

**Analyse des
Flow-abhängigen Symmetriebruchs
im Frosch *Xenopus*:
Die Funktion des Nodal-Inhibitors
Coco**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Zoologie

vorgelegt von

Maike Christine Margarete Getwan

aus Bietigheim-Bissingen

2015

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Martin Blum
2. berichtende Person: Prof. Dr. Heinz Breer

Eingereicht am: 08. 01. 2015
Mündliche Prüfung am: 13. 04. 2015

Die vorliegende Arbeit wurde am 04. 03. 2015 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Martin Blum möchte ich dafür danken, dass er mir dieses äußerst spannende und weitreichende Thema anvertraut hat. Außerdem möchte ich dafür danken, dass er mich während meiner Zeit in der Zoologie unterstützt und viele Einblicke in die weite Welt der Wissenschaft durch Besuche verschiedenster Konferenzen und Fortbildungen ermöglicht hat.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz Breer, dass er sich die Zeit nimmt diese Arbeit zu lesen und sich sofort dafür bereit erklärt hat sie zu begutachten.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Axel Schweickert. Ohne dich wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen! Du warst jederzeit bereit für wissenschaftliche Diskussionen, hast mit vielen kreativen Anstößen diese Arbeit gedeihen lassen und warst mir immer eine emotionale Stütze, wenn du mir mehr zugetraut hast als ich mir selbst. Danke für alles!

Außerdem will ich all meinen Begleiter(innen) während meiner Zeit in der Embryologie danken. Angefangen mit den Ehemaligen und Zurückgekehrten. An aller erster Stelle die Alliterations-Lehrämter Steffen und Dominik, die mir schon die Diplomarbeitszeit mit ihrer kreativen Art erleichtert und versüßt haben. Gefolgt von Nadine, mit der ich den Laboralltag bis zur Doktorarbeit sehr genossen hab. Philipp, der mir wissenschaftlich in dieser Zeit mit Rat und Tat und vielen Ideen beigestanden hat. (Du solltest die alten Freitagnachmittage wieder auferstehn lassen! ;)) Ebenso wie Tina mit ihrem ruhigen, netten und Thomas mit seinem lustigen, frechen aber auch sehr liebenswertem Wesen.

Weiterhin danke ich Mr. Bic-C Marco, durch dessen lustige Art die Anfangszeit der Doktorarbeit unglaublich angenehm war. Mit der Doktorarbeit kam dann auch Anna, die mich immer wieder mit ihrer unbeschweren Art auf den Boden gebracht, aufgebaut und sehr unterstützt hat. Außerdem brachte der Einzug ins große Labor Matze, meinen unglaublich optimistischen, engagierten und weltklasse Laborplatz-Nachbarn mit sich. Auch Tim möchte ich danken, nicht zuletzt, weil er meinen Ergebnisteil kritisch beäugt hat (jep, Kästle), sondern auch für den frischen wissenschaftlichen Wind, den er mit ins Labor bringt. Ebenso möchte ich allen Doktoranden, die mit mir Zeit im Labor verbracht haben nicht nur für wissenschaftlichen Austausch danken!

Ich möchte die Zeit nicht missen!

Ebenso möchte ich allen meinen ehemaligen Schützlingen dafür danken, dass sie mich ertragen haben. Angefangen mit meinem längsten, sehr liebenswürdigen, quirligen Schützling Kathrin, gefolgt von den Bachelorn Darja (zumindest in der Anfangszeit), Melanie, Tabea und Angela, Anna und dem Masterstudenten Matthias. Ich wünsch euch viel Glück und Erfolg für die Zukunft!

Nicht zu vergessen, geht auch ein großes Dankeschön an alle weiteren Mitarbeiter, die einem wissenschaftlich und bürokratisch weiterhelfen und sich für das Wohl unserer Tiere sorgen!

Auch wenn der Dank für sie hier an letzter Stelle steht, ist er riesengroß, da sie schon immer eine wichtige stützende Rolle in meinem Leben und so auch während der Doktorarbeit spielte, meine Familie. Im Speziellen meine Mutter. Danke, dass mir immer der Rücken frei gehalten wurde!

Zusammenfassung

Der Bauplan der Vertebraten ist durch drei Körperachsen gekennzeichnet, die antero-posteriore (AP), dorsoventrale (DV) und links-rechts (LR) Achse. Die LR-Achse ist die letzte Achse, die während der Embryogenese festgelegt wird. Ihre Ausprägung wird beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* nach einigen Tagen morphologisch anhand der Lage der visceralen Organe wie Herz, Darm und Gallenblase sichtbar.

Die ersten molekularen Unterschiede zwischen der linken und rechten Körperhälfte können dagegen schon nach einem Tag, während der frühen Neurulation, detektiert werden. Diese finden sich in der Archenterondachplatte („gastrocoel roof plate“ – GRP), ein ciliertes Epithel, welches für den Symmetriebruch essentiell ist. Ihre rotierenden Monocilien erzeugen einen linksgerichteten Flüssigkeitsstrom, welcher das Cerberus/DAN-Gen *Coco* unterdrückt. Da *Coco* als Inhibitor des bilateralsymmetrisch ko-exprimierten TGF β -Faktors Nodal (*Xnr1*) agiert, wird *Xnr1* Flüssigkeitsstrom-abhängig aus seiner Reprimierung entlassen. Nun ist *Xnr1* in der Lage eine unilaterale Signalkaskade im linken Seitenplattenmesoderm (SPM) mit sich selbst, seinem Antagonisten *Lefty/ antivin* und dem Homeoboxgen *Pitx2c* zu induzieren.

Eine zentrale Frage dieses Szenarios ist die nach dem Mechanismus, durch welchen der Flüssigkeitsstrom die Repression von *Coco* erzielt. Die Analyse der *Coco*-Transkription gab den ersten Hinweis, dass *Coco* mRNA posttranskriptionell abgebaut und/ oder seine Translation unterbunden wird. Die Genregulation auf Ebene der mRNA erfolgt für gewöhnlich durch ihre untranslatierten Regionen (UTR), meist durch die 3'-UTR. Um die Rolle der *Coco* 3'-UTR für seine Regulation zu untersuchen, wurden Protektor-RNAs verwendet, welche endogene *Coco* mRNA vor ihren Inhibitoren schützen sollte. Ihre Injektion führte zur Unterbindung der Flüssigkeitsstrom-abhängigen *Coco*-Repression und bestätigte so die Regulation von *Coco* über seine 3'-UTR. Da 3'-UTRs der Angriffspunkt von mikroRNAs sind, wurden Funktionsverlustversuche des Syntheseeenzyms *Dicer* durchgeführt. Diese Versuche bestätigten ihre Beteiligung innerhalb der *Coco*-Regulation. Anschließende Untersuchungen identifizierten miR-15a als zentralen Spieler. Wurde ihre Synthese verhindert oder ihre Bindestelle innerhalb der *Coco* 3'-UTR spezifisch geschützt, konnte die Strom-abhängige *Coco*-Repression unterbunden werden.

Epistasisexperimente demonstrieren, dass die LR-Achse von Embryonen mit inhibierter Flüssigkeitsströmung durch die Zugabe eines miR-15a Vorläufermoleküls auf der linken Seite wieder hergestellt werden konnte. Zusammenfassend enthüllte diese Arbeit, dass miRNAs dem Nodal-Inhibitor *Coco* vorgeschaltet und somit das primäre Ziel des linksgerichteten Flüssigkeitsstroms sind.

Abstract

The bilaterally symmetrical vertebrate body plan is characterized by the three body axes, anterior-posterior (AP), dorsal-ventral (DV) and the left-right (LR). The LR-axis is the last one to be specified during embryonic development. Its impact on the morphology of the developing organism is visible after a few days in *Xenopus laevis*, because of the orientation of the visceral organs, such as the heart, gut and the gall bladder.

The first molecular differences between the left and right side can already be detected after one day during early neurulation. It is found at the gastrocoel-roof-plate (GRP), a ciliated epithelium which is essential for symmetry breakage. Cilia rotate to produce a leftward fluid movement, which represses the Cerberus/DAN gene *Coco* in the lateral cells of the epithelium. As *Coco* acts as an inhibitor of the coexpressed TGF β -type growth factor Nodal (*Xnr1*), *Xnr1* is flow-dependently released from repression on the left side. *Xnr1* is capable to induce a unilateral gene-cascade in the left lateral plate mesoderm (LPM) consisting of Nodal itself, its antagonist *Lefty/ antivin* and the homeobox gene *Pitx2c*.

A central question in this setting concerns the mechanism by which flow results in the repression of *Coco*. The analysis of *Coco* transcription gave a first hint, indicating that *Coco* mRNA is post-transcriptionally degraded and/ or that its translation is blocked.

Gene regulation at the level of mRNA usually occurs through the untranslated regions (UTR), in most cases via the 3'UTR. To examine the role of the *Coco* 3'UTR for its regulation, protector-RNAs were used which should protect endogenous *Coco* mRNA from potential inhibitors. Injections led to the interruption of the flow-dependent *Coco* repression, verifying regulation of *Coco* via the 3'UTR. As 3'UTRs are target sites for microRNAs, loss of function experiments of the processing enzyme *Dicer*

were performed. These experiments verified the involvement of miRNAs in the regulation of *Coco*. Further analyses identified miR-15a as a central player. The interruption of its synthesis or the specific protection of its binding site within the *Coco* 3'UTR prevented flow-dependent down-regulation of *Coco*. Epistatic experiments demonstrated that the LR-axis of embryos with inhibited flow could be rescued by addition of the miR-15a precursor on the left side. In summary this thesis work revealed miRNAs as a primary target of leftward flow, upstream of the Nodal inhibitor *Coco*.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I. Einleitung..... | 1 |
| 1. Die Links-Rechts-Achse..... | 1 |
| 1.1 Nodal..... | 1 |
| 1.2 Ausbildung der LR-Achse - Die Nodal-Signalkaskade..... | 2 |
| 1.3 Die Archenterondachplatte..... | 4 |
| 1.3.1 Entstehung und Bau der GRP..... | 4 |
| 1.3.2 Cilien..... | 5 |
| 1.3.3 GRP-Cilien..... | 6 |
| 1.4 Der Symmetriebruch durch den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom..... | 8 |
| 1.4.1 Das „Morphogen“-Modell – Transport durch Vesikel..... | 8 |
| 1.4.2 Das „Flow-Sensor“-Modell..... | 8 |
| 1.5 <i>Coco</i> – ein Zielgen des asymmetrischen Flüssigkeitsstroms..... | 10 |
| 1.5.1 <i>Coco</i> und die <i>Cerberus/ DAN</i> -Familie..... | 11 |
| 1.5.2 Die Funktion von <i>dand5</i> -Genen beim Symmetriebruch..... | 11 |
| 2. Posttranskriptionelle Regulation – mikroRNAs..... | 13 |
| 2.1 Prozessierung..... | 13 |
| 2.2 Wirkungsweise von mikroRNAs..... | 16 |
| 2.3 Die Rolle von mikroRNAs während der Entwicklung von <i>Xenopus</i> | 17 |
| 2.3.1 Regulation von <i>Nodal</i> durch miRNAs..... | 17 |
| 2.3.2 Regulation der Ciliogenese durch miRNAs..... | 18 |
| II. Arbeitshypothese..... | 19 |
| III. Ergebnisse..... | 22 |
| 1. Posttranskriptionelle Regulation von <i>Coco</i>..... | 22 |
| 1.1 Klonierung und Vergleich der 3'-UTRs von <i>Xenopus laevis Coco</i> -Paralogen.. | 22 |
| 1.2 Regulation von <i>Coco</i> durch die 3'-UTR..... | 26 |
| 1.3 Unterteilung der <i>Coco</i> 3'-UTRs in Protektor-RNAs..... | 27 |
| 1.3.1 <i>Coco A</i> 3'-UTR..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| Die Wirkung der Protektor-RNAs <i>A F1</i> bis 3 auf <i>Coco</i> | 28 |
| Subfraktionierung der <i>Coco A</i> 3'-UTR..... | 29 |
| Einfluss der Protektorfragmente <i>A F1-3</i> auf die Spezifizierung der LR-Achse..... | 31 |
| 1.3.2 <i>Coco B</i> 3'-UTR..... | 33 |
| Auswirkung der <i>Coco B</i> Protektor-RNAs auf <i>Coco</i> | 33 |
| Die Bedeutung der <i>Coco B</i> 3'-UTR für die Induktion der LR-Achse..... | 34 |
| 2. miRNA-vermittelte Regulation der <i>Coco</i>-Asymmetrie..... | 37 |
| 2.1 Koexpression von <i>Coco</i> und <i>Dicer</i> in der GRP..... | 37 |
| 2.2 Die linksseitige Repression von <i>Coco</i> ist <i>Dicer</i> -abhängig..... | 39 |
| 2.3 Funktionsverlust von <i>Dicer</i> unterbindet die Nodal-Kaskade..... | 40 |
| 2.4 <i>Dicer</i> -MO wirkt nicht über Ciliogenese oder Morphogenese der GRP..... | 42 |
| 3. <i>Coco</i>-regulierende miRNAs..... | 45 |
| 3.1. Analyse der 3'-UTR von <i>Coco A</i> und <i>B</i> auf potentielle miRNA Bindestellen..... | 45 |
| 3.2 Der Einfluss von miR-15a auf <i>Coco</i> und die Nodal-Kaskade..... | 47 |
| 3.2.1 Räumlich-zeitliches Expressionsmuster von miR-15a..... | 47 |
| 3.2.2 Funktionsverlust von <i>miR-15a</i> verhindert die Regulation von <i>Coco</i> und resultiert in einer veränderten Nodal-Kaskade..... | 48 |
| 3.2.3 Schutz der miR-15a-Bindesequenz in der <i>Coco</i> 3'-UTR stabilisiert die mRNA-Expression..... | 50 |
| 3.3 miR-107* aber nicht miR-145 reguliert <i>Coco</i> mRNA-Stabilität während des Symmetriebruchs..... | 53 |
| 3.3.1 Expressionsmuster von miR-107* in SM und GRP..... | 53 |
| 3.3.2 miR-107* reguliert die Stabilität der <i>Coco</i> mRNA in den somitischen GRP-Zellen..... | 55 |
| 4. Die Regulation von <i>Coco</i> durch miRNAs erfolgt Flow-abhängig..... | 57 |
| 4.1 Die linksseitige Regulation der <i>Coco</i> mRNA durch miR-15 ist Flüssigkeitsstrom-abhängig..... | 57 |
| 4.2 Epistatische Wirkung des <i>Coco</i> 3'-UTR-Schutzes und des Flow-Verlusts..... | 59 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Regulation der <i>Coco</i>-reprimierenden miRNA(s) durch den Flüssigkeitsstrom..... | 61 |
| 5.1 Polyductin..... | 61 |
| 5.1.1 Die Expression von <i>pkhd1</i> mRNA während der <i>Xenopus</i> -Entwicklung..... | 61 |
| 5.1.2 Funktionsverlust von <i>pkhd1</i> resultiert in LR-Achsen-Defekten..... | 63 |
| 5.1.3 Polyductin-Funktion bei der Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms..... | 65 |
| 5.2 Funktion von Bicaudal C für die <i>Coco</i> -Regulation..... | 67 |
| 5.2.1 Die RNA-Bindedomäne von Bic-C ist notwendig für die <i>Coco</i> -Regulation..... | 67 |
| 5.2.2 Regulation von <i>Coco</i> durch Bic-C ist abhängig von PC2..... | 69 |
| 6. Differenzielle Rolle von <i>Dicer</i> und <i>Dgcr8</i> bei der LR-Achsen-Differenzierung..... | 72 |
| 6.1 <i>Dgcr8</i> mRNA Expression im superfiziellen Mesoderm und in der GRP..... | 72 |
| 6.2 Funktionsverlust von <i>Dgcr8</i> und <i>Dicer</i> führt zu differenziellen Effekten..... | 75 |
| 6.3 Analyse der GRP nach <i>Dgcr8</i> -Funktionsverlust..... | 77 |
| 6.3.1 Unveränderte somitische GRP-Zellen in <i>Dgcr8</i> -Morphanten..... | 77 |
| 6.3.2 Die Ciliogenese der GRP ist <i>Dgcr8</i> -abhängig..... | 77 |
| 6.4 <i>Dgcr8</i> - und <i>Dicer</i> -Verlustversuche wirken antagonistisch..... | 78 |
| 6.4.1 <i>Dicer</i> -Funktionsverlust rettet die Ciliogenese in <i>Dgcr8</i> -Morphanten..... | 78 |
| 6.4.2 Verlust von <i>Dicer</i> rettet <i>Coco</i> mRNA-Expression nach <i>Dgcr8</i> -Knock-down..... | 81 |
| 6.4.3 Der gleichzeitige Funktionsverlust von <i>Dicer</i> und <i>Dgcr8</i> ist für die Nodal-Kaskade folgenlos..... | 82 |
| 6.5 Inhibition der Haut-Ciliogenese durch <i>Dicer</i> - und <i>Dgcr8</i> -Funktionsverlust..... | 83 |
| IV. Diskussion..... | 86 |
| 1. Flüssigkeitsstrom-abhängige Regulation von <i>Coco</i> durch miRNAs..... | 86 |
| 1.1 miR-107* als potentieller Kandidat der <i>Coco</i> -Regulierung..... | 87 |
| 1.2 miRNAs des miR-17~92-Clusters als potentielle Kandidaten der <i>Coco</i> -Regulation | 88 |

| | |
|---|------------|
| 2. Flow-anhängig Aktivierung von miRNAs..... | 90 |
| 2.1 Flow-abhängiger Transport von miRNAs via Exosomen..... | 90 |
| 2.2 miRNA-Aktivierung im „Flow-Sensor“-Modell..... | 92 |
| 2.3 Bicaudal C, ein möglicher Effektor der asymmetrischen miRNA- Aktivierung..... | 93 |
| 2.3.1 Bic-C-abhängige Regulation von <i>Coco</i> durch miRNAs..... | 93 |
| 2.3.2 Wirkungsweise von Bic-C..... | 95 |
| 3. Die Rolle von miRNAs bei der Entwicklung der GRP..... | 96 |
| 3.1 Mögliche Dgcr8-Zielprozesse bei der Spezifizierung des SM..... | 96 |
| 3.1.1 FGF-Signalweg..... | 96 |
| 3.1.2 Pkd2/ BicC..... | 98 |
| 3.1.3 Wnt-Signaltransduktion..... | 98 |
| 3.2 Die Rolle von Dicer und Dgcr8 bei der SM-Spezifizierung: ein Modell..... | 99 |
| 3.3 Mögliche miRNA-Kandidaten und deren Ziel-mRNAs für die SM- Spezifizierung..... | 101 |
| 4. Schlussfolgerung der Arbeit..... | 103 |
| V. Methoden und Materialien..... | 104 |
| VI. Abkürzungsverzeichnis..... | 131 |
| VII. Quellenverzeichnis..... | 133 |
| VIII. Lebenslauf..... | 147 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------|---|----|
| Abb. 01 | Expression von <i>dand5</i> - und <i>Nodal</i> -Homologen der Vertebraten. | 12 |
| Abb. 02 | miRNA-Synthese. | 14 |
| Abb. 03 | Sequenzvergleich der 3'-UTRs von <i>Coco A</i> und <i>B</i> | 24 |
| Abb. 04 | Expressionsanalyse der paralogen <i>Coco</i> -Gene. | 26 |
| Abb. 05 | Schutz der <i>Coco</i> 3'-UTR vor posttranskriptionellen Repressoren. | 26 |
| Abb. 06 | Schutz der <i>Coco A</i> 3'-UTR verhindert Abbau von <i>Coco</i> mRNA. | 28 |
| Abb. 07 | Eingrenzung der für die posttranskriptionelle Regulation von <i>Coco A</i> wichtigen Bereiche. | 30 |
| Abb. 08 | Schutz der <i>Coco A</i> 3'-UTR beeinflusst die Induktion der Nodal-Kaskade nicht. | 31 |
| Abb. 09 | <i>Coco</i> mRNA wurde durch Schutz der <i>Coco B</i> 3'-UTR stabilisiert. | 33 |
| Abb. 10 | LR-Achsen-Entwicklung wird durch linksseitigen Schutz der <i>Coco B</i> 3'-UTR gestört. | 35 |
| Abb. 11 | Expression von <i>Dicer</i> mRNA. | 38 |
| Abb. 12 | Verlust von <i>Dicer</i> stabilisiert <i>Coco</i> ohne Veränderung der somitischen GRP Zellen. | 40 |
| Abb. 13 | miRNA-abhängige <i>Coco</i> -Regulation ist für die LR-Achsen-Ausbildung notwendig. | 41 |
| Abb. 14 | Kein Einfluss von <i>Dicer</i> -MO auf die Ciliogenese der GRP. | 43 |
| Abb. 15 | Potentielle miRNA-Bindestellen in der <i>Coco</i> 3'-UTR. | 46 |
| Abb. 16 | Expressionsanalyse von miR-15. | 48 |
| Abb. 17 | Die miR-15a-Regulation von <i>Coco</i> ist für die LR-Achsen-Entwicklung essentiell. | 49 |
| Abb. 18 | Das Blockieren der miR-15a-Bindestelle von <i>Coco A</i> und <i>B</i> stabilisiert die mRNA. | 51 |
| Abb. 19 | Schutz von <i>Coco</i> durch miR-15a hat keinen Einfluss auf LR-Achsen-Entwicklung. | 52 |
| Abb. 20 | Expressionsanalyse von miR-107*. | 54 |
| Abb. 21 | Regulation von <i>Coco</i> erfordert miR-107*, nicht aber miR-145. | 56 |
| Abb. 22 | Flow-abhängige <i>Coco</i> -Regulation durch miR-15. | 58 |
| Abb. 23 | Epistatische Wirkung eines Flüssigkeitsstrom-Verlusts in Kombination mit <i>Coco B F2</i> Protektor-RNA. | 60 |

| | | |
|----------------|---|-----|
| Abb. 24 | Expressionsanalyse von <i>pkhd1</i> | 62 |
| Abb. 25 | <i>pkhd1</i> -MO resultiert in LR-Achsen-Defekten. | 63 |
| Abb. 26 | <i>Coco</i> wird durch <i>pkhd1</i> -erlust stabilisiert. | 64 |
| Abb. 27 | Verlust von <i>pkhd1</i> unterbindet die GRP-Ciliogenese. | 66 |
| Abb. 28 | Aufbau von Bic-C- Δ SAM und Δ KH. | 67 |
| Abb. 29 | Bic-C schützt <i>Coco</i> durch seine KH-Domänen. | 68 |
| Abb. 30 | Überexpression von Bic-C- Δ SAM in Kombination mit <i>Pkd2</i> führt zur Induktion der Nodal-Kaskade. | 69 |
| Abb. 31 | Koinjektion von Bic-C- Δ SAM und <i>Pkd2</i> destabilisiert <i>Coco</i> | 70 |
| Abb. 32 | Expressionsmuster von <i>Dgcr8</i> mRNA. | 74 |
| Abb. 33 | <i>Dgcr8</i> ist für die Regulation von <i>Coco</i> notwendig. | 76 |
| Abb. 34 | Morphologie der somitischen GRP-Zellen wird durch <i>Dgcr8</i> -MO nicht verändert. | 77 |
| Abb. 35 | Veränderte Ciliogenese in der GRP von <i>Dgcr8</i> -Morphanten. | 78 |
| Abb. 36 | <i>Dicer</i> -MO stellt Cilienpolarisierung und -länge in der GRP nach <i>Dgcr8</i> -Verlust wieder her. | 80 |
| Abb. 37 | <i>Dicer</i> -MO und <i>Dgcr8</i> -MO kompensieren sich in Bezug auf <i>Coco</i> und <i>Pitx2c</i> | 82 |
| Abb. 38 | Einfluss von <i>Dgcr8</i> - und <i>Dicer</i> -MO auf Morphogenese und Ciliogenese der Epidermis von Kaulquappen. | 85 |
| Abb. 39 | Modell der Flow-abhängigen miRNA-Aktivierung. | 91 |
| Abb. 40 | Einordnung von <i>Dgcr8</i> -prozessierten miRNAs in den Prozess der SM-Spezifizierung. | 97 |
| Abb. 41 | Potentiellies Zusammenspiel von <i>Dicer</i> und <i>Dgcr8</i> während der SM-Spezifizierung. | 100 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabelle 01 | Auswirkung der <i>Coco A</i> 3'-UTR Protektor-RNAs <i>F1 – 3</i> auf <i>Coco</i> mRNA Expression und Symmetrie. | 29 |
| Tabelle 02 | Auswirkung der <i>Coco A</i> 3'-UTR Protektor-RNAs <i>F1.1 – 3.1</i> auf <i>Coco</i> | 30 |
| Tabelle 03 | Auswirkung der <i>Coco A</i> 3'-UTR Protektor-RNAs <i>F1 – 3</i> auf <i>Pitx2c</i> mRNA Expression. | 32 |
| Tabelle 04 | Auswirkung der <i>Coco B</i> 3'-UTR Protektor-RNAs <i>F1</i> und <i>2</i> auf <i>Coco</i> | 34 |
| Tabelle 05 | Auswirkung der <i>Coco B</i> 3'-UTR Protektor-RNAs <i>F1</i> und <i>2</i> auf <i>Pitx2c</i> | 34 |
| Tabelle 06 | Auswirkung eines <i>Dicer</i> -Verlusts auf <i>Coco</i> | 39 |
| Tabelle 07 | Auswirkung eines <i>Dicer</i> -Funktionsverlusts auf <i>Pitx2c</i> | 42 |
| Tabelle 08 | <i>Dicer</i> -MO verändert GRP-Ciliogenese nicht. | 44 |
| Tabelle 09 | Auswirkung der Inhibition der miR-15a-Prozessierung auf <i>Coco</i> | 50 |
| Tabelle 10 | Auswirkung der Inhibition der miR-15a-Prozessierung auf <i>Pitx2c</i> | 50 |
| Tabelle 11 | Die Wirkung der Protektion der miR-15a-Bindestelle in <i>Coco A</i> und <i>B</i> auf <i>Coco</i> | 52 |
| Tabelle 12 | Die Wirkung der Protektion der miR-15a-Bindestelle in <i>Coco A</i> und <i>B</i> auf <i>Pitx2c</i> | 53 |
| Tabelle 13 | Auswirkung der Protektor-RNA von miR-145 bzw. -107* auf <i>Coco</i> | 55 |
| Tabelle 14 | Ektopische, linke Expression von miR-15 gleicht den Verlust des Flüssigkeitsstroms aus. | 58 |
| Tabelle 15 | <i>Coco B F2</i> Protektor-RNA und Verlust der Strömung wirken epistatisch. | 60 |
| Tabelle 16 | <i>pkhd1</i> -Funktionsverlust verhindert <i>Pitx2c</i> -Expression im linken SPM. | 63 |
| Tabelle 17 | Verlust der linksseitigen <i>Coco</i> -Repression durch <i>pkhd1</i> -Knockdown. | 64 |
| Tabelle 18 | Verlust der GRP-Monocilien durch <i>pkhd1</i> -Knockdown. | 65 |
| Tabelle 19 | Verlust der linksseitigen <i>Coco</i> -Repression durch Überexpression von <i>Bic-C-ΔSAM</i> | 68 |
| Tabelle 20 | Verlust der linksseitigen Nodal-Kaskade durch Überexpression von <i>Bic-C-ΔSAM</i> | 70 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabelle 21 | Überexpression von <i>Bic-C-ΔSAM</i> und <i>Pkd2</i> fördert die Induktion der Nodal-Kaskade. | 70 |
| Tabelle 22 | Überexpression von <i>Bic-C-ΔSAM</i> und <i>Pkd2</i> fördert die Repression von <i>Coco</i> | 71 |
| Tabelle 23 | Auswirkung des <i>Dgcr8</i> -MO auf <i>Pitx2c</i> | 75 |
| Tabelle 24 | Auswirkung des <i>Dgcr8</i> -MO auf <i>Coco</i> | 75 |
| Tabelle 25 | Auswirkung eines <i>Dgcr8</i> -Funktionsgewinn auf <i>Coco</i> -Expression. | 76 |
| Tabelle 26 | Partielle Wiederherstellung der Cilienpolarisierung durch Koinjektion von <i>Dgcr8</i> -MO und <i>Dicer</i> -MO. | 79 |
| Tabelle 27 | Partielle Wiederherstellung der Cilienlänge durch Koinjektion von <i>Dgcr8</i> -MO und <i>Dicer</i> -MO. | 81 |
| Tabelle 28 | Wiederherstellung der linksseitigen <i>Coco</i> -Repression nach kombinierter Injektion von <i>Dgcr8</i> -MO und <i>Dicer</i> -MO. | 83 |
| Tabelle 29 | Wiederherstellen der Nodal-Kaskade nach LOF von <i>Dgcr8</i> und <i>Dicer</i> | 84 |

I. Einleitung

1. Die Links-Rechts-Achse

Die Ausprägung einer LR-Achse ist beim adulten Organismus nicht offensichtlich. Erst die visceralen Organe zeigen asymmetrische Lagebeziehungen auf. Die meisten Organe weisen eine asymmetrische Lage auf, die ihre bestmögliche Funktionalität bei geringem Raumangebot erlaubt. Auf der rechten Seite gibt es eine höhere Anzahl an Lungenloben, da der Apex des Herzens zur linken Körperhälfte gerichtet ist. Der Aufbau des Herzens an sich zeigt ebenso keine Symmetrie. Und auch der Darm weist bei jedem Organismus eine spezifische, asymmetrische Windung auf (Blum et al., 2014a). Diese Anlage der Organe wird als *Situs solitus* bezeichnet. In einem von 10.000 Fällen ist beim Menschen der Organsitus gespiegelt. Man spricht von einem *Situs inversus totalis* (Cooke, 2004). Dieser führt zu keinerlei gesundheitlichen Problemen. Sind jedoch nur einzelne Organe invertiert, wie dies bei einer Heterotaxie der Fall ist, kann es z.B. im Fall des Herzens embryonal lethal sein (Storm van's et al., 2005).

Die Entwicklung der LR-Achse lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen. (1) Da der frühe Embryo bilateral symmetrisch ist, muss ein Symmetriebruch die Achse etablieren. Dieser erfolgt während der Neurulation und führt zu (2) einem asymmetrischen und damit unilateralen Signal auf der linken Seite. Durch dieses kommt es (3) zu einem Transfer der asymmetrischen Information in das linke Seitenplattenmesoderm (SPM). Dort wird (4) eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche (5) in der asymmetrischen Lokalisierung der Organe resultiert. Diese Schritte werden im Folgenden genauer beleuchtet.

1.1 Nodal

Nodal zählt zu den TGF β -Wachstumsfaktoren („transforming growth factor β “), welche sekretiert werden. Im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass Nodal-moleküle als Morphogene agieren und über lange Distanzen diffundieren können (Chen et al., 2001). Neben der LR-Achsen Entwicklung sind die bei *Xenopus laevis* vorkommenden Nodal related Moleküle Xnr1 – 6, an vielen weiteren essentiellen Prozessen, wie z. B. der Mesoderminduktion und dessen Musterbildung, beteiligt

(Jones et al., 1995; Kimelman, 2006; Schier, 2009). Das Nodalprotein wird von der Zelle als Proprotein sekretiert und dort durch Konvertasen in die Prodomäne und den reifen Liganden gespalten. Der Ligand bildet mit einem weiteren TGF β -Faktor ein Dimer (Schier, 2009). Es handelt sich in den meist Fällen um Homodimere, es können sich aber auch zwei unterschiedliche Liganden der TGF β -Familie zusammenschließen, wie dies z.B. im Frosch mit dem Nodal related Protein Xnr1 und derrière (GDF3 – „growth differentiation factor 3“) der Fall ist (Tanaka et al., 2007; Vonica et al., 2007). Das Dimer bindet daraufhin an einen Komplex aus einem Typ I und Typ II Aktivin-Rezeptor (ActRII und ActRIIA/B), die beide Serin/ Threonin-Kinase Rezeptoren sind. Der Komplex besteht aus je zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren, ist also ein Tetramer. Er interagiert wiederum mit einem Nodal-Korezeptor der EGF-CFC Familie, wie Cripto oder Cryptic (Shen et al., 2000). Die ligandenabhängige Aktivierung setzt eine Phosphorylierungskaskade in Gang. Die Typ II Rezeptoren phosphorylieren intrazellulär den Typ I Rezeptor, wodurch die sekundären Botenstoffe, die Smads, phosphoryliert werden. Im Fall des Nodal-Signalwegs handelt es sich um die R-Smads („receptor activated Smads“) Smad 2 und 3. Erst durch die Phosphorylierung interagieren diese miteinander und darüber hinaus noch mit einem universellen Mediator, dem Co-Smad Smad 4. Daraufhin gelangen sie in den Zellkern und aktivieren dort die Transkription von Zielgenen (Schier, 2009). Im Fall von Nodal ist darunter auch das *Nodal*-Gen selbst, was zu einer positiven Rückkopplung führt. Teilweise werden aber auch Inhibitoren des Signalwegs induziert, wie das ebenfalls zur TGF β -Großfamilie gehörende *Lefty/ activin* während der LR-Achsen Entwicklung (Constam, 2014; Schier, 2009; Weiss et al., 2012).

1.2 Ausbildung der LR-Achse - Die Nodal-Signalkaskade

Die Untersuchung des molekularen Hintergrunds der LR-Achsen-Entwicklung begann damit, dass 1995 von den ersten LR-asymmetrisch exprimierten Genen im Hühnchenembryo berichtet wurde (Levin et al., 1995). Unter ihnen waren vier Gene, der Aktivin-Rezeptor *cActR11a* („*chicken activin receptor 11a*“), der Transkriptionsfaktor *HNF3 β* („*Hepatocyte nuclear factor*“) bzw. *FoxA2* („*forkhead box A2*“), das sekretierte Signalmolekül *Shh* („*Sonic Hedgehog*“) sowie *Nodal* („*chicken nodal related 1*“ - *cNR1*; Levin et al., 1995). Nur eines davon zeigte auch in anderen Vertebraten, wie dem Frosch und

der Maus, eine asymmetrische Expression im linken Seitenplattenmesoderm (SPM), nämlich *Nodal* (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Lustig et al., 1996).

Nodal wird beim Hühnchen nicht nur im SPM asymmetrisch exprimiert. Etwas früher kann es bereits links neben dem Hensenschen Knoten detektiert werden (Levin et al., 1995). Bei allen anderen untersuchten Vertebraten gibt es eine bilateralsymmetrische Transkriptionsdomäne im Links-Rechts-Organisator (LRO). LROs sind allerdings morphologisch nicht einheitlich organisiert. Bei der Maus ist die *Nodal*-Expression erst bilateralsymmetrisch und wird im Laufe des Symmetriebruchs linksasymmetrisch. Sie liegt posterior zur *Chorda dorsalis* und flankiert das PNC („posteriore notochord“; Blum et al., 2007; Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996). Bei Medaka, dem Zebrafisch und *Xenopus* gibt es im wesentlichen ein bilateralsymmetrisches Muster, das zuweilen links oder rechts deutlicher ausgeprägt sein kann (Long et al., 2003; Schweickert et al., 2010; Soroldoni et al., 2007). Dieses flankiert das Kupffersche Vesikel (KV; Medaka und Zebrafisch) oder lässt sich innerhalb des Embryos am Archenterondach detektieren (*Xenopus*; Long et al., 2003; Soroldoni et al., 2007).

Die LRO-Expression von *Nodal* ist in jedem Fall notwendig, um im linken SPM die *Nodal*-Signalkaskade zu aktivieren (Brennan et al., 2002). Wie *Nodal* über mehrere Zellen hinweg und von Keimblatt zu Keimblatt (Endoderm zu Mesoderm) die Distanz von den LROs zum SPM überwindet, ist noch nicht letztlich geklärt. Auf Grund einer höheren Stabilität bildet es wahrscheinlich mit einem GDF-Faktor (Maus: GDF1; Frosch: *derrière*) ein Dimer, welches sich entlang von Glykosaminoglykanen/Proteoglykanen der Extrazellulären Matrix fortbewegt (Marjoram et al., 2011; Oki et al., 2007; Rankin et al., 2000; Tanaka et al., 2007; Vonica et al., 2007).

Auch „Gap Junctions“ (Connexin 26) zwischen den Endodermzellen sind notwendig, um das linksseitige *Nodal*-Signal im SPM zu induzieren (Beyer et al., 2012; Viotti et al., 2012). Dort wird zusätzlich die Expression des *Nodal*-Inhibitors *Lefty/ antivin* aktiviert. Dieser bindet kompetitiv an den *Nodal*-Rezeptor, und blockiert dadurch die Auslösung der *Nodal*-Signalkaskade. Eine zweite *Lefty*-Expression bildet sich in der dorsalen Mittellinie, in der Grundplatte des Neuralrohrs, aus. Diese unterbindet die Diffusion des *Nodal*-Signals auf die rechte Seite („midline barrier“; Cheng et al., 2000; Lohr et al., 1997).

Die Nodalkaskade induziert im SPM zusätzlich auch *Pitx2c*, das über eine positive Rückkopplungsschleife die eigene Transkription kontrolliert (Campione et al., 1999). Dadurch bleibt das linksseitige Signal auch nach der Lefty-vermittelten Inhibition der Nodal-Kaskade im SPM erhalten und steuert dort die asymmetrische Organomorphogenese (Logan et al., 1998).

1.3 Die Archenterondachplatte

Die frühe *Nodal*-Expression findet in den laterale Zellen der Archenterondachplatte („gastrocoel roof plate“ – GRP) statt, dem LRO des Frosches. Sie ist ein Epithel, welches sich am posterioren Ende des Urdarmdachs befindet (Shook et al., 2004). Homologe Strukturen in anderen Wirbeltierspezies sind das KV bei den „Echten Knochenfischen“ und das PNC bei Säugetieren (Blum et al., 2007; Essner et al., 2005). Alle befinden sich anterior zu jeweiligen homologen Strukturen des Spemann Organisators (Blum et al., 2014a).

1.3.1 Entstehung und Bau der GRP

Die GRP wird aus dem superfiziellen Mesoderm (SM) gebildet. Dieses ist das einzige mesodermale Gewebe, das vor der Gastrulation an der Keimoberfläche liegt (Shook et al., 2004). Das SM ist durch die Expression einiger Gene charakterisiert: dazu zählen das Nodalgen *Xnr3*, der Wachstumsfaktor der Wnt-Familie *Wnt11* und *Foxj1*, ein Transkriptionsfaktor der forkhead-Familie (Smith et al., 1995; Stubbs et al., 2008; Walentek et al., 2013). Im Laufe der Gastrulation beginnen die SM-Zellen in den Embryo einzuwandern, kommen am Archenterondach zu liegen und werden nun als GRP bezeichnet. Dies ist etwa im Stadium 13, bei Beginn der Neurulation, der Fall. Während der voranschreitenden Neurulation integrieren die GRP-Zellen in darunterliegende Gewebe. Somit bleibt sie nur bis ca. zum Stadium 19/ 20 erhalten. Daher ist die GRP eine sehr transiente Struktur. Diese Eigenschaft gilt für alle LROs (Blum et al., 2014a). Entsprechend ihrem Zellschicksal lässt sich das Epithel in drei Zelltypen einteilen: (1) zentrale notochordale Zellen, die später Teil der *Chorda dorsalis* werden; (2) die beidseitig flankierenden hypochordalen Zellen, die später eine Frosch-spezifische Struktur, das Hypochord, bilden und (3) die lateralen Zellen der GRP, welche sich als erste abfalten,

in die Somiten integrieren und entsprechend somitische GRP-Zellen genannt werden (Shook et al., 2004).

Die somitischen Zellen sind in vielerlei Hinsicht anders als die notochordalen und hypochordalen Zellen. Zum Beispiel gibt es einige Gene, die speziell hier exprimiert werden, wie *Xnr1 (Nodal)* und *derrière*, aber auch der Somitenmarker *myoD* (Vonica et al., 2007). Es gibt jedoch auch Gemeinsamkeiten aller GRP-Zellen, wie z.B. die Ausbildung von Cilien (Schweickert et al., 2007).

1.3.2 Cilien

Cilien sind Ausstülpungen der Zelle und daher von der Zellmembran umgeben. Die Ausstattung an Membranproteinen unterscheidet sich jedoch vom Rest der Zellmembran.

Cilien lassen sich in eine Übergangszone und das Axonem untergliedern (Fliegau et al., 2007). Das Axonem besteht für gewöhnlich aus zwei zentralen Mikrotubulisträngen, welche von neun Mikrotubulidupletts umgeben sind (9x2+2 Struktur). Die Anzahl der zentralen Mikrotubuli kann variieren. So können sich auch vier oder kein Mikrotubulistrang in der Mitte befinden. Sein Fehlen ist meist ein Zeichen für die Unbeweglichkeit des Ciliums. Der zentrale Strang dient nämlich als lose Ansatzstelle von Dyneinen. Diese sind zusätzlich fest mit den äußeren Mikrotubulidupletts verbunden und sind als Motorproteine in der Lage, sich entlang des inneren Mikrotubulistrangs zu bewegen. Hierdurch wird eine Ablenkung und daher ein Schlagen des Ciliums erzeugt (Fliegau et al., 2007). Dyneine dienen außerdem dazu, Moleküle aus dem Cilium heraus zu transportieren (retrograder Transport). Eine weitere Familie von Motorproteinen, die Kinesine, bewegen Moleküle in das Cilium hinein (anterograder Transport). Dies ist essentiell, da im Cilium selbst keine Proteine translatiert werden können. So entsteht ein Intraflagelärer Transport (IFT), welcher u.a. für den Aufbau des Ciliums notwendig ist (Fliegau et al., 2007).

Ein spezieller Cilientyp, die sensorischen Cilien, können auf unterschiedliche Weise extrazelluläre Signale wahrnehmen (mechanosensorisch oder chemosensorisch) und in die Zelle weitergeben. Dies wird durch verschiedene Transmembranmoleküle (Ionenkanäle, Rezeptoren) gewährleistet. So scheint der SHH- oder der PCP-Wnt-Signalweg an Cilien gekoppelt zu sein (Fliegau et al., 2007).

Sensorische Cilien sind sehr weit verbreitet und ganz typisch für sensorische Nervenzellen wie Photorezeptorzellen, die Niere, die Gallengänge, den Pankreas und die Knochen/ Knorpel (Fliegau et al., 2007). Daher ist es nicht verwunderlich, dass ein Verlust der Cilien zu einer Vielzahl von Krankheitssymptomen führt (cystische Nieren/ Leber/ Gallenblase, mentale Retardation, Unfruchtbarkeit, Blindheit), die kollektiv als Ciliopathien bezeichnet werden (Gerdes et al., 2009; Lancaster et al., 2009).

Neben sensorischen, unbeweglichen Cilien gibt es auch bewegliche Cilien. Die Zellen mancher Gewebe tragen mehrere hundert von ihnen, manche aber auch nur eines (Monocilium), wie z.B. die Geißeln von Spermien, bestimmte Bereiche des Gehirns oder der LROs. Alle beweglichen Cilien werden von *Foxj1* induziert. Ob eines oder viele Cilien pro Zelle entstehen, hängt von der Anzahl der Basalkörper pro Zelle ab. Um viele Basalkörper bilden zu können, wird das Gen *Multicilin* benötigt (Stubbs et al., 2012).

Multicilien sind typisch für das Lungenepithel des Menschen aber auch für die Epidermis der Froschkaulquappe. Beide Epithelien ähneln sich stark in der Zellzusammensetzung (Becherzellen, Multicilierte Zellen, Ionozyten) und in ihrer Funktion (Dubaiissi et al., 2011). Becherzellen („goblet cells“) sind für die Produktion von Mukus verantwortlich. Multicilierte Zellen („multiciliated cells“ – MCCs) sind für den Abtransport dieses Mukus und daher die Entfernung von Fremdkörpern (Bakterien etc.) notwendig. Ionozyten („ion secreting cells“ – ICCs) enthalten verschiedenen Ionenpumpen in ihrer Membran und puffern den pH-Wert des Epithels (Quigley et al., 2011).

Ein vierter Zelltyp, welcher spezifisch für die *Xenopus* Epidermis ist, sind die Serotonin-sekretierenden Zellen („small secretory cells“ – SSCs). Diese sind ebenfalls für die Schleimproduktion aber auch die Cilienschlagfrequenz erforderlich (Dubaiissi et al., 2014; Walentek et al., 2014).

1.3.3 GRP-Cilien

Die GRP-Cilien üben eine rotierende Bewegung aus, welche im Uhrzeigersinn verläuft. Des Weiteren sind sie dadurch gekennzeichnet, dass sie im posterioren Bereich der Zellen verankert und nach posterior geneigt sind (Schweickert et al., 2007). Rotieren die Cilien, werden sie bei ihrer Rechtsbewegung durch die Nähe

zur Zellmembran ihrer Nachbarzelle in ihrem Schlag abgeschwächt. Während ihrer Linksbewegung befinden sie sich dagegen im Extrazellulären Raum und gewinnen wieder an Schlagkraft. Hierdurch wird die Induktion einer linksgerichteten Flüssigkeitsbewegung direkt über der GRP ermöglicht (Schweickert et al., 2007). Dieses Cilien-schlagmuster ist für die Cilien aller LROs charakteristisch (Bellomo et al., 1996; Essner et al., 2005; Sulik et al., 1994).

Die Richtung, in welcher der Flüssigkeitsstrom erfolgt und auch dessen Effektivität ändern sich entsprechend der Cilien-Ausrichtung. Nur die identische posteriore Polarisierung und zusätzliche Cilien-Neigung der hypochordalen und notochordalen GRP-Zellen ermöglicht eine linksgerichtete Strömung. Ungeneigte und zentral lokalisierte Cilien würden dagegen eine lediglich turbulente, ungerichtete Strömung erzeugen.

Die Polarisierung der GRP-Cilien findet im Laufe der Neurulation vom Stadium 14 bis 17 statt (Schweickert et al., 2007). Bei der Entstehung der GRP beginnen die Cilien zuerst aus der Mitte der Zelle auszuwachsen. Mit voranschreitender Entwicklung werden sie länger und zum posterioren Pol verlagert. Dies geschieht zunächst im zentralen Bereich der GRP und setzt sich von dort nach lateral fort, mit Ausnahme der somitischen GRP-Zellen, die zentral bleiben (Schweickert et al., 2007). Neuere Publikationen zeigen, dass diese lateralen Cilien zudem immotil sind, wie dies zuvor bereits für die Maus nachgewiesen wurde (Boskovski et al., 2013; McGrath et al., 2003).

Manipulationen, die den Strom oder die Cilienbeweglichkeit ausschalten zeigen, dass der linksgerichtete Flüssigkeitsstrom für die LR-Achsen-Etablierung essentiell ist (Schweickert et al., 2007; Vick et al., 2009). Versuche in der Maus zeigen, dass ebenso die Richtung der Strömung entscheidend für die Organanlage ist. Hier wurde durch einen artifiziell angelegten, rechten Strom eine Inversion der visceralen Organe erzeugt (Nonaka et al., 2002).

1.4 Der Symmetriebruch durch den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom

Welche Rolle spielt nun die linksgerichtete Strömung? Das Vorhandensein von motilen wie auch immotilen Cilien auf der GRP deutet schon darauf hin, dass es sensorische Cilien geben könnte, die den von motilen Cilien erzeugten Flüssigkeitsstrom perzipieren. Neben diesem attraktiven Modell gibt es jedoch auch alternative Vorstellungen, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.4.1 Das „Morphogen“-Modell – Transport durch Vesikel

Ursprünglich beruhte das „Morphogen“-Modell auf der Vorstellung, dass rechtsseitiges Nodal durch den Flüssigkeitsstrom auf die linke Seite transportiert wird und sich so das Nodal-Signal im Vergleich zur rechten Seite verstärkt (Hamada et al., 2002; Saijoh et al., 2003). Diese Idee konnte von Vick widerlegt werden (Vick et al., 2009). Er zeigte, dass ein rechtsseitiger Verlust des Dyneinmotors *dnah9* („*dynein heavy chain 9*“), welcher für die Beweglichkeit der GRP-Cilien notwendig ist, zu keinerlei Veränderungen der LR-Achsen-Entwicklung führt (Vick et al., 2009). Dies belegt, dass keine essentielle LR-Achsen-Determinante aus den lateralen rechten GRP-Zellen nach links transportiert wird. Alternativ dazu könnten jedoch Determinanten in den zentralen GRP-Zellen entstehen und von dort nach links transportiert werden. Hierzu könnten z.B. kleine, vesikuläre Strukturen zählen, die in der Maus beobachtet wurden, die NVPs („nodal vesicular parcels“; Tanaka et al., 2005; Hirokawa et al., 2006). Diese beinhalten Shh und Retinsäure, welche auf der linken Seite entlassen und von den Zellen aufgenommen werden sollen. Alternativ könnten sie auch von den lateralen Cilien durch Rezeptoren chemosensorisch wahrgenommen werden. Problematisch bei diesem Modell ist, dass die Vesikel nicht allein durch die Kraft eines Zusammenpralls auf der linken Seite aufbrechen könnten. Um ihren Inhalt zu entlassen müsste ihre Membran biochemisch aufgelöst werden (Cartwright et al., 2007).

1.4.2 Das „Flow-Sensor“-Modell

Das „Flow-Sensor“-Modell basiert auf der Beobachtung, dass es zwei Arten von Cilien auf dem PNC bzw. der GRP gibt (Boskovski et al., 2013; McGrath et al.,

2003). Motile, polarisierte Cilien, die eine Strömung in Gang setzen und immotile, unpolarisierte Cilien, welche sie wahrnehmen. Um solch einen Stimulus zu detektieren benötigt das Cilium ein mechanosensorisches Membranprotein und einen mit ihm gekoppelten Rezeptor oder Ionenkanal (McGrath et al., 2003). Bei der Maus, Medaka und *Xenopus* wurden entsprechende Proteine auf GRP-Cilien gefunden, darunter der Ca^{2+} -Kanal PC2 (Polycystin 2; Gen: *pkd2*; Kamura et al., 2011; McGrath et al., 2003; Schweickert et al., 2007).

PC2 ist ein zur TRP-Familie („transient receptor potential“) gehörender Calciumkanal. Er kommt sowohl in der Cilien- als auch in der „Endoplasmatischen Retikulums“ (ER) - Membran vor (Vassilev et al., 2001). Mutationen dieses Gens führen beim Menschen zu ADPKD („Autosomal Dominate Polycystische Nierenerkrankung“). Die Erkrankung macht sich ab einem Alter von ca. 55-60 mit einer Prävalenz von 1:1.000 durch polycystische Nieren bemerkbar (Harris, 2002). In der Niere misst PC2 den Primärharn, wozu er als Sensor PC1 benötigt (Polycystin 1; Gen: *pkd1*; Nauli et al., 2003). PC1 ist ebenfalls ein Transmembranprotein, welches 11 Transmembrandomänen und einen langen, extrazellulären N-Terminus besitzt (Harris, 2002). Sein C-Terminus befindet sich in der Zelle und interagiert mit PC2 (Qian et al., 1997). Außerdem wurde nachgewiesen, dass sein C-Terminus proteolytisch abgespalten werden kann und daraufhin im Nukleus zu detektieren ist (Chauvet et al., 2004).

Kommt es durch den Primärharn zur Stimulierung von PC1, öffnet sich PC2 und entlässt Ca^{2+} Ionen ins Cilium. Der Ca^{2+} -Einstrom führt durch Öffnung von Calciumkanälen (PC2, IP3-Kanäle) des zellulären Ca^{2+} -Speichers, dem ER, zur positiven Rückkopplung. Hierdurch wird der Ca^{2+} -Einstrom ins Cytoplasma amplifiziert (Anyatonwu et al., 2004).

Auch am PNC/ KV konnten zwei verschiedene, asymmetrische Ca^{2+} -Signale beobachtet werden. Zum einen wurde beschrieben, dass teils am äußersten Rand des PNCs/ KV und in den benachbarten Endodermzellen die Calciumionen-Konzentration nach der linksgerichteten Strömung steigt (McGrath et al., 2003; Sarmah et al., 2005). Im PNC selbst konnte außerdem eine stärker linksseitig oszillierende Calciumwelle im Vergleich zur rechten Seite detektiert werden (Takao et al., 2013). Daher ist ein ähnliches Szenario wie in der Niere auch für die verschiedenen LROs vorstellbar.

Das Modell wird weiterhin dadurch gestützt, dass der Verlust von PC2 bei Maus und

Fisch (Zebraabärbling, Medaka) zu einer abnormalen LR-Achsen-Entwicklung führt, ohne die jeweiligen LROs-Cilien bzw. den Flüssigkeitsstrom hierbei zu verändern. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass trotz des Vorkommens von PC2 auf allen PNC-Cilien, der Kanal nur auf den lateralen Cilien für eine korrekte LR-Achsen-Ausbildung notwendig ist (Yoshida et al., 2012).

Die Funktion des Sensors PC1 in der Niere wird jedoch bei Maus und Medaka von einem anderen PC-Familienmitglied übernommen, *pkd1l1*. Funktionsverlust von *pkd1l1* beeinflusst, im Gegensatz zu PC1, bei beiden Spezies die LR-Achsen-Entwicklung (Field et al., 2011; Kamura et al., 2011; Karcher et al., 2005).

Ein weiterer PC2-interagierender Sensor, dessen Mutation für die ARPKD (Autosomal Rezessive Polycystische Nierenerkrankung) verantwortlich ist, ist Polyductin (auch Fibrocystin genannt - Gen: *pkhd1*). Die Folge dieser Erkrankung sind ebenfalls cystische Nieren jedoch auch Cysten in der Leber und Fehlbildungen der Gallengänge. ARPKD tritt mit einer Frequenz von 1/20.000 unter allen Lebendgeburten auf und ist meist schon embryonal lethal (Garcia-Gonzalez et al., 2007). Polyductin ist mit mindestens 86 Exons und 447kDa ein sehr großes Protein (Bergmann et al., 2004). Es besitzt allerdings, wie auch PC1, lediglich eine Transmembrandomäne, einen langen, extrazellulären N-Terminus und einen kurzen, intrazellulären C-Terminus (Harris, 1999). Auch Polyductin interagiert mit PC2 durch seinen intrazellulären Terminus, allerdings dient hier das Motorprotein Kif3b als Vermittler (Wu et al., 2006). Wie PC1 kann sein C-Terminus auf einen Stimulus hin abgespalten werden und in den Zellkern gelangen (Hiesberger et al., 2006). Es wurden bisher jedoch noch keine LR-Achsen-Defekte bei *Pkhd1*-Knockout Tieren beschrieben.

1.5 Coco – ein Zielgen des asymmetrischen Flüssigkeitsstroms

Neben *Nodal* und *derrière* wird ein weiteres Gen in den lateralen GRP Zellen exprimiert, der multifunktionale Inhibitor von Wachstumsfaktoren *Coco* (auch *dand5* genannt). *Coco* mRNA Expression wird im Gegensatz zu *Nodal* und *derrière* durch den linksgerichteten Strom verändert und kann daher als Ziel des Flüssigkeitsstroms betrachtet werden, wie ich in meiner Diplomarbeit zeigen konnte (Schweickert et al., 2010).

1.5.1 *Coco* und die *Cerberus/ DAN* Familie

Coco wurde bei der Suche nach Smad7-regulierten Genen entdeckt (Bell et al., 2003). Es zählt zur *Cerberus/ DAN/ Gremlin*-Familie, welche als sekretierte Moleküle extrazellulär Wnt-, BMP- und TGF β -Faktoren binden und dadurch die Interaktion mit ihren jeweiligen Rezeptoren verhindern (Piccolo et al., 1999). Die größte Ähnlichkeit zeigt *Coco* dabei zu *Cerberus*; beide besitzen eine für die *Cerberus/ DAN*-Familie typische cysteinreiche Domäne mit 9 Cysteinen im C-Terminus. Diese ist wahrscheinlich für deren Bindung mit TGF β - und Wnt- Molekülen notwendig. Im N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid. Außerdem wurde eine Erkennungssequenz ermittelt, welche auf eine proteolytische Spaltung hinweist. Daher muss *Coco* evtl. gespalten werden, um aktiv zu werden (Bell et al., 2003; Belo et al., 2009).

Wie das im Spemann-Organisator exprimierte *Cerberus*, kann auch *Coco* nach ventraler Injektion eine partielle sekundäre Achse mit vorwiegend Kopfstrukturen ausbilden. Dorsal injiziert kommt es dagegen zu Embryonen, bei welchen anteriore Strukturen wie Kopf, Klebdrüse, Gehirn, stärker ausgeprägt sind (Bell et al., 2003). Im Gegensatz zu *Cerberus* kann *Coco* jedoch schon viel früher in der Entwicklung detektiert werden. Die mRNA liegt maternal am animale Pol vor und kann bis zum Ende der Gastrulation dort detektiert werden (Bell et al., 2003). Alle anderen Wnt- und BMP- Inhibitoren des Organisators werden dagegen erst nach dem Einsetzen der zygotischen Transkription, während des Mittblastula-Übergangs („mid blastula transition“ – MBT), hergestellt und beschränken sich in ihrer Lokalisation auf die dorsale Randzone bzw. den Organisator (Bell et al., 2003). *Coco* ist in der Blastula dafür verantwortlich, die Aktivität der Mesoderm-induzierenden Xnr- und BMP-Faktoren im Ektoderm zu unterbinden und somit den epidermalen/ neuronalen Charakter des Ektoderms zu erhalten. Das findet trotz der gleichmäßigen *Coco*-Expression im animalen Ektoderm nur auf der dorsalen Seite des Embryos statt (Bates et al., 2013).

1.5.2 Die Funktion von *dand5*-Genen beim Symmetriebruch

Cerberus/ dand5-Gene werden nicht nur während der DV-/ AP-Achsen-Entstehung benötigt sondern auch für die dritte Achse der Vertebraten, die LR-Achse. Die *dand5*-Gene werden bei den verschiedenen Wirbeltieren unterschiedlich angesprochen. In

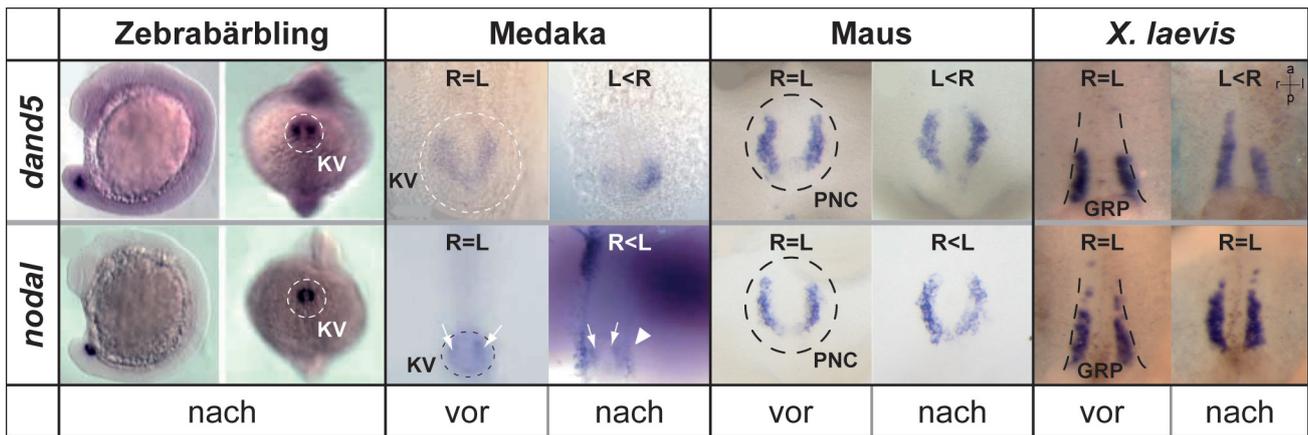


Abb. 01 Expression von *dand5*- und *Nodal*-Homologen der Vertebraten.

Es wird die Expression von *dand5*- bzw. *Nodal*-Homologen in den jeweiligen LRO (Links-Rechts-Organisatoren) von verschiedenen Vertebraten gegenübergestellt (Zebrabärbling, Medaka, Maus und *X. laevis*). Außer für den Zebrabärbling (Stadium nach dem Strom) sind Stadien vor und nach dem Flüssigkeitsstrom dargestellt. Des Weiteren ist die jeweilige Expression durch L<R (links geringer), R=L (bilateralsymmetrisch) und R<L (rechts geringer) gekennzeichnet.

