

**Funktionelle Analyse der Histondeacetylase 6 sowie
experimentelle Modellierung von Lateralitätsdefekten während
der Links-Rechts-Achsenentwicklung von *Xenopus laevis* und
*Paracentrotus lividus***

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

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Zoologie

vorgelegt von

Matthias Konrad Tisler

aus Freudenstadt

2017

1. Prodekan: **Prof. Dr. Lutz Graeve**

1. berichtende Person: **Prof. Dr. Martin Blum**

2. berichtende Person: **Prof. Dr. Heinz Breer**

Eingereicht am: **23.03.2017**

Mündliche Prüfung am: **20.07.2017**

Die vorliegende Arbeit wurde am **27.03.2017** von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.



Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Funktionelle Analyse der Histondeacetylase 6 sowie experimentelle Modellierung von Lateralitätsdefekten während der Links-Rechts-Achsenentwicklung von *Xenopus laevis* und *Paracentrotus lividus*.

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

Zusammenfassung

Wirbeltiere weisen eine asymmetrische Positionierung der viszeralen Organe auf, die als Links-Rechts-Körperachse bezeichnet wird. Ausgehend von einem bilateral-symmetrisch angelegten Embryo wird im Zug der Embryonalentwicklung eine asymmetrische Genexpression nachweisbar, die ihre Ursache in einem innerhalb der Deuterostomier evolutionär-konservierten Symmetriebruch findet.

In Stadien der Neurulation generieren rotierende Monocilien im Bereich des sogenannten Links-Rechts-Organisators (LRO) einen asymmetrischen Stimulus in Form eines extrazellulären, linksgerichteten Flüssigkeitsstroms, der maßgeblich für die unilateral-linke Genexpression der Lateralitäts-vermittelnden Nodal-Kaskade ist. Spontane Mutationen oder experimentell induzierte Funktionsverluste in bzw. von Genen, die Einfluss auf die Ciliogenese im Bereich des LRO, die Induktion der Nodal-Kaskade oder deren Weiterleitung nehmen, manifestieren sich in Lateralitätsdefekten. Lateralitätsdefekte treten frequent in siamesischen Zwillingen des Menschen auf. Thorakopage, dicephale siamesische Zwillinge weisen Defekte des Arrangements der inneren Organe auf, die sich ausschließlich im zur rechten Seite positionierten Zwilling als Randomisierung des Eingeweide *Situs* nachweisen lassen. Die funktionelle Ursache dieser zufälligen Anordnung in rechten Zwillingen blieb bislang unverstanden. Hypothesiert wurde, dass die beobachtete Lateralitätsentwicklung - entsprechend zum wildtypischen Embryo - auf den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom zurückgeführt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vorab beschriebene unilaterale Induktion der Nodal-Kaskade im linken Zwilling, entsprechend zum Symmetriebruch in wildtypischen Embryonen, auf den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom zurückgeführt werden kann. Die artifizielle Induktion einer zweiten Hauptkörperachse führt zur Duplikation des LROs. Endogene sowie induzierte LROs positionieren sich während der Stadien des Symmetriebruchs in räumlicher Nähe und weisen eine partielle Fusion der lateralen Zellpopulationen auf. Ein durch Morpholino Oligomer oder Methylcellulose vermittelter Verlust der Cilienmotilität resultierte in Defekten der Nodal-Kaskade im linken Seitenplattenmesoderm linker Zwillinge. Durch Kombination differenzieller Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Strategien war es möglich, die Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie siamesischer Zwillingen auf den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom zu beziehen und vorhersagbar zu manipulieren. Die Ursache der erstmals durch Hans Spemann und Kollegen im Tiermodell induzierten, aber bislang enigmatischen Lateralitätsdefekte siamesischer Zwillinge können somit ebenfalls durch diesen evolutionär-konservierten Mechanismus beschrieben werden. Obwohl der generelle Mechanismus des Symmetriebruchs bereits charakterisiert wurde, werden kontinuierlich neue Kandidatengene identifiziert, die eine Funktion in einer Sequenz des Symmetriebruchs übernehmen. Als ein neues Kandidatengenes der Links-Rechts-Achsenentwicklung konnte die *histoneacetylase 6 (hdac6)* in *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Antisense

Morpholino Oligomer-vermittelte Funktionsverluste führen zu dosisabhängigen Defekten der Expression der Gene der Nodal-Kaskade und weisen auf einen Wirkmechanismus von Hdac6 vor der Flüssigkeitsstrom-abhängigen *dand5*-Regulation hin. Funktionell konnte der Hdac6 eine Rolle in der Wnt-abhängigen Induktion eines Hauptregulators der Biogenese motiler Cilien, des Transkriptionsfaktors *Foxj1*, *in vivo* nachgewiesen werden. Der Hdac6 Funktionsverlust führt zu Defekten der Ciliogenese im Bereich des LROs sowie der embryonalen Epidermis. Die dargestellten Experimente stellen eine entwicklungsbiologische Relevanz von Hdac6 nach Funktionsverlust dar, die bislang nicht aus *Hdac6*^{-/-} Mäusen bekannt war und welche die Sichtweise auf differenzielle *in vivo* Wirkmechanismen dieser Histondeacetylase erweitern.

Obwohl die asymmetrische Positionierung der inneren Organe auf Wirbeltiere beschränkt ist, erweist sich die Nodal-Kaskade sowie deren unilateral-asymmetrische Expression in Embryonen der Deuterostomier als evolutionär-konserviert. Vergleichbar zu den Wirbeltieren, ist auch in deren phylogenetischer Schwestergruppe, den Echinodermaten, eine asymmetrische Expression der Nodal-Kaskade nachweisbar. Embryonen des Steinseeigels (*Paracentrotus lividus*; Stachelhäuter) weisen, entsprechend zu Wirbeltierembryonen, eine asymmetrische Expression der Kaskade im Ektoderm später Gastrulastadien auf. Durch Experimente der vorliegenden Arbeit konnte ein auf Cilien basierter Symmetriebruch auch für Seeigelembryonen demonstriert werden. Hierbei war es möglich, das mit motilen Monocilien ausgekleidete Archenteron der Seeigelembryonen als homologe Struktur zu den Links-Rechts Organisatoren der Wirbeltiere zu beschreiben. Decilierungsexperimente, die Lateralitätsdefekte induzieren, weisen auf einen Symmetriebruch während der frühen Gastrulation hin. Durch diese Experimente konnte der auf motilen Monocilien basierte Symmetriebruch als eine Synapomorphie der Deuterostomier charakterisiert werden, der das Verständnis der molekularen Etablierung asymmetrischer Genexpression ausweitet.

Abstract

Vertebrates display an asymmetric positioning of the visceral organs, which is also denominated as left-right body axis. During embryogenesis, an asymmetric gene expression is detectable that is initiated by an evolutionary conserved mechanism of symmetry breakage, which is conserved among deuterostomes.

During neurula stages, rotating motile mono-cilia at the so called left-right organizer (LRO) generate an asymmetric stimulus known as extracellular leftward fluid flow that is essential for the unilateral left asymmetric gene expression of the Nodal cascade. Spontaneous mutations or the experimentally induced loss of function of genes influencing ciliogenesis at the LRO, the induction of the Nodal cascade or its propagation lead to left-right defects. Left-right defects are frequently observed in human conjoined twins. Thoracopagus, dicephalic conjoined twins display defects in the arrangement of the inner organs, that are solely reported from the twin located to the right side. While left twins orient the inner organs wildtypically, right twins show a randomization of the left-right axis. The functional cause of the inverted arrangement regarding the right twin has remained enigmatic. It has been hypothesized that the observed laterality determination in conjoined twins, like in wildtype embryos, was dependent on leftward flow.

In the course of this thesis, the known unilateral left-sided induction of the Nodal cascade in the left conjoined twin, as in singleton embryos, can be linked to leftward flow. The artificial induction of a second body axis leads to a subsequent duplication of the LRO during development. During flow stages endogenous and induced LROs locate in close proximity and display a partial fusion of cell populations. Anti-sense Morpholino Oligomeres or methylcellulose mediated loss of cilia motility lead to a loss of marker gene expression in the left-lateral plate mesoderm of the left twin. By combining differential gain- and loss-of-function strategies, it was possible to link the establishment of laterality in conjoined twins to the leftward flow and, moreover, to manipulate it in a predictable manner. The cause of this hitherto enigmatic laterality defects in conjoined twins can therefore be explained by the evolutionary conserved mechanism of left-right establishment.

Although the general mechanism of symmetry breakage has been characterized, novel candidate genes are continuously being identified that act at a specific sequence of this process. The candidate gene *histone deacetylase 6 (hdac6)* was shown to impact on left-right development. Anti-sense Morpholino Oligomere induced loss-of-function experiments led to left-right defects in a dose dependent manner regarding, the induction of the genes of the Nodal cascade, indicating a function of *hdac6* before fluid flow induced regulation of *dand5* mRNA. Taken together: histone deacetylase 6 acts as modulator of canonical Wnt-signaling in the transcriptional induction of the Wnt-dependent transcription of *foxj1*, a master control gene of the biogenesis of motile cilia.

Loss of Hdac6 leads to defects regarding the ciliogenesis of motile cilia at the LRO as well as the multiciliated epidermis of the embryo. The here presented results represent the first developmental

hdac6 loss-of-function phenotype, which was so far not known from *Hdac6*^{-/-} mice. These experiments shed a new light on the differential *in vivo* function of this unique histone deacetylase during development.

Even though the asymmetric positioning of the inner organs is restricted to vertebrates, the asymmetric expression of the Nodal cascade turns out to be evolutionarily conserved among deuterostomes. Comparable to vertebrate species, larvae of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Echinodermata) display an asymmetric expression of the Nodal cascade in the ectoderm during gastrula stages. Experiments from this work could demonstrate that also in sea urchin embryos the asymmetric gene expression depends on motile cilia. The archenteron of gastrula stage embryos was identified and described as homologous structure to vertebrate LROs. Deciliation experiments at different time points of development induce laterality defects and point towards a symmetry breakage during early gastrulation. By these experiments, the cilia-dependent establishment of left-right asymmetry is described as a common synapomorphy of the deuterostomes being conserved from sea urchin to vertebrates, shedding a new light on the establishment of asymmetric gene expression.

Übersicht der Kapitel

Die vorliegende Dissertation umfasst vier Kapitel, die sich projektübergreifend der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie während der frühen Embryonalentwicklung widmen. Entsprechend der Kennzeichnung wurden die Kapitel bereits in englischsprachigen Peer-Review-Journalen veröffentlicht oder befinden sich in der Vorbereitung dazu.

Kapitel 1

Tisler, M., Ott, T., Landua, S.-L., Fiebig, M., Fietz, A., Thumberger, T., Schweickert, A., and Blum, M. *Histonedeacetylase 6 acts as modulator of canonical Wnt-signaling in cilia-mediated symmetry breakage.* (in Vorbereitung).

Kapitel 2

Tisler, M., Schweickert, A., and Blum, M. *Xenopus* an ideal model organism to study laterality in conjoined twins. (2017). *Genesis* 55, (1-2).

Kapitel 3

Tisler, M., Thumberger, T., Schneider, I., Schweickert, A., and Blum, M. *Leftward flow determines laterality in conjoined twins.* (2017). *Current Biology* 24, (4) 543-548.

Kapitel 4

Tisler, M., Wetzels, F., Mantino, S., Kremnyov, S., Thumberger, T., Schweickert, A., Blum, M., and Vick, P. (2016). *Cilia are required for asymmetric nodal induction in the sea urchin embryo.* *BMC Developmental Biology* 16, (1): 28.

Eidesstattliche Versicherung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	IV
Übersicht der Kapitel	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Vorwort	1
<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus der Embryonalentwicklung	2
Zygote bis Blastula	3
Gastrulation	3
Neurulation	4
Organogenese und Metamorphose	5
Links-Rechts-Asymmetrie	5
Links-Rechts-Achsenentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	7
Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms	8
Superfizielles Mesoderm und Gastrocoel Roof Plate	8
Wahrnehmung und transkriptionelle Fixierung des Flüssigkeitsstroms	9
Induktion und Weiterleitung der Nodal-Kaskade	10
Alternatives Modell des Symmetriebruchs	11
Integration von Komponenten Ionen-Fluss-Modells in den LRO basierten Symmetriebruch	12
Der kanonische Wnt-Signalweg	12
Der nicht-kanonische Wnt/PCP Signalweg	14
Cilien	15
Histondeacetylase 6	17
Histondeacetylasen im LRO basierten Symmetriebruch	18
Links-Rechts-Asymmetrie siamesischer Zwillinge	20
Die Nodal-Kaskade steuert die Links-Rechts-Asymmetrie siamesischer Zwillinge	20
Flüssigkeitsstrom-abhängige Links-Rechts-Asymmetrie in siamesischen Zwillingen	21
Links-Rechts-Asymmetrie im Seeigelembryo	22
LRO basierte Links-Rechts-Asymmetrie im Seeigel	23
Kapitel 1	24
Ergebnisse	25
HDAC6 ein Kandidatengen für die Etablierung der Links-Rechts-Achse	25
Vergleich der Aminosäuresequenz von HDAC6 innerhalb der Wirbeltiere	25
<i>In situ</i> Expressionsanalyse der <i>hdac6</i> mRNA in <i>Xenopus laevis</i>	27
Inhibition von Hdac6 induziert Defekte der Links-Rechts-Achse	29
Induktion der Nodal-Kaskade benötigt Hdac6	31
Verlust der asymmetrischen <i>dand5</i> mRNA Regulation in <i>hdac6</i> Morphanten	32

Hdac6 lokalisiert im Bereich des Basalkörpers motiler Cilien	35
Hdac6 ist essenziell für Ausbildung von motilen Cilien	37
Hdac6 Funktionsverlust führt zu einer Reduktion der Cilien im LRO	38
Hdac6 Funktionsverlust nimmt Einfluss auf die Expression von <i>foxj1</i>	39
Hdac6 nimmt Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg	41
Hdac6 Funktionsverlust verhindert Achseninduktion im Doppelachsenassay	42
Hdac6 besitzt Einfluss auf die <i>in vivo</i> Aktivität des Wnt-Signalwegs	44
Spezifizierung der Neuralleistenzellen ist abhängig von Hdac6	46
Hdac6 Proteinlokalisierung im Seeigel <i>Paracentrotus lividus</i>	49
<i>In situ</i> Expressionsanalyse der <i>Hdac6</i> mRNA in <i>Mus musculus</i>	51
Evolutionäre Konservierung und Expression von HDAC10 während der Embryonalentwicklung	53
<i>In situ</i> Expressionsanalyse der <i>hdac10</i> mRNA in <i>Xenopus laevis</i>	54
<i>In situ</i> Expressionsanalyse der <i>Hdac10</i> mRNA in <i>Mus musculus</i>	56
Subzelluläre Proteinlokalisationsanalyse von Hdac10 in <i>Xenopus laevis</i>	56
Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitel 1	58
Diskussion Kapitel 1	59
Vergleichende Analyse des <i>in vivo</i> Funktionen von HDAC6	59
HDAC6 in Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie	61
HDAC6 und weiter Ciliogenese-assoziierte Faktoren im kanonischen Wnt-Signalweg	63
Die Cilien-Retraktionskaskade und Links-Rechts-Defekte	64
Modell zur sequenziellen Beteiligung von HDAC6 in der Biogenese motiler Cilien	66
HDAC6 in der Maus	67
Evolutionäre Konservierung der HDAC6	69
Fazit	71
Kapitel 2	72
<i>Xenopus</i> , an ideal model organism to study laterality in conjoined twins	73
Abstract	74
Main Text	74
Acknowledgement	78
References	78
Figures	81

Kapitel 3	85
Leftward flow determines laterality in conjoined twins	86
Summary	87
Results and Discussion	87
References	91
Authors contribution	93
Acknowledgement	93
Figures	94
Supplemental Figures & References & Procedures	98
Kapitel 4	102
Cilia are required for asymmetric <i>nodal</i> induction in the sea urchin embryo	103
Abstract	104
Background	104
Results	106
Discussion	111
Conclusions	114
Methods	114
Declarations	116
References	117
Figures	121
Supplementary Figures	125
Supplementary Movies	126
Zusammenfassung Kapitel 1 bis Kapitel 4	127
Material und Methoden	129
Literatur	148
Danksagung	162
Lebenslauf Matthias Konrad Tisler	164

Abbildungen Kapitel 1	
Abb. 1 Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie in der Embryonalentwicklung von <i>Xenopus laevis</i> .	7
Abb. 2 Cilien als multifunktionelle Organellen der Zelle.	16
Abb. 3 Pharmakochemische Identifikation von HDACs als Kandidatengene der Lateralitätsentwicklung.	19
Abb. 4 Lateralitätsentwicklung siamesischer Zwillinge.	21
Abb. 5 Vergleich der Aminosäuresequenz von HDAC6.	26
Abb. 6 <i>In situ</i> Expressionsanalyse von <i>hdac6</i> mRNA in <i>Xenopus laevis</i> .	28
Abb. 7 Funktionsverlust von Hdac6 führt zu Defekten der Links-Rechts-Achsenpezifizierung.	30
Abb. 8 Hdac6 positioniert sich hierarchisch vor <i>dand5</i> mRNA Regulation.	32
Abb. 9 Hdac6 Funktionsverlust verhindert asymmetrische <i>dand5</i> mRNA Regulation.	33
Abb. 10 Analyse der subzellulären Proteinlokalisierung von Hdac6 in der embryonalen Epidermis.	36
Abb. 11 Funktionsverlust von Hdac6 nimmt Einfluss auf die Ausbildung motiler Cilien in MCCs.	37
Abb. 12 Hdac6 Funktionsverlust nimmt Einfluss auf die Motilität epidermaler Cilien.	38
Abb. 13 Reduzierte <i>foxj1</i> Expression nach Hdac6 Funktionsverlust.	40
Abb. 14 Inhibition von Hdac6 verhindert Achseninduktion im Doppelachsenassay.	43
Abb. 15 <i>In vivo</i> Quantifizierung der Wnt-Signalwegs Aktivität nach Hdac6 Funktionsverlust.	45
Abb. 16 Funktionsverlust von Hdac6 inhibiert die Wnt-abhängige Spezifizierung der Neuralleistenzellen.	47
Abb. 17 Funktionsverlust von Hdac6 resultiert in reduzierter <i>pax6</i> mRNA Expression.	48
Abb. 18 Cilien-assoziierte Hdac6 Proteinlokalisierung in <i>Paracentrotus lividus</i> .	50
Abb. 19 <i>In situ</i> Expressionsanalyse von <i>Hdac6</i> mRNA in der Embryonalentwicklung von <i>Mus musculus</i> .	52
Abb. 20 Interspezifischer Vergleich der Aminosäuresequenz von HDAC10.	53
Abb. 21 <i>In situ</i> Expressionsanalyse von <i>hdac10</i> mRNA in <i>Xenopus laevis</i> .	55
Abb. 22 <i>Hdac10</i> mRNA Expression in der Embryonalentwicklung der Maus.	56
Abb. 23 Subzelluläre Proteinlokalisierung von Hdac10 in multicilierten Zellen der embryonalen Epidermis.	57
Abb. 24 Vergleich der subzellulären Expression, Lokalisation sowie Funktionsgewinn- und Funktionsverlustmutanten von HDAC6.	60
Abb. 25 Arbeitsmodell der Cilien-assoziierten Funktionen von Hdac6 in <i>Xenopus</i> .	62
Abb. 26 Sequenzieller Einfluss der HDAC6 auf die Biogenese motiler Cilien.	67
Abb. 27 Phylogenetische Konservierung der HDAC6 Proteinlokalisierung im LRO der Deuterostomier.	70
Abb. 28 ATG und SB Morpholino-Bindestellen entlang der <i>hdac6</i> mRNA Sequenz.	133
Abbildungen Kapitel 2	81 ff.
Abbildungen Kapitel 3	94 ff.
Abbildungen Kapitel 4	121 ff.

Vorwort

Die Entwicklung eines Individuums ausgehend von der befruchteten Eizelle, genauer die Frage nach der Entstehung dessen körperlichen Erscheinungsbilds in Symmetrie und Proportion, beschäftigt Naturwissenschaftler seit Jahrhunderten. Durch die reine Beobachtung des entstehenden Lebens sowie der voranschreitenden Entwicklung experimenteller Fragestellungen und manipulativer Techniken konnten Einsichten in die immer neuen und doch seriell wiederkehrenden Mechanismen der Entwicklungsmechanik gewonnen werden. Die in den Anfängen der Disziplin formulierten Fragen besitzen auch heute noch Gültigkeit und werden weiterhin kontinuierlich gestellt: Welche Informationen sind nötig um die verschiedenen Zellschicksale eines Organismus zu spezifizieren und dessen Muster zu bilden, seine Formen zu etablieren und schließlich seine Funktionen zu erhalten? Welche genetischen Fehlfunktionen liegen einer Krankheit zu Grunde? Ausgehend von den wegweisenden Experimenten Hans Spemanns zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnten in den letzten Jahrzehnten der entwicklungsbiologischen Forschung weitreichende Erkenntnisse über die regulativen Mechanismen des Embryos gewonnen werden, die die Komplexität der Natur immer weiter zu Tage fördern und zu neuen Fragestellungen inspirieren. Darüberhinausgehend erhält die Faszination für das Verständnis der frühen Entwicklung in der heutigen Zeit neue Unterstützung durch das Potential humane Krankheitsbilder im embryonalen Modell zu erforschen und auf diese Weise über beide Situationen im wechselseitigen Nutzen zu lernen.

Im Folgenden soll der funktionelle Einfluss der *histoneacetylase 6 (hdac6)* auf die frühe Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis* untersucht werden. Im besonderen Fokus steht hierbei die Etablierung der (LR-) Links-Rechts-Asymmetrie im Zug der Embryonalentwicklung. Darüberhinaus sollen Experimente beschrieben werden, die Lateralitätsdefekte siamesischer Zwillinge auf den evolutionär-konservierten, linksgerichteten Flüssigkeitsstrom zurückführen lassen.

Zum besseren Verständnis des Lesers sollen in den folgenden Kapiteln die Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*, die Grundlagen der Etablierung der LR-Asymmetrie sowie einführendes Wissen über das Gen *hdac6* sowie des darin kodierten Proteins Hdac6, den kanonischen Wnt-Signalweg sowie des Zellorganells Cilium vermittelt werden. Auf Grund der differenziellen Gen-, Proteinnomenklatur der verschiedenen Wirbeltiere wird im Folgenden die Bezeichnung HDAC6 für eine allgemeine, speziesübergreifende Benennung verwendet. Ferner wird die Kennzeichnung *Hdac6*/HDAC6 (Maus) und *HDAC6*/HDAC6 (Mensch) für die Benennung des *Gens* bzw. Proteins verwendet.

***Xenopus laevis* als Modellorganismus der Embryonalentwicklung**

Xenopus laevis - auch als Apothekerfrosch bezeichnet - stellt ein gut zugängliches und unter Laborbedingungen leicht zu haltendes Tiermodell dar, das auf Grund seiner hohen Eizahl pro Gelege, seiner extrakorporalen Entwicklung, der realtiven Größe der resultierenden Embryonen sowie einer von den Jahreszeiten unabhängigen, hormoninduzierten Ovulation einzigartige Vorteile besitzt. Der größte Vorteil des Systems liegt jedoch vor allem darin, die frühe Embryonalentwicklung eines tetrapoden Wirbeltiers *in vitro* zu beobachten und experimentell zu manipulieren. Ursprünglich als biologischer Schwangerschaftstest, dem "Hogben-Test", verwendet wurden schon bald die Vorteile der hormoninduzierten Ovulation erkannt, im folgenden *Xenopus laevis* als Modellsystem etabliert und dessen Wert als manipulierbares System durch die wegweisenden Transplantationsexperimente Sir John Gurdots demonstriert (Landgrebe und Samson, 1944; Gurdon and Hopwood, 2003; Gurdon 1962). Die Entwicklung spezifischer Zellschicksalskarten, sowie manipulatorischer Techniken wie der DNA oder mRNA Überexpression und Antisense Morpholino Oligomer vermittelter Funktionsverluste, der Adaptation der sog. *in situ* Hybridisierung für den Froschembryo, bis hin zur gezielten Editierung des Genoms verleihen diesem Tiermodell eine vielseitige Einsetzbarkeit, die dem Wandel der wissenschaftlichen Fragestellungen und Ansprüchen bestand hält (Harland 1991, Heasman et al., 2000; Sive et al., 2000; Blitz et al., 2013; Nakayama et al., 2013; Blum et al., 2015; Tandon et al., 2016). Hierbei stellt *Xenopus laevis* das prominenteste Amphibienmodell mit einem breiten Anwendungsspektrum dar, das die Erforschung allgemeiner entwicklungsbiologischer Prinzipien, die Modellierung humaner Krankheiten bis hin zur molekularen Krebsforschung umfasst (Sive et al., 2000; Hardwick and Philpott, 2015; Lienkamp, 2016; Duncan and Khokha, 2016). Aus den vorab genannten Gründen erfährt der allotetraploide *Xenopus laevis* zusammen mit seinem diploiden Verwandten *Xenopus tropicalis* Verwendung in der embryologischen Forschung und dient auch in der vorliegenden Arbeit als Modellorganismus.

Zygote bis Blastula

Mit der Befruchtung des etwa ein Millimeter durchmessenden Froscheis, durch ein Spermium, beginnt die in etwa fünf Tage andauernde Embryonalentwicklung der Zygote zur freischwimmenden Kaulquappe, die sich nach vollendeter Metamorphose zu einem adulten Frosch weiterentwickelt (Nieuwkoop und Faber, 1994). So entsteht in kurzer Zeit aus der befruchteten Eizelle ein mehrzelliger Organismus, dessen Körperachsen schrittweise festgelegt werden. Die erste Körperachse, die sog. dorso-ventral-Achse, die Rücken- von Bauchgewebe unterscheidet, wird im Zuge der Befruchtung durch den Spermieintrittsort auf der animalen Hemisphäre der Eizelle bestimmt. Grund hierfür ist die vom Spermium eingebrachte Centriole. Von dieser ausgehend polymerisiert das stützende Mikrotubuligeflecht im Bereich des Eicortexs. Als Konsequenz der Befruchtung werden entlang dieses Mikrotubulinnetzwerks vegetal abgelegte maternale Faktoren um etwa 30° entgegen des Spermieintrittsortes transportiert und aktivieren den kanonischen Wnt-Signalweg asymmetrisch innerhalb der Zygote. Dieser legt im Folgenden das dorsale Zellschicksal der späteren Tochterzellen fest. Nach dem Verschmelzen der gametischen Pronuklei zum Zellkern und der ersten Duplikation des Genoms findet die erste Zellteilung statt, an diese schließen sich sieben weitere Zellteilungen auf dem Weg zur radiären Blastula an. Im Zuge der ersten Zellteilungen wird nicht nur das Zellschicksal festgelegt, sondern es entsteht auch ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, das sogenannte Blastocoel. Dieses dient als physischer Abstandhalter, der die Zellen der animalen Kappe vor dem Einfluss sekretierter Signalmoleküle aus der vegetalen Hemisphäre des Embryos abschirmt. Einhergehend mit der achten Zellteilung erfolgt die Aktivierung des zygotischen Genoms. Waren alle frühen Ressourcen des Embryos für die erforderlichen Zellteilungen in Form von mRNA oder Protein maternal hinterlegt, beginnt ab diesem Zeitpunkt die Transkription des zygotischen Genoms, das im Weiteren die Embryogenese des Individuums steuert (Gilbert; 2006.10).

Gastrulation

Zum Ende des Blastulastadiums können auf Genexpressionsebene zwei frühe Organisationszentren des Embryos nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich zum einen um das dorsal gelegene „Blastular Chordin and Noggin Expression Center“ (BCNE), welches durch die Expression der Markergene *chordin* und *noggin* markiert wird (Kuroda et al., 2004). Zum anderen um das dorsal-vegetal lokalisierte Nieuwkoop Center, das durch die Expression des Transkriptionsfaktors *siamois* charakterisiert ist (Lemaire et al., 1995). Durch instruktive Signale des Nieuwkoop Centers wird der Spemann Organisator als Hauptsignalzentrum des frühen Embryos spezifiziert und steuert die Gastrulation sowie die Spezifizierung neuralen Gewebes auf molekularer Ebene (Spemann und Mangold, 1924; De Robertis, 2009). Makroskopisch ist die beginnende Gastrulation anhand einer Pigmentakkumulation im Bereich der dorsalen Randzone des Embryos zu erkennen. Diese Ansammlung von Pigmenten entsteht als Folge einer Form- und

Oberflächenveränderung der sog. Flaschenzellen, die die Gastrulationsbewegungen der Zellen in den Embryo hinein ermöglichen (Keller et al., 2003). Das Fortschreiten der Gastrulation wird durch die schrittweise, laterale Ausbildung der dorsalen Urmundlippe deutlich. Über diese wandern die Zellen in das Innere des Embryos hinein und bilden unter Verdrängung des Blastocoels den Urdarm, das sog. Gastrocoel. Durch den Prozess der Gastrulation werden nicht nur die Keimblätter Ekto- Meso- und Endoderm organisiert, es findet auch ein Längenwachstum des Embryos statt, welches makroskopisch die Fixierung der antero-posterioren Körperachse verdeutlicht. Die Zellen der einwandernden Gewebeschichten interkalieren medial und sorgen auf diese Weise für eine Längsstreckung des vormals radiären Embryos der Blastulastadien (Keller et al., 1985; Gilbert; 2006.10).

Neurulation

Während der Gastrulation findet auch die Spezifizierung des Neuroektoderms des Embryos statt. Die in das Blastocoel hinein wandernden und nach anterior migrierenden Zellen des Organisators sekretieren im Zuge ihrer Wanderung Inhibitoren des Wnt- und BMP-Signalwegs, die die Zellen der animalen Kappe zu einer neuroektodermalen Differenzierung instruieren. Eine kombinatorische Inhibition beider Signalwege durch die Zellen des „frühen“ Organisators führt zur Spezifizierung des Neuroektoderms der anterioren Strukturen des Kopfes bzw. des Gehirns. Eine alleinige Inhibition des BMP-Signalwegs in den Zellen der animalen Kappe durch den „späten“ Organisator führt hingegen zur Spezifizierung des Neuroektoderms des späteren Rückenmarkes.

An die Spezifizierung des Neuroektoderms schließt sich der Prozess der Neurulation an. Dieser bezeichnet die sichtbare Ausbildung künftiger neuraler Strukturen, die durch die Auffaltung des Neuroektoderms, den sich anschließenden Neuralrohrschluß und das abschließende Absinken neuralen Gewebes unter das Ektoderm beschrieben werden können. In den Stadien der Neurulation findet abschließend die molekulare Etablierung der dritten Körperachse, der sog. Links-Rechts-Achse statt, auf die in weiteren Kapiteln im Detail eingegangen werden soll (Gilbert; 2006.12).

Organogenese und Metamorphose

Mit dem Ende der Neurulation sind alle Körperachsen des Embryos fixiert und das, durch die vorangegangene Gastrulation eingeleitete Rearrangement der Gewebe abgeschlossen. Es schließt sich nun die Ausbildung der Organe des Embryos an. Beispielhaft soll an dieser Stelle die Organogenese des kardiovaskulären- und digestiven Systems sowie der Sinnesorgane genannt werden, die eine eigenständige Nahrungsaufnahme und Interaktion des Individuums mit der Umwelt ermöglichen und von essentieller Bedeutung für dessen Überleben sind (Gilbert; 2006.13-15).

Abhängig von der Umgebungstemperatur entsteht innerhalb von fünf Tagen nach der Befruchtung der Eizelle eine freischwimmende Kaulquappe, die zur eigenständigen Nahrungsaufnahme fähig ist und Extremitätenanlagen aufweist. Mit der vollständigen Ausbildung anteriorer und posteriorer Extremitäten, sowie der Reduktion des postanal Schwanzes im Zug der Metamorphose endet die Larvalentwicklung des Krallenfrosches, der innerhalb von zwölf bis fünfzehn Monaten nach Befruchtung der Eizelle seine Geschlechtsreife erreicht (Gilbert; 2006.16).

Links-Rechts-Asymmetrie

Wirbeltiere weisen mit der anterior-posterioren-, dorso-ventralen- sowie der Links-Rechts-Achse drei Körperachsen auf, die den Zellen des Organismus positionelle Identität vermitteln und den Körper in funktionelle Einheiten gliedern. Von außen als bilateralsymmetrisch zu betrachten, weist der Körper der Vertebraten ein asymmetrisches Arrangement der inneren Organe auf. Dieses soll anhand der Positionierung der inneren Organe des Menschen in Thorax und Abdomen näher erklärt werden: Im *Situs solitus*, der wildtypischen Ausrichtung der inneren Organe, deutet der Apex des Herzens nach links. Der linke Lungenflügel teilt sich in zwei Loben auf, während der rechte Lungenflügel aus drei Loben besteht. Die Leber sowie die Gallenblase lokalisieren auf der rechten Körperhälfte des Unterbauchs, Dünn- und Dickdarm winden sich asymmetrisch. Als Grund für die asymmetrische Ausrichtung der inneren Organe wird eine Kompartimentierung bei gleichzeitiger Maximierung der Aufnahmeoberfläche des Verdauungssystems hypothetisiert, die in einer räumlich begrenzten Körperhöhle nur durch die ungleichmäßige Ausrichtung der lebenswichtigen Organe realisierbar wird (Gilbert 2006; 10, 11).

Eine vom Wildtyp abweichende Organisation tritt in humanen Patienten zu Tage, in denen entweder eine vollständig-spiegelbildliche Anordnung der inneren Organe vorliegt oder beide Körperhälften spiegelbildlich-duplizierte Identitäten aufweisen. Die vollständige Inversion des Arrangements wird als *Situs inversus* bezeichnet und führt im Regelfall zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität des Individuums. Wechselseitig duplizierte Identitäten beider Seiten werden als Isomerismen der viszerale Organe bezeichnet und führen in der Regel zu pränataler oder frühkindlicher Letalität. Anomalien des *Situs* stellen mit einer Häufigkeitsrate von 3 % der

Bevölkerung (1 in 8000 Geburten) ein verbreitetes Krankheitsbild dar, deren Ursache Gegenstand intensiver Forschung ist (Zhu et al., 2006; Brueckner, 2007; Duncan and Khokha, 2016).

Erste Experimente zum tieferen Verständnis der embryonalen Etablierung der LR-Achse während der Embryonalentwicklung wurden von Hans Spemann und Kollegen zu Beginn des 20. Jahrhunderts durchgeführt (Spemann und Falkenberg, 1919; Wilhelmi, 1920; Mangold, 1920). Mit Hilfe von Transplantations- und Schnürungsexperimenten gelang es ihm und seinen Kollegen den Zeitpunkt und Ort der Lateralitätsentwicklung auf das Urdarmdach neurulierender *Triturus spec.* Embryonen einzugrenzen und im Zuge der Forschung an „Zwillingen und Doppelbildungen“ Defekte der LR-Achse in rechtsseitig-positionierten siamesischen Zwillingen frequent zu erzeugen (Spemann und Falkenberg, 1919; Wilhelmi, 1920). Obwohl Zeitpunkt und Ort der Lateralitätsdetermination experimentell eingegrenzt werden konnten, blieben zu diesem Zeitpunkt sowohl deren mechanische, als auch deren stoffliche Grundlagen unklar (Wilhelmi, 1920).

Mit der Beschreibung der Ursache des humanen Kartagener-Syndroms durch Björn Afzelius konnte dieses Krankheitsbild, bei dem das Auftreten des *Situs inversus* mit Bronchiektasen und chronischer Sinusitis gekoppelt ist, mit einem Verlust der Beweglichkeit motiler Cilien-assoziiert werden (Afzelius, 1976). Die Beobachtung dieser Symptomatik stellte im Folgenden einen wegweisenden Ausgangspunkt zur schrittweisen Identifikation des symmetriebrechenden Mechanismus dar (Blum et al., 2009b).

Ausschlaggebend für die Lateralitätsentwicklung ist ein innerhalb der Deuterostomier evolutionär-konserviertes, cilienbesetztes Epithel, das als Links-Rechts-Organisator (LRO) bezeichnet wird (Blum et al., 2009b; Tisler et al., 2016). Mit Ausnahme des Haushuhns (*Gallus gallus*, *Gg*), konnten in den Modellorganismen *Paracentrotus lividus* (Seeigel, *Pl*), *Danio rerio* (Zebraquappe, *Dr*), *Xenopus laevis* (Afrikanischer Krallenfrosch, *Xl*), *Mus musculus* (Hausmaus, *Mm*) sowie *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen, *Oc*) homologe LROs nachgewiesen werden (Blum et al., 2009b). Diese werden speziesspezifisch als Kupfer-Vesikel (*Dr*), Gastrocoel Roof Plate (GRP, *Xl*) oder Posteriores Notochord (*Mm* und *Oc*) bezeichnet (Essner et al., 2005; Schweickert et al., 2007; Blum et al., 2007).

Gemeinsames Charakteristikum der LROs ist die durch motile Cilien vermittelte Erzeugung eines extrazellulären, linksgerichteten Flüssigkeitsstroms während der Neurulation (McGrath et al., 2003; Schweickert et al., 2007; Sampaio et al., 2014). Konsequenz dieses unilateral-asymmetrischen Stimulus ist die linksseitige Induktion der sog. Nodal-Kaskade im Seitenplattenmesoderm (LPM) der Embryonen, die im Weiteren die asymmetrische Organogenese auf transkriptioneller Ebene über die Expression des Transkriptionsfaktors *pitx2c* steuert (Lowe et al., 1996; Schweickert et al., 2000).

Links-Rechts-Achsenentwicklung von *Xenopus laevis*

Die Fixierung der LR-Achse in *Xenopus* kann mit der transkriptionellen Spezifizierung der Vorläuferstruktur des LRO, der Generation des asymmetrischen Stimulus durch den LRO (GRP), dessen Interpretation sowie der Induktion der Nodal-Kaskade in aufeinanderfolgende Sequenzen unterteilt werden (Abb. 1). Genetische Fehlfunktionen, pharmakochemische Inhibition, sowie experimentelle Manipulation essentieller Komponenten aller Teilschritte führen zu Lateralitätsdefekten, die weitere Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zulassen oder beitragen neue Kandidatengene des Symmetriebruchs zu identifizieren (Beyer et al., 2012a; Walentek et al., 2012; Schweickert et al., 2007; Vick et al., 2009; Schweickert et al., 2010; Beyer et al., 2012b; Schweickert et al., 2000).

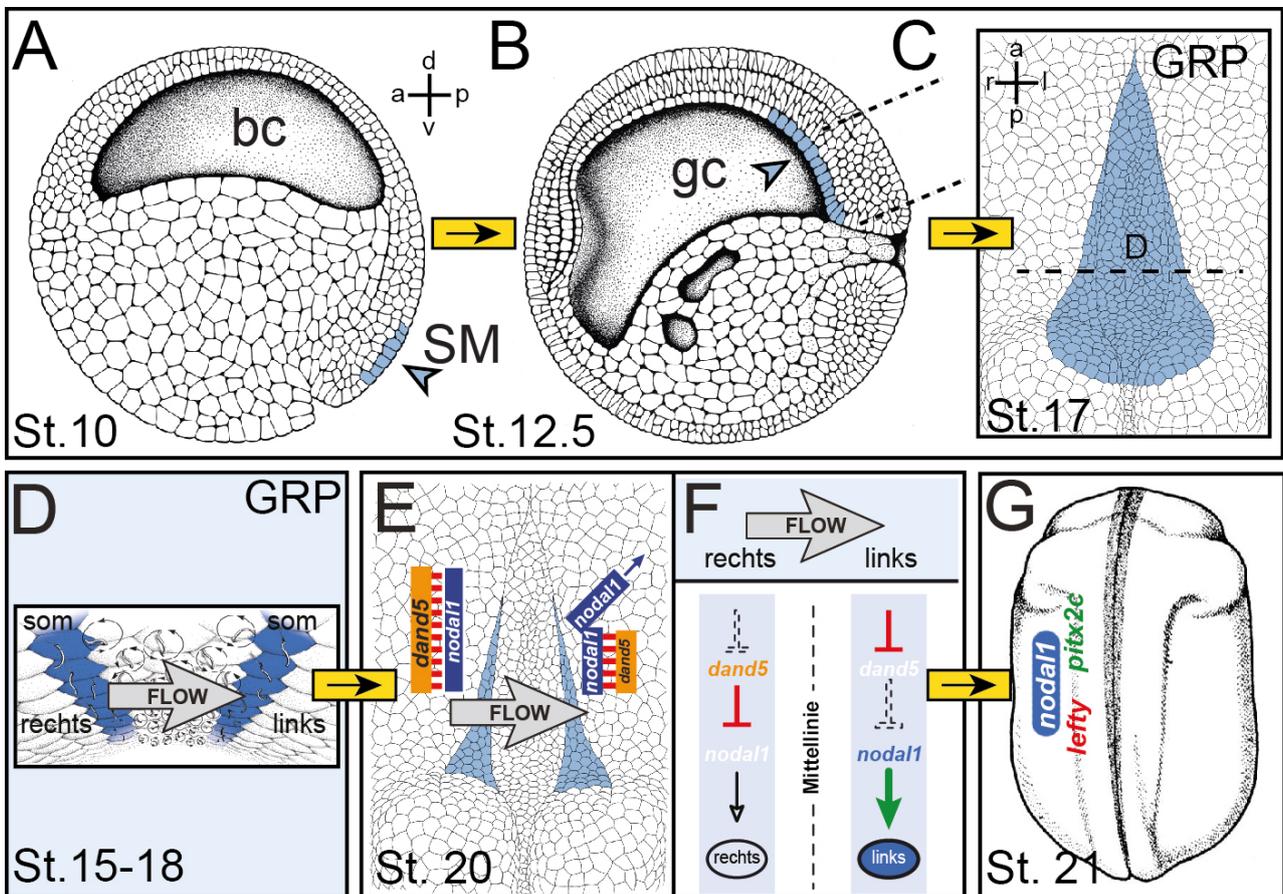


Abb. 1 Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*.

(A-G) Schematische Darstellung der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie beginnend mit der Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms (SM, blau), resultierend in links-asymmetrischer Expression der Nodal-Kaskade im linken Seitenplattenmesoderm der Kaulquappe. (A, B) Spezifizierung des SM im St. 10. Involution der Zellen des SM in das Gastrocoel (gc). (C) Eingewandertes SM bildet die transient-triangular Struktur der Gastrocoel Roof Plate (GRP, blau). (D) GRP-Zellen besitzen unterschiedliches Schicksal. Zellen mit hypochordalem und notochordalem Schicksal tragen posterior-polarisierte motile Monocilien. Cilien somitischer Zellen sind nicht mehr strikt posterior polarisiert und potenziell unbeweglich. (E-F) Somitische GRP-Zellen exprimieren den TGFβ Wachstumsfaktor *nodal1* und dessen Inhibitor *dand5*. Als Konsequenz des linksgerichteten Flüssigkeitsstroms wird *dand5* mRNA in den linken som. GRP-Zellen abgebaut und verliert so sein inhibitorische Wirkung auf Nodal1. (G) Im linken LPM aktiviert Nodal1 eine positive Rückkopplung auf die eigenen Transkription, sowie die Zielgene *lefty* (rot) und *pitx2c* (grün).

Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms

Die Fixierung der LR-Achse in *Xenopus* beginnt während der Gastrulation mit der transkriptionellen Spezifizierung der als Superfizielles Mesoderm (SM) bezeichneten Vorläuferstruktur der GRP (Shook et al., 2004; Beyer et al., 2012a; Walentek et al., 2012). Bei dem SM handelt es sich um ein dorsal lokalisiertes, einschichtiges Epithel, das die Anzahl von etwa einhundert Zellen umfasst. Die Zellen des SM wandern als Zellschicht während der Gastrulation in das Archenteron des Embryos ein, um dort temporär das Dach des Urdarms zu bilden (Shook et al., 2004; Schweickert et al., 2007).

Zu Beginn der Gastrulation lokalisieren die Zellen des SM animal im Bezug zur dorsalen Urmundlippe des Embryos und erstrecken sich halbmondförmig um den sich ausbildenden Blastoporus (Tingler et al., 2014). Auf Ebene der Genexpression wird das SM durch die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors *foxj1*, eines Hauptkontrollgens für die Biogenese motiler Cilien, in diesen Zellen markiert (Pohl et al., 2004; Stubbs et al., 2008; Walentek et al., 2012).

Mit dem TGF β Faktor *nodal3*, als auch mit einem Liganden des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs *wnt11b* wurde die Expression zweier weiterer charakteristische Markergene auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Beyer et al., 2012; Walentek et al., 2013). Als ausschlaggebend für die Expression von *foxj1* und *nodal3* im SM konnte die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs beschrieben werden, dessen direkte Zielgene sowohl *nodal3* als auch *foxj1* darstellen (Glinka et al., 1996; Beyer et al., 2012; Walentek et al., 2012).

Superfizielles Mesoderm und Gastrocoel Roof Plate

Im Zug der Involution der Zellen des SM in den Embryo unterziehen sich diese Zellen einer makroskopischen Reorganisation des Gewebes (Shook et al., 2004). Ausgehend von der medialen Urmundlippe wandern die Zellen des SM in den Embryo ein und migrieren in Richtung des prospektiven anterior des Embryos. Weiter lateral positionierte Zellen der Gewebeschicht wandern zeitlich verzögert ein und rearrangieren sich so zu einer transienten, triangulären Struktur im Dach des Archenterons, der sog. Gastrocoel Roof Plate. Parallel dazu erfolgt ein epithelial zu mesenchymaler Übergang (EMT) der Zellen des SM.

Die Zellen der GRP können in drei distinkte Populationen unterteilt werden, die sich auf Grund ihrer künftigen Gewebeidentität unterscheiden (Shook et al., 2004; Schweickert et al., 2007). Hierbei handelt es sich um GRP-Zellen hypochordalen (hGRP), notochordalen (nGRP) oder somitischen (sGRP) Schicksals (Shook et al., 2004). Gemeinsames Merkmal aller GRP-Zellen ist der Nachweis von Monocilien auf der Oberfläche der individuellen Zellen, die erstmals ab St. 14 detektierbar sind, bis zum St. 16 zu einer Länge von $\pm 5 \mu\text{m}$ auswachsen und ab St. 19 allmählich von den Zellen zurückgebildet werden (Schweickert et al., 2007). Die Cilien der hGRP/nGRP-Zellen weisen eine posteriore Polarisierung der Cilien auf, die zu einer einseitigen Rotationsbewegung entgegen des

Uhrzeigersinns fähig sind (Shook et al., 2004; Schweickert et al., 2007). Im Gegensatz zu den hGRP und nGRP-Zellen sind die Cilien der sGRP-Zellen nicht vollständig posterior lokalisiert, sondern befinden sich zentral auf der Zelloberfläche der individuellen Zellen und wurden als unbeweglich charakterisiert (Schweickert et al., 2007; Boskovski et al., 2013). Als Konsequenz der posterioren Lokalisierung der Cilien auf der kuppelförmigen Oberfläche der Zellen sowie der einseitigen Rotationsbewegung entsteht ein eindirektionaler Halbschlag des Ciliums durch das extrazelluläre Medium, auf den ein entgegengesetzter Rückzug des Ciliums entlang der Zelloberfläche erfolgt. Zwischen den Entwicklungsstadien 15-18 kann ein auf diese Weise hervorgerufener, linksgerichteter Flüssigkeitsstrom nachgewiesen werden, der seine maximale Intensität im St. 17 erreicht und der als kausaler Stimulus des Symmetriebruchs charakterisiert werden konnte (Schweickert et al., 2007; Vick et al., 2009; Schweickert et al., 2010; Thumberger et al., 2012).

Wahrnehmung und transkriptionelle Fixierung des Flüssigkeitsstroms

Um eine unterschiedliche Identität zweier Körperhälften zu etablieren, muss der symmetriebrechende Stimulus in einem bilateralsymmetrischen Szenario wahrgenommen, in eine differenzielle Genexpression übersetzt sowie auf eine Körperhälfte beschränkt werden.

Mehrere Modelle zur Signalübermittlung des Flüssigkeitsstroms wurden bislang vorgeschlagen. Zum einen wurde eine chemische Signalübermittlung zur Diskussion gestellt, dem ein vom Flüssigkeitsstrom abhängiger Transport sog. Nodal Vesicular Particles zu Grunde liegt. Diese NVPs enthalten die Signalmoleküle wie Shh oder Retinsäure und können so potentiell die Nodal-Kaskade chemisch instruieren (Tanaka et al., 2005). Zum anderen wurde eine unilaterale, mechanische Wahrnehmung des Flüssigkeitsstroms durch sensorische Cilien in Erwägung gezogen, die nicht auf einem transportierten Signalmolekül beruht, sondern den extrazellulären asymmetrischen Stimulus durch mechanische Auslenkung in ein intrazelluläres, transientes Ca^{2+} Signal übersetzt (Yoshida et al., 2012; Yuan et al., 2015).

Während in mehreren Tiermodellen verschiedene Modelle der Perzeption des Flüssigkeitsstroms zur Diskussion gestellt wurden, deren funktionelle Ursache als bislang ungeklärt gilt, besteht im Gegensatz dazu ein spezieübergreifendes Modell zur transkriptionellen Konservierung des transienten Stimulus durch eine vom Flüssigkeitsstrom abhängige Aktivierung der Nodal-Kaskade (Schweickert et al., 2007; Schweickert et al., 2010; Blum et al., 2008).

Induktion und Weiterleitung der Nodal-Kaskade

Bei *nodal1*, einem sekretierten Wachstumsfaktor der TGF β Familie, handelt es sich um das erste asymmetrisch transkribierte Gen, das im LPM der Wirbeltiere nachgewiesen werden kann (Levin et al., 1995; Sampath et al., 1997). Reguliert wird diese unilaterale Genexpression durch einen, vom Flüssigkeitsstrom abhängigen, asymmetrischen Abbau der mRNA des Nodal-Inhibitors *dand5* (Schweickert et al., 2010; Nakamura et al., 2012; Getwan, 2015).

Ausgehend von einer symmetrischen, die GRP lateral begrenzenden mRNA Expression von *nodal1*, als auch dessen Inhibitors *dand5* in den somitischen GRP-Zellen, kommt es zu einer durch den Flüssigkeitsstrom vermittelten, linksseitigen Degradation der *dand5* mRNA (Schweickert et al., 2010; Nakamura et al., 2012). Diese kann ab Stadium St. 19/20 als differenzielle mRNA Expression von *dand5* durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden und ist ausschließlich in den linken somitischen GRP-Zellen des Embryos zu beobachten (Vonica und Brivanlou, 2007; Schweickert et al., 2010). Experimentelle Daten in *Dr* und *Mm* weisen darauf hin, dass diese asymmetrische mRNA Degradation auf ein cilienbasiertes, asymmetrisches Calcium-Signal zurückzuführen ist, das durch potentiell mechanosensorischen Cilien der somitischen GRP-Zellen generiert wird (Yuan et al., 2015; Yoshiba et al., 2012). Als Konsequenz hieraus erfolgt ein miRNA vermittelter *dand5* mRNA Abbau, der auf diese Weise den extrazellulären Flüssigkeitsstrom mit einer intrazellulären Änderung der Genexpression verbindet und so den transienten Stimulus dauerhaft fixiert (Marques et al., 2004; Schweickert et al., 2010; Nakamura et al., 2012; Getwan, 2015).

Mit dem Verlust der linksseitigen Inhibition von Nodal1 durch Dand5 erfolgt die transkriptionelle Aktivierung der Nodal-Kaskade (Vonica and Brivanlou, 2007; Schweickert et al., 2010). Freies Nodal1 verstärkt durch eine auf sich selbst zurückwirkende, positive Rückkopplungsschleife die eigene Expression und induziert die Expression zweier Zielgene. Hierbei handelt es sich um den sekretierten *nodal1*-Antagonisten *lefty*, sowie den Transkriptionsfaktor *pitx2c* (Meno et al., 1999; Tanegashima et al., 2000; Schweickert et al., 2000). Im Anschluß an die *nodal1* Expression sind die mRNAs beide Zielgene im LPM detektierbar. Durch den Transkriptionsfaktor Pitx2c wird im Folgenden die asymmetrische Organmorphogenese des kardiovaskulären Systems sowie des Gastrointestinaltrakts gesteuert (Muller et al., 2003). Um die Nodal-Kaskade auf eine Körperhälfte zu beschränken weisen Embryonen eine weitere Expressionsdomäne des Antagonisten *lefty* in den Zellen des Hypochords in der Mittellinie der Embryonen auf. Diese schirmt auf Proteinebene die rechte Körperhälfte von der Nodal-Kaskade ab und besitzt somit die Funktion einer molekularen Barriere in der Mittellinie des Embryos (Yamamoto et al., 2003).

Zusammenfassend kann die Festlegung der LR-Achse als eine Summe aufeinanderfolgender Sequenzen angesehen werden, die, ausgehend von der Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms, vor und während der Gastruation ihr Ende in der asymmetrischen Expression der Nodal-Kaskade im Seitenplattenmesoderm früher Kaulquappenstadien findet (Blum et al., 2009b; Blum et al., 2014b).

Alternatives Modell des Symmetriebruchs

Im Gegensatz zum vorab beschriebenen Mechanismus der evolutionär-konservierten LR-Achsenentwicklung (Blum et al., 2009b; Blum et al., 2014b) steht die Ionen-Fluss-Hypothese des Symmetriebruchs, die als konkurrierendes Modell in *Xenopus*-, Huhn- sowie im Seeigelembryo vorgeschlagen wurde (Adams et al., 2006; Hibino et al., 2006). Basierend auf pharmakochemischen Inkubationsexperimenten, beginnend in frühen Furchungsstadien, konnten Kandidatengene der LR-Achsenentwicklung identifiziert werden, denen eine asymmetrische Lokalisierung im 4- bis 32-Zell Embryo zugewiesen wurde (Blum et al., 2014b). Vorgeschlagen wurde ein Modell, in dem die chirale Organisation von Mikrotubuli unter Mithilfe von Rab11 die asymmetrische Expression und Funktion der Ionen-Pumpe *atp4a* steuern und in den ventral-rechten Zellen des 4- bis 32-Zell Embryos einen asymmetrischen Spannungsgradienten bilden (Adams et al., 2006; Aw et al., 2008; Blum et al., 2014). Auf Grund einer proklamierten elektrischen Isolation der ventralen Blastomeren, sowie der verbindenden zellulären Kommunikation aller weiteren Blastomeren über Gap-Junctions wandert das Signalmolekül Serotonin (5HT) entlang eines intra-embryonalen Spannungsgradienten in die dorsal-linken Blastomeren des frühen Embryos, um dort ab St. 21/22 die Expression der Nodal-Kaskade zu induzieren (Fukumoto et al., 2005).

Zur Konservierung des asymmetrischen 5HT-Signals vom 4-Zell Embryo bis hin zur Expression von *nodal1* im LPM der frühen Kaulquappenstadien wurde eine linksseitige, 5HT-abhängige Reorganisation der Zugänglichkeit des Chromatins für die asymmetrische *nodal1* Transkription identifiziert (Carneiro et al., 2011). Die intrazelluläre Bindung von 5HT an dessen Interaktionsmolekül, dem Transkriptionsfaktor Mxd3, führt zur Komplexbildung mit einer nicht näher identifizierten Histondeacetylase (HDAC), die durch ihre Deacetylaseaktivität eine Modifikation des Chromatins im Intron 1 des *nodal1* Gens dorsal-rechter Blastomeren vornehmen soll (Carneiro et al., 2011). Durch die enzymatische Entfernung von Acetylgruppen, die als ladungstragende Proteinmodifikationen an Histonen vorliegen, wird die Affinität der Bindung der DNA gegenüber der Histone vergrößert und auf diese Weise die Zugänglichkeit des transkriptionellen Apparates zum Genom erschwert (Carneiro et al., 2011). Auf Grund dieses epigenetischen Mechanismus kann die transiente, positionelle Information des Ionen-Flusses aus frühen Teilungsstadien bis in Kaulquappenstadien konserviert werden und führt in diesem Modell zur asymmetrischen Induktion der Nodal-Kaskade.

Im Gegensatz zum evolutionär-konservierten und LRO-basierten Symmetriebruch steht mit der Ionen-Fluss-Hypothese ein Modell zum Symmetriebruch, das diesen auf die Stadien der ersten Zellteilungen des Embryos beschränkt und durch einen epigenetischen Mechanismus bis zur asymmetrischen Induktion der *nodal1* mRNA Expression fixiert (Blum et al., 2009b; Vandenberg and Levin, 2013). Ein Symmetriebruch, entsprechend zum vorgestellten Ionen-Fluss-Modell, wurde bislang ausschließlich für Seeigelembryonen sowie *Xenopus* und das Haushuhn vorgeschlagen und wird im Gegensatz zum LRO-basierten Symmetriebruch nicht durch eine phylogenetische Konservierung unterstützt (Hibino et al., 2006; Blum et al., 2014).

Integration von Komponenten des Ionen-Fluss-Modells in den LRO-basierten Symmetriebruch

Im Zuge aktueller Forschungsvorhaben konnten Kandidatengenene des Ionen-Fluss-Modells eindeutige Funktionen in verschiedenen Sequenzen des LRO-basierten Symmetriebruchs zugewiesen werden (Walentek et al., 2012; Beyer et al., 2012a; Beyer et al., 2012b). Den zentralen Molekülen des Ionen-Fluss-Modells, der H^+/K^+ -ATPase *Atp4*, sowie des Neurotransmitters 5HT kommen hierbei Funktionen im Ablauf des kanonischen Wnt-Signalwegs zu, der die transkriptionelle Spezifizierung des SM prägt und so die Ciliogenese im Bereich der GRP steuert.

Zum einen dient 5HT hierbei als spezifischer Kompetenzfaktor (Beyer et al., 2012a) zum anderen *Atp4* als essentielle ATPase mit Funktion als H^+/K^+ -Ionenpumpe (Walentek et al., 2012). Beide Kandidatengene wirken durch die vom kanonischen Wnt-Signalweg abhängige, molekulare Spezifizierung des SM und besitzen auf diese Weise Einfluss auf die Ciliogenese der GRP (Beyer et al., 2012a; Walentek et al., 2012). Des Weiteren konnten den für das Ionen-Fluss-Modell wichtigen Zell-Zell verbindenden Gap-Junctions (Beyer et al., 2012b) eine Funktion im Prozess des Signaltransfers der Nodal-Kaskade von den sGRP-Zellen hin zum LPM des Embryo zugewiesen werden.

Der kanonische Wnt-Signalweg

Durch die Expression seiner *bona fide* Zielgene *nodal3* und *foxj1* im SM des gastrulierenden Embryos besitzt der kanonische Wnt-Signalweg großen Einfluss auf die LR-Achsenentwicklung (Glinka et al., 1996; Pohl et al., 2004; Stubbs et al., 2008; Walentek et al., 2012; Caron et al., 2012; Beyer et al., 2012a).

Bei dem Wnt-Signalweg handelt es sich um einen Signalweg des Embryos, dessen Namen sich als Akronym der initial identifizierten Mutanten *wingless* in *Drosophila melanogaster* und *Int* der Maus herleitet (Nusse und Varmus, 1982; Clevers und Nusse, 2012).

Im Menschen wurden bislang 19 Wnt-Liganden identifiziert, die nach der Interaktion mit an der Zellmembran lokalisierten Rezeptoren der Frizzled Familie in Form des kanonischen Wnt-Signalwegs Einfluss auf die zelluläre Transkription oder durch den nicht-kanonischen bzw. Wnt/PCP-Signalweg auf die Organisation des Zytoskelettes nehmen können. Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg beschreibt eine dritte Variation dieses Signalwegs, in dem über die intrazelluläre Freisetzung des *second messengers* Calcium eine physiologische Reaktion der Zellen bewirkt wird (Gordon and Nusse, 2006).

Die Regulation der Genexpression durch den kanonischen Wnt-Signalweg erfolgt durch eine Wnt-Liganden induzierte Stabilisierung des zentralen Moleküls des Signalwegs, des transkriptionellen Koaktivators β -catenin (Clevers and Nusse, 2012).

Ausgehend von der extrazellulären Bindung der sekretierten Wnt-Liganden an die cystein rich domain (CRD) der Frizzled-Familie G-protein gekoppelter Rezeptoren und deren Interaktion mit LRP5/6 Korezeptoren erfolgt die intrazelluläre Aktivierung des Signalwegs, die zur Inaktivierung eines im Weiteren beschriebenen Abbaukomplex um β -catenin führt (Stamos und Weis, 2013). Im Liganden-ungebundenen Zustand, bilden die Ser-/Thr-Kinasen Glykogen Synthase Kinase β (GSK3 β) und Casein-Kinase 1 (CK1), Axin, Adenomatous polyposis coli (APC) sowie die E3-ubiquitin Ligase β -TrCP diesen Abbaukomplex für den transkriptionellen Ko-Aktivator β -catenin. Hierbei bildet Axin durch homonome Polymerisierung eine Ankerplattform für die Multimerisierung von Axin, APC, CK1 und GSK3 β zum funktionellen Komplex (Stamos and Weis, 2013). Im aktiven Zustand führt die Bindung an β -catenin zu einer Phosphorylierung dessen Aminoterminus an den AS Ser45, T41, Ser37 und Ser34 der Proteinsequenz. Dies erfolgt durch CK1 (1. Phosphorylierung Ser45) und GSK3 β (2.T41, 3.Ser37, 4.Ser34) (Liu et al., 2002). Der phosphorylierte Aminoterminus stellt eine direkte Bindesequenz für die Ubiquitin-Ligase β -TrCP dar, die β -catenin ubiquitiniert. Auf Grund der Markierung durch Ubiquitin erfolgt die kontinuierliche proteasomale Degradation von β -catenin, die einer Aktivierung der Zielgene entgegen wirkt (Clevers and Nusse, 2012).

Durch die Präsenz des Wnt-Liganden, dessen Bindung an den Frizzled/LRP6-Komplex und der dadurch vermittelten Phosphorylierung des intrazellulären Mediators und Adapterproteins Dishevelled (Dsh) kommt es zur Inaktivierung des beschriebenen Destruktionskomplexes (Stamos and Weis, 2013). Die Ligandenbindung führt zur Rekrutierung des gesamten Komplexes an die Zellmembran, die in einer Caveolin-abhängigen Bildung LRP6-positiver Signalosomen resultiert (Bilic et al., 2007). Hierbei handelt es sich um eine für die Aktivität des Wnt-Signalwegs essentielle subzelluläre Kompartimentierung der GSK3 β . Dies führt zu einer Stabilisierung des zytosolisch lokalisierten β -catenins (Taelman et al., 2010). Durch nukleäre Translokation und Bindung an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie steuert stabilisiertes β -catenin die Expression der Zielgene des Signalwegs (Clevers and Nusse, 2012; Kjolby and Harland, 2016). Über die vorab beschriebenen Effekte auf die frühe Embryonalentwicklung hinaus wirkt sich eine mutationsbedingte

Misregulation des kanonischen Wnt-Signalswegs in hyperproliferativ-pathologischen Phänotypen des krankhaft-veränderten Organismus aus, bei dem kolorektale Karzinome als prominente Beispiele genannt werden können.

Obwohl eine Vielzahl an weiteren, hier nicht genannten Komponenten des Signalwegs in Form von Rezeptoren, weiterer Ko-Rezeptoren und Modifikatoren existieren, werden kontinuierlich neue Kandidatengene identifiziert, die Einfluss auf diesen Signalweg besitzen und so tieferes Verständnis für Fehlfunktionen im Krankheitsfall aber auch für die Embryonalentwicklung in sich bergen (Clevers and Nusse, 2012).

Der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg

Während die Induktion des kanonischen Wnt-Signalwegs mit einer transkriptionellen Antwort der Zellen charakterisiert ist, führt die Aktivität des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und somit zu einer Änderung der Zellpolarität der Zielzellen. Eine koordinierte Polarisierung der Zellen in epithelialen und mesenchymalen Geweben spielt für morphogenetische Prozesse der Embryonalentwicklung wie bspw. der sog. "Konvergenten Extension" im Zuge der Gastrulation eine herausragende Rolle (Kim et al., 2012). Die Hauptkomponenten des Wnt/PCP-Signalwegs teilen sich mit den drei Transmembranproteinen Frizzled, Vang-like und Flamingo sowie den cytoplasmatisch lokalisierten Komponenten Dishevelled-like (Dvl), Prickle und Inversin/Diversin in zwei Fraktionen auf. Nach intrazellulärer Aktivierung von Dvl erfolgt eine Signaltransduktion über die kleinen GTPasen Rho, Rac und cdc42 sowie der Rho-assoziierten Kinase (ROK), die die Zellpolarität auf Grund der Organisation des Zytoskeletts instruieren (Yang und Mlodzik, 2015).

Eine physiologische Funktion für die Aktivität des PCP-Signalwegs im *Xenopus*-Embryo stellt die planare Orientierung von Cilien innerhalb eines orientierten Zellverbandes dar. Die posteriore Polarisierung der motilen Monocilien auf den Zellen der GRP (Shook et al., 2004; Schweickert et al., 2007; Antic et al., 2010) sowie die polarisierten multicilierten Zellen auf der embryonalen Haut (Mitchell et al., 2009) erhalten ihre positionelle Information durch die Aktivität dieses Signalwegs. Eine vom posterioren Pol abweichende Polarisierung der Cilien der GRP führt zum Verlust des linksgerichteten Flüssigkeitsstroms und resultiert in Lateralitätsdefekten (Antic et al., 2010; Walentek et al., 2013). Im Bereich des SM konnte mit der mRNA Expression von *wnt11b*, einem spezifischen Liganden des Wnt/PCP-Signalwegs, ein Ligand für die PCP-abhängige posteriore Polarisierung der Cilien des LRO identifiziert werden (Walentek et al., 2013).

Mit der Biogenese motiler Monocilien auf der Oberfläche der Zellen des LROs, sowie deren posterioren Polarisierung, im Bezug auf die AP-Achse des Embryos besitzen der kanonische Wnt/ β -catenin- sowie der nicht-kanonische Wnt/PCP-Signalweg einen sich wechselseitig ergänzenden Einfluss auf die Etablierung der LR-Achse. Die spezifische Ausbildung motiler Monocilien sowie deren räumliche Positionierung auf der Oberfläche der LRO-Zellen stellt die physiologische Integration beider Signalwege im Bezug auf die LR-Achsenentwicklung dar.

Cilien

Bei Cilien handelt es sich um fadenförmige, membranumhüllte Organellen der Zelle, die abhängig von ihrer weiteren Spezifizierung chemo- bzw. mechanosensorische Stimuli des extrazellulären Raums wahrnehmen, durch Schlagbewegungen Flüssigkeitsströme generieren können und als Wirkungsumfeld für die z.T. kompartimentierte Lokalisierung verschiedener Signalwege dienen (Schweickert and Feistel, 2015; Malicki and Johnson, 2016) (Abb.2).

