Die Rolle des mit Mikrotubuli assoziierten Proteins Hmmr bei der Vorderhirnentwicklung und im Wnt-Signalweg

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

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Biologie

vorgelegt von

Fee Mercedes Wielath

aus Stuttgart

2025

Dekan:	Prof. Dr. Jan Frank
1. berichtende Person:	PD Dr. Kerstin Feistel
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Armin Huber

Eingereicht am:	14. Juli 2025
Mündliche Prüfung am:	24. Oktober 2025

Die vorliegende Arbeit wurde am 18. Juli 2025 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Zusammenfassung

Musterbildung und Morphogenese sind grundlegende Prozesse für die Gestaltung der embryonalen Morphologie während der Entwicklung. Morphogene, extrazelluläre Botenstoffe mit konzentrationsabhängiger Wirkung, induzieren Zellschicksale im räumlichen und zeitlichen Kontext und steuern so die Musterbildung in embryonalen Geweben. Daran anschließend sind Zellformveränderungen und Zellmigration essenziell, um morphogenetische Bewegungen wie Krümmung, Faltung und Streckung des Gewebes und somit die Formgebung des Embryos zu ermöglichen. Häufig regulieren dieselben Botenstoffe sowohl die Musterbildung als auch die Morphogenese. Wie embryonale Zellen dabei unter dem Einfluss dieser Signalwege vom genregulierten Erwerb spezifischer Zellschicksale zu morphogenetischen Bewegungen übergehen, die durch die Dynamik des Zytoskeletts gesteuert werden, ist weitgehend unverstanden. Die Wnt-Signalwege spielen hierbei eine zentrale Rolle, da sie sowohl Zellschicksal, Proliferation und Differenzierung als auch Zellpolarität und morphogenetische Prozesse regulieren. Interessanterweise gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass das Mikrotubuli (MT)-Zytoskelett sowohl bei der Wnt-vermittelten Musterbildung als auch bei Wnt-vermittelten morphogenetischen Bewegungen eine Schlüsselrolle einnimmt. Dies legt nahe, dass die Modulation des MT-Zytoskeletts entscheidend für das Umschalten zwischen beiden Prozessen sein könnte. Eine Wechselwirkung zwischen dem Zytoskelett und der Wnt-Signaltransduktion könnte demnach Zellantworten präzise abstimmen und die sich entwickelnde Morphologie des Embryos steuern.

In dieser Studie wurde die funktionelle Interaktion zwischen dem MT-Zytoskelett und dem Wnt-Signalweg im Afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* analysiert. Im Fokus stand dabei das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Hmmr, das von zentraler Bedeutung für die Regulation des MT-Zytoskeletts beim mesenchymal-epithelialen Übergang (MET) ist. MET ist ein morphogenetischer Prozess, der natürlicherweise in einer Vielzahl embryonaler Gewebe stattfindet, aber auch bei pathologischen Veränderungen im adulten Organismus wie bei der Krebsmetastasierung eine Rolle spielt. MET wird durch das reziproke Zusammenspiel des kanonischen Wnt / Ctnnb1- und des nicht kanonischen Wnt / PCP-Signalwegs gesteuert.

Eine Interaktion zwischen Hmmr und dem nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalweg bei der MET-vermittelten Vorderhirnentwicklung in *Xenopus* hatte nahegelegt, dass das MT-Zytoskelett und Hmmr auch bei der Regulation des kanonischen Wnt-Signalwegs im MET eine entscheidende Rolle spielen.

Um die Rolle von Hmmr in Wnt-vermittelten MET-basierten Prozessen wie der Vorderhirnentwicklung zu verstehen, wurde zunächst das Zusammenspiel von *hmmr* und *zic2*, einem transkriptionellen Regulator von Wnt und essenziellem Faktor für die Entstehung des dorsalen Vorderhirns, analysiert. *zic2* und *hmmr* trugen dabei zusammen in einem gemeinsamen Regulationsmechanismus zum Neuralrohrschluss bei. Zudem zeigte sich, dass *hmmr* die eigene Transkription in einer Rückkopplungsschleife kontrolliert und im Funktionsverlust verschiedene *hmmr*-Isoformen kompensatorisch exprimiert werden. Die MT-Bindung von Hmmr war bereits in frühen Entwicklungsphasen essenziell für koordinierte Zellbewegungen im Rahmen des MET – insbesondere während der Epibolie und der Neurulation – und war dabei auf ein intaktes Fibronektin-Netzwerk angewiesen. Darüber hinaus wurde eine funktionelle *in vivo*-Interaktion zwischen Hmmr und Ctnnb1, dem transkriptionellen Ko-Aktivator des kanonischen Wnt-Signalwegs, nachgewiesen. Diese beeinflusste sowohl Zellschicksale als auch Zellmorphologie. Hmmr modulierte den kanonischen Wnt-Signalweg durch Interaktion mit dem Mediator Dvl2, einem zentralen Faktor beider Wnt-Signalzweige. Diese Modulation erfolgte über das MT-Zytoskelett als strukturelle Integrationsplattform zur Steuerung der Morphogenese und erforderte die Bindung von Hmmr an MT.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass Hmmr eine entscheidende Rolle als Mediator zwischen dem kanonischen Wnt-Signalweg und dem MT-Zytoskelett spielt. Die MT-abhängige funktionelle Interaktion von Hmmr mit Dvl2 legt nahe, dass diese beiden Faktoren gemeinsam das Umschalten von transkriptioneller zu morphogenetischer Aktivität im Wnt-abhängigen MET während der Embryonalentwicklung koordinieren. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen nicht nur zum grundlegenden Verständnis der Embryonalentwicklung bei, sondern liefern auch neue Einsichten in Pathomechanismen der Krebsmetastasierung.

Abstract

Pattern formation and morphogenesis are fundamental processes for shaping embryonic morphology during development. Morphogens, extracellular signaling molecules with concentration-dependent effects, induce cell fates in a spatial and temporal context and thus control pattern formation in embryonic tissues. Subsequently, cell shape changes and cell migration are essential to enable morphogenetic movements such as curvature, folding and elongation of the tissue and thus the shaping of the embryo. The same signaling molecules often regulate both pattern formation and morphogenesis. How embryonic cells, under the influence of these signaling pathways, transition from gene-regulated acquisition of specific cell fates to morphogenetic movements controlled by cytoskeletal dynamics is largely unknown. The Wnt signaling pathways play a pivotal role here, as they regulate cell fate, proliferation and differentiation as well as cell polarity and morphogenetic processes. Interestingly, there is increasing evidence that the microtubule (MT) cytoskeleton plays a key role in both Wnt-mediated pattern formation and Wnt-mediated morphogenetic movements. This suggests that modulation of the MT cytoskeleton may be crucial for switching between the two processes. Thus, an interaction between the cytoskeleton and Wnt signal transduction could precisely tune cell responses and control the development of embryonic morphology.

In this study, the functional interaction between the MT cytoskeleton and the Wnt signaling pathway was analyzed in the African Clawed Frog *Xenopus laevis*. The focus was on the microtubule-associated protein (MAP) Hmmr, which is pivotal for the regulation of the MT cytoskeleton during mesenchymal-epithelial transition (MET). MET is a morphogenetic process that occurs naturally in a variety of embryonic tissues but also plays a role in pathological changes in the adult organism such as cancer metastasis. MET is controlled by the reciprocal interaction of the canonical Wnt / Ctnnb1 and the non-canonical Wnt / PCP signaling pathway.

An interaction between Hmmr and the non-canonical Wnt / PCP signaling pathway in MET-mediated forebrain development in *Xenopus* had suggested that the MT cytoskeleton and Hmmr also play a crucial role in the regulation of the canonical Wnt signaling pathway in MET.

To understand the role of Hmmr in Wnt-mediated MET-based processes such as forebrain development, the interaction of *hmmr* and *zic2*, a transcriptional regulator of Wnt and an essential factor for the development of the dorsal forebrain, was first analyzed. *zic2* and *hmmr* together contributed to neural tube closure in a common regulatory mechanism. In addition, it was shown that *hmmr* controls its own transcription in a feedback loop and that different *hmmr* isoforms are compensatorily expressed during loss of function. MT binding of Hmmr was essential for coordinated cell movements in the MET early in development - especially during epiboly and neurulation - and was dependent on an intact fibronectin network. Furthermore, a functional *in vivo* interaction between Hmmr and Ctnnb1, the transcriptional co-activator of the canonical Wnt signaling pathway, affected both cell fate and cell morphology. Hmmr modulated the canonical Wnt signaling pathway by interacting with the mediator Dvl2, a central factor of both Wnt signaling branches. This modulation occurred via the MT cytoskeleton as a structural integration platform to control morphogenesis and required the binding of Hmmr to MT.

Overall, the results support the hypothesis that Hmmr plays a crucial role as a mediator between the canonical Wnt signaling pathway and the MT cytoskeleton. The MT-dependent functional interaction of Hmmr with Dvl2 suggests that these two factors jointly coordinate the switch from transcriptional to morphogenetic activity in the Wnt-dependent MET during embryonic development. The findings obtained here not only contribute to the fundamental understanding of embryonic development but also provide new insights into pathomechanisms of cancer metastasis.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Abstract **3**

Inhaltsverzeichnis **5**

Abbildungsverzeichnis **10**

Tabellen- und Anhangsverzeichnis **12**

Abkürzungsverzeichnis **13**

1 Einleitung **16**

1.1 Musterbildung: von der Zelle zum Organismus 16

1.2 Wnt-Signalwege während der Embryogenese 18

1.2.1 Der kanonische Wnt / Ctnnb1-Signalweg 19

1.2.2 Nicht-kanonische / Ctnnb1-unabhängige Wnt-Signalwege 22

1.2.3 Dishevelled – Knotenpunkt der Wnt-Signalwege 24

1.3 Wechselwirkungen zwischen dem Wnt / Ctnnb1-Signalweg und der Dynamik von Mikrotubuli 26

1.4 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Hmmr 29

1.4.1 Hmmr-vermittelte radiale Interkalation steuert den mesenchymal-epithelialen Übergang embryonaler Gewebe 31

1.5 Zielsetzung und zentrale Fragestellung dieser Arbeit 34

2 Ergebnisse **35**

2.1 Ein gemeinsamer Pathomechanismus von Zic2 und Hmmr ist an der Entstehung von Holoprosenzephalie beteiligt 35

2.2 Hmmr wird durch Zic2 reprimiert und kompensiert den eigenen Funktionsverlust durch die Hochregulation alternativer Hmmr-Isoformen 38

2.3 *hmmr*-sgRNAs induzieren effizient Doppelstrangbrüche im Mikrotubuli-bindenden N-Terminus 42

2.4 Die CRISPR / Cas9-vermittelte Mutagenese von *hmmr* weist auf eine essenzielle Rolle während früher und später radialer Interkalationsprozesse hin 45

2.5 Hmmr wird für Wnt-abhängige Musterbildung im Vorderhirn benötigt 51

2.6 Die Mikrotubuli-Bindung von Hmmr moduliert den kanonischen Wnt-Signalweg nachgeschaltet zur Aktivierung durch den Liganden Wnt3a 54

2.7 Hmmr und Ctnnb1 interagieren bei der Spezifizierung der Mittel-Hinterhirn-Grenze und der Polarisierung neuro-epithelialer Zellen 57

2.8 Die nukleäre Lokalisierung vom Hmmr und Ctnnb1 beeinflusst die Ctnnb1-abhängige Aktivierung des Wnt-Signalwegs 61

2.9 Die Deletion von *hmmr* Exon 4 führt zur nukleären Lokalisation in den Zellkernen der Klebdrüse 64

2.10 Hmmr moduliert Mikrotubuli-abhängig den Wnt-Signalweg zur Induktion des mesenchymal-epithelialen Übergangs während der Gastrulation und Neurulation 69

2.11 Die Mikrotubuli-Bindung von Hmmr vermittelt die Rekrutierung von Dvl2 an Mikrotubuli 76

2.12 Regulation des Wnt-Signalwegs durch das KKQK-Motiv von Hmmr 79

3 Diskussion 84

3.1 Regulatorisches Zusammenspiel von *zic2* und *hmmr* während der Neurogenese 84

3.2 Hmmr als Schlüsselfaktor bei der radialen Interkalation und der anterioren Musterbildung 88

3.3 Hmmr moduliert den Wnt-Signalweg zur Regulation der embryonalen Vorderhirnentwicklung 92

3.4 Hmmr und Dvl2: Mikrotubuli-abhängige Koordination im Wnt-Signalweg ... 96

3.5 Alternatives Spleißen von Hmmr als Mechanismus im Wnt-Signalweg 100

3.6 Musterbildung neu betrachtet: Hmmr als Schnittstelle zwischen Zytoskelett und Wnt-Signalweg in der Morphogenese 103

4 Material und Methoden 107

4.1 Beitrag weiterer Projektbeteiligter 107

4.2 Materialien und deren Bezugsquellen 108

4.2.1 Chemikalien 108

4.2.2 Laborutensilien 109

4.2.3 Geräte 110

4.2.4 Verwendete Kits 111

4.2.5 Antikörper und Fluoreszenzmarker 111

4.3 Kulturmedien, Lösungen und Puffer 112

4.4 Verwendete Organismen 115

4.5 *In-vitro*-Fertilisation (IVF) und Ovulation von *X. laevis* 116

4.6 Klonierung des *hmmr* N-Terminus in den pGEM®-T Easy Vektor 117

4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction,* PCR) 117

4.6.2 Gelelektrophorese 118

4.6.3 Ligation 118

4.6.4 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* (*E. coli*) 118

4.6.5 DNA-Extraktion aus Bakterien („Mini-Präp“) 119

4.6.6 Test-Verdau 119

4.6.7 Gewinnung größerer DNA-Mengen („Midi-Präp“) 120

4.7 Klonierung des *hmmr* N-Terminus in den $CS2^+$ und $CS2^+$-GFP Vektor 120

4.7.1 Linearisierung / Restriktionsverdau von Vektor und DNA-Insert 122

4.7.2 Aufreinigung / Fällung der linearisierten Ansätze 122

4.7.3 Dephosphorylierung der Vektoren 122

4.8 Klonierung des humanen *hsHMMR* ΔExon 4-Konstruktes (mit N-terminalem GFP-Tag) 123

4.9 Klonierung des *hmmr* N-term K97A-Konstruktes 125

4.10 Herstellung von Messenger RNA (mRNA) 126

4.10.1 Linearisierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA 126
4.10.2 *In-vitro*-Transkription 126
4.10.3 Aufreinigung der synthetisierten mRNA 126
4.10.4 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren 127
4.11 *In-vivo*-Mikroinjektionen 127
4.12 Knockdown-Experimente durch Morpholino Oligonukleotide 128
4.13 *hmmr* Knockout-Experimente durch CRISPR/Cas9 129
4.13.1 Herstellung der beiden *hmmr* sgRNAs 129
4.13.2 Injektionen der *hmmr* sgRNAs mit dem Cas9-Protein 131
4.13.3 Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese 131
4.14 *In-situ*-Hybridisierung (ISH) 134
4.14.1 Allgemeines Verfahren zur Herstellung der Sonden 134
4.15 Histologische Schnitte der ISH-Embryonen 136
4.16 Western Blot 137
4.16.1 Lysieren und Vorbereitung der Embryonen 137
4.16.2 SDS-Gelelektrophorese 137
4.16.3 Blotten nach dem Tank Blot-Verfahren 138
4.16.4 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine 138
4.17 Immunfluoreszenz-Färbung (IF) 139
4.18 Luciferase-Reporter-Assay 140
4.18.1 Vorbereitung der Zell-Lysate für das DLR-Assay 141
4.18.2 Durchführung des DLR-Assays 141
4.19 Fotodokumentation und Auswertung 142
4.19.1 Fotodokumentation der Embryonen im Ganzpräparat 142
4.19.2 Fotodokumentation von histologischen Schnitten 142
4.19.3 Fotodokumentation von Embryonen nach IF 142
4.19.4 Allgemeine Bildbearbeitung 142

4.19.5 Allgemeine Vermessung der Embryonen 143
4.19.6 Messung der Proteinmenge im Western Blot 143
4.19.7 Messung der Proteinmenge in Immunfluoreszenz-Färbungen 143
4.19.8 Vermessung der Roundness neuroepithelialer Zellen 143
4.19.9 Statistische Auswertung der Daten 144
4.20 Internet-Datenbanken und Programme 144
Anhang 145
Literaturverzeichnis 146
Danksagung 173

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphogen-Gradienten regulieren Zellschicksal und Morphogenese 17

Abb. 2: Übersicht des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalweges 21

Abb. 3: Wnt / PCP-Signaltransduktion 24

Abb. 4: Dishevelled bildet einen Verzweigungspunkt zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg 26

Abb. 5: Hmmr als molekularer Schalter während des Wnt-abhängigen MET 33

Abb. 6: Zic2 und Hmmr werden gemeinsam für den Neuralrohrschluss und die Dachplattenentwicklung benötigt.....37

Abb. 7: Zic2 wirkt als Repressor von Hmmr und differenziell gespleißte Hmmr Protein-Isoformen werden im *hmmr* Funktionsverlust hochreguliert.....41

Abb. 8: Beide gegen *hmmr* gerichteten sgRNAs im N-Terminus induzieren Doppelstrangbrüche und potenzielle Funktionsverlust-Allele 44

Abb. 9: Hmmr ist notwendig für frühe und späte radiale Interkalationsprozesse 49

Abb. 10: Wnt-abhängige Vorderhirnmarker werden durch Hmmr reguliert 53

Abb. 11: Hmmr wird nachgeschaltet vom Liganden Wnt3a für die Wnt-vermittelte Doppelachsen-Induktion benötigt.....56

Abb. 12: Die Hmmr-abhängige Erhaltung der Mittel-Hinterhirn-Grenze sowie die Polarität von Neuroepithelzellen können durch Ctnnb1 wiederhergestellt werden 60

Abb. 13: Hmmr und Ctnnb1 sind in animalen Kappenzellen nukleär ko-exprimiert und der Funktionsgewinn von *hmmr* vermindert die Zellkern-Lokalisierung von Ctnnb1.....63

Abb. 14: Die humane ∆Exon 4-Variante lokalisiert nicht in Zellkernen, im Gegensatz zur *Xenopus*-Variante, die nukleär ausschließlich in der Klebdrüse exprimiert wird.....67

Abb. 15: Die Mikrotubuli-bindende Funktion von Hmmr ist über Dvl2 für den kanonischen Wnt-Signalweg während des mesenchymal-epithelialen Übergangs in der animalen Kappe und Neuralplatte erforderlich 74

Abb. 16: Der N-Terminus von Hmmr ist essenziell für die Rekrutierung von Dvl2 an Mikrotubuli 78

Abb. 17: Das N-terminale Hmmr-Konstrukt mit KKQK-Motiv ist notwendig, aber nicht hinreichend zur effektiven Modulation des Wnt-Signalwegs 82

Abb. 18: *hmmr-nudcd2* Gen-Cluster mit *zic2*-Bindemotiv 86

Abb. 19: Das MAP Hmmr als molekularer Schalter im Wnt-Signalweg zur Steuerung der Morphogenese des Vorderhirns 106

Tabellen- und Anhangsverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Morpholino, mRNA und Plasmid-DNA Konzentrationen 128
Tabelle 2: Verwendete Antisinn-Sonden für *in-situ*-Hybridisierung.....136
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Western Blot 139
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbung 140

Anhang 1: Das KKQK-Motiv in der vollen Länge von Hmmr unterstützt die Aktivierung des Wnt-Signalwegs über Dvl2 145

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
γ-TuRC	γ-Tubulin Ring-Komplex (engl. γ-tubulin ring complex)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Alanin
a	anterior
Abb.	Abbildung
an	animal
AB	apikobasal
AC	apikale Konstriktion (engl. apical constriction)
AK	Antikörper
AP	anterior-posterior
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
atf2	*activating transcription factor 2*
BAR	β-Catenin aktivierter Reporter
BCR	Blastocoel-Dach (engl. blastocoel roof)
bmp	*bone morphogenetic protein*
Bp	Basenpaare
BP	Blastoporus
BPD	Blastoporus-Schlussdefekt
BSA	Rinderalbumin (engl. bovine serum albumin)
bZip	engl. basic leucine zipper
ca	konstitutiv-aktiv (engl. constitutive active)
Ca^{2+}	Kalzium
Cas9	engl. CRISPR-associated protein 9
CE	Konvergente Extension (engl. convergent extension)
CRISPR	engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crmp	*collapse response mediator protein*
CRNP	Cas9-Ribonukleoprotein (-Komplex)
csnk1α / ck1α	*casein kinase 1 α*
ctnnb1	*catenin beta 1, β-catenin*
d	dorsal
dd	doppelt destilliert
daam1	*dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*
DL	dorsale Urmundlippe
DLR / DLA	Dual-Luciferase® Reporter / Dual-Luciferase® Reporter-Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DA	Doppelachsen
Δ	Deletionskonstrukt
DEP	Dishevelled, Egl-10 und Pleckstrin-Domäne
DIX	Dishevelled und Axin-Domäne
dn	dominant-negativ
DV	dorsoventral
dvl2	*dishevelled segment polarity protein 2*

dynll1	*dynein light chain LC8-type 1*
EMT	Epithelial-mesenchymaler Übergang (engl. epithelial-mesenchymal transition)
et al.	und Andere („et alii“)
en2	*engrailed 2*
fam83d	*family with sequence similarity 83 member D*
Fn1	Fibronektin
FP	Bodenplatte (engl. floor plate)
fzd	*frizzled class receptor*
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gsk3α/β	*glycogen synthase kinase 3* α/β
HA	Hyaluronsäure
hCG	humanes Choriongonadotropin
hmmr	*hyaluronan-mediated motility receptor*
hmmr FL	volle Länge hmmr (engl. full length)
HPE	Holoprosenzephalie
h2b	*histone 2b*
ICE	engl. inference of CRISPR edits (Analyse)
IF	Immunfluoreszenz-Färbung
int-1	*integrated-1*
ISH	*in-situ*-Hybridisierung
IVF	*in-vitro*-Fertilisation
l	links
jnk	*c-jun-N-terminal kinase*
kDA	Kilodalton
KD	Klebdrüse
lef	*lymphoid enhancer binding factor*
lrp5/6	*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (engl. laser scanning microscope)
LT	Zellschicksalsmarker (engl. lineage tracer)
MAB	Maleinsäurepuffer (engl. maleic acid buffer)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
mapre1	*microtubule associated protein RP/EB family member 1*
MBSH	Modified Barth’s Saline
MET	Mesenchymal-epithelialer Übergang (engl. mesenchymal-epithelial transition)
MIH HPE	engl. middle interhemispheric variant of holoprosencelphaly
MO	Antisinn-Morpholino Oligonukleotid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT	Mikrotubuli
MTBD	Mikrotubuli-Bindedomäne
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (engl. microtubule-organizing center)
NES	Nukleäre Exportsequenz
NLS	Nukleäre Lokalisierungssequenz
not	*notochord homeobox*
NP	Neuralplatte
NRD	Neuralrohrschlussdefekt (engl. neural tube defect, NTD)
NRS	Neuralrohrschluss (engl. neural tube closure, NTC)

OB	olfaktorische Bulben
otx2	*orthodenticle homeobox 2*
OV	optisches Vesikel
p	posterior
PAM	engl. Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBS-	PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
PCP	Planare Zellpolarität (engl. planar cell polarity)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDZ	PSD-95/SAP90, Dlg und ZO-1
pg	Pikogramm
pH	potentium hydrogenium
pmol	piko molar
r	rechts
rac1	*rac family small GTPase 1*
rhoa	*ras homolog family member a*
RI	radiale Interkalation
RLU	engl. relative light units
Rn	Renilla-Luciferase
rock	*rho associated coiled-coil containing protein kinase*
RP	Dachplatte (engl. roof plate)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
sgRNA	engl. single guide RNA
sia	*siamois*
St.	Stadium
SSC	salzhaltiger Natriumcitratpuffer (engl. saline sodium citrate buffer)
tcf	*t-cell factor transcription factor*
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (engl. transforming growth factor)
UTR	untranslatierte Region
vangl2	*VANGL planar cell polarity protein 2*
veg	vegetal
wg	*wingless*
wnt	*wingless und int-1 (Wnt family members)*
wt / Wt	wildtypisch / Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
zic2	*Zic family member 2*

Im Folgenden wurden genannte Gene stets kursiv (z.B. *hmmr*) und Proteine nicht kursiv (z.B. Dvl2), zur Unterscheidung, gekennzeichnet. Die Nomenklatur bei menschlichen Genen und Proteinen sieht vor, beides mit Großbuchstaben zu verfassen und nur durch kursive und normale Schreibweise zu unterscheiden. Englisch-abgeleitete Begriffe wurden hinter den deutschen Begriffen in Klammern gesetzt.

Die Kategorisierung der *Xenopus laevis* Embryonalstadien in der folgenden Arbeit erfolgte anhand von Nieuwkoop und Faber (1994).

1 Einleitung

1.1 Musterbildung: von der Zelle zum Organismus

Die Entwicklung eines vielzelligen Organismus beginnt typischerweise mit einer einzelnen Zelle (Zygote) und wird maßgeblich durch die Regulation genetischer Programme orchestriert. Da alle Zellen identisches Erbgut aufweisen, ist es von zentraler Bedeutung, dass die korrekte Anordnung differenzierter Zellen innerhalb eines Organismus gelingt. Doch wie kann die Information einer einzelnen Zelle zu einem komplexen Organismus mit unterschiedlich spezialisierten Zellen und klar strukturierter Körperarchitektur führen?

Zu Beginn der frühen Embryonalentwicklung des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* definiert der Eintrittsort des Spermiums in die Eizelle bereits die zukünftige dorsoventrale (DV; Rücken-Bauch) Achse, wobei die dorsale Seite aus der Spermien-Einstrittsstelle gegenüberliegenden Hälfte des Embryos hervorgeht. Dies geschieht durch eine 30º-Rotationsbewegung der kortikalen Zytoplasmaschicht direkt unterhalb der Plasmamembran (De Robertis & Kuroda, 2004). Diese als kortikale Rotation bezeichnete Bewegung beruht auf einem an der Zentriole des Spermiums polymerisierenden, temporär ausgerichteten Mikrotubuli (MT)-Netzwerk, das bis in die vegetale Hemisphäre der befruchteten Eizelle auswächst. Der Transport dorsaler Determinanten entlang dieser ausgerichteten MT führt zur Induktion eines Signalzentrums, häufig als „Nieuwkoop-Zentrum“ bezeichnet, welches die Entwicklung der dorso-anterioren (Kopf) Region steuert (Jones & Smith, 2009). Das Nieuwkoop-Zentrum induziert einen wichtigen Bereich, der „Spemann-Organisator“ genannt wird. Dieser Bereich spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Botenstoffen, die die Entwicklung des Embryos steuern. Grundlegende Experimente in Amphibien haben gezeigt, welche wichtige Funktion der Spemann-Organisator übernimmt. Dieser sorgt dafür, dass das äußere Zellgewebe (Ektoderm) zu Nervengewebe differenziert, und emittiert Signale, die je nach Lage im Embryo verschiedene Entwicklungsprozesse auslösen. So fördert das anteriore Gewebe die Entwicklung des Vorderhirns, während das weiter posterior gelegene Gewebe die Entstehung des Rückenmarks unterstützt (Gilbert & Saxén, 1993; Gould & Grainger, 1997; Harland & Gerhart, 1997; Nieuwkoop, 1997; Ruiz i Altaba, 1993).

Im Verlauf der embryonalen Entwicklung spielt die Signalgebung durch Morphogene eine wichtige Rolle bei der Musterbildung von Epithelien. Durch die Induktion unterschiedlicher Zellschicksale sowie die Steuerung von Zellformveränderungen wie Krümmung, Faltung und Streckung tragen diese Signale entscheidend zur Formgebung des Embryos bei (Abb. 1; Gilmour et al., 2017). Wie diese Signalwege die embryonale Entwicklung steuern, wird im Folgenden näher erläutert.

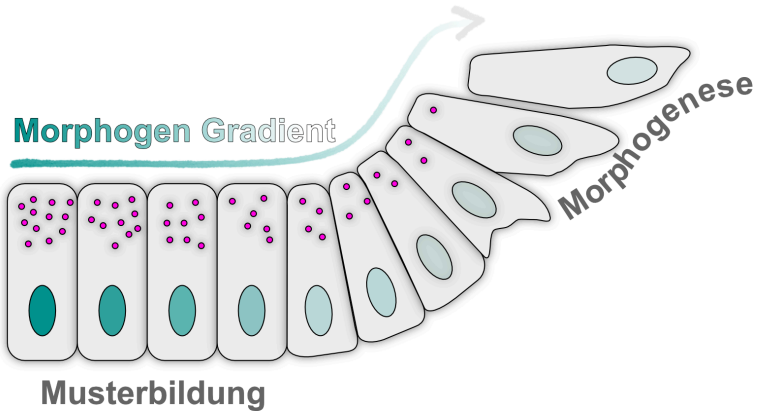


Abb. 1: Morphogen-Gradienten regulieren Zellschicksal und Morphogenese

Morphogene sind sekretierte Botenstoffe, die eine umliegende Zellpopulation in bestimmte „Muster" organisieren. Sie bilden einen Konzentrationsgradienten, der von einer lokalisierten Quelle ausgeht und bestimmen die Anordnung sowie das Schicksal der reagierenden Zellen in Abhängigkeit von der jeweils wahrgenommenen Morphogenkonzentration (Gurdon & Bourillot, 2001). Epitheliale Morphogenese wird durch Zellmigration, Veränderungen der Zellform und Zellumstrukturierung gesteuert.

Wenn Zellen miteinander kommunizieren, löst ein extrazelluläres Signal häufig eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zu einer zellulären Antwort führt – etwa in Form von Veränderungen des Zytoskeletts, des Stoffwechsels oder der Genexpression. Regulations- und Rückkopplungsmechanismen auf jeder Ebene dieser Signal-übertragungskaskade modulieren die Aktivität des Signalwegs während der Entwicklung (Sonnen & Janda, 2021). Dabei spielt eine geringe Anzahl an evolutionär hochkonservierten Signalwegen, darunter die Transforming-Growth-Factor (TGF)-β-Familie mit ihrem Subtyp Bone Morphogenic Protein (BMP), sowie der Wingless und Int1 (Wnt)-Signalweg und der Fibroblast Growth Factor (FGF)-Signalweg eine entscheidende Rolle. Als Teil der TGF- β Familie, legt die Nodal-Signalwegsaktivierung mesendodermale Gewebe fest und strukturiert sie entlang der animal-vegetalen Achse

in *Xenopus* (Jones et al., 1995; Schier, 2003; Shen, 2007). Zeitgleich strukturiert die BMP-Signalwegsaktivierung die Gewebe entlang der DV-Achse in Blastula- und Gastrula-Embryonen. Diese Achse unterscheidet sich von der späteren DV-Achse des vollständig entwickelten Embryos, da während der Gastrulation, der dorsalen Konvergenz und der Neurulation umfangreiche Zellbewegungen und -umlagerungen stattfinden (De Robertis & Kuroda, 2004; Little & Mullins, 2006; Ramel & Hill, 2012). Dagegen spielt der FGF-Signalweg eine zentrale Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung des Mesoderms und Neuroektoderms, der Steuerung morphogenetischer Zellbewegungen, der anteroposterioren (AP)-Musterbildung, der Somitenbildung sowie der Entwicklung verschiedener Organe (Böttcher & Niehrs, 2005; N. Itoh, 2007; McIntosh et al., 2000). Die Wnt-Signalwege regulieren die Festlegung von Zellschicksal, die Zellproliferation und -differenzierung, die Ausbildung der Zellpolarität sowie morphogenetische Prozesse (Clevers, 2006; van Amerongen & Nusse, 2009). Da die Aktivierung und die Steuerung des kanonischen Wnt-Signalwegs einen zentralen Bestandteil dieser Arbeit darstellen, werden im folgenden Kapitel die verschiedenen Wnt-Signalwege detaillierter erläutert.

1.2 Wnt-Signalwege während der Embryogenese

Die Grundlagen der Forschung zur Wnt-Signaltransduktion wurden in den späten 1980er- und frühen 1990er-Jahren gelegt, als festgestellt wurde, dass die Genprodukte des *Drosophila*-Gens *wingless* (*wg)* und des Maus-Gens *Int1* (später *Wnt1*) zu einer großen, evolutionär hochkonservierten Familie extrazellulärer Signalmoleküle gehören (Rijsewijk et al., 1987). Der Name „Wnt“ entspringt demnach der Kombination aus *wingless* und *Int1.* Das *Int1*-Gen wurde ursprünglich als Onkogen identifiziert, das durch insertionelle Aktivierung durch das Maus-Mammatumorvirus zur Entstehung von Mammakarzinomen beiträgt (Nusse & Varmus, 1982). Als das entwicklungsregulierende *Drosophila*-Gen *wg* isoliert wurde, konnte seine Homologie zu *Int1* nachgewiesen werden (Baker, 1987; Cabrera et al., 1987; Rijsewijk et al., 1987).

Wenige Jahre später wurden durch Injektionen der Maus *int-1* mRNA (*Wnt1)* in *Xenopus laevis*-Embryonen deutliche Phänotypen hervorgerufen – nämlich die Verdopplung der embryonalen Körperachse mit zwei Köpfen und Rümpfen,

einschließlich des Neuralrohrs und des darunterliegenden Mesoderms (McMahon & Moon, 1989). Dieser Befund lieferte überzeugende Hinweis auf eine grundlegende Rolle des Wnt-Signalweges in der Wirbeltierentwicklung, insbesondere bei der Ausbildung der Körperachsen. Die Überexpression von Wnt-Signalwegskomponenten auf der ventralen Seite von *Xenopus* führte zur embryonalen Achsenduplikation, einem charakteristischen Phänotyp, der die Aktivität dieses Signalwegs widerspiegelt (McMahon & Moon, 1989). Die Achsenduplikation hat sich als leicht durchführbarer und weit verbreiteter Assay etabliert, um die Funktion und Dynamik des Wnt-Signalwegs in den frühen Entwicklungsstadien von Wirbeltieren zu untersuchen (Niehrs, 2022).

Bei Wirbeltieren werden 19 *Wnt*-Gene in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Dabei können Wnt-Proteine über kurze Distanzen wirken, indem sie Signale zwischen benachbarten Zellen aussenden, oder sie bilden einen Gradienten mit größerer Reichweite, der sich über mehrere Zellschichten innerhalb eines Gewebes erstreckt und so das Zellschicksal in einer konzentrations-abhängigen Weise steuert (Cadigan et al., 1998; Coudreuse et al., 2006; Farin et al., 2016). Die präzise Regulation des Wnt-Signalweges ist nicht nur während der Embryonalentwicklung von Bedeutung, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase in adulten Organismen essenziell. Eine Dysregulation dieses Signalweges kann wesentlich zur Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen beitragen und ist daher von hoher medizinischer Relevanz (Nusse & Clevers, 2017; Nusse & Varmus, 2012).

1.2.1 Der kanonische Wnt / Ctnnb1-Signalweg

Die Aktivierung spezifischer Zielgene durch Catenin beta 1 (Ctnnb1, ehemals β-Catenin) als transkriptionellen Ko-Aktivator wird häufig als der „kanonische“ Wnt-Signalweg bezeichnet. Unabhängig von seiner transkriptionellen Rolle wurde Ctnnb1 in den späten 1980er-Jahren als Bestandteil eines Proteinkomplexes identifiziert, der mit E-Cadherin, der zentralen Komponente der Ca^{2+}-abhängigen Zelladhäsion, assoziiert ist. Diese Proteine wurden aufgrund ihrer vermittelnden Rolle zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett als Catenine (*lat. catena* = Kette) bezeichnet (Ozawa et al., 1989). Obwohl dieser Aspekt im Folgenden nicht weiter vertieft wird,

unterstreicht er die multifunktionelle Bedeutung von Ctnnb1 – als strukturelles Bindeglied und als Signalvermittler.

In Abwesenheit von Wnt-Proteinen werden die zytoplasmatischen Konzentrationen von Ctnnb1 durch einen Ubiquitin-abhängigen, proteasomalen Abbau niedrig gehalten – ein Prozess, der durch den sogenannten Ctnnb1-Abbaukomplex vermittelt wird (Abb. 2; Stamos & Weis, 2013). Dieser Komplex besteht aus dem Gerüstprotein Axin (Behrens et al., 1998; M. J. Hart et al., 1998) und dem Tumorsuppressor Adenomatous Polyposis Coli (APC) (Clevers, 2006; MacDonald et al., 2009; Munemitsu et al., 1995; Rubinfeld et al., 1993) sowie den Kinasen Casein Kinase 1 α1 (CK1α) und Glykogensynthase-Kinase 3 α/β (GSK3α/β) (Amit et al., 2002; C. Liu et al., 2002; Rubinfeld et al., 1996). Der Komplex katalysiert die Serin/Threonin-Phosphorylierung eines hochkonservierten Phosphodegrons am N-Terminus von Ctnnb1 (Winston et al., 1999), was zur Erkennung durch die $SCF^{\beta\text{-}TRCP}$ E3-Ubiquitin-Ligase führt und schließlich den proteasomalen Abbau einleitet (Abb. 2A; Hart et al., 1999).

Wnt-Proteine wie Wnt1, Wnt3 und Wnt8 aktivieren die Rezeptoren Frizzled (Fzd) und die Ko-Rezeptoren Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6 (LRP5/6). Dabei wird die Wnt-Signalgebung durch die dynamische Assemblierung großer, übergeordnet aktivierter Rezeptorkomplexe (auch Signalosomen) reguliert. Die Arbeit von Cong et al. (2004) lieferte Hinweise darauf, dass die Bildung von Rezeptorkomplexen für die Wnt-Signalgebung erforderlich ist und zeigte, dass die Oligomerisierung des LRP6/Fzd-Komplexes die Aktivierung des Signalwegs fördert. Die Phosphorylierung von LRP5/6 durch die Kinasen CK1α und GSK3α/β ermöglicht die Rekrutierung von Dishevelled 2 (Dvl2) an die Plasmamembran, wo es mit den Fzd-Rezeptoren interagiert und mit weiteren Dvl2-Molekülen polymerisiert (Abb. 2B; Bilic et al., 2007; Schwarz-Romond et al., 2007). Dies vermittelt die Translokation von Axin zur Plasmamembran (Cliffe et al., 2003) und die Inaktivierung des Abbaukomplexes. Diese Inaktivierung führt zur Stabilisierung von Ctnnb1 im Zytoplasma sowie zur Translokation von Ctnnb1 in den Zellkern. Dort bildet Ctnnb1 einen transkriptionsaktiven Komplex mit den Transkriptionsfaktoren (TF) Lymphoid Enhancer Factor (LEF) und T-Cell Factor (TCF) (Behrens et al., 1998; Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996) und dieser aktiviert schließlich eine Vielzahl Wnt-abhängiger Zielgene, wie z.B. *engrailed 2* (*en2*) (McGrew et al., 1999) und *siamois* (*sia*) (Brannon et al., 1997). Sowohl die Stabilisierung von Ctnnb1 als auch die funktionelle Regulation

der TCF-Proteine durch Phosphorylierung stellen offenbar evolutionär konservierte Mechanismen dar, die in unterschiedlichen biologischen Systemen erhalten geblieben sind (S. Y. Sokol, 2011).

Vereinfacht gesagt wird Ctnnb1 ohne Wnt-Aktivierung konstitutiv abgebaut, während die Wnt-Signaltransduktion diesen Prozess gezielt unterbindet.

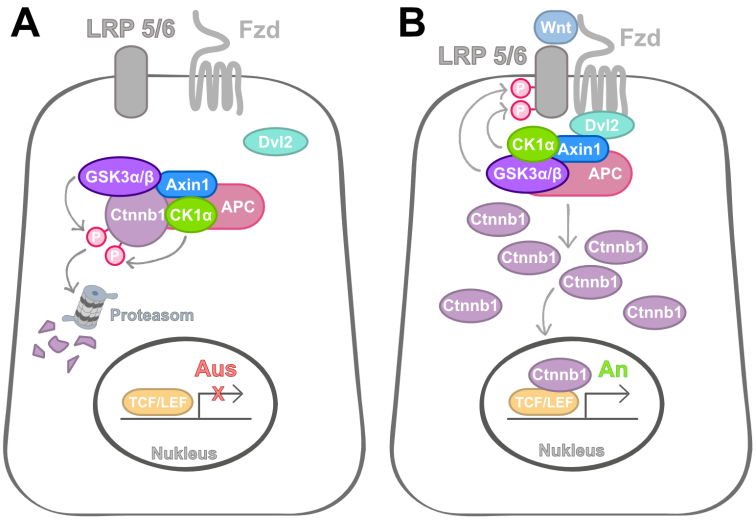


Abb. 2: Übersicht des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalweges

(**A**) Ohne Bindung von Wnt an Frizzled (Fzd) und die Ko-Rezeptoren Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (LRP5) oder LRP6 (zusammengefasst LRP5/6) wird freies zytosolisches Catenin beta 1 (Ctnnb1) vom Abbaukomplex eingefangen. Axin1 fungiert dabei als zentrales Gerüstprotein und bindet APC sowie die Kinasen GSK3α/β und CK1α. Innerhalb des Komplexes wird Ctnnb1 phosphoryliert und für den proteasomalen Abbau markiert („P“). Folglich bindet kein Ctnnb1 an die T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF)-Transkriptionsfaktoren. Die Expression Wnt-abhängiger Zielgene wird unterdrückt. (**B**) Wnt-Bindung an Fzd initiiert die Rekrutierung von LRP5/6 und die Bildung eines trimeren Rezeptorkomplexes. Daraufhin lagert sich zytosolisches Dishevelled (Dvl2) and die intrazellulären Domänen von Fzd an, fördert die Komplexbildung und rekrutiert Komponenten des Destruktionskomplexes zur Plasmamembran. Die Phosphorylierung von LRP5/6 schafft neue Bindungsstellen für Axin1 und GSK3α/β wird gehemmt. Infolge dieser Protein-umlagerungen wird der Abbau von Ctnnb1 unterdrückt. Ctnnb1 akkumuliert im Zytosol, translociert in den Zellkern und reguliert durch die Bindung an die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren kontextabhängig transkriptionelle Programme (angelehnt an Maurice & Angers, 2025).

1.2.2 Nicht-kanonische / Ctnnb1-unabhängige Wnt-Signalwege

Der kanonische Wnt-Signalweg teilt zentrale Schlüsselkomponenten mit einem anderen, bislang weniger erforschten Signalweg, dem sogenannten nicht-kanonischen Wnt / Planar Cell Polarity (PCP)-Signalweg (Niehrs, 2012). Da dieser Signalweg bereits Gegenstand früherer Studien im Rahmen dieser Arbeit war, wird er nachfolgend ebenfalls berücksichtigt. Der Wnt / PCP-Signalweg verläuft unabhängig von Ctnnb1 und steuert die Gewebepolarität, also die koordinierte Ausrichtung von Zellen innerhalb der Ebene eines Epithels, die meist senkrecht zur apikobasalen (AB) Polarität einzelner Zellen verläuft (Butler & Wallingford, 2017; Niehrs, 2012). Der PCP-Signalweg wurde zunächst in der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben, wo er die Polarität hochorganisierter Strukturen steuert – darunter die distale Ausrichtung der Flügeltrichome (Haarsinneszellen) sowie die komplexe Organisation der Ommatidien (Einheiten des Komplexauges) im adulten Auge (Maung & Jenny, 2011; Y. Yang & Mlodzik, 2015). Während der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten sind Komponenten des Wnt / PCP-Signalwegs, wie z.B. Dvl entscheidend für verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellinterkalationen und apikale Konstriktion (*engl. apical constriction,* AC), insbesondere während des Neuralrohrschlusses (NRS) und der konvergenten Extension (*engl. convergent extension*, CE) des Mesoderms bei der Gastrulation (Ossipova, Chuykin, et al., 2015; S. Sokol, 2000; S. Y. Sokol, 2015; Wallingford et al., 2002).

Nach der Bindung PCP-spezifischer Wnt-Liganden an den Transmembran-Rezeptor Fzd rekrutiert dieser auf der distalen Zellseite unter anderem das zytoplasmatische Protein Dvl (Abb. 3). Daraufhin assoziiert Dvl über das Formin-Homologie-Adaptorprotein DAAM1 (Dvl-associated Activator of Morphogenesis 1) an die kleine GTPase RHOA (Ras Homolog Family Member A), was zur Bildung des Rho-GTP-Komplexes führt, der wiederum die ROCK (Rho-Associated Coiled-coil-Kinase) aktiviert und eine Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts bewirkt (Habas et al., 2001). Zusätzlich zu dieser Aktivierung kann Dvl auch eine weitere kleine GTPase der Rho-Familie, RAC1 (Rac Family Small GTPase 1), aktivieren. Diese wiederum stimuliert den nachgeschalteten Effektor JNK (c-JUN-N-terminal Kinase), was zur Phosphorylierung und Aktivierung von c-JUN führt. Das Proto-Onkogen c-JUN ist eine der Komponenten des Aktivator-Protein-1 (AP-1), einem TF-Komplex, von dem angenommen wird, dass er eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, dem Überleben

der Zelle und Zelltod spielt (zusammengefasst in Angel & Karin, 1991; Coso et al., 1995; Yang & Mlodzik, 2015). Dadurch wird z.B. das Dendriten-Wachstum (Rosso et al., 2005) sowie Zellpolarität und Zellbewegungen während der Gastrulation in *Xenopus* reguliert (Habas et al., 2003). Diese Aktivierung kann sowohl Veränderungen im Zytoskelett und der Zellpolarität über die kleinen GTPasen hervorrufen als auch zu einer Transkriptionsaktivierung von JNK-abhängigen TFs führen – etwa des Activating Transcription Factor 2 (ATF2), was wiederum mit der Aktivierung entsprechender Zielgene einhergeht (A. Kikuchi et al., 2011; Simons & Mlodzik, 2008).

Ein besonders interessanter Aspekt der beiden Wnt-Signalwege liegt in ihrer gemeinsamen Nutzung zentraler Komponenten wie Liganden, Rezeptoren und der Adapterproteine Dvl, bevor sich die nachgeschaltete Signaltransduktion aufspaltet. Zwar zeigen bestimmte Liganden eine Präferenz für den einen oder anderen Signalweg, doch besteht hierbei keine strikte Exklusivität (Bell et al., 2022). Trotz dieser Überschneidungen gibt es fundierte Hinweise darauf, dass der nicht-kanonische Wnt-Signalweg hemmend auf den kanonischen Ctnnb1-abhängigen Signalweg wirken kann. Dieser Zusammenhang wurde erstmals 1996 in *Xenopus* beschrieben, wobei Wnt5a-Typ-Liganden (PCP-Signalweg) die Fähigkeit von Wnt1-Klasse-Proteinen (Ctnnb1-Signalweg), eine sekundäre Körperachse zu induzieren, hemmen (Torres et al., 1996). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Komplexität und Vielschichtigkeit der Wnt-Signaltransduktion, bei der kanonische und nicht-kanonische Wege nicht isoliert, sondern oft in enger Wechselwirkung stehen.

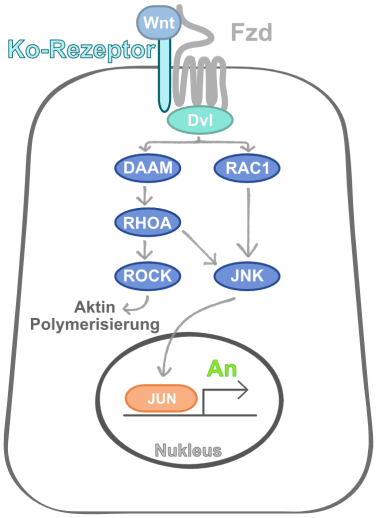


Abb. 3: Wnt / PCP-Signaltransduktion

Der Wnt / Planar Cell Polarity (PCP)-Signalweg initiiert abhängig von Dishevelled (Dvl) über DAAM1 die Aktivierung der kleinen GTPasen RHOA und RAC1, was die Aktivierung der RHO-Kinase (ROCK) und der JUN-N-Terminal Kinase (JNK) zur Folge hat und schließlich zur Aktin Polymerisierung und Stabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts führt. Dieser Signalweg ist an der Regulierung der Zellpolarität, Zellmotilität und morphogenetischen Bewegungen beteiligt (angelehnt an Niehrs, 2012).

1.2.3 Dishevelled – Knotenpunkt der Wnt-Signalwege

Wie in den Kapiteln 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben, fungiert Dvl als zentraler Verzweigungspunkt innerhalb der Wnt-Signaltransduktion und ist ein essenzieller Bestandteil sowohl des kanonischen als auch des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs (Abb. 4; Wallingford & Habas, 2005). Erwähnenswert ist, dass Dvl-Proteine zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern pendeln können, was auf ihre potenzielle Rolle in der direkten Regulation nukleärer Prozesse hinweist (Cadigan et al., 1998; Habas & Dawid, 2005; K. Itoh et al., 2005). Eine Studie hierzu zeigte, dass Dvl-Proteine sowohl eine konservierte nukleäre Exportsequenz (NES) als auch eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) enthalten, die für ihre korrekte Funktion im kanonischen Wnt-Signalweg essenziell sind (K. Itoh et al., 2005; Torres & Nelson, 2000). Zusätzliche Studien zeigten, dass nukleäres Dvl eine zentrale Rolle bei der Bildung eines stabilen Komplexes zwischen Ctnnb1 und TCFs in Säugetierzellen und Zebrabärbling spielt (Gan et al., 2008). Alle Dvl-Proteine von *Drosophila* bis zum Menschen besitzen drei konservierte Domänen: eine N-terminale DIX (Dishevelled and Axin)-Domäne, eine zentrale PDZ-Domäne und eine C-terminale DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin)-Domäne (Abb. 4; Schwarz-Romond et al., 2007).

Die DIX-Domäne vermittelt die dynamische Polymerisierung von Dvl-Punktstrukturen (Gao & Chen, 2010), wodurch Dvl-Proteine den Wnt / Ctnnb1-Signalweg aktivieren können (Schwarz-Romond et al., 2007). Dabei trägt die DIX-Domäne nicht nur zur Assemblierung von Signalosomen in der Nähe der Plasmamembran bei, sondern vermittelt auch Protein-Protein Interaktionen. Die strukturelle Ähnlichkeit der DIX-Domänen von Dvl und Axin ermöglicht eine direkte Interaktion, die die Bindung beider Proteine erleichtert (Hsu et al., 1999). Dadurch wird die durch Axin vermittelte Ctnnb1-Degradation gehemmt, Ctnnb1 stabilisiert und die transkriptionelle Aktivierung Wnt-abhängiger Zielgene induziert (Kishida et al., 1999).

Die zentrale PDZ-Domäne interagiert direkt mit einer konservierten C-terminalen Region von Fzd (KTXXXW), die für die Aktivierung des Wnt-Signalweges sowie für die membranständige Lokalisation von Dvl erforderlich ist (Wong et al., 2003). Aufgrund der zentralen Position innerhalb des Proteins scheint die PDZ-Domäne eine wichtige Rolle sowohl im kanonischen als auch im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zu spielen (Moon & Shah, 2002). Tatsächlich deuten einige Studien darauf hin, dass diese Domäne von Dvl an der Unterscheidung beider Wnt-Signalwege beteiligt ist (Boutros & Mlodzik, 1999; Weston & Davis, 2001).

Die C-terminale DEP-Domäne ermöglicht die Interaktion zwischen Dvl und DAAM1 und aktiviert dadurch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Studien haben gezeigt, dass die DEP-Domäne für die membranständige Rekrutierung von Dvl nach Wnt-Signalwegsaktivierung verantwortlich ist (Pan et al., 2004). Daneben scheint die DEP-Domäne auch essenziell für die Assemblierung funktioneller Signalosomen und die Weiterleitung des Wnt-Signals in den Zellkern zu sein (Gammons et al., 2016).

Dvl fungiert als zentraler und vielseitiger Modulator in beiden Kontexten der Wnt-Signaltransduktion und steht daher auch im Fokus der vorliegenden Arbeit, in der seine Funktion und regulatorische Bedeutung charakterisiert wird.

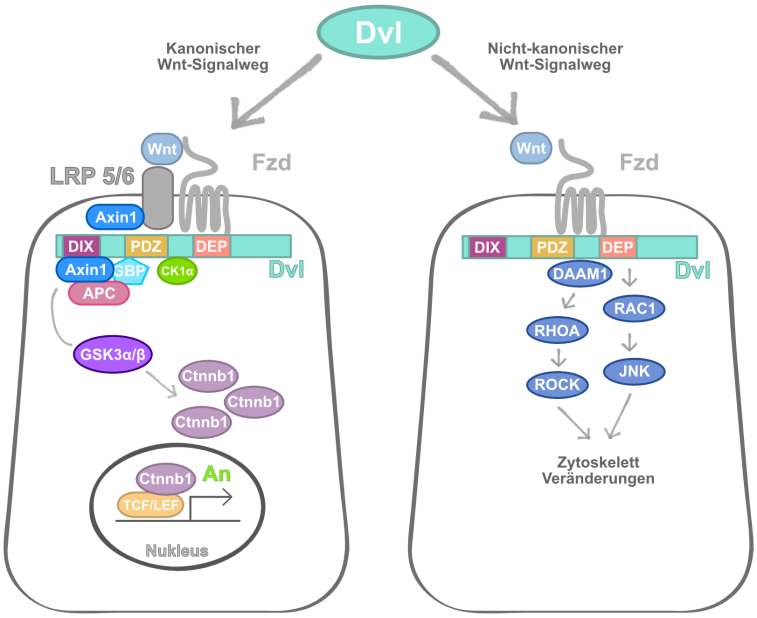


Abb. 4: Dishevelled bildet einen Verzweigungspunkt zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg

Im kanonischen Wnt-Signalweg führt die Signaltransduktion über den Frizzled (Fzd)- und LRP5/6-Rezeptorkomplex zur Stabilisierung von Catenin beta 1 (Ctnnb1). Dieser Prozess wird über die DIX- und PDZ-Domänen von Dishevelled (Dvl) sowie durch eine Reihe weiterer Faktoren wie Axin, Glykogen-Synthase-Kinase 3 α/β (GSK3α/β) und Casein-Kinase 1 α (CK1α) vermittelt. Dies führt zur Translokation von Ctnnb1 in den Nukleus und initiiert mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF die Transkription von Zielgenen. Im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg erfolgt die Signaltransduktion über Fzd, jedoch unabhängig von LRP 5/6. Vermittelt durch die PDZ- und DEP- Domänen von Dvl, kommt es zur Umstrukturierung des Zytoskeletts durch die Aktivierung der GTPasen RHOA und RAC1 (angelehnt an Habas & Dawid, 2005).