KV – Kupffersches Vesikel; PNC – „Posteriore Notochord“; GRP – „Gastrocoel Roof Plate“

Bilder verändert nach (Hashimoto et al., 2004; Hojo et al., 2007; Kitajima et al., 2013)

Xenopus als *Coco*, bei der Maus als *Cerl2* und beim Zebrabärbling sowie Medaka als *charon* (Abb. 01; Hashimoto et al., 2004; Hojo et al., 2007; Marques et al., 2004; Vonica et al., 2007).

In den genannten Organismen besitzen *dand5*-Proteine eine reprimierende Wirkung auf *Nodal*. Daher können sie nahe der *Nodal*-Expression als bilaterale Domäne detektiert werden. Sie weisen entweder eine flankierende oder überlappende Expression mit *Nodal* auf (Abb. 01; Hashimoto, 2004; Hojo et al., 2007; Marques et al., 2004; Schweickert et al., 2010; Vonica et al., 2007).

Die Abhängigkeit der *dand5* mRNA vom Flüssigkeitsstrom wurde neben *X. laevis* auch für die Maus und Medaka nachgewiesen. Hojo et al vermutete dies durch Expressionsanalysen von *charon* bei Individuen mit fehlender linksgerichteter Strömung (Hojo et al., 2007). Für *Coco* in *X. laevis* wurde dieser Zusammenhang in meiner Diplomarbeit erstmals funktionell durch Expressionsanalysen und Epistasisexperimente bestätigt (Schweickert et al., 2010). Dabei zeigte sich, dass *Coco* in Folge der Strömung linksseitig reprimiert wird. Dadurch werden *Xnr1* und *derrière* vermutlich aus der *Coco*-Reprimierung entlassen (Schweickert et al., 2010; Vonica et al., 2007) und können die Nodalkaskade im linken SPM aktivieren. Rechtsseitig wird *Coco* nicht reprimiert, weshalb es rechts nicht zur Induktion im SPM kommt (Schweickert et al., 2010).

2. Posttranskriptionelle Regulation – mikroRNAs

Die funktionellen *Coco*-Experimente konnten den Zusammenhang zwischen der Strömung und der *Coco*-Expression sowie der Induktion der Nodal-Kaskade eindeutig belegen (Schweickert et al., 2010). Allerdings war die Repression auf mRNA Niveau weniger deutlich ausgeprägt. Nur ca. 60% der untersuchten Embryonen zeigte in einem dem Flüssigkeitsstrom nachgeschalteten Stadium (Post-Flow) eine Reduktion des Signals auf der linken Seite. Damit liegt nahe, dass *Coco* posttranskriptionell reguliert wird.

Erste Kandidaten für posttranskriptionelle Regulation sind die mikroRNAs (miRNAs). miRNAs sind kleine, nicht-kodierende und einzelsträngige RNAs von ca. 23 bp Länge, welche sich zusammen mit einem Enzymkomplex meist an komplementäre Sequenzen der 3'-UTR aber auch in Introns oder der 5'-UTR von Ziel-mRNAs anlagern und so deren Translation verhindern oder/ und zu deren Abbau führen (Ha et al., 2014). miRNAs sind in nahezu jedem biologischen Prozess involviert und regulieren mindestens 60% aller humanen Gene, da ebenso viele Gene konservierte miRNA-Bindestellen besitzen (Ha et al., 2014). miRNAs sind sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich weit verbreitet und schon bei Protisten zu finden. Je nach Reich werden sie auf leicht unterschiedliche Weise hergestellt und agieren etwas anders (Cerutti et al., 2006). Generell sind sie meist dafür zuständig, Systeme zu puffern und eine Balance zwischen den beteiligten Faktoren herzustellen (Ebert et al., 2012; Herranz et al., 2010; Wu et al., 2009). Daher ist es nicht überraschend, dass eine miRNA mehrere Zielgene besitzt aber auch eine mRNA häufig durch unterschiedliche miRNAs reguliert wird (Wu et al., 2009).

2.1 Prozessierung

MikroRNAs werden durch miRNA Gene kodiert. Diese können sich in dem Intron eines Protein-kodierenden Gens oder zwischen zwei Genen befinden. Dies führt dazu, dass sie mit dem/ den jeweiligen Gen(en) transkribiert werden. Meist werden die entsprechenden Gene dann auch über die kotranskribierten miRNAs reguliert. miRNA-Gene können durch einen eigenen Promotor oder auch in miRNA-Clustern abgelesen werden. Dies geschieht, wie bei den meisten Genen auch, durch die RNA-

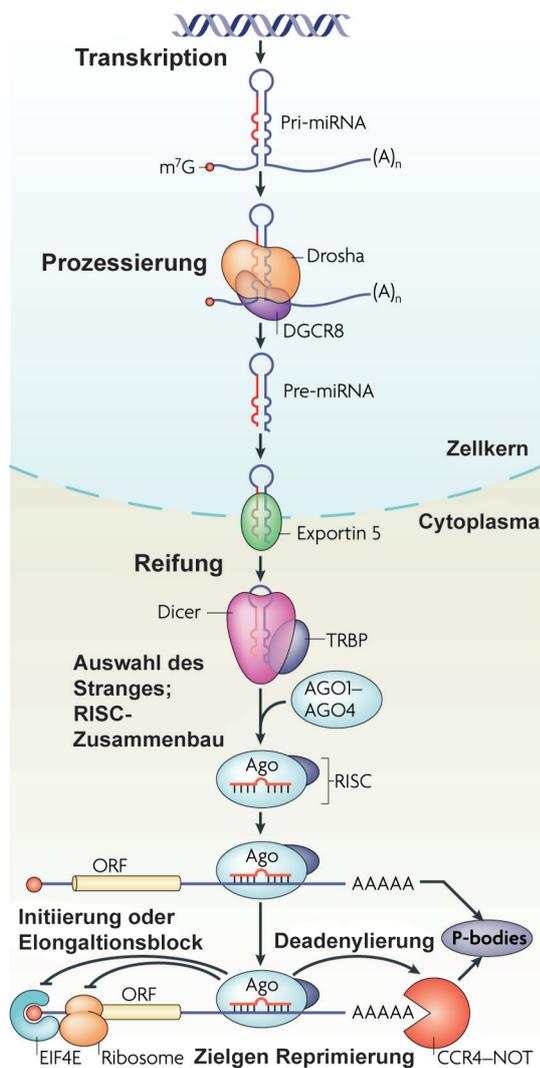


Abb. 02 miRNA-Synthese

Details s. Text; Bild verändert nach Inui et al., 2010

Polymerase II (Abb. 02; Shukla et al., 2011). Das Produkt, die pri-miRNA („primary miRNA“), ist für gewöhnlich über tausend Basenpaare groß. Sie faltet sich in eine Haarnadelstruktur, mit einer terminalen, einzelsträngigen Schleife und einem doppelsträngigen Mittelstück. Dieses wird in 3'-5'-Richtung von einem einzelsträngigen RNA-Ende flankiert. Wie für mRNAs üblich, besitzt auch dieses Transkript eine CAP-Struktur und einen Poly(A)-Schwanz (Abb. 02; Shukla et al., 2011).

Die pri-miRNA wird schon im Zellkern auf eine Länge von ca. 65-70 bp verkürzt. Dafür bildet die RNase III Drosha mit ihrem Kofaktor und dsRNA-Bindeprotein Dgcr8 („DiGeorge Syndrom Critical Region Gene 8“) einen sogenannten „Mikroprozessor“ (Han et al., 2006). Von ihm werden die überhängenden Einzelstränge in 3'- und 5'-Richtung entfernt, sodass nur die Haarnadelstruktur

übrig bleibt. Für die Prozessierung bindet zuerst Dgcr8 spezifisch an die doppelsträngige RNA. Spezifisch heißt in diesem Fall nicht, dass die pri-miRNA eine spezielle Erkennungssequenz hat, sondern vielmehr, dass es den Abstand von den einzelsträngigen 5'- und 3'-Überhängen zu der späteren Schnittstelle (ca. 11 bp) erkennt. Durch Dgcr8 kann sich auch Drosha an die pri-miRNA anlagern, welches daraufhin den Doppelstrang mit einem zwei-Basen-Überhang am 3'-Ende schneidet (Han et al., 2006). Als Produkt dieser Prozessierung entsteht die pre-miRNA („precursor-miRNA“; Abb. 02).

Der Überhang der pre-miRNA wird von dem Exportprotein Exp5 erkannt, welches das Vorläufermolekül zusammen mit einem GTP-bindenden, nukleären Protein (RAN-GTP) bindet. Nachdem dieser Komplex durch eine Kernpore ins Cytoplasma

gelangt ist, wird GTP hydrolysiert und die pre-miRNA entlassen (Abb. 02). Exp5 scheint während dieses Prozesses die pre-miRNA zu schützen, da sein Verlust zum Abbau des miRNA-Vorläufers führt und nicht zu seiner Anhäufung im Zellkern (Ha et al., 2014).

Im Cytoplasma werden pre-miRNAs von einer weiteren RNase III, Dicer, erkannt und zu einem ca. 22 bp langen RNA-Doppelstrang prozessiert (Abb. 02). Dicer besitzt mehrere funktionelle Untereinheiten: eine Helikase-Untereinheit, die die terminale Schleife der pre-miRNA erkennt, eine PAZ (PIWI/ AGO/ ZWILLE) Domäne, welche die freien Enden registriert, und zwei RNase III Untereinheiten, die als intramolekulares Dimer die pre-miRNA schneiden. Die Schnittstelle wird anhand der Entfernung der RNasen III vom 3'- und 5'- Ende gemessen (Ha et al., 2014; Park et al., 2011).

Bei der Prozessierung sind die beiden Kofaktoren TRBP und PACT beteiligt aber nicht zwingend notwendig. TRBP wird jedoch dafür gebraucht den RISC („RNA induced silencing complex“) zu bilden, welcher letztlich für die Regulation der Ziel-mRNA zuständig ist (Abb. 02). RISC setzt sich aus der miRNA, Dicer, TRBP, GW182 und Argonaut-Proteinen (Ago) zusammen. Ago-Proteine besitzen, wie Dicer, eine PAZ-Domäne, die mit dem 3'-Ende der miRNA interagiert und eine MID-Domäne, welche an das 5'-Ende bindet und als Bindungspartner eine Adenosin- oder Uracil-Base bevorzugt. Die dritte, sogenannte PIWI-Untereinheit, ist für die Degradierung der mRNA zuständig und besitzt eine RNase H-ähnliche Struktur (Fabian et al., 2010; Ha et al., 2014; Kawamata et al., 2010).

Bevor RISC jedoch posttranskriptionell in die Genexpression eingreifen kann, muss aus dem doppelsträngigen (ds) miRNA-Produkt durch Dicer eine einzelsträngige, reife miRNA werden (Abb. 02). Dafür wird die ds-miRNA aufgetrennt und ein Strang, der „Guide“- Strang, im Komplex behalten. Der partiell komplementäre „Passenger“- Strang (mit * gekennzeichnet) wird dagegen für gewöhnlich durch Ago-Proteine degradiert. Entscheidend dafür, welcher Strang im RISC für die Regulation behalten wird, ist die thermodynamische Stabilität der miRNA Stränge an ihrem 5'-Ende. Je unstabiler das 5'-Ende im Vergleich zum Gegenstrang ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit als miRNA agieren zu können (Ha et al., 2014; Kawamata et al., 2010; Winter et al., 2009).

2.2 Wirkungsweise von mikroRNAs

Die Bindestelle von miRNAs ist im Tierreich normalerweise nicht 100%ig komplementär zur miRNA. Trotzdem gibt es einige Bereiche, die für eine effiziente Regulation komplementär sein sollten. Besonders wichtig sind die Nukleotide 2 bis 7 der miRNA, die sogenannte „Seed-Sequenz“. Diese dient als essentielle Erkennungssequenz für die Genregulation durch eine miRNA (Dweep et al., 2013; Grimson et al., 2007; Saetrom et al., 2007).

Hat die miRNA inklusive des RISCs an die mRNA gebunden, wird diese entweder abgebaut oder die Translation wird inhibiert. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass beide posttranskriptionelle Regulationmöglichkeiten parallel ablaufen können. So führt miR-430 in der frühen Zebrafisch-Entwicklung z.B. zuerst zu einer Inhibition der Translation und später zur Degradation der mRNA (Bazzini et al., 2012). Für die Translationsinhibition gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Zum einen kann die Initiation der Translation an sich unterbunden werden, oder der Block erfolgt erst nach der Translations-Einleitung. Beispiele hierfür sind, dass die Erkennung zwischen dem Initiationsfaktor eIF4F und der CAP-Struktur verhindert wird, dass sich der Ribosomkomplex nicht zusammenbauen kann oder dass die Schlaufenbildung des 3'- und 5'-Endes der mRNA nicht ausgebildet werden kann. Nachdem die Translationsinitiation begonnen hat kann RISC verhindern, dass Ribosomen das entstehende Protein elongieren und fertigstellen. Alternativ kann die Dissoziation des Ribosoms von der mRNA induziert oder die Proteolyse des elongierenden Polypeptids beschleunigt werden (Fabian et al., 2010).

Für die mRNA-Degradierung werden die beiden stabilisierenden Strukturen, die CAP und der Poly(A)-Schwanz, entfernt oder abgebaut. Die Interaktion mit dem Deadenylase-Komplex CCR4-NOT1 beschleunigt die Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes und die CAP kann in Zusammenarbeit mit dem „decapping“-Komplex (DCP1-DCP-2) entfernt werden (Fabian et al., 2010).

Die miRNA-regulierte mRNA akkumuliert zusammen mit diversen anderen Proteinen der Translationsinhibition und des mRNA-Abbaus in kleinen Organellen der Zelle, den sogenannten P-Bodies („processing bodies“). Diese stellen somit Ansammlungen unterschiedlicher mRNAs und Enzyme, wie den oben aufgezählten Deadenylasen oder „decapping“-Enzymen aber auch 5'-3' Exonukleasen (XRN1), dar.

Ebenso können dort Proteine der miRNA-Maschinerie, wie Ago oder GW182 sowie weitere RNA-Bindeproteine wie z.B. Bic-C, nachgewiesen werden (Fabian et al., 2010; Maisonneuve et al., 2009; Parker et al., 2007).

2.3 Die Rolle von mikroRNAs während der Entwicklung von *Xenopus*

Im Folgenden sollen drei Beispiele zeigen, wie wichtig miRNAs für die Entwicklung von *Xenopus* sein können. Dabei handelt es sich um Faktoren, die ebenso während der LR-Achsen-Entwicklung eine Rolle spielen und auch hier durch miRNAs reguliert werden könnten.

2.3.1 Regulation von *Nodal* durch miRNAs

Zwei miRNAs sind auf unterschiedliche Art und Weise für die frühe Embryonalentwicklung wichtig, miR-427 und die miR-15/ 16 Familie (Martello et al., 2007; Rosa et al., 2009).

miR-427 ist homolog zu miR-430 aus dem Zebrafisch. Beide werden direkt nach der MBT der jeweiligen Organismen aktiv und beginnen maternale mRNAs abzubauen, die nicht mehr gebraucht werden (Giraldez, 2006; Lund et al., 2009). Darunter sind auch ein *Nodal* Gen (*squint*) und seine beiden *Lefty*-Antagonisten (Choi et al., 2007). Im Frosch werden zwei *Nodal* Gene, *Xnr5* und *Xnr6*, und beide *Lefty*-Gene degradiert (Rosa et al., 2009). Die Regulation des Agonisten in Kombination mit seinem Antagonisten durch eine miRNA zeigt, dass die miRNA auch hier für die Pufferung zuständig ist. Die beiden reprimierten *Xnr*-Gene werden noch vor MBT als erste *Nodal*-Gene im Frosch transkribiert und sind für die Spemann-Organisator-Induktion und die Musterung des Mesoderms wichtig (Skirkanich et al., 2011). Daher ist es nicht verwunderlich, dass beide bei einem Verlust von miR-427 betroffen sind und es weiterhin zur Reprimierung von mesodermalen wie auch Organisator-Markern kommt. Dies ähnelt vielmehr einer Überexpression des *Nodal*-Antagonisten *Lefty* als der von *Nodal* selbst. Daher wird vermutet, dass miR-427 eine stärkere Auswirkung auf *Lefty* als auf *Nodal* besitzt (Rosa et al., 2009).

Eine weitere miRNA, welche über *Nodal* für die Ausbildung des Spemann-Organisators notwendig ist, ist miR-15/ 16 (Martello et al., 2007). Diese bildet einen Gradienten entlang der dorsoventralen Achse, wobei die Konzentration auf der

ventralen Seite höher ist. Das Zielgen ist der Nodalrezeptor *ActR1IA* (*acvr2a*), welcher für einen aktiven Nodal-Signalweg auf der dorsalen Seite und damit für die Etablierung des Spemann-Organisators notwendig ist. Eine Fehlexpression der miRNA auf der dorsalen Seite verkleinert die Marker-Expression des Organisators und ihr Verlust führt zu seiner Ausdehnung. Die miRNA wird wiederum vom Wnt-Signalweg reguliert. Dies scheint innerhalb ihres Synthesewegs zu erfolgen, da eine Manipulation von Wnt nur Einfluss auf die reife miRNA, nicht aber auf ihr Vorläufermolekül, pri-miR-15/16, hat (Martello et al., 2007).

2.3.2 Regulation der Ciliogenese durch miRNAs

Im Übrigen konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass unterschiedliche Arten von Cilien während der *Xenopus*-Entwicklung, aber auch generell im Tierreich, durch miRNAs reguliert werden. Prominentestes Beispiel sind die Multicilien der *Xenopus*-Epidermis, aber auch auf dem respiratorischen Epithel von Mensch und Maus. Diese werden in unterschiedlichen Abschnitten ihrer Entwicklung durch die miRNA-34/449 Familie beeinflusst (Marcet et al., 2011b; Song et al., 2014). Dazu zählt die Vervielfältigung der Centriolen, die Bildung des apikalen Aktinnetzwerks, die Entwicklung des Basalkörpers und seine Anlagerung an die Zellmembran. Knockout-Mäuse der miRNA-Familie besitzen Probleme mit dem Schleimtransport in den Luftwegen und entwickeln daher Atemwegserkrankungen. Zielgen der miRNA-Familie ist *cp110*, welches die Ausbildung und das Anlagern von Basalkörpern an die Membran unterbindet (Song et al., 2014). Weitere Zielgene sind *Notch* und sein Ligand *Delta*, welche das multicilierte Schicksal einer Hautzelle unterbinden (Marcet et al., 2011b; Marcet et al., 2011a).

Zwei weitere, interessante aber *Xenopus*-unabhängige Verbindungen zwischen miRNAs und Cilien sind zum einen, dass miRNA-183 in Geweben ektodermalen Ursprungs bei Protostomiern und Deuterostomiern exprimiert wird, welche sensorischen Cilien ausbilden (Pierce et al., 2008). Aber auch bewegliche Monocilien scheinen durch miRNAs reguliert zu werden, genauer durch miR-129. Verhindert man ihre Synthese, gibt es weniger Cilien auf dem KV des Zebrabärblings. Dies resultiert vermutlich in einem gestörten Flüssigkeitsstrom und führt daher zu einer fehlerhaften Anlage der Organe entlang der LR-Achse (Cao et al., 2012).

II. Arbeitshypothese

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen durch welchen Flüssigkeitsstrom-abhängigen Inhibitor *Coco* linksseitig reprimiert wird und diesen Faktor zu charakterisieren. Dazu mussten einige Fragen über die Natur der *Coco*-Repression gestellt werden, die zu detaillierten Arbeitshypothesen führen und letztlich das experimentelle Vorgehen bestimmen sollten. Vier zentrale Fragen wurden hier untersucht.

1. Auf welcher Regulationsebene wird *Coco* linksseitig gehemmt?

Die Regulation von Proteinkonzentration bzw. -aktivität kann im Prinzip auf drei Ebenen erfolgen: der Transkription des Gens, posttranskriptionell über die Stabilität oder Expressivität der mRNA oder posttranslationell über Proteinabbau oder Modifikationen. Publierte Vorarbeiten aus meiner Diplomarbeit führten zur Hypothese, dass *Coco* posttranskriptionell, auf Ebene der mRNA, reguliert wird (Schweickert et al., 2010).

Hauptargument hierfür ist das zeitlich-räumliche Expressionsmuster von *Coco* während und nach der linksgerichteten Strömung (Schweickert et al., 2010). In frühen Neurulastadien, vor dem Flüssigkeitsstrom, wird eine beidseitig-symmetrische und balancierte *Coco*-Expression beobachtet. Sobald der robuste, linksgerichtete Flüssigkeitsstrom einsetzt, geht das Signal auf der linken Seite herunter. Dieses Bild verfestigt sich in späten Neurulastadien, die wieder durch einen turbulenten, ungerichteten Flüssigkeitsstrom gekennzeichnet sind. Allerdings zeigen höchstens 70-80% dieser Embryonen eine linksseitige Absenkung des *Coco* mRNA Levels. Dieser Befund steht im deutlichen Gegensatz zu 95% *Situs solitus* in unbehandelten Gelegen (Blum et al., 2014b). Daher konnte eine transkriptionelle Repression sowie ein rein auf Proteinabbau basierender Mechanismus ausgeschlossen werden. Das *Coco*-Expressionsmuster lässt somit den Schluss zu, dass *Coco* mRNA linksseitig posttranskriptionell reguliert wird und zwar über Abbau und/ oder Inhibition der Translation.

2. Wie wird *Coco* mRNA reguliert?

Ein posttranskriptioneller Inhibitor benötigt eine Ansatzstelle innerhalb der mRNA. Dafür dienen meist regulatorische Sequenzen wie die nicht translatierten Regionen (UTRs), bevorzugt die 3'-UTR (Kedde et al., 2008; Roretz et al., 2011). Der Nachweis, dass die 3'-UTR tatsächlich Ziel eines Regulationsmechanismus darstellt, sollte über einen neuen experimentellen Ansatz mit Protektor-RNAs geführt werden. Protektor-RNAs sind komplementär zur 3'-UTR und sollen durch Hybridisierung an diese im Embryo die *Coco* UTR vor Anlagerung eines Inhibitors schützen. Ein linksseitiger Einsatz würde, falls erfolgreich, den Abbau von *Coco* verhindern und zu einer fehlerhaften LR-Achsen Entwicklung führen.

3. Zu welcher Gruppe von Inhibitoren gehört der *Coco*-Regulator?

Eine sehr erfolgsversprechende Familie von posttranskriptionellen Inhibitoren, die via 3'-UTR agieren und sowohl mRNA abbauen als auch die Translation verhindern können, sind miRNAs (Fabian et al., 2010). Diese kleinen einzelsträngigen RNAs werden durch verschiedene Enzyme prozessiert und hergestellt. Ein zentrales Enzym der miRNA-Synthese ist Dicer (Ha et al., 2014). Im Falle, dass Protektor-RNA in der Lage ist *Coco* zu schützen, soll eine mögliche Rolle von miRNAs für die *Coco*-Regulation untersucht werden. Hierfür würde der miRNA-Syntheseweg durch Verlust an *Dicer* manipuliert. Wird die linksseitige *Coco*-Repression durch miRNAs erzielt, müssten entsprechende Funktionsverlustexperimente zur Stabilisierung der *Coco* mRNA und daher zu LR-Achsen-Defekten führen.

4. Falls *Coco* durch miRNAs reguliert wird, stellt sich die Frage:

Welche ist hierfür zuständig?

Wenn die Inhibition der miRNA-Synthese die *Coco*-Reprimierung verhindert, wäre der darauffolgende Schritt die *Coco*-regulierende(n) miRNA(s) ausfindig zu machen. Zur Identifikation der miRNA sollen wiederum Protektor-RNAs dienen, welche gegen verschiedene, spezifische Regionen der *Coco* 3'-UTR gerichtet sind. Hierdurch soll der Sequenzbereich eingegrenzt werden in welchem sich die Zielsequenz der vom Flüssigkeitsstrom-abhängigen miRNA befindet.

Führt eine oder mehrere Protektor-RNAs zum Schutz von *Coco* und LR-Achsen-

Defekten, werden die entsprechenden 3'-UTR Sequenzen mit Hilfe einer Online-Datenbank nach potentiellen miRNA-Zielsequenzen durchsucht. Weitere Funktionsverlust und –gewinn Analysen der ermittelten miRNAs sollen dann schließlich Aufschluss über den *Coco*-reprimierenden Kandidaten geben.

III. Ergebnisse

1. Posttranskriptionelle Regulation von *Coco*

Im Fokus dieser Arbeit stand die Aufklärung des Mechanismus, der für die asymmetrische Regulation von *Coco* über den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom verantwortlich ist. Meine eigenen Beobachtungen in bereits publizierten Untersuchungen haben zu der Hypothese geführt, dass die *Coco*-Expression auf Ebene der mRNA inhibiert wird (Schweickert et al., 2010). Posttranskriptionelle Regulation basiert häufig auf der spezifischen Kontrolle der mRNA-Stabilität oder der Translationseffizienz des Transkripts. Diese erfolgt über die 3' nicht-translatierte Region („3' untranslated region“ - 3'-UTR; Ho et al., 2014). Daher diente die Analyse der *Coco* 3'-UTR als Ausgangspunkt für die funktionelle Aufklärung der linksseitigen Inhibition von *Coco*.

1.1. Klonierung und Vergleich der 3'-UTRs von *Xenopus laevis* *Coco*-Paralogen

Xenopus laevis besitzt einen sogenannten allotetraploiden Chromosomensatz und daher in der Regel zwei Varianten eines Gens. Einige dieser doppelt vorkommenden Gene sind inaktiv und stellen Pseudoparaloge dar. Bei anderen Genen sind beide Paraloge aktiv und tragen zu der Genfunktion bei. Zu Beginn der Arbeit waren die kodierenden Sequenzen beider *Coco*-Paraloge, die im folgenden als *Coco A* und *Coco B* bezeichnet werden, beschrieben. Beide Proteine zeigten eine nahezu identische Aminosäureabfolge (91%; Vonica et al., 2007). In Bezug auf die 3'-UTR fand sich jedoch nur ein Datenbankeintrag, welcher *Coco A* zugeschrieben werden konnte (NM_001098726). Da Sequenzen der 3'-UTR evolutionär starken Veränderungen unterliegen können und somit die regulatorischen Einflüsse auf beide Transkripte variieren könnten, wurde die 3'-UTR von *Coco B* kloniert und mit *Coco A* verglichen.

Als Grundlage für die Klonierung diente eine Datenbanksuche mit Hilfe der 1836 Basen umfassenden 3'-UTR von *Coco A*. Dabei wurde ein „Expressed Sequence Tag“ (EST) cDNA Klon mit 734 Basen identifiziert, der eine hohen Übereinstimmung (76%)

zu *Coco A* aufwies. Da eine Überlappung mit der *Coco B* kodierenden Sequenz nicht vorlag, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt, um die Identität des Klons festzustellen. Zunächst wurde per RT-PCR die fehlenden *Coco B* 3'-UTR Sequenzen ermittelt, indem ein vorwärtsgerichteter Primer innerhalb der kodierenden Sequenz von *Coco B* und ein reverser Primer innerhalb des ESTs hergestellt wurde. Die Sequenzanalyse ergab letztlich eine 2002 bp lange 3'-UTR der *Coco B* cDNA (Abb. 03). Ein Sequenzvergleich der beiden UTRs zeigte drei Regionen mit einer besonders hohen Homologie. Die 5'-Region umfasste 349 bp von *Coco A* und 355 bp von *Coco B*, welche durch 198 bp zweigeteilt war. In diesem Bereich wies die zweite Sequenz eine 81%ige Übereinstimmung auf, die mehr zentral gelegene und kleinste Homologieregion (151 bp) war zu 83% identisch (in Abb. 03 B blau). Die am 3' Ende gelegene und mit 483 bp längste Region wies eine 76%ige Homologie auf (Abb. 03, braun), deutlich höher als dazwischenliegende Bereiche (49% bzw. 21%).

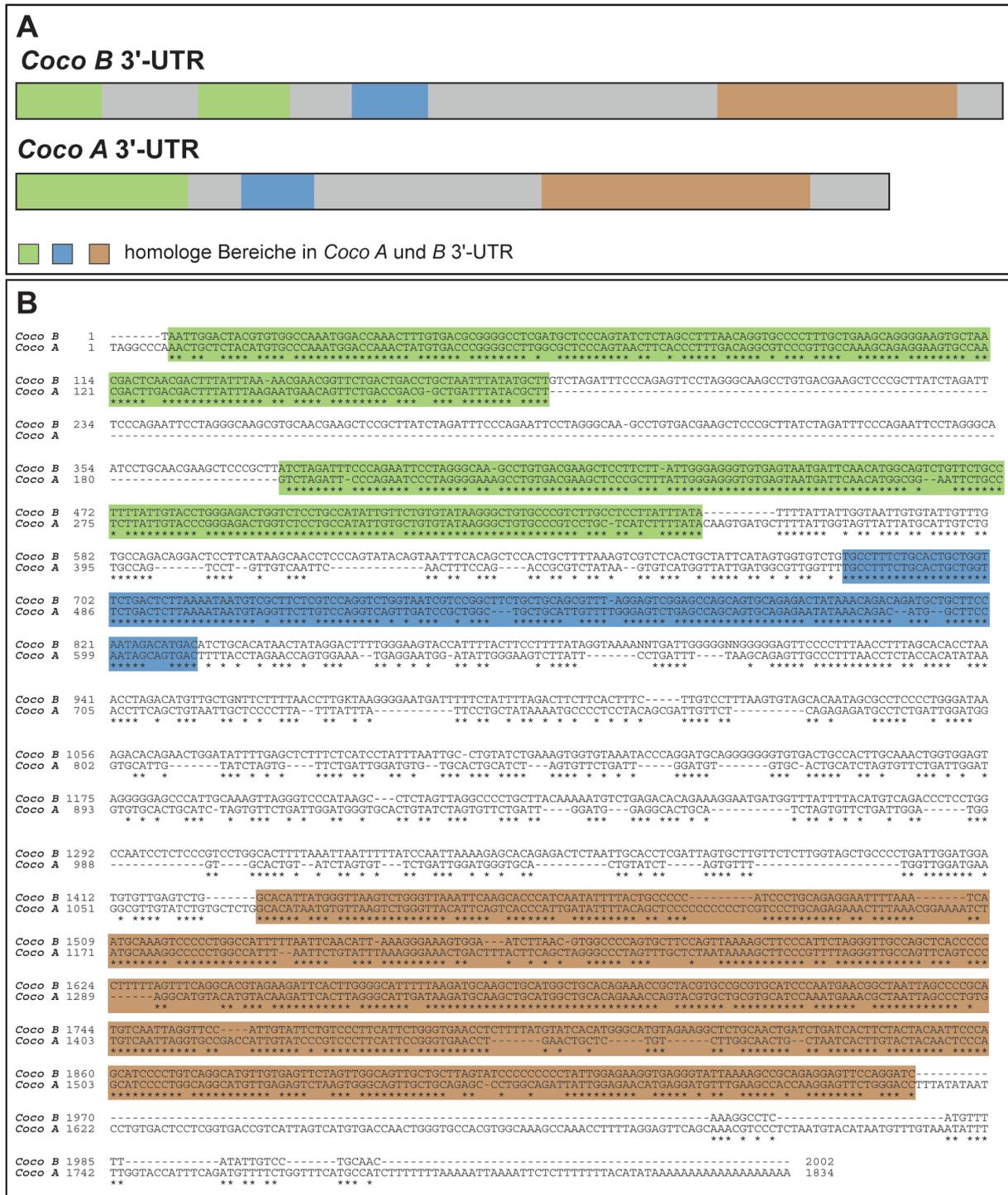


Abb. 03 Sequenzvergleich der 3'-UTRs von Coco A und B.
(A) Schematischer Vergleich zwischen der 3'-UTR von Coco A und B **(B)** Alignment der Basenabfolge beider 3'-UTRs. Sie besitzen drei homologe Bereiche, welche in **(A)** und **(B)** durch dieselbe Farbe markiert sind (grün, blau, orange). Die Übereinstimmungen liegen bei 76% (grün), 81% (blau) und 83% (orange).

Die Frage ob beide Allele bei der Vermittlung der linken Positionsinformation beteiligt sind, oder ob nur eines als Ziel des linksgerichteten Flüssigkeitsstroms fungiert, konnte auf Grund der substantiellen Unterschiede zwischen den 3'-UTRs von *Coco A* und *B* mittels *in situ* Hybridisierung („whole-mount ISH“ – WMISH) experimentell überprüft werden. Embryonen in Stadien während der Strömung (Flow Stadien; St. 17 und 18) sowie Stadien nach diesem (Post-Flow Stadien; St. 19 und 20) wurden auf die mRNA-Expression von *Coco A* und *B* untersucht. Zum Vergleich diente die kodierende Sequenz, welche beide Allele nachwies. Alle drei Expressionen zeigten das typische Muster von *Coco* in den somitischen GRP-Zellen. Während des Flüssigkeitsstroms war überwiegend eine bilateralsymmetrische Domäne zu beobachten. In den nachfolgenden Stadien veränderte sich diese zu einer links-asyymetrischen Expression, bei welcher der anteriore Teil der linken Domäne im Vergleich zur rechten abgeschwächt war (Abb. 04). Dieser Befund wies zum einen eindeutig die Koexpression beider Allele in der GRP nach. Zum anderen deutete er darauf hin, dass *Coco A* und *B*, möglicherweise durch den gleichen Mechanismus, also durch den Flow, inhibiert werden könnten.

Überraschenderweise zeigten sich Unterschiede in der Dynamik dieses Prozesses, einerseits innerhalb der 3'-UTRs beider Allele und andererseits zwischen den UTRs und der kodierenden Region (Abb. 04 B). Die kodierende *Coco*-Sonde zeigte bis zum Abebben des Flüssigkeitsstroms (ab St. 18) einen größeren Anteil an Embryonen mit verringerter linksseitiger Expression im Vergleich zu den 3'-UTRs (kodierend: 57%; *Coco A*: 32%; *Coco B*: 41%). Erst ab diesem Zeitpunkt gibt es im Fall der *Coco B* 3'-UTR vergleichbar viele Embryonen bei denen die linksseitige Reprimierung sichtbar wurde (St.19: 66%). Bei der 3'-UTR von *Coco A* wurde die Abschwächung der Expression mit 73% erst im Stadium 20 in annähernd demselben Ausmaß deutlich wie bei der kodierenden Sequenz und der 3'-UTR von *Coco B* (kodierend: 82%; *Coco B*: 86%). Die linksgerichtete Strömung wirkte sich somit zuerst auf die kodierende Region und erst zeitversetzt auf den Abbau der 3'-UTRs aus. Die *Coco A* 3'-UTR zeigte dabei den zeitlich spätesten Effekt.

Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass die 3'-UTR eine wichtige Rolle für die *Coco*-Stabilität einnimmt. Daher sollte die Funktion der 3'-UTR für die Flow-abhängige *Coco*-Reprimierung im Weiteren näher untersucht werden.

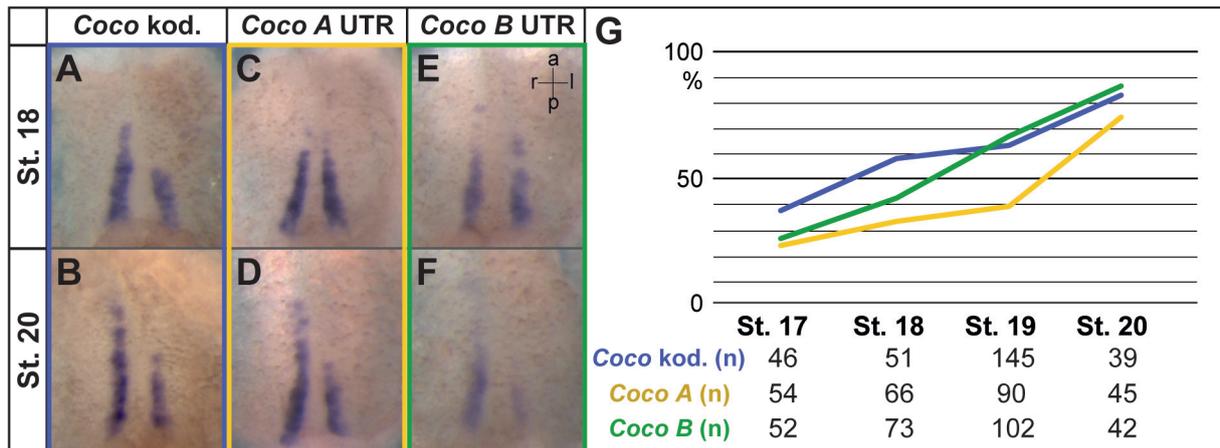


Abb. 04 Expressionsanalyse der paralogen *Coco*-Gene.

WMISH mit Sonden gegen die kodierende Region von *Coco* und gegen die jeweiligen 3'-UTRs von *Coco A* und *B*. Dorsale Explantate aufeinanderfolgender Neurula-Stadien (St. 17-20; **A-F**). Die 3'-UTR von *Coco A* (**C, D**) und von *Coco B* (**E, F**) konnte wie der entsprechende kodierende Bereich von *Coco* (**A bzw. B**) in den somitischen GRP-Zellen nachgewiesen werden. (**G**) Anteil der Embryonen mit schwächerer linker Expression (St. 17-20). Die linksseitige *Coco*-Repression wurde durch die 3'-UTR-Sonden später sichtbar.

Coco-Expression: blau - kodierende Region; gelb - *Coco A* Paralog; grün - *Coco B* Paralog

1.2 Regulation von *Coco* durch die 3'-UTR

Die posttranskriptionelle Regulation von *Coco* durch seine 3'-UTR sollte im Weiteren durch funktionelle Versuche analysiert werden. Dafür wurde *Coco* mRNA vor der Bindung des Inhibitors direkt und spezifisch durch ein antisinn 3'-UTR-Konstrukt (Protector-RNA) geschützt (Abb. 05 B). Durch Hybridisierung mit der endogenen *Coco* mRNA sollte die Erkennungssequenz des potentiellen *Coco*-Inhibitors blockiert und die Sekundär- sowie Tertiärstruktur der mRNA verändert werden. Dies sollte die Anlagerung des *Coco*-Inhibitors und seine Auswirkung auf *Coco* unterbinden.

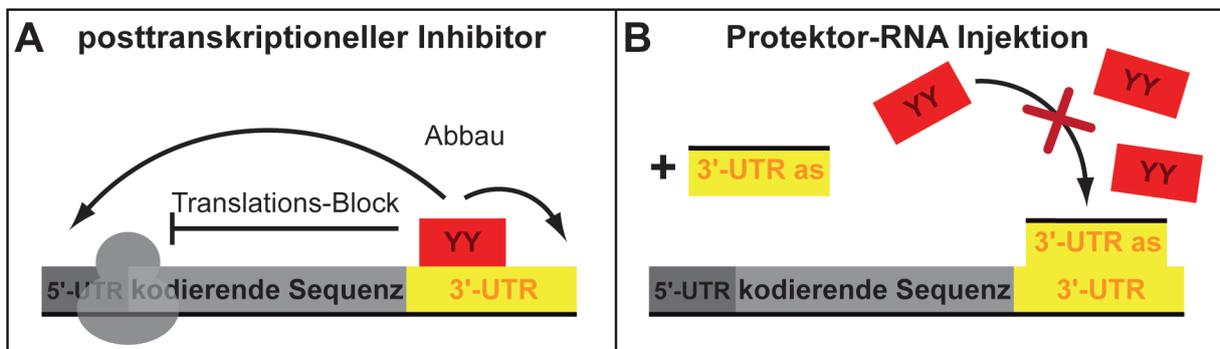


Abb. 05 Schutz der *Coco* 3'-UTR vor posttranskriptionellen Repressoren.

(**A**) Posttranskriptionelle Regulatoren binden häufig innerhalb der 3'-UTR ihres Zielgens. Von hier aus steuern sie den Abbau der mRNA oder die Inhibition der Translation. (**B**) Injektion von Protector-RNAs (antisinn 3'-UTR-Konstrukte), die kompetitiv zum potentiellen Regulator binden und *Coco* vor Abbau schützen sollten.

Die Injektion von Kontroll-Protector-RNAs, welche komplementär zu 3'-UTRs anderer Gene (*derrière* und *Xnr1*) waren, zeigten, dass die Protector-RNA-Injektion an sich die *Coco*-Expression nicht beeinflusste (nicht gezeigt).

1.3 Unterteilung der *Coco* 3'-UTRs in Protector-RNAs

Für die 3'-UTR-Analyse von *Coco* wurde die Region in verschiedene Fragmente unterteilt und diese als Protector-RNAs injiziert. Ein Vergleich der verschiedenen Regionen sollte zur Identifizierung potentieller Interaktionsstellen des Inhibitors führen. Im Fall von *Coco A* wurden drei, für *Coco B* zwei Fragmente verwendet.

Bei *Coco A* handelte es sich um die drei Fragmente *A F1* (737 bp), *A F2* (330 bp) und *A F3* (703 bp). *Coco B* wurde in *B F1* (350 bp), welches sich am 5'-Ende der UTR befand und *Coco B F2* (919 bp), im 3'-Bereich der UTR, unterteilt.

Diese Protectorfragmente wurden kloniert und anschließend antisinn-RNA hergestellt und injiziert. Nach der Injektion wurde die Auswirkung der Protector-RNAs auf die asymmetrische *Coco*-Expression hin untersucht. Hierfür wurden beide Domänen miteinander verglichen (L<R; R=L; R<L), um zu analysieren in welchem Maß *Coco* auf der linken Seite reprimiert wird. Die Verringerung des *Coco*-Signals findet nach dem Flüssigkeitsstrom vorwiegend im anterioren Bereich der Domäne statt. Deshalb wurde die AP-Ausdehnung sowie die Intensität der Expression als Kriterium für die Einteilung in eine L<R, R=L oder R<L *Coco*-Expression verwendet.

Durch eine posttranskriptionelle Regulation kann mRNA nicht nur abgebaut sondern auch die Translation inhibiert werden. Bei *Coco* könnten beide Vorgänge Relevanz haben. Durch die alleinige Analyse der *Coco*-Domäne mittels WMISH wird jedoch nur die mRNA semi-quantitativ analysiert und nicht die Expression auf der Ebene des Proteins. Ein spezifischer *Coco*-Antikörper ist kommerziell nicht verfügbar, weshalb diese Ebene der Analyse nicht möglich war. Als indirekter Readout wurde nach Protector-RNA-Injektion daher zusätzlich die nachgeordnete asymmetrische Induktion der Nodal-Kaskade durch die SPM-Expression von *Pitx2c* analysiert.

1.3.1 Coco A 3'-UTR

Die Wirkung der Protektor-RNAs A F1 bis 3 auf Coco

Alle drei Protektor-RNAs von *Coco A* führten auf der jeweiligen Injektionsseite zu einem verstärkten *Coco*-Signal (Abb. 06 H). Die Wirkung von Fragment *A F1* war nur rechtsseitig signifikant ($p=0,00343$), jedoch nicht auf der gegenüberliegenden Seite (Abb. 06 C, H; Tabelle 01; $p= 0,24892$). Dagegen waren sowohl *A F2* und *A F3* auf der linken Seite in der Lage, *Coco* signifikant vor dem Abbau zu bewahren (*A F2* $p=0,00274$; *A F3* $p<0,000$). Für *A F2* war dies auch auf der rechten GRP-Hälfte signifikant der Fall, jedoch nicht für *A F3* (Abb. 06 E, H; Tabelle 01; *A F2* $p=0,00384$; *A F3* $p= 0,03354$).

Die injizierten Protektor-RNAs, insbesondere das 3'-gelegene *A F3*, führten zu einer verstärkten Stabilität von *Coco* in Stadien nach dem Flow. Da dies durch alle drei Fragmente mehr oder weniger stark erzielt wurde, sollte sich eine genauere Analyse der *Coco* 3'-UTR anschließen. Hierfür wurde die *Coco* UTR in kleinere Fragmente unterteilt, welche ermöglichen sollten Interaktionssequenzen des *Coco*-Inhibitors zu identifizieren und sie untereinander zu vergleichen.

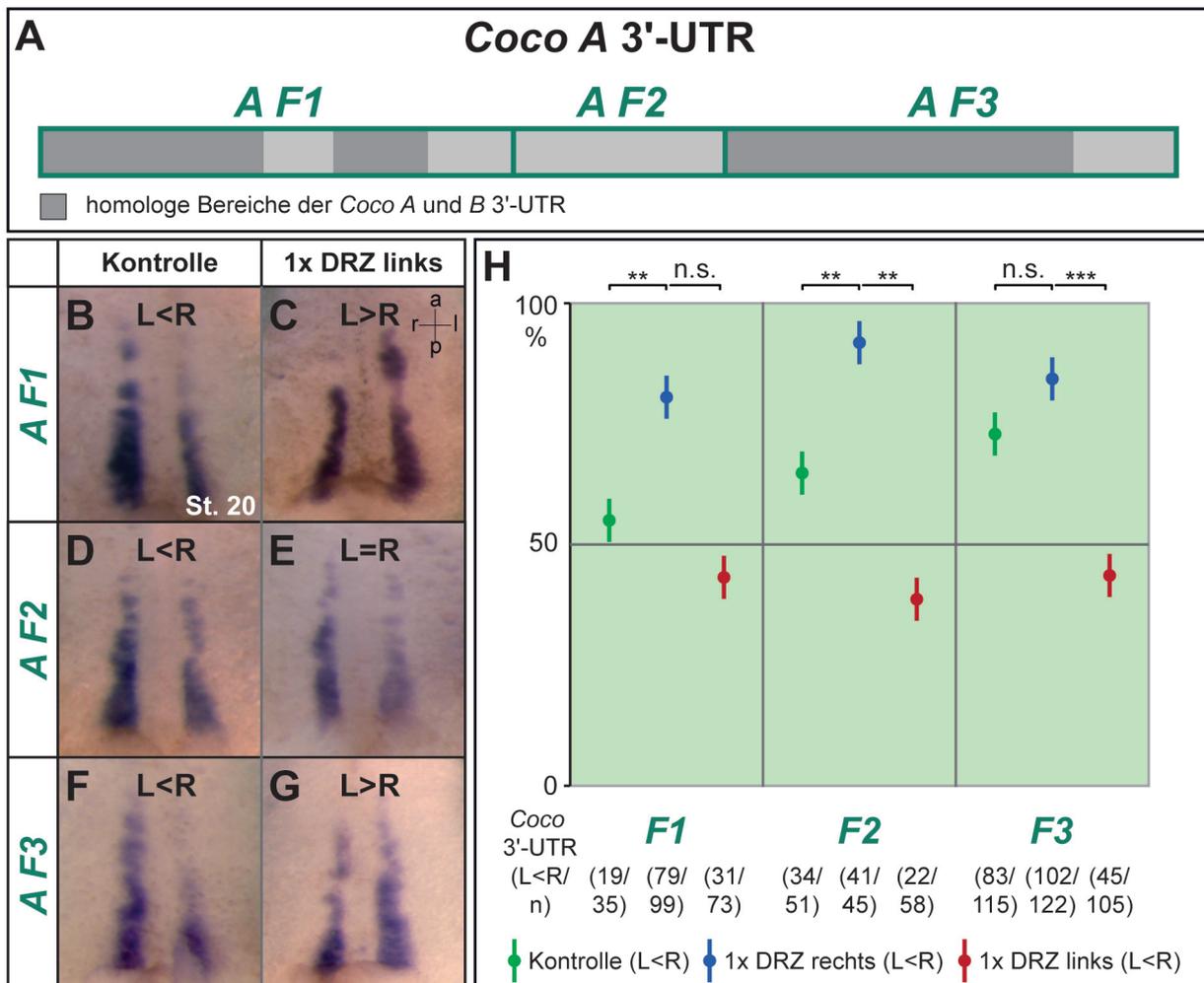


Abb. 06 Schutz der Coco A 3'-UTR verhindert Abbau von Coco mRNA.

(A) Die 3'-UTR von *Coco* wurde in drei Fragmente unterteilt (*A F1-3*). Konser-vierte Bereiche zwischen *Coco A* und *B* sind grau markiert. Diese wurden in die dorsale Randzone der linken oder rechten Blastomere von 4-8-Zellembryonen injiziert. (B-G) WMISH mit dorsale Explantate von Neurulae in Post-Flow Stadien (St. 20). Als Sonde diente die kodierende Sequenz von *Coco*. (H) Prozentualer Anteil an Embryonen mit verringerter linker Expression. Verstärkung der Expression auf der jeweils injizierten Seite. Der Effekt war bei *A F3* auf der linken und bei *A F2* auf der rechten Seite am deutlichsten.

Behandlung der Embryonen: grün - unbehandelte Kontrolle; blau - 1x DRZ rechts; rot - 1x DRZ links

| Fragment | Inj. ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|-------------|----------|-------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 35 | 54,3 | 28,6 | 17,1 | - |
| <i>A F1</i> | re | 80 pg | 99 | 79,8 | 13,1 | 7,1 | 0,00343 |
| <i>A F1</i> | li | 80 pg | 73 | 42,5 | 41,1 | 16,4 | 0,24892 |
| Kontrolle | | | 51 | 66,7 | 23,5 | 9,8 | - |
| <i>A F2</i> | re | 80 pg | 45 | 91,1 | 4,4 | 4,4 | 0,00384 |
| <i>A F2</i> | li | 80 pg | 58 | 37,9 | 27,6 | 34,5 | 0,00274 |
| Kontrolle | | | 115 | 72,2 | 19,1 | 8,7 | - |
| <i>A F3</i> | re | 80 pg | 122 | 83,6 | 15,6 | 0,8 | 0,03354 |
| <i>A F3</i> | li | 80 pg | 105 | 42,9 | 41,0 | 16,2 | <0,000 |

Tabelle 01 Auswirkung der Coco A 3'-UTR Protektor-RNAs F1 – 3 auf Coco mRNA Expression und Symmetrie.

Fragment – injizierte Protektor-RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

Subfraktionierung der Coco A 3'-UTR

Die Fragmente *A F1.1*, *F2.1* und *F3.1* stellen jeweils den 3'-Bereich der Sequenzen von *A F1-3* dar (Abb. 07 A). Den stärksten linksseitigen Schutz von *Coco* vor der Repression durch den Flüssigkeitsstrom wurde durch das am weitesten 3'-gelegene Fragment *A F3.1* ausgeübt (Abb. 07 F, G und H; $p < 0,000$; Tabelle 02). *A F1.1* schützte am wenigsten effektiv und *A F2.1* in signifikantem Ausmaß (Abb. 07 H; *A F1.1* $p = 0,01772$; *A F 2.1* $p = 0,00487$; Tabelle 02). Verglichen mit den Fragmenten *F1-3* gab es bei den rechtsseitigen Injektionen Unterschiede. Keines der Fragmente *A F1.1*, *A F2.1* oder *A F3.1* erzeugte eine signifikante Verstärkung des *Coco*-Signals auf dieser Seite (Abb. 07 H; Tabelle 02; *A F1.1*; $p = 0,44121$; *A F 2.1* $p = 0,3683$; *A F3.1* $p = 0,14961$).

Somit spiegelte die Effektivität der kleinen Fragmente die von *A F1-3* wider. Lediglich der rechtsseitige Effekt der antisinn-Konstrukte blieb mit kleineren Fragmenten aus.

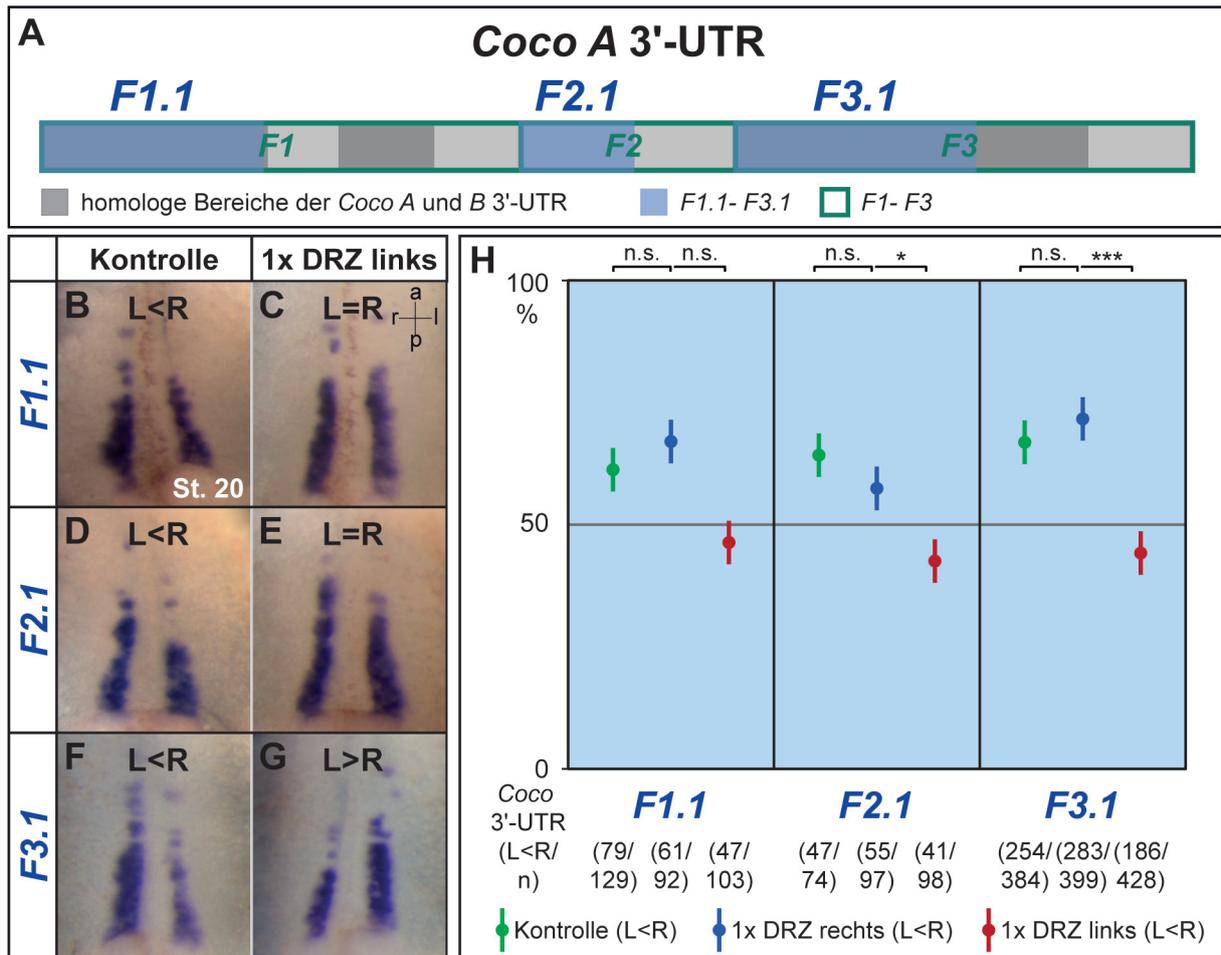


Abb. 07 Eingrenzung der für die posttranskriptionelle Regulation von *Coco A* wichtigen Bereiche.

(A) Aus A F1-3 wurden kleinere Protektor-Konstrukte (A F1.1-3.1) kloniert (blau). Graue Unterlegung stellt konservierte Bereiche zwischen *Coco A* und *B* dar. A F1.1-3.1 wurden in 4/ 8-Zellstadien links bzw. rechts injiziert und deren Effekt auf *Coco* (kodierend; St. 20) untersucht. (B-G) Linksseitig wurde die Expression durch die Protektor-RNAs verstärkt. Rechtsseitig gab es keine Auswirkung. (H) Prozentualer Anteil an Embryonen mit L<R. grün – unbehandelten Kontrollen; blau – rechts 1x DRZ; rot – links 1x DRZ.

| Fragment | Inj. ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|-----------|----------|-----------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 129 | 61,2 | 20,9 | 17,8 | - |
| A F1.1 | re | 59,2 pg | 92 | 66,3 | 18,5 | 15,2 | 0,44121 |
| A F1.1 | li | 59,2 pg | 103 | 45,6 | 37,0 | 21,4 | 0,01772 |
| Kontrolle | | | 74 | 63,5 | 21,6 | 14,9 | - |
| A F2.1 | re | 64 pg | 97 | 56,7 | 29,9 | 13,4 | 0,3683 |
| A F2.1 | li | 64 pg | 98 | 41,8 | 44,9 | 13,3 | 0,00487 |
| Kontrolle | | | 384 | 66,1 | 20,1 | 13,8 | - |
| A F3.1 | re | 80-120 pg | 399 | 70,9 | 16,3 | 12,8 | 0,14961 |
| A F3.1 | li | 80-120 pg | 428 | 43,5 | 26,2 | 30,4 | <0,000 |

Tabelle 02 Auswirkung der *Coco A* 3'-UTR Protektor-RNAs A F1.1 – 3.1 auf *Coco*.

Fragment – injizierte Protektor-RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L

Einfluss der Protektorfragmente A F1-3 auf die Spezifizierung der LR-Achse

Wurde der prozentuale Anteil an wildtypischen Embryonen nach linker Injektion betrachtet, variierte dieser bei allen Fragmenten zwischen 84% (A F1 links) und 93% (A F2 links). Auch bei unbehandelten Embryonen weisen durchschnittlich 95% *Pitx2c* links auf. Daher konnte hier von einem geringen bis keinem Effekt gesprochen werden, auch wenn die Unterschiede zur Kontrolle signifikant waren (A F1 $p < 0,000$; A F2 $p = 0,0013$; A F3 $p < 0,000$; Tabelle 03). Prozentual gesehen führte von allen Fragmenten A F1 am häufigsten, in geringerem Ausmaß auch A F3, linksseitig injiziert zu Veränderungen der Nodal-Kaskade (Tabelle 03). A F2 zeigte den geringsten Effekt (Abb. 08 E; Tabelle 03). Überraschenderweise erzielte man bei rechtsseitig behandelten Embryonen mit allen Fragmenten ebenfalls einen Effekt auf *Pitx2c* (Tabelle 03; A F1 $p < 0,000$; A F2 $p = 0,00068$; A F3 $p < 0,000$). Auch hier wurde *Pitx2c* wie bei einer linken Injektion beidseitig nicht im SPM aktiviert (Abb. 08 E; Tabelle 03).

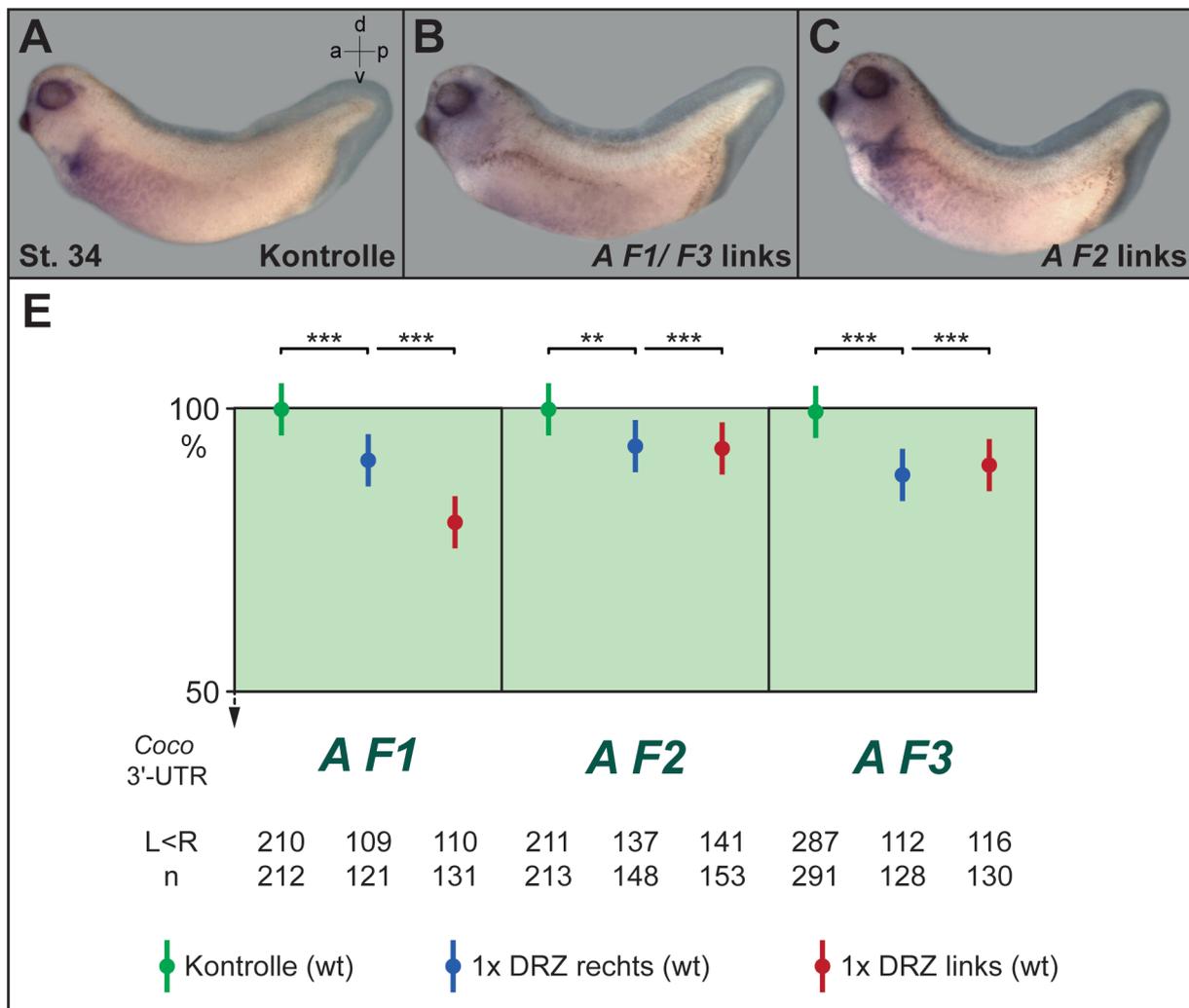


Abb. 08 Schutz der *Coco A* 3'-UTR beeinflusst die Induktion der Nodal-Kaskade nicht.