Auf Grund ihrer Form und Funktion werden Cilien in kurze, unbewegliche sensorische Cilien oder längere, bewegliche, sog. motile Cilien unterschieden. Gemeinsames Charakteristikum beider Typen von Cilien ist deren Aufbau. Ausgehend von dem, für die Verankerung im apikalen Zytoskelett der Zellen verantwortlichen Basalkörper, polymerisiert das als Axonem bezeichnete Mikrotubuli-Zytoskelett des Ciliums (Malicki und Johnson, 2016). Bei beweglichen Cilien bilden neun Mikrotubulidoublets hierbei einen kreisförmigen äußeren Ring, der durch 0, 2 oder 4 zentraler Mikrotubuli ergänzt werden kann (Feistel und Blum, 2006). Die Komponenten des Axonems sind durch eine Vielzahl an Strukturproteinen untereinander oder mit den zentralen Mikrotubuli verbunden. Motilität erhalten die Cilien durch die von Motorproteinen abhängige, gegenseitige Verschiebung der Mikrotubulidupletts des äußeren Mikrotubulirings gegeneinander. Bei den Motorproteinen handelt es sich um Dyneine, die abhängig von der ATP-Hydrolyse ihre Konformation ändern und so die Cilienbewegung veranlassen (Porter und Sale, 2000).

Auf Grund ihrer Ultrastruktur sowie der regionalisierten Lokalisierung ciliärer Proteine können Cilien entlang ihrer proximal-distalen Achse in differenzielle Kompartimente unterteilt werden. Vom Basalkörper ausgehend erstreckt sich die "*transition zone*" des Ciliums, an die sich das "*Inversin compartment*" anschließt, das in den Körper des Ciliums mit dessen distaler Spitze übergeht. Hierbei kommt der *transition zone* eine regulatorische Funktion des membrangebundenen Transports von ciliär-lokalisierten Proteinen, in das Cilium hinein oder heraus, zu (Reiter et al., 2012; Malicki und Johnson, 2016).

Die Ausbildung von Cilien auf der Zelloberfläche ist eng mit dem Zellzyklus koordiniert (Malicki und Johnson, 2016). Grund hierfür ist die duale Funktion der zum Basalkörper umwandelbaren Centriole als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum. Ausgehend von der als Basalkörper agierenden Muttercentriole werden die Cilien in G₀-, G₁- und S-Phase des Zellzyklus ausgebildet und müssen

vor der Zellteilung zurückgebildet werden (Goto et al., 2016). Reguliert wird der Abbau der aus α/β -Tubulin-Multimeren bestehenden Mikrotubuli des Axonems durch die am Basalkörper lokalisierte Aurora Kinase A (AURKA). Die zum Abbau führende Destabilisierung des Axonems erfolgt durch die Deacetylierung von α -Tubulin Molekülen durch die Histondeacetylase 6 (HDAC6) im Cilium als Konsequenz ihrer Phosphorylierung durch AURKA (Abb. 2; Pugacheva et al., 2007; Malicki and Johnson, 2016).

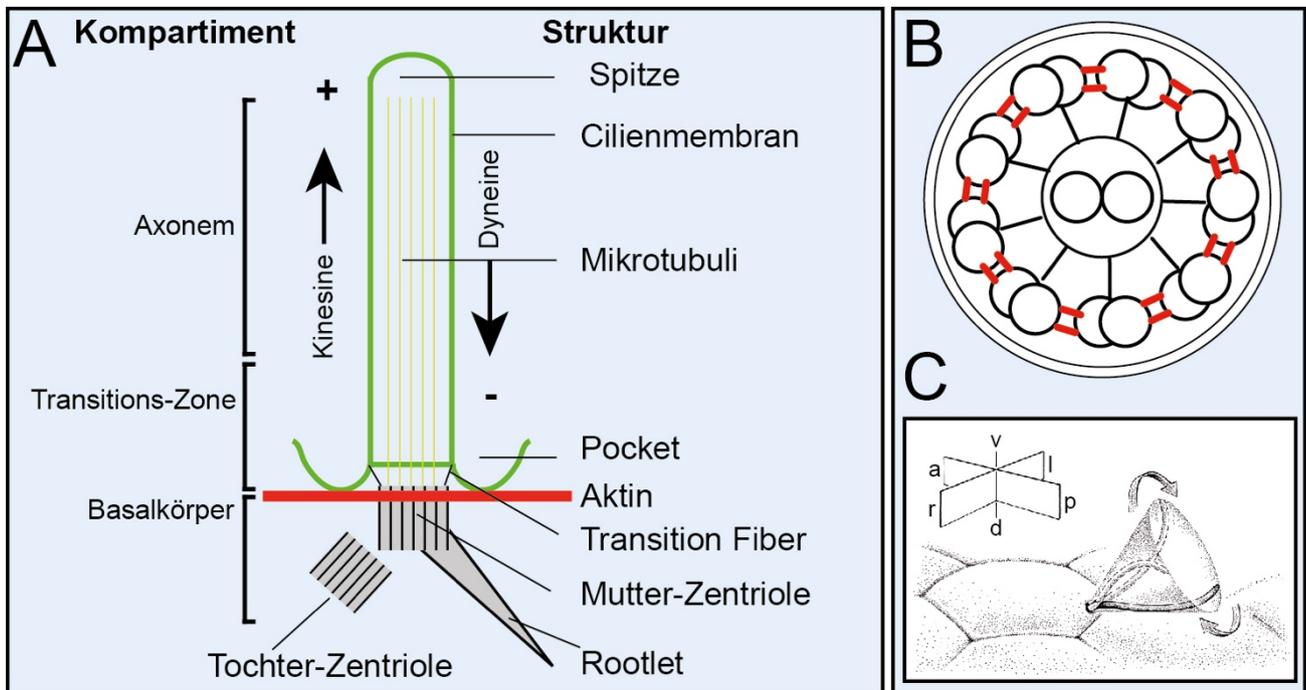


Abb. 2 Cilien als multifunktionelle Organellen der Zelle.

Cilien sind fadenförmige Organellen der Zelle. Generell können diese in primäre, immotile, sowie bewegliche Cilien unterschieden werden. Sie dienen als Reaktionskompartiment von Signalwegen oder sind in der Lage durch Bewegung Flüssigkeitsströme zu generieren. **(A)** Schematische Darstellung eines Ciliums. Ausgehend vom Basalkörper polymerisieren Mikrotubuli-Doubletten, die das Grundgerüst des ciliären Axonems darstellen und von einer Membran umschlossen sind. Verankerung findet der Basalkörper in dem apikalen Aktin Netzwerk der Zellen. Im Axonem des Ciliums finden Transportprozesse entlang der Mikrotubuli statt. Dieser wird durch Moleküle des IFT-Komplexes realisiert unter Verwendung von Kinesinen für den anterograden (+) und Dyneinen (-) für den retrograden Transport. **(B)** Schematische Darstellung der Ultrastruktur des Axonems motiler Cilien. Motile Cilien weisen zuzüglich zu neun peripheren Mikrotubulidoubletten ein zentrales Paar von Mikrotubuli auf. Dieses zentrale Paar ist durch radiale Speichen mit den äußeren Mikrotubulidoubletten verbunden. Motilität wird den Cilien durch die Existenz von Dyneinarmen verliehen, die unter Energieverbrauch eine Verschiebung des Axonems induzieren. **(C)** Piktografische Darstellung eines polarisierten motilen Monociliums eines mukozilierten Epithels. Auf Grund der direktionalen Rotation in Kombination mit der posterioren Polarisierung können gerichtete Flüssigkeitsströme erzeugt werden. **(C)** aus Blum et al., 2009b; Gilbert 2010).

Histondeacetylase 6

Posttranslationale Modifikationen spielen eine wichtige Rolle für die funktionelle und katalytische Aktivität von Proteinen. Enzymatisch werden hierbei funktionelle Gruppen auf Aminosäuren einzelner Proteine übertragen oder entfernt. Bei der posttranslationalen Acetylierung von Proteinen handelt es sich um eine Variante dieser Proteinmodifikationen (Wang et al., 2013).

Acetylgruppen, die aus einer Carbonyl- und Methylgruppe zusammengesetzt sind und die chemische Struktur $R-C(O)CH_3$ aufweisen, können auf Lysine (K) der Peptidsequenz übertragen werden. Die Acetylierung von Proteinen an sequenzspezifischen Acetylierungs-Stellen wird durch eine Reihe von Acetyltransferasen katalysiert (Kouzarides, 2000). Die Entfernung von Acetylgruppen erfolgt durch eine, als Proteindeacetylasen bezeichnete Gruppe von Proteinen, die die Proteinfamilien der Histondeacetylasen (HDACs) und die sequenziell nicht verwandten Sirtuine umfasst und in vier Klassen unterteilt wird. Klasse I umfasst die Mitglieder HDAC1, -2, -3, -8; Klasse IIa HDAC4, -5, -7, -9; Klasse IIb HDAC6, -10; und Klasse IV HDAC11. Sirtuine spielen für die vorliegende Arbeit keine Rolle und werden deshalb an dieser Stelle nicht weiter behandelt. Namensgebend für die HDAC Genfamilie ist die Genexpression regulierende Deacetylierung von Histonen im Zellkern, die sich auf die DNA-Histon Interaktion auswirkt (Haberland et al., 2009). Neben Histonen wurden eine Vielzahl von acetylierten Nicht-Histon Proteinen identifiziert, die als Substrate für HDACs dienen. Hierbei handelt es sich sowohl um nukleär, als auch zytoplasmatisch lokalisierte Proteine, die durch HDACs reguliert werden können (Seidel et al., 2015). Die Deacetylierung einiger zytoplasmatischer Proteine erfolgt durch die Interaktion mit HDAC6 die, untypischerweise für HDACs, nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma der Zellen lokalisiert ist (Hubbert et al., 2002). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der HDAC-Familie weist die HDAC6 eine Duplikation ihrer katalytisch aktiven Deacetylase Domänen, eine Zinkfinger-Ubiquitin-Bindedomäne am Carboxyterminus sowie zwei Kern-Export-Sequenzen im Amino- und Carboxy-Terminus der Nukleotidsequenz als strukturelle Besonderheiten auf (Boyault et al., 2007).

Funktionell wurde HDAC6 eine Beteiligung der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse nachgewiesen. Diese umfassen u. a. die Kontrolle der Dynamik von Mikrotubuli, die Bewegungsfähigkeit von Zellen, Endocytose-Prozesse, vesikulären Transport, die Regulation von Signalwegen, Autophagie sowie Aggresomen Bildung und die Reifung von Glucocorticoid Rezeptoren (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Kawaguchi et al., 2003; Iwata et al., 2005; Kovacs et al., 2005; Zhang et al., 2007, Gao et al., 2007; Gao et al., 2010, Mak et al., 2012).

Fehlfunktionen der HDAC6 sind mit Krankheitsbildern verschiedener neurodegenerativer und proliferativ-invasiver Pathologien wie Alzheimer, Parkinson und Huntington (Simões-Pires et al., 2013) und/oder verschiedenen Krebstypen (Aldana-Masangkay und Sakamoto, 2011) assoziiert. Aus therapeutischen Gesichtspunkten konnten deshalb bereits eine Vielzahl an chemischen HDAC

Inhibitoren (HDACi) identifiziert werden. Diese befinden sich bereits zum Teil in klinischen Studien, um ihre Wirksamkeit in der Krebstherapie des Menschen zu überprüfen (Wagner et al., 2013).

Trotz der beschriebenen intrazellulären Funktionen sind *Hdac6*^{-/-} Mäuse lebensfähig, fertil und weisen keinen embryologischen Phänotyp auf (Zhang et al., 2008). Ein Einfluss auf die Kognitionsleistung adulter Individuen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Govindarajan et al., 2012). Beobachtete Effekte des emotionalen Verhaltens von *Hdac6*^{-/-} Mäusen konnte aber auf einen Verlust der Aktivität als Deacetylase zurückgeführt werden. Hierbei handelt es sich um den Nachweis von Hyperaktivität, ein reduziertes Angst- sowie antidepressives Verhalten der Mäuse (Fukada et al., 2012). In humanen Patienten war es möglich heterozygote Mutationen einer miRNA-Bindestelle in der 3'UTR der *HDAC6* mRNA zu identifizieren die in einem pathologischen Phänotyp resultieren (Simon et al., 2010). Hierbei handelt es sich um ein bislang unbenanntes Syndrom, das eine X-Chromosomal dominante Chondrodysplasie aufweist, die in Kombination mit Platyspondyly, distinktiver Brachydaktylie (Kurzfingerigkeit) sowie Hydrocephalus (Wasserkopf) und Mikrophthalmie (rudimentäre Ausbildung der Augäpfel) auftritt (Chassaing et al., 2005; OMIM #300863). In Patienten entkoppelt der Verlust einer miRNA-433 Bindestelle die posttranskriptionelle Regulation der *HDAC6* mRNA durch miRNAs, die in einem nicht-letalen Funktionsgewinn-Phänotyp resultiert (Simon et al., 2010).

Histondeacetylasen im LRO basierten Symmetriebruch

Obwohl der grundlegende Mechanismus des Symmetriebruchs der Wirbeltiere funktionell charakterisiert wurde, können weiterhin bislang unbekannte Kandidatengene der LR-Achsenentwicklung identifiziert werden. Im Zug zweier unabhängiger pharmakochemischer Inhibitor-Screens konnte die Genfamilie der HDACs als für diesen Prozess relevante Moleküle beschrieben werden (Cao et al., 2009; Carneiro et al., 2011). Bislang war jedoch keinem der elf Mitglieder dieser Genfamilie eine eindeutige molekulare Funktion in einer Sequenz der LRO-basierten LR-Achsenentwicklung zuweisbar.

Ziel des ersten Kapitels der vorliegenden Arbeit ist es, die am Symmetriebruch beteiligte(n) HDAC(s) zu identifizieren, deren molekulare Funktion experimentell zu charakterisieren um schließlich die funktionell beteiligten HDAC(s) in das derzeit gültige Bild des Symmetriebruchs einzuordnen. Hierbei besteht die begründete Vermutung, dass es sich bei der in der LR-Achsenentwicklung beteiligten HDAC um die HDAC6 handelt, deren Lokalisation als mit primären Cilien assoziiert beschrieben werden konnte (Pugacheva et al., 2007). Daraus hervorgehend wird vorhergesagt, dass Funktionsverluste der *Hdac6* in *Xenopus* Embryonen zu Defekten der Etablierung der LR-Achse führen. Diese Defekte könnten ihre Ursache in Defekten der Biogenese motiler Cilien des LRO finden. Darüber hinaus soll die subzelluläre Lokalisation des *Hdac6* Proteins

in der Embryonalentwicklung des Krallenfroschs sowie eine mögliche evolutionäre Konservierung der Proteinlokalisierung im LRO des Seeiglembryos nachgewiesen werden.

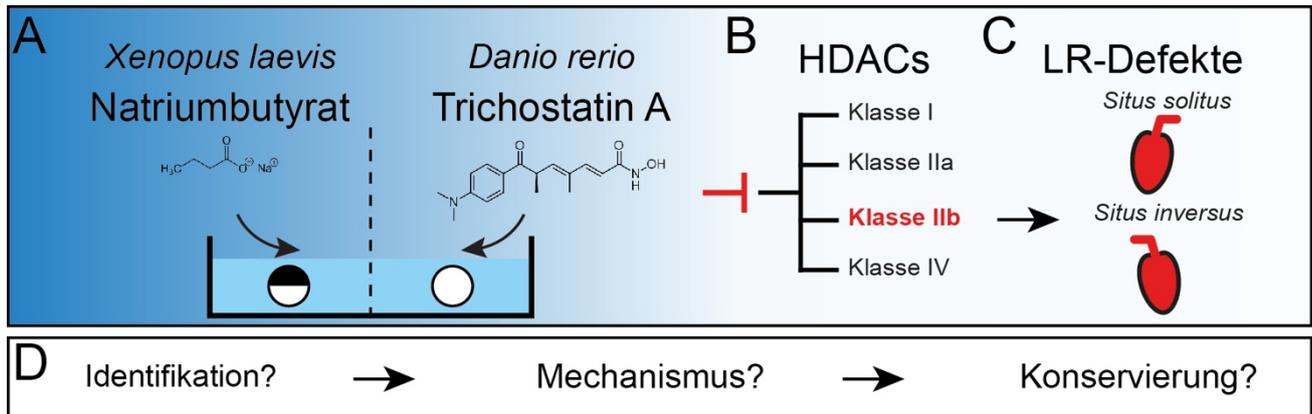


Abb. 3 Pharmakochemische Identifikation von HDACs als Kandidatengene der Lateralitätsentwicklung.

(A) Identifikation von Histondeacetylasen (HDACs) der Klasse IIb als Kandidatengene der Lateralitätsentwicklung durch pharmakochemische Inhibitor-Screens mit Embryonen von *Danio rerio* und *Xenopus laevis*. (B) Inkubationen mit Natriumbutyrat (*X. laevis*; Carneiro et al., 2011) sowie Trichostatin A (*D. rerio*; Cao et al., 2009) induzieren Lateralitätsdefekte im Frosch und Zebrafisch. (C) Einschränkung der potentiellen Kandidatengene auf Klasse IIb HDACs auf Grund der selektiven Inhibition von Trichostatin A. Unbekannt verbleiben Kandidatengene, deren Funktion im Kontext des LRO basierten Symmetriebruchs und die evolutionäre Konservierung innerhalb der Deuterostomier.

Links-Rechts-Asymmetrie siamesischer Zwillinge

Im zweiten und dritten Kapitel der Arbeit sollen Konzepte und Experimente vorgestellt werden, die die initial von Hans Spemann und Kollegen berichteten Lateralitätsdefekte experimentell erzeugter siamesischer Zwillinge auf den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom zurückführen lassen.

Mit der im Zug der Arbeiten zur Identifikation des Spemann Organisators entwickelten Technik zur experimentellen Achsenduplikation war es Spemann und Kollegen möglich, ein zur damaligen Zeit von humanen siamesischen Zwillingen bekanntes Krankheitsbild experimentell zu modellieren (Spemann und Falkenberg, 1919). In späten Entwicklungsstadien wiesen künstlich erzeugte siamesische Zwillingenlarven des Molchs ein fehlerhaftes Arrangement der inneren Organe auf. Diese waren ausschließlich auf den zur rechten Seite orientierten Zwilling beschränkt und betrafen nie den sich auf der linken Seite befindenden Zwilling (Spemann und Falkenberg, 1919). Bei menschlichen siamesischen Zwillingen, die mit einer Frequenz von etwa 1 in 100.000 Schwangerschaften auftreten, werden entsprechende Lateralitätsdefekte ausschließlich in dicephalen, thoracopagen Zwillingen beobachtet (Levin et al., 1996). Entsprechend zu siamesischen Zwillingen des Molchs beschränkt sich auch im Menschen der *Situs inversus* auf den rechten Zwilling und tritt mit einer Frequenz von 50 % auf (Kaufman, 2004).

Die Nodal-Kaskade steuert die Links-Rechts-Asymmetrie siamesischer Zwillinge

Durch die Charakterisierung der links-asymmetrischen Nodal-Kaskade (Lowe et al., 1996) sowie der künstlichen Zwillingeninduktion durch mRNA Überexpression von induktiven Komponenten des Wnt-Signalwegs, war es möglich, die molekulare Grundlage der Lateralitätsdefekte siamesischer Zwillinge zu identifizieren (Sokol et al., 1991; Nascone und Mercola, 1997). Überraschenderweise wurde nach experimenteller Zwillingeninduktion *nodal1* mRNA ausschließlich im linken Seitenplattenmesoderm des linken Zwillinges exprimiert. Weder im Mesoderm zwischen der primären und sekundären Körperachse, noch im rechten Seitenplattenmesoderm des rechten Zwillinges war *nodal1* mRNA Expression durch *in situ* Hybridisierung nachweisbar (Nascone und Mercola, 1997). Wie im wildtypischen Embryo instruiert somit auch im siamesischen Zwilling die links-asymmetrische Nodal-Kaskade die Organogenese im linken Zwilling, während der rechte Zwilling keine Induktion dieser Kaskade erfährt. Durch das Ausbleiben dieses instruktiven Signals unterliegt die Ausrichtung der inneren Organe der Zufälligkeit, die sich weiterführend in einer Randomisierung der Orientierung manifestiert (Nascone und Mercola, 1997). Die funktionelle Ursache dieser asymmetrischen Genexpression in siamesischen Zwillingen und dessen Beschränkung auf den linken Zwilling konnte zu diesem Zeitpunkt aber nicht aufgeklärt werden.

Flüssigkeitsstrom-abhängige Links-Rechts-Asymmetrie siamesischer Zwillinge

Mit der Identifikation des LROs innerhalb der Vertebraten sowie dessen evolutionärer Konservierung konnte die Etablierung der LR-Asymmetrie als ein transienter, von motilen Cilien abhängiger Vorgang beschrieben werden (Schweickert et al., 2007; Blum et al., 2009b; Tisler et al., 2016). Im Froschembryo führt die experimentelle Induktion eines sekundären Organisators zur Duplikation des LROs im Gastrocoel neurulierender Embryonen. Duplizierte LROs siamesischer Zwillinge lokalisieren nebeneinander und weisen keine Unterschiede im Bezug auf den Cilienbesatz, Cilienlänge oder deren Beweglichkeit auf (Tisler, 2011). Basierend auf dieser Beobachtung wird die Hypothese formuliert, dass die Etablierung der LR-Asymmetrie siamesischer Zwillinge, entsprechend zum wildtypischen Embryo, auf dem linksgerichteten Flüssigkeitsstrom beruht. Vorhergesagt wird, dass die linksseitige Induktion der Nodal-Kaskade unabhängig vom endogenen oder induzierten Ursprung des Zwillings erfolgt und sich ausschließlich auf dessen linksseitiger Positionierung gründet (Nascone und Mercola, 1997). Die gezielte Induktion und Möglichkeit zur Manipulation endogener und induzierter LROs stellen ein einzigartiges Testsystem dar, um die physiologische Ursache dieses humanen Phänotyps aufzuklären.

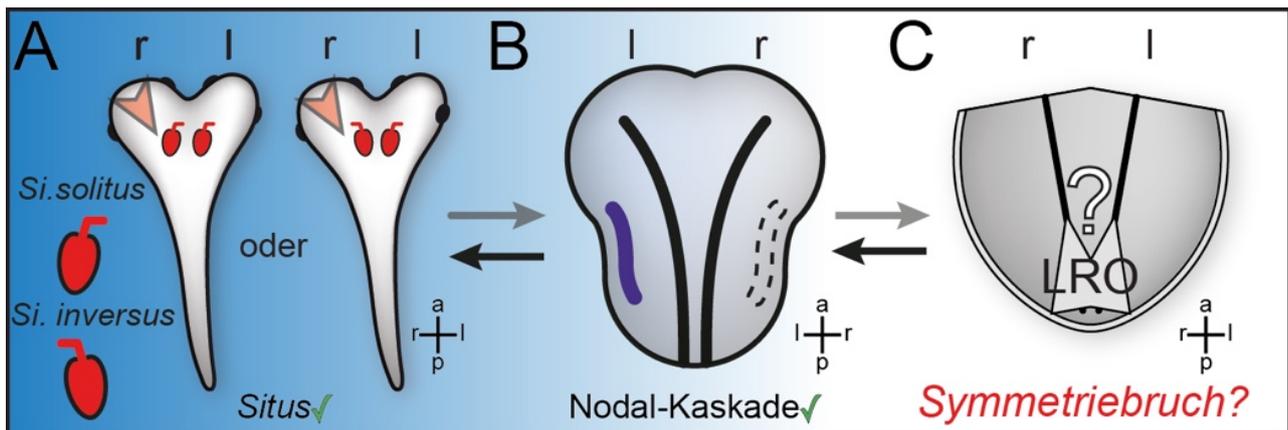


Abb. 4 Lateralitätsentwicklung siamesischer Zwillinge.

(A) Thoracopage, dicephale siamesische Zwillinge weisen Lateralitätsdefekte auf, die sich auf rechte Zwillinge beschränken. Rechte Zwillinge zeigen eine randomisierte Orientierung der inneren Organe auf (Spemann und Falkenberg, 1919; Kaufman, 2004). (B) Links-gerichtete Induktion der Nodal-Kaskade in linken Zwillingen (Nascone und Mercola, 1997). (C) Als Konsequenz der Duplikation des Links-Rechts-Organisators durch experimentelle Achseninduktion wird ein Cilien-basierter Symmetriebruch auch in siamesischen Zwillingen zur Diskussion gestellt (Tisler, 2011).

Links-Rechts-Asymmetrie im Seeigelembryo

Im vierten Kapitel der Arbeit sollen Experimente vorgestellt werden, die die Induktion der asymmetrischen Nodal-Kaskade im Seeigelembryo auf einen mit motilen Cilien besetzten LRO zurückführen lassen und diesen Mechanismus als innerhalb der Deuterostomier konserviert charakterisieren.

Auch über die Wirbeltiere hinaus kann die Etablierung einer LR-Asymmetrie während der Individualentwicklung beobachtet werden. Im Lanzettfischchen *Branchiostoma floridae*, oder dem Seeigel *Paracentrotus lividus* kann eine asymmetrische Expression der Nodal-Kaskade dargestellt werden, die entsprechend zu den Wirbeltieren, im Zug später Gastrulastadien (*Pl*) oder während der Neurulation (*Bf*) nachweisbar ist (Duboc et al., 2005; Soukup et al., 2015).

Im Gegensatz zur asymmetrischen Ausrichtung der inneren Organe instruiert die Nodal-Kaskade die asymmetrische Morphogenese des Lanzettfischchens, die bspw. die asymmetrische Ausrichtung der Somiten zueinander, sowie die linksasymmetrische Positionierung des Mundes umfassen (Blum et al., 2014a, Soukup et al., 2015). In späten Gastrulastadien von Seeigelembryonen kann ebenfalls eine unilaterale Induktion der Nodal-Kaskade in Form der asymmetrischen mRNA Expression ihrer Mitglieder *nodal*, *lefty* sowie *pitx2c* nachgewiesen werden (Duboc et al., 2005). Ausgehend von einem bilateralsymmetrisch organisierten Embryo instruiert die im Seeigel als rechts-asymmetrisch (Duboc et al., 2005) beschriebene Nodal-Kaskade die embryonale Anlage des als Rudiment bezeichneten prämetamorphen Seeigels. Hierbei unterbindet die Expression der Nodal-Kaskade die symmetrische Entwicklung des Rudiments aus den sog. Coelomic Pouches und beschränkt diese auf eine einseitige Entwicklung (Duboc und Lepage, 2007).

Trotz des Nachweises der evolutionären Konservierung des Lateralitätsbestimmenden Signalwegs blieb der funktionelle Mechanismus des Symmetriebruchs im Seeigelembryo bislang unaufgeklärt. Entsprechend zum alternativen Modell des Symmetriebruchs in *Xenopus* konnte, basierend auf pharmakologischen Inhibitionsexperimenten, ein Ionen-Fluss-Modell des Symmetriebruchs für Seeigelembryonen aufgestellt und die funktionelle Beteiligung von Cilien in der Etablierung der LR-Asymmetrie bislang ausgeschlossen werden (Hibino et al., 2006; Blum et al., 2014b; Warner et al., 2016). Daten einer aktuellen Arbeit implizieren, konträr zur bisherigen Datenlage, eine funktionelle Beteiligung von Cilien im Prozess des Symmetriebruchs, die einer genaueren Aufarbeitung bedarf (Takemoto et al., 2016).

LRO basierte Links-Rechts-Asymmetrie im Seeigel

Ausgehend von den in Blum et al., 2009b und Blum et al., 2014a formulierten Hypothesen zum Symmetriebruch im Seeigelebryo sollen im Rahmen dieser Arbeit Experimente vorgestellt werden die dazu beitragen, die funktionelle Ursache der asymmetrischen Expression der Nodal-Kaskade in *Paracentrotus lividus* aufzuklären. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Etablierung der LR-Asymmetrie im Seeigelebryo, entsprechend zu Wirbeltierembryonen, auf einem mit motilen Cilien besetzten LRO beruht. Vorhergesagt wird, dass das Archenteron des gastrulierenden Seeigelebryos als cilienbesetzter LRO charakterisiert werden kann. Mit Hilfe der experimentellen Decilierung der Seeigelebryonen könnten Defekte der Etablierung der LR-Achse herbeigeführt werden, die zu einer weiteren Eingrenzung des Zeitpunkts des Symmetriebruchs in der Embryonalentwicklung der Stachelhäuter führen könnte. Durch den potentiellen Nachweis eines LROs im Seeigelebryo könnte der Cilien-basierte Symmetriebruch als Synapomorphie der Deuterostomier charakterisiert werden .

Kapitel 1

Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollen Experimente vorgestellt werden, die die Funktion von Histondeacetylasen der Klasse IIb während der Etablierung der LR-Achse in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* verdeutlichen. Im Speziellen wurde die Hypothese untersucht, ob die Histondeacetylase 6 eine Funktion in der molekularen Spezifizierung des evolutionär konservierten LROs besitzt und diese innerhalb der Deuterostomier konserviert ist.

HDAC6 ein Kandidatengen für die Etablierung der Links-Rechts-Achse

Die im Zug zweier pharmakochemischer Inhibitor-Screens identifizierte Proteinfamilie der Histondeacetylasen umfasst 11 Mitglieder, die auf Grund ihrer Basensequenz in 4 Klassen eingeteilt werden (Gregoretti et al., 2004; Cao et al., 2009; Carneiro et al., 2011; Seidel et al., 2015). Als Kandidatengene für eine molekulare Funktion innerhalb der LR-Achsenentwicklung des Embryos wurden die Mitglieder der Histondeacetylase Klasse IIb identifiziert (Cao et al., 2009). Diese Klasse wird aus den zwei nah verwandten HDACs -6 und -10 gebildet, die auf Proteinebene zytoplasmatisch lokalisieren (Haberland et al., 2009). Im Folgenden sollen Experimente vorgestellt werden, die eine Funktion des *hdac6* Gens im Prozess der LR-Achsenentwicklung von *Xenopus laevis* nachweisen lassen. Darüber hinaus sollen vorläufige Daten vorgestellt werden, die eine potenziell redundante Beteiligung von *hdac10* in diesem Prozess nahelegen.

Vergleich der Aminosäuresequenz von HDAC6 innerhalb der Wirbeltiere

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen Modellorganismen der Wirbeltierentwicklung und dem Menschen verdeutlichte die evolutionäre Konservierung der HDAC6 zwischen diesen Spezies (Abb. 5 A). In *Xenopus laevis* umfasst die Sequenz des Hdac6 Proteins 1285 Aminosäuren (AS), (*Xenopus tropicalis* 1160 AS; *Danio rerio* 1066 AS; *Mus musculus* 1009 AS; *Homo sapiens* 1204 AS) und weist eine Konservierung der Aminosäuresequenz von 49,3 % zwischen *X. laevis* und *H. sapiens* auf. Durch die Darstellung der konservierten Aminosäuren können drei strukturell-konservierte Domänen des Proteins grafisch veranschaulicht werden (Abb. 5 B-C), die im Zug der initialen Beschreibung der HDAC6 als die Deacetylase Domänen 1 & 2 sowie als Zinkfinger-Motiv charakterisiert wurden (Hubbert et al., 2002; Hook et al., 2002). Diese Domänen sind essentiell für die Funktion des Enzyms als Deacetylase und innerhalb der Wirbeltiere konserviert (Zhang et al., 2005). Durch die fortschreitende funktionelle Charakterisierung dieses Gens konnten bereits zahlreiche direkte Protein-Interaktionspartner der HDAC6 wie α -Tubulin, β -catenin, Polycystin2 oder CD133 identifiziert werden (Hubbert et al., 2002; Mak et al., 2012; Wang et al., 2014; Cebotaru et al., 2014).

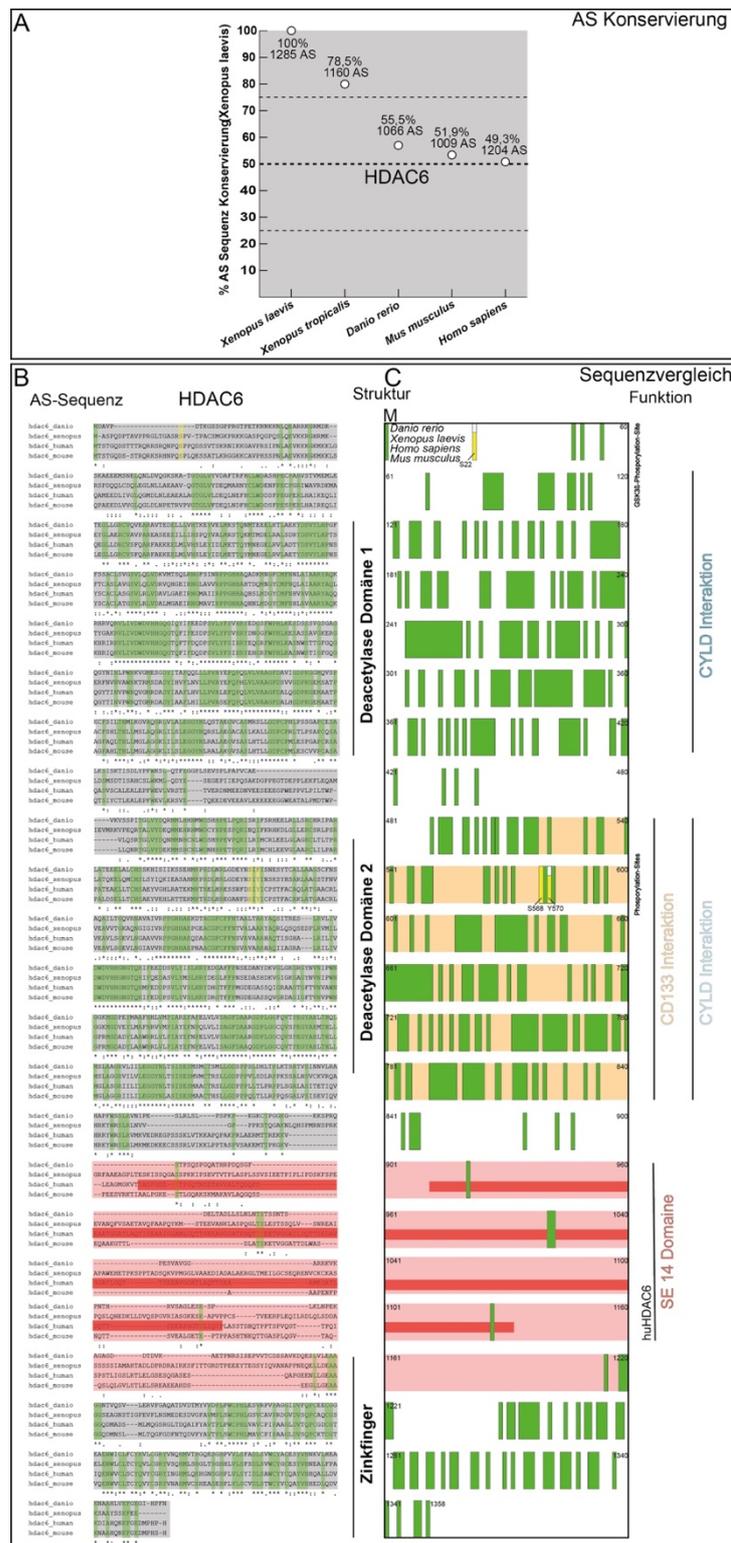


Abb. 5 Vergleich der Aminosäuresequenz von HDAC6.

(A-C) Vergleich der AS-Sequenz von HDAC6 zwischen Modellorganismen der Wirbeltiere (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *Mus musculus*), sowie des Menschen (*Homo sapiens*). (A) Vergleich der Konservierung auf AS-Ebene zu *X. laevis*: HDAC6 in *X. tropicalis* (78,5 %; 1160 AS), *D. rerio* (55,5 %; 1066 AS), *M. musculus* (51,9 %; 1009 AS) und *H. sapiens* (49,3 %; 1204 AS). (B) Grafische Darstellung der Sequenzanalyse (Übereinstimmende AS, grün; phosphorylierbare AS, gelb; S, Serin; Y, Tyrosin, humanspezifische SE 14 Domäne, rot). Evolutionär-konservierte Bereiche: Deacetylase Domäne (DD) 1 & 2, C-Terminale Zink-Finger Domäne. (C) Abstraktion der konservierten Aminosäuren (grün), konservierten Phosphorylierungs-Sites (gelb) und die humane SE14 Domäne (rot). Für beide DDs des Proteins konnten verschiedene Interaktoren beschrieben werden (CYLD, Wickström et al., 2010; CD133, Mak et al., 2012). Die SE 14 Domäne findet sich exklusiv in humaner HDAC6 (Bertos et al., 2004).

In situ* Expressionsanalyse der *hdac6* mRNA in *Xenopus laevis

Um eine gewebespezifische mRNA Expression während der Embryonalentwicklung nachzuvollziehen, wurde die gesamte AS-codierende Nukleotidsequenz (4012 bp) der *hdac6* cDNA kloniert und eine stadienübergreifende mRNA Expressionsanalyse durchgeführt (Abb. 6 A-K"). In St. 8 lokalisierte *hdac6* mRNA im Bereich der animalen Hemisphäre des Embryos (Abb. 6 A) und war während der Gastrulation in der gesamten animalen Hemisphäre sowie ubiquitär im Bereich der äußeren und tiefen Zellschicht des Superfiziellen Mesoderms detektierbar (Abb. 6 B-B'). Zum Ende der Neurulation im St. 17 konnte eine Expression von *hdac6* mRNA im Dünnschnitt durch dorsale Explantate im Notochord sowie im Bereich der GRP nachgewiesen werden (Abb. 6 C-C'). In den Stadien 17-20 war zudem eine lokalisierte mRNA Expression im Notochord deutlich erkennbar (Abb. 6 D). Frühe Kaulquappen im St. 23 wiesen eine regionalisierte Expressionen von *hdac6* mRNA in den Anlagen der Augen, den wandernden Neuralleistenzellen sowie im präsomitischen Mesoderm auf (Abb. 6 E). In St. 30 war eine Expression in den Kiemenbögen, dem embryonalen Pronephros sowie den ventral gelegenen hämatopoetischen Stammzellen sowie den Augen detektierbar (Abb. 6 F-F"). In den Stadien 40-45 konnte eine anhaltende *hdac6* mRNA Expression in den Nasengruben der Embryonen nachgewiesen werden (Abb. 6 G-I'). Explantate des Gastrointestinaltrakts wiesen eine lokalisierte Färbung im Magen sowie in der embryonalen Leber auf (Abb. 6 J-J"). Ebenfalls war in explantierten Gehirnen des St. 45 eine regionalisierte mRNA Lokalisation im dorsalen Diencephalon, der Hypophyse, den Rhombomergrenzen des Rhombencephalons sowie den davon abgehenden Hirnnerven zu beobachten (Abb. 6 K-K").

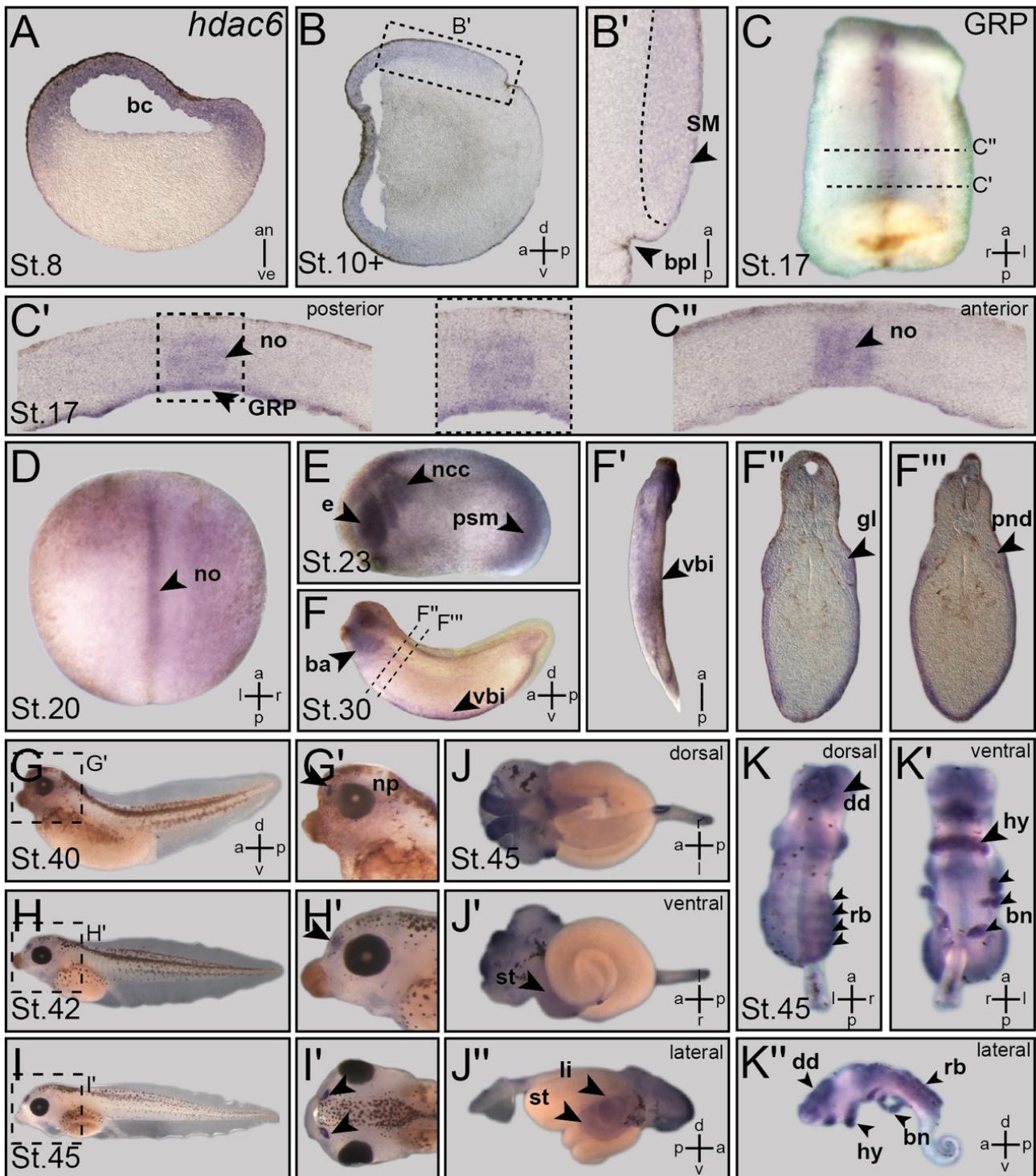


Abb. 6 *In situ* Expressionsanalyse von *hdac6* mRNA in *Xenopus laevis*.

(A-K'') *hdac6* mRNA Expression in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. In St. 8 lokalisierte *hdac6* mRNA ubiquitär in der animalen Hemisphäre des Embryos (A). St. 10+: Lokalisation im Bereich des Superfiziellen Mesodermis (SM) (B; B'). St. 17-20: Expression im Notochord (no) (C; C'; D) und im LRO (GRP, C'). St. 23: Expression im Bereich des präsomitischen Mesodermis, der wandernden Neuralleistenzellen (ncc), der Augenanlage (e) (E). St. 30: Expression in den hämatopoetischen Stammzellen des Embryos (vbi), dem embryonalen Pronephros (pn) sowie in den Kiemenbögen (F). Ventrale Ansicht (F') mit Expression in vbi. (F'; F''), transversale Schnitte durch F; Expression in Glomus (gl) des Pronephros und des Nierenkanals (pnd) in vbi. In St. 40, 42, 45: spezifische Expression in den Nasengruben (np) (G-I). Vergrößerungen von (G-I in G'-I'). Viszerale Explantate des St. 45: Expression im Kiemenkorb, Magens (st) und Leber (li). Im explantierten Gehirn des Kaulquappens St. 45: lokalisiert *hdac6* mRNA im dorsalen Diencephalon (dd), der Hypophyse (hy), den Rhombomergrenzen (rb) des Rhombencephalons und den Hirnnerven (bn) (K); dorsale Ansicht (K') ventrale Ansicht; (K'') laterale Ansicht. (Schnittdicke in A, B, C, F', F''' 35 μ m).

Inhibition von Hdac6 induziert Defekte der Links-Rechts-Achse

Um einen Einfluss des Hdac6 Proteins auf die LR-Achsenentwicklung zu untersuchen wurden Embryonen ab St. 8 in 100 nM, 500 nM, 750 nM Tubastatin A bzw. DMSO-haltiger Ringerlösung inkubiert und im Anschluß einer Analyse der Markergenexpression unterzogen. Bei Tubastatin A handelt es sich um einen Hdac6-spezifischen, chemischen Inhibitor mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration im nM Bereich (Butler et al., 2010). Nach Inkubation in Tubastatin A haltiger Ringerlösung konnte ein dosisabhängiger Effekt des Verlustes der links-asymmetrischen *pitx2c* mRNA Expression beobachtet werden (100nM, 12,5 % fehlend n.s.; 500nM, 38 % fehlend $p < 0.001$; 750nM, 57,9 % fehlend; $p < 0.001$; Fietz, 2014).

Um die durch Inkubationsexperimente erhaltenen Daten zu bestätigen, wurden Antisense Oligomer Morpholino (MO) vermittelte Funktionsverlustexperimente durchgeführt. Durch Bindung an die Ziel mRNA im Bereich der Translations-Initiationsstelle oder durch Blockierung der Splice-Donor/Akzeptorstellen kann die Translation der mRNA in eine AS-Sequenz verhindert oder ein fehlerhaftes Splicing der prä-mRNA induziert werden. Fehlerhaftes Splicing resultiert in einem verfrühten Stoppcodon und/oder einem Abbau des fehlerhaft translatierten Proteins (Eisen and Smith, 2008). Um die *hdac6* mRNA während der Embryonalentwicklung gezielt zu inhibieren wurden zwei unterschiedliche MOs gegen *hdac6* mRNA verwendet, die zum einen spezifisch die Translations-Initiationsstelle (ATGMO; Bestman et al., 2015) besetzten, zum anderen die Exon-Intron Grenze von Exon 1-Intron 1 der prä-mRNA von *hdac6* blockiert (SBMO). Um einen Einfluss von Hdac6 auf die LR-Asymmetrie zu bestätigen wurden Embryonen im 4-Zell Stadium mit ATG- oder SBMO injiziert (C1 Injektion; Moody, 1987; Vick et al., 2009) und im St. 30 einer *pitx2c* mRNA Expressionsanalyse unterzogen (Abb. 7 A-B). Im Vergleich zu Standard-Kontroll-MO (KoMO) injizierten Kontrollen wiesen sowohl SBMO als auch ATGMO injizierte Morphanten einen signifikanten, dosisabhängigen Verlust der asymmetrischen *pitx2c* mRNA Expression auf (Abb. 7 C-D; SBMO: 0.75 pmol, 2,7 % fehlend, $p > 0.05$; 1.0 pmol 21,8 % fehlend, 3,6 % bilateral $p < 0.001$; 1.5 pmol, 37,3 % fehlend, $p < 0.001$; ATGMO: 1.0 pmol, 21,7 % fehlend, 2,2 % bilateral, $p < 0.001$; 2.0 pmol, 47,4 % fehlend $p < 0.001$). Das Fehlen der Markergenexpression war beobachtbar, nachdem der MO-vermittelte Funktionsverlust in der Randzone dorsal-linker (dl) Blastomeren (C1 Injektion) durchgeführt wurde. Ein Funktionsverlust in dorsal-rechten (dr) Blastomeren (C1 Injektion) induzierte keine Abweichung vom Wildtyp (Abb. 7 C; SB MO: 0.75 pmol, 100 % wildtypisch, $p > 0.05$; 1.0 pmol, 97,6 % wildtypisch $p > 0.05$, 1.5 pmol, 97 % wildtypisch, $p > 0.05$). Zum Nachweis der Spezifität des Funktionsverlustes durch den SBMO wurde ein Rettungsexperiment durchgeführt. Durch die Koinjektion von humaner *HDAC6* mRNA sollte der MO vermittelte Funktionsverlust im Embryo ausgeglichen sowie die *pitx2c* mRNA Expression im LPM reinduziert werden. Im Rettungsexperiment konnte der SBMO induzierte Funktionsverlust von Hdac6 (SBMO: 32,8 % fehlend, 1.5 pmol, $p < 0.001$) bis auf wildtypisches Niveau reinduziert werden (50-75ng/ μ l *HDAC6*

mRNA, 1,8 % fehlend, $p < 0.001$; n.s. $p > 0.05$). Um den auf mRNA-Expressionsebene beobachteten Funktionsverlust auf morphologischer Ebene zu validieren, wurden im Anschluß Embryonen im 4-Zell Stadium mit SBMO in dl-, dr- oder ventral-rechte (vr) Blastomeren injiziert (C1 Injektion) und bis zum Erreichen später Kaulquappenstadien (St. 45) kultiviert. In diesem Entwicklungsstadium konnte die asymmetrische Anordnung der inneren Organe bestimmt werden (Abb. 7 F-H). Im Vergleich zur Kontrolle wiesen ausschließlich dl injizierte Kaulquappen (16,6 %) eine signifikante Anzahl an invers positionierten Herzen auf (Abb. 7 H; $p < 0.001$). Embryonen die im 4-Zell Stadium dr oder vr injiziert worden waren zeigten hingegen keine Abweichung von der wildtypischen Positionierung des Herzens ($p > 0.05$).

In Zusammensicht der Inkubationsexperimente mit dem spezifischen Hdac6 Inhibitor Tubastatin A, sowie den ATG-/SBMO vermittelten Funktionsverlustexperimenten konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass (1.) Hdac6 eine *bona fide* Funktion während der Etablierung der LR-Achse übernimmt und (2.) diese in den Tochterzellen dorsaler Blastomeren des Embryos zu vermuten ist.

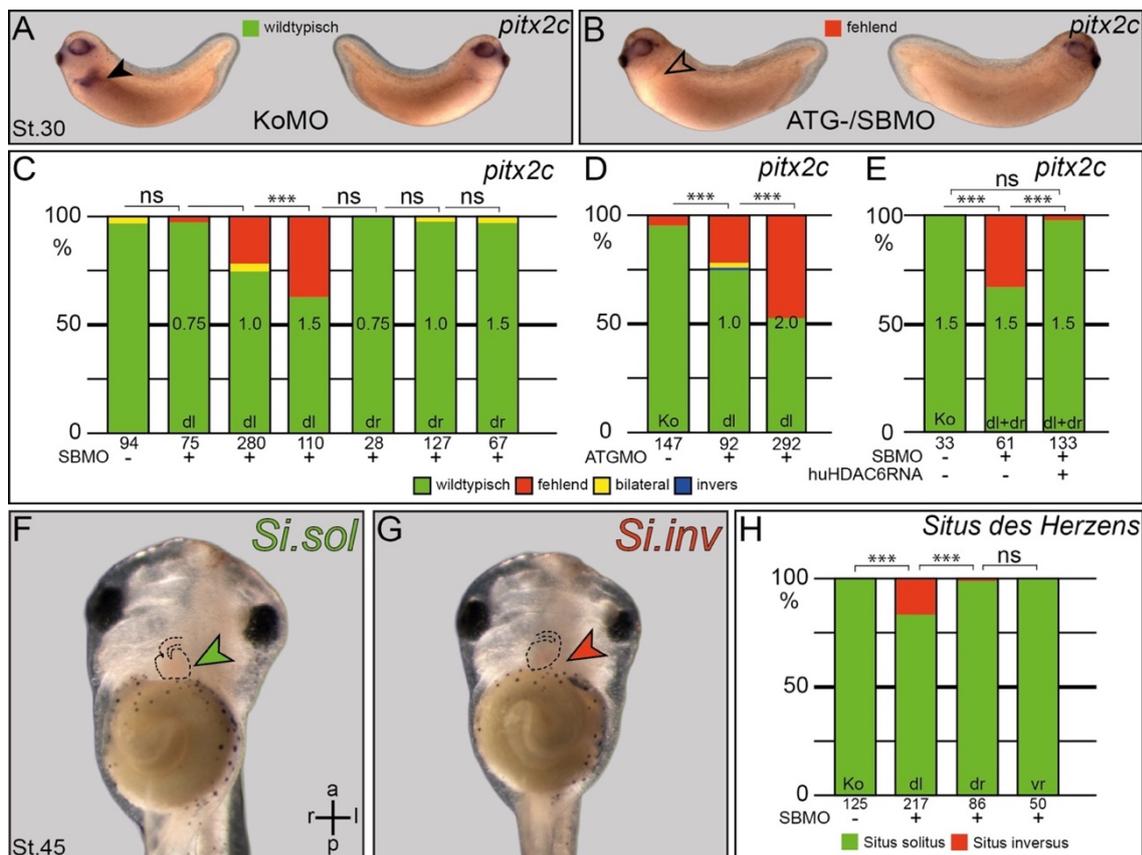


Abb. 7 Funktionsverlust von Hdac6 führt zu Defekten der Links-Rechts-Achsenpezifizierung.

(A-G) Morpholino Oligomer vermittelter Funktionsverlust von Hdac6 führt zu einem Verlust der *pitx2c* mRNA Expression im St. 30 sowie *Situs inversus* des Herzens im St. 45. (A) Linksasymmetrische *pitx2c* Expression in Kontrollen, (B) Verlust der *pitx2c* mRNA Expression in Morphanten. (C, D, E) Quantifizierung der Markergenexpression nach ATGMO oder SBMO induziertem Funktionsverlust (0.75 pmol; 1.0 pmol; 1.5 pmol; dorsale Marginalzone links, dl; dorsale Marginalzone rechts, dr). DI Injektionen führen konzentrationsabhängig zu LR-Defekten, die durch Koinjektion von humaner *HDAC6* mRNA bis auf wildtypisches Niveau gerettet werden konnten. (F, G) Kaulquappen im St.45 wiesen nach MO Injektion *Situs inversus* des Herzens auf (H) Quantifizierung des *Situs inversus* des Herzens. DI Funktionsverlust führt zu signifikantem Auftreten des *Situs inversus* des Herzens. Statistische Analyse: Chi²-Test; n.s. nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Induktion der Nodal-Kaskade benötigt Hdac6

Um die zeitliche sowie räumliche Wirkebene von Hdac6 im Zuge der LR-Achsenentwicklung einordnen zu können wurden Experimente durchgeführt, die eine regulatorische Funktion des Hdac6 Proteins im Bezug auf die Induktion der Nodal-Kaskade aufklären sollten. Hierbei wurden SBMO induzierte Embryonen einer mRNA *in situ* Hybridisierung gegen *nodal1* unterzogen (Abb. 8 A-F; Sampath et al., 1997). Morphanten zeigten, im Vergleich mit KoMO injizierten Kontrollen, eine signifikante Reduktion der *nodal1* mRNA Expression im linken Seitenplattenmesoderm auf. Wie auch schon in vorausgegangen Experimenten führten dl MO Injektionen (C1-Injektion) zu einem prozentual höheren Verlust der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle oder zum dr Funktionsverlust (Abb. 8 B; dl 65 % fehlend, vs. dr 23 % fehlend; $p < 0.001$).

Da diese Experimente eine molekulare Funktion von Hdac6 sowohl zeitlich als auch hierarchisch vor der asymmetrischen *nodal1* mRNA Expression implizierten, sollte im nächsten Schritt ermittelt werden, ob die resultierenden Morphanten noch die allgemeine Kompetenz besaßen, die Nodal-Kaskade im Seitenplattenmesoderm zu aktivieren. Auf Grund der symmetrischen Anlage des LROs im Dach des Archenteron existieren mit den somitischen GRP-Zellen der linken sowie rechten Körperhälfte des Embryos zwei Zellpopulationen, die *nodal1* sowie dessen Inhibitor *dand5* exprimieren (Schweickert et al., 2007; Schweickert et al., 2010). Um die Induktion der Kaskade unter Ausschluss eines regulatorischen Effekts durch den Flüssigkeitsstrom zu testen, wurde ein kombinatorischer Funktionsverlust von Hdac6 sowie Dand5 auf der dr Seite des Embryos durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Induktion der *nodal1* Expression im Seitenplattenmesoderm auf mRNA Ebene ermittelt (Abb. 8 C; Schweickert et al., 2000; Vonica und Brivanlou, 2007; Blum et al., 2009a; Schweickert et al., 2010).

Wie vorab beschrieben führte ein MO vermittelter Verlust von Hdac6 in dl Blastomeren (C1/C2-Injektion) zum Verlust von *nodal1* mRNA (Abb. 8 C; dl, 70 % fehlend $p < 0.001$, dr, 13 % fehlend), sowie ein MO vermittelter Funktionsverlust von Dand5 in dr Blastomeren (C1/C2-Injektion) zu einer effektiven Induktion der Expression von *nodal1* mRNA im Seitenplattenmesoderm der Embryonen (Vonica und Brivanlou, 2007). Nach kombinatorischem Funktionsverlust von Hdac6 und Dand5 durch Koinjektion von MOs konnte eine Induktion der *nodal1* Genexpression beobachtet werden. 54 % der resultierenden Morphanten wiesen nach kombiniertem Hdac6/Dand5 Funktionsverlust eine bilaterale mRNA Expression von *nodal1* im LPM des St. 23 auf (Abb. 8 C). Eine generelle Kompetenz zur Induktion der Nodal-Kaskade in Zellen der C1 sowie C1/C2-Lineage war nach Funktionsverlust von Hdac6 somit weiterhin vorhanden.

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust der mRNA Expression von *nodal1* sowie *pitx2c* im linken LPM der Embryonen auf einem Verlust der vom Flüssigkeitsstrom abhängigen Regulation der *dand5* mRNA basieren könnte (Schweickert et al., 2007; Vick et al., 2009; Schweickert et al., 2010).

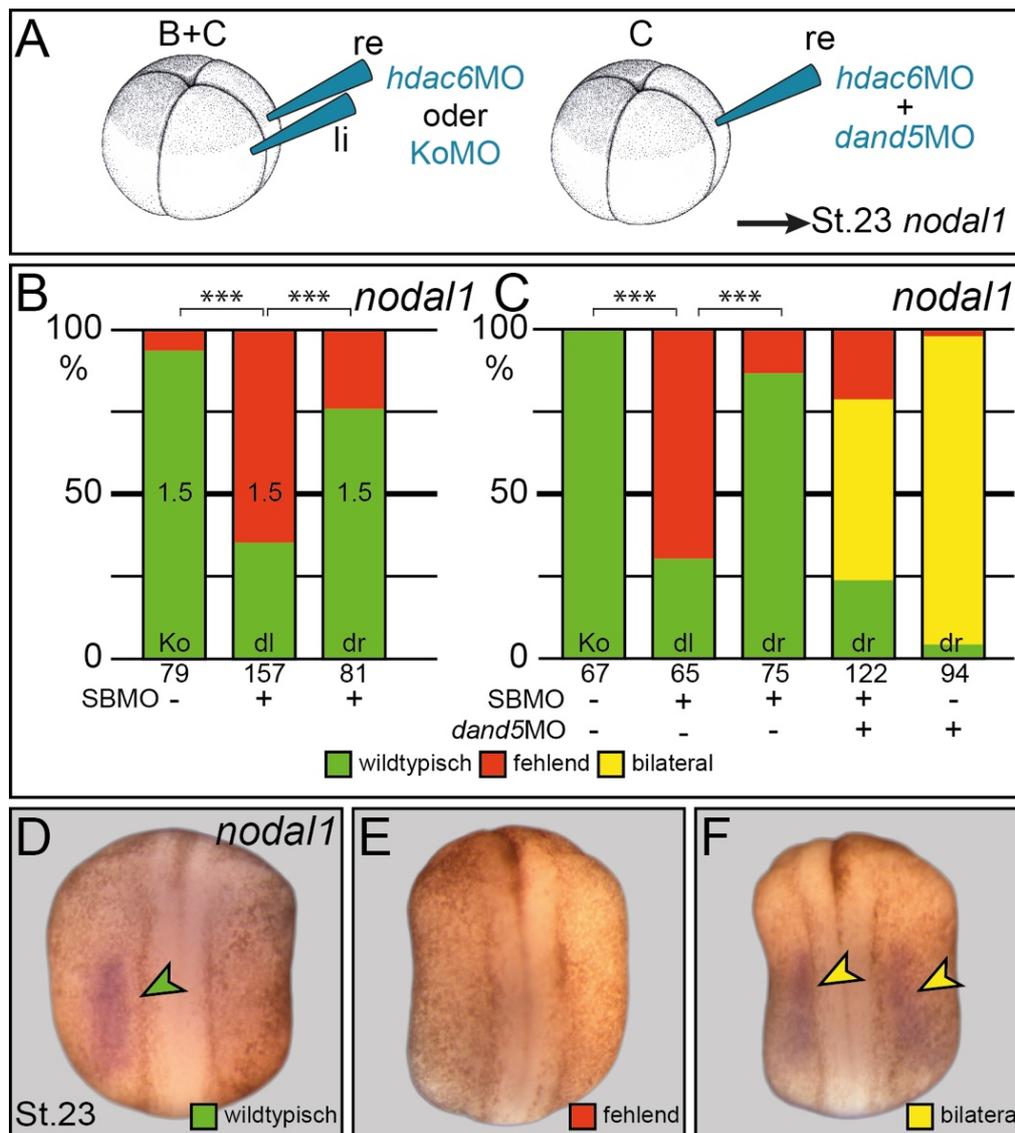


Abb. 8 Hdac6 positioniert sich hierarchisch vor *dand5* mRNA Regulation.

(A) Einordnung der hierarchischen Ebene der Hdac6 Funktion. Hdac6 ordnet sich vor der asymmetrischen Regulation von *dand5* mRNA ein und beschränkt sich auf die linke Körperhälfte. Schematische Darstellung der Injektionsexperimente. (B, C) Quantifizierung der Experimente. Injektion von SBMO oder KoMO (1.5 pmol) in linke oder rechte Blastomeren der dorsalen Marginalzone. Koinjektion von SBMO (1.0 pmol) und *dand5*MO (0.5 pmol) in dorsal-rechte Blastomeren. Quantifizierung des *nodal1* mRNA Expressionsmusters im St. 23. Darstellung repräsentativer Embryonen in wildtypisch, D, fehlend, E; bilateral, F; Statistische Analyse: Chi²-Test; n.s. nicht signifikant; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Verlust der asymmetrischen *dand5* mRNA Regulation in *hdac6* Morphanten

Mit dem Abbau der *dand5* mRNA in den somitischen GRP-Zellen der linken Körperhälfte wird der asymmetrische Stimulus molekular fixiert und in eine differenzielle Genexpression übersetzt (Vonica und Brivanlou, 2007; Schweickert et al., 2010). Manipulationen, die zu einem Verlust oder einer fehlerhaften Regulation der *dand5* mRNA führen, induzieren Defekte der LR-Achsenentwicklung im Bezug auf die asymmetrische Genexpression sowie die Ausrichtung der inneren Organe (Vonica und Brivanlou, 2007; Schweickert et al., 2007; Schweickert et al., 2010). Um einen möglichen Einfluss des Funktionsverlusts von Hdac6 auf die asymmetrische Regulation der *dand5* mRNA zu überprüfen, wurden *hdac6* Morphanten im St. 19/20 auf die Flüssigkeitsstrom-induzierte, links-

asymmetrische Reduktion der *dand5* mRNA hin untersucht (Abb. 9 A-D; Schweickert et al., 2010). Kontrollembryonen wiesen im St.19/20 eine wildtypische, linksseitige Reduktion der *dand5* Expression auf, wohingegen in Morphanten ein Verlust dieser Regulation zu beobachten war (Abb. 9 A-B). Die Quantifizierung des Effekts ergab einen signifikanten Verlust des Abbaus der *dand5* mRNA (Abb. 9 C; $l = r$, 51 %, $p < 0.01$) im Vergleich zu KoMO injizierten Kontrollembryonen ($l = r$, 6 %).

Zur experimentellen Bestätigung dieser Beobachtung wurde ein kombinatorischer Funktionsverlust von Hdac6 und Dand5 zur Rettung der *pitx2c* Expression durchgeführt (Abb. 9 D). Der SBMO vermittelte Funktionsverlust (dl; C1/C2 Injektion) im Bezug auf die Expression von *pitx2c* mRNA (48 % wildtypisch; 46 % fehlend; 3 % bilateral, 3 % invers, $p < 0.001$) konnte durch einen kombinierten Verlust durch SBMO und *dand5*MO partiell gerettet werden (65 % wildtypisch; 17 % fehlend, 10 % bilateral, 8 % invers, $p < 0.05$). Dieser Versuch implizierte somit einen Einfluss des Hdac6 Proteins auf die LR-Achsenentwicklung hierarchisch vor der Flüssigkeitsstrom-induzierten asymmetrischen Regulation von *dand5* mRNA.

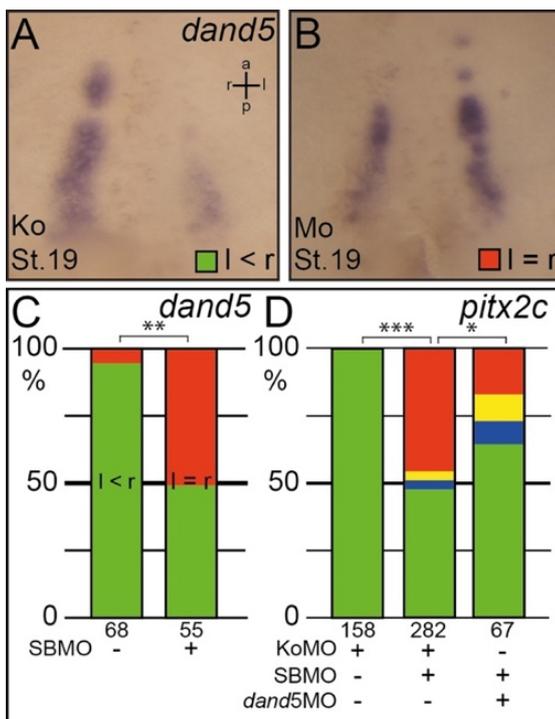


Abb. 9 Hdac6 Funktionsverlust verhindert asymmetrische *dand5* mRNA Regulation.

(A) *In situ* Hybridisierung für *dand5* mRNA in St. 19/20 in Kontrollembryonen und (B) Morphanten. *hdac6* Morphanten wiesen einen Verlust der asymmetrischen *dand5* mRNA Regulation auf ($l = r$; grün), die in Kontrollen zu beobachten war ($l < r$; rot). (C) Quantifizierung der *dand5* mRNA Expression im St. 19/20 (51 % $l = r$; $p < 0.01$). (D) Funktionsverlust von Hdac6 und Dand5 führt zu einer partiellen Rettung der *pitx2c* Expression im Seitenplattenmesoderm des St. 30.

