

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Aktivität der *Calponin*-Genfamilie während der Embryogenese des Frosches *Xenopus laevis* im Detail untersucht. Die Expressionsmuster der drei Gene stehen im Einklang mit der Rolle von Calponinen als Regulatoren der Zytoskelettdynamik auf Ebene der Aktin-Myosin-Interaktionen während den Migrationsprozessen und der Achsenentstehung im sich entwickelnden Embryo. Mit Hilfe von Funktionsgewinnexperimenten, Phosphorylierungs- und Deletionsmutanten von *Xclp1*, 2 und 3 konnten jedoch keine Erkenntnisse bezüglich der embryonalen Funktion gewonnen werden, da diese in keinerlei phänotypischen Veränderungen resultierten. Erst mit der Deletion mehrerer regulativer Proteinsequenzen war es möglich eine Wirkung von Calponin bei der Wanderung von Neuralleistenzellen nachzuweisen.

Die Expressionsmuster, das Fehlen der veränderten Phänotypen nach Überexpression von *Xclp1*, 2 und 3 und deren Mutanten, die Beeinflussung der Wanderung von Neuralleistenzellen durch die ABD 2 von Calponin und die Funktion der Calponin-Proteine als mögliche Effektoren im nichtkanonischen Wnt-Signalweg werden folgend diskutiert.

3.1. Expressionsmuster und funktionelle Analyse von *Xclp1*

Die Expressionsdomäne des *Calponin 1* beschränkt sich im Gegensatz zu *Calponin 2* oder *3* auf die Zellen der glatten Muskulatur. Das embryonale Expressionsmuster von *Calponin 1* wurde bisher in vielen verschiedenen Vertebraten wie der Maus (Samaha et al., 1996), der Wachtel (Moralez et al., 2006) sowie dem Schaf (Chuan et al., 2005) untersucht und gleicht weitgehend dem hier für *Xenopus laevis* beschriebenen.

3.1.1. *Xclp1* als Marker für Lungenentwicklung in *Xenopus laevis*

Die Expression von *Xclp1* erstreckte sich auf die sich differenzierenden glatten Muskelzellen von *Xenopus laevis* (Abb.7). Bereits im Schwanzknospenstadium St.38 erfolgt *Xclp1* Transkription spezifisch in den Zellen des anterioren dorsalen splanchnischen Seitenplattenmesoderms (Abb.7, A). Dieses mesenchymale Gewebe differenziert sich während der Entwicklung in die kontraktile glatte Muskulatur der Lunge. Studien belegen, dass Glattmuskelmarker wie beispielsweise α Aktin und *Calponin h1* schon zu Beginn der pulmonalen Knospenbildung in der embryonalen Maus und Ratte vorhanden sind (Jostarndt-Fögen et al., 1998). Damit erfüllt *Xclp1* auch in den embryonalen Stadien des Frosches die Funktion eines spezifischen Markergens für die Lungenentwicklung. Über die Expression von *Xclp1* in den glatten Muskelzellen der funktionsfähigen Lungen von *Xenopus laevis* nach der Metamorphose ist jedoch noch nichts bekannt.

3.1.2. Expression von *Xclp1* in den sich differenzierenden glatten Muskelzellen des Darmes

In *Xenopus* wird *Xclp1* mRNA zudem in den Zellen des splanchnischen Mesoderms (St.42), die sich in die glatte Muskulatur ausdifferenzieren und später auch die epitheliale Darmröhre umgeben, exprimiert. Das Expressionsmuster bestätigt die Annahme, dass *Xclp1* wie *Calponin h1* eine Rolle in der funktionellen Reifung von Glattmuskelmyofilamenten erfüllt (Draeger et al., 1991; Gimona et al., 1992; Glukhova et al., 1990). So wird *Calponin h1* in der Maus ab dem Entwicklungsstadium E14 ebenfalls in der glatten Muskulatur des Vorder-, Mittel- und Enddarmes exprimiert (Samaha et al., 1996). Auch im Hühnchen und der Wachtel konnte das Mesenchymgewebe, das sich in die glatten Muskelzellen des Ösophagus und in das Herz differenziert durch die verstärkte Expression

von *Calponin h1* charakterisiert werden (Moralez et al., 2006). Damit scheint die spezifische Genexpression von *Aktin* und dessen regulatorischen Proteinen für die Muskelzeldifferenzierung von Geflügel und Säugern von entscheidender Bedeutung zu sein (Kruithof et al., 2003). Möglicherweise gilt dies auch für die Differenzierung der Glattmuskelvorläuferzellen in Amphibien. Die Hypothese, dass Calponin als Regulator der Kontraktion vielmehr in höheren Differenzierungsebenen der glatten Muskelzellen anzutreffen ist (Frid et al., 1992) konnte jetzt auch im Frosch widerlegt werden. Vielmehr ist *Xclp1* auch hier in den noch nicht ausdifferenzierten glatten Muskelzellen vorhanden. Allerdings bestehen zwischen den verschiedenen Spezies erhebliche Unterschiede in dem Expressionsprofil der Glattmuskelproteine. So findet sich im Gegensatz zu Beobachtungen in der Maus keine *Xclp1* Expression im embryonalen Herz von *Xenopus*. Vielleicht wird deren Funktion durch *Xclp2* bzw. *Xclp3* kompensiert, die bereits in den nach ventral migrierenden Herzvorläuferzellen exprimiert werden (Abb.8, C''; 9, E).

3.1.3. Überexpression von *Xclp1*

Die Überexpression von *Xclp1* in den vegetalen Bereich des zukünftigen Mesoderms hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung des Darmes.

Das mittlere, ventral gelegene viscerale Mesoderm differenziert sich zur glatten Muskulatur, die den proximalen Teil und die äußere Windung des Darmes umgibt (Chalmers and Slack, 1998).

Mit der Überexpression von *Xclp1* in das zukünftige ventrale Mesoderm wurde versucht, die Entwicklung bzw. funktionelle Reifung der den Darm umgebenden Myoblasten zu beeinträchtigen und damit zum Beispiel die Darmschleifenbildung selbst zu beeinflussen. Durch die kollektive krafterzeugende Mechanik vieler Zellen kann die Morphogenese während der embryonalen Entwicklung vorangetrieben werden. So können die aktiven, koordinierten Veränderungen der Gestalt individueller Zellen zusammen mit den mechanischen Verbindungen zu großflächigen

Veränderungen innerhalb der Gewebe führen (Holtfreter 1943, 1944; Burnside, 1971; Burnside and Jacobson, 1968). Die Überexpression von *Xclp1* in den glatten Muskelzellen des Intestinaltraktes, wie auch die Fehlexpression von *Xclp1* in anderen Geweben des sich entwickelnden *Xenopus laevis* hatten jedoch keine phänotypischen Veränderungen der Embryonen zur Folge (Abb.11, A, B). Zum einen ist für die funktionelle Aktivität neben der Anwesenheit der Calponin-Proteine auch deren Modifikation durch zum Beispiel posttranslationale Veränderungen von entscheidender Bedeutung. Des weiteren waren Mäuse einer Calponin h1 knockout Mauslinie in physiologischer Hinsicht weitgehend normal und fertil. Daher geht man davon aus, dass Calponin h1 kein essentielles Protein für die Kontraktilität glatter Muskelzellen ist, sondern vielmehr auf Ebene der Feinregulation der Aktin-Myosin-Interaktionen agiert (Babu et al., 2006; Yoshikawa et al., 1998).

3.2. Expression von *Xclp2* und *Xclp3*

Die Analyse der Expressionsmuster während der frühen Entwicklung ließ die Beteiligung von *Xclp2* und *3* an den Zellbewegungen während den entscheidenden embryologischen Stadien vermuten. Die Gene wurden überlappend oder distinkt dort exprimiert, wo

Umstrukturierungsbewegungen von Zellen stattfinden. Wie beispielsweise in den migrierenden Zellen während der Gastrulation (Abb.8, A', 9, C'), in den Herzvorläuferzellen (Abb.8, C'; 9, E'), in den Zellen des neuralen Ektoderms und in den Neuralleistenzellen (Abb.8, B, B', B').

Beispiel der überlappenden Expression von *Xclp2* und *Xclp3* während den späteren Embryonalstadien von *Xenopus laevis* ist die Entwicklung des Pronephros (Abb.8, D, D'; 9, F, F').

Dazu gehören der sich nach caudal erstreckende Pronephroskanal und die Pronephrostubuli. Während dem mesenchymal-epithelialen Übergang der Zellen erfolgen starke morphologische Veränderungen der Zellgestalt,

denen drastische Umstrukturierungen des Zytoskeletts zugrunde liegen. Im Stadium 24 besitzen die Zellen eine säulenartige Gestalt und erscheinen gedehnt und flaschenförmig. Bei der Ausdehnung des Pronephroskanals nach caudal werden Zellen aus der posterioren Seitenplatte rekrutiert (Vize et al., 1995). Dabei erfolgt, wenn auch nur über kurze Distanzen, wiederum Zellmotilität. Die Regulation dieser morphologischen Umordnungen könnte mit Hilfe von *Xclp2* bzw. *Xclp3* erfolgen, die in den Zellen der sich entwickelnden Vorniere koexprimiert werden.

3.2.1. Koexpression von *Xclp2* und *Xclp3* während der Gastrulation

Im gastrulierenden Embryo wurden sowohl *Xclp2* als auch *Xclp3* in den epithelialen Zellen der superfiziellen und sensorischen Schicht des zukünftigen Neuro- bzw. epidermalen Ektoderms exprimiert. Des Weiteren fand sich die mRNA von *Xclp2* und *Xclp3* koexprimiert in dem zukünftigen dorsalen und ventralen Mesoderm und Entoderm vor der Involution (Abb.8, A, A'; 9, B, B', C, C'). In diesem entscheidenden Entwicklungsstadium wurde eine Expression der beiden Gene in anderen Vertebraten bisher nicht beschrieben. Nach dem Eindringen in das Innere des gastrulierenden Embryos verloren die Zellen rasch ihre *Xclp2* bzw. *Xclp3* Transkription (Abb.8, A'; 9, C').

Bei den einwandernden Zellen bildete sich eine scharfe Grenze zwischen Calponin Transkription und Nichttranskription. Der Stopp der Transkription und der Abbau der vorhandenen mRNA könnten bei einer zusätzlichen raschen Degradation der Calponin-Proteine zum sofortigen Funktionsverlust nach der Involution der Zellen führen.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Veränderung der Calponin Expression Auswirkungen auf die Zellmigration hat. In Calponin h2 Funktionsverlustexperimenten in Zebrafisch Embryonen konnte die natürliche Migration der Endothelzellen während der Bildung der intersegmentalen Gefäße blockiert werden. *In vitro* Studien belegten

zudem, dass die Migration von menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen mit dem Ausschalten der Calponin h2 Expression vermindert werden konnte (Tang et al., 2006). Für Calponin 3 gibt es bisher keine vergleichbaren Experimente.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Xclp2- bzw. Xclp3-Proteine stabil und deshalb nach dem Transkriptionsstopp in den migrierenden Zellen nach deren Einwanderung weiterhin aktiv sind. In diesem Fall könnte die Calponin Aktivität die Migration der Zellen fördern. In *in vitro* Experimenten mit menschlichen Endothelzellen zum Beispiel erhöhte die Überexpression von Calponin h2 deren Migration und förderte damit unter anderem die Wundheilung (Tang et al., 2006). In diesem Fall wären der Sinn des sofortigen Transkriptionsstopps und der Abbau der mRNA beider Gene allerdings noch unklar.

3.2.2. Distinkte Expression von *Xclp2* und *Xclp3* nach der Gastrulation

Erst nach der Gastrulation, während der Entwicklung der Chorda dorsalis oder des Neuralrohrs wurden *Xclp2* und *Xclp3* erneut wieder transkribiert. Dabei waren die Expressionsorte beider Gene verschieden (Abb.8, C, D; 9, D, E). Die Bildung beider Strukturen erfordert die auf Interkalation der Zellen basierenden konvergenten Extensionsbewegungen. Dabei konnte mit Explantaten des dorsalen Bereichs von gastrulierenden Embryonen gezeigt werden, dass sich vor allem die mesenchymalen Zellen der zukünftigen Chorda und der posterioren Neuralstrukturen unabhängig voneinander aktiv ausdehnen und konvergieren konnten (Schechtman, 1942; Keller and Danilchik, 1988). Diese Zellbewegungen setzen sowohl die Veränderung der Zellmorphologie als auch der Zellmotilität voraus. Die intrazelluläre Umstrukturierungen des Zytoskeletts führen zur Auflösung fester Verankerungspunkte, und die zunehmende Aktindynamik bewirkt die Ausbildung von Zellfortsätzen und die Kontraktion von Aktin-Myosinfilamenten im Zytoplasma. Diese Veränderungen führen dann

letztlich zu eigenständiger Motilität der Zellen. Die Annahme, dass Calponin 2 und Calponin 3 an den Umstrukturierungen des Zytoskeletts direkt beteiligt sind wird durch eine Reihe von Zellkulturexperimenten unterstützt. Zudem zeigten diese Analysen, dass beide Proteine in den Zellen unterschiedlich lokalisiert sind.

So lagerte sich Calponin 2 nach Transfektion in Fibroblasten an den Enden der Stressfasern und in den Membranfalten an. Calponin 3 war hingegen entlang der Stressfasern angeordnet und fand sich nicht in peripheren F-Aktinstrukturen (Danninger et al., 2000). Die Lokalisation beider Proteine spricht bei überlappender Expression in den gleichen Zellen während der Entwicklung für deren synergistische Aktivität in Bezug auf das Zytoskelett bzw. die Zellmorphologie- und bewegung. Bei distinkter Expression deutet die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung beider Proteine auf verschiedene Funktionen innerhalb des Zytoskeletts, entsprechend des jeweiligen Zellcharakters hin. Die Frage nach der subzellulären Lokalisation der Calponin-Proteine in den Zellen des sich entwickelnden Frosches muss allerdings noch geklärt werden.

3.2.2.1. *Xclp2* Expression in den Zellen der sich entwickelnden Chorda dorsalis.

Der dorsale mesodermale Bereich der frühen Gastrula besteht aus zwei Zellpopulationen. Zum einen handelt es sich um die tief gelegenen schwärmenden Zellen, die später zur Bildung der antero-dorsalen Prächordalplatte beitragen und zum anderen sind es die Zellen der subepithelialen dorsalen Randzone. Diese bilden durch konvergente Extension den kompakten Stab des axialen Mesoderms, welcher sich in das zentrale Notochord und in zwei flankierende Bereiche des paraxialen somitogenen Mesoderms differenziert. *Xclp2* wird in den mesodermalen Zellen der sich bildenden Chorda dorsalis exprimiert (Abb.8, B', B'', C', C'').

Diese Chordazellen unterscheiden sich morphologisch von den paraxialen Zellen. Sie sind flacher und kompakter miteinander verbunden. Außerdem bilden sie lamellipodienförmige Ausstülpungen um mit den benachbarten Zellen in Kontakt zu treten. Die jungen Chordazellen sind zunächst scheibenförmig. In ihren peripheren Bereichen entstehen später Vakuolen. Durch diese Vakuolen schwellen die Zellen der Chorda dorsalis an, was deren Ausdehnung zusätzlich unterstützt. Die Zellkerne befinden sich anfänglich im Zentrum der Zellen. Später rücken die Kerne teilweise in die, peripher von den Vakuolen gelegenen Plasmabezirke. Aus dieser Rindenzone entsteht das Chordaepithel, der Bildungsbereich für die blasigen Turgorzellen, die später das Innere der Chorda aufbauen (Pflugfelder, 1970).

Für die Bewegungen und Umstrukturierungen der Zellen und die Verlagerung ihrer Zellkompartimente in verschiedene Zellbereiche bedarf es der raschen Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts. Die Expression von *Xclp2* in diesen Zellen lässt vermuten, dass das Protein an der Organisation und Motilität der notwendigen Aktin-Myosin-Interaktionen und der Aktinfilamentdynamik, die letztlich auch die Plasmaströmung beeinflussen, beteiligt ist.

3.2.2.2. Expression von *Xclp3* im neuralen Ektoderm

In allen bisher untersuchten Vertebraten konvergiert das zukünftige Neuralgewebe mediolateral und elongiert in antero-posteriorer Richtung. Dabei besteht das vorläufige Neuralplattenektoderm aus zwei *Xclp3* exprimierenden Zellpopulationen. Die eine bildet die superfizielle und die andere die tiefe ektodermale Schicht.