(A) *A F1-3* wurden als Protektor-RNA in die DRZ von 4/ 8-Zellstadien verabreicht. Die Embryonen wurden in St. 34 fixiert und der Einfluss auf *Pitx2c* untersucht (A-C). (D) Anteil an Embryonen mit wildtypischer (wt), linker *Pitx2c* SPM-Expression in Prozent. (A, D) Kontrollen exprimierten *Pitx2c* wildtypisch. (B, D) Schwache Effekte zeigten v.a. *A F1* und *A F3*.

grün – Kontroll-Embryonen, blau – rechts 1x DRZ; rot – links 1x DRZ

| Fragment | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|-------------|---------|-------|-----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 212 | 99,1 | 0 | 0,9 | 0 | - |
| <i>A F1</i> | re | 80 pg | 121 | 90,1 | 0 | 9,1 | 0,8 | <0,000 |
| <i>A F1</i> | li | 80 pg | 131 | 84,0 | 1,5 | 13,7 | 0,8 | <0,000 |
| Kontrolle | | | 213 | 99,1 | 0 | 0,9 | 0 | - |
| <i>A F2</i> | re | 80 pg | 148 | 92,6 | 0 | 7,4 | 0 | 0,0013 |
| <i>A F2</i> | li | 80 pg | 153 | 92,2 | 0 | 7,8 | 0 | 0,00068 |
| Kontrolle | | | 291 | 98,6 | 0 | 1,4 | 0 | - |
| <i>A F3</i> | re | 80 pg | 128 | 87,5 | 1,6 | 7,0 | 3,9 | <0,000 |
| <i>A F3</i> | li | 80 pg | 130 | 89,2 | 2,3 | 5,4 | 3,1 | <0,000 |

Tabelle 03 Auswirkung der *Coco A* 3'-UTR Protektor-RNAs *F1 – 3* auf *Pitx2c* mRNA Expression.

Fragment – injizierte Protektor-RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler *Pitx2c*-Expression

Nach den Ergebnissen der *Coco A* Protektor-RNAs sollte *Coco* mRNA vor dem Abbau geschützt werden. Dieser Effekt reicht jedoch nicht aus, um auch die Nodal-Kaskade zu beeinflussen. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass die Regulation von *Coco A* nicht ausreicht, um eine korrekte LR-Achse auszubilden. Eventuell wird hierfür zusätzlich das paraloge *Coco B*-Gen gebraucht, was nachfolgend untersucht wurde.

1.3.2 *Coco B* 3'-UTR

Auswirkung der *Coco B* Protektor-RNAs auf *Coco*

Wie für *Coco A* wurde zunächst die Effektivität des Schutzes von *Coco* mRNA durch die Protektor-RNA von *Coco B* untersucht. Wurden die antisinn Konstrukte von *Coco B* in die linke Embryohälfte injiziert, konnte die *Coco* mRNA sowohl durch Fragment *B F1* als auch durch *B F2* im Vergleich zur Kontrolle effektiv vor der Repression abgeschirmt werden (Abb. 09 B-F; Tabelle 04; *B F1* $p < 0,000$; *B F2* $p < 0,000$). Auf der rechten Seite war die schützende Wirkung von Fragment *B F2* stärker als die von *B F1* (Abb. 09 F; Tabelle 04; *B F1* $p = 0,04124$; *B F2* $p = 0,00103$). Der Effekt von *B F2* ist vergleichbar stark zu *Coco A* (*A F3*). Der effektive Schutz von *Coco* durch diesen Abschnitt lässt vermuten, dass die 3'-UTRs von *Coco A* und *B* in diesem Bereich Ansatzstellen für Inhibitoren besitzen. Eventuell handelt es sich um regulatorische Sequenzen für denselben Inhibitor.

Im Folgenden wurde untersucht, wie die Protektor-RNAs von *Coco B* im Hinblick auf *Pitx2c* wirken.

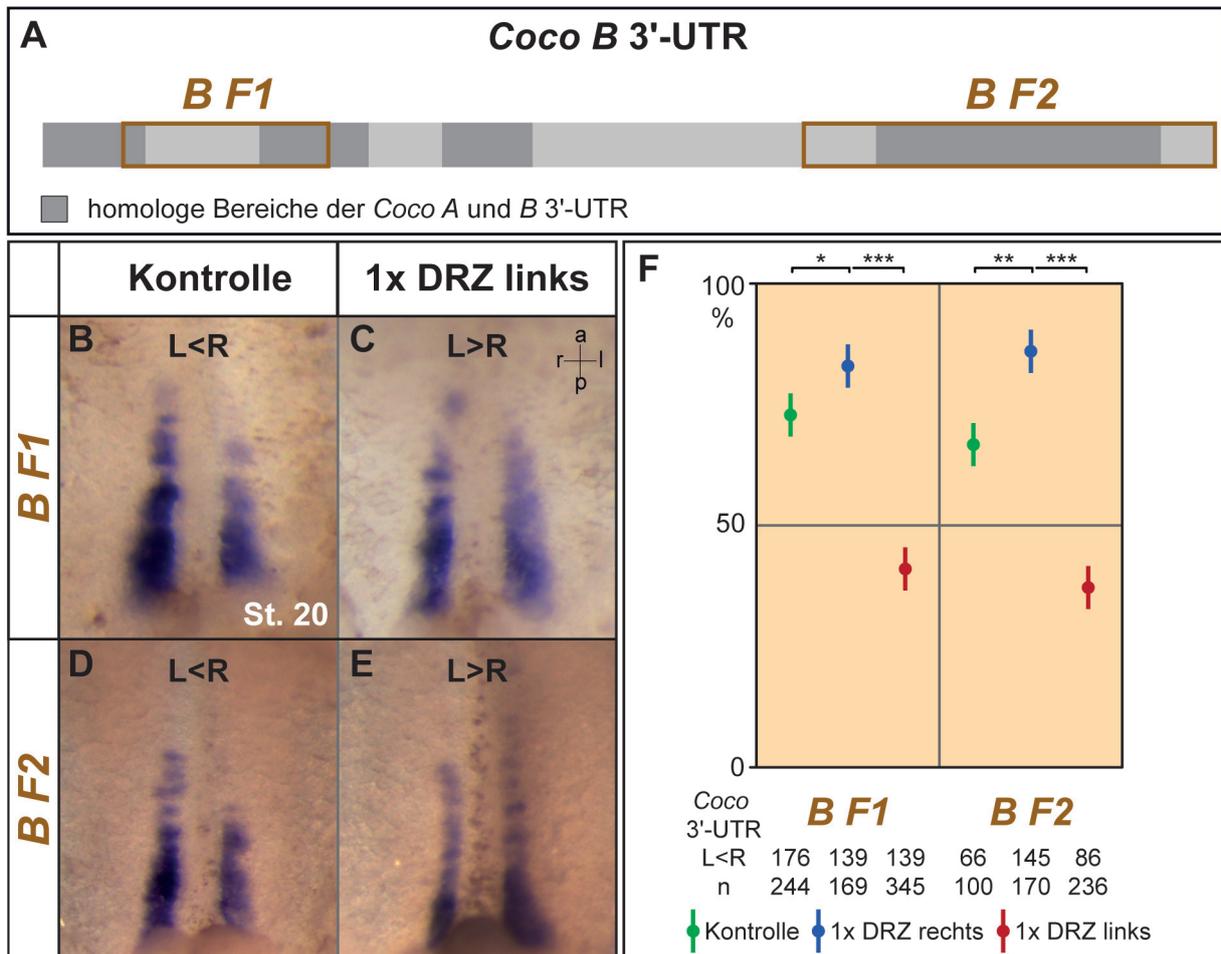


Abb. 09 Coco mRNA wurde durch Schutz der Coco B 3'-UTR stabilisiert.

(A) *Coco B F1* und *F2* wurden 1xDRZ in 4/ 8-Zellstadien injiziert. Graue Unterlegung stellt konservierte Bereiche zwischen *Coco A* und *B* dar. (B-E) WMISH mit kodierender *Coco* Sequenz (St. 20). (F) Anteil aller Embryonen mit L<R. Die Anzahl dieser nahm im Vergleich zu den Kontrollen (grün) bei den rechts injizierten Embryonen (blau) zu und bei linker Injektion (rot) ab.
grün – Kontroll-Embryonen, blau – rechts 1x DRZ; rot – links 1x DRZ

| Fragment | Inj. ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|-------------|----------|----------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 244 | 72,1 | 20,9 | 7,0 | - |
| <i>B F1</i> | re | 80 pg | 169 | 82,2 | 14,8 | 3,0 | 0,04124 |
| <i>B F1</i> | li | 80 pg | 345 | 40,3 | 37,7 | 22,0 | <0,000 |
| Kontrolle | | | 100 | 66,0 | 28,0 | 6,0 | - |
| <i>B F2</i> | re | 48-80 pg | 170 | 85,3 | 12,4 | 2,4 | 0,00103 |
| <i>B F2</i> | li | 48-80 pg | 236 | 36,4 | 39,0 | 24,6 | <0,000 |

Tabelle 04 Auswirkung der Coco B 3'-UTR Protektor-RNAs B F1 und 2 auf Coco.

Fragment – injizierte Protektor-RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

Die Bedeutung der Coco B 3'-UTR für die Induktion der LR-Achse

Zur Analyse der Funktion von *Coco B* und seine Repression durch den Flüssigkeitsstrom auf die LR-Achsen-Entwicklung, wurde die Auswirkung der *Coco B* Protektor-RNAs auf *Pitx2c* genauer untersucht. Trotz linksseitigem Schutz von *Coco* durch das Fragment *Coco B F1* wurde *Pitx2c* weiterhin asymmetrisch, im linken SPM exprimiert. Es bestand keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10 B; Tabelle 05; p=0,44509). Wurde dagegen *B F2* links injiziert, konnte die Expression von *Pitx2c* beidseitig im SPM signifikant verhindert werden (Abb. 10 F; Tabelle 05; p<0,000). Auf der rechten Seite hatte dieses Fragment wiederum keinen Einfluss auf die LR-Achse (Abb. 10 F; Tabelle 05; p=0,94879).

| Fragment | Inj. ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|-------------|----------|-------|-----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 96 | 95,8 | 0 | 3,1 | 1,0 | - |
| <i>B F1</i> | li | 80 pg | 91 | 97,8 | 0 | 2,2 | 0 | 0,44509 |
| Kontrolle | | | 217 | 92,2 | 0 | 6,5 | 1,4 | - |
| <i>B F2</i> | re | 80 pg | 112 | 92,0 | 0 | 8,0 | 0 | 0,94879 |
| <i>B F2</i> | li | 80 pg | 188 | 70,7 | 2,1 | 25,0 | 2,1 | <0,000 |

Tabelle 05 Auswirkung der Coco B 3'-UTR Protektor-RNAs B F1 und 2 auf Pitx2c.

Fragment – injizierte Protektor-RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler *Pitx2c*-Expression

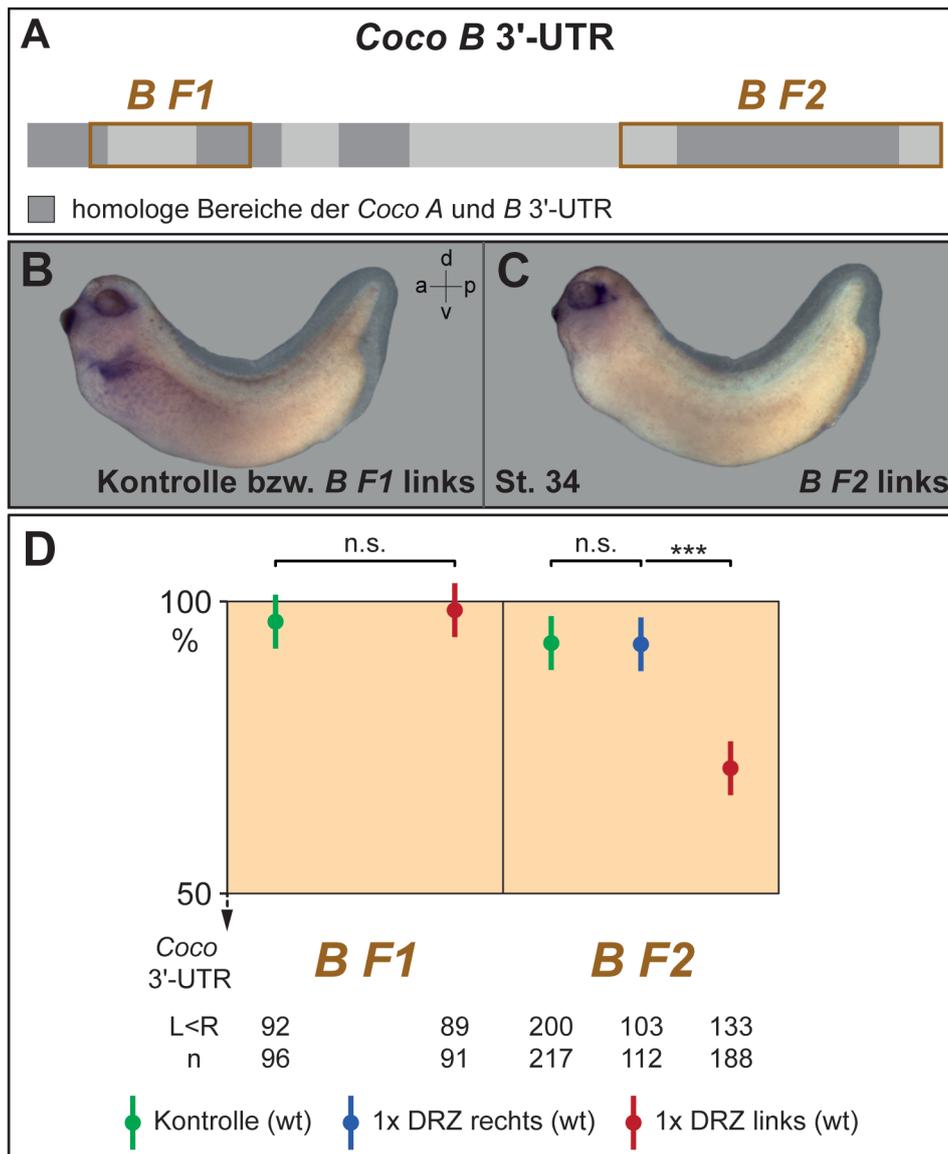


Abb. 10 LR-Achsen-Entwicklung wird durch linksseitigen Schutz der *Coco B* 3'-UTR gestört. (A) *Coco B F1* und *B F2* wurden in 4/ 8-Zellstadien überexprimiert. Graue Markierungen stellen konservierte Sequenzen von *Coco A* und *B* dar. (B, C) Anschließend wurde das Vorhandensein von *Pitx2c* im SPM überprüft. Die Kontrollen und *B F1*-injizierte Embryonen wiesen wildtypische Expression auf (B, D). *B F2* führte linksseitig zur Unterdrückung der *Pitx2c* Transkription (C, D). Behandlung der Embryonen: grün – Kontrolle; blau – rechts 1x DRZ; rot – links 1x DRZ

Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten 3'-UTR Bereichen führte der 3' Bereich von *Coco B* zu einer klaren Beeinflussung der LR-Achse (Abb. 10; Tabelle 05). Damit wurde klar gezeigt, dass *Coco B* in der Regulation von *Coco* eine wichtigere Stellung einnimmt als *Coco A*. Außerdem ließ sich zeigen, dass die posttranskriptionelle Regulation von *Coco* über seine 3'-UTR relevant für die generelle LR-Achsen Entstehung ist. Diese Ergebnisse bestärkten außerdem die Vermutung, dass die

posttranskriptionelle Regulation von *Coco* nicht nur durch den Abbau seiner mRNA erfolgt sondern auch durch das Unterbinden der Translation. Andernfalls sollten alle Protektor-RNAs, die *Coco* mRNA effektiv vor ihrem Abbau schützen, auch die Expression von *Pitx2c* im linken SPM unterbinden.

2. miRNA-vermittelte Regulation der Coco-Asymmetrie

Der Effekt der verschiedenen Protektor-RNAs deutet auf miRNA-vermittelte Regulation von *Coco* hin. Zur genaueren Charakterisierung wurde zunächst überprüft, ob die RNase III, *Dicer*, räumlich und zeitlich im Embryo so aktiv ist, dass ein miRNA-Effekt prinzipiell möglich ist. Die publizierten Daten haben die hier interessierenden Stadien und Gewebe nur unzureichend untersucht (Gessert et al., 2010).

2.1 Koexpression von *Coco* und *Dicer* in der GRP

Dicer-Transkripte konnten ab dem 4-Zellstadium detektiert werden, was auf eine maternale Expression dieses Enzyms schließen lässt. Die mRNA findet sich in diesem Stadium im animalen Bereich (Abb. 11 A - A'), der später hauptsächlich ektodermales Gewebe (Haut und Zentrales Nervensystem) ausbildet. Histologische Schnitte zeigten, dass sich die mRNA bis zur Neurulation in mesodermalen Geweben, wie den Somiten und der *Chorda dorsalis*, anreichert (Abb. 11 B' / B''). Die Expression beschränkte sich nicht auf die tiefliegenden Somiten, sondern umfasste auch die oberflächlich gelegenen somitischen GRP-Zellen (Abb. 11 B' / B''). Im Gegensatz zu diesen waren die zentral gelegenen hypochordalen und notochordalen GRP-Zellen nur im anterioren Bereich der GRP *Dicer*-positiv (Abb. 11 B''' / B'''). In älteren Stadien (St. 23) konnte *Dicer* mRNA auch in ektodermalen Geweben detektiert werden. Die histologische Analyse der *Dicer*-Expression zeigte Signale innerhalb der Epidermis und in tiefer gelegenen Hautschichten. Auch im Neuralrohr wurde *Dicer* stark exprimiert (Abb. 11 C'). Die Färbung im neuralen Gewebe zog sich weiter nach rostral, wo sie besonders stark im Bereich des Gehirns und der Augenvesikel zu finden war (Abb. 11 C''). Diese Expressionsorte waren bereits berichtet worden und wiesen die Spezifität der Färbung nach (Gessert et al., 2010).

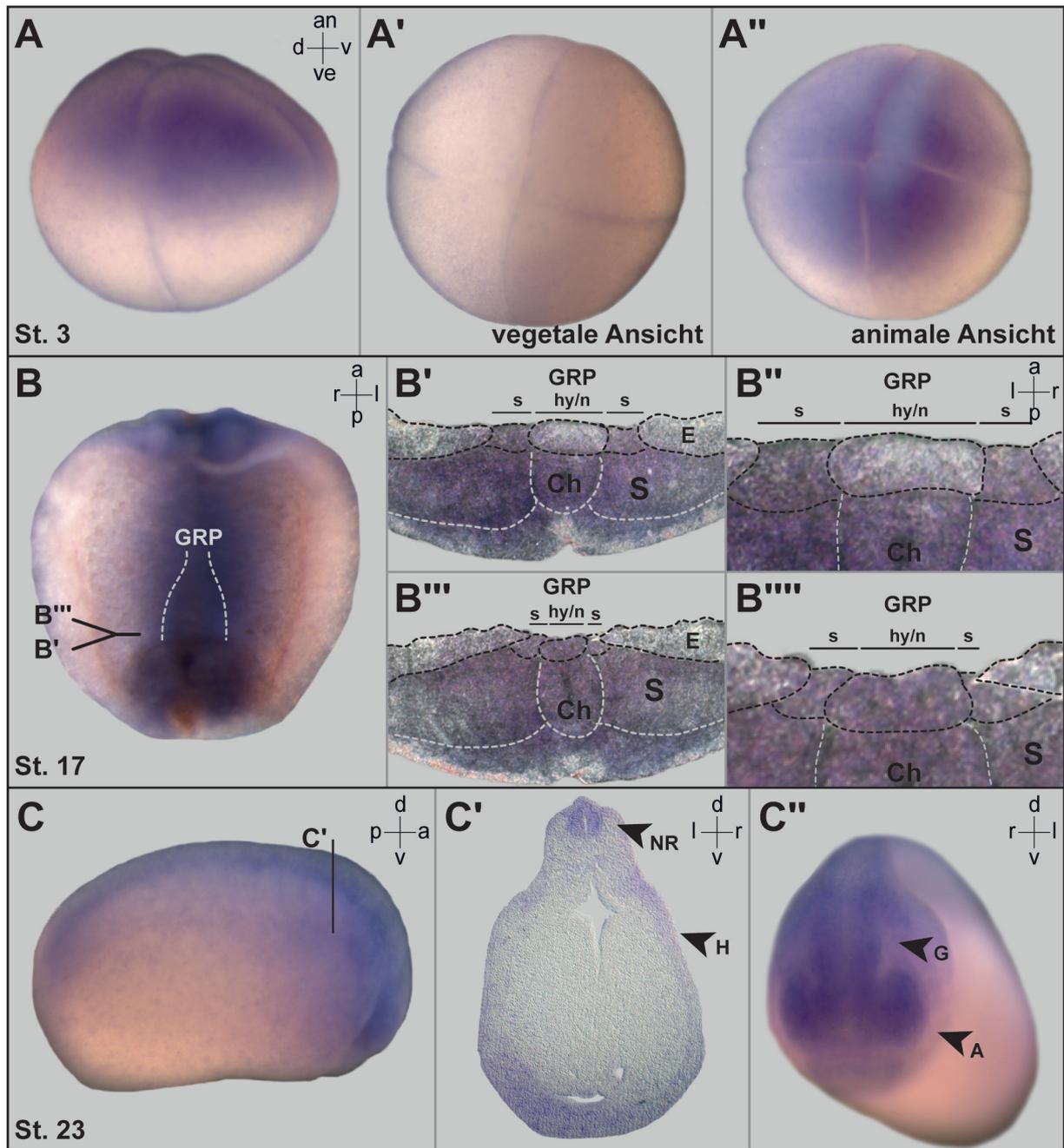


Abb. 11 Expression von *Dicer* mRNA.

Embryonen des St. 3, 17 und 24 wurden einer WMISH mit einer antisinn-Sonde gegen *X. laevis Dicer* unterzogen. (A - A'') 4-Zellstadien wiesen Expression im animalen Pol auf. (B) dorsales Explantat in ventraler Aufsicht auf GRP. (B' und B''') transversale Schnitte von (B); (B'' und B''') Vergrößerungen der Schnitte (B' und B'''). *Dicer* konnte in den Somiten (S) und der *Chorda dorsalis* (Ch) detektiert werden. Weiterhin war *Dicer* im anterioren und posterioren Bereich der somitischen GRP-Zellen (s GRP) nachweisbar. In den hypochordalen (hy GRP) und notochordalen (n GRP) GRP-Zellen war Expression dagegen nur im anterioren Bereich sichtbar (B'''/ B'''). (C - C') In St. 24 waren das Neuralrohr (NR), die Haut (H), Gehirn (G) und Augenvesikeln (A) positiv für *Dicer*. E – endodermalen Zellen

Die *Dicer* mRNA Expression in den somitischen GRP-Zellen war demnach in Einklang mit der Hypothese, dass die linksseitige und Flüssigkeitsstrom-abhängige Repression von *Coco* durch miRNAs hervorgerufen werden könnte. Zur Überprüfung wurden Funktionsverlust-Versuche von *Dicer* durchgeführt.

2.2 Die linksseitige Repression von *Coco* ist *Dicer*-abhängig

Zur Überprüfung der Hypothese wurde die Translation von *Dicer* durch ein antisinn Morpholino-Oligonukleotid (MO) unterbunden. Durch die Injektion von *Dicer*-MO auf der linken Seite konnte die Flüssigkeitsstrom-abhängige Abschwächung des linken *Coco*-Signals dosisabhängig und in einer statistisch signifikanten Weise verhindert werden (Tabelle 06; 1,0pmol *Dicer*-MO $p=0,064$; 1,5pmol *Dicer*-MO $p<0,000$). Dies führte dazu, dass es in den injizierten Embryonen vermehrt zu einer bilateral-symmetrischen bzw. stärkeren Expression auf der linken als auf der rechten Seite kam (Abb. 12 A, B, G; Tabelle 06). Kontrollinjektionen in die rechte Blastomere bzw. in eine Region, welche später Teile des Darms aber nicht der GRP ausbildet (D1), führten zu keiner signifikanten Veränderung der *Coco*-Expression (Abb. 12 G; Tabelle 06; 1,0pmol *Dicer*-MO rechts $p=0,33557$; 1,5pmol *Dicer*-MO rechts $p=0,56384$; D1 $p=0,11438$). Die ausschließlich linksseitige Stabilisierung von *Coco* ließ daher auf eine links-asymmetrische Wirkung von *Dicer* schließen.

Um die Morphologie der somitischen GRP-Zellen nach *Dicer*-Funktionsverlust zu analysieren, wurden Expressionsanalysen von zwei symmetrisch exprimierten, somitischen GRP-Markern, *myoD* und *Bicaudal C* (*Bic-C*) durchgeführt. Die *Dicer*-Morphanten wurden nach der WMISH einer detaillierten histologischen Analyse unterzogen. Beide Gene zeigten in Bezug auf ihre GRP-Expression keinen Unterschied im Vergleich zu Kontrollembryonen (Abb. 12 C-F). Daher sollte der *Dicer*-Effekt auf die *Coco* mRNA spezifisch und nicht einer unspezifischen Stabilisierung von mRNAs geschuldet sein.

| MO | Inj.ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|----------|----------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 291 | 79,0 | 15,5 | 5,5 | - |
| <i>Dicer</i> -MO | 1x D1 li | 1,5 pmol | 52 | 88,5 | 9,6 | 1,9 | 0,11438 |
| <i>Dicer</i> -MO | re | 1,0 pmol | 47 | 85,1 | 12,8 | 2,1 | 0,33557 |
| <i>Dicer</i> -MO | re | 1,5 pmol | 83 | 81,9 | 14,5 | 3,6 | 0,56384 |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,0 pmol | 210 | 72,4 | 16,7 | 11,0 | 0,064 |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,5 pmol | 378 | 51,3 | 28,8 | 19,8 | <0,000 |

Tabelle 06 Auswirkung eines *Dicer*-Verlusts auf *Coco*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

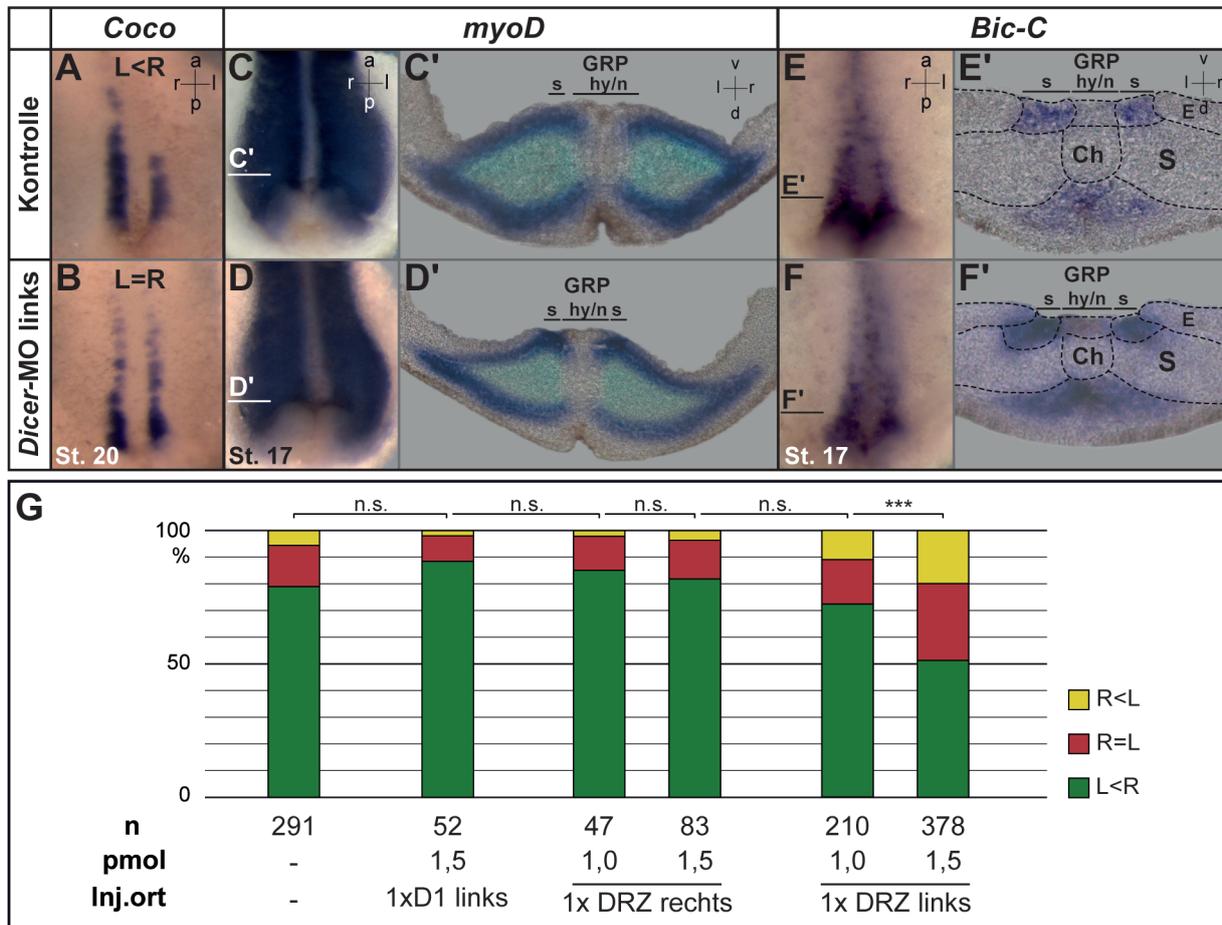


Abb. 12 Verlust von *Dicer* stabilisiert *Coco* ohne Veränderung der somitischen GRP-Zellen. *Dicer*-MO wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in die DRZ von 4-8 zelligen Embryonen injiziert. St. 17 diente der Analyse von *myoD* (C, C', D, D') bzw. *Bic-C* (E, E', F, F'); St. 20 von *Coco* (A, B). (C' - F') Transversale Schnitte nach *myoD*- bzw. *Bic-C*-WMISH. Es konnte kein Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Seite festgestellt werden. (G) Für die *Coco*-Analyse wurde die Expressionsstärke bestimmt (L<R (rot), R<L (grün) und R=L (gelb)). Die Kontrollinjektion in den vegetalen Pol (D1) zeigte keine Veränderungen verglichen mit der Kontrolle. Linke aber nicht rechte Injektionen wiesen eine konzentrationsabhängige Expressionssteigerung von *Coco* auf (A, B, G).

2.3 Funktionsverlust von *Dicer* unterbindet die Nodal-Kaskade

Ob sich diese Auswirkung auf *Coco* in der Induktion der Nodal-Kaskade widerspiegeln, sollte die Analyse von *Pitx2c* in *Dicer*-Morphanten zeigen. Zum Nachweis der Spezifikation der LR-Achse durch *Pitx2c*-Expression wurde *Dicer*-MO wie zuvor injiziert. In gut 30% aller Embryonen fehlten durch den linksseitigen Verlust der *Dicer*-Funktion *Pitx2c*-Transkripte im linken SPM (Abb. 13 C und E; Tabelle 07; p<0,000). Dieses Ergebnis zeigte, dass miRNAs für die Spezifizierung der LR-Achse wichtig sind.

Um zu untersuchen, dass hierfür die Stabilisierung der *Coco* mRNA tatsächlich verantwortlich war, wurde ein Epistasisexperiment durchgeführt. Die durch eine Reduktion an Dicer Protein erzeugte linksseitige Anreicherung von *Coco* sollte in diesem Experiment durch einen gleichzeitig durchgeführten *Coco*-Funktionsverlust ausgeglichen werden. So sollte evtl. die wildtypische Achsenausbildung wieder hergestellt werden.

Koinjektion von *Dicer*-MO und *Coco*-MO in die linke DRZ führte tatsächlich im Vergleich zur alleinigen *Dicer*-MO-Injektion zu vermehrt wildtypischen Embryonen (Abb. 13 D, E; Tabelle 07; $p=0,00026$). Die Injektion von *Coco*-MO in die linke Embryohälfte hatte dagegen keine Auswirkung auf *Pitx2c* (Abb. 13 B, E; Tabelle 07; $p=0,14221$). Dieser Befund legt nahe, dass *Dicer*-MO die LR-Achsen Entwicklung *Coco*-abhängig beeinflusste.

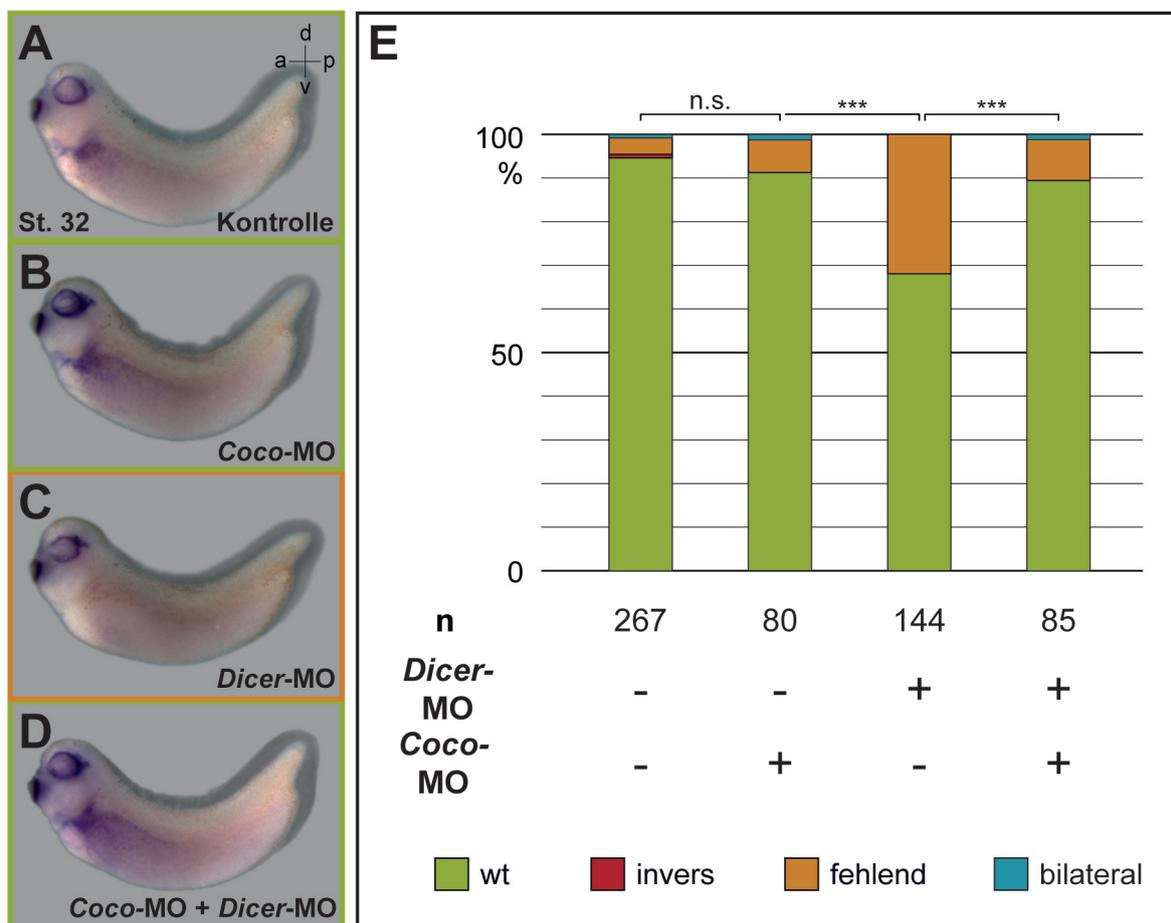


Abb. 13 miRNA-abhängige *Coco*-Regulation ist für die LR-Achsen-Ausbildung notwendig.

Injiziert wurde *Dicer*-MO +/- *Coco*-MO in die linke DRZ von 4-8 Zellstadien. WMISH mit *Pitx2c* wurde im St. 32 durchgeführt. (A, B) Kontrollen und *Coco*-Morphanten wiesen wildtypische Expression von *Pitx2c* auf (grün in E). *Dicer*-MO führte bei ca. 30% linksseitig zu fehlender *Pitx2c*-Expression (C, orange in E). Koinjektion von *Dicer*-MO und *Coco*-MO führte wieder zu wildtypischem Zustand der Embryonen (D, E). *Pitx2c*-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

| MO | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert |
|-------------------------------------|---------|----------------------|-----|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|------------------------------------|
| Kontrolle | | | 267 | 95,5 | 0,4 | 3,7 | 0,4 | - |
| <i>Coco</i> -MO | li | 0,5 pmol | 80 | 91,3 | 0 | 7,5 | 1,3 | 0,14221 (zu Ko) |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,5 pmol | 144 | 68,1 | 0 | 31,9 | 0 | <0,000 (zu Ko) |
| <i>Coco</i> -MO <i>Dicer</i> -MO | li | 0,5 pmol 1,5 pmol | 85 | 89,4 | 0 | 9,4 | 1,2 | 0,00026 (zu <i>Dicer</i> MO) |

Tabelle 07 Auswirkung eines *Dicer*-Funktionsverlusts auf *Pitx2c*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler *Pitx2c*-Expression

2.4 *Dicer*-MO wirkt nicht über Ciliogenese oder Morphogenese der GRP

Die bisher durchgeführten Analysen ließen außer Acht, ob die Integrität und Funktionalität der GRP durch *Dicer*-Funktionsverlust in Mitleidenschaft gezogen war oder nicht. In etlichen anderen Untersuchungen, z.B. zur Funktion von Serotonin oder der Protonenpumpe ATP4, waren solche Effekte allerdings zentral wichtig (Beyer et al., 2012; Walentek et al., 2012). Daher sollte in Kontroll-experimenten dieser Frage gezielt nachgegangen werden. Als Marker für die Analyse der Spezifikation des superfiziellen Mesoderms wurden *Xnr3* und *Foxj1* verwendet (Abb. 14 A - D). In beiden Fällen veränderte die linksseitige Translationsunterdrückung von *Dicer* die Expression im Vergleich zur nicht-injizierten Kontrollseite bzw. zu unbehandelten Kontrollembryonen nicht (Abb. 14 A - E). Somit war weder die Identität des superfiziellen Mesoderms (*Xnr3*) noch die Ciliogenese innerhalb dieses Gewebes (*Foxj1*) gestört. Diese Aussage konnte in Neurulastadien durch die Expressionen der zwei Cilienmarker *Tektin2* und *dnah9* weiter bestätigt werden (Abb. 14 E - H). Wie in Kontrollembryonen ließen sich beide sowohl auf der linken als auch rechten Hälfte der GRP gleichmäßig nachweisen (Abb. 14 E - H). Zusätzlich konnten die Cilien durch eine IF auf der GRP von Embryonen mit beidseitiger *Dicer*-Repression direkt detektiert werden (Abb. 14 J - L; Tabelle 08). Durch die posteriore Ausrichtung der Cilien der *Dicer*-Morphanten ließ sich indirekt schließen, dass auch der Flow durch den *Dicer*-Funktionsverlust nicht verändert wurde. Damit sollte *Coco* direkt und spezifisch durch miRNAs reguliert werden. Im Folgenden wurde untersucht, welche miRNAs dafür in Frage kommen.

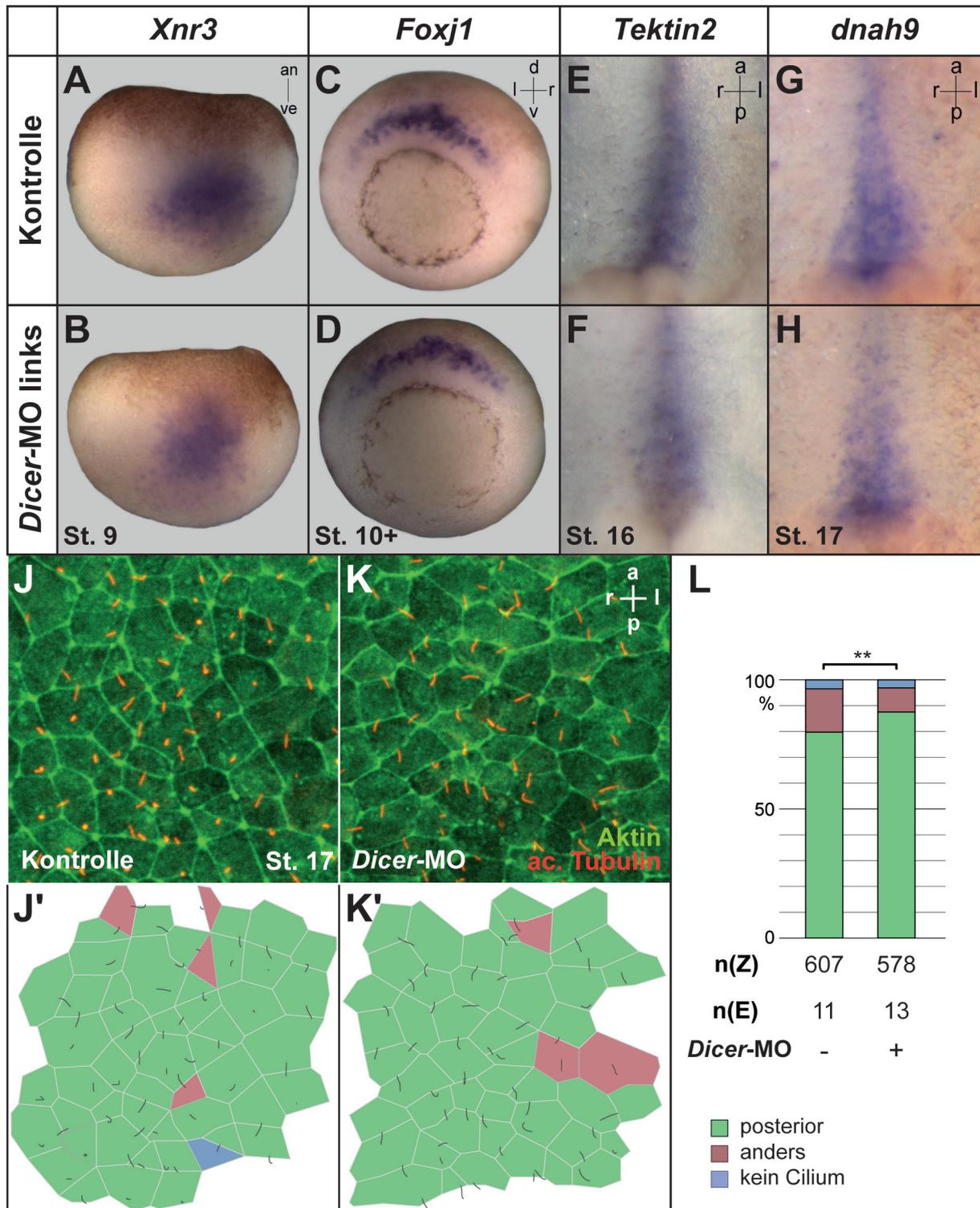


Abb. 14 Kein Einfluss von *Dicer*-MO auf die Ciliogenese der GRP.

Analyse von *Xnr3* (A, B) und *Foxj1* (C, D) (SM) sowie *Tektin2* (E, F) und *dnah9* (G, H) nach Funktionsverlust von *Dicer*. Injektion von *Dicer*-MO in die linke DRZ von 4-8 Zellstadien. Blastula (St. 9) und Gastrula (St. 10-10.5) (A-D) in dorsaler Ansicht. Dorsale Explantate von St. 16/ 17 in ventraler Ansicht (E - H). Weder *Xnr3*, *Foxj1*, *Tektin2* noch *dnah9* wurden in ihrer Expression nach *Dicer*-MO Injektion verändert (A - H). (J - L) Analyse der GRP-Morphologie und -Cilierung durch IF von dorsalen Explantaten des St.17 nach *Dicer* Verlust. GRP-Cilien (α -Tubulin) in rot und Aktin (Phalloidin) in grün dargestellt. (J - K) Vergrößerungen des zentralen Bereichs der GRP. (J, J') In der Kontrolle konnten vorwiegend zum posterioren Pol hin ausgerichtete Cilien detektiert werden (grün in J'; rot – abweichende Polarisierung; blau – kein Cilium). Die beidseitig mit *Dicer*-MO getroffene GRP ist dazu vergleichbar (K, K', L). Cilienausrichtung: grün – posterior; rot – anders; blau – kein Cilium

| MO | Inj.ort | Konz. | n (E) | n (Z) | P in % | A in % | R in % | L in % | M in % | K in % | p-Wert |
|------------------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Kontrolle | | | 11 | 578 | 87,5 | 0,5 | 2,9 | 3,8 | 2,1 | 3,1 | - |
| <i>Dicer</i> -MO | 2x DRZ | 1,5 pmol | 13 | 607 | 79,7 | 0,7 | 4,9 | 5,9 | 5,3 | 3,5 | 0,0062 |

Tabelle 08 *Dicer*-MO verändert GRP-Ciliogenese nicht.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n(E) – Anzahl der Embryonen; n(Z) – Anzahl der Zellen insgesamt; P/ A/ R/ L/ M/ K in % - Anteil der posterior (P)/ anterior (A)/ rechts (R)/ links (L)/ mittig (M) lokalisierten oder fehlenden (K – keine) Cilien

3. Coco-regulierende miRNAs

3.1. Analyse der 3'-UTR von *Coco A* und *B* auf potentielle miRNA-Bindestellen

Der erste Schritt der Identifizierung potentieller miRNA-Kandidaten für die *Coco*-Regulation war die Suche nach miRNA-Bindestellen innerhalb der *Coco A* und *B* 3'-UTR mit Hilfe der Internetdatenbank miRBase (www.mirbase.org). Das Augenmerk lag hierbei auf miRNAs bzw. miRNA-Familien, die mehrere Bindestellen innerhalb der UTRs besitzen, da dies für eine effizientere Regulation spricht. Außerdem wurde nach Bindestellen gesucht, die auch in *Coco*-Genen anderer Wirbeltiere vorkommen.

Dabei fielen vier miRNAs/ -Familien auf (Abb. 15):

(1) Die miRNA-15/ 16-Familie (Finnerty et al., 2010; Martello et al., 2007; Abb. 15 A und B; rot markiert), für die in *Coco A* zwei Bindestellen gefunden wurden, eine für miR-15* und eine für miR-15a (Abb. 15 B und B'), welche ebenfalls in der *Coco B* 3'-UTR auftraten (Abb. 15 A, B/ B'). *Coco B* besaß außerdem zwei weitere miR-15 Hybridisierungsstellen: miR-15* (Abb. 15 B'') und miR-15b (Abb. 15 B''');

(2) Das miR-17~92-Cluster (Tanzer et al., 2004; Abb. 15 A, C - C'''; grün markiert). Zu diesem Cluster zählen außer miR-17 und -92a-1 die miR-18a, -19a, -19b-1 und -20a auch deren partiell komplementäre *-Formen (Petrocca et al., 2008). Beide *Coco* 3'-UTRs könnten Ziel der miR-18a* und -19a sein (Abb. 15 C', C''). Eine *Coco B* spezifische Regulation könnte über eine miR-18* Stelle erfolgen (Abb. 15 C'''). Zusammenfassend ergaben sich in der *Coco A* 3'-UTR insgesamt sechs und in der UTR von *Coco B* drei potentielle Bindestellen für Mitglieder des miR-17~92-Clusters;

(3) In der 3'-UTR von *Coco B* fiel eine am 5'-gelegenen Ende, *Coco B* spezifische und repetitive Sequenz auf (Abb. 15 A und D). Die Region enthielt zahlreiche miR-145 und -107* Zielsequenzen. Auf Grund der repetitiven Natur der Region könnten beide miRNAs fünf Mal in abwechselnder Reihenfolge hintereinander binden.

Im Folgenden wurden die einzelnen Kandidaten experimentell überprüft.

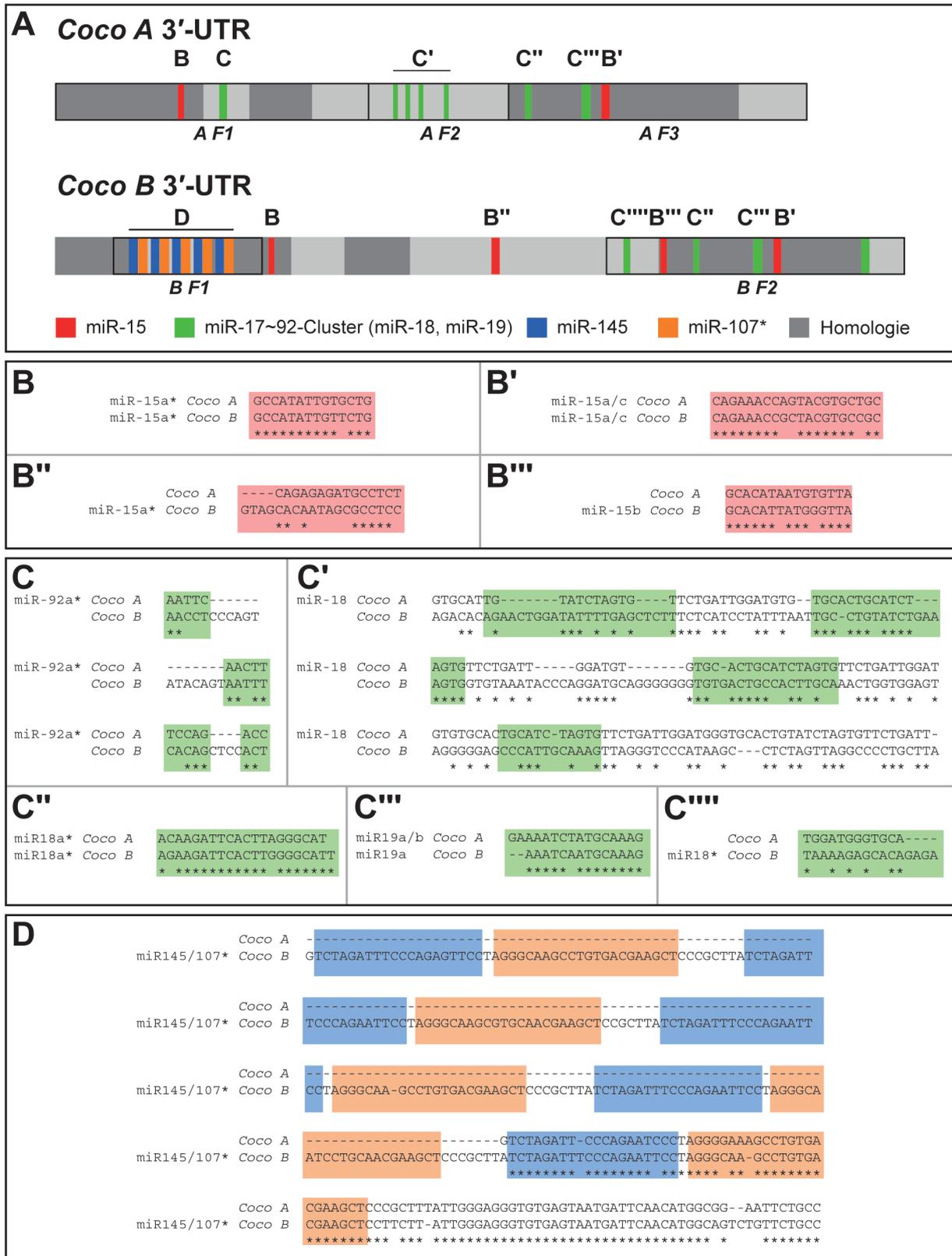


Abb. 15 Potentielle miRNA-Bindestellen in der *Coco* 3'-UTR.

(A) Schematische Gegenüberstellung der *Coco* A und B 3'-UTRs. Markierte miRNA-Bindestellen wurden mit Hilfe der Datenbank „mirbase“ gesucht. miRNAs einer Familie, die potentiell *Coco* regulieren, wurden farbig markiert (rot – miR-15/16 Familie; grün – miR-17~92-Cluster; blau – miR-145; orange – miR-107*). Protektor-RNA-Sequenzen (A F1-3; B F1/2) und homologe Bereiche zwischen den 3'-UTRs (grau) wurden hervorgehoben. Alle markierten, regulatorischen Sequenzen sind in (B-D) genauer dargestellt und nach Familie/ Cluster geordnet. (B) beinhaltet miR-15/ 16, (C) miR-17~92 und (D) die für miR-145 und -107*. Bei allen in (B - D) aufgeführten Sequenzen, welche als Ansatzstelle für eine miRNA dienen könnten, wurde die entsprechende miRNA vor die Sequenz geschrieben; dient sie nicht als Anlagerungsstelle wurde sie weggelassen.

3.2 Der Einfluss von miR-15a auf *Coco* und die Nodal-Kaskade

miR-15a ist bereits in der frühen Entwicklung von *Xenopus laevis* für die Gastrulation essentiell wichtig. Insbesondere beeinflusst miR-15a *Nodal*, weshalb ihre Familie als erste untersucht wurde (Martello et al., 2007). Außerdem sind Bindestellen anderer miRNAs des miR-15/ 16-Clusters in verschiedenen Organismen konserviert. Neben den zwei *Coco*-Genen von *Xenopus laevis* besitzt auch *Coco* aus *Xenopus tropicalis*, *Cer12* der Maus sowie das menschliche Homolog *DAND5* Bindestellen der miR-15/ 16-Familie.

3.2.1 Räumlich-zeitliches Expressionsmuster von miR-15a

Zunächst wurde untersucht, ob miR-15a im Embryo zur richtigen Zeit am richtigen Ort vorhanden ist. Überraschenderweise fanden sich beim Vergleich der Expressionsmuster zwischen der reifen miR-15a und dem Vorläufermolekül pri-miR15/16 deutliche Unterschiede während Gastrulations- (St. 10.5) und Flow-Stadien (St. 17).

Während der Gastrulation kam die miRNA dorsal wie ventral in mesodermalem Gewebe vor (Abb. 16 C', D'). Die pri-miRNA beschränkte sich auf die tieferen Zellschichten, während die reife miRNA-Expression bis in das darüber gelegene superfizielle Epithel reichte (Abb. 16 A', B'). In den ektodermalen Zellschichten des animalen Pols fand sich das gleiche Muster. Die pri-miRNA Färbung war nur in tieferen Regionen zu sehen, die reife miRNA dagegen zusätzlich auch in der superfiziellen ektodermalen Schicht (Abb. 16 A', B'). In Neurulastadien wurden die RNAs für beide miR-15-Moleküle in mesodermalem Gewebe wie Somiten und der *Chorda dorsalis* detektiert (Abb. 16 C', D'). In dorsalen Explantaten von Stadium 17 Embryonen konnte beobachtet werden, dass sich nur die reife miR-15a in allen GRP-Zelltypen nachweisen ließ (Abb. 16 D'). Eine Asymmetrie entlang der LR-Achse konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Abb. 16 D' für St. 17; und nicht gezeigte

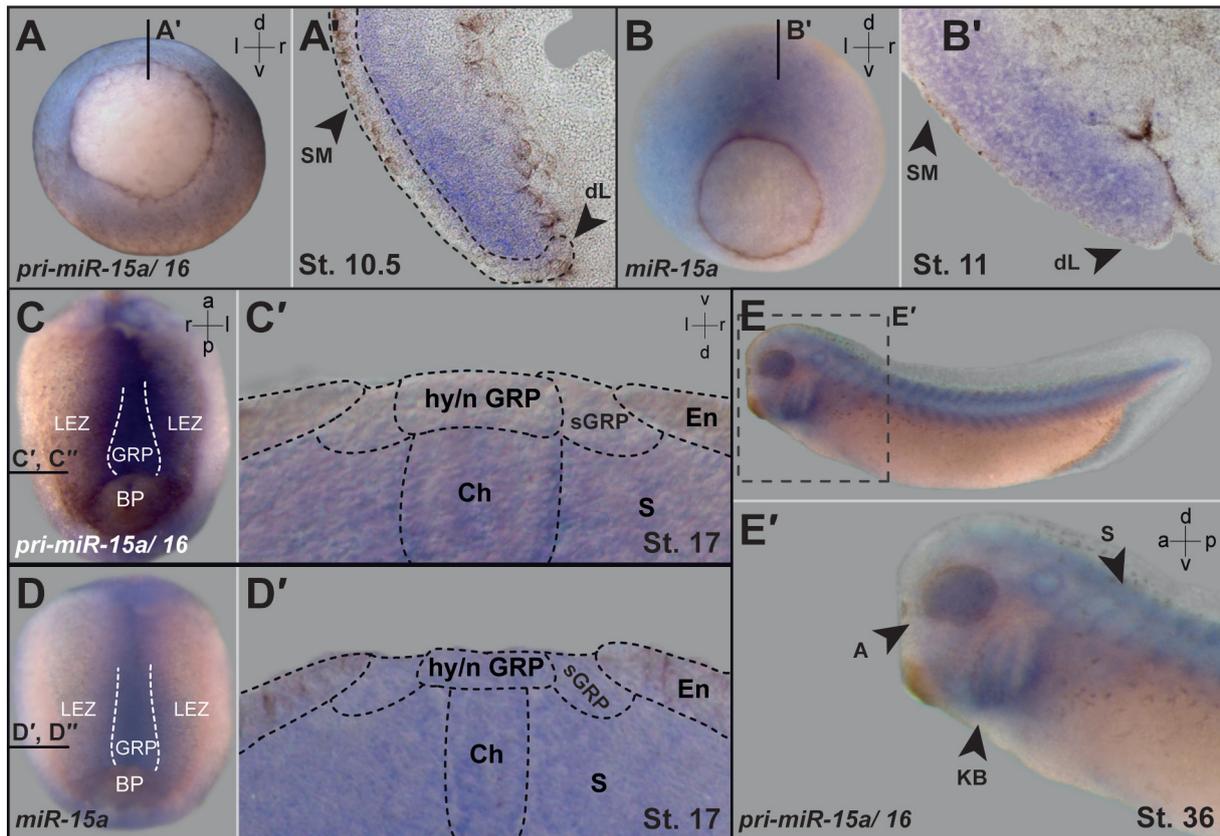


Abb. 16 Expressionsanalyse von miR-15.