Ausgehend von dem Expressionsmuster der *hdac6* mRNA in der embryonalen Niere (Abb. 6), der mit sensorischen Cilien assoziierten Proteinlokalisierung in Zellkultur sowie den durch den MO vermittelten Funktionsverlusten wurde für die weiterführenden Experimente eine molekulare Funktion von Hdac6 im Rahmen der Ciliogenese, sowie eine Cilien-assoziierte Funktion in Erwägung gezogen (Pugacheva et al., 2007; Prodromou et al., 2012).

Die Tochterzellen der C1-Lineage des 4-Zell Stadiums tragen zur Ausbildung der zentralen GRP-Zellen mit hypochordalem sowie notochordalem Zellschicksal bei (Shook et al., 2004). Diese Zellen lokalisieren im zentralen Bereich der GRP und exprimieren weder *nodal1* noch dessen Inhibitor *dand5*, tragen aber nach spezifischem Funktionsverlust von Hdac6 in dieser Lineage zu LR-Defekten bei (Abb. 7 C; Schweickert et al., 2010). Als charakteristisches Merkmal weisen die GRP-Zellen dieses Zellschicksals posterior-polarisierte, motile Monocilien auf. Durch rotierende Bewegungen erzeugen diese Cilien in den Stadien 15-18 den asymmetrischen Flüssigkeitsstrom des LROs (Schweickert et al., 2007). Unter Beteiligung immotiler, sensorischer Cilien wird dieser Flüssigkeitsstrom wahrgenommen und durch die Aktivierung der Nodal-Kaskade in den linken somitischen GRP-Zellen transkriptionell fixiert (Schweickert et al., 2007; Schweickert et al., 2010; Boskovski et al., 2013). Im nächsten Schritt sollte deshalb eine mögliche Hdac6 Proteinlokalisierung in Assoziation mit motilen Cilien in der Epidermis und dem LRO untersucht werden, die Rückschlüsse auf die Ursache der beobachteten LR-Defekte liefern könnten.

Hdac6 lokalisiert im Bereich des Basalkörpers motiler Cilien

Xenopus Embryonen in den Entwicklungsstadien 20-39 stellen ein geeignetes Modellsystem zur Aufklärung Cilien-assoziiierter Proteinlokalisierung dar (Brooks and Wallingford, 2015; Werner und Mitchell, 2013; Schweickert und Feistel, 2015). In multicilierten Zellen der embryonalen Epidermis kann eine mit motilen Cilien assoziierte Lokalisation von Proteinen und weiterführend Phänotypen nach Funktionsgewinn- und Funktionsverlustexperimenten analysiert werden (Park et al., 2008; Stubbs et al., 2008; Stubbs et al., 2012). Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation des endogenen Hdac6 Proteins in *Xenopus* Embryonen wurden Antikörper-vermittelte Immunofluoreszenzfärbungen mit einem kommerziell erhältlichen Anti-HDAC6 Antikörper durchgeführt.

Nach Dents' Fixierung konnten in einem distinkten Zelltyp der embryonalen Epidermis spezifische, punktartige Signale im Bereich der apikalen Zellmembran detektiert werden (Abb. 10 A-A'). Als Konsequenz des SBMO vermittelten Funktionsverlusts war diese Expressionen stark reduziert (Abb. 10 C-D). Dieses Experiment bestätigte somit wechselseitig die Spezifität des verwendeten SBMO sowie des eingesetzten Anti-HDAC6-Antikörpers. Um festzustellen, ob es sich bei den Hdac6 positiven Zellen um multicilierte Zellen handelte wurde im Anschluß eine kombinierte Immunofluoreszenzfärbung gegen Hdac6 und acetyliertes Tuba4a durchgeführt. Ac.Tuba4a ist Bestandteil des Axonems der Cilien und markiert dadurch spezifisch cilierte Zellen der embryonalen Epidermis sowie des LROs (Chu und Klymkowsky, 1989; Werner und Mitchell, 2013).

Nach Durchführung des Experiments wurde eine räumliche Assoziation des Immunofluoreszenzsignals von Hdac6 und ac.Tuba4a in multicilierten Zellen der embryonalen Haut beobachtet (Abb. 10 E-E'''). Hierbei konnte eine Positionierung des Hdac6 Signals am proximalen Ende der Cilien in multicilierten Zellen festgestellt werden (Abb. 10 E'''). Ein entsprechendes Signal für Hdac6 Protein war auch an der Basis motiler Monocilien des *Xenopus* LRO nachweisbar (Fiebig, 2016). Durch weiterführende Analysen mit Markern für den Basalkörper der Cilien, γ -Tubulin (Tubg1) und Cetn2-EGFP konnte die subzelluläre Proteinlokalisierung von Hdac6 weiterführend aufgeklärt und bestätigt werden (Werner und Mitchell, 2013; Fiebig, 2016).

Als Konsequenz der Cilien-assoziierten, subzellulären Proteinlokalisierung von Hdac6 wurde für die folgenden Experimente die Hypothese aufgestellt, dass ein Funktionsverlust von Hdac6 Einfluss auf die Ausbildung von Cilien und deren Beweglichkeit nehmen könnte.

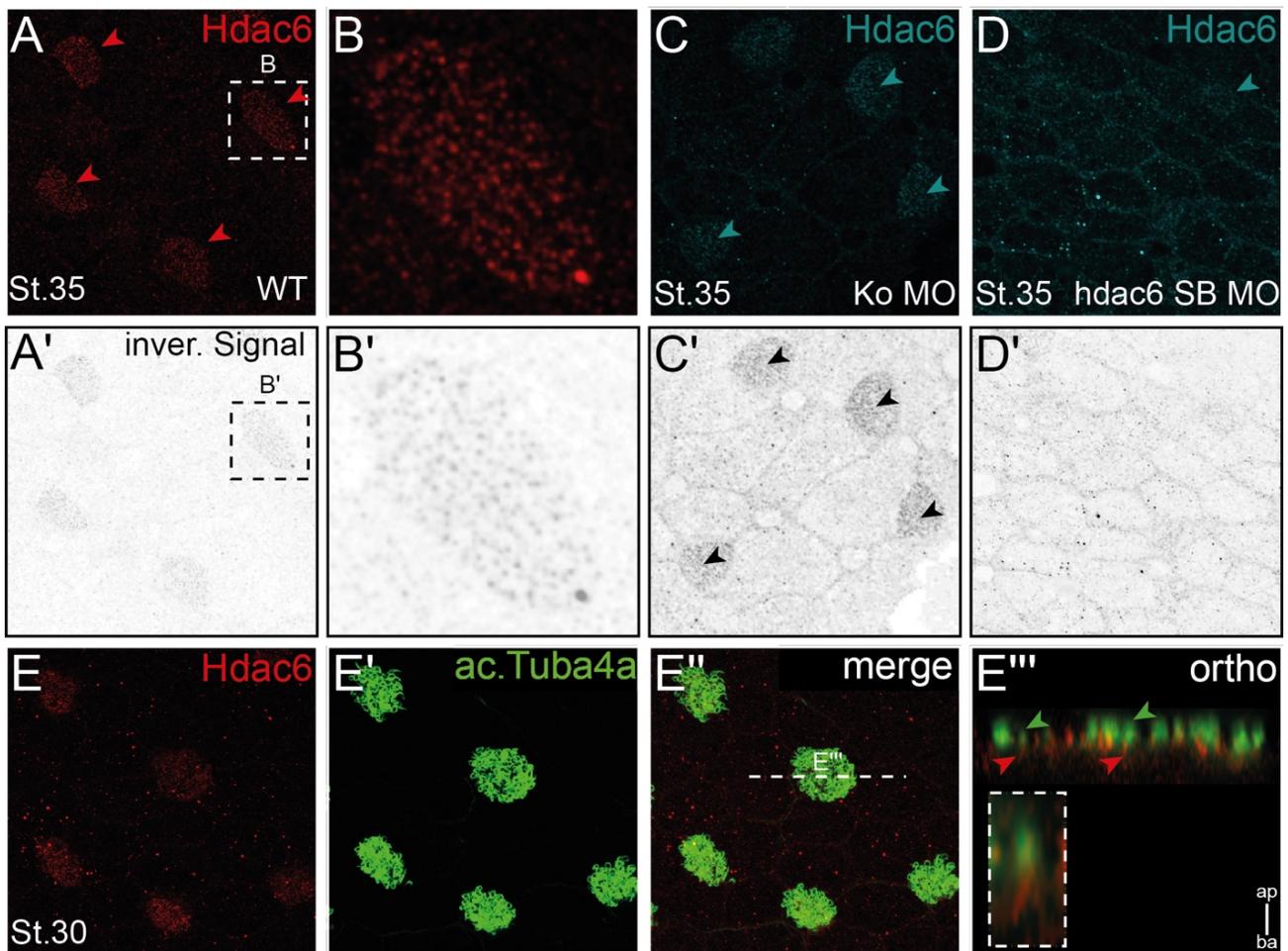


Abb. 10 Analyse der subzellulären Proteinlokalisierung von Hdac6 in der embryonalen Epidermis.

(A) Antikörpervermittelte Analyse der subzellulären Proteinlokalisierung von endogenem Hdac6 Protein in der embryonalen Epidermis St. 30-35. Im St. 35 können distinkte, auf einen Zelltyp beschränkte Signale detektiert werden (A' invertierter Kanal aus A). (B) zeigt eine Vergrößerten Ausschnitt aus (A; B' invertierter Kanal aus B). (C-D') Subzellulär lokalisiert Hdac6 in einem gepunkteten Muster im Bereich der apikalen Zellmembran. Injektion von SBMO nahm Einfluß auf das detektierbare Hdac6-Signal. (E-E''') Hdac6 lokalisiert spezifisch in multicilierten Zellen der Haut. Doppelimmunofluoreszenz gegen Hdac6 und ac. Tuba4a. Hdac6 lokalisiert im Bereich der Basis motiler Cilien wies aber auch eine partielle Kolokalisation mit ac. Tuba4a auf (E''').

Hdac6 ist essenziell für Ausbildung von motilen Cilien

Um einen Effekt des Funktionsverlusts von Hdac6 auf die Ausbildung und Motilität von Cilien zu untersuchen wurden Experimente in der embryonalen Haut durchgeführt (Abb. 11 A-D'). Im Vergleich zu Kontrollembryonen (Abb. 11 A-B) resultierte ein SBMO vermittelter Funktionsverlust in einer Reduktion der Anzahl der Cilien sowie deren Verkürzung (Abb. 11 C-D'). Im Rahmen des komplementären Experiments, der Überexpression humaner *HDAC6* mRNA, konnte kein Ciliogenese-Phänotyp beobachtet werden (Abb. 11 C-C'). Mit der Überexpression einer katalytisch-inaktiven humanen *HDAC6* war es jedoch möglich, den vorab beschriebenen MO vermittelten Funktionsverlust zu phänokopieren (Abb. 11 D-D'). Zur Untersuchung eines möglichen Effekts auf die Motilität der Cilien nach Funktionsverlust wurden im Anschluss Hochgeschwindigkeitsaufnahmen des Bewegungsmusters von Cilien multicilierter Zellen aufgenommen (Abb. 12 A-B''; Filme 1-5). Multicilierten Zellen von Kontrollembryonen wiesen eine wildtypische Cilierung und ein nicht-beeinflusstes Schlagmuster der Cilien auf (Abb. 12 A-A''), wohingegen bei Morphanten eine Reduktion der Cilienzahl, sowie eine Reduktion ihrer Beweglichkeit festgestellt werden konnte (Abb. 12 B-B'').

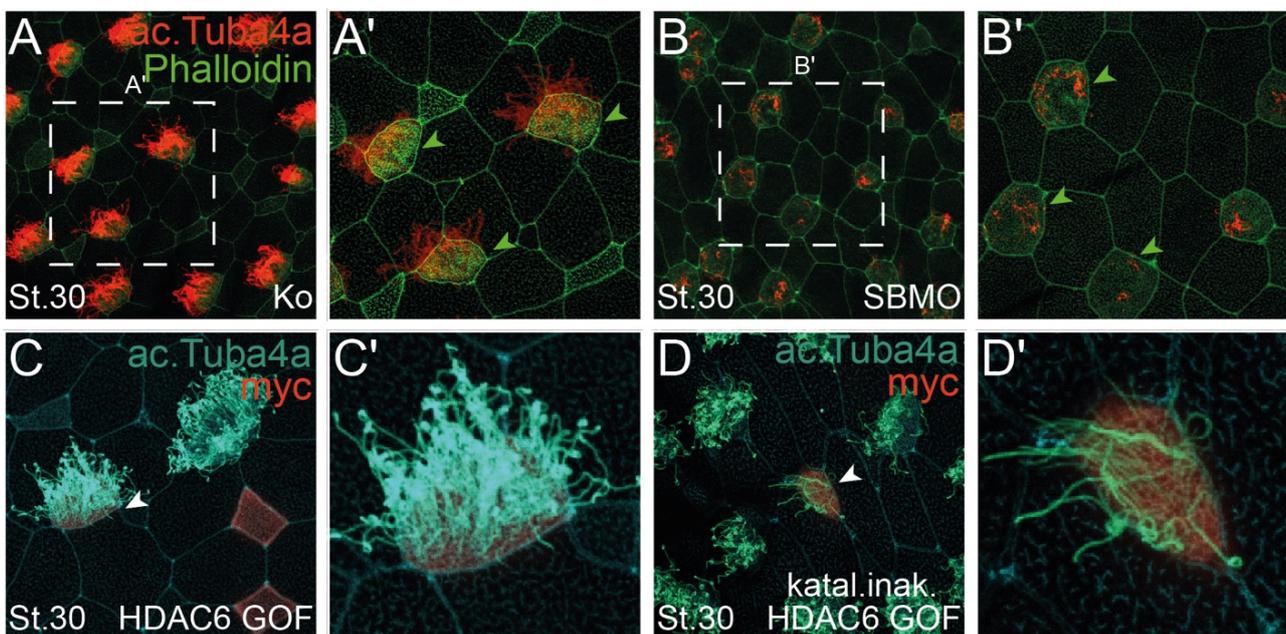


Abb. 11 Funktionsverlust von Hdac6 nimmt Einfluss auf die Ausbildung motiler Cilien in MCCs.

(A-D) Reduktion der Cilien in multicilierten Zellen nach Hdac6 Funktionsverlust. (A) Wildtypische Ciliogenese sowie wildtypisches apikales Aktinnetzwerk der Zellen (A; Vergrößerung aus A' grüner Pfeil). (B; B'). Reduktion des ac.Tuba4a Signals und fehlerhafte Ausbildung des apikale Aktinnetzwerks der MCCs in *hdac6* Morphanten. (C; C') Überexpression humaner myc-markierter HDAC6 besitzt keinen Effekt auf die Ciliogenese. (D; D') Überexpression einer katalytisch-inaktiven humanen HDAC6 phänokopierte den Effekt des MO vermittelten Funktionsverlusts (weißer Pfeil).

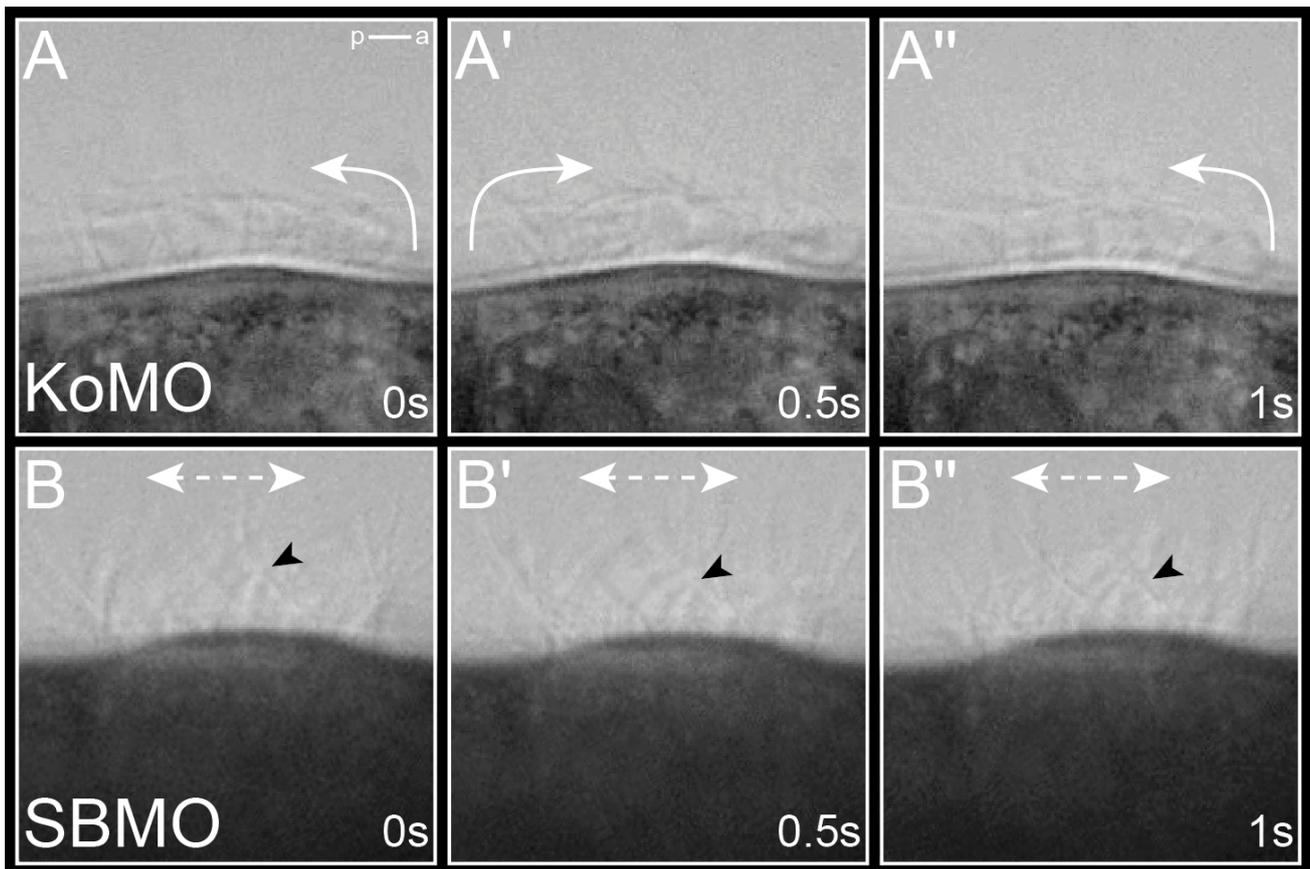


Abb. 12 Hdac6 Funktionsverlust nimmt Einfluss auf die Motilität epidermaler Cilien.

(A-B'') SBMO vermittelter Funktionsverlust von Hdac6 nimmt Einfluss auf die Ciliogenese und Motilität epidermaler Cilien. (A; A'') Wildtypisches Schlagmuster der Cilien in Kontrollen. (B; B'') Morphanten weisen eine reduzierte Anzahl an Cilien und ein eingeschränktes Bewegungsmuster auf. (A-B''); 2 pmol SBMO/KoMO; Einzelbilder einer Hochgeschwindigkeitsaufnahme 1s; t=0s, t=0.5s, t=1s; n=4; schwarze Pfeile weisen auf die unveränderte Positionierung eines repräsentativen Ciliums in B-B'' hin, weiße Pfeile deuten die Bewegungsrichtung der Cilien an, Siehe auch Filme 1-5).

Hdac6 Funktionsverlust führt zu einer Reduktion der Cilien im LRO

Aufgrund der beobachteten LR-Defekte nach Hdac6 Funktionsverlust in den Zellen der C1-Lineage und dem Wissen um die MO vermittelten Ciliendefekten wurde die Hypothese formuliert, dass die vorab dargestellten LR-Phänotypen in Defekten der Ciliogenese im Bereich der GRP begründet liegen könnten.

Mit der Durchführung von MO-Injektionsexperimenten und anschließendem Nachweis der Cilien sowie der Quantifizierung ihrer Länge und Polarisierung konnten diese Annahme bestätigt werden (Landua, 2015). Nach MO vermitteltem Funktionsverlust von Hdac6 wiesen GRPs des St. 17 eine dosisabhängige Verkürzung der Cilien (0.75 pmol, 41.4 % verkürzte Cilien, \varnothing 4,4 μ m; 1,5 pmol, 67,6 % verkürzte Cilien, \varnothing 2,0 μ m) sowie eine fehlerhafte Polarisierung (0.75 pmol 74,2 % posterior, 25,8 % abweichend; 1.5pmol 54,9 % posterior, 45,1 % abweichend) im Vergleich zu Kontrollembryonen auf (83,1 % Cilien mit \varnothing 5,5 μ m; Landua, 2015). Dies implizierten, dass die Ursache der LR-Defekte im Verlust des linksgerichteten Flüssigkeitsstroms liegt, dessen Verlust zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht experimentell nachgewiesen werden konnte.

Nach Durchführung der subzellulären Lokalisationsanalyse konnte eine Cilien-assoziierte, subzelluläre Lokalisation von Hdac6 Protein im Bereich des Basalkörpers motiler Cilien in multicilierten Zellen der embryonalen Haut und des LROs beschrieben werden. MO induzierte Funktionsverlustexperimente führten zum Verlust der Nachweisbarkeit des endogenen Hdac6 Proteins in multicilierten Zellen der Epidermis. Morphanten wiesen Defekte der Ciliogenese in Bezug auf die Länge, Polarisierung und Beweglichkeit der Cilien auf. Diese können als Ursache für die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Defekte der LR-Achse angesehen werden (Fietz, 2014; Landua, 2015, Fiebig, 2016; diese Arbeit).

Hdac6 Funktionsverlust nimmt Einfluss auf die Expression von *foxj1*

Zur Aufklärung der funktionellen Ursache des beobachteten Ciliogenese-Phänotyps wurde weiterführend eine mögliche Beteiligung von Hdac6 im Rahmen der transkriptionellen Spezifizierung mukociliärer Gewebe in Erwägung gezogen. Die Ausbildung motiler Cilien unterliegt der gewebespezifischen Kontrolle verschiedener Gene wie den Transkriptionsfaktoren *forkhead box J1* (*foxj1*) (Pohl et al., 2004; Stubbs et al., 2008) und *regulatory factor X2* (*rfx2*) (Chung et al., 2012), deren Funktionsverluste in Defekten der LR-Achse resultieren. *foxj1* mRNA ist während der Embryonalentwicklung im Superfiziellen Mesoderm (SM) gastrulierender Embryonen in den Stadien 10-11.5 im superfiziellen Gewebe der dorsalen Urmundlippe und während Kaulquappenstadien in multicilierten Zellen der Epidermis exprimiert. Im Zug mehrerer unabhängiger Studien konnte dieser Transkriptionsfaktor als notwendig sowie ausreichend für die Biogenese motiler Cilien charakterisiert werden (Stubbs et al., 2008; Walentek et al., 2012; Hagenlocher et al., 2013). Um einen möglichen Einfluss des Funktionsverlusts von Hdac6 auf die mRNA Expression von *foxj1* zu testen wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt. Zum einen sollte nach MO vermitteltem Funktionsverlust die *foxj1* mRNA Expression in SM (ATGMO) und den multicilierten Zellen (SBMO) evaluiert, zum anderen eine Reporter-abhängige Messung der Aktivität des humanen *FOXJ1*-Promotor nach Funktionsverlust durchgeführt werden (Abb. 13; Ohkawara und Niehrs, 2011; Didon et al., 2013). Im St.10⁺ konnte eine Reduktion der *foxj1* mRNA Expression im SM gastrulierender Morphanten im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 13 A-B). 46 % der Morphanten zeigten eine Reduktion des mRNA *in situ* Signals nach ATGMO Injektion auf (Abb. 13 B'-B''; $p < 0.001$). Nach SBMO Injektion konnte eine entsprechende Reduktion jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 13 B'''-B''').

Um den beobachteten Effekt des Funktionsverlusts von Hdac6 auf die transkriptionelle Aktivität des *foxj1* Gens zu verifizieren wurde eine Messung der Reporter-basierten Luziferase-Aktivität im Embryo durchgeführt (Didon et al., 2013). Im Vergleich zu KoMO injizierten Embryonen wiesen ATG-/SBMO injizierte Morphanten eine Reduktion der Promotoraktivität (Relative Luziferase Units, RLU)

des humanen *FOXJ1*-Promotors um 38 % RLU (ATGMO) bzw. 43 % RLU (SBMO) auf und bestätigten die durch *in situ* Hybridisierung festgestellte Reduktion der *foxj1* mRNA Expression (Abb. 13 C-C''''; Didon et al., 2013).

Zur Aufklärung der Funktion von Hdac6 im Bezug auf die transkriptionelle Aktivität des *foxj1* Gens wurde für weitere Experimente die Hypothese aufgestellt, dass Hdac6 Einfluss auf die *foxj1* Expression über eine Beteiligung im kanonischen Wnt-Signalweg nimmt (Caron et al., 2012; Walentek et al., 2012).

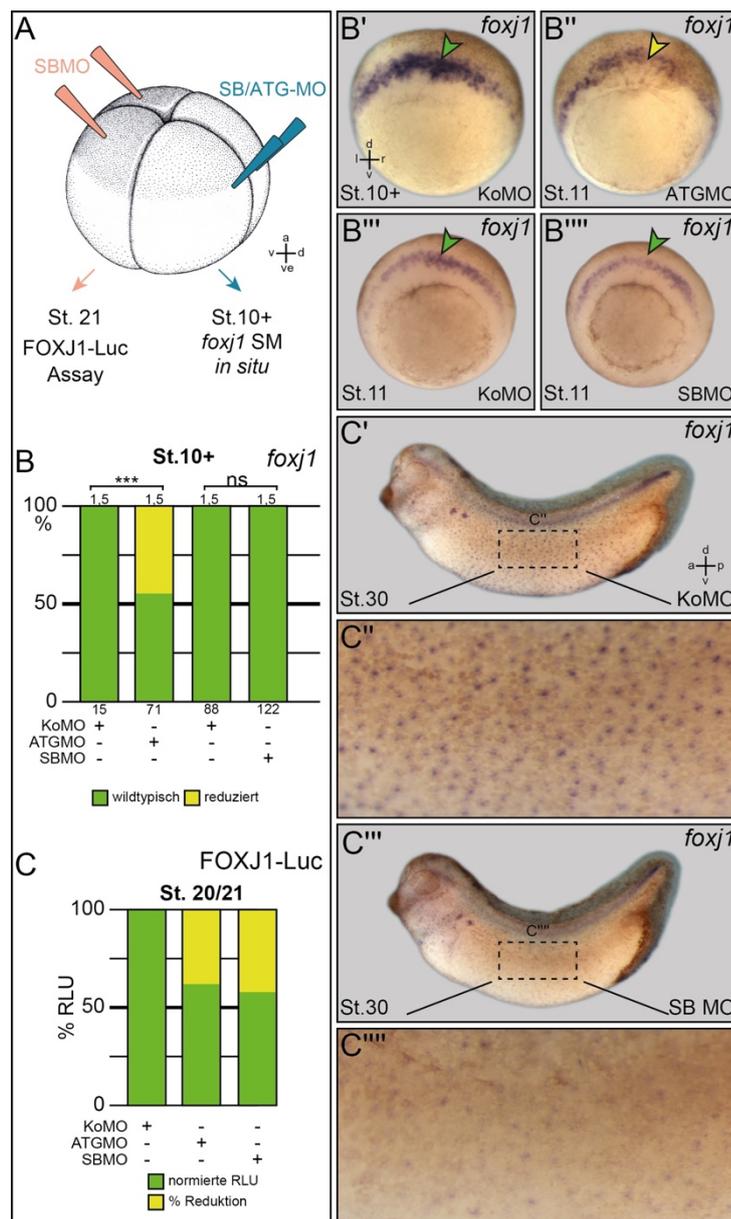


Abb. 13 Reduzierte *foxj1* mRNA Expression nach Hdac6 Funktionsverlust.

(A-C''') ATG-/SBMO vermittelter Funktionsverlust führt zur reduzierter Expression von *foxj1* mRNA im SM oder der embryonalen Epidermis. (A) Injektionsschema für die Expressionsanalyse durch *in situ* Hybridisierung, blau; sowie Luciferase Reporter Assay, rot. (B-B''') ATGMO (2 pmol; 2x C1) vermittelter Funktionsverlust führte im Gegensatz zur SBMO Injektion ($p > 0.05$; n.s.) zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0.001$) der *foxj1* Expression im SM des Entwicklungsstadiums 10+. (C) ATG/SBMO vermittelte Reduktion der relativen Biolumineszenz (ATGMO Reduktion um 38 %, SBMO Reduktion um 47,5 % RLU; jeweils $n = 3$) des *FOXJ1*-Luciferase-Reporters im Vergleich zur Kontrolle St. 20/21. (C'-C''') Reduziertes *foxj1* mRNA Signal in der embryonalen Haut repräsentativer Kontroll Embryonen und Morphanten im St. 30; Vergrößerungen in (C''; C''').

Hdac6 nimmt Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor *foxj1* stellt ein gut charakterisiertes Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs dar, der als essentiell für die Biogenese motiler Cilien charakterisiert wurde (Stubbs et al., 2008; Walentek et al., 2012; Caron et al., 2012). Funktionsverluste von essentiellen Komponenten/Genen des Signalweges, wie dem membranständigen Rezeptor Frizzled10, der Ionenpumpe Atp4a oder dem transkriptionellen Koaktivator β -catenin führen zu Defekten der LR-Achse in *D. rerio* und *X. laevis* (Levin et al., 2002; Caron et al., 2012; Walentek et al., 2012). Diese Defekte werden durch eine Reduktion der Anzahl, Länge und Polarisierung motiler Cilien im Kupfer-Vesikel des Zebrafisches sowie der GRP des Froschs verursacht, die auf eine Beeinflussung der Expression von *foxj1* mRNA zurückzuführen waren (Caron et al., 2012; Walentek et al., 2012).

Auch für humanes HDAC6 Protein konnte in Zellkulturexperimenten eine Beteiligung in der Regulation des kanonischen Wnt-Signalwegs sowie der Epidermal Growth Factor-abhängigen nukleären Lokalisierung von β -catenin nachgewiesen werden (Li et al., 2008; Mak et al., 2012; Wang et al., 2014). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde die Hypothese formuliert, dass Hdac6 auch im Froschembryo einen Beitrag zur Regulation des kanonischen Wnt-Signalwegs leistet und dadurch Einfluss auf die Embryonalentwicklung nimmt. Als Folge dessen könnten die beschriebenen LR-Defekte nach MO-vermitteltem Funktionsverlust von Hdac6 auf den Verlust der Wnt-abhängigen *foxj1* Expression zurückzuführen sein.

Xenopus Embryonen stellen ein herausragendes *in vivo* Testmodell des kanonischen Wnt-Signalwegs dar, das im Rahmen unterschiedlicher experimenteller Ansätze Aussagen über die Induktion und Manipulation des Signalwegs tätigen lässt. Durch ventrale Überexpression induktiver Signalwegskomponenten können sekundäre Körperachsen induziert werden, die als Assay zur Aufklärung positiver oder negativer Signalwegsregulation herangezogen werden (sog. Doppelachsenassay; Sokol et al., 1991; Kühl und Pandur, 2008). Im Zug der Wnt-abhängigen Spezifizierung der Neuralleistenzellen sind Beeinflussungen der Signalwegsaktivität durch die Expression transkriptioneller Zielgene des Signalwegs in frühen Kaulquappenstadien nachvollziehbar (Wu et al., 2005). Abschließend kann die transkriptionelle Aktivität durch Reporterplasmid-abhängige Messungen der Biolumineszenz in embryonalen Explantaten oder gesamt Embryonen artifiziell bestimmt werden (Ohkawara und Niehrs, 2011).

Hdac6 Funktionsverlust verhindert Achseninduktion im Doppelachsenassay

Um eine potenzielle regulatorische Funktion von Hdac6 im Rahmen des kanonischen Wnt-Signalwegs zu untersuchen wurden alle drei Embryo-basierten Assays komplementierend angewendet (Abb. 14-16). Zur Durchführung des Doppelachsenassays wurden durch ventrale mRNA Überexpressionen des kanonischen Liganden *wnt3a* (Wolda et al., 1993) sekundäre Körperachsen induziert (Abb. 14 A). Im Vergleich zur KoMO adjustierten *wnt3a* Überexpression, die in einer 88,9 %igen Induktion von vollständigen Doppelachsen resultierte (Abb. 14 B; DA⁺⁺: 88,9 %; DA^{+/-}: 11,1 %; DA⁻: 0 %), wiesen Koinjektionen von ATGMO eine signifikante Reduktion der DA⁺⁺ Doppelachsen auf (Abb.14 B; DA⁺⁺: 26,6 %; DA^{+/-}: 26,4 %; DA⁻: 47 %; p < 0.001). Die spezifische Funktion von Hdac6 innerhalb des Wnt-Signalwegs bestätigend konnte der ATGMO induzierte Funktionsverluste nach *wnt3a* Überexpression durch Koinjektion von *β-catenin* mRNA wieder reinduziert werden (Abb.14 B; DA⁺⁺: 73,7 %; DA^{+/-}: 18,9 %; DA⁻: 7,4 %; jeweils p < 0.001)

Zur Bestätigung der hierarchischen Einordnung einer molekularen Funktion von Hdac6 Protein innerhalb des Wnt-Signalwegs wurde ein weiteres Doppelachsenassay mit Achseninduktion durch Überexpression dominant negativ (dn) agierender Glykogensynthasekinase 3β (Gsk3β; Dominguez et al., 1995) durchgeführt (Abb. 14 C). Auf Grund der β-catenin stabilisierenden, Lys49-Deacetylierung durch das Hdac6 Protein sollte ein Funktionsverlust von *hdac6* mRNA durch eine Überexpression von dnGsk3β kompensiert werden können (Gao et al., 2014; Schofield et al., 2013). Entsprechend der Hypothese konnte im Rahmen der gemeinsamen Überexpression von *dnGsk3β* mRNA und ATGMO kein Unterschied in der Achseninduktion im Vergleich zu KoMO injizierten Doppelachsen beobachtet werden (Abb. 14 C; *dnGsk3β*/KoM DA⁺⁺: 62,1 %; DA^{+/-}: 36,6 %; DA⁻: 1,3 %; *dnGsk3β*/ATGMO DA⁺⁺: 58,7 %; DA^{+/-}: 38,2 %; DA⁻: 3,1 %; p > 0.05). Zusammengefasst lieferten diese Experimente einen ersten *in vivo* Nachweis einer entwicklungsbiologischen Beteiligung von Hdac6 innerhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs und bestätigten eine hierarchische Einordnung der Funktion vor der durch die Gsk3β vermittelten Phosphorylierung β-catenins auf Proteinebene.

Komplementär zum Funktionsverlust sollte im Anschluß eine potentielle Achseninduktion durch Überexpression von HDAC6 überprüft werden. Weder nach heterologer, ventraler Überexpression von *Hdac6*-, *HDAC6*- oder katalytisch inaktiver *HDAC6* mRNA (jeweils,120 ng/μl; 1x ventrale Randzone, 4-Zell Stadium; Maus, Mensch) konnte die Ausbildung sekundärer Körperachsen beobachtet werden (*Hdac6* DA⁻: n= 0/77; *HDAC6* DA⁻: n= 0/20; k.i *HDAC6* DA⁻: n=0/53).

Nach Durchführung der Doppelachsenexperimente war es somit möglich, die funktionelle Beteiligung von Hdac6 innerhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs als notwendig, nicht aber als hinreichend für die Induktion des Signalwegs charakterisiert werden.

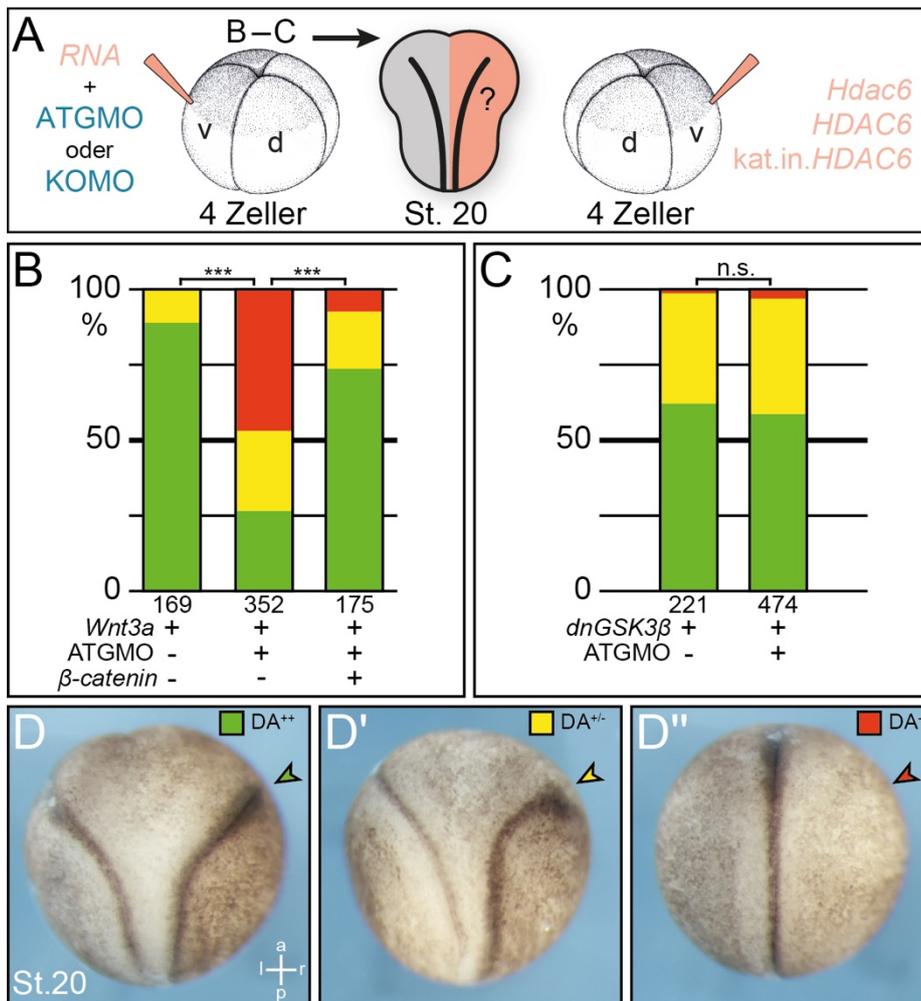


Abb. 14 Inhibition von Hdac6 verhindert Achseninduktion im Doppelachsenassay.

(A) Schematische Darstellung des Doppelachsenassays sowie der ventralen Überexpression heterologer HDAC6 mRNA (mRNA in rot, Kontroll- und ATGMO in blau). (B) *wnt3a* (0,35ng/ μ l) induzierte Doppelachsen (DA⁺⁺: 88,9 %; DA^{+/-}: 11,1 %; DA⁻: 0 %) werden durch Koinjektion von ATGMO (Bestman et al., 2015) signifikant reduziert (DA⁺⁺: 26,6 %; DA^{+/-}: 26,4 %; DA⁻: 47 %; $p < 0.001$ ***; 2-2.5 pmol ATGMO; $n = 7$) und durch Überexpression von β -catenin (60ng/ μ l) wieder gerettet (DA⁺⁺: 73,7 %; DA^{+/-}: 18,9 %; DA⁻: 7,4 %; jeweils $p < 0.001$ ***). (C) Durch Überexpression dominant negativer (*dn*)*gsk3beta* mRNA (100ng/ μ l) induzierte Doppelachsen waren durch die Koinjektion von ATGMO nicht beeinflusst (C, $n = 4$; n.s.). Beispielhafte Darstellung der Doppelachsen-Kategorien im St. 20 (D-D'': D komplette Doppelachse, DA⁺⁺, grün; D' reduzierte Achsenentwicklung, DA^{+/-}, gelb; D'' keine Doppelachse, DA⁻, rot). Kontrollinjektionen wurden mit Standard KoMO und mGFP mRNA zu entsprechenden Konzentrationen eingestellt.

Hdac6 besitzt Einfluss auf die *in vivo* Aktivität des Wnt-Signalwegs

Als Bestätigung des Doppelachsenassays sollte dieses um eine Reporterplasmid vermittelte Biolumineszenzmessung im Embryo erweitert werden (Ohkawara und Niehrs, 2011). Durch die Injektion eines sensitiven, durch β -catenin-aktivierbares Reporterplasmid (BAR) kann dessen Aktivität nach Funktionsverlust im Vergleich zur Kontrolle mittels Biolumineszenz ermittelt werden (Abb. 15 A-C; Biechele und Moon, 2008). Nach Lyse der Embryonen im St. 12 und St. 14 und anschließender Messung der Reporteraktivität (St.12) war eine Reduktion des BAR-abhängigen Lumineszenzsignals der endogenen Signalwegsaktivität um 22,5 % RLU auf 77,5 % RLU im Vergleich zur KoMO injizierten Morphanten (=100 % RLU) zu beobachten (Abb. 15 B; n = 3). Messungen der Aktivität des Reporterkonstrukts im St. 14 (Abb. 15 B, n = 3) ergaben eine Reduktion der Reporteraktivität um 68,55 % RLU auf 31,45 % RLU im Vergleich zu KoMO injizierten Morphanten (=100 % RLU).

Die durch die Doppelachsenassays gewonnen Daten zum Einfluss auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs konnte somit durch die *in vivo* Reporteranalyse unterstützt werden. Ausgehend von der Beschreibung des regulativen Einflusses von Hdac6 auf die endogene Aktivität des Wnt-Signalwegs wurde die Möglichkeit einer wechselseitigen transkriptionellen Regulation untersucht.

Zur Aufklärung einer potentiellen Induktion der humanen *HDAC6*-Promotoraktivität durch Induktion des Wnt-Signalwegs wurde ein entsprechendes, Biolumineszenz-basiertes Reporter-Assay in embryonalen Kappen durchgeführt (Birdsey et al., 2012). Messdaten der Biolumineszenz nach experimenteller Induktion des Wnt-Signalwegs in animalen Kappen deuten jedoch nicht auf eine Induktion der Transkription des Reporters, sondern tendenziell auf eine potentielle Repression der Induktion des *HDAC6*-Reporters hin (Abb. 15 C; 13 % Reduktion der humanen *HDAC6*-Promoteraktivität im Vergleich zur Kontroll mRNA).

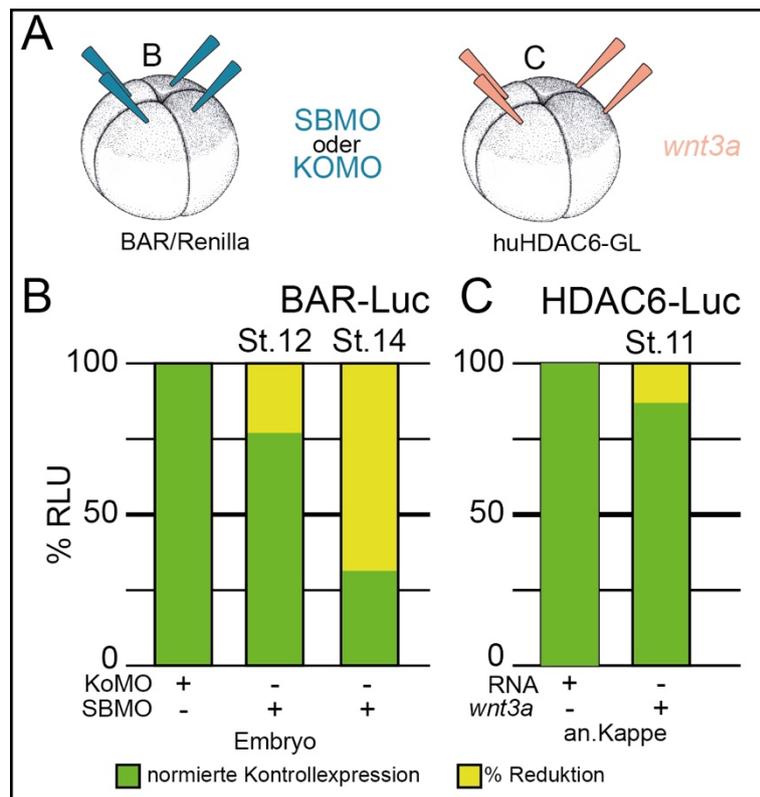


Abb. 15 In vivo Quantifizierung der Wnt-Signalwegs Aktivität nach Hdac6 Funktionsverlust.

(A) Grafische Darstellung des Injektionschemas der Morpholino Injektionen in blau; RNA in rot). SBMO vermittelter Funktionsverlust im Embryo führte zu einem reduzierten Luziferase-Signal im Vergleich zu KoMO Injektion (B) 22,5 % Reduktion der RLU vs KoMO Injektion im St. 12; 68,5 % Reduktion der RLU vs KoMO Injektion im St.14; 4x 1 pmol SBMO; Standardisierung des BAR-GI durch Renilla-TK; jeweils n = 3). (C) Kein Einfluss auf die humane HDAC6 Promotor-Aktivität durch *wnt3a* mRNA (0,35ng/ μ l) Überexpression; 13 % Reduktion der RLU im Vergleich zur Kontroll RNA; Standardisierung des huHDAC6-GI durch Renilla TK). Lyse der Embryonen in St. 11 (Animale Kappen), St. 12 oder St. 14. Normierte Kontrollmessung in grün, prozentuale Reduktion der RLU in gelb.

Zur weiteren experimentellen Bestätigung einer mit dem Wnt-Signalweg assoziierten, endogenen Funktion von Hdac6 wurde die Expression Wnt/ β -catenin-abhängiger Zielgene im Neuroektoderm und Neuralleistenzellen des *Xenopus* Embryos untersucht (McGrew et al., 1999; Wu et al., 2005). Neuralleistenzellen werden im Zuge der frühen Neurulation spezifiziert, durchlaufen einen epithelial zu mesenchymalen Übergang und tragen u. a. zur Ausbildung des Gesichtsschädels bei (Pegoraro et al., 2013).

Mit dem Auffinden einer Familie mit dominanter X-Chromosom abhängiger Chondrodysplasie, die unter dem OMIM Eintrag #300863 beschrieben wurde, konnte eine im Funktionsgewinn resultierende Mutation der miR433 Bindestelle in der 3' UTR humaner *HDAC6* mRNA identifiziert werden (Chassaing et al., 2005; Simon et al., 2010). Auf Grund der X-chromosomalen HDAC6 Lokalisation weisen männliche Patienten im Vergleich zu heterozygoten, weiblichen Merkmalsträgern einen stärker ausgeprägten Phänotyp auf. Dieser umfasst eine proximale Verkürzung der Extremitäten (Rhizomelie), eine generelle Abflachung der Wirbelkörper (Platyspondylie), Kurzfingerigkeit (Brachydaktylie), Wasserkopf (Hydrocephalus), Dysmorphismus des Gesichts, sowie eine rudimentäre Ausbildung der Augen (Mikrophthalmie; Simon et al., 2010).

Eine Überexpression von Hdac6 in *Xenopus* Embryos führte, entsprechend dem humanen Phänotyp, zu Defekten der Augenentwicklung und zu Defekten der Spezifizierung der Neuralleistenzellen (Massé et al., 2012).

Die im Zug der mRNA *in situ* Expressionsanalyse dargestellten, spezifischen *hdac6* mRNA Expression in den wandernden Neuralleistenzellen und Augenanlagen des *Xenopus* Embryos leiteten zur Frage, ob auch Funktionsverlustexperimente in den Zellen der Neuralleiste einen Einfluss auf deren Wnt-abhängige Spezifizierung nehmen und Defekte der Augenanlage nach sich ziehen würden.

Spezifizierung der Neuralleistenzellen ist abhängig von Hdac6

Um eine zusätzliche experimentelle Bestätigung eines funktionellen Einflusses der Hdac6 auf die Embryonalentwicklung zu erzielen wurden MO vermittelte Funktionsverluste von Hdac6 im Neuroektoderm sowie in den Neuralleistenzellen durchgeführt (Abb. 16 A-I'). Da eine *hdac6* mRNA Expression vorab in wandernden Neuralleistenzellen wildtypischer Embryonen des St. 23 sowie den Kiemenbögen des St. 30 nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 6) und in Defekten der Augen und Neuralleistenzellen nach Überexpression resultierten wurde ein Phänotyp im Rahmen der Wnt/ β -catenin-abhängigen Spezifizierung der Neuralleistenzellen angenommen (Massé et al., 2012).

Zur Evaluation eines potenziell-negativen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Zielgenen des Wnt-Signalwegs im Neuroektoderm und Neuralleistenzellen wurden mRNA *in situ* Hybridisierungen gegen *engrailed2* (*en2*), *tfap2a/ap2*, *myc* (McGrew et al., 1999; Luo et al., 2003; Bellmeyer et al., 2003) und darüber hinaus den Effektoren *snail2* (*snai2*) und *twist1* (*twist*) (Mayor et al., 1995; Hopwood et al., 1989) durchgeführt. Der SBMO vermittelte Funktionsverlust von Hdac6 induzierte die Reduktion der *en2* mRNA Expression im Bereich des Mittelhirns (St. 16) im Vergleich zur uninjizierten Hemisphäre des Embryos sowie der Injektionskontrolle (Abb. 16 B; 9,5 % wildtypisch; 36,5 % reduziert; 54 % fehlend, $p < 0.001$). In Bezug auf die Expression der Markergenexpression der Neuralleistenzellen konnte eine Reduktion von *tfap2a* (16,3 % wildtypisch; 62,8 % reduziert; 20,9 % fehlend, $p < 0.001$), *myc* (44% wildtypisch; 50 % reduziert; 6 % fehlend, $p < 0.001$) sowie *snail2* (46 % wildtypisch; 46 % reduziert; 8 % fehlend, $p < 0.001$) und *twist1* (22,8 % wildtypisch; 54,4 % reduziert; 22,8 % fehlend, $p < 0.001$) in den St. 16-22 nachgewiesen werden (Abb. 16 A-G').

Im St. 45 wiesen *hdac6* Morphanten, komplementierend zu den auf transkriptioneller Ebene beobachteten Funktionsverlusten, eine fehlerhafte Ausbildung des Kiemenkorbs nach SBMO Injektion auf (Abb. 16 H-I'). Hierdurch konnten die vorab beschriebenen Defekte der Spezifizierung der Neuralleistenzellen auf Ebene eines morphologischen Phänotyps verdeutlicht werden. Funktionsgewinn sowie -verlust Experimente wiesen auf eine physiologische Beteiligung dieser HDAC im Bezug auf die Entwicklung der craniofacialen Strukturen des Frosches hin, die bereits aus

humanen Patienten und der mRNA Überexpression in *Xenopus* bekannt waren (Simon et al., 2010; Massé et al., 2012).

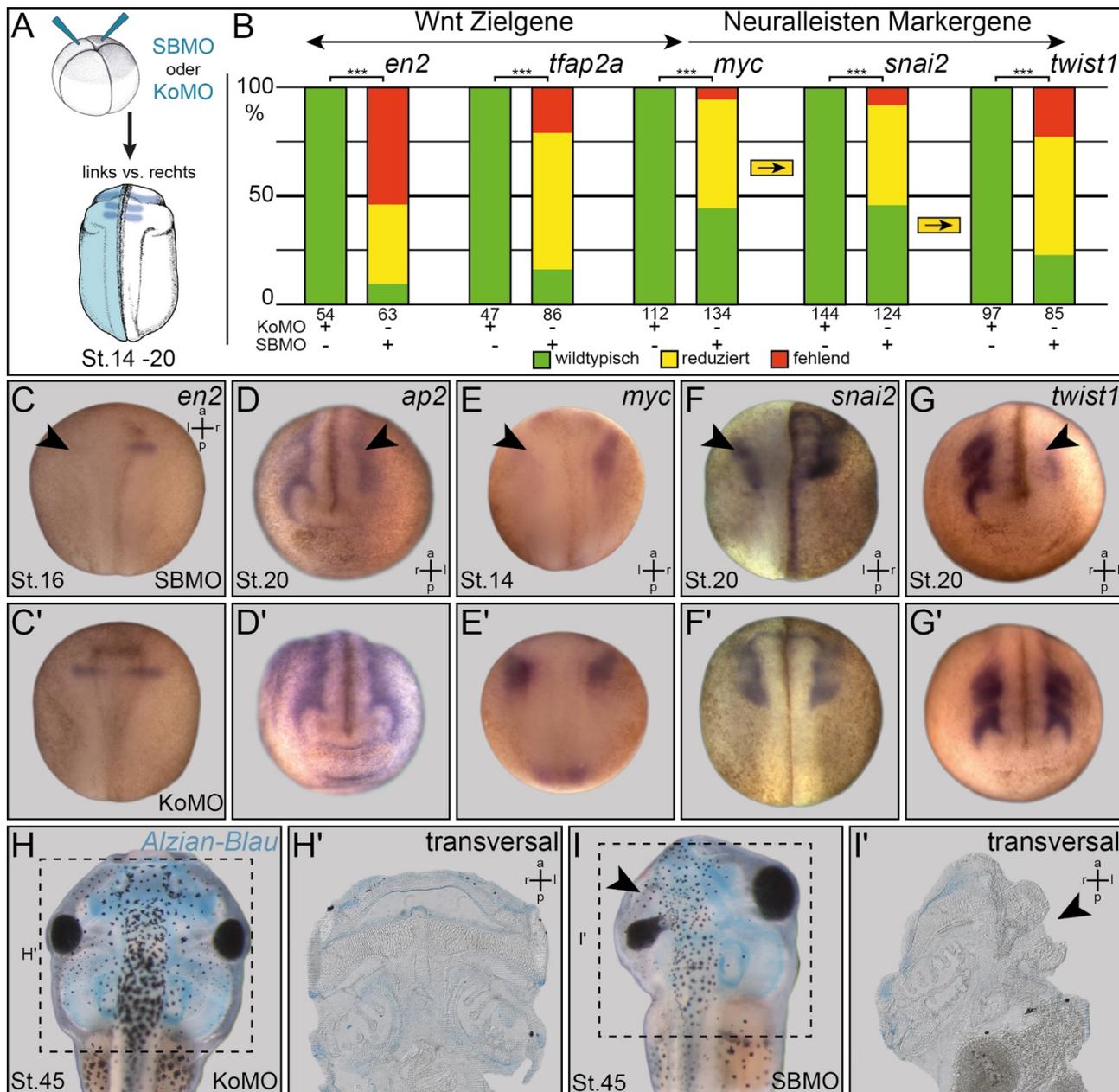


Abb. 16 Funktionsverlust von Hdac6 inhibiert die Wnt-abhängige Spezifizierung der Neuralleistenzellen.

(A) Schematische Darstellung des Versuchsansatzes: unilaterale animale Injektion von KoMO oder SBMO; jeweils 1,5 pmol; im 4/8-Zell Embryo; blau. MO vermittelter Funktionsverlust der Markergenexpression. (B) Quantifizierung des Funktionsverlusts der mRNA Expression der Neuralleisten Markergene *engrailed homeobox 2* (*en2*; **C-C'**), *transcription factor AP-2 alpha* (*tfap2a*; **D-D'**), *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (*myc*; **E-E'**), *snail family zinc finger 2* (*snai2*; **F-F'**) und *twist family bHLH transcription factor 1* (*twist1*; **G-G'**) im Vergleich zur Kontrolle. *en2*, *tfap2a* und *myc* sind *bona fide* Zielgene des Wnt-Signalwegs. (**B**; $p < 0,001 = ***$, jeweils $n = 3-5$ Experimente, gelb unterlegte Pfeile stellen hierarchische Abfolge der Induktion der Markergene dar). Darstellung repräsentativer Embryonen aus Versuch und Kontrolle (**C-G'**). (**H-I'**) Im Vergleich zu Kontroll-Embryonen wiesen SBMO injizierte Kaulquappen Defekte des Kiemenkorbs auf; Knorpelfärbung durch Alzian-Blau-Färbung, **H'** und **I'** 35µm Schnitte durch Embryonen in **H** und **I**; (1.5 pmol SBMO; 2x unilateral animal; 8-Zeller)

Weiterhin war es möglich, die schon nach Funktionsgewinn *Xenopus* und Mensch beschriebenen Defekte der Augenentwicklung (Chassaing et al., 2005; Massé et al., 2012) auch in vorläufigen Experimenten des mRNA Funktionsverlusts nachzuvollziehen (Abb. 17 A-E). Ein SBMO vermittelter Augenphänotyp, der sich in der Reduktion der Anlage des Auges äußert (Abb. 17 A-B'; 52,3 % Reduktion der Augenanlage; 47,7 % fehlende Augenanlage) konnte auf eine reduzierte mRNA Expression des Hauptkontrollgens für Augenentwicklung, *pax6*, zurückgeführt werden (Hirsch und Harris, 1997; Chow et al., 1999). Morphanten wiesen eine Reduktion (45,5 % reduziert; 15,2 % fehlend) des *pax6* mRNA-Signals nach Verlust des Hdac6 Proteins im Vergleich zur Kontrolle auf und implizierten auf diese Weise eine Rolle von Hdac6 in der Spezifizierung des anterioren Neuroektoderms und/oder optischen Placoden während früherer Kaulquappenstadien der Embryos (Schlosser und Ahrens, 2004).

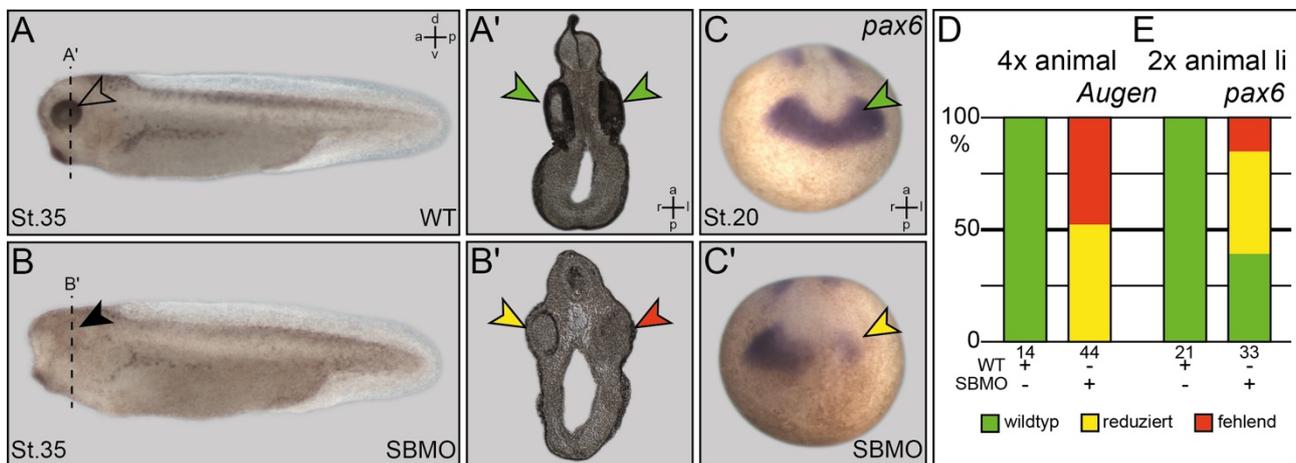


Abb. 17 Funktionsverlust von Hdac6 resultiert in reduzierter *pax6* mRNA Expression.

(A-E) SBMO vermittelter Funktionsverlust von Hdac6 führt zu verkümmerten oder fehlenden Augenanlagen. (A) Unijizierte Kontrollembryonen im St.35 wiesen eine wildtypisch-symmetrische sowie pigmentierte Anlage der Augen auf (A-A'; geschlossene Pfeile). (B) Reduktion der Anlagen in Morphanten (B-B'); 4x 1,5 pmol SBMO; offene Pfeile). (C) Reduzierte *paired box 6* (*pax6*) Expression in Morphanten (C-C'); 2x unilateral-animale Injektion, 1,5 pmol SBMO). (D,E) Quantifizierung der präliminären Daten der MO induzierten ophthalmologischen Defekte (D; St. 35) und *pax6* Expression (E; St. 20). (A' und B' stellen Schnitte der Embryonen in A und B dar; s35µm).

Im Rahmen der bis zu diesem Zeitpunkt vorgestellten Ergebnisse konnte dargestellt werden, dass *hdac6* auf mRNA Ebene gewebespezifisch exprimiert war und diese Expression mit einer Basalkörpern-assoziierten, subzellulären Proteinlokalisierung in ciliierten Geweben wie dem LRO, oder multicilierten Zellen der Epidermis korreliert werden konnte. Hdac6-spezifische Funktionsverluste resultierten in Defekten der Etablierung der LR-Achse während der frühen Embryonalentwicklung des Krallenfroschs. Die dargestellten LR-Defekte waren auf einen durch den Funktionsverlust- induzierten Defekt der Biogenese motiler Cilien im LRO des Froschs zurückzuführen. Nach Funktionsverlust konnten negative Effekte auf die Induktion des kanonischen Wnt-Signalwegs im Doppelachsenassay, der BAR-Reporter vermittelten Biolumineszenzmessung, sowie der Wnt/ β -catenin-abhängigen Spezifizierung der Neuralleistenzellen dokumentiert werden. Die initial beschriebenen LR-Defekte konnten somit durch eine Funktion von Hdac6 in der vom

kanonischen Wnt-Signalweg abhängigen mRNA Expression des Transkriptionsfaktors *foxj1* charakterisiert werden (Cao et al., 2009, Caneiro et al., 2011, Walentek et al., 2012). Die vorgestellten Experimente tragen zur Erklärung der durch Cao et al., 2009 und Caneiro et al., 2011 beschriebenen LR-Defekte nach HDAC-Inhibition bei und unterstreichen eine direkte *in vivo* Funktion des *hdac6* Gens im Rahmen der Embryonalentwicklung des Krallenfroschs.

Im Zuge der weiteren Kapitel sollen Experimente unter Verwendung von Embryonen des Steinseeigels (*Paracentrotus lividus*) sowie der Hausmaus (*Mus musculus*) vorgestellt werden.

Hdac6 Proteinlokalisierung im Seeigel *Paracentrotus lividus*

Die Etablierung der LR-Asymmetrie während der Embryonalentwicklung der Wirbeltiere basiert auf einem evolutionär-konservierten, extrazellulären Flüssigkeitsstrom der im Bereich des LRO in Stadien der Neurulation die asymmetrischen Genexpression instruiert (Blum et al., 2009b). Mit dem cilierten Archenteron konnte ein entsprechender, mit motilen Cilien besetzter LRO auch in Gastrula-Stadien des Seeigelebryos vorgeschlagen werden (Tisler et al., 2016). Auf Grund der evolutionären Konservierung war es möglich den Mechanismus des Symmetriebruchs als Synapomorphie innerhalb der Deuterostomier zu beschreiben (Tisler et al., 2016). Seeigelebryonen weisen während ihrer planktischen Embryonalentwicklung eine Monocilierung der Zellen des Ekoderms sowie motile Cilien im Archenteron gastrulierender Embryonen auf. Diese konnte als essentiell für die LR-Achsenentwicklung beschrieben werden (Iwaikawa, 1967; Warner et al., 2014; Tisler et al., 2016). Um eine evolutionäre Konservierung der subzellulären Cilien-assoziierte Hdac6 Proteinlokalisierung im Seeigelebryo nachzuweisen wurde, entsprechend zum Frosch, eine durch einen Anti-HDAC6 Antikörper vermittelte Lokalisationsanalyse mittels Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt (Abb. 18 A-F). Distinkte, extranukleäre Hdac6 Proteinsignale konnten im Bereich des Blastoporus gastrulierender Seeigelebryonen nachgewiesen werden (Abb. 18 A-A'). Vergleichbar mit der Cilien-assoziierten, subzellulären Hdac6 Proteinlokalisierung im Frosch war eine entsprechende intrazelluläre Proteinlokalisierung an der Basis motiler Cilien des LROs (Abb. 18 B-B') sowie der cilierten Zellen des Ekoderms nachweisbar (Abb. 18 C-E). Mit der *in situ* Visualisierung des Hdac6 Proteins an der Basis motiler Cilien konnte eine evolutionäre Konservierung dieses Moleküls innerhalb der Deuterostomier nachgewiesen werden, die im Weiteren für einen ebenfalls konservierten Wirkmechanismus dieses Gens innerhalb der Embryonalentwicklung spricht.

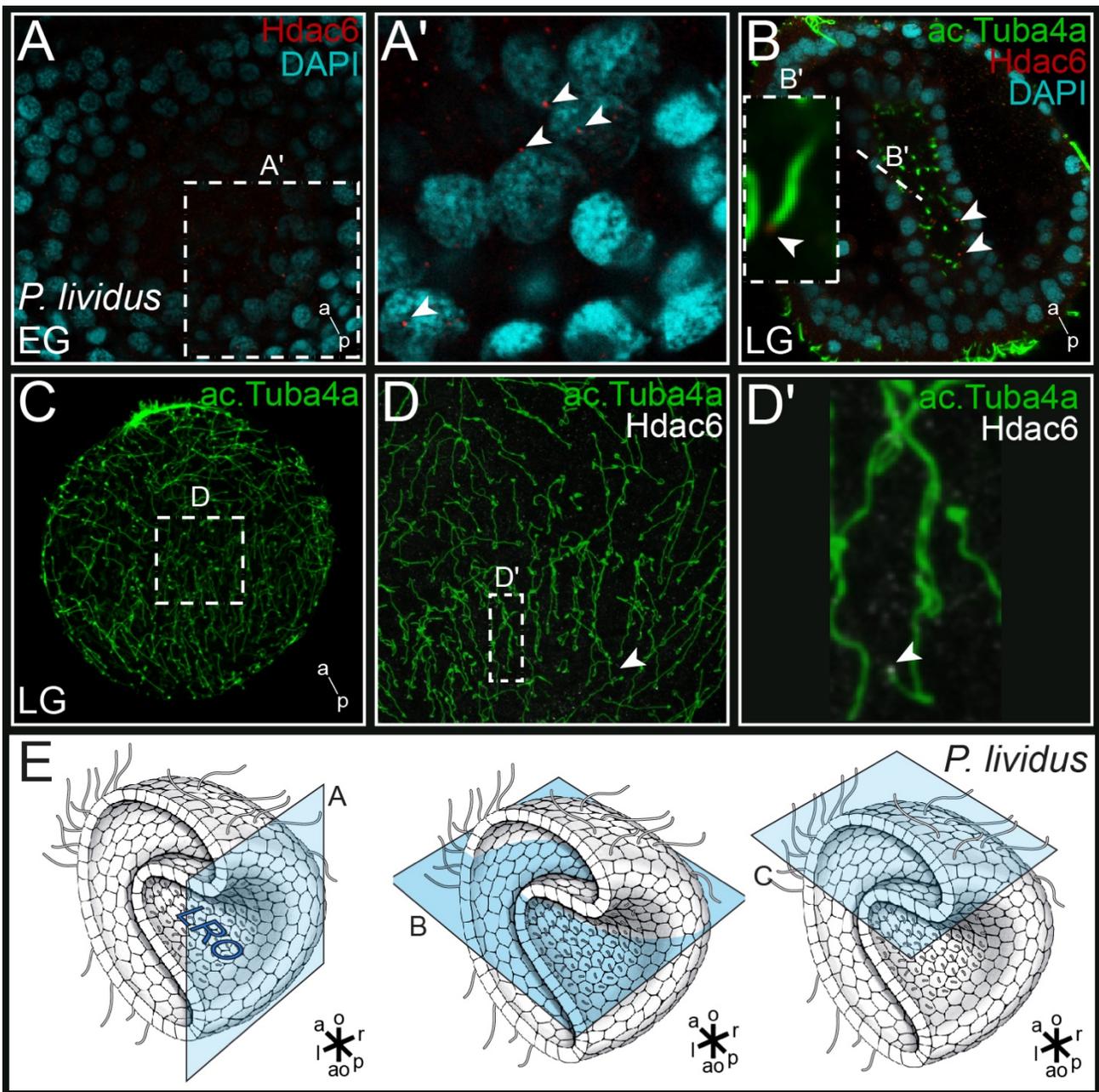


Abb. 18 Cilien-assoziierte Hdac6 Proteinlokalisierung in *Paracentrotus lividus*.

