind in schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäurereste grau.

Die isolierte cDNA für CPZ aus der Maus besitzt alle die für CRD charakteristischen Cystein-Reste an konservierter Position. Die für die Koordination des Zink-Ions, für die Substratbindung sowie die Katalyse wichtigen Aminosäuren der Carboxypeptidase-Domäne sind ebenfalls vorhanden: Histidin253, Glutamat256, Arginin328, Histidin385 und Glutamat477.



Abbildung 5: Homologievergleich der bekannten CPZ-Proteinsequenzen. CPZ aus der Ratte und aus der Maus zeigen die größte Ähnlichkeit, die CPZ aus dem Huhn ist das am stärksten abweichende Homolog. Die Carboxypeptidase-Domäne von CPZ aus der Ratte ist zu der von CPE aus der Ratte zu 49% identisch. Dies ist innerhalb der CPE/N-Unterfamilie der MC-Carboxypeptidasen ein typischer Konservierungsgrad (Xin et al., 1998a). Insgesamt ist die Carboxypeptidase-Domäne zwischen den vier Spezies der am stärksten konservierte Sequenzabschnitt, gefolgt von der CRD. Die Sequenzen zwischen dem Signalpeptid und der CRD sowie zwischen der Carboxypeptidase-Domäne und den C-terminalen 40 Aminosäuren zeigen die höchste Divergenz, wobei im Huhn nur die C-terminalen 23 Aminosäurereste konserviert sind. Die groß geschriebenen Prozentangaben entsprechen der Identität der Aminosäuresequenzen, die kleiner dargestellte Prozentangabe darunter zeigt die Homologie unter Berücksichtigung ähnlicher Aminosäuren. Abkürzungen: CP – Carboxypeptidase-Domäne, SP – Signalpeptid.

Ein Homologievergleich der vier bekannten Proteinsequenzen zeigt, dass sich die beiden Homologe der Ratte und der Maus mit einer Identität von 95% am ähnlichsten sind (siehe Abb. 5). Die Frizzled-Domäne von CPZ aus der Maus zeigt eine Homologie von 89% zu der des Menschen, die Carboxypeptidase-Domäne ist zu 96% ähnlich; die Gesamthomologie liegt bei 87%. Das aus dem Huhn isolierte Homolog zeigt im Vergleich zu den anderen CPZs die höchste Divergenz. Die Gesamthomologie mit der humanen Sequenz liegt bei 77%, wobei die Carboxypeptidase-Domäne mit 86% im Vergleich zur CRD mit 84% eine größere Ähnlichkeit besitzt (die Homologie zu den CPZ-Orthologen der Ratte und der Maus ist vergleichbar). Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die Carboxypeptidase-Domäne in den verschiedenen Spezies am stärksten konserviert ist, gefolgt von der CRD. Die Sequenzabschnitte zwischen dem Signalpeptid und der CRD sowie zwischen der Carboxypeptidase-Domäne und den C-terminalen 40 Aminosäuren zeigen die höchste Divergenz, wobei im Huhn nur die C-terminalen 23 Aminosäurereste konserviert sind. Die cDNA-Sequenz von CPZ aus dem Huhn (cCPZ) wurde von E.C. Swindell isoliert und für die weiteren Experimente freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2 Analyse von CPZ im Hühnerembryo

3.2.1 Expressionsanalyse von cCPZ in der frühen Embryogenese des Huhns

Das Expressionsmuster von cCPZ wurde mittels *in situ*-Hybridisierung während der frühen Embryonalentwicklung des Huhnes bestimmt (siehe Abb. 6). Die erste schwache Expression von cCPZ ist im HH Stadium 7 in den sich bildenden Somiten zu detektieren (nicht dargestellt). In den darauf folgenden Stadien, in denen sich neue Somiten bilden und differenzieren, bleibt die Expression von cCPZ in diesen Strukturen bestehen (Abb. 6 A-D). Transversale Schnitte zeigen, dass cCPZ im gesamten epithelialen Somiten exprimiert ist (Abb. 6 B, H). Wenn der Somit sich in das Sklerotom und das Dermamyotom differenziert, sind die Transkripte auf das Sklerotom beschränkt (Abb. 6 F).

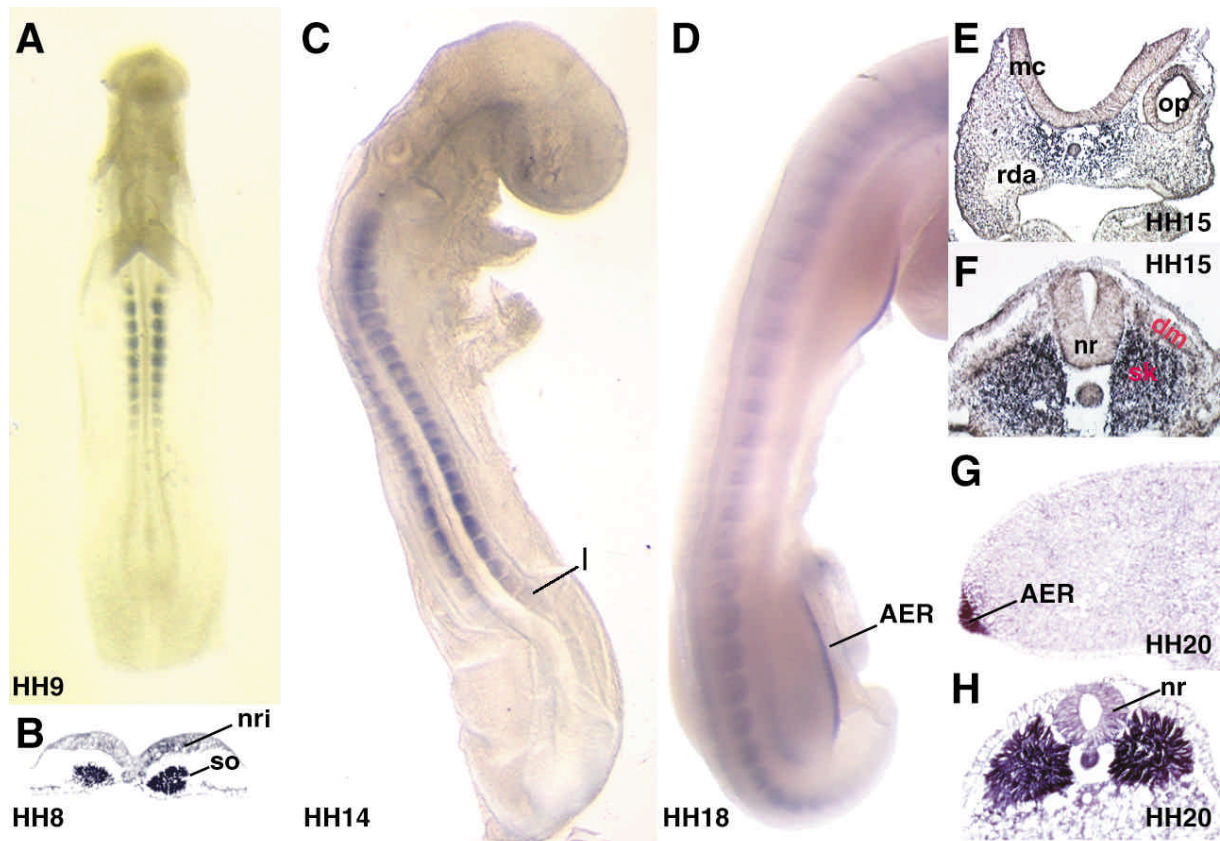


Abbildung 6: Expressionsmuster von *cCPZ* in der frühen Embryonalentwicklung des Huhns. (A) Ein Embryo im HH Stadium 9. *cCPZ* Transkripte sind in allen neun Somiten-Paaren zu sehen. (B) Transversalschnitt eines HH Stadium 8 Embryos auf Höhe des dritten Somiten. *cCPZ* ist im gesamten epithelialen Somiten zu finden. (C) Im HH Stadium 14 Embryo zeigen alle 22 Somiten Expression. Das höchste Expressionsniveau ist in den Somiten V bis X zu sehen (Somit I ist der am jüngsten gebildete, nach Gossler und Hrabe de Angelis, 1998, und in der Abb. als „I“ gekennzeichnet). (D) Im HH Stadium 18 ist die Expression von *cCPZ* in allen Somiten sowie in der AER zu sehen. (E) Transversalschnitt durch die Kopfregion eines HH Stadium 15 Embryos. *cCPZ* ist im paraxialen Mesenchym exprimiert, das die *chorda dorsalis* umgibt. (G) Schnitt durch die Gliedmaßenanlage eines HH Stadium 20 Embryos. *cCPZ* ist stark in der apikalen ektodermalen Leiste exprimiert. (H) Transversalschnitt durch die Schwanzregion eines HH Stadium 20 Embryos. Der gesamte epitheliale Somit zeigt *cCPZ* Transkripte. Abkürzungen: AER - *apical ectodermal ridge*, dm - Dermamyotom, mc - Myelencephalon, Aorta, nr - Neuralrohr, nri - Neuralrinne, op - Ohrplakode, rda - rechte dorsale Aorta, sk - Sklerotom, so - Somite.

Im HH Stadium 22 nach Abschluß der Somitenbildung exprimieren alle Sklerotome *cCPZ*. Mit der Kondensation der Sklerotome nimmt die Expression in rostrocaudaler Progression ab (nicht dargestellt). *cCPZ* Transkripte wurden des Weiteren in der apikalen ektodermalen Leiste (Abb. 6 D und G) sowie im paraxialen Mesoderm der Kopfregion detektiert (Abb. 6 E).

3.2.2 Ablationsexperimente im Hühnerembryo

Die Expression verschiedener sklerotomaler Gene wie z.B. *Pax1* ist von Signalen aus der *chorda dorsalis* sowie dem ventralen Teil des Neuralrohrs abhängig (Fan & Tessier-Lavigne, 1994; Marcelle et al., 1999). Dies wurde unter anderem in Experimenten gezeigt, in denen das präsomitische Mesoderm von den axialen Strukturen operativ getrennt wurde, bevor es *Pax1* exprimiert (Marcelle et al., 1999). In den Somiten, die sich aus diesem abgetrennten Mesoderm bildeten, blieb die Induktion von *Pax1* aus, da das Mesoderm nicht dem Einfluss von Noggin und Shh ausgesetzt war (siehe Einleitung). Diese Induktionseigenschaft könnte auch auf *cCPZ* zutreffen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die beschriebenen Experimente nachgestellt und das präsomitische Mesoderm von HH Stadium 10 Embryonen mit Hilfe einer Wolframnadel von den axialen Strukturen getrennt. Nach einer Inkubationszeit von 12 bis 16 Stunden wurden die Embryonen dann zur *in situ*-Hybridisierung eingesetzt (HH Stadium 13/14). Zur Erinnerung: Im HH Stadium 10 exprimieren alle 10 gebildeten Somiten *cCPZ*, das präsomitische Mesoderm zeigt jedoch keine Expression. Nach der Abtrennung von den axialen Strukturen ist dieses Gewebe nicht mehr dem Einfluss axialer Signale wie z.B. Shh oder Noggin ausgeliefert. Gene, die durch diese Signalmoleküle in den Somiten induziert werden, sollten daher ausbleiben.

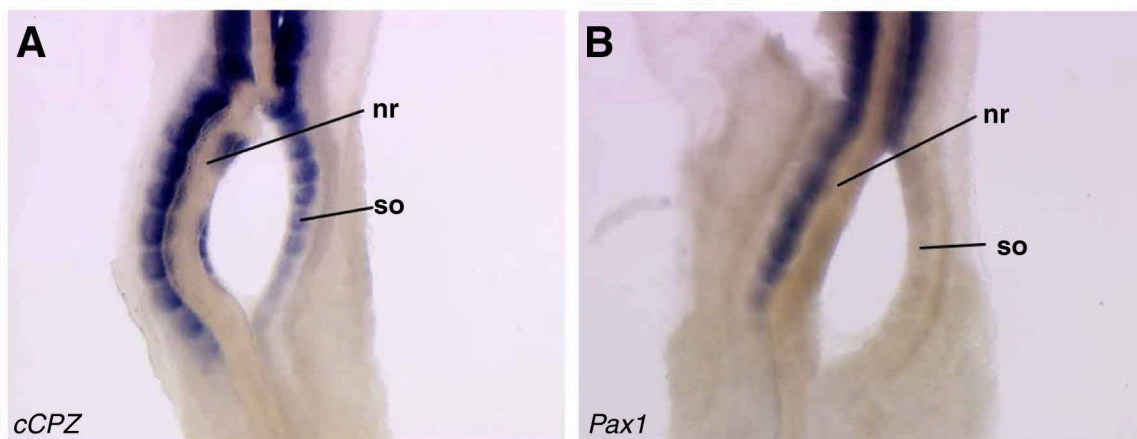


Abbildung 7: *cCPZ*-Expression im Somiten wird nicht durch Signalmoleküle aus dem Neuralrohr oder der *chorda dorsalis* induziert. In den präsentierten Embryonen wurde das präsomitische Mesoderm im HH Stadium 10 von den axialen Strukturen durch einen manipulativen Eingriff abgetrennt. Nach 12-16 Std. Inkubation wurden die Embryonen dann zur WMISH eingesetzt. (A) Die Expression von *cCPZ* in den abgetrennten Somiten ist klar zu erkennen. Die Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Ablationsseite im Expressionsniveau könnten durch die Tatsache hervorgerufen sein, dass durch die Separation die Somitenentwicklung *per se* eingeschränkt ist. (B) Von den axialen Strukturen abgetrennte Somiten können die Expression von *Pax1* nicht induzieren. nr – Neuralrohr, so – Somit.

In allen Fällen einer solchen Abtrennung des Neuralrohrs und der *chorda dorsalis* vom präsomitischen Mesoderm zeigten die neu gebildeten Somiten auf der ablatierten Seite die Expression von *cCPZ* (n=13) (siehe Abb. 7 A). Im Gegensatz dazu wurde die Expression von *Pax1* durch die beschriebene Operation komplett inhibiert (n=9/9) (Abb. 7 B). Dies steht im Einklang mit bereits beschriebenen Studien (Marcelle et al., 1999). Die Somiten, die nach der operativen Abtrennung gebildet worden sind, können die Expression von *cCPZ* initiieren. Daher wird die sklerotomale bzw. Somiten-Expression von *cCPZ* nicht direkt von Signalmolekülen aus dem Neuralrohr oder der *chorda dorsalis* reguliert. Dies schließt allerdings nicht die Möglichkeit aus, dass die Aktivität von CPZ an der Regulation eben solcher Signalmoleküle beteiligt ist.

3.2.3 Ektopische Expression von cCPZ im Hühnerembryo

Die Expression von *cCPZ* in den Somiten legt eine Funktion von CPZ in der Entwicklung der sich aus dem Somiten bildenden Strukturen nahe. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde die ektopische Expression von *cCPZ* im Hühnerembryo als Ansatz gewählt. Der mögliche Einfluss einer solchen Überexpression auf die Entwicklung der betroffenen Strukturen sollte einen Rückschluss auf die native Funktion bzw. den Funktionsmechanismus von CPZ erlauben. Die vollständige cDNA-Sequenz von *cCPZ* wurde in ein replikationskompetentes Retrovirus (RCAS-*replication competent avian retrovirus*) eingefügt. Dieses Virus (RCAS-cCPZ) wurde HH Stadium 10 Embryonen in das präsomitische Mesoderm auf Höhe der zukünftigen Flügelanlage injiziert. Die Embryonen wurden 48-60 Std. nach der Injektion gesammelt und zur WMISH-Analyse eingesetzt (Abb. 8). In den meisten untersuchten Fällen konnte man eine starke Expression von *cCPZ* in 2-4 Somiten sowie dem lateralen Mesoderm der injizierten Seite auf Höhe der Flügelanlage beobachten (Abb. 8 A). Diese ektopische Expression wurde nicht auf der unbehandelten Seite detektiert (Fig. 8 B, C). Transversale Schnitte durch Embryonen nach einer solchen WMISH zeigten, dass die Virus-vermittelte Überexpression von *cCPZ* auf das Dermamyotom beschränkt war, sowohl epaxial, als auch zentral und hypaxial (Abb. 8 C). Eine solche eingeschränkte Überexpression, hervorgerufen durch eine Injektion eines RCAS-Virus in das präsomitische Mesoderm, wurde u.a. auch für die Überexpression von *Shh* beschrieben (Johnson et al., 1994) (die endogene Expression von *cCPZ* nimmt zu diesem Zeitpunkt bereits wieder ab).

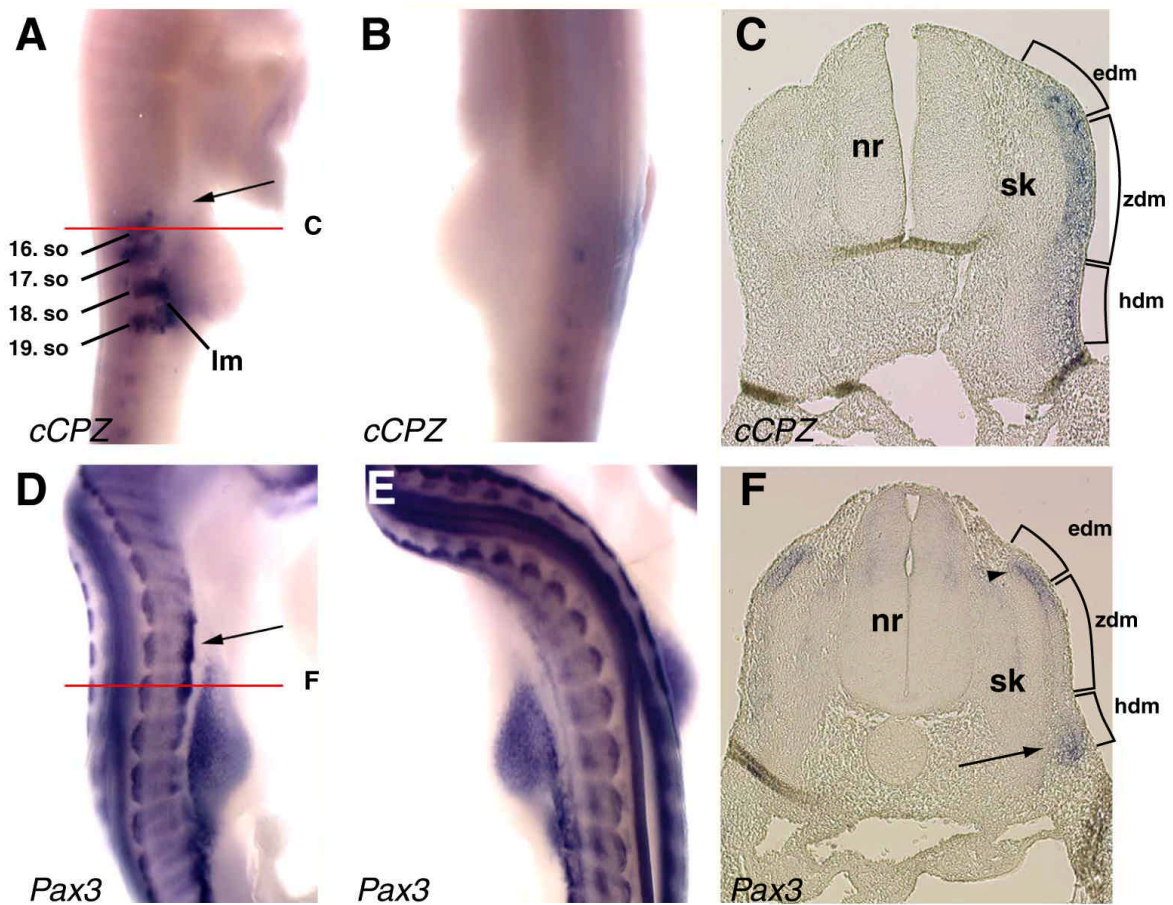


Abbildung 8: Die ectopische Expression von *cCPZ* im Dermamyotom induziert *Pax3*. (A, D) Die injizierten Seiten des Embryos, (B, E) die unbehandelten Kontrollseiten. (A) Starke ectopische Expression von *cCPZ* in den Somiten 16-19 und dem lateralen Mesoderm, visualisiert durch WMISH. Die endogene Expression nimmt zu diesem Zeitpunkt bereits ab. (B) Die ectopische Expression ist auf der unbehandelten Seite des Embryos nicht zu sehen. (C) Transversalschnitt durch den Embryo in (A) und (B) auf Höhe der roten Linie. Die Überexpression ist auf das gesamte Dermamyotom der injizierten Seite beschränkt. (D) Ectopische Expression von *Pax3* im hypaxialen Dermamyotom (Pfeil). (E) Auf der unbehandelten Kontrollseite des Embryos ist keine Veränderung in der *Pax3*-Expression zu sehen. (F) Transversalschnitt durch den Embryo aus (D) und (E) auf Höhe der roten Linie. Die ectopische Expression von *Pax3* ist auf das hypaxiale Dermamyotom beschränkt (Pfeil), die native *Pax3*-Expression im epaxialen Dermamyotom ist nicht verändert (Pfeilkopf). Die präsentierten Embryonen sind im HH Stadium 21-22, die Klammern in (C) und (D) zeigen die Unterteilungen des Dermamyotoms an. Abkürzungen: edm – epaxiales Dermamyotom, hdm – hypaxiales Dermamyotom, lm – laterales Mesoderm, nr – Neuralrohr, sk – Sklerotom, so – Somit, zdm – zentrales Dermamyotom.

Da die ektopische Expression von *cCPZ* auf das Dermamyotom beschränkt war, wurden mehrere dermyotomale Markergene auf ein verändertes Expressionsmuster hin überprüft. Die Expression von *MyoD*, *myf5* und *myogenin* wurde durch die *cCPZ* Überexpression nicht beeinflusst (n=10 in jedem Fall, Daten nicht präsentiert). *Pax3* hingegen zeigte unter Einfluss von *cCPZ* eine ektopische Expression im hypaxialen Dermamyotom (Abb. 8 D und F) (n=16/31). Auf dieser axialen Höhe ist *Pax3* hauptsächlich im epaxialen Bereich des Dermamyotoms exprimiert (Abb. 8 F). Die Expression des sklerotomalen Genes *Pax1* wurde durch die Überexpression von *cCPZ* nicht verändert (n=10, Daten nicht präsentiert).

Die CPE/N-Unterfamilie der Metalloproteasen ist u.a. durch einen konservierten Glutamatrest charakterisiert. Mitgliedern der Unterfamilie, denen dieser Rest fehlt bzw. in denen dieser Rest durch einen anderen ersetzt wurde, haben keine enzymatische Aktivität wie z.B. CPX1 und CPX2 (siehe Einleitung). Die Substitution dieser Aminosäure durch ein Glutamin eliminiert die katalytische Aktivität von CPE. Die Substratbindung wird durch diese Mutation allerdings nicht eingeschränkt (Qian et al., 1999). Unter der Annahme, dass *cCPZ* seine Funktion in erster Linie als katalytisch wirkendes Enzym erfüllt und dass die beobachtete induzierte ektopische Expression von *Pax3* Resultat des nativen Funktionsmechanismus' von CPZ ist, sollte eine katalytisch inaktive *cCPZ* nicht in der Lage sein, diese ektopische Expression zu induzieren. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die entsprechende Punktmutation (Glu469Gln) in die cDNA-Sequenz von *cCPZ* eingefügt und ein RCAS-Virus hergestellt, das diese mutierte Form von *cCPZ* überexprimiert (RCAS-*cCPZ*^{E469Q}). Die Punktmutation in die *cCPZ*-cDNA wurde von E. C. Swindell inseriert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. RCAS-*cCPZ*^{E469Q} wurde wie RCAS-*cCPZ* appliziert. 48-60 Std. nach der Injektion zeigten die Embryonen eine Überexpression von *cCPZ*^{E469Q} wie zuvor bei der Injektion von RCAS-*cCPZ*. Überexpression von *Pax3* im hypaxialen Dermamyotom konnte allerdings nicht festgestellt werden (n=15) (Daten nicht präsentiert). Dies zeigt, dass die durch *cCPZ* induzierte ektopische Expression von *Pax3* Resultat eines Prozesses ist, der durch die katalytische Aktivität von CPZ bewirkt wird.

Die ektopische Expression von *Pax3* im hypaxialen Dermamyotom spiegelt möglicherweise die Tatsache wieder, dass durch die ektopische Expression von *cCPZ* die entwicklungsbiologische Determinierung dieser Zellen beeinflusst wird. Ist dies der Fall, sollte sich das in einer Veränderung der Entwicklung des Schaftes der Skapula (Schulterblatt) manifestieren, der aus diesem Teil des Dermamyotoms gebildet wird (Huang et al., 2000). Die Skapula besteht aus einem Kopf, dem Acromium, und aus einem Schaft (Baumel und Witmer, 1993 und Ede, 1964). Wenn die *cCPZ*-injizierten Embryos nach 10 Tagen einer Skelettpräparation unterzogen wurden, zeigten 55% von

ihnen Fehlbildungen des Schaftes der Skapula und der Rippen (siehe Abb. 9) (n=22). Die häufigste Missbildung war eine Verkürzung der genannten Strukturen.