Die Expression von miR-15 wurde mit zwei Sonden durchgeführt, mit einer LNA-Sonde für die reife miR-15a und mit einer die pri-miRNA-15/ 16. Das Ergebnis beider Sonden ist im Vergleich für St. 10.5/ 11 und St. 17 dargestellt. Für St. 32 wurde lediglich die pri-miRNA-Sonde verwendet. **(A', B')** Histologische Schnitten der Gastrulastadien (St. 10.5/ 11) zeigten für die reife und die unprozessierte miRNA in tiefem mesodermalem Gewebe Färbung. Nur die reife miR-15a war im superfiziellen Mesoderm (SM) und der dorsalen Lippe (dL) zu detektieren. **(C', D')** Im St. 17 konnte ebenso nur miR-15a in der oberflächlich liegenden GRP (sGRP, hyGRP, nGRP) nachgewiesen werden und nicht die pri-miRNA. Beide befanden sich in den Somiten (S) und der *Chorda dorsalis* (Ch). **(E, E')** In Kaulquappen (St. 36) gab es weiterhin Färbung in den Somiten (S) und zusätzlich in Kiemenbögen (KB) und dem Auge (A). En – Endoderm.

Daten). Im Gegensatz hierzu waren keine pri-miRNA-Signale in der GRP zu detektieren (Abb. 16 C'), auch nicht in Post-Flow Stadien.

In älteren Stadien (St. 36) zeigten außerdem mesodermale Gewebe wie die Somiten eine Färbung (Abb. 16 E, E'). Zusätzlich waren die Kiemenbögen und das Auge positiv für die antisinn-Sonde der pri-miR-15/ 16 (Abb. 16 E, E').

3.2.2 Funktionsverlust von *miR-15a* verhindert die Regulation von *Coco* und resultiert in einer veränderten Nodal-Kaskade

Zur weiteren Analyse von miR-15a wurde ein miR-15a spezifisches MO verwendet. Dieses Oligonukleotid verhinderte durch Anlagerung an die Dicer-Erkennungssequenz innerhalb der pre-miRNA die Prozessierung von miR-15a durch Dicer und führte

somit zum Funktionsverlust. Injektionen wurden in der linken und rechten DRZ des Embryos durchgeführt, um eine mögliche LR-Achsen-spezifisch, laterale Wirkung nachzuweisen. Linksseitig injiziert zeigte das MO sowohl auf *Coco* als auch auf *Pitx2c* einen deutlichen Effekt. *Coco* mRNA wurde im Vergleich zur rechten Seite linksseitig hochreguliert und die asymmetrische *Pitx2c*-Expression fehlte bei knapp 40% der manipulierten Embryonen (Abb. 17; Tabelle 09 und 10; jeweils $p < 0,000$). Interessanterweise zeigte ein rechtsseitiger *miR-15a*-Funktionsverlust keinen Einfluss auf *Coco* und *Pitx2c* (Tabelle 09 und 10; *Coco* $p = 0,21098$; *Pitx2c* $p = 0,14972$).

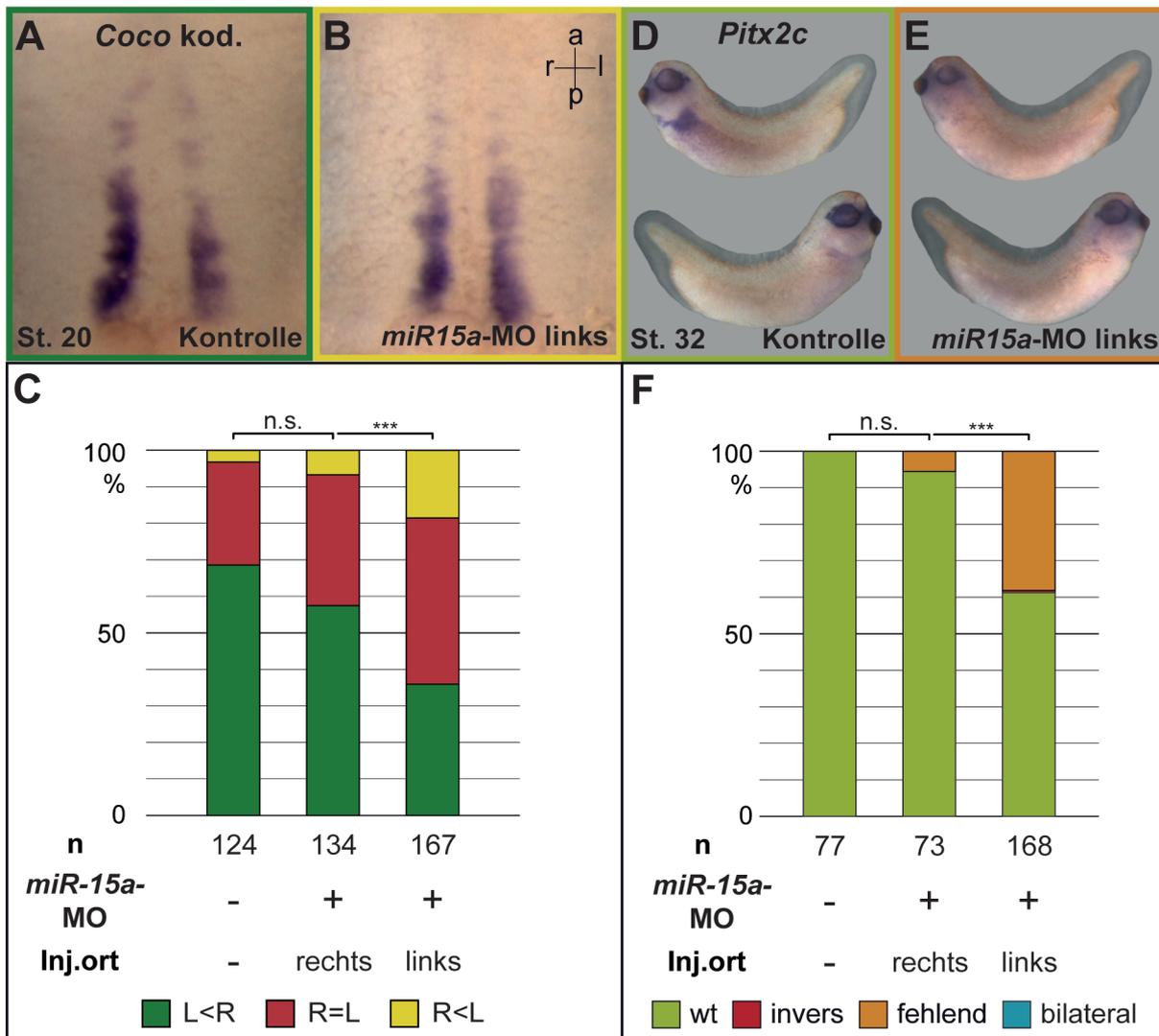


Abb. 17 Die miR-15a-Regulation von Coco ist für die LR-Achsen-Entwicklung essentiell.

Das *miR-15a*-MO wurde unilateral in die linke oder rechte Blastomere (DRZ) von 4/ 8-zelligen Embryonen injiziert. Analysiert wurden dorsale Explantate von St. 20 für *Coco* und St. 32 für *Pitx2c*. (A - C) Die *Coco*-Expression wurde in L<R, R<L und R=L eingeteilt. Der Anteil an Embryonen mit verringerter linksseitiger *Coco*-Expression (grün in C) nahm durch Verlust von *miR-15a* bei linker und rechter Injektion ab. Der Effekt war linksseitig stärker (B, C). (D - F) Linksseitiger Funktionsverlust führte zu einer fehlenden Expression von *Pitx2c* (E; orange in F), rechtsseitiger bei einer geringen Anzahl von Embryonen ebenfalls (F).

Coco-Expression: grün – L<R; rot – L=R; gelb – R<L; *Pitx2c*-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

| MO | Inj.ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|--------------------|---------|----------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 124 | 68,5 | 28,2 | 3,2 | - |
| <i>miR-15a</i> -MO | re | 2,0 pmol | 134 | 57,5 | 35,8 | 6,7 | 0,21098 |
| <i>miR-15a</i> -MO | li | 2,0 pmol | 167 | 35,9 | 45,5 | 18,6 | <0,000 |

Tabelle 09 Auswirkung der Inhibition der miR-15a-Prozessierung auf *Coco*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

| MO | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|--------------------|---------|----------|-----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 77 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | - |
| <i>miR-15a</i> -MO | re | 2,0 pmol | 73 | 94,5 | 0 | 5,5 | 0 | 0,14972 |
| <i>miR-15a</i> -MO | li | 2,0 pmol | 168 | 61,3 | 0,6 | 38,1 | 0 | <0,000 |

Tabelle 10 Auswirkung der Inhibition der miR-15a-Prozessierung auf *Pitx2c*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bi. in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler (bi.) *Pitx2c*-Expression

Diese Ergebnisse zeigten, dass die miR-15a Funktion entscheidend für die Regulation der *Coco* mRNA-Stabilität sowie für die LR-Achsen-Entwicklung ist. Es konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachteten Effekte wirklich von einer direkten Interaktion der miR-15a mit der *Coco* mRNA herrührten oder evtl. indirekter Natur waren, d.h. durch andere Zielgene vermittelt wurden.

3.2.3 Schutz der miR-15a-Bindesequenz in der *Coco* 3'-UTR stabilisiert die mRNA-Expression

Ob *Coco* direkt durch miR-15a reprimiert wird sollte mit einem „target protector“ MO (*TP*-MO) untersucht werden. Ein *TP*-MO ist komplementär zur miRNA-Bindestelle der jeweiligen 3'-UTR. Es interagiert somit nicht direkt mit der miRNA sondern mit der Zielsequenz in der mRNA. Deshalb sollten andere Zielgene dieser miRNA nicht beeinflusst werden. Ein *TP*-MO wurde gegen die miRNA-15a Bindestellen von *Coco A* (in *A F3*; *Coco A-TP-MO*^{miR-15a} bzw. *A-TP-MO*) und *Coco B* (in *B F2*; *Coco B-TP-MO*^{miR-15} bzw. *B-TP-MO*) hergestellt. Die Wirkung der Manipulation wurde auf Ebene von *Coco* (Flow) und *Pitx2c* (Nodal-Kaskade) untersucht. Die Auswertung der *Coco* mRNA-Stabilität wurde hierbei modifiziert. Die beiden lateralen *Coco*-Expressionsdomänen wurden nicht in einen direkten Vergleich gesetzt, sondern die Stärke der rechten bzw. linken Signale isoliert betrachtet und mit der rechten bzw. linken Wildtypexpression verglichen.

Die Blockierung der miR15a Bindestelle hatte keine Auswirkung auf die rechte *Coco*-Domäne, egal ob das 4-Zellstadium in die linke oder rechte Blastomere injiziert wurde (Abb. 18 F; Tabelle 11; *A-TP-MO* rechts $p=0,3300$; links $p=0,3977$; *B-TP-MO* rechts $p=0,4275$; links $p=0,4590$). Die Analyse der linken Domäne ließ erkennen, dass eine rechte Injektion ebenfalls keinen Effekt hatte (Abb. 18 F; Tabelle 11; *A-TP-MO* $p=0,14256$; *B-TP-MO* $p=0,05369$), eine linke jedoch die Repression von *Coco* verhinderte. Dies war sowohl für *A-TP-* als auch für *B-TP-MO* der Fall (Abb. 18 B, D, F; Tabelle 11; jeweils $p<0,000$).

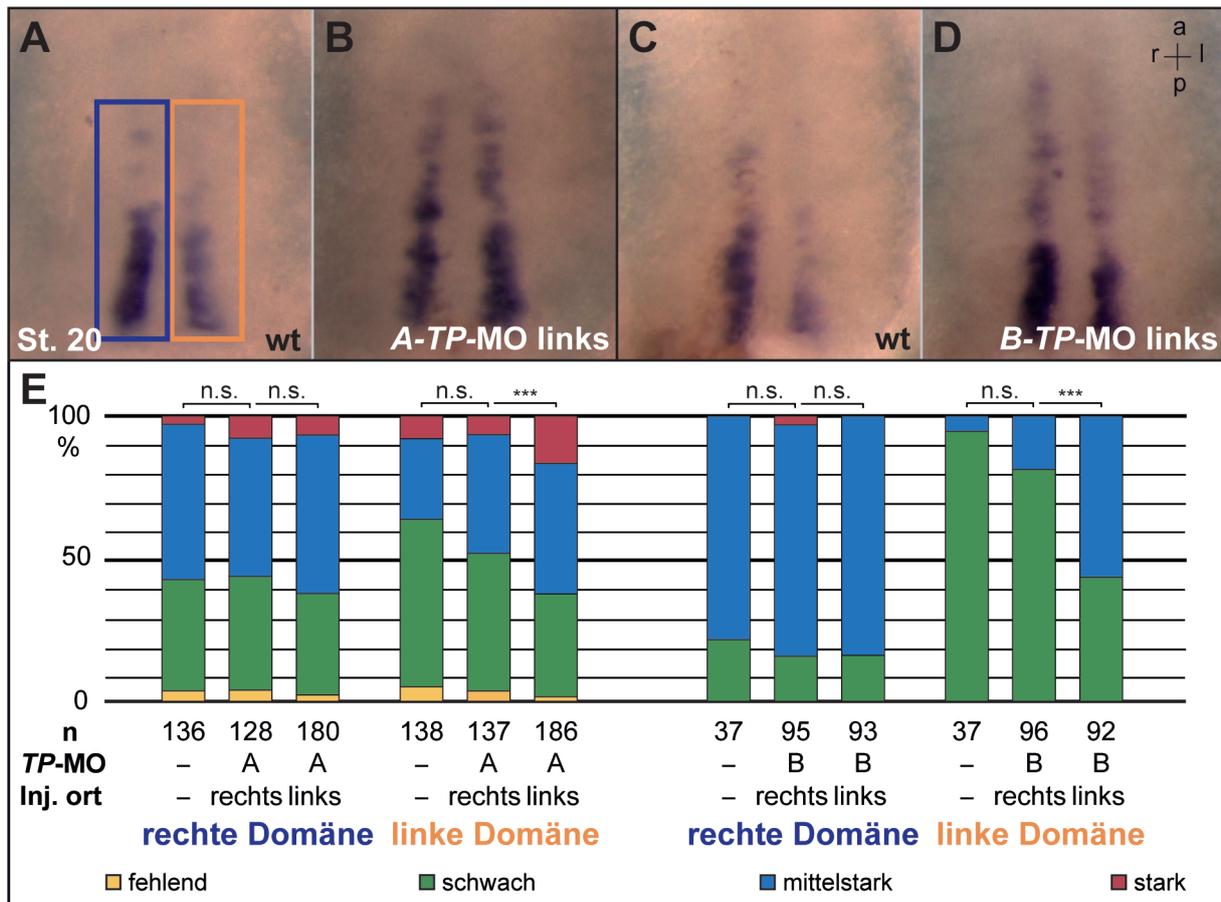


Abb. 18 Das Blockieren der miR-15a-Bindestelle von *Coco A* und *B* stabilisiert die mRNA.

Das *Coco A-TP-MO^{miR-15a}* und *Coco B-TP-MO^{miR-15a}* wurden in die linke bzw. rechte dorsale Blastomere von 4-8 Zellstadien injiziert. Im St. 20 wurde die *Coco*-Expression ausgewertet (A, E). Die linke (orange) und rechte (dunkelblau) Hälfte der *Coco*-Domäne wurde getrennt voneinander in eine fehlende (gelb in E), schwache (grün in E), mittelstarke (blau in E) und starke (rot in E) Färbung eingeteilt. (A, C, E) In den Kontrollen war die rechte Domäne meist mittelstark und die linke schwach. (E) Injizierte man die Embryonen rechts, verändert sich verglichen dazu nichts. (B, D, E) Bei einer linken Injektion konnte bei beiden Domänenhälften meist eine mittelstarke Färbung nachgewiesen werden. *Coco*-Expression: gelb - fehlend; grün - schwach; blau - mittelstark; rot - stark

| MO | Inj.ort | Konz. | rechte Domäne | | | | linke Domäne | | | |
|-----------|---------|----------|---------------|--------------|---------------|-----------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------------|
| | | | n | F/ S in % | M/ St in % | p-Wert (zur Ko) | n | F/ S in % | M/ St in % | p-Wert (zur Ko) |
| Kontrolle | | | 136 | 42,6 | 57,3 | - | | 63,8 | 138 | - |
| A | re | 1,5 pmol | 128 | 43,8 | 56,2 | 0,3300 | 137 | 51,8 | 48,2 | 0,14256 |
| A | li | 1,5 pmol | 180 | 37,8 | 62,2 | 0,3977 | 186 | 37,6 | 62,4 | <0,000 |
| Kontrolle | | | 37 | 21,6 | 78,4 | - | | 94,6 | 37 | - |
| B | re | 1,5 pmol | 95 | 15,8 | 84,2 | 0,4275 | 96 | 81,3 | 18,7 | 0,05369 |
| B | li | 1,5 pmol | 93 | 16,1 | 83,9 | 0,4590 | 92 | 43,5 | 56,5 | <0,000 |

Tabelle 11 Die Wirkung der Protektion der miR-15a-Bindestelle in *Coco A* und *B* auf *Coco*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; F/ S bzw. M/ St in % - Anteil der Embryonen mit fehlender (F) und schwacher (S) bzw. mittelsatkrer (M) und starker (St) Expression der linken bzw. rechten *Coco*-Domäne

Dagegen führten beide *TP*-MOs weder rechts noch links injiziert zu Veränderungen der *Pitx2c*-Expression (Abb. 19; Tabelle 12).

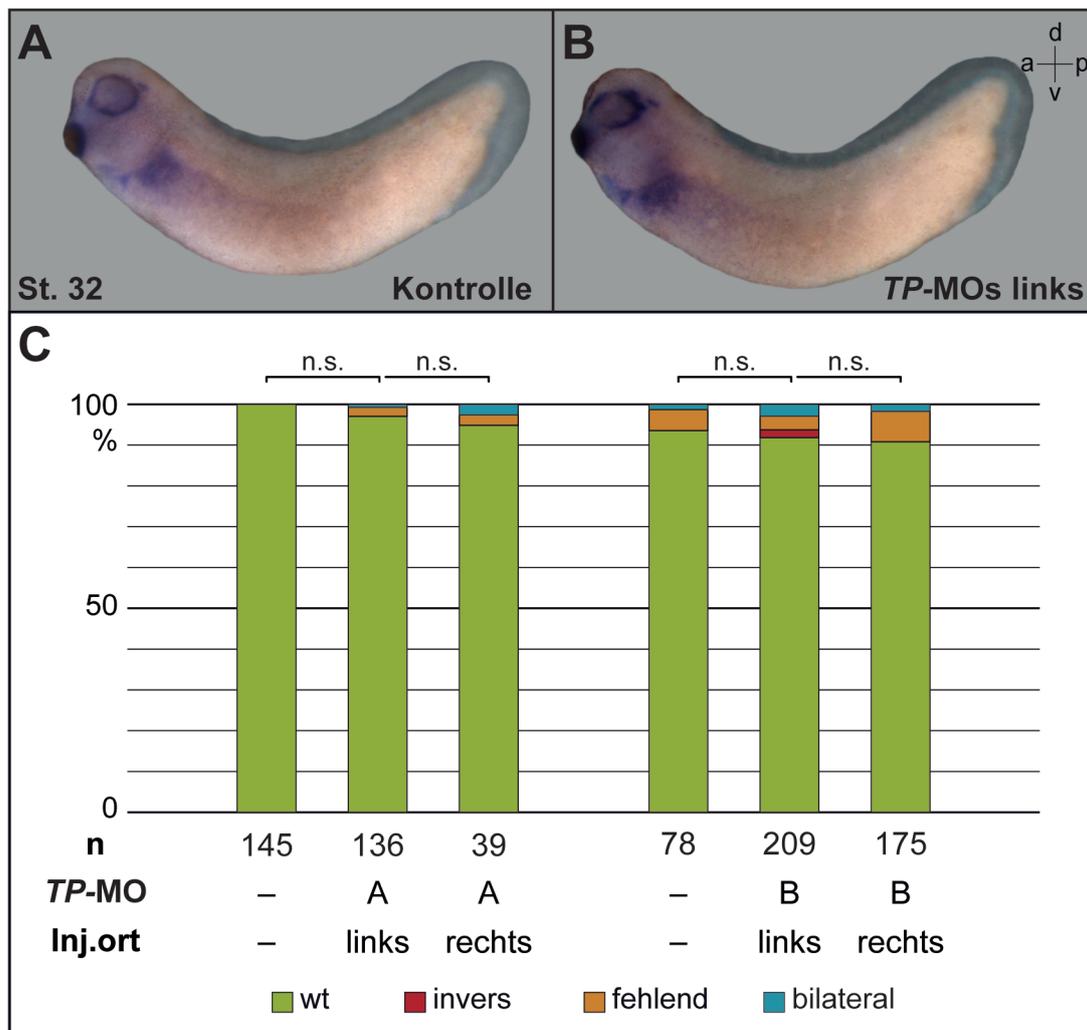


Abb. 19 Schutz von *Coco* durch miR-15a hat keinen Einfluss auf LR-Achsen-Entwicklung.

Analyse der *Pitx2c*-Expression nach unilateraler Injektion von *Coco A-TP-MO^{miR-15a}* und *Coco B-TP-MO^{miR-15a}* in die DRZ von 4-8 Zellstadien. (A-C) Weder durch Injektion auf der linken noch auf der rechten Seite konnte die Expression von *Pitx2c* im Vergleich zu den Kontrollen verändert werden. *Pitx2c* war durchgehend linksseitig zu detektieren (grün in C).

Pitx2c-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

| MO | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|-----------|---------|----------|-----|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| Kontrolle | | | 145 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | - |
| A | re | 1,5 pmol | 39 | 94,9 | 0 | 2,6 | 2,6 | 0,05098 |
| A | li | 1,5 pmol | 136 | 97,1 | 0 | 2,2 | 0,7 | 0,1514 |
| Kontrolle | | | 78 | 93,6 | 0 | 5,1 | 1,3 | - |
| B | re | 1,5 pmol | 175 | 90,9 | 0 | 7,4 | 1,7 | 0,4669 |
| B | li | 1,5 pmol | 209 | 91,9 | 1,9 | 3,3 | 2,9 | 0,62533 |

Tabelle 12 Die Wirkung der Protektion der miR-15a-Bindestelle in *Coco A* und *B* auf *Pitx2c*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler *Pitx2c*-Expression

Diese Analysen zeigten somit, dass die *Coco* 3'-UTR ein direktes Ziel der miR-15a darstellt. Da keine Veränderungen der Nodal-Kaskade beobachtet wurden, sollten weitere miRNAs an der Flüssigkeitsstrom-abhängigen Regulation von *Coco* beteiligt sein.

3.3 miR-107* aber nicht miR-145 reguliert *Coco* mRNA-Stabilität während des Symmetriebruchs

Basierend auf der *in silico* Analyse der *Coco* 3'-UTR Sequenzen wurden zwei weitere miRNAs gewählt, welche die *Coco* mRNA regulieren könnten, miR-107* und miR-145. Beide kommen lediglich in der 3'-UTR von *Coco B* innerhalb eines nicht-konservierten Bereichs zu *Coco A* vor. Sie waren interessant, da es von miR-107* in Kombination mit miR-145 fünf, in direkter Reihenfolge hintereinander liegende Bindestellen gab. Die miR-107* schien außerdem ein erfolgsversprechender Kandidat für die Inhibition von *Coco* zu sein, da miR-107* eine Bindestelle im *Cer12*-Gen der Maus besitzt.

3.3.1 Expressionsmuster von miR-107* in SM und GRP

Zunächst wurde die Expression von miR-107* und miR-145 in Stadien, die für den Symmetriebruch wichtig sind, überprüft (Gastrulation und Neurulation). miR-107* Expression ließ sich während der Gastrulation und Neurulation nachweisen. Im

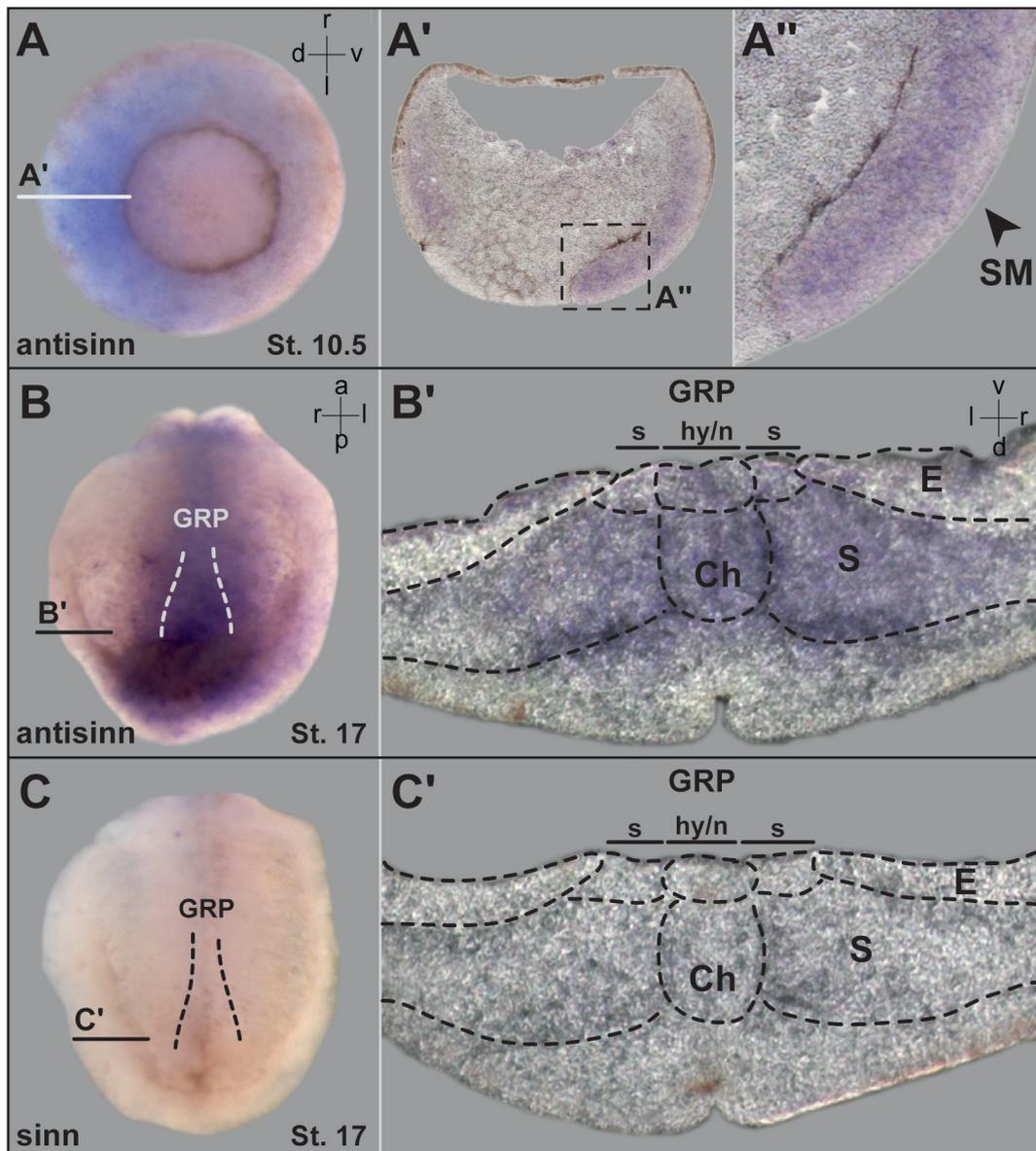


Abb. 20 Expressionsanalyse von miR-107*.

Detektion der pri-miR-107* von St. 10.5 und St. 17. **(A - A'')** Während der Gastrulation zeigte sich dorsal und ventral Färbung. **(A'/ A'')** Vibratomschnitte verdeutlichten, dass miR-107* auf der dorsalen Seite im SM nachzuweisen war und ventral im tiefen. **(B')** Im St. 17 konnte miR-107* vorwiegend in den Somiten (S), der *Chorda dorsalis* (Ch) und in der GRP (s, hy, n GRP) nachgewiesen werden. In den GRP-angrenzenden endodermalen Zellen (E) war ein punktförmiges, oberflächliches Muster auszumachen. **(C, C')** Die sinn-Kontroll-Sonde führte zu keinerlei Färbung.

Stadium 10.5 färbte sie das tiefe mesodermale Gewebe der Randzone an (Abb. 20 A', A''). Dies war sowohl dorsal als auch ventral der Fall (Abb. 20 A'). Zusätzlich fand sich eine epitheliale, oberflächliche miR-107*-Expression auf der dorsalen Urmundlippe und im superfiziellen Mesoderm (Abb. 20 A''). Im Stadium 17 konnte miR-107* in den Somiten, der *Chorda dorsalis* und allen GRP-Zelltypen detektiert werden (Abb. 20 B und C).

Für miR-145 konnte dagegen keine Expression in Neurula- bzw. Gastrulaembryonen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Diese Expressionsanalyse ließ eine Regulation von *Coco* durch miR-107*, nicht aber durch miR-145 vermuten, was nachfolgend experimentell untersucht wurde.

3.3.2 miR-107* reguliert die Stabilität der *Coco* mRNA in den somitischen GRP-Zellen

Um herauszufinden, ob miR-107* und -145 eine Rolle innerhalb der LR-Achsen-Entwicklung einnehmen, wurden antisinn-RNA-Fragmente in 4-Zellstadien injiziert. Die Fragmente waren komplementär zur Konsensus-Sequenz der jeweils fünf miRNA Bindestellen der *Coco B* UTR (Abb. 21 A' und A''). Die RNAs sollten mit der *Coco* 3'-UTR im Embryo hybridisieren und die Bindestellen der miRNAs vor einer Interaktion mit miR-145 bzw. -107* schützen. Daher werden auch sie nachfolgend als Protektor-RNAs bezeichnet. Die Injektion der miR-145 Protektor-RNA führte zu keinem signifikanten Effekt bezüglich der *Coco*-Expression im Vergleich zu Kontroll-embryonen (Abb. 21 A, B, F; Tabelle 13; $p=0,68967$). Die miR-107* Protektor-RNA verstärkte dagegen die Expression von *Coco* auf der linken Seite signifikant (Abb. 21 D, E, F; Tabelle 13; $p=0,008$).

| AS | Inj.ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|---|---------|-----------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 69 | 58,0 | 34,8 | 7,2 | - |
| <i>miR-145 Coco B AS</i> (Protektor-RNA) | li | 80-160 pg | 75 | 54,7 | 37,3 | 8,0 | 0,68967 |
| Kontrolle | | | 109 | 68,8 | 26,6 | 4,6 | - |
| <i>miR-107* Coco B AS</i> (Protektor-RNA) | li | 80-160 pg | 208 | 53,4 | 38,5 | 8,2 | 0,008 |

Tabelle 13 Auswirkung der Protektor-RNA von miR-145 bzw. -107* auf *Coco*.

AS – injizierte Protektor RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

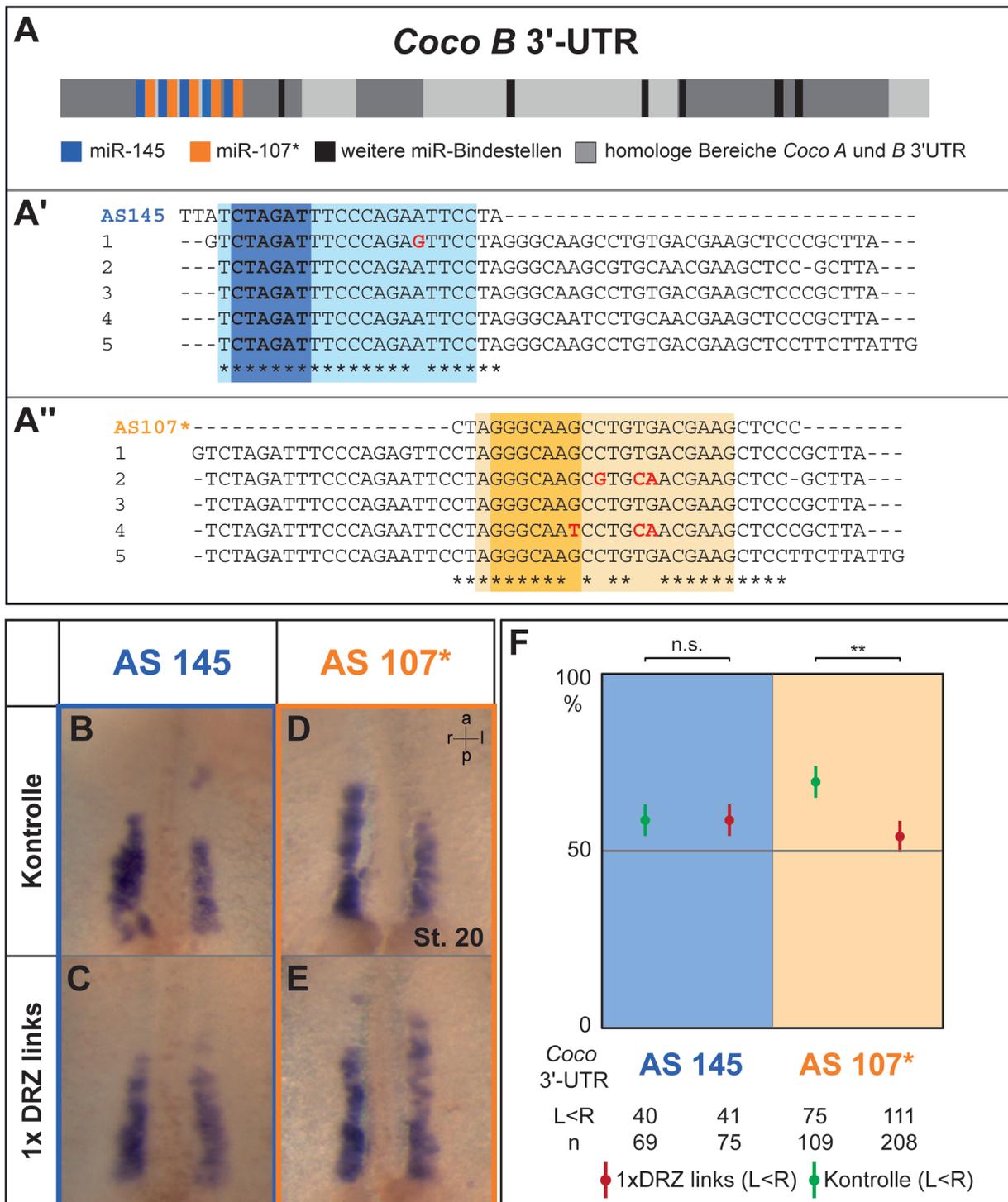


Abb. 21 Regulation von *Coco* erfordert miR-107*, nicht aber miR-145.

(A) *Coco B* 3'-UTR mit potentiell wichtigen miRNA-Bindestellen für seine Regulation. Hervorgehoben sind miR-145 (blau) und miR-107* (orange). Eine Protektor-RNA (AS 145 bzw. AS 107*) der Konsensussequenz aller fünf Bindestellen wurde zum Schutz injiziert. Die Sequenzen der Konstrukte sind in (A' und A'') den fünf Anlagerungsmöglichkeiten innerhalb der 3'-UTR gegenübergestellt. Rot markierte Basen deuten auf Unterschiede zwischen den Bindestellen hin. In dunkelblau bzw. -orange sind die „Seed-Sequenzen“ der miRNAs unterlegt. AS 107* und miR-145 wurden in die äquatoriale Ebene der dorsalen, linken Blastomere von 4-8 zelligen Embryonen injiziert und *Coco* im St. 20 analysiert. (F) Anteil an Embryonen mit L<R. (B, D, F) Die Kontrollen (grün in F) wiesen in beiden Fällen meist eine L<R Expression auf. (C, F) Eine linke Injektion von AS 145 (rot in F) änderte daran nichts. (E, F) Durch eine entsprechende Überexpression von AS 107* (rot in F) wurde der Anteil der L<R Embryonen im Vergleich zur Kontrolle (grün in F) verringert und *Coco* mRNA somit linksseitig stabilisiert.

4. Die Regulation von *Coco* durch miRNAs erfolgt Flow-abhängig

Die Frage ob die identifizierten miRNAs tatsächlich in einer Flüssigkeitsstrom-abhängigen Weise zur linksseitigen *Coco*-Repression führen ist von grundlegender Natur. Alternativ, und eher der konventionellen miRNA-Funktion entsprechend, könnten sie für ein Flüssigkeitsstrom-unabhängiges Gleichgewicht zwischen den Akteuren *Nodal* und *Coco* sorgen. Um diesen Zusammenhang zu klären, wurden Epistasisexperimente durchgeführt.

4.1 Die linksseitige Regulation der *Coco* mRNA durch miR-15 ist Flüssigkeitsstrom-abhängig

Wird *Coco* Flow-abhängig durch miRNAs reguliert, sollte bei einem Verlust des Flüssigkeitsstroms ein unbekanntes Signal fehlen, welches die miRNAs in die Lage versetzt die *Coco*-Expression zu reprimieren. Die Folge wäre eine anhaltende *Nodal*-Repression durch *Coco* in den somitischen GRP-Zellen und in der Folge LR-Achsen Defekte. In diesem Fall sollte eine linksseitige miRNA-Überexpression in Embryonen ohne Flüssigkeitsstrom die Repression durch *Coco* und damit die LR-Asymmetrie wieder herstellen. Solch ein Experiment würde die Epistase von Flüssigkeitsstrom und der miRNA-Aktivität nachweisen.

Um den Flüssigkeitsstrom zu unterbinden, wurde die Beweglichkeit der GRP Cilien durch einen Funktionsverlust für das axonemale „*dynein axonemal heavy chain 9*“ (*dnah9*) mit einem spezifischen MO unterbunden (Vick et al., 2009). Zur Überexpression der miR-15 wurde die pri-miRNA synthetisiert. Zusätzlich diente eine Koinjektion von „*humaner Argonaut 2*“ (*hAgo2*) mRNA zur Unterstützung der Umsetzung zur reifen miRNA, da im frühen *Xenopus*-Embryo nur eine geringe Menge *Argonaut* Expression nachgewiesen wurde (Liu et al., 2004; Lund et al., 2011). Als Marker für eine korrekte LR-Achsen-Entwicklung wurde die *Xnr1*-Expression im SPM analysiert. Kontrollexperimente zeigten, dass die Injektionen von pri-miR-15/ 16 mit *hAgo2* mRNA zu keiner veränderten Expression von *Xnr1* im linken SPM führte (Abb. 22 C, E, H; Tabelle 14; $p=0,16555$). Der Verlust der Cilienbeweglichkeit durch *dnah9*-MO war mit bis zu 60% an Embryonen ohne linke *Xnr1*-Expression im SPM effektiv

(Abb. 22 A, C, F und H, Tabelle 14; $p < 0,000$).

Wurden allerdings der Verlust des Flüssigkeitsstroms (*dnah9*-MO) und die Überexpression von pri-miRNA auf der linken Seite kombiniert durchgeführt, konnte die linke Nodal-Kaskade signifikant wieder hergestellt werden ($p = 0,00298$ im Vergleich zu *dnah9*-MO; Abb. 22 E und Tabelle 14).

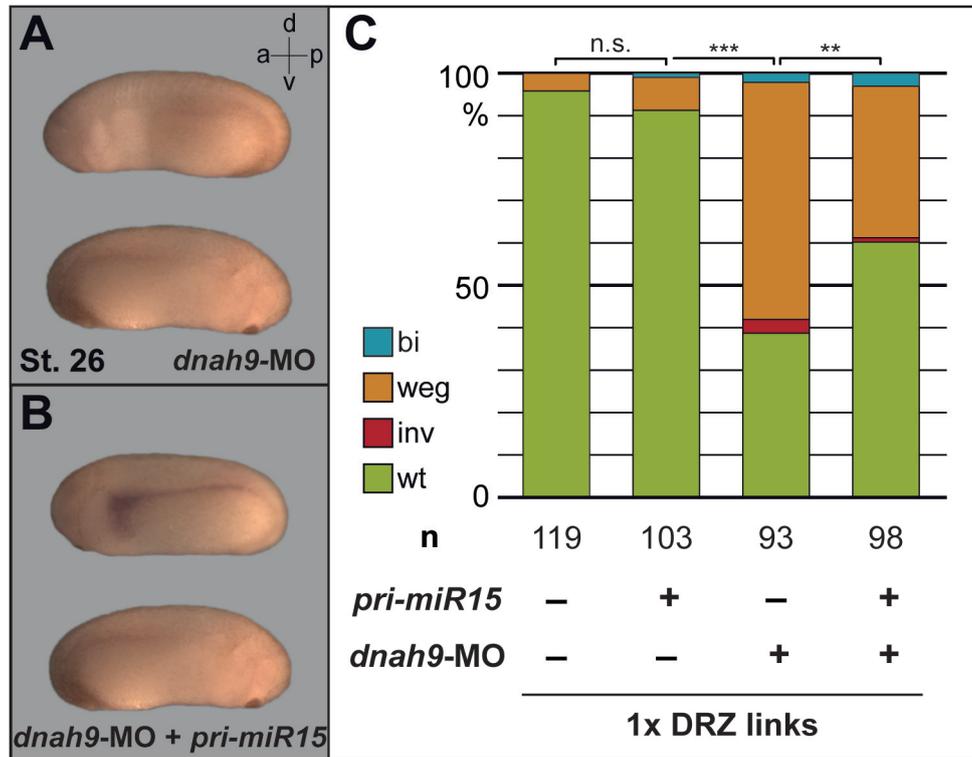


Abb. 22 Flow-abhängige Coco-Regulation durch miR-15.

Der Verlust des Flüssigkeitsstroms sollte durch miR-15 Überexpression ausgeglichen werden. Funktionsverlust des Stroms wurde durch *dnah9*-MO erzeugt. Der Funktionsgewinn von miR-15 wurde mit der pri-miRNA zusammen mit *hAgo2* RNA durchgeführt. Injiziert wurde in die DRZ von 4-8 Zellstadien. (A - C) Detektion von *Xnr1* im SPM von St. 26 Embryonen. (C) Die Kontrollen und Embryonen mit alleiniger Überexpression der pri-miRNA wies wildtypische Färbung auf (grün in C). (C) Das Fehlen des Flüssigkeitsstroms resultierte in einer Unterdrückung der *Xnr1*-Expression (orange in C). (B, C) Durch die Kombination des *dnah9*-MOs mit dem Funktionsgewinn-Konstrukt konnte diese partiell auf der linken Seite wieder induziert und dadurch der wildtypische Zustand wieder hergestellt werden (grün in C).

Pitx2c-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

| Konstrukt | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert |
|--|---------|-----------------------------|-----|--------------|-------------|--------------|----------------|---|
| Kontrolle | | | 119 | 95,8 | 0 | 4,2 | 0 | - |
| <i>pri-miR-15/16</i> <i>hAgo2</i> | li | 800 pg 80 pg | 103 | 91,3 | 1,0 | 7,8 | 1,0 | 0,16555 (zur Ko) |
| <i>dnah9</i> -MO <i>hAgo2</i> | li | 2,5 pmol 80 pg | 93 | 38,7 | 3,2 | 55,9 | 2,2 | <0,000 (zur Ko) |
| <i>pri-miR-15/16</i> <i>dnah9</i> -MO <i>hAgo2</i> | li | 800 pg 2,5 pmol 80 pg | 98 | 60,2 | 1,0 | 35,7 | 3,1 | 0,00298 (zu <i>dnah9</i> - MO) |

Tabelle 14 Ektopische, linke Expression von miR-15 gleicht den Verlust des Flüssigkeitsstroms aus.

Konstrukt – injizierte RNA/ MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler *Xnr1*-Expression im SPM

Die partielle Wiederherstellung der linken *Nodal*-Expression zeigte, dass die reprimierende Wirkung der miR-15a auf *Coco* Flüssigkeitsstrom-abhängig ist.

4.2 Epistatische Wirkung des *Coco* 3'-UTR-Schutzes und des Flow-Verlusts

In einem erweiterten Epistasisexperiment sollte der vorhergehende Befund überprüft werden. Konkret sollte das Ausbleiben der *Coco*-Repression nach einem Verlust des Flüssigkeitsstroms bei gleichzeitiger Blockierung von miRNA-Bindestellen sich effizienter und häufiger nachweisen lassen. Um dies statistisch auswertbar zu gestalten, wurden suboptimale Dosen des *dnah9*-MOs und der Protektor-RNA verwendet (1,5pmol MO und 80pg RNA/ Embryo), die für sich alleine nur geringe Wirkung auf *Coco* und die *Nodal*-Kaskade besaßen (Abb. 23).

Als Protektor-RNA diente in diesen Experimenten das *Coco B F2* Fragment, welches in vorangegangenen Versuchen den größten Einfluss auf *Coco* und vor allem die *Nodal*-Kaskade hatte (Abb. 10). Als Marker für die Induktion der *Nodal*-Kaskade diente wiederum die linke *Xnr1*-Expression im SPM. Wie erwartet, war der Effekt durch den *dnah9*-MO wie auch die Protektor-RNA alleine auf die linke *Nodal*-Expression sehr gering (Abb. 23; Tabelle 15; *dnah9*-MO $p=0,44166$; *B F2* $p=0,976$). Bei Kombination von *B F2* und *dnah9*-MO war bei circa der Hälfte der Embryonen *Xnr1* im linken SPM nicht mehr nachweisbar. Dies war sowohl im Vergleich zu den Kontrollen als auch zu den Einzelinjektionen ein signifikanter Effekt (Tabelle 15; $p<0,000$).

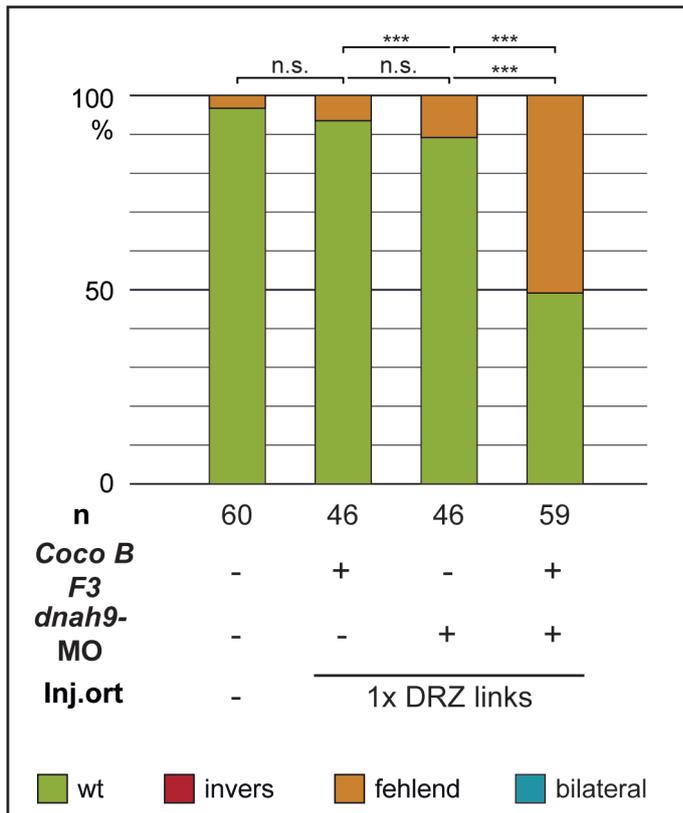


Abb. 23 Epistatische Wirkung eines Flüssigkeitsstrom-Verlusts in Kombination mit *Coco B F2* Protektor-RNA.

Es wurde sowohl von *dnah9*-MO als auch von *B F2* eine suboptimale Dosis in die DRZ von 4/ 8-Zellstadien injiziert. Die Analyse auf die LR-Achse fand durch *Xnr1* im SPM statt. Beides allein injiziert resultierte in einer überwiegend wild-typischen, linken (grün) Expression. Die Koinjektion führte zu einer fehlender Expression.

Pitx2c-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

| Konstrukt | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert |
|----------------------------|---------|-------------------|----|--------------|-------------|--------------|----------------|------------------------------|
| Kontrolle | | | 60 | 96,7 | 0 | 3,3 | 0 | - |
| <i>Coco B F2</i> | li | 80 pg | 46 | 93,5 | 0 | 6,5 | 0 | 0,976 (zur Ko) |
| <i>dnah9</i> -MO | li | 1,5 pmol | 46 | 89,1 | 0 | 10,9 | 0 | 0,44166 (zur Ko) |
| <i>Coco B F2 dnah9</i> -MO | li | 80 pg 1,5 pmol | 59 | 49,2 | 0 | 50,8 | 0 | Je <0,000 (zur Ko, MO & RNA) |

Tabelle 15 *Coco B F2* Protektor-RNA und Verlust der Strömung wirken epistatisch.

Konstrukt – injiziertes Molekül; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler *Xnr1*-Expression im SPM

Diese Experimente zeigten, dass durch den partiellen Verlust des Flüssigkeitsstroms die *Coco*-Regulation durch miRNAs teilweise aufgehoben wurde. Durch den Schutz der *Coco* 3'-UTR vor miRNAs wurde diese Regulation zusätzlich reduziert.

Zusammenfassen konnten diese Experimente nachweisen, dass miRNAs die *Coco* mRNA Flow-abhängig regulieren.

5. Regulation der *Coco*-reprimierenden miRNA(s) durch den Flüssigkeitsstrom

Die bisherigen Experimente zeigten, dass miRNAs *Coco* Flow-abhängig regulieren. Unklar bleibt, wie der Flüssigkeitsstrom die *Coco*-Repression aktiviert. Im „Flow-Sensor“-Modell spielt der Ca^{2+} -Kanal PC2 eine zentrale Rolle (Bisgrove et al., 2003). Er führt zusammen mit dem Flow-Sensor *pkd111* zu einem links-asymmetrischen, intrazellulären Calcium-Anstieg. Das Calciumsignal breitet sich dabei auch über die sensorischen Zellen weiter Richtung Seitenplattenmesoderm aus (McGrath et al., 2003; Takao et al., 2013). Dieses Szenario sollte bei Amphibien konserviert sein (Blum et al., 2014). Deshalb wurden in den nächsten Experimente zwei PC2-interagierende Moleküle, Polyductin und Bic-C, genauer auf eine mögliche Funktion im Zusammenhang mit miRNA-abhängiger *Coco*-Repression analysiert.

5.1 Polyductin

Expressionsanalysen für *pkd111* und für *pkd1*, das als Sensorprotein in der Niere fungiert, zeigten keine eindeutigen mRNA-Signale in den GRP-Zellen (Kozlova, 2012), weshalb ein dritter möglicher Kandidat untersucht werden sollte.

Polyductin, das von *pkdh1* kodiert wird, ist ein wenig charakterisierter Interaktionspartner von PC2 in Cllien der Niere (Ward, 2003; Wu et al., 2006; Zhang et al., 2004), der auf Grund seiner PC1-ähnlichen Struktur ebenfalls als Flow-Sensor wirken könnte (Ward, 2003). *pkhd1* ist darüberhinaus interessant, weil es in Leberzellen für die Induktion von miR-15a verantwortlich gemacht wird (Chu et al., 2008; Lee et al., 2008). Und damit für eine der Flow-abhängigen, *Coco*-regulierenden miRNAs (vgl. III. Ergebnisse 4.1). Im Frosch-System wurde Polyductin bislang nicht bezüglich seiner Wirkung auf die LR-Achse beschrieben.

5.1.1 Die Expression von *pkhd1* mRNA während der *Xenopus*-Entwicklung

Im ersten Schritt wurde die mRNA Expression von *pkhd1* untersucht. Hierfür wurde ein 902 bp langes Fragment des *X. laevis* Gens kloniert, basierend auf einer in der Datenbank vorhandenen *X. tropicalis* Sequenz (XM_002933603).

Maternale Transkripte ließen sich in 4-Zellstadien nachweisen (Abb. 24 A), wobei

die Signale auf den animalen Bereich der vier Blastomeren konzentriert waren (Abb. 24 A'). Während der Gastrulation wurden die *pkhd1*-Signale schwächer. Transkripte ließen sich nun in tiefen mesodermalen Gewebeschichten der Randzone und in animalen, ektodermalen Zellen detektieren (Abb. 24 B, B'). In Neurulastadien (St. 17) fand sich die *pkhd1* mRNA in den Somiten (Abb. 24 C, C'). In histologischen Schnitten konnte auch eine deutliche Expression in den somitischen GRP-Zellen beobachtet werden (Abb. 24 C'). Die Spezifität der Färbung wurde mit einer sinn-Sonde nachgewiesen, die keine Signale ergab (Abb. 24 D). Die somitischen Signale verloren sich im Laufe der weiteren Entwicklung. Frühe Kaulquappenstadien (St. 28) wiesen nur noch *pkhd1* Expression im Bereich der *Chorda dorsalis* und im Kopfbereich auf (Abb. 24 E).

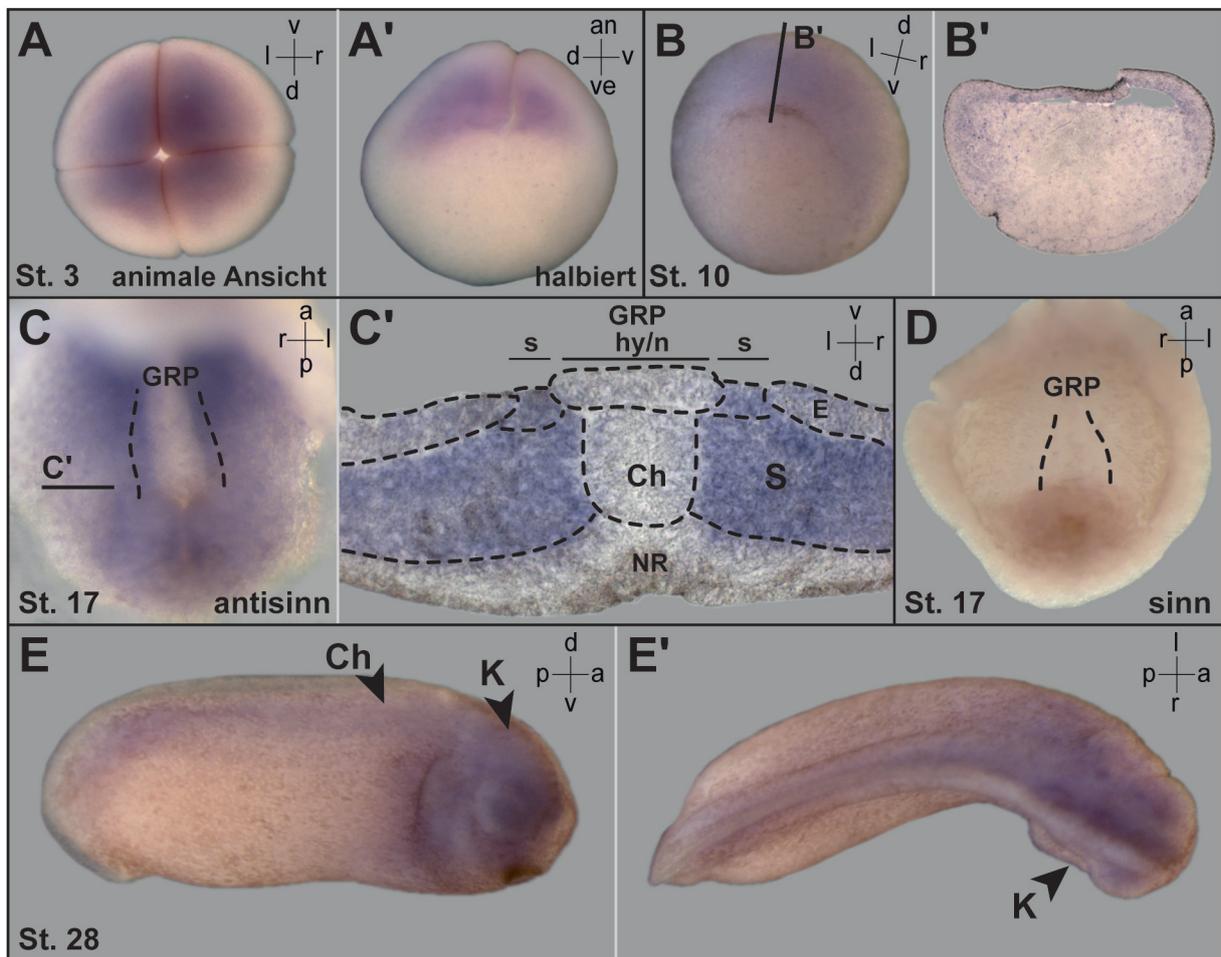


Abb. 24 Expressionsanalyse von *pkhd1*.

(A, A') Maternale *pkhd1* mRNA konnte im animalen Pol von 4-Zellstadien detektiert werden. (B, B') Während der Gastrulation fanden sich Transkripte im Mesoderm und in der ektodermalen Kappe. (C) Die mesodermale Expression konnte auch noch in Neurulastadien nachgewiesen werden. (C') Sowohl die Somiten (S) als auch die somitischen GRP-Zellen (s – somitisch) zeigten Färbung, die restlichen GRP-Zellen waren dagegen negativ (hy – hypochordal; n – notochordal). (D) Die sinn-Sonden Kontrolle zeigte keinerlei Färbung. (E, E') In Kaulquappenstadien beschränkte sich die Expression auf die *Chorda dorsalis* (Ch) und den Kopf. E – Endoderm; NR – Neuralrohr

5.1.2 Funktionsverlust von *pkhd1* resultiert in LR-Achsen-Defekten

Die Lokalisation von *pkhd1*-Transkripten in den somitischen GRP-Zellen von Neurulaembryonen deutet auf eine ciliäre und/ oder sensorische Funktion hin. Dies wurde mit *pkhd1*-Funktionsverlust Experimenten analysiert. Der Knockdown wurde mit einem MO durchgeführt, das den Translationsstart blockiert. Als LR-Marker dienten *Pitx2c* und *Coco*. Nach Injektion von *pkhd1*-MO in die Vorläuferzellen der linken *Coco*-exprimierenden GRP-Zellen fehlte *Pitx2c* konzentrationsabhängig in ca. 25-45% der Embryonen im linken SPM (Abb. 25 und Tabelle 16). Ein rechtsseitiger Verlust von *pkhd1* hatte keinerlei Auswirkungen auf die *Pitx2c*-Expression (Abb. 25).

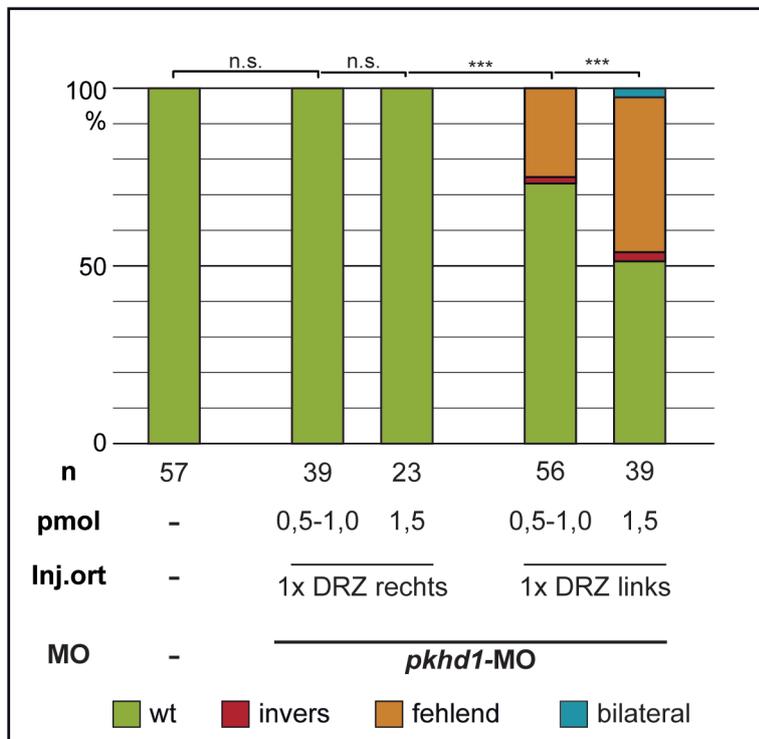


Abb. 25 *pkhd1*-MO resultiert in LR-Achsen-Defekten.

Der Verlust von *pkhd1* wurde bei 4- bzw. 8-Zellstadien in die Region der späteren GRP durchgeführt. Analysiert wurde die LR-Achsen-Entwicklung durch die Expression von *Pitx2c* im SPM. Injektionen in die linke Blastomere führten konzentrationsabhängig dazu, dass *Pitx2c*-Expression fehlte. Bei rechtsseitiger Injektion ergab sich kein Effekt auf *Pitx2c*.