(A-E) Immunofluoreszenznachweis der subzellulären Proteinlokalisierung von Hdac6 in Embryonen des Steinseeigels (*Paracentrotus lividus*). (A, A') Hdac6 lokalisiert an der Basis motiler Monocilien des Ektoderms sowie des LRO. In frühen Gastrulastadien (EG) war Hdac6 extranukleär in distinkter Lokalisation nachweisbar, Hdac6 in rot, DAPI in blau). (B, B'). In späten Gastrula-Stadien (LG) konnte Hdac6 ebenfalls an der Basis verkürzter motiler Monocilien im Bereich des LRO nachgewiesen werden; (Box B' Vergrößerung des Optischen Schnittes durch B; Hdac6 in rot, ac.Tuba4a in grün, DAPI in blau). Weder in LRO Cilien (B-B') noch in elongierten Cilien des Ektoderms (D-D'') konnte eine axonemale Lokalisation von Hdac6 nachgewiesen werden (Box D'' Vergrößerung aus D'). Schwarz-Weiß Inversion des Hdac6 Kanals aus D (E). Weiße bzw. schwarze Pfeile weisen auf subzelluläre Hdac6 Lokalisation in EG, LG/LRO und Ektoderm hin. Schematische Darstellung der optischen Ebenen (E, A-C; optische Ebene in blau; Schemazeichnungen aus Tisler et al., 2016).

In situ* Expressionsanalyse der *Hdac6* mRNA in *Mus musculus

Die sich komplementierenden Effekte nach Funktionsverlust bzw. -gewinn in *Xenopus* Embryonen, sowie die beschriebenen humanen Phänotypen (Chassaing et al., 2005, Massé et al., 2012, diese Arbeit) stehen in Widerspruch zur *Hdac6*^{-/-} Maus (Zhang et al., 2008). Knockout Mäuse weisen nach ihrer Geburt keinen spezifischen, entwicklungsphysiologischen Phänotyp auf und sind darüber hinaus lebensfähig und fertil. Einzig geringe Defekte im Bezug auf die Mineralisierung der Knochen konnten im Unterschied zu wildtypischen Geschwisterindividuen beschrieben werden. Mit der Darstellung der Expression der *Hdac6* im Gewebe des Gehirns, der Niere sowie der Leber und des Hodens adulter Mäuse (Zhang et al., 2008) konnten z.T. Expressionsnachweise in Geweben geführt werden, in denen eine *hdac6* mRNA Expression während der *Xenopus* Embryonalentwicklung festgestellt werden konnte. Zur Überprüfung einer konservierten Expression der HDAC6 innerhalb der Embryonalentwicklung der Wirbeltiere wurde die cDNA Sequenz der *Hdac6* der Maus kloniert und im Anschluß eine mRNA *in situ* Hybridisierung gegen Embryonalstadien durchgeführt (Abb. 19).

Entsprechend zur mRNA Expression von *hdac6* in *Xenopus* war eine *Hdac6* mRNA Expression in Mausembryonen im embryonalen Pronephros, der Augenanlage sowie der Branchialbögen nachweisbar (Abb. 19 A-E"). Darüber hinaus konnte eine Expression in den Knospen der Vorder- und Hinterextremitäten sowie den Spinalganglien festgestellt werden (Abb. 19 G-E"). Auf Grund der einerseits konservierten mRNA Expression während der Embryonalentwicklung, aber eines andererseits nicht zum Phänotyp führenden Knockouts des *Hdac6* Gens in der Maus wurde eine potentielle Kompensation des Funktionsverlust durch ein funktionell und strukturell verwandtes Protein in Erwägung gezogen (Kaluza et al., 2011).

Als Kandidatengen für eine Kompensation wurde die ebenfalls der Klasse IIb angehörige *Hdac10* identifiziert (Gregoretto et al., 2004). Diese weist, vergleichbar zu *Hdac6*, eine Duplikation der Deacetylase Domänen (DD) auf. Im Unterschied zur DD2 der HDAC6 konnte die DD2 der HDAC10 jedoch als nicht-funktionell charakterisiert werden. Übereinstimmend im Vergleich mit HDAC6 ist die generelle zytoplasmatische Lokalisation des Proteins, wobei eine darüber hinausgehende, subzelluläre Lokalisation des Proteins bislang nicht beschrieben wurde (Guardiola and Yao, 2002). Auf funktioneller Ebene resultierte ein Funktionsverlust der *HDAC10* mRNA in humanen Krebszelllinien, entsprechend zum Verlust der *HDAC6* mRNA, in einer Verminderung der Aktivität des Wnt-Signalwegs (Götze et al., 2014).

Um die Möglichkeit einer kompensierenden Redundanz der Histondeacetylasen der Klasse IIb während der Embryonalentwicklung zu untersuchen wurden im Weiteren vergleichende Analysen der HDAC10 AS-Sequenz durchgeführt sowie die mRNA Expressionsmuster in *Xenopus laevis* und *Mus musculus* vergleichend dargestellt. Zur Überprüfung einer potenziellen Cilien-assoziierten Proteinlokalisierung konnten Funktionsgewinnexperimente eines *Hdac10*-GFP Fusionsproteins im Frosch durchgeführt werden, die im Folgenden beschrieben werden.

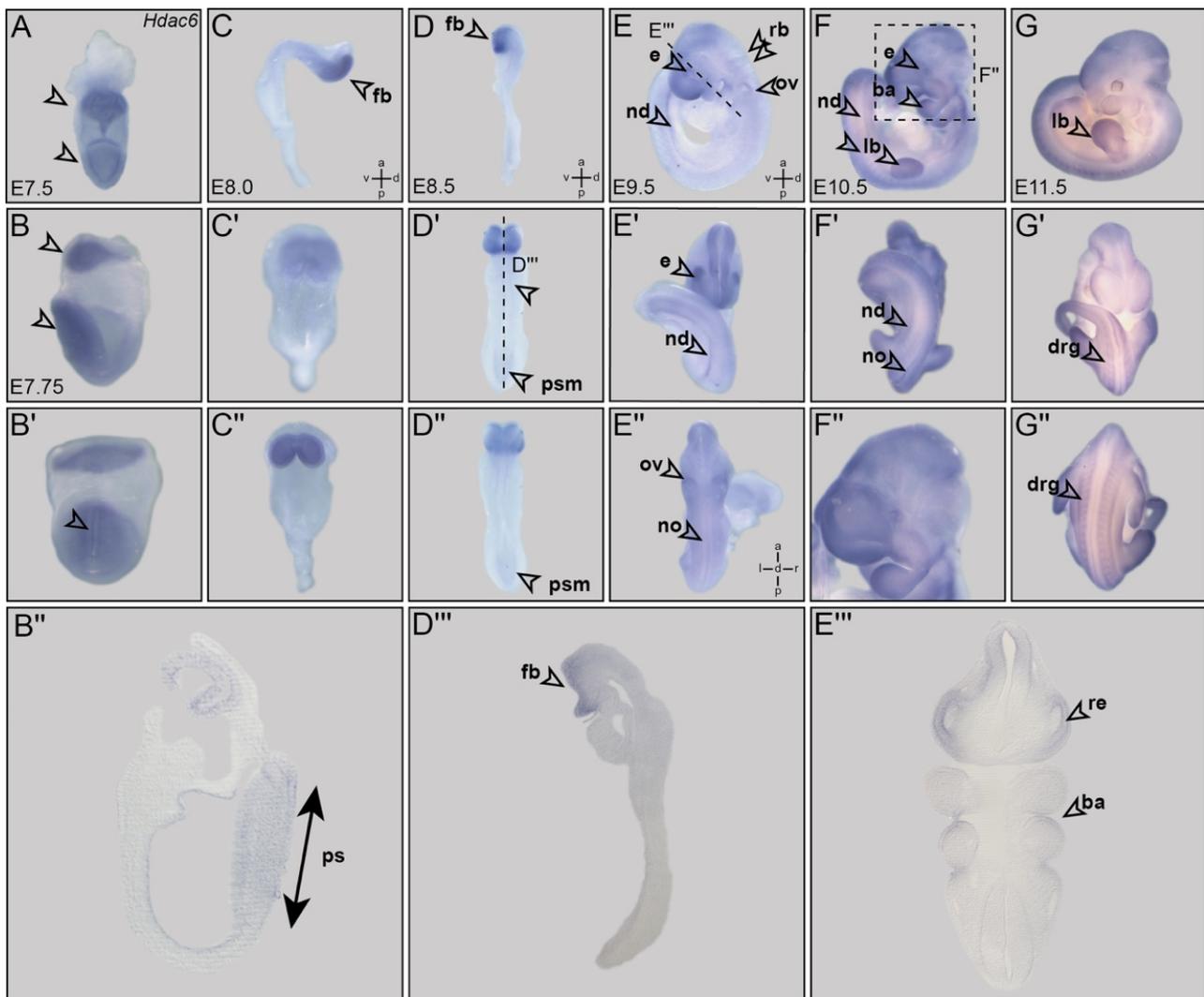


Abb. 19 In situ Expressionsanalyse von *Hdac6* mRNA in der Embryonalentwicklung von *Mus musculus*.

(A-E''') *Hdac6* mRNA wurde durch *in situ* Hybridisierung während der frühen Embryonalentwicklung der Hausmaus (*Mus musculus*; B16) dargestellt. (A) Im St E.7,5 lokalisierte *Hdac6* mRNA im extraembryonalen sowie im embryonalen Gewebe (ex, extraembryonal; emb, embryonal). (B-B''') Im St. E7.75 ließ sich eine Expression im Bereich des Primitivstreifens (ps) nachweisen. (C-C'') In E8.0 und (D-D''') E8.5 konnte eine Expression im Vorderhin (fb) festgestellt werden, die in E8.5 um eine Expressionsdomäne im präsomitischen Mesoderm ergänzt wurde (D'', Pfeil). (E-E''') In E9.5 waren Expressionen in der Augenanlage (e), der Ohrenanlage (ov), den Branchialbögen (ba) und Nierenkanal (nd) sowie den Rhombomergrenzen (rb) nachweisbar. (F-F'') In den Stadien E10.5 und (G-G'') E11.5 wurden die Expressionsdomänen aus E9.5 aufrechterhalten und um eine Expression in anterioren und posterioren Extremitätenknospen (li) und Spinalganglien (drg) ergänzt. (Schnittdicke in B''; D''; E'', 35 µm).

In situ* Expressionsanalyse der *hdac10* mRNA in *Xenopus laevis

Um die Möglichkeit einer funktionellen Redundanz zwischen *hdac6* und *hdac10* sowie deren evolutionären Konservierung während der Embryonalentwicklung zu untersuchen wurden die jeweils die volle Länge umfassenden *hdac10/Hdac10* cDNA-Sequenzen aus Frosch und Maus kloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Im Anschluß daran konnte durch Antisense mRNA *in situ* Hybridisierung das Expressionsmuster der *hdac10/Hdac10* während der Embryonalentwicklung der jeweiligen Spezies ermittelt werden (Abb. 21 *Xenopus laevis*; Abb. 22 *Mus musculus*).

In *Xenopus* Embryonen des St. 15 konnte eine lokalisierte Expression der *hdac10* mRNA im Bereich des Neuroektoderms nachgewiesen werden (Abb. 21 A-B'). In dorsalen Explantaten des St. 17 war bis auf eine leichte Hintergrundfärbung keine spezifische mRNA Expression im Bereich der GRP nachweisbar (Abb. 21 C). Zum Ende der Neurulation konnte eine distinkte Expression der *hdac10* im Bereich der *hatching gland* des Embryos, einzelnen Zellen der dorsalen Mittellinie sowie im Bereich der Zellen des *circum blastoporal collar* nachgewiesen werden (Abb. 21 D-F'). Im St. 35 wurde *hdac10* mRNA in den Nasengruben des Embryos, der Anlage des Innenohrs sowie dem embryonalen Pronephros exprimiert (Abb. 21 G-G'). In Kaulquappen des St. 42 konnte eine mRNA Expression der *hdac10* in den Nasengruben des Embryos sowie Expressionsdomänen im Bereich des Seitenlinienorgans, sowie des Flossensaums visualisiert werden (Abb. 21 H-H"). Explantierte Gehirne des St. 45 wiesen ein regionalisiertes Expressionsmuster der *hdac10* auf (Abb. 21 I-I'). In Explantaten des Gastrointestinaltrakts des St. 45 konnte eine Expression in Magen und Leber der Kaulquappen nachgewiesen werden (Abb. 21 J-J").

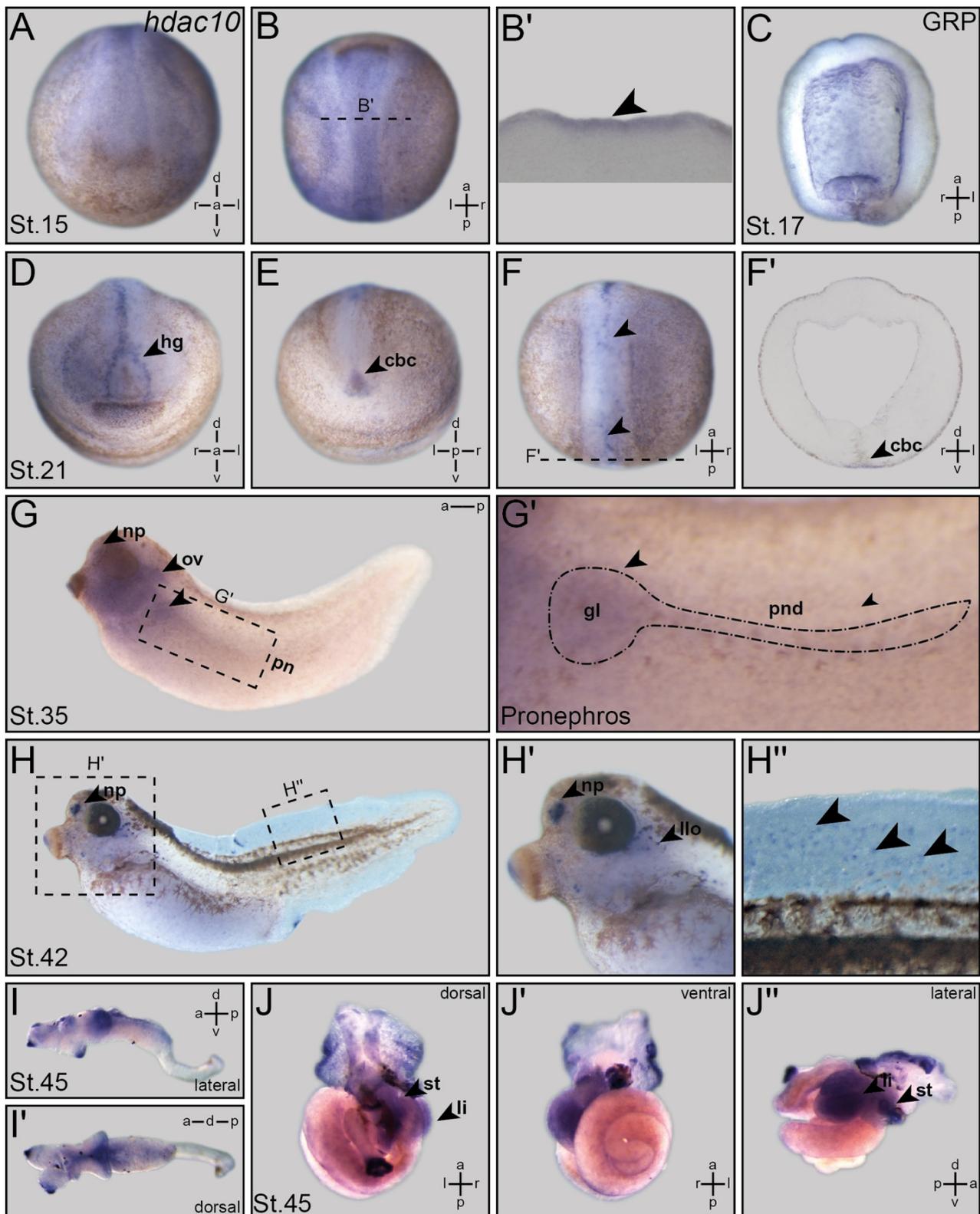


Abb. 21 *In situ* Expressionsanalyse von *hdac10* mRNA in *Xenopus laevis*.

(A-J'') *hdac10* mRNA Lokalisierung konnte durch *in situ* Hybridisierung während der Embryonalentwicklung. (A-B') In St.15 lokalisierte *hdac10* mRNA im Neuroektoderm des Embryos. (C) Im St. 17 ließ sich eine Lokalisation im Bereich des Endoderms nachweisen (C, animales Explantat). (D-F') Expression in den Zellen der hatching gland (hg), in medialen Zellen des schließenden Neuralrohrs und im Blastoporus (cbc) im St. 21. (G-G') Während St. 35 wurden Expressionsdomänen im Bereich der Nasengruben (np), dem Glomus (gl) und Nierenkanal (pnd) des embryonalen Pronephros (pn) sowie in den Kiemenbögen nachgewiesen. (H-H'') Im St. 42 anhaltende Expression in den Nasengruben sowie in den Zellen des Seitenlinienorgans (llo) und des Flossensaums. (I-I') In Explantaten des embryonalen Gehirns und Gastrointestinaltrakts des St. 45 wies *hdac10* ein regionalisiertes Expressionmuster im Gehirn sowie im Magen (st) und der Leber (li) auf (J-J''). Schnittdicke in B', F'; 35 μ m).

In situ* Expressionsanalyse der *Hdac10* mRNA in *Mus musculus

Um eine *Hdac10* mRNA Expression in der Maus nachzuvollziehen wurden Embryonen der Entwicklungsstadien E7.5-11.5 einer *in situ* Hybridisierung unterzogen (Abb. 22 A-H). Mit E8.5 konnte eine erste mRNA Expression im Vorderhirn nachgewiesen werden. Ab E10.5 konnte eine Expression in den Branchialbögen, Extremitätenanlagen und Spinalganglien (Abb. 22 E; F) nachgewiesen werden. Diese wurde in E11.5 aufrechterhalten (Abb. 22 G-H).

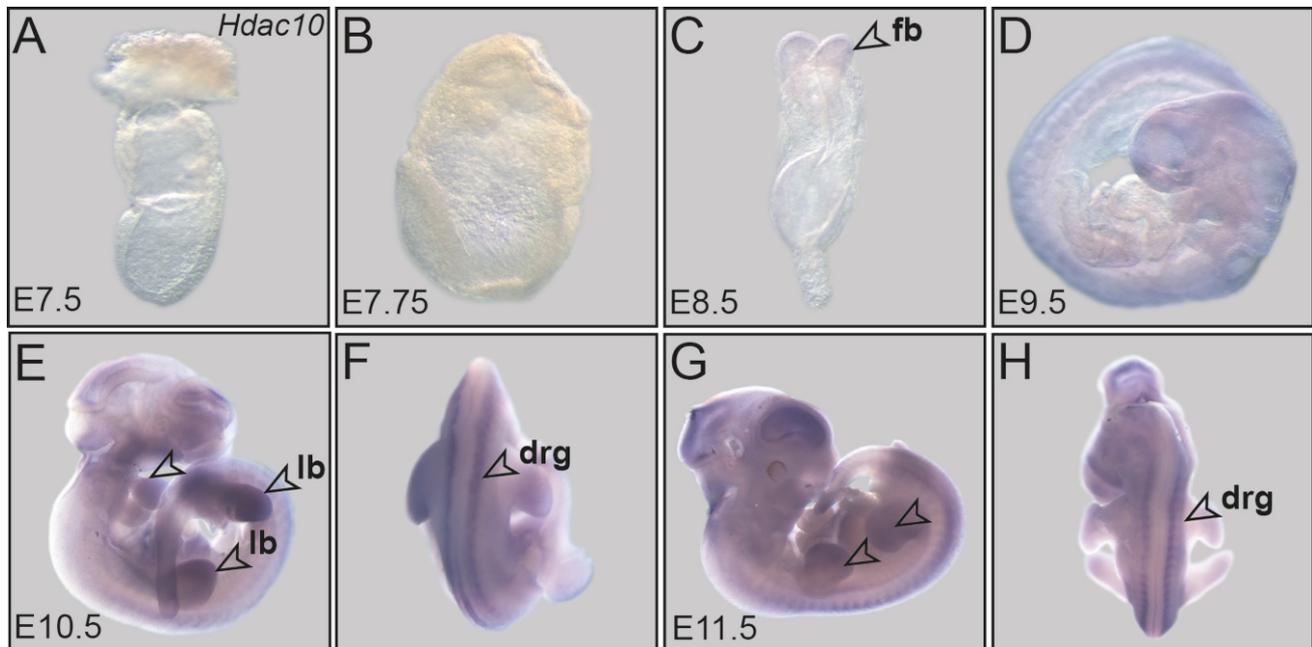


Abb. 22 *Hdac10* mRNA Expression in der Embryonalentwicklung der Maus.

(A-H) Whole mount *in situ* Hybridisierung gegen *Hdac10* mRNA in frühen Embryonalstadien der Maus. (A, B) In Stadien E7.5 bis E7.75 konnte keine mRNA Transkript detektiert werden. (C) Im Stadium E8.5 war eine Expression im anterioren Neuroektoderm nachweisbar. (D) Im Stadium E9.5 konnte eine Expression im gesamten Embryo nachgewiesen werden. (E-F) In den Stadien E10 und E11.5 (G-H) gewebespezifische Expression in den Branchialbögen (E-G) sowie den Extremitätenanlagen. Auffällig ist eine stadienübergreifende Expression von *Hdac10* mRNA im Gewebe der dorsalen Spinalganglien (F, H). Pfeile weisen auf *Hdac10* mRNA Expressionsdomänen hin.

Subzelluläre Proteinlokalisationsanalyse von *Hdac10* in *Xenopus laevis*

Nach Aufklärung der gewebespezifischen Expression der *hdac10/Hdac10* in Frosch- und Mausembryonen konnten in Froschembryo mit der mRNA Expression im Pronephros, sowie im Gehirn und Gastrointestinaltrakts der Embryonen Domänen der Synexpression von *hdac6/hdac10* identifiziert werden. Interessanterweise wiesen die beiden HDACs der Klasse IIb keine deckungsgleichen Expressionsmuster, jedoch Gewebe der räumlichen und zeitlichen Koexpression auf. Auch in Mäusembryonen war es möglich mit den Augenanlagen, den Extremitätenknospen und Spinalganglien Gewebe mit räumlicher und zeitlicher Koexpression darzustellen.

Um erste Hinweise für eine mögliche funktionelle Redundanz von *Hdac6/Hdac10* zu erhalten sollte im Folgenden mit Hilfe der Überexpression eines *Hdac10*-GFP Fusionsproteins eine potenzielle Cilien-assoziierte subzelluläre *Hdac10* Lokalisation nachgewiesen werden.

Nach Funktionsgewinn in der embryonalen Haut war ein distinktes Proteinlokalisationsmuster feststellbar (Abb. 23 A-I). Eine anschließende Immunfluoreszenzanalyse gegen *ac.Tuba4a* konnte eine distinkte Lokalisation von Hdac10-GFP Protein an der Basis motiler Cilien, sowie im ciliären Axonem von Cilien der multicilierten Zellen nachgewiesen werden.

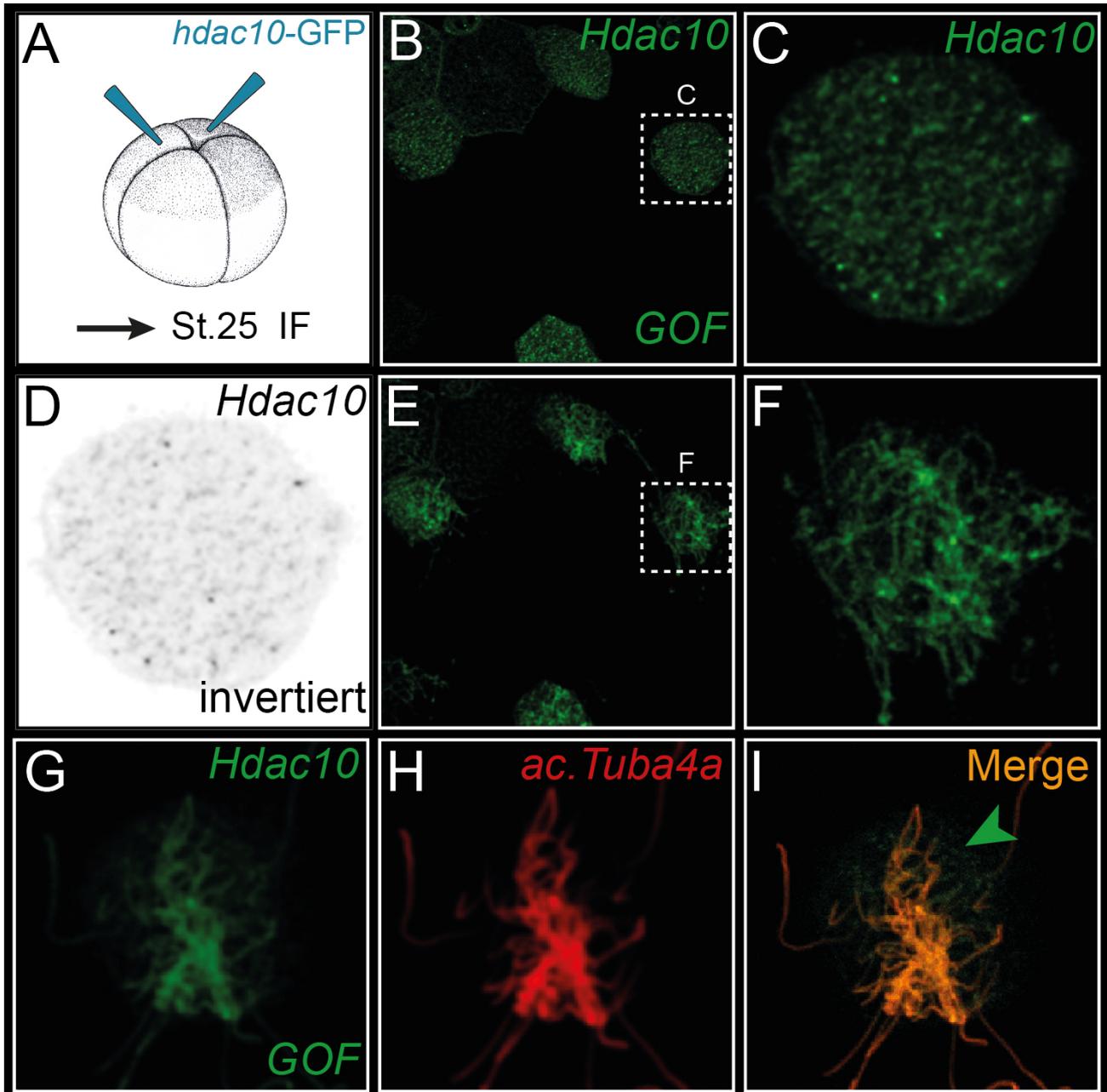


Abb. 23 Subzelluläre Proteinlokalisierung von Hdac10 in multicilierten Zellen der embryonalen Epidermis.

(A-I) Überexpression eines N-terminal fusionierten Hdac10-GFP Konstruktes zeigt eine punktuelle Akkumulation von Hdac10 entlang der apikalen Membran sowie im Axonem multiciliierter Zellen (MCC) der Haut. (A) Animale Überexpression von *hdac10-GFP* mRNA im 4-zelligen Embryo. (B, C) Die Überexpression wies zahlreiche Intensitätsfoci im Bereich der apikalen Membran eines distinkten Zelltyps auf. (D) Invertiertes Signal aus C in S/W). Axonemale Lokalisation von Hdac10-Protein in motilen Cilien (E-F). (G-H) Hdac10 lokalisiert an der Basis und im Axonem motiler Cilien. Einzelkanäle von Hdac10-GFP (G) sowie (H) *ac.Tuba4a* und überlagerte Kanäle (I, merge). Grüner Pfeil in I weist auf Hdac10 Lokalisation an der Basis der Cilien hin.

In der embryonalen Haut von *Xenopus laevis* lokalisieren mit den Proteinen Hdac6 und Hdac10 beide Klasse IIb HDACs in räumlicher Nähe zur Basis motiler Cilien multicilierter Zellen. Auf Grund der partiell-redundanten subzellulären Lokalisation der Proteine besitzen beide HDACs das Potential einen wechselseitigen Funktionsverlust kompensieren zu können. Diese Daten liefern erste Hinweise auf eine funktionelle Redundanz beider HDACs im frühen *Xenopus* Embryo und müssen in zukünftigen Experimente weiterführend untersucht werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitel 1

Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnte eine Funktion von *hdac6* im Bezug auf die embryonale LR-Achsenentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. *hdac6/Hdac6* wurde während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* sowie *Mus musculus* in gewebespezifischen Mustern dynamisch exprimiert. Stadienübergreifende mRNA Expressionsdomänen sowie die subzelluläre Proteinlokalisierung ließen auf eine Expression sowie Proteinlokalisierung in in mukociliären Epithelien schließen. Das endogene Hdac6 Protein lokalisierte Cilien-assoziiert im Bereich des Basalkörpers motiler Cilien. Antisense Morpholino Oligomer vermittelte Funktionsverluste führten zu spezifischen Defekten der LR-Asymmetrie, die auf einen Defekt der Ciliogenese im Bereich der GRP nach Funktionsverlust zurückgeführt werden konnten. Als kausale Ursache für die beobachteten Ciliendefekte konnte ein Einfluss der *hdac6* auf die mRNA Expression von *foxj1*, einem Hauptregulator motiler Cilien, zurückgeführt werden. Ein Einfluss auf die Expression des Transkriptionsfaktors *foxj1*, eines Zielgens des kanonischen Wnt-Signalwegs, war durch den Nachweis einer endogenen Funktion von Hdac6 im kanonischen Wnt-Signalweg darstellbar. Des Weiteren war es möglich eine weitere Funktion von Hdac6 im Rahmen der Wnt/ β -catenin abhängigen Spezifizierung der Neurralleistenzellen während der Embryonalentwicklung nachzuvollziehen. Mit Aufklärung der mRNA Expressionsmuster von *hdac10* sowie deren ebenfalls Cilien-assoziierten subzellulären Lokalisation konnte dieser Klasse IIb HDAC eine partiell-redundante Expression und Lokalisation im Vergleich zu *hdac6/Hdac6* nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stellen den ersten Nachweis der entwicklungsphysiologischen Funktion des *hdac6* Gens in einem Modellorganismus dar und erweitert somit die Sichtweise auf dieses, auf Proteinebene, multifunktionellen Enzyms.

Diskussion Kapitel 1

Bei der HDAC6 handelt es sich um eine evolutionär-konservierte Histonedeaacetylase, mit der zahlreiche gewebespezifische Funktionen im gesunden und pathologisch veränderten menschlichen Organismus in Verbindung gebracht werden können (Aldana-Masangkay und Sakamoto, 2011; Seidel et al., 2015). Diese Funktionen basieren auf der enzymatischen Aktivität dieser HDAC als Lysin-Deacetylase diverser Interaktionspartner im Zytoplasma der Zellen. Regulatorische Einflüsse auf die Aktivität von Signalwegen wie dem EGF- und Wnt-Signalweg, der Aggressomen-vermittelten Proteindegradation, der Zellmigration, der Immunantwort und Zellproliferation sowie auf den Zelltod konnten für die HDAC6 experimentell nachgewiesen werden (Li et al., 2008; Mak et al., 2012; Li et al., 2013; Götze et al., 2014; Seidel et al., 2015).

Eine fehlerhafte Expression des Proteins assoziiert mit einem breiten Spektrum an Krankheiten des Menschen, wie dem Multiplen Myelom (Wang et al., 2014) oder neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson (Simões-Pires et al., 2013). Diese kausale Verbindung ermöglicht es, diese multifunktionelle HDAC als geeignetes Zielgen für die pharmakologische Behandlung humaner Patienten zu identifizieren und gezielt Wirkstoffe zu entwickeln (Witt et al., 2009).

Vergleichende Analyse der *in vivo* Funktion der HDAC6

Um die *in vivo* Funktion der HDAC6 aufzuklären wurden Arbeiten in unterschiedlichen Modellsystemen durchgeführt, die einen differenziellen Blick auf die physiologische Funktion dieses Enzyms erlauben (Seidel et al., 2015). Experimente in Zellkultur, Zebrafisch, Krallenfrosch, Maus und humanen Patienten lieferten zum einen sich wechselseitig ergänzende Daten der funktionellen Beteiligung von HDAC6 in der Regulation der Aktivität des EGF- und kanonischen Wnt-Signalwegs (Li et al., 2008; Mak et al., 2012; Götze et al., 2014; Abb. 24 A-T). Zum anderen wurden nach differenziellem Funktionsverlust unterschiedliche Effekte auf verschiedene Modellorganismen berichtet. *Hdac6*^{-/-} Mäuse sind lebensfähig und fertil und zeigen keinen morphologischen Phänotyp (Zhang et al., 2008). Im Gegensatz dazu weisen Zebrafische nach MO vermitteltem Funktionsverlust Defekte im Bezug auf die Angiogenese auf (Kaluza et al., 2011). Ein Funktionsverlust von *hdac6* mRNA in *Xenopus* führt hingegen zu Defekten der LR-Achsenentwicklung, sowie zu Defekten der Spezifizierung der Neuralleistenzellen und des Auges (Massé et al., 2012; Landua 2015; diese Arbeit). Durch übereinstimmende Nachweise in mehreren Modellsystemen kann aber eine generelle Basalkörper-assoziierte Lokalisation an sensorischen und motilen Cilien (Pugacheva et al., 2007; Ran et al., 2016; Fiebig 2016; diese Arbeit), sowie eine Beteiligung im Wnt-Signalweg (Mak et al., 2012; Götze et al., 2014; diese Arbeit) als gesicherte Funktion der HDAC6 angesehen werden. Nach Inkubationsexperimenten und MO vermitteltem Funktionsverlust von *Hdac6* konnten erstmals morphologische Phänotypen und ein Einfluss auf die

Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalwegs im SM, den Neuralleistenzellen und LR-Defekte während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* beschrieben werden, die bislang weder aus *Danio rerio*, *Mus musculus* oder dem Menschen bekannt waren (Caneiro et al., 2011; Fietz 2014; Landua, 2015; Fiebig, 2016; diese Arbeit).

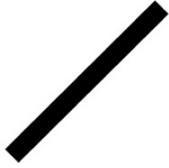
	Zellkultur	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
mRNA <i>in situ</i>	A 	B Keine Lokalisation beschrieben	C Gewebespezifische Expression <small>Agnes Fietz 2014 Diese Arbeit</small>	D Gewebespezifische Expression <small>Diese Arbeit</small>	E Keine Lokalisation beschrieben
Proteinlokalisierung	F Cytoplasmatische Lokalisation Lokalisiert im Bereich der Basalkörper <small>Hubbert et al., 2002 Pugacheva et al., 2007 Ran et al., 2015 Ran et al., 2016</small>	G Keine Lokalisation beschrieben	H Cilien-assoziierte Lokalisation <small>Marc Fiebig 2016 Diese Arbeit</small>	I Raphe Kerne <small>Fukada et al., 2012</small>	J Keine Lokalisation beschrieben
LOF Phänotypen	K Wnt-Signalweg ↓ <small>Mak et al., 2012 Wang et al., 2014 Götze et al., 2014 Iaconelli et al., 2016</small>	L Angiogenese Defekte <small>Kaluza et al., 2011</small>	M Defekte: L/R Achse Ciliogenese Wnt-Signalweg NCC-Spezifikation Neurogenese <small>Bestman et al., 2016 Sophie-Luise Landua 2015 Diese Arbeit</small>	N - Embryo - Lebensfähig und fertil kein Phänotyp <small>Zhang et al., 2008</small> - Adult - Hyperaktivität reduzierte Angst <small>Fukada et al., 2012</small>	O - Neonatal - Kein Patient beschrieben - Adult - Expression in Depressive/ Bipolaren ↓ Patienten <small>Hobara et al., 2010</small>
GOF Phänotypen	P Chemotaktische Beweglichkeit <small>Hubbert et al., 2002</small>	Q Keine GOF Phänotypen beschrieben	R Defekte: Craniofaciale Morphogenese <small>Masse et al., 2012</small>	S - Embryo/Adult - Keine GOF Phänotypen beschrieben	T postnatal OMIM #300863 „Chondrodysplasia mit Platypondyly, distinktive Brachydactyly Hydrocephalus Microphthalmie“ <small>Simon et al., 2005 Chassaing et al., 2010</small>

Abb. 24 Vergleich der subzellulären Expression, Lokalisation sowie Funktionsgewinn- und Funktionsverlustmutanten von HDAC6.

(A-T) Speziesübergreifende Darstellung der *in situ* mRNA Expression, subzellulären Proteinlokalisierung sowie Funktionsverlust- (LOF) und Funktionsgewinn (GOF)- Phänotypen zwischen Zellkultur, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* (A-T). mRNA *in situ* Nachweis: (A) nicht beschrieben, (B) Keine Lokalisation in *Dr* beschrieben, (C) Gewebespezifische Expression in *Xl* (Fietz 2014, diese Arbeit), (D) Gewebespezifische Expression in *Mm* (diese Arbeit), (E) Keine Lokalisation in *Hs* beschrieben. Proteinlokalisierung: (F) Cytoplasmatische und Basalkörper-assoziierte Lokalisation in Zellkultur, (G) keine Lokalisation in *Dr* beschrieben, (H) Cilien-assoziierte Lokalisation in *Xl* (Fiebig, 2016; diese Arbeit), (I) Lokalisation in Raphe Kernen (Fukada et al., 2012), (J) keine Lokalisation in *Hs* beschrieben. LOF Phänotypen: (K) Aktivitätsverlust des Wnt-Signalswegs (Mak et al., 2012; Wang et al., 2014, Götze et al., 2014, Iaconelli et al., 2016), (L) Defekte in der Angiogenese in *Dr* (Kaluza et al., 2011), (M) Defekte der: LR-Achse, Ciliogenese, Wnt-Signalwegsaktivität Neuralleistenzell-Spezifikation, Neurogenese in *Xl* (Landua, 2015; Bestman et al., 2016, diese Arbeit), (N) Kein embryonaler LOF Phänotyp in *Mm*, Adulte Mäuse weisen Hyperaktivität und reduziertes Angstverhalten auf (Fukada et al., 2012), (O) Keine Patienten mit LOF-Mutationen beschrieben, reduzierte Expression in Depressiven/Bipolaren Patienten. GOF-Phänotypen: (P) Einfluss auf chemotaktische Bewegungen in Zellkultur (Hubbert et al., 2002, (Q) Keine GOF-Phänotypen in *Dr* beschrieben, (R) Defekte in der Craniofazialen Morphogenese in *Xl* (Massé et al., 2012), (S) Keine GOF-Phänotypen in *Mm* beschrieben, (T) OMIM# 300863 in *Hs* (Simon et al., 2005; Chassaing et al., 2010).

HDAC6 in der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie

Im Zug der Suche nach neuen Kandidatengen für die Spezifizierung der LR-Achse wurden Histondeacetylasen als zentrale Moleküle der Ionen-Fluss-Hypothese des Symmetriebruchs identifiziert (Aw et al., 2008; Carneiro et al., 2011). In diesem Modell fixieren nicht näher charakterisierte HDAC(s) transiente, asymmetrische Stimuli früher Teilungsstadien durch epigenetische Modifikation(en) im Bereich des Intron 1 des *nodal1* Gens und machen sie so in Kaulquappenstadien transkriptionell zugänglich (Carneiro et al., 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Effekte auf die Etablierung der LR-Achse durch Hdac6 in *Xenopus laevis* unterstützen diese initiale Beobachtung der Beteiligung von Histondeacetylasen im Prozess der Etablierung der LR-Asymmetrie (Carneiro et al., 2011), lassen diese Effekte aber auf einen Wirkmechanismus im Zusammenhang des LRO-basierten Symmetriebruchs zurückführen. Diese Arbeit überführt ein weiteres, zentrales Molekül des Ionen-Fluss-Modells in den Kontext des evolutionär-konservierten Mechanismus des Symmetriebruchs, in dessen Zentrum die Biogenese motiler Cilien steht (Blum et al., 2014b).

Basierend auf zwei unabhängigen pharmakochemischen Inhibitor-Screens konnte Mitglieder der HDAC-Proteinfamilie als Kandidatengen der Lateralitätsentwicklung identifiziert und auf die Klasse IIb dieser Proteinfamilie eingegrenzt werden (Gregoretti et al., 2004; Cao et al., 2009; Carneiro et al., 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie drei assoziierten Bachelorarbeiten war es möglich, eine funktionelle Beteiligung von Hdac6 im Prozess der Spezifizierung der LR-Achse nachzuweisen und diese in eine hierarchische Ebene des LRO-basierten Symmetriebruchs einzuordnen (Fietz, 2014; Landua, 2015; Fiebig, 2016).

Dargestellte LR-Defekte von *Xenopus* Embryonen basieren auf einer regulativen Beteiligung von Hdac6 in der Wnt/ β -catenin-abhängigen Expression des Transkriptionsfaktors *foxf1*, eines Hauptregulators der Biogenese motiler Cilien (Stubbs et al., 2008; Walentek et al., 2012; Caron et al., 2012). MO vermittelte Funktionsverlustexperimente resultierten in (1.) fehlerhaftem Docking des Basalkörpers an die apikale Membran cilierter Zellen, (2.) einer Reduktion der Länge motiler Cilien und (3.) dem Verlust der posterioren Polarisierung der Cilien im Bereich des LRO (Landua, 2015; Fiebig, 2016; Abb. 25 A-D). Eine für die LR-Achsenentwicklung essentielle, linksseitige Regulation der *dand5* mRNA Expression konnte nach Hdac6 Funktionsverlust nicht mehr beobachtet werden und führte zum Verlust der *nodal1* und *pitx2c* Markergenexpression im linken Seitenplattenmesoderm der Embryonen sowie zu Defekten der asymmetrischen Positionierung des Herzens in prämetamorphen Kaulquappen (Vonica and Brivanlou, 2007; Schweickert et al., 2010).

Basierend auf antikörpervermittelter Immunfluoreszenzmikroskopie war es möglich, die endogene, subzelluläre Lokalisation des Hdac6 Proteins in Assoziation des Basalkörpers motiler Cilien des LRO, sowie in multicilieren Zellen der embryonalen Epidermis von *Xenopus laevis* nachzuweisen (Fiebig, 2016, diese Arbeit).

Um eine potentiell funktionelle Redundanz von Hdac6 und Hdac10 während der Embryonalentwicklung zu untersuchen wurden die mRNA Expressionsmuster der ebenfalls der HDAC Klasse IIb zugehörigen Gens *hdac10/Hdac10* in *Xenopus laevis* und *Mus musculus* vergleichend dargestellt. Domänen der Synexpression beider Klasse IIb HDACs in beiden Modellorganismen deuten auf eine potentiell kooperative Funktion beider HDACs während der Embryonalentwicklung hin. Mit der Überexpression eines Hdac10-GFP Fusionsproteins konnte die subzelluläre Proteinlokalisierung des Hdac10 Proteins im Bereich der Basis motiler Cilien in der embryonalen Epidermis von *Xenopus laevis* verdeutlicht werden. Hdac6 und Hdac10 lokalisieren Cilien-assoziiert im Bereich des Basalkörpers in den multicilierten Zellen der Epidermis sowie Hdac6 an der Basis der Cilien des LROs (Fiebig, 2016; diese Arbeit). Auf Grund der partiellen Koexpression der Gene *hdac6/hdac10* sowie der jeweiligen, mit motilen Cilien-assoziierten subzellulären Proteinlokalisierung, erscheint eine wechselseitig-kompensatorische Funktion nach Funktionsverlust eines der beiden Gene der HDAC Klasse IIb möglich.

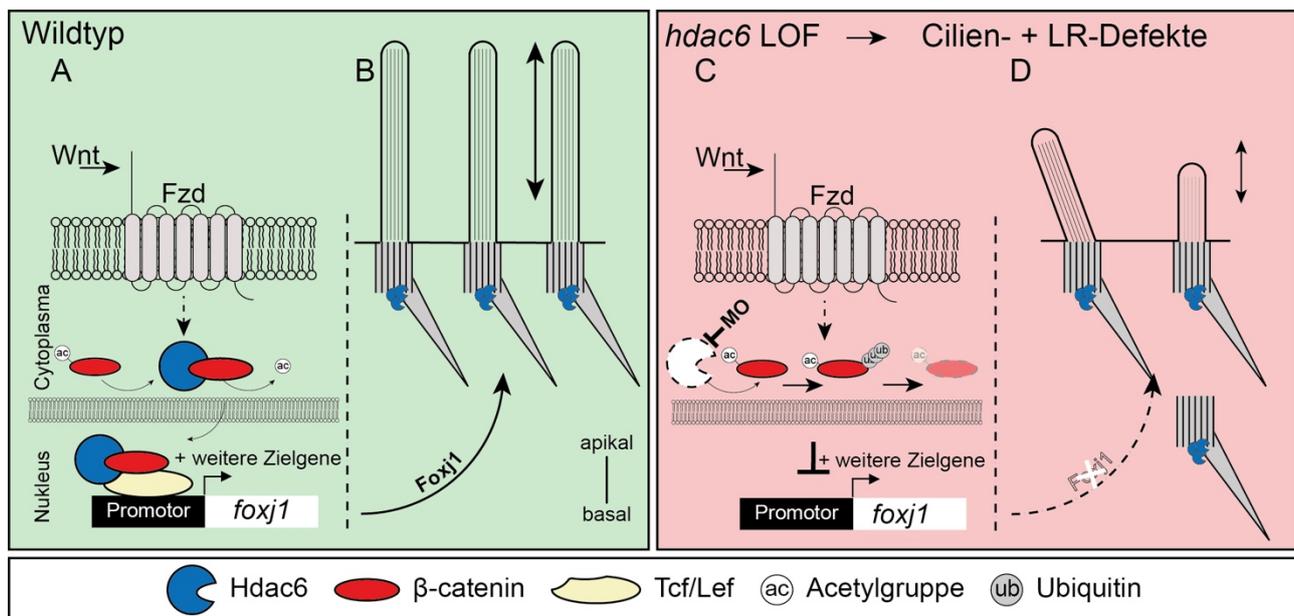


Abb. 25 Arbeitsmodell der Cilien-assoziierten Funktionen von Hdac6 in *Xenopus*.

(A-D) Arbeitsmodell des funktionellen Einflusses der Hdac6 auf die Biogenese, Funktion motiler Cilien während der LR-Achsenentwicklung. (A) Cytoplasmatisch lokalisiertes Hdac6 deacetyliert β -catenin und ermöglicht dessen Stabilisierung, nukleäre Translokation und Interaktion mit Tcf/Lef Transkriptionsfaktoren. Dies resultiert in der Expression des Transkriptionsfaktors *foxy1*. (B) Der Transkriptionsfaktor Foxy1 steuert die Ciliogenese motiler Mono- und Multicilien und kontrolliert die Verankerung von Basalkörpern im apikalen Aktin-Netzwerk der Zelle. (C) MO vermittelter Hdac6 Funktionsverlust führt zur Reduktion der *foxy1* Expression und resultiert in Defekten der Ciliogenese und (D) in Defekten der Basalkörper-Verankerung. Hdac6 (blau), β -catenin (rot), Tcf/Lef (gelb), ac Acetylgruppe, ub Ubiquitin.

HDAC6 und weitere Ciliogenese-assoziierte Faktoren im kanonischen Wnt-Signalweg

Mit der Durchführung von Doppelachsenassays und Wnt-Reporter-vermittelten Biolumineszenzmessungen sowie der Analyse der Induktion Wnt/ β -catenin-abhängiger Zielgene während der transkriptionellen Spezifizierung des SM und der Neuralleistenzellen im *Xenopus* Embryo konnte der Hdac6 eine funktionelle Beteiligung innerhalb dieses Signalwegs *in vivo* nachgewiesen werden. In frühen Teilungsstadien der Embryonen fixiert die Aktivität dieses Signalwegs die dorso-ventral-Achse des Embryos und trägt somit maßgeblich zur Etablierung der Körperachsen bei (Gilbert 2006). Obwohl der Hdac6 eine molekulare Funktion im kanonischen Wnt-Signalweg nachgewiesen werden konnte, resultierte ein dorsaler Funktionsverlust im 4-Zell Stadium überraschenderweise nicht in einer Ventralisierung der Embryonen, wie sie für *β -catenin* Morphanten vorab berichtet wurde (Heasman et al., 2000). Dieser Befund schließt eine Beteiligung der Hdac6, im Zug der dorsalen Determination während früher Furchungsstadien nicht aus, argumentiert aber für die funktionelle Relevanz des in der Oocyte maternal hinterlegten Hdac6 Proteins in der frühen Embryonalentwicklung (Peshkin et al., 2015). Eine Ventralisierung der Embryonen sollte, entsprechend dieser Hypothese, erst nach Unterbindung der Translation maternalen *hdac6* mRNA durch *maternal depletion* während der Eireifung zu Tage treten, dann aber den Funktionsverlust von *β -catenin* nachvollziehen und so die funktionelle Relevanz des *hdac6* Gens für die Aktivität dieses Signalwegs im *Xenopus* Embryo verdeutlichen.

Mit Identifikation des Tumorsuppressorgens *Cylindromatosis* (CYLD), eines negativen Regulators des kanonischen Wnt-Signalwegs, konnte neben β -catenin ein weiterer, direkter Protein-Protein Interaktionspartner der HDAC6 beschrieben werden, der eine Funktion in der Regulation dieses Signalwegs übernimmt (Wickström et al., 2009; Tauriello et al., 2010). Entsprechend zu HDAC6, konnte dieser zytoplasmatisch-lokalisierter Deubiquitinase eine duale Funktion in der Biogenese motiler Cilien, sowie der Signalwegsregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs nachgewiesen werden (Tauriello et al., 2010; Yang et al., 2014; Eguether et al., 2014). Entsprechend der Cilien-assoziierten subzellulären Lokalisation der HDAC6 lokalisiert CYLD ebenfalls am Basalkörper motiler Cilien und führt nach Funktionsverlusten zu Fehlern der Verankerung von Basalkörpern und Defekten in der Ausbildung motiler Cilien (Eguether et al., 2014). Trotz dieser Funktion und beschriebenen Docking-Defekten motiler Cilien wurden bislang jedoch keine Defekte der LR-Achse als Phänotyp dieser Mäuse in der Literatur beschrieben.

Funktionell konnte aber eine epistatische Wechselwirkung von HDAC6 und CYLD während der Ciliogenese durch die Analyse von Doppelknockout Mäusen nachvollzogen werden (Ran et al., 2016). Durch *Cyld*^{-/-} induzierte Verkürzungen der motilen Cilien der Trachea, waren durch einen additionalen *Hdac6*^{-/-} bis hin zu wildtypischen Länge rettbar und verdeutlichten die Beteiligung beider Interaktionspartner im Prozess der Ciliogenese. Überraschenderweise stehen diese

Ergebnisse im Gegensatz zu den beobachteten Phänotypen nach Funktionsverlust im Froschemryo. Hdac6 Funktionsverluste in *Xenopus* resultieren in einer fehlerhaften der Biogenese motiler Cilien, in Form ihrer Verkürzung und in fehlerhafter Polarisierung sowie Defekten des Dockings des Basalkörpers an die apikale Plasmamembran (Landua 2015; Fiebig 2016) und führen nicht, wie in Ran et al., 2016, beschrieben, zu einem GOF-Phänotyp multicilierter Zellen.

Die Aufklärung des *cyld* mRNA Expressionsmusters in *Xenopus* Embryos, sowie die Durchführung von Funktionsgewinn- und Funktionsverlustexperimenten könnten weitere zum Verständnis hilfreiche Hinweise auf die funktionelle und genetische Interaktion beider Gene liefern und zur weiteren Aufklärung dieses funktionellen Unterschieds zwischen diesen Modellorganismen beitragen. Hierbei soll die Hypothese aufgestellt werden, dass Cyld Einfluss auf die transkriptionelle Spezifizierung des Ciliogenesprogramms via *foxj1* Expression nimmt. Dieser könnte ebenfalls auf einer funktionellen Beteiligung im kanonischen Wnt-Signalweg des Embryos beruhen (Tauriello et al., 2010). Vorhergesagt wird, dass ein Funktionsverlust von Cyld zu Defekten der Biogenese motiler Cilien führt und diese in Defekten der LR-Achsenentwicklung resultieren. Kombinatorische Funktionsverlustexperimente von Hdac6 und Cyld könnten hierbei Aufschluss über eine genetische und molekulare Interaktion beider Gene während der Embryonalentwicklung liefern. Im Speziellen könnte durch diese Experimente die Frage untersucht werden, ob Cyld auf Grund seiner molekularen Interaktion mit Hdac6 eine Funktion in der Cilien-Retraktionskaskade zugeordnet werden kann, die im nächsten Kapitel behandelt werden soll (Mergen et al., 2013).

Cilien-Retraktionskaskade und Links-Rechts-Defekte

Ausgehend von einer Mikrotubuli-assoziierten Funktion in der Kontrolle der α -Tubulin Dynamik des Cytoskletts (Hubbert et al., 2002) konnte in Pugacheva et al., 2007 eine subzelluläre Lokalisation der HDAC6 im Bereich des Basalkörpers primärer Cilien nachgewiesen werden. Durch chemische Inhibition war es möglich HDAC6 als essentielles Molekül für die Retraktion sensorischer Cilien zu charakterisieren und diese Funktion auf eine aktivierende Phosphorylierung der HDAC6 durch die Aurora Kinase A (AURKA) zurückzuführen (Pugacheva et al., 2007).

Hierbei unterliegt die Aktivierung von HDAC6 der direkten Kontrolle einer Regulationskaskade, bestehend aus den Cilien-assoziierten Proteinen PITCHFORK, AURKA, HEF1 und INVERSIN (Kinzel et al., 2010; Mergen et al., 2013). In Ciliendefekten resultierende Funktionsverluste von INVERSIN konnten durch pharmakologische Inhibition der HDAC6 aufgehoben werden und verdeutlichten die INVERSIN/AURKA/HEF1 vermittelte Induktion der Cilienresorption durch HDAC6. Interessanterweise war es möglich durch die Charakterisierung der PITCHFORK- und INVERSIN Mutationen embryonale Phänotypen der LR-Achsenspezifizierung zu identifizieren, die ebenfalls durch Mitglieder dieser Retraktionskaskade hervorgerufen werden konnten (Morgan et al., 1998; Watanabe et al., 2003; Kinzel et al., 2010). *Pitchfork*^{+/-} Embryos wiesen mit der abnormen

Ausbildungen des ciliären Axonems einen auf Ciliogenesedefekten beruhenden Phänotyp auf, dessen molekulare Hintergrund bislang nicht näher charakterisiert wurde (Kinzel et al., 2010).

Inversin Mäuse zeigen einen enigmatischen Phänotyp der LR-Achsenentwicklung (Yokoyama et al., 1993). Trotz nachgewiesener ciliärer Proteinlokalisierung im PNC der Maus konnten keine Veränderung der Anzahl oder ein Einfluss auf motile Cilien in *Inv*^{-/-} Individuen beobachtet werden (Watanabe et al., 2003). Kontrastierend dazu war eine Randomisierung der Orientierung des Herzens, nach Morpholino vermitteltem Funktionsverlust von *Inversin*, auch im Zebrafisch zu beobachten (Otto et al., 2003). Dies lässt Polarisierungsdefekte der motilen Cilien des LROs vermuten. Beide Veröffentlichungen verdeutlichen die Beteiligung der Komponenten der Retraktionskaskade im Mechanismus des Symmetriebruchs und stellen die Frage nach dem konkreten Wirkmechanismus.

Weiterführende Experimente könnten einen funktionalen Zusammenhang der Mitglieder der Retraktionskaskade im Bezug auf die Spezifizierung der LR-Achse weiter aufklären.

PITCHFORK, INVERSIN und HDAC6 könnten hierbei sowohl eine Beteiligung in der transkriptionellen Spezifizierung des Ciliogeneseprogramms im LRO und seinen Vorläuferstrukturen, als auch während der Ausbildung der Cilien im LRO, in den Stadien des Symmetriebruchs eine Rolle spielen. Alle drei Komponenten weisen eine Basalkörper-assoziierte Proteinlokalisierung auf (Kinzel et al., 2010; Suizu et al., 2016, Fiebig, 2016). Einfache, sowie kombinierte Funktionsverlustexperimente der Mitglieder der Retraktionskaskade, könnten die epistatische Beziehung dieser Gene im Bezug auf die Etablierung der LR-Achse aufklären und im Weiteren die jeweilige hierarchische Position der einzelnen Komponenten in einer Sequenz des Cilien-basierten Symmetriebruchs einordnen lassen. Neben den beschriebenen Defekten der LR-Achse verursachen Funktionsverlust-Mutationen von *INVERSIN* in humanen Patienten, sowie im Tiermodell Nierenzysten, die mit einem Verlust von primären Cilien einhergehen und deren Auftreten durch pharmakochemische Inhibitoren der HDAC6 potentiell abgemildert werden (Otto et al., 2003). HDAC6 könnte somit in Zukunft als pharmakologisch beeinflussbares Protein in Zukunft weiter in den Fokus therapeutischer Ansätze geraten (Mergen et al., 2013).

Modell zur sequenziellen Beteiligung der HDAC6 in der Biogenese motiler Cilien

Basierend auf den vorab diskutierten Erkenntnissen über eine funktionelle Beteiligung der HDAC6 im Wnt/ β -catenin-Signalweg, der Cilien-assoziierten Proteinlokalisierung und den beschriebenen Protein-Protein Interaktionen, soll ein Arbeitsmodell vorgeschlagen werden, dass eine Beteiligung der HDAC6 in der transkriptionellen Spezifizierung, funktionellen Homöostase und die abschließende Retraktion motiler Cilien umfasst (Abb. 26 I-III).

Sequenz I, transkriptionelle Spezifizierung: Durch die Deacetylierung von acetyliertem β -catenin nimmt die HDAC6 Einfluss auf die Wnt-abhängige Spezifizierung der Ciliogenese durch die Expression des Transkriptionsfaktors *FOXJ1* (Li et al., 2008; Mak et al., 2012; Wang et al., 2014; diese Arbeit). Dieser steuert im Zuge der Biogenese motiler Cilien die Expression seiner Zielgene, sowie die Verankerung der Basalkörper an der apikalen Membran der Zellen. Funktionsverluste der HDAC6 führen zu einer Reduktion der Expression von *FOXJ1* und folglich zu Defekten der Verankerung der Basalkörper im apikalen Aktinnetzwerk ciliierter Zellen, sowie einer Reduktion der Länge der Cilien und einer Einschränkung ihrer Motilität (Abb. 26 I).

Sequenz II, Funktion am Basalkörper: Im Rahmen einer inhibitorisch wirkenden Interaktion mit CYLD oder dem PKD-Komplex findet eine funktionelle Inaktivierung der Deacetylase-Aktivität der HDAC6 im Bereich des Basalkörpers der Cilien statt (Kim et al., 2013; Ran et al., 2016). Stabilisierte ac. α -TUBA4A Einheiten bilden die Mikrotubuli des Axonems des Ciliums. Eine vorzeitige Retraktion des Axonems wird durch eine funktionelle Inaktivierung der HDAC6 auf Proteinebene unterbunden. Auf Grund der direkten oder indirekten molekularen Interaktion mit Mitgliedern der Retraktionskaskade durch HDAC6 erfolgt eine potentielle Inhibition der Stabilisierung β -catenins, die im Weiteren eine Polarisierung motiler Cilien auf der Zelloberfläche durch die Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs ermöglicht (Abb. 26 II; Hypothese).

Sequenz III, Resorption: Nach der temporären Ausbildung motiler Cilien erfolgt deren Resorption und der Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus. Ausgehend von der AURKA (Pugacheva et al., 2007; Mergen et al., 2013; Ran et al., 2016) vermittelten Aktivierung der HDAC6 durch Phosphorylierung erfolgt die Deacetylierung des axonemalen α -TUBA4As, dass zum Abbau des Ciliums führt und den Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus erlaubt (Prodromou et al., 2012; Abb. 26 III).

Das hier vorgestellte Modell erweitert die bisherige, auf die Retraktion des Ciliums fokussierte Sichtweise der HDAC6 um eine funktionelle Beteiligung dieses Enzyms in allen Sequenzen der Ciliogenese. Ausgehend von einer Beteiligung in der transkriptionellen Spezifizierung des Zellschicksals, bis hin zur Destabilisierung und Retraktion des motilen Ciliums. HDAC6 erweist sich hierbei als multifunktionelle Deacetylase, die in Abhängigkeit des räumlichen und zeitlichen Kontextes unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Ciliogenese ausüben könnte.

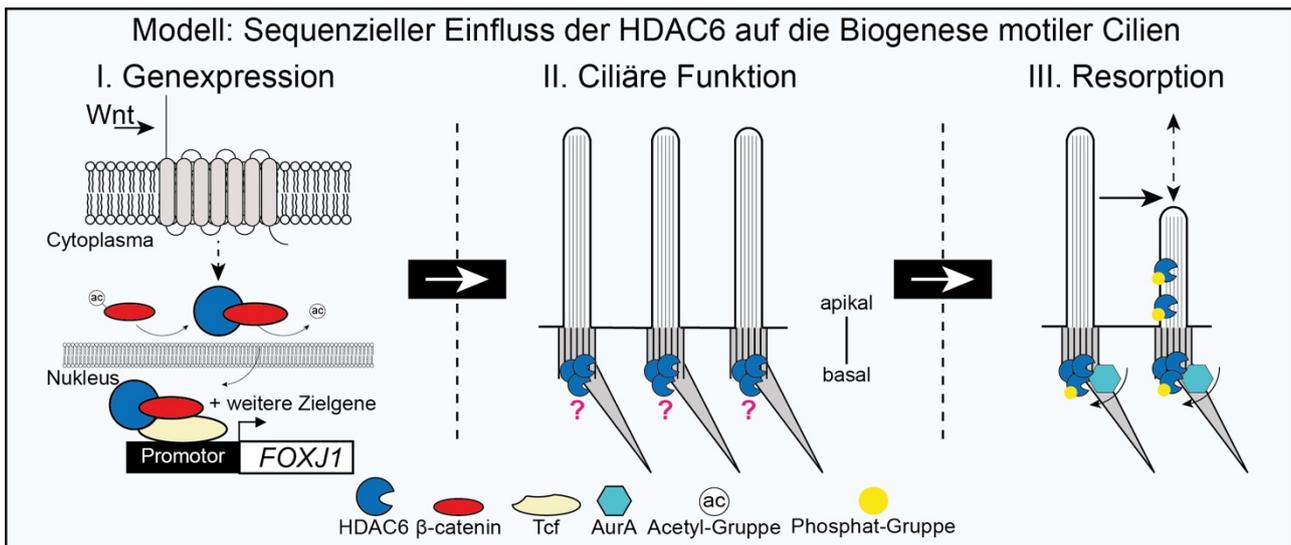


Abb. 26 Sequenzieller Einfluss der HDAC6 auf die Biogenese motiler Cilien.

(I.-III.) Arbeitsmodell: HDAC6 besitzt multiple Funktion während der Ciliogenese. (I.) Einfluss auf die Wnt-Signalweg induzierte *FOXJ1* Expression (Mak et al., 2012; Götze et al., 2014; diese Arbeit). (II.) Inhibition der HDAC6 durch Inversin/ CYLD oder den PKD-Komplex an der Basis der Cilien (Mergen et al., 2013, Ran et al., 2016). (III.) Mediation der Resorption von Cilien nach Phosphorylierung durch Aurka via Deacetylierung von ac.TUBA4A (Pugacheva et al., 2007, Mergen et al., 2013, Ran et al., 2016).

HDAC6 in der Maus

Kontrastierend zu den in dieser Arbeit dargestellten biologischen Funktionen der HDAC6 steht die *Hdac6*^{-/-} Maus (Zhang et al., 2008). Diese weist, kontraintuitiv zu den in *Xenopus laevis* experimentell ermittelten Daten von *hdac6* Morphanten, keinen embryonalen Phänotyp auf, der einen Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg oder eine Beteiligung im Rahmen der Ciliogenese vermuten lässt. *Hdac6*^{-/-} Mäuse sind nach dem genomischen Verlust des *Hdac6* Gens lebensfähig und fertil, weisen aber als molekulares Charakteristikum des erfolgten Funktionsverlustes eine gesteigerte Menge an zellulärem hyperacetyliertem α -Tubulin auf (Zhang et al., 2008). Im Laufe ihres Lebens zeigen adulte *Hdac6*^{-/-} Mäuse eine erhöhte Resistenz gegenüber artifizien, durch Karzinogene induzierte Tumoren der Haut, sowie eine Beeinflussung ihres emotionalen Verhaltens auf (Lee et al., 2008; Fukada et al., 2012). Ein sich nicht manifestierender Phänotyp durch Verlust von HDAC6 stellt eine interessante Beobachtung dar und könnte durch eine funktionelle Kompensation der Deletionsmutante durch ein strukturell verwandtes Gen der HDAC Genfamilie während der Embryonalentwicklung erklärt werden. Vergleichende Experimente im Zebrafisch deuten hierbei auf ein generelles, kompensatorisches Potential des Funktionsverlusts essentieller Gene während der Embryonalentwicklung hin. In Deletionsmutanten konnte eine transkriptionelle Induktion einer Anzahl potentiell-kompensatorischer Transkripte beobachtet werden, die in MO induzierten Funktionsverlusten nicht erfolgte. Morphanten wiesen im Gegensatz zu kompensatorisch-gepufferten Mutanten einen robusten embryonalen Phänotyp auf, der in Mutanten nicht beobachtet werden konnte (Rossi et al., 2015). *Hdac6* in der Maus könnte sich im

Zuge künftiger Untersuchungen als ein durch einen vergleichbaren Mechanismus kompensiertes Gen erweisen. Grundlage dieser Hypothese stellt die chromosomale Lokalisation der *Hdac6* im Genom, sowie die nahe Verwandtschaft zur *Hdac10* dar (Gregoretta et al., 2004; Malicki und Johnson, 2016). Der Mechanismus der funktionellen Kompensation bzw. der kompensatorischen Redundanz konnte bereits vorab innerhalb der Genfamilie der Histondeacetylasen zwischen *Hdac1* und *Hdac2* (Montgomery et al., 2007) sowie *Hdac5* und *Hdac9* (Chang et al., 2004; Haberland et al., 2009) nachgewiesen werden. *Hdac1^{-/-}* und *Hdac2^{-/-}* Mäuse wiesen erst nach einem gewebespezifischen Doppel-Knockout einen Phänotyp auf (Montgomery et al., 2004; Haberland et al., 2009). *Hdac5^{-/-}* und *Hdac9^{-/-}* Mäuse sind, entsprechend zur *Hdac6^{-/-}* Maus, lebensfähig und wiesen ebenfalls erst nach additionellem Verlust beider Deacetylasen einen spezifischen Phänotyp auf, der Defekte der ventrikulären Septen sowie die Ausbildung des Myokardiums umfasst. (Chang et al., 2007; Haberland et al., 2009).