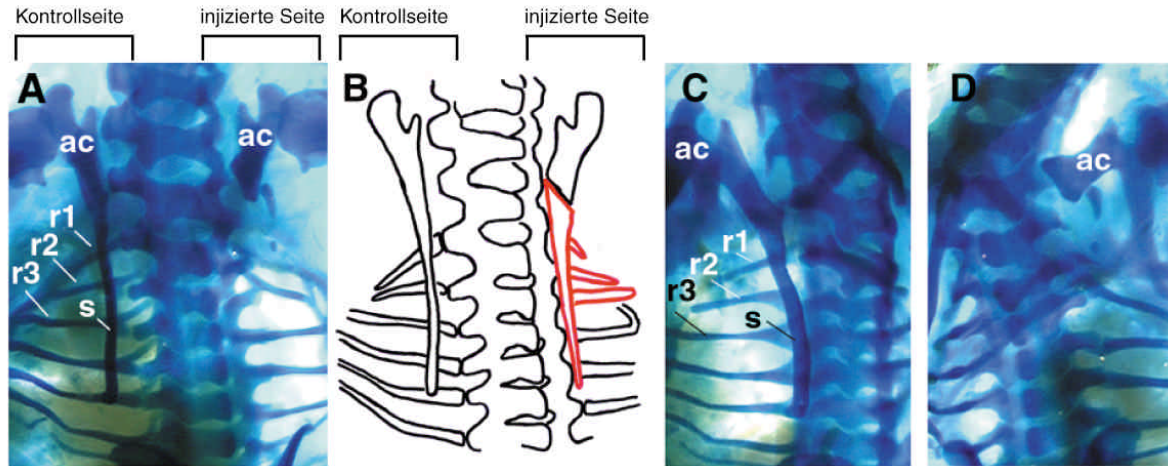


Abbildung 9: Überexpression von cCPZ in den Somiten führt zu Defekten des Schaftes der Skapula und der Rippen der behandelten Seite. (A) Dorsale Sicht auf das Skelettpräparat eines 10 Tage alten Embryos, der bei HH Stadium 10 mit RCAS-cCPZ injiziert worden war. Der Schaft der Skapula und die drei rostralen Rippen sind auf der injizierten rechten Seite des Embryos erheblich verkürzt. (B) Schematische Zeichnung der Skelettpräparation in (A). Der fehlende Teil der Skapula und der Rippen ist in rot gezeichnet. (C) Seitliche Sicht auf die unbehandelte Kontrollseite in (A). (D) Seitliche Sicht auf die rechte Seite des behandelten Embryos aus (A). Abkürzungen: ac – Acromium, s – Schaft der Skapula, r – Rippe

In sieben behandelten Embryonen waren der Schaft der Skapula und die rostralen Rippen verkürzt. Zwei Embryonen zeigten eine Verkürzung der Skapula, bei drei Fällen waren lediglich die Rippen betroffen. Injektionen eines RCAS-Kontrollvirus', der Alkalische Phosphatase exprimierte, hatten keinen Effekt auf die Morphogenese behandelter Embryonen (n=22). Wenn Embryonen nach einer Injektion mit RCAS-cCPZ^{E469Q} einer Skelettpräparation unterzogen wurden, wurde eine wesentlich geringere Frequenz skelettaler Fehlbildungen festgestellt (n=3/22). Der Einfluss auf die Morphogenese war erheblich schwächer als in den zuvor beschriebenen Fällen: Bei einem Embryo fehlte der distale Teil des Skapulaschaftes; zwei Embryonen zeigten eine leichte Krümmung des Schaftes nach außen.

Im HH Stadium 26 ist *Pax1* in einem Streifen mesenchymaler Zellen parallel zu den Somiten 17-20 exprimiert. Diese *Pax1*-positiven Zellen stammen vom hypaxialen Dermamyotom ab und werden als das Ursprungsgewebe des Skapulaschaftes betrachtet (Huang et al., 2000). Da die mit cCPZ behandelten Embryonen im hypaxialen Dermamyotom eine Überexpression von *Pax3* zeigen und da das aus diesen Zellen gebildete Gewebe, der Schaft der Skapula, in diesen Embryonen fehlt, sollte im

Fälle einer kausalen Verbindung zwischen Überexpression von *cCPZ* und den morphologischen Effekten dieser *Pax1*-Streifen ebenfalls betroffen sein. In der Tat zeigen 50% der mit RCAS-*cCPZ* injizierten Embryonen ein Fehlen dieser *Pax1*-positiven Zellen, wenn die Embryonen im HH Stadium 26 einer WMISH unterzogen werden (Abb. 10) (n=12).

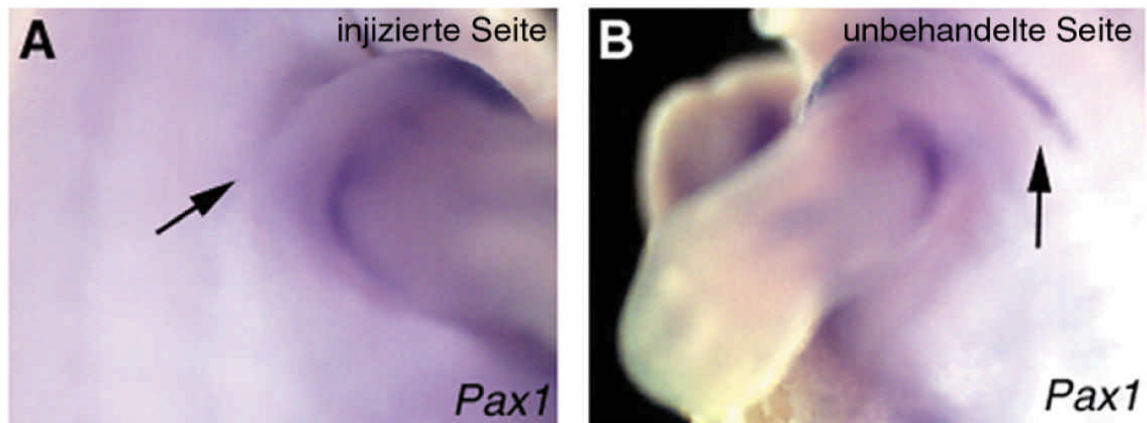


Abbildung 10: Inhibierung der *Pax1*-Expression im Vorläufergewebe des Skapula-Schaftes durch Überexpression von *cCPZ* im Dermamyotom. (A) Injizierte Seite eines HH Stadium 26 Embryos. Die *Pax1*-Expression fehlt in dem Bereich, der normalerweise die sich bildende Skapula beinhaltet (Pfeil). (B) Auf der unbehandelten Kontrollseite ist der *Pax1*-positive Streifen zu erkennen.

3.3 *In vitro*-Analyse von CPZ

3.3.1 Cokultivierungsexperimente mit CPZ-exprimierenden Zellen

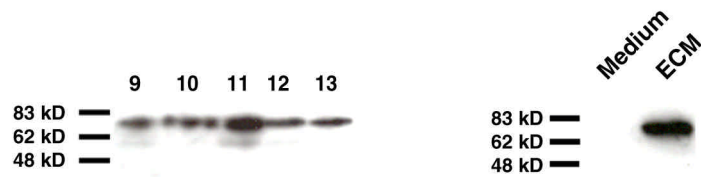
Die bisher präsentierten Daten zeigen, dass CPZ im Hühnerembryo einen tiefen Effekt auf die Morphogenese des Skelettes haben kann und dass dieser Effekt von der katalytischen Aktivität von CPZ abhängig ist. Diese Beobachtung eröffnete die Frage, in welchen entwicklungsbiologischen Prozess oder Signalweg CPZ eingreift und was das potentielle Substrat von CPZ sein kann. CPZ unterscheidet sich von allen anderen Mitgliedern der CPE/N-Unterfamilie der Carboxypeptidasen dadurch, dass sie N-terminal zu ihrer Peptidase-Domäne eine CRD trägt. Dies ist eine Domäne, für die in anderen Proteinen die Interaktion mit Wnt-Liganden gezeigt worden ist (siehe Einleitung). Für *Pax3*

wurde gezeigt, dass es durch mehrere Wnt-Signalmoleküle im PSM induziert wird (Fan et al., 1997; Lee et al., 2000). Diese Beobachtung in Kombination mit der oben beschriebenen ektopischen Expression von *Pax3* durch *cCPZ*-Überexpression im präsomitischen Mesoderm (PSM) führte zu der Annahme, dass CPZ seine native Funktion durch Beeinflussung des extrazellulären Wnt-Signalwegs ausübt. Um zu überprüfen, ob CPZ einen Einfluss auf den Wnt-Signaltransduktionsweg hat, wurde ein parakrines *in vitro*-System adaptiert (Lickert et al., 2000). In diesem *in vitro*-System werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus der Maus auf einem Monolayer aus NIH-3T3-Zellen inkubiert. NIH-3T3-Zellen, die Wnt-Signalmoleküle sezernieren (Kispert et al., 1998), induzieren in den ES-Zellen die Expression des Homöoboxgens *Cdx1*. Von den getesteten Wnt-Molekülen zeigten Wnt1, Wnt3a und Wnt4 in diesem System das höchste Induktionspotential (Lickert et al., 2000). Die Induktion von *Cdx1* wird hierbei über den Wnt/ β -Catenin Signalweg vermittelt.

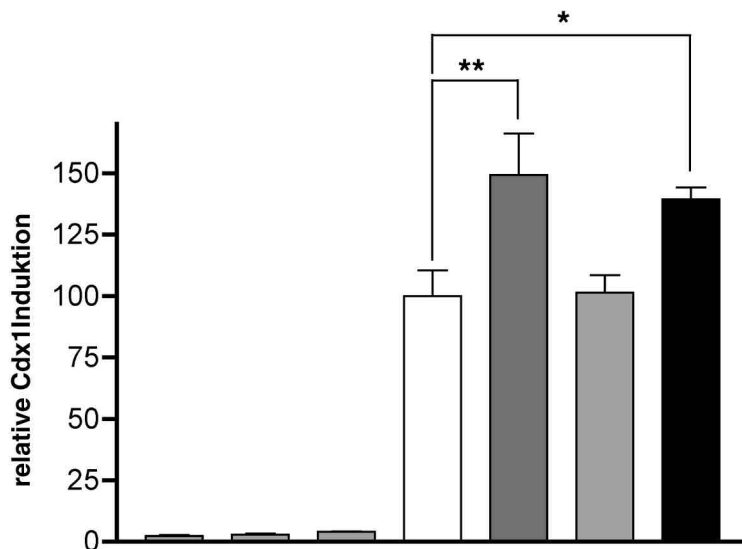
In einem Cokultivierungsexperiment sollte nun gezeigt werden, ob CPZ die von den Wnt-Proteinen vermittelte Induktion von *Cdx1* beeinflussen kann. Hierzu wurden stabile HEK-293-Zelllinien hergestellt, die entweder die native CPZ oder die oben beschriebene mutierte CPZ^{E477Q} aus der Maus exprimierten (CPZ-HEK-293 bzw. CPZ^{E477Q}-HEK-293). Die entsprechenden cDNA-Sequenzen wurden in einen Vektor subkloniert, der die Produktion der insertierten Proteine unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors stellt und an die cDNA-Sequenz C-terminal einen myc-Tag anfügt (pcDNA3.1-myc/HIS-A, Invitrogen, USA). Mit Hilfe dieses myc-Tags wurden die Proteine anschließend detektiert. Von jeder Form von CPZ wurden 24 stabile Linien etabliert, alle produzierten ähnliche Mengen des Proteins in richtiger Größe (Abb. 11 A, links; gezeigt sind die Zelllysate von 5 exemplarischen Zelllinien). Zellextraktionen zeigten, dass CPZ in den Zellen (Abb. 11 A, links) und der Extrazellulärmatrix (ECM – *extracellular matrix*) lokalisiert war (Abb. 11 A, rechts). Im Zellkulturmedium konnte CPZ mit einer für die Expression von CPZ aus der Ratte in AtT-20-Zellen etablierten Prozedur (Novikova et al., 2000) nicht nachgewiesen werden.

Das Co-Kultivierungsexperiment wurde wie folgt durchgeführt: CPZ-HEK-293 oder unbehandelte HEK-293-Kontrollzellen wurden über Nacht auf Gewebekulturschalen wachsen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer EDTA-Lösung von der Schale gewaschen. Auf diese Weise entstanden zwei Arten von Gewebekulturschalen: Platten, die mit einer CPZ-haltigen ECM beschichtet waren, und solche, die mit normaler Wildtyp-ECM konditioniert waren. Auf Schalen, die mit CPZ-ECM konditioniert worden waren, wurden dann Wnt4-exprimierende NIH-3T3-Zellen (Kispert et al., 1998) zusammen mit CPZ-HEK-293-Zellen und ES-Zellen kokultiviert (für Details der Cokultivierung siehe Materialien und Methoden). Auf Schalen, die die normale ECM enthielten, wurden dementsprechend Wnt4-exprimierende NIH-3T3-Zellen zusammen mit unbehandelten HEK-293-Zellen und ES-Zellen kultiviert. Nach 8 Stunden wurden diese Co-Kultivierungen abgebrochen und das *Cdx1*-Induktionsniveau mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. In Gegenwart von CPZ-produzierenden HEK-293-Zellen und ECM, die CPZ enthielt, wurde die durch Wnt4 hervorgerufene *Cdx1*-Induktion um 50% gesteigert (Abb. 11 B, vergleiche Balken 4 und 5).

A



B



NIH-3T3 Zellen	LacZ	LacZ	LacZ	Wnt4	Wnt4	Wnt4	Wnt4
HEK-293 Zellen	-	CPZ	-	-	CPZ	CPZ ^{E477Q}	-
ECM	-	CPZ	CPZ	-	CPZ	CPZ ^{E477Q}	CPZ

Abbildung 11: Cokultivierungsexperimente mit CPZ-exprimierenden Zellen. (A) Links: Zellysate von fünf repräsentativen CPZ-HEK-293-Zelllinien. Die Zellen exprimieren alle vergleichbare Mengen von CPZ mit richtigem Molekulargewicht (ca. 75kD). Rechts: Das Protein wird in der ECM detektiert, kann allerdings nicht im Medium nachgewiesen werden. (B) Relative Induktion von *Cdx1* in ES-Zellen, die mit Wnt- und CPZ-produzierenden Zellen kokultiviert worden sind (für experimentelle Details siehe Text). Die Tabelle unter dem Diagramm zeigt die jeweiligen Komponenten der Cokultivierung an. Die ECM auf den Schalen entsprach entweder der HEK-293-Wildtyp-ECM (-), enthielt CPZ in seiner nativen Form (CPZ) oder die katalytisch inaktive Mutante (CPZ^{E477Q}). Die anschließende Co-Kultivierung beinhaltete NIH-3T3-Zellen, die entweder LacZ (Negativ-Kontrolle) oder Wnt4 exprimierten, zusammen mit HEK-293-Zellen, die entweder unbehandelt waren (-), CPZ in seiner nativen Form produzierten (CPZ) oder die mutierte Version sezernierten (CPZ^{E477Q}). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, p-Werte kleiner als 0.05 sind durch einen Stern gekennzeichnet (Balken 4 und 7), p-Werte kleiner als 0.01 mit zwei Sternen (Balken 4 und 5) (Student's T-Test).

Wenn unbehandelte HEK-293- zusammen mit Wnt4-exprimierenden NIH-3T3-Zellen und ES-Zellen auf CPZ-ECM-konditionierten Platten kokultiviert wurden, konnte eine vergleichbare Erhöhung der *Cdx1*-Induktion durch Wnt4 gemessen werden (Abb.11, Balken 4 und 7). Dies zeigt, dass die beobachtete Steigerung der Wnt4-basierten *Cdx1*-Induktion das Ergebnis eines extrazellulären Ereignisses ist.

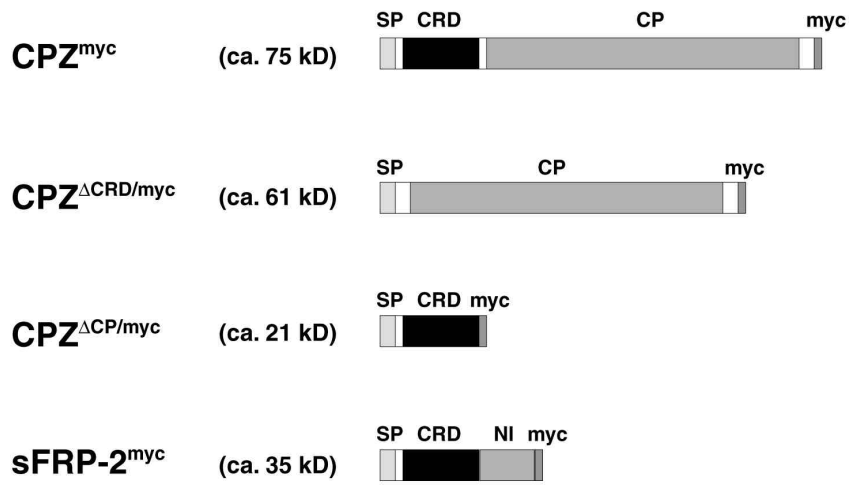
Zellen, die die mutierte Form von CPZ produzieren (CPZ^{E477Q}-HEK-293), waren nicht in der Lage, die *Cdx1*-Induktion zu steigern (Abb. 11 B, Balken 4 und 6). Daher ist die katalytische Aktivität von CPZ für das beobachtete extrazelluläre Ereignis nötig ist, welches zur Steigerung der *Cdx1*-Induktion führt. Weder die CPZ-HEK-293-Zellen noch die mit CPZ-ECM konditionierten Platten allein hatten einen Einfluss auf das basale *Cdx1*-Expressionsniveau, wenn sie in einem ähnlichen Ansatz mit LacZ-exprimierenden NIH-3T3-Zellen kokultiviert wurden (Abb. 11 B, Balken 1-3). Dies zeigt, dass die durch CPZ hervorgerufene Steigerung der *Cdx1*-Induktion kein intrinsischer Effekt von CPZ auf diese Expression ist, sondern durch einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg zurückzuführen ist.

Die *Cdx1*-Induktion durch Wnt1- oder Wnt3a-exprimierende NIH-3T3-Zellen wurde durch CPZ nicht moduliert, der Einfluss war spezifisch für Wnt4 (Daten nicht präsentiert).

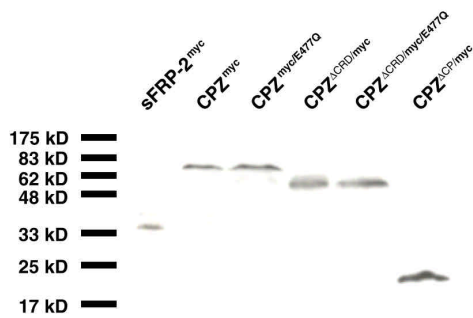
3.3.2 *In vitro*-Interaktionsstudien von CPZ mit Wnt4

Die extrazelluläre Potenzierung des Wnt4-Signals eröffnete die Frage, ob CPZ direkt mit Wnt4 interagieren kann und wenn ja, welche Proteindomäne für diese Interaktion nötig ist. Es wurden daher Co-Immunopräzipitationen aus HEK-293-Zelllysaten durchgeführt. pcDNA3.1-Expressionsvektoren mit den jeweiligen cDNA-Sequenzen wurden hierzu zusammen mit Wnt4 in HEK-293-Zellen cotransfiziert. Eingesetzt wurde hierbei Wnt4, welches einen C-terminalen Hämagglutinin (HA)-Tag besitzt (Wnt4^{HA}) (Lescher et al., 1998), und fünf verschiedene CPZ-Konstrukte, die alle über einen C-terminalen myc-Tag verfügten: die beiden bisher beschriebenen vollständigen cDNA-Sequenzen, CPZ^{myc} und CPZ^{myc/E477Q}, zwei Versionen, in denen die CRD deletiert war, CPZ^{ΔCRD/myc} und CPZ^{ΔCRD/myc/E477Q}, sowie ein Konstrukt, in dem die Carboxypeptidase-Domäne fehlte, CPZ^{ΔCP/myc} (siehe Abb. 12 A). Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers präzipitiert und dann über PAA-Gelelektrophorese und Western-Blotting analysiert. Alle Konstrukte führten zur Expression von Proteinen des richtigen Molekulargewichtes (Abb. 12 B bzw. Abb. 12 A). Sowohl die native wie die mutierte CPZ kann mit Wnt4 interagieren (Abb. 12 C, Spur 2 und 3).

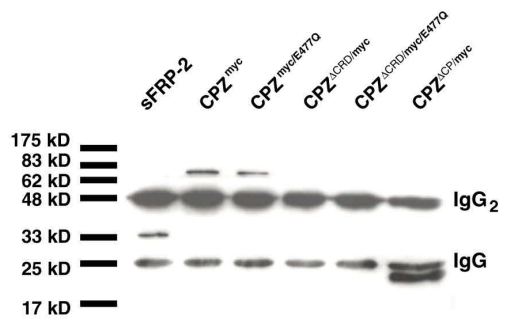
A



B



C



D

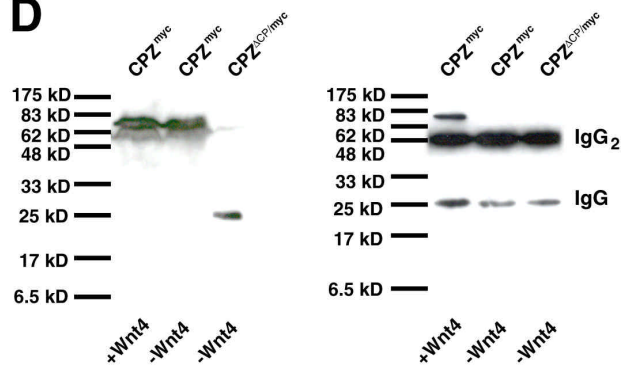


Abbildung 12: Co-Immunopräzipitationen von CPZ mit Wnt4. (A) Darstellung der in den Präzipitationsexperimenten eingesetzten Konstrukte. Die CPZ-Konstrukte, die die inaktivierenden Punktmutationen tragen, CPZ^{ΔCRD/myc/E477Q} und CPZ^{myc/E477Q}, sind nicht gezeigt. (B) Western-Blot-Analyse der Zelllysate, die zuvor mit den in (A) präsentierten Konstrukten und Wnt4^{HA} cotransfiziert worden waren, detektiert mit einem anti-myc-Antikörper. Alle Konstrukte führten zur Expression von Proteinen richtigen Molekulargewichtes (siehe (A)). (C) Präzipitierte Proteine der Lysate in (B) nach Immunopräzipitation von Wnt4^{HA}, detektiert mit einem anti-myc-Antikörper. SFRP-2^{myc}, CPZ^{myc}, CPZ^{myc/E477Q} und CPZ^{ΔCP/myc} werden mit Wnt4 copräzipitiert, wohingegen die beiden Konstrukte, denen die CRD fehlt, nicht mit Wnt4 interagieren können (CPZ^{ΔCRD/myc} und CPZ^{ΔCRD/myc/E477Q}). (D) Die beschriebene Interaktion mit Wnt4 ist spezifisch, CPZ^{myc} und CPZ^{ΔCP/myc} werden nicht durch den anti-HA-Antikörper und die Protein-G-Agarose präzipitiert, wenn Wnt4 im Reaktionsansatz fehlt. Links sind die Zelllysate der Präzipitationsexperimente zu sehen, rechts die präzipitierten Proteine. Die Anwesenheit von Wnt4 im Reaktionsansatz ist unter den Spuren angezeigt. Abkürzungen: CP – Carboxypeptidase-Domäne, CRD-Cystein-reiche Domäne, IgG – Immunoglobulin, leichte Kette, IgG₂ – Immunoglobulin, schwere Kette, NI – *Netrin-like-domain*, SP-Signalpeptid.

Ein Konstrukt, welches die cDNA-Sequenz für sFRP-2 (sFRP-2^{myc}) enthielt, diente als positive Kontrolle. Für dieses Gen wurde die Interaktion mit Wnt4 bereits beschrieben (Lescher et al., 1998). Wie in Abb. 12 B, C gezeigt, wird sFRP-2 produziert und copräzipitiert mit Wnt4^{HA} (jeweils Spur 1). Die beiden Konstrukte, in denen die CRD fehlt CPZ^{ΔCRD/myc} und CPZ^{ΔCRD/myc/E477Q}, binden nicht an Wnt4 (Abb. 12 B, C, Spuren 4 und 5), wohingegen die Deletion der Carboxypeptidase-Domäne die Interaktion mit Wnt4 nicht beeinträchtigt, da eine auf diese Weise verkürzte CPZ, CPZ^{ΔCP/myc}, von Wnt4^{HA} copräzipitiert wird. Die Banden der Größe von 25 kD und 50 kD in Abb. 12 C entsprechen der leichten bzw. schweren Kette der Immunoglobuline des Antikörpers, der für die Präzipitation verwendet worden war. Dieser wurde in der anschließenden Detektion durch den sekundären Antikörper nachgewiesen. Sie beeinträchtigen die Detektion der copräzipitierten Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts nicht und dienten als Ladungskontrolle. Keines der mit Wnt4 interagierenden Proteine wurde unspezifisch von dem anti-HA-Antikörper oder der eingesetzten Protein-G-Agarose gebunden (Abb. 12 D).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Wnt4 und CPZ miteinander interagieren können und dass diese Interaktion über die CRD von CPZ vermittelt wird. Wie die Experimente mit den mutierten Konstrukten zeigen, ist die katalytische Aktivität von CPZ *per se* für das Binden von Wnt4 nicht notwendig.