Pitx2c-Expüression: orange – keine Expression; grün – wildtypisch (links); rot – invers (rechts); blau – bilateral

| MO | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|---------|----------|----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 57 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | - |
| <i>pkhd1</i> -MO | re | 0,5 pmol | 39 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | 0,78948 |
| <i>pkhd1</i> -MO | re | 1,5 pmol | 23 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | 0,51415 |
| <i>pkhd1</i> -MO | li | 0,5 pmol | 56 | 73,2 | 1,8 | 25,0 | 0 | 0,00012 |
| <i>pkhd1</i> -MO | li | 1,5 pmol | 39 | 51,3 | 2,6 | 43,6 | 2,6 | <0,000 |

Tabelle 16 *pkhd1*-Funktionsverlust verhindert *Pitx2c*-Expression im linken SPM.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker/ inverse/ fehlende/ bilaterale Expression von *Pitx2c*

Entsprechend wurde auch die *Coco*-Expression in späten Neurulastadien (St. 20) nur bei linksseitiger, nicht aber bei rechtsseitiger Injektion verändert (Abb. 26 C). Linksseitig injizierte Embryonen wiesen keine Flow-abhängige Repression der *Coco* mRNA auf (Abb. 26 B, C). Mit 40% überwog der Anteil an Individuen, welche eine bilaterale-symmetrische Expression aufwies (Abb. 26 C und Tabelle 17).

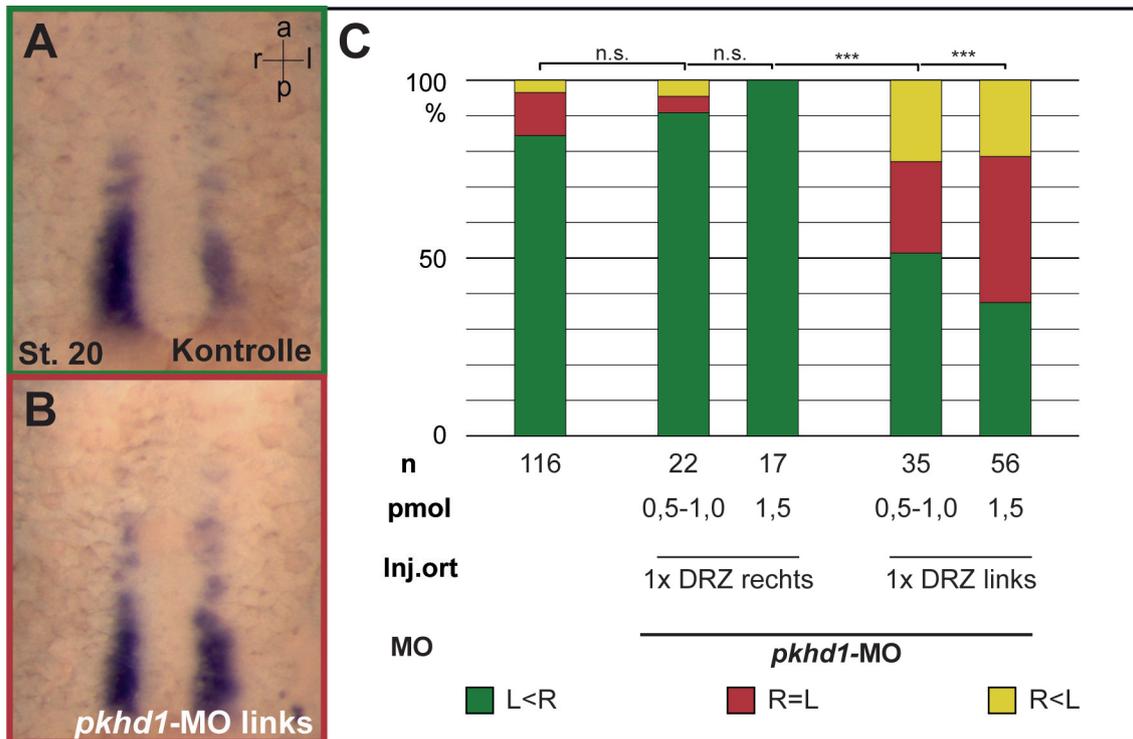


Abb. 26 *Coco* wird durch *pkhd1*-Verlust stabilisiert.

pkhd1-MO wurde in 4/ 8-Zellstadien in die dorsale Randzone injiziert. Die anschließende *Coco* Analyse ergab, dass es konzentrationsabhängig auf der linken Seite stabilisiert wurde (B, C). Rechtsseitig war kein Effekt zu detektieren (C).

(C) grün – L<R; rot – R=L; gelb – R<L

| MO | Inj.ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|---------|----------|-----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 116 | 84,5 | 12,1 | 3,4 | - |
| <i>pkhd1</i> -MO | re | 0,5 pmol | 22 | 90,9 | 4,5 | 4,5 | 0,43244 |
| <i>pkhd1</i> -MO | re | 1,5 pmol | 17 | 100,0 | 0 | 0 | 0,25963 |
| <i>pkhd1</i> -MO | li | 0,5 pmol | 35 | 51,4 | 25,7 | 22,9 | <0,000 |
| <i>pkhd1</i> -MO | li | 1,5 pmol | 56 | 37,5 | 41,1 | 21,4 | <0,000 |

Tabelle 17 Verlust der linksseitigen *Coco*-Repression durch *pkhd1*-Knockdown.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

5.1.3 Polyductin-Funktion bei der Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms

Allerdings ließen sich die vorrausgegangenen Daten auch durch eine Wirkung von Polyductin auf den Flüssigkeitsstrom selbst erklären. Dies wurde z.B. auch beim *Pkd2*-Knockdown beobachtet (Vick, 2009). Die Ursache hierfür ist eine Funktion von PC2 bei der Spezifizierung des SM (*Foxj1* reduziert), die in Morphanten zu gestörter Ciliogenese sowie Morphologie der GRP führt. Um sicher zu gehen, dass die GRP-Entwicklung nicht auch durch den *pkhd1*-Knockdown beeinflusst wird, erfolgte eine detaillierte Analyse der SM-Spezifikation (*Foxj1*-Expression) sowie der Ciliogenese (*Tektin2*) und Morphologie (IF) der GRP.

Zunächst wurde die *Foxj1*-Expression in gastrulierenden Embryonen nach *pkhd1*-MO Injektion untersucht (Abb. 27 A, B). Diese war jeweils auf der injizierten Seite stark verringert (Abb. 27 B). Dieser Befund korrelierte mit einer reduzierten Expression des Cilienmarkers *Tektin2* in der GRP. Die MO-injizierten GRP-Hälften wiesen deutlich reduzierte *Tektin2*-Signale im Vergleich zur unbehandelten Seite auf (Abb. 27 D). Dieser Befund konnte wiederum beim Ciliennachweis durch IF-Analyse von acetyliertem α -Tubulin bestätigt werden (Abb. 27 E, F in rot). Die Zellgrenzen wurden außerdem mit einer Aktinfärbung dargestellt (Phalloidin; Abb. 27 E, F in grün). Cilien konnten nach *pkhd1*-Funktionsverlust nicht mehr detektiert werden (Abb. 27 E', F' und G; Tabelle 18), d.h. der Phänotyp entsprach dem Effekt des *Pkd2*-Knockdowns. Im Unterschied zum *Pkd2*-Funktionsverlust wiesen *pkhd1*-Morphanten jedoch unveränderte Zellmorphologien auf.

| MO | Inj.ort | Konz. | n (E) | n (Z) | P in % | A in % | R in % | L in % | M in % | K in % | p-Wert |
|------------------|---------|----------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Kontrolle | | | 6 | 320 | 84,1 | 3,1 | 2,5 | 6,3 | 0,6 | 6,3 | - |
| <i>pkhd1</i> -MO | 2x DRZ | 1,5 pmol | 5 | 182 | 23,6 | 0 | 0 | 1,6 | 1,1 | 73,6 | <0,001 |

Tabelle 18 Verlust der GRP-Monocilien durch *pkhd1*-Knockdown.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n(E) – Anzahl der Embryonen; n(Z) – Anzahl der ausgewerteten Zellen; P/ A/ R/ L/ M/ K in % - Anteil der posterior (P)/ anterior (A)/ rechts (R)/ links (L)/ mittig (M) lokalisierten oder fehlenden (K – keine) Cilien

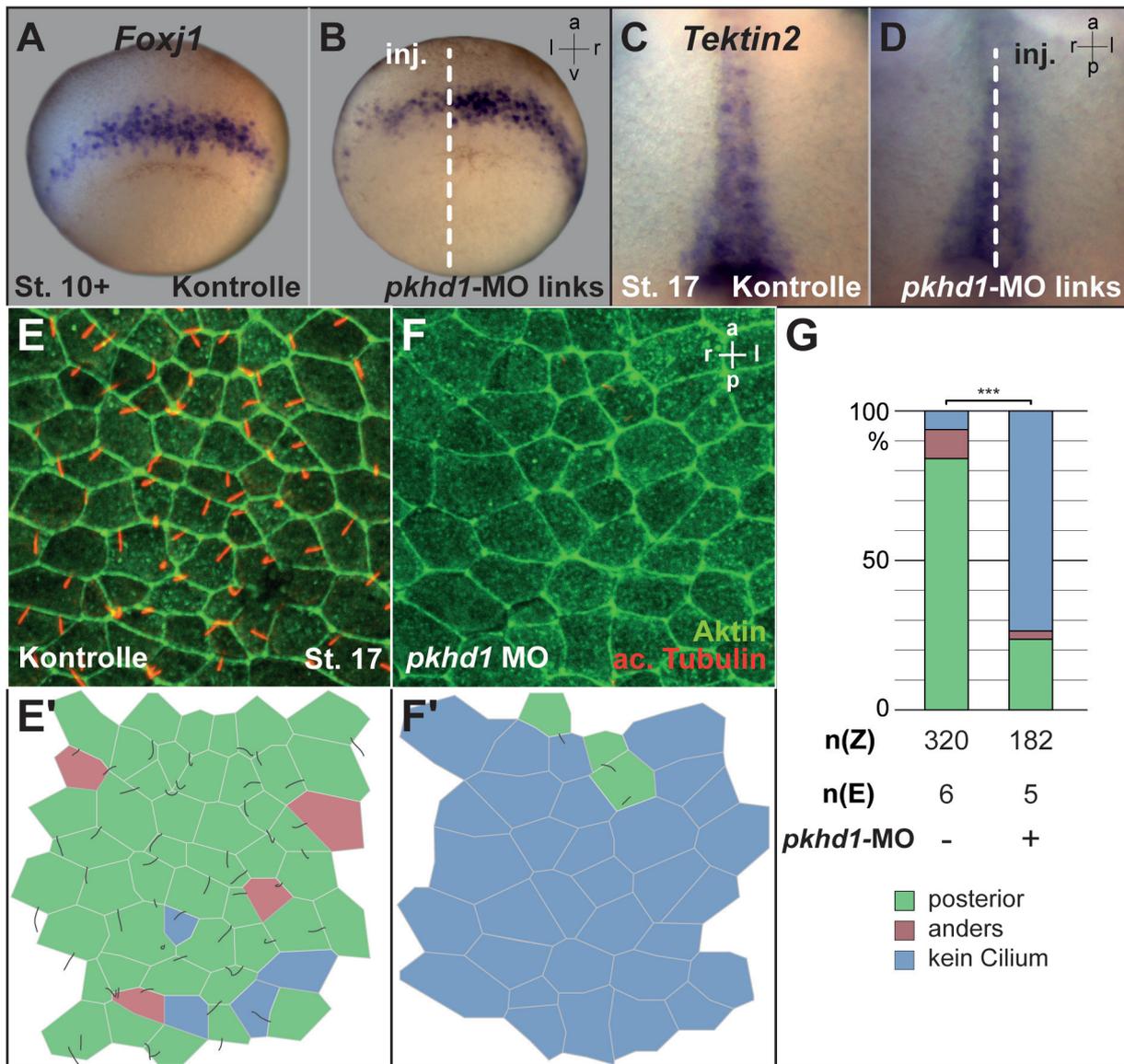


Abb. 27 Verlust von *pkhd1* unterbindet die GRP-Ciliogenese.

Das *pkhd1*-MO wurde unilateral links (*Foxj1*, *Tektin2*) oder bilateral (IF) verabreicht. Ziel war die dorsale Randzone von 4/ 8-Zellembryonen. Im St. 10+ zeigte die *Foxj1*-Expression auf der injizierten Seite eine Repression (**A**, **B**), ebenso *Tektin2* im St. 17 (**C**, **D**). Bei der IF wurden Zellgrenzen durch Aktinfärbung (Phalloidin, grün) und Cilien (acetyliertes α -Tubulin, rot) markiert, um die Polarisierung der GRP-Cilien bestimmen zu können (**F**). (**E**/ **F**) zeigt einen Ausschnitt der mittigen GRP-Zellen. Die Cilien der Kontroll-GRP waren weitestgehend posterior lokalisiert (grün; **G**). Durch *pkhd1*-Verlust waren annähernd keine Cilien mehr zu detektieren (blau; **G**).

Diese Experimente zeigten, dass Polyductin schon während der Ausbildung des SM eine wichtige Funktion einnimmt. Möglicherweise spielt Polyductin aber auch für den Symmetriebruch als sensorischer Kofaktor von PC2 eine Rolle.

5.2 Funktion von Bicaudal C für die *Coco*-Regulation

Ein weiterer Faktor, welcher Aufschluss über die Flow-abhängige Regulation der miRNAs geben könnte, ist das RNA-Bindeprotein Bicaudal C (Bic-C bzw. Bicc1). Es besitzt fünf N-terminale sog. KH-RNA-Bindedomänen (hnRNP K Homology) sowie eine Proteinbindedomäne am C-Terminus („Sterile Alpha Motif“ – SAM; Abb. 29). Bic-C wurde in posttranskriptionell regulatorischen Organellen, den sog. P-Bodies, detektiert (Maisonneuve et al., 2009). Daher ist es nicht überraschend, dass Bic-C mit miRNAs interagiert. Dies kann aktivierend oder inhibierend für ihre Funktion sein (Piazzon et al., 2012; Tran et al., 2010). Analysen von Bic-C im Kontext der LR-Achsen-Spezifizierung zeigten, dass Bic-C für die Polarisierung der GRP-Cilien verantwortlich ist und wie *Xnr1* und *Coco* in den lateralen GRP-Zellen exprimiert wird (Maisonneuve et al., 2009).

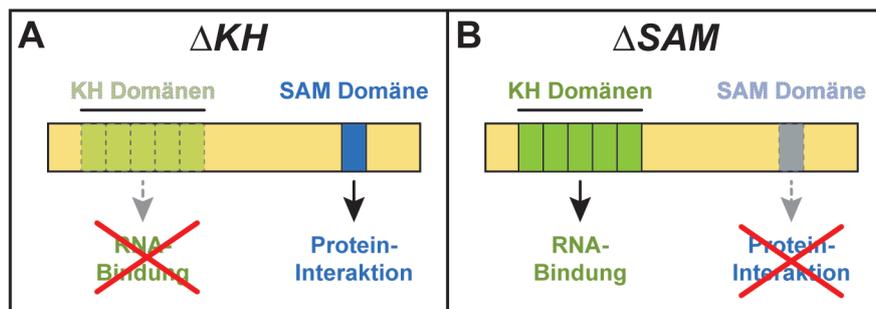


Abb. 28 Aufbau von Bic-C- Δ SAM und Δ KH.

(A) Bic-C- Δ KH besitzt lediglich die Protein-Bindedomäne SAM (blau), die KH-Domänen (grün) sind deletiert. (B) Entsprechend sind bei Bic-C- Δ SAM nur die RNA-Bindedomänen (grün), nicht aber die Protein-Bindedomäne (blau) enthalten. Abbildung verändert nach Wessely et al., 2000.

5.2.1 Die RNA-Bindedomäne von Bic-C ist notwendig für die *Coco*-Regulation

Um den Zusammenhang von Bic-C und *Coco* während des Symmetriebruchs genauer zu untersuchen und herauszufinden, ob für die Wirkung auf *Coco* nur die KH-Domänen oder auch die Protein-Bindedomäne notwendig ist, wurden Deletionskonstrukte verwendet. Zum einen wurde die RNA-Bindedomäne deletiert (Δ KH; Abb. 28 A), in einem zweiten Konstrukt die Protein-Bindedomäne (Δ SAM; Abb. 28 B).

Durch Überexpression dieser Konstrukte konnte gezeigt werden, dass die RNA-Bindedomäne, nicht jedoch die Protein-Bindedomäne, *Coco* linksseitig stabilisiert (Abb. 29 A-D; Tabelle 19; Δ SAM p=0,31517; Δ KH p=0,00808). Ebenso war lediglich Δ SAM in der Lage, die Induktion der Nodal-Kaskade und daher die *Pitx2c*-Expression linksseitig zu verhindern (Abb. 29 E; Tabelle 20; Δ SAM p=0,93486; Δ KH p=0,00013).

Beide Ergebnisse ließen darauf schließen, dass *Coco* durch die RNA-Bindedomäne von Bic-C reguliert wird.

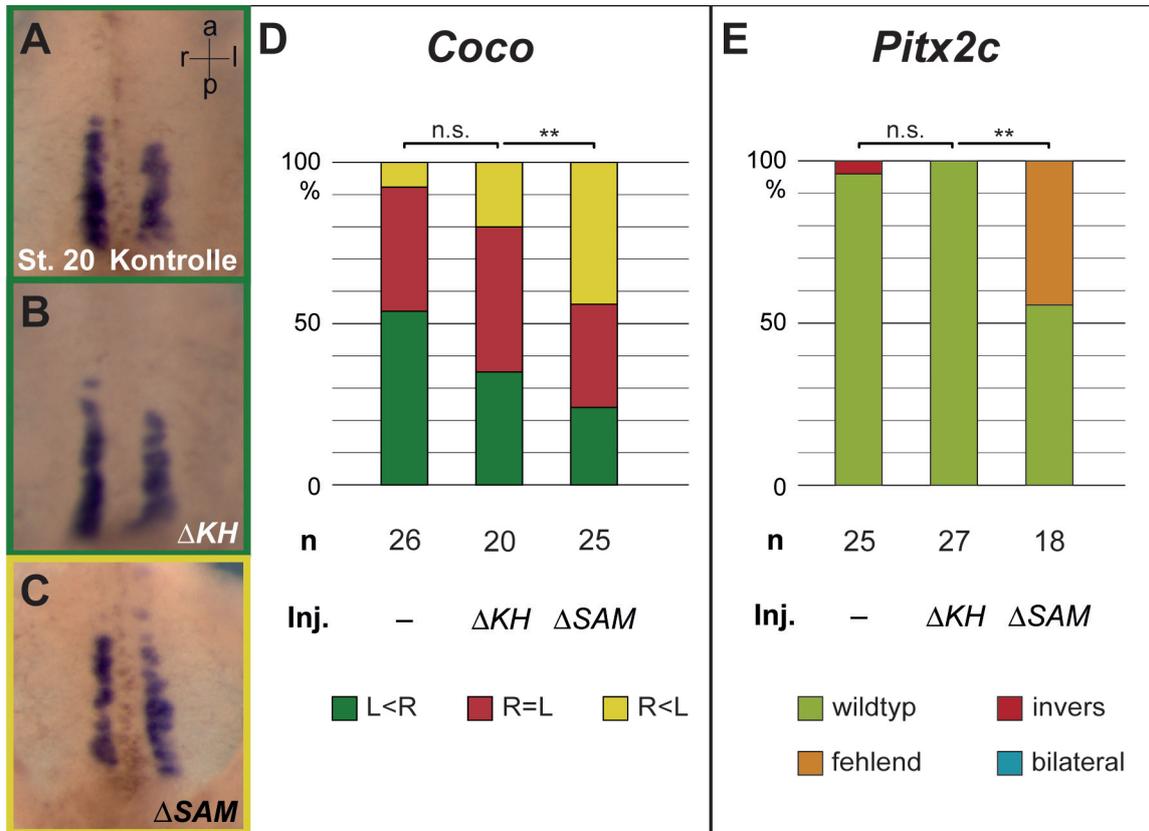


Abb. 29 Bic-C schützt *Coco* durch seine KH-Domänen.

Mit der Injektion von *Bic-C* RNA (ΔKH / ΔSAM) in 4/ 8-Zellstadien wurde der spätere linke, laterale GRP-Bereich beeinflusst. (D, E) Injektionen mit *Bic-C- ΔKH* führten zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle bezüglich *Coco* (A, B, D) und *Pitx2c* (E). Dagegen gab es durch ΔSAM eine größere Anzahl an Embryonen, die eine R<L-Expression von *Coco* aufwiesen (C, D - gelb) oder eine fehlende Expression von *Pitx2c* hatten (E – orange).

(D) *Coco*: grün – L<R; rot – R=L; gelb – R<L; (E) *Pitx2c*: hellgrün – wildtypisch (linkes SPM); rot – invers (rechtes SPM); orange – fehlend (keine Expression); blau – bilateral (linkes und rechtes SPM)

| RNA | Inj.ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|--------------------------------------|---------|--------|----|----------|----------|----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 26 | 53,8 | 38,5 | 7,7 | - |
| <i>Bic-C-ΔKH</i> | li | 400 pg | 20 | 35,0 | 45,0 | 20,0 | 0,31517 |
| <i>Bic-C-ΔSAM</i> | li | 400 pg | 25 | 24,0 | 32,0 | 44,0 | 0,00808 |

Tabelle 19: Verlust der linksseitigen *Coco*-Repression durch Überexpression von *Bic-C- ΔSAM* .

RNA – injizierte RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R<L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R<L *Coco*-Expression

| RNA | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|--------------------------------------|---------|--------|----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 26 | 96,0 | 4,0 | 0 | 0 | - |
| <i>Bic-C-ΔKH</i> | li | 400 pg | 20 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | 0,93486 |
| <i>Bic-C-ΔSAM</i> | li | 400 pg | 25 | 55,6 | 0 | 44,4 | 0 | 0,0013 |

Tabelle 20: Verlust der linksseitigen Nodal-Kaskade durch Überexpression von *Bic-C- ΔSAM* .

RNA – injizierte RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverse/ fehlende/ bilaterale Expression von *Pitx2c*

5.2.2 Regulation von *Coco* durch *Bic-C* ist abhängig von *PC2*

Im nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob und wie *PC2* und *Bic-C* bei der Repression von *Coco* interagieren. Dazu wurden kombinierte Injektionsexperimente durchgeführt mit Konzentrationen, die jede für sich keinen Phänotyp erzeugten. Konkret wurde *Bic-C-ΔSAM* appliziert und dazu *Pkd2* mRNA zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration. Eine linksseitige Injektion mit beiden Faktoren führte zu weniger LR-Achsen-Defekten als die Überexpression von *Bic-C-ΔSAM* allein (Abb. 30; Tabelle 21; ΔSAM $p=0,00029$; $\Delta SAM + Pkd2$ $p=0,02594$). Eine rechtsseitige Injektion beider Faktoren führte dagegen vermehrt zur Inversion bzw. zur bilateralen Expression von *Pitx2c* und daher verstärkt zur nicht-wildtypischen Induktion der Nodal-Kaskade (Abb. 30; Tabelle 21; ΔSAM $p=0,75538$; $\Delta SAM + Pkd2$ $p=0,00017$).

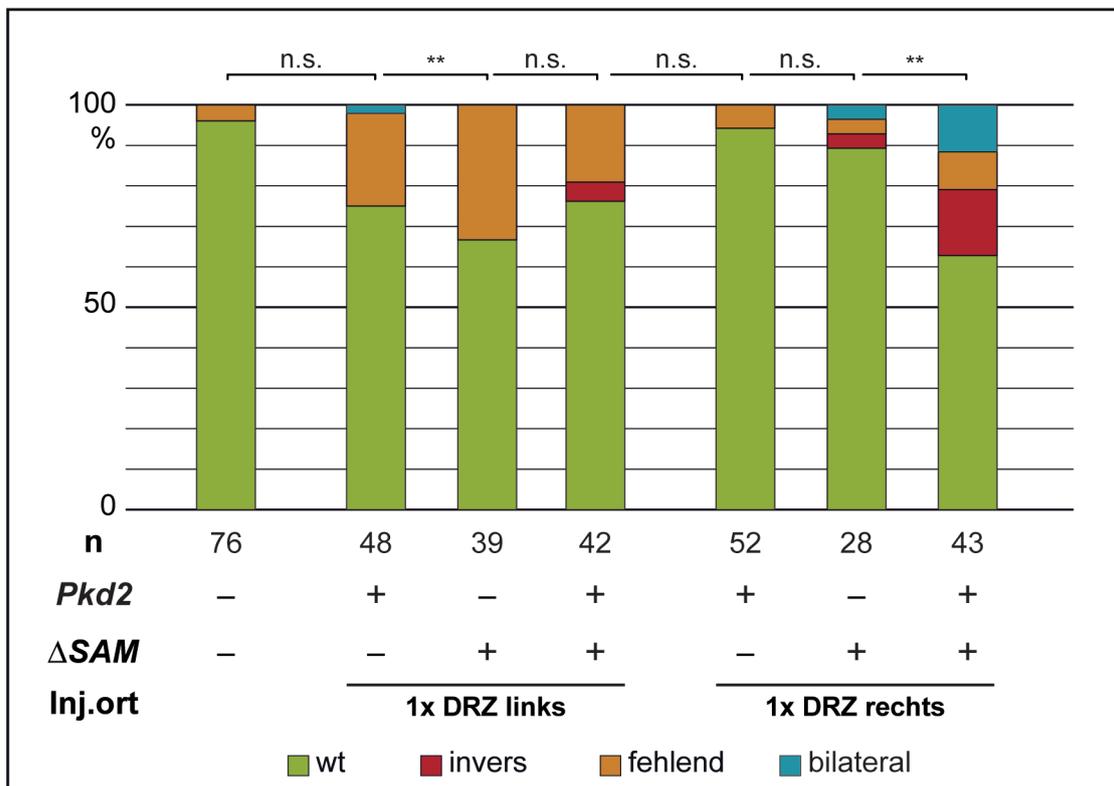


Abb. 30 Überexpression von *Bic-C-ΔSAM* in Kombination mit *Pkd2* führt zur Induktion der Nodal-Kaskade.

Bic-C-ΔSAM +/- *Pkd2* wurden in die linke bzw. rechte DRZ von 4/ 8-Zellstadien injiziert. *Bic-C-ΔSAM* allein, linksseitig injiziert führte zur Inhibition der Nodal-Kaskade. Koinjektion mit *Pkd2* konnte diese partiell wieder herstellen. Rechtsseitige Überexpression von *Bic-C-ΔSAM* resultierte dagegen in keiner Veränderung der *Pitx2c* Expression. Wurde auf dieser Seite zusätzlich *Pkd2* injiziert, wurde *Pitx2c* vermehrt rechtsseitig induziert.

Pitx2c-Expression: orange – fehlend; grün – wildtypisch (links); rot – invers (rechts); blau – bilateral

| RNA | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|-----------------------------|---------|----------------------|----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 76 | 96,1 | 0 | 3,9 | 0 | - |
| <i>Pkd2</i> | li | 400 pg | 48 | 75,0 | 0 | 22,9 | 2,1 | 0,01126 |
| Δ SAM | li | 400-640 pg | 39 | 66,7 | 0 | 33,3 | 0 | 0,00029 |
| <i>Pkd2</i> Δ SAM | li | 400 pg 400-640 pg | 42 | 76,2 | 4,8 | 19,0 | 0 | 0,02594 |
| <i>Pkd2</i> | re | 400 pg | 52 | 94,2 | 0 | 5,8 | 0 | 0,94639 |
| Δ SAM | re | 400-640 pg | 28 | 89,3 | 3,6 | 3,6 | 3,6 | 0,75538 |
| <i>Pkd2</i> Δ SAM | re | 400 pg 400-640 pg | 43 | 62,8 | 16,3 | 9,3 | 11,6 | 0,00017 |

Tabelle 21: Überexpression von *Bic-C- Δ SAM* und *Pkd2* fördert die Induktion der Nodal-Kaskade. RNA – injizierte RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverse/ fehlende/ bilaterale Expression von *Pitx2c*

Die *Coco*-Expression nahm bei einer Koinjektion von *Bic-C- Δ SAM* mit *Pkd2* tendenziell auf der jeweiligen Injektionsseite im Vergleich zur alleinigen *Bic-C*-Überexpression ab (Abb. 31; Tabelle 22; links: Δ SAM p=0,00042; Δ SAM + *Pkd2* p=0,00391; rechts: Δ SAM p=0,05995; Δ SAM + *Pkd2* p=0,42288).

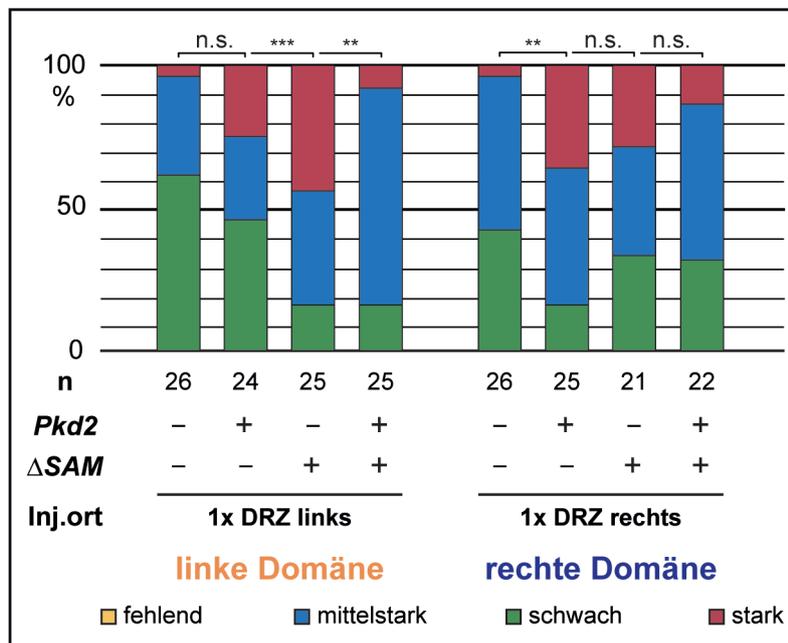


Abb. 31 Koinjektion von *Bic-C- Δ SAM* und *Pkd2* destabilisiert *Coco*.

Bic-C- Δ SAM wurde allein oder in Kombination mit *Pkd2* in die linke bzw. rechte dorsale Blastomere von 4-8 Zellembryonen injiziert. Für die *Coco*-Auswertung wurde die linke (orange) und rechte (dunkelblau) Hälfte der *Coco*-Domäne getrennt voneinander in eine fehlende (gelb), schwache (grün), mittelstarke (blau) und starke (rot) Expression eingeteilt. Sowohl *Bic-C- Δ SAM* als auch *Pkd2* stabilisierten allein injiziert *Coco* auf der Injektionsseite. Die Koinjektion beider RNAs verringerte tendenziell diese Stabilisierung.

| | RNA | Inj.ort | Konz. | n | schwach in % | mittelstark in % | stark in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|-----------------------------|---------|----------------------|----|-----------------|---------------------|---------------|--------------------|
| Linke Domäne | Kontrolle | | | 26 | 61,5 | 34,6 | 3,8 | - |
| | <i>Pkd2</i> | li | 400-640 pg | 24 | 45,8 | 29,2 | 25,0 | 0,09658 |
| | Δ SAM | li | 400 pg | 25 | 16,0 | 40,0 | 44,0 | 0,00042 |
| | <i>Pkd2</i> Δ SAM | li | 400 pg 400-640 pg | 25 | 16,0 | 76,0 | 8,0 | 0,00391 |
| Rechte Domäne | Kontrolle | | | 26 | 42,3 | 53,8 | 3,8 | - |
| | <i>Pkd2</i> | re | 400-640 pg | 25 | 16,0 | 48,0 | 36,0 | 0,00743 |
| | Δ SAM | re | 400 pg | 21 | 33,0 | 38,1 | 28,6 | 0,05995 |
| | <i>Pkd2</i> Δ SAM | re | 400 pg 400-640 pg | 22 | 31,8 | 54,5 | 13,6 | 0,42288 |

Tabelle 22: Überexpression von *Bic-C- Δ SAM* und *Pkd2* fördert die Repression von *Coco*.

RNA – injizierte RNA; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; schwach, mittelstark bzw. stark in % - Anteil der Embryonen mit schwacher, mittelstarker und starker Expression der linken bzw. rechten *Coco*-Domäne

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die stabilisierende Wirkung von *Bic-C* auf *Coco* durch die Aktivität von PC2 abnimmt. Damit könnte Calcium dafür verantwortlich sein, den Bic-C-vermittelten Schutz der *Coco*-mRNA vor miRNA-gesteuerter Repression aufzuheben.

6. Differenzielle Rolle von Dicer und Dgcr8 bei der LR-Achsen-Differenzierung

Obgleich die bisher dargestellten funktionellen Experimente eindeutig zeigten, dass Dicer und miRNAs für die LR-Achsen-Entwicklung notwendig sind, war die Wirkung auf die Nodal-Kaskade nach *Dicer*-Knockdown weniger stark ausgeprägt als erwartet, auch wenn eine deutliche Stabilisierung von *Coco* mRNA beobachtet wurde. Ein Gen-Knockdown von *Coco* führt generell sehr effizient zu eindeutig vorhersagbaren Veränderungen von LR-Achsen-Markergenexpression (Schweickert et al., 2010). Um die Spezifität der miRNA Befunde zu verifizieren, wurden Funktionsverlustexperimente von *Dgcr8* durchgeführt. *Dgcr8* hilft als Kofaktor die pri-miRNA zur pre-miRNA umzusetzen und ist damit hierarchisch Dicer vorgeschaltet (Han et al., 2006).

6.1 *Dgcr8* mRNA Expression im superfiziellen Mesoderm und in der GRP

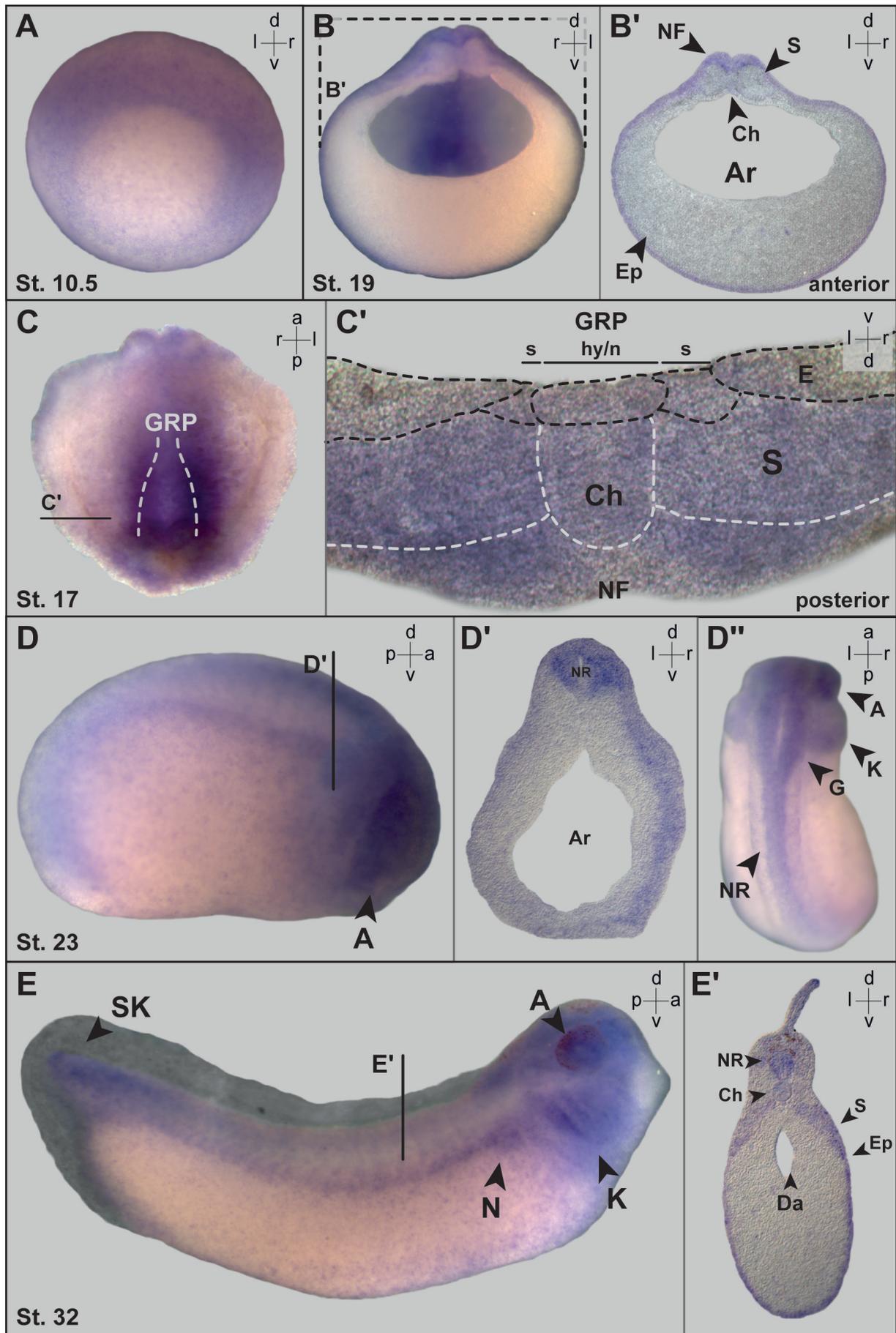
Zunächst sollte auch die Expressionsanalyse von *Dgcr8* nachweisen, dass es wie *Dicer*, eine Koexpression mit *Coco* aufweist. *Dgcr8* mRNA Expression wurde in unterschiedlichen Embryonalstadien untersucht.

Eine animale Lokalisation von *Dgcr8* mRNA in 4-Zellembryonen wurde beobachtet und ließ daher, wie bei *Dicer*, auf eine maternale Expression schließen. Während der Gastrulation fanden sich in allen ektodermalen Zellen *Dgcr8*-Signale. Die Färbung war dabei auf der dorsalen Seite, im Bereich des superfiziellen Mesoderms, etwas stärker (Abb. 32 A). Auch in Neurula-Stadien wurde *Dgcr8*-Expression vorwiegend in ektodermalen Strukturen gefunden (Abb. 32 B, C). Im anterioren Bereich des Embryos waren die Signale auf Epidermis und Neuralfalten konzentriert (Abb. 32 B). Am stärksten war die Expression in den Neuralfalten des Kopfes (nicht gezeigt). In Somiten und *Chorda dorsalis* konnte dagegen nur wenig bis keine mRNA detektiert werden (Abb. 32 B'). Am posterioren Ende von Neurula-Embryonen konnte dagegen starke *Dgcr8*-Expression in den Somiten und der *Chorda dorsalis* nachgewiesen werden, nicht aber in den Neuralfalten (Abb. 32 C). Durch histologische Schnitte ließ sich zeigen, dass sich die Färbung bis in die GRP-Zellen hochzog (Abb. 32 C'). Im Vergleich zu *Dicer* war dies nicht nur auf die somitischen GRP-Zellen beschränkt. In der GRP war die Färbung generell

etwas schwächer als in den tieferen Geweben (Abb. 32 C'). Endodermal konnte keine *Dgcr8* mRNA detektiert werden (Abb. 32 B, C). In frühen Kaulquappenstadien (St. 23 und 34) fand sich *Dgcr8* mRNA in Epidermis, Neuralrohr, Gehirn, Augenanlagen und Somiten (Abb. 32 D, E). Schwache Expression konnte in der *Chorda dorsalis* beobachtet werden. Ebenso zeigten die Schwanzknospe, Kiemenbögen und Nephrostome deutliche Expression von *Dgcr8* (Abb. 32 E).

Abb. 32 Expressionsmuster von *Dgcr8* mRNA.

Die zeitliche und räumliche Verteilung von *Dgcr8* mRNA wurde in Embryonen des St. 10.5; 17; 19 und 23 analysiert. **(A)** In der Gastrula konnte Färbung im Ektoderm und Mesoderm nachgewiesen werden. **(B)** Transversale Vibratomschnitte von St. 17 zeigten, dass im anterioren Bereich des Embryos ektodermale Strukturen wie die Haut (Epidermis - Ep) und Neuralfalten (NF) positiv für *Dgcr8* waren. *Chorda dorsalis* (Ch) und die Somiten (S) waren schwach gefärbt. **(C)** Richtung posterior waren *Chorda dorsalis* (Ch) und Somiten (S) stark und Epidermis (Ep), Neuralfalten (NF) und GRP in geringem Umfang angefärbt. **(D - D'')** Im St. 23 waren weiterhin Neuralrohr (NR), Epidermis (Ep) und die Augen (A) sowie das Gehirn (G) und Kiemenbögen (K) positiv für *Dgcr8*. **(E - E')** Diese Färbung war auch noch im St. 32 erkennbar. Zusätzlich war das Nephrostom (N) sowie die Somiten (S) und die *Chorda dorsalis* (Ch) angefärbt.



6.2 Funktionsverlust von *Dgcr8* und *Dicer* führt zu differenziellen Effekten

Funktionsverlust von *Dicer* resultierte, wie oben gezeigt, in einer Unterdrückung der *Pitx2c* Expression im linken SPM. Dies wurde durch den Verlust von *Coco*-Degradation in Abwesenheit maturer miRNAs verursacht (Abb. 12, 13). Der Befund sollte zusätzlich durch der Deaktivierung des vorgeschalteten Syntheseproteins *Dgcr8* bestätigt werden. Die Analyse umfasste den LR-Achsen-Marker *Pitx2c* und *Coco* selbst.

Wie bei den *Dicer*-Experimenten führte ein linksseitiger *Dgcr8* Knockdown zu einem signifikanten Verlust der linken *Pitx2c*-Transkription (Abb. 33 B, C; Tabelle 23; $p < 0,000$). Allerdings konnte die linke *Pitx2c*-Expression auch mit einer *Dgcr8*-MO-Behandlung auf der rechten Seite in signifikantem Ausmaß verhindert werden (Abb. 33 C; Tabelle 23; $p < 0,000$).

| MO | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|---------|-----------|-----|--------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | | | 105 | 100,0 | 0 | 0 | 0 | - |
| <i>Dgcr8</i> -MO | re | 0,75 pmol | 106 | 82,1 | 0 | 15,1 | 2,8 | <0,000 |
| <i>Dgcr8</i> -MO | li | 0,75 pmol | 166 | 32,5 | 1,2 | 65,7 | 0,6 | <0,000 |

Tabelle 23 Auswirkung des *Dgcr8*-MO auf *Pitx2c*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker) Expression von *Pitx2c*

Die Analyse der *Coco* mRNA nach einem Verlust von *Dgcr8* erbrachte ein unerwartetes Ergebnis. Sowohl links- als auch rechtsseitiger *Dgcr8*-Funktionsverlust verringerte die somitische GRP-Expression von *Coco* auf der jeweils behandelten Seite deutlich (Abb. 33 D-F; Tabelle 24 links $p < 0,000$; rechts $p = 0,00128$). Manipulierte Embryonen zeigten häufig nur noch eine sehr schwache bzw. keine *Coco*-Expression (Abb. 33 E). Um diese Wirkung besser beschreiben zu können, wurden bei der Auswertung für die *Dgcr8*-Manipulationen Embryonen mit sehr geringer *Coco*-mRNA-Konzentration als eigene Gruppe erfasst (Abb. 33 F).

| MO | Inj.ort | Konz. | n | R>>L in % | L<R in % | R=L in % | R<L in % | L>>R in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|---------|-----------|----|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 49 | 0 | 77,6 | 12,2 | 10,2 | 0 | - |
| <i>Dgcr8</i> -MO | re | 0,75 pmol | 45 | 0 | 37,8 | 13,3 | 35,6 | 13,3 | 0,00128 |
| <i>Dgcr8</i> -MO | li | 0,75 pmol | 65 | 33,8 | 47,7 | 9,2 | 7,7 | 1,5 | <0,000 |

Tabelle 24 Auswirkung des *Dgcr8*-MO auf *Coco*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; R>>L, L<R, R=L, R<L und L>>R in % - Anteil der Embryonen der jeweiligen *Coco*-Expression

Ein Überexpressions-Konstrukt von *Dgcr8* zeigte, dass der beobachtete Effekt spezifisch war (Abb. 33 G - J). Injektion dieses Konstrukts verstärkte die *Coco*-Färbung auf der behandelten Seite deutlich (Abb. 33 H, J; Tabelle 25; links $p < 0,000$; rechts $p = 0,01178$).

| MO | Inj.ort | Konz. | n | R>>L in % | L<R in % | R=L in % | R<L in % | L>>R in % | p-Wert (zur Ko) |
|------------------|---------|-----------|----|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 49 | 0 | 77,6 | 12,2 | 10,2 | 0 | - |
| <i>Dgcr8</i> -MO | re | 0,75 pmol | 45 | 0 | 37,8 | 13,3 | 35,6 | 13,3 | 0,00128 |
| <i>Dgcr8</i> -MO | li | 0,75 pmol | 65 | 33,8 | 47,7 | 9,2 | 7,7 | 1,5 | <0,000 |

Tabelle 25 Auswirkung eines *Dgcr8*-Funktionsgewinn auf *Coco*-Expression.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; R>>L, L<R, R=L, R<L und L>>R in % - Anteil der Embryonen der jeweiligen *Coco*-Expression

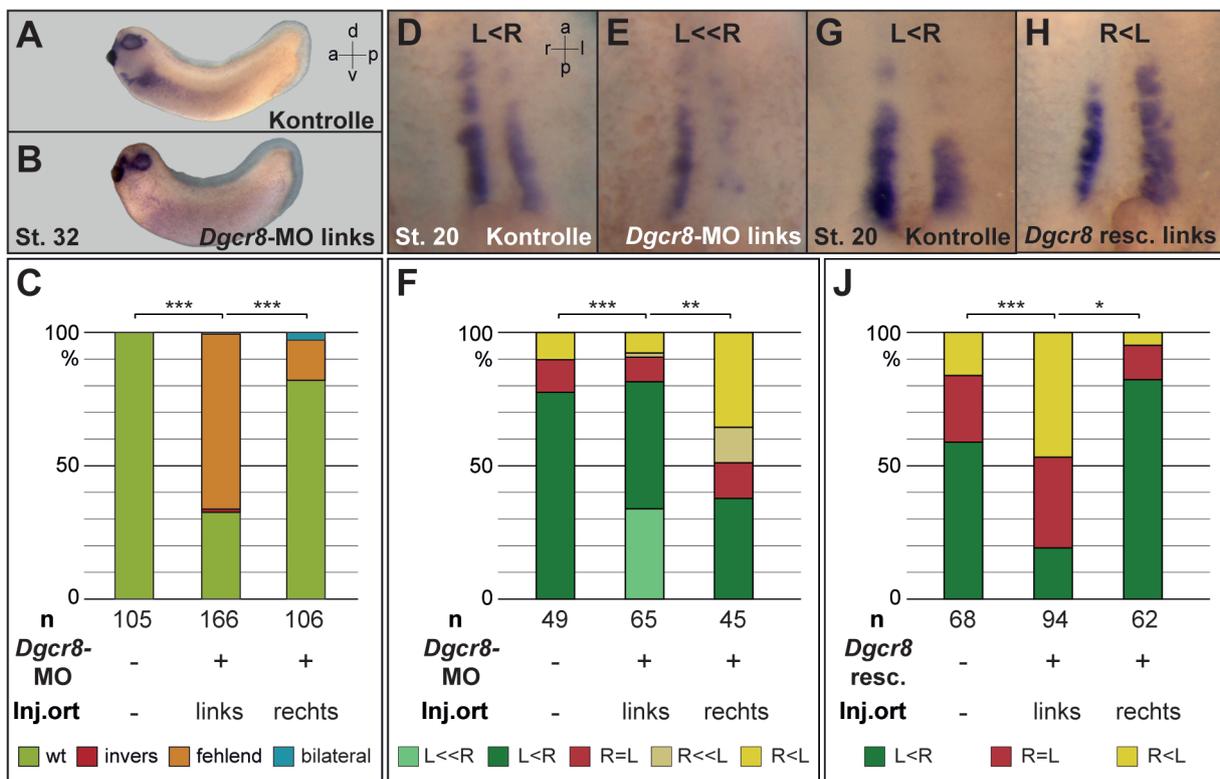


Abb. 33 *Dgcr8* ist für die Regulation von *Coco* notwendig.

Dgcr8-MO wurde in die linke bzw. rechte Blastomere auf der dorsalen Seite injiziert. Im St. 20 bzw. 32 wurden *Coco* bzw. *Pitx2c* analysiert. Für die Analyse von *Coco* wurde zusätzlich ein Funktionsgewinn von *Dgcr8* entsprechend durchgeführt. Die *Coco*-Domäne der Neurula-Rückenstücke wurde außer in L<R, R<L und R=L auch in L<<R (E) für eine sehr geringe linke und R<<L für eine sehr geringe rechte Expression eingeteilt (F). (B) Das MO führte zu einem effektiven Verlust von *Pitx2c* im SPM (orange in C). (E, F) Ebenso wird die *Coco*-Domäne auf der Injektionsseite stark reduziert. (H, J) Entsprechend dazu führt eine Überexpression von *Dgcr8* zu einer höheren Konzentration an *Coco* mRNA. *Coco*-Expression: grün – L<R; rot – L=R; gelb – R<L; *Pitx2c*-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

6.3 Analyse der GRP nach *Dgcr8*-Funktionsverlust

Dgcr8 könnte als übergeordneter Faktor von *Dicer*, z.B. schon für die Morphogenese der GRP verantwortlich sein. Daher wurde die Entstehung der GRP nach *Dgcr8*-Verlust genauer unter die Lupe genommen und die Ausbildung der somitischen GRP-Zellen sowie die Ciliogenese genauer analysiert.

6.3.1 Unveränderte somitische GRP-Zellen in *Dgcr8*-Morphanten

Für die Analyse der somitischen GRP-Zellen wurde *myoD* und *Bic-C* untersucht. Beide Marker bestätigten, dass die somitischen GRP-Zellen auch nach einer Repression der *Dgcr8*-Translation noch vorhanden waren (Abb. 34). Dies wurde sowohl im Vergleich zu den Kontrollen als auch durch den Vergleich der injizierten mit der uninjizierten Kontrollseite beobachtet (Abb. 34 B, D).

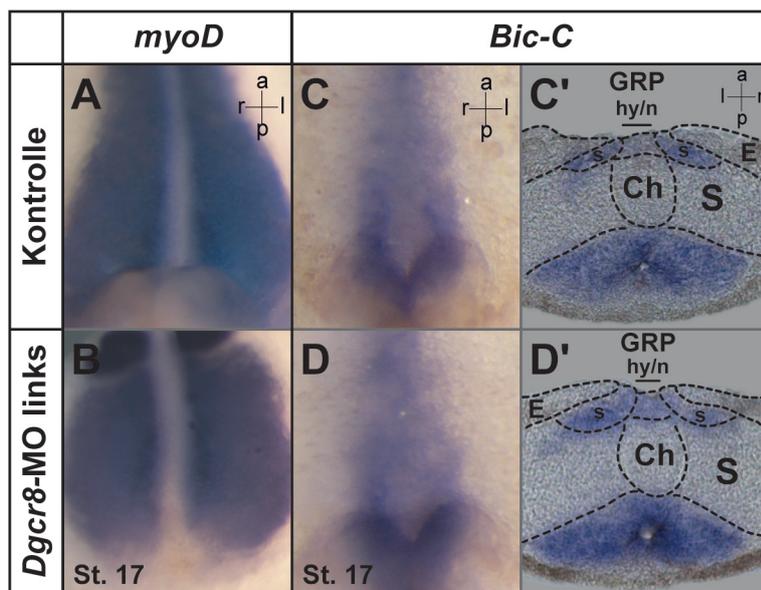


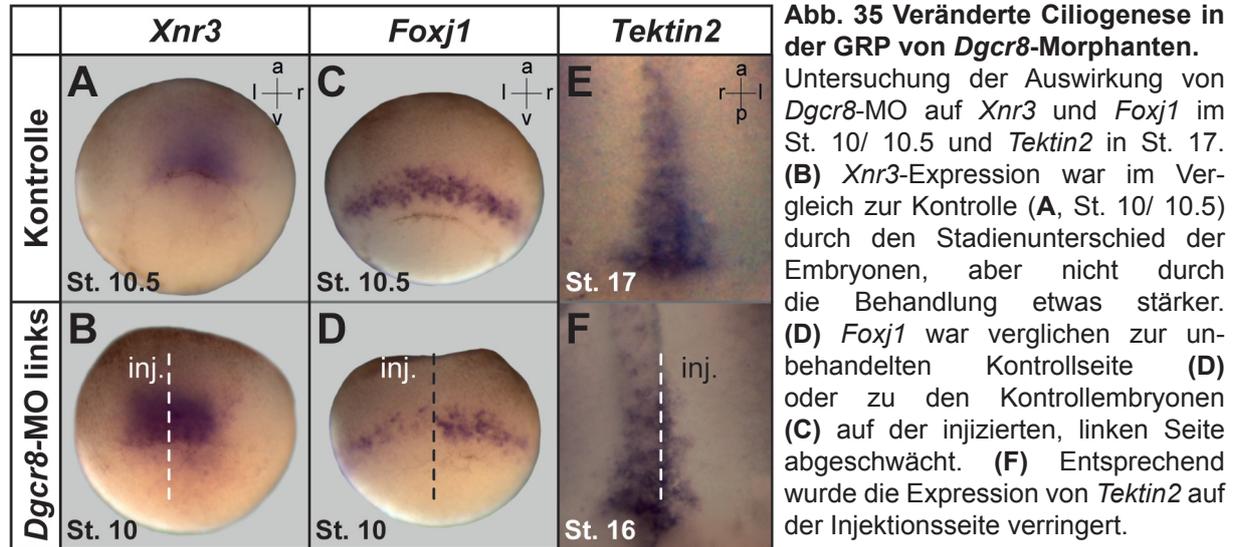
Abb. 34 Morphologie der somitischen GRP-Zellen wird durch *Dgcr8*-MO nicht verändert. Nach Injektion des *Dgcr8*-MOs wurden *myoD* und *BicC* analysiert. Die *myoD*- (A, B) wie auch *Bic-C*- (C, D) Expression wurde nicht verändert. Für *Bic-C* wurde dies durch Vibratomechnitte verdeutlicht (C', D'). Die Färbung war immer noch nachzuweisen und mit den Kontrollen vergleichbar.

6.3.2 Die Ciliogenese der GRP ist *Dgcr8*-abhängig

Eine Rolle von miRNAs bei der Ciliogenese wurde schon in anderen Zusammenhängen nachgewiesen, weshalb diese nach *Dgcr8*-Verlust untersucht werden sollte (Cao et al., 2012; Marcet et al., 2011; Pierce et al., 2008; Song et al., 2014). Neben der Ciliogenese wurde zusätzlich die Spezifikation des superfiziellen Mesoderms analysiert. Als SM-Marker dienten *Xnr3* und *Foxj1* während Blastula- und Gastrulastadien. Die GRP-Ciliogenese wurde an Hand der *Tektin2*-Transkription überprüft. Während die *Xnr3* Expression im Vergleich zur Kontrolle unverändert erschien

(Abb. 35 A, B), führte der *Dgcr8* Funktionsverlust zu einer starken Reduktion der *Foxj1* Signale (Abb. 35 C, D). Dementsprechend war auch das *Foxj1*-Zielgen *Tektin2* nur noch in geringem Maß auf der injizierten Seite nachzuweisen (Abb. 35 E, F).

Dieser Befund wies somit eine wichtige Rolle von miRNAs für die Entwicklung der GRP-Cilien nach und zeigte außerdem, dass dieser Prozess *Dgcr8*-abhängig ist.



6.4 *Dgcr8*- und *Dicer*-Verlustversuche wirken antagonistisch

In den bisher präsentierten Experimenten führte *Dgcr8*-MO im Vergleich zu *Dicer*-MO zu konträren Ergebnissen. Im Folgenden sollte untersucht werden, in welcher Hierarchie die von *Dicer* und *Dgcr8* regulierten Prozesse zueinander stehen. Ob sie also zeitlich nacheinander ablaufen oder dieselben Mechanismen auf unterschiedlichen Stufen der miRNA Synthese beeinflussen.

6.4.1 *Dicer*-Funktionsverlust rettet die Ciliogenese in *Dgcr8*-Morphanten

Um die epistatische Beziehung beider Faktoren zu analysieren, wurden Ciliogenese und somitische Marker nach Doppelknockdown von *Dgcr8* und *Dicer* mit dem je einfachen Funktionsverlusten verglichen.