In Mensch und Maus besitzt *HDAC6/Hdac6* eine X-chromosmale Lokalisation. Diese konnte durch fluoreszente *in situ* Hybridisierung an humanen Metaphase-Chromosomen als Einzelkopie-Gen im Genom identifiziert werden (Voelter-Mahlknecht und Mahlknecht, 2003; Zhang et al., 2008). Analog zur Steigerung des Phänotyps in HDAC6 Funktionsgewinn-Mutationen männlicher Patienten im Vergleich zur heterozygoten weiblichen Merkmalsträgern wäre ohne Kompensation nach Verlust des einzigen männlichen HDAC6 Allels keine endogene transkriptionelle Kompensation durch ein homologes Allel möglich (Simon et al., 2010). Folglich lässt dies eine abpuffernde Kompensation durch ein verwandtes Gen der HDAC-Familie in der *Hdac6^{-/-}* Maus in Betracht ziehen und als wahrscheinlich erachten.

Tatsächlich weisen vergleichende Funktionsverlustexperimente der HDAC6 und HDAC10 in Zellkultur auf eine mögliche funktionelle Redundanz beider Gene hin (Götze et al., 2014). Nach wechselseitigem siRNA vermitteltem Funktionsverlust von HDAC6/10 konnte eine Reduktion der relativen Expression von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs beobachtet werden, die Hinweise auf eine prinzipielle Kompensation nach HDAC6 Funktionsverlust liefern. Des Weiteren lokalisieren beide Klasse IIb HDACs cytoplasmatisch und weisen gemeinsam eine Cilien-assoziierte subzelluläre Lokalisation am Basalkörper motiler Cilien auf. Aufschlussreiche Informationen über eine tatsächliche Kompensation von HDAC6 durch HDAC10 in der Maus könnte eine existente, aber bislang wissenschaftlich uncharakterisierte *Hdac10^{-/-}* Maus liefern (Mausline; B6N(Cg)-*Hdac10tm1.1(KOMP)Mbp/J.*) Ausgehend von der beschriebenen partiellen Synexpression beider Gene in Frosch- und Mausembryonen, sowie dem Gedanken der wechselseitigen Kompensation müsste ein *Hdac10^{-/-}* nicht unmittelbar in einem embryonalen Phänotyp resultieren. Dieser wäre erst im Zug eines doppelten Funktionsverlusts beider Klasse IIb HDACs vorherzusagen und sollte die im Frosch beschriebenen Phänotypen reflektieren.

Evolutionäre Konservierung der HDAC6

Abschließend soll die evolutionäre Konservierung der HDAC6 im Bezug auf die Etablierung der LR-Asymmetrie im Seeigel diskutiert werden (Abb. 27). Entsprechend zur FOXJ1 regulierten Biogenese motiler Cilien in Vertebraten (Stubbs et al., 2008; Zhang et al., 2004; Gomperts et al., 2004) konnte diese auch in cilierten Epithelien früher Seeigelembryonen nachgewiesen werden (Warner et al., 2014; Tisler et al., 2016). Mit der Charakterisierung des cilierten Archenterons gastrulierender Seeigelembryonen als LRO war es möglich, den Cilien-basierten Symmetriebruch auch auf Embryonen der Echinodermaten zu übertragen und diesen folglich als Synapomorphie der Deuterostomier zu beschreiben (Tisler et al., 2016). Das Archenteron des Seeigelembryos entsteht durch Gastrulationsbewegungen der Zellen der vegetalen Platte in das Blastocoel der Seeigelembryonen hinein und elongiert im Zuge der Gastrulation zum animalen Pol des Embryos hin (McClay et al., 1991). Analog zur Wnt-abhängigen Spezifizierung des Superfiziellen Mesoderms im Frosch (Beyer et al., 2012a; Walentek et al., 2012) weisen die Zellen der vegetalen Platte eine nukleäre Lokalisation von β -catenin auf, die sich im Zuge der Entwicklung zur Hatching Blastula auf das Zellschicksal der vegetalen Mikromeren beschränkt. Diese tragen maßgeblich zur Ausbildung des Archenterons bei und erweisen sich als *foxj1* positiv (Logan et al., 1999; Tisler et al., 2016). Inkubationsexperimente mit dem H^+/K^+ -ATPase Inhibitor SCH28080 resultierten, entsprechend zum Frosch, in Defekten der LR-Achse, die auf einen Einfluss auf die Wnt-Signalwegs abhängige *foxj1* Expression zurückzuführen sein könnten (Hibino et al., 2006; Walentek et al., 2012). Auf Grund der nachgewiesenen nukleären Expression von β -catenin, der Expression von *foxj1* sowie deren funktionellen Beteiligung zur Morphogenese des Archenterons, könnten die Zellen der vegetalen Platte die homologe Struktur zum Superfiziellen Mesoderm des Krallenfrosches im Seeigelembryo darstellen (Shook et al., 2004; Logan et al., 1999; Beyer et al., 2012a; Tisler et al., 2016). Unter Annahme der vorab formulierten Hypothese zum sequenziellen Beitrag der *hdac6* in der Biogenese motiler Cilien könnte eine chemische Inhibition der Hdac6 zu Defekten in der Ciliogenese und damit LR-Defekten führen, sich auf ein Zeitfenster während Blastulastadien beschränken und auf einer fehlerhaften Expression von *foxj1* beruhen.

Entsprechend zum Frosch war auch im Seeigelembryo eine Cilien-assoziierte Hdac6-Protein Lokalisation im Bereich des LRO zum Zeitpunkt des Symmetriebruchs und in cilierten Zellen des Ektoderms nachweisbar (Fiebig, 2016; diese Arbeit). Die evolutionäre konservierte Proteinlokalisierung kann als Indiz der ebenfalls konservierten embryonalen Funktion der HDAC6 angesehen werden. Funktionelle Experimente wie die Inkubation von Seeigelembryonen in frühen Blastulastadien mit dem HDAC6-spezifischen Inhibitor Tubastatin A könnten in künftigen Experimenten Aufschluss über eine Beteiligung der transkriptionellen Spezifizierung der Zellen der Vegetal Plate des Seeigelembryos geben, deren Zellen durch die Gastrulationsbewegungen den mit motilen Cilien besetzten LRO des Seeigels bilden. Die pharmakochemische Inhibition der *hdac6* des

Seegelembryos würden, analog zum Funktionsverlust im Frosch, in einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors *foxf1* in Blastula/Gastrulastadien des Seeigels resultieren und im Zuge der weiteren Embryonalentwicklung zu Defekten der asymmetrischen Ausbildung des Rudiments führen. Entsprechende Versuche der LR-Achsenentwicklung könnten auch mit Embryonen des Lanzettfischchens durchgeführt werden. Auf Grund der phylogenetischen Verwandtschaft der Cephalochordaten zu Echinodermaten und Vertebraten ist ein vergleichbarer, auf motilen Cilien-basierender Symmetriebruch vorherzusagen. Hierbei ist eine entsprechende Funktion der *hdac6* im Bezug auf die transkriptionelle Spezifizierung des noch zu charakterisierenden LRO über eine molekulare Funktion im kanonischen Wnt-Signalweg, sowie eine Hdac6 Proteinlokalisierung im Bereich des Basalkörpers anzunehmen und in künftigen Experimenten zu überprüfen.

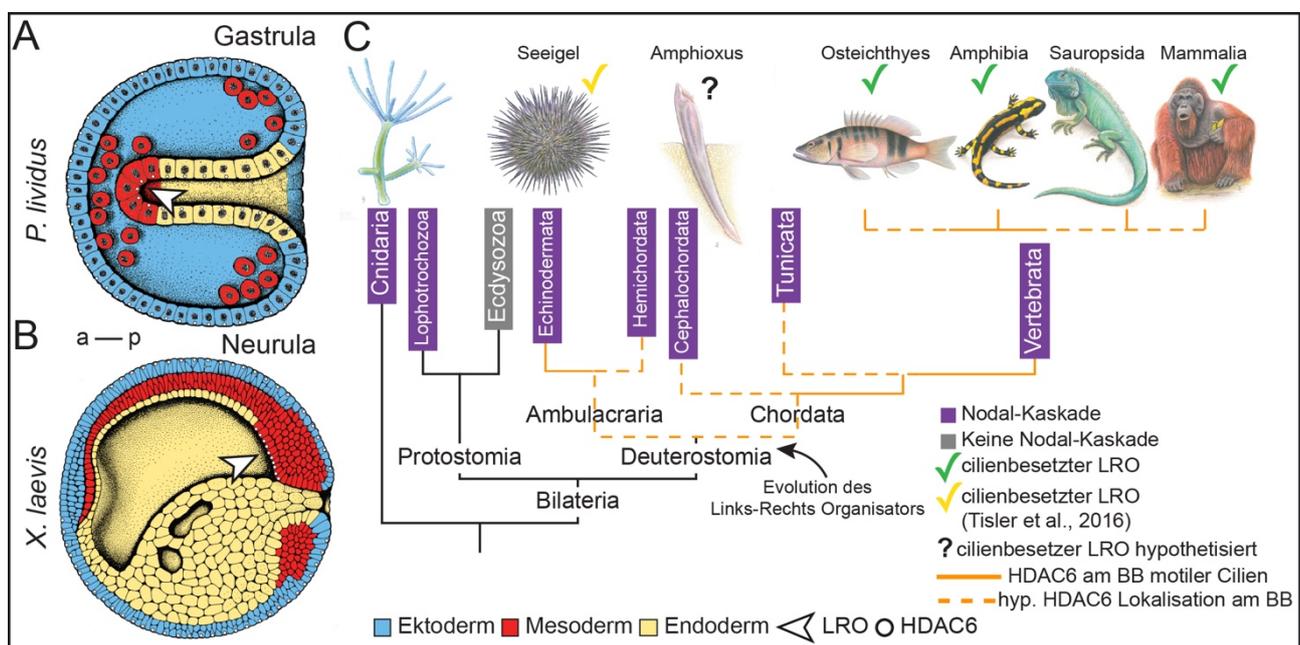


Abb. 27 Phylogenetische Konservierung der HDAC6 Proteinlokalisierung im LRO der Deuterostomier.

(A-C) Schematische Darstellung von Seeigel- und Froschembryonen während speziesspezifischer Stadien des Symmetriebruchs (A; *Paracentrotus lividus*, Gastrula; B; *Xenopus laevis*, Neurula, Ektoderm blau, Mesoderm rot, Endoderm gelb; Links-Rechts-Organisator (LRO) leerer Pfeil; Hdac6 als leerer Kreis). (C) Phylogenetischer Baum der Metazoen mit evolutionärer Konservierung der Nodal-Kaskade; Ausnahme: Ecdysozoa. Deuterostomier besitzen als gemeinsame Apomorphie den cilienbesetzten LRO. Hdac6 konnte an der Basis motiler Cilien des LRO von Echinodermaten und Amphibien nachgewiesen werden. (Vorhandene Nodal-Kaskade in lila; HDAC6 mit Assoziation zu motilen Cilien, orange; Abbildung verändert nach Tisler et al., 2016).

Fazit

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Lokalisierungs- und Funktionsverlustexperimenten konnte erstmals eine entwicklungsbiologische Relevanz des *hdac6* Gens im Zuge der Embryonalentwicklung des Krallenfroschs *Xenopus laevis* beschrieben werden. Diese ordnet sich zeitlich vor einem beschriebenen Funktionsverlust in der Retina prämetamorpher Kaulquappen des St. 45 ein (Bestman et al., 2015) und verdeutlicht eine breite funktionelle Beteiligung der Hdac6 im Bezug auf (1.) die Wnt-Signalwegs Aktivität im Embryo und (2.) die Biogenese motiler Cilien. Die in dieser Arbeit präsentierten Erkenntnisse über die embryonale Funktion erweitern die bislang etablierte Sichtweise bezüglich dieses Gens um eine relevante *in vivo* Beteiligung während der frühen Embryonalentwicklung.

Kapitel 2

***Xenopus*, an ideal model organism to study laterality in conjoined twins**

Matthias Tisler, Axel Schweickert and Martin Blum*

University of Hohenheim
Institute of Zoology
Garbenstr. 30
D-70593 Stuttgart, Germany
Phone +49 711 4592 2255

*To whom correspondence should be addressed at martin.blum@uni-hohenheim.de

Keywords: conjoined twin, twin, organ situs, situs inversus, human, cilia

Short title: Laterality in conjoined twins

Abstract

Conjoined twins occur at low frequency in all vertebrates including humans. Many twins fused at the chest or abdomen display a very peculiar laterality defect: while the left twin is normal with respect to asymmetric organ morphogenesis and placement (*situs solitus*), the organ situs is randomized in right twins. Although this phenomenon has fascinated already some of the founders of experimental embryology in the 19th and early 20th century, such as Dareste, Fol, Warynsky and Spemann, its embryological basis has remained enigmatic. Here we summarize historical experiments and interpretations as well as current models, argue that the frog *Xenopus* is the only vertebrate model organism to tackle the issue, and outline suitable experiments to address the question of twin laterality in the context of cilia-based symmetry breakage.

Main text

Malformations of the human body, in former times frequently addressed as monstrosities, have fascinated mankind at all times. One of the most impressive developmental pathologies is represented by the duplication of the main body axes in conjoined twins. In the vast majority of cases, these represent incompletely separated identical twins, 70% of which are female (Kaufman, 2004). This quite rare condition has been reported in many vertebrate species including humans, where about 1/200.000 live births is affected (Kaufman, 2004; Spitz, 2005; Weber and Sebire, 2010). The rate is higher when still born fetuses and terminated pregnancies are included, with numbers ranging in the order of 1/50.000 (Kaufman, 2004; Spitz, 2005; Weber and Sebire, 2010). Frequencies are higher following *in vitro* fertilization, which increases the rates of monozygotic twinning about 10-fold. In the US, about 50 pairs of conjoined twins are born each year, of which only 10-15 survive the first 24 hours. Successful surgical separation of conjoined human twins, though highly publicized, are rare and restricted to few cases (Spitz and Kiely, 2000). The anatomical collection of Johann Friedrich Meckel the older (1724-1774) at the University of Halle (Germany) hosts a good number of human and animal conjoined twins (Schultka, 2012; Fig. 1). Different cases can be distinguished, depending on where the two axes are fused. Twins joined obliquely (thoracopagus) or laterally (dicephalic) at the chest or abdomen, which together represent some 70% of cases, display a remarkable and unexplained feature: while left twins consistently exhibit normal orientation of the inner organs (*situs solitus*), one half of the right twins show *situs inversus*. Laterality defects are not observed in twins joined at the head (craniopagus), pelvis (ischiopagus), rump (pygopagus) or belly (omphalopagus) (Kaufman, 2004; Levin et al., 1996).

Today, it is little known that during the late 19th and early 20th century some of the most eminent experimental embryologist, including Dareste, Fol, Warynsky and Spemann, studied the problem of organ situs in chick and amphibian single embryos as well as in conjoined twins. In that sense, vertebrate organ laterality was one of the earliest problems tackled by experimental embryology. Camille Dareste in his *Recherches sur la production artificielle des monstruosités ou Essais de tératogénie expérimentale* (Researches on the production of artificial monsters or Essays on experimental teratology; Dareste, 1891) reported that he was able to invert the organ situs by unilateral warming of the chicken egg. Fol and Warynsky published a series of studies on this issue in which they used a thermocauterizer to heat the chick embryo in a localized manner. They even included embryos with a double heart, i.e. twinned specimens (Fol and Warynsky, 1883, 1884, 1886; reviewed in Blum et al., 1999; Buscaglia and Duboule, 2002). First insights into the developmental origin of laterality defects in conjoined twins were obtained by Hans Spemann and his co-workers during the first two decades of the 20th century. Well before turning to embryonic induction, Spemann was fascinated by the problem of symmetry breakage in bilaterally symmetrical embryos. During his time at Rostock University, his student Hermann Falkenberg studied laterality defects in experimentally generated conjoined twins, a technique which Spemann had introduced by partial ligatures of early cleavage stage amphibian embryos using a baby hair loop. Spemann published the results of this work in 1919, after Falkenberg had died during World War I (Spemann and Falkenberg, 1919). Remarkably, these experimental conjoined twins displayed the identical laterality defects that were observed in humans, i.e. *situs solitus* in left twins and an inversion of heart looping in 50% of right twins.

Induced conjoined twins were not the only means by which Spemann and co-workers were able to alter organ laterality in a predictably manner: inversion of the middle part of the neural plate during early neurulation resulted in a complete inversion of organ *situs* in almost one hundred percent of operated specimens from three amphibian species (Spemann 1904, 1906a, b; Meyer 1913). Ablation of small parts of gastrula embryos specifically on the left side led to situs defects as well (Wilhelmi, 1921). Hilde Wilhelmi was the last of Spemann's colleagues to work on laterality problems. She summarized the experimental evidences on laterality in twins and single tadpoles, that were available at the time, in a paper in 1921 in which she concluded:

“*Situs inversus viscerum* kann experimentell erzeugt werden durch Herausnahme eines Stückes auf der linken Seite der Gastrula. Die Tatsache, dass *Situs inversus* im Allgemeinen nur bei linken* Zwillingen auftritt, erklärt sich dadurch, dass die linke Hälfte des Keims etwas hat, was die rechte Hälfte nicht hat. Dieses Etwas ist an einer bestimmten Stelle lokalisiert und scheint normalerweise den bestimmenden Einfluss auszuüben für die spezifische Richtung der

Darmasymmetrien. Beim Fehlen dieses Einflusses scheint es dem Zufall überlassen zu sein, ob die Krümmungen des Darms nach links oder rechts erfolgen.” (Wilhelmi, 1921).

In English: “*Situs inversus viscerum* can be experimentally generated by removal of a piece on the left side of the gastrula. That *situs inversus* in general occurs only in left twins can be explained by the fact that the left half of the germ has something that the right half does not have. This something is localized at a specific place and seems to normally determine the specific direction of gut asymmetries. If this influence is lacking, it seems to be left to chance whether the looping of the gut occurs to the left or to the right”.

Today the identity of this left determinant in normal embryos is text book knowledge, i.e. the Nodal signaling cascade in the left lateral plate mesoderm (Hamada et al., 2002). In the meanwhile, the Spemann and Falkenberg results have been reproduced in *Xenopus* without resorting to hair loop-mediated ligatures, for example following the induction of conjoined twins by ventral microinjections mRNAs encoding Wnt signaling pathway components such as *wnt8* or *β -catenin* (Nascone and Mercola, 1997a). Nascone and Mercola (1997a) reported that *nodal1* was normally expressed on the left side of the left twin, while mRNA was absent from the right twin, and that heart looping was normal in the left and randomized in the right twin. This finding is remarkable, as it perfectly fit Hilde Wilhelmi’s prediction, namely that in the absence of the left determinant organ situs is determined randomly. Data from other vertebrate model organisms are scarce but confirmatory; in the chick, for example, spontaneously arisen thoracopagus twins, which occur with a frequency of about 1/1000 (Levin et al., 1997) revealed left-asymmetric *Nodal* expression in the left twin and absence of mRNA in the right one (Levin et al., 1996). Importantly, besides *Xenopus* no other vertebrate model is available in which conjoined twins can be induced at high frequency in a predictable manner. Co-culture-induced parabiosed chick twins develop a common vasculature, but fail to produce fused thoracopagus and dicephalic twins (Nagai et al., 2011). Therefore, the only experimental vertebrate system to address the enigmatic situs defects in conjoined twins is *Xenopus*. Here, thoracopagus twins can be obtained at will, and the induced twins can be placed on the left or right side of the endogenous one by injecting mRNAs encoding Wnt pathway components *wnt8*, *β -catenin* or *siamois* into the left or right ventral blastomere at the 4-cell stage. Fig. 2 shows the emergence of such twins in a series of histological sections at different stages of development.

The question at hand thus concerns the induction of the Nodal signaling cascade in the left but not the right twin in thoracopagus pairs. What is the determinant that the left twin harbors and the right one lacks upstream of *nodal1* induction in the lateral plate mesoderm (LPM)? Analyzing spontaneous chick twins, Tabin and co-workers concluded in 1997 that “LR information is initiated

with respect to the AP and DV axes of each embryo and is due neither to a maternally derived prepattern within the blastodisc nor to a zygotic decision prior to the establishment of the AP and DV axes" (Levin et al., 1997). Along the same lines, Nascone and Mercola discussed organ situs in their Wnt-pathway induced conjoined frog twins as the possible result of organizer patterning before and during gastrulation (Nascone and Mercola, 1997b). Mercola and Levin, reviewing twins in chick and frog, state that these studies revealed that "...there is no irreversible LR pre-pattern prior to gastrulation" (Mercola and Levin, 2001). Nevertheless, a pre-pattern might exist, which Levin and colleagues addressed in *Xenopus* in a series of papers and reviews, starting with their proposal of an „ion-flux" mode of symmetry breakage (Aw et al., 2008; Levin et al., 2002, reviewed in Blum et al., 2014b). In this model, asymmetric mRNAs pre-pattern the cleavage stage embryo and set up an asymmetric voltage gradient. This gradient, via gap-junctional communication, drives asymmetric localization of serotonin, that finally sets up the Nodal cascade at neurula stages (Carneiro et al., 2011; Fukumoto et al., 2005; Levin et al., 2002).

This same model was used to describe laterality in conjoined twins, arguing that *situs solitus* could only be achieved if the induced twin was able to receive left-sided information from the endogenous twin (addressed as „big brother" effect; cf. Fig. 3; Vandenberg and Levin, 2010; 2012; Vandenberg et al., 2014). According to this proposal, twins located on the right side would consistently lack cleavage-stage pre-patterning information and therefore orient organ situs by chance (Vandenberg and Levin, 2010). By including components of Wnt/PCP-signaling and apical-basal polarity complex proteins into the „big brother" model, the authors concluded that these signaling mechanisms were essential for the inter-twin communication of orientation cues (Vandenberg et al., 2011). A last modification of this hypothesis was promoted in 2014, when it was suggested that polarity proteins would align cells in the blastoderm, therefore enabling signaling molecules like serotonin, to traverse through open gap junctions from the primary to the secondary organizers. Ion-flux determinants thus would play a dual role in left-right patterning of conjoined twins: during early cleavage stages (Vandenberg and Levin, 2010) and after secondary axis development (Vandenberg et al., 2014; Fig. 3).

None of these studies and models, however, addressed the issue of twin laterality in the very context in which symmetry is broken in singleton embryos, namely with respect to cilia-driven leftward flow (Fig. 4). Following Afzelius' finding in 1976 that cilia motility defects underlie Karthagener's syndrome (Afzelius, 1976), a human laterality syndrome characterized by male infertility and situs defects, cilia-bearing left-right organizers (LROs) have been identified in fish, amphibian and mammalian embryos over the last 20 years (Blum et al., 2014a; 2007). In short, LROs function during early neurulation by producing a leftward fluid flow in the extracellular

space, which is instrumental for left-asymmetric *nodal* induction in the LPM (Fig. 4). Directionality is achieved by polarization and tilting of monocilia which rotate in a clockwise fashion. In the frog *Xenopus*, the LRO is transiently positioned in the gastrocoel roof; it develops during late gastrulation from a patch of cells caudal to Spemann's organizer that is known as superficial mesoderm (Shook et al., 2004; Blum et al., 2007). Once the Nodal cascade is activated in the left LPM, the LRO cells integrate into notochord and somites (Shook et al., 2004).

In order to address the nature of symmetry breakage in conjoined twins, all of these processes need to be analyzed during embryogenesis. The following issues and questions suggest themselves: how are the LROs organized in twins? Does each twin have a separate LRO? Are cilia motile and is motility equally present in both twins? Do LROs impact on each other? Or is laterality in twins perhaps governed by a cilia-independent earlier process that acts during early cleavage stages, as suggested by Levin and colleagues? Now that the cascade in single embryos has been worked out in such great detail, the molecular mechanisms of symmetry breakage and laterality defects in conjoined twins can finally be addressed at the molecular level to answer the question that Spemann was already fascinated with: why organ situs is randomly specified in right twins while being consistently normal in left twins. The tools to answer this question are there, and *Xenopus* is the best - and only - model organism in which this question can be addressed and answered.

Acknowledgements

Work in the Blum lab was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to MB (BL 285/9-2). MT was funded by the Federal Ministry of Education and Research (01PL11003), Humboldt reloaded at the University of Hohenheim, Germany.

References

- Afzelius, B.A. 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193: 317–319.
- Aw, S., Adams, D.S., Qiu, D. & Levin, M. 2008. H⁺/K⁺-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry. *Mech Dev* 125: 353–372.
- Blum, M., Steinbeisser, H., Campione, M. & Schweickert, A. 1999. Vertebrate left-right asymmetry: old studies and new insights. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45: 505–516.
- Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., Bogusch, S., Beyer, T., van Straaten, H.W.M. & Viebahn, C. 2007. Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* 75: 133–146.
- Blum, M., Beyer, T., Weber, T., Vick, P., Andre, P., Bitzer, E. & Schweickert, A. 2009. *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry. *Dev Dyn* 238: 1215–1225.

- Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T. & Schweickert, A. 2014a. The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* 141: 1603–1613.
- Blum, M., Schweickert, A., Vick, P., Wright, C.V.E. & Danilchik, M.V. 2014b. Symmetry breakage in the vertebrate embryo: when does it happen and how does it work? *Dev Biol* 393: 109–123.
- Buscaglia, M. & Duboule, D. 2002. Developmental biology in Geneva: a three century-long tradition. *Int J Dev Biol* 46: 5–13.
- Carneiro, K., Donnet, C., Rejtar, T., Karger, B.L., Barisone, G.A., Díaz, E., Kortagere, S., Lemire, J.M. & Levin, M. 2011. Histone deacetylase activity is necessary for left-right patterning during vertebrate development. *BMC Dev Biol* 11: 29.
- Dareste, C. 1891. *Recherches sur la production artificielle des monstruosités, ou Essais de tératogénie expérimentale* (Paris).
- Fol, H. & Warynsky, S. 1883 Sur la production artificielle de l'inversion viscérale ou hétérotaxie chez des embryons de poulet. *C R Acad Sc* 96: 1674-1676.
- Fol, H. & Warynsky, S. 1884 Recherches expérimentales sur la cause de quelques monstruosités simples et de divers processus embryogéniques. *Recueil zool suisse I*: 1-25.
- Fol, H. & Warynsky, S. 1886 Sur la production artificielle de monstres à coeur double chez le poulet, Genève
- Fukumoto, T., Kema, I.P. & Levin, M. 2005. Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Curr Biol* 15: 794–803.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D. & Saijoh, Y. 2002. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 3: 103–113.
- Kaufman, M.H. 2004. The embryology of conjoined twins. *Childs Nerv Syst* 20: 508–525.
- Levin, M., Pagan, S., Roberts, D.J., Cooke, J., Kuehn, M.R. & Tabin, C.J. 1997. Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev Biol* 189: 57–67.
- Levin, M., Roberts, D.J., Holmes, L.B. & Tabin, C. 1996. Laterality defects in conjoined twins. *Nature* 384: 321.
- Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K.R., Nogi, T. & Mercola, M. 2002. Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111: 77–89.
- Meyer, R. 1913. Die ursächlichen Beziehungen zwischen dem Situs viscerum und Situs cordis. *Arch f Entw Mech* 37: 85-107.
- Mercola, M. & Levin, M. 2001. Left-right asymmetry determination in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 779–805.
- Nagai, H., Lin, M.-C. & Sheng, G. 2011. A modified cornish pasty method for ex ovo culture of the chick embryo. *Genesis* 49: 46–52.

- Nascone, N. & Mercola, M. 1997a. Organizer induction determines left-right asymmetry in *Xenopus*. *Dev Biol* 189: 68–78.
- Schultka, R. 2012. Das vorzüglichste Cabinet. Wettin-Löbejün: Janos Stekovics. p 1-295.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K. & Blum, M. 2007. Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. *Curr Biol* 17: 60–66.
- Shook, D.R., Majer, C. & Keller, R. 2004. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol* 270: 163–185.
- Spemann, H. 1904 Über experimentell erzeugte Doppelbildungen mit cyclopischem Defekt. *Zool Jahrb VII (suppl.):* 429-470.
- Spemann, H. 1906a Über eine neue Methode der embryonalen Transplantation. *Verh d dtsh zool Ges* 16:195-202.
- Spemann, H. 1906b Über embryonale Transplantation. *Verh. d. Gesellsch. deutscher Naturforscher und Ärzte* 78:189-201.
- Spemann, H. & Falkenberg, H. 1919. Über asymmetrische Entwicklung und Situs inversus viscerum bei Zwillingen und Doppelbildungen. *Arch f Entw Mech* 45: 371-422.
- Spitz, L. & Kiely, E. 2000. Success rate for surgery of conjoined twins. *Lancet* 356: 1765.
- Spitz, L. 2005. Conjoined twins. *Prenat Diagn* 25: 814–819.
- Vandenberg, L.N. & Levin, M. 2010. Consistent left-right asymmetry cannot be established by late organizers in *Xenopus* unless the late organizer is a conjoined twin. *Development* 137: 1095–1105.
- Vandenberg L.N., Pennarola B.W. & Levin M. 2011. Low frequency vibrations disrupt left-right patterning in the *Xenopus* embryo. *PLoS One*: e23306
- Vandenberg, L.N. & Levin, M. 2012. Polarity proteins are required for left-right axis orientation and twin-twin instruction. *genesis* 50: 219–234.
- Vandenberg, L.N., Blackiston, D.J., Rea, A.C., Dore, T.M., & Levin, M. 2014. Left-right patterning in *Xenopus* conjoined twin embryos requires serotonin signaling and gap junctions. *Int J Dev Biol* 58: 799–809.
- Weber, M.A. & Sebire, N.J. 2010. Genetics and developmental pathology of twinning. *Semin Fetal Neon Med* 15: 313–318.
- Wilhelmi, H. 1921. Experimentelle Untersuchungen über Situs inversus viscerum. *Arch f Entw Mech.* 48: 517–532.

Figures

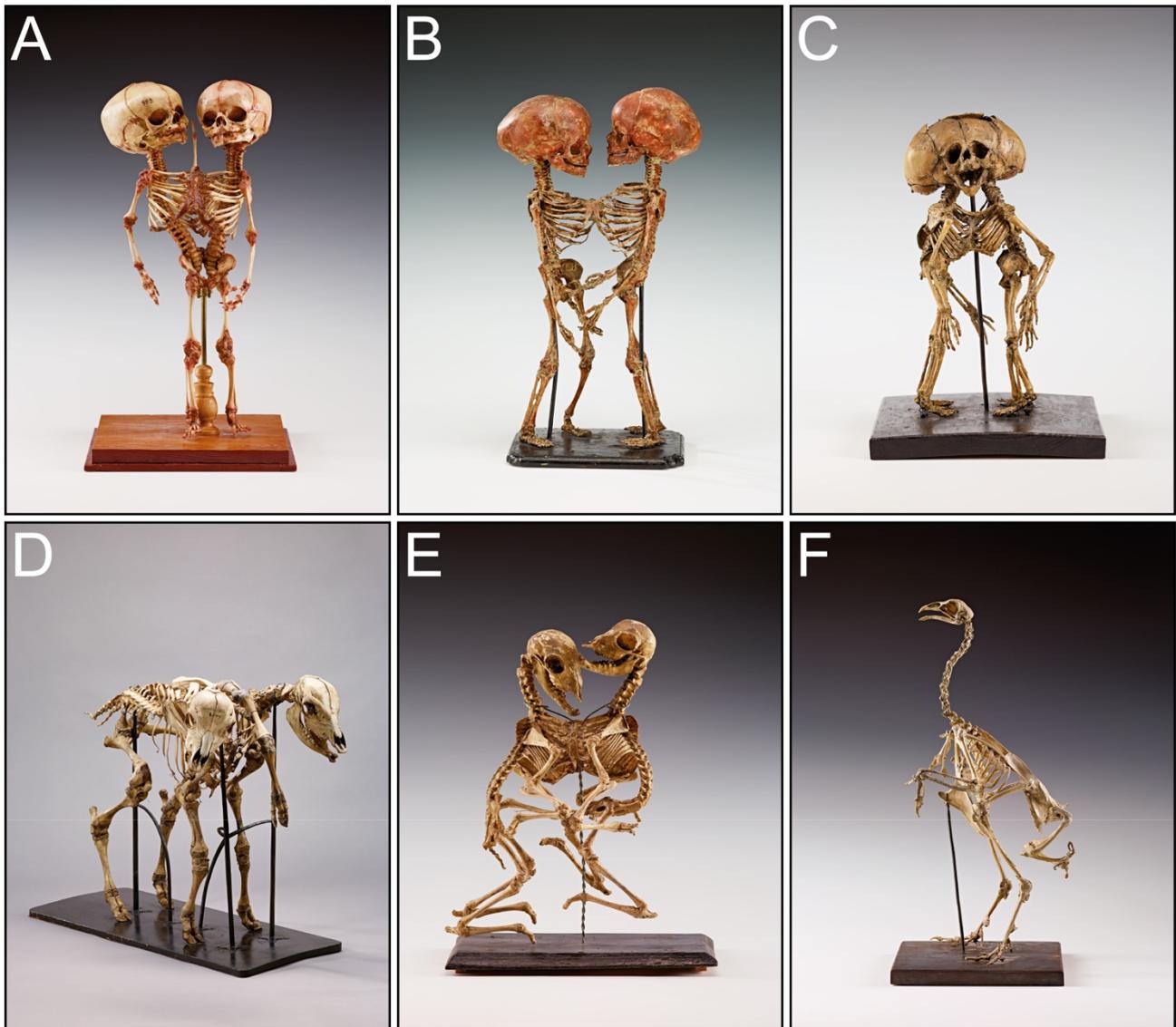


Figure 1. Examples of conjoined human and animal twins from the collection of Johann Friedrich Meckel the older. (A-C) Human dicephalic (A), thoracopagus (B) and cephalothoracopagus (C) specimens. (D) Dicephalic cattle. (E) Thoracopagus sheep. (F) Meckel's four-legged rooster, that reportedly roamed Meckel's chicken run for three years. Reproduced from Schultka (2012) with permission.

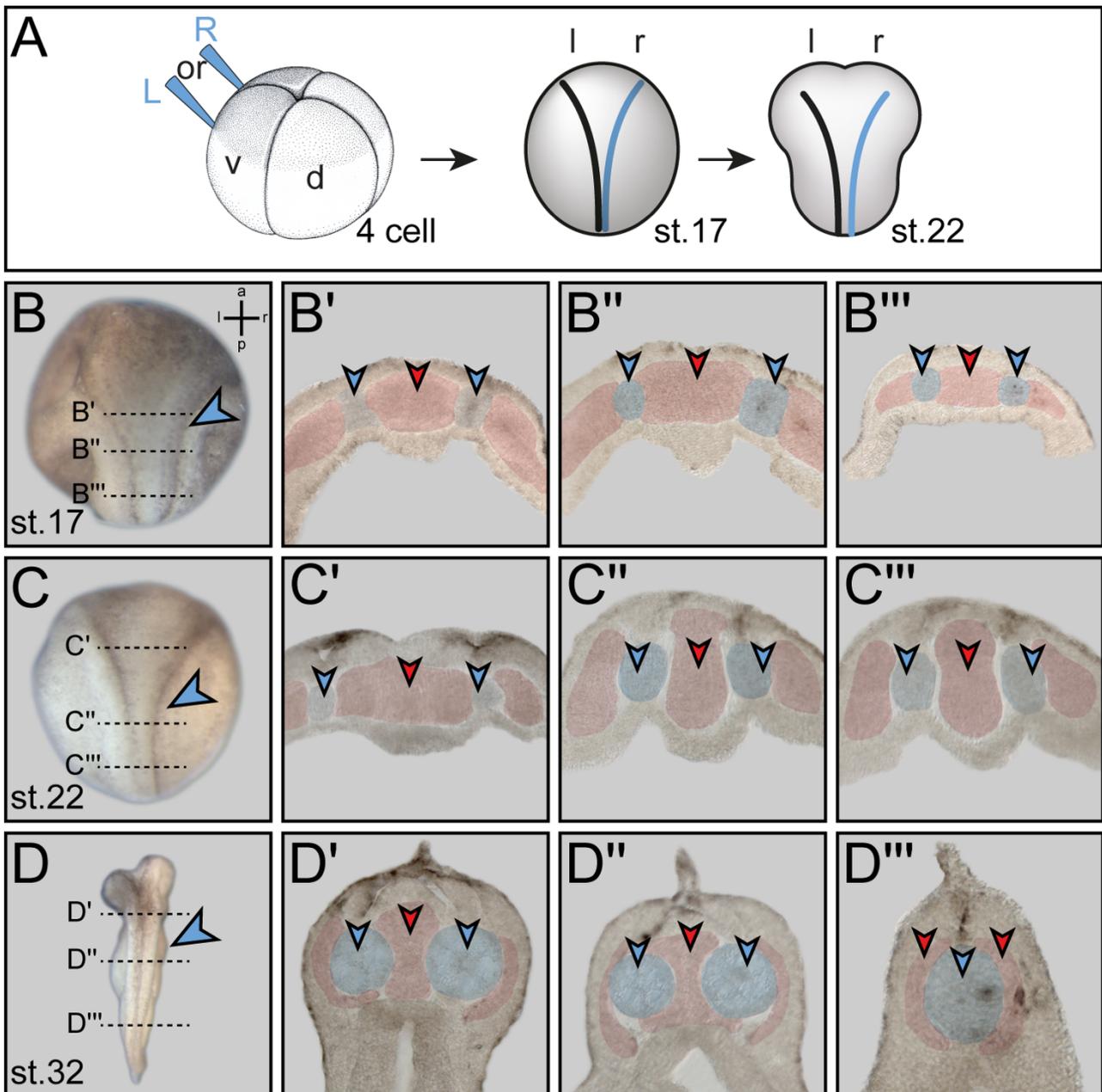


Figure 2. Thoracopagus *Xenopus* twin tadpoles. (A) Thoracopagus conjoined twins in *Xenopus laevis* can be generated by injection of Wnt-pathway components into the ventral marginal zone of cleavage stage embryos. Depending on whether left or right ventral blastomeres are injected, the induced twins are placed on the left or right side of the endogenous twin. (B-C) Genesis of conjoined twins. Histological vibratome sections of st. 17 (B'-B'''), st. 20 (C'-C''') and st. 32 (D'-D''') conjoined twins (B-D) demonstrate the thoracopagus character of twins. At stage 17 and 22, two separate notochords are present throughout (filled arrowheads), which fuse at the posterior end during tadpole stages (D''', st. 32). Normal sized somites are present lateral to both notochords and a large fused somite in between (open arrowheads in B'-B''', C'-C''', D', D''). Blue shading, notochord; pink shading, somites.

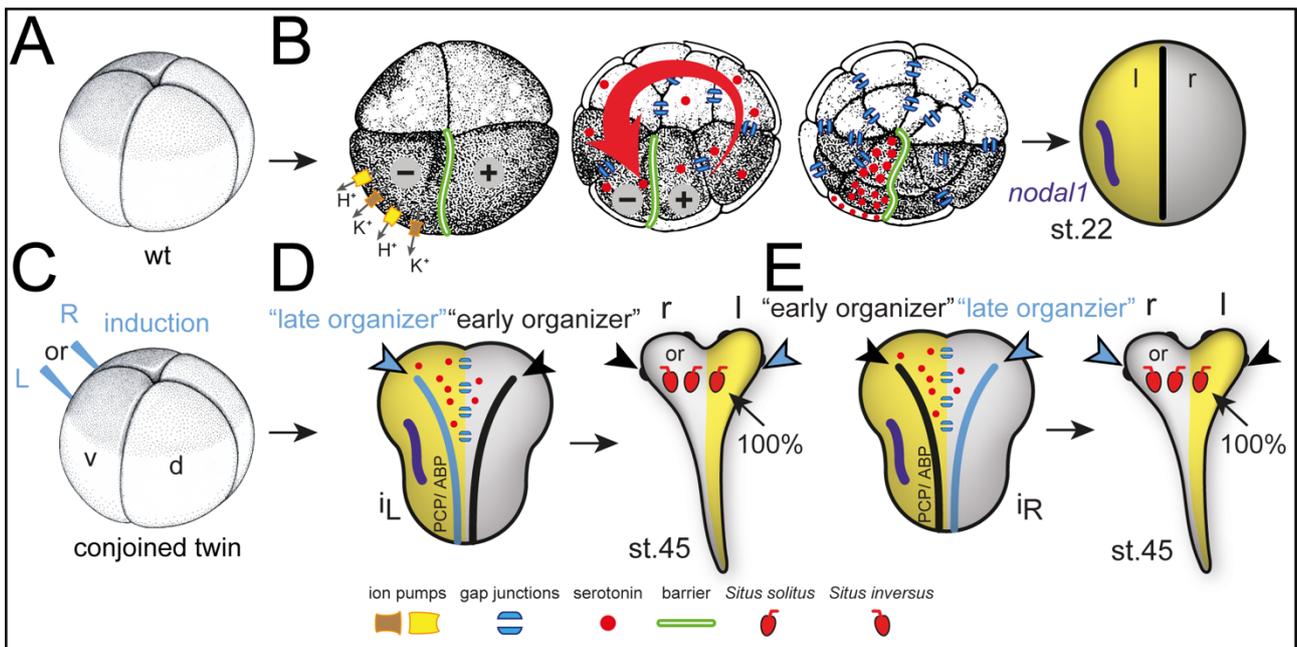


Figure 3. "Ion-flux" model of symmetry breakage in wt embryos and conjoined twins. (Adapted from various publications from M. Levin; cf. references). (A, B) According to this model, wildtype embryos establish asymmetrical *nodal1* expression in the LPM at st. 22 via an asymmetric distribution of serotonin during early cleavage stages. (C-E) In artificially induced conjoined twins (C), late organizers can only instruct a wildtype arrangement of inner organs (st. 45) if they give rise to the left twin (iL), that obtained ion-flux pre-patterning during cleavage stages (D). Right-sided late organizers (iR) miss pre-patterning information and therefore orient the heart randomly (E). Ion-flux pre-patterning (yellow), *nodal1* LPM expression (purple), induced twin (pink), endogenous twin (black). ABP, apico-basal polarity genes and proteins; PCP, planar cell polarity genes and proteins. B redrawn from Blum et al. (2014b).

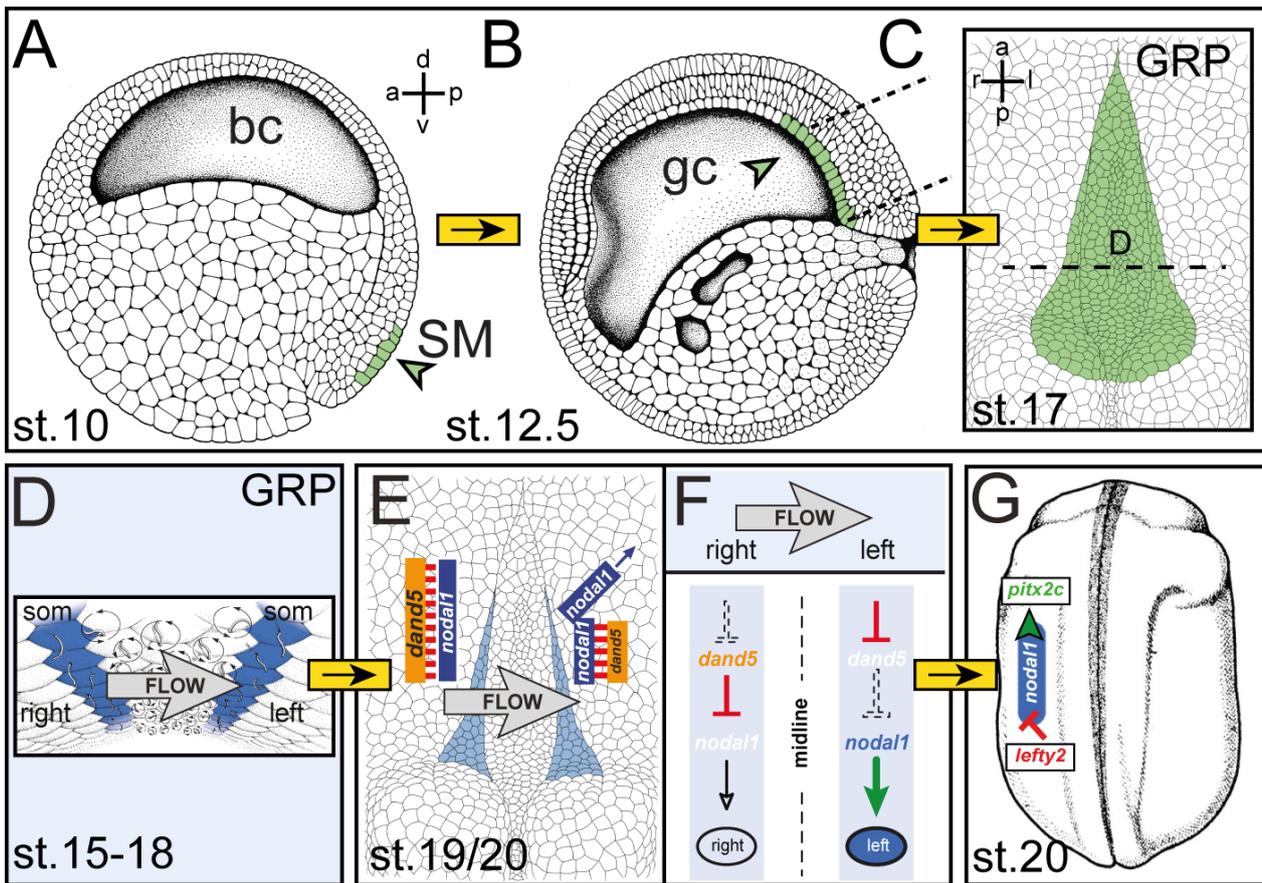


Figure 4. Cilia- and leftward flow-driven mode of symmetry breakage in *Xenopus*. (A-C) The ciliated GRP develops from the superficial mesoderm (SM), which expresses the motile cilia transcription factor *foxj1*, and which invaginates during gastrulation. (D-G) Polarized cilia at the center of the GRP produce a leftward flow of extracellular fluids (D), which represses the Nodal inhibitor *dand5* in the lateral GRP cells (E) to de-repress the co-expressed Nodal (F) and induce the asymmetric Nodal signaling cascade in the left LPM (G).

Kapitel 3

Leftward flow determines laterality in conjoined twins

Matthias Tisler,¹ Thomas Thumberger^{1,2}, Isabelle Schneider¹, Axel
Schweickert¹ & Martin Blum^{1,3,*}

¹University of Hohenheim, Institute of Zoology, Garbenstr. 30, 70593 Stuttgart, Germany

²Present address: Centre for Organismal Studies (COS) Heidelberg, Heidelberg
University, Im Neuenheimer Feld 230, 69120 Heidelberg, Germany

³Lead contact

*Correspondence: martin.blum@uni-hohenheim.de

SUMMARY

Conjoined twins fused at the thorax display an enigmatic left-right defect: while left twins are normal, laterality is disturbed in one half of right twins [1-3]. Molecularly, this randomization corresponds to a lack of asymmetric Nodal cascade induction in right twins [4]. Here we studied the role of leftward flow [5,6] at the embryonic left-right organizer (LRO, [7,8]) in thoracopagus twins in *Xenopus*, which displayed a duplicated, fused and ciliated LRO. Cilia were motile and produced a leftward flow from the right LRO margin of the right twin to the left margin of the left twin. Motility was required for correct laterality in left twins, as knockdown of dynein motor *dnah9* prevented Nodal cascade induction. Nodal was rescued by parallel knockdown of the inhibitor *dand5* [9,10] on the left side of the left twin. Lack of Nodal induction in the right twin, despite the presence of flow, was due to insufficient suppression of *dand5*. Knockdown of *dand5* at the center of the fused LRO resulted in asymmetric Nodal cascade induction in the right twin as well. Manipulation of leftward flow and *dand5* in a targeted and sided manner induced the Nodal cascade in a predictable manner, in the left twin, the right one, both or neither. Laterality in conjoined twins thus was determined by cilia-driven leftward fluid flow like in single embryos, which solves a century-old riddle, as the phenomenon was already studied by some of the founders of experimental embryology, including Doreste [11], Fol & Warynsky [12] and Spemann [13] (reviewed in [14]).

RESULTS AND DISCUSSION

Conjoined *Xenopus* twins display a duplicated and fused LRO.

To systematically investigate left-right (LR) axis specification in conjoined twins, several salient benchmarks during *Xenopus* development were analyzed [6]. Twins were induced in a side-directed manner, by injecting synthetic β -catenin (β cat) mRNA into the left or right ventral blastomere at the 4-cell stage [4] (Figure S1A). The *Xenopus* LRO is represented by the gastrocoel roof plate (GRP), a transient ciliated epithelium which develops from the superficial mesoderm (SM) while this patch of epithelial cells involutes during gastrulation [15] (Figure 1A). A characteristic SM marker gene is *foxj1*, a key transcription factor of motile ciliogenesis [16] (Figure 1B). Figure 1C shows that *foxj1* was expressed in the SM of the primary as well as the induced secondary axis, and that the two SM tissues were clearly separated. GRP cells are flanked by *sox17a*-positive endodermal cells (Figure 1D) [17]. Analysis of *sox17a* expression in dorsal explants prepared from neurula stage induced twins (stage 17) revealed a U-shaped region devoid of *sox17a* mRNA (Figure 1E), suggestive of a fused GRP. GRP cells express the axonemal dynein motor gene *dnah9* [18] (Figure 1F). Figure 1G shows *dnah9* expression in a pattern complementary to *sox17a*, confirming the fused nature of the common GRP. Previous analyses of conjoined twins induced in the frog *Xenopus* revealed *nodal1* expression in the left LPM of left twins at late neurula and early tadpole stages, while mRNA was consistently absent from the right LPM [4, 19]. We reproduced and extended these data to include

the two other genes of the Nodal cascade, *lefty2* and *pitx2c* (Figure S1B-D), which together direct the morphogenesis and placement of asymmetric organs (heart, lung and gastro-intestinal tract; GIT). Expression of all three genes was restricted to the left lateral plate mesoderm (LPM) of the left twin, irrespective of the side of twin induction (Figure S1H). Assessment of organ asymmetry was restricted to the heart of stage 45 larvae, because the GIT was generally common to both twins and looping abnormal in most cases (Figure S1E-G). The heart, as reported in experimental twins and human patients [4, 13, 20], was randomized in the right twin while the left displayed situs solitus (Figure S1E-H, Movie S1). Identical results of marker gene expression and heart situs were obtained when twinning was induced by injection of *siamois1* or *wnt8a* mRNA (Figure S1I, J).

Motile and polarized cilia at the fused LRO produce a leftward flow of extracellular fluids

Vertebrates break symmetry during neurulation: polarized monocilia rotate to produce a leftward flow of extracellular fluids at the LRO [20]. Cilia were present on all cells of the fused GRP region, as visualized by scanning electron microscopy (SEM) of dorsal explants (Figure 1H-K, Figure S2), suggesting that the U-shaped area represented an incomplete fusion of the GRPs of the two twins. Central GRP cilia are motile and polarized, while the flanking lateral domains harbor predominantly non-polarized and immotile cilia [21], with the latter cilia presumably sensing flow directionality [5,6,22,23]. When cilia localization was analyzed in SEM close-ups, polarized cilia were found in central regions on both sides of the U (Figure S2C and S2D). In contrast, central cilia and cells devoid of cilia were seen at the fused center of the twinned GRP (Figure S1E), as well as in both lateral domains bordering the endodermal cells (not shown). Primary and induced sides of the GRP did not differ with respect to cilia polarization, length of cilia and ciliation rate, while the fused central domain revealed fewer ciliated cells (Figure 1I-K). The presence of polarized cilia suggested directed fluid flow on the left and right sides of the fused GRP. To assess flow directly, dorsal explants of conjoined twins were prepared and cultured in the presence of fluorescent microbeads [21]. Beads were transported with identical, i.e. leftward, directionality and similar velocity on both sides (Figure 1L and 1M, Movie S2). Primary and induced parts of the fused GRP thus were indistinguishable with respect to ciliation, cilia polarization and leftward flow (Figure 1N).

Cilia motility and leftward flow are required for normal laterality development in left conjoined twins

To abrogate cilia motility and directly test their role in LR specification in twins, previously characterized antisense morpholino oligonucleotides (MOs) against the axonemal dynein gene *dnah9* were used [18]. Control MO (CoMO) or *dnah9*MO were injected into the endogenous GRP lineage, and secondary axes were induced by β cat on the left or right side (Figure 2A). CoMO did not interfere with the induction of *nodal1* in the left LPM of the left twin (Fig. 2B and 2E). Knockdown

of cilia motility interfered with *nodal1* induction when the endogenous, *dnah9MO*- injected twin was on the left side (Figure 2C and 2E), while no effect was seen when the induced twin, i.e. the one which did not receive *dnah9MO*, was on the left (Figure 2D and 2E). Flow analysis of morphants demonstrated that beads at the GRP of flow-compromised left twins moved only slowly and without directionality, while flow was normal in right twins. A representative specimen is shown in Movie S3. These data demonstrated that motile cilia were required for LR axis determination in conjoined twins, but acted exclusively on the left side of the fused GRP. Cells flanking the LRO co-express *nodal1* and its inhibitor *dand5* [6, 9, 10]. Flow downregulates *dand5*, releases Nodal repression and - following transfer to the left LPM - induces the Nodal signaling cascade [6, 10]. Therefore, *dand5* was analyzed next in order to assess the impact of flow. Three expression domains of *nodal1/dand5* were observed in twinned GRPs (right, center, left; Figure 2F-L), indicating a fusion of the right lateral domain of the left twin to the left lateral domain of the right one. Specimens in about 75% of cases displayed a complete fusion (Figure 2F-I), while the anteriormost aspect of the fused central domain was bifurcated to various degrees in 1/4 of twinned GRPs (Figure 2J). Importantly, *nodal1* expression did not differ during and after flow (Figure 2F and 2G). In contrast, the left *dand5* domain of the left twin was clearly reduced at post-flow stages (Figure 2H and 2I). The left domain of the right twin was partially reduced as well, which was best seen in specimens with anterior bifurcations of the fused central domain, in agreement with the observed flow in both twins (Figure 2J-L). This partially reduced signal, however, was still consistently stronger than the one on the left side of the left twin (Figure 2K and 2L). This result is in perfect agreement with the observed situs solitus in left twins (repression of *dand5* followed by left-asymmetric induction of the Nodal cascade) and the randomization on the right side (absence of Nodal cascade gene expression). The lack of Nodal cascade induction in the LPM tissue between the twins, anterior to the bifurcation of the axes, however, was puzzling, asking whether this tissue was competent to be induced. If it was competent, the unchanged patterns at flow and post flow stages would indicate that flow was insufficient to repress *dand5* enough for Nodal cascade induction to occur (Figure 2C and 2D). To investigate this possibility, we delivered a previously characterized *dand5MO* [10] specifically to the right side of the fused central domain by injection into the left GRP margin of the primary embryo and induction of the twin on its left side (Figure 3A). Remarkably, *nodal1* and *pitx2c* were expressed in the interaxial LPM in 133/186 (*nodal1*) and 31/91 (*pitx2c*) cases (Figure 3B-E). These experiments demonstrated that (1) LPM tissue between the axes was competent to express the Nodal cascade; (2) induction required repression of *dand5* beyond levels that flow was able to achieve.

Flow-mediated repression of *dand5* determines laterality in conjoined twins. If laterality in conjoined twins was determined as in single embryos, the Nodal cascade should be susceptible to manipulation in a predictable manner. Interfering with cilia motility/flow and *dand5*, alone and in combination, should suffice to activate the Nodal cascade at will. As depicted in Figure 4A, embryos were simultaneously manipulated to a) de-repress Nodal by *dand5* gene knockdown in the primary embryo; b) induce twinning; c) ablate cilia motility at the fused GRP by injection of 1.5% methylcellulose (MC) into the gastrocoel before flow stages [22]. CoMO and buffer injections did not

alter nodal1 expression, (Figure 4B and 4F). Disruption of flow alone following MC and CoMO injection prevented nodal1 induction altogether (Figure 4C and 4F). These results were obtained irrespective of the side of twin induction and MO injection (data not shown). Knockdown of dand5 in buffer-injected specimens induced nodal1 in the right twin when twinning was induced on the left, but in an inverted manner, as the knockdown occurred on the right side of the primary embryo (Figure 4D and 4F). Finally, abrogation of flow together with selective knockdown of dand5 on the right of the primary embryo resulted in absence of nodal1 in the left twin and induction in an inverted pattern in the right one, i.e. an inversion of the typical pattern of conjoined twins (Figure 4E and 4F).

Together these experiments demonstrated that laterality in conjoined *Xenopus* twins was determined by cilia-driven leftward flow, which repressed dand5 at the left GRP margin of the left twin as in single embryos (Figure 4F). The Nodal cascade was not induced in the right twin, because flow - though present - was insufficient to reduce dand5 expression in the fused central domain to a level that abolishes Nodal repression (Figure 4F). Although our data on laterality determination in conjoined twins clearly demonstrated that cilia and flow were required for Nodal cascade induction, they do not exclude the formal possibility that earlier LR asymmetries exist that developmentally precede cilia-based LR patterning [25, 26]. Together with previous analyses of leftward flow in singletons [10, 22, 27-30], these experiments unequivocally demonstrate, however, that potential early asymmetries, which certainly were present before leftward flow evolved [8, 31], have been superseded by cilia-based symmetry breakage.

Other vertebrate model organisms have not been systematically investigated for situs defects in conjoined twins, short of a means to induce twinning during embryogenesis. We have identified a single E8.5 conjoined mouse twin, which expressed *Pitx2* selectively in the left LPM of the left twin (Figure S3), as in our *βcat*-induced twins in *Xenopus* (Figure S1D and S1H). Only a certain type of human conjoined twins, which together account for some 70% of cases [1], displays situs randomization in the right twin, namely twins in which the thorax is fused (dicephalic, thoracopagus). Twins joined at the head or pelvis, however, develop situs solitus in both twins [1, 14, 32]. Our experimental manipulations in *Xenopus* only allow for the generation of thoracopagus twins, which - like in humans - show strict randomization of the right twin. Vertebrate LROs are only transiently present in the developing embryo [8]; they generally form and function between the 6-20 somite stage, i.e. at anterior-posterior positions corresponding to the upper chest region during later development and adulthood. This notion supports the view that twins joined in the head or pelvis region each retain separate LROs and thus develop without LR defects. How the differential specification of laterality in conjoined thoracopagus twins is determined has remained enigmatic. It has been argued that twinning is induced too early to be influenced by cilia and leftward flow, and that induced twins must pick up laterality information from a primary organizer in the endogenous twin [33-35]. The unclear mechanism of differential situs determination in conjoined twins has remained a last serious objection against the general acceptance of cilia-driven symmetry breakage in fish, amphibians and mammals. The predictable Nodal cascade induction in conjoined twins by

manipulation of just flow itself and the flow target gene *dand5* demonstrates that cilia- driven leftward flow represents the decisive mechanism for symmetry breakage in conjoined twins, as in single embryos.

REFERENCES

- [1] Kaufman, M.H. (2004). The embryology of conjoined twins. *Childs Nerv. Syst.* 20, 508–525.
- [2] Spitz, L. (2005). Conjoined twins. *Prenat. Diagn.* 25, 814–819.
- [3] Weber, M.A., and Sebire, N.J. (2010). Genetics and developmental pathology of twinning. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15, 313–318.
- [4] Nascone, N., and Mercola, M. (1997). Organizer induction determines left-right asymmetry in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 189, 68–78.
- [5] Yoshida, S., and Hamada, H. (2014). Roles of cilia, fluid flow, and Ca(2+) signaling in breaking of left-right symmetry. *Trends Genet.* 30, 10–17.
- [6] Blum, M., Schweickert, A., Vick, P., Wright, C.V.E., and Danilchik, M.V. (2014). Symmetry breakage in the vertebrate embryo: when does it happen and how does it work? *Dev. Biol.* 393, 109–123.
- [7] Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., Bogusch, S., Beyer, T., van Straaten, H.W.M., and Viebahn, C. (2007). Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* 75, 133–146.
- [8] Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T., and Schweickert, A. (2014). The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* 141, 1603–1613.
- [9] Vonica, A., and Brivanlou, A.H. (2007). The left-right axis is regulated by the interplay of *Coco*, *Xnr1* and *derrière* in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 303, 281–294.
- [10] Schweickert, A., Vick, P., Getwan, M., Weber, T., Schneider, I., Eberhardt, M., Beyer, TPachur, A., and Blum, M. (2010). The nodal inhibitor *Coco* is a critical target of leftward flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 20, 738–743.
- [11] Dareste, C. (1891). *Recherches sur la production artificielle des monstruosités, ou Essais de tératogénie expérimentale* (Paris: Reinwald).
- [12] Fol, H., and Warynsky, S. (1883). *Sur la production artificielle de l'inversion viscérale ou hétérotaxie chez des embryons de poulet*. *CR Acad. Sci. Paris* 96, 1674–1676.
- [13] Spemann, H., and Falkenberg, H. (1919). *Über asymmetrische Entwicklung und Situs inversus viscerum bei Zwillingen und Doppelbildungen*. *Archiv für Entwicklungsmechanik* 45, 371–422.

- [14] Tisler, M., Schweickert, A., and Blum, M. (2016). *Xenopus*, an ideal model organism to study laterality in conjoined twins. *Genesis* (New York, NY 2000), DOI 10.1002/dvg.22993.
- [15] Shook, D.R, Majer, C., and Keller, R. (2004). Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Dev. Biol.* 270, 163–85.
- [16] Stubbs, J.L., Oishi, I., Belmonte, J.C.I, and Kintner, C. (2008). The forkhead protein *Foxj1* specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* 40, 1454–1460.
- [17] Hudson, C., Clements, D., Friday, R.V., Stott, D., and Woodland, H.R. (1997). *Xsox17alpha* and -beta mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell* 91, 397–405.
- [18] Vick, P., Schweickert, A., Weber, T., Eberhardt, M., Mencl, S., Shcherbakov, D., and Blum, M. (2009). Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 331, 281–291.
- [19] Hyatt, B.A., and Yost, H.J. (1998). The left-right coordinator: the role of *Vg1* in organizing left- right axis formation. *Cell* 93, 37–46.
- [20] Lander, A., King, T., and Brown, N.A. (1998). Left-right development: mammalian phenotypes and conceptual models. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 35–41.
- [21] Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829–837.
- [22] Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., and Blum, M. (2007). Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 17, 60–66.
- [23] Yuan, S., Zhao, L., Brueckner, M., and Sun, Z. (2015). Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry. *Curr. Biol.* 25, 556–567.
- [24] Boskovski, M.T., Yuan, S., Pedersen, N.B., Goth, C.K., Makova, S., Clausen, H., Brueckner, M., and Khokha, M.K. (2013). The heterotaxy gene *GALNT11* glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality. *Nature* 504, 456–459.
- [25] Danilchik, M.V., Brown, E.E., and Riepert, K. (2006). Intrinsic chiral properties of the *Xenopus* egg cortex: an early indicator of left-right asymmetry? *Development* 133, 4517–4526.
- [26] Vandenberg, L.N., and Levin, M. (2013). A unified model for left-right asymmetry? Comparison and synthesis of molecular models of embryonic laterality. *Dev. Biol.* 379, 1–15.
- [27] Beyer, T., Danilchik, M., Thumberger, T., Vick, P., Tisler, M., Schneider, I., Bogusch, S., Andre, P., Ulmer, B., Walentek, P., et al. (2012). Serotonin Signaling Is Required for Wnt-Dependent GRP Specification and Leftward Flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 22, 33–39.

- [28] Beyer, T., Thumberger, T., Schweickert, A., and Blum, M. (2012). Connexin26-mediated transfer of laterality cues in *Xenopus*. *Biology Open* 1, 473–481.
- [29] Walentek, P., Beyer, T., Thumberger, T., Schweickert, A., and Blum, M. (2012). ATP4a Is Required for Wnt-Dependent Foxj1 Expression and Leftward Flow in *Xenopus* Left-Right Development. *Cell Reports* 1, 516–527.
- [30] Tingler, M., Ott, T., Tözser, J., Kurz, S., Getwan, M., Tisler, M., Schweickert, A., and Blum, M. (2014). Symmetry breakage in the frog *Xenopus*: Role of Rab11 and the ventral-right blastomere. *Genesis (New York, NY: 2000)* 52, 588-599.
- [31] Blum, M., Weber, T., Beyer, T., and Vick, P. (2009). Evolution of leftward flow. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 464–471.
- [32] Levin, M., Roberts, D.J., Holmes, L.B., and Tabin, C. (1996). Laterality defects in conjoined twins. *Nature* 384, 321.
- [33] Vandenberg, L.N., and Levin, M. (2010). Consistent left-right asymmetry cannot be established by late organizers in *Xenopus* unless the late organizer is a conjoined twin. *Development* 137, 1095– 1105.
- [34] Vandenberg, L.N., and Levin, M. (2012). Polarity proteins are required for left-right axis orientation and twin-twin instruction. *Genesis (New York, NY: 2000)* 50, 219–234.
- [35] Vandenberg, L.N., Blackiston, D.J., Rea, A.C., Dore, T.M., and Levin, M. (2014). Left-right patterning in *Xenopus* conjoined twin embryos requires serotonin signaling and gap junctions. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 799–809.

Author contributions

M.T., T.T., A.S. and M.B. designed experiments. M.T., T.T. and I.S. performed experiments. M.T. and M.B. wrote the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to all members of the Blum lab for continuous support and discussions. We are particularly thankful to Bärbel Ulmer who provided us with the mouse conjoined twin embryo stained for Pitx2. M.T. was funded by the Federal Ministry of Education and Research (01PL11003), project Humboldt reloaded. T.T. received a Ph.D. fellowship from the Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg. Work in the Blum lab was supported by a grant from the DFG to M.B. (BL 285/9-2).