3.4 Untersuchungen zu CPZ in der Maus

3.4.1 Expressionsanalyse von CPZ in der Maus

Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde die Expression von CPZ während der Embryonalentwicklung der Maus bestimmt. CPZ-Transkripte sind ab E9.5 beginnend im ventralen Ektoderm der sich formierenden Vordergliedmaßenanlage detektierbar (nicht präsentiert). Diese Expression ist bei E10.5 am stärksten und auf das ventrale Ektoderm und die sich bildende AER beschränkt (Abb. 13 A, C, D). Wenn die Gliedmaßenanlagen weiter reifen und die AER deutlicher hervortritt, nimmt die Expression im ventralen Ektoderm ab, die AER zeigt allerdings weiter CPZ-Expression (Abb. 13 B, E, F). Die Expression von CPZ in der Hintergliedmaßenanlage ist identisch mit der Vordergliedmaßenanlage, jedoch der Entwicklung entsprechend verzögert (vergleiche Abb. 13 A und B).

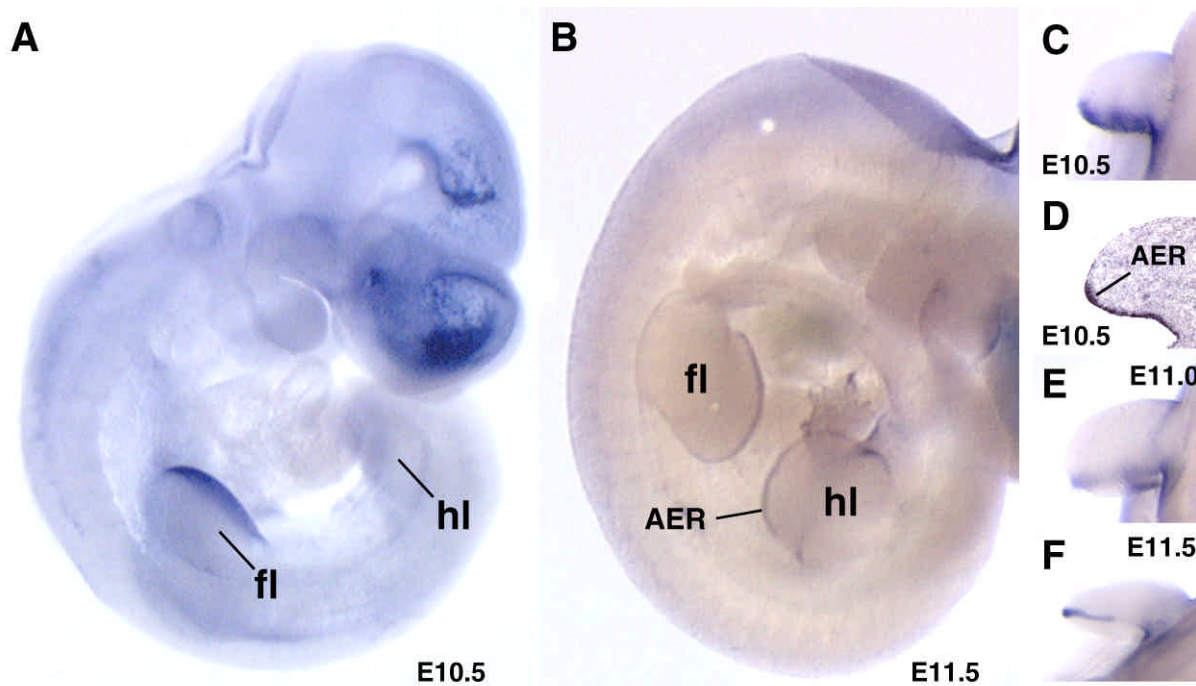


Abbildung 13: Expression von CPZ in der frühen Embryonalentwicklung. (A) Expression bei E10.5. CPZ-Transkripte sind im ventralen Ektoderm der Vordergliedmaßenanlage und der AER zu sehen. (B) Expression von CPZ bei E11.5. CPZ wird lediglich in der AER detektiert. (C) Frontale Sicht auf eine Vordergliedmaßenanlage bei E10.5, ventral ist unten. CPZ wird im ventralen Ektoderm und der sich bildenden AER exprimiert. (D) Transversaler Schnitt durch eine E10.5 Vordergliedmaßenanlage. (E)/(F) CPZ-Expression in der Gliedmaßenanlage bei E11 und E11.5. Die Expression von CPZ wird mit zunehmender Reifung auf die AER beschränkt. Abkürzungen: AER – *apical ectodermal ridge* (apikale ektodermale Leiste), fl – *forelimb* (Vordergliedmaßenanlage), hl – *hindlimb* (Hintergliedmaßenanlage).

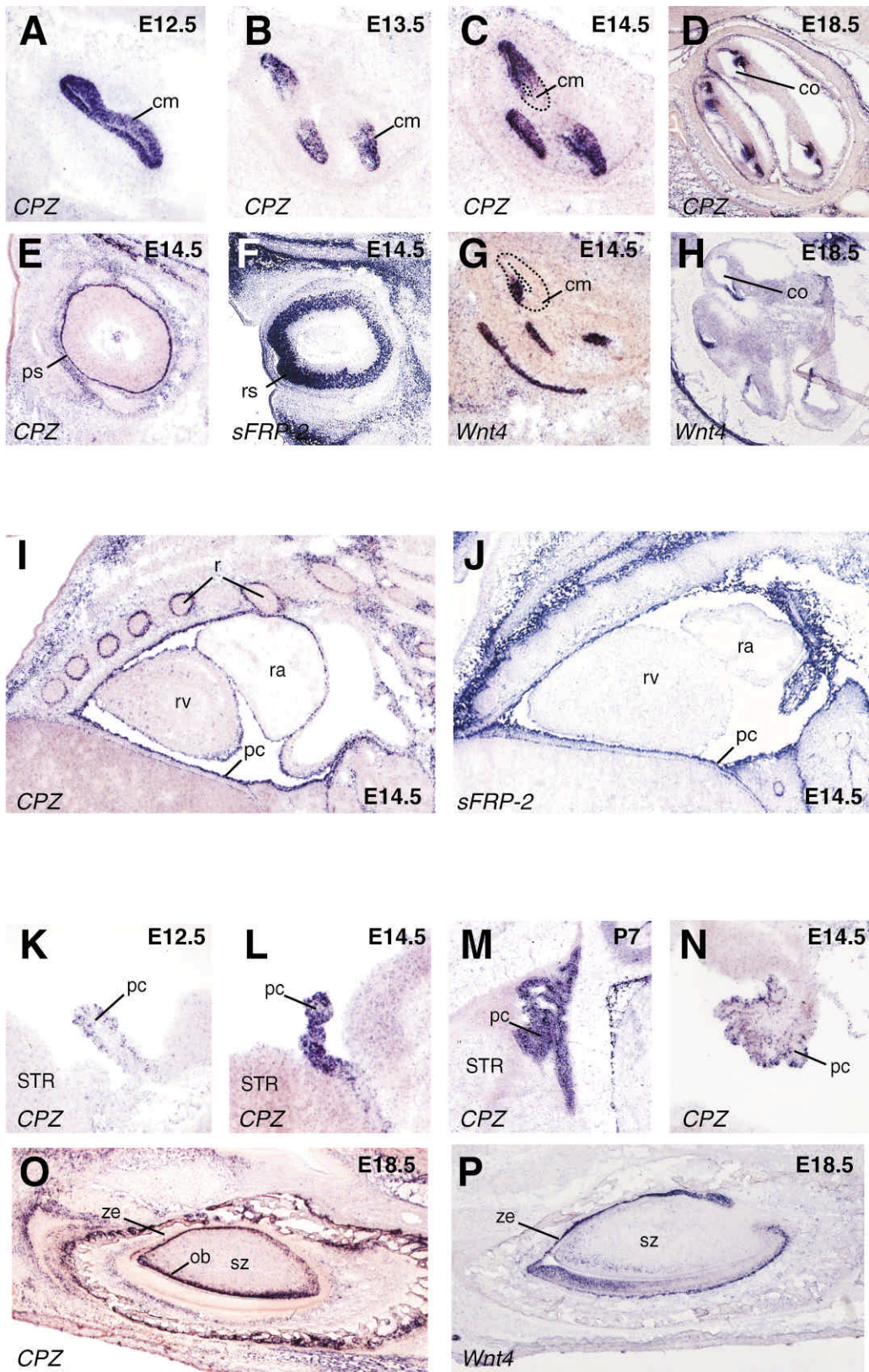


Abbildung 14: Expression von *CPZ* in verschiedenen Regionen der späten Mausedbryogenese. (A)-(D): Expression in der Cochlea-Entwicklung. Bei E12.5 sind *CPZ*-Transkripte im gesamten Mesenchym der Cochlea zu sehen (A), die sich aber in den späteren Stadien auf die äußeren Bereiche dieses Mesenchyms beschränken ((B) und (C)). Die gestrichelten Linien in (C) zeigen den Bereich des Cochlea-Mesenchyms an, der keine *CPZ*-Expression aufweist. Bei E18.5 ist *CPZ* im Cortischen Organ der Cochlea exprimiert (D). (E) Expression von *CPZ* in der Pigmentschicht des Auges bei E14.5. (F) *sFRP-2* ist im Vergleich dazu in der Retina-bildenden

Schicht transkribiert. (G) und (H) Expression von *Wnt4* im inneren Ohr bei E14.5 und E18.5. Die Expression von *Wnt4* ist zu der von *CPZ* teilweise komplementär (der gestrichelte Bereich in (G) zeigt das Cochlea-Mesenchym an, welches kein *Wnt4* exprimiert). (I) Expression von *CPZ* im Perikard und im Perichondrium der Rippen bei E14.5. (J) *sFRP-2* ist bei E14.5 ebenfalls im Perikard exprimiert. (K)-(N). Expression von *CPZ* im Plexus Choroideus. *CPZ*-Transkripte sind in den Plexi Choroidei der Seitenventrikel detektierbar, sobald diese gebildet werden (E12.5). Die Expression in diesen Strukturen wird während der nachfolgenden Embryonalentwicklung beibehalten und ist auch postnatal noch zu sehen (L)(M). *CPZ*-Transkripte sind auch in den Plexi Choroidei der anderen Ventrikel zu detektieren, wie z.B. in dem des 4.Ventrikels (N). (O) Expression von *CPZ* im Schneidezahn bei E18.5. Die Expression von *CPZ* ist auf die Schicht der Odontoblasten beschränkt. (P) Im Vergleich dazu zeigt *Wnt4* hauptsächlich Expression in der äußeren Zahnschmelzschicht. Abkürzungen: cm – Cochlea-Mesenchym, co – cortisches Organ, ob – Odontoblasten, pc – perikard, ps – Pigmentschicht, r – Rippe, ra – rechtes Atrium, rs – Retinaschicht, rv – rechter Ventrikel, pce – Plexus Choroideus, STR – Striatum, sz – Schneidezahn, ze – äußeres Zahnschmelzepithel.

Ab E12.5 ist *CPZ* im Mesenchym des Ohrvesikels bzw. im Cochlea-Mesenchym exprimiert (Abb. 14 A). Anfänglich sind die Transkripte auf das gesamte Mesenchym verteilt. Ab E13.5 beginnen sich diese dann aber auf den äußeren Teil zu beschränken (siehe Abb. 14 B und C). Bei E18.5 ist *CPZ*-Expression im Cortischen Organ zu sehen (D). Interessanterweise zeigt ein Vergleich, dass *Wnt4*, das Wnt-Signalmolekül, mit dem *CPZ* interagieren kann und dessen Induktionspotential es verstärkt hat (s.o.), ebenfalls im sich bildenden inneren Ohr exprimiert ist, allerdings in z.T. komplementären Bereichen der Cochlea. Bei E14.5 ist *Wnt4* in einem Teil des Cochlea-Mesenchyms exprimiert, der dem Inneren der Cochlea-Windung zugewandt ist (Abb. 14 G). Bei E.18.5 sind *Wnt4*-Transkripte im direkt am Cortischen Organ angrenzenden Bereich der Cochlea detektierbar (Abb. 14 H).

Ab E 12.5 sind *CPZ*-Transkripte im Perikard des Herzen zu sehen (nicht dargestellt). Diese Expression nimmt bis E14.5 zu (Abb. 14 I), ist bei E18.5 allerdings nicht mehr detektierbar. *sFRP-2* ist ein sezernierter Inhibitor von Wnt-Signalmolekülen, u.a. auch von *Wnt4* (siehe Einleitung). Die Expression von *CPZ* im Perikard ist zu der von *sFRP-2* ähnlich, im Auge zeigen diese beiden Gene aber ein komplementäres Expressionmuster: *sFRP-2* ist in der Retina-bildenden Schicht des Auges detektierbar, *CPZ* zeigt Expression in der umgebenden Pigmentschicht (vergleiche Abb. 14 E mit F, bzw. Abb. 14 I mit J).

CPZ ist des Weiteren in den Plexi Choroidei aller Gehirnvatrikel exprimiert, beginnend mit ihrer Entwicklung bei E12.5 bis in das postnatale Entwicklungsstadium hinein (Abb. 14 K-N).

Ein weiterer Bereich komplementärer Expression von *CPZ* und *Wnt4* ist bei E18.5 in den Schneidezähnen zu finden: *CPZ* ist in der Schicht der Odontoblasten transkribiert, wohingegen *Wnt4* hauptsächlich im äußeren Zahnschmelzepithel zu finden ist (vergleiche Abb. 14 O und P).

Weitere Expressionsareale von *CPZ* während der Mausembryogenese, auf die hier nicht eingegangen wird, sind das Perichondrium der Rippen (Abb. 14 I), die Meningen, das Peritoneum der inneren Organe sowie Weichgewebe in Ober- wie Unterkiefer.

Die Expression von *CPZ* im adulten Tier wurde mit Hilfe von Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Eingesetzt wurde hierbei der Mouse MTN Blot (Clontech, USA) entsprechend der Herstellerangaben.

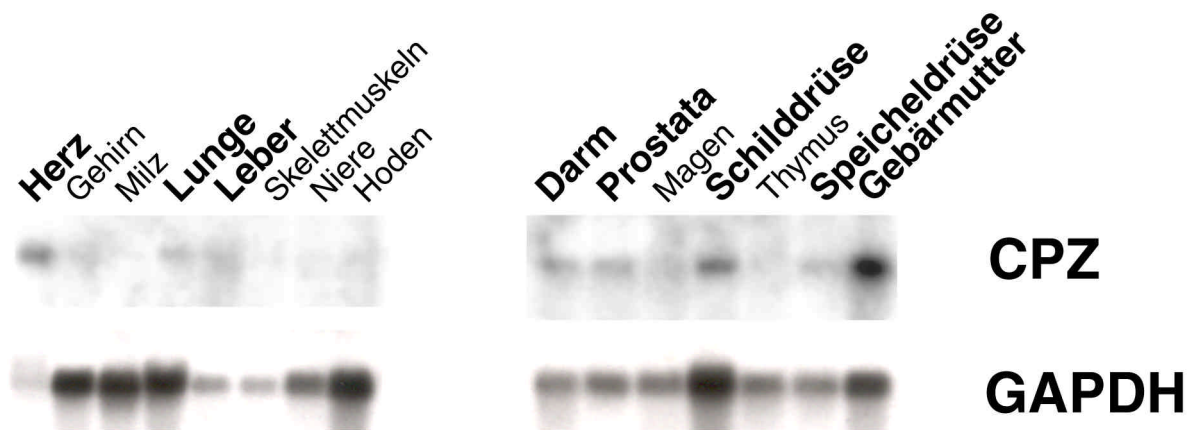


Abbildung 15: Northern Blot-Analyse von CPZ mit RNA aus verschiedenen Geweben der adulten Maus. Oben: CPZ-mRNA wird in Herz, Lunge, Leber, Darm, Prostata, Schilddrüse, Speicheldrüse und Gebärmutter detektiert. Die fett gedruckten Gewebe zeigen Expression von *CPZ*. Unten: GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als Ladungskontrolle.

CPZ ist in der Schilddrüse, der Gebärmutter und im Herz stark, in Darm, Prostata, Leber Lunge und Speicheldrüse schwach exprimiert (Abb. 15). Interessanterweise wird nur ein Transkript von CPZ detektiert (ca. 2.5 kb). Dies steht zwar im Einklang mit publizierten Ergebnissen bei der Ratte (Xin et al., 1998b), ist allerdings konträr zu Daten mit der humanen CPZ, für die mehrere Transkriptgrößen beschrieben worden sind (Song & Fricker, 1997) (siehe Diskussion).

3.4.2 Herstellung eines mutierten Alleles für das CPZ-Gen in der Maus

3.4.2.1 Charakterisierung des genomischen Lokus des CPZ-Gens in der Maus

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer CPZ-defizienten Mauslinie. Hierzu sollte ein so genannter Targetingvektor durch homologe Rekombination in den Genlokus von CPZ eingefügt werden (Capecchi, 1989) und durch geeignete Modifikation der endogenen Sequenz die Synthese eines funktionalen CPZ-Proteins verhindern. Zur Herstellung des Targetingvektors war es daher nötig, den bis dahin unbeschriebenen Genlokus von CPZ in der Maus zu isolieren und zu charakterisieren (zu Beginn dieser Experimente war die Sequenz des Mausgenoms weder öffentlich zugänglich noch kommerziell verfügbar). In einem ersten Schritt wurde hierzu eine genomische Phagenbibliothek mit einer murinen CPZ-cDNA-Sonde hybridisiert (siehe Materialien und Methoden). Von den so isolierten Phagenklonen enthielt nur einer tatsächlich den Genlokus von CPZ. Dieser Phagenklon wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III verdaut und die entstandenen Restriktionsfragmente subkloniert. Diese so genannten Shotgunklone wurden durch Sequenzierung, Restriktionsanalyse und Southern Blot-Analyse charakterisiert wodurch eine Restriktionskarte des Genlokus von CPZ erstellt werden konnte (siehe Abb. 16, die nicht aus dem Cosmid gewonnenen Informationen wurden durch Datenbankanalyse erhalten). Da *Eco*RI gar nicht und *Hind*III nur in der 3'-terminalen Hälfte des Lokus schneidet, wurde der im Cosmid vorhandene 5'-Bereich durch Doppelverdau mit *Eco*RI und *Hind*III isoliert. Das CPZ-Gen ist in elf Exons aufgegliedert und überspannt einen Bereich von wenigstens 23 kb auf dem Chromosom 5 der Maus. Das Signalpeptid sowie die direkt C-terminal folgende Sequenz werden von den ersten beiden Exons kodiert, die CRD komplett vom 3. Exon. Die Carboxypeptidase-Domäne ist auf die übrigen 8 Exons aufgeteilt. Das erste Exon war nicht in dem isolierten Cosmid vorhanden. Abb. 16 zeigt eine schematische Darstellung des CPZ-Lokus, der grün markierte Bereich war nicht Inhalt des Cosmidinserts. Die unter dem Lokus angegebenen Fragmente kennzeichnen die Shotgunklone, die zur Erstellung der Restriktionskarte herangezogen wurden. Die Organisation des CPZ-Lokus wurde durch Vergleich mit genomischen Sequenzen der Maus bestätigt (Celera, USA) und im Falle der fehlenden 5'-Region ergänzt.

muriner CPZ-Genlokus, 23 kb, Chromosom 5

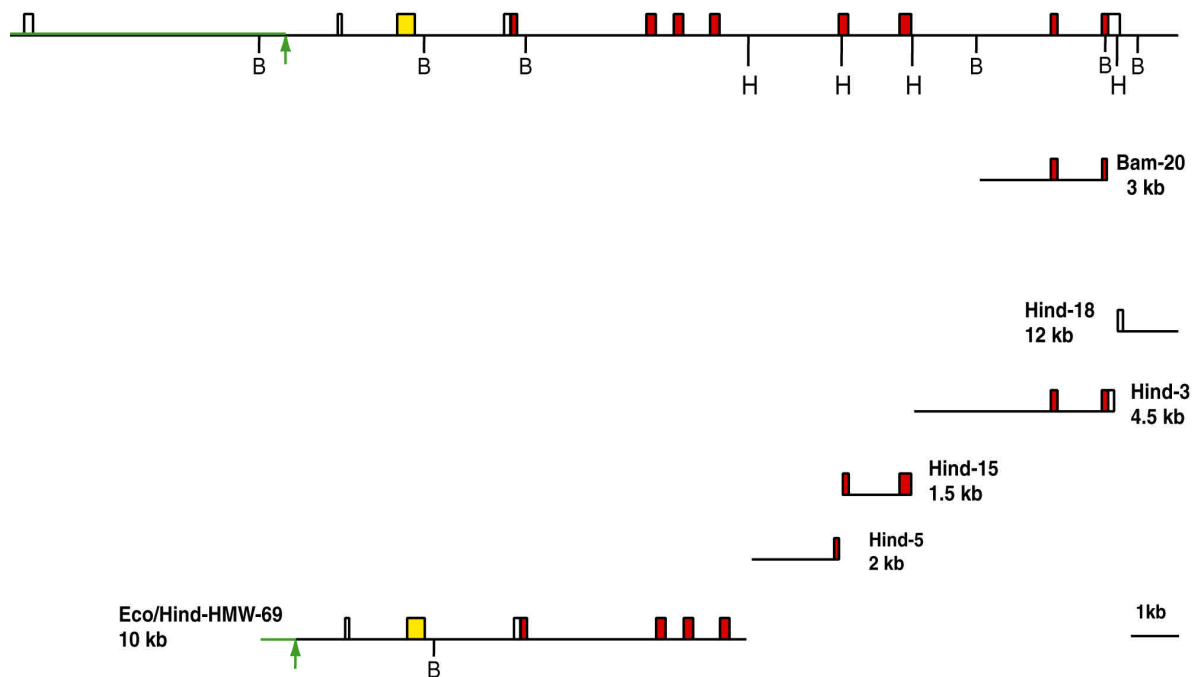


Abbildung 16: Schematische Darstellung des murinen CPZ-Genlokus. Oben: der gesamte Lokus mit seinen wichtigen Restriktionsschnittstellen resultierend aus Analyse der Shotgunklone sowie *in silico*-Analyse. Der grün markierte Bereich des 5'-Endes war nicht im isolierten Cosmid vorhanden (der grüne Pfeil hebt das Ende dieser Sequenz hervor). Unten sind die Shotgunklone gezeigt, die für die Herstellung der Restriktionskarte verwendet worden sind. Die CRD ist gelb gekennzeichnet, die Carboxypeptidase-Domäne überspannt 8 Exons und ist rot dargestellt. Die Längenverhältnisse zwischen den Intron- und den Exonabschnitten entsprechen nicht ganz den tatsächlichen Sequenzlängenverhältnissen, die Exons sind der Übersicht wegen vergrößert dargestellt. Abkürzungen: B – *Bam*HI-Schnittstelle, H – *Hind*III-Schnittstelle.

3.4.2.2 Herstellung des Targetingvektors

Der Shotgunklon Eco/Hind-HMW-69 wurde als Ausgangskonstrukt für die Herstellung des Targetingvektors ausgewählt und entsprechend modifiziert. Das dritte Exon wurde für die Insertion einer Selektionskassette ausgewählt (die Insertionskassette wurde freundlicherweise von A. Kispert und M. Leitges zur Verfügung gestellt). Nach Insertion der Kassette in das Exon sollte bei der Transkription eine um die eingefügte Sequenz verlängerte mRNA entstehen. Die Kassette bestand konsekutiv aus einem IRES-Element (*internal ribosomal entry site*-interne ribosomale Eintrittsstelle), dem bakteriellen β -Galaktosidasegen, einem PolyA-Signal sowie einer von *LoxP*-Erkennungsstellen flankierten Neomycin-Resistenz (Abb. 17). Das IRES-Element soll bei der Translation der mutierten mRNA zum Translationsabbruch sowie einer Translationsinitiierung 3' von dieser Sequenz führen (Jackson et al., 1990). Dies hat bei einer erfolgreichen Integration in das 3. Exon zur Folge, dass vom CPZ-Gen nur die ersten beiden Exons translatiert werden, also das Signalpeptid und die unmittelbar

anschließende Sequenz, die CRD fehlt dann größtenteils, die Peptidase-Domäne komplett (die Integration erfolgte so, dass nur die ersten 22 Aminosäuren der CRD translatiert werden).