1.3 Wechselwirkungen zwischen dem Wnt / Ctnnb1-Signalweg und der Dynamik von Mikrotubuli

Der Wnt-Signalweg steuert nicht nur das Zellschicksal (Clevers, 2006; van Amerongen & Nusse, 2009), sondern auch morphologische Zellformveränderungen in enger Zusammenarbeit mit dem MT-Zytoskelett. Erste Hinweise, dass der Wnt / Ctnnb1-Signalweg das Zytoskelett direkt regulieren könnte, ergaben sich aus der Beobachtung, dass Dvl in Säugerzellen eine enge Assoziation mit MT eingeht (Krylova et al., 2000; Miller et al., 1999). Für die effektive Transduktion von Wnt-Signalen ist die Internalisierung und Etablierung von Signalosomen und Vesikeln unabdingbar (Blitzer & Nusse, 2006). Dabei fungieren MT als essenzielle Transportbahnen (Rowning et al., 1997). Studien belegten, dass diverse Komponenten des Wnt-Signalwegs in

Wechselwirkung mit dem MT-Zytoskelett treten (Salinas, 2007). Aber inwiefern kann umgekehrt das MT-Zytoskelett die Aktivität des Wnt-Signalwegs beeinflussen?

MT sind hohle Röhren und essenzielle, multifunktionale Proteinpolymere des Proteins Tubulin, wobei die Tubulin-Untereinheit selbst aus einem Heterodimer mit zwei ähnlichen kugelförmigen Proteinen, α-Tubulin und β-Tubulin, besteht (Alberts, 2012). Diese Anordnung verleiht den MT eine ausgeprägte Polarität, was bedeutet, dass sie über ihre gesamte Länge eine strukturelle Richtung besitzen und sich an ihren beiden Enden funktionell unterscheiden. Diese Polarität ermöglicht die gerichtete Bewegung von Motorproteinen entlang der MT und schafft damit Transportwege für Vesikel und Organellen (Gudimchuk & McIntosh, 2021). MT sind hochdynamisch, wobei das schnell wachsende Ende des Tubulus als „Plus-Ende“ und das langsamer wachsende Ende als „Minus-Ende“ bezeichnet wird. An der Keimbildung für das Wachstum von MT ist neben α-Tubulin und β-Tubulin in kleineren Mengen das γ-Tubulin beteiligt. Die Keime für MT werden immer an einer bestimmten intrazellulären Stelle angelegt, dem MT-organisierenden Zentrum (MTOC, *engl. microtubule-organizing center).* Außerdem hängt die Keimbildung in vielen Fällen vom γ-Tubulin-Ringkomplex (γ-TuRC, *engl. γ-tubulin ring complex*) ab. Ein klar definiertes MTOC in vielen Tierzellen ist das Zentrosom, welches nahe am Zellkern liegt und aus dem die MT an ihrem „Minus-Ende“ angelegt werden, sodass die „Plus-Enden“ nach außen weisen (Alberts, 2012). Die Dynamik der MT wird gezielt reguliert, um das Zytoskelett zu organisieren und Kräfte auf andere zelluläre Strukturen auszuüben (Gudimchuk & McIntosh, 2021).

Die präzise Regulation des Zytoskeletts ist essenziell für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, von der Festlegung der Teilungsebene bis hin zu Veränderungen der Zellform, -migration und -polarität. Diese Prozesse werden durch Änderungen in Organisation, Verteilung und Dynamik von Aktinfilamenten oder MT vermittelt (Salinas, 2007). Bisher wurde angenommen, dass Morphogene das Zytoskelett indirekt regulieren indem sie die Expression von Zielgenen verändern. Darauffolgende Studien zeigten jedoch, dass die durch Morphogene aktivierten Signalwege, wie der kanonische Wnt / Ctnnb1-Signalweg, das Zytoskelett direkt modulieren, und zwar durch Veränderungen in der Aktivität, Lokalisation und Stabilität Zytoskelett-regulierender Proteine (Ciani et al., 2004; Schlesinger et al., 1999; Walston et al., 2004).

Beispielsweise bindet in sich entwickelnden Neuronen endogenes Dvl bevorzugt an stabile MT (Krylova et al., 2000). Wird der Wnt-Signalweg über Dvl aktiviert, erhöht sich die Stabilität der MT, wodurch sie unempfindlich gegenüber einer Depolymerisation durch Nocodazol werden (Ciani et al., 2004; Krylova et al., 2000). Daneben bindet endogenes Axin, ein negativer Wnt-Regulator, an MT und stabilisiert diese (Ciani et al., 2004). Außerdem beeinflusst die Inhibition von GSK3β das Verhalten von MT direkt, indem sie die Phosphorylierung spezifischer Zytoskelett-abhängiger Zielproteine verändert. GSK3β phosphoryliert eine Reihe MT-assoziierter Proteine (MAPs), darunter Tau, MAP2, MAP1B, CRMP (*engl. collapse response mediator protein*) sowie auch APC (Salinas, 2007).

Zusammengefasst deutet die enge Assoziation zahlreicher Wnt-Komponenten mit dem MT-Zytoskelett darauf hin, dass der Wnt / Ctnnb1-Signalweg lokal eine präzise regulierte Signaltransduktion ermöglicht. Zeitgleich deuten diese Befunde darauf hin, dass Veränderungen im Zytoskelett selbst die Verteilung und/oder Aktivität von Wnt-Komponenten beeinflussen könnten und auf diese Weise die Effizienz der Wnt-Signalwegskaskade modulieren (Salinas, 2007). Doch wie werden die Veränderungen und die Dynamik des MT-Zytoskeletts vermittelt? Dabei spielen MAPs eine zentrale Rolle. Im Fokus dieser Arbeit steht ein essenzielles MAP, welches eine duale Funktion übernimmt: indem es das MT-Zytoskelett beeinflusst und zugleich als Modulator des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalwegs fungiert.

1.4 Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Hmmr

Im Zentrum dieser Arbeit steht das Mikrotubuli-assoziierte Protein HMMR, (*engl. hyaluronan mediated motility receptor,* auch bekannt als RHAMM/IHABP), das ursprünglich als Bestandteil eines neuartigen Hyaluronsäure-Rezeptorkomplexes aus Zellkulturüberständen muriner Zellen isoliert wurde (Hardwick et al., 1992). Hmmr steht sowohl mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko als auch mit dem Fortschreiten verschiedener Tumorarten in Zusammenhang. Mittlerweile ist HMMR weniger als Hyaluronsäure-Rezeptor, sondern vielmehr als MT-bindendes Protein und in dieser Funktion als Regulator von Gewebehomöostase, Mitose und Meiose bekannt (He et al., 2020).

Bei Vertretern der Chordatiere und Insekten wird HMMR als überwiegend coiled-coil-strukturiertes Protein vorhergesagt (80-85 % der gesamten Aminosäuren (AS)) (He et al., 2020). Die zentrale coiled-coil Region des humanen HMMR (AS 69-681) fungiert als potenzielle Dimerisierungsdomäne und als Bindungsplattform für weitere Proteine. HMMR interagiert mit CHICA/FAM83D über die zentralen AS 365-546 (Dunsch et al., 2012) wohingegen die Region zwischen den AS 574-602 als Calcium-sensitive Calmodulin-Bindedomäne wirkt (Assmann et al., 1999). Über die Interaktion mit CHICA rekrutiert HMMR die Dynein light chain 1 (DYNLL1) sowie CK1α an die mitotische Spindel (Fulcher et al., 2019). Die über die coiled-coil-Region vermittelte Proteininteraktionen sind wichtig für die korrekte Ausrichtung der mitotischen Spindel und die Etablierung der Zellteilungsebene (He et al., 2020).

Daneben befinden sich am N-terminalen Ende zwei Mikrotubuli-Bindedomänen (MTBD), worüber HMMR direkt an MT bindet (Assmann et al., 1999). Während das volle Länge HMMR-Protein sowohl an Zentrosomen lokalisiert als auch an MT bindet (Maxwell et al., 2003), weist die natürlich vorkommende Spleißvariante von HMMR, der Exon 4 fehlt (-Exon 4), in Interphase-Zellen eine vorwiegend nukleäre Lokalisierung auf (Assmann et al., 1999; Maxwell et al., 2003). Diese Expression korreliert mit dem Fortschreiten multipler Myelome (Maxwell et al., 2004) und Mammakarzinomen (Venables et al., 2008). Das konservierte, C-terminale basic leucine zipper (bZip)-Motiv überlappt mit den sogenannten Basic (B) (X)7 Basic (B-X7-B)-Motiven, die über ionische Wechselwirkungen an Hyaluronsäure und Heparin binden (Yang et al., 1993, 1994). Daneben ist das bZip-Motiv entscheidend für die

Lokalisierung des Proteins am Zentrosom ebenso wie für die Interaktion mit Dynein (Maxwell et al., 2005).

In *Xenopus*-Embryonen, bei denen die Funktion von *hmmr* eingeschränkt ist, manifestieren sich ausgeprägte Defekte während der neuralen Entwicklung. *hmmr*-Morphanten weisen gravierende Hirn-Fehlbildungen auf, darunter ein beeinträchtigter NRS, eine Verengung des Vorderhirns, dazu eine fehlende Hemisphären-Trennung sowie verkleinerte Riechkolben (Prager et al., 2017). Interessanterweise führte die Wiederherstellung der Proteinfunktion mittels eines mutierten *hmmr*-Konstruktes, welchem die N-terminalen 130 AS und damit beide MTBD fehlen, zu einer wildtypischen, polarisierten Zellmorphologie sowie zu gerichteten und organisierten MT. Im Gegensatz dazu scheiterten die neuroepithelialen Zellen daran, zur Mittellinie hin zu migrieren, was in einem Neuralrohr-Schlussdefekt (NRD) resultierte (Prager et al., 2017).

Hmmr ist demnach funktionell entscheidend für die Dynamik des Zytoskeletts und die daraus resultierende morphologische Aktivität neuraler Zellen. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob der Einfluss auf die MT-Dynamik nicht nur Zellformveränderungen und morphogenetische Bewegungen in Geweben bewirkt, sondern auch Veränderungen in der Signaltransduktion des Wnt-Signalwegs hervorrufen kann.

Vorangegangene Analysen zeigten tatsächlich, dass die MT-Bindung von Hmmr wichtig für die Modulation des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalwegs ist (Deese, 2022, 2025; Nickel, 2020; Sätzler, 2023; Wiest, 2022). Die spezifischen Mechanismen, durch die Hmmr mit Komponenten des Signalweges interagiert, sowie die Ebene innerhalb der Wnt / Ctnnb1-Signalkaskade, auf der Hmmr für eine Modulation erforderlich ist, sind bislang nicht abschließend geklärt.

Ein morphogenetischer Prozess, der durch den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert wird, ist der sogenannte mesenchymal-epitheliale Übergang (*engl. mesenchymal-epithelial transition*, MET) (Schwab et al., 2018). Dieser Übergang ist ein aktiver, migrationsabhängiger Prozess, der maßgeblich durch den Wnt-Signalweg gesteuert wird. MET tritt in vielen embryonalen Geweben auf, ist aber wohl am besten in der sich entwickelnden Niere untersucht (Simons et al., 2005; Stark et al., 1994). Während eines vollständigen MET kondensieren mesenchymale Zellen zunächst durch die

Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen, polarisieren anschließend und interkalieren, um ein Epithel auszubilden (Walck-Shannon & Hardin, 2014). Diese Abfolge kann während der Morphogenese auch nur teilweise durchlaufen werden, wenn z.B. tiefe und superfizielle Zellen eines mehrschichtigen Epithels miteinander interkalieren und dabei weiter epithelialisieren (Kim et al., 2017). Zell-Zell-Interkalation während eines MET verläuft in radialer Richtung, d.h. entlang der AB-Achse der beteiligten Zellen. *hmmr* ist ein Mediator von radialer Interkalation (RI), die während eines partiellen MET beim NRS und der anschließenden Bildung des Neuralrohrlumens essenziell ist (Prager et al., 2017). Im mehrschichtigen Neuroepithel von *Xenopus* interkalieren tief liegende Zellen mit mesenchymalen Charakteristika radial mit superfiziellen Zellen und nehmen fortschreitend epithelialere Eigenschaften an (Davidson & Keller, 1999). Beim Funktionsverlust von *hmmr* konnten die neuralen Zellen nicht radial miteinander interkalieren, was mit einer abgerundeten Zellform und einer fehlenden Polarität des MT-Zytoskeletts einherging, sodass die für die Dachplatte bestimmten Zellen lateral verblieben (Prager et al., 2017). Die Störung von MT-Dynamik (z.B. durch Nocodazol) beeinträchtigt ebenfalls RI und den NRS (Schön, 2015; Soltys, 2017). Dies zeigt deutlich, dass ein durch den Wnt-Signalweg getriebener morphogenetischer Prozess von MT und MAPs abhängig ist.

In der Entwicklung von *Xenopus* treten METs z.B. in der animalen Kappe während der Epibolie oder im sich schließenden Neuralrohr auf. Die Analyse dieser Prozesse eignet sich somit hervorragend dafür, die Wechselwirkung zwischen dem MT-Zytoskelett und dem Wnt-Signalweg zu untersuchen.

1.4.1 Hmmr-vermittelte radiale Interkalation steuert den mesenchymal-epithelialen Übergang embryonaler Gewebe

Der NRS stellt einen zentralen Prozess bei der Neurulation in Wirbeltieren dar, bei dem sich die planare Neuralplatte, auch Neuroepithel, als verdickter Bereich des Ektoderms auf der dorsalen Seite des frühen Embryos anhebt und zu einem geschlossenen, hohlen Neuralrohr fusioniert (Schroeder, 1970). Eine Fehlregulation des NRS kann zu schwerwiegenden NRDs führen, die zu den häufigsten kongenitalen Fehlbildungen beim Menschen zählen (Wallingford et al., 2013). Im rostralen Bereich differenziert sich

das Neuralrohr weiter zum zukünftigen Gehirn, während der kaudale Abschnitt zur Ausbildung des Rückenmarks beiträgt (Copp et al., 2003).

Die Entwicklung des Gehirns hängt eng mit der Regulation des Wnt-Signalwegs zusammen. Zum einen muss der kanonische Wnt-Signalweg im Bereich der anterioren Neuralplatte reprimiert werden, damit craniales Zellschicksal entsteht (Kiecker & Niehrs, 2001). Zusätzlich sind Komponenten des nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalwegs aktiv, um die Morphogenese des NRS zu steuern. Diese erfordert das koordinierte Zusammenspiel von Zellformveränderungen sowie Zellpolarisation, -migration und -interkalation (Wallingford, 2005).

Im Bereich des sich entwickelnden Vorderhirns durchlaufen Zellen der Neuralplatte Wnt / PCP-vermittelte RI (Ossipova, Chu, et al., 2015; Prager et al., 2017). Hierbei ist die RI der treibende morphogenetische Prozess, welcher sowohl die Verengung des neuralen Gewebes als auch die Bildung des Ventrikellumens während des NRS vermittelt (Davidson & Keller, 1999). Die bislang vorliegenden Daten legen nahe, dass *hmmr* ein entscheidender Regulator der RI im Bereich des anterioren Neuroektoderms ist und damit maßgeblich zum korrekten anterioren NRS beiträgt (Prager et al., 2017).

Während der Gastrulation durchläuft die animale Hemisphäre (auch animale Kappe) eine nahezu gleichmäßige Ausdehnung durch eine Verringerung der Epitheldicke (Epibolie). Bei der Epibolie wird die Anzahl der Zellschichten in einem mehrschichtigen Epithel ebenfalls durch RI verringert (Keller, 1980). Typisch für *hmmr*-exprimierende Gewebe wie der animale Kappe, der Neuralleiste und dem Pronephros ist (Casini et al., 2010), dass die zugehörigen Zellen zunächst mesenchymal organisiert sind und anschließend epithelialisieren, d.h. sie durchlaufen einen MET.

Dieser Arbeit vorangegangene Studien zeigten, dass *hmmr* grundsätzlich an RI / MET-Prozessen während der Embryonalentwicklung von *Xenopus* beteiligt ist und dies von der Modulation des kanonischen Wnt / Ctnnb1 und des nicht kanonischen Wnt / PCP-Signalweges abhängig zu sein scheint (Abb. 5; Nickel, 2020; Prager et al., 2017). Studien zur Nierenentwicklung zeigten, dass während des MET zunächst die kanonische Wnt-Signalgebung aktiv sein muss, um Proliferation und Zellschicksal zu regulieren. Anschließend muss der kanonische Wnt-Signalweg runterreguliert werden, gefolgt von einem Wechsel zur Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalwegs. Dies ermöglicht, dass Zellformveränderungen und morphogenetische

Bewegungen wie Migration stattfinden (Carroll & Yu, 2012; Iglesias et al., 2007; Papakrivopoulou et al., 2014). Auch in den oben genannten Geweben ist dieser Wechsel der Wnt-Signalgebung für RI / MET nötig.

Wir wissen bereits, dass Hmmr für Zellformveränderungen wie Elongation und Polarisierung sowie für Zellmigration notwendig ist und in diesen Prozessen mit dem nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalweg interagiert (Prager et al., 2017). Außerdem zeigten erste Anhaltspunkte, dass Hmmr auch den kanonischen Wnt-Signalweg moduliert (Nickel, 2020). Da beide Wnt-Signalwegzweige auf MT angewiesen sind, wäre es denkbar, dass Hmmr durch seine Assoziation mit dem MT-Zytoskelett als eine Art molekularer Schalter den Übergang von der einen zur anderen Signalwegsvariante ermöglicht und somit den Ablauf von MET ermöglicht (Abb. 5). Noch unklar ist, auf welcher Ebene der Signaltransduktion Hmmr mit dem kanonischen Wnt-Signalweg interagiert und am Ende Wnt-abhängige RI / MET-Prozesse während der Embryonalentwicklung steuert.

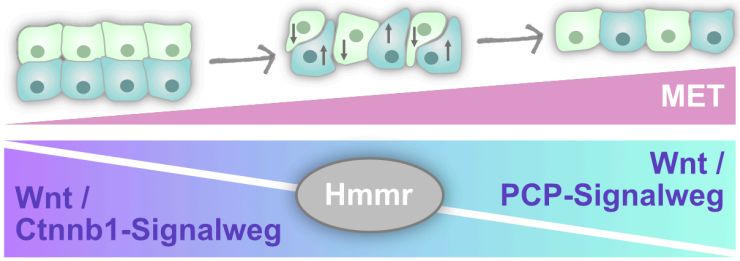


Abb. 5: Hmmr als molekularer Schalter während des Wnt-abhängigen MET

Hmmr moduliert die initiale Aktivierung mit anschließender Runterregulierung des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalwegs als molekularer Schalter und steuert den mesenchymal-epithelialen Übergang (MET). Gleichzeitig wird die Aktivierung des Wnt / PCP-Signalweg für die Aufrechterhaltung des MET benötigt.

1.5 Zielsetzung und zentrale Fragestellung dieser Arbeit

Diese Arbeit folgt der zentralen Hypothese, dass Hmmr als MAP mit beiden für den MET benötigten Zweigen des Wnt-Signalwegs interagiert. Dabei ist vorstellbar, dass Hmmr als Schalter zwischen Proliferation und Musterbildung (kanonischer Wnt / Ctnnb1-Signalweg) und morphogenetischen Bewegungen (nicht-kanonischer Wnt / PCP-Signalweg) agiert, wobei der Einfluss auf die Wnt-Signalwege auf einer Bindung von Hmmr an das MT-Zytoskelett beruht.

In dieser Arbeit soll eine Analyse dieser Interaktion in Geweben erfolgen, die RI / MET durchlaufen und entsprechende Phänotypen im Funktionsverlust von *hmmr* zeigen. Dazu gehört u.a. das animale Gewebe im Prozess der Epibolie sowie der NRS und die Entwicklung des Vorderhirns, vor allem die Entwicklung der Dachplatte und ihrer Derivate. Der Fokus liegt auf der Interaktion von Hmmr mit dem kanonischen Wnt-Signalweg, da noch nicht bekannt ist, auf welche Weise eine Modulation der Wnt-Signaltransduktion durch Hmmr stattfinden kann.

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen soll eine neue Rolle von *hmmr* bei der Regulation von Wnt-Signalwegen nachgewiesen werden. Dadurch entsteht ein klares Bild über die Bedeutung des MT-Zytoskeletts und *hmmr*-vermittelter morphogenetischer Bewegungen für die Entwicklung des Vorderhirns.

2 Ergebnisse

2.1 Ein gemeinsamer Pathomechanismus von Zic2 und Hmmr ist an der Entstehung von Holoprosenzephalie beteiligt

Die häufigste Fehlbildung des menschlichen Vorderhirns ist die Holoprosenzephalie (HPE), die mit einer Prävalenz von 1 in 15.000 Neugeborenen auftritt und Schätzungen zufolge bei bis zu 1 von 250 Frühschwangerschaften vorkommt (Muenke & Beachy, 2000). Mutationen in *ZIC2* sind im Menschen als Ursache für die mittlere interhemisphärische Fusionsvariante der HPE identifiziert worden (Brown et al., 1998). Zudem identifizierten Studien Zic2 als einen Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs (Pourebrahim et al., 2011). Im Frosch *Xenopus laevis* führte der Funktionsverlust von *hmmr,* vermittelt durch Antisinn-Morpholino-Oligonukleotide (MO), zu einer gestörten anterioren Neurulation und zu schweren Fehlbildungen des Vorderhirns (Prager et al., 2017). Aufgrund der sich ähnelnden Pathologien und des nachgewiesenen Einflusses von Zic2 auf die kanonische Wnt-Signalgebung, sollte in dieser vorliegenden Arbeit ein putativer, gemeinsamer Wirkmechanismus von *zic2* und *hmmr* während des anterioren NRS in *X. laevis* untersucht werden.

Wie bereits in Prager et al., 2017 beschrieben, war der deutlichste *hmmr* Funktionsverlust-Phänotyp in späten Kaulquappen im Stadium (St.) 45 zu erkennen. Die Köpfe der Morphanten waren schmaler, die Augen kleiner und auch der Abstand zwischen diesen reduziert. Speziell bei den explantierten Vorderhirnen war auffällig, dass diese im Vergleich zu den Kontroll-Gehirnen schmaler und die olfaktorischen Bulben kleiner ausgebildet waren (Prager et al., 2017).

Für eine vergleichende Beobachtung des Funktionsverlusts von *zic2* zum *hmmr* Funktionsverlust-Phänotyp im Frosch, wurden Embryonen im 4-Zellstadium sowohl unilateral als auch bilateral in die dorsalen Blastomeren mit je 1 pmol *zic2* MO, gerichtet gegen beide *zic2* L- und S-Alloallele*,* injiziert (Abb. 6). Wildtypische Embryonen im Neurula St. 21 zeigten ein anterior geschlossenes Neuralrohr sowie eine linear ausgebildete dorsale Mittellinie (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu, zeigten Embryonen, die im St. 3 unilateral mit dem *zic2* MO injiziert wurden, eine hin zur Injektionsseite geneigte Mittellinie (Abb. 6B). Ähnlich zu den Kontrollembryonen war das Neuralrohr anterior geschlossen, jedoch zeigten die *zic2* Morphanten auf der

injizierten Seite eine verbreiterte Schlüpfdrüse und auch Klebdrüse. Der bilaterale Funktionsverlust von *zic2* resultierte bei Kaulquappen im St. 45 im Vergleich zu den Kontrollembryonen (Abb. 6C, C') in einem verschmälerten Vorderhirn und verkleinerten olfaktorischen Bulben (Abb. 6D, D'). Dieser Phänotyp ähnelte dem der *hmmr* Morphanten im St. 45 wie oben beschrieben in Prager et al. (2017).

Zusätzlich sollte untersucht werden, wie sich die alleinige und gemeinsame Injektion beider MOs gegen *hmmr* und *zic2* auf die tieferen Schichten der Neuralplatte auswirkt (Abb. 6E-G). Aus Prager et al. (2017) war bereits bekannt, dass der Verlust von *hmmr* zu einer Verbreiterung der Neuralplatte führte. Hierfür wurden Embryonen im St. 21 analysiert, da zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits ein sichtbares Ventrikellumen entstanden ist und die beiden Schichten der frühen Neuralplatte durch RI zu einem zukünftigen, einschichtigen Neuralrohr zusammengeführt wurden (Davidson & Keller, 1999). Für die Analyse wurden die Embryonen auf der Ebene des sich entwickelnden Vorderhirns präpariert, die anterioren Teile mittels Stereomikroskop fotografiert und anschließend in ImageJ vermessen. Da in Kontrollembryonen beide Seiten der Neuralplatte in etwa gleich breit waren, wurde ausgehend von der Bodenplatte als zentraler Orientierungspunkt das Neuralrohr in beide Richtungen vermessen und ein Quotient (rechte / linke Seite der Neuralplatte) gebildet, der bei einem Wert von 1,01 lag (Abb. 6E, G). Die unilaterale Injektion eines niedrig dosierten (0,3 pmol) *hmmr* MO als auch eines niedrig dosierten (0,3 pmol) *zic2* MO sollte dazu dienen, einen milderen Effekt auf die Verbreiterung des Neuralrohrs zu generieren. In *hmmr* Morphanten lag der Quotient bei einem Wert von 1,10, der von *zic2* Morphanten bei einem Quotienten von 1,05. Die Ko-Injektion beider niedrig dosierten Morpholinos hingegen führte zu einem additiven Effekt und einem daraus resultierenden höheren Wert von 1,15 (Abb. 6F, G).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl *zic2* als auch *hmmr* ähnliche Funktionsverlust-Phänotypen während der Neurulation und in späten Kaulquappen-Stadien aufzeigten. Der additive Effekt, der durch die gemeinsame Injektion beider Morpholinos entstanden ist, deutet darauf hin, dass beide Gene während der neuralen Morphogenese in einer putativen Wnt-vermittelten epistatischen Verbindung zueinanderstehen.

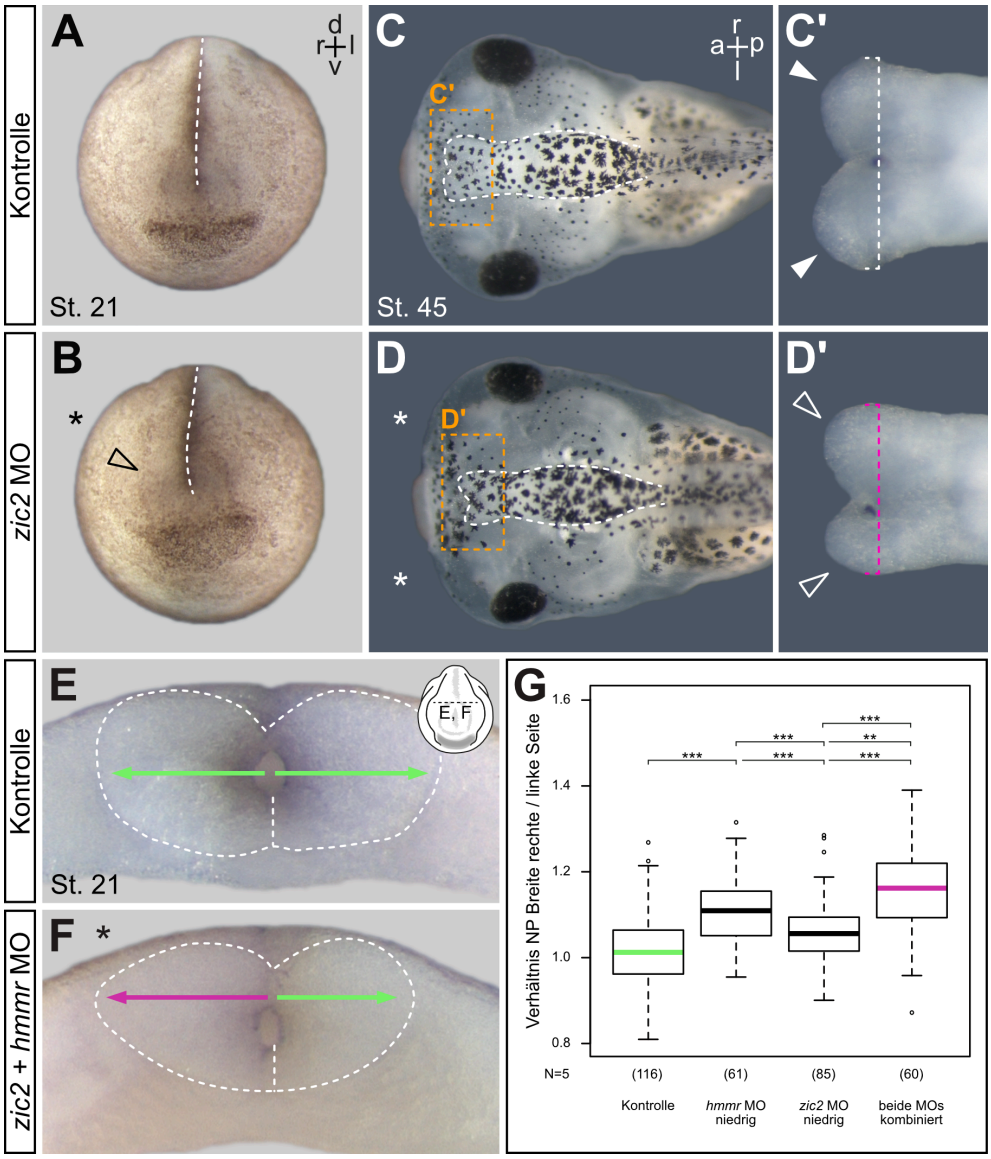


Abb. 6: Zic2 und Hmmr werden gemeinsam für den Neuralrohrschluss und die Dachplattenentwicklung benötigt

(**A, B**) Anteriore Ansicht auf *Xenopus laevis* Embryonen im St. 21. Gestrichelte, weiße Linien kennzeichnen normale (A) und abnormale (B) Position der dorsalen Mittellinie. (B) Morpholino Oligomer gerichtet gegen *zic2.L+S* (*zic2* MO) wurde unilateral in eine der dorsalen Blastomeren injiziert (Asterisk). Beeinträchtigte Neuralfalten-Konvergenz und gebogene Mittellinie (schwarze Pfeilspitzenumrandung) im Vergleich zu Kontrollembryonen (A). (**C, D**) Dorsale Ansicht auf die Kopfregion von Kaulquappen im St. 45 (rostral links). Kontrollen (C) und Embryonen, die bilateral in beide dorsal-animalen Blastomeren im 4-Zellstadium mit *zic2* MO (D, Asteriske) injiziert wurden. Umrandung der Gehirne dargestellt mit gestrichelten, weißen Linien. (**C', D'**) Dorsale Ansichten auf explantierte Vorderhirne, der Bereich ist durch die orangenen Boxen in C und D gekennzeichnet. Hervorzuheben ist die Verschmälerung des Vorderhirns in *zic2* Morphanten (D'; gestrichelte, magentafarbene Klammer) im Vergleich zu Kontrollen (C'; weiß gestrichelte Klammer). Weiße Pfeilköpfe zeigen auf wildtypisch entwickelte olfaktorische Bulben (C') und weiße Pfeilkopfumrandungen auf die reduzierte Größe der olfaktorischen Bulben. (**E, F)** Kontrollembryonen (E) und Embryonen unilateral in die rechte, dorsal-animale Blastomere im 4-Zellstadium mit *zic2* MO und einem *hmmr*.L MO zusammen injiziert (F; Asterisk), wurden im St. 21 transversal im Bereich des Vorderhirns (angedeutet durch Schnittebene in Cartoon-Darstellung) halbiert; Ansicht auf die Schnittfläche.

Gestrichelte, weiße Linien markieren die Grenzen des neuralen Gewebes und deuten die dorsale Mittellinie an. Wildtypische Breite des Neuralrohrs ist durch grüne Pfeile und verbreitertes Neuralrohr durch einen magentafarbenen Pfeil gekennzeichnet. (**G**) Quantifizierung und statistische Analyse der Neuralplatten-Breite aus E und F (Box-Plot, Wilcoxon-Rangsummentest). (a) anterior, (d) dorsal, (l) links, (MO) Morpholino Oligomer, (N) Anzahl der Experimente, (NP) Neuralplatte, (OB) olfaktorische Bulben, (p) posterior, (r) rechts, (v) ventral, (Zahl) Anzahl der Embryonen.

2.2 Hmmr wird durch Zic2 reprimiert und kompensiert den eigenen Funktionsverlust durch die Hochregulation alternativer Hmmr-Isoformen

Das L-Homolog von *hmmr* befindet sich im Genom von *Xenopus laevis* auf Chromosom 3 (Chr3L). In unmittelbarer Nähe der *hmmr* 5'UTR befindet sich auf dem Genlocus von *nudcd2.L* eine *zic2.L* TF-Bindestelle (Karimi et al., 2018). Um zu analysieren, ob *zic2* einen Einfluss auf die mRNA-Expression von *hmmr* und der damit einhergehenden Proteinfunktion hat, wurde das Expressionsmuster von *hmmr* in der Neuralplatte im St. 17, wie bereits in Casini et al., 2010 gezeigt, nochmals in Abhängigkeit von *zic2* untersucht.

Durch *in-situ*-Hybridisierung mit einer N-terminalen *hmmr* Antisinn-Sonde konnte das bereits bekannte neurale Expressionsmuster in wildtypischen Embryonen bestätigt werden (Abb. 7A). Die schwache Expression von *hmmr* erstreckte sich über die gesamte Neuralplatte und war speziell in den tiefen neuralen Gewebsschichten zu finden (Abb. 7A'). Diese Transkripte konnten auch in früheren Analysen mit einer C-terminalen *hmmr* Antisinn-Sonde detektiert werden (Prager et al., 2017). Auffallend war eine verstärkte Expression von *hmmr* in der dorsalen Mittellinie, bzw. der Bodenplatte des zukünftigen Neuralrohrs (Abb. 7A'), welche bisher noch nicht beschrieben wurde. Ein dorsal unilateral herbeigeführter *zic2* Funktionsverlust führte bei 76 % der Embryonen zu einer verstärkten *hmmr* Expression auf der injizierten Hälfte des Embryos (Abb. 7B, D). Dies wurde in den Schnitten durch das Vorderhirn noch deutlicher (Abb. 7B'). Vergleichend hierzu, zeigte sich beim dorsalen unilateralen Funktionsverlust von *hmmr,* dass dessen eigene Expression, detektiert durch eine N-terminale Antisinn-Sonde gegen *hmmr,* bei 100 % der Morphanten hochreguliert wurde (Abb. 7C, C', D). Diese Beobachtung konnte bereits für andere Gene, wie z.B. das

Tumorsuppressorgen *Breast Cancer 1 (BRCA1)* gemacht werden, bei dem die volle Länge des Proteins in Brustkrebstumoren herunterreguliert war und es gleichzeitig durch alternatives Spleißen zu einer kompensatorischen Hochregulation einer anderen Isoform kam (Wiener et al., 2015).

Um diesen Feedback-Mechanismus von Hmmr auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Embryonen im St. 9, St. 12,5, St. 18 und St. 32 mittels Western Blot analysiert. Zunächst wurde ein *hmmr* Funktionsverlust in der animalen Hemisphäre der Embryonen im 4-Zellstadium induziert. Die Analyse ergab, dass verschiedene mutmaßliche Isoformen des Hmmr-Proteins in *Xenopus* vorliegen. Neben dem volle Länge Protein mit einem Molekulargewicht von 136 kDA konnten zwei Varianten mit einem geringeren Molekulargewicht von 126 kDA und 83 kDA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Analysen überein (Nickel, 2020).

Zum Vergleich der Hmmr Proteinmengen wurden alle Daten zu der wildtypischen, volle Länge Proteinmenge im St. 9 relativiert. Hervorzuheben ist, dass in wildtypischen Embryonen die Menge der 1. Isoform und somit die volle Länge des Hmmr Proteins über den Entwicklungszeitraum von St. 9 bis zum St. 18 um 34,45 % zunahm und im St. 32 am geringsten vorhanden war mit einer Reduktion um 25,65 % im Vergleich zu Embryonen im St. 9 (Abb. 7E, F). In den *hmmr* Morphanten kam es zu einer stetigen Reduktion des vollen Länge Proteins, angefangen im St. 9, wo sich in diesen Embryonen die Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollen nahezu halbierte (46,72 %). Auch in den St. 12,5 und St. 18 kam es jeweils zu einer Reduktion um 70,31 % und 81,87 % im Vergleich zu den wildtypischen Proben. Im St. 32 wiesen *hmmr* Morphanten 84,33 % weniger Proteinmenge der 1. Isoform als die Kontroll-Embryonen auf (Abb. 7E, F). Besonders deutlich zeigte sich eine Erhöhung der Proteinladung der 2. Isoform in allen untersuchten Stadien der *hmmr* Morphanten. Durchschnittlich wiesen die behandelten Embryonen im St. 9 bis St. 18 im Vergleich zu den Kontrollen eine um 24,92 % erhöhte Proteinladung auf. Hervorzuheben ist, dass im späteren Kaulquappen Stadium 32 der größte Effekt bei der 2. Isoform mit einer 9-fach (88,92 %) stärkeren Proteinladung in den *hmmr* Morphanten verglichen zu den Kontroll-Embryonen nachgewiesen werden konnte. Selbst die wildtypische Proteinmenge im St. 32 war verglichen zu St. 18 um 77,15 % reduziert (Abb. 7E, F). Ein vergleichbarer Effekt konnte für die 3. Hmmr Isoform beobachtet werden. Ähnlich zu der 2. Isoform zeigten die *hmmr* Morphanten in den St. 9 bis St. 32 eine erhöhte Proteinmenge der

3. Isoform im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle im selben Stadium. Durchschnittlich zeigten die *hmmr* Morphanten von der 3. Isoform 15,56 % mehr Proteinladung in den St. 9 bis St. 18 (Abb. 7E, F). Auch hier zeigte sich die größte Auswirkung des *hmmr* Funktionsverlusts auf die Proteinmenge der 3. Isoform im St. 32. Hier wurde im Vergleich zur Kontrolle mehr als doppelt (58,2 %) so viel Protein nachgewiesen.

Abb. 7G zeigt den Vergleich der relativen Protein Expression von Hmmr vom Zeitpunkt der St. VI Oozyte bis zum unbefruchteten Ei einen schnellen Anstieg von 0,018 auf 0,148, was einer ca. 8-fachen Menge entspricht (Fisher et al., 2023; Peshkin et al., 2019). Diese Proteinmenge steigt bis zum St. 12 auf ein Maximum von 0,167, also 12,84 % mehr Protein verglichen zur Zygote. Daraufhin halbiert sich die relative Hmmr Protein Expression auf ein Minimum von 0,071 im St. 26. Über den weiteren Entwicklungsverlauf bis zum St. 41 bleibt die relative Hmmr Protein Menge bei einem Wert von 0,081 (Fisher et al., 2023; Peshkin et al., 2019). Demgegenüber steigt gleichzeitig zur relativen Hmmr Proteinmenge auch die Anzahl der *hmmr* mRNA Transkripte (Abb. 7G; Fisher et al., 2023; Session et al., 2016). Hierbei kommt es zu einem ca. 23-fachen Anstieg von 14,04 Transkripte / Millionen (*engl. transcripts per million,* TPM*)* in der Oozyte zu 319,24 TPM im unbefruchteten *Xenopus* Ei. Anschließend kommt es zu einem deutlichen Abfall der *hmmr* mRNA-Transkripte im St. 8 auf 95,63 TPM.

Bei *Xenopus* erfolgen nach der Befruchtung elf bis zwölf schnelle, nahezu synchrone Zellteilungen ohne gleichzeitiges Wachstum (Satoh, 1977), das dem St. 8 (Nieuwkoop & Faber, 1994) und dem Mitt-Blastula Übergang entspricht (J. C. Gerhart, 1980; Newport & Kirschner, 1982; Signoret & Lefresne, 1971). Währenddessen kommt es zu einer Aktivierung des zygotischen Genoms (Bachvabova & Davidson, 1966), was im darauffolgenden St. 9 mit dem Anstieg der *hmmr* mRNA-Transkripte auf 140,4 TPM einhergeht. Ab St. 10 mit einer Menge von 109,06 TPM reduzieren sich die mRNA-Transkripte im weiteren Entwicklungsverlauf stetig, bis dann im St. 35-36 nur noch 1,94 TPM detektiert werden können. Allerdings kommt es im letzten dargestellten St. 40 nochmals zu einem Anstieg der mRNA-Transkripte auf 47,1 TPM (Abb. 7G; Fisher et al., 2023; Session et al., 2016).

Abschließend ist festzuhalten, dass die *hmmr* mRNA-Transkription abhängig von der Repressor-Funktion von *zic2* ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *hmmr* selbst einen Feedback-Mechanismus für die eigene mRNA-Transkription besitzt und sich

dies auf die Proteintranslation mit der Hochregulation anderer Hmmr Protein Isoformen kompensatorisch auswirkt.

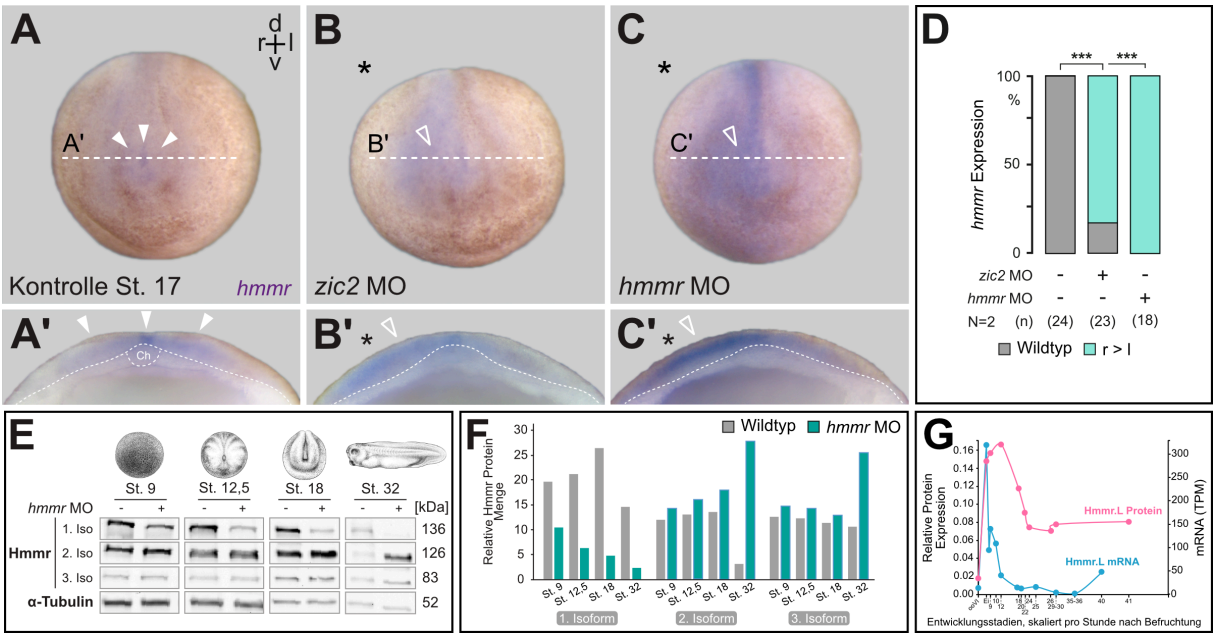


Abb. 7: Zic2 wirkt als Repressor von Hmmr und differenziell gespleißte Hmmr Protein-Isoformen werden im *hmmr* Funktionsverlust hochreguliert

(**A-C**) *hmmr* Expression in Kontrollembryonen (A), *zic2* (B) und *hmmr* Morphanten (C) nach *in situ*-Hybridisierung (anteriore Ansicht) mit N-terminaler Antisense-Sonde im St. 17. Die jeweiligen Morpholino Oligomere (1 pmol) wurden dorsal unilateral in eine Blastomere im 4-Zellstadium injiziert (Asterisk; B, C). Pfeilköpfe zeigen *hmmr* Expression in den tiefen, neuralen Zellen und der dorsalen Mittellinie. Gestrichelte, weiße Linien deuten die transversalen Schnittebenen im Bereich des sich entwickelnden Vorderhirns an. Verstärkte Expression nach *hmmr* und *zic2* Funktionsverlust (Pfeilkopfumrandungen, B, C). (**A'-C'**) Transversale Schnitte der Embryonen gekennzeichnet in A-C. Gestrichelte, weiße Linien grenzen tiefe neurale Schicht von der unteren ventralen ab. (**D**) Quantifizierung und statistische Analyse der *hmmr*-exprimierenden Embryonen. Wildtypische und verstärkte Expression auf der rechten, injizierten Seite (r>l) wurden ausgewertet (χ^2-Test). (**E**) Western Blot-Analyse von Hmmr in *X. laevis* Embryonen im St. 9, 12,5, 18 und 25 nach 4-facher *hmmr* MO-Injektion (je 1 pmol) in die animalen Blastomeren im 4-Zellstadium. Immunoblots wurden mit anti-Hmmr Antikörper und anti-α-Tubulin Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. *Xenopus* Illustrationen © Natalya Zahn (2022). (**F**) Quantifizierung der relativen Hmmr Protein Menge der Western Blot-Analyse in E. (**G**) mRNA und Protein Expressions-Profil von *Xenopus hmmr*.L (von Xenbase.org). (Ch) Corda dorsalis, (d) dorsal, (Iso) Isoform, (l) links, (MO) Morpholino Oligomer, (N) Anzahl der Experimente, (n) Anzahl der Embryonen, (r) rechts, (TPM) *engl. transcripts per million*, (v) ventral.

2.3 *hmmr*-sgRNAs induzieren effizient Doppelstrangbrüche im Mikrotubuli-bindenden N-Terminus

Analysen mit *hmmr* MO-induzierten Funktionsverlust-Experimenten in *Xenopus* zeigten bereits, dass die Bindung über den konservierten N-Terminus an MT die Funktion von Hmmr während des NRS und der damit einhergehenden neuralen Morphogenese erheblich beeinflusst (Prager et al., 2017). Um zu testen, ob diese Neurulationsdefekte durch den Knockdown maternaler oder früh aktivierter, zygotischer *hmmr* mRNA verursacht werden und zur Verifizierung des *hmmr* MO-Phänotyps, sollte mithilfe des *engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) / CRISPR-*associated protein 9* (Cas9)-Systems die gezielte Mutagenese durchgeführt werden. Hierbei zielt eine sequenzspezifische *engl. small guide* (sg)-RNA auf die genomische Zielsequenz neben der *engl. Protospacer Adjacent Motif* (PAM)-Sequenz ab und verursacht durch die Rekrutierung der Cas9-Endonuklease einen Doppelstrangbruch. Anschließend wird diese DNA durch nicht-homologe Endverknüpfung repariert, bei dem kleinere Insertionen und Deletionen (Indels) entstehen können (Bhattacharya et al., 2015). Da *hmmr* in *Xenopus laevis* nur auf dem L-Alloallel vorkommt, ist es für die CRISPR / Cas9-vermittelte Genom-Editierung, ähnlich wie diploide Organismen, zugänglicher.

Zur Erzeugung von *hmmr* F0-Mutanten (auch *hmmr* Crispanten), wurden zwei verschiedene sgRNAs, welche spezifisch im Hmmr N-Terminus die MTBD 2 anzielen, hergestellt (Abb. 8A). Die erste *hmmr* sgRNA richtet sich gegen eine Sequenz in Exon 4, die zweite gegen eine Sequenz in Exon 5 (Abb. 8A). Beide wurden gemeinsam mit Cas9 als ein Cas9-Ribonukleoprotein (CRNP)-Komplex im 1-Zellstadium injiziert und werden im weiteren Verlauf als *hmmr* CRNP 1 und *hmmr* CRNP 2 abgekürzt. Erste Ergebnisse mithilfe des T7 Endonuklease (T7E1)-Assays konnten zeigen, dass ein CRISPR / Cas9-induzierter Funktionsverlust am *hmmr*-Lokus in St. 45 Embryonen, welche mit *hmmr* CRNP 1 injiziert wurden, und in St. 21 Embryonen, welche mit *hmmr* CRNP 2 injiziert wurden, nachweisbar war (Abb. 8B). Aufgrund der unterschiedlichen Schweregrade der resultierenden Phänotypen, welche durch die Injektionen beider *hmmr* CRNPs hervorgerufen wurden, erfolgte die Analyse verschiedener embryonaler Entwicklungsstadien. Das T7E1-Assay wird häufig zur Erkennung modifizierter DNA eingesetzt. Durch dieses können Heteroduplexe nachgewiesen werden, die durch die Hybridisierung von Wildtyp- und mutierten DNA-Strängen entstehen (Mashal et al.,

1995). Daher konnten die Mutationen um den Cas9-vermittelten Doppelstrangbruch in beiden *hmmr* Zielsequenz-Regionen durch die Anwesenheit der T7E1-verdauten DNA-Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 8B). In den wildtypischen Kontrollen wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction,* PCR) eine DNA-Bande auf Höhe von 916 Basenpaaren (Bp) deutlich. In *hmmr* CRNP 1 Embryonen wurden wildtypische DNA-Fragmente in Höhe von 916 Bp und kleinere Fragmente, welche durch T7E1 geschnitten wurden, auf Höhe von 683 Bp und 229 Bp sichtbar. Für Embryonen, welche mit *hmmr* CRNP 2 injiziert wurden, konnten auf Höhe von 916 Bp wildtypische Fragmente und auf Höhe von 589 Bp und 327 Bp mutierte Fragmente detektiert werden (Abb. 8B).

Ein ergänzender Nachweis der Mutagenese an den *hmmr*-Loki konnte nach PCR-basierter Amplifikation der genomischen DNA fusionierter Embryonenproben der Stadien 21 (für *hmmr* CRNP 2) und 45 (für *hmmr* CRNP 1) durch die Sequenzierung der Zielregion und mit weiterführender *engl. inference of CRISPR edits* (ICE) – Analyse verifiziert werden (Abb. 8C, D). Die Ergebnisse zeigten, dass beide sgRNAs spezifisch *hmmr* in Kombination mit Cas9 schneiden konnten und dadurch einen Doppelstrangbruch drei Basenpaare oberhalb der PAM-Seite zur Folge hatten (Abb. 8C, D). Für die mit *hmmr* CRNP 1-injizierten und sequenzierten Embryonen, lag die Indel-Frequenz bei 25%, was den hypothetischen Anteil an Zellen widerspiegelt, die verändert vorlagen. Der auf dem Pearson-Korrelations-Koeffizienten (R^2) beruhende Modell-Fit gibt an, wie gut die berechneten Indels zu den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung passen. Je höher dieser R^2-Wert, desto zuverlässiger ist der angegebene Knockout-Wert. Für *hmmr* CRNP 1 Embryonen lag der R^2-Wert bei 94% und der zugehörige Knockout-Wert bei 1 (Abb. 8C). Dieser Knockout-Wert gibt an, dass 1% der fusionierten Embryonen eine kleine Deletion von -2 Bp aufwies und somit zu einer Frameshift-Mutation führte (Abb. 8C). Im Vergleich dazu lag die Indel-Frequenz bei den mit *hmmr* CRNP 2-injizierten und analysierten Embryonen bei 92% (Abb. 8D). Der R^2-Wert für diese Embryonen war ähnlich zu den *hmmr* CRNP 1 Embryonen und lag bei 92%. Im Gegensatz zu dem niedrigen Knockout-Wert von 1 bei den *hmmr* CRNP 1 Embryonen, lag der Knockout-Wert hier nun bei 52. Somit zeigten 52% der fusionierten Embryonenproben Indels, welche zu einer Frameshift-Mutation potenziell beitrugen (Abb. 8D).

Die Analysen der *hmmr* Crispanten bestätigen, dass beide *hmmr* sgRNAs im Genom schneiden und zu einem effizienten Knockout des Gens führen. Durch diese gezielte Mutagenese im Mikrotubuli-bindenden N-Terminus sollte im Folgenden untersucht werden, ob der *hmmr* MO-Phänotyp reproduziert werden kann und ob sich daraus Rückschlüsse auf die Relevanz der MTBD für RI / MET-Prozesse während der Embryonalentwicklung ziehen lassen.