Figures

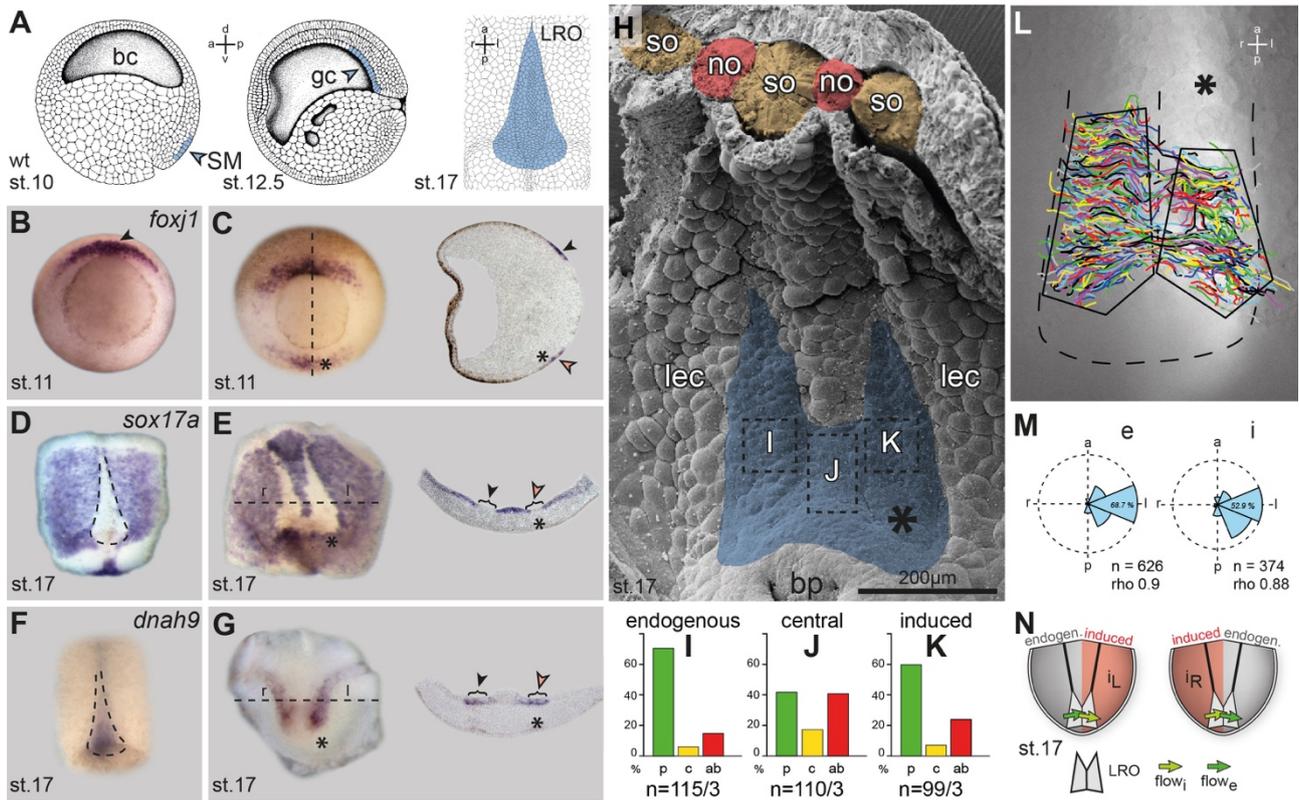


Figure 1. Leftward flow at the fused LRO in *Bcat*-induced conjoined twins

(A) Development of the LRO at the *Xenopus* gastrocoel roof: the superficial mesoderm (SM) involutes during gastrulation to give rise to the GRP during early neurulation, which is shown in a dorsal explant in ventral view on the right (blue). (B and C) Endogenous and induced SM marked by *foxj1* expression in a singleton (B) and a conjoined twin (C, * injected side). Note that the two SMs are clearly separated. (D-G) Ventral views of dorsal explants of singleton embryos (D, F) and conjoined twins (E, G). GRP tissues are highlighted by the absence of *sox17a* (D and E) and the presence of *dnah9* transcripts (F and G). Note that the GRPs are posteriorly fused in the twins (E and G). (H) Scanning electron micrograph of representative twinned GRP (blue). (I-K) Compilation of cilia polarization in endogenous (I), fused central (J) and induced (K) parts of three twinned GRPs (p, posterior; c, central; ab, absent; n, number of cells). (L-M) Leftward flow at twinned GRPs. (L) Tracks of fluorescent beads, (M) directionality of flow. (N) Schematic representation. a, anterior; ab, absent; c, central; d, dorsal; e, endogenous twin; i, induced twin; l, left; no, notochord; p, posterior; r, right; so, somite; v, ventral. *, induced twin. See also Figure S1, Figure S2, Movie S1 and Movie S2.

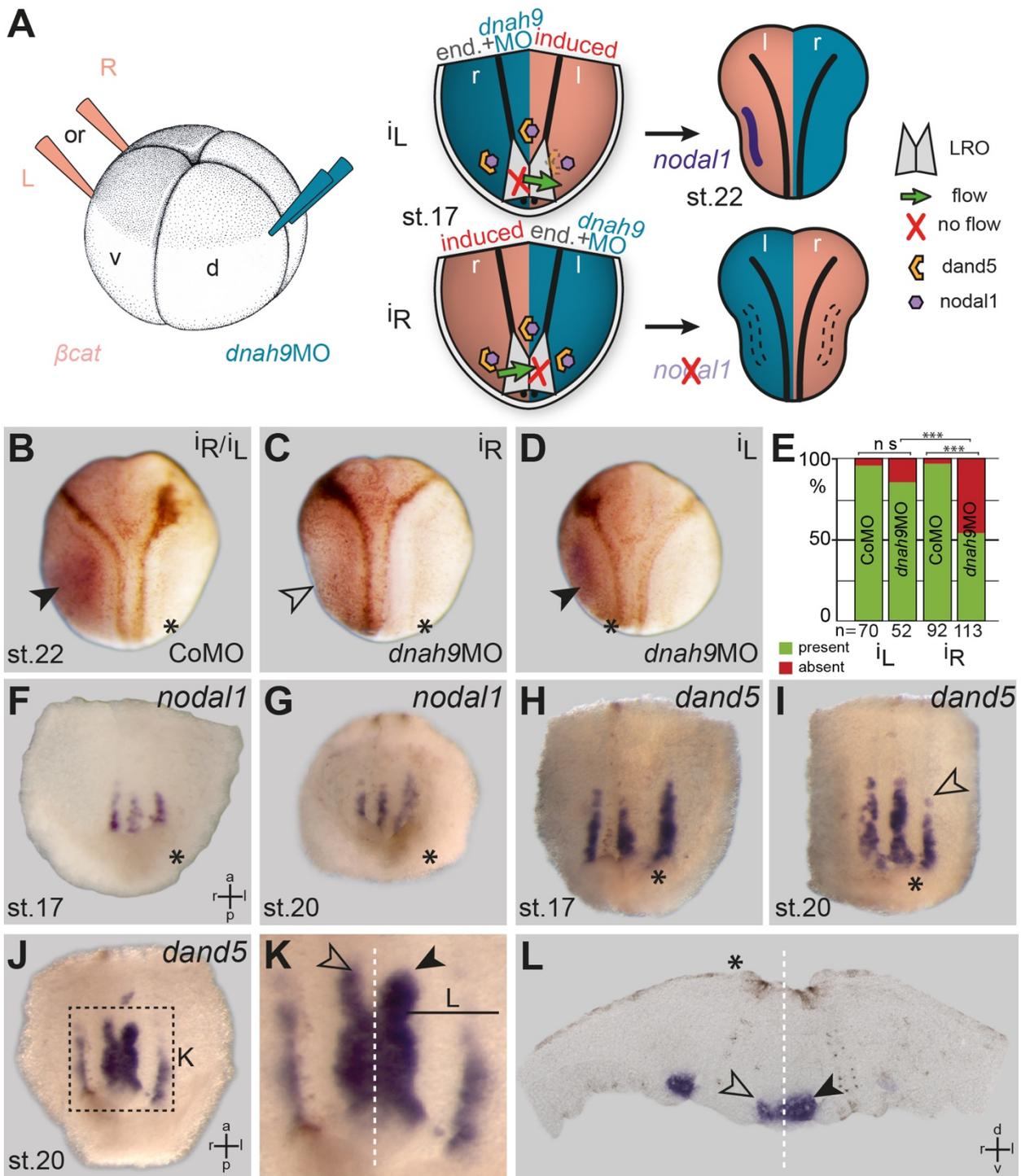


Figure 2. Leftward flow is required for *nodal1* expression in conjoined twins

(A) Injection scheme and predicted *nodal1* expression in CoMO or *dnah9MO* injected embryos following *βcat*-induced twinning on the left (iL) or right (iR) side. (B-D) Left-sided *nodal1* expression in CoMO-injected twins (B) was absent in *dnah9*-injected specimens upon twinning on the right (C) but present when the induced twin was placed on the left of the endogenous embryo (D). (E) Summary of *nodal1* expression in induced twin (green, present; red, absent; n, number of analyzed specimens). (F-L) *nodal1* (F and G) and *dand5* (H-L) expression in twinned GRPs of flow (F and H) and post-flow (G, I-L) embryos. Note that *dand5* was clearly reduced on the left side of the left embryo (open arrowhead), but only partially in the left half of the fused central domain. *, induced twin. See also Movie S3.

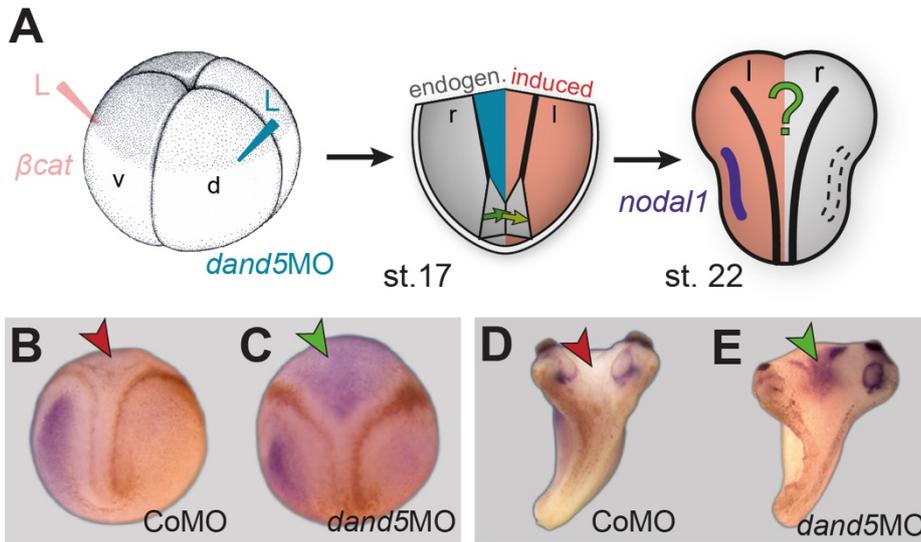


Figure 3. Knockdown of *dand5* on the right side of the fused central domain induces *nodal1* in right twins

(A) Injection scheme: CoMO or *dand5MO* were targeted to the left side of the GRP and twinning was induced on the left side, such that *dand5MO* was delivered to the right side of the fused center of the twinned GRP. (B-E) *nodal1* (B and C) and *pitx2c* expression (D and E) in CoMO- (B and D) and *dand5MO*-injected (C and E) specimens.

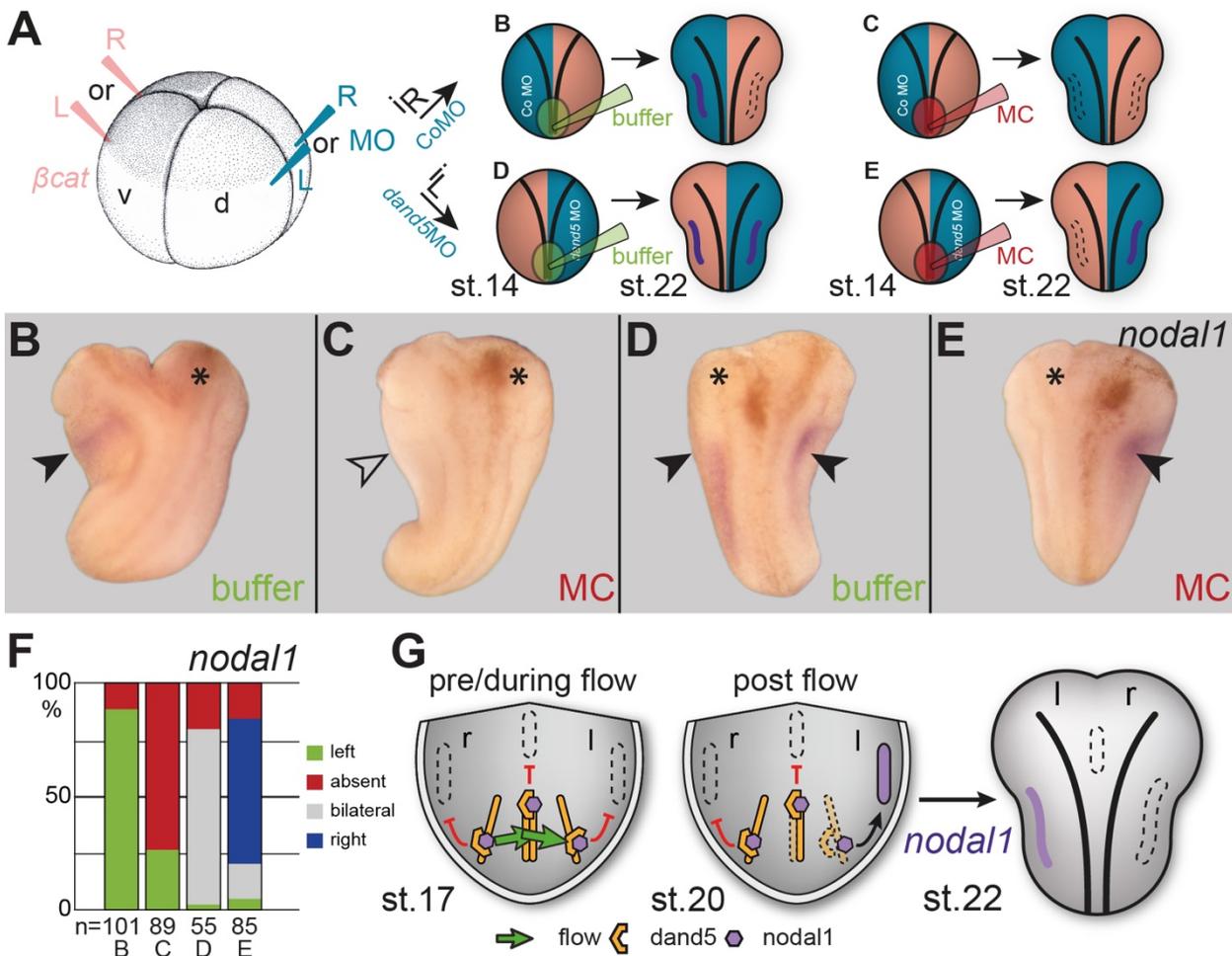
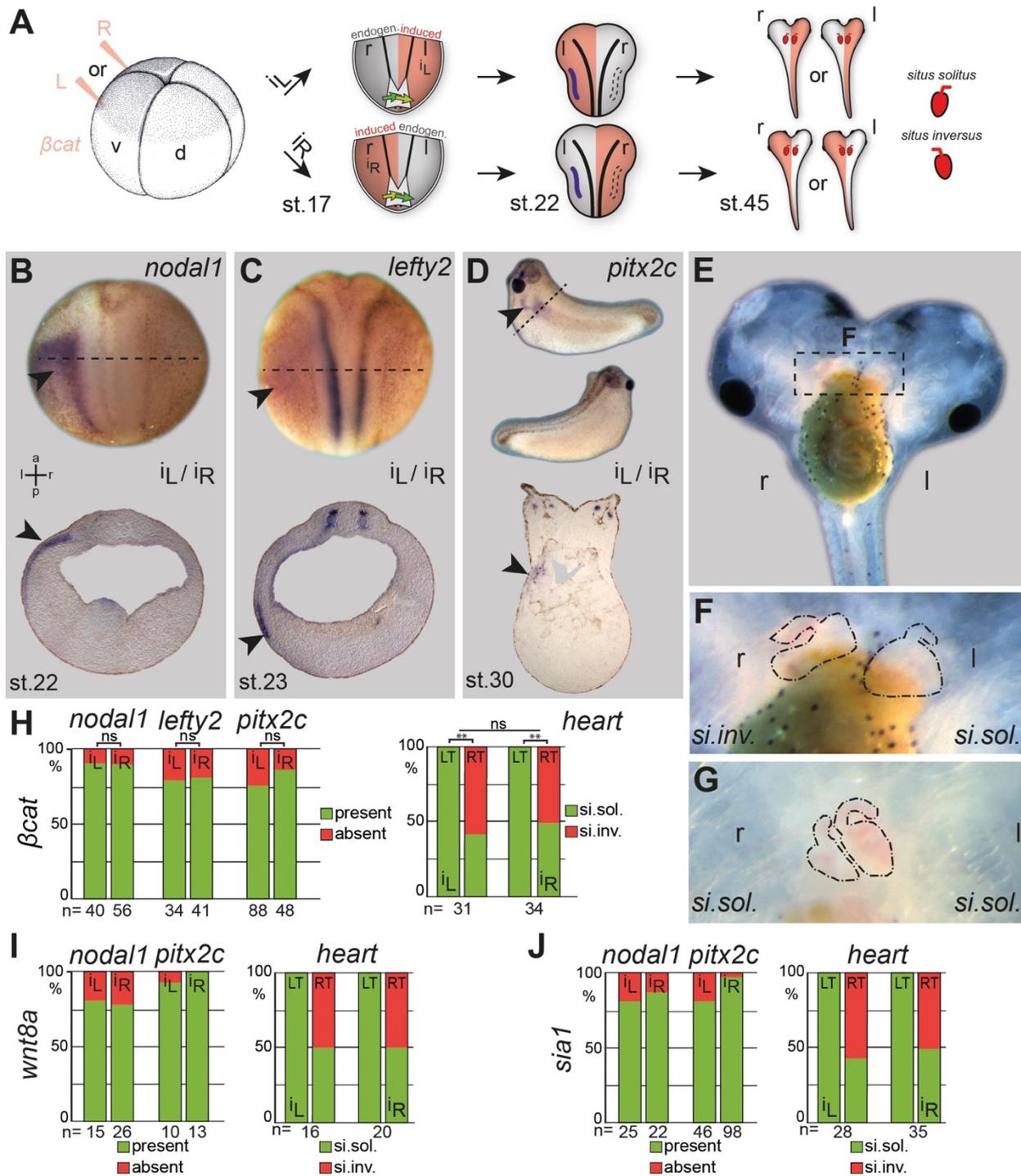


Figure 4. Flow-mediated repression of dand5 determines laterality in conjoined twins Injections scheme

(A) and anticipated *nodal1* expression patterns (B-E) in (1) CoMO (B and C) or dand5MO (D and E) injected primary embryos; with (2) twinning induced on the left (iL; D and E) or right side (iR; B and C); and (3) intact or ablated leftward flow following buffer (green; B and D) or methylcellulose (MC, red; C and E) injection into the gastrocoel before onset of flow (st. 14). (B- E) Representative specimens. (F) Summary of *nodal1* expression patterns (n, number of analyzed specimens). (G) Model of flow-mediated symmetry breakage in conjoined twins. For details see text. *, induced twin; l, left; r, right. See also Figure S3.

SUPPLEMENTAL FIGURES AND LEGENDS



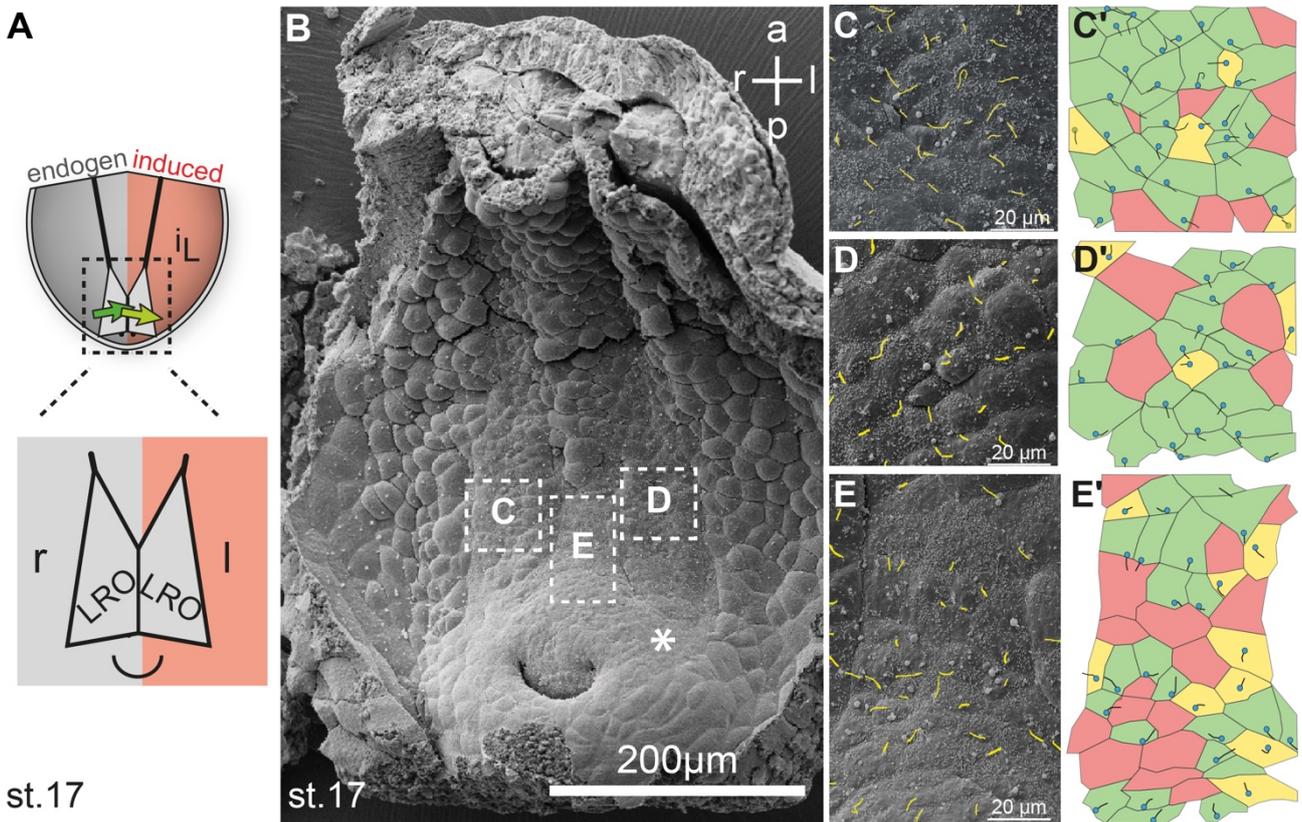


Figure S2 (Related to Figure 1) **Ciliation in a representative twinned GRP**

(A) Scheme of fused GRP in *βcat*-induced conjoined twin. (B) Scanning electron micrograph of fused GRP. a, anterior; l, left; p, posterior; r, right. (C-E) Blow-ups of central regions of endogenous (C) and induced (D) GRP as well as of fused region in center (E). Cilia highlighted in yellow. (C'-E') Evaluation of ciliation and cilia polarization. Green, cells with polarized cilia; yellow, cells with central cilia; red, cells without cilia. Blue dots, base of cilia. Note that cells with polarized cilia predominate in central regions while the fused center is characterized by cells lacking or displaying non-polarized cilia.

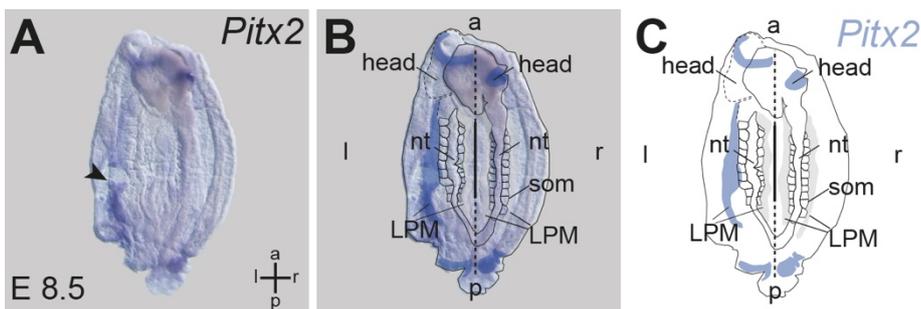


Figure S3 (Related to Figure 4) ***Pitx2* expression in a conjoined twinned mouse embryo**

This specimen of about 10-12 somites arose spontaneously in a litter isolated from a wildtype mouse. Note that *Pitx2* mRNA was only found in the left LPM of the left twin. (A) Dorsal view. (B) labeling of axial structures. (C) Line drawing of twinned specimens with labeled *Pitx2* expression (blue) and labeling of axial structures. a, anterior; l, left; LPM, lateral plate mesoderm; nt, neural tube; p, posterior; r, right; som, somite.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Manipulations of *Xenopus* embryos *Xenopus laevis* eggs were obtained and fertilized *in vitro* as described [S1]. Embryos were injected in 2% Ficoll in 1xMBSH buffer and cultured in 0.1x MBSH (pH7.4). Developing embryos were reared at 14-18°C and staged according to [S2]. Embryo culture and microinjection followed standard procedures [S1]. mRNAs were prepared using the Ambion message machine kit. For microinjections, drop size was calibrated to about 4 nl/injection. mRNAs were transcribed from a CS2⁺-expression vector and injected at 60 ng/μl (*βcat*), 20 ng/μl (*wnt8a*) and 0.4 ng/μl (*sia1*). For gene knock-down experiments, previously published MOs were used at the following concentrations: *dnah9*MO, 1 pmol/embryo [S3]; *dand5*MO, 0.5 pmol/embryo [S4]; control MO, 0.5 - 1 pmol/embryo (Gene Tools LLC). To block cilia-driven leftward flow using methylcellulose (MC), stage 14 embryos were injected into the archenteron with control buffer (1xMBSH) or 1.5% MC dissolved in buffer and cultured until the stages indicated, as described [S5]. Statistical calculations were performed using Pearson's chi-square test comparing the number of affected embryos against the number of wildtype embryos (Statpages.com).

RNA in situ hybridization and histological analysis

Embryos were fixed in 4% PFA for 2 hrs and processed following standard protocols [S6]. Digoxigenin-labelled (Roche) RNA probes were prepared from linearized plasmids using SP6 or T7 RNA polymerase (Promega). For histological analyses embryos were embedded in gelatine-albumin and sectioned (35μm) on a vibratome (Leica).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM analysis was performed following published protocols [S7]. In brief, embryos were dissected and immediately fixed in 2.5% glutaraldehyde in Soerensen's buffer (0.1 M sodium phosphate buffer; pH 7.4). Specimens were postfixed in 1% OsO₄, critical point dried, sputter coated, and examined using a Zeiss DSM 940A SEM.

Animal experimentation

Handling, care and experimental manipulations of *Xenopus laevis* frogs were approved by the Regional Government Stuttgart, Germany (A379/12 ZO Molekulare Embryologie) and performed according to German laws and regulations (§6, article 1, sentence 2, nr. 4 of the animal protection act).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- [S1] Sive, H.L., Grainger, R.M., Harland, R.M. Sive, H. (2000). Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [S2] 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: Garland Pub.).
- [S3] Vick, P., Schweickert, A., Weber, T., Eberhardt, M., Mencl, S., Shcherbakov, D., Beyer, T. and Blum, M. (2009). Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **33**, 281-91.
- [S4] Vonica, A., and Brivanlou, A.H. (2007). The left-right axis is regulated by the interplay of *Coco*, *Xnr1* and *derrière* in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **303**, 281-94.
- [S5] Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., and Blum, M. (2007). Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **17**, 60-6.
- [S6] Belo, J.A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., and De Robertis, E.M. (1997). *Cerberus-like* is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech. Dev.* **68**, 45-57.
- [S7] Sulik, K., Dehart, D.B., Iangaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K., and Schoenwolf, G.C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev. Dyn.* **201**, 260- 78.

Kapitel 4

Cilia are required for asymmetric *nodal* induction in the sea urchin embryo

Matthias Tisler¹, Franziska Wetzel^{1#}, Sabrina Mantino^{1#}, Stanislav
Kremnyov², Thomas Thumberger¹⁺, Axel Schweickert¹, Martin Blum¹,
Philipp Vick^{1*}

¹University of Hohenheim, Institute of Zoology, 70593 Stuttgart, Germany; ²Lomonosov
Moscow State University, Department of Embryology, Moscow, Russia

+Current address: Centre for Organismal Studies, Im Neuenheimer Feld 230, Heidelberg
University, 69120 Heidelberg, Germany

*correspondence: philipp.vick@uni-hohenheim.de

#These authors contributed equally to this study

Abstract

Background: Left-right (LR) organ asymmetries are a common feature of metazoan animals. In many cases, laterality is established by a conserved asymmetric Nodal signaling cascade during embryogenesis. In most vertebrates, asymmetric *nodal* induction results from a cilia-driven leftward fluid flow at the left-right organizer (LRO), a ciliated epithelium present during gastrula/neurula stages. Conservation of LRO and flow beyond the vertebrates has not been reported yet.

Results: Here we study sea urchin embryos, which use *nodal* to establish larval LR asymmetry as well. Cilia were found in the archenteron of embryos undergoing gastrulation. Expression of *foxj1* and *dnah9* suggested that archenteron cilia were motile. Cilia were polarized to the posterior pole of cells, a prerequisite of directed flow. High-speed videography revealed rotating cilia in the archenteron slightly before asymmetric *nodal* induction. Removal of cilia through brief high salt treatments resulted in aberrant patterns of *nodal* expression. Our data demonstrate that cilia - like in vertebrates - are required for asymmetric *nodal* induction in sea urchin embryos.

Conclusions: Based on these results we argue that the anterior archenteron represents a *bona fide* LRO and propose that cilia-based symmetry breakage is a synapomorphy of the deuterostomes.

Keywords: sea urchin, deuterostomes, left-right asymmetry, symmetry breakage, nodal, cilia, left-right organizer

Background

Vertebrates possess pronounced visceral asymmetries along their left-right (LR) body axis, although they belong to the large phylogenetic group of the Bilateria, which refers to their bilaterally symmetric outer appearance¹. Most organs are positioned in a characteristic way in the thoracic and abdominal cavities. In all vertebrate species examined so far, these asymmetries are under the control of the Nodal signaling cascade, which is only activated in the left lateral plate mesoderm before the first appearance of anatomical asymmetries². The secreted transforming growth factor beta (TGF β) Nodal binds to its receptor which results in the activation of its own transcription and that of its negative feedback inhibitor *lefty* (*left-right determination factor*), another secreted TGF β superfamily member. Lefty antagonizes Nodal signaling, providing its temporal and spatial control. Additionally, the paired-like homeodomain transcription factor *pitx2* is induced downstream of Nodal and mediates, through less well-known target gene activation, the setup of asymmetric organ morphogenesis.

The event activating this highly conserved developmental program is referred to as symmetry breakage. Even though variations of the common theme may exist, an ancestral mode of vertebrate symmetry breaking has emerged over the past few years: at the heart of this mechanism acts an extracellular leftward fluid flow, generated by a transient ciliated epithelium, the so-called left-right organizer (LRO)³⁻⁵. The vertebrate LRO (known as Kupffer's vesicle in fish, gastrocoel roof plate (GRP) in amphibians, and posterior notochord or ventral node in mammals) represents a field of mono-ciliated cells at the posterior end of the forming notochord, flanked by endodermal archenteron cells⁶⁻⁸. This unique tissue, which develops during early neurula stages, consists of superficially located mesendodermal cells which are transiently placed in the primitive gut or archenteron, where they function as the LRO. The cells of the LRO subsequently leave the epithelium to ingress into deeper mesodermal structures^{7,8}. The polarized attachment of cilia at the posterior cell surface, together with their clockwise rotational movement, create an asymmetric stimulus by the leftward acceleration of extracellular fluids, i.e. a leftward flow⁹. This setup has been functionally described in mammals (mouse, rabbit), amphibians (*Xenopus*) and teleost fish (medaka, zebrafish), and homologous tissues have been identified in salamanders (axolotl) and basal bony fish (white sturgeon). Interference with ciliary length, motility, polarization or flow function in general resulted in defects of the LR axis¹⁰⁻¹⁵.

As a result of leftward flow, the Nodal inhibitor *dand5* becomes down-regulated on the left margin of the LRO, where it is co-expressed on both sides with *nodal* itself. Nodal thus becomes liberated on the left side to induce the asymmetric signaling cascade in the left lateral plate mesoderm¹⁶⁻¹⁸. *dand5* repression is induced through a flow-dependent intracellular calcium signal, which is mediated through the calcium channel *pkd2* (polycystic kidney disease 2). Although ubiquitously expressed during these stages, *pkd2* inhibition causes LR defects and prevents a unilateral calcium signal in mouse and fish LROs^{5,19-22}.

Outside of the vertebrate lineage, LR asymmetries are common as well. For many deuterostome lineages, unilateral *nodal* expression has been described, which seems to be *the* common mediator of LR asymmetries in metazoan animals^{3,23-25}. Tunicates, the sister group of the vertebrates, as well as the cephalochordates, the most basal group of chordates, both express *nodal* asymmetrically on the left side^{26,27}. The latter seem to show an ancient state of this set-up, with many LRO targets activated similarly to vertebrates, such as *nodal*, *lefty*, *pitx2* and *dand5*^{26,28-31}. Accordingly, interfering with Nodal activity in the cephalochordate amphioxus also resulted in LR defects³². The existence of an LRO in amphioxus has been predicted, but not yet analyzed or functionally tested^{3,11}. Within the deuterostomes, the Ambulacraria, a chordate sister group which comprises the echinoderms, show unilateral *nodal* activation during late gastrula stages as well³³.

Although adult echinoderms took the path of reestablishing a radially pentameric body plan during evolution, their early embryo displays the typical bilaterally symmetrical embryonic development, which results in a pronounced LR asymmetry before metamorphosis³⁴. As in other deuterostomes, *nodal* is the first asymmetrically activated gene, and is first found on one side in the developing archenteron tip^{33,35}. The functional requirement and a complex downstream gene regulatory network have been elucidated in detail in sea urchin embryos³⁶. This asymmetric archenteron domain instructs a second symmetrical ectodermal *nodal* domain to switch towards this side as well³⁷. This expression is thought to be on the *right*, as deduced from a ventral mouth opening²⁵. We have previously argued that this difference can be resolved to a common evolutionary origin, if the ventral side of echinoderms is homologized with the dorsal side of chordates¹¹. This reasoning is based on the expression of dorsal organizer genes in the oral ectoderm of the sea urchin larva, suggesting that the mouth - counterintuitively - opens on the dorsal side. Such an evolutionary mouth repositioning can be easily envisaged as a transitional process from echinoderm ancestors to vertebrates³⁸. Indeed, oral organizer identity has been recently shown to be functionally conserved in the sea urchin *P. lividus*³⁹. Thus, in this scenario, *left*-asymmetric *nodal* expression is a synapomorphy of the deuterostomes¹¹.

One major question, however, has remained unanswered: how does symmetry breakage upstream of asymmetric *nodal* induction occur in echinoderms? Do sea urchin embryos possess a LRO or an evolutionary functional precursor that induces asymmetric *nodal* expression? Do archenteron cells possess cilia and, if so, are these required to induce asymmetric *nodal* expression? Using descriptive and functional approaches we show that (1) archenteron cells in the sea urchin larva harbor monocilia; (2) archenteron cilia are polarized and motile; and (3) cilia are required for asymmetric *nodal* induction.

Results

Sea urchin archenteron cells harbor polarized monocilia

The defining feature of vertebrate LROs are polarized monocilia. As an entry point into studying sea urchin symmetry breakage, we investigated the presence of cilia on staged gastrula embryos by performing immunofluorescence (IF) with a well-characterized anti-acetylated α -tubulin antibody. In addition to the previously described long ectodermal cilia, optical sections of gastrula stage *Paracentrotus lividus* embryos revealed a population of shorter cilia within the developing archenteron (Fig. 1a-b"). Higher magnification showed that most cilia ranged from 4-6 μm in length, with the most anterior ones being longer, measuring up to 10 μm (Fig. 1c). The same basic characteristics of mesendodermal archenteron cilia were also found in a second sea urchin

species, *Strongylocentrotus pallidus*, demonstrating the conserved presence of cilia in the primitive gut of sea urchin larvae. One slight variation was observed, namely that very early gastrula embryos of *Strongylocentrotus* apparently lacked archenteron cilia (Fig. 1d), which were, however, present at mid to late gastrula stages (Fig. 1e). In *P. lividus*, cilia were present already at earlier gastrula stages (Fig. 1b, and data not shown).

Scanning electron microscopy (SEM) of *P. lividus* was employed to further characterize archenteron cilia and to test a potential polarization of cilia along the animal-vegetal, and thus along the AP axis of the embryo (Fig. 1f-h). Embryos, which were broken perpendicularly to the animal-vegetal axis and thus allowed a high-power magnification view inside the archenteron, revealed monocilia of about 4 μm in length (Fig. 1f, g). Archenteron cilia were clearly present already in mid gastrula stage embryos (Fig. 1f). Importantly, using the cilium-insertion point and the cell center as reference points, a clear posterior polarization of cilia was obvious already when cells were orienting towards the inside of the archenteron in animal/anterior direction (Fig. 1h). In summary, our descriptive analysis of the archenteron showed that cells harbored monocilia at a time point just prior to the asymmetric induction of *nodal*, suggesting a functional role homologous to that of vertebrate LROs.

The sea urchin gastrula embryo expresses marker genes for motile cilia

Next we analyzed the expression of marker genes indicative of motile cilia. To that end, sea urchin homologs of two marker genes for motile cilia, *dynein axonemal heavy chain 9 (dnah9)* and *forkhead box protein J1 (foxj1)* were cloned by RT-PCR and expression patterns during embryonic development were assessed by whole-mount in situ hybridization. In the ectoderm, *dnah9* was broadly expressed with intense signals in the apical tuft region. Localized mRNA expression was also found in the vegetal part of the gastrula mesendodermal tissue, followed by expression in the archenteron (Fig. 2a, b). Sense control probes were negative at all stages examined and for all genes analyzed in this study (Fig. 2c and data not shown). Analyses of *foxj1* mRNA expression revealed a similar pattern in the ectoderm and strong staining in the area of the developing apical tuft (Fig. 2e-g). At early gastrula stages, localized expression was found in the vegetal plate region (Fig. 2e), while in late gastrula stages, a mesodermal expression domain started to appear at the anterior tip of the archenteron (Fig. 2g). These expression patterns were indicative of a population of motile mesendodermal cilia in the archenteron and reminiscent of vertebrate LROs.

To investigate additional potentially conserved LRO genes, we cloned *P. lividus Bicaudal C homolog 1 (bicc1)*⁴⁰, which is required for cilia polarization at the vertebrate LRO, and *pkd2*, a calcium channel required for sensing of the flow²². Expression of *bicc1* has been recently

described in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*, i.e. an unrelated genus. Our analysis in *P. lividus* confirmed the reported localization, i.e. strong expression of *bicc1* mRNA at the vegetal pole of early to late gastrula stage embryos, directly at the site of invagination (Supplementary Fig. 1 and ⁴¹). *P. lividus* *pkd2* mRNA (also termed *suPC2*) was expressed in a pattern reminiscent of *bicc1* in early to late gastrula stages, namely in vegetal cells of the early gastrula embryo (Fig. 2i-l). *pkd2* mRNA transcription was further activated in the apical tuft cells and at the archenteron tip of late gastrula to early prism stage embryos (Fig. 2i-k).

Cilia in the archenteron are motile

In order to directly assess the potential motility of archenteron cilia in live embryos, we analyzed early to mid-gastrula stage embryos by high-speed videography. To highlight moving objects, movies were processed using a temporal difference imaging method (cf. Material and Methods). Supplementary Movie 1 demonstrates that the posteriorly polarized cilia of invaginating archenteron cells (cf. Fig. 1g) were indeed highly motile. Next we analyzed mid to late gastrula stage embryos, focusing on the lumen of the central part of the elongated archenteron. Again, the monocilia detected by SEM analysis (Fig. 1h) were motile, displaying a rotating pattern (Supplementary Movie 2). Attempts to visualize a possible effect of cilia motility, i.e. whether or not this resulted in directed movement of extracellular fluids, failed due to technical reasons, as we were not able to introduce fluorescent micro beads into the archenteron (not shown). Despite this shortcoming, our results strongly suggest that the sea urchin embryo harbors a vertebrate-type LRO, i.e. an archenteron epithelium with posteriorly polarized rotating monocilia, which expresses a set of characteristic marker genes, including *foxj1*, *dnah9*, *bicc1* and *pkd2*.

Archenteron cilia are required for asymmetric *nodal* induction

As an alternative to visualizing cilia-driven fluid flow, we chose to directly test the function of cilia in asymmetric *nodal* induction. In a first set of experiments we used the pharmacological inhibitor Ciliobrevin D, which inhibits the ATPase activity of axonemal and cytoplasmic dynein motor proteins⁴². Treatment of early gastrula stage embryos with 50µM Ciliobrevin D efficiently inhibited ciliary motility, as judged by direct microscopic observation of embryonic swimming behavior, which completely ceased within minutes (data not shown). As this treatment efficiently prevented gastrulation movements as well, we were not able to analyze later *nodal* expression (data not shown).

Short of a specific inhibitor of axonemal dynein function, we decided to assess the role of cilia for symmetry breakage by removing cilia from the embryo. To that end, a brief osmotic shock with high-salt (HS) seawater containing twice the normal molarity of NaCl (sodium chloride) was applied, a procedure previously reported to completely deciliate the ectodermal surface of the embryo⁴³. Embryos between early gastrula and prism stage were treated with HS seawater for 60-90 seconds and returned to regular seawater until untreated control embryos reached late gastrula to pluteus stages. Embryos were fixed, assessed for developmental defects and/or processed for IF, SEM or *in situ* hybridization. First we analyzed whether this procedure was suited to remove archenteron cilia. Swimming behavior was instantly impaired, as described for Ciliobrevin above (not shown). Embryos were fixed 20 min after treatment and subjected to IF analysis of cilia or SEM analysis. While normal ciliation was seen in SEM photographs of untreated embryos, HS-treated specimens were devoid of cilia, both on the outer surface and at the proximal (posterior) end of the archenteron cavity (Fig. 3a, b). To investigate whether cilia were removed along the entire archenteron, we analyzed optical sections of treated embryos using IF. Control embryos displayed normal ciliation along the extended archenteron. In contrast, about half of the HS-treated embryos lacked cilia altogether, with the remainder of specimens displaying a small number of very short cilia remnants (Fig. 3c, d; Supplementary Fig. 1i). These experiments demonstrated that HS treatment was an efficient tool to remove archenteron cilia from the embryo.

Because of the proven function of cilia in signal transduction in different species^{44,45}, we asked whether deciliation affected normal embryonic development. The protocol applied here has been previously used to remove ectodermal cilia at different stages of development, without any reports of developmental defects⁴⁶⁻⁴⁹. Stephens et al. (1977) even applied multiple rounds of deciliation (up to ten times) which resulted in phenotypically normal pluteus larvae⁵⁰. In order to confirm that the HS-protocol did not interfere with normal embryogenesis in our experiments as well, >1.500 embryos were deciliated in 11 independent experiments at different time points during development, between late blastula and late gastrula stages. Treated specimens were fixed and assessed for developmental delays or phenotypic alterations at time points when untreated control embryos had reached a) late gastrula with fully elongated archenteron; or b) early pluteus stages. In both sets of experiments, no phenotypical difference was noted between control and HS-treated samples (Supplementary Fig. 1e-h). Quantitative evaluation of experiments revealed no temporal delay in either of these groups, besides minor and random fluctuations that were sometimes observed (Supplementary Fig. 1j). Together with the previously published deciliation approaches, these control experiments demonstrate that the protocol applied here efficiently removed archenteron cilia without impairment of normal development.

In a final series of experiments, we tested whether deciliation impacted on *nodal* asymmetry in the archenteron and ectoderm, which we hypothesized based on our descriptive analysis of archenteron cilia. HS treated embryos indeed revealed grossly altered patterns of *nodal* expression at late gastrula stages, when control embryos displayed unilateral patterns in both, the archenteron and the ectoderm (Fig. 3e, f). Surprisingly, HS treatment at early to mid-gastrula stages, i.e. just before asymmetric induction of the *nodal* cascade, resulted in an expanded, bilateral ectodermal expression of *nodal* in the vast majority of treated specimens. The same result was obtained with *pitx2* (Fig. 3g, h), a direct target of Nodal⁵¹. Bilateral activation of the Nodal cascade was especially evident when analyzed in the developing coelomic pouches of early pluteus stage embryos, using *pitx2* as a late LR marker gene (Fig. 3j, k). The archenteron domain of *nodal* in late gastrula stage embryos, however, was mostly undetectable (Fig. 3e, f).

Next we tested whether high-salt treatments resulted in a stress-induced activation of MAPK/p38-mediated ectopic activation of *nodal*⁵². If it were, inhibition of MAPK/p38 should rescue the deciliation-induced aberrant activation of the Nodal cascade. Blastula-stage embryos were treated with the MAPK/p38 pathway-specific inhibitor SB203580⁵², to test the efficiency of the drug, which resulted in dorso-ventral axis defects (Supplementary Fig. 1k-n). When embryos were treated after deciliation at mid to late gastrula stages, development was not impaired but specimens still exhibited bilateral *pitx2* expression in the coelomic pouches at early pluteus stage (Fig. 3l-o). These experiments thus demonstrated that the expanded expression pattern of LR marker genes after deciliation was not due to MAPK/p38-mediated over-activation of Nodal signaling during gastrulation.

In order to determine whether there was a sensitive time period, i.e. whether cilia were required only during certain developmental stages, we performed a time course of deciliation and treated specimens with high salt at defined points of development: early gastrula, mid gastrula, late gastrula or prism stage. Based on cilia-driven symmetry breakage in the vertebrates, the time window was expected to be rather narrow. Figure 3i demonstrates that deciliation at very early to mid-gastrula stages, before full extension of the archenteron and before asymmetric *nodal* expression, caused aberrant LR development. Embryos treated after this point, during late gastrula to early prism stages, showed normal unilateral expression of *nodal*, i.e. the sensitive time window closes during late gastrulation.

In summary, our work demonstrates that the sea urchin archenteron harbors polarized and motile monocilia, which are required for LR axis determination during gastrulation.

Discussion

Theoretical considerations and deductive logics have previously led us to propose that sea urchin embryos possess an ancestral LRO, homologous to that of the vertebrates¹¹. Here we demonstrate in two species that sea urchin gastrula embryos indeed display a mesendodermal monociliated archenteron, which is reminiscent of the vertebrate LRO (Fig 4a). Importantly, cilia were required for asymmetric *nodal* induction, arguing for a conserved cilia-based mechanism for LR symmetry breakage in the deuterostome lineage.

Common features between the sea urchin archenteron and vertebrate LROs include polarized and motile monocilia as well as expression of *dnah9* and *foxj1*, two genes which are mandatory for generation of leftward flow. Although we were not able to visualize a fluid flow within the archenteron directly, we propose that cilia-dependent symmetry breakage is a conserved feature between sea urchin and the vertebrates. In order to qualify as the *nodal* inducing event, cilia-driven symmetry breakage should occur at the right time, before asymmetric *nodal* induction, and in the right place, i.e. at the archenteron. Besides the presence of motile cilia itself, the expression of vertebrate LRO components *dnah9*, *foxj1*, and *pkd2* in this very region are in perfect agreement with this proposal (Fig. 2).

Not every LRO feature seems to be conserved between sea urchins and the vertebrates, though. While flow-perceiving (and *nodal* expressing) cells in vertebrates are located at the posterior pole of the embryo, close to the blastopore or proximal end of the gut, these cells reside at the anterior tip of the archenteron in the sea urchin late gastrula embryo, at its distal end, as deduced from the *nodal* expression domain (Fig. 3e and^{37,53}). Interestingly, an intermediate scenario is encountered in amphioxus. Here, like in amphibians, a bilateral *nodal* expression domain was found, but in the anterior part of the archenteron like in sea urchins. The expression on the right side of amphioxus later disappears, possibly due to a leftward cilia-driven flow^{3,26} (Fig 4b). This reasoning is further supported by the recent description of a *dand5* homolog, which was found co-expressed with *nodal* but down-regulated on the left side, resembling the situation at the vertebrate LRO²⁸. Interestingly, a *dand5* orthologue was not reported for *P. lividus*, nor was it found in *S. purpuratus*⁵³. Considering just two features, localization of the supposed LRO and presence or absence of *dand5*, sea urchins, cephalochordates and vertebrates could represent three distinct states, indicative of evolutionary transitions: while sea urchins and amphioxus share an anterior (distal) position of the LRO within the archenteron, amphioxus and vertebrates both possess an orthologue of the Nodal antagonist *dand5*, but only the vertebrates localize their LRO close to the blastopore. What kind of functional adaptations underlie these variations remains to be investigated.

There are additional LR components worth being considered in the evolutionary context, namely *pkd2* and *bicc1*, both of which were expressed in early sea urchin gastrula mesendodermal tissues during invagination (Fig. 2i-k, Supplementary Fig. 1 and⁴¹). *bicc1* in mouse and frog functions to polarize LR cilia⁴⁰. In that sense the expression in sea urchins correlated with that in frog and mouse: it is precisely the *bicc1* expressing cells which harbor cilia polarized to the posterior pole in mid gastrula stage embryos in the sea urchin, and which we here report to be motile (cf. Fig. 1h and Supplementary Fig. 1 and Movie 1). Expression differed in another aspect, however, as *bicc1* mRNA was not colocalized with *nodal* expression at the archenteron tip, different from the vertebrates, where *bicc1* is co-expressed with *nodal* in the LRO-flanking cells - and might be involved in sensing of flow⁴⁰. It would be interesting to know where *bicc1* is expressed in amphioxus, around the blastopore or in the anterior mesoderm.

pkd2 in the sea urchin embryo was expressed in the vegetal mesoderm and endoderm at early to mid-gastrula stages and at the tip of the archenteron. This expression is remarkable, as *pkd2* has not been reported to be transcriptionally up-regulated in or at any vertebrate LRO. The encoded protein, the calcium channel Polycystin-2, however, is present in mouse and fish LROs, where it is involved in flow sensing^{19,20,22}. Functional conservation of symmetry breakage is further supported by the expression of *pkd2* in *Xenopus* gastrula embryos, where it is highly expressed in the mesendodermal ring around the blastopore, reminiscent of the vegetal mesoderm expression in sea urchins (our unpublished observations). Again, expression in amphioxus has not been reported as yet but should be highly informative. Taken together, the presence of cilia and the expression of conserved LR genes strongly argue for a conserved role of motile archenteron cilia in LR symmetry breakage.

The most convincing result, however, is presented by our analysis of cilia function, where deciliation at a time point just prior to asymmetric induction of *nodal* in the archenteron resulted in altered expression of the Nodal cascade. Molecular asymmetries were lost, with a differential response of *nodal* and *pitx2*. While archenteron *nodal* was mostly absent or below the detection level of the experiment, the ectodermal domain and later on *pitx2* in the coelomic pouches became expanded and bilateral (Fig. 3). These observations cannot be attributed to the absence of archenteron Nodal. When Nodal was experimentally manipulated in the archenteron to be absent or expressed in a bilateral manner, the ectodermal domain remained asymmetrical, although in a randomized manner, being activated either on the left or on the right side^{33,37}. The ectoderm is still competent to express *nodal* on both sides during gastrulation, as shown by Activin treatment of early gastrula embryos³³. The maintenance of unilateral ectodermal *nodal* expression might thus be explained by an additional ectodermal cilia function, which was ablated in high salt-treated embryos as well, but we can only speculate on this issue. Our results would be explained if external cilia had a function in restricting Nodal cascade activation unilaterally in

the ectoderm, and the archenteron cilia provided a biasing cue, as they do during vertebrate LR axis determination².

While this manuscript was under review, two papers were published that dealt with symmetry breaking in sea urchin embryos. In agreement with our conclusions, Takemoto et al. deduced that cilia were required for symmetry breakage in sea urchins. Application of an inhibitor of motile cilia to early blastula stage embryos resulted in a loss of *nodal* asymmetry, archenteron cilia, however, were not analyzed in this study⁵⁴. Warner et al. (2016) injected 1-cell stage embryos with a kinesin-2 antibody, which removed all cilia from the time point of injection onwards. *Nodal* was strongly reduced in the four embryos analyzed, while asymmetric *SoxE* expression in the coelomic pouches was retained in the six embryos included in this one experiment. The authors concluded that cilia were not required for symmetry breakage but rather for hedgehog signaling-mediated *nodal* maintenance⁵⁵. We strongly disagree with this conclusion for the following reasons: (1) Lepage and colleagues have shown that asymmetric *SoxE* expression occurs independent of archenteron *Nodal*; (2) the removal of all cilia from the earliest developmental stages onwards potentially impacts on many more signaling pathways, such as for example hedgehog, as shown by Warner et al (2016)⁵⁵, and thus most probably impact on stages before archenteron cilia emerge; (3) attenuated *nodal* expression by permanent cilia ablation, as described by Warner et al., might be the result of a) loss of archenteron cilia function, which causes bilateral expanded *nodal* expression as shown in our present work, followed in time by b) loss of hedgehog-mediated *nodal* maintenance, as described by Warner et al. (2016).

We like to extend our evolutionary considerations to the precursor tissue of the LRO in the sea urchin. Keller and colleagues previously revitalized the concept of the superficial mesoderm (SM) in the chordate lineage. Best characterized in amphibians, the SM of the pre-gastrula embryo gives rise to the archenteron LRO during gastrula/neurula stages to end up in the axial and paraxial mesoderm during later embryogenesis⁸. Besides the birds, which lack an LRO, the SM has been identified in most chordate lineages^{8,11,56} (Fig 4a-d). In the sea urchin mesenchyme blastula, the non-skeletogenic mesoderm, together with the endoderm, locates superficially at the vegetal pole as well, reminiscent of the situation in amphibians^{8,57}. Of the known SM marker genes in the frog, *foxj1*⁵⁸⁻⁶⁰, *nodal3*⁵⁸ and *wnt11b*⁶¹, only *foxj1* has been analyzed in sea urchins (Fig. 2e-g). Its mRNA localization in the early gastrula vegetal cells indeed argues for a conserved blastula stage SM (Fig. 2h). Furthermore, like in vertebrate SM tissues, these cells show accumulation of nuclear β -catenin at the very time point when the SM is specified⁶². This is of relevance, as *foxj1* expression has been shown to be directly induced by canonical Wnt signaling.

Conclusions:

We conclude that the early sea urchin embryo represents an ancestral deuterostome state with a vegetal SM at blastula stages, which transforms into an archenteron LRO, where motile cilia are necessary to break the bilateral symmetry. Cilia-driven symmetry breakage thus should represent a synapomorphy of the deuterostome lineage.

Methods**Animals and embryo manipulation**

Adult *P. lividus* were collected in Pula/Croatia in early summer during the natural breeding season and reared short-term in the laboratory. Adult *S. pallidus* were collected at the MSU White Sea Biological Station, Kandalaksha Bay/Russia during the summer. Embryos were obtained by artificial fertilization after injecting adult specimen with 1 ml of 0.5 molar KCl into the oral field to obtain sperm and oocytes and raised in artificial sea water (ASW) containing antibiotics at 18-20°C or 4°C for *P. lividus* and *S. pallidus*, respectively.

High-salt and Ciliobrevin D treatment

Early or mid-gastrula stage embryos were transferred to 3% ASW, which contained high concentrations of NaCl (1M) but regular seawater molarities of all other ions, and kept for 60-90 sec before washing and transferring to regular ASW. Efficiency of deciliation was controlled in the microscope by absence of embryonic swimming behavior. Subsequently, embryos were incubated until the desired stages for treatment or analysis were reached. For dynein motor inhibition, embryos were transferred to ASW containing 50µM Ciliobrevin D at early gastrula stage and incubated until control untreated specimens reached late gastrula stage. For SB203580 treatment (ENZO Life Sciences), embryos were transferred in sterile sea water containing either 20µM or 5µM of SB203580 or DMSO as a control in the same dilution and grown until pluteus stage.

RT-PCR

Total RNA was isolated from embryos at various stages of development using peqGOLD Trifast (VWR International GmbH, Erlangen/Germany) and cDNAs were prepared using standard protocols. Primers used for PCR amplification of fragments were designed using ESTs:

plbicc1_fwd: 5'gcctgaggtttggttagtgc3', plbicc1_rev: 5'cgatctgtctgcaatagaaacc3', plfoxj1_fwd: 5'gtcaacacattccaaccatctc3', plfoxj1_rev: 5'ctctctttggcatggtctg3', pldnh9_fwd: 5'tgccaactttcaatcatatttca3', pldnh9_rev: 5'atgaacactctacatcagagatc3', plpkd2_fwd: 5'atccctctggagaacgagac3', plpkd2_rev: 5'gcaaacatgacagtgaatcctc3', plnodal_fwd: 5'ttctctgctccattcctcc3', plnodal_rev: 5'gaactaagacggctcctcc3'

Cloning of Constructs

Partial coding sequences of *plbicc1*, *plfoxj1*, *pldnh9*, *plpkd2* and *plnodal* were cloned in the pGEM-T Easy vector system and verified by sequencing.

RNA *in Situ* Hybridization

Embryos were fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% PFA for 30 min, stored in 100% Ethanol at -20°C and processed following standard protocols. Digoxigenin-labeled RNA (Roche) probes were prepared with SP6 or T7 RNA polymerase on linearized pGEM-T Easy templates (Promega). *In situ* hybridization was modified from⁶³. Initial rehydration steps were performed with 1%BSA in PBS to avoid agglutination of embryos. All steps were performed either in glass wells or custom made plastic tubes with meshwork.

Immunofluorescence

Embryos were fixed in 4% PFA in ASW for 30 min, washed with PBS, permeabilized with PBS/0.1% Triton X-100 (Sigma), blocked with CAS-Block™ Histochemical Reagent (Life technologies) and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Secondary antibodies were incubated for 2 hours at room temperature. Primary antibodies used in this study were: anti-acetylated α -tubulin (Sigma, T6793); anti- α -tubulin (Sigma, T6199). Reagents used for visualization of nuclei included DAPI, Hoechst and propidium iodide. To visualize cell membranes, Phalloidin-Tetramethylrhodamin B isothiocyanate (Sigma, P1951) or Alexa 488 Phalloidin (Life technologies, A12379) were used.

Scanning electron microscopy

Wild-type or HS-treated embryos were fixed in 4% PFA containing 0.2% Glutaraldehyde in PBS. Preparation of embryos for SEM followed standard protocols. Prior to sputter-coating with gold, some embryos were manually broken using a pipette tip, in order to visualize the archenteron surface.

High-speed videography of cilia motility in gastrula stage embryos

To observe ciliary motility directly, gastrula stage embryos were either transferred into a solution containing 0.5-1.0% methylcellulose (Sigma) in ASW in order to slow down beating of the cilia in the forming archenteron cavity (for early to mid-gastrula stages), or positioned within a nitex screen (SEFAR, Germany) to focus on the central archenteron cavity (mid-late gastrula stages). Imaging was performed using a Hamamatsu ORCA-Flash 4.0 Digital CMOS camera mounted on a Zeiss Imager.M1 microscope equipped with a Plan-Apochromat 100x/1.4 oil objective. Acquisition of frames was performed using the Zeiss ZEN software. Fiji⁶⁴ was used for temporal difference imaging, i.e. for visualization of movements against a 'static' background. Each frame of a time-series was subtracted from its consecutive frame ($t_n - t_{n+1}$), resulting in different pixel grey values with black indicating no change in between two frames.

Photo-documentation and picture analysis

IF pictures were taken on a Zeiss Observer. Z1/LSM 700 equipped with a 63x objective (C-Apochromat 63x/1.2 W Corr). Photographs of embryos after *in situ* hybridization were taken on an Axioskop 2 mot plus (Zeiss, Germany) and processed in Adobe Photoshop. Figures were assembled using Adobe Illustrator.

Declarations:

Acknowledgements

We thank Cathrin Hagenlocher for SEM assistance and Nikoloz Tsikolia for advice. Work in the Blum lab was supported by DFG grants BL285/9-2 and BL285/10-1. M. Tisler was funded by the Federal Ministry of Education and Research (01PL11003), Humboldt reloaded at the University of Hohenheim, Germany. S. Kremnyov was funded by a RFBR fund, grant 14-04-32085 mol_a.

Authors' contributions

PV, MB, TT, MT and SK designed experiments. MT, FW, SM, SK, TT and PV performed experiments. PV, MB, AS, TT and SK interpreted the results. PV and MB wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

References

1. Dunn, C. W., Giribet, G. & Edgecombe, G. D. Animal Phylogeny and Its Evolutionary Implications. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 45, 371-395 (2014).
2. Yoshiba, S. & Hamada, H. Roles of cilia, fluid flow, and Ca²⁺ signaling in breaking of left-right symmetry. *Trends. Genet.* 30, 10–17 (2014).
3. Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T. & Schweickert, A. The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* 141, 1603–1613 (2014).
4. Hamada, H. Breakthroughs and future challenges in left-right patterning. *Development Growth Diff.* 50, S71–S78 (2008).
5. Hirokawa, N., Tanaka, Y. & Okada, Y. Cilia, KIF3 molecular motor and nodal flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 31–39 (2012).
6. Blum, M. et al. Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* 75, 133–146 (2007).
7. Sulik, K. et al. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev. Dyn.* 201, 260–278 (1994).
8. Shook, D. R., Majer, C. & Keller, R. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Dev. Biol.* 270, 163–185 (2004).
9. Nonaka, S. et al. De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol* 3, e268 (2005).
10. Schweickert, A. et al. Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 17, 60–66 (2007).
11. Blum, M., Weber, T., Beyer, T. & Vick, P. Evolution of leftward flow. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 464–471 (2009).
12. Kramer-Zucker, A. G. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 132, 1907–1921 (2005).
13. Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Izpisua-Belmonte, J. C. & Hirokawa, N. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633–644 (2005).
14. Nonaka, S. et al. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829–837 (1998).
15. Essner, J. J. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247–1260 (2005).
16. Schweickert, A. et al. The Nodal Inhibitor *Coco* Is a Critical Target of Leftward Flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 1–6 (2010).
17. Hojo, M. et al. Right-elevated expression of *charon* is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle. *Development Growth Diff.* 49, 395–405 (2007).

18. Marques, S. et al. The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes Dev.* 18, 2342–2347 (2004).
19. Yuan, S., Zhao, L., Brueckner, M. & Sun, Z. Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry. *Curr. Biol.* 25, 556–567 (2015).
20. Pennekamp, P. et al. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr. Biol.* 12, 938–943 (2002).
21. Schottenfeld, J., Sullivan-Brown, J. & Burdine, R. D. Zebrafish curly up encodes a Pkd2 ortholog that restricts left-side-specific expression of southpaw. *Development* 134, 1605–1615 (2007).
22. Yoshida, S. et al. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* 338, 226–231 (2012).
23. Namigai, E. K. O., Kenny, N. J. & Shimeld, S. M. Right across the tree of life: the evolution of left-right asymmetry in the Bilateria. *Genesis* 52, 458–470 (2014).
24. Chea, H. K., Wright, C. V. & Swalla, B. J. Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. *Dev. Dyn.* 234, 269–278 (2005).
25. Duboc, V. & Lepage, T. A conserved role for the nodal signaling pathway in the establishment of dorso-ventral and left–right axes in deuterostomes. *J. Exp. Zool.* 310B, 41–53 (2007).
26. Yu, J.-K., Holland, L. Z. & Holland, N. D. An amphioxus nodal gene (AmphiNodal) with early symmetrical expression in the organizer and mesoderm and later asymmetrical expression associated with left-right axis formation. *Evol. Dev.* 4, 418–425 (2002).
27. Morokuma, J., Ueno, M., Kawanishi, H., Saiga, H. & Nishida, H. HrNodal, the ascidian nodal-related gene, is expressed in the left side of the epidermis, and lies upstream of HrPitx. *Dev. Genes Evol.* 212, 439–446 (2002).
28. Le Petillon, Y., Oulion, S., Escande, M.-L., Escriva, H. & Bertrand, S. Identification and expression analysis of BMP signaling inhibitors genes of the DAN family in amphioxus. *Gene Expr. Patterns* 13, 377–383 (2013).
29. Boorman, C. J. & Shimeld, S. M. Pitx homeobox genes in Ciona and amphioxus show left-right asymmetry is a conserved chordate character and define the ascidian adenohypophysis. *Evol. Dev.* 4, 354–365 (2002).
30. Onai, T., Yu, J.-K., Blitz, I. L., Cho, K. W. Y. & Holland, L. Z. Opposing Nodal/Vg1 and BMP signals mediate axial patterning in embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev. Biol.* 344, 377–389 (2010).
31. Yasui, K., Zhang, S., Uemura, M. & Saiga, H. Left-right asymmetric expression of BbPtx, a Ptx-related gene, in a lancelet species and the developmental left-sidedness in deuterostomes. *Development* 127, 187–195 (2000).
32. Soukup, V. et al. The Nodal signaling pathway controls left-right asymmetric development in amphioxus. *EvoDevo* 6, 1–22 (2015).
33. Duboc, V., Röttinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L. & Lepage, T. Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Dev. Cell* 9, 147–158 (2005).
34. McClay, D. R. Evolutionary crossroads in *Dev. Biol.*: sea urchins. *Development* 138, 2639–2648 (2011).