Herstellung des Targeting-Vektors

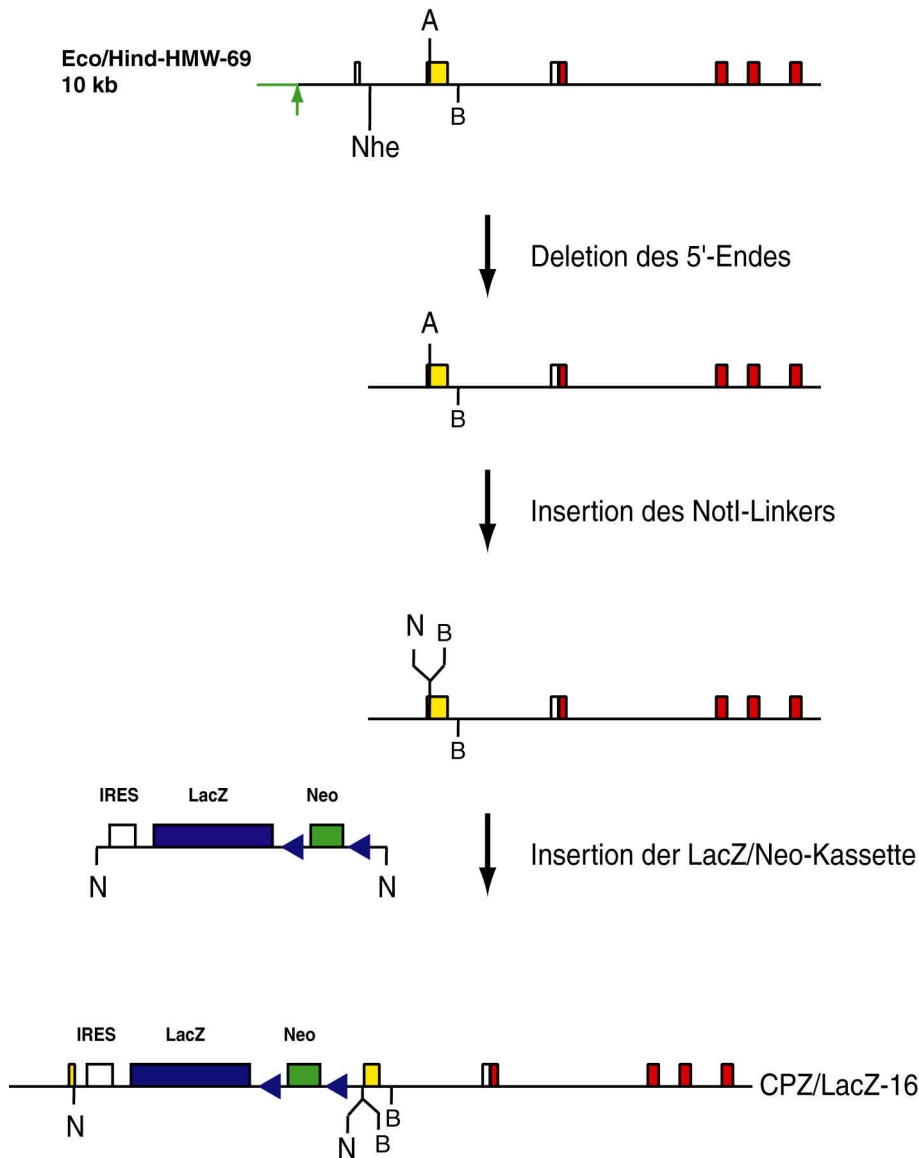


Abbildung 17: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Herstellung des Targetingvektors für CPZ (für Details siehe bitte Text). Das 3. Exon des CPZ-Lokus ist gelb dargestellt, die Carboxypeptidase-Domäne rot. Der grüne 5'-Sequenzabschnitt ist ein Teil der Cosmid-Sequenz, der durch die Shotgun-Klonierung in den Klon Eco/Hind-HMW-69 eingefügt worden ist. Er umfaßt ca. 300 bp. Abkürzungen: B – *Bam*HI-Schnittstelle, N – *Not*I-Schnittstelle, Nhe – *Nhe*I-Schnittstelle.

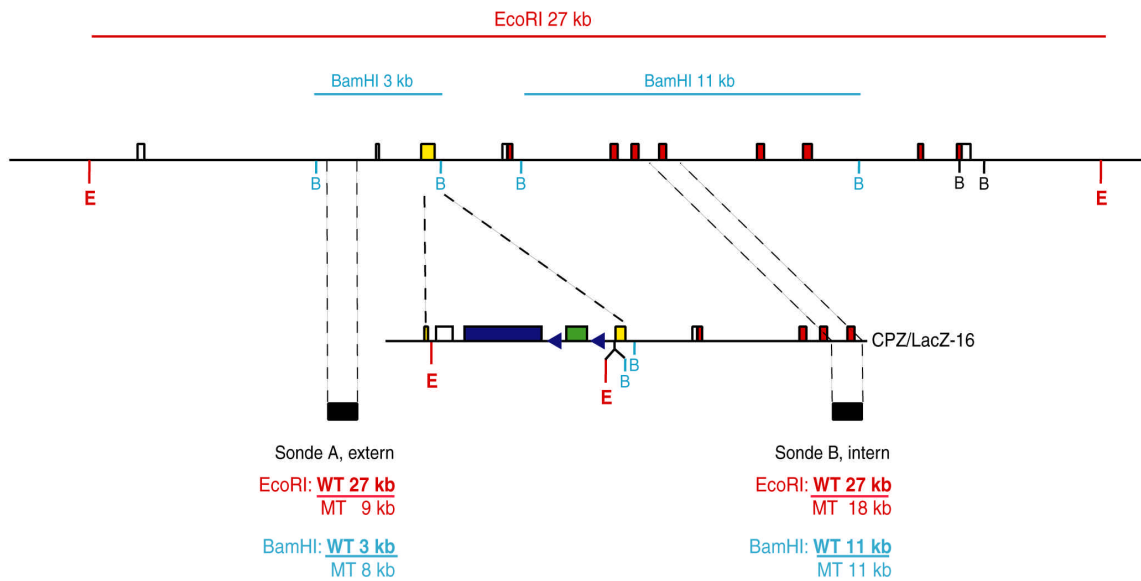
Die Insertion des bakteriellen Galaktosidase-Gens unter Einfluss des endogenen CPZ-Promotors sollte eine Detektion der Promotoraktivität erlauben, das PolyA-Signal sollte zu einem Transkriptionsabbruch führen. Die Neomycin-Resistenz war vom CPZ-Promotor unabhängig und wurde konstitutiv aktiviert.

In einem ersten Schritt wurden aus Konstrukt Eco/Hind-HMW-69 die 5'-terminalen 1.6 kb des Inserts über einen Verdau mit *EcoRI* und *NheI* und anschließende Religation deletiert. Dieses deletierte Fragment des CPZ-Lokus diente später als externe Sonde zum Test auf den so eingefügten Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) (Abb. 17). In die *AgeI*-Schnittstelle des 3. Exons wurde dann ein doppelsträngiges Oligonukleotid inseriert, welches in die Schnittstelle nacheinander eine *NotI*- und eine *BamHI*-Schnittstelle einfügte. Beide Enzyme schneiden nicht in der Selektionskassette, *NotI* wurde zur Insertion der Kassette verwendet, die *BamHI*-Schnittstelle fügte den RFLP ein: Durch die Insertion der Kassette (ohne *BamHI*-Schnittstelle) wurde das das 3. Exon beinhaltende genomische 3kb-*BamHI*-Fragment um die Größe der eingefügten Kassette verlängert (5kb, s.u.). Anschließend wurde die Selektionskassette über *NotI* in den Targetingvektor inseriert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung auf die vollständige Insertion sowie die richtige Orientierung hin überprüft. Der so hergestellte CPZ-Targetingvektor hatte einen Homologiebereich von 9 kb und einen so genannten kurzen Arm von ca. 1.1 kb. Diese Größenverhältnisse gewährleisteten in der Regel eine hohe Frequenz homologer Rekombinationsereignisse (Hasty et al., 1991a; Hasty et al., 1991b).

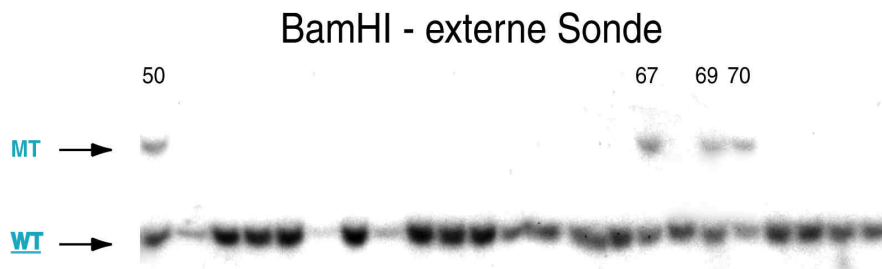
3.4.2.2 Etablierung der CPZ-defizienten Mauslinie

Zur Etablierung der CPZ-defizienten Mauslinie wurden pluripotente E14.1-Stammzellen mit linearisierten Targetingvektor wie im Materialien und Methoden-Teil beschrieben transfiziert und selektiert. Die selektierten Klone wurden in einer Southern Blot-Analyse mit Hilfe der Sonde A (siehe Abb. 18) auf eine homologe Rekombination des Targetingvektors hin überprüft. Von 300 selektierten und getesteten ES-Zellklonen zeigten 8 ein solches Rekombinationsereignis. Dies entspricht einer Frequenz von ungefähr 1:40, d.h. eine homologe Rekombination auf 40 randomisierte Integrationen des Targetingvektors in das Mausgenom (Abb. 18 B, vier dieser Klone mit homologer Insertion sind exemplarisch dargestellt). Von den isolierten 8 positiven ES-Zell-Klonen wurden 5 expandiert und einer weiteren Analyse unterzogen. Zuerst wurde mit Hilfe der Sonde A (extern) das Ergebnis der ersten Southernblot-Analyse bestätigt (Abb. 18 C links). Die Southern Blot-Analyse mit der Vektor-internen Sonde B bestimmt die Integrationshäufigkeit; bei einer zusätzlichen Integration ins Genom sollte sie mehr als die detektierte Bande zeigen (Abb. 18 C links). Die Restriktionsanalyse mit beiden Sonden wurde auch noch nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt. Beide Southern Blot-Analysen zeigten die erwarteten Banden (vergleiche Abb. 18 A mit C, rechts). Der Targetingvektor ist in den charakterisierten Klonen nur einmal ins Genom eingefügt worden und zwar an homologer Position.

A



B



C

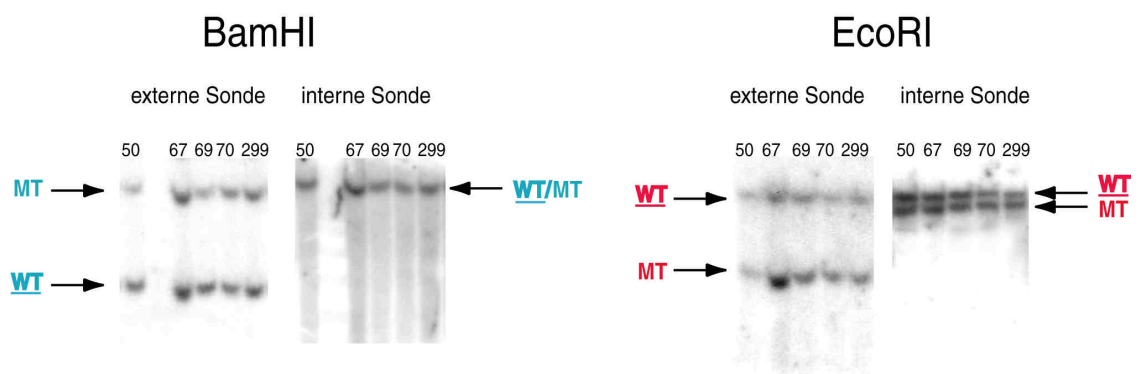


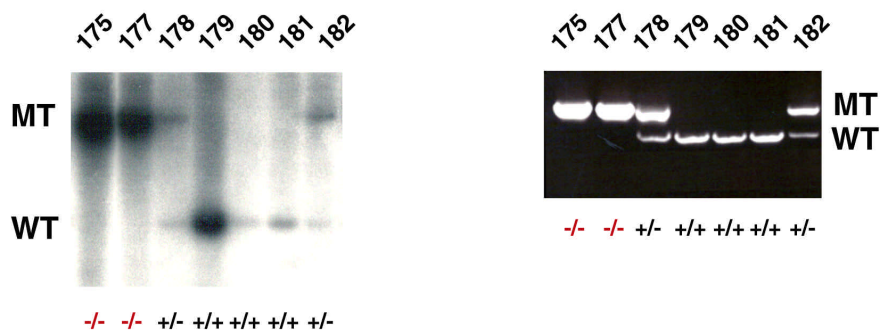
Abbildung 18: Herstellung von ES-Klonen mit homologer Insertion des CPZ-Targetingvektors. (A) Restriktionskarte des murinen CPZ-Lokus unter Einbeziehung der relevanten Schnittstellen. Im Wildtyp-Allel entsteht bei Verdau mit *EcoRI* ein 27 kb-Fragment (rot, WT), welches von beiden Sonden detektiert wird. Im Falle der Insertion werden 2 *EcoRI*-Schnittstellen eingefügt, die externe Sonde A erkennt so ein 9 kb-Fragment, die interne Sonde B ein 18 kb-Fragment (MT). Bei einem Verdau mit *BamHI* entstehen im Wildtyp-Allel zwei Fragmente (beide hellblau): ein 3 kb-Fragment, welches von der externen Sonde A erkannt wird, und ein 11 kb-Fragment, das von der internen Sonde B detektiert wird (beide WT). Im Falle der homologen Rekombination wird in das erstgenannte Fragment eine weitere *BamHI*-Schnittstelle sowie eine 5kb-lange Sequenz eingefügt. Das durch Sonde A detektierte Fragment ist so 8 kb groß, die interne Sonde B detektiert immer noch das gleiche 11 kb – Fragment (beide WT). (B) Beispiel von vier ES-Zellklonen, die ein homologes Rekombinationsereignis

zeigen (die negativen Klone sind nicht gekennzeichnet). Dargestellt ist die Southern-Blot-Analyse von selektierten ES-Zellklonen nach *Bam*HI-Verdau und Hybridisierung mit der externen Sonde A. (C) Fünf ES-Klone, die in der ersten Southern-Blot-Analyse positiv waren, wurden expandiert und einer vollständigen Analyse wie in (A) gezeigt unterzogen (vier der Klone sind in (B) dargestellt). Alle fünf ES-Zellklone zeigen die erwarteten Fragmente in der Analyse, sie alle haben den Targetingvektor nur einmal in das Genom inseriert, vollständig und an homologer Position. Abkürzungen: B – *Bam*HI-Schnittstelle, E – *Eco*RI-Schnittstelle, MT – mutiertes Allel, WT – Wildtyp-Allel.

Zur Herstellung chimärer Mäuse wurden die mutierten ES-Zellklone No. 69 und No. 79 in NMRI-Blastocysten injiziert. Die Manipulation der Embryonen wurden von M. Leitges und F. Kruse durchgeführt. Die entstandenen männlichen Chimäre wurde dann mit NMRI-Weibchen verpaart, um eine Keimbahntransmission anhand der Fell- und Augenfarbe in der F1-Generation zu überprüfen. Drei eingesetzte chimäre Böcke produzierten insgesamt 11 Tiere, die eine solche Keimbahntransmission vorwiesen. Von diesen 11 Tieren der F1-Generation waren 4 heterozygot, d.h. sie trugen ein mutiertes CPZ-Allel (drei Weibchen und ein Bock) (siehe Abb. 19 B). Die anderen 7 Tiere mit Keimbahntransmission entsprachen dem Wildtyp-Genotyp. Die heterozygoten Mäuse wurden dann mit Wildtyp-NMRI-Tieren verpaart, um die Anzahl heterozygoter Mäuse zu erhöhen (Abb. 19 B, F2). Die Tiere der F2-Generation wurden zur Herstellung homozygoter CPZ^{-/-}-Mäuse miteinander verpaart. Die Vererbung des CPZ-Alleles erfolgt nach Mendelschen Regeln, von 91 Tieren der F3-Generation waren 26 homozygot für das CPZ-Allel, 46 heterozygot und 19 entsprachen dem Wildtyp (Abb. 19 B). Abb. 19 A zeigt ein Beispiel einer Genotypisierung von Nachkommen einer Heterozygoten-Verpaarung (links Southernblot-Analyse, rechts PCR-Genotypisierung der gleichen Mäuse). Es sind sowohl homozygote Mäuse (#175 und #177), wie heterozygote (#178 und #182) als auch Wildtyp-Mäuse zu sehen (#179, #180, #181). Eine Analyse von E10.5 Embryonen ergab, dass weder mit RT-PCR noch im Northern Blot-Verfahren CPZ-Transkripte detektierbar waren, der Transkriptionsabbruch durch die eingefügte Kasette ist erfolgreich. Bei der RT-PCR wurde ein Primerpaar gewählt, welches die Insertionskasette überspannt und im Falle des mutierten Alleles kein Produkt ergibt; der Northernblot wurde mit den 5'terminalen 1.2 kb von CPZ als cDNA-Sonde hybridisiert, im Falle eines Transkriptionsabbruchs nach dem PolyA-Signal der Insertionskasette ist kein Transkript detektierbar (Abb. 19 C).

Die CPZ^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und zeigen im Vergleich zu ihren heterozygoten bzw. Wildtyp-Geschwistern keinen offensichtlichen Phänotyp (Abb. 19 D). Eine Skelettpräparation ergab, dass alle Knochen vorhanden waren und die gleichen Größenverhältnisse vorwiesen. Abb. 19 E zeigt beispielhaft das Präparat des rechten Vorderlaufes einer CPZ^{-/-}-Maus im Vergleich mit dem entsprechenden Präparat einer Wildtyp-Maus aus dem gleichen Wurf. Es ist kein Unterschied zu erkennen.

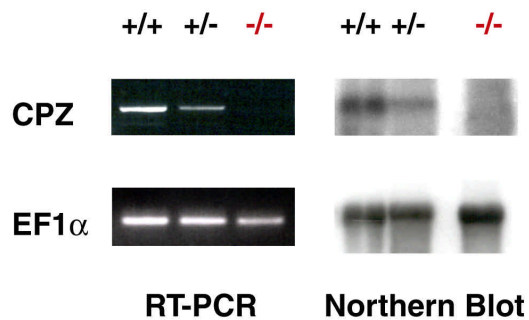
A



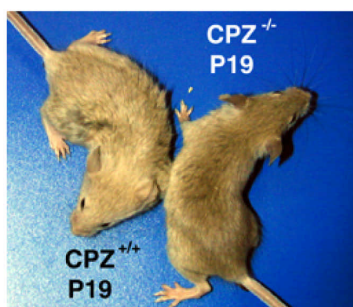
B

	+/+	+/-	-/-
F1 (11 total)	7	4	-
F2 (119 total)	52	67	-
F3 (91 total)	19	46	26

C



D



E

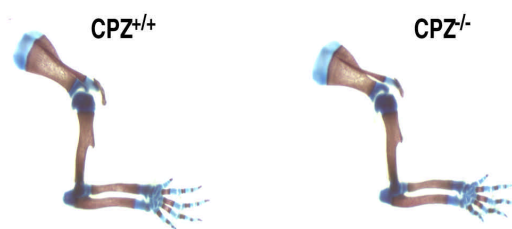


Abbildung 19: (A) Beispiel einer Genotypisierung von Nachkommen einer Heterozygoten-Verpaarung (links Southern-Blot-Analyse, rechts PCR-Genotypisierung der gleichen Mäuse). Es sind sowohl homozygote Mäuse (#175 und #177), wie heterozygote (#178 und #182) als auch Wildtyp-Mäuse zu sehen (#179, #180, #181). (B) Tabellarische Darstellung der Genotypverteilung der ersten drei Generationen. Das CPZ-Allel vererbt sich entsprechend den Mendelschen Regeln. (C) Analyse der CPZ-Transkripte mittels RT-PCR (links) und Northern Blot (rechts). In den heterozygoten Tieren ist ca. die halbe Transkriptkonzentration mit beiden Analyseverfahren zu sehen, in den CPZ^{-/-}-Mäusen fehlen sie vollständig. (D) Die CPZ^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und zeigen im Vergleich zu ihren Geschwistern keinen äußerlich unterschiedlichen Phänotyp. Beispiel einer CPZ^{-/-}- und ihrer Wildtyp-Geschwistermaus. Es handelt sich bei den gezeigten Tieren um 19 Tage alte Weibchen (E) Skelettpräparation der rechten Vorderläufe einer Wildtypmaus (links) und einer CPZ^{-/-}-Maus (rechts) aus einem Wurf am Tag der Geburt. Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Präparaten zu erkennen.

3.5 Expressionsanalyse von *Lix1* in der Embryogenese der Maus

Lix1 (*Limb expression-1*) ist ein neues Gen bisher unbekannter Funktion und ohne Ähnlichkeit zu bekannten Proteinsequenzen. Es besitzt Homologe in den Organismen Maus, Mensch, Huhn, *Drosophila* und im Zebrafisch *Danio rerio* (Swindell et al., 2001, und E.C. Swindell, persönliche Mitteilung). Im Hühnerembryo ist *Lix1* transient in der Beinanlage, in den Rhombomeren 3 und 5, sowie in den Vorläufergeweben des Gesichtes (mit Ausnahme der mandibularen Komponente des ersten Kiemenbogens) und der AIP (*AIP-anterior intestinal portal*) exprimiert. Die Einschränkung der Expression in der Gliedmaßenentwicklung auf die Beinanlage, bzw nur Vorder- oder Hinterextremitätenanlage teilt *Lix1* mit einer kleinen Gruppe von Genen, die bei der Bestimmung der Gliedmaßenidentität eine Rolle spielen (siehe Einleitung). Um einen Einblick in die mögliche Funktion von *Lix1* zu bekommen, wurde das Expressionsmuster von *Lix1* während der Embryogenese der Maus bestimmt.

***Lix1*-Expression im frühen Mäuseembryo von E8 – E11.5**

Lix1-Transkripte sind erstmals im E8.0 Embryo im den Primitivstreifen umgebenden Neuroepithel zu sehen (Abb. 20 A). Die Expression in dieser Region des Embryos ist bis E9.5 zu detektieren (Abb. 20 C, D), danach nimmt sie ab. Von E10.5 an ist sie nicht mehr zu sehen. Von E8.5 an ist *Lix1* im Neuroektoderm der Kopffalte sichtbar (Abb. 20 B-G). Bei E9.5 manifestiert sich diese Expression in den Vorläufergeweben aller drei Hirnregionen: Prosencephalon, Mesencephalon und Metencephalon (Abb. 20 C). Entgegen der Situation im Hühnchen ist *Lix1* in der Maus sowohl in den Vordergliedmaßen als auch in den Beinanlagen exprimiert. Diese Expression beginnt dem unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkt beider Anlagen entsprechend zuerst in der Vordergliedmaßenanlage im lateralen Mesoderm bei E 8.5 (Abb. 20 B, D, E) und ist danach im Mesenchym der sich bildenden Gliedmaße gut sichtbar (Abb. 20 C). Ab E10 ist *Lix1* dann auch in der Hintergliedmaßenanlage erkennbar (Abb. 20 H, I). Die Expression ist in den Gliedmaßen bei E11.5 auf das distale und das kondensierende Mesenchym beschränkt (Abb. 20 I, links und unten rechts).

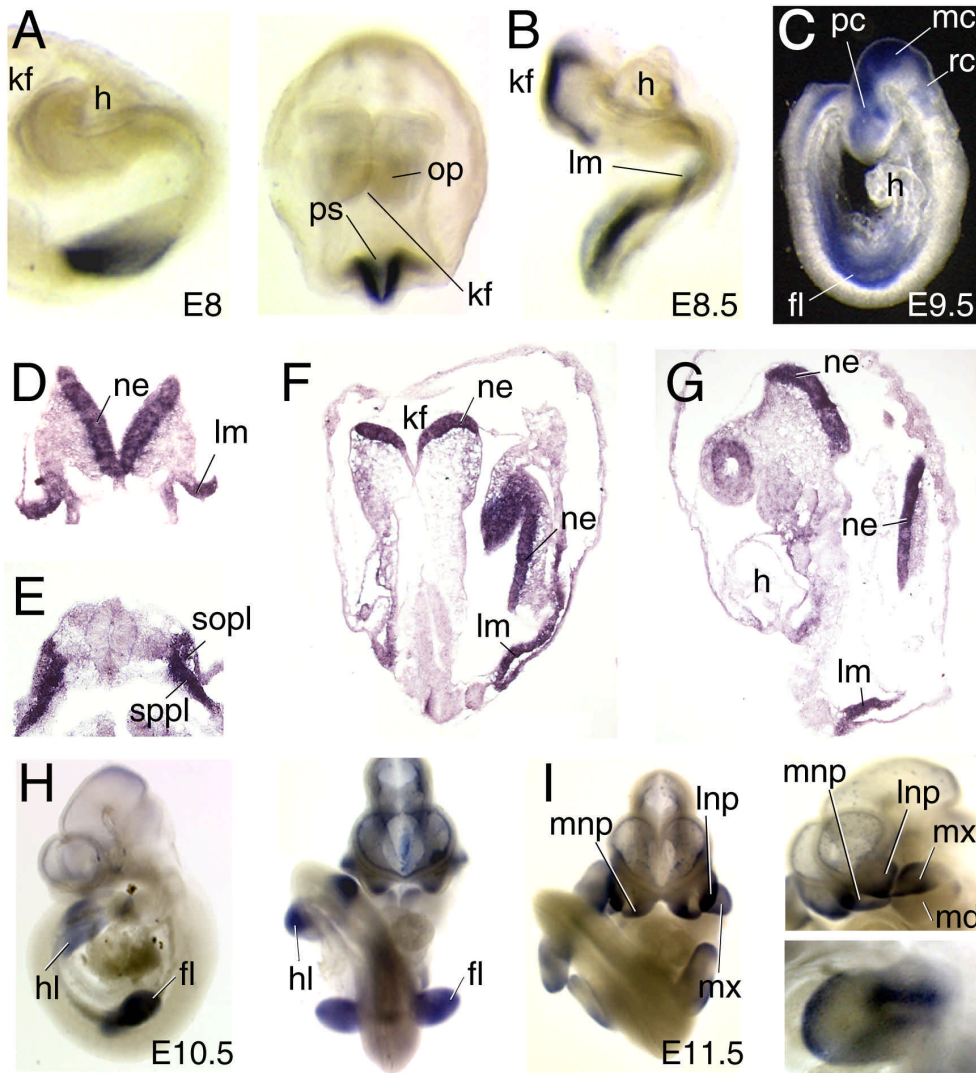


Abbildung 20: Expression von *Lix1* in der frühen Entwicklung der Maus von E8 bis E11.5. (A) Expression in der Region des Primitivstreifens in einem E8 Embryo, links ist die laterale Ansicht des Embryos zu sehen, rechts eine frontale Sicht auf den gleichen Embryo. (B) *Lix1*-Expression in einem E8.5 Embryo. Transkripte werden im Neuroektoderm der Kopffalte und des Primitivstreifens sowie im lateralen Mesoderm detektiert. (C) Expression in einem E9.5 Embryo. (D, E) Transversale Schnitte eines E8.5 Embryos in der Schwanz- bzw. Rumpfregeion. (D) *Lix1* ist im Neuroepithel, das den Primitivstreifen umgibt, sowie dem lateralen Mesoderm zu sehen. (E) Wenn sich das laterale Mesoderm in das Somatopleura und das Splanchnopleura aufteilt, bleibt *Lix1* in beiden Bestandteilen exprimiert. (F, G) Horizontaler bzw. sagittaler Schnitt durch einen E8.5 Embryo. *Lix1*-Expression ist im Neuroepithel der Kopffalte und der Schwanzregion sowie im lateralen Mesoderm zu sehen. (H) Im E10.5 Embryo ist *Lix1* in beiden Gliedmaßenanlagen sowie in Vorläufern des Gesichts exprimiert (links laterale, rechts frontale Sicht auf denselben Embryo). (I) Expression von *Lix1* im E11.5 Embryo. Transkripte werden in den medialen und lateralen nasalen Ausläufern sowie der maxillaren Komponente des ersten Kiemenbogens detektiert (links und oben rechts). In den Gliedmaßenanlagen ist die Expression auf das distale wie kondensierende Mesenchym beschränkt (links und unten rechts). Abkürzungen: fl – forelimb (Vordergliedmaßenanlage), h – Herz, hl – hindlimb (Hintergliedmaßenanlage), kf – Kopffalte, lm – laterales Mesoderm, lnp – lateral nasal process (lateraler Ausläufer des Nasenvorläufergewebes) mc – Mesencephalon, md – Mandibulare Komponente des ersten Kiemenbogens, mnp – medial nasal process (medialer Teil des Nasenvorläufergewebes), mx – Maxillarkomponente des ersten Kiemenbogens, op – optische Plakode, ne – Neuroepithel, pc – Prosencephalon, ps – Primitivstreifen, rc – Rhombencephalon, topl – Somatopleura, spl – Splanchnopleura.