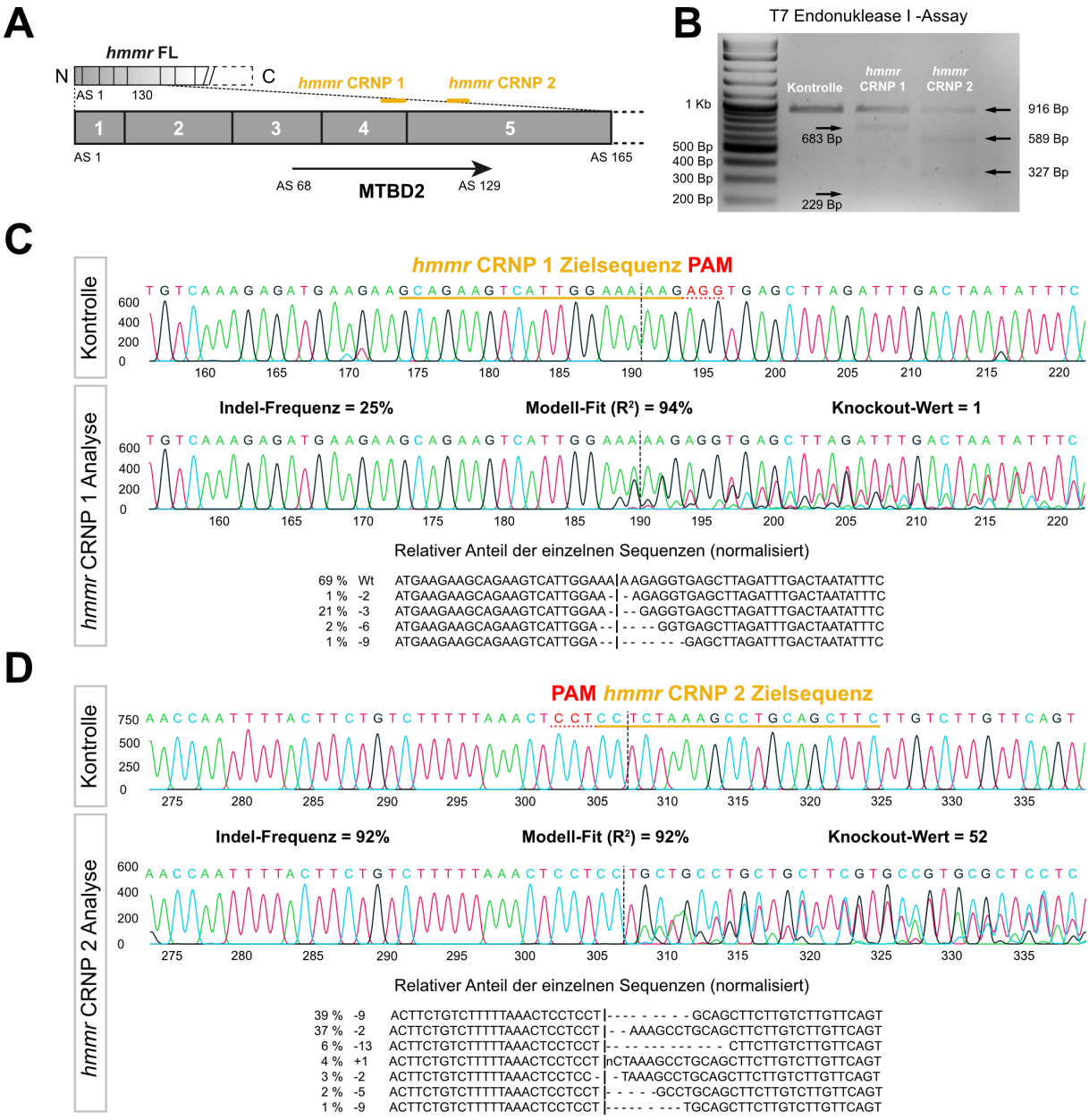


Abb. 8: Beide gegen *hmmr* gerichteten sgRNAs im N-Terminus induzieren Doppelstrangbrüche und potenzielle Funktionsverlust-Allele

(**A**) Schematische Darstellung der vollen Länge von Hmmr mit vergrößerter Darstellung des N-Terminus beginnend mit Aminosäure 1 bis 130. Beide sgRNAs *hmmr* CRISPR-Cas9 Ribonukleoprotein (CRNP) 1 und CRNP 2 (gelb) sind gegen die Zielsequenz der Mikrotubuli Bindedomäne 2 (AS 68 - AS 129) von Hmmr gerichtet. (**B**) T7 Endonuklease 1 Assay zum Nachweis von CRISPR/Cas9-induzierten Mutationen am *hmmr* Lokus in St. 45 Embryonen für die sgRNA in Exon 4 und St. 21 Embryonen für die sgRNA in Exon 5. Der T7E1 Assay zeigt Mutationen um den durch Cas9 induzierten Doppelstrangbruch in beiden sgRNA Regionen, die auf die MTBD2 von Hmmr abzielen, was durch die Anwesenheit der T7E1-verdauten Fragmente verdeutlicht wird. (**C**, **D**) Synthego ICE Sequenzier-Ergebnisse der beiden *hmmr* CRNPs bestätigen die Funktionalität der sgRNAs (Sequenz jeweils gelb in der Kontrolle unterstrichen). Die rot gestrichelte Linie gibt die PAM-Sequenz an. Die erwartete Restriktion wird durch die vertikale, schwarz gestrichelte Linie repräsentiert. Unterschiedliche DNA-Spezies resultieren in heterogenen Sequenzierungspeaks um und hinter der Restriktionsstelle. (AS) Aminosäure, (Bp) Basenpaare, (CRNP) CRISPR-Cas9 Ribonukleoprotein, (FL) *engl. full length*, (Kb) Kilobase, (MTBD) Mikrotubuli-Bindedomäne, (T7E1) T7 Endonuklease 1, (Wt) Wildtyp.

2.4 Die CRISPR / Cas9-vermittelte Mutagenese von *hmmr* weist auf eine essenzielle Rolle während früher und später radialer Interkalationsprozesse hin

RI ist die treibende Kraft des MET, ein bekannter Wnt-abhängiger Prozess, der in einigen embryonalen Gewebsschichten, insbesondere während der Nierenentwicklung, vorkommt (Simons et al., 2005; Stark et al., 1994). Wie bereits erwähnt, sind die N-terminalen Motive von *hmmr* ausschlaggebend für korrekte RI / MET-Prozesse während des NRS (Prager et al., 2017). Allerdings kommen RI / MET-Prozesse bereits früher während der Gastrulation in *Xenopus laevis* vor.

Bereits durchgeführte Experimente mit *hmmr* MO-Injektionen zeigten, dass die Zellelongation und in Folge die RI in der dorsalen nicht-einwandernden Marginalzone im St. 11/12, während der späten Epibolie, beeinträchtigt war. Jedoch konnte in solchen Embryonen keine offensichtlichen Gastrulationsdefekte beobachtet werden (Nickel, 2020). Aufgrund dessen sollte durch die CRISPR / Cas9-basierte Mutagenese untersucht werden, ob Gastrulationsdefekte verursacht werden könnten. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob *hmmr* nicht doch eine spezifische Rolle während früher RI / MET-Prozesse einnimmt und ob diese abhängig von zygotisch-aktivierter *hmmr* mRNA ist.

Durch *in situ*-Hybridisierung mit einer gegen den C-Terminus von *hmmr* gerichteten Antisinn-Sonde wurde die Expression vor und während der Epibolie erneut untersucht (Abb. 9A-C). Im 1-Zellstadium ließ sich maternales *hmmr* Transkript in der animalen Hälfte des Embryos nachweisen (Abb. 9A; Casini et al., 2010). Zu Beginn der Epibolie im St. 8 lag *hmmr* Transkript auch in der animalen Hälfte des Embryos vor und erstreckte sich im Laufe der Entwicklung weiter vegetal (Abb. 9B; Casini et al., 2010). Mit startender Gastrulation im St. 10, war *hmmr* mRNA hauptsächlich im Ektoderm exprimiert und im sagittalen Schnitt wurde deutlich, dass sich *hmmr* Transkript in der animalen Kappe befand (Abb. 9C, C'; Casini et al., 2010). Die Epibolie findet in *Xenopus* Embryonen zwischen den St. 8 und St. 11,5 statt. In dessen Folge expandieren die Zellen der animalen Kappe, bzw. des Blastocoel-Dachs (*engl. blastocoel roof,* BCR), welches sich dadurch verdünnt (Keller, 1978; Szabó et al., 2016). Zu Beginn besteht das BCR aus einer mit mehreren engen Zell-Zell-Verbindungen superfiziellen Einzelschicht (Abb. 9D, Blau), während die tiefe Zellschicht aus 2-4 Ebenen schwach verbundener Zellen besteht (Abb. 9D, Grün; Keller, 1978, 1980; Szabó et al., 2016). Mit voranschreitender Epibolie durchlaufen die tiefen Zellen RI, um eine Einzelschicht zu bilden (Abb. 9D; Keller, 1980), allerdings dringen diese Zellen nicht in die superfizielle Schicht ein (Abb. 9D; Keller, 1978). Ein wesentlicher Bestandteil des basalen BCR-Substrats, an dem Zellen während der Epibolie entlang migrieren können, ist eine extrazelluläre Matrix bestehend aus Fibronektin (Fn1)-Fibrillen, die sich während der Gastrulation auf dem BCR entwickelt (Abb. 9D; Boucaut & Darribere, 1983; Lee et al., 1984; Nakatsuji & Johnson, 1983; Winklbauer, 1998).

Vorangegangene Untersuchungen *in vivo* zeigten, dass der *hmmr* Funktionsverlust im Neuralrohr zu einer reduzierten Zell-Matrix-Adhäsion führte (Hagenlocher, 2016). Dabei lösten sich die Zellen von der Basalmembran, wodurch eine Lücke zwischen den Zellen und der Basalmembran entstand. Zusätzlich wurden nur noch wenige, dickere Fn1-Fibrillen, statt eines feinen Netzwerks gebildet (Hagenlocher, 2016). Aufgrund dieser Beobachtung sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob *hmmr* schon früh während der Gastrulation für die korrekte Ausbildung des Fn1-Netzwerks benötigt wird.

Hierfür wurden Embryonen in die animale Hemisphäre im 1-Zellstadium mit *hmmr* CRNP 2, welches das Exon 5 anzielt, injiziert (Abb. 9E-H). Die wildtypischen Kontrollen

wiesen gegen Ende der Epibolie zum St. 11 eine dünnere, bzw. durch Interkalation verjüngte tiefe Zellschicht der animalen Kappe auf (Abb. 9E, E'). Zusätzlich bildete sich ein dichtes Fn1-Netzwerk am BCR aus, welches bei der Betrachtung der inneren animalen Kappe durch die feinen, verzweigten Fn1-Fibrillen deutlich wurde (Abb. 9F). Im Gegensatz dazu bewirkte die Injektion von *hmmr* CRNP 2, dass die Zellschichten der animalen Kappe massiv verdickt waren und es zu keiner RI und folglich keiner Reduktion der Zellschichten kam (Abb. 9G, G'). Auch das Fn1-Netzwerk wurde nicht mehr richtig ausgebildet und führte im Knockout von *hmmr* zu wenigen, dicken Fn1-Fibrillen, wie zuvor schon im Neuralrohr beobachtet werden konnte (Abb. 9G, H; Hagenlocher, 2016).

Um die Ursache dieses Phänotyps zu klären, wurden daraufhin Zeitrafferfilme über einen Zeitraum von t=400 min, bzw. über sechs Stunden, aufgenommen (Abb. 9I, I_1, J, J_1). Als Startpunkt der Zeitrafferfilme (t=0') wurde die beginnende Gastrulation mit Ausbildung der dorsalen Urmundlippe (DL) zum St. 10 gewählt, da bis zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung von Kontrollen und *hmmr* Crispanten gleich ablief (Abb. 9I, J). Mit dem Ende der Gastrulation zum St. 12,5 (t=400') zeigten die Kontroll-Embryonen einen deutlich verkleinerten Blastoporus (BP; Abb. $9I_1$). Demgegenüber scheiterten die mit *hmmr* CRNP 2 injizierten Embryonen daran den BP zu schließen und wiesen dabei starke Exogastrulations-Phänotypen auf (Abb. $9J_1$). Ein ähnlicher Phänotyp zeigte sich in früheren Studien, wo der Verlust eines intakten Fn1-Netzwerks zu ähnlichen Exogastrulations-Phänotypen führte (J. C. Boucaut et al., 1985). Dies lässt vermuten, dass *hmmr* an der RI in der animalen Kappe und der korrekten Ausbildung eines Fn1-Netzwerks beteiligt ist.

Weitere phänotypische Analysen der *hmmr* Crispanten zeigten, dass neben den Blastoporus-Schlussdefekten (BPD) auch anteriore Neurulationsdefekte (NRD) im St. 21 auftraten (Abb. 9K-N). Im Vergleich zu den Wildtypen kam es durch die Injektion von *hmmr* CRNP 1 oder von *hmmr* CRNP 1 und 2 gemeinsam in 1-Zellstadien vorwiegend zu anterioren Neurulationsdefekten (Abb. 9K, M, N), wobei ein geringer Teil der Embryonen auch ein offenes Neuralrohr aufwies (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen deckten sich mit denen aus früheren Studien, in denen der Verlust der *hmmr* Funktion zu Defekten im anterioren Neuralrohr führte (Prager et al., 2017). Den stark ausgeprägten BPD zeigten überwiegend die Embryonen, die auch mit *hmmr* CRNP 2 injiziert wurden (Abb. 9L, N).

Im späteren Kaulquappen-Stadium 36 wurde deutlich, dass in etwa 56% der *hmmr* CRNP 1 Embryonen im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen hauptsächlich anteriore Malformationen, wie kleinere Köpfe und verkleinerte Klebdrüse, fehlende Augen und eine kürzere Körperachse auftraten (Abb. 9O, P). Diese Phänotypen bestätigen zusätzlich die Spezifität des *hmmr* MO aus der Analyse früherer Arbeiten, bei der die zusätzliche Injektion der vollen Länge (*engl. full length,* FL) von *hmmr* mRNA die fehlerhaften Kopfstrukturen wieder retten konnte (Prager et al., 2017). In einem der frühesten Schritte der Augenentwicklung bildet das anteriore Neuroepithel des Neuralrohrs durch beidseitige Ausstülpung die optischen Vesikel (OV; Hyer et al., 1998). Es wurde bereits dokumentiert, dass *hmmr* für die Augenentwicklung benötigt wird. Im Verlust der *hmmr* Funktion konnte beobachtet werden, dass das Augengewebe zwar noch *pax6* exprimierte, jedoch bildete sich kein vollständiges Lumen und auch das umgebende Epithel war weniger organisiert im Vergleich zu den Kontroll-Proben (Hagenlocher, 2016). In Erweiterung dieser bisherigen Kenntnisse, konnte in sagittalen Schnitten durch das OV in den *hmmr* CRNP 1 Embryonen beobachtet werden, dass die Lumen-Bildung des OVs auch gestört war und das umliegende Epithel weniger elongierte und organisierte Zellen aufwies (Abb. 9Q, Q_1, R, R_1).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *hmmr* während früher RI / MET-Prozesse in der animalen Kappe während der Epibolie benötigt wird. Diese Prozesse scheinen abhängig von einem korrekt ausgebildeten Fn1-Netzwerk zu sein, welches in *hmmr* CRNP 2 Embryonen deutlich gestört war. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das CRISPR / Cas9-System die *hmmr* MO-verursachten Effekte weitestgehend phänokopieren kann. Allerdings hatten Embryonen, die in 4-Zellstadien 4-mal in die animale Hemisphäre injiziert wurden, keinen schweren Gastrulationsdefekt entwickelt (nicht gezeigt; Nickel, 2020). Dies lässt vermuten, dass unter Verwendung des *hmmr* MO kompensatorische Mechanismen die Exogastrulation verhindern. Letztlich zeigten auch Neurula- und Kaulquappen-Stadien, die mit *hmmr* CRNPs behandelt wurden, dass N-terminale Motive von *hmmr*, wie die MTBD 2, speziell für die RI / MET-Prozesse während des anterioren NRS und die Ausbildung der OV essenziell ist.

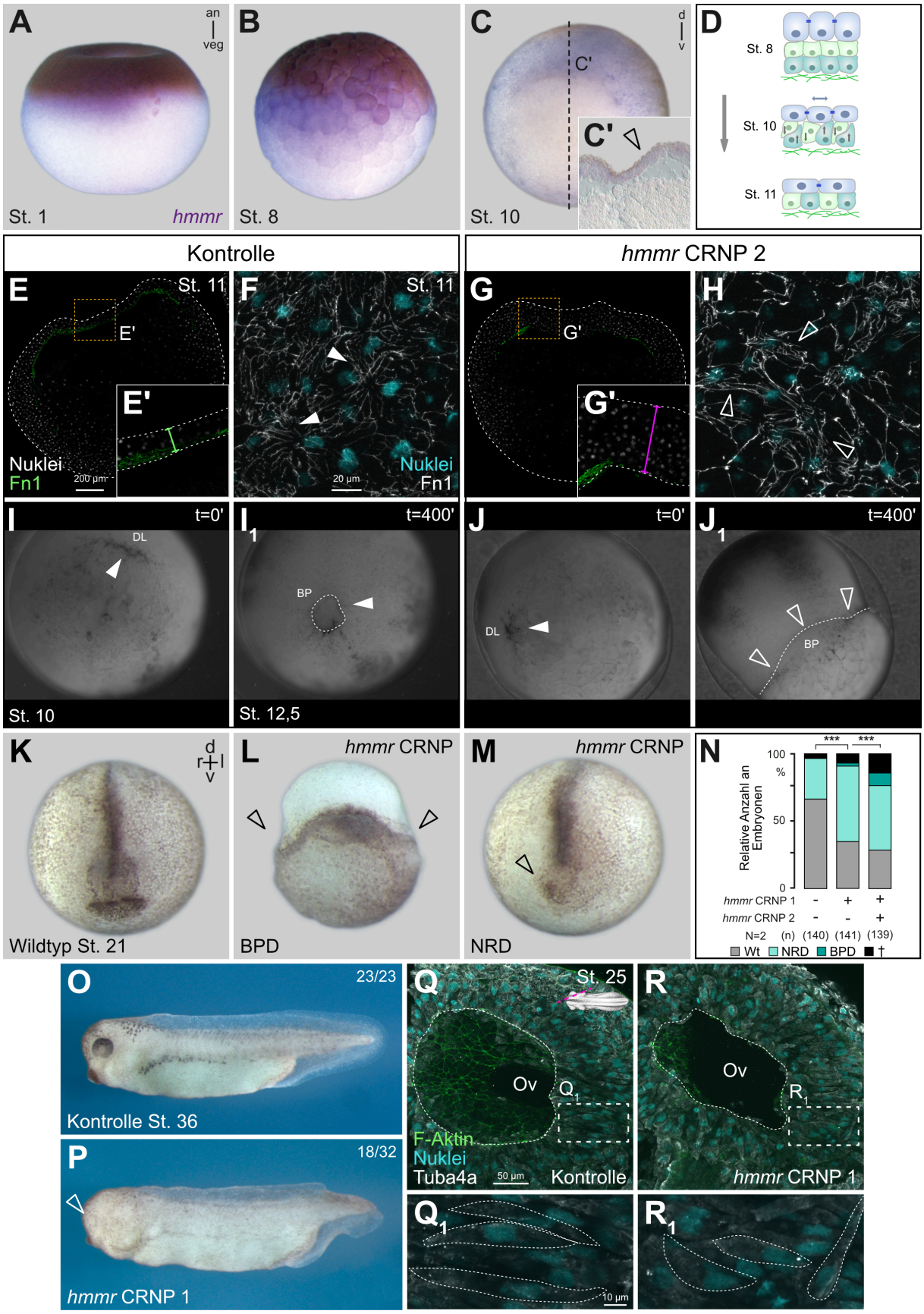


Abb. 9: Hmmr ist notwendig für frühe und späte radiale Interkalationsprozesse

(**A**-**C**) *hmmr* Expression in wildtypischen Embryonen St. 1, 8 und 10 nach *in-situ*-Hybridisierung mit C-terminaler Sonde. Frühe maternale *hmmr* Expression in animaler Hemisphäre in St. 1 und 8. Anschließende zygotische mRNA-Expression nach Midblastula-Übergang (C). (C') Midsagittaler Schnitt durch Embryonen im St. 10 (Ebene verdeutlicht in C) zeigt *hmmr* Expression in animaler Kappe. (**D**) Schematische Darstellung des in C' dargestellten Prozesses der Epibolie in *Xenopus* Embryonen, einschließlich der Verbreiterung der superfiziellen Schicht (gezeigt in Blau) und der radialen Interkalation der tiefen Zellschichten (gezeigt in Hell- und Dunkelgrün). Die tiefe Schicht interkaliert nicht in die superfizielle Schicht (Schema angelehnt an Szabó et al., 2016). Fibronektin dargestellt als Bestandteil der Basalmembran (Grün) und Adhäsionsproteine als Verbindung der apikalen Membran (Dunkelblau). (**E**, **G**) Sagittale Schnitte von St. 11 Embryonen mit Hoechst-gefärbten Nuklei (Weiß) und Fibronectin (Grün)-markierte Basalmembran zeigt interkalierte, tiefe Zellschicht in animalen Kappen von Kontrollen (E; grüne Klammer in E') und stark verdickte animale Kappe in *hmmr* CRISPR-Cas9 Ribonukleoprotein 2 Crispanten (G; magenta Klammer in G'). (**F**, **H**) Regelmäßige Fn1-Matrix (weiß; Pfeilspitzen) in Kontrollembryonen (F) mit Hoechst-gefärbten Nuklei (Cyan). Gestörte fibrilläre Fn1-Matrix in den *hmmr* CRNP 2 Crispanten (H; Pfeilspitzenumrandungen). (**I**, **I_1**, **J**, **J_1**) Vegetale Ansicht von Zeitraffer Videoaufnahmen der Gastrulas im St. 10 zum Zeitpunkt t=0' (I, J). Dorsale Urmundlippe (Pfeilspitzen) in Kontrollen (I) und *hmmr* CRNP 2 Crispanten (J). Nach t=400' Minuten ist der Blastoporus (weiß gestrichelte Linie) in Kontrollembryonen St. 12,5 nahezu vollständig geschlossen (I_1; Pfeilspitze). Konträr dazu Exogastrulas mit weit geöffnetem BP in *hmmr* CRNP 2 Crispanten (J_1, weiß gestrichelte Linie; Pfeilspitzenumrandungen). (**K**-**M**) Neurula Embryonen, die fixiert wurden, sobald die Kontrollembryonen (K) St. 21 erreicht haben. Starke Blastoporus-Schlussdefekte (L) und Neuralrohrschlussdefekte (M) in *hmmr* Crispanten injiziert mit *hmmr* CRNP 1 oder *hmmr* CRNP 1+2 zusammen (Pfeilspitzenumrandungen). (**N**) Quantifizierung und statistische Analyse der Ergebnisse in K-M (χ^2-Test). (**O**, **P**) Wildtypische Kontroll-Kaulquappen in St. 36 (O) und *hmmr* CRNP 1-injizierten Embryonen mit reduzierten bis fehlenden anterioren Strukturen (P, Pfeilspitzenumrandung). (**Q**, **R**) Sagittale Schnitte (magenta Schnittebene in Cartoon in Q) durch das optische Vesikel von St. 25 Kontroll- (Q) und *hmmr* CRNP 1-Embryonen (R). Fluoreszenz-markierte Nuklei (cyan) und F-Aktin (grün) zusammen mit immunofluoreszent-markierten α-Tubulin als Marker für das Mikrotubuli-Zytoskelett (Tuba4a, Weiß). OV-Lumen ist durch weiß gestrichelte Linie gekennzeichnet. Reduziertes Lumen in *hmmr* CRNP 1 Crispanten (R). (**Q_1**, **R_1**) Vergrößerung der in Q und R weiß gestrichelten Boxen. Elongierte und interkalierte Epithelzellen in Kontrollembryonen (Q_1; weiß gestrichelte Umrandungen) und abgerundete, fehlorganisierte Zellen in *hmmr* CRNP 1 Crispanten (R_1; weiß gestrichelte Umrandungen). (an), animal, (BP) Blastoporus, (BPD) Blastoporus-Schlussdefekte, (CRNP) CRISPR-Cas9 Ribonukleoprotein, (DL) dorsale Urmundlippe, (Fn1) Fibronektin, (N) Anzahl der Experimente, (n) Anzahl der Embryonen, (NRD) Neuralrohrschlussdefekte, (OV) optisches Vesikel, (t) Zeitpunkt, (veg) vegetal, (Wt) Wildtyp.

2.5 Hmmr wird für Wnt-abhängige Musterbildung im Vorderhirn benötigt

Die Musterbildung während der frühen Embryonalentwicklung hängt von einem komplexen Zusammenspiel zwischen Signalwegen und TF ab (J. Gerhart, 2015). Im Diencephalon stellt die Epiphyse (Zirbeldrüse) ein markantes Derivat der Dachplatte dar und zeichnet sich durch die Expression des Homeodomänen-TF *notochord homeobox (not)* aus. Noch bevor die Epiphyse als morphologische Struktur erkennbar wird, markiert *not* bereits zwei Vorläuferzellpopulationen in den anterioren Neuralfalten (Abb. 10A, A'; Aquilina-Beck et al., 2007; von Dassow et al., 1993). Diese Zellpopulationen konvergieren in wildtypischen Embryonen mit den Neuralfalten medial und verschmelzen an der Mittellinie, wodurch auf Höhe des kaudalen Diencephalons die Dachplatte und somit die Anlage der Epiphyse entsteht (Abb. 10A, A'; Prager et al., 2017).

Frühere Studien zeigten, dass der Verlust der *hmmr* Funktion dazu führt, dass die *not*-exprimierenden Zellpopulationen in Neurula-Embryonen nicht medial konvergieren können (Prager et al., 2017). Zum Vergleich wurde in dieser Arbeit ein *hmmr* CRNP 1 vermittelter Funktionsverlust induziert und anschließend die Expression dreier verschiedener anteriorer Marker-Gene durch *in-situ*-Hybridisierung analysiert (Abb. 10). Dabei zeigten 65,6 % der *hmmr* CRNP 1 Embryonen im St. 21 spezifizierte *not*-exprimierende Zellpopulationen, die allerdings daran scheiterten zu konvergieren und in der Mittellinie zu fusionieren (Abb. 10B, B'). Zusätzlich war die Ausbildung des Neuralrohrlumens deutlich gestört (Abb. 10B'). In einer aktuellen Studie wurde belegt, dass Mutationen in Mäusen, die entweder zu einer reduzierten oder übermäßigen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führen, ebenfalls anteriore NRDs entwickeln (Bogart & Brooks, 2025). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch in den *hmmr* CRNP 1 Embryonen die Neuralfalten-Fusionierung aufgrund fehlerhafter Wnt-Signalwegs-Regulierung gestört war.

Der TF *forkhead box D1 (foxd1,* auch *Xbf2*) ist in Neurula-Stadien in der Vorderhirnregion von *Xenopus* Embryonen exprimiert (Abb. 10C; Gómez-Skarmeta et al., 1999; Mariani & Harland, 1998), dort wo die Levels an BMP- und Wnt-Signalwegsaktivierung am niedrigsten sind (Niehrs et al., 2001). Hierbei fungiert *foxd1* als transkriptioneller Repressor, welcher die Eigenschaft besitzt ektodermalen Zellen

ein neurales Schicksal zu vermitteln (Mariani & Harland, 1998). In animalen Kappen-Explantaten, die durch *foxd1* Überexpression neurales Schicksal erlangten, wurde die Expression von *wnt3a* induziert. Diese Wnt-Aktivität wird für die *foxd1*-abhängige neurale Kaudalisierung benötigt (Fonar et al., 2011). Die Injektion von *hmmr* CRNP 1 versursachte bei 63,8 % der Embryonen im St. 18 eine verkleinerte und schmalere *foxd1*-Domäne in der anterioren Neuralplatte und hatte zur Folge, dass vor Beginn der Migration die segmentieren Schädelneuralleisten-Zellen in lateral verbreiterten Expressionsdomänen verblieben (Abb. 10D). Des Weiteren waren die *hmmr* Crispanten (CRNP 1) nicht in der Lage das anteriore Neuralrohr zu schließen, wie es in Kontroll-Embryonen der Fall war (Abb. 10C, D).

Der TF *orthodenticle homeobox 2* (*otx2*) wird in *Xenopus* vom Gastrula- bis zum frühen Schwanzknospenstadium im Mittel- und Vorderhirn sowie in der Anlage der zukünftigen Klebdrüse exprimiert, wobei die Expression im Gehirn bis in spätere Embryonalstadien erhalten bleibt (Abb. 10E; Blitz & Cho, 1995). Die Klebdrüse befindet sich anterior zum Vorderhirn und gilt allgemein als die am weitesten anteriore, ektodermale Struktur, die durch neurale Induktionssignale spezifiziert wird (Drysdale & Elinson, 1993; Sive et al., 1989). Durch die Injektion von *hmmr* CRNP 1 verblieben bei 65,9 % der Embryonen die anterioren *otx2*-Domänen, welche das Vorder- und Mittelhirn markieren, weiter ventral und zeigten nicht die typische Hufeisen-Form wie in den wildtypischen Kontrollen (Abb. 10E, F). Auch der Bereich der Klebdrüse war verschmälert und zeigte deutlich, dass die kopfbildenden Strukturen durch die Injektion von *hmmr* CRNP 1 gestört waren (Abb. 10F). Der Verlust von *hmmr* hatte jedoch auch für dieses anteriore Marker-Gen keinen Auswirkung auf die Intensität der Expression. Dies konnte auch in vorangegangenen Studien für den Funktionsgewinn von *hmmr* beobachtet werden, bei denen die Überexpression der vollen Länge von *hmmr* und auch die Injektion eines *hmmr* Deletionskonstrukts, dessen N-Terminus fehlt, keinen Effekt auf die *otx2*-Expression im St. 13 zeigten (Wiest, 2022).

Zusammenfassend ergab die Expressions-Analyse der anterioren Marker-Gene *not, foxd1* und *otx2,* dass der Knockout von *hmmr* zwar keinen Einfluss auf die Induktion, jedoch auf die RI / MET-vermittelte Wnt-abhängige anteriore Musterbildung hat.

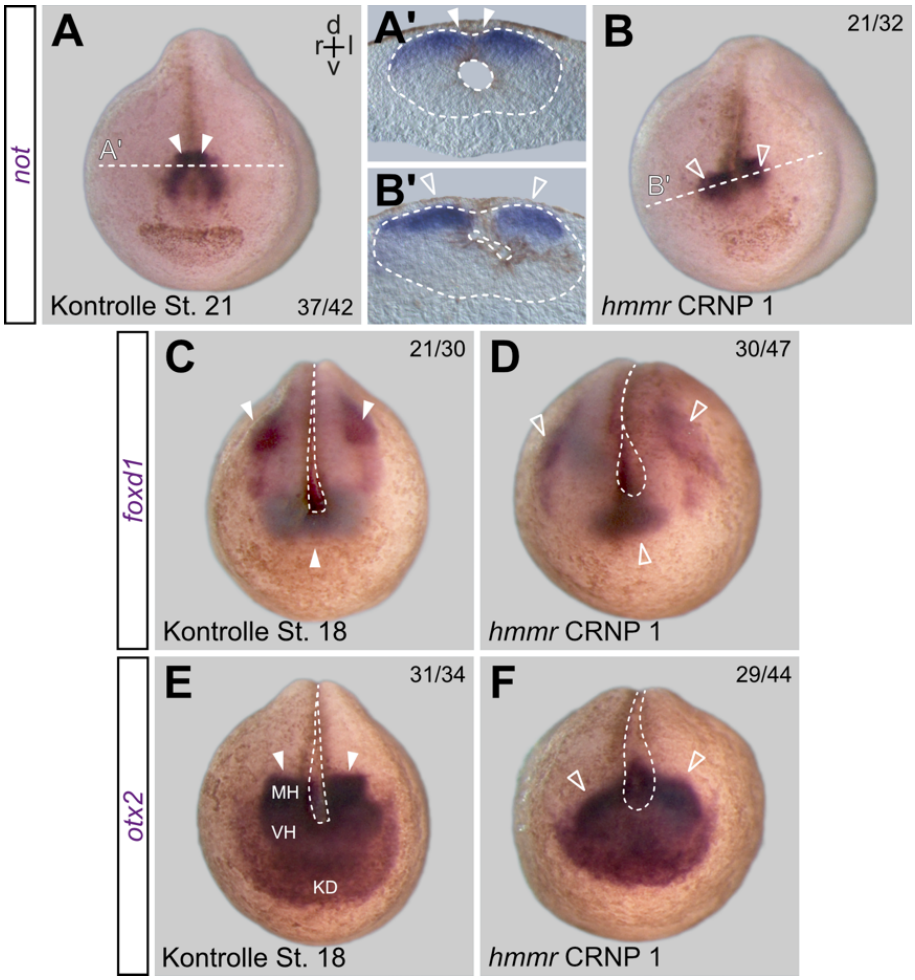


Abb. 10: Wnt-abhängige Vorderhirnmarker werden durch Hmmr reguliert

(**A**-**F**) Anteriore Ansicht von Embryonen nach *in-situ*-Hybridisierung mit anterioren Vorderhirnmarkern. (**A**, **B**) Neurale *not*-Expression in Kontrollembryonen (A) und in im 1-Zellstadium induzierten *hmmr* Crispanten 1 (CRNP 1; B) im St. 21. (A', B') Transversale Schnitte im Bereich des Vorderhirns wie in A und B angegeben. Neuralrohr umrandet mit weiß gestrichelten Linien. Keine mediale Annäherung *not*-exprimierender Zellpopulationen (weit auseinanderliegende Pfeilspitzenumrandung) und gestörte Lumen-Bildung. (**C**, **D**) *foxd1*-exprimierende Kontrollembryonen (C) und *hmmr* CRNP 1 (D) im St. 18. Wildtypen zeigten eine Expression in der anterioren Neuralplatte (untere Pfeilspitze) und in den segmentierten Schädelneuralleisten vor Beginn der Migration (seitliche Pfeilspitzen). Die weiß gestrichelte Linie deutet auf nahezu geschlossenes Neuralrohr hin (C). Im Gegensatz zeigten *hmmr* CRNP 1 eine verschmälerte anteriore Neuralplatte (untere Pfeilspitzenumrandung) und verbreiterte laterale Expressionsdomänen (seitliche Pfeilspitzenumrandung). Anteriores Neuralrohr weiter geöffnet als in Kontrollen (D; weiß gestrichelte Linie). (**E**, **F**) *otx2*-exprimierende Kontrollembryonen (E) und *hmmr* CRNP 1 (F) im St. 18. Hufeisenförmige Expression (Pfeilspitzen) im Bereich des Vorder- und Mittelhirns und expandierte Expression im Bereich der Klebdrüse bei Kontrollen (E). *hmmr* CRNP 1 zeigten, dass Expressionsdomänen ventraler verblieben (Pfeilspitzenumrandung) und der Bereich der Klebdrüse war komprimiert. Weiß gestrichelte Linien zeigten weiter geöffnetes Neuralrohr (F) als bei Kontrollen (E). Anzahl aller Embryonen mit jeweiligem Phänotyp in jedem Bild angegeben. (d) dorsal, (KD) Klebdrüse, (l) links, (MH) Mittelhirn, (NP) Neuralplatte, (r) rechts, (v) ventral, (VH) Vorderhirn.

2.6 Die Mikrotubuli-Bindung von Hmmr moduliert den kanonischen Wnt-Signalweg nachgeschaltet zur Aktivierung durch den Liganden Wnt3a

Wie in 2.5 gezeigt, scheint *hmmr* für die Wnt-vermittelte anteriore Musterbildung essenziell zu sein (Abb. 10). Im Jahr 1924 zeigten Transplantations-Experimente, dass ein Gewebebereich in der Nähe der dorsalen Urmundlippe des Blastoporus einer Amphibien-Gastrula, wenn er auf die ventrale Seite eines Wirts-Embryos transplantiert wird, eine sekundäre Achse induziert (Spemann & Mangold, 1924). Diese Erkenntnis führte im weiteren Verlauf dazu, dass die Injektion von *wnt1* in die ventrale Blastomere eines 4-zelligen Embryos die Ausbildung eines zweiten Organisators und somit die Entstehung siamesischer Zwillinge zur Folge hatte (McMahon & Moon, 1989). Dieses Verfahren, auch Doppelachsen (DA)-Assay genannt, etablierte sich als Standardmethode zur Analyse des Wnt-Signalwegs (Kühl & Pandur, 2008).

Bereits vorangegangene Experimente zeigten, dass die Modulation von *hmmr* zur verstärkten Induktion sekundärer Achsen führte (Nickel, 2020). Um Hmmr präziser hierarchisch einordnen zu können, wurde untersucht, ob Hmmr abhängig vom Liganden Wnt3a oder vom transkriptionellen Ko-Aktivator Ctnnb1 den kanonischen Wnt-Signalweg modulieren kann. Denn auch die Überexpression von *ctnnb1* auf der ventralen Seite von *Xenopus*-Embryonen führt zur Induktion sekundärer Achsen (Funayama et al., 1995).

Im nächsten Schritt wurde entweder eine niedrige Konzentration von *wnt3a* mRNA (0,16-0,32 pg) oder ein GFP-getaggtes *ctnnb1* mRNA-Konstrukt (60 pg; vereinfacht *ctnnb1* mRNA) einmal in die ventrale Marginalzone in St. 3 Embryonen in Kombination mit oder ohne *hmmr* MO (1 pmol) injiziert (Abb. 11A). Zur genauen Analyse war es essenziell, dass die injizierte mRNA so heruntertitriert wurde, dass nur noch in etwa die Hälfte aller Embryonen eine sekundäre Achsen ausbildeten (Nickel, 2020). Dies ist wichtig, um einordnen zu können, ob gewisse Faktoren, die im Wnt-Signalweg untersucht werden sollen, zu einer Reduktion oder einem Anstieg der ausgebildeten sekundären Achsen, und somit zu einer Modulation der Wnt-Signalwegsaktivierung führen. Für die Auswertung wurden die Embryonen in drei verschiedene Kategorien unterteilt. Hierbei wurden Kaulquappen, welche keine sekundäre (2°) Körperachse aufwiesen (Abb. 11B), die partielle 2° Achsen und somit komplette Rumpfstrukturen

aufzeigten (Abb. 11C) und welche, die eine komplette 2° Achse, inklusive aller Kopfstrukturen, wie Augen, Klebdrüse und Schlüpfdrüse hatten analysiert (Abb. 11D).

Die ventrale Überexpression von *wnt3a* mRNA führte zur Ausbildung von 37,5 % partiellen und 3,1 % kompletten DA. Die Ko-Injektion des *hmmr* MO führte zu einer deutlichen Reduktion der partiellen DA auf 16 %, wobei keine einzige komplette DA zustande kam (Abb. 11E). Dies widerlegt die Ergebnisse aus früheren Studien, in denen der Verlust der *hmmr* Funktion zu einer Anhäufung von DA und somit einem Anstieg der Wnt-Signalwegsaktivierung führte (Nickel, 2020). Ursächlich hierfür könnten die Konzentrationen an eingesetzter *wnt3a* mRNA sein, da schon sehr geringe Mengen den sensitiv reagierenden Wnt-Signalweg beeinflussen können. Im Vergleich dazu wiesen Embryonen, die mit *ctnnb1* mRNA injiziert wurden zu 26,6 % partielle und zu 22,6 % komplette DA auf. Der zusätzliche Verlust von *hmmr* hatte keinen Einfluss auf die Entstehung sekundärer Achsen. Auch hier wiesen 30,4 % der Embryonen eine partielle und 26,3 % eine komplette DA auf (Abb. 11F). Dies verdeutlicht, dass *hmmr* in der Modulation des Wnt-Signalwegs vorgeschaltet oder auf demselben Level von *ctnnb1* involviert sein könnte.

Im Rahmen dieser Analyse sollte zudem näher darauf eingegangen werden, welche spezifischen Domänen von Hmmr an der Modulation des Wnt-Signalwegs beteiligt sein könnten. Hierfür wurden *hmmr*-Deletionskonstrukte (∆) verwendet, die in vorherigen Studien Auswirkungen auf den anterioren Neuralrohrschluss hatten (Prager et al., 2017). Im weiteren Verlauf sollten diese *hmmr* Deletionskonstrukte mit der Ko-Injektion von *wnt3a* mRNA untersucht werden, da der Funktionsverlust von *hmmr* einen eindeutigen Effekt auf die Entstehung *wnt3a*-induzierter DA hatte. In den *hmmr* Funktionsgewinn-Experimenten entwickelten 38 % der Embryonen in Folge der *wnt3a* Überexpression partielle DA und 6,2 % komplette DA (Abb. 11G). Im Gegensatz zur Injektion des *hmmr* MO, hatte die Ko-Injektion der *hmmr* FL mRNA (100 pg) zu einem Anstieg der DA geführt, wobei 41,1 % der Embryonen partielle DA und 16,3 % komplette DA aufwiesen (Abb. 11G). Diese Zunahme der induzierten sekundären Körperachsen durch die Ko-Injektion von *hmmr* FL konnte auch in vorherigen Studien beobachtet werden (Nickel, 2020). Ebenso vergleichbar zu diesen bereits durchgeführten Studien, zeigten die Injektionen der *hmmr*-Deletionskonstrukte, welchen entweder der Amino- (∆N), der Carboxy-Terminus (∆C) oder beide Termini (∆N+C) fehlen keinen eindeutigen Effekt auf die Entstehung sekundärer Achsen und

folglich der Modulation des Wnt-Signalwegs (Nickel, 2020). Die Injektion von *hmmr* ΔN mRNA (80-160 pg) resultierte vergleichbar zur alleinigen Injektion der *wnt3a* mRNA in 34,1 % partiellen und in 11,1 % kompletten DA. Ähnlich hierzu zeigten 41,6 % der Embryonen, die mit *hmmr* ΔC mRNA (100 pg) injiziert wurden, partielle DA und 8,3 % komplette DA. Lediglich die Embryonen, die mit *hmmr* ΔN+C mRNA (300 pg) injiziert wurden, zeigten deutlich weniger komplette DA (1,7 %) und vergleichbar zu allen anderen Injektionsansätzen zu 39 % partielle DA (Abb. 11G).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Hmmr nachgeschaltet vom Liganden Wnt3a für die Modulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs benötigt werden könnte. Außerdem scheint diese Modulation abhängig von der MT-bindenden Eigenschaft von Hmmr zu sein, da insbesondere die *hmmr*-Konstrukte mit intaktem N-Terminus die Entstehung sekundärer Körperachsen begünstigten.

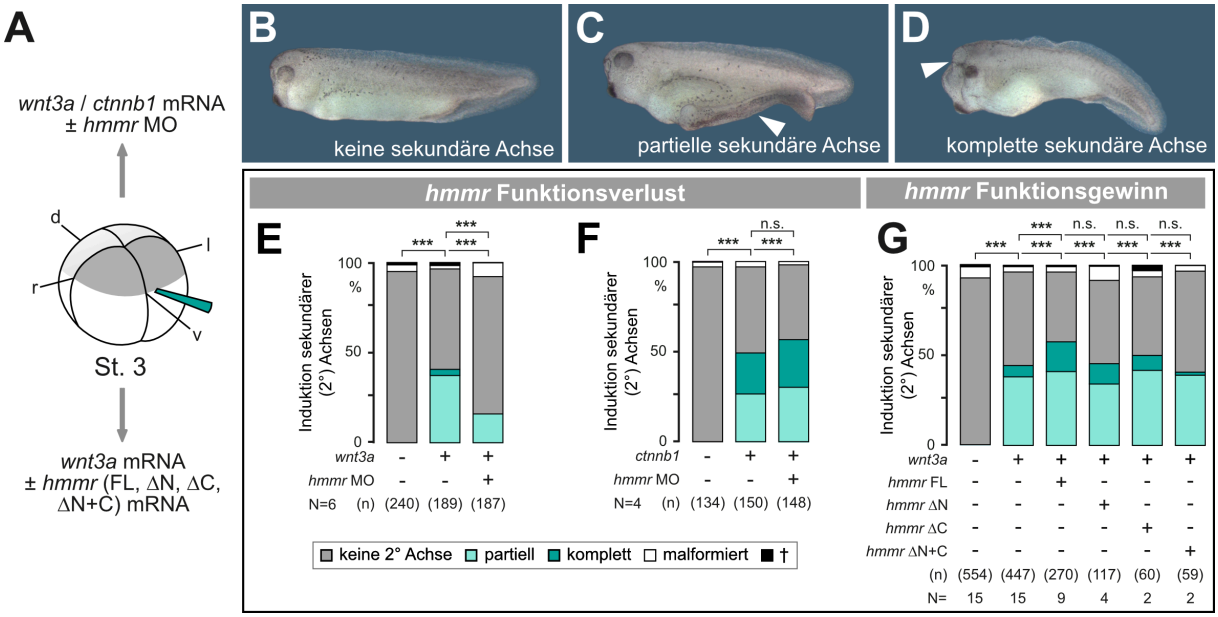


Abb. 11: Hmmr wird nachgeschaltet vom Liganden Wnt3a für die Wnt-vermittelte Doppelachsen-Induktion benötigt

(**A**) Injektionsschema: St. 3 Embryonen wurden unilateral in die linke ventrale Marginalzone injiziert. Für Funktionsverlust-Experimente wurde entweder *wnt3a* oder *ctnnb1* (auch *ß-catenin*) GFP mRNA mit einem gegen *hmmr*.L gerichteten Morpholino Oligomer ko-injiziert. Für Funktionsgewinn-Experimente wurde *wnt3a* mRNA zusammen mit der vollen Länge von *hmmr*, *hmmr* Deletionskonstrukten (Δ), welchen der Amino- (ΔN), der Carboxy-Terminus (ΔC) oder beide Termini (ΔN+C) fehlen ko-injiziert. (**B**-**D**) Repräsentative Kaulquappen im St. 35 ohne sekundäre (2°) Achse (B), mit einer partiellen (C) oder kompletten sekundären Körperachse (D). Hervorzuheben sind die Rumpfstrukturen (Pfeilspitze, C) oder komplette Kopfstrukturen inklusive Augen und Klebdrüse mit Rumpfgewebe (Pfeilspitze, D) in den

behandelten Embryonen. (**E**-**G**) Quantifizierung und statistische Analyse der induzierten sekundären Achsen in Abhängigkeit von *hmmr* (χ^2-Test). Zusammen mit der Injektion des Wnt-Liganden *wnt3a* führte der Funktionsverlust von *hmmr* zu reduzierten sekundären Achsen (E), aber nicht in Kombination mit dem transkriptionellen Ko-Aktivator *ctnnb1* (F). Die Injektion von *wnt3a* führte nur mit der Ko-Injektion von *hmmr* FL zu vermehrten kompletten sekundären Achsen, aber nicht mit den *hmmr* Deletionskonstrukten (Δ; G). (d) dorsal, (FL) *engl. full length*, (l) links, (MO) Morpholino Oligomer, (N) Anzahl der Experimente, (n) Anzahl der Embryonen, (n.s.) nicht signifikant, (r) rechts, (v) ventral.

2.7 Hmmr und Ctnnb1 interagieren bei der Spezifizierung der Mittel-Hinterhirn-Grenze und der Polarisierung neuroepithelialer Zellen

Die neurale Induktion hängt weitgehend von der Hemmung des BMP-Signalwegs ab, obwohl nachfolgende Studien eine zunehmende Komplexität aufzeigten, indem sie zusätzliche Signalmoleküle einschließlich des FGF und Wnt identifizierten, die an diesem Prozess beteiligt sind (Stern, 2001). Die AP-Musterbildung des neuralen Gewebes wird durch verschiedene Organisationszentren, die Signalmoleküle sekretieren, beeinflusst. Die Organisation des Mittelhirns und des anterioren Hinterhirns wird durch die FGF-8 und Wnt-sekretierende Mittel-Hinterhirn-Grenze reguliert (A. Liu & Joyner, 2001; Wurst & Bally-Cuif, 2001). Dieses organisierende Zentrum wird bereits während der Gastrulation durch einen Wnt-Gradienten etabliert, der die Expression zwischen *gbx* und *otx* dosis-abhängig steuert (Hidalgo-Sánchez et al., 2005). An der Grenze dieser *otx*- und *gbx*-exprimierenden Zellen entsteht ein Gewebestreifen, der den Homeobox-TF *engrailed homeobox 2* (*en2*) exprimiert und somit die Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn definiert (Hidalgo-Sánchez et al., 2005). *en2* wurde als ein direktes Zielgen des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs identifiziert (McGrew et al., 1999).

Wenn Hmmr für die Modulation des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs benötigt wird, sollte die Expression direkter Wnt-Zielgene, wie *en2* beeinflusst werden. Zur Überprüfung dieser Abhängigkeit wurde das *hmmr* MO (1 pmol) einmal in die animale, dorsale Blastomere von St. 3 Albino-Embryonen injiziert. Anschließend wurde die Expression von *en2* durch *in-situ*-Hybridisierung analysiert (Abb. 12A-D).

Wildtypische Embryonen im St. 16 zeigten eine *en2*-Expression als Streifen quer über die anteriore Neuralplatte, repräsentativ für die Mittel-Hinterhirn-Grenze, mit einer Expressions-freien Lücke in der Mitte, der Neuralrinne (Abb. 12A; Brivanlou & Harland, 1989). Der Funktionsverlust von *hmmr* führte in 57,7 % der Embryonen zu einer reduzierten und in 15,5 % der Embryonen zu einer fehlenden *en2*-Expression auf der injizierten Seite der Embryonen und 26,8 % spiegelten die wildtypische *en2*-Expression wider. Interessanterweise zeigten auch die *en2*-Expressionsdomänen, welche nicht direkt durch das *hmmr* MO getroffen wurden, eine veränderte Morphologie (Abb. 12B, D). Vergleichbare Resultate wurden auch in früheren Arbeiten erzielt, bei denen die Injektion des *hmmr* MO zu einer reduzierten *en2* Domäne führte (Deese, 2022). Die Expression des anterioren Vorderhirnmarkers *forkhead box G1* (*foxg1,* ehemals *bf1*) war auf der injizierten Seite der Embryonen ebenfalls reduziert und zeigte zusätzlich eine verkleinerte *foxg1*-Expressionsdomäne (Abb. 12B). Da die Expressionsanalyse des *foxg1* Marker-Gens lediglich zur generellen Analyse der anterioren neuralen Morphologie dienen sollte, wurde diese im weiteren Verlauf der Arbeit nicht genauer untersucht. Mit dem Ziel zu prüfen, auf welcher Ebene des kanonischen Wnt-Signalwegs *hmmr* für die Induktion der *en2*-Expression benötigt werden könnte, wurde *ctnnb1* mRNA (60 pg) zum Rettungs-Versuch des *hmmr* Funktionsverlusts ko-injiziert (Abb. 12C). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, bei denen die Ko-Injektion der *ctnnb1* mRNA die *en2*-Expression nicht wiederherstellen konnte (Deese, 2022), zeigten 52,6 % der Embryonen durch die Wiederherstellung mittels *ctnnb1* mRNA eine wildtypisch *en2*-Expression (Abb. 12C, D). Die Ko-Injektion der *ctnnb1* mRNA verhinderte in allen Embryonen den vollständigen Verlust der *en2*-Domäne und legt somit eine potenzielle Kompensation des *hmmr* Verlusts durch *ctnnb1* nahe (Abb. 12C, D). Dies würde bedeuten, dass *ctnnb1* in der Hierarchie der Wnt-Signalkaskade parallel von *hmmr* interagiert und, dass *hmmr* spezifisch mit *ctnnb1* im Wnt / Ctnnb1-Signalweg benötigt wird.

Bereits publizierte Studien zeigten, dass *hmmr* mit *vangl2*, einer zentralen Komponente des nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalwegs, bei der Regulation der Zellpolarität sowie anterioren Morphogenese interagiert (Prager et al., 2017).

Da es Hinweise gibt, dass *hmmr* zusätzlich im kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalweg benötigt wird, sollte die gestörte Verschmälerung des Neuralrohrs und die Zellform in *hmmr* Morphanten in Abhängigkeit von *ctnnb1* analysiert werden (Abb. 12E-I). Hierfür

wurden Embryonen im St. 3 einmal in die animale dorsale Blastomere mit dem *hmmr* MO (1 pmol) zusammen mit dem Zellschicksalsmarker (*engl. lineage tracer,* LT) Cascade Blue in Kombination mit und ohne *ctnnb1* mRNA (60 pg) injiziert, bis zum St. 21 kultiviert und anschließend im Bereich des anterioren Vorderhirns präpariert und anhand von Immunofluoreszenz-Färbung untersucht (Abb. 12E-G, E'-G'). Die neuralen Zellen der Kontrollembryonen waren entlang ihrer AB-Achse elongiert. Dies wurde durch die Färbung des geordneten MT-Zytoskeletts (Tuba4a) und die elliptische Form der Nuklei, gefärbt durch den DNA-Farbstoff Hoechst, sichtbar (Abb. 12E, E'). Wie auch in Prager et al. (2017), waren die Zellen im *hmmr* Funktionsverlust verkürzt und rundlicher, mit ebenso abgerundeten Nuklei (Abb. 12F, F'). Das MT-Zytoskelett schien ungeordnet und wies mehr vernetzte Strukturen auf als das der Kontrollembryonen. Die Ko-Injektion von *ctnnb1* mRNA stellte die Zell- und Kernelongation sowie die gerichtete Anordnung des MT-Zytoskeletts wieder her (Abb. 12G, G'; I). Die „Roundness“ von Zellen unbehandelter Kontrollen war durch einen Median-Wert von 0,166 charakterisiert, welcher eher elongierten, bzw. polarisierten Zellen entspricht. Im Gegensatz dazu hatten die Zellen in *hmmr* Morphanten einen Median-Wert von 0,39, also folglich rundere Zellen als die der Kontrollen. Im Rettungsversuch durch Überexpression von *ctnnb1* mRNA normalisierte sich der Median-Wert auf 0,25 (Abb. 12I). Erwähnenswert ist, dass die Ko-Injektion der *ctnnb1* mRNA zwar die Zellelongation wiederherstellen konnte, jedoch nicht die Verbreiterung der Neuralplatte (Abb. 12H, I). Kontrollembryonen zeigten ein ähnliches Verhältnis der Neuralplattenbreite (injizierte versus uninjizierte Seite) mit einem Quotienten von 0,97. Anders als bei den *hmmr* Morphanten, die einen höheren Quotienten von 1,16 aufwiesen und die Ko-Injektion mit *ctnnb1* mRNA führte zu einem vergleichbaren Quotienten von 1,13 (Abb. 12H). Dies spiegelt frühere Ergebnisse wider, bei denen die Ko-Injektion des *hmmr* ∆N-Konstrukts, dem beide MTBD fehlen, die gestörte Verschmälerung der Neuralplatte nicht retten konnte, aber in der Lage war die Zellelongation und die Anordnung des MT-Zytoskeletts wiederherzustellen (Prager et al., 2017).

Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich eine potenzielle Funktion von Hmmr parallel vom transkriptionellen Ko-Aktivator Ctnnb1 für die Aktivierung des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs ableiten. Das Zusammenwirken von *hmmr* und *ctnnb1* begünstigt zwar die gerichtete Anordnung des MT-Zytoskeletts, sowie die Polarisierung neuraler Zellen, jedoch nicht die Migration neuraler Zellen, um das Neuralrohr zu schließen. Dies

deutet auf zwei getrennte Prozesse für die Erhaltung der RI / MET-vermittelten neuralen Morphogenese hin.