35. Molina, M. D., de Croz e, N., Haillet, E. & Lepage, T. Nodal: master and commander of the dorsal–ventral and left–right axes in the sea urchin embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 445–53 (2013).
36. Su, Y.-H. Telling left from right: Left-right asymmetric controls in sea urchins. *Genesis* 52, 269–278 (2014).
37. Bessodes, N. et al. Reciprocal signaling between the ectoderm and a mesendodermal left-right organizer directs left-right determination in the sea urchin embryo. *PLoS Genet.* 8, e1003121 (2012).
38. Christiaen, L. et al. Evolutionary modification of mouth position in deuterostomes. *Sem. Cell Dev. Biol.* 18, 502–511 (2007).
39. Lapraz, F., Haillet, E. & Lepage, T. A deuterostome origin of the Spemann organiser suggested by Nodal and ADMPs functions in Echinoderms. *Nat. Commun.* 6, 8434 (2015).
40. Maisonneuve, C. et al. Bicaudal C, a novel regulator of Dvl signaling abutting RNA-processing bodies, controls cilia orientation and leftward flow. *Development* 136, 3019–3030 (2009).
41. Yaguchi, S., Yaguchi, J. & Inaba, K. Bicaudal-C is required for the formation of anterior neurogenic ectoderm in the sea urchin embryo. *Sci. Rep.* 4, 6852–7 (2014).
42. Firestone, A. J. et al. Small-molecule inhibitors of the AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. *Nature* 484, 125–129 (2012).
43. Auclair, W. & Siegel, B. W. Cilia regeneration in the sea urchin embryo: evidence for a pool of ciliary proteins. *Science* 154, 913–915 (1966).
44. Lancaster, M. A. & Gleeson, J. G. The primary cilium as a cellular signaling center: lessons from disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 220–229 (2009).
45. Warner, J. F., McCarthy, A. M. & Morris, R. L. Hedgehog signaling requires motile cilia in the sea urchin. *Mol. Biol. Evol.* 31, 18–22 (2013).
46. Eldon, E. D., Angerer, L. M., Angerer, R. C. & Klein, W. H. Spec3: embryonic expression of a sea urchin gene whose product is involved in ectodermal ciliogenesis. *Genes Dev.* 1, 1280–1292 (1987).
47. Kinukawa, M. & Vacquier, V. D. Adenylate kinase in sea urchin embryonic cilia. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 310–319 (2007).
48. Prul iere, G., Cosson, J., Chevalier, S., Sardet, C. & Chenevert, J. Atypical protein kinase C controls sea urchin ciliogenesis. *Mol. Biol. Cell* 22, 2042–2053 (2011).
49. Stephens, R. E. Tubulin and tektin in sea urchin embryonic cilia: pathways of protein incorporation during turnover and regeneration. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 2), 683–692 (1994).
50. Stephens, R. E. Differential protein synthesis and utilization during cilia formation in sea urchin embryos. *Dev. Biol.* 61, 311–329 (1977).
51. Shen, M. M. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 134, 1023–1034 (2007)
52. Bradham, C. A. & McClay, D. R. p38 MAPK is essential for secondary axis specification and patterning in sea urchin embryos. *Development* 133, 22–32 (2006).
53. Luo, Y.-J. & Su, Y.-H. Opposing nodal and BMP signals regulate left-right asymmetry in the sea urchin larva. *PLoS Biol.* 10, e1001402 (2012).

54. Takemoto, A., Miyamoto, T., Simoni, F., Kurogi, N., Shirae-Kurabayashi, M., Awazu, A., Suzuki, K. T., Yamamoto T., Sakamoto N. Cilia play a role in breaking left-right symmetry of the sea urchin embryo. *Genes Cells*. 2016; 21 (6): 568-78.
55. Warner JF, Miranda EL, McClay DR. Contribution of hedgehog signaling to the establishment of left-right asymmetry in the sea urchin. *Dev Biol*. 2016; 411 (2):314-24.
56. Männer, J. Does an equivalent of the 'ventral node' exist in chick embryos? A scanning electron microscopic study. *Anat. Embryol*. 203, 481–490 (2001).
57. Schweickert, A., Walentek, P., Thumberger, T. & Danilchik, M. Linking early determinants and cilia-driven leftward flow in left–right axis specification of *Xenopus laevis* A theoretical approach. *Differentiation* 83, S77-87 1–11 (2011).
58. Beyer, T. et al. Serotonin Signaling Is Required for Wnt-Dependent GRP Specification and Leftward Flow in *Xenopus*. *Curr. Biol*. 22, 33–39 (2012).
59. Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua-Belmonte, J. C. & Kintner, C. The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet*. 40, 1454-1460 (2008).
60. Blum, M., Schweickert, A., Vick, P., Wright, C. V. E. & Danilchik, M. V. Symmetry breakage in the vertebrate embryo: When does it happen and how does it work? *Dev. Biol*. 393, 109-23 (2014).
61. Walentek, P., Schneider, I., Schweickert, A. & Blum, M. Wnt11b Is Involved in Cilia-Mediated Symmetry Breakage during *Xenopus* Left-Right Development. *PLoS ONE* 8, e73646-9 (2013).
62. Logan, C. Y., Miller, J. R., Ferkowicz, M. J. & McClay, D. R. Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Development* 126, 345-357 (1999).
63. Belo, J. A. et al. Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech. Dev*. 68, 45–57 (1997).
64. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9, 676-682

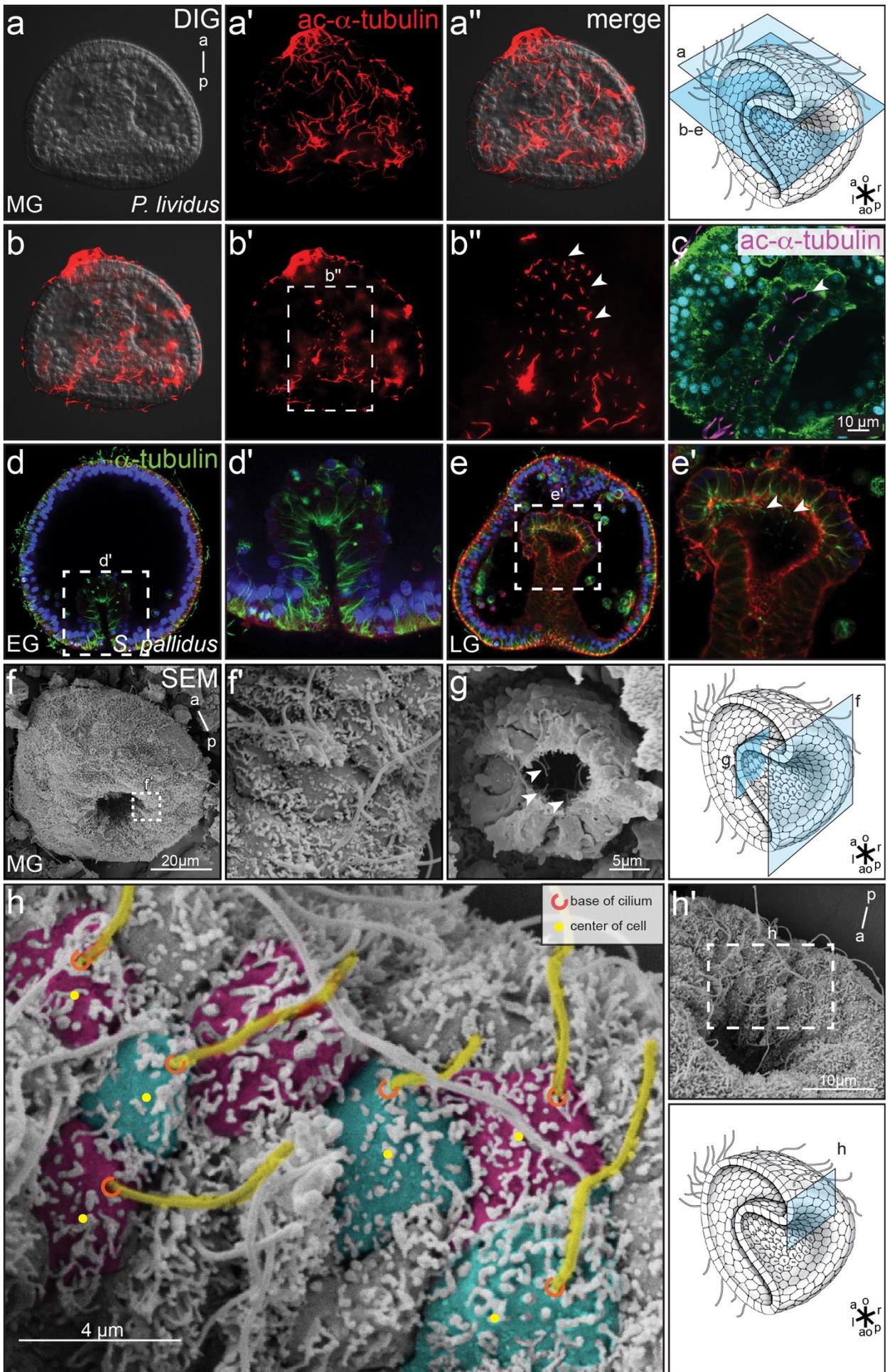
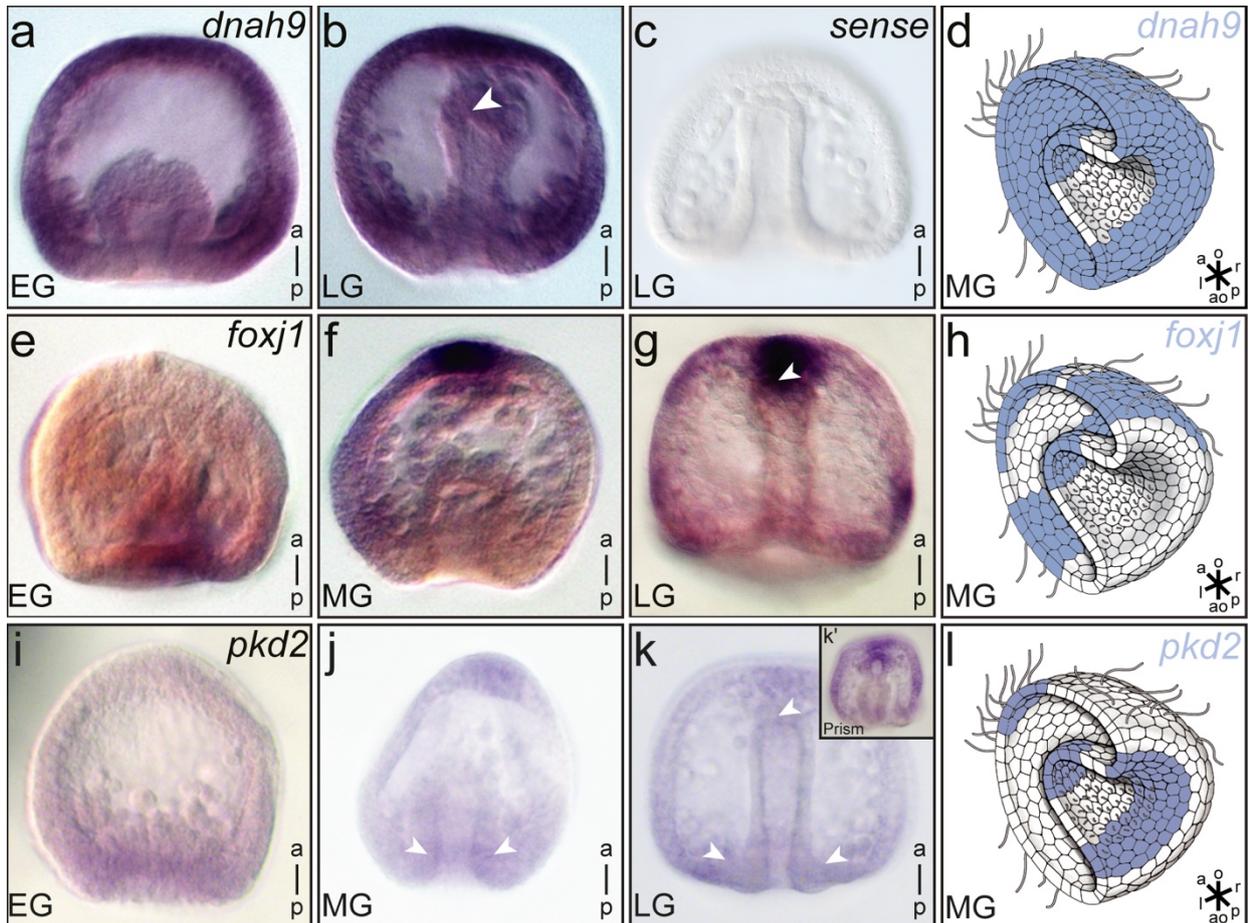


Fig. 1 Polarized cilia at the sea urchin archenteron.

(a-e) *P. lividus* (a-c) and *S. pallidus* embryos (d-e') were analyzed by IF for the presence of cilia at the archenteron. Optical sections showed ectodermal (a'; a'') and archenteron cilia (b'-c) at mid gastrula stages. Late (e; e') but not early *S. pallidus* gastrula stage embryos revealed cilia in the archenteron and at the archenteron tip (d, d'). Cilia were stained with an antibody against acetylated- α -tubulin (red, a'-c) or anti- α -tubulin (green, d-e'), nuclei were stained with DAPI (d-e'), and cell boundaries were visualized by phalloidin-green (c) or phalloidin-red (d-e'). (f, g) SEM analysis of *P. lividus* ectodermal and archenteron cilia. Fractured embryos allowed the visualization of monocilia on archenteron cells (g). Cilia are highlighted by an arrowhead (f-h') Posterior polarization of cilia on cells which invaginated into the archenteron. Cilia are colored in yellow and individual cells alternating in green and purple. The ciliary base is marked by a red semicircle, the center of the cell is indicated by a yellow dot. Schematic drawings adapted from Blum et al. 2014 [3].

**Fig. 2 Motile cilia marker genes *dnah9* and *foxj1* are expressed throughout sea urchin gastrulation.**

Whole mount in situ hybridization of early (EG), mid (MG) and late (LG) gastrula stage *P. lividus* embryos, as well as prism stages (k') for mRNA expression of *dnah9* (a-d), *foxj1* (e-h) and *pkd2* (i-l). Schematic representation of staining in mid-gastrula embryos is highlighted in drawings in (d, h and l). White arrowheads highlight vegetal blastopore and archenteron tip expression areas. Schematic drawings adapted from Blum et al. 2014 [3].

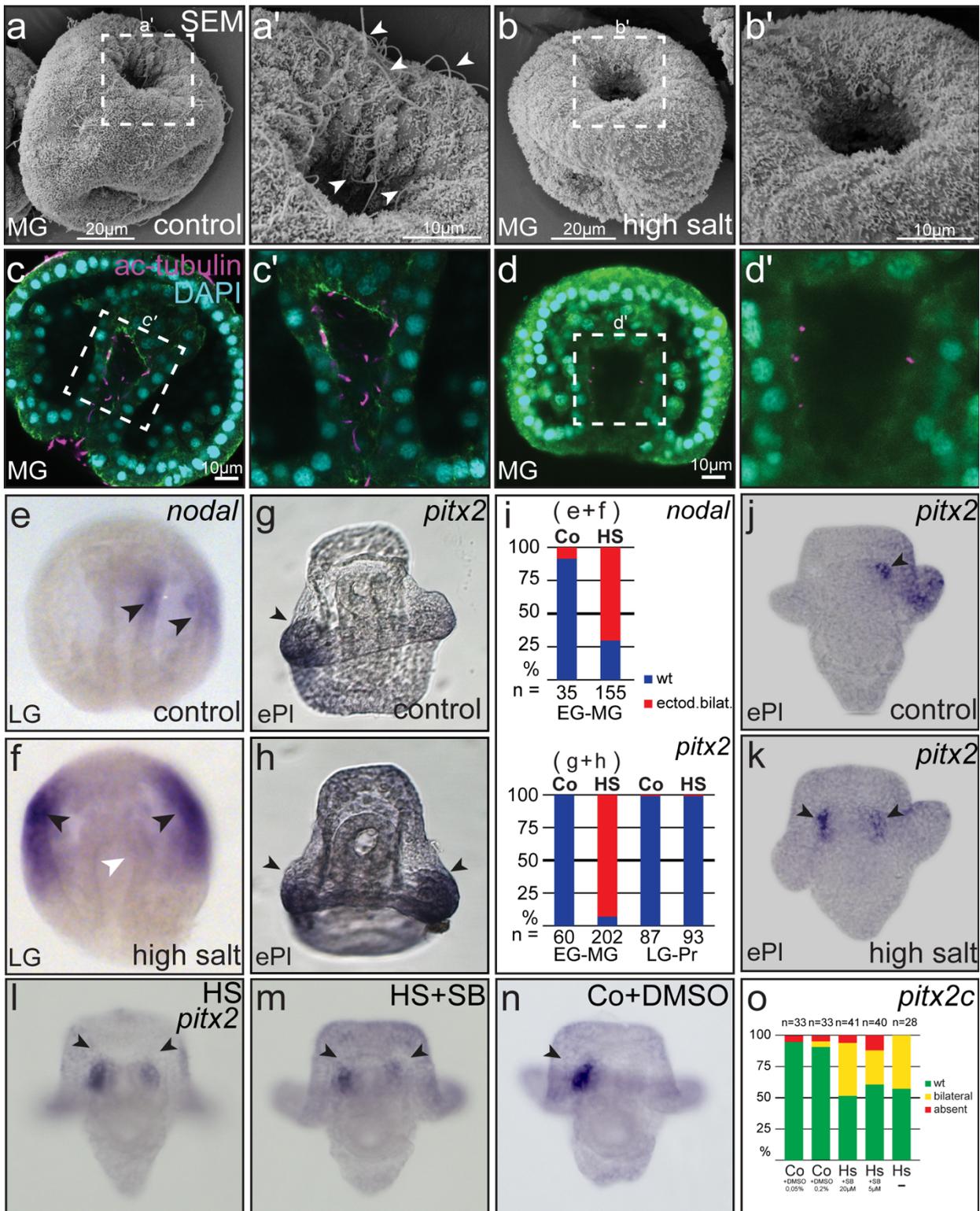


Fig. 3 Deciliation impairs LR asymmetric *nodal* cascade induction.

SEM (a, b) and IF (c, d) analyses of cilia in control untreated embryos (a, c) and specimens exposed to a 60-90 sec osmotic shock (b, d). Note that cilia were almost completely absent following high salt treatment. Cilia in (c) and (d) were stained with an antibody against anti-acetylated- α -tubulin (purple), nuclei with DAPI, and cell boundaries visualized by phalloidin-green. (e, g) Unilateral induction of asymmetric *nodal* cascade genes in control embryos. (f, h) Bilateral ectodermal *nodal* and *pitx2* expression following deciliation of early to mid-gastrula stage embryos. Black arrowheads highlight expression in the archenteron and ectoderm; white arrowheads indicate lack of expression. (i) Quantification of expression pattern from (e-h). Unilateral *pitx2* expression in coelomic pouches of pluteus stage control specimen (j) and bilateral expression in deciliated embryos (k). Bilateral expression of *pitx2* after deciliation is independent of MAPK/p38 inhibition through SB203580 (l-m). (o) Quantification of expression patterns. Posterior/vegetal is to the top in (a, b) and to the bottom in (c-g).

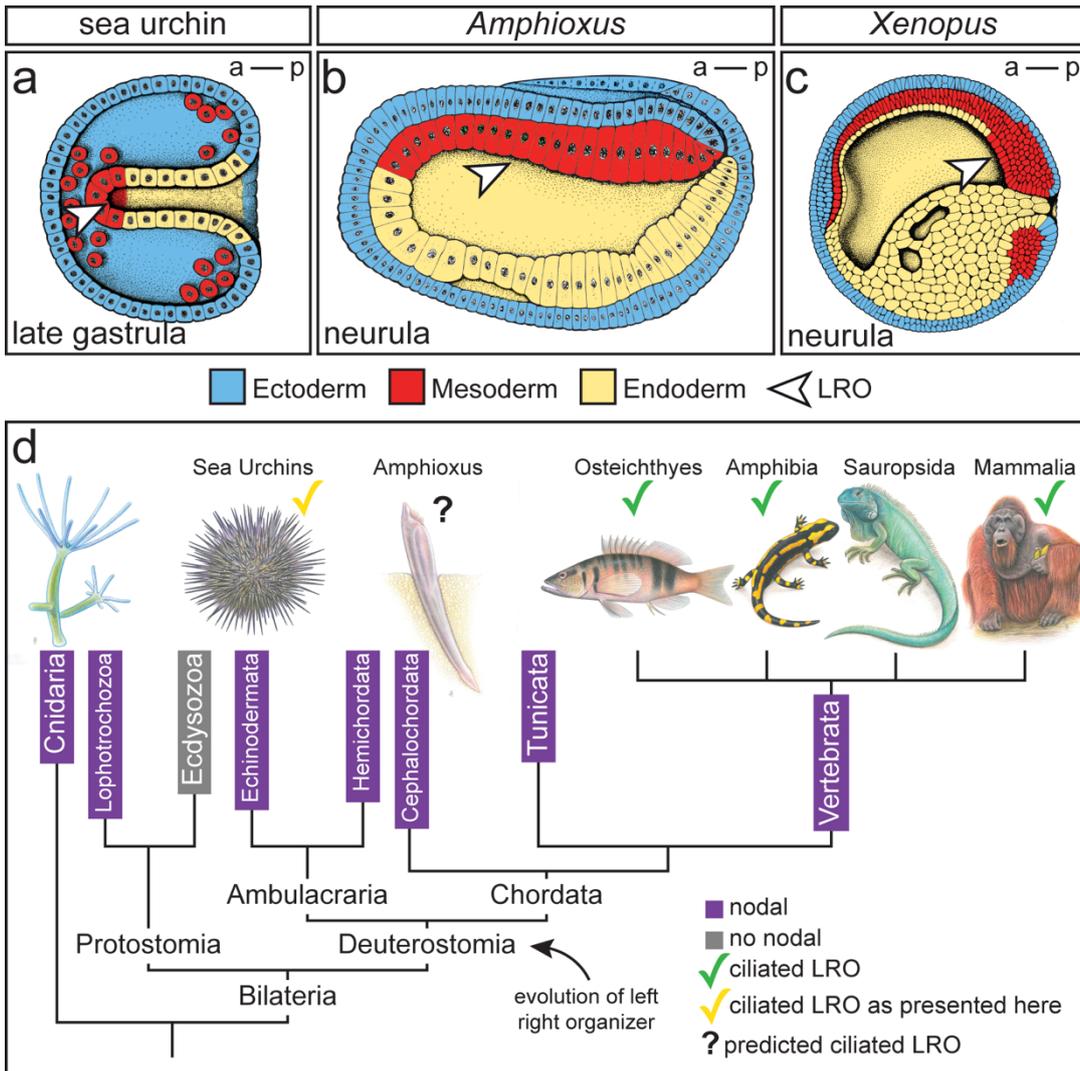
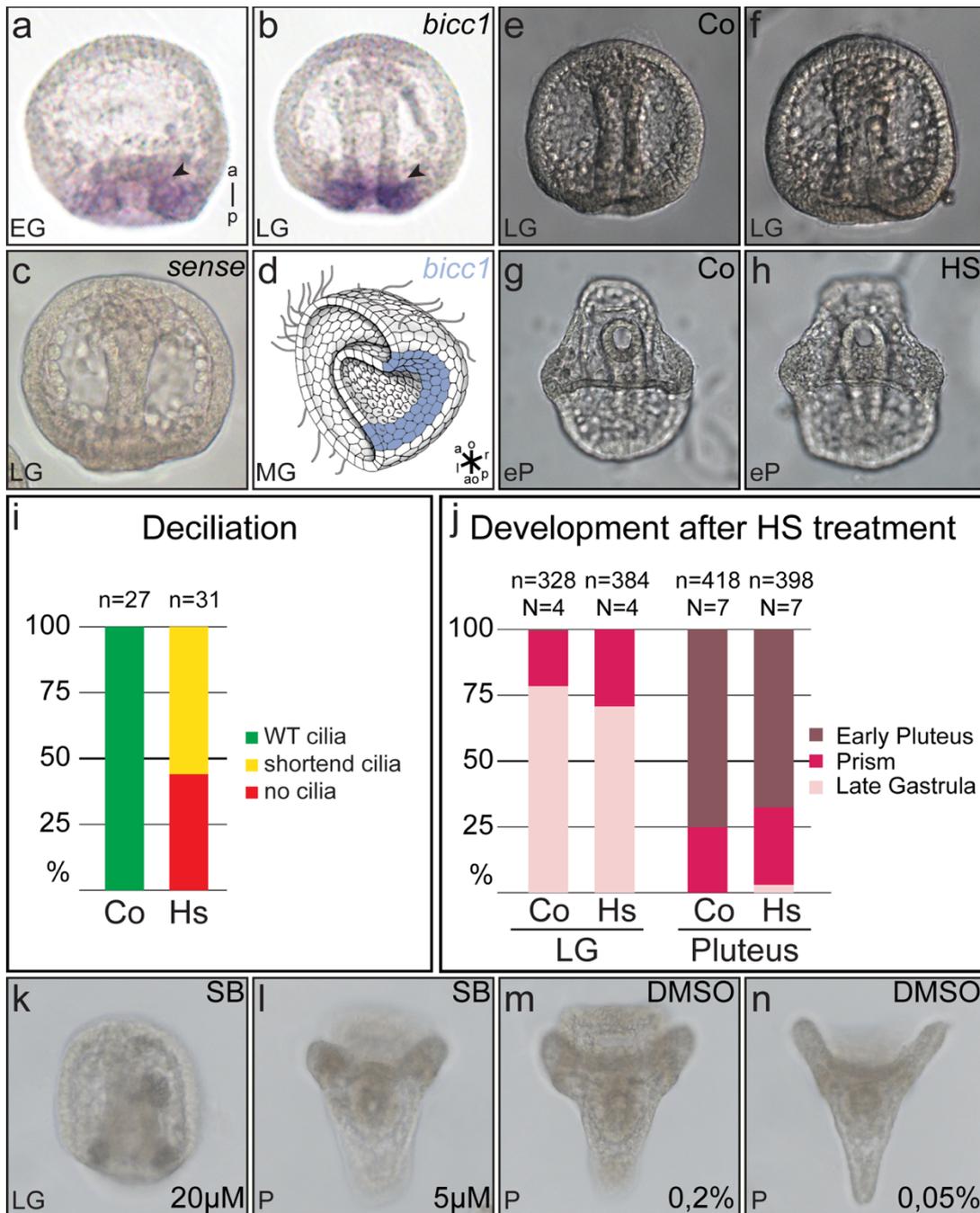


Fig. 4 The ciliated Left-Right Organizer: a synapomorphy of the deuterostomes.

(a-c) Schematic drawings of sea urchin (a), amphioxus (b) and *Xenopus* (c) gastrula/neurula stage embryos (anterior to the left). In all cases the archenteron harbors cells of mesodermal fate (SM, red), which in frog and sea urchin are ciliated and function as LROs. The position of mesodermal LROs is indicated by an arrowhead. (d) *nodal* is evolutionary conserved among metazoans except for the ecdysozoa. Deuterostomes share a ciliated LRO as a common synapomorphy. Drawings adapted in parts from Blum et al. 2014 [3].

Supplementary Figures



Supplementary Figure 1

mRNA expression of *bicc1* (a-d) and overall normal development of *Paracentrotus lividus* embryos upon high salt induced deciliation (e-j) or upon early MAPK/p38 inhibition (k-n)

(a-d) *bicc1* transcripts were detected in the invaginating mesendodermal cells during gastrulation. (c) A control embryo stained with sense RNA showed no staining. Embryos deciliated between late blastula to late gastrula stages developed without apparent phenotype to late gastrula (f) or early pluteus stage (h), respectively, as compared to control embryos (e, g). (i) Quantification of deciliation efficiency after high salt treatment, based on assessment of IF using an antibody against acetylated tubulin (n = number of embryos analyzed). (j) Developmental stages of wild-type and high-salt treated embryos. Summary of results from a total of 11 deciliation experiments performed at early (EG), mid (MG) or late gastrula (LG) stages and scored when most controls developed to late gastrula stage (left bars) or early pluteus stage (right bars), respectively (n = number of embryos; N = number of experiments). Please note that there was no overall delay in development after HS treatment. (k-n) Embryos after MAPK/p38 inhibition during blastula showed dose-dependent DV patterning phenotypes resembling late gastrula stages (LG) at early pluteus (P) stages (k, l) while DMSO control embryos developed normally (m, n). Drawings in (d) adapted from Blum et al. 2014¹.

Supplementary Movies

Supplementary Movie 1

Archenteron cilia are motile.

Real-time movie of early to mid gastrula stage embryo in lateral-vegetal view reveals fast movement of polarized cilia on laterally invaginating cells at the posterior aspect of the archenteron (cf. Figure 1h). Bright-field movie (a) and high-magnification (white box) of the inner archenteron wall (a'). (b) Temporal difference imaging rendered version of the same movie, which highlights pixel grey value differences between two consecutive frames. Movie was acquired at 55fps (cf. methods for details).

Supplementary Movie 2

Monocilia inside the archenteron of gastrula stage embryos rotate

Real-time movie of mid to late gastrula stage embryo in vegetal view, focusing on the central archenteron region, reveals fast rotating monocilia inside the archenteron (cf. Figure 1g). (a) bright-field movie. (b) Temporal difference imaging rendered version of the same movie, which highlights pixel grey value differences between two consecutive frames. (a', b') High-magnification area as outlined in (a, b). Movie was acquired at 35fps. Please note the rotating cilia on the inner epithelium of this embryo.

Supplementary References

01. Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T. & Schweickert, A. The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* **141**, 1603–1613 (2014).

Zusammenfassung der Kapitel 1 bis 4

Wirbeltiere weisen mit der anterior-posterior-, dorso-ventral- sowie der Links-Rechts-Achse drei Körperachsen auf, die dem Körper seine dreidimensionale Organisation verleihen. Die Links-Rechts-Achse umfasst die asymmetrische Positionierung der inneren Organe, die im Zug der Embryonalentwicklung durch die Expression der asymmetrischen Nodal-Kaskade transkriptionell gesteuert wird. In Vertebraten findet der initiale Bruch der Bilateralsymmetrie während Neurulastadien im Bereich des Links-Rechts-Organisators statt, dessen homologe Struktur in allen Modellorganismen der Wirbeltiere, mit Ausnahme des Huhnes, nachgewiesen werden konnte. Auch in Wirbellosen, wie dem Steinseeigel *Paracentrotus lividus*, findet diese evolutionär-konservierte Kaskade Verwendung um einen Bruch der symmetrischen Organisation zu vollziehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die den Symmetriebruch in Seeigelembryonen auf motile Cilien während früher Stadien der Gastrulation zurückführen lassen. Das Archenteron des Seeigelembryos konnte hierbei als Homolog zu den Links-Rechts-Organisatoren der Wirbeltiere wie der Gastrocoel Roof Plate im Afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis*, dem Kupffer-Vesikel in *Danio rerio* oder dem Posterioren Notochord in *Mus musculus* beschrieben werden. Decilierungsexperimente führten zu Defekten in der Spezifizierung der Links-Rechts-Achse, die den Symmetriebruch auf einen Zeitpunkt zu Beginn der Gastrulation eingrenzen lassen (Tisler et al., 2016).

Obwohl der generelle Mechanismus des Symmetriebruchs bereits charakterisiert wurde, werden weiterhin neue Gene identifiziert, die eine bislang unbekannte molekulare Funktion in diesem Prozess übernehmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die, der Histondeacetylase Klasse IIb angehörige, *hdac6* in *Xenopus laevis* als Kandidatengen der Links-Rechts-Achsenentwicklung identifiziert und funktionell charakterisiert werden. *In vivo* übernimmt die *hdac6* eine molekulare Funktion in der durch den Wnt-Signalweg induzierten Expression des Transkriptionsfaktors *foxj1*, eines Hauptregulators der Biogenese motiler Cilien. Antisense Oligomer Morpholino vermittelte Funktionsverluste der *hdac6* führen zu Defekten in der Etablierung der Links-Rechts-Achse, die in Defekten der Ciliogenese begründet liegen. Mit den durchgeführten Experimenten konnte die in der Literatur beschriebene, auf eine Aufgabe während der Resorption von Cilien beschränkte Sichtweise der *hdac6*, um eine Funktion innerhalb der der transkriptionellen Spezifizierung des Ciliogeneseprogramms erweitert werden. Im Gegensatz zu bekannten Funktionsgewinn-Mutationen im Menschen stellen die dargestellten Funktionsverlustexperimente des *hdac6* Gens einen entwicklungsbiologischen Phänotyp dar, der bislang aus keinem Modellorganismus oder menschlichen Patienten berichtet wurde (Fietz 2014, Landua 2015; Fiebig 2016; diese Arbeit).

Ein prominentes Beispiel für Lateralitätsdefekte des Menschen stellen *Situs*-Defekte thoracopager, dicephaler siamesischer Zwillinge dar. Diese werden seit Jahrzehnten in der Literatur berichtet und faszinieren Entwicklungsbiologen seit Generationen (Tisler et al., 2017a). Auf Grund der experimentellen Zugänglichkeit stellt *Xenopus laevis* ein ideales Modellsystem dar, um siamesische Zwillinge definiert experimentell zu erzeugen um so die Lateralitätsdefekte humaner Zwillinge zu modellieren. Im Rahmen der Vorliegenden Arbeit konnten Experimente durchgeführt werden, die die beschriebenen Lateralitätsdefekte humaner siamesischer Zwillinge sowie weitere Modellorganismen durch den evolutionär-konservierten Mechanismus des Symmetriebruchs begründen lassen. Siamesische Zwillinge weisen in Folge der Duplikation des Spemann Organisators eine Duplikation des Links-Rechts Organisators auf. Im Zug der Neurulation kann ein linksgerichteter Flüssigkeitsstrom dargestellt werden, der zu einer links-asyymetrischen Induktion der Nodal-Kaskade im linken Zwilling führt und auf einer linksseitigen Regulation des *nodal1*-Inhibitors *dand5* beruht (Tisler et al., 2017b).

Durch die vorliegende Arbeit konnte der Links-Rechts-Organisator basierte Symmetriebruch als Synapomorphie der Deuterostomier beschrieben und somit in Einklang mit der asymmetrischen Expression der ebenfalls konservierten Nodal-Kaskade gebracht werden. Ferner war es möglich in der *Histoneacetylase 6* ein neues Kandidatengen der Links-Rechts-Achsenentwicklung zu identifizieren und funktionell als essentielles Molekül in der vom kanonischen Wnt-Signalweg abhängigen Biogenese motiler Cilien zu charakterisieren. Abschließend konnten Experimente durchgeführt werden, die bislang engigmatischen Lateralitätsentwicklung siamesischer Zwillinge ebenfalls auf den linksgerichteten Flüssigkeitsstrom beziehen und dessen Bedeutung als evolutionär-konservierten Mechanismus betonen.

Xenopus laevis

Froschhaltung

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modellorganismus handelt es sich um den "Afrikanischen Krallefrosch" *Xenopus laevis*, (Daudin, 1802) der entsprechend der geltenden deutschen Gesetzgebung und unter Genehmigung des Regierungspräsidiums Stuttgart (Vorhaben A379/12 ZO Molekulare Embryologie nach §6, Artikel 1, Satz 2, Nr. 4 Tierschutzgesetz), im Kleintierhaus des Instituts für Zoologie der Universität Hohenheim in Stuttgart gehalten wird. Die Frösche leben in Kleingruppen zu maximal 6 Tieren und unterliegen einem Tag/Nacht-Zyklus von 12 Stunden. Ernährung, Wasserwechsel und Salinität des Wassers entsprechen den Standards der wissenschaftlichen Gemeinschaft sowie den gesetzlichen Vorschriften des Tierschutzes.

Die Klassifizierung der Embryonalentwicklung, beginnend mit der befruchteten Eizelle, unterliegt dem Entwicklungsatlas „Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): A Systematical & Chronological Survey Of The Fertilized Egg Till The End Of Metamorphosis“ by P.D. Niewkoop and J.Faber, 1994 und wird im Text mit der Abkürzung Stadium (St.) gekennzeichnet.

Induktion der Ovulation

Xenopus laevis ist in der Lage unter konstanten Lebensbedingungen, ganzjährig zur Induktion der Ovulation angeregt zu werden. Unter Einhaltung einer Regenerationszeit von mindestens 100 Tagen, die zur Oogenese benötigt werden, kann ein weiblicher Frosch 2-3mal jährlich zur Gewinnung von Gelegen herangezogen werden. Um die Eireifung und die 2. Meiotische Reifeteilung zu induzieren werden weibliche Frösche im Zeitraum von etwa einer Woche vor der geplanten Induktion der Ovulation durch die subkutane Injektion einer subeffizienten Menge an humanem Choriongonadotropin in die dorsalen Lymphsäcke stimuliert. Hierzu werden in Abhängigkeit der Körpergröße und des Gewichts der Weibchen 50-100 Units des in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Hormons injiziert. Um die Ovulation herbeizuführen werden 500-800 Units des gelösten Hormons subkutan in die dorsalen Lymphsäcke injiziert. Der Laichdruck setzt, abhängig von der Außentemperatur, etwa 12 Stunden nach der Hormongabe ein und hält an bis alle legerreifen Eier abgelegt sind. Pro Weibchen können viele Hundert Eier gewonnen werden, die durch händische Stimulation aus den legebereiten Weibchen heraus massiert werden können (Sive et al., 2000).

Präparation der männlichen Gonaden

Um gezielte *in vitro* Fertilisationen durchführen zu können müssen männliche Gonaden des Frosches präpariert werden. Hierzu werden männliche Frösche mit dem Fisch-Anästhetikum MS222 narkotisiert und durch Dekapitation mit anschließendem Ausbluten getötet. Im Anschluß erfolgt die Präparation der paarigen Gonaden. Anhängendes Fettgewebe oder Adern werden entfernt und der Hoden in einem Hochsalzpuffer (1x MBSH) bei 4 °C aufbewahrt. Unter genannten Umständen gelagert können die Spermien des präparierten Hodens 7-10 Tage zur Befruchtung eingesetzt werden (Sive et al., 2000).

***In vitro* - Fertilisierung**

Ziel der *in vitro* Fertilisation ist es eine möglichst große Menge sich synchron entwickelnder Embryonen zu erhalten, die im folgenden experimentell manipuliert werden können. Die Befruchtungen finden in Petrischalen statt, in die zuvor die Gelege abgestriffen wurden. Zu jedem Gelege wird ein Hodenmazerat in Hochsalzpuffer pipettiert. Hierzu werden einige mm³ des präparierten Hodens in 1ml 1x MBSH aufgenommen und mit Hilfe von Skalpell und Pinzette mazeriert. Die Spermienlösung wird zwischen den Eiern des Geleges verteilt und im Anschluß mit 0,1x MBSH aufgegossen. Durch die Verdünnung des Hochsalzpuffers erlangen die Spermien ihre Motilität und befruchten synchron die Eier des Geleges. Eine erfolgreiche Befruchtung ist durch das Abheben der Vitellinhülle sowie dem späteren Absinken des Pronukleus erkenntlich. Nach 90 Minuten bei Raumtemperatur (RT) erfolgt die erste, nach etwa 120 Minuten die zweite Zellteilung der frühen Embryonen (Sive et al., 2000).

Vereinzelung der Embryonen eines Geleges

Die Eier eines Geleges sind von einer Gallerte umgeben, die sie in der Natur vor mechanischer Beschädigung schützt. Um Experimente im frühen Entwicklungsstadien durchführen zu können müssen die Eier des Geleges von der Gallerthülle befreit und vereinzelt werden. Dies erfolgt durch eine Inkubation des Geleges für eine Zeit von etwa 7 Minuten in einer Cysteinlösung;(2%; pH 7,98). Während der Inkubation in der Cysteinlösung werden die Embryonen in der Petrischale im Abstand von etwa 30 Sekunden manuell bewegt um sie sukzessive zu vereinzeln. Zum Ende der Inkubationszeit erfolgen mehrere Waschschrte mit 0,1x MBSH (5x), um die Cysteinlösung auszuwaschen. Bis zur Durchführung der Experimente werden die Embryonen in 1x MBSH kultiviert, maximal aber bis zum Erreichen eines späten Blastula-Stadiums (Sive et al., 2000).

Injektionsexperimente

Auf Grund gut etablierter Zellschicksalskarten eignen sich *Xenopus* Embryonen in frühen Furchungsstadien um durch Mikroinjektionsexperimente gezielt Zellen eines embryonalen Gewebes experimentell zu manipulieren. Injektionsexperimente wurden in einem Versuchsaufbau bestehend aus Zeiss Binokular (Stemi 2000-C), Injektionsgerät: „Harvard Apparatus“ (HPI 10) sowie unter Verwendung eines Mikromanipulators MK1 (Singer Instruments) durchgeführt. Die verwendeten Injektionsnadeln, wurden mit Hilfe eines Nadelauszuggerätes P-87 (Sutter) hergestellt und mit einer Feinpinzette AA (FST By DUMONT) unter dem Binokular gebrochen. Das Injektionsvolumen umfasste zwischen 4-8 nl Flüssigkeitsmenge, in denen abhängig vom experimentellen Vorhaben DNA, RNA sowie Anti-sense Oligonukleotid- Morpholinos oder weitere Chemikalien gelöst waren. Zur Durchführung der Injektion wurden Embryonen in Ficoll Lösung (2% in 1x MBSH) überführt und entsprechend des experimentellen Vorhabens ein oder mehrere Male injiziert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Embryonen frühestens 30 Minuten nach Injektion, spätestens aber vor St.8 in Petrischalen (Greiner) mit 0,1x MBSH überführt und bis zum Erreichen des Zielstadiums beobachtet (Sive et al., 2000).

Methylcellulose-Injektion in das Archenteron neurulierender Embryonen

Mit der Injektion von Methylcellulose in den Urdarm des neurulierenden Embryos kann Einfluss auf die Viskosität der Archenteroflüssigkeit genommen werden um Lateralitätsdefekte in der Embryonalentwicklung zu induzieren (Schweickert et al., 2007). Entsprechend der intrazellulären Injektion wurde der vorab beschriebene Injektionsaufbau auch zur Archenteroninjektion der Methylcellulose verwendet. Im Unterschied zur intrazellulären Injektion wurde die Injektionsnadel mit bewusst großem Öffnungsdurchmesser gebrochen um die viskose Methylcellulose-Lösung (1,5% in 1x MBSH) aufzusaugen und einen das Archenteron füllenden Tropfen zu generieren. Vorbereitend wurde die Methylcellulose über Nacht bei 4° C auf der Mischplatte gelöst und kann bei gekühlter Lagerung mehrere Tage verwendet werden. Um Lateralitätsdefekte zu erzeugen erfolgte die Archenteroninjektion in den Entwicklungsstadien St. 13/14. Nach erfolgter Injektion wurden Versuchs - und Kontrollembryonen bis zum Abschluss der Neurulation bei 27 °C inkubiert um die Viskosität der Methylcellulose weiter zu erhöhen.

Fixierung der Zielstadien

Um Genexpressionsanalysen in wildtypischen Embryonen durchzuführen oder experimentell induzierte Veränderungen der Genexpression auszuwerten müssen die Embryonen mit dem Erreichen der gewünschten Entwicklungsstadien fixiert und bis zur Expressionsanalyse gelagert werden. Zur Fixierung wurden die Embryonen in verschließbare Glasfläschchen in MEMFA-Fixanz für 2 Stunden bei RT auf dem Taumelroller inkubiert. Im Anschluß an die Fixierung wurden die Embryonen 2x für 10 Minuten mit 100% ETOH gewaschen und in 100% ETOH bei -20 °C bis zur Genexpressionsanalyse aufbewahrt und entfettet (Belo et al., 1997).

Paracentrotus lividus

Adulte Individuen des getrenntgeschlechtlichen Steinseeigels (*Paracentrotus lividus*, Echinodermata) wurden dem Küstengewässer der Adria (Pula, Kroatien) entnommen bis zur Verwendung in Seewasser lebend gehältert und nach Abgabe der Gameten wieder am Sammelort ins Meer entlassen.

Induktion der Ovulation und Spermienabgabe

Durch die intraperitoneale Injektion einer KCl-Lösung (0,5M) zur Abgabe der Eizellen und Spermien stimuliert. Ovulierende Seeigel wurden nach der Detektion der einsetzenden Eiabgabe invertiert auf ein mit Meerwasser gefülltes Becherglas gesetzt und bis zum Ende der Abgabe der Eier auf diesem belassen. Im Falle der Abgabe von Spermien wurden diese mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in einem Eppendorf-Reagenzgefäß gesammelt. Spermien des Seeigels eigneten sich zur gekühlten Lagerung bei 4 °C und behielten ihre Motilität für mindestens 24 Stunden (Gago et al., 2011)

***In vitro*-Fertilisierung**

Um die Befruchtung der Seeigeleier vorzubereiten wurden diese 3x mit frischem Meerwasser und anschließend 2x mit künstlichen Meerwasser in einem Becherglas gewaschen. Zur Durchführung der Befruchtung wurden vorab erhalten Spermien in Meerwasser verdünnt (50 µl Spermien / 15000 µl steriles Meerwasser) und zu den Oozyten pipettiert. Resultierende Zygoten wurden verdünnt in mit Meerwasser gefüllten Petrischalen ausgesäht und sich bis zu dem gewünschten Entwicklungsstadium bei Raumtemperatur ihrer Entwicklung überlassen.

Fixierung der Zielstadien

Nach Erreichen der Zielstadien (Frühe Gastrula, Späte Gastrula und Pluteus) wurden die Seeigelembryonen in Dents'-Fixanz (80% Methanol; 20% DMSO oder 100% Methanol für eine spätere Immunofluoreszenz-Analyse fixiert. Die Lagerung Embryonen bis zur Prozessierung erfolgte bei -20 °C in Methanol.

***In situ* Hybridisierung nach** (Belo et al., 1997)

Die zur Genexpressionsanalyse verwendete *in situ* Hybridisierung wurde im Labor von Prof. Dr. Edward de Robertis zur Anwendung in Froschembryonen adaptiert und in Belo et al., 1997 publiziert. Die *in situ* Hybridisierung erstreckt sich über einen Zeitraum drei aufeinanderfolgender Tage und zielt darauf ab eine markierte Antisense-Sonde an die Ziel-mRNA zu hybridisieren (Tag 1), diese durch einen spezifischen Antikörper zu detektieren (Tag 2) und eine durch diesen Antikörper vermittelte Farbreaktion herbeizuführen (Tag 3).

Sondensynthese

Abhängig von der eingesetzten linearisierten Plasmid DNA als Matritze für die wurde die Antisense Sonde durch folgenden Reaktionsansatz und durch Inkubation von 2 Stunden bei 37°C hergestellt.

Volumen Reagenz

2 µl	linearisierte Plasmid DNA (1µg)
4 µl	5x Transkriptionspuffer
0,5 µl	RNAse Inhibitor
2 µl	Dig-label Mix (rNTPs)
2 µl	100mM DTT
2 µl	RNA Polymerase (SP6/T7)
7,5 µl	H ₂ O

Aufreinigen der Sonde

Zur Aufreinigung der Sonde wurden folgende Reagenzien pipettiert, gevortext und für min. 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes für 25 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Das resultierende RNA-Pellet wurde in 50 µl Formamid/H₂O (1:1) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Volumen Reagenz

30 µl	H ₂ O
5 µl	5M Amonium Acetat
165 µl	100% ETOH

In situ Hybridisierung: Tag 1

Rehydrierung der Embryonen über eine Ethanolreihe (75%, 50%, 25%)

3x 5 Minuten waschen mit PBSw

15 Minuten Proteinase K Verdau (1ml Proteinase/Gläschen 10 µg/ml Proteinase K in PBSw)

1x 5 Minuten waschen mit PBSw/Glycin (2mg/ml Glycin in PBSw)

3x 5 Minuten waschen mit PBSw

15 Minuten fixieren (4% PFA / 0,2% Glutaraldehyd in PBSw)

3x 5 Minuten waschen mit PBSw

1x 5 Minuten waschen in 1ml 50% Hyb-Mix/50% PBSw

1x 5 Minuten waschen in 1ml 100% Hyb-Mix

1ml durch 900 µl Hyb-Mix ersetzen und bei 65 °C für 3 Stunden vorhybridisieren

Je Ansatz 99 µl Hyb-Mix und 1 µl Sonden-Mix für 5 Minuten bei 95 °C aufkochen, dann auf Eis

100 µl Sondenlösung zu den 900 µl Hyb-Mix hinzugeben und über Nacht bei 70 °C hybridisieren.

In situ Hybridisierung: Tag 2

Sondenlösung durch 1ml frischen Hyb-Mix ersetzen 30 Minuten bei 70 °C waschen

1x 30 Minuten bei 70 °C in frischem Hyb-Mix waschen

1x 1ml Hyb-Mix durch 800 µl Hyb-Mix ersetzen und 5 Minuten waschen

3x im Abstand von 5 Minuten 400 µl 2xSSC (pH 4,5) hinzupipettieren

2x 30 Minuten in 2xSSC (pH 7,0) bei 70 °C waschen

2x 10 Minuten mit MABw bei RT waschen

2x 30 Minuten mit MABw bei 70 °C waschen

2x 10 Minuten mit PBSw bei RT waschen

PBSw durch 1ml Blocking-Reagenz ersetzen und 2 Stunden bei 4 °C inkubieren

1ml Blocking-Reagenz durch 1ml Antikörpermix ersetzen (1:10000 AK in Blocking-Reagenz) und über Nacht bei 4 °C inkubieren.

In situ Hybridisierung: Tag 3

Antikörpermix durch PBSw/BSA (0,1% BSA) ersetzen und 45 Minuten auf Taumelroller bei RT waschen

4x 45 Minuten mit PBSw/BSA auf Taumelroller bei RT waschen

2x 30 Minuten mit PBS auf Taumelroller bei RT waschen

3x 15 Minuten mit AP1 (pH 9,5) bei RT waschen

Embryonen in BM-Purple Färbelösung überführen und über Nacht färben lassen

2x 10 Minuten PBS waschen zum Abstoppen der Färbereaktion

Zur Langzeitlagerung in 100% ETOH überführen.

Fotodokumentation

Zur Dokumentation der Versuche wurden Embryonen und/oder histologische Dünnschnitte unter dem Fotobinokular/ Mikroskop fotografiert und die erhaltenen Bilder als .tif Datei abgespeichert. Zur weiteren Prozessierung wurden die Bilder mit Adobe Photoshop CC und Adobe Illustrator bearbeitet, wobei keine Bearbeitung vorgenommen wurden, die die initiale Aussage/Ergebnisse der Experimente verfälschen würden.

Histologische Dünnschnitte am Vibratom

Zur genaueren Analyse der Genexpression wurden Dünnschnitte der gefärbten Embryonen hergestellt. Hierzu wurden ausgewählte Embryonen über Nacht in 1 ml Gelatine-Albumin Mix in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß äquilibriert. Unter Verwendung einer Glasplatte, sowie zweier Aluminiumwinkel wurde eine nach oben offene Reaktionskammer erstellt. Die Zugabe von 72 μ l Glutaraldehyd (25%) zu 1 ml Gelatine-Albumin Mix induzierte eine Vernetzung zu einer viskösen Masse, die zum Aushärten in die Reaktionskammer gegossen wurde. Nach der Positionierung der zu schneidenden Embryonen auf dem Gelboden wurden diese mit Gelatine-Albumin Mix überschichtet und nach kurzem Aushärten mit einem Vibratom in 30-35 μ m starke Schnitte geschnitten. Zur Konservierung wurden die Dünnschnitte auf Objektträger überführt, mit Mowiol getränkt und einem Deckglas gedeckelt.

Knorpelfärbung mit Alcian Blau

Bei der Alcianblau-Färbung handelt es sich um eine Färbetechnik mit deren Hilfe Knorpel- und Knochengewebe histologisch dargestellt werden können. Saure Proteoglykane sowie Polysaccharide können durch den Farbstoff Alcianblau in Schnitt oder Ganzkörperpräparaten angefärbt werden. In *Xenopus* dient diese Methode dazu den Kiemenkorps oder der St. 40-45 zu visualisieren.

Embryonen der gewünschten Zielstadien wurden für 1 Stunde in 1x MEMFA fixiert und im Anschluß 3x für 10min in PBSw auf dem Taumelroller gewaschen. Darauf hin wurden die Kaulquappen für 2 Stunden in 1x Acidic Alcohol (Eisessig; 80% ETOH (100% vergällt): 20% Essigsäure (100%)) inkubiert. Die Färbungsreaktion mit Alcian Blau (0,05g in 100ml Eisessig (Lichtgeschützt) fand unter regelmäßiger Sichtkontrolle für ca. 30-45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller statt. Zur Beendigung der Färbereaktion erfolgte ein Auswaschen der Lösung für 6x 2 Stunden oder über Nacht auf dem Taumelroller. Abschließend musste der Eisessig durch PBS ersetzt werden. 3x10min in PBSw Waschschr. Alle Waschschr. erfolgten unter dem Abzug

Antisense-Morpholino-Oligonukleotide

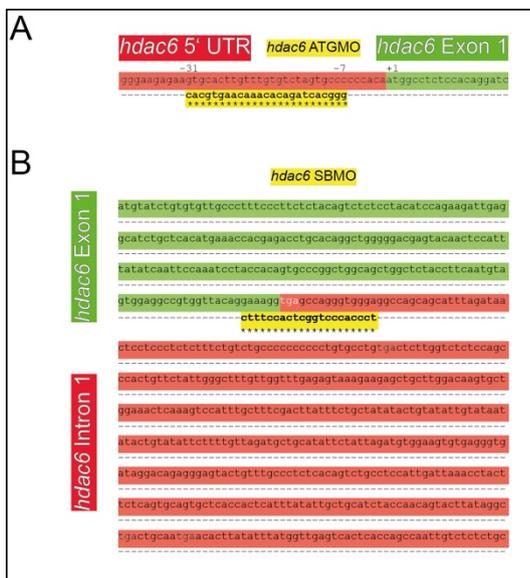


Abb. 28 ATG und SB Morpholino-Bindestellen entlang der *hdac6* mRNA Nukleotidsequenz.

Grafische Darstellung der Antisense Oligomer Morpholino Bindestellen entlang der mRNA Sequenz von *hdac6* (A-B). (A) Der ATG Morpholino umfasst 25 Basenpaare und weist keine Fehlpaarung auf. Das Bindemotiv erstreckt sich von von Nukleotid -31 bis Nukleotid -7 in der 5'UTR der *hdac6* mRNA. Das verwendete Morpholino wurde vorab als funktionell beschrieben (Bestman et al., 2015); 5'UTR Sequenz in rot; *hdac6* Exon 1 grün; *hdac6* ATGMO in gelb. (B) Der SBMO überspannt die Grenze des Exon1 zu Intron 1 der nicht gespliceten *hdac6* mRNA. Er umfasst 21 Basenpaare und weist keine Fehlpaarungen auf; *hdac6* Exon 1, grün; *hdac6* Intron 1, rot; *hdac6* SBMO in gelb. Sterne markieren die komplementierenden Basenpaarungen.

Verwendete Antisense Oligomer Morpholinos

<i>dand5MO</i>	5' TGG TGG CCT GGA ACA GCA GCA TGT C 3'	Vonica et al., 2007
<i>dnah9MO</i>	5' CAT AGG AAT CAA CTC ACT TTT TCT C 3'	Vicket al., 2009
<i>pkd2MO</i>	5' GGT TTG ATT CTG CTG GGA TTC ATC G 3'	Vick, 2009
<i>hdac6ATGMO</i>	5' GGG CAC TAG ACA CAA ACA AGT GCA C 3'	Bestman et al. 2015
<i>hdac6SBMO</i>	5' TCC CAC CCT GGC TCA CCT TTC 3'	diese Arbeit

Herstellung von mRNA zur Überexpression in *Xenopus laevis***Volumen Reagenz**

5 µl	H ₂ O; Nuklease frei
10 µl	2x NTP/CAP-Mix
2 µl	10x Reactions Puffer
1 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	Sp6 RNA-Polymerase -Mix

Die Reaktionslösung wird für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß werden zugegeben
 1 µl DNase I

Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C

115 µl	H ₂ O
15 µl	Ammonium Acetat
150 µl	Phenol/Chloroform

Durch Zentrifugation für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit trennt sich das H₂O/Phenol/Chloroform-Gemisch in mehrere Phasen auf. Die obere, wässrige Phase wurde entnommen und mit 150 µl Chloroform gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit. Die obere Phase wurde daraufhin erneut in ein steriles Reagenzgefäß überführt und in 150 µl Isopropanol aufgenommen. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde die RNA bei -20 °C ausgefällt und durch eine Zentrifugation über 20 Minuten bei 4 °C pelletiert. Das mRNA-Pellet wurde anschließend in 20 µl nukleasefreiem H₂O gelöst und in 1 µl Fraktionen aliquotiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung der bei -80 °C.

Inkubationsexperimente

Mit Hilfe von Inkubationsexperimenten können die Auswirkungen spezifischer Chemikalien auf die Embryonalentwicklung des Krallenfrosches festgestellt und weiterführend analysiert werden.

Bis zur Durchführung der Inkubationsexperimente wurden Embryonen in 0,1x MBSH kultiviert und durch einen Proteinase K Verdau von 5 Minuten (10 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K in 0,1x MBSH) von ihrer Vitellinmembran befreit und dieser im Anschluß durch mehrere Waschschrirte mit 0,1x MBSH unterbunden. Mit dem Erreichen des für die Inkubation vorgesehenen Entwicklungsstadiums konnten die Embryonen in gläserne Petrischalen überführt werden, die zuvor mit definierter Inkubationslösung befüllt worden waren. Die zur Inkubation verwendeten Chemikalien wurden, im Falle der Wasserlöslichkeit, in MBSH gelöst. Für hydrophobe Stoffe diente Dimethylsulfoxid als organisches Lösungsmittel, das im Weiteren mit 0,1x MBSH verdünnt wurde. Mit Erreichen des Zielstadiums wurden die Embryonen fixiert und weiter prozessiert.

Für Inkubationsexperimente verwendete HDAC Inhibitor:

Tubastatin A Hydrochlorid

(N-Hydroxy-4-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrido(4,3-b) indol-5-ylmethyl) benzamid hydrochlorid, $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2 \times \text{HCl}$, löslich in DMSO. Kommerziell erhältlich; Sigma Aldrich.

Flowanalyse

Die Analyse der Geschwindigkeit und Direktionalität des ciliengenerierten Flüssigkeitsstroms dient dazu den möglichen Einfluss einer experimentellen Manipulation auf diesen nachzuvollziehen. Entsprechend der in (Schweickert et al., 2007; Vick et al., 2009) publizierten Methodik wurde dieser gemessen und im Einzelfall bestimmt.

Luciferase Reporter Assay

Das Luziferase Reporter Assay dient dazu mit Hilfe von Reporterkonstrukten promotorabhängige, transkriptionelle Aktivität bestimmter Zielgene -bzw. Signalwegs Aktivität in Zellen, bis hin zu ganzen Embryonen bestimmen. Hierbei befindet sich ein regulatives Element (Promotor, artifizielle Transkriptionsfaktorbindestellen) vor einem für die Luziferase des Glühwürmchens codierenden open reading frame. Die Aktivität des zu Untersuchenden Signalwegs führt zu einer Akkumulation der Luziferase, die nach Zugabe ihres Substrats ein Lumineszenzsignal emittiert. Dieses Signal kann maschinell gemessen und Koexpression durch ein Kontrollkonstrukt normiert werden.

Um den Einfluss des Funktionsverlusts von *hdac6* auf den Wnt-Signalweg in *Xenopus* Embryonen zu untersuchen wurden zusätzlich zum SBMO / KoMO ein durch aktives kanonisches Wnt Signaling aktivierbares Reporterkonstrukt (BAR-GL) im Verhältnis (1:1) (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$) zum Kontroll-/Normierungskonstrukt (Renilla-Luziferase) im Bereich des animalen Pols 4 bzw. 8 zelliger Embryonen injiziert und die Embryonen bis zur Probenentnahme ihrer Entwicklung überlassen. Pro Ansatz wurden Dorsale Explantate von 7 Embryonen im St. 14 präpariert, zusammengefasst und unter Zusatz von 100 μl Passive Lysis Buffer unter Mazeration durch pipettieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Eppendorf-Reaktionsgefäßen lysiert. Im Anschluß erfolgten 2 Zentrifugationsschrirte für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit. Die resultierenden Überstände wurden jeweils überführt und final in 96-Well-Plates übertragen. Die Messung des Lumineszenzsignals erfolgte im Luminometer in Triplikaten und wurde durch LARII (Luziferase) sowie Stop'n'Glow (Renilla) ausgelöst bzw. abgestoppt (75 μl je Reagenz) (Ohkawara und Niehrs, 2011).

Verwendete Reporterkonstrukte

BAR-GL	Aktivität: kanonischer Wnt-Signalweg	Biechele und Moon 2008
FOXJ1-GL	Forkhead Box J1; humaner Promotor	Didon et al., 2013
HDAC6 -GL	Histoneacetylase 6; humaner Promotor (Fragment)	Birdsey et al., 2012
Renilla-TK	Normierungskonstrukt	Promega

Immunfluoreszenz *Xenopus laevis*

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann durch ein antikörpervermitteltes Fluoreszenzsignal die Lokalisierung von Proteinen in Embryonen aufgeklärt werden. Zur Visualisierung motiler Cilien auf den Zellen der GRP wurden Embryonen der Entwicklungsstadien 17-18 bzw. St. 30-35 für 1 Stunde auf dem Taumelroller mit 4% PFA (in PBS⁻) fixiert. Die Fixierung wurde durch PBS⁻ Waschröte (2x 15 Minuten) beendet und die Embryonen zur Präparation Dorsaler-Expantate (Schweickert et al. 2007) in Agaroseschälchen überführt. Im Anschluß an die Präparation wurde die Embryonen in für 2x 15 Minuten in PBS/TritonX (0,1%) bei 4 °C gewaschen. Um eine fehlerhafte Bindung des Primären Antikörpers zu vermeiden wurden die Embryonen in CAS-Block (1:10 CAS in PBS/TritonX) überführt und über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Um die spezifische Antikörperbindung herbeizuführen wurden der CAS-Block durch 200 µl Antikörper-Mix ersetzt (primärer Antikörper in CAS-Block 100%). Die Antikörper-Reaktion erfolgt über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplatte. Um den primären Antikörper zu entfernen musste der Antikörper-Mix durch PBS ersetzt und 3x 15 Minuten bei Raumtemperatur ausgewaschen werden. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers (sekundärer Antikörper in unverdünntem CAS-Block) konnte der vorab gebundene primäre Antikörper detektiert und auf diese Weise das Zielprotein nachgewiesen werden. Vor der Detektion des Fluoreszenzsignals unter dem Laser Scanning Microscope musste der sekundäre Antikörper ebenfalls für einen Zeitraum von 3x 15 Minuten mit PBS ausgewaschen werden.

Immunfluoreszenz *Paracentrotus lividus*

Alle Schritte der Seeigel-Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgten in Eppendorf-Reagenzgefäßen. Dents' fixierte Seeigelembryonen wurden durch eine Methanol-Reihe (75%, 50%, 25%) in PBS überführt. Nach einer Äquibrierung über 5 Minuten wurden die Embryonen, um den Medienwechsel zu erleichtern, mit der Tischzentrifuge für einige Sekunden abzentrifugiert. Anschließend erfolgten 3x5 Minuten Waschröte in PBS/TritonX (0,1%). Im PBS gefüllten Eppendorf-Reagenzgefäß sanken fixierte Seeigelembryonen auf Grund der Schwerkraft innerhalb weniger Minuten ab und mussten nicht mehr abzentrifugiert werden. Vor der Antikörperbindung wurde Embryonen für 30 Minuten in 1:10 PBS/TritonX (0,1%): Cas-Block (100%) geblockt und anschließend die Blocking-Reagenz durch Antikörper-Mix ersetzt (Anti-Hdac6(Maus) 1:250 in 100% Cas) Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C auf Schüttelplatte. Nach 3x15 Minuten Auswaschen des primären Antikörpers mit PBS erfolgte die Detektion des primären Antikörpers durch den entsprechenden sekundären sowie chromophoregekoppelten Antikörper (Anti-Maus; Cy3). Vor der Analyse des Fluoreszenzsignals wurde der sekundäre Antikörper 3x10 Minuten mit PBS ausgewaschen. Für Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Block-, Binde- und Waschröte erneut ausgeführt. Um mögliche Kreuzreaktionen mit dem gegen acetyliertes Tubulin gerichteten primären Antikörper zu vermeiden wurde die antikörpervermittelte Hdac6-Protein Detektion immer als erste Reaktion und nie zeitgleich mit einem weiteren primären Antikörper durchgeführt. Die Zellkernfärbung wurde durch DAPI (Roche) erzielt.

Phalloidin Färbung

Die Phalloidin-Färbung wird verwendet um Aktinfilamente des Zytoskeletts durch Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren. Bei Phalloidin handelt es sich um ein stark toxisches Phallotoxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und besteht aus sieben cyclisch angeordneten Aminosäuren. Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurde ein mit einer Alexa 488 Fluorophore konjugiertes Phalloidin verwendet. Um das filamentäre Aktin der embryonalen Zellen in *Xenopus laevis* zu färben wurde das Phalloidin 1:50 in PBS⁻ verdünnt und für mindestens 1 Stunde oder über Nacht bei RT auf einer Schüttelplatte inkubiert und im Anschluß 3x15 Minuten bei RT mit PBS⁻ gewaschen.

Verwendete primäre Antikörper und deren Konzentration

Antikörper	Konz.	Reaktivität	Fixierung	Spezies
Anti-Acetyliertes - α -Tubulin	1:700	<i>Xenopus laevis</i> <i>Paracentrotus lividus</i>	Dents' 4% PFA	Maus
Anti-HDAC6	1:250	<i>Xenopus laevis</i> <i>Paracentrotus lividus</i>	Dents'	Maus

Verwendete sekundäre Antikörper und deren Konzentration

Antikörper	Konz.	Spezies
CY3	1:250	Maus
Alexa488	1:250	Maus

Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

Um mRNA aus Embryonen zu isolieren wurden 2 Embryonen des ausgewählten Entwicklungsstadiums (10 animale Kappen) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Trizol überschichtet und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden die Embryonen durch Pipettieren mazeriert und erneut für 10 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 200 μ l Chloroform und 15 sekündigem vortexten erfolgte eine Inkubation über 5 Minuten auf Raumtemperatur. Darauf folgend wurde das Mazerat für 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und die resultierende obere, wässrige Phase in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Weiteren auf Eis gelagert. Die abgenommene, wässrige Phase wurden mit 500 μ l Isopropanol vermischt und für 10 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert. Um die ausfallende RNA zu pelletieren erfolgte eine Zentrifugation über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 4 °C. Das resultierende RNA-Pellet wurde in 20 μ l sterilem H₂O aufgenommen, zur cDNA Synthese verwendet oder bei -80 °C gelagert.

cDNA Synthese**Volumen Reagenz**

1 µg RNA
 0,5 µl Random Hexamer Oligonukleotide (250ng)
 y µl H₂O, auf 14 µl einstellen
 5 Minuten bei 70 °C inkubieren und dann auf Eis kühlen

5 µl 5x M-MLV RT Puffer
 1,25 µl 10mM dNTPs
 3,75 µl H₂O
 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase

10 Minuten auf RT inkubieren
 60 Minuten bei 42 °C inkubieren
 15 Minuten bei 70 °C inkubieren um die RT-Reaktion zu stoppen
 Lagerung der cDNA bei -20 °C

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion dient zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente. Das Reaktionsgemisch wurde nach Standardprotokoll erstellt. Jede Probe enthielt folgende Komponenten:

Volumen Reagenz

x µl cDNA
 5,0 µl 5x Taq Puffer (500 mM KCl, 15mM Mg₂Cl₂, 100 mM Tris-HCl; pH 9)
 2,5 µl 2mM dNTPs
 1,0 µl 10mM forward Primer; spezifisch für das jeweilige Amplikon
 1,0 µl 10mM revers Primer; spezifisch für das jeweilige Amplikon
 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase oder Pfu-DNA-Polymerase
 y µl H₂O, auf 25 µl einstellen

Amplifikationsreaktion im Thermocycler

Zur Amplifikation der DNA wurde folgendes Standardprotokoll zur Programmierung des Thermocyclers verwendet. Abhängig von der Länge des zu vermehrenden DNA Fragments wurden Änderungen bezüglich der Elongationszeit vorgenommen.