Die neurale Induktion wird durch das Mesoderm der Prächordalplatte (Teil des Spemannorganisators) bei dessen Bewegung entlang der dorsalen Mittellinie während der Gastrulation vermittelt. Die darüber liegenden ektodermalen Zellen der tieferen Schicht differenzieren sich und bilden durch Elongation das säulenförmige generative

Neuroepithelium der Neuralplatte. Dabei reagieren die Zellen der tiefen Schicht auf die Induktion mit Gestaltsveränderungen. Abhängig von ihrer Lage innerhalb der mediolateralen Richtung erfahren die *Xclp3* exprimierenden Zellen des neuralen Ektoderms verschiedene Gestaltsveränderungen. Wie bei der Gastrulation hängen die Veränderungen der Zellform mit der Krümmung der Neuralplatte und der Bildung der Neuralwülste zusammen. Die Zellen der Neuralplatte werden schmaler als die Zellen des benachbarten Ektoderms (Ezin et al., 2006). Beginnt die Neurulation, rollt sich die Platte ein. Die Zellen an der Kante der sich krümmenden Platte werden an der apikalen Oberfläche gestaucht und damit keilförmig (Wolpert, 1999).

Der Mechanismus des Neuralrohrschlusses verläuft durch koordinierte morphogenetische Bewegungen. *Xclp3* mRNA wird kontinuierlich in den Zellen des neuralen Ektoderms während der gesamten Neurulation exprimiert (Abb.9, D, D'). Die Transfektion von Calponin 3 in menschliche embryonale Nierenzellen (HEK 293) führte zu starken morphologischen Veränderungen. Die Zellen rundeten sich ab und ihr Zellkörper verkleinerte sich. Außerdem besaßen viele der Zellen oft verzweigte Zellfortsätze, was auf starke Reorganisation der Mikrofilamente schließen lässt (Ferhat et al., 2001).

Damit war Calponin 3 in der Lage in Zellkulturexperimenten das Aktin-Zytoskelett zu reorganisieren und der Zelle einen völlig neuen Phänotyp zu verleihen. Mit diesen Fähigkeiten wäre das Protein für die neurale embryologische Entwicklung von großer Bedeutung.

3.3. Funktionelle Analysen der Calponin Eigenschaften

Die Expression von *Xclp1*, *Xclp2* und *Xclp3* und deren bisher bekannte intrazelluläre Verteilung in Kontakt mit den Zytoskelettkomponenten in migrierenden Zellen, bzw. in sich morphologisch verändernden Zellen ließ

vermuten, dass die Proteine an den Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts aktiv beteiligt sind. In *Xenopus* sollte überprüft werden, ob sich die vor allem *in vitro* Analysen erhaltenen Informationen über die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Calponin 1, 2 oder 3 auf die embryonale Entwicklung des Gesamtorganismus der Vertebraten übertragen ließe.

Die Über- bzw. Missexpression von *Xclp1*, *Xclp2* und *Xclp3* in verschiedenen Geweben resultierte nicht wie erwartet in morphologisch veränderten Embryonen.

Die Komplexität der Entwicklungsvorgänge wie der Neurulation oder der Gastrulationsbewegungen sind sehr hoch. Deshalb scheint es unmöglich, dass solche aufwendigen Prozesse lediglich durch einen einzigen Mechanismus gesteuert werden. Möglicherweise werden diese Abläufe durch die Interaktion vieler verschiedener Proteine mit redundanten Funktionen kontrolliert. Zudem unterliegen die einzelnen Funktionsmechanismen selbst variabler Regulation auf Ebene der Transkription, der Translation und der posttranslationalen Modifikation.

3.3.1. Mutation von potentiellen Phosphorylierungstellen des Xclp3

Nach der Translation können Proteine durch eine Vielzahl biochemischer Mechanismen modifiziert werden. Dazu gehören die Phosphorylierung, die Glykosylierung, die Komplexbildung oder die Abspaltung von Signalsequenzen und viele mehr.

Im Laufe der Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die Calponin-Proteine durch posttranslationale Phosphorylierung negativ reguliert würden. Abouzaglou et al. zeigten 2004 *in vitro* die Phosphorylierung von Calponin h1 und Calponin h3 durch die zytoplasmatische mit Src verwandte Tyrosinkinase. Durch die Phosphorylierung gingen dabei Bindungen an F-Aktin um 75% (Calponin h3) und 68% (Calponin h1) verloren. Strukturanalysen wiesen den Tyrosin-Rest 261 (im dritten

Wiederholungsmotiv der ABD 2) des Calponin h3 und die Tyr 261 und Tyr 182 des Calponin h1 als die Phosphorylierungsstellen aus.

In dem Xclp3-Protein wurden die Zielaminosäuren der entsprechenden Kinasen durch nicht zu phosphorylierende Aminosäuren ausgetauscht. Damit sollten die im embryonalen Gewebe vorhandenen Kinasen die Aktivität des ektopischen Proteins nicht mehr beeinflussen können.

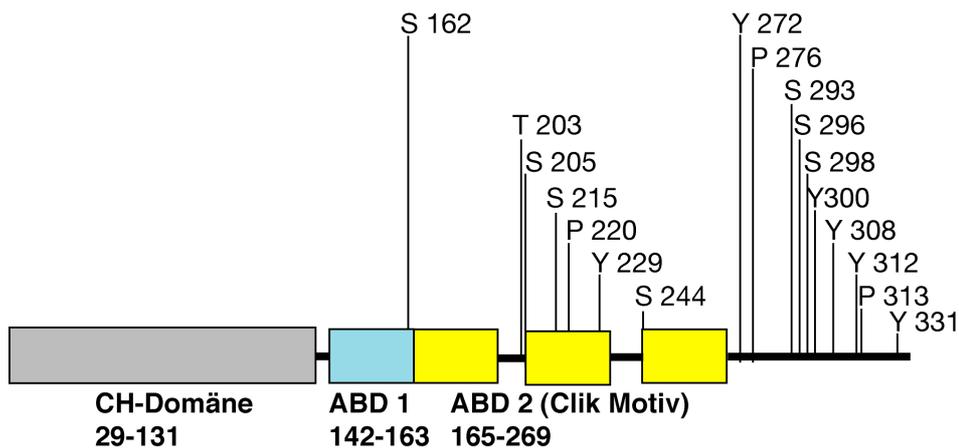


Abb.20 Xclp3 mit den funktionellen Domänen und allen über die Kinaseerkennungssequenz ermittelten phosphorylierbaren Aminosäuren.

Das Xclp3-Protein besitzt mehrere Aminosäuren, deren Seitengruppen durch Phosphorylierung potentiell modifiziert werden können. Diese wurden anhand der Kinasezielsequenzen ermittelt. Für die Mutation wurden nur die Aminosäuren innerhalb der ABD 1 und ABD 2 berücksichtigt. Es wurden drei Konstrukte CamKmutXclp3(S162C), SrcmutXclp3(Y229A) und CK1mutXclp3(S244A) mit jeweils einer mutierten Aminosäure erzeugt. In bisherigen *in vitro* Studien zeigte sich, dass die Mutation bereits einer einzelnen Aminosäure, wie zum Beispiel des Serin 175 zum Verlust der funktionellen Aktivität von Calponin h1 führte (Winder et al., 1990; Naka et al., 1990).

Trotzdem zeigten die über- bzw. missexprimierten mutierten Xclp3 cDNA Konstrukte keine morphologischen Veränderungen in den *Xenopus laevis* Embryonen. Möglicherweise genügte die Mutation einer einzelnen Phosphorylierungsstelle nicht um die Regulation der Proteine zu inhibieren. Die durch Edgar M. Pera et al. (2003) *in vitro* Mutagenese

hergestellte „Linker Mutante“ LM-Smad 1 besaß Punktmutationen in jeder der vier MAPK Phosphorylierungsstellen. In diesem Fall wurden gleichzeitig vier Serin Aminosäuren durch nicht zu phosphorylierbare Alanin Aminosäuren ersetzt. Die Injektion von *LM-Smad 1* mRNA resultierte schließlich wie BMP 4 in einem stark ventralisierten Phänotyp. Eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben einer phänotypischen Veränderung besteht darin, dass in diesem verwendeten Programm zur Analyse der Kinasezielerkennungssequenzen weitere, bis dato unbekannte regulatorische Signalwege nicht berücksichtigt wurden. Zusätzlich gibt es *in vivo* weitere Mechanismen, wie die autoregulatorische Interaktion zwischen verschiedenen Proteindomänen, die unabhängig von der Phosphorylierung der Calponin-Proteine deren funktionelle Aktivität negativ beeinflussen können.

3.3.2. Deletionsmutanten von Xclp1 und Xclp2

Die zweite Aktinbindedomäne (ABD 2; Clik 23-26 Wiederholungsmodul) der Calponin-Proteine dient der Aktinfilamentbündelung und der Stabilisierung der Aktinfilamente (Gimona et al., 2003). Ein vergleichbares Protein (UNC-87, aus 7 Kopien des Clik 23-Moduls bestehend), wurde aus *Caenorhabditis elegans* isoliert und ist dort in die Bildung stabiler Aktinfilamentbündel involviert (Kranewitter et al., 2001; Goetnick and Waterston, 1994). Lener et al. (2004) zeigten, dass die ektopische Expression der Calponin h1 Clik 23 durch die Stabilisierung der Aktinfilamentbündel die Zellmotilität und Koloniebildung kultivierter Maus Melanomzellen und menschlicher Adenokarzinomzellen reduzieren konnte. Der carboxyterminalen Region der Calponin-Proteine wurden negative autoregulatorische Fähigkeiten auf die ABD 2 und damit auf die Interaktion der Proteine mit dem Zytoskelett zugesprochen (Danninger et al., 2000). Das Entfernen dieser C-terminalen Domäne der Calponin-Proteine verstärkte *in vitro* die Assoziation der Proteine an die Aktinfilamente (Burgstaller et al., 2002). Daneben kann die Aktivität der

ABD 2 ebenfalls durch die CH Domäne reguliert werden (Lener et al., 2004). Möglicherweise spielen in der Regulation der funktionellen Aktivität, die bereits für das EB-1 Protein (Mikrotubuli Plusende-Bindeprotein) beschriebenen Interaktionen zwischen der N- und C-terminalen Sequenz eine Rolle (Burgstaller et al., 2002).

Daher wurden von *Xclp1* und *Xclp2* zwei verschiedene carboxyterminale Deletionskonstrukte mit (*Xclp1Δt(1-265)*; *Xclp2Δt(1-267)*) und ohne (*Xclp1Clik*; *Xclp2Clik*) der N-terminalen CH- und der ersten Aktinbindedomäne erzeugt. Mit beiden Konstrukten wurden Über- und Missexpressionsexperimente durchgeführt. Überraschenderweise bewirkte keine dieser Deletionsmutanten die Veränderung des Phänotyps der sich entwickelnden *Xenopus laevis* Embryonen (Abb.18). Für die fehlenden phänotypischen Veränderungen könnte folgende Erklärung dienen: Die Veränderung der Aktivität von Proteinen, die mit dem Zytoskelett der Zelle interagieren, hat oft nur einen geringen Effekt. Als Beispiel dienen Experimente, die mit Aktinbindeproteinen in den Zellen von *Dictyostelium* durchgeführt wurden. Durch Mutation hatten diese Zellen die Aktivität ihrer Zytoskelettproteine Severin und α Aktinin verloren. Trotzdem zeigten sie im Vergleich zu Wildtypzellen keinerlei Unterschied in ihrer Beweglichkeit als Reaktion auf chemische Reize. Die Zellen bewegten sich vielmehr, im Vergleich zu den Wildtypzellen, mit gleicher Geschwindigkeit, zeigten die gleichen morphologischen Charakteristika und standen diesen in der Detektion und Reaktion auf chemische Reize in nichts nach (Bray, 2001).

Die Funktionen der mit dem Zytoskelett interagierenden Proteine sind bis zu einem gewissen Grad redundant. Dies gilt vor allem für den Prozess der Zellbewegung und die Bündel-stabilisierenden Proteine, wie zum Beispiel Calponin (Bray, 2001).

Hossain et al (2003) gingen davon aus, dass Calponin h2 kein essentielles Protein für die epithelialen Zellen oder Fibroblasten sei. Es könnte vielmehr ein regulatorischer Mechanismus für die Feinregelung der Funktionen des Aktin-Zytoskeletts darstellen. Dennoch, obwohl die Achsenentstehung durch die Calponin Über- bzw. Missexpression nicht beeinträchtigt werden konnte, gelang der Nachweis der Interaktion der Aktinbindedomäne 2 (ABD 2) mit dem Aktin-Zytoskelett einer kleinen Population migrierender Neuralleistenzellen.

3.3.3. Die ABD 2 von Xclp1 und Xclp2 inhibiert das Wanderverhalten von *Krox20* positiven Neuralleistenzellen.

Nach dem Neuralrohrschluss entsteht im embryonalen Ektoderm dorso-lateral im Grenzbereich zwischen Neuralplatte und dem nicht neuralen Ektoderm die Neuralleiste. Diese Zellen tragen nicht zur Bildung des Zentralnervensystems bei, sondern kolonialisieren verschiedene Körperbereiche, wo sie eine Vielzahl verschiedener Gewebe und Organe bilden. Die *Xclp2* mRNA exprimierenden Zellen beschreiben einen epithelial-mesenchymalen Übergang, bilden Lamellipodien und migrieren schließlich nach ventral. Die Fähigkeit der Neuralleistenzellen innerhalb des Organismus zu wandern ähnelt den Beobachtungen bei Tumorinvasionen und bedarf einer sehr hohen Dynamik des Aktin-Zytoskeletts (Mayor et al. 2001).

Um die Beeinflussung der Zellmigration im embryonalen Organismus durch Xclp1 und Xclp2 zu überprüfen wurde eine Analyse einzeln migrierender, *Krox20* exprimierender Neuralleistenzellen während der frühen Kaulquappenstadien von *Xenopus laevis* gewählt. Die Missexpression der ABD 2 von Xclp1 (*Xclp1Clik*) und Xclp2 (*Xclp2Clik*) in den dorsal-animalen Bereich, hatte die Verminderung des epithelial-mesenchymalen Übergangs oder der anschließenden Neuralleistenzellmigration zur Folge.

Dabei unterschieden sich die Zellen in der Länge ihrer zurückgelegten Migrationswege, was auf die Veränderung des individuellen Migrationsverhaltens durch die Calponin Überexpression zurückzuführen war.

Die Zellen andere Embryonen zeigten keinerlei Neuralleistenzellwanderung und verblieben im Neuroektoderm, was auf eine Störung des epithelial-mesenchymalen Übergangs zurückzuführen war. Die Fehlexpression von (*Xclp1Δt(1-265)* oder *Xclp2Δt(1-267)*) hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der Neuralleistenzellen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Inhibition durch regulatorische Sequenzen innerhalb des Proteins sein (Danninger et al., 2000). Bisher konnten drei verschiedene, inhibitorische Sequenzen des Proteins analysiert werden. Neben den durch Phosphorylierung modifizierbaren Aminosäuren, besitzen die Proteine eine regulative N-terminale Proteinsequenz, aus der CH-Domäne und der ABD 1 bestehend. Als weitere, inhibierend wirkende Domäne fungiert die C-terminale Sequenz, die wiederum mit den Aminosäuren der ABD 2 interagieren kann. Erst das Entfernen aller regulatorischen Domänen der Proteine *Xclp1* und *Xclp2* zeigte Auswirkungen auf das Verhalten der Neuralleistenzellen.

Damit konnten die über die ABD 2 stattfindenden Interaktionen der Calponin-Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett bestätigt werden. Trotzdem zeigten die *Xenopus laevis* Embryonen überraschenderweise keinen veränderten Phänotyp.

Ein möglicher Grund hierfür wurde von Saldivar et al. (1997) beschrieben. Mit im Hühnchen durchgeführten Ablationsexperimenten zeigte es sich, dass NLZ in der Lage sind ihre ursprünglichen Wanderrouten zu verändern um fehlende NLZ-Populationen zu kompensieren. Diese Zellen passen sich subsequent in der Folge ihrer Umgebung an und differenzieren zum Beispiel in craniofasciale Strukturen. Das resultierende craniofasciale Skelett erscheint in diesem Fall unversehrt.