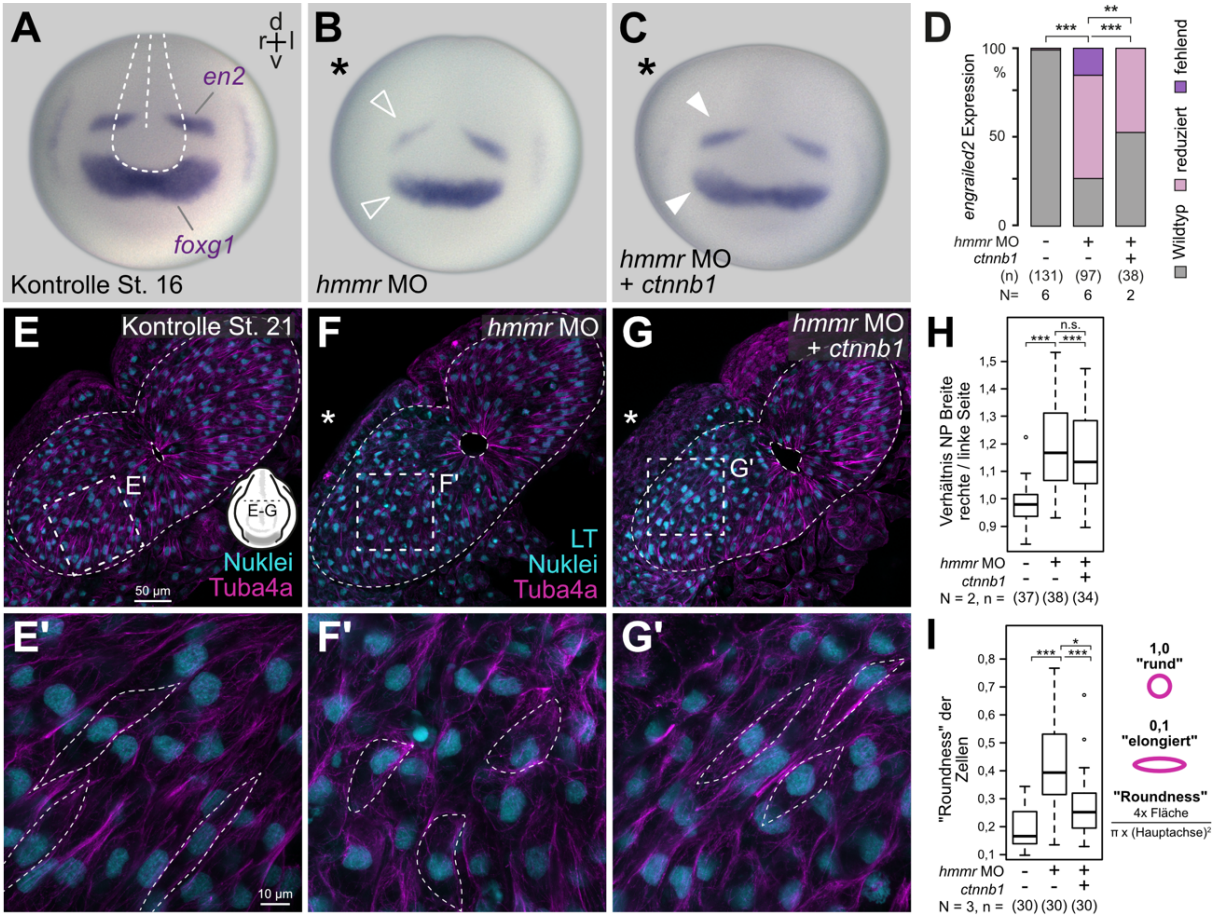


Abb. 12: Die Hmmr-abhängige Erhaltung der Mittel-Hinterhirn-Grenze sowie die Polarität von Neuroepithelzellen können durch Ctnnb1 wiederhergestellt werden

(**A**-**C**) Anteriore Ansicht von Albino Embryonen im St. 16 nach *in-situ*-Hybridisierung mit dem Wnt-Zielgen *engrailed2* (*en2*) und dem anterioren Vorderhirnmarker *forkhead box G1* (*foxg1*). Embryonen wurden im 4-Zellstadium unilateral in eine dorsale Blastomere injiziert (Asteriske; B, C). Kontrollembryonen (A) zeigten wildtypische Expressionsdomänen von *en2* seitlich der Neuralplatte und der dorsalen Mittellinie (gestrichelte Linien) und *foxg1*-Expression im Bereich des Telencephalons**.** Reduzierte *en2*- und *foxg1*-Expression und veränderte Morphologie nach *hmmr* MO-Injektion (B; Pfeilspitzenumrandungen). Die Wiedereinführung von *ctnnb1* mRNA kompensierte die Morphologie und Genexpression von *en2* und *foxg1*-exprimierenden Geweben (C; Pfeilspitzen). (**D**) Quantifizierung und statistische Analyse der *en2*- und *foxg1*-exprimierenden Embryonen (χ^2-Test). (**E-G; E'-G'**) Die gestörte Polarität neuroepithelialer Zellen in *hmmr* Morphanten (F) kann durch die Ko-Injektion von *ctnnb1* mRNA (F) gerettet werden. Transversale Schnitte durch den Bereich des Vorderhirns (gestrichelte Linie im Cartoon) von St. 21 Embryonen, die im 4-Zellstadium unilateral in eine dorsale Blastomere injiziert wurden (Asteriske in F und G). Vergleich der Neuralrohrbreite (gestrichelte Umrandung) und Zellform (gestrichelte Linien in E'-G') mit Immunfärbung des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Tuba4a; magenta), der Nuklei (cyan) und des Zellschicksalsmarkers (cyan) Cascade Blue in Wildtypen (E), *hmmr* Morphanten (F) und mit *ctnnb1*-geretteten Embryonen

(G). (**H, I**) Quantifizierung und statistische Analyse der Experimente aus E-G und E'-G' (Box-Plot, Wilcoxon-Rangsummentest). Verhältnis der Neuralplatten Breite injizierte vs. wildtypische Seite (H). (I) Roundness der Zellen in Kontrollen, *hmmr* Funktionsverlust und Rettungsversuch durch *ctnnb1* mRNA. (LT) *engl. lineage tracer,* (MO) Morpholino Oligomer, (N) Anzahl der Embryonen/Behandlung in (I), Anzahl der Experimente in (D) und (H), (n) Anzahl der Zellen/Behandlung in (I), Anzahl der Embryonen in (D) und (H), (NP) Neuralplatte, (n.s.) nicht signifikant.

2.8 Die nukleäre Lokalisierung vom Hmmr und Ctnnb1 beeinflusst die Ctnnb1-abhängige Aktivierung des Wnt-Signalwegs

Vorangegangene Experimente ließen bereits vermuten, dass *hmmr* gemeinsam mit *ctnnb1* für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs benötigt wird (Abb. 12). Infolgedessen sollte eine Analyse über die Lokalisierung beider Proteine innerhalb der Zellen Aufschluss geben, inwiefern diese Komponenten die Wnt-Signalkaskade abhängig voneinander beeinflussen könnten. Da zur Induktion eines zweiten Organisators Wnt-aktivierende Komponenten auf die ventrale Seite 4-zelliger Embryonen im St. 3 injiziert und zusammen mit den zu untersuchenden Faktoren analysiert werden können, wurde im ersten Schritt ein GFP-getaggtes *ctnnb1* RNA-Konstrukt (60 pg) bilateral in die ventrale Marginalzone von St. 3 Embryonen injiziert (Abb. 13A). Aufgrund dieses Effekts sollte die Lokalisierung von Hmmr, abhängig von der *ctnnb1*-Injektion untersucht werden. Die Embryonen wurden bis zum St. 9 kultiviert und im Bereich des Äquators geschnitten (Abb. 13A).

Mit einem *Xenopus*-spezifischen Antikörper (AK), welcher gegen den C-Terminus von Hmmr gerichtet ist (Groen et al., 2004), wurde das endogene Protein ubiquitär in nahezu allen Zellkernen und schwach zytoplasmatisch in den mesodermalen, äquatorialen Zellen der animalen Kappen nachgewiesen (Abb. 13B, B'). Die nukleäre Färbung von Hmmr wurde bereits in früheren Studien in Zellkultur beschrieben (Assmann et al., 1999; Maxwell et al., 2011). Im nächsten Schritt sollte durch zusätzliche Immunofluoreszenz-Färbung mit einem Anti-GFP Antikörper das exogene GFP-gekoppelte Ctnnb1 nachgewiesen werden (Abb. 13C, C_1).

Im Folgenden zeigte sich eine deutliche nukleäre Ko-Lokalisation von endogenem Hmmr und exogenem Ctnnb1. Hervorzuheben ist, dass Hmmr klar abgegrenzt in den

Zellkernen vorzufinden war, wohingegen Ctnnb1 auch stärker um die Zellkerne, im Zytoplasma und in der Plasmamembran lokalisiert auftrat (Abb. 13C, C_1, C_1', C_2, C_2'). Diese fast ausschließliche nukleäre Lokalisierung zum St. 9 könnte ein Indiz dafür sein, dass Hmmr und Ctnnb1 potenziell genregulatorisch wirken.

Um zu testen, ob der Funktionsgewinn von *hmmr* einen Einfluss die nukleäre Lokalisierung von Ctnnb1 hat, wurde zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs *wnt3a* mRNA (0,32 pg) zusammen mit einem GFP-gekoppelten *H2B clustered histone 21* (*h2b,* auch *h2bc21*) RNA-Konstrukt (200 pg) als Zellschicksalsmarker und in Kombination mit und ohne *hmmr* FL mRNA (100 pg) zweifach über Kreuz in die animalen Blastomeren ko-injiziert (Abb. 13D). Die Injektion in die animalen Blastomeren und anschließende Präparation der animalen Kappen wird auch animales Kappen-Assay (*engl. animal cap assay*) bezeichnet (Green, 1999). Die Zellen der animalen Kappe, die mit *wnt3a* mRNA und *h2b* GFP mRNA injiziert wurden, zeigten einen Pool aus membranständigen, zytoplasmatischen und nukleären Ctnnb1 (Abb. 13F, F'). Hervorzuheben ist, dass das nukleäre Ctnnb1 sehr schwach detektierbar war, aber die Intensität dennoch durch Zellkern-Visualisierung der *h2b* GFP-getroffenen Zellkerne messbar war. Zur Auswertung wurde das nukleäre, endogene Ctnnb1 mit dem exogenen H2B GFP normalisiert und ins Verhältnis gesetzt (Abb. 13E). Es fiel auf, dass die Ko-Injektion von *wnt3a, h2b* GFP und *hmmr* FL zu einer um 21,5 % verringerten nukleären Ctnnb1 Lokalisierung führte (Abb. 13E, G, G'). Hierbei zeigte sich auch eine verringerte Gesamt-Menge an Ctnnb1-Pools, sowohl in den Plasmamembranen als auch im Zytoplasma, worauf aber im weiteren Verlauf nicht weiter eingegangen wird (Abb. 13G, G').

Die Gesamtheit der Ergebnisse unterstützt die Annahme, dass Hmmr und Ctnnb1 aufgrund von zeitlicher und räumlicher Ko-Lokalisation in den mesodermalen Zellen, in denen potenziell sekundäre Achsen induziert werden könnten, eine gemeinsame Rolle im kanonischen Wnt-Signalweg einnehmen. Die Erkenntnis, dass der Funktionsgewinn von *hmmr* zu einer geringeren nukleären Ctnnb1 Menge führte, lässt den Schluss zu, dass die Zellen eine exakte Regulierung der Hmmr Mengen brauchen, um den sensitiv reagierenden Wnt-Signalweg zu aktivieren.

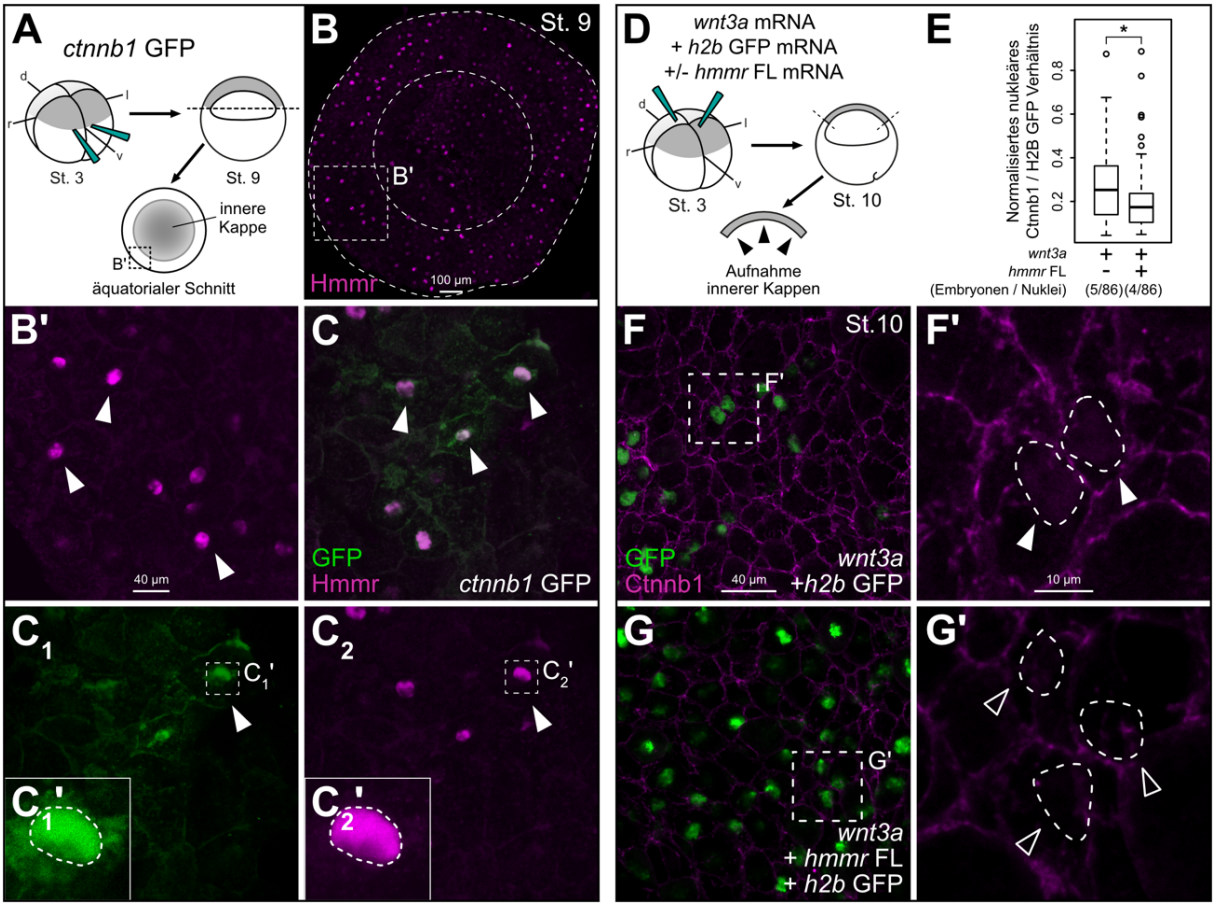


Abb. 13: Hmmr und Ctnnb1 sind in animalen Kappenzellen nukleär ko-exprimiert und der Funktionsgewinn von *hmmr* vermindert die Zellkern-Lokalisierung von Ctnnb1

(**A**) Injektionsschema: St. 3 Embryonen wurden bilateral in die ventrale Marginalzone mit *ctnnb1* GFP mRNA injiziert und bis St. 9 kultiviert und anschließend äquatorial geschnitten. (**B**) Äquatoriale Ansicht in die innere animale Kappe von uninjizierten Kontrollen zeigt endogenes, nukleär exprimiertem Hmmr (Magenta) in nahezu allen Zellkernen auf der Schnittfläche der Marginalzone (B', Pfeilspitzen). (**C**) Injektion von GFP-gekoppeltem *ctnnb1* RNA-Konstrukt (Grün) zeigt nukleäre Ko-Lokalisation mit endogenem Hmmr (Magenta); hervorgehoben in Einzelkanälen (Pfeilspitzen in **C$_1$**, **C$_2$**; weiß gestrichelte Linien in C$_1$' und C$_2$'). (**D**) Injektionsschema: St. 3 Embryonen wurden zweifach über Kreuz in die animalen Blastomeren mit *wnt3a* mRNA, *h2b* GFP mRNA und der vollen Länge mRNA von *hmmr* injiziert. Die Embryonen wurden bis St. 10 kultiviert, die animalen Kappen präpariert und einer Immunfärbung von Ctnnb1 (Magenta) und GFP (Grün) unterzogen. (**E**) Quantifizierung und statistische Auswertung der Experimente in **F** und **G** (Box-Plot, Wilcoxon-Rangsummentest). (**F**, **G**) Nach *wnt3a* mRNA-Injektion lokalisierte Ctnnb1 zytoplasmatisch, membranös und schwach nukleär (Magenta, weiß gestrichelte Umrandungen und Pfeilspitzen in **F'**). Injektion von *h2b* GFP verdeutlicht getroffene Zellen. Die Ko-Injektion von *hmmr* FL mRNA reduzierte die gesamte Lokalisierung von Ctnnb1 in den animalen Kappenzellen (G), insbesondere nukleär (weiß gestrichelte Umrandungen und Pfeilspitzenumrandung in **G'**). (d) dorsal, (FL) *engl. full length,* (l) links,(r) rechts, (v) ventral.

2.9 Die Deletion von *hmmr* Exon 4 führt zur nukleären Lokalisation in den Zellkernen der Klebdrüse

Die nukleäre Lokalisierung von Hmmr (Abb. 13) konnte schon in früheren Studien beobachtet werden. Diese berichteten über eine intrazelluläre Lokalisierung der HMMR (früher RHAMM/IHABP) Isoformen in menschlichem Brustkrebs sowie in verschiedenen Tumor-Zelllinien von Nagetieren (Assmann et al., 1998; Hofmann et al., 1998). Außerdem gibt es Hinweise zu exprimierten HMMR-Isoformen, die durch alternatives Spleißen primärer Gen-Transkripte entstehen (Assmann et al., 1998; Entwistle et al., 1995). Im Rahmen des alternativen Spleißens wurden beim humanen HMMR sowohl einzelne als auch doppelte Deletionen der Exons 4 und 13 beobachtet. Das Spleißen von Exon 4 führt dabei zum Verlust der MT-Bindung und induziert die nukleäre Translokation des humanen HMMR (Assmann et al., 1999). Da bisher keine vergleichbaren Varianten in *Xenopus* nachgewiesen werden konnten, sollte die Lokalisierung GFP-gekoppelter *Xenopus hmmr*-Konstrukte und humaner *HMMR*-Konstrukte in verschiedenen Embryonalgeweben analysiert werden, um mögliche Schlüsse auf die Funktion z.B. im kanonischen Wnt-Signalweg ziehen zu können. Von Bedeutung ist, dass sich beide Hmmr-Varianten in ihrer Proteingröße unterscheiden. Das *Xenopus* Hmmr-Protein besteht aus 1175 AS, wohingegen das humane HMMR nur aus 724 AS besteht. Durch AlphaFold-Strukturmodelle war es möglich die Proteinfaltung beider Varianten direkt zu vergleichen (Abb. 14A, B). Hervorzuheben ist, dass beide Varianten einen größtenteils unstrukturierten N-Terminus, mehrere coiled-coil Strukturen im zentralen Bereich und einen teilweise unstrukturierten C-Terminus aufzeigten (Abb. 14A, B). Im *Xenopus* Hmmr befindet sich Exon 4 im Übergang vom unstrukturierten zum strukturierten Bereich des N-Terminus (AS 1-130) ausgehend von AS 77 mit einem putativen „Knick“ bis zu AS 102 (Abb. 14A). Im humanen HMMR befindet sich Exon 4 ebenfalls im Übergang vom gefalteten, unstrukturierten hin zum strukturierten Bereich von AS 76-91, nahe der N-terminalen Kopf (*engl. head*) Region von AS 1-69 (Abb. 14B; Assmann et al., 1999).

Zur Untersuchung der Protein Lokalisierung in der anterioren Neuralplatte wurde jeweils *hmmr* FL GFP mRNA (200 pg), *hmmr* ∆Exon 4 (∆E4) GFP mRNA (200 pg), *hSHMMR* GFP mRNA (120 pg) oder *hsHMMR* ∆E4 GFP mRNA (120 pg) unilateral animal in eine dorsale Blastomere in St. 3 Embryonen injiziert. Zur Vereinfachung werden im weiteren Verlauf die verwendeten mRNAs ohne „GFP“ genannt. Danach

wurden die Embryonen bis zum St. 21 kultiviert und im Bereich des Vorderhirns transversal präpariert und mittels Immunofluoreszenz-Färbung analysiert (Abb. 14C-F). Die Überexpression des *hmmr* FL-Konstrukts führte zu einer Bündelung der MT-Fasern (Tuba4a) und war auch im Bereich des Spindelapparats detektierbar. Hierbei zeigte sich eine klare Überexpression des GFP-getaggten *hmmr* FL-Konstrukts mit dem MT-Zytoskelett (Abb. 14C, C_1, C_2). Diese Protein-Lokalisierung wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben und konnte auch in diesem Fall verifiziert werden (Nickel, 2020; Sätzler, 2023; Wiest, 2022). Entgegen den Erwartungen zeigte sich keine nukleäre Lokalisierung in den neuralen Epithelzellen durch die Injektion des *hmmr* ∆E4 Konstrukts (Abb. 14D, D_1, D_2; Sätzler, 2023; Wiest, 2022). Das Protein lokalisierte vermehrt an den MT (Abb. 14D_2) und bündelte diese sogar noch mehr als das *hmmr* FL-Konstrukt (Abb. 14C_2). Das hatte allerdings zur Folge, dass das MT-Zytoskelett nicht korrekt organisiert war und die Zellen eher abgerundet schienen. Dies entspricht ebenso den Ergebnissen aus vorangegangenen Experimenten (Sätzler, 2023; Wiest, 2022). Außerdem konnten Vesikel-ähnliche *hmmr* ∆E4 GFP-positive Strukturen beobachtet werden (Abb. 14D_2). Die Injektion des *hsHMMR*-Konstrukts verdeutlichte die Lokalisierung des humanen FL-Homologs entlang des MT-Zytoskeletts. Jedoch beeinträchtigte diese Proteinlokalisierung die Organisation der MT (Abb. 14E, E_1, E_2). Zusätzlich wurde hsHMMR in gepunkteter Form nahe der MT detektiert (Abb. 14E_2). Ebenso konträr wie das *Xenopus* Hmmr ∆E4-Konstrukt, lokalisierte das hsHMMR ∆E4-Konstrukt auch nicht in den Zellkernen der neuroepithelialen Zellen, sondern überwiegend im Zytoplasma (Abb. 14F- F_2,F'- F_2'). Dabei zeigte sich eine Abweichung der bisherigen Kenntnisse, in denen humanes HMMR ∆E4 überwiegend in den Zellkernen von Krebszelllinien nachgewiesen wurde (Assmann et al., 1999). Visualisiert wurde dies durch optische orthogonale Schnitte, die zeigten, dass hsHMMR ∆E4 zwar perinukleär zu lokalisieren scheint, jedoch nicht innerhalb der Nuklei (Abb. 14F'-F_2'). Hervorzuheben ist auch, dass hsHMMR ∆E4 teilweise mit dem MT-Zytoskelett ko-lokalisiert scheint, aber die MT wurden hierbei nicht gebündelt (Abb. 14F, F_1, F_2).

Da sowohl *hmmr* ∆E4, als auch die humane Variante *hsHMMR* ∆E4 nicht in den Nuklei neuraler Zellen vorgefunden werden konnte, bleibt zu klären, ob dieser Effekt Zeit- und Gewebespezifisch variiert und ob die Bindung an MT während der Neurulation im St. 21 bedeutsamer ist als die nukleäre Lokalisation.

Es ist bekannt, dass die Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs zur Anteriorisierung der Neuralplatte führt und somit eine Vergrößerung der Klebdrüse (KD) zur Folge haben kann (Deardorff et al., 2001; Kiecker & Niehrs, 2001). Aufgrund dieser Wnt-Abhängigkeit der KD, sollte analysiert werden, ob eines der Hmmr-Konstrukte nukleär vorzufinden ist und ob diese so einen potenziellen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung des Wnt-Signalwegs haben könnten. Hierfür wurden Embryonen im St. 3 unilateral animal in eine Blastomere vom dorsal-ventralen Übergang mit den gleichen Mengen an *hmmr* / *hsHMMR* Konstrukten (siehe oben) injiziert (Abb. 14G-J). In wildtypischen Embryonen konnte endogenes Hmmr in den Zellkernen der KD nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im direkten Vergleich des KD-Gewebes mit dem darunterliegenden ventralen Gewebe wurde deutlich, dass die Injektion der *hmmr* FL-Variante in der KD zytoplasmatisch lokalisierte (Abb. 14G, G_1, G'). Wohingegen die ventral darunterliegende Epidermis organisierte und gerichtete MT-Bündel, vergleichbar zur Lokalisierung in den neuralen Zellen, aufzeigte (Abb. 14G, G2, G''). In den optischen orthogonalen Schnitten konnte gezeigt werden, dass Hmmr FL weder in der KD noch im darunterliegenden Gewebe im Kern lokalisiert vorkam (Abb. 14G_1, G', G_2, G''). Erstaunlicherweise wies das *hmmr* ΔE4 Konstrukt eine abweichende Lokalisierung in der KD auf, hier zeigten die Zellen überwiegend nukleär lokalisiertes Hmmr ΔE4 (Abb. 14H, H_1, H'). Auffällig war, dass die darunterliegenden Zellen keinerlei nukleär-lokalisiertes, jedoch stark gebündeltes Hmmr ΔE4 widerspiegelten (Abb. 14H, H_2, H''). Die Kern-Lokalisierung des Hmmr ΔE4 Proteins wurde zudem in optischen orthogonalen Schnitten veranschaulicht (Abb. 14H_1, H'). Im Kontrast dazu, lokalisierte hsHMMR in kurzen, feinen Filamenten auf der KD (Abb. 14I, I_1) und in starken MT-Fasern in den ventralen Epidermiszellen (Abb. 14I, I_2). Lediglich das hsHMMR ΔE4 Protein lokalisierte kaum spezifisch und nur sehr schwach zytoplasmatisch in der KD und den darunterliegenden Zellen (Abb. 14J, J_1, J_2).

Die umfassende Lokalisierungs-Analyse der beiden *Xenopus* Varianten Hmmr FL und Hmmr ΔE4 und der beiden humanen Varianten hsHMMR und hsHMMR ΔE4 lässt vermuten, dass unterschiedliche Zelltypen verschiedene Hmmr-Spleißvarianten exprimieren könnten, die sich nicht nur in ihrer subzellulären Lokalisation, sondern auch in ihrer Funktion unterscheiden (Assmann et al., 1999). Die Identifizierung des nukleär-lokalisierten *Xenopus* Hmmr ΔE4 bietet erstmals die Möglichkeit eine potenziell transkriptionelle Rolle von Hmmr im vordersten anterioren neuralen Gewebe, der KD, in Verbindung mit der Wnt-Signalwegsaktivierung anzunehmen.

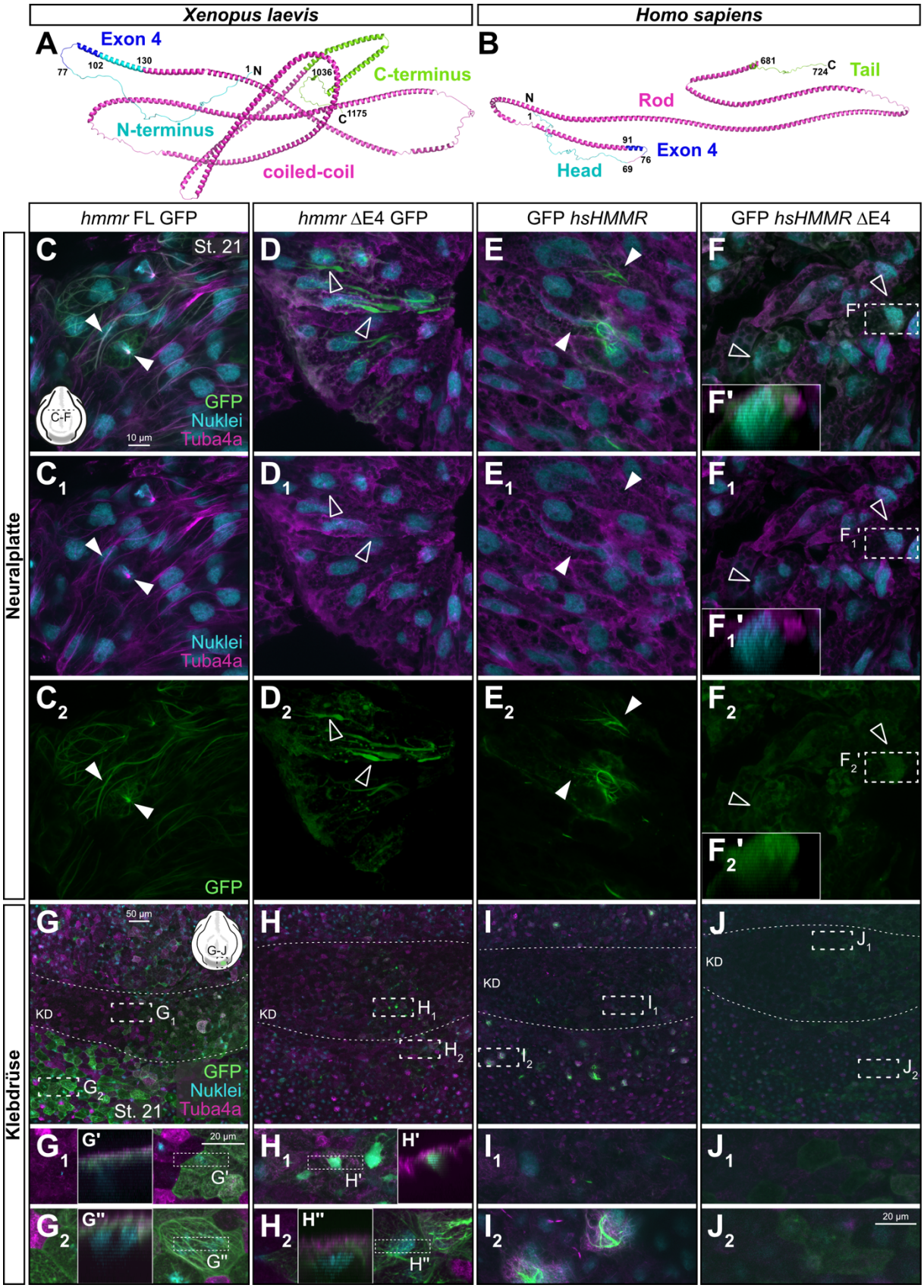


Abb. 14: Die humane ΔExon 4-Variante lokalisiert nicht in Zellkernen, im Gegensatz zur *Xenopus*-Variante, die nukleär ausschließlich in der Klebdrüse exprimiert wird

(**A**, **B**) AlphaFold-Strukturmodelle der *Xenopus laevis* (A) und *Homo sapiens* (B) Hmmr. Beide Proteine besitzen einen weitgehend unstrukturierten N-Terminus (Cyan), zentrale Coiled-coil-Domänen (Magenta) und einen teils unstrukturierten C-terminus (Grün). Exon 4 liegt bei beiden Spezies im Übergang vom unstrukturierten zum gefalteten Bereich (AS 77-102 in *Xenopus*, AS 76-91 in Menschen), nahe der N-terminalen Kopfregion. *Xenopus* Hmmr ist mit 1175 AS deutlich länger als das humane Pendant (724 AS) (**C**-**F**) Unilaterale Injektion in eine dorsale Blastomere im St. 3 und anschließende Präparation im St. 21. Schnittebene im Bereich des Vorderhirns (Cartoon in C). Überexpression der *Xenopus* GFP-gekoppelten Konstrukte *hmmr* volle Länge (C, C_1, C_2), *hmmr* ∆Exon 4 (∆E4; D, D_1, D_2) und der humanen GFP-gekoppelten Konstrukte *hsHMMR* (E, E_1, E_2) und *hsHMMR* ∆E4 (F, F_1, F_2). Immunfärbung zeigt das Mikrotubuli (MT)-Zytoskelett (Tuba4a, Magenta), die GFP-gekoppelten Konstrukte (Grün) und Nuklei (Cyan). Überexpression von *hmmr* FL und *hsHMMR* führen zur MT-Bündelung (Pfeilspitzen, C_2, E_2). Das *hmmr* ∆E4 Konstrukt erzeugt übermäßige MT-Bündelung (Pfeilspitzenumrandung, D_2). Nur *hmmr* FL bewirkt eine klar organisierte MT-Struktur (Pfeilspitzen, C_1). *hsHMMR* ∆E4 lokalisiert nur perinukleär (Pfeilspitzenumrandungen F, F_1, F_2), sichtbar in optischen orthogonalen Schnitten (F', F_1', F_2'). (**G**-**J**) Unilaterale Injektion in eine dorsale Blastomere im St. 3 und anschließende Immunfärbung im St. 21. Anteriore Aufsicht auf den Bereich der Klebdrüse (Cartoon in G). Der Vergleich zweier anteriorer Gewebe (G, G_1, G_2) in Embryonen injiziert mit *hmmr* FL zeigt zytoplasmatisch verteiltes Hmmr Protein direkt auf der Klebdrüse (G_1) und stark gebündelte MT in ventralen Zellen (G_2) vergleichbar zur Neuralplatte (C_2). (H) In *hmmr* ∆E4-injizierten Exemplaren dagegen ist Hmmr ohne Exon 4 in den Nuklei der KD lokalisiert (H, H_1, orthogonale Ansicht in H') , aber nicht in den ventralen Zellen darunter (H_2, H''). Hier zeigt das GFP-gekoppelte Hmmr Protein eine starke Bündelung der MT (H_2) vergleichbar zur Neuralplatte (D_2). Das humane Konstrukt *hsHMMR* lokalisiert auf der KD leicht, strichförmig an MT (I, I_1), wohingegen die ventralen Zellen starke MT-Bündel vorweisen (I, I_2). Im Vergleich zum *Xenopus hmmr* ∆E4 Konstrukt (H, H_1), lokalisiert das humane *hsHMMR* ∆E4 Konstrukt nur zytoplasmatisch in der KD (J, J_1) und auch in den darunterliegend ventralen Zellen (J, J_2). Strukturmodelle erstellt mit AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024); Visualisierung via PyMOL (Version 2.1 Schrödinger, LLC. (FL) *engl. full length*, (KD) Klebdrüse.

2.10 Hmmr moduliert Mikrotubuli-abhängig den Wnt-Signalweg zur Induktion des mesenchymal-epithelialen Übergangs während der Gastrulation und Neurulation

Die vorangegangenen Experimente legten nahe, dass Hmmr eine potenziell wichtige Rolle im kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalweg einnimmt (Abb. 10 – 13). Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob Hmmr spezifisch in der Neuralplatte und in der animalen Kappe auf die transkriptionelle Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs Einfluss nimmt und welche Domänen von Hmmr an der Modulierung der Signalwegsaktivierung daran beteiligt sind. Ein Großteil der neueren Charakterisierung des kanonischen Wnt-Signalwegs beruht auf den praktischen Eigenschaften transkriptionsbasierter Reportersysteme. Der erste transkriptionsbasierte Luciferase-Reporter für die kanonische Wnt / Ctnnb1-Signalwegsaktivierung, TOPFlash, wurde von Korinek et al. entwickelt (1997). Die Notwendigkeit, die Wnt / Ctnnb1-Signalwegsaktivierung in nicht transfizierbaren Zellen, z.B. *in vivo* in *Xenopus* mit einer erhöhten Nachweisempfindlichkeit zu analysieren, resultierte in der Entwicklung des *engl. β-catenin activated reporter* (BAR) Systems (Biechele & Moon, 2008). Aufgrund der 12 Tcf-Erkennungselemente, können folglich Ctnnb1 und Tcf and den Reporter binden, um die Transkription der nachgeschalteten Firefly-Luciferase zu initiieren. Die gemessene Firefly-Luciferase-Aktivität wurde zusätzlich durch die Aktivität einer konstitutiv-aktiven Renilla (Rn)-Luciferase, angetrieben durch einen HSV-TK Promotor, normalisiert.

Um zu überprüfen, inwiefern der Funktionsverlust von *hmmr* einen Einfluss auf die endogene Wnt-Signalwegsaktivierung hat, wurden Embryonen im St. 3 einmal animal in eine dorsale Blastomere mit BAR-Plasmid (40 pg), Rn-Plasmid (8 pg) und *hmmr* MO (1 pmol) injiziert um die anteriore Neuralplatte, in der *hmmr* benötigt wird, zu treffen (Abb. 15A). Die Embryonen wurden im St. 16 durch die Fluoreszenz von als Zellschicksalmarker verwendetem GFP (nicht gezeigt) in der Neuralplatte selektiert und bis zum St. 21 kultiviert. Anschließend wurden die anterioren Gewebsstücke mit Hilfe des Dual-Luciferase-Assays (DLA) analysiert (Abb. 15A). Die Lumineszenz (*engl. relative light units*, RLU) von Kontrollembryonen, in die zuvor nur BAR- und Rn-Plasmid injiziert worden war, wurde auf 100 % gesetzt. Auf diese Weise lässt sich darstellen, ob zusätzliche Faktoren einen induzierenden oder reprimierenden Einfluss auf die Aktivierung nehmen. Die Ko-Injektion von *hmmr* MO führte hierbei zu einer

Reduktion des Signals um 36 % (Abb. 15B). Dies bestätigt die Ergebnisse aus vorherigen Experimenten (Wiest, 2022).

Um spezifisch einordnen zu können, auf welcher Ebene Hmmr für die Modulation des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs benötigt wird, wurde die Aktivierung im nachfolgenden Abschnitt abstufend in der Wnt-Signalkaskade, beginnend mit dem Liganden Wnt (*wnt3a* mRNA), dem Signalosomen-Protein Dvl2 (Myc-getaggtes *dishevelled segment polarity protein 2, dvl2* mRNA-Konstrukt) und letztlich mit dem transkriptionellen Ko-Aktivator Ctnnb1 (GFP-getaggtes *ctnnb1,* vereinfacht *ctnnb1* mRNA-Konstrukt) in Abhängigkeit verschiedener *hmmr*-Konstrukte getestet (Abb. 15C, D). Innerhalb des Amino-/N-Terminus (AS 1-130) von Hmmr erstreckt sich die erste MTBD von AS 40-60 und die zweite MTBD von AS 68-129. Dem *hmmr* ∆N (∆1-130)-Konstrukt fehlen entsprechend beide MT-Bindemotive. Im Vergleich dazu, beinhaltet das oben beschriebene *hmmr* ∆E4 (Abb. 14)-Konstrukt eine vollständige MTBD1, allerdings fehlt ein zentraler Teil (AS 77-102) der MTBD 2 (Abb. 15D). Wie oben bereits gezeigt (Abb. 14), führte die Überexpression eines GFP-getaggten *hmmr* FL mRNA-Konstrukts zur Bündelung der MT-Fasern in neuralen Zellen im St. 21. Vergleichend hierzu lokalisierte das *hmmr* ∆N GFP-Konstrukt eher verteilt im Zytoplasma, anstatt entlang der MT, bzw. hat zur Folge, dass die MT nicht mehr gebündelt werden können (Abb. 15D; Nickel, 2020). Zum direkten Vergleich wurde das oben gezeigte *hmmr* ∆E4 GFP-Konstrukt (Abb. 14) hier nochmals aufgeführt und verdeutlicht eine übermäßige Bündelung von Strukturen, die an MT erinnern und eine veränderte Lokalisierung (Abb. 15D).

Da neben dem Verlust von *hmmr* auch die Überexpression verschiedener *hmmr*-Konstrukte einen Einfluss auf die Wnt-Signalwegstransduktion in anderen Assays zu haben schien (Abb. 11, 13), sollte zusätzlich zur Injektion von *hmmr* MO (1 pmol) auch die Injektion von *hmmr* FL (100 pg), *hmmr* ∆N (80 pg) und *hmmr* ∆E4 (200 pg) in der animalen Kappe Aufschluss über eine mögliche Modulation des Wnt-Signalwegs geben (Abb. 15E, F, G). Hierfür wurde wie oben beschrieben BAR-Plasmid (40 pg), Rn-Plasmid (8 pg) in Kombination mit den zu untersuchenden Faktoren zweifach animal über Kreuz in St. 3 Embryonen injiziert, bis zum St. 10 kultiviert und daraufhin die animalen Kappen präpariert und im Luminometer analysiert (Abb. 15E). In den drei dargestellten Kästen (Abb. 15F) wurde erst gezeigt, dass die *wnt3a*-vermittelte Aktivierung wurde durch die Ko-Injektion des *hmmr* MO um 41,2 % reduziert wurde. Ebenso wurde die *ctnnb1*-vermittelte Aktivierung im *hmmr* Funktionsverlust um 46 %

reduziert. Auf Ebene der *dvl2*-induzierten Aktivierung des Wnt-Signalwegs führte die Ko-Injektion von *hmmr* MO zu einer Reduktion um 34 %. In diesem Experiment-Ansatz führte die Ko-Injektion von *hmmr* MO und *hmmr* FL mRNA zu einer Wiederherstellung des detektierten Wnt-Signals auf 99% (Abb. 15F). Unterhalb der drei einzelnen Säulendiagramme gezeigt in Abb. 15F ist hervorzuheben, dass die Aktivierung des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs mit der *ctnnb1* mRNA, normalisiert zur Aktivierung mit *wnt3a* mRNA, am stärksten war mit einem RLU-Wert von 436 %. Die Ko-Injektion mit *hmmr* MO halbierte das detektierte Signal nahezu. Darauf folgte die Aktivierung mit *wnt3a* mRNA, welche zum direkten Vergleich auf 100 % gesetzt wurde. Auch hierbei kam es durch die *hmmr* MO-Injektion zu einer Reduktion um 46 %. Die niedrigste und in dieser Darstellung kaum sichtbare Aktivierung wurde durch *dvl2* mRNA-Injektion erzielt, hier kam es im Vergleich nur zu einer Aktivierung von 9 % und in Kombination mit *hmmr* MO wurde dieses Signal um ca. 33 % reduziert (hier dargestellt nicht sichtbar). Dies deutet darauf hin, dass die Wnt-Signalwegsaktivierung abhängig von der Ebene der Induktion ist (*wnt3a, dvl2 oder ctnnb1*), allerdings führte in allen Szenarien der *hmmr* Funktionsverlust konsistent zu einer Reduktion des detektierten Wnt-Signals (Abb. 15F).

Die nachfolgenden Funktionsgewinn-Experimente zeigten, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs mittels *wnt3a* mRNA-Injektion und Ko-Injektion von *hmmr* FL mRNA überraschenderweise zu einer Reduktion um 15 % führte (Abb. 15G, blaue Säulen). Durch die Ko-Injektion der *wnt3a* mRNA und des *hmmr* ∆N Konstrukts, dem beide MTBD fehlen, kam es dagegen zu einer nicht signifikanten Erhöhung um ca. 29 %. Im Vergleich dazu führte die Injektion von *wnt3a* mRNA und *hmmr* ∆E4 mRNA zu einer nicht signifikanten Reduktion von 7 % (Abb. 15G, blaue Säulen). Die Ko-Injektion von *dvl2* mRNA und *hmmr* FL mRNA hatte eine signifikante 3,5-fache Signal-Erhöhung (um 189 %) zur Folge. Auch in diesem Kontext führte die Ko-Injektion mit *hmmr* ∆N mRNA zu einer nicht signifikanten Erhöhung, jedoch um 99 % (Abb. 15G, cyan Säulen). Dagegen führte hierbei die Ko-Injektion des *hmmr* ∆E4-Konstrukts zu einer signifikanten Erhöhung um 89 % (Abb. 15G, cyan Säulen). Auffällig war, dass bei der Wnt-Signalwegsaktivierung mit *ctnnb1* mRNA, die Überexpression von *hmmr* FL, *hmmr* ∆N und *hmmr* ∆E4 keine signifikanten Unterschiede zur alleinigen Injektion von *ctnnb1* mRNA aufwies (Abb. 15G, magenta Säulen). Mit dem *hmmr* FL-Konstrukt kam es zu einer Erhöhung um 15 %, mit dem *hmmr* ∆N-Konstrukt zu einer Reduktion um 10 % und schließlich mit dem *hmmr* ∆E4-Konstrukt zu einer Erhöhung um 19 % (Abb.

15G, magenta Säulen). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die MT-Bindung von Hmmr und das in Hmmr enthaltene Exon 4 zusammen mit Dvl2 eine modulierende Wirkung auf den kanonischen Wnt-Signalweg hat.

In vorherigen Experimenten (Abb. 14) lokalisierten die humanen HMMR-Varianten *hsHMMR* und *hsHMMR* ∆E4 differenziell entweder entlang der MT (*hsHMMR*) oder zytoplasmatisch und perinukleär (*hsHMMR* ∆E4). Zwar konnte im St. 21 keine nukleäre Lokalisierung des Deletionskonstrukts nachgewiesen werden, dennoch sollte auch im DLA analysiert werden, ob es ein Unterschied auf transkriptioneller Ebene abhängig von *ctnnb1* gibt (Abb. 15H). Hierfür wurden die Embryonen genauso injiziert, wie in Abb. 15E beschrieben. Auffällig war, dass die Ko-Injektion von *hsHMMR* zu einer signifikanten Erhöhung des Signals um 26 % führte, wohingegen die Injektion von *hsHMMR* ∆E4 eine nicht signifikante Erhöhung von 9 % aufwies (Abb. 15H).

Endogenes Hmmr-Protein lokalisiert in kleinen Pünktchen entlang AB-polarisierter MT-Bündel und innerhalb basaler MT-Gitter (Prager et al., 2017). Diese Pünktchen traten vermehrt am Zellcortex, sowohl apikal als auch basal auf. Ein weiteres MT-plus-Ende-bindendes Protein Mapre1 (*engl. microtubule associated protein RP/EB family 1,* auch EB1) wurde in unmittelbarer Nähe der Hmmr Pünktchen detektiert (Prager et al., 2017). Aufgrund dieser engen Lokalisierung beider Proteine sollte untersucht werden, ob dieses MT-bindende Protein einen ähnlichen Effekt auf die *dvl2*-vermittelte Wnt-Signalantwort haben könnte. Dabei zeigte sich erneut, dass die Ko-Injektion von *hmmr* FL zu einer stärkeren Erhöhung (um 49 %, nicht signifikant) des Wnt-Signals führte, im Vergleich zum humanen *hsMAPRE1* Konstrukt, welches sogar eher zu einer Reduktion um 49 % führte (Abb. 15I, nicht signifikant).

Es ist bereits bekannt, dass Hmmr auf den Rac1-vermittelten Zweig des nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalwegs wirkt (Nickel, 2020). Interessanterweise verstärkt die GTPase Rac1 den kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalweg in Zellkultur, wenn dieser zusätzlich durch einen Wnt-Agonisten, wie z.B. LiCl aktiviert wurde (Jamieson et al., 2015). Dadurch, dass Rac1 auf beide Wnt-Signalzweige wirkt, sollte untersucht werden, wie *hmmr,* humanes konstitutiv-aktives *RAC1* (*caRAC1*) und humanes dominant-negatives *RAC1* (*dnRAC1*) aktiviert durch *ctnnb1* auf den kanonischen Wnt-Signalweg wirken könnten (Abb. 15J). Wie oben beschrieben (Abb. 15F), führte auch hier der Funktionsverlust von *hmmr* zu einer Signalreduktion um 45 % (Abb. 15J). Im direkten Vergleich verstärkte die Injektion von *ctnnb1* und *caRAC1* das Signal um

108 %. Hervorzuheben ist, dass die zusätzliche Injektion von *hmmr* MO zu einer starken Reduktion um 76 % führte (Abb. 15J). Im Vergleich dazu hatte die Injektion von *ctnnb1* und *dnRAC1* eine Reduktion des Signals um 31 % zur Folge. Auch in diesem Experiment-Ansatz verstärkte die Ko-Injektion von *hmmr* MO die *dnRAC1*-vermittelte Reduktion weiter um 53 % (Abb. 15J). Daraus lässt sich schließen, dass Hmmr auch für die Rac1-vermittelte Wnt / Ctnnb1-Signalwegsaktivierung benötigt wird.

Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass Hmmr durch differenzielle MT-Bindung den kanonischen Wnt-Signalweg zur Induktion des RI / MET-Prozesses in der Neuralplatte und animalen Kappe steuert und dass dies höchstwahrscheinlich auf der Ebene von Dvl2 in der Wnt-Signalkaskade geschieht. Die zusätzlichen Analysen mit den humanen HMMR-Varianten, dem MT-bindenden Protein Mapre1 und der kleinen GTPase Rac1 offenbaren eine spezifische Funktion von Hmmr für die MT-abhängige Aktivierung des Wnt-Signalwegs, die dadurch differenziell RI / MET-vermittelte Prozesse während der Morphogenese steuern kann.

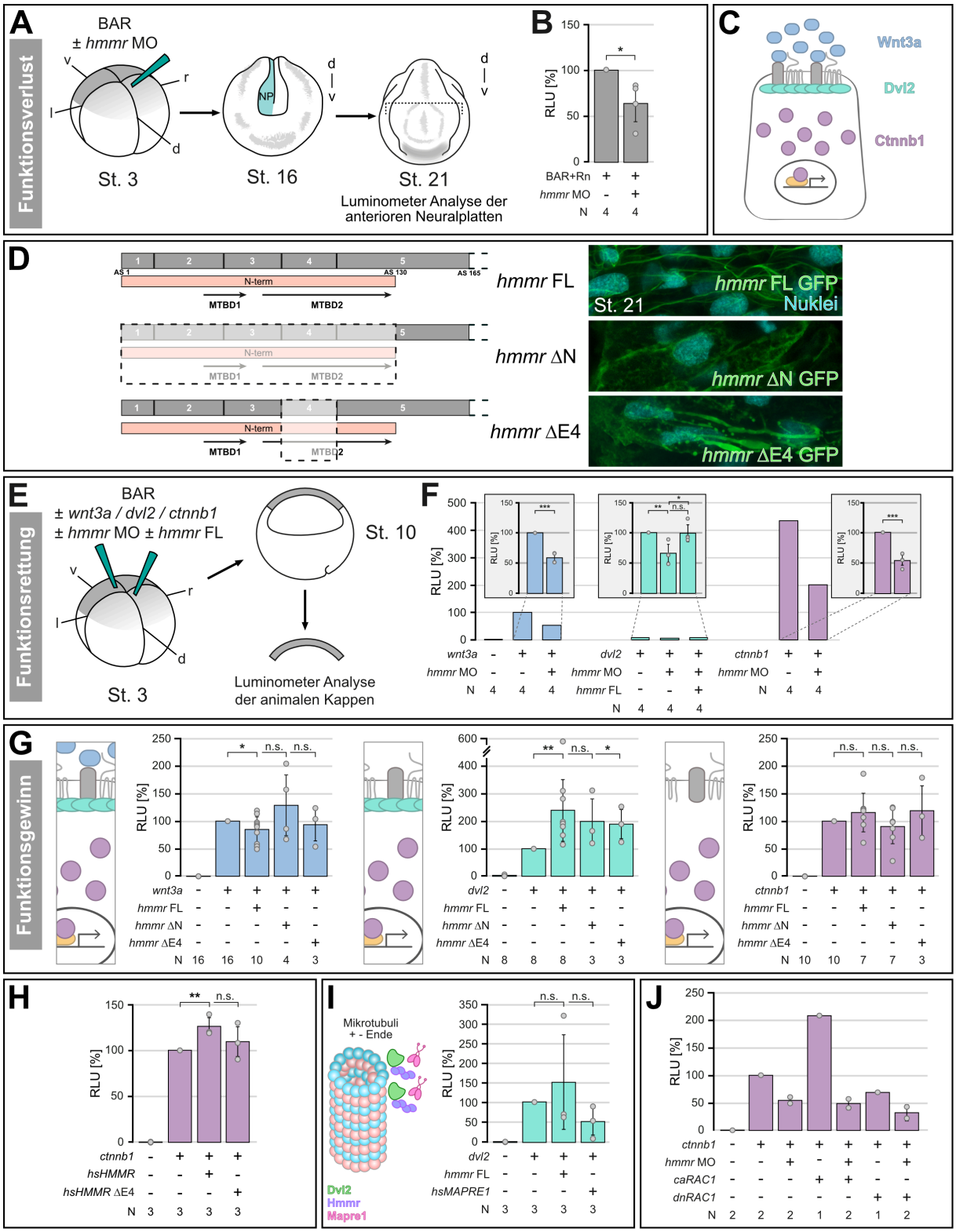


Abb. 15: Die Mikrotubuli-bindende Funktion von Hmmr ist über Dvl2 für den kanonischen Wnt-Signalweg während des mesenchymal-epithelialen Übergangs in der animalen Kappe und Neuralplatte erforderlich

(**A**) Injektionsschema für das Luciferase Reporter Assay: St. 3 Embryonen wurden unilateral in eine dorsale Blastomeren mit einem β-Catenin-aktiviertem Reporter, *hmmr* MO und Zellschicksalsmarker injiziert. Im St. 21 wurden die Embryonen im Bereich des Vorderhirns geschnitten und nur die anterioren Teile auf Firefly-Luciferase-Aktivität untersucht. (**B**)

Luciferase Aktivität (Firefly/Renilla) nach BAR und Renilla (Rn)-Luciferase Injektion mit / ohne *hmmr* MO. Die Wnt-Aktivität wurde durch das *hmmr* MO unterdrückt. (**C**) Vereinfachtes Schema des kanonischen Wnt-Signalwegs mit Wnt3a, Dvl2 und Ctnnb1. (**D**) Schematische Darstellung dreier hmmr-Konstrukte mit Fokus auf den N-terminus (Orange). *hmmr* FL mit zwei Mikrotubuli-Bindedomänen; *hmmr* ∆N (gesamter N-Terminus fehlt); *hmmr* ∆E4 (Teil der Mikrotubuli-Bindedomäne 2 fehlt). In St. 21 Neuroepithelzellen zeigt nur *hmmr* FL organisierte, feine Strukturen, die an Mikrotubuli erinnern (GFP: Grün; Nuklei: Cyan). (**E**) Injektionsschema in animalen Kappen: Embryonen im St. 3 wurden zwei-fach über Kreuz mit BAR- und Rn-Plasmid mit *wnt3a* mRNA, *dvl2* mRNA, oder *ctnnb1* mRNA zur Wnt-Signalwegsaktivierung injiziert. Zusätzlich wurde *hmmr* MO und in Kombination mit *dvl2* mRNA auch noch *hmmr* FL injiziert. Die Embryonen wurden bis St. 10 kultiviert und anschließend deren animalen Kappen präpariert und auf Luciferase-Aktivität untersucht. (**F**) Die Wnt-Aktivierung (RLU) wurde in allen drei Experiment-Ansätzen (*wnt3a* (Blau)*, dvl2* (Cyan) und *ctnnb1* (Violett)-mRNA-Injektion) durch das *hmmr* MO reduziert (siehe separate Kästen). Die unten dargestellten Säulen wurden in Relation zur *wnt3a* mRNA-abhängigen Aktivierung dargestellt. Man beachte, dass die stärkste Wnt-Signalwegsaktivierung durch *ctnnb1* mRNA-Injektion erfolgte. Die Spezifität der *hmmr* MO-induzierten Repression des *dvl2*-aktivierten Wnt-Signalwegs konnte durch die Ko-Injektion der *hmmr* FL mRNA nachgewiesen werden. (**G**) Funktionsgewinn-Experimente mit *hmmr* FL, *hmmr* ∆N und *hmmr* ∆E4 nach Injektion (siehe Schema in E) von *wnt3a*, *dvl2,* oder *ctnnb1* mRNA. Schemata präsentieren die Ebene, auf welcher der Wnt-Signalweg aktiviert wurde (Blau, Wnt3a; Cyan, Dvl2; Violett, Ctnnb1). Hervorzuheben ist, dass die Mikrotubuli-bindende Funktion von Hmmr speziell auf Ebene von Dvl2 benötigt wird. (**H**) Humanes *hsHMMR* Konstrukt erhöht die Luciferase-Aktivität im Gegensatz zum Deletionskonstrukt *hsHMMR* ∆E4. (**I**) Im Vergleich zu *MAPRE1* verstärkt *hmmr* FL die Luciferase-Aktivität auf der Ebene von Dvl2. Schematisch dargestellt ist die mögliche Ko-Lokalisation mit Dvl2 an Mikrotubuli-Plus-Enden. (**J**) Konstitutiv-aktives *RAC1* erhöhte die Luciferase-Aktivität zusammen mit *ctnnb1*. Diese wurde durch *hmmr* MO stärker reduziert als durch dominant-negatives *RAC1* mit *hmmr* MO. N in **B**, **F**, **G**, **H**, **I** und **J** gibt die Anzahl unabhängiger Experimente an. Es wurden 10 anteriore Teile (B) oder animale Kappen (F, G, H, I, J) je Experiment und Behandlung analysiert. Relative Einzelwerte sind als graue Punkte dargestellt. Die Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. Statistische Auswertung erfolgte mit einem einseitigen Student's t-Test für zwei unabhängige Stichproben, basierend auf den Einzelwerten. (AS) Aminosäure, (BAR) *engl. β-catenin activated reporter*, (d) dorsal, (FL) *engl. full length*, (l) links, (MO) Morpholino Oligomer, (MTBD) Mikrotubuli-Bindedomänen, (n.s.) nicht signifikant, (r) rechts, (RLU) *engl. relative light units*, (v) ventral.