Die Expression von *Lix1* in den Vorläuferstrukturen des Gesichtsfeldes der Maus entspricht denen des Hühnerembryos: Beginnend bei E10.5 sind die Transkripte von *Lix1* auf die Maxillar-Komponente des ersten Kiemenbogens sowie die medialen und lateralen nasalen Ausläufer beschränkt (Abb. 20 I, links und oben rechts).

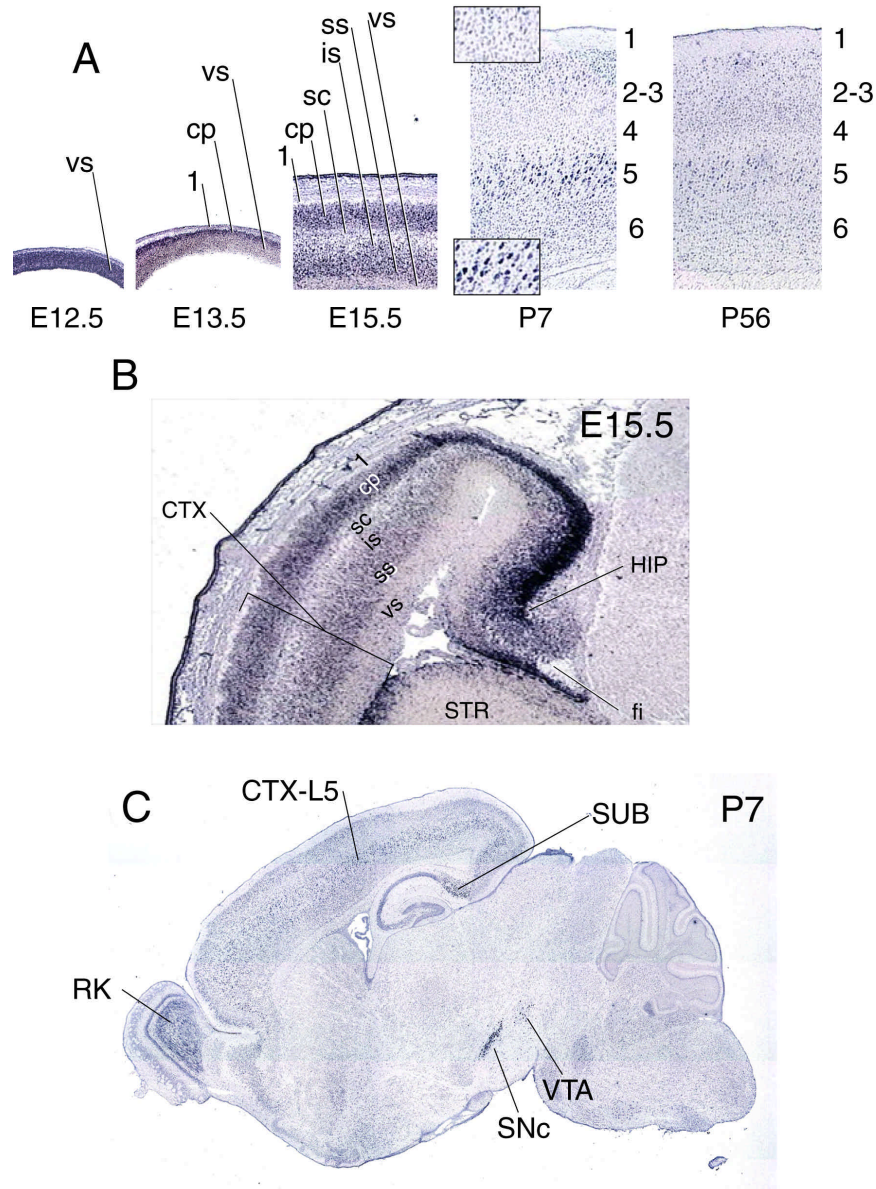


Abbildung 21: Expression von *Lix1* in der Entwicklung des cerebralen Cortex. (A) Aufeinander folgende Stadien der Cortexentwicklung von E12.5 bis P56, für Details siehe bitte Text. (Die Vergrößerungen bei P7 zeigen oben Zellen ohne *Lix1*-Expression und unten *Lix1*-exprimierende Zellen der Corticalschicht 5). (B) Vergrößerte Ansicht des caudalen Cortex und des Hippocampus' eines E15.5 Gehirns. *Lix1* wird in der Corticalplatte und der Subventrikularschicht des Cortex und des Hippocampus' exprimiert. (C) Sagittaler Schnitt durch ein P7 Gehirn. *Lix1* ist in der Cortexschicht 5, dem Subiculum, dem Riechkolben und der pars compacta der Substantia nigra (Schwarzer Kern) exprimiert. Abkürzungen: cp – Corticalplatte, CTX-L5 – Corticalschicht 5, HIP – Hippocampus, is – intermediäre Schicht, RK – Riechkolben, sc – Subcorticalschicht, ss – Subventrikularschicht, SNc – Substantia nigra pars compacta, STR – Striatum, SUB – Subiculum, vs – Ventrikularschicht, VTA – *ventral tegmental area* (ventrales Tegmentum).

Da *Lix1* in der Maus im Gegensatz zum Huhn in den Vorläufergeweben des zentralen Nervensystems (ZNS) ein prominentes Expressionsmuster zeigte, wurden die daraus gebildeten Strukturen in der späteren Embryonalentwicklung untersucht, besonders mit Hinblick auf Entwicklung des Cortex und des Schwarzen Kerns (s.u.).

Nach einer Reduktion des Expressionsniveaus im ZNS zwischen E10 und E12.5 (siehe Abb 20 C, H, I), kam es ab E12.5 wieder zu einem Anstieg. Bei E12.5 waren *Lix1*-Transkripte im gesamten Neuroepithel des Telencephalon sichtbar (Abb. 21 A). Diese Expression ist bei E13.5 auf die Corticalplatte beschränkt, wobei die corticale Expression einen rostrocaudalen Gradienten aufweist: Die jüngeren caudalen Gewebe (z.B. der Hippocampus) zeigten eine wesentlich stärkere Expression als die entwicklungsbiologisch reiferen rostralen Gewebe (Abb. 21 B). Im sich entwickelnden Hippocampus war *Lix1* in der Subventrikularschicht, in der Intermediärschicht und in der Ventrikularschicht des Striatums zu sehen (Abb. 21 B). Im Cortex war die *Lix1*-Expression bei E15.5 auf die Corticalplatte und die Subventrikularschicht beschränkt, bei P7 (postnataler Tag 7) auf die Cortexschicht 5 (Abb. 21. A, C). Die corticale Expression war im adulten Gehirn (P56) kaum noch detektierbar.

Die Expression von *Lix1* im sich entwickelnden Mesencephalon ist komplex. Bei E14.5 zeigte das Neuroepithel des Tegmentums und des inferioren Culliculums Expression (Daten nicht präsentiert). In der zukünftigen Substantia nigra ist erstmals bei E14.5 im Neuroepithel des Tegmentums und der Grenze zwischen Diencephalon und Mesencephalon *Lix1*-Expression zu sehen. Von E15.5 an ist diese in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und im ventralen Tegmentum (VTA-*ventral tegmental area*) sehr prominent (Abb. 22 A). Die Expression von *Lix1* in der SNc ist der bekannter Markergene dieses Areals wie z.B. Tyrosin-Hydroxylase (Gupta et al., 1990) und *Nurr1* (Zetterstrom et al., 1996) sehr ähnlich (Abb. 22 A-A''), wobei die Expressionsdomäne von *Lix1* ein wenig kleiner zu sein scheint. *Lix1* bleibt in der SNc sowie der VTA auch in postnatalen Stadien (Abb. 22 C) bis hin zum Abschluss der Hirnentwicklung sichtbar (Daten nicht präsentiert).

Im Rhombencephalon wurde *Lix1* von E14.5 bis zum adulten Stadium in einer Zellpopulation bisher unbekannter Natur rostradorsal zum Cerebellum detektiert (Abb. 22 B, Sternchen). Zusätzlich findet man Expression in den Ganglien des fünften und siebten cranialen Nerven (Abb. 22 C), den motorischen Nuklei des fünften wie siebten cranialen Ganglions (Abb. 22 B) sowie in Nuklei der sich differenzierenden cranialen Nerven an der Grenze zwischen Medulla Oblongata und Rückenmark (Daten nicht präsentiert). Bei E14.5 zeigen das mediale Neuroepithel am Boden des 4. Ventrikels und das dem Vorläufer des Cerebellums entsprechende Neuroepithel *Lix1*-Expression.

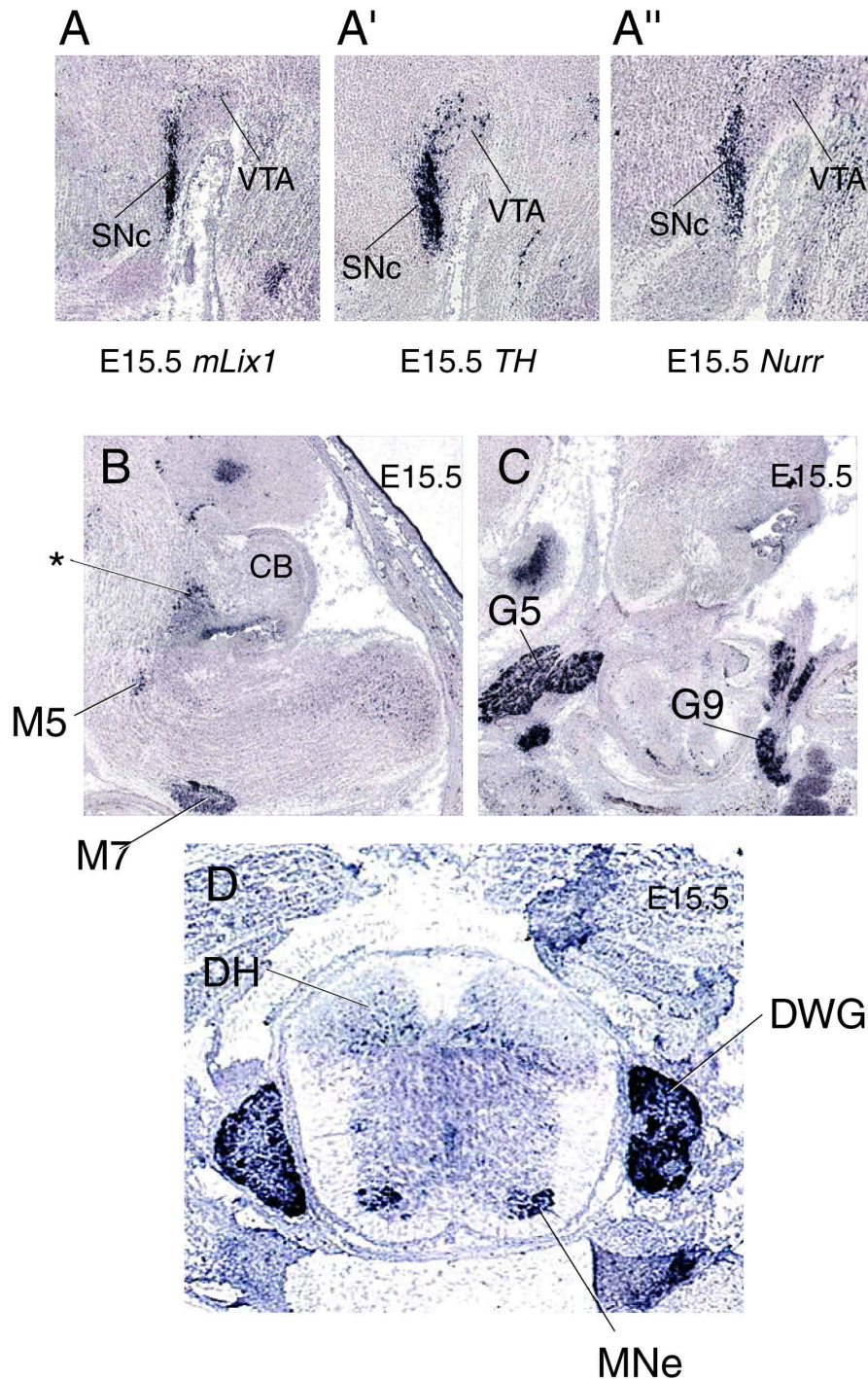


Abbildung 22: Expression von *Lix1* in der Substantia nigra, dem Rhombencephalon und dem peripheren Nervensystem bei E15.5. (A) Vergleich der *Lix1*-Expression in der Substantia nigra mit der Expression bekannter Markergene für dieses Gewebe: Tyrosin Hydroxylase (A') und Nurr1 (A''). (B) Expression bei E15.5 in den motorischen Nuklei des fünften und siebten cranialen Ganglions und in einer unbekanntem Zellpopulation rostral zum sich entwickelnden Cerebellum (siehe Sternchen und Text). (C) *Lix1*-Transkripte sind in den Ganglien des fünften und neunten cranialen Nerve zu sehen. (D) Expression von *Lix1* im Rückenmark. Bei E15.5 zeigen einige Motoneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks sowie einige Interneuronen des dorsalen Horns Expression. Des Weiteren zeigen die dorsalen Wurzelganglien starke Expression. Diese beginnt bei E12.5 (siehe Text für Details). Abkürzungen: CB – Cerebellum, DWG – dorsale Wurzelganglien, DH – dorsales Horn des Rückenmarks, G5 – Ganglion des fünften cranialen Nerve, G9 – Ganglion des neunten cranialen Nerve, M5 – Motornukleus des fünften cranialen Ganglions, M7 – Motornukleus des siebten cranialen Ganglions, MNe – Motoneuronen, SNc – Substantia nigra pars compacta – VTA –ventral tegmental area.

Außerhalb des ZNS konnte *Lix1* ab E12.5 in den dorsalen Wurzelganglien, in einer Gruppe von Motoneuronen sowie Interneuronen des dorsalen Horns des Neuralrohrs (Abb 22 C), in der Linse des Auges und im Vorläufergewebe des Geschlechtsapparates detektiert werden (nicht präsentiert).

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass sich die Expression von *Lix1* in der Embryogenese der Maus wesentlich von der des Huhns unterscheidet: In der Maus ist *Lix1* sowohl in der Vorder- wie der Hintergliedmaßenanlage exprimiert. Die Expression im sich entwickelnden ZNS ist beim Huhn auf die Rhombomere 3 und 5 beschränkt, bei der Entwicklung in der Maus hingegen zeigt *Lix1* ein komplexes Expressionsmuster. Die auffälligsten Expressionsdomänen sind hierbei der sich ausbildende Cortex sowie die Substantia nigra, die auch im adulten Gehirn *Lix1*-Expression zeigt. Die Expression in den Vorläufern des Gesichtes ist bei Maus und Huhn identisch.

Kapitel 4

Diskussion

Die embryonale Entwicklung wird durch verschiedene organisierende Gewebe kontrolliert, die über ihr Zusammenspiel für positionelle Informationen sorgen und spezifische Zelldifferenzierung induzieren. Dieser Prozess wird auch als Musterbildung beschrieben und wurde bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts hinein mittels klassischer manipulativer Experimente analysiert. Mit Einzug molekularbiologischer Methoden konnten diesen Prozessen Gene zugeordnet, sowie ihre Funktionen und Wechselwirkungen bei der Embryogenese bestimmt werden. Eines der am besten studierten Modelle für Musterbildung ist die Gliedmaßenentwicklung im Vertebraten. Die Entwicklung entlang der drei Gliedmaßenachsen wird durch Morphogene der Hedgehog-, Wnt-, BMP- und FGF-Familie reguliert (zur Übersicht siehe: Capdevila & Izpisua Belmonte, 2001). Moleküle dieser Proteinfamilien sind an zahlreichen anderen entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. Eine wichtige Herausforderung stellen allerdings noch das genaue Zusammenspiel dieser Signalwege, deren extra- wie intrazelluläre Regulation sowie die Identifizierung neuer an diesen Prozessen beteiligter Gene und ihre Einordnung in die beschriebenen Signalwege dar. In dieser Arbeit wurden die beiden Gene CPZ und Lix1 mit Hinblick auf ihre Funktion in der Embryonalentwicklung untersucht.

Lix1 ist ein neues Gen unbekannter Funktion, welches in unserer Arbeitsgruppe isoliert worden ist und das in der Embryogenese des Huhnes transiente Expression in verschiedenen Geweben zeigt. In dieser Arbeit wurde die Expression des Homologs aus der Maus analysiert und mit der des Huhns verglichen.

Carboxypeptidase Z gehört zur Familie der CPE/H-Metallo-carboxypeptidasen, denen im Gegensatz zur CPA-Unterfamilie eine regulatorische Funktion durch die Prozessierung ihrer Substrate wie z.B. bei der Sezernierung bioaktiver Neuropeptiden zugeschrieben wird. CPZ wurde erstmals 1997 von Song et al. beschrieben (Song & Fricker, 1997). Gefunden wurde dieses Enzym bei einer Datenbankrecherche auf der Suche nach Carboxypeptidasen, die für die noch vorhandene CP-Aktivität in den sogenannten CPE^{fat}/CPE^{fat}-Mäusen verantwortlich sind (diese Mäuse haben ein mutiertes CPE-

Gen, welches zum Verlust der CPE-Aktivität führt). CPZ enthält neben der Carboxypeptidase-Domäne eine N-terminale, Cystein-reiche Domäne, die ca. 30% Aminosäurehomologie mit der Cystein-reichen Domäne der Frizzled-Proteine zeigt, sowie ein N-terminales Signalpeptid für die Translation ins ER. Für CPZ konnte in einem *in vitro*-Assay mit synthetischen Oligopeptiden eine Aktivität nachgewiesen werden, die ungefähr 10% der CPE-Aktivität entspricht (Novikova & Fricker, 1999; Song & Fricker, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass CPZ in der ECM lokalisiert ist (Novikova et al., 2000). Abseits dieser Eigenschaften gibt es keine Informationen über die biologische Aufgabe von CPZ.

In dieser Arbeit wurde durch die detaillierte Beschreibung der Expressionsmuster der CPZ-Homologe während der Embryogenese der Maus und des Huhnes sowie durch *in vitro*-Studien und *in vivo*-Experimente ein Einblick in die biologische Funktion von CPZ gewonnen.

4.1 Die Expression von *Lix1* in der Embryogenese der Maus

In dieser Arbeit wurde die Expression von *Lix1* während der Embryogenese der Maus beschrieben. Die Proteinsequenz des murinen Homologs von *Lix1* ist zu 83% identisch mit der *Lix1*-Proteinsequenz aus dem Huhn. Unter Einbeziehung konservierter Substitutionen ergibt sich eine Ähnlichkeit von 89%. Genomische Analysen in öffentlichen wie kommerziellen Datenbanken brachten in der Maus sowie im Menschen kein Homolog hervor, welches dem *Lix1* aus dem Huhn ähnlicher ist (Celera, Ensembl). Des Weiteren wurden in cDNA-Bibliotheken, durch RT-PCR (E. C. Swindell, nicht publizierte Daten) sowie durch *in silico*-Analysen keine anderen Homologe im Huhn gefunden. Es wird daher angenommen, dass es sich bei dem hier untersuchten *Lix1* aus der Maus um das Ortholog des *Lix1* handelt, welches im Huhn beschrieben worden ist (Swindell et al., 2001).

Die Expression unterscheidet sich in der Maus von der des Huhnes erheblich in folgenden Punkten: In der Maus zeigt *Lix1* transiente Expression sowohl in der Vorder- als auch in der Hintergliedmaßenanlage, im Hühnerembryo ist hingegen nur eine transiente Expression in der Hintergliedmaßenanlage zu sehen. Das murine Homolog zeigt in der Entwicklung des zentralen wie peripheren Nervensystems ein komplexes Expressionmuster in allen drei Hirnregionen, während im Huhn die neuronale Expression auf die Rhombomere 3 und 5 beschränkt ist. Die Expression in den Vorläufern des Gesichtes ist in beiden Spezies vergleichbar. Die unterschiedliche Expression homologer Gene in verschiedenen Spezies stellt keinen Einzelfall dar, sondern wurde auch für andere Gene beschrieben (siehe zum Beispiel: Sefton et al., 1998).

Die Expression von *Lix1* in der Embryogenese der Maus weist mehrere interessante Eigenschaften auf: 1. *Lix1* zeigt transiente Expression in beiden Gliedmaßenanlagen in der Maus, jedoch nicht im Huhn (s.o.). Dies unterscheidet *Lix1* von bekannten Genen, die mit der Gliedmaßenidentität in Zusammenhang gebracht worden sind, wie z.B. *Tbx4* und *Tbx5*, die in beiden Organsimen ein ähnliches Expressionsmuster besitzen (siehe Einleitung). 2. Die prominente Expression im Cortex (Corticumschicht 5), in der Substantia nigra pars compacta und in den Motoneuronen des Rückenmarks. Die Erforschung der Entwicklung komplexer biologischer Strukturen wie z.B. des Nervensystems wird durch den Einsatz von Markergenen, die spezifisch für bestimmte Substrukturen sind, erleichtert. Mit diesen kann man den Werdegang dieser Strukturen entwicklungsbiologisch sichtbar machen und in zeitliche wie räumliche Relation zu anderen Geweben bringen. Die Entwicklung und Differenzierung des Rückenmarks bzw. seiner Neuronen wird z.B. mit Hilfe zahlreicher Markergene analysiert, die jenes in Subpopulationen spezifischer Expression unterteilen (z.B. *Isl1* und *Isl2* (Sockanathan & Jessell, 1998)). Insbesondere in der Corticumschicht 5 sowie in der Substantia nigra, wo *Lix1* während der kompletten Entwicklung exprimiert ist, kann es als ein solches Markergen fungieren, um die

Entwicklung dieser beiden Strukturen zu verfolgen, für die es bisher nur wenige spezifische Markergene gibt. Die Parkinson'sche Krankheit, eine der am häufigsten auftretenden neurodegenerativen Krankheiten, resultiert aus der Degenerierung dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra pars compacta. Dies führt zu einer reduzierten dopaminergen Signalisierung in das Striatum, was final in den hypokinetischen Symptomen der Krankheit resultiert (DeLong, 2000). Möglicherweise kann Lix1 sich in diesem Zusammenhang als nützlicher Kandidat erweisen, um die Degenerierung dieser Zellen zu verfolgen, besonders weil es dort auch noch im adulten Stadium exprimiert ist.

Aufgrund dieser Expressionseigenschaften drängt sich die Frage nach der biologischen Funktion von Lix1 auf. Da Lix1 über eine so genannte *coiled coil*-Domäne verfügt, eine Proteindomäne, die in Protein-Protein-Interaktionen impliziert ist, ist die Isolierung von Interaktionspartnern über z.B. einen *yeast-two-hybrid*-Screen ein geeigneter Ansatz. Durch die Bestimmung solcher Interaktionspartner kann Lix1 dann möglicherweise einem biologischen Prozess zugeordnet werden.