Wie bei vorangegangenen Analysen wirkte *Dicer*-Funktionsverlust weder auf die Cilienpolarisierung noch auf die Länge der GRP-Cilien (Abb. 36 B-B", E, F; Tabelle 26 und 27; Polarisierung $p=0,2175$; Länge $p=0,80568$). Dagegen waren nach *Dgcr8*-Verlust die Cilien häufig nicht nachweisbar. Vorhandene Cilien waren nicht polarisiert

und/ oder stark verkürzt (Abb. 36 C-C", E, F; Tabelle 26 und 27; jeweils $p < 0,000$). Der Doppel-Knockdown führte jedoch zu einer Wiederherstellung der Ciliogenese. Die GRP-Ciliogenese wurde in dieser experimentellen Anordnung nicht durch den *Dgcr8*-MO Effekt dominiert, sondern spezifisch durch den *Dicer*-Funktionsverlust wiederhergestellt (Abb. 36 D-D", E, F; Tabelle 26 und 27). Die Cilien waren nicht nur nachweisbar, sondern auch weitestgehend korrekt polarisiert (Abb. 36 D', E; Tabelle 26 und 27; $p < 0,000$ im Vergleich zum *Dgcr8*-Kockdown). Außerdem besaßen sie eine mit Kontroll-embryonen vergleichbare Länge (Abb. 36 D", F; Tabelle 26 und 27; $p < 0,000$ im Vergleich zum *Dgcr8*-Kockdown).

| MO | Inj.ort | Konz. | n (E) | n (Z) | P in % | A in % | R in % | L in % | M in % | K in % | p-Wert |
|--------------------------------------|---------|----------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------------|
| Kontrolle | | | 3 | 273 | 80,2 | 0,7 | 6,6 | 2,2 | 4,8 | 5,5 | - |
| <i>Dicer</i> -MO | 2x DMZ | 1,5 pmol | 5 | 334 | 76,0 | 1,8 | 6,6 | 2,7 | 6,6 | 6,3 | 0,2175 (zu Ko) |
| <i>Dgcr8</i> -MO | 2x DMZ | 0,5 pmol | 4 | 230 | 13,5 | 9,6 | 3,9 | 7,0 | 13,5 | 52,6 | <0,000 (zu Ko) |
| <i>Dicer</i> -MO <i>Dgcr8</i> -MO | 2x DMZ | 1,5 pmol 0,5 pmol | 8 | 422 | 48,1 | 5,9 | 7,3 | 8,1 | 7,6 | 23,0 | <0,000 (zu <i>dgcr8</i> -MO) |

Tabelle 26 Partielle Wiederherstellung der Ciliolenpolarisierung durch Koinjektion von *Dgcr8*-MO und *Dicer*-MO.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n(E) – Anzahl der Embryonen; n(Z) – Anzahl der Zellen insgesamt; P/ A/ R/ L/ M/ K in % - Anteil der posterior (P)/ anterior (A)/ rechts (R)/ links (L)/ mittig (M) lokalisierten oder fehlenden (K) – keine Cilien

| MO | Ort | Konz. | n (E) | n (Z) | normal in % | Kurz in % | Sehr kurz in % | Keine in % | p-Wert |
|--------------------------------------|--------|----------------------|-------|-------|-------------|-----------|----------------|------------|------------------------------|
| Kontrolle | | | 3 | 271 | 62,4 | 22,9 | 8,9 | 5,9 | - |
| <i>Dicer</i> -MO | 2x DMZ | 1,5 pmol | 5 | 349 | 63,3 | 20,6 | 10,6 | 5,4 | 0,80568 (zu Ko) |
| <i>Dgcr8</i> -MO | 2x DMZ | 0,5 pmol | 4 | 220 | 5,0 | 2,3 | 39,1 | 53,6 | <0,000 (zu Ko) |
| <i>Dicer</i> -MO <i>Dgcr8</i> -MO | 2x DMZ | 1,5 pmol 0,5 pmol | 8 | 422 | 29,9 | 22,3 | 24,9 | 23,0 | <0,000 (zu <i>dgcr8</i> -MO) |

Tabelle 27 Partielle Wiederherstellung der Ciliolenlänge durch Koinjektion von *Dgcr8*-MO und *Dicer*-MO.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n(E) – Anzahl der Embryonen; n(Z) – Anzahl der Zellen insgesamt; normal/ kurz/ sehr kurz/ keine in % - Anteil der Cilien mit durchschnittlich normaler/ kurzer/ sehr kurzer Länge oder fehlende (keine) Cilien

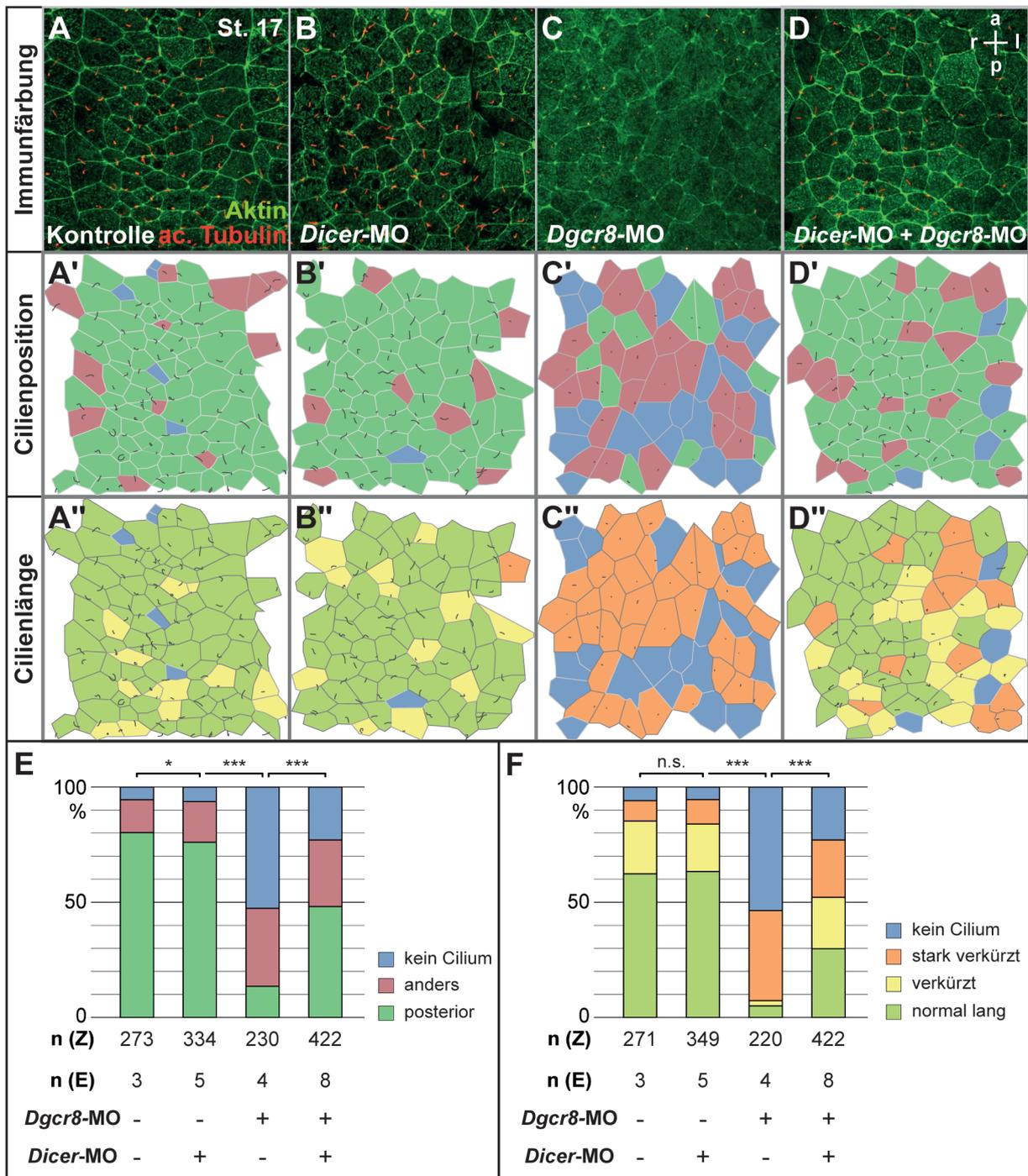


Abb. 36 *Dicer*-MO stellt Cilienpolarisierung und -länge in der GRP nach *Dgcr8* Verlust wieder her. *Dgcr8*- bzw. *Dicer*-MO wurden in beide dorsalen Blastomeren von 4-8 Zellembryonen injiziert. Neurulae (St. 17) wurden mit einem anti α -Tubulin Antikörper (Cilien; in rot) und mit Alexa488 gekoppeltem Phalloidin (Aktin; in grün) behandelt. Der zentrale Bereich der GRP wurde ausgewählt und die Zellen entsprechend ihrer Cilienpolarisierung (A' - D') bzw. Cilienlänge (A'' - D'') angefärbt (Polarisierung: dunkelgrün – posterior; rot – anders als posterior; blau – kein Cilium; Länge: grün – normal; gelb – verkürzt; orange – stark verkürzt; blau – kein Cilium). *Dicer*-Verlust veränderte Cilienlokalisation (B, B', E) und länge (B'', F) nicht. (C - C'', E, F) *Dgcr8*-MO führte zu einer Reduktion der Cilienanzahl und -länge sowie zu einer fehlenden Polarisation. (D - D'', E, F) Koinjektion von *Dgcr8*-MO mit *Dicer*-MO stellt Länge und Polarisation der GRP-Cilien wieder partiell her.

Dieser Epistasisversuch lässt den Schluss zu, dass *Dgcr8* im Zusammenspiel mit *Dicer* für die Ciliogenese der GRP wichtig ist. Ansonsten sollte ein Verlust von *Dicer* die Auswirkungen von *Dgcr8*-MO nicht kompensieren können. Die effektive Wiederherstellung der Cilien an sich und ihrer Lokalisation spricht außerdem dafür, dass beide Faktoren in einem frühen Schritt der Ciliogenese notwendig sind.

Zur anschließenden Charakterisierung dieses unerwarteten Befunds wurden weitere Epistasisexperimente in Bezug auf die Wirkung von *Dgcr8*- und *Dicer*-Verlust auf *Coco* und *Pitx2c* durchgeführt.

6.4.2 Verlust von *Dicer* rettet *Coco* mRNA-Expression nach *Dgcr8*-Knockdown

Bezüglich *Coco* zeigten beide miRNA-Synthesepoteine ebenfalls eine komplementäre Wirkung. *Dicer*-MO verstärkte *Coco* mRNA Expression, in *Dgcr8*-Morphanten war die Expression vermindert (Abb. 12 A, B, G; Abb. 25 D - F). Da der Einfluss von *Dgcr8*-MO auf die Ciliogenese durch *Dicer*-MO verhindert werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich die Auswirkung beider MOs auf *Coco* ebenso ausgleicht. *Dicer*-Funktionsverlust schützte *Coco* wie zuvor signifikant vor der Flüssigkeitsströmungs-abhängigen Destabilisierung (Tabelle 21; 1,0 pmol $p= 0,0056$; 1,5 pmol $p< 0,000$). Im Gegensatz dazu führte *Dgcr8*-Knockdown zu einer stark reduzierten *Coco* mRNA-Expression auf der injizierten Seite (Tabelle 21; $p= 0,00104$). Der Funktionsverlust beider Faktoren resultiert, wie schon für die GRP-Cilierung gezeigt, zu einer Kompensation des jeweils anderen Faktors und damit zu einer weitgehend wildtypischen Expression von *Coco* (Abb. 29 D, E; Tabelle 21; $p= 0,116$ im Vergleich zur Kontrolle).

| MO | Inj.ort | Konz. | n | L<R in % | R=L in % | R<L in % | R<<L in % | p-Wert (zur Ko) |
|--------------------------------------|---------|----------------------|----|----------|----------|----------|-----------|-----------------|
| Kontrolle | | | 74 | 68,9 | 27,0 | 4,1 | 0 | - |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,0 pmol | 48 | 58,3 | 18,8 | 22,9 | 0 | 0,0056 |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,5 pmol | 57 | 29,8 | 24,6 | 45,6 | 0 | <0,000 |
| <i>Dgcr8</i> -MO | li | 0,5 pmol | 95 | 59,9 | 13,7 | 8,4 | 18,0 | 0,00104 |
| <i>Dicer</i> -MO <i>Dgcr8</i> -MO | li | 1,0 pmol 0,5 pmol | 93 | 74,2 | 16,1 | 9,7 | 0 | 0,116 |

Tabelle 28 Wiederherstellung der linksseitigen *Coco*-Repression nach kombinierter Injektion von *Dgcr8*-MO und *Dicer*-MO.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; L<R/ R=L/ R>L in % - Anteil der Embryonen mit L<R/ R=L/ R>L *Coco*-Expression

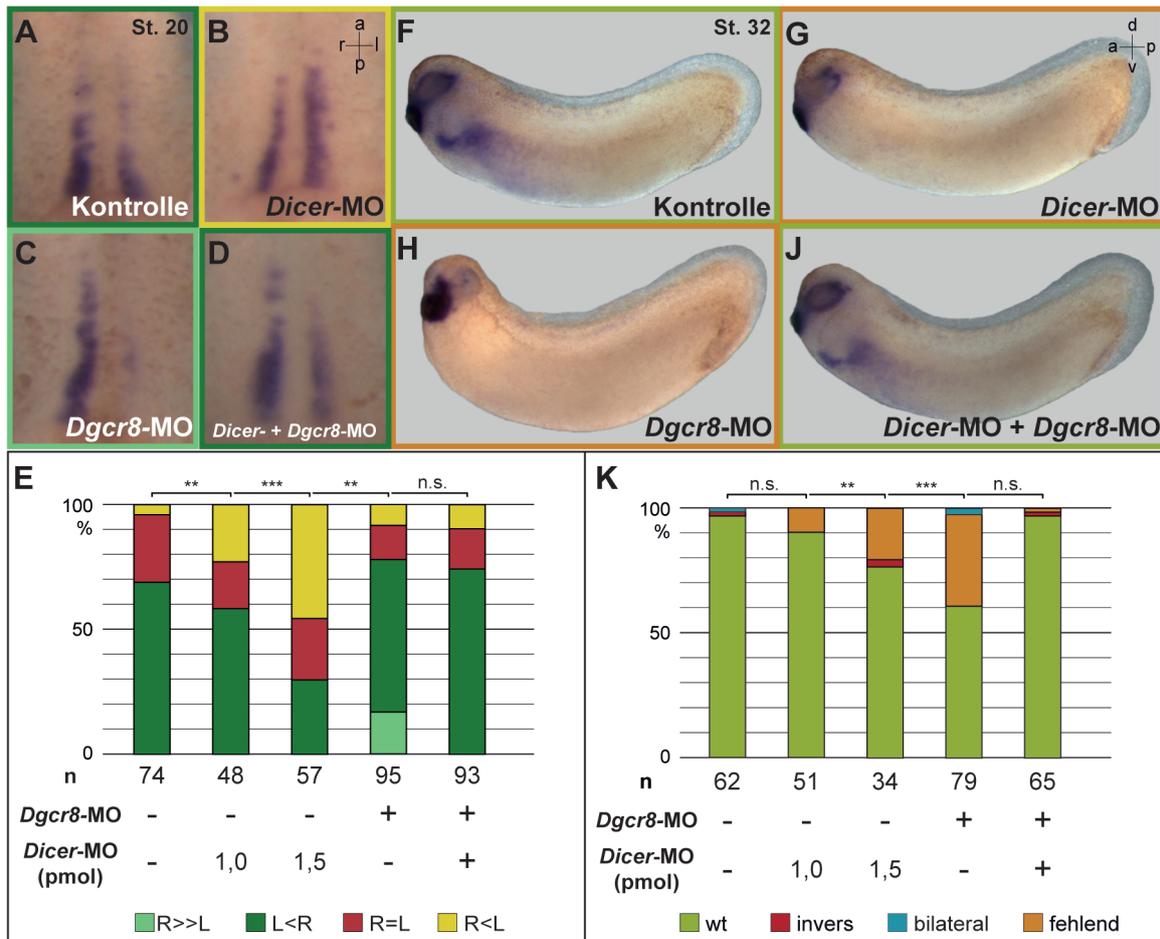


Abb. 37 *Dicer*-MO und *Dgcr8*-MO kompensieren sich in Bezug auf *Coco* und *Pitx2c*.

Dicer- und *Dgcr8*-MO wurden 4-8 Zellembryonen in die linke, dorsale Randzone verabreicht und *Coco* sowie *Pitx2c*-Expression analysiert. (A - E) *Coco* wurde durch *Dgcr8*-MO reduziert (C, E) und durch *Dicer*-MO verstärkt (B, E) im Vergleich zu Kontrollen (A, E). (D, E) Koinjektion beider MOs führt wieder zu einer wildtypischen Repression von *Coco* auf der linken Seite. Die *Pitx2c* Expression im SPM wurde durch die jeweiligen MOs unterbunden (G, H, K). Wurden beide kombiniert, kam es wieder zu einer wildtypischen Aktivierung von *Pitx2c* im linken SPM (J, K).

Coco-Expression: grün – L<R; rot – L=R; gelb – R<L; *Pitx2c*-Expression: hellgrün – wildtypisch; rot – invers; hellblau – bilateral; orange – fehlend

6.4.3 Der gleichzeitige Funktionsverlust von *Dicer* und *Dgcr8* ist für die Nodal-Kaskade folgenlos

Im Gegensatz zu ihrer Wirkung auf die Ciliogenese und *Coco* zeigten *Dgcr8*- und *Dicer*-Morphanten dasselbe Ergebnis bezüglich asymmetrischer *Pitx2c*-Expression. In beiden Fällen war *Pitx2c* mRNA nicht im linken SPM detektierbar (Abb. 12 C, E; Abb. 25 A - C; Abb. 37 G, H, K). Diese Befunde wurden bestätigt und wiesen für *Dgcr8*- und *Dicer*-MO signifikante Effekte auf (Abb. 37 G, H, K; Tabelle 22; *Dicer*-MO 1,0 pmol $p=0,14888$; 1,5 pmol $p=0,00184$; *Dgcr8*-MO $p<0,000$). Doppelmorphanten zeigten wie unbehandelte Kontrollembryonen fast ausschließlich linke SPM Expression von *Pitx2c* (Abb. 37 E; Tabelle 22; $p=0,9617$).

| MO | Inj.ort | Konz. | n | wildtyp in % | invers in % | fehlend in % | bilateral in % | p-Wert (zur Ko) |
|--------------------------------------|---------|----------------------|----|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| Kontrolle | | | 62 | 96,8 | 1,6 | 0 | 1,6 | - |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,0 pmol | 51 | 90,2 | 0 | 9,8 | 0 | 0,14888 |
| <i>Dicer</i> -MO | li | 1,5 pmol | 34 | 76,5 | 2,9 | 20,6 | 0 | 0,00184 |
| <i>Dgcr8</i> -MO | li | 0,5 pmol | 79 | 60,8 | 0 | 36,7 | 2,5 | <0,000 |
| <i>Dicer</i> -MO <i>Dgcr8</i> -MO | li | 1,0 pmol 0,5 pmol | 65 | 96,9 | 1,5 | 1,5 | 0 | 0,9617 |

Tabelle 29 Wiederherstellen der Nodal-Kaskade nach LOF von *Dgcr8* und *Dicer*.

MO – injiziertes MO; Inj.ort – Injektionsort (DRZ); Konz. – injizierte Gesamtkonzentration; n – Anzahl der Embryonen; wildtyp/ invers/ fehlend/ bilateral in % - Anteil der Embryonen mit wildtypischer (linker)/ inverser/ fehlender/ bilateraler (bi) Expression von *Pitx2c*

Neben der GRP tragen viele weitere Gewebe des Frosches Cilien, wie z.B. die Epidermis von Kaulquappen. Ein Effekt von miRNAs auf Hautcilien wurde kürzlich nachgewiesen (Marcet et al., 2011; Song et al., 2014), und wurde daher im nächsten Experiment nach *Dicer*- und *Dgcr8*-Funktionsverlust angeschaut. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die beobachteten, gegensätzlichen Wirkungen ein LR-Achsen spezifisches oder evtl. ein generelles miRNA-Wirkprinzip darstellten könnte.

6.5 Inhibition der Haut-Ciliogenese durch *Dicer*- und *Dgcr8*-Funktionsverlust

Die Epidermis der Kaulquappe besteht aus vier Zelltypen: Becherzellen, Ionen-sekretierenden Zellen („ion-secreting“; ISC), kleinen sekretorischen Zellen („small secretory“; SSC) und multicilierten Zellen („multiciliated cells“; MCC). MCCs lassen sich besonders einfach in Bezug auf Ciliogenese analysieren (Stubbs et al., 2012). Daher wurde der *Dgcr8*- und *Dicer*-Funktionsverlust in MCCs analysiert und die Cilien der Epidermis mit IF spezifisch angefärbt. Bereits in Übersichtsbildern wurde sichtbar, dass die Anzahl der Cilienbüschel nach *Dgcr8*-Knockdown abnahm (Abb. 38 A-C). Stärkere Vergrößerung verdeutlichte den Effekt (Abb. 38 C', C'''; gelbe Pfeile). Bei einigen MCCs war das acetylierte Tubulin (in rot) nur unterhalb der apikalen Zelloberfläche auszumachen (Abb. 38 c'', C'''; blauer Pfeil).

Dagegen besaßen MCCs bei Embryonen mit inhibierter *Dicer*-Translation zwar weniger und kürzere Cilien als Kontrollembryonen, aber trotzdem deutlich mehr und längere Cilien als *Dgcr8*-Morphanten (Abb. 38 B', B'''; gelbe Pfeile).

Qualitativ zeigten also beide Funktionsverlustansätze einen vergleichbaren Effekt auf

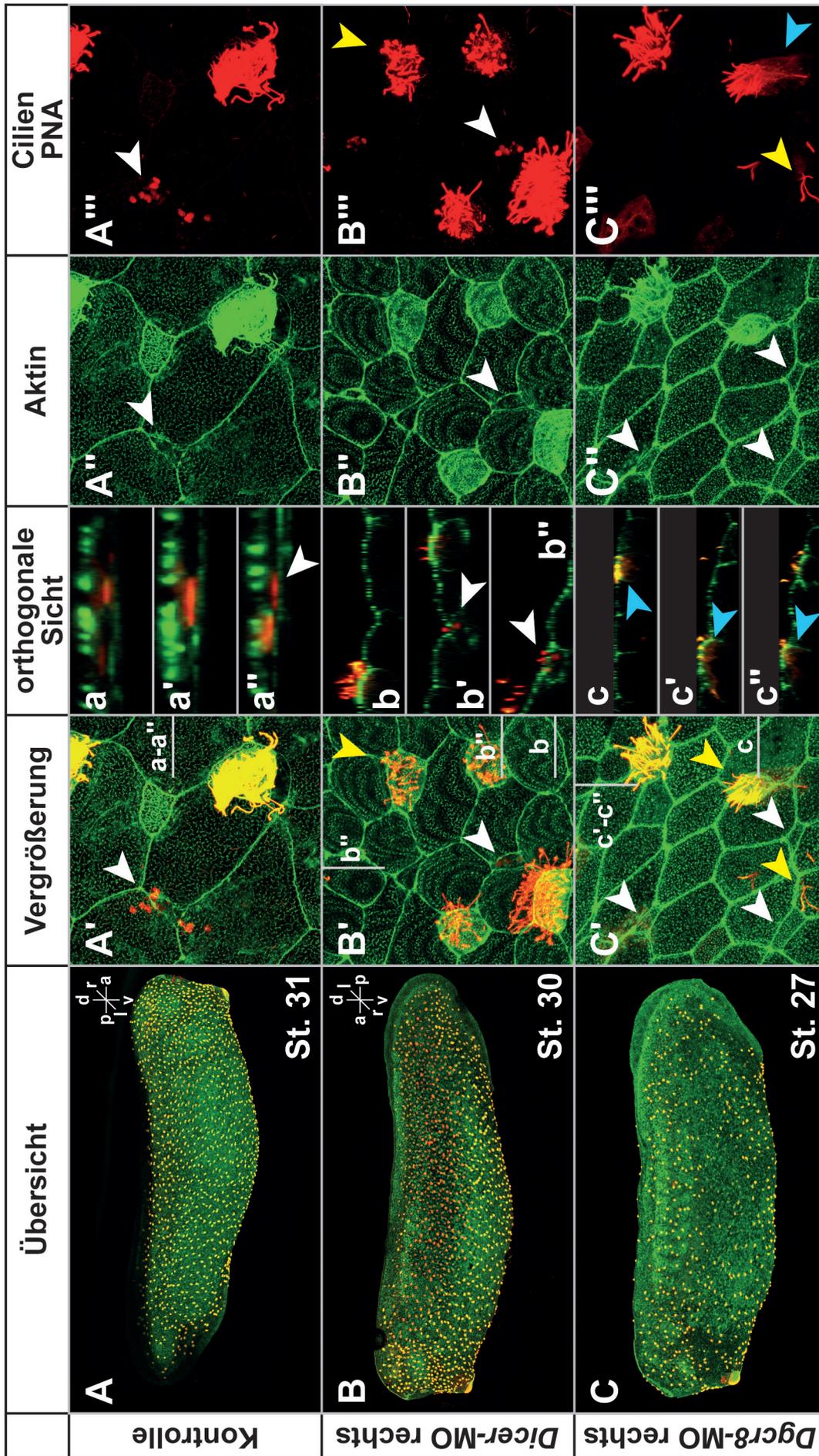
die Ciliogenese, im Gegensatz zu den in der GRP beobachteten konträren Wirkungen dieser beiden Faktoren.

In Bezug auf einen weiteren Zelltyp, den SSCs, konnte jedoch ebenfalls eine differenzielle Wirkung gezeigt werden. SSCs lassen sich mit einem Fluoreszenz markierten Lektin nachweisen („peanut agglutinin“ - PA). Überraschenderweise waren diese nur in *Dicer*-Morphanten, nicht aber nach *Dgcr8*-Funktionverlust zu sehen (Abb.38 B', b', B''', C', C'''; PA in rot; weißer Pfeil). Die Zellen selbst waren allerdings durchaus noch vorhanden, zumindest nach der morphologischen Beurteilung der *Dgcr8*-Morphanten (Abb. 38 C''; weißer Pfeil).

Die Ergebnisse der Funktionsverlustexperimente von *Dgcr8* und *Dicer* zeigten, dass in der embryonalen Epidermis im wesentlichen gleichartige Resultate erzielt wurden, während in der GRP, also während der LR-Achsen-Spezifizierung durchweg antagonistische Effekte beobachtbar waren. Im mukociliären Epithel der Kaulquappe entsprachen die Befunde der bekannten Abfolge der Reifungsschritte von miRNAs, während antagonistische Wirkungen auf räumlich und zeitlich komplexere Regulationsmechanismen schließen ließen (siehe Diskussion).

Abb. 38 Einfluss von *Dgcr8*- und *Dicer*-MO auf Morphogenese und Ciliogenese der Epidermis von Kaulquappen.

Dgcr8-MO bzw. *Dicer*-MO wurde in den animalen Pol beider rechter Blastomeren injiziert. St. 27 - 31 Embryonen wurden mit anti α -Tubulin Antikörper (Cilien, in rot), Alexa568 gekoppeltem PNA und Alexa488 konjugiertem Phalloidin (Aktin; in grün) behandelt. In der Abbildung sind Zusammenfassungen des roten und grünen Kanals von Übersichtsbildern der Embryonen (A - C), von Vergrößerungen dieser mit einem 63x Objektiv (A' - C') und deren orthogonale Ansichten (a-c) gezeigt. Alle verwendeten Kanäle von (A - C) sind außerdem noch einzeln dargestellt (A'' - C'''). (B - B''') *Dicer*-MO verkürzte Multicilien teilweise und reduzierte ihre Anzahl (gelber Pfeil in B' und B'''). Die Serotonin-Vesikel waren in und über den SSCs nachweisbar (weißer Pfeil in B', B'', B''', b'). (C - C''') In *Dgcr8*-Morphanten waren SSCs durch Größe und Gestalt zu erkennen, Vesikel waren allerdings nicht mehr detektierbar (weißer Pfeil in C''). Cilienanzahl und -länge nahm ebenfalls drastisch ab (C; gelber Pfeil in C' und C'''). In den orthogonalen Ansichten wurde ersichtlich, dass sich α -Tubulin vor allem unter der Zelloberfläche ansammelte (c' und gelber Pfeil in c'').



IV. Diskussion

Die experimentellen Untersuchungen der posttranskriptionellen Regulation von *Coco* haben eindeutig ergeben, dass miRNAs für die Flow-abhängige Repression auf der linken Seite des LRO, der GRP, verantwortlich sind. Die Ausgangshypothese dieser Doktorarbeit konnte somit klar bestätigt werden. Außerdem wurde mit dem Symmetriebruch im Froschembryo erstmals ein miRNA-abhängiger Mechanismus entdeckt, der eine „Alles-oder-nichts“-Entscheidung während der Embryogenese steuert. Dies steht im Gegensatz zur Pufferfunktion, die miRNAs in den meisten bisher untersuchten physiologischen Zusammenhängen wahrnehmen. Unklar bleibt, wie komplex die Regulation durch miRNAs ausfällt, warum *Dgcr8* und *Dicer* im Embryo antagonistisch wirken und durch welchen molekularen Mechanismus miRNAs Flow-abhängig asymmetrisch aktiviert werden.

1. Flüssigkeitsstrom-abhängige Regulation von *Coco* durch miRNAs

Die Regulation der linken *Coco*-Domäne durch Flüssigkeitsstrom-abhängige miRNAs wurde hier konkret für miR-15a nachgewiesen. Funktionsverlustversuche machten deutlich, dass miR-15a für die *Coco*-Repression notwendig ist. Im Speziellen durch den spezifischen Schutz von *Coco* mittels *Coco-TP-MO^{miR15a}*, der zur linksseitigen Stabilisierung von *Coco* mRNA führte. Im Gegensatz dazu wurde die Nodal-Kaskade trotzdem, wie bei unbehandelten Embryonen, asymmetrisch links induziert. miR-15a ist zwar für den Abbau der *Coco* mRNA notwendig, aber wahrscheinlich nicht für einen zusätzlich und essentiellen Translationsblock verbleibender mRNA-Moleküle. Diese Aufgabe könnte von einer oder mehreren weiteren miRNAs übernommen werden.

Um interessante Kandidaten zu identifizieren, sollten weiterführende Studien verstärkt das *Coco* Protein untersuchen. Zum einen könnte die Proteinverteilung mit Hilfe von Antikörpern zwischen unbehandelten Embryonen und solchen mit einem Funktionsverlust der verschiedenen miRNAs durch *TP-MOs* verglichen werden. Wenn eine miRNA für die Flow-abhängige Inhibition der Translation notwendig ist, sollte nach ihrem linksseitigen Funktionsverlust mehr *Coco* Protein detektierbar sein.

Dies könnte mikroskopisch durch IF oder semiquantitativ durch Western Blot Analyse untersucht werden. In einem Western Blot könnte die linke Seite der GRP der rechten gegenübergestellt werden indem Protein nur jeweils aus einer GRP-Hälfte extrahiert wird. Dies könnte technisch anspruchsvoll aber machbar sein. Alternativ könnte ein Fusionskonstrukt aus spezifischen Bereichen der *Coco* 3'-UTR (entsprechend der Protektor-RNAs) und einem fluoreszierenden Protein (GFP/RFP) bzw. dem *Luciferase*-Marker gen eingesetzt werden. Auf diese Weise würden sie unter die Kontrolle der *Coco* 3'-UTR kommen und die Translation der Markerproteine derselben miRNA-Regulation unterliegen. Weiter könnten die für die *Coco*-Repression erforderlichen Sequenzen genauer eingegrenzt werden. Vergleichende Überexpression der Konstrukte in der linken und rechten GRP-Hälfte erlaubten zudem eine interne Kontrolle. Ebenso könnten die Konstrukte allein bzw. in Kombination mit einer pri-miRNA in den animalen Pol von *Xenopus*-Embryonen injiziert werden. Mit Hilfe von animalen Kappenexplantaten, welche aus ektodermal undifferenziertem Gewebe bestehen, könnte das Protein in der *ex vivo* Kultur untersucht werden.

Weitere miRNA-Kandidaten wurden durch vorläufige Befunde und *in silico* Analysen identifiziert. Diese sollen im Folgenden auf ihre Qualitäten als *Coco*-regulierende miRNAs besprochen werden.

1.1 miR-107* als potentieller Kandidat der *Coco*-Regulierung

miR-107* bietet sich aus verschiedenen Gründen an: **(1)** miR-107* ist mit *Coco* koexprimiert (Abb. 20); **(2)** Protektor-RNAs gegen miR-107* Bindestellen verhindern die Flüssigkeitsstrom-abhängige Repression von *Coco* (Abb. 21); **(3)** *Coco B* weist fünf mögliche miR-107* Bindestellen auf; **(4)** der Abstand zwischen diesen Bindestellen könnte eine effektive Regulation ermöglichen (Grimson et al., 2007). **(5)** Obwohl das Fehlen von miR-107*-Bindestellen in 3'-UTRs einiger homologer *Coco*-Gene (mit Ausnahme von *Cerl2* in der Maus) vordergründig einer angenommenen konservierten Funktion widerspricht, besitzt ihre „Seed-Sequenz“ eine hohe Homologie zu miR-15. Kennzeichnend ist, dass miRNAs innerhalb dieser Superfamilie häufig dieselben Zielgene aufweisen (Finnerty et al., 2010). Daher ist ein Szenario vorstellbar, in dem die miR-107*/-107 Bindestelle in *Coco B* und *Cerl2* der Maus teilweise die Funktion von miR-15/ 16 Bindestellen übernommen hat und so die

Effektivität weiterer miR-15/ 16 Bindestellen in diesen 3'-UTRs verstärkt. Allerdings hat die Protektor-RNA mit der miR-107*-Bindestelle (*B F1*) im Gegensatz zu *B F2* nicht zu LR-Achsen-Defekten geführt (Abb. 10).

1.2 miRNAs des miR-17~92-Clusters als potentielle Kandidaten der *Coco*-Regulation

Eine zweite interessante miRNA Familie stellte das miR-17~92-Cluster dar, zusammen mit den paralogen Clustern 106a-363 und 106b-25. Die Indizien hierfür sind: **(1)** In *Coco A* und *B* 3'-UTRs gibt es jeweils mehrere Bindestellen, in *Coco A* sechs (vier miR-18, eine miR-18a* und -19a) und in *Coco B* drei (eine miR-18*, -18a* und 19a); **(2)** die regulatorischen Bereiche („Seed-Sequenz“ und die Nukleotide 13 - 17) der miR-19a zeigen eine hohe Übereinstimmung mit ihrer Bindestelle in den *Coco* 3'-UTRs. Die Bindestelle einer zweiten miRNA dieses Clusters, miR-18a*, besitzt ebenfalls hohe Übereinstimmungen mit ihrer „Seed-Sequenz“ und den Nukleotiden in Position 13 - 17; **(3)** der 3'-UTR Bereich, der die Bindestellen für miR-19a, miR-18a* und miR-15a enthält, ist zwischen *Coco A* und *B* hoch konserviert; **(4)** der Abstand zwischen miR-18a* und -15a bietet sich für eine Koregulation an (Abb. 14; 26 bp in *Coco A* und 27 bp in *Coco B*; Grimson et al., 2007); **(5)** die Lage der miR-19a und -18a* -Anlagerungsstellen am 3' Ende sprechen für eine hohe Effektivität. Von hieraus kann die Translation und der Abbau der mRNA leichter gesteuert werden als von zentralen Bereichen der UTR-Region (Grimson et al., 2007).

Die Analyse dieser Bindestellen bietet eine gute Basis, um die Mitglieder des miR-17~92-Clusters in die engere Auswahl für mögliche *Coco*-koregulierende Kandidaten aufzunehmen. Ebenso unterstützt die Konservierung der Bindestellen von Mitgliedern des miR-17~92-Clusters (bzw. von verwandten miRNAs dieses Clusters) in den *Coco*-Genen von *Xenopus tropicalis*, Zebrafisch, Maus und Mensch die Vermutung, dass diese miRNAs an einer bei Wirbeltieren konservierten Regulation von *Coco* beteiligt sein könnten. Besonders klare Hinweise für die Beteiligung dieser miRNAs an der Flüssigkeitsstrom-abhängigen Regulation von *Coco* lieferten jedoch vorläufige, funktionelle Experimente im Rahmen dieser Arbeit. In einem Versuch konnte der Verlust des Flüssigkeitsstroms durch ektope Überexpression des miR-17~92-Clusters gerettet werden (nicht gezeigt). Zudem hat-

ten Protektor-RNAs gegen die Fragmente *A F3* und *B F2*, die konservierte Bindestellen von miR-17~92 Kandidaten (aber auch für miR-15a) aufwiesen, tatsächlich den stärksten Einfluss auf *Coco* und auf die LR-Achsen Entwicklung (Abb. 06 - 10).

Sowohl miR-107* als auch miRNAs des miR-17~92-Clusters können leicht, wie für miR-15a beschrieben, auf ihre Funktion bei der *Coco*-Regulation untersucht werden. Verschiedene Kombinations-Injektionen von jeweiligen *TP*-MOs könnten die Rolle der miRNAs für die *Coco*-Regulation offenlegen.

Außerdem könnte zusätzlich zu den beschriebenen Protektor-RNA Injektionen ein weiterer Versuchsaufbau mit „Squelching-RNAs“ durchgeführt werden. Solche Sinn-Konstrukte sollten die *Coco*-regulierenden miRNAs abfangen können und - wie Protektor-RNAs - verhindern, dass sich die miRNAs reprimierend auf *Coco* auswirken. Des Weiteren könnten „Squelching-RNAs“ hergestellt werden, bei denen die miRNA-Bindestellen potentieller *Coco*-regulierender Kandidaten evtl. in Kombination mit der von miR-15a mutiert sind. Diese könnten die Funktion bestimmter miRNA-Bindestellen für die *Coco*-Regulation zeigen und auch dazu dienen, das Zusammenspiel aller *Coco*-regulierenden miRNAs zu untersuchen.

2. Flow-anhängige Aktivierung von miRNAs

Da die Repression von *Coco* als Reaktion auf den Flow innerhalb ganz kurzer Zeit (vermutlich 2 - 3 Stunden) erfolgt, liegt es nahe, dass die beteiligten miRNAs bereits vorliegen. Unterstützt wird diese Vermutung durch das Expressionsmuster von miR-15a. Schon in Prä-Flow Stadien gelangt die reife Form aus den tieferen Zellschichten in die GRP und damit auch in die somitischen, also sensorischen GRP-Zellen (Abb. 15 D, D'; Abb. 39 A, B). Wie dieser Transfer erfolgt ist dabei völlig unklar. Ein ähnliches Szenario wurde bisher in keinem miRNA-System berichtet. In den somitischen GRP-Zellen gibt es in Post-Flow Stadien außerdem keine quantitativen Unterschiede zwischen der linken und rechten Seite, d.h. die miRNAs müssen Flow-abhängig aktiviert werden. Hierfür werden im Folgenden die bisher vorgeschlagenen Signale näher diskutiert.

Konzeptionell unterscheidet man zwei Modelle, das „Flow-Sensor“-Modell („2-cilia“ model) und das „Morphogen“-Modell („morphogen“ model; McGrath et al., 2003; Tanaka et al., 2005; I. Einleitung 1.4; Abb. 39). Für beide ist die in Maus und im Fisch beschriebene Flow-abhängige linksseitige Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration wichtig, die letztlich zur Repression von *Coco* führen muss.

2.1 Flow-abhängiger Transport von miRNAs via Exosomen

Die Idee für dieses Modell ist von einer Variante des Morphogen-Modells abgeleitet. In der Maus wurde berichtet, dass FGF-abhängig Vesikel (sog. „nodal vesicular parcels“ oder NVPs) im Zentralbereich des PNCs entstehen. Diese enthalten Retinsäure und Shh und werden mit dem Flow auf die linke Seite des PNCs transportiert (Tanaka et al., 2005). Im Froschembryo wurden ähnliche Vesikel beobachtet (T. Beyer und M. Blum, unveröffentlicht).

Etlche Studien konnten miRNAs in extrazellulären Vesikeln nachweisen, in denen sie durch Körperflüssigkeiten über eine große Distanz transportiert werden können (Chen et al., 2012). miRNAs können in kleine Mikrovesikel verpackt werden, oder - was häufiger der Fall zu sein scheint - in sog. Exosomen (Xu et al., 2013). Das Verpacken von miRNAs in Exosomen ist vermutlich sehr spezifisch, da hierfür spezielle miRNA-bindende Proteine (z.B. hnRPNA2B1; „heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2

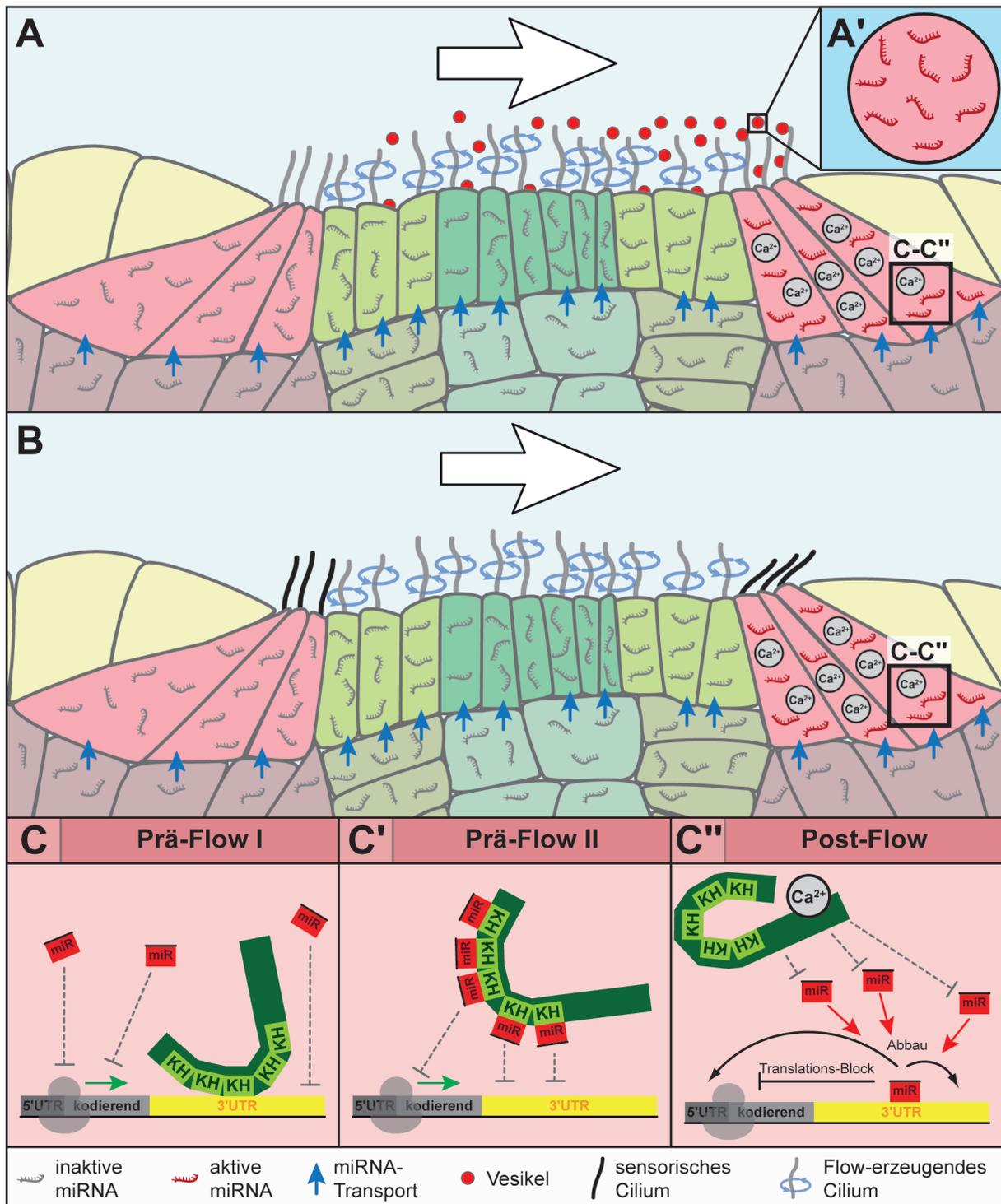


Abb. 39 Modell der Flow-abhängigen miRNA-Aktivierung.

Dargestellt sind (A) das „Flow-Sensor“-Modell und (B) das „Morphogen“-Modell. Blaue Pfeile deuten auf den Transport der reifen miRNAs in die GRP-Zellen hin. (C - C'') Darstellung der Funktion von Bic-C vor und nach dem Flüssigkeitsstrom. Nähere Erläuterung der Modelle im Text.

B1“) zuständig sind (Villarroya-Beltri et al., 2013). Unter anderem konnten von den potentiell Coco-regulierenden miRNAs miR-17, -18 und -15 in Exosomen nachgewiesen werden (Valadi et al., 2007).

Der Transfer von miRNA-enhaltenden Exosomen in MVPs („multivesicular bodies“) wird durch die zu den Lipiden gehörenden Ceramide eingeleitet und ist daher unabhängig vom gewöhnlichen Sekretionsprozess durch die ESCRT-Maschinerie (Trajkovic et al., 2008; Kosaka et al., 2010). Für die Synthese der an diesem Vorgang beteiligten Ceramide werden neutrale Sphingomyelinasen II benötigt (nSMase2; Gen: *Smpd3*; Kosaka et al., 2010). *Smpd3* wird allerdings nicht in der GRP exprimiert (nicht gezeigt), könnte jedoch auch als Protein maternalen Ursprungs vorliegen. Um zu klären, ob die beobachteten Vesikel miRNAs enthalten, könnten weiterführende Versuche mit dem spezifischen nSMase2-Inhibitor GW4869 durchgeführt werden. Dabei könnte GW4869 ins Archenteron von Neurulaembryonen injiziert werden, um einen Effekt auf *Coco* und *Pitx2c* zu untersuchen.

Allerdings spricht die beobachtete symmetrische Verteilung der reifen miR-15a gegen ein Flow-abhängiges Ungleichgewicht zwischen der linken und rechten Seite. Der Konzentrationsunterschied der miRNAs könnte aber auch unterhalb der Nachweisgrenze der WMISH liegen. Hier könnte ein Vergleich der miRNA-Konzentration zwischen der linken und rechten GRP-Hälfte durch qRT-PCR Klarheit bringen. Allerdings war miR-15a bereits in Prä-Flow Stadien in den lateralen, *Coco*-exprimierenden Zellen zu finden. Dies spricht dafür, dass diese schon vor der Strömung dort vorhanden ist und auf einen Flow-induzierten Stimulus hin direkt aktiviert werden könnte. Aus den genannten Gründen erscheint das Exosomen-Modell im Moment wenig attraktiv.

2.2 miRNA - Aktivierung im „Flow-Sensor“-Modell

Das Flow-Sensor Modell ist gut etabliert und in unterschiedlichen Wirbeltierspezies beschrieben worden (McGrath et al., 2003; Field et al., 2011; Kamura et al., 2011). Demnach sollen laterale, unbewegliche und sensorische Cilien durch die Strömung abgelenkt werden, wodurch sich der Ca^{2+} -Kanal PC2 öffnet und das beobachtete asymmetrische Calciumsignal generiert wird (Abb. 39 B; McGrath et al., 2003; Field et al., 2011; Kamura et al., 2011). Deaktivierung von PC2 führt in Maus und im Fisch zu LR-Achsen-Defekten. Auch im Frosch fehlt nach *Pkd2*-Funktionsverlust die *Pitx2c*-Expression. Jedoch ist hier auch schon das Vorläufergewebe, das SM, betroffen und daher die GRP-Morphologie wie auch die Cilienpolarität verändert

(Maisonneuve et al., 2009; Vick, 2009). PC2 ist dennoch auch im Frosch in den GRP-Cilien vorhanden (Schweickert et al., 2007). Mögliche PC2 Sensoren sind im Frosch nur ansatzweise auf ihren Einfluss auf die LR-Achse untersucht. In dieser Arbeit wurde Polyductin als möglicher Sensor charakterisiert. Polyductin interagiert indirekt mit PC2 und kann eventuell mit weiteren Sensoren wie PC1 oder *pkd111* einen Komplex bilden (Wu et al., 2006; Fedeles et al., 2011). Auch wenn für die *Pkhd1*-Knockout Maus kein LR-Achsen-Phänotyp beschrieben wurde, macht ihn seine Rolle als miR-15a-regulierenden Faktor zu einem interessanten Sensor-Kandidaten (Lee et al., 2008; Chu et al., 2008).

2.3 Bicaudal C, ein möglicher Effektor der asymmetrischen miRNA-Aktivierung

Zwei Szenarien wurden für die Interaktion von miRNAs mit dem RNA-Bindeprotein Bic-C beschrieben. Zum einen fördert es die Repression der Adenylat Cyclase-6 (AC6). In diesem Fall erleichtert die KH-Domäne die Bindung der miR-125 an die mRNA von AC6 und die SAM-Domäne rekrutiert Proteine des RISC-Komplexes, wie Argonaut (Piazzon et al., 2012). Zum anderen wurde eine protektive Funktion von Bic-C nachgewiesen, indem es die Repression von *pkd2* mRNA durch miR-17 verhindert (Tran et al., 2010). Hierfür ist nur seine RNA-Bindedomäne, nicht jedoch die Protein-Bindedomäne SAM notwendig. Wie und wo die Regulation durch diese Domäne beeinflusst wird, d.h. ob es an die 3'-UTR bindet oder die miRNA abfängt, ist nicht klar. Es wird jedoch vermutet, dass Bic-C nur vor bestimmten miRNAs schützt, wie z.B. vor miRNAs der miR-17-Familie (Tran et al., 2010). Für die Regulation von *Coco* sind ebenfalls nur die RNA-Bindedomänen (KH-Domänen) essentiell (Abb. 29 A - D). Dieser Befund legt nahe, dass Bic-C die Bindung von miRNAs an die *Coco* 3'-UTR verhindert.

2.3.1 Bic-C-abhängige Regulation von *Coco* durch miRNAs

Es ist bekannt, dass asymmetrische Calciumwellen in PNC-Zellen für eine korrekte LR-Achsen-Entwicklung notwendig sind (Takao et al., 2013). Hier wurde gezeigt, dass Überexpression von *Bic-C-ΔSAM* *Coco* mRNA schützte, und dass dieser Schutz durch Koinjektion von *pkd2* partiell aufgehoben wurde (Abb. 29 und

31). Falls Bic-C Ca^{2+} -abhängig ist, könnte dieser Befund dadurch erklärt werden, dass Bic-C je nach Ca^{2+} -Konzentration seine Konformation ändert und damit die Bindung an Ziel-mRNAs verliert (Abb. 39 C - C"). Eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration in Prä-Flow Stadien könnte *Coco* mRNA vor Degradation schützen. Der Flow-abhängige Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration könnte dagegen die Bic-C-Faltung so verändern, dass die *Coco* 3'-UTR oder auch die *Coco*-regulierenden miRNAs nicht mehr von Bic-C gebunden werden und *Coco* in der Folge abgebaut werden kann (Abb. 39 C - C").

Zur genaueren Charakterisierung der Ca^{2+} -Abhängigkeit von Bic-C könnte im Gegensatz zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch einen *Pkd2*-Funktionsgewinn ein *Pkd2*-Knockdown auf der linken Seite induziert werden. Dieser sollte die schützende Funktion von *Bic-C* verstärken. Werden *Bic-C-ΔSAM* und *Pkd2*-MO bei jeweils suboptimaler Konzentration injiziert, sollte die schützende Wirkung auf *Coco* im Vergleich zu den Einzelinjektionen zunehmen. Ebenso könnte *Bic-C-ΔSAM* zusammen mit einer suboptimalen Konzentration von *pkhd1*-MO injiziert werden. Wenn Polyductin im Frosch als Sensor dient, worauf das Expressionsmuster hinweist (Abb. 24 C), sollten die lateralen GRP-Cilien nicht mehr in der Lage sein, den Strom zu detektieren und via PC2 Ca^{2+} in die Zelle zu befördern. Daher sollte sich *Bic-C-ΔSAM* stärker schützend auf *Coco* auswirken als in Gegenwart der wildtypischen *pkhd1*-Konzentrationen.

Um die Auswirkungen von *Pkd2* und *pkhd1* auf die frühe Entwicklung zu umgehen, könnten alternativ niedermolekulare Effektoren von Calciumkanälen zur Veränderung der Calcium Konzentration eingesetzt werden. Diese könnten z.B. ins Archenteron von Neurulaembryonen injiziert werden. Dadurch würde der Einfluss von Ca^{2+} auf die SM-Spezifizierung umgangen werden. Ionomycin, welches intrazellulär die Calcium-Konzentration erhöht, würde sich z.B. hierfür anbieten. Verabreicht man Ionomycin ins Archenteron und induziert rechtsseitig *Bic-C-ΔSAM*, sollte durch die homogene Wirkung von Ionomycin im gesamten Archenteron *Coco* beidseitig reprimiert und *Pitx2c* beidseitig exprimiert werden. Um die Abhängigkeit von *Coco*-regulierenden miRNAs von Bic-C zu zeigen, könnten diese auf der rechten Seite in Kombination mit *Bic-C-ΔSAM* und Ionomycin/ *Pkd2* RNA überexprimiert werden. In diesem Szenario sollte es vermehrt zu Achseninversionen bzw. zur bilateralen Expression von *Pitx2c* kommen.

2.3.2 Wirkungsweise von Bic-C

Offen bleibt in diesem Bild, ob Bic-C direkt an die *Coco* 3'-UTR bindet und somit miRNA-Bindestellen blockiert, oder ob es miRNAs bindet und diese Calcium-abhängig freisetzt (Abb. 39 C - C"). Zur Klärung könnte *Bic-C-ΔSAM* zusammen mit „Squelching-RNAs“ der *Coco* 3'-UTR getestet werden, die miRNAs abfangen sollten. Normalerweise sollte sowohl die „Squelching“-RNA als auch Bic-C *Coco* vor der miRNA-vermittelten Degradation bewahren. Wenn dies im Fall von Bic-C durch Interaktion mit der *Coco* 3'-UTR zustande kommt, sollte Bic-C auch an die „Squelching“-RNA binden und so abgefangen werden. Auf diese Weise würde es nicht mehr für den Schutz von *Coco* zur Verfügung stehen. Bei gleichzeitiger Applikation beider Konstrukte sollte *Coco* daher weniger stabilisiert werden als nach Einzelinjektion jeder der beiden Komponenten. Ein synergistischer Effekt von *Bic-C-ΔSAM* und der „Squelching“-RNA wäre dagegen ein Hinweis, dass Bic-C nicht mit der *Coco* UTR sondern mit den *Coco*-regulierenden miRNAs interagiert. Damit wären beide Konstrukte dann im selben Mechanismus aktiv, womit sich der stabilisierende Effekt auf *Coco* verstärken sollte.

3. Die Rolle von miRNAs bei der Entwicklung der GRP

Die miR-34/ 449-Familie ist für die Ausbildung von MCCs und die miR-129 für die Entstehung von beweglichen Monocilien des KV notwendig (Song et al., 2014; Cao et al., 2012). Im Einklang damit verhinderte der Verlust des miRNA-Bindeproteins *Dgcr8* die Ciliogenese der GRP (Abb. 35 und 36). Drei bekannte Signalwege, die das SM beeinflussen, FGF, Pkd2/ Bic-C und Wnt (Vick, 2009; Montino, 2011; Walentek et al., 2013; Walentek et al., 2013; Schneider, 2014), könnten alle durch *Dgcr8*-abhängige miRNAs reguliert werden.

3.1 Mögliche *Dgcr8*-Zielprozesse bei der Spezifizierung des SM

Der *Dgcr8*-Funktionsverlust unterdrückte die GRP-Ciliogenese und die Expression von *Foxj1*, nicht aber die Transkription von *Xnr3* im SM, und führte außerdem zu einem weitgehenden Verlust der *Coco*- und *Xnr1*-Expression (Abb. 25 - 28, 37 A). Im Gegensatz dazu war die mRNA des Wachstumsfaktors *derrière* in den somitischen GRP-Zellen stark erhöht (nicht gezeigt). Zusammen mit der *myoD*-Expression in Morphanten lässt sich folgern, dass die somitischen GRP-Zellen und ihr mesodermales Zellschicksal auch in Abwesenheit von *Dgcr8* erhalten bleiben (Abb. 26). In Abb. 40 A werden molekulare und morphologische Phänotypen nach *Dgcr8*-Funktionsverlust mit denen von SM-regulatorischen Faktoren verglichen. Hierdurch soll versucht werden, die *Dgcr8*-abhängige miRNA Synthese in ein Modell der SM-Spezifizierung zu integrieren.

3.1.1 FGF-Signalweg

Der FGF-Signalweg („fibroblast growth factor“) ist für viele Prozesse während der Embryogenese notwendig, wie z.B. die Induktion von mesodermalem und neuralem Gewebe, Zellwanderung und die Extremitätenentwicklung (Thisse et al., 2005). Für den FGF-Signalweg konnte in Bezug auf die LR-Achse eine frühe von einer späten Funktion getrennt werden. Vor der Gastrulation wird es für die Ausbildung des SMs und nach der Gastrulation für die Expression von *Coco* und *Xnr1* benötigt (Schneider, 2014). Wie bei *Dgcr8* verhindert auch der frühe Funktionsverlust von FGF die Expression von *Foxj1*, die GRP-Ciliogenese und die Induktion von *Coco* und *Xnr1*

| A | Wirkung auf | Verlust von | <i>Dgcr8</i> | FGF | <i>Pkd2</i> | <i>Bic-C</i> | 5'HT | <i>Fz8</i> | <i>ATP4a</i> | <i>Wnt11</i> |
|---|-------------|-------------|---------------|-----|-------------|--------------|------|------------|--------------|--------------|
| | | | <i>Pitx2c</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Coco</i> | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | (+) | ↓ |
| somitische GRP (<i>myoD</i> , <i>Bic-C</i>) | + | - | (?) | (?) | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| <i>Xnr3</i> (SM) | + | ? | ? | ? | ? | ↓ | ? | + | + | |
| <i>Foxj1</i> (SM) | ↓ | ↓ | ↓ | ? | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | (↓) | |
| GRP-Cilien (<i>Tektin2</i> , <i>dnah9</i> , IF) | ↓ | ↓ | ↓ | + | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | (↓) | |
| GRP-Cilien (Polarisierung, Länge) | - | - | - | ↓ | - | + | ↓ | ↓ | | |
| SM-Spezifizierung | | | | | | | | | | |
| B | | | C | | | | | | | |
| Pkd2 | | | Wnt | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

Abb. 40 Einordnung von Dgcr8-prozessierten miRNAs in den Prozess der SM-Spezifizierung.

(A) Gegenüberstellung von Auswirkungen des *Dgcr8*-Funktionsverlusts mit denen der anderen für die SM-Spezifizierung wichtigen Faktoren FGF, *Pkd2*, *Bic-C*, Serotonin, *Fz8*, *ATP4a* und *Wnt11b*. Pfeile weisen auf eine Repression/ Verringerung hin; „-“ – nicht exprimiert/ fehlend; „+“ – keine Veränderung zum Wildtyp; „?“ – nicht bekannt. Für Details siehe Text.

(B, C) Mögliche Interaktion von Dgcr8-prozessierten miRNAs („Dgcr8“) mit SM-Spezifizierungskomponenten (*Pkd2*, Wnt). Für Details siehe Text.

(Abb. 40 A). Verantwortlich hierfür ist jedoch im Unterschied zu *Dgcr8*, dass sich die somitischen Zellen in der GRP nicht bilden, weshalb von unterschiedlichen Funktionen für die SM-Entwicklung ausgegangen werden kann. Damit sollte die FGF-Signaltransduktion nicht an Dgcr8-abhängige miRNAs gebunden sein.

3.1.2 Pkd2/ Bic-C

Neben FGF ist auch PC2 für die *Foxj1*-Expression im SM notwendig (Abb. 40 A; Gründl, 2012). Für Bic-C kann dies vermutlich ausgeschlossen werden, da auch nach Funktionsverlust Cilien auf der GRP detektiert wurden (Maisonneuve et al., 2009). Allerdings wurde eine Veränderung der Zellmorphologie der lateralen GRP-Zellen beobachtet (Abb. 40 A). Eventuell hat Bic-C daher eine *Foxj1*-unabhängige Funktion bei der SM-Entwicklung und/ oder bei der GRP Morphogenese. PC2 und Bic-C sind außerdem für die Induktion der *Coco*- und *Xnr1*-Expression in den somitischen GRP-Zellen erforderlich (Abb. 40 A). Diese Befunde sprechen dafür, dass PC2-abhängige Prozesse durch Dgcr8-prozessierte miRNAs reguliert werden könnten (Abb. 40 B).

3.1.3 Wnt-Signaltransduktion

Für die SM-Spezifizierung ist weiter der kanonische Wnt-Signalweg notwendig (Beyer et al., 2012). Beyer diskutiert in ihrer Doktorarbeit (Beyer, 2011) die Möglichkeit, dass zwei unabhängige Zielprozesse durch kanonische Wnt-Signaltransduktion an der LR-Achsen-Spezifizierung beteiligt sein könnten, die Aktivierung des Wnt-Zielgens *Xnr3* und die davon unabhängige Induktion von *Foxj1* (Abb. 40 C). Serotonin ist an beiden Prozessen beteiligt (Beyer, 2011), während die Protonenpumpe ATP4, der kanonische Wnt-Rezeptor Frizzled8 und eventuell auch der Wnt-Ligand Wnt11b nur in der *Xnr3*-unabhängigen Induktion von *Foxj1* involviert sind (Beyer, 2011; Walentek et al., 2012; Walentek et al., 2013). Da der Knockdown der Serotonin Signaltransduktion *Foxj1*- und *Xnr3*-Expression verhindert, scheidet er als Zielprozess von Dgcr8-abhängigen miRNA aus (Abb. 40 A). Im Gegensatz dazu ist der Phänotyp des Knockdowns von vor allem *Wnt11b* aber auch von *ATP4a* und *Fz8* vergleichbar mit dem von *Dgcr8*, wodurch Dgcr8-abhängige miRNAs mit diesen Faktoren in Verbindung stehen könnten (Abb. 40 C).

3.2 Die Rolle von Dicer und Dgcr8 bei der SM-Spezifizierung: ein Modell

Während Dicer für die Flow-abhängige *Coco*-Repression eindeutig notwendig war (Abb. 12), scheint die SM-Spezifizierung auf den ersten Blick Dicer-unabhängig zu erfolgen. Da *Dicer*-Verlust die durch *Dgcr8*-Knockdown hervorgerufenen GRP-Ciliendefekte rettet, sollte Dicer jedoch auch in diesen frühen Prozessen involviert sein. Ebenso spricht die publizierte Steigerung der Dicer-Enzymaktivität nach der Befruchtung dafür, dass dieses miRNA-Prozessierungsenzym bereits eine Rolle in der frühen *Xenopus*-Entwicklung wahrnimmt (Lund et al, 2006).

Eine differenzielle Wirkung dieser beiden miRNA-prozessierenden Faktoren impliziert, dass verschiedene miRNAs oder miRNA-Gruppen involviert sind (Abb. 41). Eine Klasse könnte z.B. nur Dicer-abhängig prozessiert werden, weil sie schon maternal als pre-miRNA vorliegen, während andere erst transkribiert und anschließend durch beide Proteine umgesetzt werden. Dieser Prozess sollte mit dem Mittblastula-Übergang, also der Aktivierung des zygotischen Genoms, einhergehen (Abb. 41 B). Diese beiden hypothetischen miRNAs sollten differenzielle Auswirkungen auf die SM-Ausbildung haben.