2.11 Die Mikrotubuli-Bindung von Hmmr vermittelt die Rekrutierung von Dvl2 an Mikrotubuli

Wenn Hmmr über die Bindung an MT, abhängig von Dvl2 den Wnt-Signalweg modulieren kann, könnte ein Unterschied in der zellulären Lokalisierung beider Proteine zu beobachten sein. Studien belegten, dass Vertreter der Dvl-Protein Familie mit MT-assoziierten Proteinen im Wnt-Signalweg interagieren (K. Kikuchi et al., 2018; Vuong et al., 2014).

Um die Lokalisierung von Dvl2 in Abhängigkeit der MT-Bindung von Hmmr zu analysieren, wurden Embryonen im St. 3 zweifach animal über Kreuz mit einem MT-getaggten *dvl2* mRNA-Konstrukt (vereinfacht *dvl2*), mit einem GFP-getaggten *hmmr* FL mRNA-Konstrukt (vereinfacht *hmmr* FL) oder einem GFP-getaggten *hmmr* ∆N mRNA-Konstrukt ko-injiziert (vereinfacht *hmmr* ∆N; vgl. Abb. 15), bis zum St. 10 kultiviert und anschließend wurden die inneren animalen Kappen mittels Immunfluoreszenz-Färbung untersucht (Abb. 16A).

Durch die Verwendung eines AK gerichtet gegen Myc, konnte exogenes Dvl2 in den animalen Kappen visualisiert werden. Hierbei lokalisierte Dvl2 generell zytoplasmatisch und auch vorwiegend an der Plasmamembran der injizierten Zellen (Abb. 16B, B'). Die Ko-Injektion von *hmmr* FL mRNA führte wie zuvor beschrieben zur Bündelung und Organisation der MT-ähnlichen Fasern und veränderte die intrazelluläre Lokalisierung von Dvl2. Dieses ko-lokalisierte zusammen mit Hmmr entlang der organisierten MT-ähnlichen Bündel und wirkte dadurch nicht mehr diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 16C-C_2, C'-C_2'). Weitere Studien zeigten, dass die Überexpression von *hmmr* FL auch dazu führte, dass Dvl2 vermehrt entlang der Zellgrenzen lokalisierte (Deese, 2025). Überraschenderweise ko-lokalisierte Dvl2 auch mit Hmmr ∆N, welches ähnlich zur alleinigen Injektion von *dvl2* mRNA auch diffus verteilt im Zytoplasma vorzufinden war. Dagegen zeigten sich keinerlei organisierte MT-ähnliche Bündel wie mit Hmmr FL (Abb. 16D- D_2, D'-D_2'). Diese Ko-Lokalisation von Dvl2 und Hmmr ∆N konnte in weiteren Studien belegt werden (Deese, 2025).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Hmmr mit Dvl2 unabhängig vom MT-bindenden N-Terminus interagieren kann. Allerdings befördert die MT-Bindung von Hmmr die Rekrutierung von Dvl2 an das MT-Zytoskelett und zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 2.10 kann man schließen, dass die *dvl2*-vermittelte Wnt-

Signalwegsaktivierung von der Hmmr MT-Bindung und -Organisation abhängig ist, wohingegen die reduzierte Signalwegsaktivierung durch *hmmr* ΔN mRNA-Injektion auf die MT-unabhängige Dvl2-Hmmr ΔN Ko-Lokalisierung zurückzuführen ist.

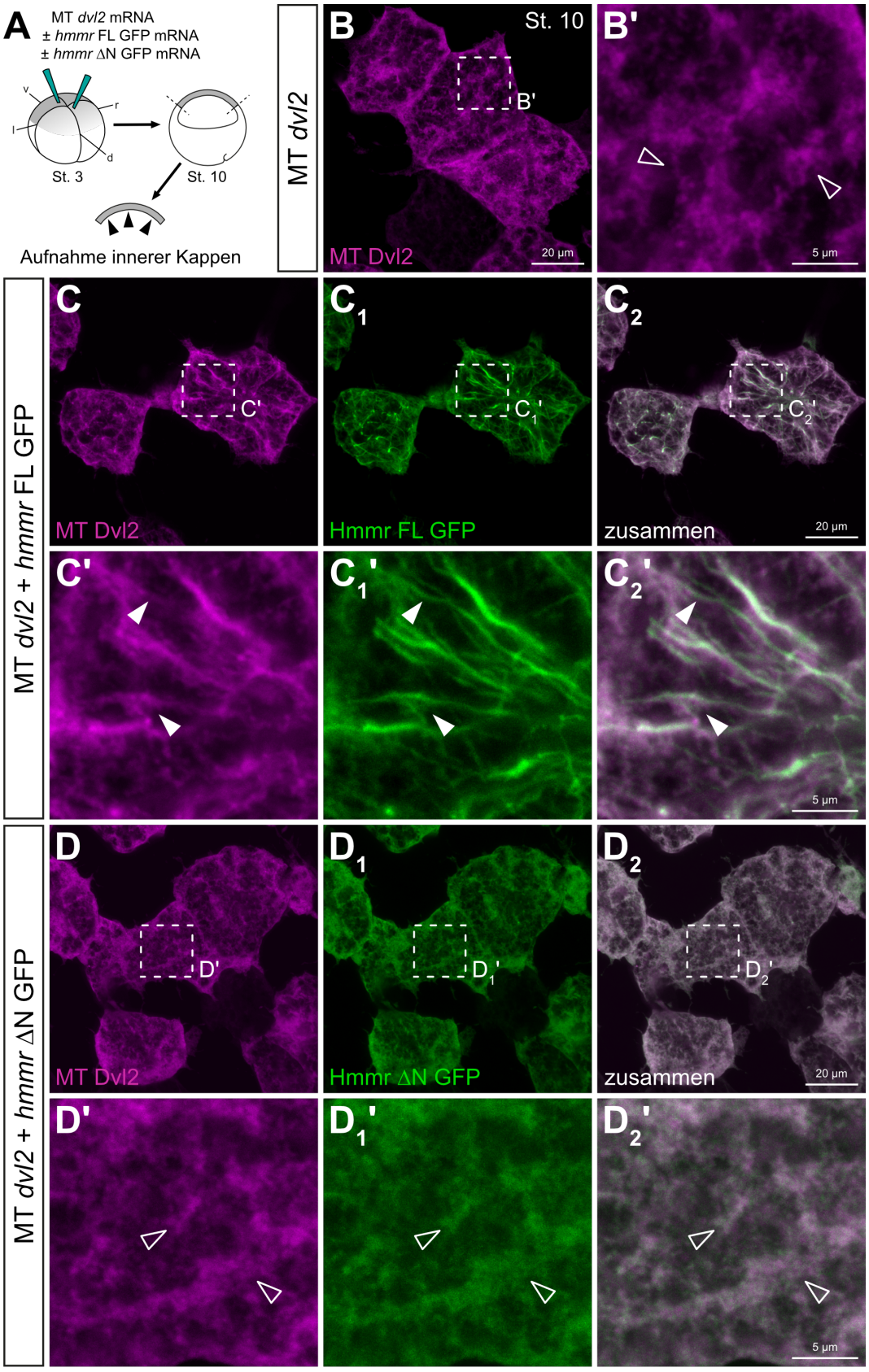


Abb. 16: Der N-Terminus von Hmmr ist essenziell für die Rekrutierung von Dvl2 an Mikrotubuli

(**A**) Injektionsschema für Immunfluoreszenz-Färbung (B-D) in den animalen Kappen von Embryonen im Stadium (St. 10). Embryonen im St. 3 wurden bilateral animal mit einem N-

terminal Myc-gekoppelten *dvl2* mRNA-Konstrukt injiziert in Kombination mit oder ohne die C-terminal GFP-gekoppelte volle Länge von *hmmr* oder mit dem ebenso C-terminal GFP-gekoppelten Deletionskonstrukt (Δ) *hmmr* ΔN, welchem der N-Terminus fehlt. (**B**) Überexpression des Myc-Tag (MT) *dvl2*-Konstrukts (Magenta) zeigte zytoplasmatische Lokalisierung in den animalen Kappenzellen (Vergrößerung B', Pfeilspitzenumrandung). (**C**, **C_1**, **C_2; C'**,**C_1'**,**C_2'**) Ko-Injektion des GFP-gekoppelten *hmmr* FL-Konstrukts (Grün) zusammen mit dem MT *dvl2*-Konstrukt (Magenta) führte zu organisierten und gerichteten Mikrotubuli-ähnlichen Strukturen (Pfeilspitzen in Vergrößerungen in C', C_1', C_2'). Beide Konstrukte sind ko-lokalisiert (C_2, C_2'). (**D**, **D_1**, **D_2; D'**,**D_1'**,**D_2'**) Überexpression des MT *dvl2*-Konstrukts (Magenta) zusammen mit dem GFP-gekoppelten Deletionskonstrukt *hmmr* ΔN (Grün) zeigte keine deutlichen, geordneten Mikrotubuli-ähnliche Strukturen wie in Kombination mit *hmmr* FL (C). Siehe Vergrößerungen D', D_1' und D_2' (Pfeilspitzenumrandung). Hervorzuheben ist, dass MT *dvl2* und *hmmr* ΔN auch ko-lokalisiert vorlagen (D_2, D_2'), allerdings differenziell zur Ko-Injektion von MT *dvl2* und *hmmr* FL (C_2, C_2'). (d) dorsal, (FL) *engl. full length,* (l) links, (MT) Myc-Tag, (r) rechts, (v) ventral.

2.12 Regulation des Wnt-Signalwegs durch das KKQK-Motiv von Hmmr

Im Ctnnb1-Abbaukomplex ist CK1α die Isoform, die für die initiale Phosphorylierung und den Abbau von Ctnnb1 verantwortlich ist. Ohne die Wnt-Aktivierung phosphoryliert CK1α Ctnnb1 an Serin 45 und bereitet damit die nachfolgenden Phosphorylierungen an Thr 41, Ser 37 und Ser 33 durch GSK-3β vor (Amit et al., 2002; C. Liu et al., 2002; Sakanaka, 2002). Innerhalb der CK1α vermittelt eine basische Region der AS 228-231 (KKQK-Motiv) die Bindung an Axin (Sobrado et al., 2005). Diese basische Region interagiert außerdem mit anderen Interaktionspartnern, wie z.B. Tubulin und Aktin (Bustos et al., 2005). Studien zeigten, dass insbesondere die Substitution des dritten Lysins (K231) durch Alanin die Bindung an Axin am stärksten beeinträchtigt (Sobrado et al., 2005). Interessanterweise enthält Hmmr mittig der MTBD 2 des N-Terminus das gleiche Motiv $K^{94}KQK^{97}$. Aufgrund dieser Ähnlichkeit zu CK1α ist es denkbar, dass Hmmr mit dem KKQK-Motiv zusammen mit CK1α um die Bindung an Axin konkurriert und dadurch die Rekrutierung des Abbau-Komplexes stört. Folglich würde es zu einer Aktivierung des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs kommen.

Um dies zu überprüfen, sollte im ersten Schritt die Lokalisierung eines N-terminalen Hmmr-Konstrukts (AS 1-130) im Vergleich zu Hmmr FL in der animalen Kappe untersucht werden. Hierfür wurden Embryonen im St. 3 zweifach über Kreuz in die animalen Blastomeren mit einem GFP-getaggten *hmmr* FL mRNA-Konstrukt (600 pg)

und einem GFP-getaggten *hmmr* N-term mRNA-Konstrukt (400 pg) injiziert, bis zum St. 10 kultiviert und im Anschluss durch Immunofluoreszenz-Färbung in der inneren animalen Kappe untersucht (Abb. 17A). Ebenso wie in den zuvor beschriebenen Ergebnissen (Abb. 14, 15, 16) lokalisierte die Hmmr FL an MT-Bündeln und organisierte dadurch das MT-Zytoskelett (Abb. 17B, B_1, B_2). Dies zeigte sich durch die nahezu vollständige Ko-Lokalisation von Hmmr FL und dem MT-Zytoskelett (Tuba4a; Abb. 17B). Im Vergleich hierzu wies auch das Hmmr N-term-Konstrukt eine überwiegende Ko-Lokalisation mit den MT auf, allerdings schien der Hmmr N-Terminus allein das MT-Zytoskelett nicht durch gerichtete MT-Bündel organisieren zu können (Abb. 17C, C_1, C_2).

Im nächsten Schritt wurde eine N-terminale Hmmr Mutationsvariante von Hmmr generiert, in der – analog zur CK1α-Mutante – das dritte Lysin im KKQK-Motiv durch Alanin ersetzt wurde (Abb. 17D, E). Dass KKQK-Motiv (AS 94-97) befindet sich in der MTBD 2 (AS 68-129) in Exon 4 von Hmmr. Dass das Exon 4 in *Xenopus* eine wichtige Rolle einzunehmen scheint, wurde in den zuvor beschriebenen Ergebnissen bereits erläutert (Abb. 14, 15). Die Modulationsfähigkeit von Hmmr im Wnt-Signalweg schien ohne Exon 4 eingeschränkt zu sein (Abb. 15). Im AlphaFold-Strukturmodell wird deutlich, dass sich das KKQK-Motiv direkt nach einer Konformationsänderung, die als lokaler Knick zwischen dem unstrukturierten (AS 1-88) und strukturierten (AS 89-130) Bereich des N-Terminus sichtbar wird, befindet (Abb. 17D). Die Substitution von K97 zu A97 erfolgte durch einen zweifachen Basenaustausch von AAG zu GCG (Abb. 17E). Interessanterweise zeigte sich auch im AlphaFold-Strukturmodell von CK1α eine ähnliche Positionierung des KKQK-Motivs (AS 229-232) im strukturierten Bereich des Proteins (Abb. 17F). Dieses Motiv befindet sich ebenfalls in unmittelbarer Nähe eines Konformationsänderung-bedingten Knicks und beginnt direkt nach einem unstrukturierten Abschnitt des Proteins. Diese ähnliche Positionierung des KKQK-Motivs in Hmmr und CK1α könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Bindung von Axin auch durch Hmmr stattfinden könnte.

Nachfolgend sollte also getestet werden, wie sich die Mutationsvariante Hmmr N-term K97A im Vergleich zum Hmmr N-Terminus mit normalem KKQK-Motiv im kanonischen Wnt-Signalweg verhält. Hierfür wurden wie oben beschrieben (Abb. 15) DLA in animalen Kappen durchgeführt und der Einfluss beider Konstrukte auf allen drei Wnt-Induktionsebenen (*wnt3a, dvl2* und *ctnnb1*) analysiert (Abb. 17G, H, I). Die Injektion

der *wnt3a* mRNA wurde zum Vergleich auf 100 % gesetzt (Abb. 17G). Die Ko-Injektion der *hmmr* N-term mRNA (20 pg) reduzierte das detektierte Signal um 10 % (nicht signifikant; Abb. 17G). Diese Tendenz ähnelt sehr der Ko-Injektion von *wnt3a* mRNA und *hmmr* FL mRNA, wo es auch zu einer Reduktion des Signals kam (Abb. 15). Dagegen hatte die Ko-Injektion der mutierten mRNA *hmmr* N-term K97A (20 pg) weder eine Aktivierung noch eine Reduktion des Signals zur Folge (Abb. 17G). Die Induktion des Wnt-Signalwegs durch *dvl2* mRNA wurde durch die Ko-Injektion von *hmmr* N-term mRNA leicht unterdrückt (- 14 %, nicht signifikant; Abb. 17H). Die Mutation K97A verhinderte diesen Effekt (Abb. 17H). Ein weiterer Vergleich zwischen dem *hmmr* FL-Konstrukt und der Mutations-Variante *hmmr* K97A (ebenso in der vollen Länge von *hmmr*) in der *dvl2*-vermittelten Wnt-Signalwegsaktivierung zeigte deutlich, dass das KKQK-Motiv für die effiziente Aktivierung mit *dvl2* benötigt wird (Anhang 1). Die Ko-Injektion von *ctnnb1* mRNA und *hmmr* N-term mRNA führte, sehr ähnlich zur Kombination aus *ctnnb1* mRNA und *hmmr* FL, zu einer geringen Erhöhung des Wnt-Signals (+ 11 %, nicht signifikant; Abb. 17I). Jedoch führte in diesem Fall das *hmmr* N-term K97A-Konstrukt dazu, dass sich das Wnt-Signal um 21 % verringerte (Abb. 17I, nicht signifikant).

Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass der N-Terminus von Hmmr zwar eigenständig an MT binden kann, dass aber für die Organisation des MT-Zytoskeletts als auch für eine Erhöhung der durch Dvl2 induzierten Wnt-Signalwegsaktivität weitere Strukturelemente erforderlich sind. Der N-Terminus ist also essenziell, aber nicht hinreichend für die Induktion von Wnt. Vielmehr weist er allein eine gewisse modulierende Eigenschaft bezüglich der Aktivierung des Wnt-Signalwegs auf. Die Annahme, dass Hmmr zusammen mit CK1α um die Bindung an Axin und folglich der Rekrutierung des Abbau-Komplexes konkurriert, konnte nicht vollständig geklärt werden. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass der N-Terminus von Hmmr allein nicht maßgeblich an der Regulation des Wnt-Signalwegs beteiligt ist und es weitere Strukturen, wie zentrale coiled-coil Domänen oder den C-Terminus von Hmmr für die erfolgreiche Modulierung benötigt.

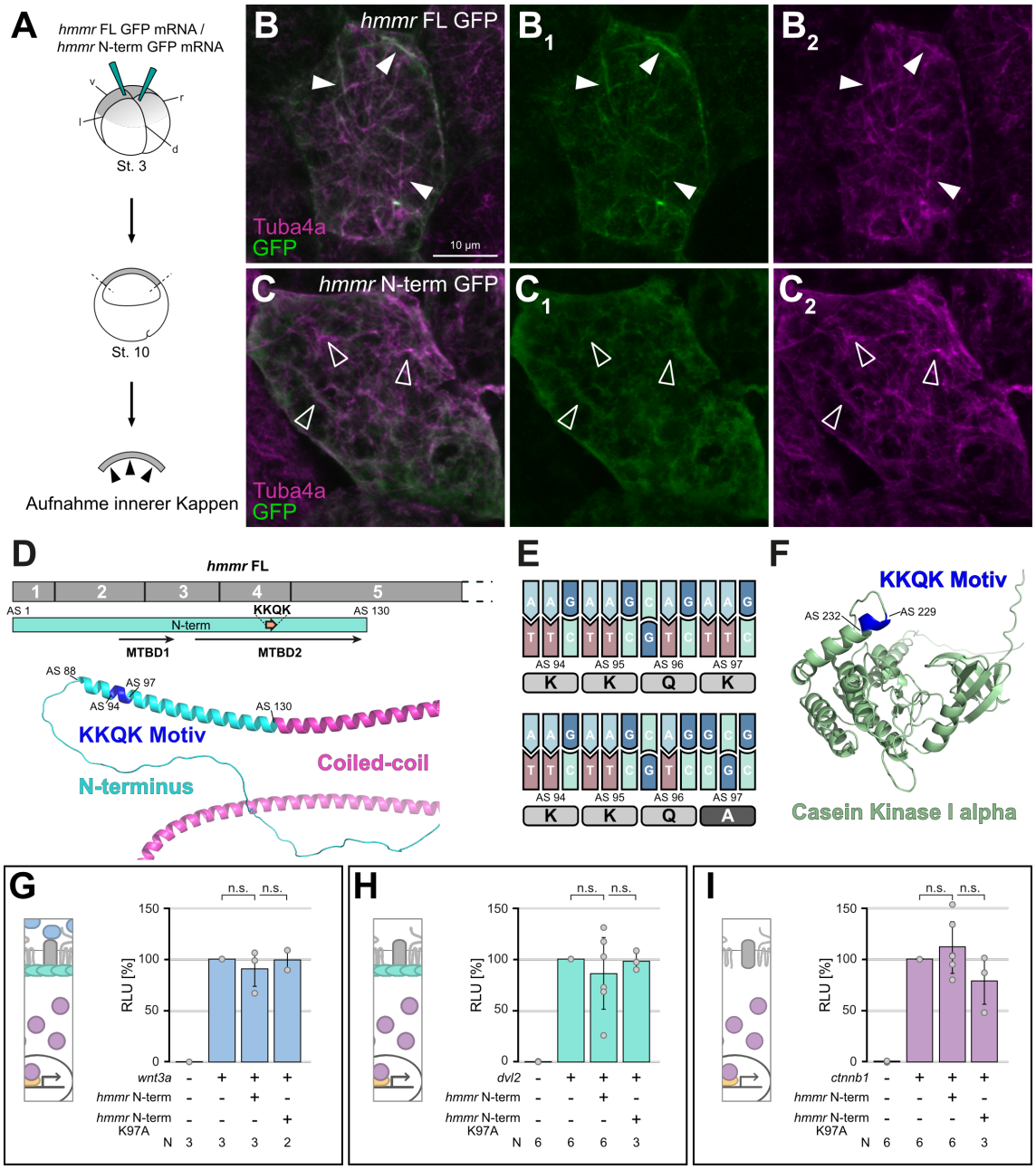


Abb. 17: Das N-terminale Hmmr-Konstrukt mit KKQK-Motiv ist notwendig, aber nicht hinreichend zur effektiven Modulation des Wnt-Signalwegs

(**A**) Injektionsschema für Immunfluoreszenz-Färbung (B, C) in den animalen Kappen von Embryonen im Stadium (St. 10). Embryonen im St. 3 wurden animal zwei Mal über Kreuz mit einem C-terminal GFP-gekoppelten *hmmr* volle Länge (*engl. full length,* FL) Konstrukt oder mit einem C-terminal GFP-gekoppelten *hmmr* N-Terminus (N-term) Konstrukt, welches nur aus 130 Aminosäuren (AS), inklusive beider Mikrotubuli-Bindedomänen (MTBD), besteht injiziert. (**B**, **B$_1$**, **B$_2$**) Die Immunfärbung des Mikrotubuli (MT)-Zytoskeletts (Tuba4a, Magenta) zeigt organisierte und gerichtete MT-Filamente (Pfeilspitzen). Die Überexpression des GFP-gekoppelten *hmmr* FL-Konstrukts (Grün) zeigt deutliche Ko-Lokalisierung an gebündelten MT-Filamenten (B). (**C**, **C$_1$**, **C$_2$**) Die Injektion des GFP-gekoppelten *hmmr* N-term Konstrukts führt dazu, dass die Immunfärbung des MT-Zytoskeletts (Tuba4a, Magenta) weniger geordnete, filamentöse Strukturen aufweist (Pfeilspitzenumrandung). (**D**) Schematische Darstellung des Amino- (N-terminalen) Endes (Cyan) von Hmmr mit 5 Exons und genauer Lokalisation des KKQK-Motivs (orangener Pfeil). Das Motiv befindet sich in der MTBD2, ausgehend von

Aminosäure (AS) 94 – AS 97. Darunter dargestellt ist ein Ausschnitt des AlphaFold-Strukturmodells mit markiertem KKQK-Motiv (Dunkelblau), welches sich direkt nach einer Konformationsänderung, die als lokaler Knick sichtbar wird, zwischen dem unstrukturierten (AS 1 – 88) und strukturierten (AS 89 – AS 130) Bereich des N-Terminus (Cyan) befindet. Der zentrale Teil des Proteins (Magenta), bestehend aus einer Vielzahl an Coiled-coil Strukturen, wird hier nur anteilig dargestellt. (**E**) Vergleichende Darstellung der Nukleotide und zugehörigen AS-Sequenz 94 – 97 von *hmmr* FL und *hmmr* K97A. Bei der Mutation handelt es sich um einen AS-Austausch von einem Lysin (K) zu einem Alanin (A). (**F**) Ausschnitt eines AlphaFold Strukturmodells des Wnt-Signalwegs-Komponenten Casein Kinase I alpha (Csnk1a1 oder auch CK1α). Diese Kinase besitzt ebenso wie Hmmr ein KKQK-Motiv (Dunkelblau; AS 229 – AS 232), welches an der Bindung kanonischer Substrate beteiligt ist. Dieses Motiv befindet sich in unmittelbarer Nähe eines Konformationsänderung-bedingten Knicks und beginnt direkt nach einem unstrukturierten Abschnitt des Proteins. (**G**-**I**) Luciferase-Reporter Assay in animalen Kappen (Injektionsschema wie in Abb. 10, E). *hmmr* N-term und *hmmr* N-term K97A Funktionsgewinn-Experimente nach Injektion von *wnt3a*, *dvl2,* oder *ctnnb1* mRNA. Schemata neben den Säulendiagrammen präsentieren die Ebene, auf welcher der Wnt-Signalweg aktiviert wurde (Blau, Wnt3a; Cyan, Dvl2; Violett, Ctnnb1). Hervorzuheben ist, dass der Hmmr N-Terminus allein nicht maßgeblich an der Wnt-Signalwegsaktivierung auf allen drei Ebenen beteiligt ist. Der AS-Austausch im *hmmr* N-term K97A Konstrukt jedoch führt zu keiner Modulation (G, H) bis hin zu einer leichten Repression (I) des Wnt-Signalwegs. N in **G** – **I** gibt die Anzahl unabhängiger Experimente an. Es wurden 10 animale Kappen pro Experiment und Behandlung analysiert. Die Daten der unabhängigen Experimente werden als Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. Relative Einzelwerte sind als graue Punkte dargestellt. Statistische Auswertung erfolgte mit einem einseitigen Student's t-Test für zwei unabhängige Stichproben, basierend auf den Einzelwerten. (d), dorsal, (l) links, (n.s.) nicht signifikant, (r) rechts, (RLU) *engl. relative light units*, (v) ventral.

3 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse identifizieren Hmmr erstmals als Modulator des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalwegs während der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis,* insbesondere im Kontext der Vorderhirnentwicklung. Dabei zeigte sich, dass die Fähigkeit von Hmmr, diesen Signalweg zu beeinflussen, wesentlich von seiner MT-Bindung abhängt. Vor dem Hintergrund der bekannten Rolle von Hmmr in der Tumorbiologie – insbesondere bei Brustkrebs – weisen diese neuen Erkenntnisse auf eine mögliche Verbindung zwischen der Regulation Wnt-abhängiger Zellbewegungen in der Embryonalentwicklung und der Wnt-vermittelten Metastasierung von Tumoren hin.

3.1 Regulatorisches Zusammenspiel von *zic2* und *hmmr* während der Neurogenese

Zic2 ist ein Transkriptionsfaktor mit zentraler Bedeutung für die Gehirnentwicklung bei Tier und Mensch (Brewster et al., 1998; Nakata et al., 1998). Er wirkt zu mehreren Zeitpunkten der neuralen Entwicklung: einerseits reguliert er die Migration der Prächordalplatte, einer mesendodermalen Struktur, die für die Ausbildung des Vorderhirns notwendig ist, andererseits beeinflusst er die Migration differenzierter Neuronen im Vorderhirn der Maus (Murillo et al., 2015). Während der Neurulation wird *zic2* an den lateralen Rändern der Neuralplatte exprimiert, die später die Dachplatte bilden (Brewster et al., 1998; Nagai et al., 1997). Darüber hinaus wirkt *ZIC2* in vielen Tumorarten als transkriptioneller Aktivator und fördert die Tumorprogression (Lu et al., 2017; Zhao et al., 2019; Zhu et al., 2015). Mutationen in *ZIC2* sind, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, mit MIH HPE assoziiert.

Da *hmmr*-Morphanten in *Xenopus* eine vergleichbare Vorderhirn-Fehlbildung zeigten (Prager et al., 2017), lag die Annahme nahe, dass *hmmr* und *zic2* ähnliche oder komplementäre Funktionen im Rahmen des NRS erfüllen. Der Funktionsverlust von *zic2* führte zu einer unilateralen Verbreiterung des Neuralrohrs, wie zuvor auch neben *hmmr* beschrieben wurde (Nickel, 2020). Diese Beobachtung wurde durch eigene Experimente bestätigt – sowohl während der frühen Neurulation als auch in späteren

Kaulquappen-Stadien. Hier zeigten sich ein schmales Vorderhirn und verkleinerte Riechkolben im *zic2*-Verlust (Abb. 6). Die zusätzlich verbreiterten Schlüpf- und Klebdrüsen im Stadium 21 (Abb. 6B) könnten auf eine unvollständige Migration darunterliegender neuroepithelialer Zellen zur Mittellinie hin hindeuten, analog zum Verlust von *hmmr*. Ob dies auf eine gestörte Zellpolarität oder eine generelle Migrationsstörung zurückzuführen ist, bleibt offen und wäre ein interessanter Ansatz für zukünftige Untersuchungen.

Reziproke Wiederherstellungsexperimente – etwa durch Injektion von *zic2*-MO kombiniert mit *hmmr*-mRNA und umgekehrt – könnten Aufschluss über die funktionelle Hierarchie der beiden Gene geben. Da sowohl *hmmr* (Abb. 7, 9) als auch *zic2* früh maternal exprimiert sind, ist eine Rolle in sehr frühen Entwicklungsprozessen wahrscheinlich – noch bevor die Neurulation beginnt. Besonders interessant wäre dabei die Frage, ob eines der beiden Gene übergeordnet zum anderen spezifische Signalwege der Embryogenese reguliert. Dadurch, dass Hmmr in *Xenopus* als MAP beschrieben wurde (Groen et al., 2004), und dessen MT-Bindung für die Zellmigration während des NRS essenziell ist (Prager et al., 2017), erscheint es daher plausibel, dass *zic2* als Transkriptionsfaktor gezielt Gene reguliert, deren Produkte mit MT interagieren – und somit indirekt über das Zytoskelett den NRS beeinflusst. *Zic2*-exprimierende Neuronen zeigten beispielsweise eine Herunterregulation von APC2, einem Wnt-Regulator, der über die Dynamik von MT die Dendriten-Entwicklung beeinflusst (Kahn et al., 2018; Morenilla-Palao et al., 2020).

Bemerkenswert ist, dass sich in unmittelbarer Nähe des Gens *hmmr.*L ein *zic2*.L-Bindemotiv auf Exon 1 des Gens *nudcd2* (*engl. nudc domain-containing protein* 2) befindet (Abb. 18). Nudcd2 bindet – ähnlich wie Hmmr – an den Dynein-Komplex und lokalisiert am Zentrosom (Y. Yang et al., 2010). Dieses *hmmr-nudcd2*-Gen-Cluster ist evolutionär konserviert und kodiert für zwei coiled-coil Zentrosom-Proteine, die gemeinsam mit Dynein an der Homöostase, der Zentrosomenfunktion und der Stabilität der mitotischen Spindel beteiligt sind (He et al., 2020; Jiang et al., 2013). Die räumliche Nähe sowie die regulatorische Verknüpfung von *zic2* mit *nudcd2* legen nahe, dass *hmmr* und *zic2* indirekt – möglicherweise über *nudcd2* – in relevante Prozesse während der Neurulation eingebunden sind.

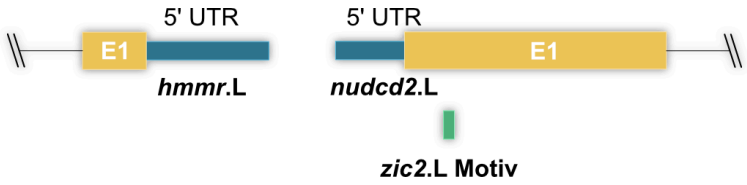


Abb. 18: *hmmr-nudcd2* Gen-Cluster mit *zic2*-Bindemotiv

Auf dem *Xenopus* Chromosom 3 sind die Gene *hmmr*.L und *nudcd2*.L des konservierten Gen-Clusters in entgegengesetzte Richtungen orientiert. Dabei befindet sich *hmmr* in Vorwärts-Orientierung und *nudcd2* in Rückwärts-Orientierung, sodass die 5'-Enden der Gene 224 Basenpaare voneinander entfernt liegen. Auf dem Exon 1 (E1) von *nudcd2* befindet sich ein *zic2* Transkriptionsfaktor-Bindemotiv (angelehnt an Karimi et al., 2018).

Die vermehrte Expression von *hmmr* nach dem *zic2*-Funktionsverlust (Abb. 7) legt nahe, dass *zic2* unter physiologischen Bedingungen als Repressor der *hmmr*-Expression wirkt. Ein Verlust dieser Repression könnte die beobachteten NRD-Phänotypen zumindest mitverursachen. Diese Interpretation wird durch frühere Studien gestützt, in denen eine Überexpression von *hmmr* zu Defekten während des NRS und der Vorderhirnentwicklung führte (Nickel, 2020). Es ist daher denkbar, dass *zic2*-assoziierte NRD sekundär durch eine Überaktivierung von *hmmr* entstehen.

Die beobachtete Hochregulation von *hmmr* im eigenen Funktionsverlust deutet auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hin (Abb. 7). Solche mRNA-basierte Kontrollmechanismen sind dafür bekannt, die Translation fehlerhafter Transkripte zu unterbinden und gleichzeitig die Expression verwandter Gene – einschließlich des betroffenen Gens selbst – zu verstärken (El-Brolosy et al., 2019). Zwar handelt es sich beim MO-induzierten *hmmr*-Verlust nicht um eine klassische Mutation, jedoch könnte das verminderte Hmmr-Proteinlevel über alternative Mechanismen die Transkription weiterer *hmmr*-Isoformen stimulieren. Ein vergleichbarer positiver Feedback-Mechanismus wurde für Pax6 beschrieben – ein TF, der essenziell für die Augen- und Hirnentwicklung ist (Stoykova et al., 1996; Walther & Gruss, 1991). In Zellkultur führte die Überexpression einzelner Pax6-Isoformen (Pax6 und Pax6(5a)) zu einer verstärkten Expression beider Varianten. RT-PCR-Analysen zeigten, dass jede Isoform die mRNA-Menge der jeweils anderen ebenfalls erhöhte (Pinson et al., 2006).

Interessanterweise zeigte sich in wildtypischen Embryonen eine bislang unbeachtete verstärkte *hmmr*-Expression in der Bodenplatte des Neuralrohrs. Frühere Studien hatten hingegen Defekte vor allem in der Dachplatte des Vorderhirns im Verlust von

hmmr beschrieben (Nickel, 2020; Prager et al., 2017). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass eine Hmmr-Variante mit intaktem N-Terminus auch in der Bodenplatte funktionell relevant ist – allerdings ohne dort zu offensichtlichen Fehlbildungen im Funktionsverlust zu führen.

Western-Blot-Analysen über die gesamte Embryonalentwicklung hinweg zeigten im *hmmr*-Funktionsverlust eine kontinuierliche Abnahme der ersten Isoform (Abb. 7), begleitet von einem Anstieg der zweiten und dritten Isoform. Dies unterstützt die Annahme, dass der MO-induzierte Verlust zu einer Hochregulierung alternativer *hmmr*-Transkripte führt. Möglich wäre eine autoregulative Rückkopplung, bei der Hmmr die eigene Transkription hemmt. Zu beachten ist, dass der verwendete Antikörper gegen die letzten 137 Aminosäuren des C-Terminus gerichtet ist. Daher bleibt unklar, ob die beobachtete Hochregulierung tatsächlich Isoformen mit intaktem N-Terminus betrifft. Klärung könnten reziproke Analysen mit einer C-terminalen Antisinn-Sonde sowie einem N-terminalen Hmmr-Antikörper bringen.

Schließlich stellt sich die Frage, ob *hmmr* und *zic2* im Rahmen embryonaler Signalwege gemeinsam agieren. *zic2* wurde bereits als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs beschrieben: seine Überexpression hemmt die transkriptionelle Aktivität des Ctnnb1 / TEF4-Komplexes und reduziert die Expression direkter Zielgene. Zudem verhinderte die Ko-Injektion von *ctnnb1*- und *zic2*-mRNA die Bildung sekundärer Körperachsen vollständig (Pourebrahim et al., 2011). Andererseits wurde in Darmkrebs ein gegenteiliger Effekt beschrieben, bei dem Zic2 den Wnt-Signalweg über Ctnnb1 verstärkt und Axin2 reprimiert (Xu et al., 2021). Gemeinsam betrachtet legen diese Daten nahe, dass *zic2* und *hmmr* nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch über Wnt-vermittelte Signalwege den NRS koordinieren könnten. Für MET / RI-Prozesse ist es essenziell, dass die kanonische Wnt-Signalgebung runterreguliert wird. Dies wurde auch bei der Entwicklung von Nierentubuli beobachtet, bei denen der letzte MET-Schritt abhängig von einer Reduktion des kanonischen Wnt-Signals ist, um das Lumen der Tubuli ausbilden zu können (Park et al., 2007; Schlüter & Margolis, 2009). Auch in Bezug auf den NRS muss der kanonische Wnt-Signalweg herunterreguliert werden, um die morphogenetischen Bewegungen durch RI / MET zu ermöglichen. Daher ist es denkbar, dass der Verlust der *zic2* Repressor-Funktion des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einem erhöhten Wnt-Signal im Vorderhirnbereich führt und dadurch die RI / MET-vermittelte Migration neuraler Zellen stört.

Zusammenfassend belegen die vorliegenden Daten, dass *zic2* als Repressor von *hmmr* fungiert und beide Gene gemeinsam zur RI / MET-vermittelten Regulation des Neuralrohrschlusses beitragen. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf einen autoregulativen Mechanismus hin, durch den *hmmr* seine eigene Transkription – und damit die Expression alternativer Isoformen – modulieren könnte.

3.2 Hmmr als Schlüsselfaktor bei der radialen Interkalation und der anterioren Musterbildung

In der vorliegenden Studie führte der CRISPR / Cas9-vermittelte Funktionsverlust von *hmmr* zu deutlichen Defekten während der Gastrulation und Neurulation (Abb. 9). Die eingesetzten sgRNAs richteten sich gezielt gegen Sequenzen innerhalb der MTBD 2 (Abb. 8). Eine solche gezielte Mutagenese funktioneller Domänen erhöht typischerweise den Anteil an Nullmutationen und verstärkt die negative Selektion (Shi et al., 2015).

Auffällig war, dass Embryonen, die mit *hmmr* CRNP 1 behandelt wurden, nur einen Knock-out-Wert von 1 % aufwiesen – also lediglich 1 % der Allele Frameshift-Mutationen zeigten (Abb. 8). Dabei berücksichtigt die ICE-Analyse jedoch keine In-frame-Indels (Vielfache von 3 bp), die trotz erhaltener Leseraster-Integrität zu funktionell relevanten Störungen führen können. Denn auch Mutationen innerhalb des Leserasters können die Faltung kritischer Domänen beeinträchtigen und so Proteinaktivität oder -stabilität einschränken (Nakayama et al., 2014). Der Umstand, dass die *hmmr* CRNP 1 Embryonen vergleichbare NRDs wie *hmmr* Morphanten zeigten (Prager et al., 2017), deutet darauf hin, dass auch In-frame-Mutationen in der MTBD 2 funktionelle Konsequenzen haben. Besonders kritisch erscheint die Nähe der Schnittstelle der sgRNA1 zum Übergang zwischen einem unstrukturiertem Abschnitt (AS 1–92) und dem α-helikalen Bereich (AS 93–130), was auf eine mögliche Störung der sterischen Faltung hindeutet. Darüber hinaus könnte eine alternative Translation an einem Methionin zwei Aminosäuren upstream der Schnittstelle ebenfalls die Proteinkonformation verändern, indem das Fehlen des unstrukturierten Teils des N-Terminus potenzielle Protein-Interaktionen unterbindet.

Während der Gastrulation führte der Verlust von *hmmr* zu einer Beeinträchtigung der RI in der nicht-einwandernden dorsalen Marginalzone, dem Vorläufergewebe des Neuroepithels (Nickel, 2020; Prager et al., 2017), was auf eine grundsätzliche Bedeutung von *hmmr* bei Interkalationsprozessen hinweist. Die maternale Expression sowie das Vorhandensein von zygotischen *hmmr*-Transkripten bereits zu Beginn der Gastrulation in der animalen Kappe (Abb. 9) deuten darauf hin, dass *hmmr* bereits vor dem NRS funktionell aktiv ist. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass *hmmr* nicht nur für die Ausbildung eines korrekt ausgerichteten Fn1-Netzwerks und die Zell-Matrix-Adhäsion während des NRS (Hagenlocher, 2016), sondern bereits früh während der Gastrulation am BCR erforderlich ist (Abb. 9).

Die Fn1-Matrix, die das BCR überzieht, ist essenziell für das Interkalationsverhalten der darunterliegenden Zellschichten während der Gastrulation (Marsden & DeSimone, 2001). In Zellkulturexperimenten wurde darüber hinaus gezeigt, dass HMMR die Fn1-Expression über die Ko-Aktivierung von E2F1 verstärken kann (Meier et al., 2014). Eine fehlgesteuerte oder verstärkte E2F1-Aktivität steht in verschiedenen Krebsarten mit einer ungünstigen Prognose in Zusammenhang (Eymin et al., 2001; J.-S. Lee et al., 2010).

Die gezielte Mutagenese innerhalb der MTBD 2 durch *hmmr* CRNP 2 führte zu einer deutlichen Störung des Fn1-Netzwerks (Abb. 9). Auch Embryonen im *hmmr* Funktionsverlust durch MOs zeigten gestörte Fn1-Fibrillen im inneren BCR (nicht dargestellt). Auffällig war zudem die stark erhöhte Anzahl der Zellschichten im BCR der Crispanten im Vergleich zu Wildtypembryonen. Da diese Gewebeverdickung bereits vor Beginn der Fn1-Fibrillenassemblierung auftrat, lässt sich der Effekt nicht allein durch eine gestörte RI während der Epibolie erklären. Frühere Arbeiten zeigten, dass eine Blockierung der Fn1-Matrix vor Stadium 9 nur geringe Effekte auf die frühe Phase der Epibolie hat, ihre Funktion jedoch für die späteren zellulären Umlagerungen während der Gastrulation essenziell ist (Marsden & DeSimone, 2001). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die beobachtete Zunahme der Zellschichten im BCR in *hmmr* CRNP 2 Embryonen möglicherweise auf eine gesteigerte Zellproliferation zurückzuführen ist. Eine immunhistochemische Färbung mit dem mitotischen Marker Phospho-Histon H3 (pH3) könnte hierüber Aufschluss geben.

Eine Verbindung zwischen HMMR und Zellproliferation wurde bereits im Kontext von Fibrosarkomzellen beschrieben: hier regulieren Interaktionen von HMMR mit

niedermolekularer Hyaluronsäure die Zellproliferation über den Wnt / Ctnnb1-Signalweg (Kouvidi et al., 2016). Zudem kann Ctnnb1 als Wnt-Signalvermittler die Expression des Adhäsionsmoleküls Fn1 direkt beeinflussen (Gradl et al., 1999). Somit erscheint es plausibel, dass eine Fehlregulation des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs zur abnormalen Gewebeverdickung des BCR in *hmmr* Crispanten beiträgt. Besonders eindrücklich zeigten die Zeitraffer-Aufnahmen der *hmmr* CRNP 2 Embryonen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-Embryonen, dass endodermale und mesodermale Zellen während der Gastrulation nicht wie erwartet involutierten, sondern daran scheiterten, ins Innere des Embryos zu wandern (Abb. 9). Eine gestörte Fn1-Matrix könnte ursächlich für diesen Defekt sein, da frühere Studien gezeigt haben, dass die Blockade der Fn1-Fibrillen die Migration mesodermaler Zellen hemmt und somit die Gastrulation verhindert (Darribère, 1990).

Auffällig ist, dass sich die Gastrulationsdefekte in den CRISPR / Cas9-Experimenten deutlich von den frühen Phänotypen der *hmmr*-Morphanten unterschieden (nicht gezeigt). Selbst Embryonen, die vierfach animal mit *hmmr* MO injiziert wurden, zeigten keine auffälligen Gastrulationsdefekte, sondern ausschließlich Defekte während des NRS (nicht gezeigt). Diese Diskrepanz könnte auf unterschiedliche Wirkmechanismen der beiden Ansätze zurückzuführen sein. MOs wirken frühzeitig auf maternale Transkripte und der Embryo könnte durch kompensatorische Mechanismen – etwa die Hochregulation alternativer *hmmr*-Isoformen (siehe Kapitel 3.1) – funktionelle Ausfälle zumindest teilweise ausgleichen. Der CRISPR / Cas9-vermittelte Knock-out hingegen zielte mit sgRNA 2 direkt auf Exon 5 und führte in 52 % der Allele zu Frameshift-Mutationen (Abb. 8). Studien zeigen, dass Frameshifts häufig zur Bildung trunkierter Proteine führen, insbesondere wenn alternative Translationsstarts genutzt oder editierte Exons übersprungen werden (Smits et al., 2019). Daraus lässt sich ableiten, dass die beobachteten Gastrulationsdefekte möglicherweise auf dominant-negative Effekte solcher trunkierter Proteinvarianten zurückzuführen sind.

In späteren Neurula- und Kaulquappenstadien zeigten sowohl der *hmmr* Knock-out als auch der MO-vermittelte Funktionsverlust vergleichbare NRDs (Abb. 9). Auffällig war jedoch, dass in St. 36 insbesondere in *hmmr* CRNP 1 Embryonen schwerwiegendere anteriore Defekte auftraten. Diese zeigten entweder stark reduzierte oder vollständig fehlende Augen sowie eine deutlich verkleinerte Klebdrüse. Die fehlerhafte Augenentwicklung könnte durch eine gestörte RI des OVs bedingt sein (Abb. 9).

Auffällig ist außerdem, dass diese Phänotypen mit einer Überaktivierung des Wnt-Signalwegs einhergehen: eine Behandlung von Embryonen mit Lithiumchlorid – einem bekannten Wnt-Agonisten – ab St. 10 führte zum vollständigen Verlust anteriorer Strukturen wie Augen und Klebdrüse (Fredieu et al., 1997). Neben den methodenabhängigen Unterschieden zwischen MO und CRISPR / Cas9 könnte auch die Entstehung einer trunktieren Variante von Hmmr durch das CRISPR / Cas9-System eine Rolle für die Diskrepanz der beobachteten Phänotypen spielen. Diese verkürzte Proteinform könnte den Wnt-Signalweg überaktivieren, was wiederum zu kleineren Köpfen führt.

Expressionsanalysen von *not*, *foxd1* und *otx2* zeigten, dass *hmmr* für die korrekte anteriore Musterbildung erforderlich ist (Abb. 10). Die *hmmr* CRNP 1 Embryonen phänokopierten, ähnlich wie die Morphanten (Prager et al., 2017), die fehlerhafte mediale Annäherung der *not*-exprimierenden Zellpopulationen und zeigten darüber hinaus eine gestörte Migration tiefer neuraler Zellschichten. Da die CRISPR-Zielsequenz in Exon 4 liegt, spricht vieles dafür, dass dieser Effekt auf eine Störung der MTBD 2 im N-Terminus zurückzuführen ist. Trotz der beobachteten Migrationsdefekte waren alle Expressionsdomänen der untersuchten anterioren Marker vorhanden. Das lässt darauf schließen, dass *hmmr* nicht für die Induktion, sondern für die korrekte räumliche Positionierung dieser anterioren Gene erforderlich ist. Die irreguläre Lokalisation der *not*-, *foxd1*- und *otx2*-Domänen deuten auf eine selektive Störung der anterioren Musterbildung, abhängig von einer Fehlregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs, hin.

Eine mögliche Ursache könnte eine veränderte Wnt-Aktivität entlang der AP-Achse sein (Kiecker & Niehrs, 2001), eventuell in Kombination mit gestörter Zellinterkalation und einer Fehlregulation des Wnt / PCP-Signalwegs (Ossipova, Chu, et al., 2015). Die gestörte anteriore Musterbildung legt nahe, dass die durch das CRISPR / Cas9-System potenziell entstandene Hmmr-Variante zu einer Hochregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs führt, obwohl dieser anterior für korrekte RI / MET-Prozesse herunterreguliert werden muss (Abb. 5). In der Folge kann Hmmr seine Funktion als molekularer Schalter zwischen dem kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg nicht mehr korrekt erfüllen um RI / MET-Prozesse zu steuern. Weitere Hinweise auf eine funktionelle Verknüpfung zwischen *hmmr* und der Wnt-Signalwegsaktivität werden in den Kapiteln 3.3 und 3.4 dargestellt.

Insgesamt stützen diese Ergebnisse die Annahme, dass insbesondere die MTBD 2 im N-Terminus von *hmmr* eine zentrale Rolle in der RI während der Epibolie, der Neurulation sowie der OV-Ausbildung spielt. Trotz gewisser methodenbedingter Unterschiede zwischen MO- und CRISPR / Cas9-Ansätzen konnte hier erstmals gezeigt werden, dass *hmmr* bereits während der Gastrulation – in Abhängigkeit eines intakten Fn1-Netzwerks – essenziell für koordinierte Zellbewegungen ist. Künftige Untersuchungen könnten klären, ob eine Überexpression von *hmmr* FL oder *hmmr* ΔN auch die *fn1*-Expression und Fn1-Proteinlokalisierung beeinflusst. Dies könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit die Stabilisierung der Fn1-Matrix von der MT-Bindung von *hmmr* abhängt.

Zusammengefasst weisen sämtliche Befunde darauf hin, dass *hmmr* als molekularer Schalter zwischen kanonischer und nicht-kanonischer Wnt-Signalwegsaktivierung agiert (Abb. 5). Funktionseinschränkungen durch trunkierte Hmmr-Varianten führen vermutlich zu einer übermäßigen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, wodurch die Initiierung von RI / MET-Prozessen gestört und in der Folge die korrekte anteriore Musterbildung beeinträchtigt wird.

3.3 Hmmr moduliert den Wnt-Signalweg zur Regulation der embryonalen Vorderhirnentwicklung

Jüngere Studien belegen eine funktionelle Rolle von HMMR in verschiedenen Tumorarten, darunter Lungen- (Li et al., 2020), Leber- (Zhang et al., 2020), Blasen- (D. Yang et al., 2021) und Magenkrebs (Kang et al., 2020). HMMR ist dabei sowohl an der Regulation von Proliferation und Metastasierung (D. Yang et al., 2021) als auch der Aufrechterhaltung der Stammzellfähigkeit (Tilghman et al., 2014) beteiligt. Zudem wird seine Überexpression mit einem verstärkten epithelial-mesenchymalen Übergang (*engl. epithelial-mesenchymal transition,* EMT) in Brustkrebszellen in Verbindung gebracht (Kolliopoulos et al., 2019).

Der EMT ist ein zentraler Vorgang der Embryonalentwicklung, bei dem Zellen ihre Zell-Zell-Adhäsion und Polarität verlieren und zugleich migratorische sowie invasive Eigenschaften erwerben (Thiery et al., 2009). HMMR ist nicht nur am EMT, sondern auch am umgekehrten Prozess, dem MET, in Krebszellen involviert (Jiang et al., 2010).

Frühere Studien zeigten, dass HMMR an Ctnnb1 bindet, es vor dem Abbau schützt und dessen nukleäre Translokation in Fibrosarkomzellen fördert (Kouvidi et al., 2016). Aufbauend darauf wurde später nachgewiesen, dass dieser Schutzmechanismus auf der Regulation der intrazellulären Verteilung des Ctnnb1-Abbaukomplexes durch HMMR beruht, und zwar in Abhängigkeit von niedermolekularer Hyaluronsäure (Berdiaki et al., 2023). Darüber hinaus zeigten TOP / FOP-Flash-Assays, dass ein Knockdown von *HMMR* die Aktivität des Wnt / Ctnnb1-Signalwegs reduzierte, während dessen Überexpression diesen deutlich verstärkte (D. Yang et al., 2021). Diese Befunde stützen die Annahme, dass *hmmr* als Modulator zwischen dem nicht-kanonischen Wnt / PCP-Signalweg und dem kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalweg fungiert und so die EMT-MET-Dynamik während der Embryogenese steuert.