4.2 Die CPZ-Homologe

Der Vergleich der vier bekannten CPZ-Homologe ergab, dass sich die beiden Homologe aus der Ratte und der Maus am ähnlichsten sind. Die CPZ aus dem Huhn zeigt im Vergleich zu den anderen drei Homologen die höchste Divergenz. Alle vier verfügen über die für die Koordination des Zinkions, für die Substratbindung und für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste der Peptidase-Domäne sowie über die 10 konservierten Cystein-Reste der CRD. Über alle Spezies zeigt die Carboxypeptidase-Domäne die höchste Konservierung, gefolgt von der CRD. Die variabelsten Proteinabschnitte befinden sich unmittelbar N-terminal zur CRD sowie C-terminal zur Peptidase-Domäne (Song & Fricker, 1997; Xin et al., 1998a, sowie die hier präsentierten Daten).

Eine Analyse der zur Verfügung stehenden Genome der drei untersuchten Säugetiere zeigt, dass es in jeder Spezies nur ein Homolog von CPZ gibt. Das des Menschen ist auf Chromosom 4p16.1 lokalisiert, das der Nagetiere in den entsprechenden syntenischen Regionen auf Chromosom 14q21 bei der Ratte bzw. Chromosom 5b1 bei der Maus (Celera, LocusLink, Ensembl; es wurden sowohl die Protein- als auch die Nukleotidsequenzen mit vorhergesagten Genen sowie den gesamten genomischen Sequenzen verglichen). CPZ stellt in Bezug auf die strukturelle Kombination einer CRD mit einer Carboxypeptidase-Domäne eine Einzigartigkeit in diesen Organismen dar. Obwohl das Homolog von CPZ aus dem Huhn (cCPZ) zu den anderen CPZs die höchste Divergenz zeigt (64% Identität der Proteinsequenz im Vergleich zum humanen CPZ, bei Einbeziehung ähnlicher Aminosäuren eine Homologie von 77%) und obwohl das Expressionmuster im Hühnerembryo von der

des Mausembryos abweicht (s.u.), kann davon ausgegangen werden, dass es sich um das entsprechende Ortholog von CPZ im Huhn handelt. Zum einen ist, soweit möglich, in den genomischen Sequenzen der anderen Spezies nur ein Homolog von CPZ zu finden (s.o.). Zum anderen haben cDNA-Array Untersuchungen in unserem Labor nur das beschriebene cCPZ hervorgebracht (E.C. Swindell, nicht publizierte Daten). Des Weiteren wurde in EST-Datenbanken nur das beschriebene Gen gefunden (z.B.: Boardman et al., 2002). Deshalb kann die Existenz eines anderen CPZ-Paralogs im Huhn zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich.

Die Organisation des CPZ-Genlokus in den drei Säugetieren ist ähnlich, alle drei Loci sind durch 11 Exons gekennzeichnet und umspannen ungefähr gleich große genomische Bereiche (23 kb in Ratte und Maus, 27 kb im Menschen). Für die beiden Homologe aus dem Menschen und der Ratte wurden mehrere cDNA-Isoformen beschrieben (Song & Fricker, 1997; Xin et al., 1998a), für die vorgeschlagen wurde, dass es sich um alternative Spleißvarianten handele. Obwohl bei der Isolierung der cDNA von CPZ aus der Maus nicht explizit nach alternativen cDNA-Varianten gesucht worden war, wurden zwei Spleißvarianten gefunden: die im Ergebnisteil beschriebene Version, welche für das vollständige 654 Aminosäuren lange Protein codiert, sowie eine um 33 bp kürzere Version. Die 33 bp-Deletion entspricht der Deletion des zweiten Exons (zwischen Signalpeptid und CRD), ergibt keine Verschiebung des Leserasters und wurde nur in einer geringen Anzahl der Transkripte isoliert (n=2/20). Andere Isoformen bzw. Insertionen in die beschriebene Sequenz wurden nicht gefunden. Dies kann darin begründet sein, dass die drei Homologe aus unterschiedlichen Geweben isoliert worden sind (CPZ aus der Maus und dem Huhn wurden aus embryonalem Gewebe isoliert, CPZ aus der Ratte aus Zelllinien, die humane CPZ aus Speicheldrüsen Gewebe). Allerdings muss betont werden, dass sowohl in der Ratte als auch in der Maus nur eine Transkriptgröße im Northern-Blot-Verfahren mit RNA aus verschiedenen Geweben detektiert wurde. Die Existenz anderer Spleißvarianten mit deutlichem Größenunterschieden kann also ausgeschlossen werden. Die beobachtete Deletion des zweiten Exons in der Maus hat auf die gewählte Strategie für die Mausmutante keine Auswirkung.

4.3 CPZ und der Wnt-Signaltransduktionsweg

4.3.1 Experimentelle Beweise für eine Beteiligung von CPZ am extrazellulären Wnt-Signaltransduktionsweg

Schon bei der ersten Beschreibung von CPZ wurde aufgrund der N-terminalen CRD vorgeschlagen, dass sie Teil des extrazellulären Wnt-Signaltransduktionswegs sein könne (Song & Fricker, 1997). Ein Beleg für diese Möglichkeit wurde allerdings bisher nicht geliefert. Die vorliegenden Studien liefern drei voneinander unabhängige experimentelle Bestätigungen für eine solche Funktion von CPZ:

1. Die Überexpressionsexperimente von cCPZ im Hühnerembryo führten zu einer ektopischen Expression von *Pax3* im hypaxialen Dermamyotom. Für verschiedene Wnt-Moleküle, u.a. auch Wnt4, wurde gezeigt, dass sie die Expression von *Pax3* im präsomitischen Mesoderm induzieren können (Fan et al., 1997; Lee et al., 2000). In diesen Arbeiten wurde präsomitisches Mesoderm mit Wnt-exprimierenden Zellen kokultiviert und die Expression von *Pax3* mittels *in situ*-Hybridisierung bzw. RT-PCR bestimmt. Es wird daher im Allgemeinen davon ausgegangen, dass Wnt-Moleküle aus dem dorsalen Neuralrohr sowie dem überliegenden Ektoderm die Transkription dermyotomaler Gene positiv beeinflussen (zur Übersicht siehe: Borycki & Emerson, 2000). Die hier beschriebenen Experimente stellen insofern eine Abweichung dar, als die Injektion des cCPZ-exprimierenden Virus zwar in das präsomitische Gewebe erfolgte, die anschließende Analyse aber durchgeführt wurde, als sich das PSM in Sklerotom und Dermamyotom differenziert hatte. Bedingt durch die Eigenschaften des RCAS-Virus, das eine effiziente Überexpression erst nach 48 Std. gewährleistet (Logan & Tabin, 1998), war eine Detektion der *Pax3*-Expression zu einem früheren Entwicklungsstadium der Embryonen nicht möglich. Der gewählte experimentelle Ansatz hatte allerdings den Vorteil, dass er den Effekt einer übermäßigen cCPZ-Expression im lebenden Embryo unter Einbeziehung aller das Dermamyotom beeinflussenden Gewebe nachstellt.

2. Ein weiterer Beweis für eine Rolle von CPZ im Wnt-Signalweg ergibt sich aus der Beobachtung, dass CPZ die Aktivierung des Wnt-Reportergenes *Cdx1* in einem *in vitro*-System (Lickert et al., 2000) potenziert. Da die Aufreinigung von löslichen, biologisch aktiven Wnt-Molekülen nach wie vor eine Herausforderung darstellt, die noch nicht zufriedenstellend bewältigt worden ist, sind die üblichen Testverfahren für einen Einfluss von neuen Proteinen in der Regel indirekt, wie z.B. die Duplikation der Körperachse in *Xenopus* oder die cytosolische Stabilisierung von β -Catenin. Das ausgewählte *in vitro*-System bietet den Vorteil, dass es sich auf die extrazelluläre Signaltransduktion beschränkt. Über welche der Wnt-Kaskaden das Signal vermittelt wird, ist nicht relevant. Ausserdem erlaubt es, einen positiven Einfluss auf den Wnt-Signalweg zu detektieren; viele andere Test können nur eine Inhibition feststellen.

In den hier beschriebenen Experimenten wurden die drei Wnt-Moleküle getestet, die zum einen ein hohes Induktionspotential für *Cdx1* in dem von Lickert et al. beschriebenen Assay zeigten und die zum anderen ein embryonales Expressionsmuster besitzen, welches mit den durch die Überexpressionen erzielten Resultaten in Einklang steht: Wnt1, Wnt3a und Wnt4 (s.u.). Extrazelluläres CPZ erhöht die Induktion des Gens *Cdx1* in ES-Zellen durch sezerniertes Wnt4 um ca. 50% (siehe Ergebnisse). Die Induktion durch die anderen beiden Wnt-Moleküle wurde nicht potenziert. Für die Experimente standen die gleichen Zelllinien zur Verfügung, die für die Studien von Lickert et al. verwendet worden sind (Kispert et al., 1998). Dies erleichtert die Interpretation der Ergebnisse, eine Veränderung der Induktionseigenschaften im Vergleich zu den publizierten Daten durch unterschiedliche Zellen kann ausgeschlossen werden.

Die Präsenz von CPZ in der ECM war für diesen Effekt ausreichend, CPZ-sezernierende Zellen waren für die Potenzierung nicht notwendig. Dies beweist, dass die Potenzierung Resultat eines extrazellulären Ereignisses ist und nicht auf einen intrinsischen Effekt der CPZ-exprimierenden Zellen in diesem System zurückgeführt werden kann. In den stabil transfizierten Zellen ist CPZ in der ECM lokalisiert. Dies deckt sich mit anderen Studien, in denen ebenfalls gezeigt wurde, dass CPZ in der ECM zu finden ist, bzw. an Komponenten der ECM bindet (Novikova & Fricker, 1999; Novikova et al., 2000). Interessanterweise konnte von HEK-293-Zellen sezerniertes CPZ nicht im Zellkulturmedium nachgewiesen werden, wenn die Präparation der Medium-Proteine anhand eines Protokolls durchgeführt wurde, welches für CPZ aus der Ratte etabliert worden war (Novikova et al., 2000). Ursächlich hierfür kann zum einen eine andere Beschaffenheit der ECM sein, so dass unterschiedliche Retentionseigenschaften für CPZ entstehen (die publizierten Präparationen wurden in AtT-20-Zellen durchgeführt). Ein anderer Grund kann ein geringeres Expressionsniveau von CPZ in den hier verwendeten HEK-293-Zellen sein, so dass der Medium-Anteil von CPZ unterhalb detektierbarer Konzentrationen ist. Novikova et al. beobachteten, dass die im Medium detektierte Form von CPZ ca. 4 kD kleiner sei als die ECM-gebundene, und postulierten, dass die C-terminalen 29 Aminosäuren der CPZ aus der Ratte für die ECM-Bindung verantwortlich seien und CPZ durch enzymatisches Abschneiden dieser Domäne an einer Furin-Erkennungsstelle ins Medium freigesetzt wird (Novikova et al., 2000). Für diese Hypothese gibt es keinen experimentellen Beweis. Sollte sie allerdings richtig sein, so müsste sie auch in dem hier angewandten System greifen: Die murine CPZ besitzt die Furin-Erkennungsstelle an der gleichen Position in der Proteinsequenz, und die HEK-293-Zellen verfügen über die entsprechende enzymatische Aktivität (Wu et al., 2003). Es sei daran erinnert, dass ein direkter Vergleich zwischen den im Ergebnisteil gezeigten Präparaten des Mediums und der ECM nicht möglich ist, da die Zusammensetzung der beiden Proteinpräparate grundsätzlich verschieden ist. Einerseits wurde aus dem Medium präzipitiertes Protein aufgetragen; bei der ECM handelt es sich jedoch um ein komplexes Gemisch verschiedenster Proteinkomponenten. Eine sinnvolle Ladungskontrolle ist daher nicht möglich. Die präsentierten Experimente zeigen allerdings, dass CPZ sezerniert wird und sich in der ECM der Zellen anreichert.

Sowohl bei der ektopischen Expression im Hühnerembryo als auch bei dem *Cdx1*-Induktionstest war die katalytische Aktivität von CPZ nötig. In beiden Experimenten wurde auch eine mutierte Version von CPZ eingesetzt, die eine Glutamat zu Glutamin-Substitution im aktiven Zentrum der Carboxypeptidase-Domäne trug (cCPZ^{E469Q} bzw. CPZ^{E477Q}). Dieser Glutamatrest ist für die proteolytische Katalyse notwendig. Mitglieder der CPE/N-Unterfamilie, denen diese Aminosäure fehlt, zeigten keine enzymatische Aktivität (siehe Einleitung). Die beschriebene Glutamat zu Glutamin-Substitution in CPE führte zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität, die Substratbindung allerdings wurde nicht beeinträchtigt (Qian et al., 1999). Die entsprechend mutierten CPZ-Homologe waren nicht in der Lage, bei Überexpression im Dermamyotom *Pax3* zu induzieren, bzw. das Induktionspotential von Wnt4 im beschriebenen Cokultivierungstest zu steigern. Dies zeigt, dass die

beiden beobachteten Effekte von CPZ auf den extrazellulären Wnt-Signalweg durch die proteolytische Katalyse von CPZ vermittelt werden.

3. Der dritte in dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer Beteiligung von CPZ an der Wnt-Signaltransduktion ist die Interaktion von CPZ mit Wnt4 über die CRD von CPZ. Verschiedene Konstrukte der murinen CPZ wurden mit Wnt4 in HEK-293-Zellen cotransfiziert. Nach Lysis der Zellen wurde Wnt4 präzipitiert und die copräzipitierten Proteine mittels Westernblot nachgewiesen. Von den verschiedenen eingesetzten CPZ-Konstrukten konnten die beiden Versionen copräzipitiert werden, die für das vollständige Protein codierten (nativ und mutiert, s.o.), sowie eine Deletionsmutante, der die Carboxypeptidase-Domäne fehlte. Die beiden Konstrukte, in denen die CRD nicht vorhanden war, konnten nicht in den Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Interessanterweise ist die Interaktion zwischen CPZ und Wnt4 ähnlich effizient wie die Interaktion von Wnt4 mit dem extrazellulären Inhibitor sFRP-2 (Lescher et al., 1998). Die Konzentration von sFRP-2 und CPZ in den Zelllysaten bzw. Präzipitaten ist ähnlich. Abschließend bleibt daran zu erinnern, dass die Immunopräzipitation mit Lysaten cotransfizierter Zellen durchgeführt wurde. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion von CPZ und Wnt4 über eine extrazelluläre Komponente vermittelt wird, die in den HEK-293-Zellen exprimiert ist. Da die rekombinante Expression aktiver Wnt-Moleküle noch nicht gelungen bzw. nicht beschrieben ist, sind direkte Interaktionsstudien mit CPZ in einem reinen *in vitro*-System nicht möglich. Die Präsenz eines solchen bisher unbekanntem Interaktionspartners, der die Bindung von CPZ an Wnt4 vermittelt, stellt allerdings die Beobachtung generell nicht in Frage, dass CPZ mit Wnt4 interagieren kann, denn dieser gemeinsame Interaktionspartner sollte wie in den Zellen auch in den Organismen vorhanden sein.

4.3.2 Potentielle Funktionsweisen von CPZ

Wnt-Signalmoleküle werden in spezifischen Geweben sezerniert, diffundieren im Extrazellularraum und binden im Zielgewebe an ihren Rezeptorkomplex, von dem die Signalkaskade über die kanonische β -Catenin-Signaltransduktion oder über alternative Signalwege vermittelt wird (zur Übersicht siehe: Huelsken & Birchmeier, 2001). Die Beobachtung, dass CPZ die Wnt-Signaltransduktion positiv beeinflussen kann, dass dies im Extrazellularraum stattfindet und dass diese Einflussnahme von der katalytischen Aktivität von CPZ abhängig ist, eröffnet die Frage, auf welche Weise CPZ dies bewerkstelligt. Es sind mehrere Mechanismen vorstellbar, die sich nicht gegenseitig ausschließen müssen. 1. Die Beschaffenheit des extrazellulären Raums bzw. seiner Proteine ist für die Transduktion von Wnt-Signalen von essentieller Bedeutung (siehe z.B.: Alexander et al., 2000; Baeg et al., 2001). CPZ könnte Komponenten der ECM prozessieren bzw. durch das Abspalten C-terminaler Aminosäurereste deren Prozessierung initiieren. Hierdurch könnte sich die Bindungskonstante der Wnt-Moleküle ändern und so eine Änderung lokaler Konzentrationsgradienten hervorrufen. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist Qsulf-1, eine extrazelluläre Sulfatase, die durch ihre

Aktivität zu einer Verstärkung von Wnt-Signalen beiträgt (Dhoot et al., 2001). 2. CPZ könnte extrazelluläre Wnt-Inhibitoren wie z.B. FRPs prozessieren, resultierend in einer Änderung ihrer Affinität für die Wnt-Moleküle. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus gibt es bei den BMP-Signalmolekülen: BMPs binden an ihren Inhibitor Chordin. Dieser wird durch die Protease BMP-1/Tolloid gespalten, woraufhin die BMP-Moleküle freigesetzt werden und an ihre Rezeptoren binden können (zur Übersicht siehe: Nakayama et al., 2000). 3. CPZ und die Wnt-Moleküle interagieren direkt. Die Feststellung, dass CPZ in den Interaktionsstudien Wnt4 bindet und dass dies über die CRD vermittelt wird, unterstützt diese Hypothese. Es ist denkbar, dass das Binden von Wnt4 an CPZ den ersten Schritt darstellt, der von der proteolytischen Prozessierung von Wnt4 gefolgt wird. Song und Fricker haben gezeigt, dass CPZ C-terminales Arginin von synthetischen Peptiden hydrolysiert (Song & Fricker, 1997). Interessanterweise ist Wnt4 das einzige der drei getesteten Wnt-Moleküle, für das im *in vitro*-Induktionstest eine Potenzierung nachgewiesen wurde, und das einzige der drei Moleküle, welches ein C-terminales Arginin trägt (Gavin et al., 1990). Wie eine solche Proteolyse den Wnt-Signalweg beeinflussen könnte, bleibt unklar. Denkbar ist, dass sich die Bindungseigenschaften von Wnt4 gegenüber den Rezeptoren, ECM-Komponenten oder gegenüber den Wnt-Inhibitoren ändert und so eine bessere Verfügbarkeit der Wnt-Moleküle am Rezeptorkomplex entsteht oder dass die C-terminale Proteolyse den initialen Schritt weiterer Modifikationen darstellt. Eine zusätzliche Möglichkeit wäre die generelle Änderung der Stabilität der Wnt-Moleküle.

Ein weiteres Wnt-Molekül, das über ein C-terminales Arginin verfügt, ist Wnt8c aus dem Huhn (Hume & Dodd, 1993). Viele andere Wnts tragen ein C-terminales Lysin, ebenfalls eine basische Aminosäure. Generell ist die Katalyse der Carboxypeptidasen der CPE/N-Unterfamilie nicht auf Arginin beschränkt, sondern gilt auch für die anderen basischen Aminosäuren Lysin und Histidin, wobei Histidin deutlich ineffektiver abgespalten wird (siehe Einleitung und Smyth et al., 1989). Obwohl der Nachweis für das Freisetzen von C-terminalem Lysin durch CPZ noch aussteht, wurde mit synthetischen Peptidanaloga gezeigt, dass die Bindungsaffinität für C-terminales Lysin wesentlich geringer ist als für Arginin (Novikova & Fricker, 1999). Es bleibt also fraglich, ob CPZ eine solche Katalyse mit Wnt-Molekülen als Substrate durchführen kann und welche Auswirkungen diese dann hätte.

Es wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem CPZ im Extrazellularraum mit den Frizzled-Rezeptoren um die Wnt-Moleküle konkurriert und durch das Binden an die Wnt-Moleküle die Aktivierung der Frizzled-Rezeptoren bzw. der intrazellulären Signalkaskade verhindert (Reznik & Fricker, 2001; Song & Fricker, 1997). Zwei experimentelle Beobachtungen dieser Arbeit sprechen gegen eine solche Funktionsweise von CPZ: Zum einen verstärkt CPZ in den *in vitro*-Experimenten die Wirkung von Wnt4 anstatt sie zu inhibieren, zum anderen war bei der Überexpression im Hühnerembryo und bei den Induktionsstudien die katalytische Aktivität von CPZ nötig. Ein Wirkungsmechanismus, der lediglich die Interaktion zwischen zwei Proteinen beinhaltet, also die einfache Bindung, wie sie z.B.

für die Inhibitoren WIF und die FRPs angenommen wird, sollte aber nicht von einer Katalyse abhängig sein.

Der abschließende Nachweis einer direkten Interaktion von CPZ mit Wnt4 in einer reinen *in vitro*-Studie mit aufgereinigten Proteinen sowie der Nachweis des Abtrennens des C-terminalen Arginins von Wnt4 durch CPZ in einem solchen System stellen eine anspruchsvolle Aufgabe für die Zukunft dar. Bislang waren solche Untersuchungen nicht durchführbar, da die Aufreinigung von löslichen, biologisch aktiven Wnt-Molekülen nicht möglich war. Neueste Studien aus der Gruppe von R. Nusse, Stanford, geben allerdings Hoffnung, dass dies in Zukunft bewerkstelligt werden kann. In dieser Studie ist es gelungen, aktives Wnt3a aufzureinigen (Willert et al., 2003). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass Wnt3a für seine biologische Aktivität einen kovalent gebundenen Palmitoylrest benötigt, ein unerwartetes Beispiel für die posttranslationelle Modifikation von Wnt-Molekülen.

4.4 Die ektopische Expression von CPZ und die Bildung des Schaftes der Skapula und der Rippen im Hühnerembryo

Die Skapula ist in Vögeln wie folgt organisiert: Sie besteht aus einem Kopf, dem Acromium, einem Schaft, der über dem proximalen Teil der Rippen liegt und als Ansatzpunkt für die Humerusmuskeln dient, und einer knöchernen Verjüngung, die diese beiden Elemente miteinander verbindet (Baumel und Witmer, 1993). Entwicklungsbiologisch entsteht sie aus verschiedenen Geweben: Während das Acromium und die verbindende Verjüngung somatopleuralen Ursprungs sind, wird der Schaft der Skapula aus dermamyotomalen Gewebe der Somiten 17-24 gebildet (Huang et al., 2000a). Es wurde vorgeschlagen, dass Signale aus dem lateralen Mesoderm dafür verantwortlich seien, dass das hypaxiale Dermamyotom der entsprechenden Somiten die *Pax3*-Expression reduziert und so eine myotomale Differenzierung dieses Gewebes verhindert. Anschließend würde die Induktion von *Pax1*, einem eigentlich sklerotomalen Markergen, welches die Ausbildung von Knochen impliziert, die Bildung des Skapulaschaftes ermöglichen. Der Schaft der Skapula wurde daher als verknöchertes Muskelanhang bezeichnet und nicht als echtes skelettales Element (Huang et al., 2000a).

In den hier gezeigten Überexpressionsexperimenten im Hühnerembryo führte die ektopische dermamyotomale Expression von cCPZ zu einer ektopischen Expression von *Pax3* im hypaxialen Dermamyotom, gefolgt von einer Inhibierung von *Pax1* im Skapula-bildenden Gewebe und einem anschließenden Fehlen skelettaler Elemente wie des Schaftes der Skapula und der rostralen Rippen.

Es wurde mehrfach demonstriert, dass Wnt-Moleküle das dermamyotomale Gen *Pax3* im präsomitischen Mesoderm induzieren können (Fan et al., 1997; Lee et al., 2000). In Anbetracht der *in vitro*-Induktionsstudien könnte die ektopische Expression von CPZ zu einer Verstärkung von Wnt-Signalen im Nahbereich des Dermamyotoms geführt haben, die sich dann in der ektopischen

Expression von *Pax3* manifestierte, gefolgt von einem Ausbleiben der *Pax1*-Induktion im Skapula-bildenden Gewebe, was letztendlich zu einer Abwesenheit der betrachteten Elemente führte. Ob die geänderte Expression der beiden *Pax*-Gene ursächlich ist für die Fehlbildung und ob jene in einer konsekutiven Abfolge stehen, d.h. ob die ektopische *Pax3*-Expression die *Pax1*-Expression inhibiert oder ob die Expressionsänderungen unabhängig voneinander durch die CPZ-Expression induziert werden, bleibt zwar anhand der gezeigten Studien offen, ist für die zu Grunde liegenden Studien aber nicht von Bedeutung. Die beiden Gene dienten in den präsentierten Untersuchungen als entwicklungsbiologische Marker, um den Verlauf der Skapula-Entwicklung verfolgen zu können.