Das interessante, erstmals beschriebene Expressionsmuster und die Veränderung der Dynamik als Folge des Funktionsgewinns von *Xclp2* in den Neuralleistenzellen von *Xenopus laevis*, sollte nun auch in anderen Organismen überprüft werden. Vor allem im Zusammenhang mit der bisher sehr gut beschriebenen Neuralleistenzellwanderung im Hühnchenembryo wären das Expressionsmuster und die Beeinflussung durch Calponin 2 sehr interessant.

In *Xenopus laevis* sollte der Effekt des *Xclp* Funktionsgewinns auf den epithelial-mesenchymalen Übergang und das Wanderverhalten einer größeren Population von Neuralleistenzellen untersucht werden. Als Marker könnten die beiden Transkriptionsfaktoren AP-2 und Snail verwendet werden. AP-2 ist ein in Neuralleistenzellen verschiedener Vertebraten exprimierter Transkriptionsfaktor der cranialen Neuralleistenzellen (Mitchell et al., 1991; Shen et al., 1997). Während der Gastrulation wird AP-2 in dem nicht neuralen Ektoderm transkribiert. Mit fortschreitender Neurulation finden sich AP-2 Transkripte in den Neuralfalten. Sie markieren die Neuralleistenzellen vor, während und nach ihrer Migration (Meulemans and Bronner-Fraser, 2002). In den Neuralfalten von *Xenopus* bzw. dem Neuralrohr wird ebenfalls der Neuralleistenzellmarker Snail (ein transkriptioneller Repressor, dessen Aktivität für die frühe Spezifizierung und Migration der Neuralleistenzellen benötigt wird) exprimiert. *Snail* ist das früheste Gen, das im vorläufigen Neuralleistengewebe exprimiert wird. Die Expression beschränkt sich auf die Neuralplattengrenze, die vorläufige Neuralleistenregion, die Neuralfalten, die später das Vorderhirn bilden (Aybar et al., 2003) und die Neuralleistenzell-Derivate, wie die branchialen Knorpel (Mayor et al., 1993).

3.4. Funktion des Aktin-Zytoskeletts während der embryonalen konvergenten Extension

Trotz der Tatsache, dass die Überexpression des Aktinbindeproteins Calponin keine phänotypischen Veränderungen in Bezug auf die konvergente Extension während der embryonalen Entwicklung zur Folge hatte, gibt es einige Hinweise, die die Notwendigkeit der Aktindynamik für die Embryonalentwicklung bestätigen. In der Literatur wurde gezeigt, dass die Manipulation des Aktin-Zytoskeletts schwerwiegende Konsequenzen beispielsweise auf die konvergenten Extensionsbewegungen der betroffenen Zellen hatte.

Für die Zellmotilität und die Veränderung der Zellmorphologie während den konvergenten Extensionsbewegungen ist die schnelle Umordnung des Aktin-Zytoskeletts wesentlich. So war es möglich durch die Einwirkung von Cytochalasin B (einem reversiblen Inhibitor der Aktinpolymerisation) auf Zellen mit mesodermalem Charakter deren durch Aktivin (einem Mitglied TGF β Familie, Transforming Growth Factor) induzierte Elongation zu verhindern (Tamai et al., 1999). Zudem konnte durch die Injektion von Cytochalasin B in das Blastocoel von Blastula-*Xenopus* Embryonen, deren Gastrulation inhibiert werden (Nakatsuji, 1979).

Skoglund et al. (2008) zeigten, dass eine Nichtmuskelvariante von Myosin, Myosin IIB für die konvergenten Extensionsbewegungen der Chordazellen wesentlich ist.

Der Funktionsverlust des Myosin IIB führte im *Xenopus* Embryo zu schweren Gastrulationsdefekten. Die Calponin-Proteine besitzen Myosin II Bindestellen und sind in der Lage die auf Aktin-Myosin II basierende Zytoskelettfunktion zu regulieren und könnten somit über die Organisation des Zytoskeletts die Gastrulationsbewegungen beeinflussen (Danninger et al., 2000; Winder and Walsh, 1996; Gimona and Small, 1996). Ob Calponin 2 und 3 während der konvergenten Extensionsbewegung mit

Myosin IIB funktionell interagieren, könnte eine subzelluläre Kolokalisierung dieser Proteine zeigen.

3.5. Calponin-Proteine als mögliche Effektoren im nichtkanonischen Wnt-Signalweg

Bei der Kontrolle der konvergenten Extensionsbewegungen während der embryonalen Entwicklung spielen die Wnt-Signalwege eine wesentliche Rolle. Der Wnt/Fz7/Dsh-Signalweg kann die konvergenten Extensionsbewegungen während der Gastrulation mit Hilfe von GTPasen sowohl über den PCP als auch über den Wnt/Ca²⁺-Signalweg beeinflussen (Medina and Steinbeisser, 2000; Medina et al., 2000).

Über die Effektoren der GTPasen ist bisher nur wenig bekannt. Watanabe et al. (2004) beschrieben in einem Modell, dass die Aktivierung der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 zur Rekrutierung von IQGAP1 und APC (der Tumorsuppressor Adenomatous polyposis coli) führt. Diese bilden zusammen mit einem Mikrotubuli stabilisierenden Protein einen Komplex, welcher wiederum das Aktin-Zytoskelett und die Mikrotubulidynamik während der Zellpolarisation und Migration miteinander verbindet.

In motilen Zellen reguliert IQGAP1 als Effektor die Anordnung der Aktinfilamente und Mikrotubuli direkt oder indirekt (Fukata et al., 2002; Mataraza et al., 2003; Watanabe et al., 2004). Diese Funktionen sind für die Migration notwendig.

Für die direkte oder indirekte Verbindung von Calponin mit den GTPasen gibt es mehrere Hinweise. Neben der Expression in Geweben, die der konvergenten Extension unterliegen, gibt es Befunde aus der Literatur, die auf eine mögliche direkte oder indirekte Verbindung von Calponin mit den GTPasen der nichtkanonischen Wnt-Signalwege hindeuten.

3.5.1. Koexpression von Xclp2 und Xclp3 mit der GTPase Cdc42 während den Gastrulationsbewegungen

Die in *Xenopus laevis* klonierte Rho-GTPase XCdc42 agiert unterhalb des sekretierten Wachstumsfaktors XWnt-5a. Sie ist als Mitglied des Wnt/Ca²⁺Signalwegs in die Regulation der Ausbildung neuer Fortsätze (Filopodien) involviert (Penzo-Mendèz et al., 2003) indem sie die Polymerisation des dafür notwendigen fibrillären Aktins über den Arp2/3 Komplex positiv reguliert (Rohatgi et al., 1999). In Experimenten mit Aktivin behandelten Polkappen konnte bestätigt werden, dass die Aktivität von XCdc42 eine wesentliche Rolle bei der Regulation morphogenetischer Bewegungen wie der konvergenten Extension spielt (Choi and Han, 2002).

Während der Gastrulation von *Xenopus laevis* wird XCdc42 im Ektoderm, in den tiefen Schichten des einwandernden dorsalen Mesoderms und im posterioren Neuroektoderm, das selbst der extensiven konvergenten Extension unterliegt, exprimiert (Choi and Han, 2002). Damit gleicht das XCdc42 Expressionsmuster während der Gastrulation dem von Xclp2 und Xclp3 in den mesodermalen und ektodermalen Zellen vor der Involution. Möglicherweise könnte dies auf eine funktionelle Beziehung der drei Proteine bei der stattfindenden Aktinfilamentdynamik zum Beispiel während der mit der Zellmigration verbundenen Bildung von Zellfortsätzen hindeuten. Auch hier sollte die intrazelluläre Kolokalisation der Proteine in diesem Zusammenhang untersucht werden.

3.5.2. RhoA und Calponin

Der GTPase RhoA wird im PCP-Signalweg, und somit während der mediolateralen Zellinterkalation, eine zentrale Rolle zugeschrieben. Dabei wirkt RhoA über die Rho-Kinase (ROK oder ROCK) bei der Stabilisierung bereits existierender Zellfortsätze, bei der erleichterten Bündelung

kontraktiler Aktin-Myosinstressfasern und bei deren Kontraktion (Keller et al., 2000; Winter et al., 2001).

Dabei geht man davon aus, dass die Rho-Kinase in die Modulation der zentralen Stressfasern, die auch mit Calponin 1 und 3 interagieren können, involviert ist (Ridley and Hall, 1992). Tatsächlich konnte für Calponin h1 eine direkte Phosphorylierung der ABD 2 durch ROK *in vitro* nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung durch ROK führte zum Verlust der Aktinbindefähigkeit des Calponins (Kaneko et al., 2000). Die hohe Sequenzhomologie der ABD 2 der verschiedenen Calponin-Proteine lässt auf einen ähnlichen Regulationsmechanismus für Calponin 2 und 3 schließen.

Der experimentelle Nachweis, dass die Funktion des embryonalen Calponin 2 und 3 unter der Kontrolle der GTPasen RhoA bzw. XCdc42 steht und damit der nichtkanonischen Wnt-Signalwege, muss noch erbracht werden. Erste vorläufige Befunde zeigten jedoch, dass der Funktionsverlust von *Xclp2* und *Xclp3* in *Xenopus laevis* Embryonen zu Neuralrohrschlussdefekten (NTD) als Folge einer Inhibition der konvergenten Extensionsbewegungen während der Gastrulation, führte (Loges, 2008). Der NTD Phänotyp ist charakteristisch für einen Funktionsverlust im nichtkanonischen Wnt-Signalweg und entspricht somit der Hypothese, dass Calponine Effektoren jener Signalkaskaden darstellen könnten. Epistaseexperimente, welche die Überexpression von dominant negativen bzw. aktiven Komponenten der nichtkanonischen Wnt-Signalwege (z.B. *RhoA* oder *Xcdc42*) mit einem Funktionsverlust bzw. -gewinn von *Xclp2* und *3* verbinden, würden formal die Beteiligung der Calponine beweisen.

Die in dieser Arbeit hergestellten *Xclp3* Mutanten könnten in solchen Experimenten weitere Hinweise geben, welche Proteinabschnitte bzw. -domänen für die Calponin Funktion notwendig sind. Zukünftige, weiterführende Analysen, die beispielsweise die subzelluläre

Lokalisierung der Calponin-Proteine in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis* aufklären, könnten einen Mechanismus aufzeigen, wie die nichtkanonische Wnt-Signalkaskade den zentralen embryonalen Prozess der konvergenten Extension steuert.

Kapitel 4: Material und Methode

4.1. Material

4.1.1. Bezugsquellen

Acrylamid/N,N`-Methylenbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	AppliChem
Agarose	Peqlab
Albumin Fraktion V	AppliChem
Ampicillin.....	Sigma-Aldrich
Anti-Digoxigenin-AP	Boehringer
Aprotinin.....	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxidsulfat).....	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Gibco BRL
Bakto-Hefeextrakt	Gibco BRL
Bakto-Peptide	Gibco BRL
Bakterienschalen (9 cm, 15 cm)	Greiner
β - HCG (Gonadotropin).....	Sigma-Aldrich
Boehringer-Blocking-Reagenz (BBR)	Boehringer
BM-Purple.....	Boehringer
Bradford-Reagenz	BIO-RAD
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactopyranosid (X-Gal).....	Roche
Bromphenolblau.....	Serva
Bovine Serum Albumin (Fraction V; BSA)	Roth, Karlsruhe
CHAPS (3-(Cholamidopropyl)-Dimethylammonio)-1-Propan-Sulfonat.....	Sigma-Aldrich
Chloroform.....	Roth, Karlsruhe
6-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Rose-Gal).....	AppliChem
c-Myc (9E10)	Santa Cruz
Cystein	Merck
Deckgläschen.....	Bender und Hobein
Desoxynukleosidtriphosphate	Peqlab
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
Digoxygenin-dNTP-Labeling Mix	Boehringer

N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	Promega
DNA-Purification Kit (Easy Pure)	Biozym Diagnostik
Entwicklerlösung	Kodak, Professional
Ethanol.....	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenguanintetraessigsäure (EGTA).....	Roth, Karlsruhe
Ethyl p-Amino-Benzoate (Benzocaine)	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Ficoll® 400	AppliChem
Filme	Agfa, Kodak
Fixiersalz	Tetanal
Formaldehyd	AppliChem
Formamid	Roth, Karlsruhe
Freon (1,1,2-Trichlorotrifluoroethane)	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glogos	Stratagene
Glutaraldehyd.....	Sigma-Aldrich
Glycerin.....	Roth, Karlsruhe
Glycin	SERVA
Haftsilan.....	Sigma-Aldrich
HCl (37%).....	Merck
Hefe-RNA (torula)	Boehringer
Hefeextrakt.....	Sigma-Aldrich
Heparin	AppliChem
Hydroxyethyl-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES).....	AppliChem
Injektionsnadeln Sterican (0,4 x 20 mm).....	Braun
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Isopropanol.....	Roth, Karlsruhe
K-Acetat	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck

KH ₂ PO ₄	Merck
Ladepuffer-DNA IV (10 x)	AppliChem
Lambda-DNA	Promega
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Ligase (T4-Ligase)	Promega
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	Merck
Maleinsäure	Merck
Maltose	Serva
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	BIO-RAD
mRNA mMessage Machine	Ambion
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem
Mowiol® 488	Hoechst
Na-Acetat	Roth, Karlsruhe
Na-Citrat	Roth, Karlsruhe
NaCl	AppliChem
NaOH	Roth, Karlsruhe
Na-Dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
NGS (Ziegenserum)	Gibco BRL, Eggenstein
Objektträger	Bender und Hohbein
Oligonukleotide	MWG-Biotech AG
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin, Streptomycin (PenStrep)	Gibco BRL, Eggenstein
PeqGold Trifast	PeqLab
pGEM®- T-Easy-Vektor	Promega
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform (Rotiphenol)	Roth, Karlsruhe
Pipetten (Einweg-Pasteur-Pipetten)	Sarstedt

Plasmid-Maxi-Präp.-Kit®.....	Qiagen
Plasmid-Midi-Präp.-Kit®.....	Promega
Plasmid-Mini-Präp.-Kit®.....	Promega
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF).....	Sigma-Aldrich
2-Propanol.....	Roth, Karlsruhe
Proof reading Polymerase (PFU).....	Promega
Proteinase K.....	Sigma-Aldrich
Protein-Marker Broad Range (6-kDa).....	BioLabs Inc.
Qiagen-Tip 500 Säulen®.....	Qiagen
Reaktionsgefäße.....	Eppendorf
Rediprime.....	Promega
Restriktionsendonukleasen und Puffer.....	Promega
RNAse A.....	Promega
RNAse-Inhibitor.....	Promega
Röntgenfilme (Hyperfilm MP).....	Amersham
Saccharose.....	AppliChem
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) ...	Roche Diagnostics, Mannheim
SP6-, T3-, T7 -RNA-Polymerase.....	Promega
Sterilfilter.....	Invitrogen
Superscript-Reverse-Transkriptase.....	Gibco BRL
Taq-DNA-Polymerase (Go Taq).....	Gibco BRL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED).....	Roth, Karlsruhe
Topo-TA-Cloning Kit.....	Invitrogen
Torula RNA (Hefe).....	Sigma-Aldrich
Tris-Base.....	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl.....	Sigma-Aldrich
Trypton.....	AppliChem
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20).....	Serva
Whatman 3 mm Papier.....	Bender und Hobein

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien bzw. Materialien wurden von den Firmen AppliChem (Dornstedt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Multimed (Kirchheim u. Teck), Häberle (Lonsee, Ettlenschieß), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich GmbH (Deisenhofen), NeoLab (Heidelberg) bezogen.

4.1.2. Puffer, Lösungen und Medien

Bei den Prozentangaben in Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern handelt es sich (ohne weitere Anmerkung) um Volumenprozent (v/v).

Alkalischer Agarose 2 x Ladepuffer: Für 1 mL: 200 μ L Glycerin; 750 μ L H₂O; 45 μ L gesättigtes BPB; 5 μ L 5 M NaCl

10 x Alkalischer Puffer: Für 50 mL: 3 mL 5 M NaOH; 2 mL 5 M EDTA; 45 mL H₂O.

Antikörper-Puffer: 10% Ziegen Serum (30 min bei 56°C deaktiviert); 1% Boehringer Blocking Reagenz in PBSw.