Erste Untersuchungen in *Xenopus* zeigten, dass sowohl der Verlust als auch die Überexpression von *hmmr* die Anzahl *wnt3a*-induzierter DA erhöhten (Nickel, 2020) – ein Befund, der im Widerspruch zu Berichten aus humanen Tumormodellen steht, bei denen der Verlust von HMMR mit einer reduzierten Wnt / Ctnnb1-Aktivität einhergeht (D. Yang et al., 2021). Die hier vorliegende Studie trägt zur Klärung dieser Diskrepanz bei: während die Ko-Injektion von *wnt3a*-mRNA und *hmmr* MO zu deutlich weniger DA führte, bewirkte die Ko-Injektion von *wnt3a* mit *hmmr* FL eine Zunahme der Frequenz und Vollständigkeit der DA (Abb. 11) im Vergleich zu *wnt3a* allein. Diese Befunde stützen die Annahme, dass Hmmr die Wnt / Ctnnb1-Signalwegsaktivität fördert – in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Krebszellen. Die Unterschiede zu früheren *Xenopus*-Studien könnten auf unterschiedliche *wnt3a*-Dosierungen zurückzuführen sein, da niedrige Konzentrationen diesen Signalweg rasch aktivieren können – unabhängig von der Dvl-Phosphorylierung (Bryja et al., 2007).

Überraschenderweise zeigte der Funktionsverlust von *hmmr* keinen Einfluss auf die durch *ctnnb1*-mRNA induzierten DA (Abb. 11). Dies widerspricht der Annahme, dass Hmmr Ctnnb1 vor dem Abbau schützt (Kouvidi et al., 2016) und somit für eine stabile Wnt-Aktivierung notwendig ist. Möglicherweise wird dieser stabilisierende Effekt erst relevant, wenn das endogene Ctnnb1-Niveau unterhalb eines kritischen Schwellenwerts liegt – während die hier eingesetzte *ctnnb1*-mRNA zu einer deutlich höheren exogenen Ctnnb1-Konzentration führte. Alternativ könnten kompensatorische Mechanismen greifen, etwa durch andere Ctnnb1-stabilisierende Proteine, die in der Marginalzone vorliegen, aber nicht in der animalen Kappe. Die vorliegenden Daten

deuten somit darauf hin, dass Hmmr vorgeschaltet oder parallel von Ctnnb1 in die Signaltransduktion eingreift, seine Funktion jedoch dosis- oder kontextabhängig ist.

Frühere Studien zeigten, dass der Einfluss von *hmmr* auf die Stärke der Wnt-Signalwegsaktivierung von seiner MTBD abhängt (Nickel, 2020). Die hier präsentierten Daten bestätigen diese Beobachtung: die Überexpression von *hmmr* ΔN**,** dem Konstrukt ohne MT-bindenden N-Terminus, zeigte in Kombination mit *wnt3a* keine verstärkte DA-Induktion (Abb. 11). Unerwartet war hingegen, dass *hmmr* ΔC – im Gegensatz zu früheren Daten – in diesem Ansatz ebenfalls keine verstärkende Wirkung entfaltete. In der aktuellen Studie konnte ebenfalls nur die Überexpression eines volle Länge *hmmr*-Konstrukts die DA-Anzahl erhöhen. Dies legt nahe, dass nicht nur die MT-Bindung, sondern auch C-terminale Motive wie z.B. die bZip-Domäne für eine effektive Aktivierung des Wnt-Signalwegs erforderlich sind. Zusätzlich bestätigten weitere Analysen die Relevanz der MT-Bindung für die Entstehung von DA: hierbei lokalisierte Hmmr an den vegetalen MT von Zygoten – ein wichtiges Netzwerk zur Translokation dorsaler Determinanten, um eine Körperachse ausbilden zu können (pers. Mitteilung PD Dr. Kerstin Feistel, 2025).

Neben der im Krebskontext direkten Interaktion von Hmmr und Ctnnb1 im kanonischen Wnt-Signalweg (Kouvidi et al., 2016), zeigte die Interaktion zwischen *hmmr* und *ctnnb1 in vivo,* dass *hmmr* an der Aktivierung des direkten Wnt-Zielgens *en2* beteiligt ist – im Einklang mit früheren Ergebnissen (Deese, 2022). Während in Deese (2022) die reduzierte *en2*-Domäne im Funktionsverlust von *hmmr* durch *ctnnb1* nicht wiederhergestellt werden konnte, gelang dies in den hier gezeigten Ergebnissen (Abb. 12). Diese Diskrepanz könnte durch eine schwellenwertabhängige Wirkung der injizierten mRNA-Mengen verursacht werden – ähnlich wie zuvor bei der Diskrepanz in den *wnt3a*-vermittelten DA-Experimenten (Nickel, 2020).

Trotz der *ctnnb1*-vermittelten Wiederherstellung der *en2*-Expression zeigte die Analyse der *foxg1*-Expression, dass das anteriore Neuralrohr weiterhin verbreitert war (Abb. 12C). Dies bestätigte sich durch die Vermessung transversal geschnittener Neuralplatten: die Ko-Injektionen des *hmmr* MO und der *ctnnb1*-mRNA führte nicht zu einer Verschmälerung der Neuralplatte. Das deutet darauf hin, dass *ctnnb1* zwar die transkriptionelle Aktivität des Wnt-Zielgens *en2* wiederherstellen konnte, jedoch nicht die RI / MET-vermittelte Migration der neuralen Zellen während des NRS.

Bemerkenswert ist jedoch, dass trotz der verbreiterten Neuralplatte die AB-Zellpolarität neuraler Zellen durch die *ctnnb1*-Injektion wiederhergestellt wurde (Abb. 12I). Diese Beobachtung erinnerte an frühere Befunde, in denen die Ko-Injektion von *hmmr* MO und *hmmr* ΔN mRNA ebenfalls die Zellpolarität und das MT-Zytoskelett teilweise wiederherstellen konnte, obwohl die Neuralplatte verbreitert blieb (Prager et al., 2017). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei Ko-Injektionen von *vangl2* nach dem Verlust von *hmmr* beobachtet, bei der aber sowohl Zellpolarität als auch die Neuralplattenbreite wiederhergestellt wurden (Prager et al., 2017).

Diese Ergebnisse weisen auf eine potenzielle doppelte Rolle von Ctnnb1 hin – als transkriptioneller Ko-Aktivator und als struktureller Regulator der epithelialen Zellpolarität. Letztere Funktion erfolgt unter anderem über die Interaktion seiner Armadillo-Domänen mit klassischen Cadherinen, was zur Bildung von Adherens Junctions beiträgt (Baum & Georgiou, 2011). Die Wiederherstellung der Zellpolarität durch *ctnnb1* lässt vermuten, dass Ctnnb1 in Abwesenheit von Hmmr vermehrt an der Membran lokalisiert und dort mit Cadherinen interagiert, anstatt nukleär benötigt zu werden. Da jedoch die Wiederherstellung der Polarität nicht mit einer verbesserten Zellmigration einherging – vergleichbar mit den Effekten nach *hmmr* ΔN Ko-Injektion – legt dies nahe, dass Ctnnb1 nicht an der RI / MET-vermittelten Migration der neuralen Zellen beteiligt ist.

Weitere Studien untermauern die Annahme, dass die koordinierte Funktion von Hmmr und Ctnnb1 essenziell für MT-abhängige Zellmigration ist. So wurde berichtet, dass eine Desorganisation des MT-Netzwerks sowie dessen Wachstumshemmung mit einer erhöhten nukleären Akkumulation von Ctnnb1 und einer gesteigerten Expression *ctnnb1*-regulierter Zielgene einhergehen (Huang et al., 2007). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals in einem *in vivo*-Modell, dass Hmmr und Ctnnb1 nicht nur gemeinsam den kanonischen Wnt-Signalweg modulieren, sondern kooperativ für RI / MET während des NRS benötigt werden. Dabei trägt Ctnnb1 zunächst zur Musterbildung durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs bei und anschließend zum RI / MET, indem es Zellen dabei unterstützt korrekt zu polarisieren. Die darauffolgende Zellmigration, die durch RI / MET begünstigt wird, kann durch Ctnnb1 aber nicht gerettet werden und trägt somit nicht zur Dynamik von MT bei, die es für die korrekte Migration während des NRS braucht. Hierfür wird also zusätzlich Hmmr benötigt.

Sowohl Hmmr als auch exogen eingebrachtes Ctnnb1 ko-lokalisierten in den Zellkernen mesodermaler Zellen (Abb. 13). Die direkte Ko-Lokalisierung von Hmmr und Ctnnb1 wurde auch in Fibrosarkomzellen dokumentiert (Berdiaki et al., 2023). Ob diese Beobachtungen in *Xenopus* eine funktionelle Relevanz besitzen, ist bislang weitgehend ungeklärt.

Unerwartet war, dass in animalen Kappen-Assays die Ko-Injektion von *wnt3a* und *hmmr* FL nicht zu einer verstärkten, sondern zu einer reduzierten nukleären Ctnnb1-Anreicherung führte (Abb. 13). Obwohl Wnt3a typischerweise die nukleäre Transduktion von Ctnnb1 induzieren kann, reduzierten sich die Ctnnb1-Mengen in Kombination mit Hmmr FL – sowohl im Zellkern als auch in den membranständigen und zytoplasmatischen Pools. Dieser Befund steht im Kontrast zum Anstieg an DA unter denselben Injektionsbedingungen und deutet auf eine kontextabhängige Regulation hin. Der räumlich-zeitliche Unterschied zwischen animalen Kappen (Ektoderm) und den Geweben, in denen die Entstehung einer sekundären Achse induziert wird (Mesoderm), könnten erklären, warum eine reduzierte nukleäre Ctnnb1-Lokalisierung nicht zwangsläufig mit einer reduzierten Signalaktivität einhergeht. Möglicherweise steuert Hmmr nicht nur die Verfügbarkeit von Ctnnb1, sondern auch dessen subzelluläre Verteilung und Funktion.

Angesichts der hier gezeigten wechselseitigen Effekte ist davon auszugehen, dass Hmmr und Ctnnb1 nicht nur funktionell miteinander interagieren und auf diese Weise gemeinsam zur präzisen Regulation von transkriptioneller Aktivität, Zellpolarität und im Rahmen von MET-basierten Entwicklungsprozessen beizutragen. Künftige Studien sollten untersuchen, inwiefern diese Koordination konserviert ist und ob sich daraus neue Angriffspunkte für therapeutische Interventionen, insbesondere im onkologischen Kontext, ableiten lassen.

3.4 Hmmr und Dvl2: Mikrotubuli-abhängige Koordination im Wnt-Signalweg

Die beobachtete Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch *hmmr* impliziert eine potenzielle Rolle als MT-bindendes Protein innerhalb dieser Signalkaskade. Bereits bekannte Interaktionen zwischen Komponenten des Wnt-Signalwegs und dem

MT-Zytoskelett deuten auf eine regulierende Funktion dieses zellulären Netzwerks hin (Salinas, 2007). Vor diesem Hintergrund erscheint Dvl, als zentraler Mediator beider Signalzweige, ein möglicher Interaktionspartner für Hmmr bei der Modulation der Wnt-Signalwegsaktivierung zu sein.

Funktionelle Analysen im DLA legen nahe, dass Hmmr eine regulierende Rolle in der *dvl2*-vermittelten Wnt-Signaltransduktion einnimmt. Der Befund, dass der Verlust von *hmmr* die Signalaktivität reduziert, während seine Überexpression eine synergistische Verstärkung in Anwesenheit von Dvl2 bewirkt, spricht für eine Funktion entlang der Dvl2-vermittelten Signalweiterleitung. Dies deutet auf eine mögliche Wechselwirkung beider Proteine im Rahmen des Wnt-Signaltransduktion hin.

Dvl wird primär als Signalvermittler innerhalb des Wnt-Signalwegs betrachtet, zeigt aber darüber hinaus funktionelle Interaktionen mit stabilisierten Mikrotubuli – insbesondere über seine PDZ-Domäne. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Dvl-1 über die Inhibition von GSK3β zur Stabilisierung von MT beiträgt (Krylova et al., 2000). GSK3β selbst ist ein zentraler negativer Regulator des Wnt-Signalwegs und phosphoryliert zahlreiche MAPs, die die MT-Stabilität steuern (Hanger et al., 1992; Lucas et al., 1998; Mandelkow et al., 1992). Die Daten legen nahe, dass Dvl über die PDZ-Domäne in ein Netzwerk von Protein-Protein-Interaktionen eingebunden ist, das strukturelle und signalvermittelnde Funktionen am Zytoskelett integriert.

Hmmr ist bekannt dafür, polymerisierte MT zu bündeln (Groen et al., 2004) – eine Eigenschaft, die auch im Kontext des Wnt-Signalwegs funktionell relevant zu sein scheint. In neuroepithelialen Zellen zeigte sich überexprimiertes, GFP-markiertes Hmmr in tubulären Strukturen, die MT-ähnlich lokalisierten (Nickel, 2020), was durch den Vergleich mit α-Tubulin-Immunfärbungen gestützt wird (Prager et al., 2017). Funktionelle Analysen mit einem *hmmr*-Konstrukt, dem beide MTBD fehlen (*hmmr* ΔN), ergaben einen vollständigen Verlust der Wnt-Regulation, unabhängig von der Aktivierung durch *wnt3a, dvl2* oder *ctnnb1.* Dies weist darauf hin, dass die MT-Bindung für die Hmmr-vermittelte Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs essenziell ist. Zudem war nur das volle Länge *hmmr*-Konstrukt in der Lage, Dvl2 an MT-strukturähnliche Bündel zu rekrutieren (Abb. 16; Deese, 2025). Interessanterweise blieb trotz fehlender MT-Bündelung eine Ko-Lokalisation von Hmmr ΔN mit Dvl2 erhalten, ein Befund, der sowohl in der vorliegenden Arbeit (Abb. 16) als auch von

(Deese, 2025) beobachtet wurde. Dies weist auf eine zusätzliche Interaktionsdomäne außerhalb der MTBD hin. Ob die Interaktion zwischen Hmmr und Dvl2 direkt erfolgt oder durch zusätzliche zelluläre Faktoren vermittelt wird, bleibt offen. Weitere Beobachtungen zeigten jedoch, dass die Translokation von Dvl2 an den Zellkortex ausschließlich in Anwesenheit des vollen Länge Hmmr-Proteins erfolgt, nicht aber bei der Expression der ∆N-Variante (Deese, 2025). Dies legt nahe, dass die MTBD von Hmmr nicht nur für die Bündelung, sondern auch für die subzelluläre Umverteilung von Dvl2 funktionell notwendig sind.

Die vorliegenden Daten unterstreichen die Rolle von Hmmr als funktionelles MAP, das durch MT-Bündelung zur strukturellen Organisation des zytoskelettalen Netzwerks beiträgt – eine Voraussetzung für die korrekte Lokalisation für Wnt-Signalwegskomponenten. Interessanterweise ging die Überexpression von *hmmr* FL mit einer Reduktion der *wnt3a*-vermittelten Wnt-Aktivierung einher (Abb. 15), was mit einer verminderten nukleären Translokation von Ctnnb1 korrelierte (Abb. 13). Dies legt nahe, dass eine übermäßige MT-Bündelung durch Hmmr die zytoplasmatische Retention von Ctnnb1 begünstigen könnte. Ein vergleichbarer Mechanismus wurde in Tumorzellen beobachtet, wo MT-interagierende Substanzen zu einer Reduktion von Ctnnb1 und gleichzeitiger Hochregulation von Axin und APC sowie Reduktion von Dvl führten – begleitet von einer verminderten nukleären Lokalisation von Ctnnb1 (Kumari et al., 2021).

Der Funktionsverlust von *hmmr* reduzierte die Wnt-Signalwegsaktivität – unabhängig davon, ob die Aktivierung des Signalwegs durch *wnt3a, dvl2* oder *ctnnb1* vermittelt wurde (Abb. 15). Dieser Befund steht im Kontrast zu den Ergebnissen aus Abb. 11, in denen der Verlust von *hmmr* keinen Einfluss auf die *ctnnb1*-induzierte Ausbildung sekundärer Körperachsen hatte. Es ist denkbar, dass trotz des Funktionsverlusts eine ausreichende Menge an maternalem Hmmr vorhanden war, um diesen Effekt abzupuffern. Eine weitere mögliche Erklärung dafür ist, dass die durch *ctnnb1*-vermittelte Achseninduktion *in vivo* auch bei reduzierter Signalstärke erhalten bleibt, solange eine kritische Mindestmenge an Ctnnb1 verfügbar ist. Die Sensitivität der eingesetzten Assays könnte hier unterschiedliche Schwellenwerte abbilden.

Mapre1 (Su et al., 1995) ist ein weiteres MAP, das bevorzugt an die „Plus-Enden“ von Interphase-MT bindet und *in vitro* die Polymerisation von MT in Anwesenheit der C-terminalen Domäne von APC fördern kann (Berrueta et al., 1998; Mimori-Kiyosue et

al., 2000; Morrison et al., 1998). In neuroepithelialen Zellen wurde Mapre1 in direkter Nähe zur punktförmigen Lokalisierung von Hmmr detektiert (Prager et al., 2017), was auf eine mögliche funktionelle Interaktion hindeutet. Um zu prüfen, ob die Hmmr-Dvl2-vermittelte Modulation des Wnt-Signalwegs spezifisch ist oder durch ein funktionell verwandtes MAP wie Mapre1 ersetzt werden kann, wurde ein direkter Vergleich durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass lediglich die volle Länge von *hmmr* in der Lage war, den Wnt-Signalweg gemeinsam mit *dvl2* zu aktivieren, während *MAPRE1* keinen vergleichbaren Effekt zeigte. Dies spricht für eine spezifische, nicht durch andere MAPs substituierte Funktion von Hmmr in diesem Kontext.

Im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg kann Dvl die kleine GTPase Rac1 aktivieren und so nachgeschaltete Prozesse einleiten (siehe Kapitel 1.2.2). Interessanterweise wird eine überhöhte Rac1-Aktivität auch mit der nukleären Akkumulation von Ctnnb1 und einer gesteigerten TCF / LEF-abhängigen Transkription in Tumorzellen in Verbindung gebracht (Esufali & Bapat, 2004). Darüber hinaus wurde Rac1 auch als integraler Bestandteil der kanonischen Wnt-Signalwegsaktivierung im normalen zellulären Kontext identifiziert. Es wird angenommen, dass die Rac1-vermittelte Phosphorylierung von Ctnnb1 die Wnt-abhängige Genaktivierung unterstützt, indem diese die Assemblierung des Ctnnb1 / LEF1-Komplexes im Zellkern fördert (Jamieson et al., 2015; Wu et al., 2008). Hmmr wurde in Komplexen mit RACGAP1 (*engl. Rac GTPase-activating Protein 1)* nachgewiesen, das als Aktivator der Rac1-GTPase Funktion bekannt ist (Connell et al., 2017). Funktionelle Analysen im *Xenopus*-Modell zeigten, dass sowohl der Verlust von *hmmr* als auch die Überexpression von *dnRAC1* und *caRAC1* zu vergleichbaren Defekten während der Morphogenese der Neuralplatte führen (Nickel, 2020). Zudem war Rac1 im *hmmr* Funktionsverlust vermehrt an der Zellmembran lokalisiert – was auf eine gestörte subzelluläre Verteilung und potenziell reduzierte Aktivität schließen lässt (Nickel, 2020). Die Beobachtung in dieser Studie, dass *caRAC1* in *hmmr*-defizienten Zellen nicht in der Lage war, die Wnt-Signalaktivität im DLA zu steigern (Abb. 15) deutet darauf hin, dass Hmmr eine regulatorische Funktion in der Rac1-vermittelten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs übernimmt.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Befunde auf eine koordinierte Rolle von Hmmr und Dvl2 in der Regulation sowohl des kanonischen als auch des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs hin – jeweils in enger funktioneller Abhängigkeit vom

MT-Zytoskelett. Hmmr, Dvl2 und Rac1 zeigen in diesem Zusammenhang eine duale Funktion in beiden Wnt-Signalwegen, was auf ein hohes Maß an Interkonnektivität innerhalb der Wnt-Signalgebung schließen lässt. Diese Ergebnisse unterstützen nicht nur die Auflösung der klassischen Trennung zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen zugunsten eines dynamischen Netzwerks aus multiplen, kontextabhängigen Interaktionen. Sie deuten zudem darauf hin, dass der Wechsel zwischen beiden Signalwegen essenziell für die Steuerung von RI / MET-Prozessen ist.

3.5 Alternatives Spleißen von Hmmr als Mechanismus im Wnt-Signalweg

Alternatives Spleißen ist ein zentraler Mechanismus zu Erzeugung von Proteinvielfalt in Eukaryoten. Schätzungen zufolge weisen über 90 % der menschlichen Gene zwei oder mehr alternative mRNA-Varianten auf (Modrek et al., 2001). Zelluläre Signalwege können diesen Prozess direkt modulieren, wobei Fehlregulationen sowohl des alternativen Spleißens als auch der zugrundeliegenden Signalwege in nahezu allen Krebsarten beobachtet wurden (Blaustein et al., 2007; Heyd & Lynch, 2011; Lynch, 2007; Martin, 2003; Oltean & Bates, 2014). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass der Wnt-Signalweg direkt oder indirekt in die Regulation alternativer Spleißvorgänge eingreift – ein Mechanismus, der die Tumorentstehung begünstigen könnte (Gonçalves et al., 2008).

Unter mehreren Spleißvarianten, wurde eine HMMR-Spleißvariante von Exon 4, $HMMR^{-exon4}$, bei Myelompatient:innen sowie in verschiedenen Tumoren und Krebszelllinien beschrieben (Assmann et al., 1999; Crainie et al., 1999; Line et al., 2002). Auch in gesundem Gewebe ist diese Isoform nachweisbar, wobei das Verhältnis zwischen HMMR mit und ohne Exon 4 in tumorösem und angrenzendem Gewebe unterschiedlich ausfällt – etwas bei Kolonkarzinomen. Funktionell beeinträchtigt der Verlust von Exon 4 die Interaktion mit MT während der Interphase und steht gleichzeitig im Zusammenhang mit einer veränderten subzellulären Lokalisation – insbesondere einer Anreicherung im Zellkern (Assmann et al., 1999). Diese nukleäre Präsenz ist nicht ungewöhnlich, da auch andere MAPs wie Tau-Proteine oder Mip-90 im Zellkern lokalisiert sein können (González et al., 1998; Loomis

et al., 1990). Die funktionelle Bedeutung der verschiedenen HMMR-Isoformen beim Menschen ist jedoch bisher kaum erforscht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Deletion von Hmmr Exon 4 (Hmmr ΔE4) gezielt im entwicklungsspezifischen Kontext von *Xenopus* untersucht, um zu klären, ob alternatives Spleißen mit RI-spezifischen Prozessen während der Morphogenese verknüpft ist. Frühere Analysen hatten bereits gezeigt, dass die putative Variante Hmmr ΔE4 nicht im Zellkern neuroepithelialer Zellen lokalisiert vorkam (Sätzler, 2023; Wiest, 2022). Stattdessen führte sie zu einer starken MT-Bündelung, rundlich verformten Zellen und einer Desorganisation des Zytoskeletts – ein Phänotyp, der dem Funktionsverlust von *hmmr* ähnelt. Zudem war diese Isoform nicht in der Lage, den NRS im Verlust von *hmmr* funktionell zu retten (Sätzler, 2023; Wiest, 2022). Diese Ergebnisse unterstreichen die funktionelle Bedeutung von Exon 4 auch in *Xenopus*, insbesondere im Hinblick auf den korrekten RI / MET-vermittelten NRS. Allerdings lokalisierten weder eine humane Spleißvariante, der das vierte Exon fehlt (*hsHMMR* ΔE4), noch *Xenopus* Hmmr ΔE4 in den Zellkernen neuroepithelialer Zellen (Abb. 14). Daraus lässt sich ableiten, dass diese Variante – zumindest in diesem entwicklungsspezifischen Kontext – nicht auf eine nukleäre Funktion ausgerichtet ist.

Jedoch schließt die nukleäre Abwesenheit von Hmmr ΔE4 in der Neuralplatte zu diesem Zeitpunkt eine nukleäre Translokation zu anderen Zeitpunkten nicht aus. Tatsächlich wurde endogenes, nukleär lokalisiertes Hmmr in neuroepithelialen Zellen nachgewiesen (Prager et al., 2017), allerdings bleibt unklar, um welche Isoform es sich dabei handelt. Da Hmmr kein klassisches NES besitzt, ist ein indirekter Export über Interaktionspartner denkbar. Aufgrund seiner bekannten NES-Sequenz und funktionellen Interaktion mit Hmmr im Wnt-Signalweg erscheint Dvl ein möglicher Kandidat (K. Itoh et al., 2005; Torres et al., 1996).

Bemerkenswerterweise konnte Hmmr ΔE4 in den Zellkernen der Klebdrüse von *Xenopus*-Embryonen nachgewiesen werden (Abb. 14). Auch endogenes Hmmr war dort nukleär lokalisiert (nicht gezeigt), was erstmals auf eine möglicherweise spezifisch nukleär wirkende putative Isoform in dieser Region hinweist. Die Klebdrüse stellt die am weitesten anterior gelegene, neural geprägte Struktur dar (Michiue et al., 2007), und Dvl ist bekannt dafür, sowohl Marker der Klebdrüse als auch neuronale Marker in animalen Kappen zu induzieren – unabhängig vom Vorliegen mesodermaler Anteile (S. Y. Sokol et al., 1995). Vor dem Hintergrund, dass die volle Länge von Hmmr den

Wnt-Signalweg – insbesondere in Kombination mit Dvl2 – aktivieren kann, erscheint es denkbar, dass die Exon-4-defiziente putative Isoform gezielt in den Zellkern der Klebdrüse transloziert wird, um dort eine antagonistische Wirkung auszuüben. Eine nukleäre Lokalisierung könnte somit der feinregulierten Inhibition des Wnt-Signalwegs im anterioren Embryonalbereich dienen – ein notwendiger Schritt zur Ausbildung von Kopfstrukturen (Niehrs et al., 2001). Die potenzielle nukleäre Ko-Lokalisierung von Hmmr und Dvl2 würde dieses Modell zusätzlich stützen und auf eine bislang unbeachtete Rolle beider Proteine in der transkriptionellen Regulation hindeuten. In Übereinstimmung damit zeigte die DLA-Analyse eine deutlich verringerte Wnt-Aktivierung durch das *hmmr* ΔE4-Konstrukt in Anwesenheit von *dvl2*.

Dies wirft die Frage auf, ob ein spezifisches Sequenzmotiv innerhalb von Exon 4 für die Interaktion mit Dvl2 entscheidend ist – und ob bereits dezente Veränderungen einzelner Aminosäuren ausreichen könnten, um die Fähigkeit von Hmmr zur Modulation des Wnt-Signalwegs zu beeinflussen.

Auffällig ist ein konserviertes $K^{94}KQK^{97}$-Motiv innerhalb der MTBD2 von Hmmr, das im Zentrum von Exon 4 liegt. Ein vergleichbares basisches Motiv (KKQK) ist aus dem negativen Wnt-Regulator CK1α bekannt, wo es die Bindung an Axin über die Aminosäuren 228–231 vermittelt (Sobrado et al., 2005). Eine Substitution des dritten Lysinrests zu Alanin reduzierte dort signifikant die Affinität zu Axin. Daneben interagiert diese Region auch mit Tubulin und Aktin (Bustos et al., 2005). Es erscheint daher plausibel, dass Hmmr mit CK1α um die Bindung an Axin konkurrieren könnte. Eine gestörte Axin-Bindung durch Mutation des Lysins (KKQA), analog zur Situation bei CK1α, würde dann potenziell den Ctnnb1-Abbaukomplex destabilisieren und somit die Aktivierung des Wnt-Signalwegs begünstigen.

Aktuelle Studien in Fibrosarkomzellen liefern zusätzliche Hinweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen HMMR und Axin-2: niedermolekulare Hyaluronsäure (LMW-HA) reguliert die intrazelluläre Expression von HMMR, das als Gerüstprotein Ctnnb1 und Axin-2 in verschiedenen zellulären Kompartimenten bindet. Diese Interaktionen steigern die Ctnnb1-Expression und -Aktivität und fördern dadurch die transkriptionelle Wnt-Signaltransduktion sowie das Tumorwachstum (Berdiaki et al., 2023).

Weitere Wnt-Analysen im DLA zeigten keinen klaren Einfluss der KKQA-Mutation im Hmmr N-Terminus allein auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs (Abb. 17). Trotzdem führte dieser AS-Austausch bei der vollen Länge von *hmmr* im Vergleich zur vollen Länge mit KKQA-Mutation zu einer verminderten Wnt-Signalwegsaktivierung (Anhang 1). Auffällig war jedoch, dass die *dvl2*-abhängige Signalaktivierung durch das KKQK-Motiv im N-terminalen *hmmr*-Konstrukt stärkeren Schwankungen unterlag. Dies legt nahe, dass der N-Terminus von Hmmr notwendig ist, aber allein nicht ausreicht, um die *dvl2*-vermittelte Wnt-Aktivierung vollständig zu steuern – das KKQK-Motiv jedoch in die Feinregulation eingreift. Die Überexpression eines GFP-markierten N-terminalen *hmmr*-Konstrukts führte zudem zu einer gestörten Mikrotubuli-Organisation, obwohl beide MTBD vorhanden waren – ein Hinweis darauf, dass für die funktionelle Organisation des MT-Zytoskeletts zusätzliche Regionen außerhalb des N-Terminus erforderlich sind.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das alternative Spleißen von Exon 4 in Hmmr spezies- und gewebe-spezifische Funktionen während der Embryogenese übernimmt. Durch die nukleäre Lokalisation würde diese putative Isoform Prozesse wie Musterbildung, Zellschicksal und Proliferation beeinflussen können, während Isoformen, die an das MT-Zytoskelett binden, an RI / MET-Prozessen beteiligt sind. Dadurch könnte gezielt der Wechsel von kanonischer zu nicht-kanonischer Wnt-Signalwegsaktivierung reguliert werden.

3.6 Musterbildung neu betrachtet: Hmmr als Schnittstelle zwischen Zytoskelett und Wnt-Signalweg in der Morphogenese

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse beleuchten verschiedene Facetten der Rolle von Hmmr in der frühen embryonalen Entwicklung und Musterbildung. Zunächst konnte gezeigt werden, dass *zic2* als transkriptioneller Repressor von *hmmr* fungiert und beide Gene als Teil eines gemeinsamen Regulationsmechanismus zum NRS beitragen. Parallel dazu deuten die Befunde auf einen autoregulativen Mechanismus hin, der durch *hmmr* seine eigene Transkription sowie Isoform-Expression beeinflussen könnte.

Zudem belegen die Ergebnisse, dass Hmmr bereits früh für koordinierte Zellbewegungen essenziell ist – insbesondere im Rahmen der Epibolie und Neurulation. Diese Funktionen scheinen dabei maßgeblich von einem intakten Fn1-Netzwerk abhängig zu sein. Die N-terminale MTBD 2 von Hmmr spielt in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle und vermittelt offenbar eine strukturelle Kopplung zwischen dem MT-Zytoskelett und der extrazellulären Matrix. Diese Befunde legen nahe, dass Hmmr als MAP mit Fn1 kooperiert, um eine funktionelle Kopplung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix herzustellen – eine Voraussetzung für koordinierte Zellbewegungen, Gewebeorganisation und nachgeschaltete Musterbildungsprozesse.

Darüber hinaus weisen die Befunde erstmals auf eine funktionelle Interaktion *in vivo* zwischen Hmmr und Ctnnb1 hin, insbesondere im Hinblick auf Zellpolarität und Transkriptionsaktivität. Auch die enge Verknüpfung zwischen Hmmr mit Dvl2 unterstreicht die zentrale Position von Hmmr an der Schnittstelle von kanonischem und nicht-kanonischem Wnt-Signalweg – vermittelt über das MT-Zytoskelett als strukturelle Integrationsplattform. Nicht zuletzt wurde die Rolle des putativen alternativen Spleißens von Hmmr Exon 4 als potenziell spezies- und gewebeabhängiger Regulationsmechanismus identifiziert, der gezielt in die embryonale Signalgebung eingreifen kann. Doch wie lässt sich erklären, dass ein MAP wie Hmmr die Morphogenese des Embryos beeinflusst?

Die strukturelle Kopplung von Zytoskelett, Signalantwort und Zellverhalten wird besonders deutlich im Kontext der Wnt-Signalosomen, die nach Ligandenbindung von Fzd und Lrp6 gebildet werden (Bilic et al., 2007). Ihre Entstehung hängt von Dvl ab, das bei Aktivierung zur Membran transloziert, dort oligomerisiert und so stabile Signalplattformen ausbildet (Bilic et al., 2007; Casagolda et al., 2010; Ma et al., 2020; Wong et al., 2003; Zeng et al., 2008).

Mehrere Studien zeigten, dass dieser Prozess auf ein intaktes MT-Netzwerk angewiesen ist. MAPs wie MAP7/MAP7D1 und das Motorprotein KIF5B unterstützen die gerichtete Translokation von Dvl zur Membran (K. Kikuchi et al., 2018). Auch MAP1B, dessen MT-Affinität durch GSK3-abhängige Phosphorylierung reguliert wird, beeinflusst signalabhängige Strukturveränderungen neuronaler Zellen (Barnat et al., 2016; Bouquet et al., 2004; Goold et al., 1999). Bereits klassische Arbeiten zur Dorsalisierung in *Xenopu*s belegten die MT-abhängige Verlagerung von Dvl (Rowning

et al., 1997; Weaver et al., 2003), und auch für Hmmr konnte eine vergleichbare MT-Abhängigkeit zur Translokation von Dvl gezeigt werden (Deese, 2025). Dies unterstreicht die zentrale Rolle des MT-Zytoskeletts in der Positions-gesteuerten Wnt-Signalweiterleitung.

Diese Daten verdeutlichen insgesamt eine Wnt-abhängige Dynamik des MT-Zytoskeletts, einschließlich seiner Stabilität, räumlichen Organisation und intrazellulären Verteilung. Das Verständnis dieser Wechselwirkungen liefert zentrale Einblicke in die Regulation zellulären Verhaltens, die Gewebemorphogenese und mögliche pathologische Prozesse (K. Kikuchi & Arata, 2024).

Vor diesem Hintergrund lässt sich Hmmr im Modell (Abb. 19) als weiteres funktionelles MAP einordnen, das durch die Interaktion mit den MT-assoziierten Komponenten Axin, Ctnnb1 und vor allem Dvl2 den Wechsel von kanonischer zu nicht-kanonischer Wnt-Signalwegsaktivierung als molekularer Schalter begünstigt. Durch diese Modulation können RI / MET-vermittelte Prozesse, die am anterioren NRS und der Vorderhirnentwicklung beteiligt sind, reguliert werden. Letztlich liefern diese Einflüsse auf Zellmigration und Gewebeorganisation ein vertieftes Verständnis der Prinzipien embryonaler Morphogenese – mit möglicher Relevanz auch für pathophysiologische Prozesse wie Tumorinvasion, fehlerhafte Musterbildung oder gestörte Gewebehomöostase.

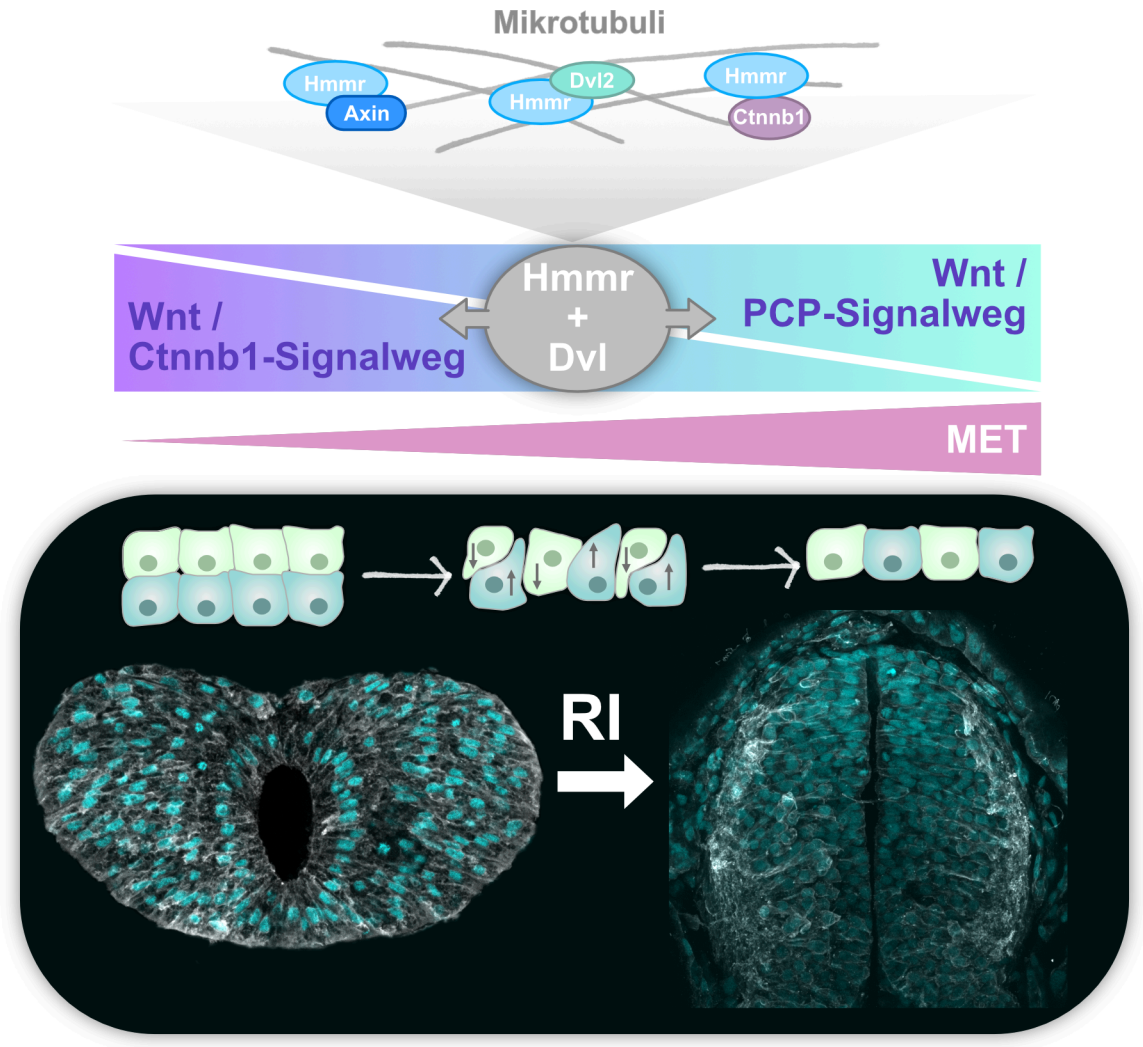


Abb. 19: Das MAP Hmmr als molekularer Schalter im Wnt-Signalweg zur Steuerung der Morphogenese des Vorderhirns

Durch Interaktion mit dem MT-Zytoskelett und der Interaktion mit MT-assoziierten Wnt-Komponenten wie Axin, Dvl und Ctnnb1 moduliert Hmmr den Wechsel zwischen kanonischer und nicht-kanonischer Wnt-Signalwegsaktivierung, vorzugsweise über Dvl. Dies steuert RI / MET-abhängige Prozesse während dem anterioren NRS.

4 Material und Methoden

4.1 Beitrag weiterer Projektbeteiligter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bestimmte experimentelle Teilaufgaben von weiteren Projektbeteiligten durchgeführt. Diese Arbeiten fanden im Kontext studentischer Abschlussarbeiten und erfolgten unter fachlicher Anleitung sowie in enger Abstimmung mit mir.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Daten in dieser Arbeit von mir generiert. Folgende beteiligte Personen haben zur Datengrundlage dieser Dissertation beigetragen:

Ann-Kathrin Burkhart:	Klonierung von *hmmr* FL und *hmmr* ∆N in den CS2+-GFP Vektor.
Emily Deese:	Erste *in-situ*-Hybridisierung-Analysen von *en2* im Funktionsverlust von *hmmr.*
PD Dr. Kerstin Feistel:	Planung, Aufbau und Betreuung dieser Studie.
Cathrin Hagenlocher:	Klonierung des *hmmr* FL-Konstrukts. Ihre Dissertation (2016) bildete erste Grundlagen für weitere Analysen.
Angela Nickel:	Ihre Publikation Prager et al., 2017 und Dissertation Nickel, 2020 dienten als Grundlage für die hier vorliegende Arbeit.
Tim Ott:	Klonierung der Deletionskonstrukte *hmmr* ∆N, *hmmr* ∆C und *hmmr* ∆N+C.
Clara Erna Conde de Moura Sätzler:	Immunfluoreszenzfärbung auf *hmmr* FL-GFP positive Zellen der Neuralplatte.
Benjamin Silas Joel Wiest:	Klonierung des *hmmr* Konstruktes mit Deletion des 4. Exons (*hmmr* ∆E4) in den CS2+ und CS2+-GFP Vektor.

Das Kapitel 4 Material und Methoden wurde anteilig aus (Wielath, 2016, 2019) übernommen und angepasst.

4.2 Materialien und deren Bezugsquellen

4.2.1 Chemikalien

Agar	AppliChem
Agarose LE	Genaxxon BioScience
Agarose Low Melt	Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	AppliChem
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumperoxodisulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Merck
Ampicillin	AppliChem
Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente	Roche
BM Purple	Roche
Boehringer-Blocking-Reagenz	Roche
CAS-Block	Life Technologies
CHAPS	AppliChem
Chloroform	Merck
Cystein	AppliChem
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Promega
Digoxigenin dNTP-Labeling Mix	Promega, Roche
Dithiothreitol (DTT)	Promega
DNase I	Thermo Scientific
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ethylenguanintetraessigsäure (EGTA)	Roth
Ethyl-p-Aminobenzoat (Benzocain)	Sigma
Ficoll 400	Sigma
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glutaraldehyd (25 %)	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	AppliChem
HCl (37 %)	Merck
Heparin	AppliChem
Hepes	AppliChem
Humanes Choriongonadotropin (HCG)	Sigma
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	AppliChem
Ladepuffer DNA Orange (6x)	AppliChem
Lambda-Phagen DNA	Promega
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Roth
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
MOPS	AppliChem
Mowiol® (4-88)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4H_2O$)	Roth
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	AppliChem
Oligonukleotide	MWG-Biotech AG
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Gibco
peqGREEN	Peqlab
Pfu-DNA Polymerase	Promega
Proteinase K	Roth
Restriktionsenzyme und Puffer	Promega
RNasin (RNase-Inhibitor)	Promega
Sp6-RNA-Polymerase	Promega
T7-RNA-Polymerase	Promega
Taq-DNA-Polymerase (GoTaq)	Promega
Torula-Hefe RNA	Sigma
Tris	AppliChem
Tris Base	Roth
Tween 20	Roth
Ziegenserum	Sigma

4.2.2 Laborutensilien

Deckgläschen	Roth
Einweg-Pasteur-Pipetten	Copan und Ratiolab
Einmal-Injektions-Kanülen, Sterican (Gr. 20)	B. Braun
Einmal-Spritzen, Omnifix-F (1 ml)	B. Braun

Glaskapillare	Hilgenberg
Glaswaren	Schott Duran
Multiwell-Platten	Greiner
Nitrocellulose Membran, Amersham™ Protran™ 0,2 µM NC	GE Healthcare Life Sciences
Objektträger	Diagonal, Roth
Petrischalen (Plastik)	Multimed
Pipetten	Gibco
Pipettenspitzen	Eppendorf / Sarstedt
Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Reaktionsgefäße	Eppendorf / Starstedt
Skalpelle	Bayha
Sterilfilter	Schleicher und Schuell
Whatman®-Filterpapier 150 x 150 mm	Schleicher & Schuell MicroScience GmbH

4.2.3 Geräte

ChemiDoc XRS+ Molekular Imager	Bio-Rad
Fluoreszenz-Stereomikroskop	Leica, MZ FLIII
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Axio Imager M1
Gelkammern	ThermoEC ClassicTM mit Consort
GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader	Promega
Kaltlichtquellen	Zeiss, KL1500LCD
Kameras	Zeiss, AxioCam HRc Zeiss, AxioCam HSm
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)	Zeiss, AxioObserver.Z mit Zeiss, LSM 700
Micropipette Puller	Sutter Instrument, P-87 Flaming/Brown
Mikroskop	Zeiss, Axioskop2 plus
Mikromanipulator (Injektor)	Harvard Apparatus Medical Systems, Research Products PLI-100 bzw. PLI-100A mit Zeiss, Stemi2000 und 2000C
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel (4-20%), 12-well	Bio-Rad

Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Photometer	Eppendorf, Bio Photometer
Stereomikroskop	Zeiss, SteREO Discovery.V12
Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie, peqSTAR
Transilluminator, TCP 20M	Vilber Lourmat
Vibratom	Leica, VT 1000

4.2.4 Verwendete Kits

Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System	Promega
EnGen® Mutation Detektion Kit	New England Biolabs
GeneJET Mikro-Kit für Gelextraktion und DNA-Aufreinigung	ThermoFisher Scientific
GeneJET RNA-Aufreinigungskit	ThermoFisher Scientific
innuPREP Gel Extraction Kit	Analytik Jena
MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit	ThermoFisher Scientific
MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit	ThermoFisher Scientific
mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transkription Kit	ThermoFisher Scientific
pGEM-T Easy Vector	Promega
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs

4.2.5 Antikörper und Fluoreszenzmarker

AlexaFluor® 488 goat anti-chicken IgG	ThermoFisher Scientific
AlexaFluor® 488 goat anti-mouse IgG1 (γ1)	ThermoFisher Scientific
AlexaFluor® 555 goat anti-mouse IgG1 (γ1)	ThermoFisher Scientific
AlexaFluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	ThermoFisher Scientific
AlexaFluor® 488 Phalloidin	ThermoFisher Scientific
Anti-Ctnnb1 (H-102, rabbit polyclonal IgG, 1:200)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-c-Myc (mouse monoclonal IgG1, 1:500)	Invitrogen Antibodies

Anti-Fn1 (4H2, mouse monoclonal IgG1, 1:40)	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-GFP (chicken IgY, 1:500)	ThermoFisher Scientific
Anti-Hmmr (rabbit polyclonal, 1:300)	Aaron Groen / Labor T. Mitchison
Anti-Tuba4a (DM1A, mouse IgG1, 1:500)	Sigma-Aldrich
Cascade Blue™ Dextran (MW 10.000)	ThermoFisher Scientific
Dextran, Alexa Fluor® 488 (MW 10.000)	ThermoFisher Scientific
Hoechst 33342	Molecular Probes

4.3 Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Alkalische Phophatase Puffer (AP1, pH 9,5)
100 mM Tris
0,1 M NaCl
5 mM $MgCl_2$

Antikörper-Blockierungslösung
1 % Boehringer Blocking Reagenz in MAB
0,1 % Tween 20

Blockierungslösung für Western Blot
5 % Milchpulver in 1x TBST

Blot-Puffer (1x, pH 8,3)
25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % EtOH reinst

BSA (0,1 %, 1 L)
1 g Albumine Serum in 1 L PBSw

Cystein-Lösung (pH 7,99)
2 % Cystein gelöst in H_2O dest.

Ficoll-Lösung
2 % Ficoll gelöst in 1x MBSH

Hybridisierungslösung (pH 7)
10 g/L Boehringer-Blocking-Reagenz
12,5 M Formamid
0,75 M NaCl
75 mM Natriumcitrat
1 mg/ml Torula-Hefe RNA
0,1 mg/ml Heparin
0,5 % Tween 20
0,1 % CHAPS
0,5 mM EDTA

Laemmli-Laufpuffer für Western Blot (10x, pH 8,3)
250 mM Tris
2,5 M Glycin
1 % SDS

LB-Medium (pH 7)
10 g/L Trypton
12,2 mM NaCl
5 g/L Hefeextrakt

Lysis-Puffer für Western Blot (10x, pH 8)
200 mM Tris-HCl
1,5 M NaCl
20 mM EDTA

Lysis-Puffer für Western Blot (1x, 1 mL)
100 µl 10x Lysis-Puffer
100 µl Protease Inhibitor (1 Tablette in 1 mL H2O dest.)
799 µl H2O dest.
1 µl IGEPAL® CA-630

Lysis-Puffer für CRISPR/Cas9-Embryonen
50 mM Tris (pH 8,8)
1 mM EDTA
0,5 % Tween 20

Maleinsäure-Puffer(MABw, pH 7,5)
100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
0,1 % Tween 20

MBSH (5x, 1 L)
25,7 g NaCl
0,375 g KCl
1 g $NaHCO_3$
1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,39 g $(CaNO_3)_2 \cdot 4H_2O$
0,3 g $CaCl/H_2O$
11,9 g HEPES
5 ml PenStrep

MBSH (1x, 0,1x) zum Waschen der Embryonen
5x MBSH mit H_2O dest. verdünnen

MBSH (0,1x) zur Kultivierung der Embryonen
5x MBSH mit H_2O dest. verdünnen
1 ml/L PenStrep

MEM (10x, pH 7,4)
1 M MOPS
20 mM EGTA
10 mM $MgSO_4$

MEMFA (1x, pH 7,4)
100 mM MOPS
2 mM EGTA
1 mM $MgSO_4$
3,7 % Formaldehyd

P1 (Resuspensions)-Puffer
50 mM Tris-HCl
10 mM EDTA (pH 8)
100 µg/ml RNAse A

P2 (Lysis)-Puffer
0,2 M NaOH
1 % (v/v) SDS

P3 (Neutralisations)-Puffer (pH 5,1)
3 M Kaliumacetat

PBS^- (10x, pH 7,4)
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
5 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4

PBSw
1x PBS^-
0,1 % Tween 20

PFA
4 % PFA in 1x PBS^- gelöst

SSC (20x, pH 7)
3 M NaCl
300 mM Natriumcitrat

TAE-Puffer (50x, pH 8,5)
2 M Tris
1 M Essigsäure
50 mM EDTA

TBST (1x, pH 7,4)
150 mM NaCl
50 mM Tris
0,05 % Tween 20

VIB-Mix
2,2 g Gelatine
450 ml 1x PBS^-
135 g BSA

4.4 Verwendete Organismen

Afrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis)*

Individuen aus:

- Guy Pluck, *Xenopus* express, Ancienne Ecole de Vernassal, Le Bourg 43270, Vernassal, Haute-Loire, Frankreich
- Nasco Export, 901 Janesville Ave. Fort Atkinson, WI 53538, Vereinigte Staaten von Amerika

Die adulten Frösche wurden artgerecht in einem 12-stündigen Tages/Nacht-Rhythmus gehalten. Genehmigt wurden Pflege, Handhabung und experimentelle Manipulationen von *X. laevis* Embryonen durch das Regierungspräsidium Stuttgart, Deutschland (Vorhaben V349/18 ZO, V340/17 ZO, A379/12 ZO und A365/10 ZO „Molekulare Embryologie“) gemäß der Deutschen Richtlinien und des Gesetzes (§6, Artikel 1, Satz 2, Nr. 4 des Tierschutzgesetzes).

Bakterienstamm XL1-blue (*Escherichia coli)*

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'proAB* $lacI^qZDM15$ *Tn10* (Tet^r)]

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

NEB (New England Biolabs) 5-alpha Competent *E. coli*

Genotyp: *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Bakterienstamm zur Transformation im Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB).

4.5 *In-vitro*-Fertilisation (IVF) und Ovulation von *X. laevis*

Als Modellorganismus wurde in dieser vorliegenden Dissertation der afrikanische Krallenfrosch *X. laevis* verwendet. Dabei stellt *X. laevis* ein ausgezeichnetes Modellsystem für Untersuchungen im Labor dar, da sich die Tiere leicht züchten und halten lassen (Dawid & Sargent, 1988). In den 1930er- und 1940er-Jahren wurde der Krallenfrosch hauptsächlich für physiologische Studien, unter anderem zur Schwangerschaftsdiagnostik, genutzt. Mittlerweile hat sich die Art aber längst als wichtiges Modellsystem in der Molekularbiologie etabliert (Cannatella & de Sá, 1993).

Um die *Xenopus* Weibchen gezielt zur Ovulation zu stimulieren, wurde ihnen subkutan etwa eine Woche vor der gewünschten Eiablage eine geringe Dosis (50 µl) des humanen Choriongonadotropin (HCG) Hormons injiziert und am vorigen Tag eine höhere Dosis von ca. 500 µl (je nach Größe des Individuums). Nach erfolgreicher Hormongabe und Eireifung in den Weibchen, konnten diese durch Massieren des Unterleibs zum Ablaichen angeregt werden.

Die anschließende *in vitro*-Fertilisation (IVF) der Eier erfolgte durch die Zugabe der Spermien aus den Hoden der *Xenopus* Männchen. Die entnommenen Hoden wurden dafür in 1x MBSH bei 4°C ca. 1-2 Wochen aufbewahrt, um die Spermien durch die erhöhte Salzkonzentration im Puffer immotil zu halten. Zur gewünschten Befruchtung der Oozyten wurde ein kleines Stück (1-2 mm^3) des Hodens abgetrennt und in 1 ml 1x MBSH mazeriert. Die Spermien-Lösung wurde dann auf die Oozyten geträufelt und mit ihnen bei Raumtemperatur (RT) vermischt. Um die Motilität der Spermien wieder zu aktivieren und eine synchrone Befruchtung zu garantieren, wurden die Eier mit einer 0,1x MBSH-Lösung übergossen. Etwa 40 min später wurden die befruchteten Eizellen mit einer 2 %-igen Cystein-Lösung für 7 min inkubiert, um die Eier von der klebrigen Gallerthülle zu befreien und dadurch zu vereinzeln. Abschließend wurden die Eier mehrmals (mindestens 3-Mal) mit der 0,1x MBSH-Lösung gewaschen, um diese wieder von der Cystein-Lösung zu befreien. Für darauffolgende Experimente wurden die vereinzelten Eier in eine 1x MBSH-Lösung überführt und entweder bei RT oder bei ca. 14 °C bis zum gewünschten Injektionsstadium gelagert.