Die ektopische Expression von cCPZ im Dermamyotom hatte in einem Teil der behandelten Embryonen den Verlust der rostralen Rippen zur Folge. Der Ursprung der Rippen wird kontrovers diskutiert. Es wird allgemein akzeptiert, dass sie aus den Somiten entstehen und dass sich der proximale Teil der Rippen aus dem medialen Teil der Somiten formiert sowie der distale Teil aus den lateralen Somiten gebildet wird (Olivera-Martinez et al., 2000). Die Beteiligung der beiden Komponenten Dermamyotom und Sklerotom an der Ausbildung der Rippen ist jedoch umstritten. Geht man davon aus, dass die Rippen komplett aus dem Sklerotom entstehen (Evans, 2003; Huang et al., 2000b), könnte die ektopische Expression von cCPZ zu einer "ektopischen" Aktivierung von Wnt-Signalen führen, die dann die Differenzierung des lateralen Teils des Sklerotoms so beeinflussen könnte, dass die Ausbildung der Rippen beeinträchtigt wird. Da cCPZ im Sklerotom exprimiert ist, kann die Präsenz von cCPZ *per se* keinen negativen Einfluss auf die Bildung der Rippen haben. Geht man davon aus, dass ein Teil der Rippen aus dermamyotomalem Gewebe entsteht (Kato & Aoyama, 1998), so ist der Verlust der Rippen ähnlich der Argumentation bei der Skapula-Dysmorphogenese zu deuten: Ektopische cCPZ bewirkt eine Potenzierung von Wnt-Signalen, führt dadurch zu einer Induktion von *Pax3* im hypaxialen Teil des Dermamyotoms und letztendlich zu unvollständiger Ausbildung skelettaler Strukturen.

4.5 Die native Funktion von CPZ

4.5.1 CPZ im Hühnerembryo

Bisher wurde die entwicklungsbiologische Funktion von CPZ im Kontext der Überexpression und der *in vitro*-Studien diskutiert. Es stellt sich jedoch die Frage, was die native Aufgabe von cCPZ während der Embryogenese ist. Entgegen den Bedingungen der Überexpression ist cCPZ eigentlich im epithelialen Somiten, im sich daraus bildenden Sklerotom, im axialen Mesenchym der Kopfregion sowie in der AER exprimiert.

Es lassen sich zwei verschiedene Szenarien vorstellen, die nicht exklusiv voneinander stattfinden müssen: CPZ ist ein sezerniertes Protein, dass nicht ausschließlich am Expressionsort vorzufinden ist,

sondern auch im Extrazellularraum diffundiert (Novikova et al., 2000). *cCPZ* ist im gesamten epithelialen Somiten exprimiert, aus dessen dorsalem Teil das Dermamyotom gebildet wird. Es ist daher möglich, dass, obwohl die Transkription bereits gestoppt wurde, sich noch *cCPZ*-Protein in der dermamyotomalen ECM befindet. Es ist also vorstellbar, dass *cCPZ* sowohl im exprimierenden Gewebe, sprich dem Sklerotom und der AER, als auch in benachbartem Gewebe wie dem Dermamyotom den Wnt-Signalweg moduliert. Es könnte mit Wnt-Molekülen interagieren, die im Somiten gebildet werden wie z.B. *Wnt5a* und *Wnt11* (Cauthen et al., 2001) oder mit solchen, die aus umliegenden Geweben sezerniert werden, wie dem dorsalen Neuralrohr oder dem überliegenden Ektoderm (z.B. *Wnt4*, *Wnt6*, und *Wnt7a*, (Cauthen et al., 2001; Parr et al., 1993; Tajbakhsh et al., 1998) oder aus dem Dermamyotom (z.B. *Wnt11*, (Marcelle et al., 1997; Tanda et al., 1995)). *Wnt4* wird ergänzend zu den beiden bereits genannten Expressionsdomänen auch im ventralen Neuralrohr gebildet und könnte von dort sezerniert mit *CPZ* im Somiten bzw. Sklerotom interagieren. Die mögliche Funktion von *CPZ* bei der Gliedmaßenentwicklung wird weiter unten diskutiert.

Obwohl den Wnt-Signalmolekülen, die aus dem Ektoderm, dem Neuralrohr und dem epaxialen Dermamyotom sezerniert werden, ein Einfluss auf die Induktion und die Differenzierung des Dermamyotoms zugeschrieben wird (siehe Einleitung), ist eine Funktion der Wnt-Moleküle bei der Induktion und Reifung des Sklerotoms weitestgehend nicht bekannt bzw. beschrieben. In diesem Zusammenhang sind zwei Beobachtungen interessant: 1. Wenn Hühnerembryonen das Ektoderm auf Höhe des unsegmentierten paraxialen Mesoderms entfernt wird, kommt es neben der Beeinträchtigung der Dermamyotomentwicklung auch zu Fehlbildungen der Rippen, für welche in den gleichen Experimenten ein sklerotomaler Ursprung demonstriert wurde (Huang et al., 2000b). Es wurde in diesem Zusammenhang argumentiert, dass die Interaktion zwischen Dermamyotom und Sklerotom beeinträchtigt sein kann und dies die Ursache der Dysmorphogenese ist. Genauso denkbar ist aber auch, dass die ordentliche Differenzierung des Sklerotoms von Signalmolekülen aus dem Ektoderm abhängig ist und dass die Ablation des Ektoderms das Zusammenspiel dieser Signalmoleküle, die auch Wnt-Moleküle beinhalten könnten, stört. 2. Expressionsanalysen haben gezeigt, dass in epithelialen Somiten mehrere Frizzled-Rezeptoren exprimiert sind (Cauthen et al., 2001). D.h. wenigstens in diesem Entwicklungsstadium sind im ventralen, zukünftigen sklerotomalen Teil der Somiten potentiell alle Komponenten eines Wnt-Signalweges vorhanden.

Wie die Ablationsexperimente gezeigt haben, ist die Expression von *cCPZ* in den Somiten unabhängig von axialen Signalen wie *Shh*. Dies und die Tatsache, dass der Expressionsbeginn von *cCPZ* vor dem anderer sklerotomaler Markergene wie *Pax1* und *Pax9* liegt, spricht dafür, dass *cCPZ* bei der Reifung der Somiten im Hühnerembryo eine originäre Funktion hat, die sich von der der anderen Marker unterscheidet (Ebensperger et al., 1995; Goulding et al., 1994). Abschließend sei festgehalten, dass zur Zeit keine Methode bekannt ist, die die Inhibierung eines Gens im Hühnerembryo unter anschließender Analyse des Skelettes ermöglicht. Bei Einsatz inhibierender Oligonukleotide ist es momentan nicht möglich, die Embryos bis zur Ausbildung des Skeletts wachsen zu lassen. Da für *CPZ*

keine dominant-negative Form bekannt ist, die man in einer Überexpression einsetzen könnte, wurde für eine solche *loss of function*-Studie die genetische Manipulation in der Maus gewählt (s.u.).

4.5.2 CPZ in der Maus

In der frühen Embryogenese der Maus ist *CPZ* in der sich bildenden Gliedmaßenanlage exprimiert, beginnend mit dem ventralen Ektoderm bei E9.5, bei E10.5 im ventralen Ektoderm und der AER. Danach beschränkt sich die Expression in der Gliedmaße auf die AER, bis diese nicht mehr sichtbar ist (E12.5). In den älteren Stadien zeigt *CPZ* neben anderen Regionen noch prominente Expression im sich entwickelnden inneren Ohr, den Plexi Choroidei und den Schneidezähnen. Im adulten Gewebe wurde mittels Northern Blot-Analyse u.a. Expression im Herzen, der Schilddrüse und der Gebärmutter gezeigt.

Die frühe Expression von *CPZ* unterscheidet sich vom Huhn durch die Abwesenheit sklerotomaler Transkripte. Lediglich ein Teil der ursprünglich sklerotomalen Zellen, das Perichondrium der Rippen, zeigt eine transiente Expression. Auch in der Gliedmaßenanlage ist die Expression unterschiedlich: Im Hühnerembryo wird *cCPZ* ausschließlich in der AER transkribiert, in der Maus dagegen ist neben der AER-Expression eine transiente Expression von *CPZ* im ventralen Ektoderm zu erkennen. Man muss allerdings berücksichtigen, dass zwischen der AER-Induktion im Huhn und der Maus ein Unterschied besteht: Während sich beim Huhn die AER an der Grenze zwischen dorsalem und ventralem Ektoderm bildet, formiert sie sich bei der Maus aus Ektoderm, welches sich auf der ventralen Seite der sich bildenden Gliedmaßenanlage befindet (zur Übersicht siehe: Capdevila & Izpisua Belmonte, 2001; Martin, 1998). In beiden Organismen ist *FGF-8* ein guter Marker für die Induktion bzw. Ausbildung der AER. In der Maus ist *CPZ* bei E10.5 im Gegensatz zu *FGF-8* noch im ventralen Ektoderm zu sehen, einem Zeitpunkt an dem sich die AER bereits deutlich sichtbar ausgebildet hat und *FGF-8* auf diese beschränkt ist (Crossley & Martin, 1995). *CPZ* ähnelt in seiner Expression in der frühen Gliedmaßenentwicklung eher Genen wie *BMP-2* und *BMP-4*, die bei E10.5 neben der AER ebenfalls Expression im ventralen Ektoderm zeigen (Lyons et al., 1990; Pizette et al., 2001). Wnt-Signalmoleküle sind für die Induktion und die Beibehaltung der AER von essentieller Bedeutung: Im Hühnchen wird die Induktion von *FGF-8* in der AER über *Wnt3a* vermittelt (Kawakami et al., 2001; Kengaku et al., 1998), in der Maus induziert *Wnt3* *FGF-8* über den β -Catenin-Signalweg. Bei diesem Prozess ist interessant, dass *Wnt3* im gesamten Gliedmaßenektoderm exprimiert wird, die Induktion durch *Wnt3* aber auf das ventrale Ektoderm beschränkt ist (Barrow et al., 2003). Der genaue Mechanismus dieser Restriktion ist noch offen. In diesen Studien wurde außerdem gezeigt, dass ventral-ektodermale Gene wie *BMP-2* über den β -Catenin-Signalweg induziert werden. *Wnt4* ist ebenfalls im gesamten Gliedmaßenektoderm exprimiert (Parr et al., 1993). Die genaue Funktion von *Wnt4* während der Gliedmaßenentwicklung ist allerdings nicht bekannt. Bei einer Deletion von *Wnt3*

kann es dessen Funktion nicht übernehmen (Barrow et al., 2003). Die Wnt4-defizienten Mäuse zeichnen sich durch einen letalen Nierendefekt aus, ein Gliedmaßen-Phänotyp ist nicht beschrieben (Stark et al., 1994). Die CPZ^{-/-}-Maus zeigt keine Veränderung in der Gliedmaßenausbildung (s.u.). Ausgehend von der beobachteten Beschränkung der CPZ-Aktivität auf Wnt4 ließe sich dies mit der Beobachtung begründen, dass bei kompletter Abwesenheit von Wnt4 ebenfalls kein Gliedmaßenphänotyp zu beobachten ist, so dass eine fehlende Aktivierung durch CPZ folglich keinen Effekt hätte. Eine Übernahme der Wnt4-Aufgabe in den Mutanten bei diesem Prozess durch Wnt3 ist denkbar.

Von den oben beschriebenen CPZ-Expressionsdomänen fallen insbesondere drei ins Auge: die Expression im Plexus Choroideus, in den Schneidezähnen und im sich bildenden Cortischen Organ. In allen drei Domänen zeigt CPZ eine zu Wnt-Signalmolekülen komplementäre Expression. Im Schneidezahn wie im Cortischen Organ befindet sich die CPZ-Expressiondomäne in direkter Nähe zu einer Wnt4-Expressionsdomäne. Der choroide Plexus des Telencephalons befindet sich in direkter Nachbarschaft zu einer Region des Telencephalons, der als "*cortical hem*" ("corticaler Saum") bezeichnet wurde. In dieser Region werden einige Wnt-Moleküle exprimiert, wie z.B. Wnt3a, Wnt5a und Wnt2b. Es wurde postuliert, dass die Entwicklung des Plexus' durch die Wnt-Moleküle aus dem *cortical hem* reguliert wird (Grove et al., 1998). Über den Einfluss bzw. die Funktion von Wnt-Signalmolekülen bei der Ausbildung des inneren Ohrs ist wenig bekannt, was beispielsweise im besonderen Fall von Wnt4 darin begründet sein kann, dass die postnatale Letalität der Mausmutante solche Untersuchungen beeinträchtigt, da die Ausbildung des Gehörs erst nach der Geburt abgeschlossen wird (Stark et al., 1994). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Wnt7a aber z.B. die Orientierung der Sinneshaare im inneren Ohr beeinflusst (Dabdoub et al., 2003). Obwohl eine genaue Funktion von Wnt4 während der Ausbildung der Zähne nicht beschrieben ist, ist der Wnt-Signalweg an der Entwicklung der Zähne generell beteiligt (zur Übersicht siehe: Jernvall & Thesleff, 2000). CPZ könnte in den beschriebenen Geweben an der Regulation des extrazellulären Wnt-Signalweges beteiligt sein, mit einem wie oben diskutierten Mechanismus. Interessanterweise zeigt CPZ mit *sFRP-2*, einem extrazellulären Inhibitor für u.a. auch Wnt4, komplementäre wie überlagernde Expression: Im sich entwickelnden Auge sind CPZ und *sFRP-2* in unterschiedliche Gewebe exprimiert; im Perikard zeigen sie Expression im gleichen Gewebe. Es ist vorstellbar, dass diese beiden Moleküle mit ihrem gegenteiligen Effekten auf den Wnt-Signalweg diesen auf zellulärer Ebene komplementär steuern und lokale "Signalkonzentrationen" einstellen.

Abschließend sei auf eine Studie von Novikova et al. hingewiesen, die während der experimentellen Phase dieser Arbeit publiziert wurde (Novikova et al., 2001). In dieser zeigen die Autoren mittels immun-histochemischer Analysen eine breite Expression von CPZ während der Mausembryogenese. Eingesetzt wurden hierbei zwei polyklonale anti-CPZ-Seren, die gegen Teilsequenzen der CPZ aus der Ratte gerichtet waren. Die Autoren postulieren eine Expression von CPZ beginnend mit E5, welche bis E15 in nahezu allen Geweben persistiert, danach einen Rückgang der Expression. Diese Datenlage

ist konträr zu den hier präsentierten *in situ*-Expressionsanalysen. Es ist zwar denkbar, dass CPZ nach der Sezernierung durch Diffusion weiter entfernte Gewebe erreicht, allerdings kann dies nicht die immunologische Detektion bei Stadien früher als E9 erklären, vor denen keine CPZ-Transkripte nachgewiesen werden konnten. Novikova et al. zeigen bei der Beschreibung ihres Antikörpers keine Kreuzreaktions-Studien, welche die Bindung an nahe verwandte Proteine ausschließen würden. Es ist weiterhin fraglich, ob die spezieübergreifende Spezifität gewährleistet ist, da die Seren gegen Proteinabschnitte der CPZ aus der Ratte gerichtet sind, die an mehreren Positionen von der Sequenz aus der Maus abweichen (Novikova et al., 2000, und die hier präsentierten Daten).

4.5.3 Etablierung der CPZ-defizienten Mauslinie

In einem Parallelansatz wurde eine Mauslinie etabliert, die über ein mutiertes, inaktives CPZ-Allel verfügen sollte. Teile des genomischen CPZ-Lokus wurden subkloniert. Unter Verwendung einer Insertions-Kassette wurde ein so genannter Targetingvektor konstruiert. Dieser Targetingvektor war so konzipiert, dass in das 5'-Ende des 3. Exons (CRD-codierend) eine Kassette eingefügt wurde, die sequentiell über ein IRES-Element, das bakterielle Galaktosidase-Gen und eine Neomycin-Resistenz verfügte. Bei homologer Insertion in das Genom wird so eine CPZ-mRNA synthetisiert, die aus den ersten beiden Exons des CPZ-Gens, dem IRES-Element und dem Galaktosidasegen besteht. Eine sich daran anschließende PolyA-Sequenz sollte dann zum Transkriptionsabbruch führen. Bei der Translation wird aus dieser mRNA ein CPZ-Protein synthetisiert, welches aus den ersten beiden Exons (Signalpeptid und Brücken-Domäne) und den ersten 20 Aminosäuren der CRD-Domäne besteht. Das IRES-Element führt zum Translationsabbruch und dem Beginn eines neuen Translationsereignisses, welches die Galaktosidase produziert. Nach Transfektion in ES-Zellen ergab die Analyse der selektierten Klone, dass der Targetingvektor sich mit einer Frequenz von ca. 1/40 an homologer Position ins Genom insertiert hatte. Die Analyse von 5 dieser selektierten ES-Zellklone zeigte, dass der Vektor nur einfach integriert war. Zwei dieser Klone wurden zur Herstellung der mutierten Mauslinie in Blastocysten injiziert. Die resultierenden Chimären wurden mit NMRI-Mäusen verpaart. Die Tiere mit Keimbahntransmission wurden dann zur Etablierung der CPZ^{-/-}-Mauslinie verwendet. Die hier beschriebene homozygote Mutation ist nicht embryonal lethal, es wurde eine Mendelsche Segregation des mutierten Allels detektiert. In homozygoten Mäusen ist kein CPZ-Transkript detektierbar, der Transkriptionsabbruch nach der LacZ-Insertion ist erfolgreich. Die homozygoten CPZ^{-/-}-Mäuse zeigen keinen offensichtlichen abnormalen Phänotyp. Eine Skelettpräparation ergab, dass alle skelettalen Elemente in normaler Proportion und Größe vorhanden waren.

Worin liegt die Ursache für das Ausbleiben eines abnormalen Phänotyps in der CPZ^{-/-}-Maus? Ein möglicher Grund liegt sicherlich in im Vergleich zum Hühnembryo eingeschränkten Expressionsmuster. Es wäre, was die Skelettbildung angeht, nur ein Effekt auf die Bildung der Gliedmaßen zu erwarten gewesen (s.o.). Dass ein solcher nicht zubeobachtet ist, kann zum einen darin begründet sein, dass Wnt4 an diesem Prozeß nicht maßgeblich beteiligt ist und wenn doch, dass dann

im Falle einer Abwesenheit von Wnt4 dessen Aufgabe von Wnt3 übernommen werden kann (s.o.). Eine Redundanz durch eine andere Carboxypeptidase erscheint unwahrscheinlich: Einerseits wurden bisher keine paraloge CPZ-Homologe beschrieben und eine Analyse der zur Verfügung stehenden Genome lässt die Existenz solcher als sehr unwahrscheinlich erscheinen, andererseits unterscheiden sich die anderen Carboxypeptidasen von CPZ die katalytische Aktivität wie die Lokalisation betreffend. Die ausbleibende Aktivierung eines Wnt-Signals durch CPZ könnte aber durchaus durch andere Wnt-Moleküle kompensiert werden. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die zur Analyse verwendeten CPZ^{-/-}-Mäuse sich in einem 129/ola/NMRI-Hintergrund befanden. Viele Mausmutationen mit einem entwicklungsbiologischen Phänotyp wurden im C57BL/6-Hintergrund untersucht, der Phänotyps derselben Mutation kann mit dem genetischen Hintergrund der k.o.-Mäuse unterschiedlich ausgeprägt sein (Pritchard et al., 1996; Threadgill et al., 1995). So variiert z.B. der Phänotyp von Mäusen mit einer Null-Mutation des EGF-Rezeptors je nach genetischem Hintergrund zwischen einem embryonalen Tod im Präimplantationsstadium und einem Überleben bis in die dritte postnatale Woche, begleitet von abnormaler Ausbildung mehrerer innerer Organe (Threadgill et al., 1995).

Die Analyse der Expression von CPZ mit Hilfe des in den CPZ-Genlocus eingefügten LacZ-Reportergens lässt Raum für Spekulationen offen, da in heterozygoten Tieren eine dem erwarteten Expressionsmuster entsprechende LacZ-Färbung nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Bei der Etablierung von verschiedenen mutierten Mauslinien mit ähnlicher Insertionsstrategie und bei Verwendung der in dieser Arbeit eingesetzten Insertionskassette kam es zu vergleichbaren Resultaten. Es stellte sich heraus, dass eine Deletion der Neomycin-Resistenz, die von zwei LoxP-Erkennungsstellen flankiert ist, in diesen Mauslinien mit Hilfe der so genannten CRE-Rekombinase eine Aktivierung der Galaktosidase-Translation über das IRES-Element ermöglichte. Es wurde daher angenommen, dass der konstitutive Promotor der Neomycin-Resistenz bzw. deren konstitutive Expression das IRES-Element negativ beeinflusst (A. Kispert und M.Leitges, persönliche Kommunikation). Die Kreuzung der CPZ^{-/-}-Mäuse mit so genannten *Deleter*-Mäusen, einer Mauslinie, die die CRE-Rekombinase konstitutiv in allen Geweben exprimiert, war zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit in die Wege geleitet worden, ebenso die Kreuzung des 129/ola-Hintergrunds auf einen C57BL/6-Hintergrund.

Die in dieser Arbeit etablierte CPZ^{-/-}-Mauslinie bietet eine Grundlage zur Untersuchung der *in vivo*-Funktion von CPZ. Durch die präsentierten Ergebnisse ergeben sich verschiedene Ansätze: Wie beeinflusst CPZ die Gehörentwicklung insbesondere unter Beachtung der Wnt4-Expression? Welche Funktion hat CPZ in der Schilddrüse - in Zellen der Schilddrüse ist der Wnt-Signalweg als aktiv nachgewiesen worden, die Funktion allerdings bisher unbekannt (Helmbrecht et al., 2001)? Wie wirkt sich das Fehlen von CPZ auf die Plexi Choroidei bzw. die Bildung der Hirnflüssigkeit aus? In einer

neueren Studie wurde gezeigt, dass es in einem chemisch induzierten Tumor des Nasen-Epithels der Ratte u.a. zu einer Induktion von CPZ und einer Aktivierung des Wnt-Signalweges kommt (Genter et al., 2002). In einem solchen Zusammenhang wäre besonders bei Berücksichtigung der *in vitro*-Ergebnisse interessant zu sehen, wie sich das Fehlen von CPZ auf die Tumorgenese auswirkt.

Kapitel 5

Literaturverzeichnis

Adler, P.N. & Lee, H. (2001) Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 635-40.

Ahn, K., Mishina, Y., Hanks, M.C., Behringer, R.R., & Crenshaw, E.B., 3rd (2001) BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development*, 128, 4449-61.

Albrecht, U., Eichele, G., Helms, J.A. and Lu, H. C. (1997) Visualization of gene expression patterns by in situ hybridization. *Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology* (G.P. Daston, Ed.). CRC Press, Boca Raton, 23-48.

Alexander, C.M., Reichsman, F., Hinkes, M.T., Lincecum, J., Becker, K.A., Cumberland, S., & Bernfield, M. (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet*, 25, 329-32.

Aloy, P., Companys, V., Vendrell, J., Aviles, F.X., Fricker, L.D., Coll, M., & Gomis-Ruth, F.X. (2001) The crystal structure of the inhibitor-complexed carboxypeptidase D domain II and the modeling of regulatory carboxypeptidases. *J Biol Chem*, 276, 16177-84.

Auld D. S. (1998). Carboxypeptidase A. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 1321-1326.

Aulehla, A. & Johnson, R.L. (1999) Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signaling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation. *Dev Biol*, 207, 49-61.

Aviles F. X. und Vendrell J. (1998). Carboxypeptidase B. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 1333-1335.

Baeg, G.H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S., & Perrimon, N. (2001) Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development*, 128, 87-94.

- Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P.W., Yaniv, A., & Aaronson, S.A. (1999) Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem*, 274, 16180-7.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., & Aaronson, S.A. (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*, 3, 683-6.
- Barret A. J., Rawlings N. D. und Woessner J. D. (1998) Metallopeptidases and their clans. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 989-991.
- Barret A. J., Rawlings N. D. & Woessner J. D. (1998)b Clan MC containing metallocarboxypeptidases. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 1318-1320.
- Barrow, J.R., Thomas, K.R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M.R., & McMahon, A.P. (2003) Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev*, 17, 394-409.
- Baumel, J. J. and Witmer, L. M. (1993) *Osteologia. Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium* (ed. J. J. Baumel). Cambridge, Massachusetts: Nuttall Ornithological Club, 45-132.
- Bejsovec, A. (2000) Wnt signaling: an embarrassment of receptors. *Curr Biol*, 10, R919-22.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., & Nusse, R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382, 225-30.
- Binari, R.C., Staveley, B.E., Johnson, W.A., Godavarti, R., Sasisekharan, R., & Manoukian, A.S. (1997) Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development*, 124, 2623-32.
- Boardman, P.E., Sanz-Ezquerro, J., Overton, I.M., Burt, D.W., Bosch, E., Fong, W.T., Tickle, C., Brown, W.R., Wilson, S.A., & Hubbard, S.J. (2002) *A Comprehensive Collection of Chicken cDNAs*. *Curr Biol*, 12, 1965-9.
- Borycki, A.G. & Emerson, C.P., Jr. (2000) Multiple tissue interactions and signal transduction pathways control somite myogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 48, 165-224.
- Borycki, A.G., Mendham, L., & Emerson, C.P., Jr. (1998) Control of somite patterning by Sonic hedgehog and its downstream signal response genes. *Development*, 125, 777-90.
- Brand-Saberi, B. & Christ, B. (2000) Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol*, 48, 1-42.
- Brent, A.E. & Tabin, C.J. (2002) Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev*, 12, 548-57.
- Cadigan, K.M. & Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 11, 3286-305.
- Capdevila, J. & Izpisua Belmonte, J.C. (2001) Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 87-132.
- Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244, 1288-92.