AP1-Puffer (pH 9,5): 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,5); 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂

Bleaching Lösung: 4% Formamid; 0,3% H₂O₂ ; 0,5 x SSC.

Blockierungslösung: 10% Ziegen Serum (durch Hitze inaktiviert); 1% Boehringer Blocking Reagenz in PBSw; Lösen (65°C).

DNA-Probenpuffer: 10 mM EDTA (pH 8,0); 10% Glycerin; 0,1% (w/v) SDS; 0,02% Bromphenolblau.

Ficoll (2% Lösung): 2 g Ficoll 400 in 100 mL 1 x MBS-H lösen (RT).

Gelatine-Albumin Mixtur: 2,2 g Gelatine in 450 mL PBS (erhitzen) lösen. Nach Zugabe von 135 g BSA längere Zeit rühren; Zugabe von 90 g Saccharose.

Gurdon's Injektionspuffer: 88 mM NaCl; 15 mM HEPES; 1 mM KCl; 15 mM Tris-HCl (pH 7,6).

Hybridisierungs-Mix: Für 50 mL: 0,5 g Böhringer Blocking Reagenz; 25 mL Formamid; 12,5 mL 20 x SSC (pH 7); lösen bei 65°C; Zugabe von 6 mL H₂O;

5 mL 10 mg/mL Hefe-RNA (2 min, 65°C); 100 μ L 50 mg/mL Heparin; 250 μ L 20% Tween 20; 500 μ L CHAPS; 500 μ L 0,5 M EDTA. Lösung steril filtrieren. Lagerung (-20°C).

IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside): Stock Lösung (0,1 M): 1,2 g IPTG werden auf ein Volumen von 50 mL mit H₂O aufgefüllt. Lösung steril filtrieren. Lagerung (4°C).

5 x Laufpuffer (Elektrophoresepuffer): 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% SDS.

LB-Agar: Für 1000 mL: 10 g NaCl; 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 20 g Agar; H₂O. Mit 5 N NaOH pH 7 einstellen.

LB-Agar-Platten mit Ampicillin:

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf 50°C abgekühlt. 30-35 mL des Mediums wurden in 85 mm Petrischale gegeben.

Reagenzien	1 Liter LB	85 mm Petrischale
Ampicillin	100 µg/mL	
IPTG	0.5 mM	100 µL von 100 mM
X-Gal	80 µg/mL	25 µL von 50 mg/mL

LB-Medium: Für 1000 mL: 20 g NaCl; 20 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; H₂O.

X-Gal: Für 2 mL: 100 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactosid
Lösung in 2 mL N,N'-Dimethylformamid lösen.
Lagerung im Dunkeln (-20°C).

MAB (pH 7,5): 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl.

10 x MEMFA: Für 1000 mL: Stocklösung: 500 mL MOPS (pH 7,4); 200 mL
100 mM EGTA; 10 mL 1 M MgSO₄; H₂O.

Gebrauchslösung: Für 1000 mL: 100 mL frisches Formaldehyd (37%);
100 mL 10 x MEMFA; H₂O.

5 x MBS-H: Für 1000 mL: 25,7 g NaCl; 0,375 g KCl; 1 g NaHCO₃; 1 g
MgSO₄/7 H₂O; 0,39 g (CaNO₃)² 4 H₂O; 0,3 g CaCl₂/2H₂O; 11,9 g HEPES;
5 mL PenStrep; H₂O.

Mowiol® 488 Einbettmedium: 96 g Mowiol® 488; 24 g Glycerol;
24 mL H₂O zufügen; 48 mL Tris 0,2 M (pH 8,5); unter Rühren lösen
(55°C);
15 min, 5000 rpm zentrifugieren.

PFA 4% : Für 100 mL : 4 g PFA in 100 mL PBSw + 1 Tropfen NaOH;
lösen in Wasserbad (65°C).

Proteinase K: Stock: 10 mg/mL in H₂O

Für *In Situ* Hybridisierung: 10 µg/mL (Stock 1:1000 verdünnt).

Puffer für Midi-Präps.®:

Puffer 1: 50 mM TrisHCl; 10 mM EDTA (pH 8); Zugabe von 200 µL 20
mg/mL RNaseA.

Puffer 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Puffer 3: 3 M K-Acetat (pH 5,5)

1 x PBS: Für 1000 mL: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,49 g Na₂HPO₄; 24 g
KH₂PO₄; H₂O, pH 7,2 einstellen.

10 x PCR-Puffer: 500 mM Tris-HCl (pH 9); 100 mM MgCl₂.

SOB: 2% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; H₂O.

SOC-Medium: 2% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM
NaCl;
2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose.

SM-Puffer: Für 1000 mL: 5,8 g NaCl; 2 g MgSO₄ · 7 H₂O; 50 mL Tris-HCl (pH 7,5); 5 mL 2% (w/v) Gelatine; H₂O.

Rose-Gal Stocklösung: 100 mg Rose-Gal in 1 mL N-N-Dimethylformamid.

Staining Puffer: 30 mM K₃Fe(CN)₆; 30 mM K₄Fe(CN)₆; 1:10 mit PBS + MgCl₂.

Stripplösung: Für 10 mL (5 mL/Blott): 10 mL 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,2 g SDS; 62,5 µL Mercaptoethanol.

20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Na₃Citrat · x H₂O; mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen.

TAE (Tris/Acetat/EDTA) Elektrophorese Puffer:

90 mM Tris-Base (pH 8,3); 90 mM mL Eisessig; 2,5 mM EDTA (pH 8,0).

TBE-Puffer: 90 mM Tris (pH 8,3); 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA (pH 8,0).

TE-Puffer (Tris/EDTA) Puffer: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA.

TFB1: Für 100 mL: 10 mL 1 M RbCl (M120,92g); 5 mL 1 M MnCl₂(H₂O)₄; 3 mL 1 M K-Acetat (C₂H₃KO₂, M 98,13g); 1 mL 1 M CaCl₂ (M 110,99g); 15 mL Glycerol; 66 mL H₂O, mit HAc auf pH 5,8 einstellen.

TFB2: Für 100 mL: 1 mL 1 M MOPS (pH 6,5 mit KOH 1 N); 1 mL 1 M RbCl₂; 7,5 mL 1 M CaCl₂; 15 mL Glycerol; H₂O.

Transferpuffer (Blotpuffer): Für 1000 mL: 5,82 g Tris (pH 7,2-9,0), 2,93 g Glycin; 200 mL Methanol; H₂O.

Trenngelpuffer: Für 100 mL: 1,5 M Tris (18,172 g); 0,4 % SDS (0,4 g); H₂O, pH 8,8.

Sammelgelpuffer: Für 100 mL: 0,5 M Tris (6,056g); 0,4 % SDS (0,4 g); mit H₂O auf Endvolumen auffüllen, mit HCl pH 6,8 einstellen.

APS (Ammoniumpersulfat): 100 mg APS in 1 mL H₂O lösen. Lösung möglichst frisch verwenden.

Zusammensetzung des Trenn-/Sammelgels:

Für 4 mL Trenngel

	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %
TG-Puffer	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Acrylamid	0,67 mL	1 mL	1,3 mL	1,67 mL
Wasser	2,33 mL	2 mL	1,7 mL	1,33 mL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
APS	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

1 x TBST: 50 mL 10 x TBS mit H₂O auf 500 mL auffüllen;
500 µL TWEEN;

10 x TBS (pH 7,5): 12 g 100 mM Tris; 88 g 1,5 M NaCl; 100 µL H₂O; pH 7,5 einstellen.

λ Pst I-Marker:

6 µL Puffer + 3 µL Enzym Pst I (Promega) + 18,1 µL (→10 µg)

λ DNA (Promega: 553 µg/mL) + 32,9 µL H₂O

= 60 µL; ü.N. (37°C) ; 10 min (68°C).

60 µL Verdauansatz +15 µL 10 x Sample Buffer, + 25 µL H₂O

= 100 µL (0,1 µg/µL).

4.2. Methoden

4.2.1. Umgang mit Nukleinsäuren

Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren:

Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde die Extinktion (E) von UV Strahlung der Wellenlänge 260 und 280 nm beim Durchtreten durch die Nukleinsäurelösung, im Abgleich gegen das jeweilige Lösungsmittel, in einem Spektralphotometer gemessen. Eine E₂₆₀-Einheit entsprach dabei einer DNA-Konzentration von 50 mg/mL, einer RNA-Konzentration von 40 mg/mL und einer Einzelstrang-Oligonukleotid-Konzentration von 20 mg/mL. Das Verhältnis der Extinction, bei 260 und 280 nm, zueinander ist ein Indikator für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Das Verhältnis E₂₆₀ zu E₂₈₀ nimmt bei optimaler Reinheit von DNA den Wert 1,8 und von RNA den Wert 2,0 an.

Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung:

In 70% Ethanol gelöste mRNA wurde mit 3 M Natriumacetat (mit DEPC-H₂O angesetzt, um Verunreinigungen mit RNasen zu vermeiden (pH 5,2)) auf eine Salzkonzentration von 0,3 M eingestellt, gemischt, 30 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in DEPC-H₂O aufgenommen.

Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren mit Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 1% oder 1,5% Agarosegelen. Je nach Größe und Volumen der Gelkammern wurde die entsprechende Menge an Agarose in 60 oder 300 mL 1 x TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,4 µg/mL zugegeben, bevor es in die horizontale Gelkammer gegossen werden konnte. Nach dem Übersichten des Gels mit 1 x TAE-Puffer wurden die, mit 10 x DNA-Probenpuffer versehenen Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Nukleinsäure-Fragmente erfolgte, je nach Gelkammergröße, bei 80 oder 120 V. Im Anschluß wurden die aufgetrennten Fragmente, aufgrund des sich zwischen die Nukleinsäure-Stränge gelagerten und unter UV-Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht.

4.2.1.1. Präparation von RNA

Extraktion von RNA aus Froschembryonen mit dem PeqGOLD TriPure Kit (Peqlab):

Die Extraktionsmethode basiert auf einer Einzelschritt-Flüssigphasen-Separation. PeqGOLD Tripure enthält Phenol und Guanidinthiocyanat in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, wobei die wässrige Phase die RNA enthält. Die Embryonen wurden in 1 mL PeqGOLD Tripure (1 mL PeqGOLD Tri Pure/5-10 x 10⁶ Zellen) mit Hilfe eines Kunststoffhomogenisators homogenisiert und für 5 min (RT) inkubiert. Anschließend wurden 2 mL Chloroform zugegeben, 15 sec kräftig geschüttelt, 10 min (RT) inkubiert und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere farblose wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in 10 mL Isopropanol 15 min (RT) gefällt und danach für 10 min bei 12000 rpm (4°C) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in 75%igen EtOH zweimal resuspendiert und 10 min bei 12000 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in DEPC-Wasser aufgenommen und zum Lösen für 10 min (55°C) erwärmt. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Herstellung von mRNA für die Injektion mit Mmessage Mmachine™; High Yield Capped RNA, Transkription Kit.:

Als Templates für die *in vitro* Transkription wurde linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt. Die Linearisierung musste mit einem Restriktionsenzym durchgeführt worden sein, das seine Erkennungsstelle außerhalb des zu transkribierenden Inserts besitzt.

Ansatz: 20 µL: 1 µg linearisierte Template DNA; 10 µL 2 x NTP/Cap; 2 µL 10 x Reaktions Puffer; 2 µL Enzym Mix; X µL H₂O.

Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde der Reaktionsansatz gemischt und anschließend kurz abzentrifugiert.

Für ein maximales Ergebnis wurde 2 h (37°C) inkubiert.

Zur Degeneration der Template DNA wurde 1 µL DNase 1 zugegeben.

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und für 15 min (37°C) inkubiert.

Gewinn der mRNA:

Phenol/Chloroform Extraktion und Isopropanol Präzipitation:

Mit dieser Methode werden die freien Enzyme und die meisten Nukleotide der mMESSAGE mMACHINE entfernt. Nach der DNase-Behandlung wurde dem Reaktionsgemisch 115 µL Nuklease freies H₂O und 15 µL NH₄-Acetat- Stop-Lösung zugefügt (→ 150 µL).

Die Extraktion erfolgte mit dem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform (150 µL). Der Reaktionsansatz wurde 15 sec gemischt und 1 min abzentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 150 µL Chloroform wurde der Reaktionsansatz 15 sec gemischt und

1 min abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in 150 μ L Isopropanol überführt und gut gemischt. Die Fällung erfolgte für ca. 15 min (-20°C). Anschließend wurde der Reaktionsansatz 15 min (4°C) mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde vorsichtig abgenommen. Das RNA-Pellet wurde in H₂O gelöst. 1 μ L der mRNA-Lösung wurde mit 10 x Sample Buffer auf ein frisch zubereitetes TAE-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf seine Qualität überprüft. Für den späteren Einsatz bei den Injektionsversuchen wurde 2 μ L der mRNA-Lösung mit 198 μ L H₂O vermischt und die Konzentration mit dem Photometer bestimmt.

Herstellung der Digoxigenin markierten RNA-Sonde:
Für die *In Situ* Hybridisierung wurde Digoxigenin markierte Antisinn-RNA *in vitro* transkribiert.

Linearisierung der Plasmid-DNA: Vor der *in vitro* Transkription musste das Genkonstrukt linearisiert werden, um die Transkription der Vektorsequenzen zu vermeiden.

Ansatz: 100 μ L 20 μ g Plasmid-DNA (X μ L); 10 x Puffer (10 μ L); 100 x BSA (1 μ L); Enzym (4 μ L); 100 μ L H₂O; über Nacht (ü.N.) bei 37°C inkubiert.

Die Kontrolle des vollständigen Verdau erfolgte durch die elektrophoretische Gelanalyse. Analyse: 3 μ L des Verdau wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt; Zugabe von 6 μ L H₂O; 1 μ L 10 x Ladepuffer.

600 ng der entsprechenden unverdünnten Plasmid-DNA wurden als Kontrolle (Endvolumen wieder 10 μ L) benutzt.

Aufreinigung der linearisierten Plasmid-DNA:

Zu den Verdauansätzen wurde 10 μ L NH₄-Acetat + 220 μ L 100% EtOH pipettiert. Der Ansatz wurde gut gemischt und ca. 15 min (-20°C) inkubiert. Der Ansatz wurde 20 min abzentrifugiert (4°C). Das DNA-Pellet wurde in 30 μ L H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

In vitro Transkription mit Dig-label Mix (rNTPs):

Die Gensonden wurden in Expressionsvektoren kloniert, die die Transkription von RNA mit Hilfe von Phagen RNA-Polymerasen erlauben. Die RNA-Polymerasen der Bakterio-Phagenstämme Sp6, T3 und T7 wurden je nach verwendeter Plasmid-DNA eingesetzt.

Ansatz der Transkription:

Template (cDNA, linearisiert)	X μ L = 1 μ g
DIG-Mix	2 μ L
Puffer (10 x)	2 μ L
RNAse-Inhibitor	1 μ L
RNA-Polymerase	2 μ L
DEPC-H ₂ O	Auf 20 μ L auffüllen

Aufreinigung der RNA-Sonde:

Zu jeder Reaktion wurden 30 μL H_2O pipettiert. Nach der Zugabe von 5 μL NH_4Acetat und 165 μL 100% EtOH wurde der Ansatz gemischt und 30 min (-20°C) inkubiert. Bei 4°C wurde die gefällte RNA 25 min mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Das Pellet wurde mit 500 μL 70% EtOH gewaschen. Nach dem Entfernen des Alkohols (keine Flüssigkeitsreste) wurde das Pellet in 50 μL Formamid/ H_2O (1:1) aufgenommen und auf dem Gel analysiert. Bei -80°C wurde die Sonde gelagert.

Herstellung von cDNA:

Aus RNA wurde durch Erststrangsynthese mit „SUPERSCRIPT II Rnase H⁻ reversen Transkriptase (Gibco)“ cDNA hergestellt, die in einer nachfolgenden PCR amplifiziert wurde. Dazu wurden ca. 2 μg RNA mit 50 ng „Random Primer“gemischt, für 12 min (70°C) erhitzt und anschließend sofort auf Eis gebracht. Nach der Zugabe von 4 μL Erststrang-Puffer; 2 μL 0,1 M DTT; 1 μL 10 mM dNTP Mix (10 nM von je dATP, dGTP, dTTP und dCTP) wurde die Reaktion für 10 min (RT) inkubiert und anschließend für 2 min (42°C) erhitzt, bevor 1 μL der „SUPERSCRIPT II Reverse Transkriptase“ dazugegeben wurde. Anschließend wurde die Reaktion 50 min (42°C) inkubiert und danach wurde das Enzym 15 min (70°C) inaktiviert.