- | | |
|--|---|
| 1. Denaturierung der Matrizen DNA | 60 Sekunden / 95 °C; einmalig |
| 2. Denaturierung der Matrizen DNA | 30 Sekunden / 95 °C |
| 3. Anlagerung der Primerpaare | 30 Sekunden / 55-65 °C; je nach Schmelztemperatur |
| 4. Polymerisierung des DNA-Fragments | 30Sek -mehrere Minuten / 72 °C; je Fragmentlänge |
| 5. Zyklische Wiederholung der Schritte 2-4 | 35 Zyklen |
| 6. Ende der PCR-Reaktion | Entnahme der Proben / Lagerung bei 8 °C |

Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Um DNA Fragmente anhand ihrer spezifischen Länge nach der Amplifikation durch PCR oder nach erfolgtem Restriktionsverdau zu identifizieren dient die Technik der Gelelektrophorese. Hierzu werden Nukleotide auf Grund ihrer negativen Partialladung entlang eines Elektrischen Feldes durch eine Gelmatrix entlang ihrer Fragmentgröße und der daraus resultierenden differenziellen Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt. In der Durchführung wurden 1-1,5%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 1g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf Handwärme mit einem interkalierenden DNA Marker wie Ethyidium-Bromid oder PeqGreen versetzt. Aufzutrennende DNA/RNA Proben mussten mit Laufpuffer vermischt (zB. 1 µl DNA-Mix, 8 µl H₂O, 1 µl 10x Laufpuffer), auf das Gel aufgetragen und mit 1x TAE Laufpuffer überschichtet werden. Nach Anlegen einer Spannung von 50-120V erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Probe und deren Fotodokumentation. Als Längenstandard wurde das mit dem Restriktionsenzym *Pst* verdaute Genom des Bakteriophagen Lambda verwendet.

Photometrische Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Um definierte Mengen an Nukleinsäuren in experimentelle Reaktionen einsetzen zu können muss deren Stoffkonzentration in Lösung bestimmt, sowie deren Reinheitsgrad ermittelt werden. Konzentrationsmessungen von gelöster DNA/RNA wurden anhand der spezifischen Absorption von UV-Licht dieser Stoffe in einem Biophotometer bestimmt (Eppendorf). Als Referenz diente der Absorptionswert des Lösungsmittels. Zur Ermittlung des Reinheitsgrades wurde das Extinktionsverhältnis aus der Absorption bei 260nm/280nm Wellenlänge ermittelt.

Herstellung Kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien werden benötigt um Plasmid-DNA zu amplifizieren und ggf. zu selektieren. Zur Herstellung je eines Ansatzes wurden Bakterien vom Typ XL1blue in 2,5 ml LB oder SOC-Medium gepickt und über Nacht bei 37 °C im Inkubator vermehrt. 1ml der Übernachtskultur diente dazu 100 ml SOC-Medium anzupfropfen und bis zu einer OD von 0,55-0,66 (590nm) wachsen zu lassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 3.000 rpm auf 4 °C für 5 Minuten. Im Anschluß wurde das Pellet vorsichtig in 80 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und im Anschluß für 5 Minuten inkubiert. Wiederum erfolgte eine Zentrifugation bei 3.000 rpm auf 4 °C für 5 Minuten. Das resultierende Pellet wurde in 8 ml eiskaltem TFB2 resuspendiert und anschließend 50 Minuten auf Eis inkubiert. Je 100µl wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der chemisch-kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Um Plasmide selektieren oder vermehren zu können müssen diese in Bakterien transformiert werden. Zur Durchführung wurden zu 100 µl kompetenter Bakterien-Stocks aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und Eis aufgetaut. Für die Transformation eines Ligationsansatzes mussten 5 µl Ligations-Mix, für die Re-Transformierung eines Plasmids, der Plasmidsammlung 1-3 µl zu der Bakterienlösung pipettiert werden. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Im Anschluß daran erfolgte ein Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42 °C und eine direkte Abkühlung von 2 Minuten auf Eis. Zum Ausplattieren wurden den Transformationsansätze 400 µl, zur Massenvermehrung 1ml SOC-Medium hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und im Folgenden ausplattiert.

Vermehrung von Plasmid DNA

Um eine Mengenvermehrung des Plasmids durchzuführen wurden 100 ml LB-Kulturmedium mit 1ml transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator vermehrt. Entsprechend der plasmidvermittelten Resistenz wurde das Medium mit einem selektiven Antibiotikum versehen und bis zum Verbrauch bei 4 °C gelagert. Nach erfolgreicher Vermehrung wurde die Bakterienlösung in Zentrifugenbecher überführt, zentrifugiert (4.000 rpm für 10 Minuten) und der Überstand verworfen. Entsprechend der Anleitung des verwendeten Kits (Pure Yield™ Plasmid Midiprep-System; Promega) erfolgte die Resuspension, Lyse und Neutralisierung der Bakterienlösung. Das Plasmid konnte im Anschluß über eine Säule aufgereinigt und durch Zugabe von 500 µl H₂O_{dd} eluiert werden.

Restriktionsverdau

Durch Restriktionsverdau können Plasmide identifiziert werden, die definierte DNA-Fragmente tragen. Zur Durchführung eines Restriktionsverdau wurden 1 µg DNA eingesetzt. Der Reaktionsmix setzte sich aus 0,5 µl Restriktionsenzym (x), 2 µl 10x Puffer (x) sowie 0,2 µl 100x BSA zusammen, der mit H₂O_{dd} auf 20 µl eingestellt wurde. Der Verdau fand für mindestens 2h / über Nacht bei 37 °C statt.

Linearisierung und Aufreinigung von Plasmid DNA**Volumen Reagenz**

20 µg Plasmid DNA
 10 µl 10x Puffer (x)
 1,0 µl 100x BSA
 5,0 µl Enzym (x)
 y µl (100) H₂O (auf 100 µl auffüllen)
 über Nacht bei 37 °C inkubieren
 zu jedem Ansatz werden pipettiert

Volumen Reagenz

10 µl 5M NH₄Acetat
 220 µl 100% ETOH

Mindesten 15 Minuten auf bei -20 °C inkubieren
 Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (4 °C) für 20 Minuten
 Überstand verwerfen
 DNA Pellet in 20 µl H₂O_{dd} resuspendieren (ergibt ca.0,5 µg/µl)
 Bei -20 °C lagern

Puffer und Medien in alphabetischer Reihenfolge**AP1**

20 ml 5M NaCl
 100 ml 0,1M Tris (pH 9,5)
 50 ml 1M MgCl₂
 H₂O_{dd}; 1000 ml Endvolumen
 pH 9,5

Blocking

100 ml inaktiviertes Ziegen Serum (30 min bei 56 °C im Wasserbad)
 10 g Boehringer Block
800 ml 1xPBS⁻ 1h 70 °C
 1000 ml Endvolumen
 1 ml Tween
 Lagerung bei -20 °C

4% Ficoll Injektionslösung

20 g Ficoll (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer)
 1000 ml 1xMBSH
 pH 7,4
 Lagerung bei 4 °C

Gelatine-Albumin / VIB-Mix

2,2 g Gelatine
450 ml 1xPBS 65 °C lösen
 135 g Albumin (Rind)
 90 g Saccharose
 Lagerung bei -20 °C

Gurdons'-Injektionspuffer

88mM NaCl
 15mM C₈H₁₈N₂O₄S (Hepes)
 1mM KCl
 15mM Tris-HCl
 pH 7,6

Hyb-Mix

1 g Torula RNA; in 100 ml H₂O_{dd} bei 65 °C für etwa 1 Stunde gelöst
 10 g Boehringer Block
 500 ml CH₃NO
250 ml 20xSSC 1h 65 °C
 120 ml H₂O_{dd}
 100 ml Torula RNA
 2 ml Heparin (100mg in 1xSSC)
 10 ml 0,5M C₁₀H₁₆N₂O₈ (EDTA)
 1g C₃₂H₅₈N₂O₇S · xH₂O (CHAPS; in 10ml H₂O_{dd})
 5 ml Tween
 Lagerung bei -20 °C

LB-Medium

40 g Trypton
 20 g Hefeextrakt
 40 g NaCl
 3000 ml H₂O_{dd} / Endvolumen 4000 ml
 pH 7,0
 vor Benutzung autoklavieren
 Lagerung bei Raumtemperatur

1x MAB

11,607 g C₄H₄O₄
 30 ml 5M NaCl
 800 ml H₂O_{dd} / Endvolumen: 1000 ml
 pH 7,4
 Lagerung bei Raumtemperatur

5x MBSH

25,7 g NaCl
 0,375 g KCl
 1 g NaHCO₃
 1 g MgSO₄ x 1H₂O
 0,39 g Ca(NO₃)₂ x 4H₂O
 0,3 g CaCl x 2H₂O
 11,9 g C₈H₁₈N₂O₄S (Hepes)
 800 ml H₂O_{dd} / Endvolumen: 1000 ml
 pH 7,4
 vor Benutzung steril filtrieren
 5 ml PenStrep nach Filtrierung zugeben
 Lagerung bei 4 °C

10x MEMFA

418,6 g C₇H₁₅NO₄S (MOPS)
 38,035 g C₁₄H₂₄N₂O₁₀(EGTA)
 246,48 g MgSO₄
 800 ml H₂O_{dd} / Endvolumen: 1000 ml
 pH 7,4
 Lagerung bei Raumtemperatur

Mowiol

30 g Mowiol
 120 ml PBS⁻
Über Nacht unter Rühren bei 65 °C lösen
 75 ml Glycerin
 1 kleinen Kristall Thymol
 Steril Filtrieren
 Lagerung bei 4 °C

10x PBS⁻ / Stocklösung

80 g NaCl
 2 g KCl
 14,4 g Na₂HPO₄
 2,4 g KH₂PO₄
 800 ml H₂O_{dd} / Endvolumen: 1000ml
 pH 7,4
 vor Benutzung autoklavieren
 Lagerung bei Raumtemperatur

4% PFA-Fixierlösung

4 g CH₂O (Paraformaldehyde)
 100 ml H₂O_{dd}
 (für Immunofluoreszenz PBS⁻)
 Lagerung bei -20 °C

20x SSC / Stocklösung

175,3 g NaCl
 88,2 g C₆H₅Na₃O₇
 800ml H₂O_{dd} / Endvolumen: 1000 ml
 pH 7,0
 vor Benutzung autoklavieren
 Lagerung bei Raumtemperatur

50x TAE

484g C₄H₁₁NO₃ (Tris base)
 114,2 ml C₂H₄O₂ (Eisessig)
 100 ml 0,5M C₁₀H₁₆N₂O₈ (EDTA)
 1500 ml H₂O_{dd} / Endvolumen: 2000 ml
 pH 8,5
 Lagerung bei Raumtemperatur

TFB1 (100ml)

1M RbCl₂ 10 ml
 1M MnCl₂ 5 ml
 1M KAC 3 ml
 1M CaCl₂ 1 ml
 Glycerin 15 ml
 H₂O 66 ml
 mit konzentrierter HCl auf pH 5,8 einstellen.
 steril filtrieren

TFB2 (100ml)

1M MOPS (pH 6,5 mit KOH, 1N) 1 ml

1M RbCl₂ 1 ml1M CaCl₂ 7,5 ml

Glycerin 15 ml

H₂O 75,5 ml

steril filtrieren

Material	Bezugsquelle
Agar	AppliChem
Agarose LE	Genaxxon Bioscience
Albumin Fraktion V (BSA)	AppliChem
Alcian Blau 8GX	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma
Ampicap TM SP6 High Yield Message Machine Kit	Ambion
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	Roche
BM-Purple AP Substrat	Roche
Blocking Reagent	Roche
CAS-Bock TM	AppliChem
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth
Calciumnitrat	Sigma
CHAPS	AppliChem
Chloroform	Roth
Cystein	Roth
Deckgläser	Roth
Desoxynukleotidtriphosphate	Promega
Dimethylsulfoxid	Roth
Dithiotreitol	Promega
DNA Purification Kit	Promega
Dual Glow Luciferase Assay	Promega
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure / EDTA	Roth
Ethylenguanintetraessigsäure / EGTA	Roth
Ethyl-p-Aminobenzoat / Benzocain	Sigma
Ficoll	Roth
F10 Nutrient Medium	Gibco
Feinfilter	Whatman

0,5 μ m Fluospheres	Molecular Probes
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Gelatine	Merck
Gentamycin	Biochrome
Glaswaren	Schott
Glucose	Roth
Glutaraldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
HCG, humanes Choriongonadotropin	Sigma
HCl / Salzsäure	Merck
Hefeextrakt	Roth
Hefe-RNA / Torula	Sigma
Heparin	AppliChem
Hepes	AppliChem
Hoechst 33342	Molecular Probes
Injektionsnadel, Sterican (0,4 x 20 mm; Gr. 20)	B. Braun
Injektionsspritzen F1, 1ml	B. Braun
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumgluconat	Sigma
Ladepuffer 10x	AppliChem
Lambda Pst	Promega
Ligase / T4	Promega
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Methylcellulose	Sigma
Morpholino Oligonukleotide	Genetools
Mowiol	Hoechst
Natriumacetat	Roth
Natriumcarbonat	Merck
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat / SDS	Roth

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumgluconat	AppliChem
Natriumtetraborat	Roth
Objektträger	Roth
Oligonukleotide	Sigma
Paraformaldehyd / PFA	Roth
PBS ⁺	Gibco
Petrischalen	Greiner
Penstrep	Gibco
pGEM [®] -T-Easy-Vektor	Promega
Phenol/Chloroform	Roth
Pipetten / Einweg 1ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Proteinase K	Roth
Reaktionsgefäße	Eppendorf / Sarstedt
Restriktionsenzyme / Puffer	Promega
RNAse - Inhibitor	Promega
Sacharose	Appllichem
Sp6 / T7 RNA-Polymerase	Promega
Taq DNA-Polymerase	Promega
Trifast PeqGold	Peqlab Biotech
Tris	AppliChem
Triton X-100	Roth
Trypsin	Roth
Trypton	AppliChem
Tween 20	Roth
Zigenserum	Gibco
96 Well Plates, schwarz	Brandplates
PLI-100 / Injektionsgerät	Harvard Apparatus
Stemi 2000-C / Steriomikroskop	Zeiss
MK1 / Mikromanipulator	Singer Instruments
KL 1500 LCD / Kaltlichtleuchte	Zeiss
VT 1000S / Vibratom	Leica
Thermomix compact / Thermoblock	Eppendorf

Peqstar / PCR- Cylcer	Peqlab Biotech
Glomax / Explorer / Luminometer	Promega
LSM 700 / Laserscanning- Mikroskop	Zeiss
Discovery V12 / Fotobinokular	Zeiss
Axiocam Hsm & Hcr / Digitalkamera	Zeiss
Axioskope 2 / Mikroskop	Zeiss
Model P-87 / Kapilarenmaschiene	Sutter Instrument Co

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ac.Tuba4a	acetyliertes alpha Tubulin
ADPKD	Autosomal Dominante Poyzystische Nierenerkrankung
AS	Aminosäure
ATGMO	Translation-blocking Morpholino Oligomer
bzw.	beziehungsweise
<i>cd133</i>	<i>cd133/prominin1</i> ; Gen; <i>X.I.</i>
<i>cyld</i>	<i>cylindromatosis</i> ; Gen; Genopus
CYLD	Cylindromatosis; Gen; allgemein
DA	Doppelachse
<i>dand5</i>	<i>DAN domain family member 5, BMP antagonist</i> ; Gen; <i>X.I</i>
DD	Deacetylase Domäne
dl	dorsal-links
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dr	dorsal-rechts
<i>D.r.</i>	<i>Danio rerio</i>
<i>en2</i>	<i>engrailed 2</i> ; Gen; <i>X.I.</i>
et al.,	und andere
<i>foxj1</i>	<i>forkhead box j1</i> ; Gen, <i>X.I.</i>
FOXJ1	Forkhead box J1; Gen; allgemein
GFP	green fluorescent protein
GOF	gain of function
GRP	Gastrocoel Roof Plate
<i>gsk3β</i>	<i>glykogensynthasekinase 3β</i> ; Gen; <i>X.I.</i>
HDAC	Histondeacetylase allgmein.
<i>hdac6</i>	<i>histondeacetylase 6</i> ; Gen; <i>X.I und P.I.</i>
Hdac6	Histondeacetylase 6; Protein; <i>X.I und P.I.</i>
<i>Hdac6</i>	<i>Histondeacetylase 6</i> ; Gen; M.m.
HDAC6	Histondeacetylase 6; Protein; M.m
<i>HDAC6</i>	<i>Histondeacetylase 6</i> ; Gen; H.s.
<i>hdac10</i>	<i>histondeacetylase 10</i> ; Gen; <i>X.I und P.I.</i>
Hdac10	Histondeacetylase 10; Protein; <i>X.I und P.I.</i>
<i>Hdac10</i>	<i>Histondeacetylase 10</i> ; Gen; M.m.
HDAC10	Histondeacetylase 10; Protein; M.m
<i>HDAC10</i>	<i>Histondeacetylase 10</i> ; Gen; H.s.
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
hypGRP-Zellen	hypochordale GRP-Zellen
Ko	Kontrolle
KoMO	Kontroll-Morpholino Oligomer
<i>lefty</i>	<i>left-right determination factor</i> ; Gen; <i>X.I.</i>
LOF	loss of function

LPM	Lateral Plate Mesoderm
μ l	mikroliter
mM	mikromolar
MO	Morpholino Oligomer
nM	nanomolar
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
<i>nodal1</i>	<i>nodal homolog1</i> ; Gen; <i>X.l.</i>
noGRP-Zellen	notochordale GRP-Zellen
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man / Datenbank
<i>pax6</i>	<i>paired box 6</i> ; Gen; <i>X.l.</i>
<i>P.l.</i>	<i>Paracentrotus lividus</i>
PKD1	Polycystin 1, Gen, allgemein
PC1	Polycystin 1; Protein; allgemein
PKD2	Polycystin 2; Gen; allgemein
<i>pkd2</i>	<i>polycystin 2</i> ; Gen; <i>X.l.</i>
PC2	Polycystin 2; Protein, allgemein
PCLD	Pocystisches Lebersyndrom
<i>pitx2c</i>	<i>paired like homeodomain 2</i> ; Gen; <i>X.l.</i>
LRO	Links-Rechts Organisator
<i>M.m.</i>	<i>Mus musculus</i>
RLU	Relative Luziferase Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
SBMO	Splice-binding Morpholino Oligomer
<i>Si. so</i>	<i>Situs solitus</i>
<i>Si. inv</i>	<i>Situs inversus</i>
SM	Superfizielles Mesoderm
somGRP-Zellen	somitische GRP-Zellen
St.	Stadium
Tcf/LeF	Transkriptionsfaktor- Familie
Tub A	Tubastatin A
u. a.	unter anderem
vl	ventral-links
vr	ventral-rechts
<i>X.l.</i>	<i>Xenopus laevis</i>
z. T.	zum Teil

- Adams, D.S., Robinson, K.R., Fukumoto, T., Yuan, S., Albertson, R.C., Yelick, P., Kuo, L., McSweeney, M., and Levin, M. (2006). Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* *133*, 1657–1671.
- Afzelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* *193*, 317–319.
- Aldana-Masangkay, G.I., and Sakamoto, K.M. (2011). The role of HDAC6 in cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* *2011*, 875824–10.
- Antic, D., Stubbs, J.L., Suyama, K., Kintner, C., Scott, M.P., and Axelrod, J.D. (2010). Planar Cell Polarity Enables Posterior Localization of Nodal Cilia and Left-Right Axis Determination during Mouse and *Xenopus* Embryogenesis. *PLoS ONE* *5*, e8999–8.
- Aw, S., Adams, D.S., Qiu, D., and Levin, M. (2008). H,K-ATPase protein localization and Kir4.1 function reveal concordance of three axes during early determination of left-right asymmetry. *Mechanisms of Development* *125*, 353–372.
- Bellmeyer, A., Krase, J., Lindgren, J., and LaBonne, C. (2003). The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in *xenopus*. *Developmental Cell* *4*, 827–839.
- Belo, J.A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., and De Robertis, E.M. (1997). Cerberus-like is a secreted factor with neuralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mechanisms of Development* *68*, 45–57.
- Bestman, J.E., Huang, L.-C., Lee-Osbourne, J., Cheung, P., and Cline, H.T. (2015). An in vivo screen to identify candidate neurogenic genes in the developing *Xenopus* visual system. *Developmental Biology* *408*, 269–291.
- Beyer, T. (2011). The role of serotonin and gap junctions in left-right development of *Xenopus laevis*. Dissertation.
- Beyer, T., Danilchik, M., Thumberger, T., Vick, P., Tisler, M., Schneider, I., Bogusch, S., Andre, P., Ulmer, B., Walentek, P., et al. (2012a). Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* *22*, 33–39.
- Beyer, T., Thumberger, T., Schweickert, A., and Blum, M. (2012b). Connexin26-mediated transfer of laterality cues in *Xenopus*. *Biol Open* *1*, 473–481.
- Biechele, T.L., and Moon, R.T. (2008). Assaying β -Catenin/TCF Transcription with β -Catenin/TCF Transcription-Based Reporter Constructs. In *Wnt Signaling*, (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 99–110.
- Bilic, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., and Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* *316*, 1619–1622.
- Birdsey, G.M., Dryden, N.H., Shah, A.V., Hannah, R., Hall, M.D., Haskard, D.O., Parsons, M., Mason, J.C., Zvelebil, M., Gottgens, B., et al. (2012). The transcription factor Erg regulates expression of histone deacetylase 6 and multiple pathways involved in endothelial cell migration and angiogenesis. *Blood* *119*, 894–903.
- Blitz, I.L., Biesinger, J., Xie, X., and Cho, K.W.Y. (2013). Biallelic genome modification in *Xenopus tropicalis* embryos using the CRISPR/Cas system. *Genesis* *51*, 827–834.
- Blum, M., Feistel, K., Thumberger, T., and Schweickert, A. (2014a). The evolution and conservation of left-right patterning mechanisms. *Development* *141*, 1603–1613.

- Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., Bogusch, S., Beyer, T., van Straaten, H.W.M., and Viebahn, C. (2007). Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* *75*, 133–146.
- Blum, M., Beyer, T., Weber, T., Vick, P., Andre, P., Bitzer, E., and Schweickert, A. (2009a). *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry. *Dev. Dyn.* *238*, 1215–1225.
- Blum, M., De Robertis, E.M., Wallingford, J.B., and Niehrs, C. (2015). Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Developmental Cell* *35*, 145–149.
- Blum, M., Schweickert, A., Vick, P., Wright, C.V.E., and Danilchik, M.V. (2014b). Symmetry breakage in the vertebrate embryo: When does it happen and how does it work? *Developmental Biology* *393*, 109–123.
- Blum, M., Weber, T., Beyer, T., and Vick, P. (2009b). Evolution of leftward flow. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 464–471.
- Boskovski, M.T., Yuan, S., Pedersen, N.B., Goth, C.K., Makova, S., Clausen, H., Brueckner, M., and Khokha, M.K. (2013). The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality. *Nature* *504*, 456–459.
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., and Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* *26*, 5468–5476.
- Branford, W.W., and Yost, H.J. (2002). Lefty-dependent inhibition of Nodal- and Wnt-responsive organizer gene expression is essential for normal gastrulation. *Current Biology* *12*, 2136–2141.
- Brooks, E.R., and Wallingford, J.B. (2015). In vivo investigation of cilia structure and function using *Xenopus*. *Methods Cell Biol.* *127*, 131–159.
- Brueckner, M. (2007). Heterotaxia, Congenital Heart Disease, and Primary Ciliary Dyskinesia. *Circulation* *115*, 2793–2795.
- Butler, K.V., Kalin, J., Brochier, C., Vistoli, G., Langley, B., and Kozikowski, A.P. (2010). Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 10842–10846.
- Cao, Y., Semanchik, N., Lee, S.H., Somlo, S., Barbano, P.E., Coifman, R., and Sun, Z. (2009). Chemical modifier screen identifies HDAC inhibitors as suppressors of PKD models. *Pnas* *106*, 21819–21824.
- Carneiro, K., Donnet, C., Rejtar, T., Karger, B.L., Barisone, G.A., Diaz, E., Kortagere, S., Lemire, J.M., and Levin, M. (2011). Histone deacetylase activity is necessary for left- right patterning during vertebrate development. *BMC Developmental Biology* *11*, 1–19.
- Caron, A., Xu, X., and Lin, X. (2012). Wnt/ -catenin signaling directly regulates Foxj1 expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle. *Development* *139*, 514–524.
- Cebotaru, L., Liu, Q., Yanda, M., Boinot, C., Outeda, P., Huso, D.L., Watnick, T., Guggino, W.B., and Cebotaru, V. (2016). Inhibition of histone deacetylase 6 activity reduces cyst growth in polycystic kidney disease. *Kidney International* 1–10.
- Cebotaru, V., Cebotaru, L., Kim, H., Chiaravalli, M., Boletta, A., Qian, F., and Guggino, W.B. (2014). Polycystin-1 negatively regulates Polycystin-2 expression via the aggresome/autophagosome pathway. *J. Biol. Chem.* *289*, 6404–6414.

- Chang, M.-Y., and Ong, A.C.M. (2013). New treatments for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol* n/a–n/a.
- Chassaing, N., Siani, V., Carles, D., Delezoide, A.L., Alberti, E.M., Battin, J., Chateil, J.F., Gilbert-Dussardier, B., Coupry, I., Arveiler, B., et al. (2005). X-linked dominant chondrodysplasia with platyspondyly, distinctive brachydactyly, hydrocephaly, and microphthalmia. *Am. J. Med. Genet.* *136A*, 307–312.
- CHAUVEAU, D., FAKHOURI, F., and GRÜNFELD, J.-P. (2000). Liver Involvement in Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease Therapeutic Dilemma. *Jasn* *11*, 1767–1775.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* *325*, 834.
- Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *126*, 4213–4222.
- Chu, D., and Klymkowsky, M.W. (1989). The appearance of acetylated α -tubulin during early development and cellular differentiation in *Xenopus*. *Developmental Biology* *136*, 104–117.
- Chung, M.-I., Peyrot, S.M., LeBoeuf, S., Park, T.J., McGary, K.L., Marcotte, E.M., and Wallingford, J.B. (2012). RFX2 is broadly required for ciliogenesis during vertebrate development. *Developmental Biology* *363*, 155–165.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-Catenin Signaling and Disease. *Cell* *149*, 1192–1205.
- Crossen, W.R., Morsche, te, R.H.M., Hoischen, A., Gilissen, C., Chrispijn, M., Venselaar, H., Mehdi, S., Bergmann, C., Veltman, J.A., and Drenth, J.P.H. (2014). Whole-exome sequencing reveals LRP5 mutations and canonical Wnt signaling associated with hepatic cystogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 5343–5348.
- Corbit, K.C., Shyer, A.E., Dowdle, W.E., Gaulden, J., Singla, V., and Reiter, J.F. (2007). Kif3a constrains β -catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat. Cell Biol.* *10*, 70–76.
- De Robertis, E.M. (2009). Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. *Mechanisms of Development* *126*, 925–941.
- Didon, L., Zwick, R.K., Chao, I.W., Walters, M.S., Wang, R., Hackett, N.R., and Crystal, R.G. (2013). RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir. Res.* *14*, 70.
- Duboc, V., and Lepage, T. (2007). A conserved role for the nodal signaling pathway in the establishment of dorso-ventral and left–right axes in deuterostomes. *J. Exp. Zool.* *310B*, 41–53.
- Duboc, V., Röttinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L., and Lepage, T. (2005). Left-Right Asymmetry in the Sea Urchin Embryo Is Regulated by Nodal Signaling on the Right Side. *Developmental Cell* *9*, 147–158.
- Duncan, A.R., and Khokha, M.K. (2016). *Xenopus* as a model organism for birth defects- Congenital heart disease and heterotaxy. *Semin. Cell Dev. Biol.* *51*, 73–79.
- Eguether, T., Ermolaeva, M.A., Zhao, Y., Bonnet, M.C., Jain, A., Pasparakis, M., Courtois, G., and Tassin, A.-M. (2014). The deubiquitinating enzyme CYLD controls apical docking of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Commun* *5*, 4585.

- Eisen, J.S., and Smith, J.C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *135*, 1735–1743.
- Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* *132*, 1247–1260.
- Feistel, K., and Blum, M. (2006). Three types of cilia including a novel 9+4 axoneme on the notochordal plate of the rabbit embryo. *Dev. Dyn.* *235*, 3348–3358.
- Fiebig, M. (2016). Subzelluläre Proteinlokalisierung von Hdac6 in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Bachelor Thesis.
- Fietz, A. (2014). Expressionsanalyse der histondeacetylase 6 und deren Einfluss auf die Links-Rechts-Asymmetrie von *Xenopus laevis*. Bachelor Thesis.
- Fjelldal, P.G., Solberg, M.F., Hansen, T., Vågseth, T., Glover, K.A., and Kryvi, H. (2016). Salmonid fish: model organisms to study cardiovascular morphogenesis in conjoined twins? *BMC Developmental Biology* 1–10.
- Fukada, M., Hanai, A., Nakayama, A., Suzuki, T., Miyata, N., Rodriguiz, R.M., Wetsel, W.C., Yao, T.-P., and Kawaguchi, Y. (2012). Loss of Deacetylation Activity of Hdac6 Affects Emotional Behavior in Mice. *PLoS ONE* *7*, e30924.
- Fukumoto, T., Kema, I.P., and Levin, M. (2005). Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Current Biology* *15*, 794–803.
- Gao, C., Xiao, G., and Hu, J. (2014). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell & Bioscience* *2014* 4:1 4, 13.
- Gao, Y.S., Hubbert, C.C., and Yao, T.P. (2010). The Microtubule-associated Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Endocytic Trafficking and Degradation. *J. Biol. Chem.* *285*, 11219–11226.
- Gao, Y.S., Hubbert, C.C., Lu, J., Lee, Y.S., Lee, J.Y., and Yao, T.P. (2007). Histone Deacetylase 6 Regulates Growth Factor-Induced Actin Remodeling and Endocytosis. *Molecular and Cellular Biology* *27*, 8637–8647.
- Glinka, A., Delius, H., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1996). Combinatorial signalling by Xwnt-11 and Xnr3 in the organizer epithelium. *Mechanisms of Development* *60*, 221–231.
- Gomperts, B.N., Gong-Cooper, X., and Hackett, B.P. (2004). Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J. Cell. Sci.* *117*, 1329–1337.
- Gordon, M.D., and Nusse, R. (2006). Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 22429–22433.
- Goto, H., Inaba, H., and Inagaki, M. (2016). Mechanisms of ciliogenesis suppression in dividing cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–10.
- Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schlüter, O.M., Bradke, F., Lu, J., and Fischer, A. (2012). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* *5*, 52–63.

- Götze, S., Coersmeyer, M., Müöller, O., and Sievers, S. (2014). Histone deacetylase inhibitors induce attenuation of Wnt signaling and TCF7L2 depletion in colorectal carcinoma cells. *Int J Oncol* 1–9.
- Gradilone, S.A., Habringer, S., Masyuk, T.V., Howard, B.N., Masyuk, A.I., and LaRusso, N.F. (2014). HDAC6 Is Overexpressed in Cystic Cholangiocytes and Its Inhibition Reduces Cystogenesis. *The American Journal of Pathology* 184, 600–608.
- Gregoret, I., Lee, Y.-M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. 338, 17–31.
- Guardiola, A.R., and Yao, T.P. (2002). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Histone Deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* 277, 3350–3356.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles.
- Gurdon, J.B., and Hopwood, N. (2003). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10, 32–42.
- Hagenlocher, C., Walentek, P., M Ller, C., Thumberger, T., and Feistel, K. (2013). Ciliogenesis and cerebrospinal fluid flow in the developing *Xenopus* brain are regulated by foxj1. *Cilia* 2, 12.
- Hardwick, L.J.A., and Philpott, A. (2015). An oncologist's friend: How *Xenopus* contributes to cancer research. *Developmental Biology* 408, 180–187.
- Hashimoto, H., Rebagliati, M., Ahmad, N., Muraoka, O., Kurokawa, T., Hibi, M., and Suzuki, T. (2004). The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish. *Development* 131, 1741–1753.
- Heasman, J., Kofron, M., and Wylie, C. (2000). β Catenin Signaling Activity Dissected in the Early *Xenopus* Embryo: A Novel Antisense Approach. *Developmental Biology* 222, 124–134.
- Hibino, T., Ishii, Y., Levin, M., and Nishino, A. (2006). Ion flow regulates left-right asymmetry in sea urchin development. *Dev. Genes Evol.* 216, 265–276.
- Hirsch, N., and Harris, W.A. (1997). *Xenopus* Pax-6 and retinal development. *Journal of Neurobiology*.
- Hook, S.S., Orian, A., Cowley, S.M., and Eisenman, R.N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Pnas* 99, 13425–13430.
- Hopwood, N.D., Pluck, A., and Gurdon, J.B. (1989). A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59, 893–903.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Hudson, C., Clements, D., Friday, R.V., Stott, D., and Woodland, H.R. (1997). Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell* 91, 397–405.

- Iwaikawa, Y. (1967). Regeneration of cilia in the sea urchin embryo. *Embryologia*.
- Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A., and Kopito, R.R. (2005). HDAC6 and Microtubules Are Required for Autophagic Degradation of Aggregated Huntingtin. *J. Biol. Chem.* *280*, 40282–40292.
- Kaluza, D., Kroll, J., Gesierich, S., Yao, T.-P., Boon, R.A., Hergenreider, E., Tjwa, M., Rössig, L., Seto, E., Augustin, H.G., et al. (2011). Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *The EMBO Journal* *30*, 4142–4156.
- Kaufman, M.H. (2004). The embryology of conjoined twins. *Childs Nerv Syst* *20*, 1–18.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., and Ito, A. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggregate formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* *115*, 727–738.
- Keller, R.E., Danilchik, M., Gimlich, R., and Shih, J. (1985). The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* *89 Suppl*, 185–209.
- Keller, R., Davidson, L.A., and Shook, D.R. (2003). How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation* *71*, 171–205.
- Kim, E., Arnould, T., Sellin, L.K., Benzing, T., and Fan, M.J. (1999). The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 4947–4953.
- Kim, I., Ding, T., Fu, Y., Li, C., Cui, L., Li, A., Lian, P., Liang, D., Wang, D.W., Guo, C., et al. (2009). Conditional mutation of *Pkd2* causes cystogenesis and upregulates beta-catenin. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 2556–2569.
- Kim, S., Nie, H., Nesin, V., Tran, U., Outeda, P., Bai, C.-X., Keeling, J., Maskey, D., Watnick, T., Wessely, O., et al. (2016). The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nat. Cell Biol.* *18*, 752–764.
- Kinzel, D., Boldt, K., Davis, E.E., Burtscher, I., Trümbach, D., Diplas, B., Attié-Bitach, T., Wurst, W., Katsanis, N., Ueffing, M., et al. (2010). Pitchfork Regulates Primary Cilia Disassembly and Left-Right Asymmetry. *Developmental Cell* *19*, 66–77.
- Kjolby, R.A.S., and Harland, R.M. (2016). Genome-wide identification of Wnt/β-catenin transcriptional targets during *Xenopus* gastrulation. *Developmental Biology* 1–11.
- Ko, J.Y., and Park, J.H. (2013). Mouse models of polycystic kidney disease induced by defects of ciliary proteins. *BMB Reports* *46*, 73–79.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO Journal* *19*, 1176–1179.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J.M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.-P. (2005). HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell* *18*, 601–607.
- Kuroda, H., Wessely, O., and De Robertis, E.M. (2004). Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol* *2*, E92.
- Landgrebe, F.W., and Samson, L. (1944). The Hogben pregnancy test with a note on the breeding of *Xenopus* for the test. *BJOG*.

- Landua, S.-L. (2015). Der Einfluss von *hdac6* auf die LR - Achse in *Xenopus laevis*. Bachelor-Thesis.
- Langer, S., Jurczynski, K., Gessler, A., Kaup, F.-J., Bleyer, M., and Mätz-Rensing, K. (2014). Ischiopagus tripus conjoined twins in a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla*). *J. Comp. Pathol.* *150*, 469–473.
- Lee, Y.-S., Lim, K.-H., Guo, X., Kawaguchi, Y., Gao, Y., Barrientos, T., Ordentlich, P., Wang, X.-F., Counter, C.M., and Yao, T.-P. (2008). The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Research* *68*, 7561–7569.
- Lemaire, P., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (1995). Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* *81*, 85–94.
- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* *82*, 803–814.
- Levin, M., Roberts, D.J., Holmes, L.B., and Tabin, C. (1996). Laterality defects in conjoined twins. *Nature* *384*, 321–321.
- Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K.R., Nogi, T., and Mercola, M. (2002). Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* *111*, 77–89.
- Li, Y., Shin, D., and Kwon, S.H. (2013). Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *Febs J.* *280*, 775–793.
- Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.-P., and Comb, M.J. (2008). HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J. Biol. Chem.* *283*, 12686–12690.
- Lienkamp, S.S. (2016). Using *Xenopus* to study genetic kidney diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* *51*, 117–124.
- Lienkamp, S., Ganner, A., Boehlke, C., Schmidt, T., Arnold, S.J., Schäfer, T., Romaker, D., Schuler, J., Hoff, S., Powelske, C., et al. (2010). Inversin relays Frizzled-8 signals to promote proximal pronephros development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 20388–20393.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* *108*, 837–847.
- Liu, W., Fan, L.X., Zhou, X., Sweeney, W.E., Avner, E.D., and Li, X. (2012). HDAC6 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Endocytic Trafficking and Degradation in Renal Epithelial Cells. *PLoS ONE* *7*, e49418–12.
- Logan, C.Y., Miller, J.R., Ferkowicz, M.J., and McClay, D.R. (1999). Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Development* *126*, 345–357.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P., and Kuehn, M.R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* *381*, 158–161.
- Luo, T., Lee, Y.-H., Saint-Jeannet, J.-P., and Sargent, T.D. (2003). Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2 α . *Pnas* *100*, 532–537.

- Mak, A.B., Nixon, A.M.L., Kittanakom, S., Stewart, J.M., Chen, G.I., Curak, J., Gingras, A.-C., Mazitschek, R., Neel, B.G., Stagljar, I., et al. (2012). Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Reports* 2, 951–963.
- Malicki, J.J., and Johnson, C.A. (2016). The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology* 1–15.
- Mangold, O. (1920). Situs inversus bei Triton. 1–12.
- Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., and Belo, J.A. (2004). The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes & Development* 18, 2342–2347.
- Martz, L. (2011). Giving Treg cells a boost. *Science-Business eXchange* 4.
- Massé, K., Blanchard, C., Simon, D., Barillot, M., Helwi, P., Durand, C., Babin, P., Tingaud, A., Thiebaud, P., Thézé, N., Lacombe, D., Arveiler, B., (2012). *Xenopus laevis*, a model for studying the involvement of HDAC6 in a novel form of chondrodysplasia. AHG Meeting Abstract.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Berny, D.S., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal* 21, 6820–6831.
- Mayor, R., Morgan, R., and Sargent, M.G. (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. 121, 767–777.
- McClay, D.R., Morrill, J., and Hardin, J. (1991). Archenteron Morphogenesis in the Sea Urchin. *Cell-Cell Interactions in Early Development* 15–29.
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., and Brueckner, M. (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114, 61–73.
- McGrew, L.L., Takemaru, K., Bates, R., and 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, 21–32.
- Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W.S., Robertson, E.J., et al. (1999). Mouse Lefty2 and Zebrafish Antivin Are Feedback Inhibitors of Nodal Signaling during Vertebrate Gastrulation. *Molecular Cell* 4, 287–298.
- Mergen, M., Engel, C., Müller, B., Follo, M., Schäfer, T., Jung, M., and Walz, G. (2013). The nephronophthisis gene product NPHP2/Inversin interacts with Aurora A and interferes with HDAC6-mediated cilia disassembly. *Nephrol. Dial. Transplant.* 28, 2744–2753.
- Mitchell, B., Stubbs, J.L., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C., and Kintner, C. (2009). The PCP Pathway Instructs the Planar Orientation of Ciliated Cells in the *Xenopus* Larval Skin. *Current Biology* 19, 924–929.
- Moody, S.A. (1987). Fates of the blastomeres of the 16-cell stage *Xenopus* embryo. *Developmental Biology*.
- Morgan, D., Turnpenny, L., Goodship, J., Dai, W., Majumder, K., Matthews, L., Gardner, A., Schuster, G., Vien, L., Harrison, W., et al. (1998). Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the inv mouse. *Nature Genetics* 20, 149–156.

- Muller, J.K., Prather, D.R., and Nascone-Yoder, N.M. (2003). Left-right asymmetric morphogenesis in the *Xenopus* digestive system. *Dev. Dyn.* *228*, 672–682.
- Mutchinick, O.M., Luna-Muñoz, L., Amar, E., Bakker, M.K., Clementi, M., Cocchi, G., da Graça Dutra, M., Feldkamp, M.L., Landau, D., Leoncini, E., et al. (2011). Conjoined twins: A worldwide collaborative epidemiological study of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. *Am. J. Med. Genet.* *157*, 274–287.
- Nakamura, T., Saito, D., Kawasumi, A., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Dong, F., Takamatsu, A., Belo, J.A., Mochizuki, A., et al. (2012). Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of *Cerl2* mRNA. *Nat Commun* *3*, 1322.
- Nakayama, T., Fish, M.B., Fisher, M., Oomen-Hajagos, J., Thomsen, G.H., and Grainger, R.M. (2013). Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis* *51*, 835–843.
- Nascone, N., and Mercola, M. (1997). Organizer Induction Determines Left–Right Asymmetry in *Xenopus*. *Developmental Biology* *189*, 68–78.
- Nieuwkoop and Faber (1994) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* *418*, 96–99.
- Nusse, R., and 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*, 99–109.
- Ohkawara, B., and Niehrs, C. (2011). An ATF2-based luciferase reporter to monitor non-canonical Wnt signaling in *Xenopus* embryos. *Dev. Dyn.* *240*, 188–194.
- Otto, E.A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J.F., Hiller, K.S., Mueller, A.M., Ruf, R.G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., et al. (2003). Mutations in *INVS* encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nature Genetics* *34*, 413–420.
- Owens, N.D.L., Blitz, I.L., Lane, M.A., Patrushev, I., Overton, J.D., Gilchrist, M.J., Cho, K.W.Y., and Khokha, M.K. (2016). Measuring Absolute RNA Copy Numbers at High Temporal Resolution Reveals Transcriptome Kinetics in Development. *CellReports* *14*, 632–647.
- Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C., and Wallingford, J.B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature Genetics* *40*, 871–879.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., and Dworniczak, B. (2002). The Ion Channel Polycystin-2 Is Required for Left-Right Axis Determination in Mice. *Current Biology* *12*, 938–943.
- Peshkin, L., Wühr, M., Pearl, E., Haas, W., Freeman, R.M., Jr, Gerhart, J.C., Klein, A.M., Horb, M., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2015). On the Relationship of Protein and mRNA Dynamics in Vertebrate Embryonic Development. *Developmental Cell* *35*, 383–394.
- Porter, M.E., and Sale, W.S. (2000). The 9 + 2 Axoneme Anchors Multiple Inner Arm Dyneins and a Network of Kinases and Phosphatases That Control Motility. *J. Cell Biol.* *151*, F37–F42.

- Prodromou, N.V., Thompson, C.L., Osborn, D.P.S., Cogger, K.F., Ashworth, R., Knight, M.M., Beales, P.L., and Chapple, J.P. (2012). Heat shock induces rapid resorption of primary cilia. *J. Cell. Sci.* *125*, 4297–4305.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell* *129*, 1351–1363.
- Qian, C.N., Knol, J., Igarashi, P., Lin, F., Zylstra, U., Teh, B.T., and Williams, B.O. (2005). Cystic Renal Neoplasia Following Conditional Inactivation of Apc in Mouse Renal Tubular Epithelium. *J. Biol. Chem.* *280*, 3938–3945.
- Ran, J., Yu, F., Qin, J., Zhang, Y., Yang, Y., Li, D., Zhou, J., and Liu, M. (2016). Functional interplay between cylindromatosis and histone deacetylase 6 in ciliary homeostasis revealed by phenotypic analysis of double knockout mice. *Oncotarget* *7*, 27527–27537.
- Reiter, J.F., Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.* *13*, 608–618.
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., and Stainier, D.Y.R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* *524*, 230–233.
- Saadi-Kheddouci, S., Berrebi, D., Romagnolo, B., Cluzeaud, F., Peuchmaur, M., Kahn, A., Vandewalle, A., and Perret, C. (2001). Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the β -catenin gene. *Oncogene* *20*, 5972–5981.
- Sampaio, P., Ferreira, R.R., Guerrero, A., Pintado, P., Tavares, B., Amaro, J., Smith, A.A., Montenegro-Johnson, T., Smith, D.J., and Lopes, S.S. (2014). Left-Right Organizer Flow Dynamics: How Much Cilia Activity Reliably Yields Laterality? *Developmental Cell* *29*, 716–728.
- Sampath, K., Cheng, A.M., Frisch, A., and Wright, C.V. (1997). Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination. *124*, 3293–3302.
- Schlosser, G., and Ahrens, K. (2004). Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* *271*, 439–466.
- Schofield, A.V., Gamell, C., and Bernard, O. (2013). Tubulin polymerization promoting protein 1 (TPPP1) increases β -catenin expression through inhibition of HDAC6 activity in U2OS osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *436*, 571–577.
- Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., and Blum, M. (2000). Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mechanisms of Development* *90*, 41–51.
- Schweickert, A., and Feistel, K. (2015). The *Xenopus* Embryo: An Ideal Model System to Study Human Ciliopathies. *Curr Pathobiol Rep* *3*, 115–127.
- Schweickert, A., Vick, P., Getwan, M., Weber, T., Schneider, I., Eberhardt, M., Beyer, T., Pachur, A., and Blum, M. (2010). The nodal inhibitor Coco is a critical target of leftward flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* *20*, 738–743.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., and Blum, M. (2007). Cilia-Driven Leftward Flow Determines Laterality in *Xenopus*. *Current Biology* *17*, 60–66.

- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2015). Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics* 7, 103–118.
- Shook, D.R., Majer, C., and Keller, R. (2004). Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Developmental Biology* 270, 163–185.
- Simon, D., Laloo, B., Barillot, M., Barnette, T., Blanchard, C., Rooryck, C., Marche, M., Burgelin, I., Coupry, I., Chassaing, N., et al. (2010). A mutation in the 3'-UTR of the HDAC6 gene abolishing the post-transcriptional regulation mediated by hsa-miR-433 is linked to a new form of dominant X-linked chondrodysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2015–2027.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., et al. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nature Genetics* 37, 537–543.
- Simões-Pires, C., Zwick, V., Nurisso, A., Schenker, E., Carrupt, P.-A., and Cuendet, M. (2013). HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Mol Neurodegeneration* 8, 7.
- Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M. (2000). *Early Development of Xenopus Laevis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press.
- Sokol, S., Christian, J.L., Moon, R.T., and Melton, D.A. (1991). Injected Wnt RNA Induces a Complete Body Axis in *Xenopus* Embryos. *Cell* 67, 741–752.
- Soukup, V., Yong, L., Lu, T.-M., Huang, S.-W., Kozmik, Z., and Yu, J.-K. (2015). The Nodal signaling pathway controls left-right asymmetric development in amphioxus. *EvoDevo* 6, 5–23.
- Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The Beta -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a007898–a007898.
- Stubbs, J.L., Vldar, E.K., Axelrod, J.D., and Kintner, C. (2012). Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* 14, 140–147.
- Stubbs, J.L., Oishi, I., Belmonte, J.C.I., and Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nature Genetics* 40, 1454–1460.
- Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., and De Robertis, E.M. (2010). Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143, 1136–1148.
- Tan, Y.-C., Blumenfeld, J., and Rennert, H. (2011). Autosomal dominant polycystic kidney disease: Genetics, mutations and microRNAs. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1812, 1202–1212.
- Tanaka, Y., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435, 172–177.
- Tandon, P., Conlon, F., Furlow, J.D., and Horb, M.E. (2016). Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: Approaches and opportunities for human disease modeling. *Developmental Biology*.
- Tanegashima, K., Yokota, C., Takahashi, S., and Asashima, M. (2000). Expression cloning of Xantivin, a *Xenopus* lefty/antivin-related gene, involved in the regulation of activin signaling during mesoderm induction. *Mechanisms of Development* 99, 3–14.

- Tauriello, D.V.F., Haegebarth, A., Kuper, I., Edelman, M.J., Henraat, M., Dijk, M.R.C.-V., Kessler, B.M., Clevers, H., and Maurice, M.M. (2010). Loss of the Tumor Suppressor CYLD Enhances Wnt/beta-Catenin Signaling through K63-Linked Ubiquitination of Dvl. *Molecular Cell* *37*, 607–619.
- Thumberger, T., Hagenlocher, C., Tisler, M., Beyer, T., Tietze, N., Schweickert, A., Feistel, K., and Blum, M. (2012). Ciliary and non-ciliary expression and function of PACRG during vertebrate development. *Cilia* *1*, 13.
- Tingler, M., Ott, T., Tözser, J., Kurz, S., Getwan, M., Tisler, M., Schweickert, A., and Blum, M. (2014). Symmetry breakage in the frog *Xenopus*: Role of Rab11 and the ventral-right blastomere. *Genesis* *52*, 588–599.
- Tisler, M. (2011). Funktionelle Analyse der Ursache von Lateralitätsdefekten bei siamesischen Zwillingen in *Xenopus laevis*. Diplomarbeit.
- Tisler, M., Wetzel, F., Mantino, S., Kremnyov, S., Thumberger, T., Schweickert, A., Blum, M., and Vick, P. (2016). Cilia are required for asymmetric nodal induction in the sea urchin embryo. *BMC Developmental Biology* *16*, 28–12.
- Tong, J.J., Liu, J., Bertos, N.R., and Yang, X.-J. (2002). Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucl. Acids Res.* *30*, 1114–1123.
- Vandenberg, L.N., and Levin, M. (2010). Consistent left-right asymmetry cannot be established by late organizers in *Xenopus* unless the late organizer is a conjoined twin. *137*, 1095–1105.
- Vandenberg, L.N., and Levin, M. (2011). Polarity proteins are required for left-right axis orientation and twin-twin instruction. *Genesis* *50*, 219–234.
- Vandenberg, L.N., and Levin, M. (2013). A unified model for left-right asymmetry? Comparison and synthesis of molecular models of embryonic laterality. *Developmental Biology* *379*, 1–15.
- Vandenberg, L.N., Blackiston, D.J., Rea, A.C., Dore, T.M., and Levin, M. (2014). Left-right patterning in *Xenopus* conjoined twin embryos requires serotonin signaling and gap junctions. *Int. J. Dev. Biol.* *58*, 799–809.
- Vick, P. (2009). Left-right asymmetry in *Xenopus laevis*: Functional dissection of leftward flow. Dissertation.
- Vick, P., Schweickert, A., Weber, T., Eberhardt, M., Mencl, S., Shcherbakov, D., Beyer, T., and Blum, M. (2009). Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* *331*, 281–291.
- Voelter-Mahlknecht, S., and Mahlkecht, U. (2003). Cloning and structural characterization of the human histone deacetylase 6 gene. *International Journal of Molecular Medicine* 87–93.
- Vonica, A., and Brivanlou, A.H. (2007). The left-right axis is regulated by the interplay of *Coco*, *Xnr1* and *derrière* in *Xenopus* embryos. *Developmental Biology* *303*, 281–294.
- Wagner, F.F., Olson, D.E., Gale, J.P., Kaya, T., Weïwer, M., Aidoud, N., Thomas, M., Davoine, E.L., Lemercier, B.C., Zhang, Y.-L., et al. (2013). Potent and Selective Inhibition of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Does Not Require a Surface-Binding Motif. *J. Med. Chem.* *56*, 1772–1776.
- Walentek, P., Beyer, T., Thumberger, T., Schweickert, A., and Blum, M. (2012). ATP4a is required for Wnt-dependent *Foxj1* expression and leftward flow in *Xenopus* left-right development. *CellReports* *1*, 516–527.

- Walentek, P., Schneider, I., Schweickert, A., and Blum, M. (2013). Wnt11b is involved in cilia-mediated symmetry breakage during *Xenopus* left-right development. *PLoS ONE* *8*, e73646.
- Wallingford, J.B., and Mitchell, B. (2011). Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes & Development* *25*, 201–213.
- Wang, S.-H., Li, N., Wei, Y., Li, Q.-R., and Yu, Z.-P. (2014). β -catenin deacetylation is essential for WNT-induced proliferation of breast cancer cells. *9*, 973–978.
- Wang, Y.-C., Peterson, S.E., and Loring, J.F. (2013). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Nature Publishing Group* *24*, 143–160.
- Warner, J.F., McCarthy, A.M., Morris, R.L., and McClay, D.R. (2014). Hedgehog signaling requires motile cilia in the sea urchin. *Mol. Biol. Evol.* *31*, 18–22.
- Warner, J.F., Miranda, E.L., and McClay, D.R. (2016). Contribution of hedgehog signaling to the establishment of left–right asymmetry in the sea urchin. *Developmental Biology* *411*, 314–324.
- Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., and Hamada, H. (2003). The left-right determinant *Inversin* is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* *130*, 1725–1734.
- Werner, M.E., and Mitchell, B.J. (2013). Using *Xenopus* Skin to Study Cilia Development and Function. In *Cilia*, Part B, (Elsevier), pp. 191–217.
- Wickström, S.A., Masoumi, K.C., Khochbin, S., Fässler, R., and Massoumi, R. (2009). CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *The EMBO Journal* *29*, 131–144.
- Wilhelmi, H. (1920). Experimentelle Unersuchung über situs inversus viscerum. 1–16.
- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* *277*, 8–21.
- Wolda, S.L., Moody, C.J., and Moon, R.T. (1993). Overlapping expression of *Xwnt-3A* and *Xwnt-1* in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Developmental Biology* *155*, 46–57.
- Wolf, D., Rodova, M., Miska, E.A., Calvet, J.P., and Kouzarides, T. (2002). Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *J. Biol. Chem.* *277*, 25562–25567.
- Wu, J., Yang, J., and Klein, P.S. (2005). Neural crest induction by the canonical Wnt pathway can be dissociated from anterior-posterior neural patterning in *Xenopus*. *Developmental Biology* *279*, 220–232.
- Yamamoto, M., Mine, N., Mochida, K., Sakai, Y., Saijoh, Y., Meno, C., and Hamada, H. (2003). Nodal signaling induces the midline barrier by activating Nodal expression in the lateral plate. *Development* *130*, 1795–1804.
- Yang, Y., and Mlodzik, M. (2015). Wnt-Frizzled/Planar Cell Polarity Signaling: Cellular Orientation by Facing the Wind (Wnt). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *31*, 623–646.
- Yang, Y., Ran, J., Liu, M., Li, D., Li, Y., Shi, X., Meng, D., Pan, J., Ou, G., Aneja, R., et al. (2014). CYLD mediates ciliogenesis in multiple organs by deubiquitinating Cep70 and inactivating HDAC6. *Cell Res* *24*, 1342–1353.

- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I.Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J.A., Sasaki, H., et al. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* *338*, 226–231.
- Yuan, S., Zhao, L., Brueckner, M., and Sun, Z. (2015). Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry. *Curr. Biol.* *25*, 556–567.
- Zhang, M., Bolting, M.F., Knowles, H.J., Karnes, H., and Hackett, B.P. (2004). Foxj1 regulates asymmetric gene expression during left-right axis patterning in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *324*, 1413–1420.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.-J., Dent, S.R., et al. (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Molecular Cell* *27*, 197–213.
- Zhang, Y. (2005). Two Catalytic Domains Are Required for Protein Deacetylation. *J. Biol. Chem.* *281*, 2401–2404.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.-L., Chua, K., et al. (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 1688–1701.
- Zhu, L., Belmont, J.W., and Ware, S.M. (2006). Genetics of human heterotaxias. *European Journal of Human Genetics* *14*, 17–25.

Ich danke...

Professor Dr. Martin Blum

... für das Vertrauen und die Förderung seit Beginn meines Studiums und vor allem während der Promotion. Ich bin froh, in ihm einen Mentor gefunden zu haben, der meine Begeisterung für die Entwicklungsbiologie initial entfachen und verstärken konnte und der mir einmalige Freiheiten eröffnet hat mich nicht nur fachlich zu entwickeln. Seine Förderung hat maßgeblich zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen.

apl. Professor Dr. Axel Schweickert

... für das Vorbild, das ich in ihm sehe und immer sehen werde. Ich bin dankbar von ihm menschlich und fachlich lernen zu dürfen. Fast alles Wissen, das ich über die Entwicklungsbiologie des Krallenfrosches erwerben konnte ist unmittelbar durch ihn und sein Wissen inspiriert. Darüber hinaus möchte ich ihm für sein zu jeder Zeit offenes Ohr und die stetige Hilfe danken, die ich von ihm erfahren durfte. Ich hoffe, ich konnte wenigstens einen kleinen Teil davon zurückgeben.

Dr. Kerstin Feistel, Dr. Silke Schmalholz und Dr. Philipp Vick

... für die inspirierenden Gespräche, den wissenschaftlichen Austausch und die kollegiale Hilfe über die Grenzen der Arbeitsgruppen hinaus. Ich freue mich über die gemeinsame Zeit, die wir den in letzten Jahren in Hohenheim verbringen durften und wünsche Euch viel Erfolg in den kommenden Jahren Eurer Karrieren und Lebenswege.

Dipl.-Biol. Susanne Bogusch, Dr. Maike Getwan, Jennifer Kreis M.Sc, Dipl.-Biol. Sabrina Kurz, Tim Ott M.Sc., Melanie Tingler M.Sc.

... meinen unmittelbaren KollegInnen der Arbeitsgruppe für die wunderbare Zeit die wir gemeinsam verbringen durften und die ich sehr genossen habe. Eure Hilfe, Motivation und Freundschaft sind einmalig. Jeder von Euch ist auf seine ganz eigene Weise besonders. All die gemeinsamen Momente, die wir miteinander erlebt haben, werden mir unvergesslich bleiben und uns weiterhin verbinden.

Anges Fietz B.Sc., Marc Fiebig B.Sc., Sophie-Luise Landua B.Sc.

... meinen Bachelor-StudentInnen, die gemeinsam mit mir die entwicklungsbiologische Funktion des *hdac6* Gens im Krallenfrosch aufgearbeitet haben und deren Arbeit maßgeblich zum bisherigen Verständnis dieses Gens im embryologischen Kontext beigetragen haben.

Verena Andre (MTA), Anna Iwanska (BTA), Anna Schäfer (Biologielaborantin) und Wolfgang Möller

... den Technischen AssistentInnen des Instituts, deren Rat und Tat zu jeder Zeit von größtem Wert für mich war und deren Hilfe nicht hoch genug einzuschätzen ist. Ich danke Euch für jede helfende Hand, hilfreichen Trick oder rettenden Einfall, der zur erfolgreichen Durchführung vieler Experimente beigetragen hat.

Paul-Heinz Brekner und Norbert Kretschmer (CTA)

... für Eure Freundschaft und den sorgsamem Umgang und die Pflege unserer Versuchstiere. Im Besonderen danke ich Paul für seine Freundschaft und sein tiefes Vertrauen, sein offenes Ohr und die unzähligen herrlichen Stunden mit Ihm und den Hühnern in seinem Garten im Steckfeld.

Allen MitarbeiterInnen des Instituts für Zoologie der Universität Hohenheim

... aus allen Arbeitsgruppen danke ich für die Hilfe, Kollegialität und Freundschaft, die ich in den letzten Jahren erleben durfte und die mich menschlich bereichert und erfreut haben. Mein Dank gilt besonders *Professor Dr. Johannes Steidle* und *Dr. Till Tolasch*.

*Julia Gerstenberg M.A. und Dipl.-Bibl. Stephan Merz
sowie allen nicht namentlich genannten MitarbeiterInnen des Projekts „Humboldt reloaded“*

... für Eure Freundschaft und Herzlichkeit, die ich durch Euch erfahren habe. Ich bin dankbar, Teil dieses Projekts an der Universität Hohenheim gewesen zu sein, dass sehr viel zu meiner persönlichen Entwicklung und der Entwicklung meiner Fähigkeiten beigetragen hat.

*Dr.oec. (TU Wien) Johannes Gettinger, StR Steffen Kauer, Tim Ott M.Sc.,
Dipl.-Ök. Christian Seeberger, Ralf Sieber M.A.*

... für Eure Freundschaft, die mich immer und zu jeder Zeit begleitet hat und die ich als das größte Geschenk empfinde, das man empfangen kann. Ich danke Euch für die gemeinsamen Momente des Glücks, der Freude aber auch der Traurigkeit die wir in den letzten Jahren erleben durften. Jeder von Euch war und ist für mich da, so wie auch ich immer für Euch da sein werde.

Konrad und Brunhilde Tisler

... meinen lieben Eltern, die mich immer in meinen Wünschen und Zielen unterstützt haben und ohne die weder mein Studium der Biologie noch diese Promotion möglich gewesen wären. Ich danke Euch für Euer unerschütterliches Vertrauen in mich und den Rückhalt den ihr mir zu jeder Zeit gegeben habt, gebt und geben werdet.

Dr. med. Christoph Tisler

... meinem Bruder, der mir immer eine große Stütze, Hilfe und Inspiration ist und dem ich für seine selbstlose Hilfe und großartige Menschlichkeit von Herzen danke. Ich bin stolz genau diesen wunderbaren Bruder zu haben.

Frau Margarete Schwarz

... für ihre liebevolle Hilfe und Unterstützung, die ich seit meiner Kindheit erleben durfte und die mich bis heute begleitet und trägt.

Matthias Konrad Tisler

Geburtsdatum: 18.10.1985

Geburtsort: Freudenstadt

Nationalität: deutsch

Universitäre und schulische Ausbildung

2011 – 2017 Doktorarbeit an der Universität Hohenheim

Institut für Zoologie, Prof. Dr. Martin Blum

Vorliegende Arbeit

2006 – 2011 Studium der Biologie an der Universität Hohenheim

Diplom-Biologe (Notendurchschnitt 1,0 mit Auszeichnung)

Hauptfach: Zoologie

Nebenfächer: Chemische Tierökologie und Pflanzenphysiologie

Diplomarbeit: Funktionelle Analyse der Ursache von Lateralitätsdefekten bei siamesischen Zwillingen in *Xenopus laevis*

Institut für Zoologie, Prof. Dr. Martin Blum

2005 – 2006 Zivildienst

Kreiskrankenhaus Freudenstadt

1996 – 2005 Allgemeine Hochschulreife (Notendurchschnitt 2,4)

Kepler-Gymnasium Freudenstadt

Fachliche Weiterbildungen

2015 FELASA Schein Kategorie B, Universität Hohenheim

2014 Cell and Developmental Biology of *Xenopus*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA

Publikationen

Entwicklungsbiologie

Tisler, M., Ott, T., Landua, S.-L., Fiebig, M., Fietz, A., Thumberger, T., Schweickert, A. and Blum, M.

Histone deacetylase 6 acts as modulator of canonical Wnt-signaling in cilia-mediated symmetry breakage. (*in Vorbereitung*)

2017

Tisler, M., Thumberger, T., Schneider, I., Schweickert, A. und Blum, M. (2017).

Leftward flow determines laterality in conjoined twins. *Curr Biol* 24 (4) 543-548

Tisler, M., Schweickert, A. und Blum, M. (2017).

Xenopus an ideal model organism to study laterality in conjoined twins. *Genesis* 55, (1-2)

2016

Tisler, M., Wetzel, F., Mantino, S., Kremnyov, S., Thumberger, T.,

Schweickert, A., Blum, M. und Vick, P. (2016).

Cilia are required for asymmetric nodal induction in the sea urchin embryo.

BMC Developmental Biology 16 (1): 28.

2014

Tingler, M., Ott, T., Tözser, J., Kurz, S., Getwan, M., Tisler, M.,

Schweickert, A. und Blum, M. (2014).

Symmetry breakage in the frog *Xenopus*: Role of Rab11 and the ventral-right blastomere.

Genesis 52, 588–599.

2012

Thumberger, T., Hagenlocher, C., Tisler, M., Beyer, T., Tietze, N.,

Schweickert, A., Feistel, K. und Blum, M. (2012).

Ciliary and non-ciliary expression and function of PACRG during vertebrate development.

Cilia 1, 13.

Beyer, T., Danilchik, M., Thumberger, T., Vick, P., Tisler, M., Schneider, I.,

Bogusch, S., Andre, P., Ulmer, B., Walentek, P., et al. (2012).

Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus*. *Curr Biol* 22, 33–39.

Publikationen

Forschendes Lernen

2017

Selje-Abmann, N., Poll, C., Tisler, M., Gerstenberg, J., Blum, M. und Fleischer, J. (2016).
 Forschendes Lernen: Wie die Lehre in Universität und Fachhochschule erneuert werden kann.
 In Lebenswissenschaften. H. A. Mieg & J. Lehmann (Hrsg.) Frankfurt/Main: Campus.

Förderungen und Stipendien

seit 2011 *Projektkoordinator/Biologie* für das vom Bundesministerium für Bildung und
 Forschung geförderten Projekt *Humboldt reloaded (01PL11003)*
 an der Universität Hohenheim

2013 *Reisestipendium Boehringer Ingelheim Fonds*

2010 *Stuttgarter Hofbräu Stipendium*
für den wissenschaftlichen Nachwuchs der Universität Hohenheim

Meetings

2016 *3. Deutsches Xenopus Meeting*, Universität Hohenheim (Poster)

2015 *New Frontiers Symposium "Cilia Medicine"* Radboud University NL (Poster)

2015 *2. Deutsches Xenopus Meeting*, Universität Karlsruhe (Vortrag)

2014 *GFE Meeting*, Universität Nürnberg-Erlangen (Poster)

2013 *1. Deutsches Xenopus Meeting*, Universität Hohenheim (Organisation und Poster)

2012 *14th International Xenopus Conference*, Giens, Frankreich (Poster)