- Cauthen, C.A., Berdougo, E., Sandler, J., & Burrus, L.W. (2001) Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mech Dev*, 104, 133-8.
- Chaube, S. (1959) On Axiation and Symmetry in Transplanted Wing of the Chick. *Journal of Experimental Zoology*, 140, 29-77.
- Chevallier, A., Kieny, M., & Mauger, A. (1977) Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol*, 41, 245-58.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., & Beachy, P.A. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383, 407-13.
- Christ, B., Huang, R., & Wilting, J. (2000) The development of the avian vertebral column. *Anat Embryol (Berl)*, 202, 179-94.
- Christ, B., Schmidt, C., Huang, R., Wilting, J., & Brand-Saberi, B. (1998) Segmentation of the vertebrate body. *Anat Embryol (Berl)*, 197, 1-8.
- Cinnamon, Y., Kahane, N., & Kalcheim, C. (1999) Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. *Development*, 126, 4305-15.
- Cooke, J. & Zeeman, E.C. (1976) A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol*, 58, 455-76.
- Crossley, P.H. & Martin, G.R. (1995) The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, 121, 439-51.
- Cserjesi, P., Brown, D., Ligon, K.L., Lyons, G.E., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., & Olson, E.N. (1995) Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*, 121, 1099-110.
- Dabdoub, A., Donohue, M.J., Brennan, A., Wolf, V., Montcouquiol, M., Sassoon, D.A., Hsieh, J.C., Rubin, J.S., Salinas, P.C., & Kelley, M.W. (2003) Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereocilia bundles in the mammalian cochlea. *Development*, 130, 2375-2384.
- DeLong, M.R. (2000) The Basal Ganglia. In: *Principles of neural science*. McGraw-Hill, 852-867.
- Denetclaw, W.F., Jr., Christ, B., & Ordahl, C.P. (1997) Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development*, 124, 1601-10.
- Denetclaw, W.F. & Ordahl, C.P. (2000) The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Development*, 127, 893-905.
- Dhoot, G.K., Gustafsson, M.K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D.M., & Emerson, C.P., Jr. (2001) Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science*, 293, 1663-6.
- Dietrich, S., Schubert, F.R., & Lumsden, A. (1997) Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. *Development*, 124, 3895-908.
- Dockter, J.L. (2000) Sclerotome induction and differentiation. *Curr Top Dev Biol*, 48, 77-127.

- Drossopoulou, G., Lewis, K.E., Sanz-Ezquerro, J.J., Nikbakht, N., McMahon, A.P., Hofmann, C., & Tickle, C. (2000) A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development*, 127, 1337-48.
- Dubrulle, J., McGrew, M.J., & Pourquie, O. (2001) FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell*, 106, 219-32.
- Dudley, A.T., Ros, M.A., & Tabin, C.J. (2002) A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature*, 418, 539-44.
- Ebensperger, C., Wilting, J., Brand-Saberi, B., Mizutani, Y., Christ, B., Balling, R., & Koseki, H. (1995) Pax1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)*, 191, 297-310.
- Ebner von V., (1888) Urwirbel und Neugliederung der Wirbelsäule. *Sitzungsber. Akad Wiss Wien III/97*, 235-269.
- Ebner von V., (1892). Über die Beziehung der Wirbel zu den Urwirbeln. *Sitzungsber. Akad Wiss Wien III/101*, 235-260.
- Ede, D. A. (1964) *Bird structure: An approach through evolution, development and function in the fowl*. Huchtinson Educational, London.
- Evans, D.J. (2003) Contribution of somitic cells to the avian ribs. *Dev Biol*, 256, 114-26.
- Fallon, J.F., Lopez, A., Ros, M.A., Savage, M.P., Olwin, B.B., & Simandl, B.K. (1994) FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, 264, 104-7.
- Fan, C.M., Lee, C.S., & Tessier-Lavigne, M. (1997) A role for WNT proteins in induction of dermomyotome. *Dev Biol*, 191, 160-5.
- Fan, C.M. & Tessier-Lavigne, M. (1994) Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell*, 79, 1175-86.
- Forsberg, H., Crozet, F., & Brown, N.A. (1998) Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Curr Biol*, 8, 1027-30.
- Fricker, L.D. (1988) Carboxypeptidase E. *Annu Rev Physiol*, 50, 309-21.
- Fricker, L.D. & Snyder, S.H. (1982) Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 3886-90.
- Fricker L. D. (1998) Carboxypeptidase E/H. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 1341-1344
- Fricker L. D. (1998)b Carboxypeptidase D. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 1349-1351
- Fruman, D.A., Ferl, G.Z., An, S.S., Donahue, A.C., Satterthwaite, A.B., & Witte, O.N. (2002) Phosphoinositide 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase regulate overlapping sets of genes in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 359-64.
- Fuchtbauer, E.M. (1995) Expression of M-twist during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn*, 204, 316-22.

- Gavin, B.J., McMahon, J.A., & McMahon, A.P. (1990) Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev*, 4, 2319-32.
- Genter, M.B., Burman, D.M., Vijayakumar, S., Ebert, C.L., & Aronow, B.J. (2002) Genomic analysis of alachlor-induced oncogenesis in rat olfactory mucosa. *Physiol Genomics*, 12, 35-45.
- Gomis-Ruth, F.X., Companys, V., Qian, Y., Fricker, L.D., Vendrell, J., Aviles, F.X., & Coll, M. (1999) Crystal structure of avian carboxypeptidase D domain II: a prototype for the regulatory metallo-carboxypeptidase subfamily. *Embo J*, 18, 5817-26.
- Gossler, A. & Hrabe de Angelis, M. (1998) Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 38, 225-87.
- Goulding, M., Lumsden, A., & Paquette, A.J. (1994) Regulation of Pax3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development*, 120, 957-71.
- Grove, E.A., Tole, S., Limon, J., Yip, L., & Ragsdale, C.W. (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*, 125, 2315-25.
- Gupta, M., Stoler, M.H., Fossom, L.H., & Tank, A.W. (1990) Tyrosine hydroxylase mRNA in the dopaminergic neurons of young adult and aged mice by in situ hybridization. *Neurosci Lett*, 119, 49-52.
- Hacker, U., Lin, X., & Perrimon, N. (1997) The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development*, 124, 3565-73.
- Haerry, T.E., Heslip, T.R., Marsh, J.L., & O'Connor, M.B. (1997) Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signaling in *Drosophila*. *Development*, 124, 3055-64.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L. (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*, 195, 231-72.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., & Bradley, A. (1991a) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 11, 5586-91.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., Chang, C., & Bradley, A. (1991b) Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 11, 4509-17.
- He, G.P., Muise, A., Li, A.W., & Ro, H.S. (1995) A eukaryotic transcriptional repressor with carboxypeptidase activity. *Nature*, 378, 92-6.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., & Wilson, S.W. (2000) Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature*, 405, 76-81.
- Helmbrecht, K., Kispert, A., von Wasielowski, R., & Brabant, G. (2001) Identification of a Wnt/beta-catenin signaling pathway in human thyroid cells. *Endocrinology*, 142, 5261-6.
- Helms, J., Thaller, C., & Eichele, G. (1994) Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud. *Development*, 120, 3267-74.
- Hendriks D. F. (1998). Carboxypeptidase U. In: Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, San Diego, pp 1328-1330.

- Herzig, U., Cadenas, C., Sieckmann, F., Sierralta, W., Thaller, C., Visel, A., & Eichele, G. (2001) Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Found Symp*, 239, 129-46; discussion 146-59.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., & Monk, M. (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326, 292-5.
- Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., & Nathans, J. (1999) A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 398, 431-6.
- Huang, R., Zhi, Q., Patel, K., Wilting, J., & Christ, B. (2000a) Dual origin and segmental organisation of the avian scapula. *Development*, 127, 3789-94.
- Huang, R., Zhi, Q., Schmidt, C., Wilting, J., Brand-Saberi, B., & Christ, B. (2000b) Sclerotomal origin of the ribs. *Development*, 127, 527-32.
- Huang, R., Zhi, Q., Wilting, J., & Christ, B. (1994) The fate of somitocoele cells in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)*, 190, 243-50.
- Huelsken, J. & Birchmeier, W. (2001) New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 547-53.
- Hume, C.R. & Dodd, J. (1993) *Cwnt-8C*: a novel Wnt gene with a potential role in primitive streak formation and hindbrain organization. *Development*, 119, 1147-60.
- Jackson, R.J., Howell, M.T., & Kaminski, A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci*, 15, 477-83.
- Jernvall, J. & Thesleff, I. (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 92, 19-29.
- Johnson, R.L., Laufer, E., Riddle, R.D., & Tabin, C. (1994) Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell*, 79, 1165-73.
- Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D., & Pourquie, O. (2000) Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene *HES1* in the presomitic mesoderm. *Development*, 127, 1421-9.
- Kato, N. & Aoyama, H. (1998) Dermomyotomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos. *Development*, 125, 3437-43.
- Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C., & Izpisua Belmonte, J.C. (2001) WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell*, 104, 891-900.
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Pena, J., Johnson, R.L., Belmonte, J.C., & Tabin, C.J. (1998) Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, 280, 1274-7.
- Keynes, R.J. & Stern, C.D. (1984) Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature*, 310, 786-9.
- Kispert, A., Vainio, S., & McMahon, A.P. (1998) Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development*, 125, 4225-34.
- Knecht, A.K. & Harland, R.M. (1997) Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin-induced neural tissue. *Development*, 124, 2477-88.

- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C., & Moon, R.T. (2000a) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem*, 275, 12701-11.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., & Moon, R.T. (2000b) The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*, 16, 279-83.
- Laufer, E., Nelson, C.E., Johnson, R.L., Morgan, B.A., & Tabin, C. (1994) Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, 79, 993-1003.
- Lee, C.S., Buttitta, L.A., May, N.R., Kispert, A., & Fan, C.M. (2000) SHH-N upregulates *Sfrp2* to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm. *Development*, 127, 109-18.
- Lei, Y., Xin, X., Morgan, D., Pintar, J.E., & Fricker, L.D. (1999) Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metallocarboxypeptidase gene family with highest similarity to CPX-2. *DNA Cell Biol*, 18, 175-85.
- Lescher, B., Haenig, B., & Kispert, A. (1998) sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. *Dev Dyn*, 213, 440-51.
- Lewandoski, M., Sun, X., & Martin, G.R. (2000) Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet*, 26, 460-3.
- Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B.I., Freund, J.N., & Kemler, R. (2000) Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development*, 127, 3805-13.
- Lin, K., Wang, S., Julius, M.A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr., & Luyten, F.P. (1997) The cysteine-rich frizzled domain of *Frzb-1* is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11196-200.
- Lin, X. & Perrimon, N. (1999) Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature*, 400, 281-4.
- Litingtung, Y., Dahn, R.D., Li, Y., Fallon, J.F., & Chiang, C. (2002) *Shh* and *Gli3* are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*, 418, 979-83.
- Logan, M. & Tabin, C. (1998) Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods*, 14, 407-20.
- Loomis, C.A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M., & Joyner, A.L. (1996) The mouse *Engrailed-1* gene and ventral limb patterning. *Nature*, 382, 360-3.
- Lu, H.C., Revelli, J.P., Goering, L., Thaller, C., & Eichele, G. (1997) Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of *Hoxb-8*, a mediator of ZPA formation. *Development*, 124, 1643-51.
- Lyons, K.M., Pelton, R.W., & Hogan, B.L. (1990) Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development*, 109, 833-44.
- Mallo, M. & Brandlin, I. (1997) Segmental identity can change independently in the hindbrain and rhombencephalic neural crest. *Dev Dyn*, 210, 146-56.

- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., & Niehrs, C. (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411, 321-5.
- Marcelle, C., Ahlgren, S., & Bronner-Fraser, M. (1999) In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog. *Dev Biol*, 214, 277-87.
- Marcelle, C., Stark, M.R., & Bronner-Fraser, M. (1997) Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development*, 124, 3955-63.
- Martin, G.R. (1998) The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev*, 12, 1571-86.
- Masiakowski, P. & Yancopoulos, G.D. (1998) The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases. *Curr Biol*, 8, R407.
- McGrew, M.J., Dale, J.K., Fraboulet, S., & Pourquie, O. (1998) The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. *Curr Biol*, 8, 979-82.
- McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L.B., Fan, C.M., Harland, R.M., & McMahon, A.P. (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev*, 12, 1438-52.
- Miller, J.R. (2002) The Wnts. *Genome Biol*, 3, REVIEWS3001.
- Min, H., Danilenko, D.M., Scully, S.A., Bolon, B., Ring, B.D., Tarpley, J.E., DeRose, M., & Simonet, W.S. (1998) Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev*, 12, 3156-61.
- Mock, W.L. & Stanford, D.J. (1996) Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry*, 35, 7369-77.
- Monsoro-Burq, A.H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P., & Le Douarin, N. (1996) The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development*, 122, 3607-16.
- Moon, R.T., Brown, J.D., Yang-Snyder, J.A., & Miller, J.R. (1997) Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands. *Cell*, 88, 725-8.
- Muller, T.S., Ebensperger, C., Neubuser, A., Koseki, H., Balling, R., Christ, B., & Wilting, J. (1996) Expression of avian Pax1 and Pax9 is intrinsically regulated in the pharyngeal endoderm, but depends on environmental influences in the paraxial mesoderm. *Dev Biol*, 178, 403-17.
- Munsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P., & Lassar, A.B. (1995) Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev*, 9, 2911-22.
- Munsterberg, A.E. & Lassar, A.B. (1995) Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development*, 121, 651-60.
- Murtaugh, L.C., Chyung, J.H., & Lassar, A.B. (1999) Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev*, 13, 225-37.
- Murtaugh, L.C., Zeng, L., Chyung, J.H., & Lassar, A.B. (2001) The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Dev Cell*, 1, 411-22.

- Naggert, J.K., Fricker, L.D., Varlamov, O., Nishina, P.M., Rouille, Y., Steiner, D.F., Carroll, R.J., Paigen, B.J., & Leiter, E.H. (1995) Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*, 10, 135-42.
- Nakayama, T., Cui, Y., & Christian, J.L. (2000) Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development. *Cell Mol Life Sci*, 57, 943-56.
- Niswander, L. (2003) Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet*, 4, 133-43.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., & Martin, G.R. (1993) FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*, 75, 579-87.
- Novikova, E., Fricker, L.D., & Reznik, S.E. (2001) Metalloprotease Z is dynamically expressed in mouse development. *Mech Dev*, 102, 259-62.
- Novikova, E.G. & Fricker, L.D. (1999) Purification and characterization of human metalloprotease Z. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 564-8.
- Novikova, E.G., Reznik, S.E., Varlamov, O., & Fricker, L.D. (2000) Carboxypeptidase Z is present in the regulated secretory pathway and extracellular matrix in cultured cells and in human tissues. *J Biol Chem*, 275, 4865-70.
- Olivera-Martinez, I., Coltey, M., Dhouailly, D., & Pourquie, O. (2000) Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. *Development*, 127, 4611-7.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., & Pourquie, O. (1997) Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell*, 91, 639-48.
- Pandur, P. & Kuhl, M. (2001) An arrow for wingless to take-off. *Bioessays*, 23, 207-10.
- Parr, B.A. & McMahon, A.P. (1995) Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, 374, 350-3.
- Parr, B.A., Shea, M.J., Vassileva, G., & McMahon, A.P. (1993) Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development*, 119, 247-61.
- Peters, H., Wilm, B., Sakai, N., Imai, K., Maas, R., & Balling, R. (1999) Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*, 126, 5399-408.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., & De Robertis, E.M. (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature*, 397, 707-10.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J., & Skarnes, W.C. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, 407, 535-8.
- Pizette, S., Abate-Shen, C., & Niswander, L. (2001) BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*, 128, 4463-74.
- Pizette, S. & Niswander, L. (1999) BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*, 126, 883-94.
- Pourquie, O. (2001) The vertebrate segmentation clock. *J Anat*, 199, 169-75.
- Pourquie, O., Coltey, M., Breant, C., & Le Douarin, N.M. (1995) Control of somite patterning by signals from the lateral plate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3219-23.

- Pourquie, O., Fan, C.M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., & Le Douarin, N.M. (1996) Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell*, 84, 461-71.
- Pownall, M.E., Strunk, K.E., & Emerson, C.P., Jr. (1996) Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic bHLH genes in somites of quail embryos. *Development*, 122, 1475-88.
- Pritchard, C.A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., & McMahon, M. (1996) Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol*, 6, 614-7.
- Qian, Y., Varlamov, O., & Fricker, L.D. (1999) Glu300 of rat carboxypeptidase E is essential for enzymatic activity but not substrate binding or routing to the regulated secretory pathway. *J Biol Chem*, 274, 11582-6.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J.D., Wims, M., Zheng, H., & Bradley, A. (1992) Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem*, 201, 331-5.
- Reznik, S.E. & Fricker, L.D. (2001) Carboxypeptidases from A to z: implications in embryonic development and Wnt binding. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1790-804.
- Rehn, M. & Pihlajaniemi, T. (1995) Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. The longest form contains a novel motif homologous to rat and *Drosophila* frizzled proteins. *J Biol Chem*, 270, 4705-11.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75, 1401-16.
- Rodrigo, I., Hill, R.E., Balling, R., Munsterberg, A., & Imai, K. (2003) Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development*, 130, 473-82.
- Rodriguez-Esteban, C., Tsukui, T., Yonei, S., Magallon, J., Tamura, K., & Izpisua Belmonte, J.C. (1999) The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature*, 398, 814-8.
- Rovere, C., Viale, A., Nahon, J., & Kitabgi, P. (1996) Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin-concentrating hormone in obese fat/fat mice. *Endocrinology*, 137, 2954-8.
- Saga, Y. & Takeda, H. (2001) The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nat Rev Genet*, 2, 835-45.
- Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y.J., Kawakami, A., Kuroiwa, A., & Takeda, H. (2001) Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development*, 128, 4873-80.
- Sefton, M., Sanchez, S., & Nieto, M.A. (1998) Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development*, 125, 3111-21.
- Skidgel R. A. (1998) Carboxypeptidase M. In: *Handbook of proteolytic enzymes* Academic Press, San Diego, pp 1347-1349.
- Skidgel R. A. und Erdos E. G. (1998) Lysine carboxypeptidase. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, San Diego, pp 1344-1347.
- Smyth, D.G., Maruthainar, K., Darby, N.J., & Fricker, L.D. (1989) Catalysis of slow C-terminal processing reactions by carboxypeptidase H. *J Neurochem*, 53, 489-93.

- Springman E. B. (1998). Mast cell carboxypeptidase. In: Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, San Diego, pp 1330-1333.
- Sockanathan, S. & Jessell, T.M. (1998) Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell*, 94, 503-14.
- Song, L. & Fricker, L.D. (1997) Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metalloproteinase. *J Biol Chem*, 272, 10543-50.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., & McMahon, A.P. (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, 372, 679-83.
- Stockdale, F.E., Nikovits, W., Jr., & Christ, B. (2000) Molecular and cellular biology of avian somite development. *Dev Dyn*, 219, 304-21.
- Summerbell, D., Lewis, J.H., & Wolpert, L. (1973) Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature*, 244, 492-6.
- Sun, X., Lewandoski, M., Meyers, E.N., Liu, Y.H., Maxson, R.E., Jr., & Martin, G.R. (2000) Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet*, 25, 83-6.
- Sun, X., Mariani, F.V., & Martin, G.R. (2002) Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 418, 501-8.
- Swindell, E.C., Moeller, C., Thaller, C., & Eichele, G. (2001) Cloning and expression analysis of chicken *Lix1*, a founding member of a novel gene family. *Mech Dev*, 109, 405-8.
- Szeto, D.P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A.K., O'Connell, S.M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiberman, A.S., Izpisua-Belmonte, J.C., & Rosenfeld, M.G. (1999) Role of the Bicoid-related homeodomain factor *Pitx1* in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*, 13, 484-94.
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., & Cossu, G. (1998) Differential activation of *Myf5* and *MyoD* by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of *Myf5*. *Development*, 125, 4155-62.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., & Buckingham, M. (1997) Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: *Pax3* and *Myf-5* act upstream of *MyoD*. *Cell*, 89, 127-38.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., & He, X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407, 530-5.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., & He, X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407, 530-5.
- Tanda, N., Kawakami, Y., Saito, T., Noji, S., & Nohno, T. (1995) Cloning and characterization of Wnt-4 and Wnt-11 cDNAs from chick embryo. *DNA Seq*, 5, 277-81.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., & et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269, 230-4.
- Tickle, C. (1981) The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature*, 289, 295-8.

- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., & Lee, J. (1982) Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature*, 296, 564-6.
- Tribioli, C. & Lufkin, T. (1999) The murine *Bapx1* homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development*, 126, 5699-711.
- Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L., & Selleck, S.B. (1999) The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in *Drosophila*. *Nature*, 400, 276-80.
- Udupi, V., Gomez, P., Song, L., Varlamov, O., Reed, J.T., Leiter, E.H., Fricker, L.D., & Greeley, G.H., Jr. (1997) Effect of carboxypeptidase E deficiency on progastrin processing and gastrin messenger ribonucleic acid expression in mice with the fat mutation. *Endocrinology*, 138, 1959-63.
- Varlamov, O. & Fricker, L.D. (1998) Intracellular trafficking of metalloproteinase D in AtT-20 cells: localization to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface. *J Cell Sci*, 111 (Pt 7), 877-85.
- Wallin, J., Wilting, J., Koseki, H., Fritsch, R., Christ, B., & Balling, R. (1994) The role of *Pax1* in axial skeleton development. *Development*, 120, 1109-21.
- Wallingford, J.B., Ewald, A.J., Harland, R.M., & Fraser, S.E. (2001) Calcium signaling during convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol*, 11, 652-61.
- Wallingford, J.B., Rowling, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E., & Harland, R.M. (2000) Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature*, 405, 81-5.
- Watanabe, Y., Duprez, D., Monsoro-Burq, A.H., Vincent, C., & Le Douarin, N.M. (1998) Two domains in vertebral development: antagonistic regulation by SHH and BMP4 proteins. *Development*, 125, 2631-9.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., & DiNardo, S. (2000) *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, 407, 527-30.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., & et al. (1991) The *myoD* gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, 251, 761-6.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., & Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*.
- Wodarz, A. & Nusse, R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 59-88.
- Wu, C., Wu, F., Pan, J., Morser, J., & Wu, Q. (2003) Furin-mediated processing of pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem*.
- Xin, X., Day, R., Dong, W., Lei, Y., & Fricker, L.D. (1998a) Cloning, sequence analysis, and distribution of rat metalloproteinase Z. *DNA Cell Biol*, 17, 311-9.
- Xin, X., Day, R., Dong, W., Lei, Y., & Fricker, L.D. (1998b) Identification of mouse CPX-2, a novel member of the metalloproteinase gene family: cDNA cloning, mRNA distribution, and protein expression and characterization. *DNA Cell Biol*, 17, 897-909.

Zetterstrom, R.H., Williams, R., Perlmann, T., & Olson, L. (1996) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res*, 41, 111-20.

Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., & Steiner, D.F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem*, 274, 20745-8.

Zuniga, A., Haramis, A.P., McMahon, A.P., & Zeller, R. (1999) Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature*, 401, 598-602.

Curriculum vitae

Angaben zur Person

Name Carsten Möller
* 26.10.1972 in Lingen/Ems,
ledig

Adresse Zwinglstr. 4
30171 Hannover

Telefon 0511-8506959 (privat)
0511-5359-107 (dienstlich)

E-Mail carsten.moeller@mpihan.mpg.de

Schulbildung/Wehrdienst

1979-1992 Allgemeine Hochschulreife am
Ludwig-Windthorst-Gymnasium in Meppen

1992-1993 Grundwehrdienst

Studium

1993-1999 Diplomstudium Biochemie (Universität Hannover)

Prüfungsfächer Biochemie, Biophysikalische Chemie und
Pharmakologie

05/1999-11/1999 Diplomarbeit

Angefertigt im Pharmaforschungszentrum Wuppertal, Bayer AG Abteilung
Herz-Kreislauf-Forschung I

Thema: "Herstellung und Charakterisierung von Prokollagen-
Reporterkonstrukten des humanen Kollagens Typ III"

Promotion

01/2000-07/2003 Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie, Hannover
Abteilung Molekulare Embryologie
unter der Anleitung von Prof. Dr. Gregor Eichele

Veröffentlichungen

Artikel

Bertram-Drogatz PA, Sobek-Klocke I, **Moeller C**, Wingbermhle D, Beil W, Sewing KF, Manns MP, Wagner S. Growth characteristics and influence of antibiotics on rough/smooth phenotypic variants of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999 Jul;18(7):490-5

Swindell EC, **Moeller C**, Thaller C, Eichele G. Cloning and expression analysis of chicken Lix1, a founding member of a novel gene family. *Mech Dev*. 2001 Dec;109(2):405-8

Moeller C, Yaylaoglu MB, Alvarez-Balado G, Thaller C and Eichele G. Murine Lix1, a novel marker for substantia nigra, cortical layer 5, and hindbrain structures. *Brain Res Gene Expr Patterns*, 2002 (1), 1-4, 199-203

Moeller C, Swindell EC, Kispert A and Eichele G. Carboxypeptidase Z (CPZ) modulates Wnt signaling and regulates the development of skeletal elements in the chicken. *Development*, in press.

Kongressbeiträge

Möller C, Kauschke SG, Hauenschild J, Kohlmeyer J and Burchardt ER. Collagen α_1 (III) reporter hybrids: novel tools for the identification and characterization of antifibrotic compounds. Poster and Abstract, Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2000, 361(4 Suppl.) R14 Abstr. 44.

Moeller C, Swindell EC, Eichele G. A role for Carboxypeptidase Z in somite differentiation, *Dev. Biol*. 2001, 235, 172-294, Abstr. 502.