Verwendete cDNA: Aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien gewonnen: St.11,5; St.15; St. 20; St. 20/21; St. 23/24; St. 28; St. 28/29; St. 32; St. 38; St. 42.

4.2.1.2. Präparation von DNA

Isolierung genomischer DNA

Zu einer kleinen Menge des gewünschten Gewebes wurden 200 μL Lysis-Puffer gegeben. In einem Eppendorf-Gefäß wurde das Gewebe ü.N. (55°C) im Heizblock rotierend verdaut. Anschließend wurde der Ansatz gut gemischt und einige Minuten abzentrifugiert, so daß sich die Gewebsreste absetzten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA dann durch Zugabe von 200 μL Isopropanol (gleiches Volumen) gefällt. Der Reaktionsansatz wurde gemischt, bis die Lösung nicht mehr viskös war; das nun gut sichtbare DNA-Präzipitat wurde mit einer Pipettenspitze entnommen. Die DNA wurde dann in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit dem DNA Purifikation Kit „Easy Pure“ von Biozym. Unter UV-Licht wurde die DNA-Bande knapp aus dem TAE-Gel ausgeschnitten und ihr Volumen bestimmt (100 mg = 100 μL). Anschließend wurde die 3 fache Menge des Ausgangsvolumen an „SALT“-Lösung zugegeben und für mind. 5 min (55°C) unter Schütteln bis zum Lösen des Gelstückes inkubiert. Entsprechend 5 μL + 1 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ der

erwarteten DNA-Ausbeute wurde „BIND“-Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 5 min unter stetigem Schütteln inkubiert. Die DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, in 1 mL Waschlösung vollständig resuspendiert, nochmals durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und vollständig getrocknet. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10-20 μ L deionisiertem Wasser. Diese Lösung wurde nun erneut für 1 min zentrifugiert und der Überstand als gereinigte Probe in ein neues Gefäß überführt.

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Zum Erhalt der codierenden Sequenzen von *Xclp1* und *Xclp3* wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) mit den erzeugten sequenzspezifischen Oligonukleotiden und cDNA durchgeführt. Die als Matrize verwendete cDNA wurde aus der Gesamt-RNA von *Xenopus laevis* im Kaulquappenstadium transkribiert. Um die erhaltenen Klone von *Xclp1* und *Xclp3* anschließend für die Sequenzanalyse und für die *In Situ* Hybridisierung verwenden zu können, wurden diese Sequenzen zunächst in bestimmte Bakterienplasmide, sogenannten Topo®- bzw. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vektoren subkloniert.

Technik: Die PCR ist eine Methode, mit der DNA schnell und spezifisch amplifiziert werden kann. Zur Amplifikation der DNA wurden 100-200 ng der genomischen oder cDNA mit 2,5 μ L 2 mM NTP's; 2,5 μ L 10 x PCR-Puffer; 0,2 μ L thermostabiler DNA-Polymerase (*Taq*) und jeweils 10 pmol Primern in einem Gesamtvolumen von 25 μ L gemischt und in einen Thermocycler eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen der Zyklen richtete sich jeweils nach der Länge der erwarteten Fragmente, sowie der Schmelztemperatur (T_m : melting temperature) der Amplifikationsprimer und werden jeweils empirisch ermittelt.

Oligonukleotide

Xclp1:

Xclp1 cds for. (Klon clp9): 5' ATGTACGGTCACTTCAACAAGGGC 3'

Clal Xclp1cds for.: 5' ATATATCGATATGTACGGTCACTTCAACAAGGGC 3'

Xclp1 cds rev.(Klon clp3): 5' TGTTACTCAGAGTTGTAATACTGG 3'

Xho I Xclp1cds rev.:

5' ATATGAGCTCTGTTACTCAGAGTTGTAATACTGG 3'

Sequenzlänge: 37-654 + 220 = 837 bp

clp9 clp3

Xclp1-Teilsequenzoligonukleotide:

Xcnn1for(Klon 9): 5' CGAGGCAGAGGAACCAGGGGAAAA 3'

Xcnn1rev(Klon 9): 5' AATATCCACTCTGGCACCTTTTACTT 3'

Dafür verwendete EST Sequenzen:

Cnn1est9.Seq: Def. Daa22c05.y1 NICHD XGC Lu1 *Xenopus laevis* cDNA clone IMAGE:4056945, 5' similar to SW:CLP1_MOUSE Q08091

CALPONIN H1, SMOOTH MUSCLE, mRNA sequence. ACCESSION: BF426561, VERSION: BF426561.1 GI: 11437995.

Cnn1est3.Seq: Def. Daa22c05.x1 NICHD XGC Lu1 *Xenopus laevis* cDNA clone IMAGE: 4056945 3' similar to SW: CLPO_CHICK P26932 CALPONIN ALPHA AND BETA, SMOOTH MUSCLE. (1): mRNA sequence. ACCESSION: BG022965.

Xclp2:

Clalcalpocodfor 2 :

5' ATATATCGATATGAGCTCCCAGTTTAACAAGGG 3'

M S S Q F N K

Xholcalporev 2 :

5' ATATCTCGAGGAAGTCCTGCTGGTA 3'

F D Q Q Y

Xclp2-Teilsequenzenoligonukleotide:

Calpopub1 (for): 5' CACCAATGGACCATTCCACC 3' (Morgan et al., 1999)

Calpo A (for): 5' TGACCCCCAAAAGGAGACAG 3'

Calpo B (for): 5' TATGACCCCCAAAAGGAGAC 3'

Calpopub2 (rev): 5' GGTCGTAATGGCAATGTCGCC 3'

Calpo A (rev): 5' ACCAGCAAGTGACAGCAAAG 3'

Calpo B (rev): 5' GCCAAGCCCCAAAATCTGAC 3'

Xclp3:

Xclp3 cds for: 5' ATATATCGATATGGCAAACCTTCAACAAGGGACC 3'

Xcnn3 cds rev: 5' ATATCTCGAGATAATCTATTCCCTGGTCACTGTA 3'

Xclp3-Teilsequenzenoligonukleotide:

Xclp3 For1: 5' ACTGGCATAAGCTGGAGAACATTGG 3'

Xclp3 Rev1: 5' GGTAATCCCTAGGATAGTCATCGG 3'

Xclp3 For2: 5' TAGAAGAAGTGACTGGCATGATAATTGGCG 3'

Xclp3 Rev2: 5' CATCAGGATACTCAGCCTGGTAATCAG 3'

Dafür verwendete EST Sequenzen:

BJ047668 NIBB Mochii normalized *Xenopus neurula*, library *Xenopus laevis* cDNA clone XL017e21 3', mRNA sequence.

BI313066 daf86f10.y1 NICHD_XGC_EYE1 *Xenopus laevis* cDNA clone 5' similar to SW:CLP3_Human Q15417 CALPONIN, ACIDIC ISOFORM, mRNA sequence. Sequenzlänge: 992 bp

Sequenzierungsoligonukleotide:

M 13 forward: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

M 13 reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

T7: 5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'

Subklonierung: Mit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega):PCR Ansatz mit Go Taq Polymerase (→ Poly A Ende).

Ligation mit 2 x Ligations -Puffer

Der gelöste Vektor pGEM® -TEasy und das Kontroll-DNA-Insert wurden zentrifugiert.

Ansatz:

Reagenzien	Standard Reaktion	Positive Kontrolle	Background Ko.
2 x Rapid Ligation Puffer, T4 DNALigase	5 μ L	5 μ L	5 μ L
pGEM®-T Easy Vektor (50 ng)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
PCR Produkt	2 μ L	-	-
Kontroll Insert DNA	-	2 μ L	-
T4 DNA Ligase	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Aqua destinala	Auf 10 μ L	Auf 10 μ L	Auf 10 μ L

Inkubation für 1 h (RT).

Mit dem TOPO® Cloning Kit (Invitrogen):

Klonierung von PCR-Produkten mit dem „TOPO® Cloning Kit (Invitrogen)“.

Das „TOPO®-Klonierungssystem“ bewirkt aufgrund einer schnellen, einstufigen Klonierungsstrategie die Möglichkeit der direkten Insertion von *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Es beruht auf einer Template-unabhängigen Aktivität der thermostabilen *Taq*-Polymerase während PCR-Reaktionen. Diese heftet an alle 3`-Enden doppelsträngiger DNA ein zusätzliches Desoxyadenosin (A). Die A-Überhänge wurden benutzt, um PCR-Produkte in einen speziell konstruierten „pCR™II- TOPO-Vektor“, mit einzelnen 3` Desoxythymidin (T) – Überhängen, zu ligieren. Die kompetenten Zellen wurden mitgeliefert.

Zu 0,5-2 μ L des PCR-Produkts mit einer durchschnittlichen Insertlänge von 400 -1000 bp, wurde H₂O bis zu dem Volumen von 4 μ L hinzugegeben. Anschließend wurde 1 μ L „pCR-TOPO-Vektor“ dazugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen erfolgte innerhalb von 5 min (RT) die Ligation. Das ligierte Plasmid wurde anschließend transformiert.

Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Bakterien wurden mit 3,5 mL Nährmedium mit 50 μ g/mL Ampicillin ü.N.(37°C) gemischt, die E.coli-Suspensionen wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, um dann für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 100 μ L GTE (50 mM Glucose; 25 mM Tris (pH 8); 10 mM EDTA (pH 7,8))

durch Mischen. Anschließend wurden die Lösungen 5 min (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL alkalischer SDS Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurden die Proben durch dreimaliges Umdrehen durchgemischt, bevor 150 mL 3 M Na-Acetat zugegeben wurde. Wieder wurden die Proben vorsichtig für maximal 10 sec durchgemischt und anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1 (v/v)) versetzt, kräftig gemischt und erneut für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthält, wurde abgenommen, mit 1 mL 100% Ethanol (- 20°C) versetzt, gut gemischt und nach 2 min (RT) Inkubationszeit erneut, wie oben, für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, getrocknet und in 50 µL TE-Puffer, der mit Rnase versetzt war, aufgenommen.

Midipräparation von Plasmid-DNA (PureYield Midiprep Protokoll Promega):

100 mL einer ü.N. (37°C) in LB-Selektionsmedium (1% N-Broth, 0,5% Hefe-Extrakt, 100 µg/mL Ampicillin) geschüttelten E.coli-Suspensionskultur wurden in einen Bakterienbecher überführt und 10 min (4°C) im BECKMAN-Rotor „J2-21“ mit 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet (RT) kurz getrocknet. Danach wurde es in 3 mL Suspensionspuffer „P1“ (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg hitzebehandelte RNaseA/mL) gründlich resuspendiert, 5 min (RT) inkubiert und mit 3 mL Lysepuffer „P2“ (0,2 M NaOH, 1% SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken und einer Inkubation von 5 min (RT) wurde die Lösung mit 5 mL 3,0 M K-Acetat (pH 5,5) durch vorsichtiges Schwenken neutralisiert und die Lösung für 5 min (RT) inkubiert.

Bakterienkultur Mit OD ₆₀₀ ~ 100	Cell Resuspension Solution (Y ₁)	Cell Lysis Solution (Y ₂)	Neutralisation Solution (Y ₃)
50 mL – 100 mL	3 mL	3 mL	5 mL

10 min bei 12'000g-14'000g
weiter mit Vakuum- oder Zentrifugationsprotokoll

DNA-Extraktion nach Vakuumprotokoll:

Die blaue Säule (Clearing Column-Promega) wurde auf die weiße Säule (Binding Column) in das Vacuum Minifold gesteckt. Der Überstand wurde auf die blaue Säule gegeben. Das Lysat wurde vollständig durchgesaugt. Zugabe von 5 mL Endotoxin Removal Wash und 20 mL Column Wash Solution (60% EtOH; 60 mM K-Acetat; 8,3 mM Tris-HCl; 0,04 mM EDTA). Die DNA wurde durch Übergießen der Säule mit sterilem H₂O (3 min, 60-70°C) gelöst und mit Swing Out Rotor 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert.

Klonierung

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen:

Pro μg zu verdauender DNA wurden 2-4 Einheiten Enzym in 20 μL Reaktionsvolumen eingesetzt. Inkubation 2 h oder ü.N. (Temperatur enzymspezifisch).

Zippen mit SAP: (Shrimps Alkaline Phosphatase)

Ansatz: Linearisiertes Plasmid (mind. 0,5 μg) + 10 x Puffer (10 %), + SAP (0,5 Units / 0,5 μg Plasmid) + H_2O (20-30 μL); Inkubation 1 h (37°C). Hitzeinaktivierung für 15 min (65°C).

Ligation von DNA Fragmenten:

Vektor und Insert DNA wurden im Verhältnis: 1:1, 1:3, 3:1 verwendet.

ng des Vektors x kb Größe des Insert x molares Verhältnis von Insert
kb Größe des Vektors

Vektor = ng of insert.

Inkubation: 3 h (RT) ; ü.N (4°C); 4-18 h (15°C).

Expressionsvektoren: CS2+MT; CS2+ (Turner and Ralph Rupp).

Für die Überexpressionsexperimente erfolgte die Klonierung der für Calponin codierenden Sequenzen in den für das Gewebe von *Xenopus laevis* geeigneten Expressionsvektor CS2+ (Turner D. and Rupp R.). Dieser enthält sowohl starke Enhancer und den Promotor eines Bakteriophagen (CMV-Viruspromotor), sowie zwei Polylinkerregionen mit Restriktionsschnittstellen als auch SV40 Polyadenylstellen, die das Transkript stabilisieren und ein Ampicillinresistenzgen. Damit ist er bestens geeignet für die *in vitro* als auch für die *in vivo* Transkription.

Technik:

Das zu inserierende Fragment wurde zum entsprechend vorbereiteten Vektor gegeben. (Vektor zuvor mit Restriktionsenzymen „geschnitten“). Je zwei Einheiten T4-DNA-Ligase in Endvolumen von 20 μL 10 x Ligationspuffer (300 mM Tris-HCl (pH 7,4); 100 mM MgCl_2 ; 100 mM DTT; 10 mM ATP). Ligation während der Inkubation (s.o.). 10 μL des Ligationsansatzes wurden in kompetente Bakterien transformiert.

Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

500 ng Plasmid-DNA, bzw. 10-15 μL Ligationsansatz wurden zu 100 μL auf Eis aufgetauten chemisch-kompetenten Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für exakt 90 sec (42°C) erwärmt (Heat shock) und für 2 min auf Eis inkubiert. Zugabe von a) 1 mL LB-Medium (für den Midipräparationsansatz), b) 400 μL LB-Medium (zum späteren Ausplattieren). Die Bakteriensuspension wurde für 1-1.5 h (37°C) inkubiert.

Für den Midipräparationsansatz: Bakteriensuspension in 100 mL LB-Medium + Ampicillin.

Zum Ausplattieren: Die Bakterien wurden durch Zentrifugation 5 min bei

5000 rpm sedimentiert; 800 μL des Überstandes wurden verworfen. Das Bakterienpellet wurde in den verbleibenden 100 μL Medium resuspendiert und in zwei verschiedenen Konzentrationen auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen. Das Trocknen und die Inkubation der Agar-Platten erfolgte für 12-16 h (37°C).

Bakterienstamm: *Escherichia coli* XL1-Blue:

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsd R17 sup E44 rel A1 lac recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tetr)].

Protokoll für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien:

(Rezept von M.Campione)

Eine Kolonie XL1 -Blue Zellen von der Mediumplatte, die am Abend zuvor angeimpft wurde, wurde in 2,5 mL LB oder SOB gegeben und ü.N. (37°C) inkubiert.

Die Bakterienkultur wurde 1:100 in SOB + 20 mM MgSO_4 (1 mL \rightarrow 10 mL) subkultiviert. Die Subkultur wurde in etwa 2,5-3,5 h bis zu einer Dichte von OD (590 nm) von 0,55-0,6 (37°C) inkubiert.

Dann wurden die Bakterien 5 min bei 5000 rpm (4°C) zentrifugiert.

Das Pellet wurde vorsichtig in 40 mL eiskalten TFB1 resuspendiert.

Ab jetzt mussten alle Arbeitsschritte auf Eis ausgeführt werden.