4.6 Klonierung des *hmmr* N-Terminus in den pGEM®-T Easy Vektor

4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction,* PCR)

Durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR), welche zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente dient, wurden die gewünschten Inserts, hier ein Teil des N-Terminus (AS 1-102) von *hmmr,* in den pGEM®-T Easy Vektor eingebracht und mittels Transformation in Bakterien amplifiziert.

PCR-Ansatz für die Herstellung einer *hmmr* N-terminalen Antisinn-Sonde in den pGEM®-T Easy Vektor:

20 µl	Puffer
10 µl	dNTPs (2 mM)
4 µl	„forward“ Primer (10 µM)
4 µl	„reverse“ Primer (10 µM)
0,8 µl	Taq-DNA-Polymerase
3 µl	*hmmr* Plasmid DNA (~5 ng)

mit H_2O auf 100 µl aufgefüllt.

Verwendete Primer:

„forward“ Primer (FP): **hmmrFLfor**: 5‘ ATGTCATTTCCCAAGGCTCC 3‘

„reverse“ Primer (RP): **Exon4_rev**: 5‘ CTCTTTTTCCAATGACTTCTGCTTC 3‘

Die PCR wurde mittels eines PCR-Thermocyclers (peqSTAR) durchgeführt. Dabei variierte die Hybridisierungstemperatur der Primer je nach deren Schmelztemperaturen (Tm).

Standard-Protokoll:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	98 °C	5-10 Sek.	40 Zyklen
Primer Hybridisierung	55 °C	10-30 Sek.	
Elongation	72 °C	30 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Halten	4-10 °C	für immer	

4.6.2 Gelelektrophorese

Um die erfolgreiche Amplifikation der DNA zu überprüfen, wurden 2 µl der DNA, zusammen mit dem Ladepuffer 6x Orange DNA Loading Dye auf ein 1-2 %-iges Agarosegel (gelöste Agarose in 1x TAE-Puffer und 2 µl peqGREEN pro 100 ml) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer, gefüllt mit 1x TAE-Puffer, bei 120 Volt. Zur Überprüfung wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm detektiert.

4.6.3 Ligation

Für die Ligation wurden die Komponenten des pGEM®-T Easy Vector Systems zusammen mit dem *hmmr* Amplifikat verwendet.

Ligationsansatz:

2,5 µl	Rapid Ligation Buffer
0,5 µl	pGEM®-T Easy Vector (50 ng)
1 µl	DNA-Insert
0,5 µl	T4 DNA Ligase

mit H_2O auf 5 µl aufgefüllt und für 1-2 Nächte bei 4 °C ligiert.

4.6.4 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* (*E. coli*)

Mithilfe der Transformation kann die in einen Vektor (hier pGEM®-T Easy Vector) ligierte DNA in kompetente Bakterien eingebracht werden. Hierfür wurden 100 µl dieser kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut (Lagerung bei -80 °C) und unverzüglich die 5 µl des Ligationsansatzes dazu gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die Bakterien-Ligationsmischung für 90 Sek. bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen, damit die Bakterienmembran für die DNA-Aufnahme zugänglich gemacht wird. Anschließend kam der Ansatz für weitere 2 min auf Eis und wurde danach mit 400 µl SOC-Medium bei 37 °C für ca. 1,5 h im Thermocycler geschüttelt und inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension auf Selektionsplatten (LB-Medium, 15 g/L Agar, 0,5 mM IPTG, 80 µg/ml X-Gal, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über

Nacht bei 37 °C vermehrt. Dadurch konnten gezielt die Bakterien kultiviert werden, welche das gewünscht Plasmid aufgenommen hatten.

4.6.5 DNA-Extraktion aus Bakterien („Mini-Präp“)

Um einzelne Bakterienkolonien zu vermehren, wurden nur die weißen Kolonien (mit aufgenommenem Plasmid) mit Hilfe von Pipettenspitzen „gepickt“ und in ein Kulturröhrchen mit 3 mL LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden nach ausgiebigem Schütteln auf einem Vortexer ca. 1,5 ml der jeweiligen Bakterienkultur in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Pellet in 100 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl des P2-Puffers hinzugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig invertiert und für 5 min bei RT ruhen gelassen, damit die Zellen lysiert werden können. Zur Neutralisation wurden 150 µl des P3-Puffers hinzugegeben, erneut invertiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Nacht mit 1 ml Ethanol bei -20 °C gefällt. Anschließend wurden die Ansätze nochmals für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets getrocknet und ausgedampft und schließlich in 50 µl H_2Odd gelöst. Die DNA-Extrakte wurden dann bei -20 °C gelagert.

Durch einen Test-Verdau (hier EcoRI) oder DNA-Sequenzierung kann daraufhin überprüft werden, ob die DNA-Extrakte die gewünschte Ziel-Sequenz enthalten.

4.6.6 Test-Verdau

0,2 µl	BSA
2 µl	Restriktionsenzym-Puffer (10x)
1 µl	Restriktionsenzym (EcoRI)
5 µl	Plasmid-DNA aus Mini-Präp

mit H_2O auf 10 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C verdaut. Nach Zugabe von 1 µl Ladepuffer wurde die DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und konnte auf erfolgreiche DNA-Insertion überprüft werden.

4.6.7 Gewinnung größerer DNA-Mengen („Midi-Präp“)

Für die Midi-Präparation wurden 100 ml LB-Medium mit dem positiven Klon der Bakteriensuspension angeimpft, über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert, um darauffolgend die DNA mittels des PureYield^{TM} Midiprep Kits (Promega) zu isolieren. Die kultivierten Bakterien wurden am nächsten Tag in entsprechende Gefäße überführt und für 10 min bei 4000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 3 ml Resuspensions-Lösung gelöst, anschließend 3 ml einer Zell-Lysis-Lösung hinzugegeben, vermischt und für 3 min bei RT inkubiert. Zum Neutralisieren wurden 5 ml einer Neutralisations-Lösung hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 2-3 min Inkubation wurden die Ansätze für 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert.

Um die Vektor-DNA aufzureinigen, wurden anschließend Säulen, die an ein Vakuum angelegt sind, verwendet. Hierfür wurde eine Säuleneinheit, bestehend aus einer blauen „Clearing Column“ oben und einer weißen „Binding Column“ unten, aufgebaut und auf einen Vakuum-Verteiler gesteckt. Die von der „Binding Column“ aufgenommene DNA wurde sowohl mit 5 ml „Endotoxin Removal Wash“ als auch danach mit 20 ml „Column Wash Solution“ gereinigt und abschließend in 400 µl vorgewärmtes H_2Odd aufgenommen.

Auch hier kann ein Test-Verdau und eine anschließende DNA-Sequenzierung Aufschluss darüber geben, ob die Extrakte die gewünschte DNA-Sequenz enthalten.

4.7 Klonierung des *hmmr* N-Terminus in den CS2$^+$ und CS2$^+$-GFP Vektor

Zur Analyse des *hmmr* N-Terminus (AS 1-130) wurde dieses DNA-Teilstück sowohl in einen CS2$^+$-Vektor für Überexpressions-Experimente, als auch in einen GFP-getaggten CS2$^+$-Vektor kloniert, um die Lokalisierung dieses Konstruktes untersuchen zu können.

PCR-Ansatz für die Herstellung des *hmmr* N-Terminus in den CS2$^+$/CS2$^+$-GFP Vektor:

20 µl	Puffer
10 µl	dNTPs (2 mM)
4 µl	FP (10 µM)
4 µl	RP (10 µM; je Ansatz mit und ohne „TAG“)
0,8 µl	Taq-DNA-Polymerase
3 µl	*hmmr* Plasmid DNA (~5 ng)

mit H_2O auf 100 µl aufgefüllt.

Verwendete Primer:

„forward“ Primer (FP):

XhoI_Xla.hmmr_for: 5‘ GCGATCTCGAGATGTCATTTCCC 3‘

„reverse“ Primer (RP) für CS2$^+$:

Xla.hmmr.L-TAG-XhoI_rev:

5‘ GCGATCTCGAGCTATTTTACTTCTGTCTTTTTAAACTCCTCCTCT 3‘

„reverse“ Primer (RP) für CS2$^+$-GFP:

Xla.hmmr.L-XhoI_rev:

5‘ GCGATCTCGAGTTTTACTTCTGTCTTTTTAAACTCCTCCTCT 3‘

Die PCR wurde mittels eines PCR-Thermocyclers (peqSTAR) durchgeführt. Dabei variierte die Hybridisierungstemperatur der Primer je nach deren Schmelztemperaturen (Tm).

Standard-Protokoll:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	98 °C	5-10 Sek.	40 Zyklen
Primer Hybridisierung	55 °C	10-30 Sek.	
Elongation	72 °C	30 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Halten	4-10 °C	für immer	

Anschließend wurden die PCR-Produkte über Gelelektrophorese (siehe 4.6.2) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem innuPREP DOUBLE pure Kit (Analytik

Jena) lysiert und entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 20 µl Eluierungspuffer (2x 10 µl nacheinander) gelöst.

4.7.1 Linearisierung / Restriktionsverdau von Vektor und DNA-Insert

Um den $CS2^+$ bzw. $CS2^+$-GFP Vektor für die Ziel-DNA, hier der N-Terminus von *hmmr*, aufnahmefähig zu machen, wurden die Vektoren sowie die PCR-Produkte im Zuge eines Restriktionsverdaus mit XhoI geschnitten. Dadurch entstanden komplementäre Enden an der Vektor- und PCR-DNA, welche durch Ligation kovalent miteinander verbunden werden sollen.

Restriktionsverdau:

10 µg	Vektor/PCR Produkt
0,5 µl	BSA
1,5 µl	XhoI Enzym
5 µl	Restriktionsenzym-Puffer (10x)

mit H_2O auf 50 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.7.2 Aufreinigung / Fällung der linearisierten Ansätze

Um die Restriktionsverdau-Ansätze aufzureinigen, wurde jeweils 5 µl 5 M Ammoniumacetat und 110 µl Ethanol (100 %ig) hinzugegeben und für mindestens 15 min bei -20 °C inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation für 20 min bei 14 000 rpm und 4 °C wurde die ausgefallene DNA pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands und Trocknen des Pellets wurde dieses in 20 µl H_2O resuspendiert, die Konzentration gemessen und weiterverarbeitet bzw. bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

4.7.3 Dephosphorylierung der Vektoren

Durch die Dephosphorylierung des Vektors soll verhindert werden, dass er während des anschließenden Ligationsschritts in sich selbst zurückligiert, indem die 5‘-Phosphatgruppen entfernt werden, die von der DNA-Ligase benötigt werden, um das Phosphodiester-DNA-Grundgerüst miteinander zu verbinden.

Dephosphorylierungs-Ansatz:

1 µg	linearisierter Vektor
1 µl	FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase
2 µl	Reaktionspuffer

mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt, gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert und um die Reaktion zu stoppen, wurden die Ansätze anschließend für 5 min bei 75 °C erhitzt.

Im darauffolgenden Schritt wurden die PCR-Produkte mit den jeweiligen Vektoren über Nacht bei 4 °C ligiert (siehe 4.6.3), transformiert (siehe 4.6.4), aus den Bakterien extrahiert (siehe 4.6.5) und im weiteren Schritt mittels Sanger-Sequenzierung auf den Klon mit gewünschter Ziel-DNA überprüft.

4.8 Klonierung des humanen *hsHMMR* ∆Exon 4-Konstruktes (mit N-terminalem GFP-Tag)

Zur Deletion des Exon 4 aus dem humanen *HMMR*-Konstrukt wurde das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) entsprechend dem Herstellerprotokoll (E0554) verwendet.

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (2x)
1,25 µl	FP (10 µM)
1,25 µl	RP (10 µM)
1 µl	pCS2$^+$CTT_eGFP-hsHMMR (1-25 ng/µl)

mit H_2O auf 25 µl aufgefüllt.

Verwendete Primer:

Q5_hsHMMR_dex4_FP: 5‘ ATTCGTGTTCTTCTACAG 3‘

Q5_hsHMMR_dex4_RP: 5‘ CTTTGATTCCGAAGACTTAAC 3‘

Die PCR wurde mittels eines PCR-Thermocyclers (peqSTAR) durchgeführt. Dabei wurde die optimale Annealing-Temperatur der Primer mithilfe der NEB primer design software, NEBaseChanger™, festgelegt.

Standard-Protokoll:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	98 °C	10 Sek.	25 Zyklen
Primer Hybridisierung	56 °C	30 Sek.	
Elongation	72 °C	3 min 45 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Halten	4-10 °C	für immer	

Nach der PCR folgte die Behandlung mit einer Kinase, Ligase und DpnI (KLD) mit folgendem Ansatz, welchen für 5 min bei RT inkubiert wurde:

1 µl	PCR-Produkt
5 µl	KLD Reaktions-Puffer (2x)
1 µl	KLD Enzym Mix (10x)

mit H_2O auf 10 µl aufgefüllt.

Für die Transformation wurden NEB 5-alpha kompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit 5 µl der KLD-Mixtur vermischt. Der Ansatz wurde auf Eis für 30 min inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sek. unterzogen. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 950 µl SOC-Medium (RT) zum Ansatz dazugegeben und bei 37 °C für 60 min unter leichtem Schütteln inkubiert (250 rpm). Anschließend wurden 50-100 µl der Bakterien-Mixturen auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Die Extraktion der gewünschten DNA aus den Bakterien erfolgte mittels Mini- (siehe 4.6.5) und Midi-Präp (4.6.7).

4.9 Klonierung des *hmmr* N-term K97A-Konstruktes

Zum Aminosäuren-Austausch von Lysin (K) 97 zu Alanin (A) im *hmmr* N-Terminus KKQK-Motiv wurde das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) entsprechend dem Herstellerprotokoll (E0554) verwendet.

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (2x)
1,25 µl	FP (10 µM)
1,25 µl	RP (10 µM)
1 µl	*hmmr* N-term in pCS2$^+$ (1-25 ng/µl)

mit H_2O auf 25 µl aufgefüllt.

Verwendete Primer:

Q5_KKQA_Hmmr_FP: 5‘ GAAGAAGCAGGCGTCATTGGAAAAAG 3‘

Q5_KKQA_Hmmr_RP: 5‘ ATCTCTTTGACAAAATCTGC 3‘

Die PCR wurde mittels eines PCR-Thermocyclers (peqSTAR) durchgeführt. Dabei wurde die optimale Annealing-Temperatur der Primer mithilfe der NEB primer design software, NEBaseChanger™, festgelegt.

Standard-Protokoll:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	98 °C	10 Sek.	25 Zyklen
Primer Hybridisierung	57 °C	20 Sek.	
Elongation	72 °C	2 min 40 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Halten	4-10 °C	für immer	

Das weitere Vorgehen, wie KLD-Behandlung, Transformation und DNA-Extraktion aus den NEB 5-alpha kompetenten *E. coli* erfolgte, wie im Kapitel zuvor beschrieben (siehe 4.8).

4.10 Herstellung von Messenger RNA (mRNA)

4.10.1 Linearisierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Um sicher zu stellen, dass die RNA später nur aus der gewünschten Ziel-Sequenz besteht, wurden die jeweiligen DNA-Plasmide vorab entsprechend linearisiert.

Linearisierungs-Ansatz:

10 µg	Plasmid-DNA
5 µl	Restriktionsenzym-Puffer (10x)
0,5 µl	BSA
1,5 µl	Enzym (meistens NotI)

mit H_2O auf 50 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend aufgereinigt (siehe 4.7.2).

4.10.2 *In-vitro*-Transkription

Zur Herstellung von mRNA wurde das mMessage mMachine™ Kit (SP6; Thermo Fisher Scientific) verwendet. Anschließend wurde die mRNA mithilfe des GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Scientific) aufgereinigt.

In vitro-Transkriptionsansatz:

10 µl	NTP/CAP (2x)
2 µl	Reaktionspuffer (10x)
2 µl	Linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	Enzym-Mix

mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt, 2 h bei 37 °C inkubiert und danach durch die Zugabe von 1 µl DNase für 15 min bei 37 °C die Template-DNA entfernt.

4.10.3 Aufreinigung der synthetisierten mRNA

Um die mRNA aufzureinigen wurden 179 µl H2O, 100 µl Binding Buffer und 300 µl Ethanol (100 %ig) hinzugegeben und durchgemischt. Die Mixtur wurde anschließend in eine Purification Micro Column, welche auf einer Collection Tube platziert wurde, draufgegeben und für 60 Sek. bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Purification Micro Column mit 700 µl Wash Buffer 1 für nochmals 60

Sek. zentrifugiert. Dieser Waschschritt folgte noch zwei weitere Male mit 700 µl des Wash Buffer 2. Ein anschließender Zentrifugationsschritt entfernte alle Wash Buffer Überreste. Die Purification Micro Column wurde auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt und zwei Mal mit je 10 µl H_2O für 60 Sek. bei 14000 rpm zentrifugiert, um die RNA auf dem Filter der Column zu eluieren. Zum Schluss wurde die mRNA aliquotiert (1 µl) und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

4.10.4 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren zu messen, wurde ein Eppendorf Biophotometer D30 verwendet. Hierfür wurde die Absorption der Probe von Licht der Wellenlänge 260 und 280 nm detektiert. Somit konnte neben der Konzentration auch die Reinheit der Probe bestimmt werden. Bei gemessener Doppelstrang-DNA beträgt der optimale Wert 2,0 und RNA 1,8.

4.11 *In-vivo*-Mikroinjektionen

Zur Manipulation von Zielgenen mittels mRNAs oder MOs wurden sehr feine Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 5-10 µm verwendet, die im 1-4 Zellstadium in *X. laevis* Embryonen zur Injektion genutzt wurden. MOs sind Antisinn-Oligomere bestehend aus ca. 25 Nukleotiden. Sie wirken als Analoga, die an kurze Nukleotidsequenzen an der Transkriptionsstartstelle oder an Spleißstellen binden und so die Translation der Ziel-mRNA blockieren.

Zur Injektion wurden die Embryonen in eine osmotisch inaktive 2 %-ige Ficoll-Lösung überführt. Je nach Versuchsansatz wurde eine 4 nl-Lösung in die Embryonen injiziert. Um die gezielte Injektion in ein spezielles Gewebe zu überprüfen, diente die Fluoreszenz von Zellschicksalsmarkern (*engl. lineage tracer,* LT), wie z.B. Cascade Blue oder GFP. Vor dem Einsetzen der Gastrulation wurden die Embryonen wieder in eine 0,1x MBSH-Lösung mit Penicillin und Streptomycin überführt und bis zur Auswertung kultiviert.

Tabelle 1: Verwendete Morpholino, mRNA und Plasmid-DNA Konzentrationen

Morpholino Oligonukleotide	
Name	**Konzentration**
hmmr MO (xRHAMM_UTR)	1 pmol (0,3 pmol für niedrige Dosis)
zic2 MO (bestehend aus *zic2*-1 und *zic2*-2 MO)	1 pmol (0,3 pmol für niedrige Dosis) (je 0,5 pmol *zic2*-1 und 0,5 pmol *zic2*-2)
mRNA	
hmmr FL	25 ng/µl (100 pg)
hmmr ΔN	20 – 40 ng/µl (80 – 160 pg)
hmmr ΔN+C	75 ng/µl (300 pg)
hmmr ΔC	25 ng/µl (100 pg)
hmmr N-term	5 ng/µl (20 pg)
hmmr N-term K97A	5 ng/µl (20 pg)
hmmr N-term GFP	100 ng/µl (400 pg)
hmmr ΔE4	50 ng/µl (200 pg)
hmmr ΔE4 GFP	50 ng/µl (200 pg)
GFP *hsHMMR*	30 ng/µl (120 pg)
GFP *hsHMMR* ΔE4	30 ng/µl (120 pg)
ca*RAC1*	4 ng/µl (16 pg)
dn*RAC1*	4 ng/µl (16 pg)
ctnnb1 GFP	15 ng/µl (60 pg)
wnt3a	0,04 – 0,08 ng/µl (0,16 – 0,32 pg)
Myc-*dvl2*	80 ng/µl (320 pg)
h2b GFP	50 ng/µl (200 pg)
hsMAPRE1	25 ng/µl (100 pg)
Plasmid-DNA	
BAR Reporter	10 ng/µl (40 pg)
Renilla (Rn) Reporter	2 ng/µl (8 pg)

4.12 Knockdown-Experimente durch Morpholino Oligonukleotide

Die pulverförmigen MO wurden in H_2O bei 60 °C entsprechend der Herstellerangabe auf eine Stamm-Konzentration von 1 mM gelöst und bei RT aufbewahrt. Für den Funktionsverlust von *hmmr* war nur ein MO nötig, da in *X. laevis* nur eine Kopie des Gens auf dem L-Alloallel vorliegt, wohingegen der Funktionsverlust von *zic2* durch zwei MO gegen die Kopien auf dem L- und S-Alloallel verwendet wurden.

Morpholino Oligonukleotid-Sequenzen:

xRHAMM_UTR	5‘ GCTGGAGCCCGCGATGCTTTCTTTC 3‘
zic2-1 MO	5‘ GACCAGCGTCTAGTAGCATGTCCGT 3‘
zic2-2 MO	5‘ ACTGAGTGTCAGTGGCGAGACTCTG 3‘

4.13 *hmmr* Knockout-Experimente durch CRISPR/Cas9

Der *hmmr* Knockout durch CRISPR/Cas9 erfolgte durch animale, zentrale Injektionen in einzellige Embryonen (ca. 20 min nach Befruchtung). Dabei wurden 8 nl der jeweiligen Lösung injiziert. Beide sgRNAs gegen *hmmr* wurden mit einer Menge von 300 pg RNA und 1 pg Cas9 Protein injiziert.

4.13.1 Herstellung der beiden *hmmr* sgRNAs

Zunächst wurden die designten Primer in RNase/DNase freiem Wasser für 30 min bei 55 °C im Thermoblock gelöst. Anschließend wurde die sgRNA-Template Synthese bzw. Oligonukleotid Extension angesetzt.

Sequenzen der beiden *hmmr* FP und des RP:

hmmr.L sgRNA 1 FP:
5‘ GCAGCTAATACGACTCACTATA**Gg**AGAAGTCATTGGAAAAAGGTTTTAGAGC TAGAAATAGCAAG 3‘

hmmr.L sgRNA 2 FP:
5‘ GCAGCTAATACGACTCACTATA**Gg**AGCTGCAGGCTTTAGAGGGTTTTAGAGC TAGAAATAGCAAG 3‘

RP: 5‘ AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA CGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC 3‘

Zusätzliche Basen, um die Transkription zu optimieren (Nakayama et al., 2014)

T7 Promotor (benötigt zwei G‘s (**Gg**) für effiziente Transkription)

Zielsequenz ohne PAM

Backbone

sgRNA-Template-Synthese (Oligonukleotid Extension) Ansatz:

10 µl	Puffer (10x)
2 µl	dNTPs (40 mM)
1 µl	FP (100 µM; je Ansatz)
1 µl	RP (100 µM)
1 µl	Pfu-Polymerase

mit H_2O auf 100 µl aufgefüllt.

Zur Amplifikation wurde ein Thermocycler mit folgendem Programm verwendet:

Programm-Konditionen:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	98 °C	10 Sek.	10 Zyklen
Primer Hybridisierung	62 °C	20 Sek.	
Elongation	72 °C	20 Sek.	
Denaturierung	98 °C	10 Sek.	25 Zyklen
Elongation	72 °C	30 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Halten	4-10 °C	für immer	

Das PCR-Produkt wurde nach den Herstellerangaben des GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific) aufgereinigt, eluiert und mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch das Eppendorf BioPhotometer D30. Die sgRNA-Templates wurden daraufhin bei -20 °C gelagert.

sgRNA-Synthese mit dem MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific:

2 µl	Puffer (10x)
2 µl	ATP
2 µl	CTP
2 µl	GTP
2 µl	UTP
2 µl	T7 RNA-Polymerase (Enzym-Reaktions-Mix)
x µl	Template-DNA (300 ng)

mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt.

Zur Herstellung der sgRNA wurden die Ansätze für 5 h bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde 1 µl DNase hinzugefügt und nochmals für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit (Thermo Fisher Scientific) gemäß der Herstellerangaben. Zum Schluss wurde die RNA in 50 µl des vorerhitzten Elution-Puffer (95 °C) eluiert, die Konzentration photometrisch bestimmt, mittels Gelelektrophorese überprüft und in 1 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

4.13.2 Injektionen der *hmmr* sgRNAs mit dem Cas9-Protein

Zur Injektion in einzellige *X. laevis* Embryonen wurde die jeweilige *hmmr* sgRNA zuvor für 2 min auf 70 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gelagert, um Sekundärstrukturen zu vermeiden. Dann wurden 2 µl H_2O hinzugefügt und jeweils zu 1 µl Cas9-Protein (PNA Bio Cas9, CP01-50, 0,5 mg/ml in H_2O gelöst) hinzugegeben. Die Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe wurden daraufhin für 5 min bei 37 °C assembliert. Vor der eigentlichen Injektion wurden die Ansätze auf Eis gelagert.

4.13.3 Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese

Um zu verifizieren, ob der Knockout des *hmmr*-Gens spezifisch ist, wurden injizierte Embryonen im gewünschten Stadium einzeln (10 Embryonen pro Behandlung) mit Lysis-Puffer und Proteinase K (200 µg/ml) bei 56 °C über Nacht lysiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die lysierten Embryonen für 10 min bei 95 °C inkubiert. Durch 3-faches Zentrifugieren (10 min, 14000 rpm) des Lysats und durch Abpipettieren des Überstands konnte die genomische DNA der Embryonen gewonnen werden. Zum Schluss wurden die Embryonen einer einzelnen Behandlung (10 injizierte Embryonen und 5 Kontroll-Embryonen) als „genomischer Pool“ vermischt und bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurde eine Standard-Taq-PCR mit diesen Proben zur Amplifikation der editierten Genregion durchgeführt:

20 µl	Taq-Puffer
10 µl	dNTPs (2 mM)
4 µl	FP (10 µM)
4 µl	RP (10 µM)
0,8 µl	Taq-DNA-Polymerase
x µl	DNA-Mix (10 µg)

mit H_2O auf 100 µl aufgefüllt.

Sequenzierungs-Primer Sequenzen:

hmmr.L FP1: 5‘ ACATGGCCACCTGTACTTTGT 3‘

hmmr.L RP1: 5‘ AGCAGATGAGAACCCTAGCTG 3‘

Das fertige PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese analysiert und mithilfe des GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit aufgereinigt, eluiert und durch Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde es zur Überprüfung der Mutagenese via Sanger-Sequenzierung analysiert.

T7 Endonuklease-Assay

Neben der Sequenzierung wurde zur Überprüfung der Genome Targeting Effizienz auch das EnGen Mutation Detection Kit (New England Biolabs) verwendet. Dieser T7 Endonuklease Assay ist eine verbreitete Methode, um den Erfolg des Genome Editings zu quantifizieren.

Zuerst wird der editierte DNA-Bereich durch „ultra-fidelity PCR“ mit dem im Kit enthaltenen Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix amplifiziert. Die Amplifikate werden dann Hitze-denaturiert und langsam abgekühlt, sodass mutierte und Wildtyp-Einzelstränge Heteroduplexe ausbilden. Durch den anschließenden Verdau mit der strukturspezifischen EnGen T7 Endonuklease I werden dabei ausschließlich entstandene Heteroduplexe geschnitten. Der Anteil der geschnittenen DNA ist somit auch proportional zur Effizienz der erfolgreichen Mutagenese und ein einfacher und schneller Indikator („EnGen Mutation Detection Kit“).

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (2x)
1,25 µl	FP (10 µM)
1,25 µl	RP (10 µM)
x µl	genomische DNA (0,5-500 ng)

mit H_2O auf 25 µl aufgefüllt.

Primer-Sequenzen für T7 Endonuklease Assay:

hmmr.L FP S: 5‘ AAATAAGCTATCACAGCCACACC 3‘

hmmr.L RP S: 5‘ TTCTATCTGGTAGATACAGCATGG 3‘

Programm-Konditionen:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	98 °C	5 Sek.	35 Zyklen
Primer Hybridisierung	58 °C	10 Sek.	
Elongation	72 °C	30 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Halten	4-10 °C	für immer	

Nach der Überprüfung mittels Gelelektrophorese kam es zur Heteroduplex-Formation mit folgendem Hybridisierungs-Ansatz:

5 µl	PCR-Produkt
2 µl	NEBuffer 2 (10x)
12 µl	H_2O

Anschließend wurden die Ansätze denaturiert und wieder hybridisiert mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Hybridisierung	95 °C-85 °C	-2 °C/Sek.
	85 °C-25 °C	-0,1 °C/Sek.
Halten	4 °C	für immer

Anschließend wurde mit dem Heteroduplex-Verdau fortgefahren:

19 µl	hybridisiertes PCR-Produkt
1 µl	EnGen T7 Endonuklease I

Dieser Ansatz wurde vermischt und kurz zentrifugiert und anschließend für 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1 µl Proteinase K hinzugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert, um die T7 Endonuklease I zu inaktivieren. Zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese wurden die Ansätze mittels Gelelektrophorese untersucht.

4.14 *In-situ*-Hybridisierung (ISH)

Um die Lokalisation und Intensität einer spezifischen Genexpression nachzuweisen, wurde eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Dieses Vorgehen dient zum Nachweis von mRNA in allen embryonalen Geweben. Dabei binden synthetisierte Sonden über komplementäre Basenpaarung an die Ziel-Nukleinsäure. Durch eine darauffolgende Antikörper-Reaktion können die Digoxigenin-markierten Sonden detektiert und die mRNA mit einer enzymatischen Farbreaktion in den embryonalen Geweben sichtbar gemacht werden.

Für die meisten der zu untersuchenden Gene wurden recycelte Sonden aus dem Bestand des Instituts für Biologie, Fachgebiet Zoologie verwendet. Die *hmmr* N-terminale Antisense-Sonde wurde in der vorliegenden Arbeit neu synthetisiert.

4.14.1 Allgemeines Verfahren zur Herstellung der Sonden

Die Sonden für die ISH werden über *in vitro* Transkription hergestellt:

Ansatz:

2 µl linearisierte Plasmid DNA (2 µg, hier *hmmr* N-Terminus in pGEM®-T Easy Vektor)
4 µl Transkriptionspuffer (5x)
1 µl RNase-Inhibitor
2 µl Digoxigenin-dNTP-Labeling Mix
2 µl DTT (100 mM)
2 µl RNA-Polymerase (hier T7 für Antisense Sonde)

mit H_2O auf 20 µl aufgefüllt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl DNase zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Aufreinigung wurde die synthetisierte Sonde mit 30 µl doppelt destilliertem H_2O, 5 µl Ammoniumacetat und 165 µl EtOH (100 %ig) für 30 min bei -20 °C gefällt. Danach wurde das Gemisch für 25 min bei 4 °C bei 14000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50 µl Formamid / H2O (1:1) aufgenommen. Im Anschluss wurde die Herstellung der RNA-Sonde über Gelelektrophorese überprüft und bei -80 °C gelagert.

1. Tag der ISH

Am Anfang der ISH musste steril und auf Eis gearbeitet werden, um die mRNA vor Degradation zu schützen. Ausschließlich während der Proteinase K-Behandlung wurde auf RT gearbeitet. Die in Ethanol (100 %ig) aufbewahrten Embryonen wurden zuerst schrittweise mit einer EtOH/PBSw-Reihe (75 %, 50 %, 25 %) rehydriert. Danach wurden die Embryonen nochmals 3-mal mit PBSw für je 5 min gewaschen. Der erste Verdau erfolgte durch die Proteinase K-Behandlung. Um die Aktivität der Proteinase K wieder zu stoppen, wurde die Lösung durch PBSw/Glycin ersetzt. Danach wurden die Embryonen wieder auf Eis gesetzt und 3-mal mit PBSw gewaschen und über 15 min mit 4 % PFA / 0,2 % Glutaraldehyd in PBSw nachfixiert. Das Fixans wurde durch 4-mal mit PBSw waschen wieder entfernt. Anschließend gab es mehrere Hybridisierungsschritte. Als erstes wurde mit 1 ml 50 % PBSw / 50 % Hybridisierungslösung für 3 min gewaschen und dann nochmal mit 1 ml 100 % Hybridisierungslösung für weitere 3 min gewaschen. Anschließend wurde der 1 ml Hybridisierungslösung abgezogen und durch 900 µl frische Hybridisierungslösung ersetzt und für 3 h bei 65 °C im Wasserbad vorhybridisiert. Kurz vor Ablauf der 3 h wurde die RNA-Sonde für 5 min bei 95 °C aufgekocht und danach auf Eis abgekühlt. Auf 99 µl Hybridisierungslösung kam 1 µl RNA-Sonde. Im Anschluss kamen die 100 µl RNA-Sonde / Hybridisierungslösung auf die 900 µl Hybridisierungslösung drauf und wurde über Nacht bei 70 °C im Wasserbad mit den Embryonen hybridisiert.

2. Tag der ISH

An diesem Tag musste nicht mehr unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Als erstes wurde der RNA-Hybridisierungsmix vom Vortag entfernt und durch 1 ml frische Hybridisierungslösung ersetzt. Dieser Prozess wurde noch 2-mal für 30 min bei 70 °C wiederholt. Danach wurde die Lösung nochmals abgezogen und durch 800 µl frische Hybridisierungslösung ersetzt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde insgesamt 3-mal alle 5 min mit 400 µl SSC-Lösung (2x, pH 4,5) aufgefüllt. Sobald das Endvolumen von 2 ml erreicht wurde, ersetzte man den Mix durch SSC (2x, pH 7) und ließ die Embryonen 30 min bei 70 °C wachen. Dieser Schritt wurde noch 1-mal wiederholt. Im Anschluss wurde die Mixtur entfernt und 2-mal für mindestens 15 min bei RT mit MABw gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 1 h bei RT mit 1 ml

MAB-Blocking inkubiert. Zum Schluss wurde die MAB-Blocking-Lösung durch 1 ml Antikörper-Mix (1:10000, auf 10 ml MAB-Blocking kam 1 µl Digoxigenin Fab Fragments AK) ersetzt und über Nacht bei 4 °C mit leichtem Schütteln inkubiert.

3. Tag der ISH

Der AK-Mix vom Vortag wurde durch 5-mal mit MAB auf dem Taumelroller waschen für mindestens 45 min entfernt, um unspezifisch gebundene AK zu entfernen. Anschließend wurde 3-mal mit dem AP1-Puffer für 20 min auf dem Taumelroller gewaschen, um die Embryonen auf die BM-Purple Farbreaktion vorzubereiten. Dann wurden die Embryonen in die BM-Purple-Lösung überführt und im Dunkeln über Nacht bei RT inkubiert. Nach erfolgreicher Farbreaktion wurden die Embryonen 2-mal für 10 min bei RT mit PBS^- gewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Um die Färbung zu intensivieren (wird blauer), wurden die Embryonen in EtOH (100 %ig) gewaschen und anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Zur Fotodokumentation der Embryonen wurden diese wieder schrittweise in PBS^- rehydriert und in Petrischalen mit Agarose-Boden und PBS^- überführt.

Tabelle 2: Verwendete Antisinn-Sonden für *in-situ*-Hybridisierung

Antisinn-Sonde	Gen	Analyse
en2	*engrailed homeobox 2*	direktes Wnt-Zielgen
foxd1 (xbf-2)	*forkhead box D1*	Vorderhirn-Marker
foxg1 (bf1)	*forkhead box G1*	Vorderhirn-Marker
hmmr	*hyaluronan-mediated motility receptor*	Vergleich N-terminaler und C-terminaler *hmmr* Sonde
not	*notochord homeobox*	Dachplatten-Marker
otx2	*orthodenticle homeobox*	Vorder- und Mittelhirn und Klebdrüsen-Marker

4.15 Histologische Schnitte der ISH-Embryonen

Die Teilpräparate der Embryonen wurden in VIB-Mix äquilibriert und mithilfe von Metall-Winkeln wurde die untere Schicht des Schnittblocks aus 1 ml VIB-Mix und 72 µl

Glutaraldehyd gegossen. Danach wurde der Embryo auf die 1. Schicht überführt und entsprechend der gewünschten Schnittebene ausgerichtet. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und der Deckel des Schnittblocks wurde aus 1 ml VIB-Mix und 72 µl Glutaraldehyd auf den Embryo gegossen. Der ausgehärtete Schnittblock wurde mit Rasierklingen zurechtgeschnitten, mit Sekundenkleber auf einem Teller fixiert und in einer mit PBS- gefüllten Kammer des Vibratoms Leica VT 1000 eingespannt. Die 20-30 µm dünnen Schnitte wurden auf einem Objektträger platziert und mit Mowiol versiegelt.

4.16 Western Blot

4.16.1 Lysieren und Vorbereitung der Embryonen

Zunächst wurden 5 Embryonen / Behandlung im gewünschten Stadium in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Flüssigkeit vollständig abgezogen. Danach wurden 50 µl Lysis-Puffer auf die Embryonen draufgegeben. Die Embryonen wurden durch hoch- und runter pipettieren mazeriert und nochmals durch eine Spritze und Kanüle gezogen. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min bei 4 °C bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, bzw. die mittlere Schicht wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die obere, schaumige Schicht wurde hierbei verworfen, da sich dort nur Lipide befinden. Anschließend wurden 7 µl des Proteinextrakts zusammen mit 7 µl Laemmli-Loadingbuffer (2x) für 5 min bei 95 °C aufgekocht und danach weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

4.16.2 SDS-Gelelektrophorese

Hierfür wurde ein bereits hergestelltes Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel (Bio-Rad, 4-20 %, 12-well) verwendet und in eine vertikale Mini-PROTEAN® Tetra (Bio-Rad) Gelelektrophoresekammer eingespannt. Die Gelkammer und der zugehörige Tank wurden komplett bis zur Markierung mit Laemmli-Laufpuffer (1x) aufgefüllt. Zur richtigen Einordnung der aufgetrennten Proteingrößen wurde 8 µl eines Protein-

Standards aufgetragen. Von den zu untersuchenden Proben wurde jeweils 15 µl aufgetragen. Anschließend lief die Gelelektrophorese bei 120 V für 1 Stunde.

4.16.3 Blotten nach dem Tank Blot-Verfahren

Nachdem die Proteine im Gel aufgetrennt wurden, kam das Gel für 30 min in den Blot-Puffer und wurde unter Schwenken äquilibriert. Zeitgleich wurde die Nitrocellulose Membran auch für 20 min in Blot-Puffer äquilibriert und zur Markierung an einer Ecke leicht abgeschnitten. Der Blot wurde folgendermaßen zusammengebaut:

1) schwarze Seite
2) Pad (in Blot-Puffer getränkt)
3) Whatman-Filterpapier (in Blot-Puffer getränkt)
4) Protein Gel
5) Nitrocellulose Membran
6) Whatman-Filterpapier (in Blot-Puffer getränkt)
7) Pad (in Blot-Puffer getränkt)
8) transparente Seite

Die Mini Trans-Blot® Cell Apparatur (Bio-Rad) wurde wieder in den Tank eingesetzt und bis zur Markierung mit Blot-Puffer aufgefüllt. Zusätzlich wurden ein Kühl-Akku und ein Magnetfisch in den Tank gegeben und auf einen Magnetrührer gestellt. Hierbei wurde der Tank für 1 h bei 350 mA angeschlossen und laufen gelassen. Anschließend konnte man die Nitrocellulose Membran entweder in TBST aufbewahren oder mit der Antikörper-Inkubation fortfahren.

4.16.4 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Nach erfolgreichem Blotten der Proteine wurde die Nitrocellulose Membran für 1 h bei RT in einer 5 % Milchpulver (MP) / TBST-Lösung inkubiert zur Blockierung unspezifischer Bindestellen inkubiert. Die primären Antikörper Hmmr-AK und Tuba4a-AK wurden in 5 % MP (10 ml) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die AK-Mixtur durch 3-mal 20 min in 5 % MP / TBST herunter gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären HRP-gekoppelten AK erfolgte für 1-2 h bei RT unter leichtem Schwenken. Danach wurde die sekundäre AK-Mixtur bis zu 6-mal mit TBST innerhalb 1 h gewaschen. Zu Detektion wurden die Proteine zügig mit dem ECL

Western Blot Substrat Kit (Pierce) behandelt. Hierfür wurden die beiden ECL-Lösungen 1:1 verdünnt und auf die Membran gegeben und für 2 min inkubiert. Die anschließende Fotodokumentation erfolgte am ChemiDoc XRS+ Molecular Imager unter Verwendung der Software Quantity One 4.6.9.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für Western Blot

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung in TBST
Hmmr	Kaninchen	1:3000
Tuba4a	Maus	1:5000
Sekundäre Antikörper	**Spezies**	**Verdünnung in TBST**
anti-Kaninchen IgG HRP	Ziege	1:8000
anti-Maus HRP	Ziege	1:80000

4.17 Immunfluoreszenz-Färbung (IF)

Die Immunfluoreszenz-Färbung diente dazu die Lokalisierung verschiedener Proteine mithilfe von primären AK (gegen das Ziel-Protein gerichtet) und sekundären AK (mit Fluorophoren gekoppelt) zu analysieren.

Die in MEMFA oder 4 % PFA fixierten Embryonen wurden 3-mal für 10 min bei RT in 1x PBS^- gewaschen und anschließend, je nachdem welches Gewebe untersucht werden soll, präpariert. Daraufhin wurden die Embryonen 3-mal für 10 min bei 4 °C mit 1x PBSt (Triton X in PBS-, 0,1 %) in einer Multiwellplatte gewaschen, um die Membranen für die AK durchlässiger zu machen. Anschließend wurde die 1x PBSt Lösung abgezogen und mit der Blocking-Lösung CAS-Block / PBSt (1:10) ersetzt (200 µl / well). Die Embryonen inkubierten dabei für 2 h bei RT. Dann wurde die Blockierungs-Lösung durch den primären AK in CAS-Block ersetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde die AK-Mixtur recycelt und die Embryonen 4-mal für 15 min mit PBS- gewaschen. Danach kam die sekundäre AK-Lösung auf die Embryonen und wurde über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die sekundäre AK-Mixtur wurde im Anschluss abgezogen und die Embryonen nochmals 3-mal für 15 min mit PBS- gewaschen. Zellkerne wurden meistens für 30 min mit Hoechst in PBS- gefärbt und anschließend nochmal mit PBS- gewaschen. Zum Dokumentieren wurden die Embryonen in Low-melt-Agarose (0,5 %) eingebettet und in die gewünschte Position gebracht, um das Zielgewebe und die Protein Lokalisierung zu untersuchen.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbung

Primäre Antikörper		Sekundäre Antikörper	
Bezeichnung	**Verdünnung**	**Bezeichnung**	**Verdünnung**
Tuba4a (nicht acetyliertes α-Tubulin)	1:500	anti-Maus IgG1 Alexa Fluor 488 / 555	1:1000
XHmmr	1:300	anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor	1:1000
GFP	1:500	anti-Huhn IgY Alexa Fluor 488	1:1000
c-Myc	1:500	anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor 555	1:1000
Ctnnb1	1:200	anti-Kaninchen Alexa Fluor 555	1:1000
Fn1	1:40	anti-Maus IgG1 Alexa Fluor 555	1:1000
Phalloidin (F-Aktin)	1:200		
Hoechst	1:10000		

4.18 Luciferase-Reporter-Assay

Die transkriptionelle Aktivität Signalwegs-spezifischer Zielgene wurde mit dem Luciferase-Reporter-Assay (Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay Systems – Promega) untersucht. Zur Analyse des kanonischen Wnt / Ctnnb1-Signalwegs wurde der BAR-Reporter (Biechele & Moon, 2008) verwendet.

4.18.1 Vorbereitung der Zell-Lysate für das DLR-Assay

Der Passive-Lysis-Buffer (PLB, 5x) wird bei -20 °C gelagert und zur Verwendung mit H_2O 1:5 verdünnt. Der PLB ist speziell formuliert, um die Hintergrund Autolumineszenz zu minimieren. Zum Lysieren der Embryonen wurden meistens 10 präparierte, halbierte Embryonen im Stadium 10 (animale Kappen) in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt, die Flüssigkeit komplett abgezogen und die geschnittenen Embryonen in 200 µl 1x PLB lysiert. Danach wurden die lysierten animalen Kappen für 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Die Reagenzien Luciferase Assay Reagent II (LAR II) und Stop & Glo® Reagent wurden gemäß der Herstellerangaben vorbereitet und aliquotiert eingefroren.

4.18.2 Durchführung des DLR-Assays

Zu Beginn war es essenziell, dass die LAR II und Stop & Glo® Reagenzien und die Proben gut aufgetaut werden, bis diese RT erreichten. Zur Vorbereitung wurden die Proben für 5 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (mittlere Phase) wurde in ein frisches Gefäß überführt und nochmals für 1 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand jeweils in Duplikaten (je 25 µl) in die eine 96 Well-Platte überführt.

Währenddessen wurde das Gerät GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega) vorbereitet und die Injektionsnadeln und Schläuche dabei mit H_2O und EtOH (70 %ig) gespült (H_2O – 70 % EtOH – H_2O – Luft). Danach wurde der Geräts interne Heizer auf 25 °C eingestellt und der GloMax® sowohl mit LAR II (Substrat für die Firefly Luciferase) als auch Stop & Glo® (Substrat für die Renilla-Luciferase) beladen. Die Probenplatte wurde im Gerät für 10 Sek. geschüttelt, damit sich die Proben unten in den Wells sammeln konnten. Das Volumen beider Injektoren wurde daraufhin auf 75 µl eingestellt und nach dem Auswählen der Plattenbelegung konnte das Protokoll gestartet werden. Zur Auswertung der Analyse wurde ein Quotient aus den Werten der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase (Kontrolle) gebildet.

4.19 Fotodokumentation und Auswertung

4.19.1 Fotodokumentation der Embryonen im Ganzpräparat

Embryonen im Ganzpräparat wurden mit dem Stereomikroskop Zeiss SteREO Discovery.V12 aufgenommen. Die zuvor in 1x MEMFA oder 4% PFA-fixierten Embryonen wurden zunächst schrittweise in 1x PBS^- rehydriert und in PBS^- Agarose-Schälchen überführt. Das Binokular war über eine Digitalkamera (AxiCam HRc, Zeiss) mit dem Computer verbunden. Zur Aufnahme wurde das Programm AxioVision Rel. 4.6 verwendet und die Bilder anschließend im TIFF-Format gespeichert.

4.19.2 Fotodokumentation von histologischen Schnitten

Histologische Schnitte (Abb. 9, 10) wurden nach ISH (siehe 4.14) mit dem Mikroskop Zeiss Axioskop 2 aufgenommen und die Bilder im TIFF-Format gespeichert.

4.19.3 Fotodokumentation von Embryonen nach IF

Immunfluoreszenz-gefärbte Embryonen bzw. Teilpräparate, eingebettet in Low-melt-Agarose, wurden mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) 700 aufgenommen und die Bilder im TIFF-Format gespeichert.

4.19.4 Allgemeine Bildbearbeitung

Die Helligkeit, der Kontrast und die Ausrichtung der Ganzpräparate und der histologischen Schnitte inklusive der Hintergründe der abgebildeten Embryonen wurde in Adobe Photoshop CS6 angepasst. Bei den IF-Bildern wurden Helligkeit und Kontrast in ImageJ angepasst. Anschließend wurden die Bilder mit Affinity Designer 2 zusammengefügt.

4.19.5 Allgemeine Vermessung der Embryonen

Die Vorderhirne der Embryonen im Stadium 21 wurden fotodokumentiert (siehe 4.18.1) und anschließend in ImageJ vermessen.

4.19.6 Messung der Proteinmenge im Western Blot

Hierfür wurde das aufgenommene Bild-Material des Western Blots in ImageJ gespeichert und gegebenenfalls die Helligkeit und der Kontrast der Bilder so angepasst, dass der Hintergrund reduziert werden konnte. Anschließend wurden die Proteinbanden durch *engl. analyze – gels – select first lane* und *engl. analyze – gels – plot lanes* weiter analysiert. Wobei letzteres sich in einem extra Fenster öffnete und somit jede Proteinbande als „Ausschlag“ beobachtet werden konnte. Im weiteren Verlauf bekam man einen prozentualen Wert *engl. analyze – gels – label peaks*, der die Fläche des „Ausschlags“ berechnete und somit Hinweise auf die prozentuale Menge des detektierten Proteins geben konnte. Dies wurde sowohl für die Ladekontrolle (α-Tubulin), als auch für das zu untersuchende Protein Hmmr durchgeführt. Abschließend war es wichtig, die Werte zur Ladekontrolle zu normalisieren, um einen Vergleich zwischen wildtypischen und behandelten Embryonen in den jeweiligen Stadien erkennen zu können.

4.19.7 Messung der Proteinmenge in Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Proteinmenge wurde anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals in den IF-Bildern in ImageJ als durchschnittlicher Grauwert (*engl. mean gray value*) gemessen.

4.19.8 Vermessung der Roundness neuroepithelialer Zellen

Um die Elongation von Zellen in der Neuralplatte zu analysieren, wurden die Zellen in ImageJ händisch umrandet und mittels „Roundness“ ausgewertet. Dabei entspricht ein Wert von 1,0 komplett runden Zellen, wohingegen der Wert von 0,1 elongierte, bzw.

elliptische Zellformen widerspiegelt. Die „Roundness“ beruht dabei auf folgender Formel: $\frac{4 * Fläche}{\pi * (Hauptachse)^2}$

4.19.9 Statistische Auswertung der Daten

Die Daten wurden mit dem χ^2-Test, dem Wilcoxon-Rangsummen-Test oder dem Zweistichproben T-Test nach für unabhängige Stichproben in Statistical R und nach https://www.socscistatistics.com/tests/ ausgewertet. Für die Beurteilung wurden folgende Kriterien angewandt:

$p < 0,05$	signifikant (*)
$p < 0,01$	hoch signifikant (**)
$p < 0,001$	sehr hoch signifikant (***)

4.20 Internet-Datenbanken und Programme

Adobe Photoshop CS6

Affinity Designer 2

AlphaFold: https://alphafold.ebi.ac.uk/; Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022, 2024

ChatGPT (GPT-4-turbo, OpenAI, https://chat.openai.com)

ImageJ: https://imagej.net/ij/; Schneider et al., 2012

PyMOL: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.

Statistical R: https://www.r-project.org/; R Core Team, 2021

Synthego ICE: Synthego Performance Analysis, ICE Analysis. 2019. v3.0. Synthego

TM Calculator: https://tmcalculator.neb.com/#!/main; New England BioLabs

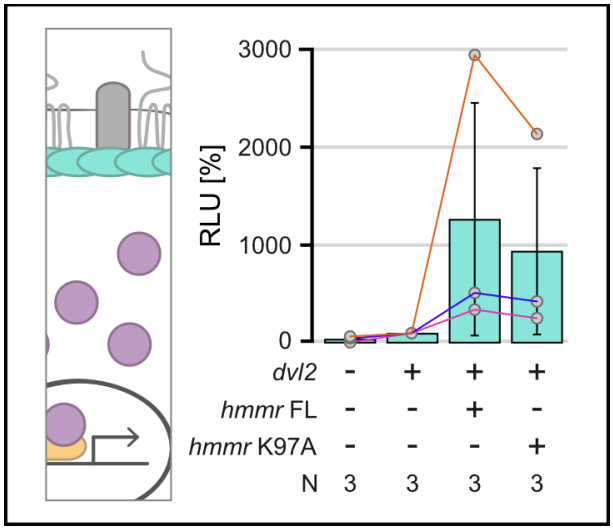
χ^2-Test und Zweistichproben T-Test: https://www.socscistatistics.com/tests/

Xenbase: http://www.xenbase.org/, RRID:SCR_003280; Fisher et al., 2023b

Quantity One 4.6.: Bio-Rad

Zotero: https://www.zotero.org/

Anhang



Anhang 1: Das KKQK-Motiv in der vollen Länge von Hmmr unterstützt die Aktivierung des Wnt-Signalwegs über Dvl2

Luciferase-Reporter Assay in animalen Kappen, separates Teilexperiment von Abb. 15G und Injektionsschema wie in Abb. 10, E (hier gezeigt wegen doppelt gezeigter *hmmr* FL-Daten). *hmmr* FL und *hmmr* K97A Funktionsgewinn-Experimente nach Injektion von *dvl2* mRNA. Schemata neben dem Säulendiagramm präsentiert die Ebene, auf welcher der Wnt-Signalweg aktiviert wurde (Cyan, Dvl2). Durch die K97A Mutation kam es zu einer verminderten Wnt-Signalwegsaktivierung. Die bunten Linien (Orange, Blau und Pink) verbinden die relativen Einzelwerte der Experimente. N gibt die Anzahl unabhängiger Experimente an. Es wurden 10 animale Kappen pro Experiment und Behandlung analysiert. Die Daten der unabhängigen Experimente werden als Mittelwert (Säulen) und Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. Relative Einzelwerte sind als graue Punkte dargestellt. (FL) *engl. full length,* (RLU) *engl. relative light units.*

Literaturverzeichnis

Alberts, B. (2012). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie (4. Auflage). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1045-1062.

Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., & Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: A molecular switch for the Wnt pathway. Genes & Development, 16(9), 1066–1076. https://doi.org/10.1101/gad.230302

Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1072(2), 129–157. https://doi.org/10.1016/0304-419X(91)90011-9

Aquilina-Beck, A., Ilagan, K., Liu, Q., & Liang, J. O. (2007). Nodal signaling is required for closure of the anterior neural tube in zebrafish. BMC Developmental Biology, 7(1), 126. https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-126

Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J. F., & Hart, I. R. (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. Journal of Cell Science, 112(22), 3943–3954. https://doi.org/10.1242/jcs.112.22.3943

Assmann, V., Marshall, J. F., Fieber, C., Hofmann, M., & Hart, I. R. (1998). The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. Journal of Cell Science, 111 (Pt12), 1685–1694. https://doi.org/10.1242/jcs.111.12.1685

Bachvabova, R., & Davidson, E. H. (1966). Nuclear activation at the onset of amphibian gastrulation. Journal of Experimental Zoology, 163(3), 285–295. https://doi.org/10.1002/jez.1401630307

Baker, N. E. (1987). Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in Drosophila: The spatial distribution of a transcript in embryos. The EMBO Journal, 6(6), 1765–1773. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02429.x

Barnat, M., Benassy, M.-N., Vincensini, L., Soares, S., Fassier, C., Propst, F., Andrieux, A., von Boxberg, Y., & Nothias, F. (2016). The GSK3–MAP1B pathway controls neurite branching and microtubule dynamics. Molecular and Cellular Neuroscience, 72, 9–21. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.01.001

Baum, B., & Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. Journal of Cell Biology, 192(6), 907–917. https://doi.org/10.1083/jcb.201009141

Behrens, J., Jerchow, B. A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D., & Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. Science (New York, N.Y.), 280(5363), 596–599. https://doi.org/10.1126/science.280.5363.596

Bell, I. J., Horn, M. S., & Van Raay, T. J. (2022). Bridging the gap between non-canonical and canonical Wnt signaling through Vangl2. Seminars in Cell & Developmental Biology, 125, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.10.004

Berdiaki, A., Thrapsanioti, L.-N., Giatagana, E.-M., K Karamanos, N., C Savani, R., N Tzanakakis, G., & Nikitovic, D. (2023). RHAMM/hyaluronan inhibit β-catenin degradation, enhance downstream signaling, and facilitate fibrosarcoma cell growth. Molecular Biology Reports, 50(11), 8937–8947. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08763-0

Berrueta, L., Kraeft, S.-K., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Chen, L. B., Hill, D. E., Pellman, D., & Bierer, B. E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(18), 10596–10601. https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10596

Bhattacharya, D., Marfo, C. A., Li, D., Lane, M., & Khokha, M. K. (2015). CRISPR/Cas9: An inexpensive, efficient loss of function tool to screen human disease genes in Xenopus. Developmental Biology, 408(2), 196–204. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.11.003

Biechele, T. L., & Moon, R. T. (2008). Assaying beta-catenin/TCF transcription with beta-catenin/TCF transcription-based reporter constructs. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 468, 99–110. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-249-6_8

Bilic, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., & Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. Science (New York, N.Y.), 316(5831), 1619–1622. https://doi.org/10.1126/science.1137065

Blaustein, M., Pelisch, F., & Srebrow, A. (2007). Signals, pathways and splicing regulation. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(11), 2031–2048. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.04.004

Blitz, I. L., & Cho, W. Y. (1995). Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: The role of the Xenopus homeobox gene orthodenticle. Development, 121(4), 993–1004. https://doi.org/10.1242/dev.121.4.993

Blitzer, J. T., & Nusse, R. (2006). A critical role for endocytosis in Wnt signaling. BMC Cell Biology, 7(1), 28. https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-28

Bogart, A. H., & Brooks, E. R. (2025). Canonical Wnt pathway modulation is required to correctly execute multiple independent cellular dynamic programs during cranial neural tube closure. Developmental Biology, 523, 115–131. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2025.04.013

Böttcher, R. T., & Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. Endocrine Reviews, 26(1), 63–77. https://doi.org/10.1210/er.2003-0040

Boucaut, J. C., Darribere, T., Li, S. D., Boulekbache, H., Yamada, K. M., & Thiery, J. P. (1985). Evidence for the role of fibronectin in amphibian gastrulation. Development, 89(Supplement), 211–227. https://doi.org/10.1242/dev.89.supplement.211

Boucaut, J.-C., & Darribere, T. (1983). Presence of fibronectin during early embryogenesis in amphibian Pleurodeles waltlii. Cell Differentiation, 12(2), 77–83. https://doi.org/10.1016/0045-6039(83)90059-3

Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F., & Nothias, F. (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 24(32), 7204–7213. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2254-04.2004

Boutros, M., & Mlodzik, M. (1999). Dishevelled: At the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. Mechanisms of Development, 83(1), 27–37. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00046-5

Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T., & Kimelman, D. (1997). A β-catenin/XTcf-3 complex binds to thesiamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus. Genes & Development, 11(18), 2359–2370. https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2359

Brewster, R., Lee, J., & Altaba, A. R. i. (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. Nature, 393(6685), 579–583. https://doi.org/10.1038/31242

Brivanlou, A. H., & Harland, R. M. (1989). Expression of an engrailed-related protein is induced in the anterior neural ectoderm of early Xenopus embryos. Development (Cambridge, England), 106(3), 611–617. https://doi.org/10.1242/dev.106.3.611

Brown, S. A., Warburton, D., Brown, L. Y., Yu, C., Roeder, E. R., Stengel-Rutkowski, S., Hennekam, R. C. M., & Muenke, M. (1998). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. Nature Genetics, 20(2), 180–183. https://doi.org/10.1038/2484

Bryja, V., Schulte, G., & Arenas, E. (2007). Wnt-3a utilizes a novel low dose and rapid pathway that does not require casein kinase 1-mediated phosphorylation of Dvl to activate beta-catenin. Cellular Signalling, 19(3), 610–616. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.011

Bustos, V. H., Marin, O., Meggio, F., Cesaro, L., Allende, C. C., Allende, J. E., & Pinna, L. A. (2005). Generation of protein kinase Ck1α mutants which discriminate between canonical and non-canonical substrates. Biochemical Journal, 391(Pt 2), 417–424. https://doi.org/10.1042/BJ20050717

Butler, M. T., & Wallingford, J. B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 18(6), 375–388. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.11

Cabrera, C. V., Alonso, M. C., Johnston, P., Phillips, R. G., & Lawrence, P. A. (1987). Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. Cell, 50(4), 659–663. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90039-0

Cadigan, K. M., Fish, M. P., Rulifson, E. J., & Nusse, R. (1998). Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. Cell, 93(5), 767–777. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81438-5

Cannatella, D. C., & de Sá, R. O. (1993). Xenopus Laevis as a Model Organism. Systematic Biology, 42(4), 476–507. https://doi.org/10.1093/sysbio/42.4.476

Carroll, T. J., & Yu, J. (2012). The Kidney and Planar Cell Polarity. Current topics in developmental biology, 101, 185–212. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394592-1.00011-9

Casagolda, D., Del Valle-Pérez, B., Valls, G., Lugilde, E., Vinyoles, M., Casado-Vela, J., Solanas, G., Batlle, E., Reynolds, A. B., Casal, J. I., de Herreros, A. G., & Duñach, M. (2010). A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling. Journal of Cell Science, 123(Pt 15), 2621–2631. https://doi.org/10.1242/jcs.067512

Casini, P., Nardi, I., & Ori, M. (2010). RHAMM mRNA expression in proliferating and migrating cells of the developing central nervous system. Gene Expression Patterns, 10(2), 93–97. https://doi.org/10.1016/j.gep.2009.12.003

Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M. J., Dale, T. C., & Salinas, P. C. (2004). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: Dishevelled signals locally to stabilize microtubules. The Journal of Cell Biology, 164(2), 243–253. https://doi.org/10.1083/jcb.200309096

Clevers, H. (2006). Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. Cell, 127(3), 469–480. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018

Cliffe, A., Hamada, F., & Bienz, M. (2003). A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. Current Biology: CB, 13(11), 960–966. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00370-1

Connell, M., Chen, H., Jiang, J., Kuan, C.-W., Fotovati, A., Chu, T. L., He, Z., Lengyell, T. C., Li, H., Kroll, T., Li, A. M., Goldowitz, D., Frappart, L., Ploubidou, A., Patel, M. S., Pilarski, L. M., Simpson, E. M., Lange, P. F., Allan, D. W., & Maxwell, C. A. (2017). HMMR acts in the PLK1-dependent spindle positioning pathway and supports neural development. eLife, 6, e28672. https://doi.org/10.7554/eLife.28672

Copp, A. J., Greene, N. D. E., & Murdoch, J. N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. Nature Reviews. Genetics, 4(10), 784–793. https://doi.org/10.1038/nrg1181

Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J.-C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., & Silvio Gutkind, J. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. Cell, 81(7), 1137–1146. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80018-2

Coudreuse, D. Y. M., Roël, G., Betist, M. C., Destrée, O., & Korswagen, H. C. (2006). Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. Science (New York, N.Y.), 312(5775), 921–924. https://doi.org/10.1126/science.1124856

Crainie, M., Belch, A. R., Mant, M. J., & Pilarski, L. M. (1999). Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: Identification of three distinct RHAMM variants. Blood, 93(5), 1684–1696.

Darribère, T. (1990). Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation. The International journal of developmental biology. https://doi.org/10.1387/IJDB.2203453

Davidson, L. A., & Keller, R. E. (1999). Neural tube closure in Xenopus laevis involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. Development, 126(20), 4547–4556. https://doi.org/10.1242/dev.126.20.4547

Dawid, I. B., & Sargent, T. D. (1988). Xenopus laevis in developmental and molecular biology. Science (New York, N.Y.), 240(4858), 1443–1448. https://doi.org/10.1126/science.3287620

De Robertis, E. M., & Kuroda, H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 20, 285–308. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.011403.154124

Deardorff, M. A., Tan, C., Saint-Jeannet, J.-P., & Klein, P. S. (2001). A role for frizzled 3 in neural crest development. Development, 128(19), 3655–3663. https://doi.org/10.1242/dev.128.19.3655

Deese, E. (2022). Funktionelle Analyse des Mikrotubuli-bindenden Proteins Hmmr während der Wnt-abhängigen neuralen Musterbildung in Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Deese, E. (2025). Functional analysis of the microtubule-binding protein Hmmr and its role in the Wnt pathway in Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Drysdale, T. A., & Elinson, R. P. (1993). Inductive events in the patterning of the Xenopus laevis hatching and cement glands, two cell types which delimit head boundaries. Developmental Biology, 158(1), 245–253. https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1183

Dunsch, A. K., Hammond, D., Lloyd, J., Schermelleh, L., Gruneberg, U., & Barr, F. A. (2012). Dynein light chain 1 and a spindle-associated adaptor promote dynein asymmetry and spindle orientation. Journal of Cell Biology, 198(6), 1039–1054. https://doi.org/10.1083/jcb.201202112

El-Brolosy, M. A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G. L. M., Takacs, C. M., Lai, S.-L., Fukuda, R., Gerri, C., Giraldez, A. J., & Stainier, D. Y. R. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. Nature, 568(7751), 193–197. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z

EnGen Mutation Detection Kit. (o. J.). New England Biolabs GmbH. Abgerufen 16. Juni 2025, von https://www.neb-online.de/genome-editing/engen-mutation-detection-kit/

Entwistle, J., Zhang, S., Yang, B., Wong, C., Li, Q., Hall, C. L., A, J., Mowat, M., Greenberg, A. H., & Turley, E. A. (1995). Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. Gene, 163(2), 233–238. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00398-p

Esufali, S., & Bapat, B. (2004). Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of β-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. Oncogene, 23(50), 8260–8271. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208007

Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C., & Brambilla, E. (2001). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. Oncogene, 20(14), 1678–1687. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204242

Farin, H. F., Jordens, I., Mosa, M. H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D. V. F., de Punder, K., Angers, S., Peters, P. J., Maurice, M. M., & Clevers, H. (2016). Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. Nature, 530(7590), 340–343. https://doi.org/10.1038/nature16937

Fisher, M., James-Zorn, C., Ponferrada, V., Bell, A. J., Sundararaj, N., Segerdell, E., Chaturvedi, P., Bayyari, N., Chu, S., Pells, T., Lotay, V., Agalakov, S., Wang, D. Z., Arshinoff, B. I., Foley, S., Karimi, K., Vize, P. D., & Zorn, A. M. (2023). Xenbase: Key features and resources of the Xenopus model organism knowledgebase. Genetics, 224(1), iyad018. https://doi.org/10.1093/genetics/iyad018

Fonar, Y., Gutkovich, Y. E., Root, H., Malyarova, A., Aamar, E., Golubovskaya, V. M., Elias, S., Elkouby, Y. M., & Frank, D. (2011). Focal adhesion kinase protein regulates Wnt3a gene expression to control cell fate specification in the developing neural plate. Molecular Biology of the Cell, 22(13), 2409–2421. https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0932

Fredieu, J. R., Cui, Y., Maier, D., Danilchik, M. V., & Christian, J. L. (1997). Xwnt-8 and lithium can act upon either dorsal mesodermal or neurectodermal cells to cause a loss of forebrain in Xenopus embryos. Developmental Biology, 186(1), 100–114. https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8566

Fulcher, L. J., He, Z., Mei, L., Macartney, T. J., Wood, N. T., Prescott, A. R., Whigham, A. J., Varghese, J., Gourlay, R., Ball, G., Clarke, R., Campbell, D. G., Maxwell, C. A., & Sapkota, G. P. (2019). FAM83D directs protein kinase CK1α to the mitotic spindle for proper spindle positioning. EMBO reports, 20(9), e47495. https://doi.org/10.15252/embr.201847495

Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P., & Gumbiner, B. M. (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: Evidence for intracellular signaling. Journal of Cell Biology, 128(5), 959–968. https://doi.org/10.1083/jcb.128.5.959

Gammons, M. V., Renko, M., Johnson, C. M., Rutherford, T. J., & Bienz, M. (2016). Wnt Signalosome Assembly by DEP Domain Swapping of Dishevelled. Molecular Cell, 64(1), 92–104. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.026

Gan, X., Wang, J., Xi, Y., Wu, Z., Li, Y., & Li, L. (2008). Nuclear Dvl, c-Jun, β-catenin, and TCF form a complex leading to stabiLization of β-catenin–TCF interaction. Journal of Cell Biology, 180(6), 1087–1100. https://doi.org/10.1083/jcb.200710050

Gao, C., & Chen, Y.-G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. Cellular Signalling, 22(5), 717–727. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.021

Gerhart, J. (2015). Cellular Basis of Morphogenetic Change: Looking Back after 30 Years of Progress on Developmental Signaling Pathways. In A. C. Love (Hrsg.), Conceptual Change in Biology: Scientific and Philosophical Perspectives on Evolution and Development (S. 175–197). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9412-1_8

Gerhart, J. C. (1980). Mechanisms Regulating Pattern Formation in the Amphibian Egg and Early Embryo. In R. F. Goldberger (Hrsg.), Biological Regulation and Development: Molecular Organization and Cell Function (S. 133–316). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9933-9_4

Gilbert, S. F., & Saxén, L. (1993). Spemann's organizer: Models and molecules. Mechanisms of Development, 41(2–3), 73–89. https://doi.org/10.1016/0925-4773(93)90039-z

Gilmour, D., Rembold, M., & Leptin, M. (2017). From morphogen to morphogenesis and back. Nature, 541(7637), 311–320. https://doi.org/10.1038/nature21348

Gómez-Skarmeta, J. L., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J., & Mayor, R. (1999). Xenopus brain factor-2 controls mesoderm, forebrain and neural crest development. Mechanisms of Development, 80(1), 15–27. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00190-7

Gonçalves, V., Matos, P., & Jordan, P. (2008). The β-catenin/TCF4 pathway modifies alternative splicing through modulation of SRp20 expression. RNA, 14(12), 2538–2549. https://doi.org/10.1261/rna.1253408

González, M., Cambiazo, V., & Maccioni, R. B. (1998). The interaction of Mip-90 with microtubules and actin filaments in human fibroblasts. Experimental Cell Research, 239(2), 243–253. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3875

Goold, R. G., Owen, R., & Gordon-Weeks, P. R. (1999). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. Journal of Cell Science, 112 (Pt 19), 3373–3384. https://doi.org/10.1242/jcs.112.19.3373

Gould, S. E., & Grainger, R. M. (1997). Neural induction and antero-posterior patterning in the amphibian embryo: Past, present and future. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 53(4), 319–338. https://doi.org/10.1007/pl00000609

Gradl, D., Kühl, M., & Wedlich, D. (1999). The Wnt/Wg Signal Transducer β-Catenin Controls Fibronectin Expression. Molecular and Cellular Biology, 19(8), 5576–5587. https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5576

Green, J. (1999). The Animal Cap Assay. In M. Guille (Hrsg.), Molecular Methods in Developmental Biology: Xenopus and Zebrafish (S. 1–13). Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-678-9:1

Groen, A. C., Cameron, L. A., Coughlin, M., Miyamoto, D. T., Mitchison, T. J., & Ohi, R. (2004). XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. Current Biology: CB, 14(20), 1801–1811. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.002

Gudimchuk, N. B., & McIntosh, J. R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 22(12), 777–795. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x

Gurdon, J. B., & Bourillot, P.-Y. (2001). Morphogen gradient interpretation. Nature, 413(6858), 797–803. https://doi.org/10.1038/35101500

Habas, R., & Dawid, I. B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: Is the nucleus the final frontier? Journal of Biology, 4(1), 2. https://doi.org/10.1186/jbiol22

Habas, R., Dawid, I. B., & He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. Genes & Development, 17(2), 295–309. https://doi.org/10.1101/gad.1022203

Habas, R., Kato, Y., & He, X. (2001). Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. Cell, 107(7), 843–854. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00614-6

Hagenlocher, C. M. (2016). Die Rolle von hmmr während Neurulation und Hirnentwicklung im Afrikanischen Krallenfrosch Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., & Anderton, B. H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. Neuroscience Letters, 147(1), 58–62. https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90774-2

Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D., & Turley, E. (1992). Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. Journal of Cell Biology, 117(6), 1343–1350. https://doi.org/10.1083/jcb.117.6.1343

Harland, R., & Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 13, 611–667. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.611

Hart, M., Concordet, J.-P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., & Polakis, P. (1999). The F-box protein β-TrCP associates with phosphorylated β-catenin and regulates its activity in the cell. Current Biology, 9(4), 207–211. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80091-8

Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1998). Downregulation of β-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β-catenin and GSK3β. Current Biology, 8(10), 573–581. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70226-X

He, Z., Mei, L., Connell, M., & Maxwell, C. A. (2020). Hyaluronan Mediated Motility Receptor (HMMR) Encodes an Evolutionarily Conserved Homeostasis, Mitosis, and Meiosis Regulator Rather than a Hyaluronan Receptor. Cells, 9(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/cells9040819

Heyd, F., & Lynch, K. W. (2011). DEGRADE, MOVE, REGROUP: Signaling control of splicing proteins. Trends in Biochemical Sciences, 36(8), 397–404. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.04.003

Hidalgo-Sánchez, M., Millet, S., Bloch-Gallego, E., & Alvarado-Mallart, R.-M. (2005). Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: The Otx2/Gbx2 boundary. Brain Research Reviews, 49(2), 134–149. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.01.010

Hofmann, M., Fieber, C., Assmann, V., Göttlicher, M., Sleeman, J., Plug, R., Howells, N., von Stein, O., Ponta, H., & Herrlich, P. (1998). Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. Journal of Cell Science, 111 (Pt 12), 1673–1684. https://doi.org/10.1242/jcs.111.12.1673

Hsu, W., Zeng, L., & Costantini, F. (1999). Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. The Journal of Biological Chemistry, 274(6), 3439–3445. https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3439

Huang, P., Senga, T., & Hamaguchi, M. (2007). A novel role of phospho-β-catenin in microtubule regrowth at centrosome. Oncogene, 26(30), 4357–4371. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210217

Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., & Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mechanisms of Development, 59(1), 3–10. https://doi.org/10.1016/0925-4773(96)00597-7

Hyer, J., Mima, T., & Mikawa, T. (1998). FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. Development, 125(5), 869–877. https://doi.org/10.1242/dev.125.5.869

Iglesias, D. M., Hueber, P.-A., Chu, L., Campbell, R., Patenaude, A.-M., Dziarmaga, A. J., Quinlan, J., Mohamed, O., Dufort, D., & Goodyer, P. R. (2007). Canonical WNT signaling during kidney development. American Journal of Physiology. Renal Physiology, 293(2), F494-500. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00416.2006

Itoh, K., Brott, B. K., Bae, G.-U., Ratcliffe, M. J., & Sokol, S. Y. (2005). Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/β-catenin signaling. Journal of Biology, 4(1), 3. https://doi.org/10.1186/jbiol20

Itoh, N. (2007). The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: Their evolutional processes and roles in development, metabolism, and disease. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 30(10), 1819–1825. https://doi.org/10.1248/bpb.30.1819

Jamieson, C., Lui, C., Brocardo, M. G., Martino-Echarri, E., & Henderson, B. R. (2015). Rac1 augments Wnt signaling by stimulating β-catenin-lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of β-catenin nuclear import. Journal of Cell Science, 128(21), 3933–3946. https://doi.org/10.1242/jcs.167742

Jiang, J., Casalegno-Garduno, R., Chen, H., Schmitt, A., Schmitt, M., & Maxwell, C. A. (2010). Multifunctional Proteins Bridge Mitosis with Motility and Cancer with Inflammation and Arthritis. The Scientific World Journal, 10, 1244–1257. https://doi.org/10.1100/tsw.2010.141

Jiang, J., Mohan, P., & Maxwell, C. A. (2013). The Cytoskeletal Protein RHAMM and ERK1/2 Activity Maintain the Pluripotency of Murine Embryonic Stem Cells. PLoS ONE, 8(9), e73548. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073548

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. https://doi.org/10.1242/dev.121.11.3651

Jones, C. M., & Smith, J. C. (2009). An Overview of Xenopus Development. In P. T. Sharpe & I. Mason (Hrsg.), Molecular Embryology: Methods and Protocols (S. 385–394). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-483-8_28

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596(7873), 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kahn, O. I., Schätzle, P., van de Willige, D., Tas, R. P., Lindhout, F. W., Portegies, S., Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2018). APC2 controls dendrite development by promoting microtubule dynamics. Nature Communications, 9(1), 2773. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05124-5

Kang, H.-G., Kim, W.-J., Kang, H.-G., Chun, K.-H., & Kim, S.-J. (2020). Galectin-3 Interacts with C/EBPβ and Upregulates Hyaluronan-Mediated Motility Receptor Expression in Gastric Cancer. Molecular Cancer Research, 18(3), 403–413. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0811

Karimi, K., Fortriede, J. D., Lotay, V. S., Burns, K. A., Wang, D. Z., Fisher, M. E., Pells, T. J., James-Zorn, C., Wang, Y., Ponferrada, V. G., Chu, S., Chaturvedi, P., Zorn, A. M., & Vize, P. D. (2018). Xenbase: A genomic, epigenomic and transcriptomic model organism database. Nucleic Acids Research, 46(Database issue), D861–D868. https://doi.org/10.1093/nar/gkx936

Keller, R. E. (1978). Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behavior during and prior to gastrulation in Xenopus laevis. Journal of Morphology, 157(2), 223–247. https://doi.org/10.1002/jmor.1051570209

Keller, R. E. (1980). The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in Xenopus laevis. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 60, 201–234.

Kiecker, C., & Niehrs, C. (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus. Development (Cambridge, England), 128(21), 4189–4201. https://doi.org/10.1242/dev.128.21.4189

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., & Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. International Review of Cell and Molecular Biology, 291, 21–71. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1

Kikuchi, K., & Arata, M. (2024). The interplay between Wnt signaling pathways and microtubule dynamics. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 60(5), 502–512. https://doi.org/10.1007/s11626-024-00860-z

Kikuchi, K., Nakamura, A., Arata, M., Shi, D., Nakagawa, M., Tanaka, T., Uemura, T., Fujimori, T., Kikuchi, A., Uezu, A., Sakamoto, Y., & Nakanishi, H. (2018). Map7/7D1 and Dvl form a feedback loop that facilitates microtubule remodeling and Wnt5a signaling. EMBO reports, 19(7), e45471. https://doi.org/10.15252/embr.201745471

Kim, H. Y., Jackson, T. R., & Davidson, L. A. (2017). On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions. Seminars in cell & developmental biology, 67, 113–122. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.05.011

Kishida, S., Yamamoto ,Hideki, Hino ,Shin-ichiro, Ikeda ,Satoshi, Kishida ,Michiko, & and Kikuchi, A. (1999). DIX Domains of Dvl and Axin Are Necessary for Protein Interactions and Their Ability To Regulate β-Catenin Stability. Molecular and Cellular Biology, 19(6), 4414–4422. https://doi.org/10.1128/MCB.19.6.4414

Kolliopoulos, C., Lin, C.-Y., Heldin, C.-H., Moustakas, A., & Heldin, P. (2019). Has2 natural antisense RNA and Hmga2 promote Has2 expression during TGFβ-induced EMT in breast cancer. Matrix Biology, 80, 29–45. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.09.002

Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science (New York, N.Y.), 275(5307), 1784–1787. https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784

Kouvidi, K., Berdiaki, A., Tzardi, M., Karousou, E., Passi, A., Nikitovic, D., & Tzanakakis, G. N. (2016). Receptor for hyaluronic acid- mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a β-catenin/c-myc signaling axis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1860(4), 814–824. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.019

Krylova, O., Messenger, M. J., & Salinas, P. C. (2000). Dishevelled-1 Regulates Microtubule Stability: A New Function Mediated by Glycogen Synthase Kinase-3β. Journal of Cell Biology, 151(1), 83–94. https://doi.org/10.1083/jcb.151.1.83

Kühl, M., & Pandur, P. (2008). Dorsal axis duplication as a functional readout for Wnt activity. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 469, 467–476. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-469-29

Kumari, A., Shriwas, O., Sisodiya, S., Santra, M. K., Guchhait, S. K., Dash, R., & Panda, D. (2021). Microtubule-targeting agents impair kinesin-2-dependent nuclear transport of β-catenin: Evidence of inhibition of Wnt/β-catenin signaling as an important antitumor mechanism of microtubule-targeting agents. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 35(4), e21539. https://doi.org/10.1096/fj.202002594R

Lee, G., Hynes, R., & Kirschner, M. (1984). Temporal and spatial regulation of fibronectin in early Xenopus development. Cell, 36(3), 729–740. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90353-2

Lee, J.-S., Leem, S.-H., Lee, S.-Y., Kim, S.-C., Park, E.-S., Kim, S.-B., Kim, S.-K., Kim, Y.-J., Kim, W.-J., & Chu, I.-S. (2010). Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 28(16), 2660–2667. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.0977

Li, W., Pan, T., Jiang, W., & Zhao, H. (2020). HCG18/miR-34a-5p/HMMR axis accelerates the progression of lung adenocarcinoma. Biomedicine & Pharmacotherapy, 129, 110217. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110217

Line, A., Slucka, Z., Stengrevics, A., Silina, K., Li, G., & Rees, R. C. (2002). Characterisation of tumour-associated antigens in colon cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 51(10), 574–582. https://doi.org/10.1007/s00262-002-0322-2

Little, S. C., & Mullins, M. C. (2006). Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis. Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews, 78(3), 224–242. https://doi.org/10.1002/bdrc.20079

Liu, A., & Joyner, A. L. (2001). Early Anterior/Posterior Patterning of the Midbrain and Cerebellum. Annual Review of Neuroscience, 24(Volume 24, 2001), 869–896. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.869

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., & He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell, 108(6), 837–847. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00685-2

Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., & Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(21), 8422–8426. https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8422

Lu, S.-X., Zhang, C. Z., Luo, R.-Z., Wang, C.-H., Liu, L.-L., Fu, J., Zhang, L., Wang, H., Xie, D., & Yun, J.-P. (2017). Zic2 promotes tumor growth and metastasis via PAK4 in hepatocellular carcinoma. Cancer Letters, 402, 71–80. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.018

Lucas, F. R., Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R., & Salinas, P. C. (1998). Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. Journal of Cell Science, 111 (Pt 10), 1351–1361. https://doi.org/10.1242/jcs.111.10.1351

Lynch, K. W. (2007). Regulation of alternative splicing by signal transduction pathways. Advances in Experimental Medicine and Biology, 623, 161–174. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77374-2_10

Ma, W., Chen, M., Kang, H., Steinhart, Z., Angers, S., He, X., & Kirschner, M. W. (2020). Single-molecule dynamics of Dishevelled at the plasma membrane and Wnt pathway activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(28), 16690–16701. https://doi.org/10.1073/pnas.1910547117

MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Developmental Cell, 17(1), 9–26. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016

Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R., & Mandelkow, E. (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. FEBS Letters, 314(3), 315–321. https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81496-9

Mariani, F. V., & Harland, R. M. (1998). XBF-2 is a transcriptional repressor that converts ectoderm into neural tissue. Development (Cambridge, England), 125(24), 5019–5031. https://doi.org/10.1242/dev.125.24.5019

Marsden, M., & DeSimone, D. W. (2001). Regulation of cell polarity, radial intercalation and epiboly in Xenopus: Novel roles for integrin and fibronectin. Development, 128(18), 3635–3647. https://doi.org/10.1242/dev.128.18.3635

Martin, G. S. (2003). Cell signaling and cancer. Cancer Cell, 4(3), 167–174. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00216-2

Mashal, R. D., Koontz, J., & Sklar, J. (1995). Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. Nature Genetics, 9(2), 177–183. https://doi.org/10.1038/ng0295-177

Maung, S. M. T. W., & Jenny, A. (2011). Planar cell polarity in Drosophila. Organogenesis, 7(3), 165–179. https://doi.org/10.4161/org.7.3.18143

Maurice, M. M., & Angers, S. (2025). Mechanistic insights into Wnt–β-catenin pathway activation and signal transduction. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 26(5), 371–388. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00823-y

Maxwell, C. A., Benítez, J., Gómez-Baldó, L., Osorio, A., Bonifaci, N., Fernández-Ramires, R., Costes, S. V., Guinó, E., Chen, H., Evans, G. J. R., Mohan, P., Català, I., Petit, A., Aguilar, H., Villanueva, A., Aytes, A., Serra-Musach, J., Rennert, G., Lejbkowicz, F., … Pujana, M. A. (2011). Interplay between BRCA1 and RHAMM regulates epithelial apicobasal polarization and may influence risk of breast cancer. PLoS Biology, 9(11), e1001199. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001199

Maxwell, C. A., Keats, J. J., Belch, A. R., Pilarski, L. M., & Reiman, T. (2005). Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. Cancer Research, 65(3), 850–860.

Maxwell, C. A., Keats, J. J., Crainie, M., Sun, X., Yen, T., Shibuya, E., Hendzel, M., Chan, G., & Pilarski, L. M. (2003). RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. Molecular Biology of the Cell, 14(6), 2262–2276. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0377

Maxwell, C. A., Rasmussen, E., Zhan, F., Keats, J. J., Adamia, S., Strachan, E., Crainie, M., Walker, R., Belch, A. R., Pilarski, L. M., Barlogie, B., Shaughnessy, J., Jr, & Reiman, T. (2004). RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. Blood, 104(4), 1151–1158. https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-4079

McGrew, L. L., Takemaru, K.-I., Bates, R., & Moon, R. T. (1999). Direct regulation of the Xenopus engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in Xenopus. Mechanisms of Development, 87(1), 21–32. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00136-7

McIntosh, I., A. Bellus, G., & Wang Jabs, E. (2000). The Pleiotropic Effects of Fibroblast Growth Factor Receptors in Mammalian Development. Cell Structure and Function, 25(2), 85–96. https://doi.org/10.1247/csf.25.85

McMahon, A. P., & Moon, R. T. (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in Xenopus embryos leads to duplication of the embryonic axis. Cell, 58(6), 1075–1084. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90506-0

Meier, C., Spitschak, A., Abshagen, K., Gupta, S., Mor, J. M., Wolkenhauer, O., Haier, J., Vollmar, B., Alla, V., & Pützer, B. M. (2014). Association of RHAMM with E2F1 promotes tumour cell extravasation by transcriptional up-regulation of fibronectin. The Journal of Pathology, 234(3), 351–364. https://doi.org/10.1002/path.4400

Michiue, T., Danno, H., Tanibe, M., Ikuzawa, M., & Asashima, M. (2007). Xenopus galectin-VIa shows highly specific expression in cement glands and is regulated by canonical Wnt signaling. Gene Expression Patterns: GEP, 7(8), 852–857. https://doi.org/10.1016/j.modgep.2007.07.001

Miller, J. R., Rowning, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L., & Moon, R. T. (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. The Journal of Cell Biology, 146(2), 427–437. https://doi.org/10.1083/jcb.146.2.427

Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., & Tsukita, S. (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. Current Biology, 10(14), 865–868. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00600-X

Modrek, B., Resch, A., Grasso, C., & Lee, C. (2001). Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. Nucleic Acids Research, 29(13), 2850–2859. https://doi.org/10.1093/nar/29.13.2850

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destrée, O., & Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell, 86(3), 391–399. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80112-9

Moon, R. T., & Shah, K. (2002). Signalling polarity. Nature, 417(6886), 239–240. https://doi.org/10.1038/417239a

Morenilla-Palao, C., López-Cascales, M. T., López-Atalaya, J. P., Baeza, D., Calvo-Díaz, L., Barco, A., & Herrera, E. (2020). A Zic2-regulated switch in a noncanonical Wnt/βcatenin pathway is essential for the formation of bilateral circuits. Science Advances, 6(46), eaaz8797. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz8797

Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F., & Meredith, D. M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. Oncogene, 17(26), 3471–3477. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202247

Muenke, M., & Beachy, P. A. (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. Current Opinion in Genetics & Development, 10(3), 262–269. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00084-8

Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(7), 3046–3050. https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.3046

Murillo, B., Ruiz-Reig, N., Herrera, M., Fairén, A., & Herrera, E. (2015). Zic2 Controls the Migration of Specific Neuronal Populations in the Developing Forebrain. Journal of Neuroscience, 35(32), 11266–11280. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0779-15.2015

Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., & Mikoshiba, K. (1998). Xenopus Zic family and its role in neural and neural crest development1. Mechanisms of Development, 75(1), 43–51. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00073-2

Nakatsuji, N., & Johnson, K. E. (1983). Comparative study of extracellular fibrils on the ectodermal layer in gastrulae of five amphibian species. Journal of Cell Science, 59(1), 61–70. https://doi.org/10.1242/jcs.59.1.61

Nakayama, T., Blitz, I. L., Fish, M. B., Odeleye, A. O., Manohar, S., Cho, K. W. Y., & Grainger, R. M. (2014). Cas9-based genome editing in Xenopus tropicalis. Methods in Enzymology, 546, 355–375. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00017-9

Newport, J., & Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell, 30(3), 675–686. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90272-0

Nickel, A. (2020). Entstehung und Morphogenese des Vorderhirns—Die Rolle des mit Mikrotubuli assoziierten Proteins Hmmr in Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(12), 767–779. https://doi.org/10.1038/nrm3470

Niehrs, C. (2022). The role of Xenopus developmental biology in unraveling Wnt signalling and antero-posterior axis formation. Developmental Biology, 482, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.11.006

Niehrs, C., Kazanskaya, O., Wu, W., & Glinka, A. (2001). Dickkopf1 and the Spemann-Mangold head organizer. The International Journal of Developmental Biology, 45(1), 237–240.

Nieuwkoop†, P. D. (1997). Short historical survey of pattern formation in the endo-mesoderm and the neural anlage in the vertebrates: The role of vertical and planar inductive actions. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 53(4), 305–318. https://doi.org/10.1007/PL00000608

Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1994). Normal table of Xenopus laevis (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. New York and London: Garland . Publishing, Inc.

Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. Cell, 169(6), 985–999. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016

Nusse, R., & Varmus, H. (2012). Three decades of Wnts: A personal perspective on how a scientific field developed. The EMBO Journal, 31(12), 2670–2684. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.146

Nusse, R., & Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell, 31(1), 99–109. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3

Oltean, S., & Bates, D. O. (2014). Hallmarks of alternative splicing in cancer. Oncogene, 33(46), 5311–5318. https://doi.org/10.1038/onc.2013.533

Ossipova, O., Chu, C.-W., Fillatre, J., Brott, B. K., Itoh, K., & Sokol, S. Y. (2015). The involvement of PCP proteins in radial cell intercalations during Xenopus embryonic development. Developmental Biology, 408(2), 316–327. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.06.013

Ossipova, O., Chuykin, I., Chu, C.-W., & Sokol, S. Y. (2015). Vangl2 cooperates with Rab11 and Myosin V to regulate apical constriction during vertebrate gastrulation. Development, 142(1), 99–107. https://doi.org/10.1242/dev.111161

Ozawa, M., Baribault, H., & Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. The EMBO Journal, 8(6), 1711–1717. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03563.x

Pan, W. J., Pang, S. Z., Huang, T., Guo, H. Y., Wu, D., & Li, L. (2004). Characterization of Function of Three Domains in Dishevelled-1: DEP Domain is Responsible for Membrane Translocation of Dishevelled-1. Cell Research, 14(4), 324–330. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290232

Papakrivopoulou, E., Dean, C. H., Copp, A. J., & Long, D. A. (2014). Planar cell polarity and the kidney. Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 29(7), 1320–1326. https://doi.org/10.1093/ndt/gft484

Park, J.-S., Valerius, M. T., & McMahon, A. P. (2007). Wnt/β-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. Development, 134(13), 2533–2539. https://doi.org/10.1242/dev.006155

Peshkin, L., Lukyanov, A., Kalocsay, M., Gage, R. M., Wang, D., Pells, T. J., Karimi, K., Vize, P. D., Wühr, M., & Kirschner, M. W. (2019). The protein repertoire in early vertebrate embryogenesis (S. 571174). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/571174

Pinson, J., Simpson, T. I., Mason, J. O., & Price, D. J. (2006). Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells. BMC Developmental Biology, 6, 25. https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-25

Pourebrahim, R., Houtmeyers, R., Ghogomu, S., Janssens, S., Thelie, A., Tran, H. T., Langenberg, T., Vleminckx, K., Bellefroid, E., Cassiman, J.-J., & Tejpar, S. (2011). Transcription Factor Zic2 Inhibits Wnt/β-Catenin Protein Signaling. Journal of Biological Chemistry, 286(43), 37732–37740. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242826

Prager, A., Hagenlocher, C., Ott, T., Schambony, A., & Feistel, K. (2017). Hmmr mediates anterior neural tube closure and morphogenesis in the frog Xenopus. Developmental Biology, 430(1), 188–201. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.020

R Core Team. (2021). A Language and Environment für Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.

Ramel, M.-C., & Hill, C. S. (2012). Spatial regulation of BMP activity. FEBS Letters, 586(14), 1929–1941. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.035

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R. (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell, 50(4), 649–657. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90038-9

Rosso, S. B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A., & Salinas, P. C. (2005). Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. Nature Neuroscience, 8(1), 34–42. https://doi.org/10.1038/nn1374

Rowning, B. A., Wells, J., Wu, M., Gerhart, J. C., Moon, R. T., & Larabell, C. A. (1997). Microtubule-mediated transport of organelles and localization of β-catenin to the future dorsal side of Xenopus eggs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(4), 1224–1229. https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1224

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1996). Binding of GSK3β to the APC-β-Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. Science, 272(5264), 1023–1026. https://doi.org/10.1126/science.272.5264.1023

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1993). Association of the APC Gene Product with β-Catenin. Science, 262(5140), 1731–1734. https://doi.org/10.1126/science.8259518

Ruiz i Altaba, A. (1993). Induction and axial patterning of the neural plate: Planar and vertical signals. Journal of Neurobiology, 24(10), 1276–1304. https://doi.org/10.1002/neu.480241004

Sakanaka, C. (2002). Phosphorylation and regulation of beta-catenin by casein kinase I epsilon. Journal of Biochemistry, 132(5), 697–703. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003276

Salinas, P. C. (2007). Modulation of the microtubule cytoskeleton: A role for a divergent canonical Wnt pathway. Trends in Cell Biology, 17(7), 333–342. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.003

Satoh, N. (1977). 'Metachronous' Cleavage and Initiation of Gastrulation in Amphibian Embryos. Development, Growth & Differentiation, 19(2), 111–117. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1977.00111.x

Sätzler, C. E. C. de M. (2023). Analyse der subzellulären Lokalisierung von Hmmr-Varianten und deren Funktion bei der Organogenese von Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Schier, A. F. (2003). Nodal signaling in vertebrate development. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 19, 589–621. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.041603.094522

Schlesinger, A., Shelton, C. A., Maloof, J. N., Meneghini, M., & Bowerman, B. (1999). Wnt pathway components orient a mitotic spindle in the early Caenorhabditis elegans embryo without requiring gene transcription in the responding cell. Genes & Development, 13(15), 2028–2038. https://doi.org/10.1101/gad.13.15.2028

Schlüter, M. A., & Margolis, B. (2009). Apical lumen formation in renal epithelia. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 20(7), 1444–1452. https://doi.org/10.1681/ASN.2008090949

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods, 9(7), 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Schön, T. (2015). Die Rolle von Mikrotubuli für Zellmigration und Zelladhäsion beim anterioren Neuralrohrschluss. Universität Hohenheim.

Schroeder, T. E. (1970). Neurulation in Xenopus laevis. An analysis and model based upon light and electron microscopy. Development, 23(2), 427–462. https://doi.org/10.1242/dev.23.2.427

Schwab, R. H. M., Amin, N., Flanagan, D. J., Johanson, T. M., Phesse, T. J., & Vincan, E. (2018). Wnt is necessary for mesenchymal to epithelial transition in colorectal cancer cells. Developmental Dynamics, 247(3), 521–530. https://doi.org/10.1002/dvdy.24527

Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J. G., Kikuchi, A., Higuchi, Y., & Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. Nature Structural & Molecular Biology, 14(6), 484–492. https://doi.org/10.1038/nsmb1247

Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J. B., Simakov, O., Putnam, N., … Rokhsar, D. S. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog Xenopus laevis. Nature, 538(7625), 336–343. https://doi.org/10.1038/nature19840

Shen, M. M. (2007). Nodal signaling: Developmental roles and regulation. Development, 134(6), 1023–1034. https://doi.org/10.1242/dev.000166

Shi, J., Wang, E., Milazzo, J. P., Wang, Z., Kinney, J. B., & Vakoc, C. R. (2015). Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. Nature Biotechnology, 33(6), 661–667. https://doi.org/10.1038/nbt.3235

Signoret, J., & Lefresne, J. (1971). Contribution a l'etude de la segmentation de l'oef d'axolotl. I. Definition de la transition blastuleenne. 4(Ann. Embryol. Morphogen.), 113–123.

Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O. A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., & Walz, G. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. Nature Genetics, 37(5), 537–543. https://doi.org/10.1038/ng1552

Simons, M., & Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: From fly development to human disease. Annual Review of Genetics, 42, 517–540. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091432

Sive, H. L., Hattori, K., & Weintraub, H. (1989). Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in Xenopus laevis. Cell, 58(1), 171–180. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90413-3

Smits, A. H., Ziebell, F., Joberty, G., Zinn, N., Mueller, W. F., Clauder-Münster, S., Eberhard, D., Fälth Savitski, M., Grandi, P., Jakob, P., Michon, A.-M., Sun, H., Tessmer, K., Bürckstümmer, T., Bantscheff, M., Steinmetz, L. M., Drewes, G., & Huber, W. (2019). Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. Nature Methods, 16(11), 1087–1093. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0614-5

Sobrado, P., Jedlicki, A., Bustos, V. H., Allende, C. C., & Allende, J. E. (2005). Basic region of residues 228–231 of protein kinase CK1α is involved in its interaction with axin: Binding to axin does not affect the kinase activity. Journal of Cellular Biochemistry, 94(2), 217–224. https://doi.org/10.1002/jcb.20350

Sokol, S. (2000). A role for Wnts in morpho-genesis and tissue polarity. Nature Cell Biology, 2(7), E124–E125. https://doi.org/10.1038/35017136

Sokol, S. Y. (2011). Wnt signaling through T-cell factor phosphorylation. Cell Research, 21(7), 1002–1012. https://doi.org/10.1038/cr.2011.86

Sokol, S. Y. (2015). Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. Seminars in Cell & Developmental Biology, 42, 78–85. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.05.002

Sokol, S. Y., Klingensmith, J., Perrimon, N., & Itoh, K. (1995). Dorsalizing and neuralizing properties of Xdsh, a maternally expressed Xenopus homolog of dishevelled. Development (Cambridge, England), 121(6), 1637–1647. https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1637

Soltys, V. (2017). Die Rolle des mikrotubuli-assoziierten Proteins Hmmr beim Neuralrohrschluss in Xenopus laevis – funktionelle Analyse von radiärer Zellinterkalation in Abhängigkeit von Mikrotubuli. Universität Hohenheim.

Sonnen, K. F., & Janda, C. Y. (2021). Signalling dynamics in embryonic development. Biochemical Journal, 478(23), 4045–4070. https://doi.org/10.1042/BCJ20210043

Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik, 100(3), 599–638. https://doi.org/10.1007/BF02108133

Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The β-catenin destruction complex. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(1), a007898. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898

Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., & McMahon, A. P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. Nature, 372(6507), 679–683. https://doi.org/10.1038/372679a0

Stern, C. D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: How many organizers? Nature Reviews. Neuroscience, 2(2), 92–98. https://doi.org/10.1038/35053563

Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C., & Gruss, P. (1996). Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. Development, 122(11), 3453–3465. https://doi.org/10.1242/dev.122.11.3453

Szabó, A., Cobo, I., Omara, S., McLachlan, S., Keller, R., & Mayor, R. (2016). The Molecular Basis of Radial Intercalation during Tissue Spreading in Early Development. Developmental Cell, 37(3), 213–225. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.008

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. Cell, 139(5), 871–890. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007

Tilghman, J., Wu, H., Sang, Y., Shi, X., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., Eberhart, C. G., Laterra, J., & Ying, M. (2014). HMMR Maintains the Stemness and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Research, 74(11), 3168–3179. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2103

Torres, M. A., & Nelson, W. J. (2000). Colocalization and Redistribution of Dishevelled and Actin during WNT-Induced Mesenchymal Morphogenesis. Journal of Cell Biology, 149(7), 1433–1442. https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1433

Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L., & Moon, R. T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development. The Journal of Cell Biology, 133(5), 1123–1137. https://doi.org/10.1083/jcb.133.5.1123

van Amerongen, R., & Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Development (Cambridge, England), 136(19), 3205–3214. https://doi.org/10.1242/dev.033910

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., … Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. Nucleic Acids Research, 50(D1), D439–D444. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061

Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Žídek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., … Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: Providing structure coverage for over 214 million protein sequences. Nucleic Acids Research, 52(D1), D368–D375. https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011

Venables, J. P., Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Koh, C., Gervais-Bird, J., Lapointe, E., Froehlich, U., Durand, M., Gendron, D., Brosseau, J.-P., Thibault, P., Lucier, J.-F., Tremblay, K., Prinos, P., Wellinger, R. J., Chabot, B., Rancourt, C., & Elela, S. A. (2008). Identification of Alternative Splicing Markers for Breast Cancer. Cancer Research, 68(22), 9525–9531. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1769

von Dassow, G., Schmidt, J. E., & Kimelman, D. (1993). Induction of the Xenopus organizer: Expression and regulation of Xnot, a novel FGF and activin-regulated homeo box gene. Genes & Development, 7(3), 355–366. https://doi.org/10.1101/gad.7.3.355

Vuong, L. T., Mukhopadhyay, B., & Choi, K.-W. (2014). Kinesin-II recruits Armadillo and Dishevelled for Wingless signaling in Drosophila. Development (Cambridge, England), 141(16), 3222–3232. https://doi.org/10.1242/dev.106229

Walck-Shannon, E., & Hardin, J. (2014). Cell intercalation from top to bottom. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 15(1), 34–48. https://doi.org/10.1038/nrm3723

Wallingford, J. B. (2005). Neural tube closure and neural tube defects: Studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 135C(1), 59–68. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30054

Wallingford, J. B., Fraser, S. E., & Harland, R. M. (2002). Convergent Extension: The Molecular Control of Polarized Cell Movement during Embryonic Development. Developmental Cell, 2(6), 695–706. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00197-1

Wallingford, J. B., & Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. Development, 132(20), 4421–4436. https://doi.org/10.1242/dev.02068

Wallingford, J. B., Niswander, L. A., Shaw, G. M., & Finnell, R. H. (2013). The Continuing Challenge of Understanding, Preventing, and Treating Neural Tube Defects. Science, 339(6123), 1222002. https://doi.org/10.1126/science.1222002

Walston, T., Tuskey, C., Edgar, L., Hawkins, N., Ellis, G., Bowerman, B., Wood, W., & Hardin, J. (2004). Multiple Wnt signaling pathways converge to orient the mitotic spindle in early C. elegans embryos. Developmental Cell, 7(6), 831–841. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.008

Walther, C., & Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. Development, 113(4), 1435–1449. https://doi.org/10.1242/dev.113.4.1435

Weaver, C., Farr, G. H., Pan, W., Rowning, B. A., Wang, J., Mao, J., Wu, D., Li, L., Larabell, C. A., & Kimelman, D. (2003). GBP binds kinesin light chain and translocates during cortical rotation in Xenopus eggs. Development (Cambridge, England), 130(22), 5425–5436. https://doi.org/10.1242/dev.00737

Weston, C. R., & Davis, R. J. (2001). Signaling Specificity—A Complex Affair. Science, 292(5526), 2439–2440. https://doi.org/10.1126/science.1063279

Wielath, F. (2016). Expression der kleinen GTPase rnd1 im afrikanischen Krallenfrosch Xenopus laevis und deren Abhängigkeit von Rab7. Universität Hohenheim.

Wielath, F. (2019). Funktionelle Analyse einer Endosomen-assoziierten Rolle von Dnah9 im FGF-Signalweg in Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Wiener, D., Gajardo-Meneses, P., Ortega-Hernández, V., Herrera-Cares, C., Díaz, S., Fernández, W., Cornejo, V., Gamboa, J., Tapia, T., Alvarez, C., & Carvallo, P. (2015). BRCA1 and BARD1 colocalize mainly in the cytoplasm of breast cancer tumors, and their isoforms show differential expression. Breast Cancer Research and Treatment, 153(3), 669–678. https://doi.org/10.1007/s10549-015-3575-0

Wiest, B. S. J. (2022). Funktionelle Analyse der Interaktion von Hmmr mit Mikrotubuli bei der Entwicklung des Vorderhirns in Xenopus laevis. Universität Hohenheim.

Winklbauer, R. (1998). Conditions for fibronectin fibril formation in the early Xenopus embryo. Developmental Dynamics, 212(3), 335–345. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3<335::AID-AJA1>3.0.CO;2-I

Winston, J. T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C. Y., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (1999). The SCFβ-TRCP–ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IκBα and β-catenin and stimulates IκBα ubiquitination in vitro. Genes & Development, 13(3), 270–283.

Wong, H.-C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.-J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.-L., & Zheng, J. (2003). Direct Binding of the PDZ Domain of Dishevelled to a Conserved Internal Sequence in the C-Terminal Region of Frizzled. Molecular Cell, 12(5), 1251–1260. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00427-1

Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A., & Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. Cell, 133(2), 340–353. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.052

Wurst, W., & Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmic organizer. Nature Reviews Neuroscience, 2(2), 99–108. https://doi.org/10.1038/35053516

Xu, Z., Zheng, J., Chen, Z., Guo, J., Li, X., Wang, X., Qu, C., Yuan, L., Cheng, C., Sun, X., & Yu, J. (2021). Multilevel regulation of Wnt signaling by Zic2 in colon cancer due to mutation of β-catenin. Cell Death & Disease, 12(6), 584. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03863-w

Yang, B., Hall, C. L., Yang, B. L., Savani, R. C., & Turley, E. A. (1994). Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformed cells. Journal of Cellular Biochemistry, 56(4), 455–468. https://doi.org/10.1002/jcb.240560406

Yang, B., Zhang, L., & Turley, E. A. (1993). Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. The Journal of Biological Chemistry, 268(12), 8617–8623.

Yang, D., Ma, Y., Zhao, P., Ma, J., & He, C. (2021). HMMR is a downstream target of FOXM1 in enhancing proliferation and partial epithelial-to-mesenchymal transition of bladder cancer cells. Experimental Cell Research, 408(2), 112860. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112860

Yang, Y., & Mlodzik, M. (2015). Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: Cellular orientation by facing the wind (Wnt). Annual Review of Cell and Developmental Biology, 31, 623–646. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125315

Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., Wynshaw-Boris, A., Hsieh, J.-C., & He, X. (2008). Initiation of Wnt signaling: Control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. Development (Cambridge, England), 135(2), 367–375. https://doi.org/10.1242/dev.013540

Zhang, D., Liu, J., Xie, T., Jiang, Q., Ding, L., Zhu, J., & Ye, Q. (2020). Oleate acid-stimulated HMMR expression by CEBPα is associated with nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. International Journal of Biological Sciences, 16(15), 2812–2827. https://doi.org/10.7150/ijbs.49785

Zhao, Z., Wang, L., Bartom, E., Marshall, S., Rendleman, E., Ryan, C., Shilati, A., Savas, J., Chandel, N., & Shilatifard, A. (2019). β-Catenin/Tcf7l2–dependent transcriptional regulation of GLUT1 gene expression by Zic family proteins in colon cancer. Science Advances, 5(7), eaax0698. https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0698

Zhu, P., Wang, Y., He, L., Huang, G., Du, Y., Zhang, G., Yan, X., Xia, P., Ye, B., Wang, S., Hao, L., Wu, J., & Fan, Z. (2015). ZIC2-dependent OCT4 activation drives self-renewal of human liver cancer stem cells. The Journal of Clinical Investigation, 125(10), 3795–3808. https://doi.org/10.1172/JCI81979

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation blicke ich mit großer Dankbarkeit auf eine intensive, lehrreiche und in vielerlei Hinsicht lebensverändernde Zeit zurück – und auf viele Menschen, die diesen Weg mit mir gegangen sind.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Kerstin Feistel, die mich nicht nur fachlich begleitet, sondern auch menschlich bestärkt und inspiriert hat. Ihre Offenheit und Geduld, aber vor allem auch die freundschaftliche und herzliche Begleitung haben meine Promotionszeit nachhaltig geprägt. Für das Vertrauen, den Raum für persönliche Entfaltung und die vielen gemeinsamen Gespräche – sei es über Wissenschaft oder das Leben – danke ich von Herzen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Armin Huber für sein Interesse an meinem Thema und die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu begleiten.

Ein ebenso großes Dankeschön geht an meine Kollegen und Kolleginnen des Fachgebiets Zoologie, mit denen ich nicht nur Experimente, Zweifel und Erfolge teilen durfte, sondern auch viele besondere Momente jenseits der Laborbank. Dabei sind einige Freundschaften entstanden, die diese Zeit für mich unvergesslich gemacht haben. Einigen davon möchte ich herzlich für alle Korrekturen bezüglich meiner Arbeit danken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden von Herzen, für die unermüdliche Unterstützung, das Verständnis und liebevolle Art, die sie mir jederzeit entgegengebracht haben. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen, wie ich es jetzt bin!

Diese Arbeit ist nicht nur das Ergebnis wissenschaftlicher Ausdauer und Neugier, sondern wurde begleitet von ganz persönlichem Wachstum, neuen Perspektiven – und der ein oder anderen Zellteilung auch fernab des Labors. Ein ganz besonderes, erfolgreiches entwicklungsbiologisches Experiment hat in dieser Zeit ebenfalls Form angenommen – und liefert seither täglich neue, faszinierende Einblicke in die Welt der Entwicklungsbiologie!