Eine einfache Erklärung könnte darin liegen, dass die Dicer-abhängigen miRNAs (miR-A) einen Aktivator und die Dicer- und Dgcr8-abhängigen miRNAs (miR-R) einen Repressor der SM-Spezifizierung regulieren (Abb. 41). In diesem Modell wird vor der Aktivierung des zygotischen Genoms am Mittblastula-Übergang der Repressor nicht inhibiert, der Aktivator dagegen schon. Mit dem Mittblastula-Übergang werden/ wird die Repressor-miRNA(s) synthetisiert und damit der Repressor zunehmend post-transkriptionell inhibiert (Abb. 40 B). Sowohl der maternale Pool als auch die aktive Form von miR-A sollten im Laufe der Entwicklung aufgebraucht werden, sodass der SM-induzierende Faktor von der Repression befreit und aktiv wird (Abb. 40 B).

Ein Beispiel für eine solche Inhibition der miRNA-Synthese ist von der dorso-ventralen Musterbildung im frühen Froschembryo bekannt. Die dorsale Synthese von miR-15/ 16 wird während Blastula-/ Gastrula-Stadien durch kanonische Wnt-Signaltransduktion verhindert. Da miR-15 den Nodal-Rezeptor ActR1a negativ reguliert, kann der Nodal-Signalweg nur dorsal induziert werden (wodurch das Nieuwkoop Zentrum etabliert wird), während diese Induktion auf der Ventralseite unterbleibt (Martello et al., 2007).

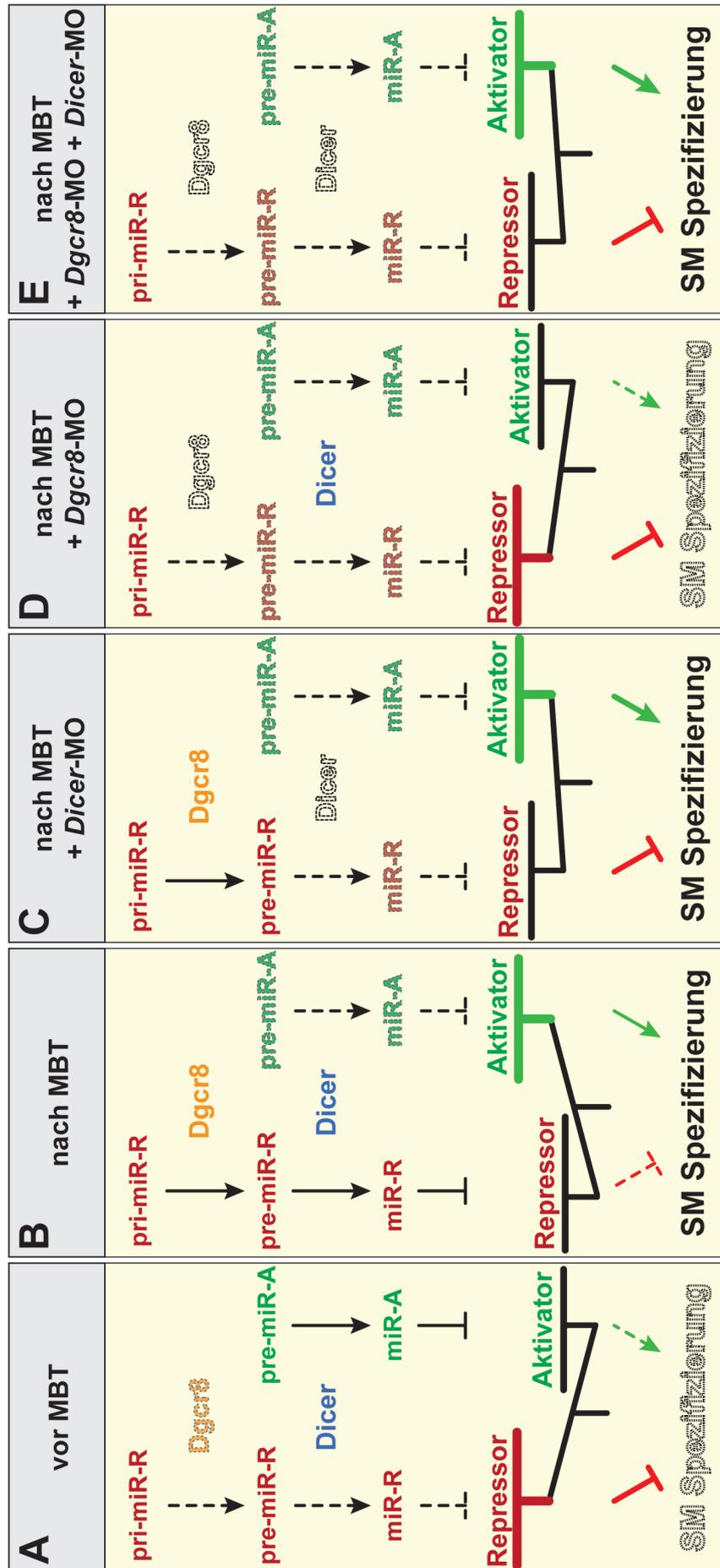


Abb. 41 Potentielles Zusammenspiel von Dicer und Dgcr8 während der SM-Spezifizierung. Für Details siehe Text.

Im Bild dieses Modells lassen sich die beobachteten Phänotypen der Doppelmorphanten von *Dgcr8* und *Dicer* sehr gut erklären. Verhindert man die Translation von *Dgcr8*, kann miR-R auch nach Beginn der zygotischen Transkription nicht synthetisiert werden. Der Repressor wird dadurch nicht unterdrückt und kann die Spezifizierung des SM dauerhaft verhindern (Abb. 40 C). Wird die Translation von *Dicer* verhindert und sinkt dadurch die Konzentration des Enzyms, bleibt dies für das SM folgenlos. Weder miR-R noch miR-A können prozessiert werden, wodurch weder der Aktivator noch der Repressor inhibiert wird. Ist der Aktivator etwas stärker aktiv als der Repressor, kommt es zur Induktion des SMs (Abb. 40 D). Der Doppel-Knockdown von *Dgcr8* und *Dicer* ergibt dasselbe Szenario, weder miR-R noch miR-A können synthetisiert werden. Damit könnte trotz *Dgcr8*-Verlust die Entwicklung normal verlaufen, mit Induktion von SM, GRP-Morphogenese und Symmetriebruch (Abb. 40 E).

3.3 Mögliche miRNA-Kandidaten und deren Ziel-mRNAs für die SM-Spezifizierung

Welche miRNAs könnten an diesem Szenario beteiligt sein? Für die frühe *Xenopus*-Embryogenese wurden zwei miRNAs beschrieben, miR-15/ 16 und miR-427 (miR-430 im Zebrafisch). miR-15/ 16 ist durch das frühe Wnt-Signal auf der dorsalen Seite allerdings nicht im SM verfügbar. Im Zebrafisch reguliert miR-430 *Wnt8*, und auch in *Xenopus* wird *Wnt8* posttranskriptionell reguliert (Wylie et al., 2014; Tian et al., 1999). *Wnt8* ist in der gesamten mesodermalen Randzone aktiv mit Ausnahme der dorsalen Seite, also dem Spemann-Organisator. Daher ist es auch nicht im SM bzw. der Region, die *Foxj1* exprimiert, aktiv. Somit könnte *Wnt8* als Repressor von *Foxj1*/ SM-Spezifizierung fungieren und miR-427 könnte ein Kandidat für die Repressor miR-R sein.

Wiederum andere Faktoren des Wnt-Signalwegs sind, wie dargestellt, zentral für die SM-Spezifizierung, da sie für die Expression von *Foxj1* erforderlich sind. In diesem Bild können auch von Zellen des Spemann-Organisators abgegebene Wnt-Inhibitoren als SM-Repressoren fungieren bzw. frühe, Wnt-induzierende Faktoren als Aktivatoren.

Aufschluss darüber, ob Wnt tatsächlich hinter der „SM-Spezifizierung“ in diesem

Modell steht, könnten Wnt-induzierte siamesische Zwillingen geben. Wird der Wnt-Signalweg ektopisch auf der ventralen Seite induziert, entsteht eine zweite Körperachse, also ein siamesischer Zwilling (Christian et al., 1993; Moon et al., 1998). Die ventrale Seite besitzt somit, mit Ausnahme von aktivem Wnt, alle Faktoren zur Achsenbildung, einschließlich potentiell Wnt-regulierender und *Dgcr8*-abhängiger miRNAs. Im Bild des vorgeschlagenen Modells sollte die Induktion siamesischer Zwillinge daher *Dgcr8*-abhängig sein, was sich durch Funktionsverlustexperimente des *Dgcr8*-MOs experimentell überprüfen lässt. Auch der Einfluss von Dicer lässt sich in diesem Szenario testen. Würden *Dgcr8* und Dicer die SM-Spezifizierung durch die Regulation desselben Signalwegs bzw. Faktors regulieren, müsste ein *Dicer*-Funktionsverlust die Doppelachsenbildung trotz parallelem *Dgcr8*-Knockdown ermöglichen.

Neben verschiedenen Wnt-Signalwegskomponenten könnte weiterhin das ebenfalls für die SM-Spezifizierung benötigte *Pkd2* durch *Dgcr8*-abhängige miRNAs reguliert werden. Studien der Niere konnten belegen, dass auch *Pkd2* durch eine miRNA, miR-17, reguliert wird (Tran et al., 2010). Ob dies auch während der SM-Ausbildung der Fall ist, ließe sich, wie für den Wnt-Signalweg, durch Epistasisexperimente testen. Wird *Pkd2* während der SM-Induktion direkt oder indirekt durch eine miRNA reguliert, sollte ein Funktionsverlust von *Dgcr8* durch eine dorsale Überexpression von *Pkd2* gerettet werden können, einschließlich Wiederherstellung des SM und der *Foxj1*-Expression.

4. Schlussfolgerung der Arbeit

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass *Coco* posttranskriptionell durch miR-15a reguliert wird. Beobachtungen und vorläufige Versuche lassen darauf schließen, dass an der *Coco*-Repression weitere miRNAs beteiligt sind. Für miR-15 und das miR-17~92-Cluster (miR-19a, miR-18a*) konnte die Flow-Abhängigkeit belegt werden. Der Mechanismus, mit dem die miRNAs links aktiviert werden, bleibt jedoch weiter unklar. Ein Kandidat könnte Bic-C sein, das *Coco* Calcium-abhängig vor miRNA-vermittelter Degradation schützen könnte.

Über die Arbeitshypothese hinaus konnte gezeigt werden, dass miRNAs mehrere Funktionen im Prozess der LR-Achsen-Ausbildung wahrnehmen und bereits während der Entwicklung des SM und der GRP eine wichtige Rolle spielen. Hierfür sollten insbesondere die Dgcr8-prozessierten miRNAs wichtig sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass miRNAs eine zentrale Rolle für die LR-Achsen Entwicklung besitzen. Bei der SM-Spezifizierung sind sie vermutlich für die Pufferung antagonistischer Signale notwendig, wie dies in vielen anderen beschriebenen Systemen für komplexe Entwicklungsprozesse der Fall ist. Darüber hinaus sind sie für DIE zentrale Entscheidung innerhalb der LR-Achsen-Entwicklung notwendig: die Frage, ob die Symmetrie gebrochen wird oder nicht. Von daher stellt der Symmetriebruch einen qualitativ einzigartigen Fall unter den miRNA-kontrollierten Prozessen dar.

V. Methoden und Material

V. Teil 1: Methoden

1. Handhabung von *X. laevis*

1.1 Induktion der Ovulation und *in vitro* Befruchtung der Eier

X. laevis Weibchen wurde mindestens drei Tage vor Eiablage das menschliche Hormon Gonadotropin (hCG; humanes Choriongonadotropin) in einer geringen Dosis (50 µl von 10 kU/ 10 ml) verabreicht. Hierdurch wurde das Weibchen langsam zur Eireifung angeregt. Am Abend bevor die Eier gewonnen werden sollten, wurden je nach Größe des Frosches und nach Jahreszeit nochmals 200 bis 700 µl Hormon in den dorsalen Lymphsack injiziert. Die reifen Eier wurden dann ca. 12 Stunden später durch Massieren der Bauchseite des Frosches gewonnen. Dies war pro Frosch für ca. 6-12 Stunden möglich. Bis zur Befruchtung wurden die Eier in einer befeuchteten Kulturschale bei ca. 14-18 °C gehalten.

Um an die für die Befruchtung notwendigen Spermien zu kommen, wurden Männchen Hoden entnommen. Diese wurden in Hochsalzpuffer (1x MBSH) bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Zur *in vitro* Befruchtung wurde ein kleines Stück Hoden zuerst in 1xMBSH zerkleinert und auf dem Gelege verteilt. Durch Zugabe von Niedrigsalzpuffer (0,1x MBSH) wurde die Beweglichkeit der Spermien induziert und der Befruchtungsvorgang aktiviert.

Da die befruchteten *Xenopus*-Zygoten von einer Mukusschicht umgeben waren, welche hinderlich für Manipulationen der Embryonen war, wurde diese nach Ablauf der kortikalen Rotation (nach 45 min) durch die schleimlösende Aminosäure Cystein entfernt. Hierfür wurde eine 2%ige Cysteinlösung (pH 7,99-8,00) für ca. 7 min auf die Embryonen gegeben und diese durch beständiges Schwenken vereinzelt. Darauf folgte dreimaliges Waschen mit 0,1x MBSH um das Cystein wieder zu entfernen. Da die Eier von *Xenopus* durch eine salzhaltige Umgebung an Festigkeit zunehmen und sich so besser injizieren lassen, wurden sie nun in 1x MBSH überführt.

1.2 Injektion der Embryonen

Während der Mikromanipulation wurden die Embryonen in eine 2%ige Zuckerlösung (Ficoll in 1xMBSH) überführt, welche nochmals zusätzlich die Festigkeit erhöhte. Die Injektion fand in 4- bis 8- Zellstadien innerhalb eines Petrischälchens mit Agaroseboden statt. 4- und 8- Zellstadien kennzeichneten sich durch zwei helle (dorsale) und zweidunkle (ventrale) animale Blastomeren aus (Klein, 1987). Da man hierdurch schon die drei späteren Körperachsen definieren konnte, war es möglich gezielt bestimmte spätere Gewebe des Embryos mit der Injektion anzusteuern. Um die spätere GRP zu treffen wurde in die dorsale Randzone (DRZ) bzw. etwas lateraler (C2) injiziert. Die Mikroinjektion wurde mit Glasnadeln durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe eines „Micropipette Puller“ aus einer Glaskapillare (Glass thinW, World Precision Instruments, 1mm Durchmesser) hergestellt. Zur Mikromanipulation wurden sie an einen „Harvard Apparatus“ Injektor angeschlossen. Dieser kann durch einen Druckluftanschluss einen

einstellbaren und zeitlich auf 1sek begrenzten Druck auf die Nadel ausüben. Dieser wurde so eingestellt, dass pro Injektion ein Volumen von 8 nl injiziert wurde. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass bei jeder Injektion dieselbe Menge verabreicht wurde. Zur Absicherung, dass in den korrekten Ort injiziert wurde, wurde ein fluoreszierender Farbstoff (Rhodamindextran, „Cascade Blue“ oder GFP-/ RFP-RNA in einer Konzentration von 50-100 ng/ µl) koinjiziert und später Embryonen aussortiert, bei denen nicht das richtige Gewebe getroffen wurden. Dies geschah mit einem Stereomikroskop mit angeschlossener UV-Quelle (LEJ ebq 100 isolated).

Etwa 30 min nach der Injektion, aber mindestens vor Beginn der Gastrulation wurden die behandelten Embryonen wieder in 0,1x MBSH gesetzt um den Prozess der Exogastrulation zu verhindern. Das 0,1x MBSH wurde mit Antibiotikum versetzt (1:1000 Penicilin-Streptomycin) und darin je nach letztlich gewünschtem Alter bei 14-25 °C gehalten.

Spezielle Behandlung bestimmter Konstrukte vor der Injektion:

Unter 4.4 (Protektor-RNAs); 4.5 (AS miR-107* und miR-145 RNA); 4.6 (*Coco B F1*); 4.7 (pri-miR-15/ 16)

1.3 Fixieren der Embryonen

Hatten die Embryonen das richtige Stadium erreicht, wurden sie mit frisch angesetztem 1x MEMFA (GP-ISH) für 1,5 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und in seltenen Fällen über Nacht bei 4 °C oder in frischem, 4%igem PFA (IF) für eine Stunde in 5 ml Glasfläschchen fixiert. Für eine GP-ISH wurden sie in 100%igen Ethanol überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Behandlung gelagert. Im Fall einer IF wurde das PFA durch zwei fünfzehnminütige Waschschrte mit 1x PBS- entfernt und die Embryonen sofort weiterbehandelt (siehe Methoden 6. IF).

1.4 Funktionsverlust durch Morpholino Oligonukleotide

Morpholino Oligonukleotide (MO) (Gene Tools, LLC, Philomath, USA) werden verwendet um einen partiellen Funktionsverlust eines Gens durchzuführen. Sie sind synthetisch hergestellte Moleküle von ca. 25 Nukleotiden Länge. Ihre Nukleotide ähneln denen von RNAs, sind aber leicht in ihrer Struktur abgewandelt. Hierdurch sind sie stabiler und langlebiger als RNA aber trotzdem in moderaten Dosen nicht toxisch für den Organismus.

Sie sind einzelsträngig und lagern sich an komplementäre Sequenzen von RNAs an. Je nachdem welchen Vorgang sie unterbinden unterscheidet man mehrere Arten von MOs.

Translationsblock-MOs (AUG-MOs) binden an das Startcodon einer mRNA oder in der Nähe davon und verhindern die Anlagerung von Ribosomen und damit die Translation. Dies unterbindet nicht nur die Produktion von zygotisch hergestellten Proteinen sondern auch die von maternalen mRNAs synthetisierten Proteine. Daher wirken sich solche MOs schon auf den Organismus vor dem Mittblastula-Übergang aus.

Eine weitere Klasse an MOs sind „splice-site“ MOs (sp MO), die sich an Exon-Intron- oder Intron-Exon- Übergänge von pre-mRNAs anlagern. Hierdurch verhindern sie das Spleißen und somit die Herstellung von funktionsfähigen Proteinen. Da maternale mRNAs schon gespleißt sind, greift diese Art von MO nicht in die frühe Embryonalentwicklung ein.

Zusätzlich zu den zwei traditionellen MOs wurden zwei weitere Typen von MOs in dieser Arbeit verwendet. Einer davon ist der „target protector“ MO (*TP-MO*). Dieser ist dafür konstruiert Bindestellen von z.B. miRNAs innerhalb von 3'-UTRs abzudecken und unzugänglich zu machen. Die synthetisierten TP MOs (*Coco A-TP-MO-miR-15a* und *Coco B-TP-MO-miR-15a*) wurden beide so konstruiert, dass sie die gesamte Bindestelle blockierten. TP MOs ermöglichen die Analyse der miRNA-Regulation eines spezifischen Gens.

Eine andere Möglichkeit einen miRNA-Verlust durch einen MO durchzuführen ist das Abschirmen der Dicer (oder auch Drosha) - Schnittstelle einer pre-miRNA. Im Fall der miR-15a wurde die Dicer-Schnittstelle geblockt. Der MO verhinderte die generelle Prozessierung der miRNA und konnte daher neben dem zu untersuchenden miRNA-Zielgen auch weitere Zielgene von ihr beeinflussen.

Verwendete MOs für den Ergebnisteil:

| | | | |
|--|----|----------------------------|----|
| <i>Coco1 AUG-MO</i> (Vonica et al., 2007) | 5' | CTGGTGGCCTGGAACAACAGCATGT | 3' |
| <i>Coco2 AUG-MO</i> (Vonica et al., 2007) | 5' | TGGTGGCCTGGAACAGCAGCATGTC | 3' |
| <i>Dicer AUG-MO</i> (Agrawal et al., 2009) | 5' | TGCAGGGCTTTTCATAAATCCAGTGA | 3' |
| <i>miR-15a-MO</i> | 5' | CCCACAAACCATTATGTGCTGCTAC | 3' |
| <i>Coco A-TP-MO^{miR-15a}</i> | 5' | GCACGCAGCACGTAAGTTTCTGT | 3' |
| <i>Coco B-TP-MO^{miR-15a}</i> | 5' | GCACGCGGCACGTAGCGTTTCTGT | 3' |
| <i>Dgcr8 AUG-MO</i> (Agrawal et al., 2009) | 5' | GGGCTACTTCCTCACACTCCTCCAT | 3' |
| <i>dnah9 sp-MO</i> (Vick et al., 2009) | 5' | CATAGGAATCAACTCACTTTTTCTC | 3' |
| <i>Pkhd1 AUG-MO</i> (unpubliziert, O. Wessely) | 5' | TATTGTGTTCTATTCTTACCTTTCT | 3' |

Die MOs wurden pulverförmig geliefert und in ddH₂O gelöst (Stock-Konzentration von 1mM). Hierfür wurden sie ca. 10 min bei 50 - 60 °C aufgewärmt. Anschließend wurden sie aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder in den mitgelieferten Glasfläschen bei RT aufbewahrt. MOs, die eingefroren waren, wurden vor der Injektion bei ca. 50 - 55 °C für 10 min erhitzt.

Konzentrationen der injizierten Moleküle des Ergebnisteils:

| Konstrukt | Molekül | Konzentration |
|--|---|----------------------|
| <i>Coco A F1</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 pg |
| <i>Coco A F2</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 pg |
| <i>Coco A F3</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 pg |
| <i>Coco A F1.1</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 59,2 pg |
| <i>Coco A F2.1</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 64 pg |
| <i>Coco A F3.1</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 – 120 pg |
| <i>Coco B F1</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 pg |
| <i>Coco B F2</i> | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 48 – 80 pg |
| <i>derrière 3'-UTR</i> (volle Länge) | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 – 160 pg |
| <i>Xnr1 3'-UTR</i> (volle Länge) | antisinn RNA ohne poly(A) und CAP | 80 – 160 pg |
| <i>Dicer-MO</i> (Agrawal et al., 2009) | AUG MO | 1,0 – 1,5 pmol |
| <i>Coco-MO 1</i> (Vonica & Brivanlou, 2007) | AUG MO | 0,5 pmol |
| <i>Coco-MO 2</i> (Vonica & Brivanlou, 2007) | AUG MO | 0,5 pmol |
| <i>miR-15a-MO</i> | MO (Dicer Schnittstelle wird verdeckt) | 2,0 pmol |
| <i>Coco A-TP-MO^{miR-15a}</i> | TP-MO | 1,5 pmol |
| <i>Coco B-TP-MO^{miR-15a}</i> | TP-MO | 1,5 pmol |
| <i>miR-107* AS Coco B</i> | RNA ohne poly(A) und CAP | 80 – 160 pg |
| <i>miR-145 AS Coco B</i> | RNA ohne poly(A) und CAP | 80 – 160 pg |
| <i>Pri-miR-15/ 16</i> (Martello et al., 2007) | mRNA | 800 pg |
| <i>hAgo2</i> (Liu et al., 2004) | mRNA | 80 pg |
| <i>dnah9 sp-MO</i> (Vick et al., 2009) | sp-MO | 1,5 – 2,5 pmol |
| <i>Dgcr8-MO</i> (Agrawal et al., 2009) | AUG-MO | 0,5 – 0,75 pmol |
| <i>Dgcr8 Resc.</i> (Agrawal et al., 2009) | mRNA | 1-2 ng |
| <i>pkhd1-MO</i> (O. Wessely, unpubliziert) | AUG-MO | 1,5 pmol |

Konzentrationen der injizierten Moleküle des Ergebnisteils:

| Konstrukt | Molekül | Konzentration |
|---|----------------------------------|----------------------|
| Pri-miR-17~92 (O'Donnell et al., 2005) | mRNA | 800 pg |
| <i>Coco B F2</i> | sinn RNA ohne poly(A) und CAP | 160 pg |
| <i>Coco B F2</i> miR-18a mut. | sinn RNA ohne poly(A) und CAP | 160 pg |
| <i>Coco B F2</i> miR-19a mut. | sinn RNA ohne poly(A) und CAP | 160 pg |
| <i>Coco B F2</i> miR-18a + -19 mut. | sinn RNA ohne poly(A) und CAP | 160 pg |
| <i>Bic-C-ΔSAM</i> (Wessely et. al, 2000) | mRNA | 400 – 640 pg |
| <i>Bic-C-ΔKH</i> (Wessely et al., 2000) | mRNA | 400 – 640 pg |
| <i>Pkd2 resc.</i> (Vick, 2009) | mRNA | 400 pg |

2. „Polymerase Chain Reaktion“ (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde dazu verwendet spezifische cDNA-Fragmente eines Gens zu vervielfältigen, um dieses daraufhin klonieren oder den cDNA-Gehalt verschiedener Stadien oder Gewebe vergleichen zu können. Die cDNA wurde aus isolierter mRNA durch Reverse Transkription gewonnen.

2.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde je nach Stadium 2 - 4 Embryonen in ein Eppendorfgefäß gegeben, das Medium abgezogen und 1 ml Trifast (PEQGold) daraufgegeben. Die Embryonen wurden daraufhin für 10 min inkubiert und anschließend mazeriert. Der Schritt wurde ein Mal wiederholt um dann 200 µl Chloroform hinzu zu geben. Das Gemisch wurde einige Sekunden gevortext, bei RT 5min inkubiert und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Zur Fällung wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und gevortext. Diese konnte dann für 10 min bei RT einwirken. Durch 15minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde die RNA pelletiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet zwei Mal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und 10minütiges Zentrifugieren bei 14.000 rpm und 4 °C gewaschen. Nun wurde das Ethanol wieder entfernt und das Pellet für ca. 5 min an der Luft getrocknet um jegliche Ethanolrückstände zu entfernen. Die RNA wurde nun in 30 µl ddH₂O gelöst. Letztlich musste die Konzentration für die anschließende RT-PCR mit einem Photometer gemessen werden. Die RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2 Konzentrationsmessung von Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren wurde 2 µl der Probe mit 198 µl ddH₂O verdünnt und hiermit die Konzentration durch ein Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Dabei wurde die Absorption der Probe von Licht der Wellenlänge 260 und 280 nm

detektiert. Die zwei Werte wurden in Relation gesetzt und somit die Reinheit der gewonnenen Nukleinsäure bestimmt. Dieser Wert beträgt bei RNA optimaler Weise 1,8 und bei DNA 2,0.

2.3 „Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR)

Durch die RT-PCR wurde mRNA in cDNA umgeschrieben.

Reaktionsansatz:

1 µg RNA
 0,5 µl Hexamer-Oligonukleotide (zufällige Primersequenzen)
 + ddH₂O auf 14 µl

Der Ansatz wurde für 5 min auf 70 °C erhitzt um die RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Daraufhin wurde den Hexameren durch schnelles Abkühlen auf Eis die Anlagerung an die RNA ermöglicht.

Nun wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

| | |
|---------|-----------------------------|
| 5 µl | M-MLV RT 5xPuffer |
| 1,25 µl | 10mM dNTPs |
| 3,75 µl | ddH ₂ O |
| 1 µl | M-MLV Reverse Transkriptase |

Die Mischung wurde für 10 min bei RT inkubiert und dann für 60 min auf 50 °C erhitzt. Während dieser Zeit fand die Reverse Transkription statt. Durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min wurde die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms abgestoppt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.4 PCR-Protokoll

PCR-Standardansatz für Taq-Polymerase:

5 µl 5x GoTaq Puffer
 2,5 µl 2mM dNTPs
 1 µl cDNA (kann angepasst werden)
 1 µl 10mM vorwärtsgerichteter (forward) Primer
 1 µl 10mM reverser Primer
 0,2 µl GoTaq-Polymerase
 mit ddH₂O auf 25 µl auffüllen (beim Standardansatz 14,3 µl)

Die PCR wurde mit einem PCR-Thermocycler durchgeführt. Das PCR-Gemisch wurde erst in das Gerät gestellt sobald dieses die PCR-Ausgangstemperatur von 95 °C erreicht hatte. Ein PCR-Zyklus setzt sich folgendermaßen zusammen: Nach der Aufspaltung der Sekundärstruktur bzw. des DNA-Doppelstrangs (95 °C) kommt es zur Anlagerung der Primer (ca. 58 °C; variiert je nach Schmelztemperatur der Primer) gefolgt von der Vervollständigung des DNA-Einzelstrangs zum Doppelstrang ausgehend von den Primern (72 °C). Je nach Primer wurde ein Standard- oder ein RAMP-Protokoll durchgeführt. Im Standard-Protokoll wurde je Zyklus eine Anlagerungstemperatur gehalten. Beim RAMP-Protokoll wurde ein Gradient von einer hohen zu

einer niedrigeren Temperatur während der jeweiligen Primer-Anlagerungsphase der ersten 4 - 5 Zyklen pro Reaktionsansatz durchlaufen. Für die restlichen Zyklen wurde eine spezifische Anlagerungstemperatur eingestellt. Die RAMP-PCR wurde bei eventuellen Sequenzunterschieden zwischen Primer und cDNA (wenn die Primer z.B. ausgehend von einer DNA-Sequenz von *X. tropicalis* oder der Maus designt wurden und die in der PCR verwendete cDNA von *X. laevis* stammte) oder bei unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen des forward und reversen Primers durchgeführt.

Standard-Protokoll

- 1: 95 °C 1 min
- 2: 95 °C 30 sek
- 3: 58 °C 1 min
- 4: 72 °C 1 min/ 1 kb
- 5: → 2. 35x
- 6: 72 °C 10 min
- 7: 4/ 8 °C für immer

RAMP-Protokoll

- 1: 95 °C 5 min
- 2: 95 °C 30 sek
- 3: 62 °C 5 sek
- 4: 0,5 °C/ sek auf 52 °C
- 5: 72 °C 1 min pro 1 kb
- 6: → 2. 4x
- 7: 95 °C 30 sek
- 8: 58 °C 30 sek
- 9: 72 °C 1 min pro 1 kb
- 10: → 7. 35x
- 11: 72 °C 7 min
- 12: 4/ 8 °C für immer

Die gewonnene, amplifizierte DNA wurde zur Analyse der PCR auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen.

2.5 Gelelektrophorese

Das Gel für die Überprüfung von DNA/ RNA setzte sich je nach Fragmentlänge des Amplifikats/ Nukleotidstücks aus 1 - 2 % in 1xTAE-Puffer gelöster Agarose und 3 µl Ethidiumbromid (4 µg/ ml) pro 100 ml Agarosegel zusammen. Die DNA/ RNA wurde zusammen mit einem Größenmarker (Pst/λ; DNA des λ-Phagen mit Pst I geschnitten erzeugt eine Mischung aus DNA-Stücken mit bekannter Größe) zur Bestimmung der Fragmentlänge aufgetragen. Für die Überprüfung der DNA wurde das Gel in einer Gelkammer mit 1x TAE-Puffer an eine Spannung von ca. 120 Volt bzw. für RNA 135 Volt angelegt. War die Nukleinsäuresequenz weit genug gelaufen, wurde sie unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm detektiert. Hierfür diente ein Transilluminator (TCP 20M, Vilber Lourmat).

2.6 Primer

2.6.1 Primer für Konstrukte des Ergebnisteils (mit Restriktionsschnittstelle)

Coco A 3'-UTR (NM_001044459)

A F1 (737 bp; 3'-UTR bp 1 – 737)

Cl_a I for atcgat gcccaaactgctctacatgtgcc
Xho I rev ctcgag aggggcattttatagcaggaa

A F2 (332 bp; 3'-UTR bp 738 – 1070)

Cl_a I for atcgat ttcttgctataaaaatgccct
Xho I rev ctcgag agcacagatacaacgccttc

A F3 (703 bp; 3'-UTR bp 1070 – 1773)

Cl_a I for atcgat gaaggcgttgtatctgtgct
Xho I rev ctcgag gaaaccagaaaacatctgaaatg

A F1.1 (403 bp; 3'-UTR bp 1 – 403)

Cl_a I for atcgat gcccaaactgctctacatgtgcc
Xho I rev ctcgag cggactggcacagacaatgc

A F2.1 (171 bp; 3'-UTR bp 737 – 908)

Cl_a I for atcgat ttcttgctataaaaatgccct
Xho I rev ctcgag ctagatgcagtgcacacatc

A F3.1 (367 bp; 3'-UTR bp 1070 – 1437)

Cl_a I for atcgat gaaggcgttgtatctgtgct
Xho I rev ctcgag ggacgggatacaaatggtcg

Coco B 3'-UTR

Zur Klonierung der gesamten 3'-UTR:

for tacgacaggaatacgggtgga
rev gagctggcaaccctagaatg

B F1 (350 bp; 3'-UTR bp 137 – 487)

for tcgaacggttctgactgacctt
rev tcaggtacaataaaaaggcagaacagt

derrière 3'-UTR (AF065135; 359 bp; komplett)

for atgtttgctttggagattgttctcatt
rev atgttaaatacacattttatttccaacaatc

***Xnr1* 3'-UTR (NM_001085796; 247 bp; komplett)**

for attctagtgatTTTTactggcctacaaaac
 rev atgCGGCCGCGTtttatagtttattgcaacaaagcc

***pkhd1* (902 bp; kodierend bp 945 - 1846)**

for ggatctcggaatggTTTTcat
 rev tgatggtaaagccaccttgtc

Coco B F2 wurde als Klon (EST clon IMAGp998F2414212Q (EST name: AGENCOURT_10486429; GenBank Acc: BU910663; GenBank gi: 24092577) im pCMV-SPORT6 Vektor; transformiert in DH10B TonA (*E. coli*)) bei „Source BioScience; Life Science“ gekauft.

2.6.2 Primer für in der Diskussion erwähnte Konstrukte**Mutierte *Coco B F2*-Konstrukte**

Primer um komplettes, mutiertes *B F2*-Konstrukt zu erstellen (908 bp; 3'-UTR bp 1339 – 2184)

Xba I for tctagac atgTCAGAacctcccagc
 Not I rev gCGGCCGc gaccCAGGaaaacctgtttg

miR-19a mutiert

for aaatcagcatgacgtccccc
 rev ggacgtcatgctgatttaaattc

miR-18a* mutiert

for gattcactgcaaactttttaag
 rev aagatttgCAGTgaatcttctacg

miR-19a und -18a* mutiert

for aaatcagcatgacgtccccc
 rev ggacgtcatgctgatttaaattc

***Smpd3* (NM_001096194; 557 bp; kodierend bp 1 - 557)**

Xho I for atggttttatacactaccccctttc
 Xba I rev ttaggattcttcttcccctgtgg

3. Klonieren

Durch das Klonieren wurde z.B. ein durch eine PCR amplifiziertes DNA-Stück in einen Vektor eingebracht und das Konstrukt mittels Transformation in Bakterien vervielfältigt. Je nach Vektor ließ sich hieraus mRNA für Injektionen (Expressionsvektor Cs²⁺; Rupp et al., 1994) oder RNA-Sonden (pGEM, Bluescript KS (BKS)) herstellen. Ebenso konnten Expressionsvektoren als DNA in *Xenopus*-Embryonen injiziert werden.

3.1 Präparation der pri-miR-107/ -145 für die Ligation

Im Fall der pri-miRNAs (107*/ 145) wurde jeweils die antisinn- und sinn-Sequenz der pri-miRNA von *X. tropicalis* als DNA bestellt (Sigma; miR-107*: MI0004823; miR-145: MI0004939), da die Fragmente zur herkömmlichen Klonierung mit vorgeschalteter PCR zu kurz waren (miR-107*: 73 bp; miR-145: 86 bp).

Vor der Ligation in den pGEM-T easy Vektor wurde je 5 µl antisinn- und sinn-Strang zusammen pipettiert und für 5 min auf 95 °C zur Lösung von Sekundärstrukturen erhitzt. Anschließend sollten sich die komplementären Sequenzen durch Abkühlen auf 70 °C für 7 min (miR-145) bzw. 15 min (miR-107*) aneinanderlagern. Nach der Reaktion wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

Da für die Ligation in den pGEM-T easy Vektor klebrige Enden in Form von Adenin-Überhängen benötigt werden, welche an den pri-miRNA-Strängen noch nicht angefügt wurden, wurde nun 2 µl der pri-miRNA-Doppelstrang-DNA, 2 µl H₂O, 1 µl 5x GoTaq-Puffer, 1 µl 2 mM dATPs und 0,15 µl GoTaq gemischt und das Ganze für 15 min bei 72 °C zur Herstellung des A-Überhangs durch die Taq-Polymerase aufgewärmt.

Sequenzen:

X. tropicalis miR-107* sinn Cla I/ EcoR I

```
GTTTTTTTTATCGATCTGCTTTTCAGCTTCTTTACAGTGTTGCCTTGTGGCATGGAGTTCAAG
CAGCATTGTACAGGGCTATCAAAGCAGAATTCTTTTTTTTG
```

X. tropicalis miR-107* antisinn EcoR I/ Cla I

```
CAAAAAAAGAATTCTGCTTTTGATAGCCCTGTACAATGCTGCTTGAACTCCATGCCACAAGG
CAACACTGTAAAGAAGCTGAAAGCAGATCGATAAAAAAAC
```

X. tropicalis mir-145 sinn Cla I/ EcoR I

```
GTTTTTTTTATCGATACCTATTTCCTCAAGGTCCAGTTTTTCCCAGGAATCCCTTGGGGTG
CTGTGGTGGGGATTCTTGAAATACTGTTCTTGGGGTGTAGGCGAATTCTTTTTTTTG
```

X. tropicalis miR-145 antisinn EcoR I/ Cla I

```
CAAAAAAAGAATTCGCCTACACCCCAAGAACAGTATTTCCAGGAATCCCCACCACAG
CACCCAAGGGATTCTTGGAATACTGGACCTTGAGGAATAGGTATCGATAAAAAAAC
```

3.2 Ligation

Für die Ligation der in dieser Arbeit aufgeführten und selbst klonierten DNA-Konstrukte wurde der pGEM-T easy (Promega) Vektor verwendet. Dieser wurde als offener Vektor, bereit für die Ligation, geliefert und besitzt einen Thymidin-Überhang an welchen sich ein Adenin-Überhang von PCR-Produkten der Taq-Polymerase anlagern kann.

Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl 2x Ligationspuffer
 1 µl pGEM-T easy Vektor
 1 µl (c)DNA
 0,5 µl T4 DNA Ligase

Damit die Ligase die zugegebene DNA effektiv mit dem Vektor ligieren konnte wurde der Ansatz über Nacht (oder bis zu 3 Tage) bei 4 °C inkubiert. Anschließend konnte er bei -20 °C gelagert oder transformiert werden.

3.3 Transformation

Mit Hilfe einer Transformation wurde die in einen Vektor ligierte DNA in Bakterien eingebracht. Hierfür diente ein durch Rubidium- und Calciumchlorid kompetent gemachter *E. coli* Stamm (*XL1 blue*), welcher aliquotiert bei -80 °C gelagert wurde. Zu 100 µl der nun aufnahmebereiten Bakterien wurde 5 µl der Ligation gegeben, leicht geschüttelt und für 30 min (4 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 Sekunden einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt, damit sie die Fremd-DNA aufnehmen. Nach dem Hitzeschock wurden sie schnell auf Eis gestellt, um sich dort für 2min zu erholen. Anschließend wurde 400 µl SOC-Medium hinzugefügt. Darin konnten sie bei 37 °C für ca. eine Stunde wachsen. Nun waren die Bakterien bereit dazu auf LB-Medium Agaragarplatten ausplattiert zu werden. Diese Platten enthielten neben LB-Medium, 15 g/l Agaragar, 1 ml/l Ampicilin (je nach Plasmid-Resistenzgen), 1 ml/l xGal (lichtempfindliches und künstliches Substrat der β -Galaktosidase. Dieses wurde nur prozessiert, wenn der Vektor keine DNA aufgenommen hatte, seine offenen Enden mit sich selbst ligierten und das in der „Multiple Cloning Site“ enthaltene Galaktosidase-Gen (*LacZ*-Gen) des pGEM-T easy Plasmids von den Bakterien abgelesen werden konnte. Ist das der Fall ist die entstehende Bakterienkolonie blau, wenn nicht ist sie weiß.) und 5 ml/l IPTG (Isopropyl beta D-thiogalaktopyranosid; nicht abbaubare Ersatzsubstanz für Galaktose, welches das Ablesen des Galaktose-Operons und daher des auf dem pGEM-T easy enthaltenen *LacZ*-Gens ermöglicht). Pro Platte wurden 50 – 250 µl der transformierten Bakterienlösung ausgestrichen, welche über Nacht bei 37 °C lichtgeschützt wachsen konnte.

Nach der Blau-Weiß-Selektion wurden nun weiße Bakterienkolonien (mit im Plasmid integrierter DNA) mit Pipettenspitzen aufgenommen und in 3 ml Nährmedium (LB-Medium) mit 100 µg/ml Ampicilin (je nach Plasmid-Resistenzgen) gegeben. Die Bakterien konnten sich nun wieder über Nacht bei 37 °C vermehren.

3.4 DNA-Extraktion aus Bakterien („Mini Präparation“)

Die Extraktion geringer Mengen an DNA aus den Bakterienkolonien dient dazu herauszufinden, welche Plasmide die gewünschte DNA integriert hatten.

Von der gewachsenen Bakterienlösung wurden ca. 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß gefüllt und der Rest bei 4 °C aufbewahrt. Dieses wurde für 5min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 100 µl P1-Puffer mit 100 ng/ml RNase H durch Vortexen gelöst. Für die anschließende Lyse wurden 200 µl P2-Puffer hinzugegeben und bei RT für 5min inkubiert. Zur Neutralisation wurden 150 µl P3-Puffer hinzugegeben, geschüttelt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Ausgefällene Proteine und Schmutz wurden durch Zentrifugieren bei 14.000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur DNA-Fällung mit 1 ml eisgekühltem, 100%igem Ethanol versetzt und bei -20 °C für mindestens 30 min gelagert. Nun wurde die DNA für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet bis jeglicher Ethanol verflüchtigt war und dann in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

Die extrahierte DNA wurde durch Restriktionsverdau auf das im Plasmid integrierte DNA-Stück untersucht. Dies funktionierte entweder anhand der Größe und/ oder auch

durch spezifische Restriktionsschnittstellen innerhalb des Fragments.

3.5 Restriktionsverdau

Der Verdau setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|---------|---|
| 5 µl | Plasmid-DNA (bzw. 1µg DNA) |
| 2 µl | 10x Restriktionsenzym-puffer |
| 0,2 µl | 100x BSA |
| 0,5 µl | Restriktionsenzym (10 U/ µl) |
| 12,3 µl | H ₂ O (auf Endvolumen von 20 µl) |

Der Ansatz wurde für ca. 2 Stunden bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde 2 µl DNA-Ladepuffer hinzugegeben und die DNA durch Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

3.6 Herstellung größerer Mengen an Plasmid-DNA („Midi-Präparation“)

Mögliche Kandidaten aus 3.5, die Plasmide mit integrierter DNA aufgenommen hatten, wurden nochmal in größerem Umfang vervielfältigt. Hierfür wurde 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicilin und einer kleinen Menge der getesteten Bakterienlösung aus 3.5 angeimpft. Diese wurde wieder über Nacht bei 37 °C hochgezogen, um dann die DNA mit Hilfe eines Kits (PureYield Midiprep von Promega) zu isolieren.

Die gewachsene Bakterienkultur wurde in einem Beckman-Gefäß bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 3 ml Resuspensionslösung gelöst. Zur Lyse wurden weitere 3 ml Zelllyselösung hinzugegeben, leicht geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Letztlich wurde die Lösung durch Zugabe von 5 ml Neutralisationslösung auf einen neutralen pH-Wert gebracht. Diese sollte für 2 - 3 min bei RT einwirken. Nun wurde für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.

Für das weitere Verfahren wurde ein Vakuumprotokoll verwendet. Mit diesem wurde die DNA durch an ein Vakuum angelegte Säulen aufgereinigt. Jeglicher Schmutz wurde durch eine erste Säule („Clearing Column“) abgefangen und die DNA durch eine sich darunter befindende zweite Säule („Binding Column“) aufgenommen. Durch 5 ml „Endotoxin Removal Wash“ und anschließende 20 ml „Column Wash Solution“ wurde die DNA gereinigt. Anschließend wurde sie durch 400 µl warmes (50 - 60 °C) ddH₂O wieder aus der Säule gelöst und in ein Eppendorfgefäß gesaugt.

Zur Sicherstellung, dass die aufgereinigte DNA das gewünschte DNA Fragment enthielt und es durch die Taq-PCR keine Lesefehler gab, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Dies geschah extern durch die Firmen MWG-Biotech AG oder Microsynth (bzw. Seqlab) mittels der Sanger-Methode.

Sollte ein Fragment in einen anderen Vektor kloniert werden, wurde es erst aus dem alten durch Restriktionsverdau ausgeschnitten (100 µl Ansatz), auf ein Agarosegel aufgetragen und aus diesem dann extrahiert (Easy Pure, Biozym). Anschließend wurde das isolierte Fragment zur Sondenherstellung in den Bluescript KS oder zur mRNA-Herstellung in den Cs²⁺ (Rupp et al, 1994) ligiert, transformiert und durch Midi-präparation vervielfältigt. Wie z.B die pri-miR-17~92 (O'Donnell et al, 2005). Sie wurde vom cDNA3 Topo Vektor durch Verdau an den EcoR V und Hind III-Schnittstellen in den Bluescript KS bzw. Cs²⁺ (ebenfalls mit EcoR V und Hind III verdaut) transferiert.

4. Herstellung von RNA

4.1 Linearisierung von Plasmid-DNA

Für die RNA-Herstellung wurden linearisierte Plasmide verwendet um zu verhindern, dass die RNA später Teile des Vektors enthält.

Der Verdau wurde mit Enzymen von Promega durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

10 µg Plasmid
 10 µl Restriktions-Puffer
 3 µl Enzym
 1 µl BSA

wurde mit ddH₂O (bidestilliertes Wasser) auf 100 µl aufgefüllt.

Verdaut wurde bei 37 °C über Nacht.

4.2 Aufreinigung der Linearisierung

Um aus dem Verdau die linearisierte DNA aufzureinigen wurde zu den Ansätzen 10 µl 5 M Ammoniumacetat und 220 µl 100%igen Ethanol pipettiert und dies für mindestens 15 min bei -20 °C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde nun durch 20 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet kurz trocknen gelassen und dann mit 20 µl ddH₂O versetzt. Durch Resuspendieren wurde es gelöst und daraufhin die Konzentration gemessen.

4.3 mRNA

Für die Herstellung von mRNA mit poly(A)-Schwanz und CAP wurde mit Hilfe eines Kits von Biozym (AmpicAP High Yield Message Maker Kit) eine *in vitro* Transkription durchgeführt und die mRNA später durch eine Phenol/ Chloroform-Mischung aufgereinigt.

Der *in vitro* Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg (1 µl) linearisiertes Plasmid
 2 µl 10x Transkriptionspuffer
 5 µl Cap/NTP PreMix
 2 µl 100 mM DTT
 0,5 µl RiboGuard RNase Inhibitor
 mit ddH₂O auf 20 µl auffüllen (→ 7,5 µl H₂O).

Die Reaktion wurde für 2 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Danach wurden DNA-Reste durch 1 µl DNase1 für 15 min bei 37 °C entfernt.

Für die Aufreinigung wurden zu der hergestellten mRNA 115 µl ddH₂O, 15 µl Ammoniumacetat (5 M) zur Ausfällung und zusätzlich 150 µl eines Phenol/ Chloroform Gemisches gegeben. Das Ganze wurde kurz gevortext und dann 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Hierdurch bildeten sich zwei Phasen aus, von welchen die obere, wässrige Phase mit der enthaltenen mRNA abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Zur weiteren Aufreinigung wurden 150 µl Chloroform hinzu pipettiert, wieder kurz gevortext und 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß gebracht und zur Fällung mit 150

μ l Isopropanol versehen. Die Mischung wurde wieder kurz gevortext und für mindestens 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach dieser Zeit wurde die mRNA durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für ca. 30sek bis 1min getrocknet um es dann in 20 μ l ddH₂O aufzunehmen. Von der gelösten mRNA wurden 1 oder 2 μ l Aliquots hergestellt, die dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

Mit 2 μ l der mRNA wurde ihre Konzentration gemessen. Außerdem wurde das Vorhandensein der mRNA durch Auftragen auf ein Agarosegel überprüft. Dieses wurde frisch hergestellt und in eine Gelkammer mit frischem 1x TAE-Puffer an eine Spannung von 135 Volt für ca. 5 - 10 min angelegt.

4.4 Protektor-RNAs

Die Protektor-RNAs wurden wie unter 4.1 beschrieben linearisiert und daraufhin RNA ohne Poly(A)-Schwanz und CAP hergestellt. Beide stabilisierenden Strukturen wurden weggelassen, damit es nicht zu eventuellen Störungen bei der Hybridisierung an die endogene *Coco* 3'-UTR kommt.

Der *in vitro* Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|--|------------------------|
| 1 μ g (1 μ l) | linearisiertes Plasmid |
| 4 μ l | 5xTranskriptionspuffer |
| 0,5 μ l | RNAse Inhibitor |
| 2 μ l | rNTPs |
| 2 μ l | 100mM DTT |
| 2 μ l | RNA-Polymerase |
| auf 20 μ l mit ddH ₂ O auffüllen (7,5 μ l). | |

Dieser wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 Stunden inkubiert, um dann für 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ die restliche Plasmid-DNA mit 1 μ l DNase1 zu verdauen.

Daraufhin wurde die RNA gefällt indem 30 μ l ddH₂O, 5 μ l 5 M Amoniumacetat und 165 μ l 100%iger, reinster Ethanol zugegeben wurden und das Gemisch für mindestens 30min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurde. Hierauf wurde die RNA durch einen 25 minütigen Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Der dabei entstehende Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 20 μ l ddH₂O gelöst. Die Protektor-RNA wurde aliquotiert (1 - 2 μ l) und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die Konzentrationsmessung und Überprüfung der RNA auf einem Agarosegel wurde mit je 2 μ l durchgeführt.

Vor der Injektion wurde lediglich die Protektor-RNA *Coco B F1* mit ddH₂O verdünnt und für 5 min auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Dieser Schritt wurde durchgeführt, da bei dieser Sequenz die Gefahr von starker Sekundärstrukturbildung auf Grund der miR-107* Bindestellen bestand.

4.5 Präparation der AS miR-107* und miR-145 RNA-Konstrukte

Die antisinn-RNA-Konstrukte für miR-107* (*AS miR-107**) und miR-145 (*AS miR-145*) wurden bei Sigma als RNA bestellt.

Die Sequenzen waren folgende:

```

AS miR-107*           5' GGGAGCUUCGUCACAGGCUUGCCCUAG 3'
AS miR-145          5' UAGGAAUUCUGGGAAAUCUAGAUAA 3'

```

Die Protektor-RNAs wurden als Feststoff geliefert, mit ddH₂O gelöst (5 µg/ µl), à 5 µl in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Kurz vor ihrer Injektion wurde die RNA 1:50 verdünnt und entweder auf Eis gehalten (*AS miR-145*) oder im Fall von *AS miR-107** 5 min bei 65 °C aufgewärmt und dann auf Eis gestellt. Das kurze Erhitzen sollte Sekundärstrukturen des Konstrukts lösen, damit es sich an die 3'-UTR anlagern konnte. Nur bei *AS miR-107** aber nicht *miR-145* bestand die Gefahr der Ausbildung von starken Sekundärstrukturen. Anschließend konnte der Injektionsansatz hergestellt werden.

4.6 Präparation von *Coco B F1* vor der Injektion

Coco B F1 enthält fünf hintereinanderfolgende miR-107* Bindestellen, welche starke Sekundärstrukturen ausbilden können (siehe 4.5). Daher wurde die Protektor RNA dieses Fragments vor der Injektion für 5min auf 65 °C erhitzt, danach schnell auf Eis abgekühlt und dort bis zur Injektion gehalten.

4.7 Präparation der pri-miR-15/ 16 vor der Injektion

Wie alle miRNA-Vorläufermoleküle (pri- und pre-miRNAs) besteht auch endogene pri-miR-15/16 aus Haarnadelstrukturen in welchen die miRNAs enthalten sind. Diese sind essentiell für die Prozessierung durch Drosha und Dicer und müssen daher vor-liegen um funktionsfähige, reife miRNAs herzustellen. Deswegen mussten diese Haarnadelstrukturen auch vor Injektion der RNA des Überexpressionskonstrukts erzeugt werden. Hierfür wurde die RNA verdünnt oder mehrere Aliquots vereint um ein größeres Volumen herzustellen (ca. 10 µl insgesamt), da die Feuchtigkeit von 1 µl-Aliquots sofort verflüchtigen würde. Der nächste Schritt bestand nämlich in einem kurzen Erhitzen auf 65 °C für 5 min. Daraufhin wurde die RNA langsam, durch Ausstellen des Thermoblocks, auf RT (25 °C) abgekühlt. Die Abkühlungsphase wurde durch den hierfür verwendeten Metallthermoblock im Vergleich zu einem Eppendorf-Thermoblock auf ca. 2 - 3 Stunden hinausgezögert. Somit wurde den pri-miRNAs mehr Zeit gegeben Haarnadelstrukturen zu bilden. Daraufhin wurde die RNA auf Eis gestellt und der Injektionsansatz hergestellt.

4.8 DNA- Konstrukte dieser Arbeit

4.8.1 Benötigte Enzyme zur Herstellung von mRNA/ Sonde aus im Ergebnisteil verwendeten Konstrukten

| (m)RNA | Vektor | Restriktionsenzym | | RNA-Polymerase | |
|--|------------------|-------------------|-------|-------------------------------|------|
| | | antisinn | sinn | antisinn | sinn |
| <i>Coco A F1</i> | pGEM | Sac II | - | sp6 | - |
| <i>Coco A F2</i> | pGEM | Sal I | - | T7 | - |
| <i>Coco A F3</i> | pGEM | Sal I | - | T7 | - |
| <i>Coco A F1.1</i> | pGEM | Sac II | - | sp6 | - |
| <i>Coco A F2.1</i> | pGEM | Sal I | - | T7 | - |
| <i>Coco A F3.1</i> | pGEM | Sal I | - | T7 | - |
| <i>Coco B F1</i> | pGEM | Sal I | - | T7 | - |
| <i>Coco B F2</i> | CMV-SPORT6 | Sal I | Not I | T7 | sp6 |
| <i>derrière 3'-UTR (volle Länge)</i> | pGEM | Sac II | - | sp6 | - |
| <i>Xnr1 3'-UTR (volle Länge)</i> | pGEM | Sac II | - | sp6 | - |
| <i>Dicer (Sonde)</i> (Gessert et al., 2010) | pSC-B | Not I | - | T3 | - |
| <i>Pri-miR-15/ 16 (mRNA)</i> (Martello et al., 2007) | Cs ²⁺ | - | Asc I | - | sp6 |
| <i>Pri-miR-15/ 16 (Sonde)</i> (Martello et al., 2007) | BKS | Hind III | Asc I | T3 | sp6 |
| <i>hAgo2 (mRNA)</i> (Liu et al., 2004) | pcDNA3-Myc | - | Apa I | - | T7 |
| <i>Dgcr8 Resc. (mRNA)</i> (Agrawal et al., 2009) | Cs ²⁺ | - | Not I | - | sp6 |
| <i>Dgcr8 Resc. (volle Länge Sonde)</i> (Agrawal et al., 2009) | Cs ²⁺ | Cla I | Not I | T7 (ohne p(A)/ T3 (mit p(A))) | sp6 |
| <i>pkhd1 (Sonde)</i> | pGEM | SacI I | Sal I | sp6 | T7 |
| <i>Coco kodierend (Sonde)</i> | pGEM | Sac II | - | sp6 | - |
| <i>Pitx2c (Sonde)</i> | BSK | Not I | - | T7 | - |
| <i>Xnr1 (Sonde)</i> | BSK | Not I | - | T7 | - |
| <i>Bic-C (Sonde)</i> | BSK | Not I | - | T7 | - |
| <i>myoD (Sonde)</i> (Rupp et al., 1994) | | Hind III | - | T7 | - |
| <i>Foxj1 (Sonde)</i> | BSK | Xho I | - | T7 | - |
| <i>Xnr3 (Sonde)</i> (Smith et al., 1995) | pGEM5Zf(-) | EcoR I | - | T7 | - |
| <i>dnah9 (Sonde)</i> | pGEM | Apa I | - | sp6 | - |
| <i>Tektin2 (Sonde)</i> | BSK | Not I | - | T7 | - |

4.8.2 Benötigte Enzyme zur Herstellung von mRNA/ Sonde aus im Diskussions- teil verwendeten Konstrukten

| (m)RNA | Vektor | Restriktionsenzym | | RNA-Polymerase | |
|--|------------------|-------------------|-------|----------------|------|
| | | antisinn | sinn | antisinn | sinn |
| <i>Pri-miR-17~92</i> (mRNA) (O'Donnell et al., 2005) | Cs ²⁺ | - | Not I | - | sp6 |
| <i>Pri-miR-17~92</i> (Sonde) (O'Donnell et al., 2005) | BKS | Hind III | Not I | T7 | T3 |
| <i>Coco B F2 miR-18a mut.</i> | pGEM | - | Apa I | - | sp6 |
| <i>Coco B F2 miR-19a mut.</i> | pGEM | - | Apa I | - | sp6 |
| <i>Coco B F2 miR-18a + -19 mut.</i> | pGEM | - | Apa I | - | sp6 |
| <i>Smpd3</i> (Sonde) | pGEM | Sac II | Sac I | sp6 | T7 |
| <i>Bic-C-ΔSAM</i> (mRNA) (Wessely & De Robertis, 2000) | Cs ²⁺ | - | Not I | - | sp6 |
| <i>Bic-C-ΔKH</i> (mRNA) (Wessely & De Robertis, 2000) | Cs ²⁺ | - | Not I | - | sp6 |
| <i>Pkd2 resc.</i> (mRNA) (Philipp Vick, unveröffentlicht) | Cs ²⁺ | - | Not I | - | sp6 |

5. „Whole Mount - *In Situ* Hybridisierung (WMISH)

Die ISH diente dazu das Expressionsmuster auf mRNA-Ebene sichtbar zu machen. Das Protokoll wurde durch Abänderungen des Vorgehens im De Robertis Labor erstellt (Belo et al., 1997).

5.1 Sondenherstellung

Zur Detektion einer endogenen mRNA benötigt man eine markierte antisinn-Sonde, die an diese bindet. In unserem Fall handelte es sich um synthetisierte RNA bei der an die Uridin-Basen teilweise Digoxigenin gekoppelt ist. Als Kontrolle dienten komplementäre sinn-Sonden.

Zur Herstellung wurde die Vektor-DNA entsprechend 4.1 linearisiert und 4.2 aufgereinigt.

Von der linearisierten DNA wurden 1 µg für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Der Ansatz hierfür setzte sich außerdem wie folgt zusammen:

- 4 µl 5x Transkriptionspuffer
- 0,5 µl RNasin (40 U/ µl)
- 2 µl Dig-Lable Mix (Digoxigenin-markierte dNTPs)
- 2 µl 100 mM DTT
- 2 µl RNA-Polymerase (10 U/ µl; je nach Orientierung des DNA-Fragments T7, sp6 oder T3)
- 7,5 µl ddH₂O (auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen)

Die *in vitro* Transkription fand bei 37 °C für 2 Stunden statt.

Anschließend wurde für 15 min die linearisierte Plasmid-DNA durch DNase I bei 37 °C verdaut. Nun wurde die Sonde mittels Zugabe von 30 µl H₂O, 5 µl 5 M Ammonium-

acetat und 165 µl 100% reinstes Ethanol für mindestens 30 min bei -20 °C gefällt. Dann wurde das Gemisch bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 50 µl eines Formamid-Wasser-Gemisches (1:1) aufgenommen. 2 µl hiervon dienten zur gelelektrophoretischen Kontrolle, um die Menge der synthetisierten RNA abschätzen zu können. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Sonde bei -80 °C gelagert.

5.2 Tag 1 – Embryonen aufnahmebereit für die Sonde machen und Sondenhybridisierung

Der erste Tag der WMISH wurde auf Eis durchgeführt, um den Abbau endogener RNA zu verhindern.