Die Resuspension wurde 5 min auf Eis inkubiert.

Dann wurden die Bakterien für 5 min bei 3000 rpm (4°C) abzentrifugiert.

Die Bakterien wurden vorsichtig in eisgekühltem TFB2 resuspendiert.

Die Suspension wurde 50 min auf Eis inkubiert.

Je 100 μL der Bakteriensuspension wurden in Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem N_2 schockgefrostet.

Die Lagerung der Bakterien erfolgte auf -80°C.

4.2.2. Embryologische Methoden (*Xenopus laevis*)

Xenopus Embryonen:

Die Embryonen von *Xenopus laevis* sind sehr robust. Es ist möglich ihre Entwicklung *in vitro* mit Hilfe von geeigneten Salzlösungen durchzuführen. Aufgrund dessen kann man die Embryonen leicht manipulieren und hat Zugriff auf jedes Entwicklungsstadium.

Umgang mit weiblichen Fröschen und Froscheiern:

Die Weibchen wurden mit 50 μL β -HCG (Gonadotropin (Serva)) in den dorsalen Lymphsack stimuliert. Die Stimulierung sollte mindestens 3 Tage vor dem Versuchsbeginn erfolgen und bleibt für mehrere Wochen bestehen.

Die Stimulation zur Eiablage der Tiere erfolgte 10-12 h vor dem Experiment mit 350-800 μL β -HCG (der Größe der Weibchen entsprechend).

Die stimulierten Weibchen mit stark durchbluteten Kloaken wurden mittels stetiger Massage zur Eiablage angeregt.

Gewinnung der Spermien:

Das Männchen wurde entweder mit Eis unterkühlt und dann am Rückenmark punktiert oder mit 0,05% Benzocain bei Raumtemperatur behandelt (2 L Wasser und 10 mL Benzocain (Stocklösung 10% in reinem EtOH); anschließend wurde eine Ligatur der Aorta durchgeführt. Der männliche Frosch wurde auf mögliche Lebenszeichen hin untersucht. Nach dem negativen Befund wurden ihm beide Hoden entnommen.

Befruchtung:

Die Hoden wurden in 1 x MBS-H (4°C) aufbewahrt.

Die Eier wurden vereinzelt.

Von dem Testis wurden ca. 1-2 mm² abgetrennt und in 1 mL 1x MBS-H maseriert. Die Eier wurden gleichmäßig mit der Spermienlösung benetzt. Aufgrund der hohen Salzkonzentration des 1x MBS-H waren die Spermien zunächst weitgehend immobil.

Nach 5 min wurden die Eier und Spermien mit H₂O bedeckt. Damit änderte sich die Salzkonzentration in ein für die Spermien günstiges Milieu. Diese waren nun in der Lage sich schnell zu bewegen und die Eier zu befruchten. Die Zeit wurde notiert.

Für die Befruchtung wurde eine Zeitspanne von 35-40 min (RT) anberaumt.

Cysteinisierung:

Mit frisch angesetzter Cysteinlösung (2% , pH 7,9-8,0 mit NaOH eingestellt) wurden die befruchteten Eier ca. 7 min (RT) inkubiert. Die Cysteinlösung befreit die Eier von ihrer natürlichen Galerthülle.

Die Cysteinlösung wurde durch 4-5 x Waschen der Zygoten mit 1x MBS-H in einem Becherglas entfernt.

Für die Injektionsexperimente wurden die 2-4 Zell Embryonen in eine 1x MBS-H Lösung mit 2 % Ficoll überführt (Ein Polysaccharid, das das Auslaufen der injizierten Embryonen verhindert, indem es osmotisch das Wasser aus dem Raum unter der Vitellinmembran entfernt).

Albino-Eier mussten mit Nil-Blau (50 µL Nil-Blau-Lösung in 50 mL 1x MBS-H) angefärbt werden. Ca. 2 h nach der Injektion wurden die Embryonen in 0,1x MBS-H überführt.

Bleichen von Embryonen: (Entfernung der Pigmentierung)

Die Embryonen wurden 2 x mit 0,5 x SSC gewaschen.

Die Bleaching-Lösung wurde auf die Embryonen gegeben und diese wurden unter Halogenlicht gebleicht.

Das Bleichen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert.

Durch das Spülen mit 0,5 x SSC wurde die Reaktion gestoppt.

Anschließend wurden die Embryonen in PBS⁻ überführt.

***In Situ* Hybridisierung mit Embryonen:**

Mit Digoxigenin markierte Anti-Sinn-RNAs (Sonden) der drei verschiedenen *Calponingene* hybridisierten spezifisch an die entsprechenden mRNAs des *Xenopus Embryos*. Die Detektion erfolgte durch einen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten, gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper.

Tag1: Für die *In Situ* Hybridisierung wurden zunächst 4 % Paraformaldehyd + 0.2 % Glutaraldehyd in PBS hergestellt. Man benötigte ca. 5 mL pro Ansatz. Die Embryonen wurden über eine Methanolreihe in PBSw rehydriert (75%, 50%, 25% MetOH) und jeweils 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen 5 x je 5 min in PBSw auf Eis gewaschen. Danach gab man 1 mL 4,5 µg/mL Poteinase K in PBSw dazu und inkubierte die Froschembryonen für 10 min (RT), (diese Zeit war jeweils empirisch zu ermitteln). Der Verdau wurde mit frisch hergestelltem 2 mg/mL Glycin in PBSw gestoppt, die Embryonen in PBSw gespült und dann 2 x für 5 min in PBSw gewaschen. Danach wurden die Embryonen 15 min in 2 mL 4% Paraformaldehyd + 0.2% Glutaraldehyd refixiert, in PBSw gespült und danach 3 mal in PBSw für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in 50% PBSw, 50% Hybridisierungslösung, und in 100% Hybridisierungslösung für jeweils 3 min. Anschließend wurden 900 µL Lösung abgezogen und durch 900 µL frische Hybridisierungslösung ersetzt. Die Proben wurden dann für mind. 3 h (65°C) vorhybridisiert. Danach folgte die Zugabe von 200 ng/mL der Sonde (200 ng der Sonde wurden dabei vorher in 100 µL der Hybridisierungslösung für 5 min (95°C) denaturiert). Die Embryonen wurden dann in einem Wasserbad ü.N. (70°C) hybridisiert.

Tag 2.: Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgezogen und dafür 800 µL Hybridisierungslösung zugegeben. Dann wurden die Embryonen 5 min (70°C) gewaschen. Anschließend wurden 400 µL 2 x SSC (pH 4.5) zugegeben (ohne die Prähybridisierungslösung abzuziehen) und das ganze für 5 min (70°C) inkubiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde der Mix abgezogen und die Embryonen zweimal jeweils 30 min in 2 x SSC (pH 7) gewaschen (70°C). Danach erfolgten zwei weitere Waschschrift 10 min in Maleinsäurepuffer (MAB: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5)) (RT). Anschließend wurden die Embryonen noch einmal in MAB gewaschen (70°C). Daraufhin wurden die Embryonen noch zweimal für jeweils 5 min in PBSw gewaschen. Dann folgte die Inkubation der Embryonen in 1 mL Antikörper-Puffer (Ansatz s.o.) für mindestens 2 h (4°C) unter stetigem Mischen. Der Antikörper selbst wurde in 1,5 mL Antikörper-Puffer ebenfalls inkubiert (4°C) und hatte als Stocklösung die Konzentration von 1/10.000 (150 Units/ 200 µL). Nach der Inkubationszeit wurde die Prähybridisierungslösung durch die Antikörperlösung ersetzt. Die Inkubation der Embryonen erfolgte ü.N. (4°C) unter stetigem Mischen.

Tag 3.: Am nächsten Tag wurden die Embryonen zunächst in 0,1% BSA (Fraktion V) in PBSw gewaschen. Anschließend erfolgten 5 weitere Waschschrift mit 0,1% BSA in PBSw für 45 min im größtmöglichen

Volumen. Danach wurden die Embryonen zweimal für 30 min in PBSw gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Embryonen in ein entsprechendes Volumen BM-Purple-Färbelösung überführt. Die Färbung wurde durch die Überführung der Embryonen und dreimaliges Waschen der Embryonen für jeweils 5 min in PBSw gestoppt. Die Dehydratation der Embryonen erfolgte in MetOH mit zunehmender Konzentration. Für die Bilddokumentation mussten die Embryonen in Glycerin überführt werden.

Herstellung von Vibratom-Schnitten:

Zum Einbetten der Embryonen wurde ein Gelatine-Albumin-Mix verwendet. Jeweils 2 mL des Gelatine-Albumin-Mixes wurden rasch mit 140 μ L 25% Glutaraldehyd (Sigma Aldrich) vermischt. Der zu schneidende Embryo wurde in der Gelatine-Albumin-Mixtur vorequibriert. Nach dem Aushärten konnten die Schnitte in PBS mit dem Vibratom angefertigt werden. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und mit Mowiol 488 eingedeckt.

Über-bzw. Missexpression von mRNA und DNA:

Im 4-8 Zellstadium wurden Embryonen in Agar-beschichteten Petrischalen mit 1x MBS-H + 2% Ficoll transferiert. Die synthetisch hergestellten mRNAs bzw. Expressionsvektoren wurden in Gurdons-Puffer auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt und mit Glaskapillaren (5-10 μ m Spitzendurchmesser) in die Embryonen injiziert. Die Eichung der Glaskapillaren erfolgte über die Bestimmung der Tropfengröße nach Injektionen in Fluorinert auf einer Mikrometerskala. Das Volumen des injizierten Tropfen betrug demnach ca. 5 nL. Die injizierten Embryonen wurden für 1-2 h in 1 x MBS-H + 2% Ficoll kultiviert und DNA in 0,1 x MBS-H überführt.

Lineagetracer:

Das Zellschicksal der injizierten Zellen wurde durch die Koinjektion eines Zellschicksalsmarkers wie β Galaktosidase (β Gal) oder das Grün Fluoreszierende Protein (GFP), aus der Qualle *Aequorea victoria* stammend, verfolgt. Beide Proteine stammen von Nichtvertebraten. Sie sind nicht toxisch oder reaktiv und greifen selbst nicht in das Entwicklungsschicksal der Zellen ein. Mischte man β Gal- oder GFP mRNA mit der *Xclp*-mRNA- oder DNA, wurden die Regionen des Embryos markiert, die das Proteinprodukt der exogenen *Xclp*-mRNA exprimieren. Die Menge an in den Überexpressionsexperimenten verwendeten *Zellschicksalsmarker*-mRNA betrug 800 pg. Das GFP kann in lebenden und in geringerer Intensität in fixierten Embryonen unter UV-Licht beobachtet werden.

Nucleäre β Galactosidase Färbung von *Xenopus* Embryos:

Die mit β Galactosidase mRNA coinjizierten Embryos wurden für 1-2 h (RT) in MEMFA fixiert.

Dann wurden die Embryonen 2 x für 5-10 min in 1 mL 1 x PBS + MgCl₂

gewaschen. Die Waschlösung wurde abgezogen.
Dann wurden die Embryonen 2 x für 5-10 min in 1 mL Staining Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation der Embryonen in jew. 1 mL Staining Puffer + 5 µL Substrat Rose-Gal (1 mg/mL). Die Embryonen wurden mit dem Substrat (37°C) im Dunkeln bis zur Färbung inkubiert.
Die Färbung wurde durch 2 x 5 min Waschen in PBS + 1 mM MgCl₂ gestoppt.
Dann wurden die Embryonen 1-2 h in MEMFA fixiert.
Anschließend überführte man die Embryonen in 100% Ethanol und lagerte diese bei -20°C.

Knorpelfärbung von *Xenopus*-Kaulquappen:

Die Embryonen wurden 2 h in Bouin's Fixierlösung (75 Teile gesättigte Pikrinsäure, 25 Teile 37% Formaldehyd, 5 Teile Essigsäure) fixiert.
Anschließend wurden die Kaulquappen in 70% EtOH NH₄OH gewaschen, bis diese rein weiss waren (Rotatorque).
Für 2 x 1 h wurden die Embryonen in Essigsäure äquilibriert.
Gefärbt wurden die Knorpel mit „Alcian blue 8GX (Sigma Aldrich)“ in 5% Essigsäure. Für 2 x 1 h wurden die Embryonen mit 5% Essigsäure gewaschen (end-over-end).

Durchsichtigmachen: Dazu wurden die Organismen in folgenden Lösungen inkubiert:

- a) MeOH 2 x 1 h (end-over-end), anschließend
- b) 2:1 Benzylbenzoate: Benzylalkohol (3 h plus ü.N).

Die Färbung war mindestens 2 Jahre stabil.

Alle Manipulationen wurden in 15 mL Polypropylenröhrchen durchgeführt.

4.2.3. Proteindetektion

Proteindetektion *in vitro*

Nach Überexpression mit *MycXclp2*- und *Xclp3* Expressionskonstrukten wurde das Gesamtprotein aus den *Xenopus Embryonen* im frühen Schwanzknospenstadium (St. 23, St. 24) extrahiert (Whole Embryo Protein Extraction with Freon, Daniel Brown, 2003). Die Proteinbestimmung der Lysate wurde mit Hilfe des Bradford-Assay (Bio-Rad) durchgeführt.

Protein Extraktion mit Freon:

(Für die Abtrennung von Fett und Dotter)

10 Embryonen wurden in einem 1,5 mL Microfugengefäß in einem Trockeneis/Ethanolbad schockgefroren, dabei wurde das die Embryonen umgebende Fett entfernt. Bei -80°C war die Aufbewahrung für die weitere Analyse möglich.

Zu den noch gefrorenen Embryonen wurden 100 µL Lysis-Puffer gegeben.

Dabei sollten die Reaktionsgefäße ständig auf dem Eis verbleiben.

Puffer: 100 mM NaCl; 20 mM NaF; 50 mM Tris (pH 7.5); 5 mM EDTA

Dieser Puffer kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

Vor dem Benutzen wurde frisch hinzugegeben :

1% (v/v) Nonidet P 40;

1% (w/v) Na Deoxycholate;

1:50 EDTA- free Complete Protease Inhibitor (Roche);

10 µL PMF (10 µL/1000 µL) in DMSO;

NaVanadat (100 mM), Tris (pH 7,5);

Leupeptin (10 µL/mL) in Tris (pH 7,5);

Aprotinin (1 µL/mL) in Tris (pH 7,5).

Die Embryonen wurden durch Pipettieren und Mischen (oder mit Hilfe von Ultraschall) lysiert.

Zugabe von 200 µL Freon (1,1,2- Trichlorotrifluoroethane, HPLC Grade, Sigma-Aldrich) und Mischen des Reaktionsansatzes. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min abzentrifugiert (4°C). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford:

Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Bio-Rad Protein-Assay

Erstellung einer BSA/Eichgeraden:

µg BSA / Eichgerade	µL BSA- StammLösung	µL H ₂ O	Gesamtvolumen In µL
1,00	10	790	800
2,00	20	780	800
5,00	50	750	800
10,00	100	700	800
15,00	150	650	800
20,00	200	600	800
Proben	10 µL Probe	790	800

Die Konzentration des BSA-Standards: 100 µg/mL.

Die Eichgerade und die Probenlösung wurde vorpipettiert.

Zu den 800 µL BSA-Standard, bzw. Probelösung wurden 200 µL Bio-Rad-Reagenz zugegeben. Als Leerwert wurden 800 µL H₂O und 200 µL Bio-Rad-Reagenz eingesetzt. Die Proben wurden nach 5-10 min bei 595 nm im Photometer gemessen.

Die Auswertung der Messung erfolgte mit Hilfe von Excel (Bradford.xls).

Gelelektrophorese und Western Blot:

Anschließend folgte die elektrophoretische Übertragung auf eine Membran. Es wurden zwischen 35-60 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Um Aussagen über die molekularen Massen treffen zu können, wurde ein definierter Protein-Marker (Broad Range, BioLabs) verwendet. Mit dem primären unkonjugierten Anti-Myc Antikörper (9E10, Santa Cruz Biotechnology) wurden die markierten Proteine detektiert. Dessen Bindung an das Myc-Epitop konnte mit Hilfe eines mit Meerrettich Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) konjugierten 2. Antikörper

durch die Umsetzung von Luminol über Lumineszenz sichtbar gemacht werden. Eine Berechnung der zu erwartenden Massen der Fusionsproteine ergab für MycXclp2 (294 Aminosäuren) 43,2 kDa und für MycXclp3 (331 Aminosäuren) 47,5 kDa.

Technik:

Benutzt wurde das Bio-Rad-System.

Die Glasplatten wurden entfettet und in den Gießstand eingespannt.

Sammel- und Trenngellösungen für ein 12%-iges Trenngel wurden pipettiert (s.o.) und gut gemischt.

Die Polymerisation des Trenngels wurde durch die Zugabe von 25 µL APS (Ammoniumpersulfat, 10% in H₂O) und 10 µL TEMED (Tetramethylethylen-diamin) gestartet.

Das Gel wurde in den Platten mit 0,3 mL Isopropanol überschichtet.

Nach der Polymerisation (nach ca. 25-30 min) wurde der Isopropanol abgesaugt und dessen Reste mit H₂O (Spritzflasche) entfernt. Die restliche Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgesaugt.

Das Sammelgel wurde gegossen und der Kamm für die Probenfächer sofort eingesetzt. Nach dessen Polymerisation (nach etwa 15 min) wurden die Fächer mit 1 x Laufpuffer gespült und die Gel-Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingebaut.

Die innere und äußere Kammer wurden mit 1 x Laufpuffer gefüllt.

Die Proben und der Molekulargewichtsmarker wurden für 5 min (95°C) erhitzt.

Die Proben und 10 µL des Molekulargewichts-Markers wurden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze aufgetragen (eine Tasche fasst max. 20 µL).

Probenauftrag: pro Spur 15-20 µg Proteinextrakt.

Lauf: bei konstanter Stromstärke (30 mA/Gel, d.h. 60 mA/2 Gele, max. 300 V). Die Spannungsquelle wurde, 4-5 min nachdem die Bromphenolblau-Front aus dem Gel herausgelaufen war, abgestellt.

Die Proteine wurden mit Hilfe des Semidry-Blotter auf einen Nitrozellulosefilter überführt. Das Gel und der Nitrozellulosefilter wurden für ca. 10 min in Blottpuffer (Transferpuffer) äquilibriert (die Blotfilter wurden mit Blottpuffer getränkt).

Blottbedingungen: 90 mA, 10 V, 30-35 min. Nach dem Blotten wurden die Gele mit 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in Glasschalen für 15-30 min angefärbt und anschließend wieder mit dem Entfärber (30-50 % MeOH/10 % Essigsäure/H₂O) bis zu dem gewünschten Kontrast entfärbt.

Der Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft:

Dazu übergoss man den Nitrocellulose-Blot kurz mit 0,2 % Ponceau-S in 3 % TCA (Trichloressigsäure). Mit H₂O wurde der Blot abgespült.

Antikörperinkubation und ECL:

Blocken: Für die Ak-Inkubation wurde 5 % Milchpulver (MP) in TBST zum Blocken verwendet und 1-2 h geblockt (RT).

Der 1. Antikörper wurde entsprechend der jeweiligen Anleitung in frischer Blocklösung verdünnt und ü.N. (4°C), oder 2 h (RT), schüttelnd inkubiert.

Der Blot wurde anschließend 3 x 5 min mit 1 x TBST gewaschen.

Der 2. Antikörper wurde entsprechend der jeweiligen Anleitung in Blocklösung (5% MP-TBST) verdünnt (Anti-Mouse horse radish Ak. 1:1000 (10 µL auf 10 mL pro Ansatz).

Die Blots wurden mit dem 2. Antikörper für 1 h (RT) schüttelnd inkubiert. Der zweite Antikörper wurde anschließend durch 3 x 5 min Waschen mit 1 x TBST entfernt.

Die Inkubationslösung für die ECL (Luminol und p-Coumaric acid) wurde wegen der Lichtempfindlichkeit erst kurz vor dem Auftrag zusammenpipettiert:

2,5 mL Luminol + 25 µL p-Coumaric acid + 4 µL H₂O₂.

Der Blot wurde mit 1 mL Inkubationslösung überschichtet und auf den Röntgenfilm in der Röntgenfilmkassette aufgelegt. Die genaue Belichtungsdauer musste empirisch ermittelt werden.

Der Röntgenfilm wurde entwickelt und fixiert. (3 min kurz wässern; 3 min fixieren; 10 min wässern).

Die Filme wurden im Trockenschrank getrocknet.

Strippen des Blots:

Für eine erneute Antikörperinkubation des Blots mit einem anderen Antikörper, musste der zuvor verwendete Antikörper entfernt (gestrippt) werden. Dazu wurden die Blots mit der Stripplösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und für

1 h (70°C) im Wasserbad erhitzt.

Danach wurden die Blots 3 x 5 min mit 1 x TBST gewaschen und in Blocklösung für 1 h geblockt.

Anschließend konnte der Blot erneut mit einem Antikörper inkubiert werden.

Immunhistochemie, IHC:

Zum immunhistochemischen Nachweis der Fusionsproteine im Zielgewebe (dorsales Mesoderm bzw. dorsaler animaler Bereich) der injizierten Embryonen wurden Stadien 32 bis 36 benutzt. Nach der Inkubation mit dem primären Anti-Myc Antikörper folgte die Reaktion mit dem sekundären Anti-Maus IgG Antikörper (Jackson, Immuno Research), der mit dem Fluorophor Cyanin2 konjugiert war. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnte anschließend die korrekte Expression der Fusionsproteine im Zentralen Nervensystem bzw. in der Chorda dorsalis gezeigt werden.

Technik: Whole mount IHC (Maus-Protokoll, nach Christina Karcher):

Die Embryonen (in Methanol) wurden mit PBS⁻ in zunehmender Konzentration rehydriert (75%, 50%, 25%). Anschließend wurden die Embryonen 3 x 10 min in PBST gewaschen (0,1% TritonX100 in PBS⁻). Preblock der Embryonen in Casein-Block. Inkubation 1 h (RT).

Der Primäre Antikörper wurde in Casein-Block vorverdünnt (Anti Myc tag (9E10)). In diesem Fall eignete sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:100 oder 1:250.

Die Inkubationslösung wurde abgenommen und der Casein-Block mit dem primären Antikörper zugegeben.
Die Inkubation mit dem primären Ak. erfolgte ü.N. (4° C) oder 2-4 h (RT).
Der primäre Ak. wurde durch 3 x 30 min Waschen in PBST (RT) entfernt.
Die Inkubation mit dem sekundären Ak. (Anti Maus Cy2, 1:200 vorverdünnt in CAS-Block) erfolgte ca. 2 h (RT) oder ü.N. bei 4°C. Die Färbung wurde durch Waschen 2 x 1 h oder ü.N. in PBS beendet.

4.2.4. Ortsspezifische Mutation der für das Protein codierenden Nukleotidsequenz

Die theoretisch ersetzten Aminosäuren wurden in die codierenden Basentriplets übersetzt. Die mutierte Nukleotidsequenz diente als Matrize für die Konstruktion von entsprechenden Oligonukleotiden. Pro Mutation wurden zwei Oligonukleotide erzeugt, die den zu amplifizierenden mutierten DNA-Abschnitt flankierten.

Pro mutiertes Basentriplett wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Polymerase-Kettenreaktionen mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. In den ersten Reaktionen wurde jeweils ein Start-Oligonukleotid mit entsprechend mutierter Basensequenz mit dem den gegenläufigen Strang repräsentierenden Oligonukleotid für die Transkription der kompletten Codingsequenz kombiniert. Als Template diente die komplette codierende Sequenz von *Xclp3*. In einer folgenden PCR wurden das rückwärtsgerichtete Oligonukleotid mit mutierter Basensequenz mit dem Start-Oligonukleotid für das gesamte offene Leseraster von *Xclp3* kombiniert.

Durch eine letzte Polymerase-Kettenreaktion wurde mit den Oligonukleotiden der gesamten codierenden Sequenz, die das mutierte Basentriplett enthaltende *Xclp3* DNA Sequenz erzeugt.

Die nach der PCR erhaltenen mutierten cDNA Sequenzen wurden sequenziert und mit dem Programm NCBI formatting BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi) auf ihre funktionellen Domänen untersucht. Die konstitutive Aktivität sollte nach der Klonierung in ektopischen Überexpressionsexperimenten überprüft werden.

Konstrukte:

CamKmutXclp3(S162C)

CK1mutXclp3(S244A)

SrcmutXclp3(Y229A)

Oligonukleotide:

S162C forw.: 5`ATG AAA GCT GGC CAA TGT GTC ATA GGC CTA CAG
3`

S162C rev.: 5`CTG TAG GCC TAT GAC ACA TTG GCC AGC TTT CAT
3`

Y229A/D230A forw.: 5`ATG AAA GCT CCA GGA ACA AGA AGA GAT
ATT GCA GCA CAG AAA 3`

Y229A/D230A rev.: 5`TTT CTG TGC TGC AAT ATC TCT TCT TGT TCC
TGG AGC 3`
S244A forw.: 5`TCT ACT ATT GCA CTG CAA ATG GGA ACC AAT AAA
GTC 3`
S244A rev.: 5`GAC TTT ATT GGT TCC CAT TTG CAG TGC AAT AGT 3`

4.2.5. Klonierung der Deletionsmutanten von Xclp1 und Xclp2

Für die Klonierung der Deletionsmutanten wurden folgende Oligonukleotide entworfen:

In die DNA der Mutanten *Xclp1Clik* und *Xclp2Clik* wurde als Translationsstart das Startcodon für Methionin N-terminal hinzugefügt. In der PCR wurde als Template-DNA die codierende *Xclp2*-DNA benutzt. Für die Überexpressionsexperimente wurde die jeweils mutierte *Xclp* cDNA in den CS2+ Vektor kloniert. Die klonierten mutierten cDNA Sequenzen wurden sequenziert und mit dem Programm NCBI formatting BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi) auf ihre funktionellen Domänen untersucht.

Oligonukleotide:

Xclp2Clik forw.: 5`GAATTCATGATTGGGCTGCAG 3`
Xclp2Clik rev.: 5`CTGGAGCTGCCTGCCAAGCCC 3`
Xclp1Clik forw.: 5`GAATTCATGATCGGGCTCCAG 3`
Xclp1Clik rev.: 5`CTCGAGTTGGCGGGGCAATCC 3`

Überprüfen der Homologie der Aminosäuresequenzen zwischen Xclp1, 2 und 3 und den Calponinen anderer Vertebraten

Benutzte Datenbanken:

Database: All non-redundant GenBank CDS,
Translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Verwendete Aminosäuresequenzen von Calponin1 verschiedener Vertebraten:

Coturnix coturnix (Acc.ABD1772), *Danio rerio* (Acc.AAI07982), *Mus musculus* (NP_082320), *Homo sapiens* (Acc.CAG46646).

Verwendete Aminosäuresequenzen von Calponin2 verschiedener Vertebraten:

Danio rerio (Acc.AAZ14863), *Mus musculus* (Acc.NP_031751), *Homo sapiens* (Acc.CAG46630).

Verwendete Aminosäuresequenzen von Calponin3 verschiedener Vertebraten:

Gallus gallus (Acc.XP422326), *Danio rerio* (Acc.NP_956047; Acc.AAH53309, Vers.GI:31419012), *Mus musculus* (Acc.NP_082320, Vers.GI:21312564), *Homo sapiens* (Acc.CAG46646, Vers.GI:49456651); *Xenopus laevis* (*Xclp3*).

4.2.6. Statistik

Der p-Wert wurde mit Hilfe des 2 x 2 Tables Chi Quadrat ermittelt und nach Bonferroni korrigiert. p = n.s., statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$); p = s statistisch signifikant ($p < 0,01$); p = h.s., statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

Kapitel 5.: Literaturverzeichnis

Abe M., Takahashi K. and Hiwada K., Effect of calponin on actin-activated myosin ATPase activity. J. Biochem. (Tokyo) 108, 835-838 (1990).

Abouzaglou J., Bénistant C., Gimona M., Roustan C., Kassab R. and Fattoum A., Tyrosine phosphorylation of calponins. Eur. J. Biochem. 271, 2615-2623 (2004).

Adler P.N., Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. Dev. Cell 2, 525-535 (2002).

Agius E., Oelgeschläger M, Wessely O., Kemp C., De Robertis E.M., Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. Development, 127, 1173-83, (2000).

Akitaya, T., and Bronner-Fraser, M., Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. Dev. Dyn. 194, 12-20 (1992).

Andrew D. Chalmers and Jonathan M.W. Slack, The *Xenopus* tadpole gut: fate maps and morphogenetic movements. Development 127, 381-392 (2000).

Applegate D., Feng W., Green R.S. and Taubmann M.B., Cloning and expression of a novel acidic calponin isoform from aortic vascular smooth muscle. J. Biol. Chem. 269, 10683-10690 (1994).

Aybar M.J., Nieto A.M. and Mayor R., *Snail* precedes *Slug* in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. Development 130, 483-494 (2003).

Babu G.J., Celia G., Rhee A.Y., Yamamura H., Takahashi K., Brozovich F.V., Osol G., and Periasamy M., Effects of h1-calponin ablation on the contractile properties of bladder versus vascular smooth muscle in mice lacking SM-B myosin. J. Physiol. 577, 1033-1042 (2006).

Bafico A., Liu G., Yaniv A., Aeronson S.A., Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. Nat. Cell Biol 3: 683-686 (2001).

Baker P.C. and Schroeder T., Cytoplasmic filaments and morphogenetic movement in the amphibian neural tube. Dev. Biol.. 15, 432-450 (1967).

Bartegi A., Roustan C., Kassab R. and Fattoum Abdellatif, Fluorescence studies of the carboxyl-terminal domain of smooth muscle calponin. Eur J. Biochem. 262, 335-341 (1999).

Bishop M. and Varmus H.E., The Nobel Prize in Physiology or Medicine, Press Release (1989).

Boettger T., Wittler L., Kessel M., FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr. Biol.* 9: 277-80 (1999).

Bouwmeester T. The Spemann-Mangold organizer: the control of fate specification and morphogenetic rearrangements during gastrulation in *Xenopus*, *int. J. Dev. Biol.* 45, 251-258 (2001).

Bouwmeester T. and Leyns L., Vertebrate head induction by anterior primitive endoderm. *BioEssays* 19, 855-863 (1997).

Bouwmeester T., Kim S.-H., Sasai Y., Lu B. and De Robertis E.M., Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601 (1996).

Boyce S.T., Ham R.G., Calcium regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* 81, 33s-40s (1983).

Brodland G.W., Do lamellipodia have the mechanical capacity to drive convergent extension? *Int. J. Dev. Biol.* 50; 151-155 (2006).

Burnside B., Microtubules and microfilaments in newt neurulation. *Dev. Biol.* 26, 416-441 (1971).

Burnside, M. B., and Jacobson, A. G., Analysis of morphogenetic movements in the neural plate of the newt *Taricha torosa*. *Dev. Biol.* 18, 537-552 (1968).

Burtnick L.D., Urosev D., Irobi E., Narayan K. and Robinson R.C., Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J.* 23, 2713-2722 (2004).

Burgstaller G., Kranewitter W.J. and Gimona M., The molecular basis for the autoregulation of calponin by isoform-specific C-terminal tail sequences, *Journal of Cell Science* 115, 2021-2029 (2002).

Campbell G.R., Campbell J.H., Manderson J.A., Horrigan S. and Rennick, R.E., *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112, 977-986 (1998).

Cano, A., Perez-Moreno M. A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M. J., del Barrio M. G., Portillo F., and Nieto M. A., The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76-83 (2000).