Die in Ethanol oder Methanol aufbewahrten Embryonen mussten im ersten Schritt über eine Ethanol-/ Methanolreihe (100, 75, 50, 25%) in wässrige Lösung (PBS- mit Tween; PBSw) gebracht werden. Die Waschschriffe betruhen für jede Alkohol- lösung mindestens 5min. Anschließend wurde weitere drei Mal mit kaltem PBSw gewaschen. Embryonen mit einem Hohlraum (Blastulae und Neurulae), in welchem sich die Sonde ansammeln konnte, wurden aufpräpariert. Bei Neurulae wurde der Kopf transversal abgeschnitten, bei Blastulae ein kleines Loch in die animale Kappe gestochen. Um die Zellen der Embryonen aufnahmefähig für die Sonde zu machen wurden Membranproteine durch Proteinase K-Behandlung (1 ml einer zimmerwarmen PBSw-Lösung mit 10 µg/ ml Proteinase K) bei RT für 15 min verdaut. Durch eine Lösung bestehend aus PBSw und Glycin (2 mg/ ml) wurde die Aktivität des Enzyms inhibiert. Dieses und Reste der Proteinase K wurden durch dreimaliges Waschen mit PBSw auf Eis entfernt. Zur Stabilisierung der Embryonen wurden sie nun für 15min in 4%iger PFA -PBS- -Lösung, welche zusätzlich mit 0,2%Glutaraldehyd versetzt wurde, refixiert. Zur Entfernung der Fixanz wurde ein kurzer und drei darauffolgende, mindestens 5 minütige Waschschriffe angeschlossen. Zur Äquilibrierung in Hybridisierungslösung (Hyb-Mix) gab es einen 5 Minuten langen Inkubationsschritt in 1 ml 1:1 mit PBSw gemischtem Hyb-Mix. Hierauf folgte das Überführen in 100%ige Hybridisierungslösung (1 ml). Das anschließende Vorhybridisieren fand für 3 Stunden bei 65 °C (60 °C für kurze pri-miRNA Sonden) in einem Wasserbad statt. Nach dieser Zeit wurde der Hyb-Mix entfernt und durch 1 ml frische, mit antisinn-/ sinn-Sonde versetzte Lösung ersetzt. Für den Hyb-Mix mit Sonde wurden 1 - 3 µl der synthetisierten Digoxigenin- markierten Sonde in 1 ml Lösung, zum Auflösen von Sekundärstrukturen, für 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurde sie schnell auf Eis abgekühlt um ihrem Abbau vorzu- beugen. Die darauffolgende Hybridisierung der Sonde an die nachzuweisende mRNA fand für gewöhnlich bei 70 °C über Nacht statt. Für die kurzen pri-miRNA-Sonden wurden geringere Temperaturen von 60 °C gewählt.

5.3 Tag 2 – Auswaschen unspezifisch gebundener Sonde und Anti- körperbehandlung

Der zweite Tag der WMISH bestand darin ungebundene Sonde auszuwaschen bzw. falschgebundene Sonde von ihrer Hybridisierungsstelle zu lösen. Dies geschah durch Waschen mit Lösungen unterschiedlichen Salzgehalts und bei unterschiedlichen Temperaturen (70 bzw. 60 °C und RT).

Die ersten Schritte wurden bei 70 (/ 60 °C pri-miRNAs) durchgeführt. Begonnen wurde damit die Sonden-Hyb-Mix Lösung durch frische Hybridisierungslösung zu ersetzen. Die Sondenlösung konnte wiederverwertet werden indem sie bei -80 °C aufbewahrt

wurde. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt, um den Hyb-Mix dann wiederum durch 800 µl Hybridisierungslösung auszutauschen. Die Waschschrift wurden jeweils 30min durchgeführt. Daraufhin wurde in 5min Abständen drei Mal 400 µl 2x SSC mit einem pH Wert von 4,5 auf die Lösung gegeben. Diese Mischung wurde wieder abgezogen und das Gläschen mit 2x SSC (pH-Wert 7,0) aufgefüllt. Nach 30 min wurde dieses durch frisches 2x SSC (pH 7,0) ausgetauscht und wieder für 30 min gewaschen. Nun folgten zwei kurze (10 min) Waschschrift mit MABw (Maleinsäure mit 0,1% Tween) bei RT und zwei lange (30 min) bei 70 (bzw. 60 °C für pri-miRNAs). MABw wurde nun bei RT durch PBSw ersetzt. Mit diesem wurde zwei Mal für 10 min und einmal für 5 min gewaschen. Dies geschah wieder bei RT. Nun waren die Embryonen bereit für den Antikörper-Blocking-Puffer. Von diesem wurde 1 ml zu den Embryonen gegeben und dies für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert, um mögliche unspezifische Bindestellen für den mit der alkalischen Phosphatase gekoppelten Antidigoxigenin-Antikörper unzugänglich zu machen. Der Antikörper wurde mit Blocking-Lösung verdünnt und auf die Embryonen gegeben (Antikörper 1:10.000 in Blocking-Lösung verdünnt). Der Antikörper konnte nun über Nacht an die Digoxigenin markierten Sonden bei 4 °C binden.

5.4 Tag 3 – Auswaschen von unspezifisch gebundenem Antikörper und Färbung

Am dritten Tag wurde falsch/ nicht gebundener Antidigoxigenin-Antikörper entfernt, um Fehlfärbungen zu vermeiden. Letztlich wurde eine Färbelösung zu den Embryonen gegeben, welche ein Substrat der alkalischen Phosphatase enthält. Wird dieses durch sie umgesetzt, entsteht dabei ein blauer Farbstoff.

Die Behandlung an Tag drei begann mit sechsmaligem Auswaschen des Antikörpers durch PBSw mit 0,1%BSA auf einem Taumelmischroller. Zwischen den Waschschriftten wurde eine Inkubationszeit von 45min gewährt. Danach folgten zwei Waschschriftte à 30 min mit 1x PBS⁻ oder PBSw und daraufhin wieder zwei à 30 min mit AP1-Puffer (Puffer der Alkalischen Phosphatase mit einem pH-Wert von 9,5). Nun wurde in jedes Well von 12er Wellplatten 1,5 ml eines 1:1 Gemisches aus AP1-Puffer und BM-Purple Lösung gegeben. Die Farbreaktion fand auf Grund des lichtempfindlichen Substrats im Dunkeln statt. Je nach Schnelligkeit der Färbung konnten die Platten bei RT, 4 °C oder auch 37 °C gehalten werden.

War die Färbung wie gewünscht, wurden die Färbereaktion durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS⁻ abgestoppt. Zur Auswertung oder für Photographien wurden die Embryonen in 1x PBS⁻ belassen oder zur Aufbewahrung in 100% Ethanol/ Methanol überführt und bei -20 °C gelagert.

5.5 miRCURY LNA-Sonde („locked nucleic acid“)

Die LNA-Sonde wurde verwendet um die reife miR-15a nachzuweisen. LNA-Sonden besitzen eine im Vergleich zur RNA-Sonde veränderte Riboseuntereinheit, welche das Molekül unbeweglicher und stabiler macht. Dies führt zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur und ist daher ideal um kleine RNAs, wie miRNAs, nachzuweisen. Eine miRCURY LNA-Sonde ist ca. 22 bp lang. In ihrer Sequenz ist ca. jede dritte Base durch eine LNA ersetzt (Hoppler et al., 2012).

Sie wurde in einer Konzentration von 25 µM in 10 µl geliefert. Hier wurde sie dann nochmals mit 10 ml HybMix auf eine Konzentration von 25 nM verdünnt, war daraufhin einsetzbar und wurde bei -20 °C gelagert. Nach der Vorhybridisierung wurden 200-300 µl Sonde in ein Gläschen gegeben. Die Sonde konnte bis zu 3 Mal wiederverwertet

werden (Hoppler et al., 2012).

miR-15a LNA-Sequenz: CACAAACCATTCTGTGCTGCTA
Hybridisierungstemperatur: +/- 70 °C

Die WMISH wurde entsprechend der unter 5. beschriebenen WMISH durchgeführt.

5.6 Histologische Vibratomschnitte

Um oberflächliche von Färbung tiefer Gewebe unterscheiden zu können, wurden histologische Schnitte von Embryonen der WMISHs angefertigt.

Hierfür wurde der zu schneidende Embryo zuerst im Ganzen fotografiert und anschließend in Gelatine-Albumin-Lösung (Vibratommix-Lösung; VIB-Mix) äquilibriert. D.h. der Embryo wurde in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml VIB-Mix gegeben und gewartet bis er abgesunken war. In diesem konnte er für einige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Gleichzeitig wurde 1 ml VIB-Mix unter vorsichtigem Vortexen (keine Blasenbildung) mit 72 µl Glutaraldehyd-Lösung (25%ig) versehen. Die Mischung wurde schnell in eine Kammer aus zwei Metallwinkeln (ca. 2x1 cm) gegossen. Nun musste der Block für ca. 10 - 15 min antrocknen, woraufhin der Embryo auf ihn transferiert werden konnte. Der überschüssige VIB-Mix um den Embryo wurde abgezogen und eine zweite Lage aus 1 ml VIB-Mix mit 72 µl Glutaraldehyd darauf gegeben. Das Ganze durfte dann wiederum für ca. eine weitere Stunde aushärten.

Nun wurde der Block mit dem mittig liegenden Embryo getrimmt, sodass der Embryo mit der gewünschten Seite nahe der Schnittebene zu liegen kam und der Block kleiner wurde. Dieser wurde ins Vibratom eingespannt, mit 1x PBS⁻ bedeckt und dann 30 - 35 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden durch Eindeckeln mittels Mowiol-Lösung und Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert und haltbar gemacht.

6. Immunfluoreszenz (IF)

Die Immunfluoreszenz diente dazu Proteine mit Hilfe eines gegen das Protein selbst gerichteten Primären Antikörper (AK) und eines Sekundären, mit einer Fluophore gekoppelten und gegen den Primären AK gerichteten AK, nachzuweisen.

Je nachdem welches Gewebe des Embryos angeschaut werden sollte, wurden die fixierten, in 1x PBS⁻ gehaltenen Embryonen präpariert. Für Analysen der GRP mussten die Embryonen halbiert werden um die GRP zugänglich für die Antikörper zu machen, da es sich um ein innenliegendes Gewebe handelt. Die Embryonen wurden dann in 24er Wellplatten mit vorgelegtem 1x PBS⁻ überführt. Das 1x PBS⁻ wurde abgezogen und durch 1x PBS⁻ mit 0,1% TritonX ersetzt. Mit diesem wurden sie zwei Mal für 15 min gewaschen um die Zellen aufnahmefähig zu machen. Anschließend wurde für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit 300 µl einer 1:10 Mischung aus CAS-Block und 1x PBS⁻/ 0,1% TritonX geblockt. Darauf folgte die Inkubation im primären Antikörper (anti-acetyliertes α -Tubulin IgG aus der Maus; 1:700). Dieser wurde mit unverdünntem CAS-Block verdünnt und davon 200 µl zu den Embryonen gegeben. Je nach Antikörper wurde er über Nacht bei 4 °C oder auch länger auf den Embryonen gelassen. Durch dreimaliges Waschen für 15 min bei RT mit 1x PBS⁻ wurde der Antikörper wieder entfernt. Die anschließende Behandlung mit sekundärem Antikörper (CY3 anti-mouse IgG aus dem Schaf; 1:250) fand entweder für ca. 3 Stunden

bei RT, bei 4 °C über Nacht oder länger statt. Hierfür wurde der Antikörper mit unverdünntem CAS-Block verdünnt und 200 µl davon auf die Wells gegeben. Da der sekundäre Antikörper lichtempfindlich ist, fand die Inkubation im Dunkeln statt. Letztlich wurde dieser dann durch drei Mal 15minütiges Waschen in 1x PBS⁻ ausgewaschen. Sollte eine zweite Färbung mit einem primären und sekundären Antikörper stattfinden, wurde die Prozedur ab dem zweimaligen Waschen mit 1x PBS⁻/ 0,1% TritonX wiederholt.

Für eine Phalloidinfärbung wurde dieses 1:40 mit 1x PBS⁻ verdünnt und 200 µl davon für mindestens 2 Stunden bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C auf den Embryonen belassen und restliches, ungebundenes Phalloidin anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS⁻ entfernt. Phalloidin benötigte auf Grund der an ihn gebundenen Fluorophore Alexa 488 keine Behandlung mit einem sekundären Antikörper.

Die Anfärbung von Serotonin-enthaltenden Vesikeln auf der *Xenopus*-Haut wurde mit dem Lecitin PNA („peanut agglutinin“) durchgeführt. Dieses erkennt spezielle Zuckerverbindungen (Gal-b-(1-3)-GalNAc; Galaktose-b-(1,3)-N-Acetyl-D-Galaktosamin) und lagert sich an diese an. Der verwendete Antikörper war schon mit der Fluorophore Alexa Fluor 568 gekoppelt und benötigte daher keine sekundäre Antikörperbehandlung (Dubaiissi et al., 2014). Er wurde 1:500 mit CAS-Block (unverdünnt) gemischt und über Nacht bei 4 °C auf den Embryonen belassen.

7. Fotodokumentation, Bildbearbeitung und Auswertung

Für die Aufnahme von Bildern der Embryonen wurden sie in 1x PBS⁻ überführt und in Schälchen mit Agaroseboden transferiert. Embryonen wurden nach einer WMISH mit einem Zeiss Stereomikroskop (Discovery.V12) und einer daran angeschlossenen Farbkamera (AxioCam HRc, Zeiss) fotografiert. Vibratomschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop dokumentiert. Aufnahmen von IFs wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 700) aufgenommen. Die Bilder wurden im TIF-Format gespeichert und anschließend mit dem Adobeprogramm Photoshop CS5.1 bearbeitet. Die Bildbearbeitung bestand in der Ausrichtung der Embryonen, Veränderung der Helligkeit und des Kontrasts sowie Vereinheitlichung des Hintergrunds. Dabei wurde die Protein- oder mRNA-Expression nicht auf eine Art und Weise verändert, dass das Ergebnis hierdurch verfälscht wurde.

Die Expressionsmuster der Embryonen, im speziellen von *Coco*, *Xnr1* und *derrière* (L<R, R=L und R<L) wurde blind ausgewertet, d.h. ohne die Behandlung des jeweiligen auszuwertenden Gläschens mit Embryonen zu kennen.

8. Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde der Mehrfelder Chi-Quadrat-Test verwendet (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>).

Die Signifikanzen wurden wie folgt angegeben:

| | | |
|-----------------------|-----|--------|
| signifikant | * | <0,05 |
| hoch signifikant | ** | <0,01 |
| sehr hoch signifikant | *** | <0,001 |

V. Teil 2: Material

1. Chemikalien

| | |
|--|-------------------|
| anti-acetyliertes α Tubulin IgG | Sigma |
| Agaragar | Roth |
| Agarose Standard (Froschexperimente) | Roth |
| Agarose LE (Gelelektrophorese) | Genaxxon |
| Albumin Fraktion V (BSA) | AppliChem |
| Ammoniumacetat | Roth |
| Ampicillin-Natriumsalz | AppliChem |
| Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments | Roche |
| BM-Purple AP-Substrat | Roche |
| Boehringer-Blocking-Reagenz | Roche |
| BSA (bovine serum albumin; 100x) | Promega |
| Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| Calciumnitrat-Tetrahydrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| CAS-Block | Invitrogen |
| Cadscade Blue, Dextran | LifeTechnologies |
| CHAPS | AppliChem |
| Chloroform | Merck |
| CY3 anti-mouse IgG | Sigma |
| Cystein | AppliChem |
| Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) | Promega |
| Digoxigenin-dNTP-Labeling Mix | Roche und Promega |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth |
| Dithioreitol (DTT) | Promega |
| DNase I | Thermo Scientific |
| Essigsäure | AppliChem |
| Ethanol | Roth |
| Ethidiumbromid | Roth |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Roth |
| Ethylenguanintetraessigsäure (EGTA) | Roth |
| Ethyl-p-Aminobenzoat | Sigma |
| Ficoll | AppliChem |
| Formaldehyd | Roth |
| Formamid | Roth |
| Gelatine | Merck |
| Gentamycin | Biochrome |
| Glucose | AppliChem |
| Glutaraldehyd (25%) | Roth |
| Glycerol | Roth |
| Glycin | AppliChem |
| HCG (humanes Choriongonadotropin) | Sigma |
| Hefeextrakt | Roth |
| Hefe-RNA (Torula) | Sigma |
| Heparin | AppliChem |
| Hepes | AppliChem |
| IPTG (Isopropyl beta D-thiogalaktopyranosid) | Roth |

| | |
|---|------------------------------|
| Isopropanol (2-Propanol) | Roth |
| Kaliumacetat ($C_2H_3KO_2$) | Roth |
| Kaliumchlorid (KCl) | AppliChem |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | AppliChem |
| Ladepuffer für DNA IV (10x) | AppliChem |
| Lambda-DNA | Promega |
| Ligase (T4-Ligase) | Promega |
| LNA Sonde (miRCURY) | Exiqon A/S |
| Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) | Merck |
| Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) | Roth |
| Maleinsäure | Roth |
| Methanol | Roth |
| M-MLV Reverse Transkriptase | Promega |
| Mowiol | Hoechst |
| Natriumacetat | Roth |
| Natriumcitrat | Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem |
| Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) | Merck |
| Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Roth |
| Natriumhydrogenphosphat Monohydrat ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$) | Roth |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Roth |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth |
| Oligonukleotide (Primer) | MWG-Biotech AG |
| Oligonukleotide (AS RNA) | Sigma |
| Paraformaldehyd (PFA) | AppliChem |
| Penstrep (Penicillin und Streptomycin) | Gibco |
| Phalloidin (Alexa488 konjugiert) | Molecular Probes, Invitrogen |
| Phenol/ Chorophorm (Rotiphenol) | Roth |
| Proteinase K | Roth |
| Restriktionsenzyme und Puffer | Promega |
| Rhodamin B Dextran | Molecular Probes |
| RNAse A | Roth |
| RNAse Inhibitor (RNAsin) | Promega |
| Saccharose | AppliChem |
| Salzsäure (37% HCl) | Merck |
| sp6-RNA-Polymerase | Promega |
| T3-RNA-Polymerase | Promega |
| T7-RNA-Polymerase | Promega |
| Taq-DNA-Polymerase (GoTaq) | Promega |
| Thymol | Serva |
| Trifast PeqGold | PEQLAB Biotech |
| Tris | AppliChem |
| Tris-HCl | AppliChem |
| TritonX-100 | Serva |
| Trypsin | Roth |
| Trypton | AppliChem |
| Tween20 | Roth |
| X-Gal | Roche |
| Ziegenserum | Sigma |

2. Kits

Amplicap TM sp6 High Yield Massage Make Kit
 innuPREP Gel Extraction Kit
 mMMESSAGE mMACHINE sp6
 pGEM T easy Vektor
 PureYield Plasmid Midiprep System

Biozym
 Analytik Jena
 Ambion
 Promega
 Promega

3. Laborutensilien

| | |
|---|-----------------------------|
| Bakterienschalen | Greiner |
| Deckgläschen | Roth |
| Einmal-Injektions-Kanülen, Sterican (0,4x20mm, Gr.20) | B.Braun |
| Einmalspritzen, Omnifix-F (1 ml) | B.Braun |
| Glaskapillare (Durchmesser 1 mm; Glass thinW) | World Precision Instruments |
| Glaswaren Schott | Duran |
| Leitfähige Haftaufkleber | Plano |
| Multiwell Platten (12 und 24 Well) | Greiner |
| Objektträger, geschnitten | Knittel |
| Petrischalen (Plastik) | Multimed |
| Pipetten (Einweg-Pasteurpipetten) | Sarstedt |
| Pipettenspitzen | Sarstedt/ Eppendorf |
| Präparationsbesteck | Fine Science Tools |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf/ Sarstedt |
| Skalpelle | Bayha |
| Sterilfilter | Schleicher und Schuell |

4. Lösungen

4.1 Lösungen für Froschexperimente (für Methoden 1.)

5x MBSH (Modified Barth's Saline mit HEPES; pH 7,4)

440 mM NaCl; 50 mM HEPES; 12 mM NaHCO₃; 5 mM KCl; 4 mM MgSO₄ 7H₂O; 2 mM CaCl₂; 1,7 mM Ca(NO₃)₂ 4H₂O; 0,5 mg/ ml Streptomycin; 500 U/ ml Penicillin

10x MEMFA (pH 7,4)

1 M MOPS, 20 mM EGTA; 10mM MgSO₄; 3,7% (v/v) Formaldehyd

1x MEMFA (für Fixierung)

10% 10x MEMFA; 10% Formamid; 80% ddH₂O; wurde täglich frisch hergestellt und bei 4 °C gelagert

Gurdon's Puffer

88 mM NaCl; 15 mM HEPES; 15 mM Tris-HCl; 1 mM KCl

Ficoll-Lösung

2% Ficoll wurde in 1x MBSH gelöst; wurde kalt gelagert

Cystein-Lösung (pH 7,99 - 8,00)

2% Cystein in ddH₂O; wurde täglich frisch hergestellt

4.2 Lösung für Gelelektrophorese (zu Methoden 2.)

50x TAE-Puffer (Tris Acetate EDTA Electrophoresis Buffer; pH 8,5)

2 M Tris (pH 8,5); 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA (pH 8,0)

4.3 Lösungen für Klonierungen (zu Methoden 3.)

SOC-Medium (Super Optimal Catabolite Repression Medium)

20 g/l Trypton; 10 mM MgSO₄; 10 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 3,6 g/l Glukose

LB-Medium (Lysogeny Broth Medium; pH 7,0)

10 g/l Trypton; 12,2 mM NaCl; 5 g/l Hefeextrakt; vor Gebrauch 0,1% Ampicillin (oder entsprechendes Antibiotikum) wurde hinzugegeben und bei 4 °C gelagert sobald es Ampicillin (oder entsprechendes Antibiotikum) enthält

P1 (Resuspensions-Puffer)

50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA (pH 8,0); 100 µg/ml RNase A; wurde bei 4 °C gelagert

P2 (Lysis-Puffer)

0,2 M NaOH; 1% (v/v) SDS

P3 (Neutralisations-Puffer; pH 5,1)

3 M Kaliumacetat

4.4 Lösungen für GP-ISH (zu Methoden 5.)

Alkalische Phosphatase Puffer (AP1 Puffer; pH 9,5)

100 mM TRIS (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂

Blocking-Lösung

10 g Boehringer-Blocking-Reagenz wurde in 800 ml 1x PBS⁻ bei 65 °C gelöst; 100 ml hitzeinaktiviertes Ziegen Serum hinzugegeben; mit 1x PBS⁻ auf 1 l aufgefüllt; steril filtriert; 1 ml Tween20 hinzugegeben; bei -20 °C gelagert

Hybridisierungslösung (HybMix; pH 7,0)

12,5 M Formamid; 10 g/ l Boehringer-Blocking-Reagenz; 0,75 M NaCl; 75 mM Natriumcitrat; 0,5% (v/v) Tween20; 5 mM EDTA; 0,1% CHAPS; 1 mg/ ml Torula-RNA (wurde vorher 1 g/ l in ddH₂O unter Rühren für 2 h bei 65 °C gelöst; in 1 l HybMix kamen davon 100 ml); 0,1 mg/ ml Heparin; bei -20 °C gelagert

MAB (Maleic Acid Buffer; pH 7,5)

150 mM NaCl; 100 mM Maleinsäure

Mowiol

30 g Mowiol; 120 ml 1x PBS⁻ (pH 7,2 – 7,4); bei 50 - 60 °C 16 Stunden rühren; 75 ml Glycin; unter Rühren wurden einige Thymolkristalle zugegeben; warme Lösung filtriert; bei 4 °C gelagert

10x PBS⁻ (Phosphate Buffered Saline; pH 7,4)

1,37 M NaCl; 100 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄

1x PBSw (pH 7,4)

10% 10x PBS⁻; 0,1% (v/v) Tween 20

20x SSC (Sodium Citrate Buffer; pH 7,0)

3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat

Vibratom-Einbettmedium (VIB Mix)

2,2 g Gelatine; 135 g Albumin Fraktion A (BSA); 90 g Saccharose; in 450 ml 1x PBS⁻ gelöst. Aliquotiert bei -20 °C gelagert.

4.5 Lösungen zur Immunfluoreszenz**1x PBS⁻/ 0,1% Triton (pH 7,4)**

10% 10x PBS⁻; 0,1% (v/v) Triton-X-100

5. Organismen**5.1 Afrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)**

Die verwendeten *X. laevis* Frösche stammten großteils von Guy Pluck, *Xenopus express*, Ancienne Ecole de Vernassale, Le Bourg 43270, Vernassal, Haute-Loire, Frankreich und Nasco, 901 Janesville Ave., Fort Atkinson, WI 53538, USA. Einige wurden auch vom IGB (Leibnitz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei), Ökophysiologie und Aquakultur, Müggelseedamm 310, Berlin, Deutschland bezogen. Die adulten Frösche wurden artgerecht gehalten und einem zwölfstündigen Lichtzyklus ausgesetzt. Entsprechend der Deutschen Richtlinien und Gesetzes (§6, Artikel 1, Satz 2, Nr. 4 des Tierschutzgesetzes) waren Pflege, Handhabung und

experimentelle Manipulationen von *Xenopus laevis* Embryonen durch das Regierungspräsidium Stuttgart, Deutschland (Vorhaben A379/12 ZO „Molekulare Embryologie“) genehmigt.

5.2 Bakterienstamm *XL1 blue (E. coli)*

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]

Aus dem Bakterienvorrat des Instituts für Zoologie, Embryologie der Universität Hohenheim.

6. Geräte

| | |
|--------------------------------------|--|
| Fluoreszenz-Stereomikroskop: | Leica MZ FLIII |
| Fluoreszenzmikroskop: | Zeiss Axio Imager. M1 |
| Gelkammern: | ThermoEC Classic TM mit Consort Elektrophoresis Power E844 |
| Kaltlichtquellen: | Zeiss, KL1500LCD |
| Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop: | LSM700 |
| Micropipette Puller: | P-87, Sutter Instrument |
| Mikromanipulator (Injektor): | Harvard Apparatus Medical Systems Research Products PLI-100 bzw. PLI- 100A und dazu Stereomikroskope von Zeiss Stemi2000 und Stemi2000C |
| Photometer: | Eppendorf Bio Photometer |
| Stereomikroskop: | Zeiss Discovery V.12 SteREO |
| Taumelroller: | TRM-V, IDL |
| Thermocycler: | Peltier Thermal Cycler PTC-200; Biozym |
| Vibratom: | Leica VT 1000 |

7. Internetdatenbanken und Programme

7.1 Internetdatenbanken

| | |
|----------|---|
| Xenbase: | http://www.xenbase.org/entry/ |
| NCBI: | http://www.ncbi.nlm.nih.gov |
| miRBase: | http://www.mirbase.org |

Materialien nach Schneider, 2013 angepasst und erweitert.

VI. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| 3'- (bzw. 5'-) UTR | 3'- (bzw. 5'-) gelegene untranslatierte Region |
| Abb. | Abbildung |
| AP | anterior-posterior |
| AS | antisinn |
| <i>BicC</i> | <i>Bicaudal C</i> |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| Ca ²⁺ | Calciumionen |
| <i>Cerl-2</i> | <i>Cerberus like 2</i> |
| <i>dand5</i> | <i>DAN domain family member 5</i> |
| <i>Dgcr8</i> | <i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i> |
| d.h. | das heißt |
| DNA | deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure) |
| <i>dnah9</i> | <i>dynein axonemal heavy chain 9</i> |
| DRZ | dorsale Randzone |
| DV | dorso-ventral |
| EST | Expressed Sequence Tag |
| evtl. | eventuell |
| <i>Foxj1</i> | <i>forkhead box j1</i> |
| GRP | gastrocoel roof plate (Archenterondachplatte) |
| <i>hAgo2</i> | <i>human Argonaut 2</i> |
| IF | Immunfluoreszenz |
| KV | Kupffersches Vesikle |
| LR | Links-Rechts |
| miRNA (miR) | micro ribonucleic acid (mikro Ribonucleinsäure) |
| MBT | midblastula-transition (Mittblastula Übergang) |
| MO | Morpholino Oligonucleotid |
| <i>myoD</i> | <i>Myogene Factor D</i> |
| mRFP | membrane red fluorescent protein |
| mRNA | messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonucleinsäure) |
| NVP | nodal vesicular parcel |
| PC1 | Polycystin1 |
| PC2 | Polycystin2 |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion) |
| <i>Pitx2c</i> | <i>paired like homeodomain transcription factor 2c</i> |
| <i>pkd1</i> | <i>polycystic kidney disease 1</i> |
| <i>pkd111</i> | <i>polycystic kidney disease 1 like 1</i> |
| <i>Pkd2</i> | <i>polycystic kidney disease 2</i> |
| <i>pkhd1</i> | <i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i> |

| | |
|-------------|--|
| PNC | posterior notochord (posteriore <i>Chorda dorsalis</i>) |
| pre-miRNA | precursor miRNA (Vorläufer miRNA) |
| pri-miRNA | primary miRNA (ursprüngliche miRNA) |
| qRT-PCR | quantitative real time PCR (quantitative Echtzeit-PCR) |
| RNA | ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase PCR |
| s. | siehe |
| SM | superficial mesoderm (oberflächliches Mesoderm) |
| sog. | sogenannt |
| SPM | Seitenplattenmesoderm |
| St. | Stadium |
| TP-MO | target protector MO (MO für den Schutz des Zielgens) |
| u.a. | unter anderem |
| vgl. | vergleiche |
| WMISH | „Whole Mount <i>In Situ</i> Hybridisation“ (Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridisierung) |
| <i>Wnt</i> | <i>wingless-type MMTV integration site family</i> |
| <i>Xnr1</i> | <i>Xenopus nodal related 1</i> |
| <i>Xnr3</i> | <i>Xenopus nodal related 3</i> |
| z.B. | zum Beispiel |

VII. Quellenangaben

- Agrawal, R., Tran, U., & Wessely, O. (2009).** The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus* pronephros development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*. *Development (Cambridge, England)*, 136(23), 3927–3936. doi:10.1242/dev.037432
- Anyatonwu, G. I., & Ehrlich, B. E. (2004).** Calcium signaling and polycystin-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(4), 1364–1373. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.043
- Bates, T. J. D., Vonica, A., Heasman, J., Brivanlou, A. H., & Bell, E. (2013).** *Coco* regulates dorsoventral specification of germ layers via inhibition of TGF β signalling. *Development (Cambridge, England)*, 140(20), 4177–4181. doi:10.1242/dev.095521
- Bazzini, A. A., Lee, M. T., & Giraldez, A. J. (2012).** Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6078), 233–237. doi:10.1126/science.1215704
- Bell, E., Muñoz-Sanjuán, I., Altmann, C. R., Vonica, A., & Brivanlou, A. H. (2003).** Cell fate specification and competence by *Coco*, a maternal BMP, TGF β and Wnt inhibitor. *Development (Cambridge, England)*, 130(7), 1381–1389.
- Bellomo, D., Lander, A., Harragan, I., & Brown, N. A. (1996).** Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 205(4), 471–485. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199604)205:4<471::AID-AJA10>3.0.CO;2-4
- Belo, J. A., Silva, A. C., Borges, A. C., Filipe, M., Bento, M., Goncalves, L., et al. (2009).** Generating asymmetries in the early vertebrate embryo: the role of the Cerberus-like family. *The International journal of developmental biology*, 53(8-9-10), 1399–1407. doi:10.1387/ijdb.072297jb
- Belo, J. A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., & De Robertis, E. M. (1997).** Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mechanisms of development*, 68(1-2), 45–57.
- Bergmann, C., Senderek, J., Küpper, F., Schneider, F., Dornia, C., Windelen, E., et al. (2004).** PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Human mutation*, 23(5), 453–463. doi:10.1002/humu.20029
- Beyer, T., Thumberger, T., Schweickert, A., & Blum, M. (2012).** Connexin26-mediated transfer of laterality cues in *Xenopus*. *Biology open*, 1(5), 473–481. doi:10.1242/bio.2012760

- Beyer, T., Danilchik, M., Thumberger, T., Vick, P., Tisler, M., Schneider, I., et al. (2012). Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus*. *Current biology : CB*, 22(1), 33–39. doi:10.1016/j.cub.2011.11.027
- Beyer, T. (2011). The role of serotonin and gap junctions in left-right development of *Xenopus laevis*, 1–138. Dissertation an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften
- Bisgrove, B. W., Snarr, B. S., Emrazian, A., & Yost, H. J. (2005). Polaris and Polycystin-2 in dorsal forerunner cells and Kupffer's vesicle are required for specification of the zebrafish left-right axis. *Developmental biology*, 287(2), 274–288. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.047
- Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., et al. (2007). Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation; research in biological diversity*, 75(2), 133–146. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00124.x
- Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T., & Schweickert, A. (2014a). The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development (Cambridge, England)*, 141(8), 1603–1613. doi:10.1242/dev.100560
- Blum, M., Schweickert, A., Vick, P., Wright, C. V. E., & Danilchik, M. V. (2014b). Symmetry breakage in the vertebrate embryo_ When does it happen and how does it work? *Developmental biology*, 1–15. doi:10.1016/j.ydbio.2014.06.014
- Boskovski, M. T., Yuan, S., Pedersen, N. B., Goth, C. K., Makova, S., Clausen, H., et al. (2013). The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality. *Nature*. doi:10.1038/nature12723
- Brennan, J., Norris, D. P., & Robertson, E. J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes & development*, 16(18), 2339–2344. doi:10.1101/gad.1016202
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., et al. (1999). The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development (Cambridge, England)*, 126(6), 1225–1234.
- Cao, J., Shen, Y., Zhu, L., Xu, Y., Zhou, Y., Wu, Z., et al. (2012). miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. *Nature cell biology*, 14(7), 697–706. doi:10.1038/ncb2512
- Cartwright, J. H. E., Piro, N., Piro, O., & Tuval, I. (2007). Embryonic nodal flow and the dynamics of nodal vesicular parcels. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 4(12), 49–55. doi:10.1098/rsif.2006.0155

- Cerutti, H., & Casas-Mollano, J. A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current genetics*, 50(2), 81–99. doi:10.1007/s00294-006-0078-x
- Chauvet, V., Tian, X., Husson, H., Grimm, D. H., Wang, T., Hieseberger, T., et al. (2004). Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *Journal of Clinical Investigation*, 114(10), 1433–1443. doi:10.1172/JCI200421753
- Chen, Y., & Schier, A. F. (2001). The zebrafish Nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature*, 411(6837), 607–610. doi:10.1038/35079121
- Cheng, A. M., Thisse, B., Thisse, C., & Wright, C. V. (2000). The lefty-related factor Xatv acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in xenopus. *Development (Cambridge, England)*, 127(5), 1049–1061.
- Choi, W. Y., Giraldez, A. J., & Schier, A. F. (2007). Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5848), 271–274. doi:10.1126/science.1147535
- Christian, J. L., & Moon, R. T. (1993). Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of Xenopus. *Genes & development*, 7(1), 13–28.
- Chu, A. S., & Friedman, J. R. (2008). A role for microRNA in cystic liver and kidney diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3585–3587. doi:10.1172/JCI36870
- Collignon, J., Varlet, I., & Robertson, E. J. (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature*, 381(6578), 155–158. doi:10.1038/381155a0
- Constam, D. B. (2014). Regulation of TGF β and related signals by precursor processing. *Seminars in cell & developmental biology*, 32, 85–97. doi:10.1016/j.semcdb.2014.01.008
- Cooke, J. (2004). Developmental mechanism and evolutionary origin of vertebrate left/right asymmetries. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(2), 377–407.
- Dubaissi, E., & Papalopulu, N. (2011). Embryonic frog epidermis: a model for the study of cell-cell interactions in the development of mucociliary disease. *Disease models & mechanisms*, 4(2), 179–192. doi:10.1242/dmm.006494
- Dubaissi, E., Rousseau, K., Lea, R., Soto, X., Nardeosingh, S., Schweickert, A., et al. (2014). A secretory cell type develops alongside multiciliated cells, ionocytes and goblet cells, and provides a protective, anti-infective function in the frog embryonic mucociliary epidermis. *Development (Cambridge, England)*, 141(7), 1514–1525. doi:10.1242/dev.102426

- Dweep, H., Sticht, C., & Gretz, N. (2013). In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Current genomics*, 14(2), 127–136. doi:10.2174/1389202911314020005
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149(3), 515–524. doi:10.1016/j.cell.2012.04.005
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B., & Yost, H. J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development (Cambridge, England)*, 132(6), 1247–1260. doi:10.1242/dev.01663
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 351–379. doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103
- Fedeles, S. V., Tian, X., Gallagher, A.-R., Mitobe, M., Nishio, S., Lee, S. H., et al. (2011). A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nature Publishing Group*, 43(7), 639–647. doi:10.1038/ng.860
- Field, S., Riley, K.-L., Grimes, D. T., Hilton, H., Simon, M., Powles-Glover, N., et al. (2011). Pkd111 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2. *Development (Cambridge, England)*, 138(6), 1131–1142. doi:10.1242/dev.058149
- Finnerty, J. R., Wang, W.-X., Hébert, S. S., Wilfred, B. R., Mao, G., & Nelson, P. T. (2010). The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *Journal of molecular biology*, 402(3), 491–509. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.051
- Fliegauf, M., Benzing, T., & Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), 880–893. doi:10.1038/nrm2278
- Garcia-Gonzalez, M. A., Menezes, L. F., Piontek, K. B., Kaimori, J., Huso, D. L., Watanick, T., et al. (2007). Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *Human molecular genetics*, 16(16), 1940–1950. doi:10.1093/hmg/ddm141
- Gerdes, J. M., Davis, E. E., & Katsanis, N. (2009). The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*, 137(1), 32–45. doi:10.1016/j.cell.2009.03.023
- Gessert, S., Bugner, V., Tecza, A., Pinker, M., & Kühl, M. (2010). FMR1/FXR1 and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development. *Developmental biology*, 341(1), 222–235. doi:10.1016/j.ydbio.2010.02.031

- Giraldez, A. J. (2006). Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5770), 75–79. doi:10.1126/science.1122689
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, 27(1), 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017
- Grüdl, K. (2012). Die Analyse der embryonalen Pkd2-Funktion auf die Festlegung der Links-Rechts-Achse in *Xenopus laevis*, 1–65. Diplomarbeit an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(8), 509–524. doi:10.1038/nrm3838
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., & Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 103–113. doi:10.1038/nrg732
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., et al. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), 887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043
- Harris, P. C. (1999). Autosomal dominant polycystic kidney disease: clues to pathogenesis. *Human molecular genetics*, 8(10), 1861–1866.
- Harris, P. C. (2002). Molecular basis of polycystic kidney disease: PKD1, PKD2 and PKHD1. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11(3), 309–314.
- Hashimoto, H. (2004). The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 131(8), 1741–1753. doi:10.1242/dev.01070
- Herranz, H., & Cohen, S. M. (2010). MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. *Genes & development*, 24(13), 1339–1344. doi:10.1101/gad.1937010
- Hiesberger, T., Gourley, E., Erickson, A., Koulen, P., Ward, C. J., Masyuk, T. V., et al. (2006). Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), 34357–34364. doi:10.1074/jbc.M606740200
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., & Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*, 125(1), 33–45. doi:10.1016/j.cell.2006.03.002
- Ho, J. J. D., & Marsden, P. A. (2014). Competition and collaboration between RNA-binding proteins and microRNAs. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 5(1), 69–86. doi:10.1002/wrna.1197

- Hojo, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Sumeragi, A., Shimada, A., Tsukahara, T., et al. (2007). Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in me-daka Kupffer's vesicle. *Development, growth & differentiation*, 49(5), 395–405. doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00937.x
- Hoppler, S., & Vize, P. D. (2012). *Xenopus Protocols*. Humana Press.
- Inui, M., Martello, G., & Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4), 252–263. doi:10.1038/nrm2868
- Jones, C. M., Kuehn, M. R., Hogan, B. L., Smith, J. C., & Wright, C. V. (1995). Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, 121(11), 3651–3662.
- Kamura, K., Kobayashi, D., Uehara, Y., Koshida, S., Iijima, N., Kudo, A., et al. (2011). Pkd11 complexes with Pkd2 on motile cilia and functions to establish the left-right axis. *Development (Cambridge, England)*, 138(6), 1121–1129. doi:10.1242/dev.058271
- Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Bitzer, E., Horie, S., Witzgall, R., & Blum, M. (2005). Lack of a laterality phenotype in Pkd1 knock-out embryos correlates with absence of polycystin-1 in nodal cilia. *Differentiation; research in biological diversity*, 73(8), 425–432. doi:10.1111/j.1432-0436.2005.00048.x
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 368–376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009
- Kedde, M., & Agami, R. (2008). Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(7), 899–903.
- Kimelman, D. (2006). Mesoderm induction: from caps to chips. *Nature Reviews Genetics*, 7(5), 360–372. doi:10.1038/nrg1837
- Kitajima, K., Oki, S., Ohkawa, Y., Sumi, T., & Meno, C. (2013). Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Developmental biology*. doi:10.1016/j.ydbio.2013.05.011
- Klein, S. L. (1987). The first cleavage furrow demarcates the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos. *Developmental biology*, 120(1), 299–304.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), 17442–17452. doi:10.1074/jbc.M110.107821
- Kozlova, D. (2012). Expressionsanalyse von Pkd1 und Pkd111 im Frosch *Xenopus laevis*, 1–62. Bachelorthesis an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften

- Lancaster, M. A., & Gleeson, J. G. (2009). The primary cilium as a cellular signaling center: lessons from disease. *Current opinion in genetics & development*, 19(3), 220–229. doi:10.1016/j.gde.2009.04.008
- Lee, S.-O., Masyuk, T., Splinter, P., Banales, J. M., Masyuk, A., Stroope, A., & LaRusso, N. (2008). MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3714–3724. doi:10.1172/JCI34922DS1
- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., & Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*, 82(5), 803–814.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., et al. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), 1437–1441. doi:10.1126/science.1102513
- Logan, M., Pagán-Westphal, S. M., Smith, D. M., Paganessi, L., & Tabin, C. J. (1998). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell*, 94(3), 307–317.
- Lohr, J. L., Danos, M. C., & Yost, H. J. (1997). Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development (Cambridge, England)*, 124(8), 1465–1472.
- Long, S., Ahmad, N., & Rebagliati, M. (2003). The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development (Cambridge, England)*, 130(11), 2303–2316.
- Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V., Potter, S. S., et al. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature*, 381(6578), 158–161. doi:10.1038/381158a0
- Lund, E., & Dahlberg, J. E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 71, 59–66. doi:10.1101/sqb.2006.71.050
- Lund, E., Liu, M., Hartley, R. S., Sheets, M. D., & Dahlberg, J. E. (2009). Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(12), 2351–2363. doi:10.1261/rna.1882009
- Lund, E., Sheets, M. D., Imboden, S. B., & Dahlberg, J. E. (2011). Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in *Xenopus laevis*. *Genes & development*, 25(11), 1121–1131. doi:10.1101/gad.2038811
- Lustig, K. D., Kroll, K., Sun, E., Ramos, R., Elmendorf, H., & Kirschner, M. W. (1996). A *Xenopus* nodal-related gene that acts in synergy with noggin to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development (Cambridge, England)*, 122(10), 3275–3282.

- M**aisonneuve, C., Guilleret, I., Vick, P., Weber, T., Andre, P., Beyer, T., et al. (2009). Bicaudal C, a novel regulator of Dvl signaling abutting RNA-processing bodies, controls cilia orientation and leftward flow. *Development (Cambridge, England)*, 136(17), 3019–3030. doi:10.1242/dev.038174
- Marcet, B., Chevalier, B., Coraux, C., Kodjabachian, L., & Barbry, P. (2011a). MicroRNA-based silencing of Delta/Notch signaling promotes multiple cilia formation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(17), 2858–2864.
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E., Cibois, M., et al. (2011b). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology*, 13(6), 693–699. doi:10.1038/ncb2241
- Marjoram, L., & Wright, C. (2011). Rapid differential transport of Nodal and Lefty on sulfated proteoglycan-rich extracellular matrix regulates left-right asymmetry in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)*, 138(3), 475–485. doi:10.1242/dev.056010
- Marques, S., Borges, A. C., Silva, A. C., Freitas, S., Cordenonsi, M., & Belo, J. A. (2004). The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes & development*, 18(19), 2342–2347. doi:10.1101/gad.306504
- Martello, G., Zacchigna, L., Inui, M., Montagner, M., Adorno, M., Mamidi, A., et al. (2007). MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature*, 449(7159), 183–188. doi:10.1038/nature06100
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., & Brueckner, M. (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell*, 114(1), 61–73.
- Montino, M. A. T. (2011). Die Rolle von xBic-C bei der Links-Rechts Achsenspezifizierung, 1–98. Diplomarbeit an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften
- Moon, R. T., & Kimelman, D. (1998). From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(7), 536–545. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199807)20:7<536::AID-BIES4>3.0.CO;2-I
- N**auli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature genetics*, 33(2), 129–137. doi:10.1038/ng1076
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., & Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*, 418(6893), 96–99. doi:10.1038/nature00849
- O**'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), 839–843. doi:10.1038/nature03677

- Oki, S., Hashimoto, R., Okui, Y., Shen, M. M., Mekada, E., Otani, H., et al. (2007). Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, 134(21), 3893–3904. doi:10.1242/dev.009464
- P**ark, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., et al. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), 201–205. doi:10.1038/nature10198
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell*, 25(5), 635–646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011
- Petrocca, F., Vecchione, A., & Croce, C. M. (2008). Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer research*, 68(20), 8191–8194. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1768
- Piazzon, N., Maisonneuve, C., Guilleret, I., Rotman, S., & Constam, D. B. (2012). Bicc1 links the regulation of cAMP signaling in polycystic kidneys to microRNA-induced gene silencing. *Journal of molecular cell biology*, 4(6), 398–408. doi:10.1093/jmcb/mjs027
- 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(6721), 707–710. doi:10.1038/17820
- Pierce, M. L., Weston, M. D., Fritsch, B., Gabel, H. W., Ruvkun, G., & Soukup, G. A. (2008). MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evolution & development*, 10(1), 106–113. doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00217.x
- Q**ian, F., Germino, F. J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., & Germino, G. G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature genetics*, 16(2), 179–183. doi:10.1038/ng0697-179
- Quigley, I. K., Stubbs, J. L., & Kintner, C. (2011). Specification of ion transport cells in the *Xenopus* larval skin. *Development (Cambridge, England)*, 138(4), 705–714. doi:10.1242/dev.055699
- R**ankin, C. T., Bunton, T., Lawler, A. M., & Lee, S. J. (2000). Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. *Nature genetics*, 24(3), 262–265. doi:10.1038/73472
- Roretz, von, C., Di Marco, S., Mazroui, R., & Gallouzi, I.-E. (2011). Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(3), 336–347. doi:10.1002/wrna.55
- Rosa, A., Spagnoli, F. M., & Brivanlou, A. H. (2009). The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection. *Developmental cell*, 16(4), 517–527. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.007

- Rupp, R. A., Snider, L., & Weintraub, H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes & development*, 8(11), 1311–1323.
- Saetrom, P., Heale, B. S. E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., & Rossi, J. J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic acids research*, 35(7), 2333–2342. doi:10.1093/nar/gkm133
- Saffman, E. E., Styhler, S., Rother, K., Li, W., Richard, S., & Lasko, P. (1998). Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. *Molecular and cellular biology*, 18(8), 4855–4862.
- Saijoh, Y., Oki, S., Ohishi, S., & Hamada, H. (2003). Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Developmental biology*, 256(1), 160–172.
- Sarmah, B., Latimer, A. J., Appel, B., & Wente, S. R. (2005). Inositol Polyphosphates Regulate Zebrafish Left-Right Asymmetry. *Developmental cell*, 9(1), 133–145. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.002
- Schier, A. F. (2009). Nodal morphogens. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), a003459. doi:10.1101/cshperspect.a003459
- Schneider, I. (2014). Multiple Funktionen des FGF-Signalwegs regulieren die Lateralitätsentwicklung im Krallenfrosch *Xenopus*, 1–140. Dissertation an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften
- Schweickert, A., Vick, P., Getwan, M., Weber, T., Schneider, I., Eberhardt, M., et al. (2010). The nodal inhibitor Coco is a critical target of leftward flow in *Xenopus*. *Current biology : CB*, 20(8), 738–743. doi:10.1016/j.cub.2010.02.061
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., & Blum, M. (2007). Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Current biology : CB*, 17(1), 60–66. doi:10.1016/j.cub.2006.10.067
- Shen, M. M., & Schier, A. F. (2000). The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends in genetics : TIG*, 16(7), 303–309.
- Shook, D. R., Majer, C., & Keller, R. (2004). Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Developmental biology*, 270(1), 163–185. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.021
- Shukla, G. C., Singh, J., & Barik, S. (2011). MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and cellular pharmacology*, 3(3), 83–92.
- Skirkanich, J., Luxardi, G., Yang, J., Kodjabachian, L., & Klein, P. S. (2011). An essential role for transcription before the MBT in *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 357(2), 478–491. doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.010

- Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S., & Harland, R. M. (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell*, 82(1), 37–46.
- Song, R., Walentek, P., Spöner, N., Klimke, A., Lee, J. S., Dixon, G., et al. (2014). miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110. *Nature*, 510(7503), 115–120. doi:10.1038/nature13413
- Soroldoni, D., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., & Czerny, T. (2007). Dynamic expression pattern of Nodal-related genes during left-right development in medaka. *Gene expression patterns : GEP*, 7(1-2), 93–101. doi:10.1016/j.modgep.2006.05.013
- Storm van's Gravesande, K., & Omran, H. (2005). Primary ciliary dyskinesia: clinical presentation, diagnosis and genetics. *Annals of medicine*, 37(6), 439–449. doi:10.1080/07853890510011985
- Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C., & Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nature genetics*, 40(12), 1454–1460. doi:10.1038/ng.267
- Stubbs, J. L., Vldar, E. K., Axelrod, J. D., & Kintner, C. (2012). Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nature cell biology*, 14(1), 1–10. doi:10.1038/ncb2406
- Sulik, K., Dehart, D. B., Iangaki, T., Carson, J. L., Vrablic, T., Gesteland, K., & Schoenwolf, G. C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 201(3), 260–278. doi:10.1002/aja.1002010309
- Takao, D., Nemoto, T., Abe, T., Kiyonari, H., Kajiura-Kobayashi, H., Shiratori, H., & Nonaka, S. (2013). Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation. *Developmental biology*, 376(1), 23–30. doi:10.1016/j.ydbio.2013.01.018
- Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H., & Saijoh, Y. (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes & development*, 21(24), 3272–3282. doi:10.1101/gad.1623907
- Tanaka, Y., Okada, Y., & Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature*, 435(7039), 172–177. doi:10.1038/nature03494
- Tanzer, A., & Stadler, P. F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of molecular biology*, 339(2), 327–335. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.065
- Thumberger, T. (2011). Towards a unifying model of symmetry breakage in *Xenopus laevis*: serotonin signaling and the cilia-driven leftward flow, 1–142. Dissertation an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften

- Thisse, B., & Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental biology*, 287(2), 390–402. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.011
- Tian, N., Yang, Y., Sachsenmaier, N., Muggenheimer, D., Bi, J., Waldsich, C., et al. (2011). A structural determinant required for RNA editing. *Nucleic acids research*, 39(13), 5669–5681. doi:10.1093/nar/gkr144
- Tian, Q., Nakayama, T., Dixon, M. P., & Christian, J. L. (1999). Post-transcriptional regulation of Xwnt-8 expression is required for normal myogenesis during vertebrate embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 126(15), 3371–3380.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., et al. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–1247. doi:10.1126/science.1153124
- Tran, U., Zakin, L., Schweickert, A., Agrawal, R., Döger, R., Blum, M., et al. (2010). The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. *Development (Cambridge, England)*, 137(7), 1107–1116. doi:10.1242/dev.046045
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. doi:10.1038/ncb1596
- Vassilev, P. M., Guo, L., Chen, X. Z., Segal, Y., Peng, J. B., Basora, N., et al. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca(2+) homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(1), 341–350. doi:10.1006/bbrc.2001.4554
- Vick, P., Schweickert, A., Weber, T., Eberhardt, M., Mencl, S., Shcherbakov, D., et al. (2009). Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 331(2), 281–291. doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.547
- Vick, P. (2009). Left-right asymmetry in *Xenopus laevis*: Functional dissection of leftward flow, 1–146. Dissertation an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., et al. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*, 4, 2980. doi:10.1038/ncomms3980
- Viotti, M., Niu, L., Shi, S.-H., & Hadjantonakis, A.-K. (2012). Role of the Gut Endoderm in Relaying Left-Right Patterning in Mice. (B. L. M. Hogan, Ed.) *PLoS Biology*, 10(3), e1001276. doi:10.1371/journal.pbio.1001276.g008

- Vonica, A., & Brivanlou, A. H. (2007). The left-right axis is regulated by the interplay of *Coco*, *Xnr1* and *derrière* in *Xenopus* embryos. *Developmental biology*, 303(1), 281–294. doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.039
- W**alentek, P., Bogusch, S., Thumberger, T., Vick, P., Dubaissi, E., Beyer, T., et al. (2014). A novel serotonin-secreting cell type regulates ciliary motility in the mucociliary epidermis of *Xenopus* tadpoles. *Development (Cambridge, England)*, 141(7), 1526–1533. doi:10.1242/dev.102343
- Walentek, P., Schneider, I., Schweickert, A., & Blum, M. (2013). *Wnt11b* is involved in cilia-mediated symmetry breakage during *Xenopus* left-right development. *PLoS one*, 8(9), e73646. doi:10.1371/journal.pone.0073646
- Walentek, P. (2012). *ATP4* and *Wnt*-signaling are required for ciliogenesis and left-right axis development of *Xenopus*, 1–191. Dissertation an der Universität Hohenheim, Fakultät Naturwissenschaften
- Ward, C. J. (2003). Cellular and subcellular localization of the *ARPKD* protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Human molecular genetics*, 12(20), 2703–2710. doi:10.1093/hmg/ddg274
- Weiss, A., & Attisano, L. (2012). The *TGFbeta* Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(1), 47–63. doi:10.1002/wdev.86
- Wessely, O., & De Robertis, E. M. (2000). The *Xenopus* homologue of *Bicaudal-C* is a localized maternal mRNA that can induce endoderm formation. *Development (Cambridge, England)*, 127(10), 2053–2062.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228–234. doi:10.1038/ncb0309-228
- Wu, C.-I., Shen, Y., & Tang, T. (2009). Evolution under canalization and the dual roles of microRNAs: a hypothesis. *Genome research*, 19(5), 734–743. doi:10.1101/gr.084640.108
- Wu, Y., Dai, X. Q., Li, Q., Chen, C. X., Mai, W., Hussain, Z., et al. (2006). *Kinesin-2* mediates physical and functional interactions between *polycystin-2* and *fibrocystin*. *Human molecular genetics*, 15(22), 3280–3292. doi:10.1093/hmg/ddl404
- Wylie, A. D., Fleming, J.-A. G. W., Whitener, A. E., & Lekven, A. C. (2014). Post-transcriptional regulation of *wnt8a* is essential to zebrafish axis development. *Developmental biology*, 386(1), 53–63. doi:10.1016/j.ydbio.2013.12.003
- X**u, L., Yang, B.-F., & Ai, J. (2013). MicroRNA transport: a new way in cell communication. *Journal of cellular physiology*, 228(8), 1713–1719. doi:10.1002/jcp.24344

- Y**oshiba, S., Shiratori, H., Kuo, I. Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., et al. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6104), 226–231. doi:10.1126/science.1222538
- Z**hang, M.-Z., Mai, W., Li, C., Cho, S.-Y., Hao, C., Moeckel, G., et al. (2004). PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2311–2316.

VIII. Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|----------------|----------------------|
| Name: | Getwan |
| Vorname: | Maike |
| Nationalität: | deutsch |
| Geburtstag: | 05. 02. 1985 |
| Geburtsort: | Bietigheim-Bissingen |
| Familienstand: | ledig |

Schulischer und universitärer Werdegang

| | |
|-------------|---|
| seit 2009 | Doktorarbeit im Institut für Zoologie der Universität Hohenheim |
| 2004 - 2009 | Studium der Biologie an der Universität Hohenheim Hauptfach: Zoologie 1. Nebenfach: Mikrobiologie 2. Nebenfach: Membranphysiologie Profilierende Lehreinheiten: „Molekulare Genetik“, „ <i>In vitro</i> Techniken“, „Infektion und Immunität“ Diplomarbeit im Institut für Zoologie: „Die embryonale Funktion des sekretierten Wachstumsfaktors <i>Coco</i> bei der Festlegung der Organlateralität von <i>Xenopus laevis</i> “ Abschluss: 1,1 Vordiplom (Juli 2006): 1,78 |
| 1995 - 2004 | Gymnasien im Ellental; Bietigheim-Bissingen Abschluss: 2,1 |
| 1991 - 1995 | Kleinsachsenheimer Grundschule, Sachsenheim |

Konferenzen und wissenschaftlicher Austausch

| | |
|-------------------------|--|
| 24. 08. - 28. 08. 2014 | „15th International <i>Xenopus</i> Conference“; Pacific Grove, Kalifornien (<i>Vortrag</i>) |
| 07. 09. - 16. 09. 2013 | „International Summer School - Molecular Mechanisms of Development, Aging and Regeneration“; Spetses, Griechenland (<i>Poster und Vortrag</i>) |
| 20. 03. - 23. 03. 2013 | „International joint meeting – German Society for Cell Biology, Society for Developmental Biology“; Heidelberg, Deutschland (<i>Poster</i>) |
| 09. 09. - 13. 09. 2012 | „14th International <i>Xenopus</i> Conference“; Giens Peninsula, Frankreich (<i>Poster</i>) |
| 21. 05. - 23. 05. 2012 | „7th Microsymposium on Small RNAs“; Basel, Schweiz (<i>Poster</i>) |
| 08. 04. - 19. 04. 2011 | „Cell and Developmental Biology of <i>Xenopus</i> “, Cold Spring Harbor, USA (<i>Kurs</i>) |
| 25. 10. und 26.10. 2010 | „Wnt Symposium – Mechanisms, functions and evolution of Wnt-Signaling pathways“; Heidelberg, Deutschland |
| 07. 10. und 08.10. 2010 | „From Signal to Structure in Embryogenesis and Organogenesis“; Freiburg, Deutschland |
| 23. 09. - 25. 09. 2010 | 8. GfE School „Common mechanisms of Development and Regeneration“; Günzburg, Deutschland (<i>Vortrag</i>) |

Stipendien und Auszeichnungen

| | |
|-------------------------|---|
| September 2013 | Posterpreis („International Summer School - Molecular Mechanisms of Development, Aging and Regeneration“) |
| September 2013 | Förderung der Kongressreise nach Spetses, Griechenland durch GfE |
| September 2012 | 1. Platz unter den Posterpreisen („14th International <i>Xenopus</i> Conference“) |
| September 2012 | Förderung der Kongressreise nach Giens Peninsula, Frankreich durch GfE |
| | Förderung der Kongressreise nach Giens Peninsula, Frankreich durch den Universitätsbund Hohenheim |
| April 2010 - April 2012 | Förderung der Promotion nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz Baden-Württemberg |
| April 2011 | Förderung des CSH-Kurses in Cold Spring Harbor, USA durch die Boehringer Ingelheim Stiftung |

Fähigkeiten

| | |
|------------------------|--|
| Technische Fähigkeiten | Mikroinjektionen- und manipulationen (<i>Xenopus</i>), <i>In situ</i> Hybridisierung, Molekulares Klonieren, DNA/ RNA Isolation und Präparation, PCR, Immunfluoreszenz, konfokale Laser Scanning Mikroskopie |
| IT-Fähigkeiten | Adobe Photoshop, Illustrator, Indesign; Microsoft Word, Excel, Powerpoint; ImageJ; AxioVision |
| Fremdsprachen | Englisch |

Publikationen

- Schweickert, A., Vick, P., Getwan, M., Weber, T., Schneider, I., Eberhardt, M., et al. (2010). The Nodal Inhibitor Coco Is a Critical Target of Leftward Flow in *Xenopus*. *Current biology : CB*, 20(8), 738–743. doi:10.1016/j.cub.2010.02.061
- Tingler, M., Ott, T., Tözser, J., Kurz, S., Getwan, M., Tisler, M., et al. (2014). Symmetry breakage in the frog *Xenopus*: Role of Rab11 and the ventral-right blastomere. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. doi:10.1002/dvg.22766