- Carl T.F., Dufton C., Hanken J. and Klymkowsky W., Inhibition of Neural Crest Migration in *Xenopus* Using Antisense Slug RNA. *Developmental Biology* 213, 101-115 (1999).
- Castresana J. and Saraste M., Does Vav bind to F-actin through a CH domain? *FEBS Lett.* 374, 149-151 (1995).
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805 (1994).
- Chalmers A.D., Strauss B., Papalopulu N., Oriented cell divisions asymmetrically segregate a PKC and generate cell fate diversity in the early *Xenopus* embryo. *Development* 130: 2657-2668 (2003).
- Chalmers A.D. and Slack J.M.W., Development of the gut in *Xenopus laevis*. *Dev. Dynam.* 212, 509-521 (1998).
- Chalovich J.M. and Eisenberg E., *J. Biol. Chem.* 257, 2432- 2437 (1982).
- Chellaiah M.A., Biswas R.S., Yuen D., Alvarez U.M. and Hruska K.A., Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate directs association of Src homology 2-containing signaling proteins with gelsolin. *J. Biol. Chem.* 276, 47434-47444 (2001).
- Choi, S. C., and Han, J. K., *Xenopus* Cdc42 regulates convergent extension movements during gastrulation through Wnt/Ca²⁺ signaling pathway. *Dev. Biol.* 244, 342-357 (2002).
- Chuan Y., Yue Z.J., Song J.F., Huang Z.F., Liu H.B., Zhu Z.H., Zhang X.J., Zhang Y., Tan P.P., Ma R.L., Molecular Cloning of Smooth Muscle Calponin h1 in Sheep. *Inst.of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China* (2005).
- Cohen jr. M.M., Asymmetry: molecular biologic , embryopathic and clinical perspectives. *Am. J. Med. Genet.* 101, 292-314 (2001).
- Costanzo R., Watterson R.L. and Schoenwolf G.C., Evidence that secondary neurulation occurs autonomously in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 219, 233-240 (1982).
- Couly G., Grapin-Botton A., Coltey P. and Le Douarin N. M., The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development* 122, 3393-3407 (1996).

- Cramer L.P., Molecular mechanism of actin-dependent retrograde flow in lamellipodia of motile cells. *Front. Bioscience* 2, d260-d270 (1997).
- Dale L. and Slack J.M.W., Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*, *Development* 99, 527-51 (1987).
- Danninger C., Gimona M., Live dynamics of GFP-calponin: isoform-specific modulation of the actin cytoskeleton and autoregulation by C-terminal sequences. *J. of Cell Science* 113, 3725-3736 (2000).
- Davidson L.A. and Keller R.E. , Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, protrusive activity, cell intercalation and convergent extension, *Development* 126, 4547-4556 (1999).
- De Robertis M., Spemann's organizer and selfregulation in amphibian embryos. *Developmental Cell Biology, Timelife, Nature. com* Vol.7 (2006).
- De Robertis M., Kuroda H., Dorsal-Ventral Patterning and Neural induction in *Xenopus* Embryos, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 285-308, (2004).
- Draeger A., Gimona M., Stuckert A., Celis J.E. and Small J.V., Calponin: developmental isoforms and low molecular weight variant, *FEBS Lett.* 291: 24-28 (1991).
- Duong L.T. and Rodan G.A., PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. *Cell motil. Cytoskel.* 4, 174-188 (2000).
- Dupre-Crochet S., Figueroa A., Hogan C., Ferber E.C., Bialucha C.U., adams J., Richardson E.C., Fujita Y., Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol. Cell. Biol.* 27(10): 3804-16 (2007).
- Eden S. et al., Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418 (6899), 790-3 (2002).
- El-Mezgueldi M., Strasser P., Fattoum A. and Gimona M., Expressing functional domains of mouse calponin: involvement of the region around Alanine 145 in the actomyosin ATPase inhibitory activity of calponin. *Biochemistry* 35, 3654-3661 (1996).
- EL-Mezgueldi M., Moleculesin focus: Calponin. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 28: 1185-1189 (1996).
- EL-Mezgueldi and Marston S.B., The effects of smooth muscle calponin on the strong and weak myosin binding sites on F-actin. *J. Biol Chem.* 271, 28161-28167 (1996).

Essex L.J., Mayor R.M. and Sargent M.G., Expression of *Xenopus snail* in mesoderm and prospective neural fold ectoderm. *Devel. Dynamics*. 198, 108-122 (1993).

Essner J.J., Amack J.D., Nyholm M.K., Harris E.B., Yost H.J., Kupfer'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).

Evans L.L., Lee A.J., Bridgman P.C. and Mooseker M.S., Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J. Cell Science*. 111, 2055-2066 (1998).

Ezin A.M., Skoglund P., Keller R., The presumptive floor plate (notoplate) induces behaviors associated with convergent extension in medial but not lateral neural plate cells of *Xenopus*. *Developmental Biology* 300, 670-686 (2006).

Fattoum A., Roustan C., Smycznski C., De Terrossian E. and Kassab R., Mapping the microtubule binding regions of calponin. *Biochemistry*. 42, 1274-1282 (2003).

Ferhat L., Rami G., Medina I., Ben-Ari Y. and Represa A., Process formation results from the imbalance between motor-mediated forces, *J. Cell. Sci.* 114, pp 3899-3904 (2001).

Ferhat L., Charton G., Represa A., Ben-Ari Y., Der Terrossian E. and Khrestchatski M., Acidic calponin cloned from neural cells is differentially expressed during rat brain development. *Eur. J. Neuroscience* 8, 1501-1509 (1996).

Ferjani I., Fattoum A., Sutherland K.M., Manai M., Benyamin Y., Roustan C., Calponin binds G-actin and F-actin with similar affinity. *FEBS Letters* 580, 4801-4806 (2006).

Ferjani I., Fattoum A., Maciver S.K., Bénistant C., Chahinian A., Manai M., Benyamin Y. and Roustan C.. A direct interaction with calponin inhibits the actin nucleating activity of gelsolin, *Biochem. J.* 396 pp. 461-468 (2006).

Frid M.G., Shekhhonin B.V., Koteliansky V.E. and Glukhova M.A., Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev. Biol.* 153(2): 185-93 (1992).

Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M., and De Robertis, E. M., Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131, 980-993 (2007).

Fujii T., Yabe S., Nakamura K. and Koizumi Y., Functional Analysis of Rat Acidic Calponin, *Biol. Pharm. Bull.* 25(5) 573-579 (2002).

Fujii T., Yamana K., Ogoma Y. and Kondo Y., Interaction of calponin with phospholipids. *J. Biochem.* 117, 999-1003 (1995).

Fujii T., Oomatsuzawa A., Kuzumaki N. and Kondo Y., Calcium-dependent regulation of smooth muscle calponin by S100. *J. Biochem. (Tokyo)* 116, 121-127 (1994).

Fuji T., Hiromori T., Hamamoto M. and Suzuki T., Interaction of chicken gizzard smooth muscle calponin with brain microtubules. *J. Biochem.* 122, 344-351 (1997).

Fujii T., *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 2622-2626 (1991).

Fukui Y., Masuda H., Takagi M., Takahashi K. and Kiyokane K., The presence of h2-calponin in human keratinocyte. *J. Dermatol. Sci.* 14, 29-36 (1997).

Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F. and Kaibuchi K., Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109, 873-885 (2002).

Fukui Y., Masuda H., Takagi M., Takahashi K. and Kiyokane K., The presence of h2-calponin in human keratinocyte. *J. Dermatol. Sci.* 14, 29-36 (1997).

Gargioli, C., and Slack, J. M., Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development* 131, 2669-2679 (2004).

Gimona M., Kaverina G., Resch P., Vignal E. and Burgstaller G., Calponin Repeats Regulate Actin Filament Stability and Formation of Podosomes in Smooth Muscle Cells, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 14, 2482-2491 (2003).

Gimona Mario, Djinovic-Carugo Kristina, Kranewitter Wolfgang J., Winder Steven J., Functional plasticity of CH domains. *FEBS Letters* 513, 98-106 (2002).

Gimona M. and Mital R., The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding. *J. Cell Sci.*, 111, 1813-1821 (1998).

Gimona M. and Small J. V., Calponin. In *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (ed. M. Bárány), pp. 91-103. Academic Press, San Diego, (1996).

Gimona M., Sparrow M.P., Strasser P., Herzog M. and Small J.V., Calponin and SM22 isoforms in avian and mammalian smooth muscle. Absence of phosphorylation *in vivo*. Eur J. Biochem. 205,1067-1075 (1992).

Gimona M., Herzog M., Vanderkerckhove J. and Small J.V., Smooth muscle specific expression of calponin, J.V., FEBS Lett. 274, 159-162 (1990).

Ghislain J., Desmarquet-Trin-Dinh C., Gilardi-Hebenstreit P., Charnay P., and Frain M., Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements cooperate for Krox20 transcriptional control. Development 130, 941-953 (2003).

Glinka A., Wu w., Onichtchouk D., Blumenstock C. and Niehrs C., Head induction by simultaneous repression of BMP and Wnt signalling in *Xenopus*, letters to Nature, Vol. 389, (1997).

Glukhova M.A., Frid M.G. and Koteliansky V.E., Developmental changes in expression of contractile and cytoskeletal proteins in human aortic smooth muscle. J. Biol. Chem. 265, 13042-13046 (1990).

Goetinck S. and Waterston R.H., The *Caenorhabditis elegans* muscle-affecting gene *unc-87* encodes a novel thin filament-associated protein. J. Cell Biol. 127, 79-93 (1994).

De Graaf A.R., investigations into the distribution of blood in the heart and aortic arches of *Xenopus laevis* (Daud.) Exp. Biol. 34, 143-172 (1957).

Green K.J., Geiger B., Jones J.C.R. and Talian J.C., The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes. J. Cell Biol. 104, 1389-1402 (1987).

Habas R., Dawid I.B. and He X., Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signalling is required for vertebrate gastrulation. Genes Dev. 17, 295-309 (2003).

Hama J., Suri C., Haremak T. and Weinstein D.C., The molecular Basis of src Kinase Specificity during Vertebrate Mesoderm Formation. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, 19806-19810 (2002).

Epperlein H.F., Meulemans D., Bronner-Fraser M., Steinbeisser H., Selleck M.A.J., Analysis of cranial neural crest migratory pathways in axolotl using cell markers and transplantation, Development 127, 2751-2761 (2000).

Habas R., Kato Y. and He X., Wnt/frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. Cell 107, 843-854 (2001).

- Haeblerle J.R. (1994). Calponin decreases the rate of cross-bridge cycling and increases maximum force production by smooth muscle myosin in *in vitro* assay. *J. Biol. Chem.*, 269, 12424-12431 (1994).
- Hama J., Suri C., Harekaki T. and Weinstein D.C., The Molecular Basis of Src Kinase Specificity during Vertebrate Mesoderm Formation. *The journal of Biological Chemistry* Vol. 277, 19806-19810 (2002).
- Hamada H., Meno C., Watanabe D. and Saijoh Y., Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* 3:103-113 (2002).
- Han E.K.H., Guadagno T.M., Dalton S.L. and Assoian R.K., A cell cycle and mutational analysis of anchorage-dependent growth: Cell adhesion and TGF-beta 1 control G1/S transit specificity. *J. Cell Biol* 122, 461-471 (1993).
- Harland R., Gerhart J., Formation and function of Spemann's organizer, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 611-67 (1997).
- Hartshorne D.J., Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Johnson L.R., ed.), pp. 423-482, Raven Press, New York (1987).
- Heasman J., Crawford A., Goldstone K., Garner-Hamrick P., Gumbiner B., Mc Crea P., Kintner C., Noro C.Y., Wylie C., Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79, 791-803 (1994).
- Hodgkinson J.L., El-Mezgueldi M., Craig R., Vibert P., Marston S.B. and Lehmann W., 3-D image reconstruction of reconstituted smooth muscle thin filaments containing calponin: visualization of interactions between F-actin and calponin. *J. Mol. Biol.* 273, 150-159 (1997).
- Hörstadius S. und Sellman S., Experimentelle Untersuchungen über die Determination des knorpeligen Kopfskeletts bei Urodelen. *Nov. Act. Reg. Soc. Scient. Ups. Ser. IV* 13, 1-170 (1946).
- Holtfreter J., A study of the mechanics of gastrulation. Part I. *J. Exp. Zool.* 94, 261-318 (1943).
- Hossain M.M., Hwang D.Y., Huang Q.Q., Sasaki Y. and Jin J.P., Developmentally regulated expression of calponin isoforms and the effect of h2-calponin on cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C156-167 (2003).

- Huang Q.Q., Hossain M.M., Wu K., Pope R.M. and Jin J.-P, Role of h2-Calponin in regulating macrophage motility and phagocytosis, JBC Papers in Press. Published on July 9, (2008).
- Huang C., Ni Y., Wang T., Gao Y., Haudenschild C.C. and Zhan X., Down-regulation of the filamentous actin crosslinking activity of cortactin by src-mediated tyrosine phosphorylation. *J.Biol. Chem.* 272, 13911-13915 (1997).
- Itoh T., Suzuki A., Watanabe Y., Mino T., Naka M. and Tanaka T., A calponin peptide enhances Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle contraction without affecting myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 270, 20400-20403 (1995).
- Itoh T., Suzuki S., Suzuki A., Nakamura F., Naka M. and Tanaka T., Effects of exogenously applied calponin on Ca(2+)-regulated force in skinned smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Pflugers Arch* 427, 301-308 (1994).
- Jaffee O.C., The Morphogenesis of the Pronephros of the Leopard Frog (*Rana pipiens*) and Studies on Pronephric Function. Ph.D. Thesis, Univ. of Indiana (1952).
- Jin J.-P., Wu D., Gao J., Nigam R. and Kwong S., Expression and purification of the h1 and h2 isoforms of calponin., ELSEVIER, Protein expression and purification, Vol.31, issue 2, 231-239 (2003).
- Jin J.-P., Walsh M. P., Sutherland C. and Chen W., A role for seine-175 in modulating the molecular conformation of calponin. *Biochem. J.* 350, 579-588 (2000).
- Jin J.P., Walsh M.P. Resek M.E. and Mc Martin G.A.. Expression and ectopic conservation of calponin in different smooth muscles and during development. *Biochem Cell Biol.* 74(2): 187-96 (1996).
- Jostarndt-Fögen K., Djonov V., Draeger A., Expression of smooth muscle markers in the developing murine lung: potential contractile properties and linear descent. *Histochem. Cell Biol* 110: 273-284 (1998).
- Kake T., Kimura S., Takahashi K. and Maruyama K. Calponin induces actin polymerisation at low ionic strength and inhibits depolymerization of actin filaments. *Biochem. J.* 312, 587-592 (1995).
- Kaneko M., Takeoka M., Oguchi M., Koganehira Y., Murata H., Ehara T., Tozuka M., Saida T. and Taniguchi S., Calponin h1 suppresses tumor growth of Src-induced transformed 3Y1 cells in association with a decrease in angiogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 935-943 (2002).

- Kaneko T., Amano M., Maeda A., Goto H., Takahashi K., Ito, M. and Kaibuchi, K., Identification of Calponin as a Novel Substrate of Rho-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 110-116 (2000).
- Katoh Hironori, Hiramoto Kiyo and Negishi Manabu, Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration, *Journal of Cell Science* 119, 56-65, (2005).
- Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Kaibuchi, K. and Fujiwara, K., Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1669-1679 (2001).
- Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Onishi, H., Kaibuchi, K., and Fujiwara, K., Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J. Cell Biol.* 153, 569-584 (2001).
- Keller R., Shaping the Vertebrate Body Plan by Polarized embryonic Cell Movements. *Science* Vol. 298, (2002).
- Keller R., Davidson L., Edlund A., Elul T., Ezin M., Shook D. and Skoglund P. Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 897-922 (2000).
- Keller R. Shih J., Sater A., The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev. Dyn.* 193, 199-217 (1992).
- Keller R. and Tibbetts P., Mediolateral cell intercalation in the dorsal, axial mesoderm of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 131, 539-549 (1989).
- Keller R., Danilchik M., Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 103: 193-209 (1988).
- Keller R.E., The cellular basis of amphibian gastrulation. In: Browder L., (Ed). *The Cellular Basis of Morphogenesis, Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*. Plenum Press, New York, pp- 241-327 (1986).
- Kimura, Y., Matsunami, H., Inoue, T., Shimamura, K., Uchida, N., Ueno, T., Miyazaki, T., and Takeichi, M., Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev. Biol.* 169, 347-358 (1995).
- Klein T.J. and Mlodzik M., Planar cell polarization, An emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 155-176 (2005).
- Knippschild U., Gocht A., Wolff S., Huber N., Löhler J., Stöter M., The casein kinase1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Science direct, Cellular Signalling* 17, 675-689 (2005).

- Knust E., Bossinger O., Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science*, 298, 1955-1959 (2002).
- Kolakowski J. and Dabrowska R.. Insight into kinetics and the mode of the interaction between smooth muscle calponin and F-actin. *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 49 No. 2, 471-479 (2002).
- Kolakowski J., Makuch R., Stepkowski D. and Dabrowska R., Interaction of calponin with actin and its functional implications. *Biochem. J.* 106, 199-204 (1995).
- Kordylewski, L., Light and Electron Microscope Observations of the Development of intestinal Musculature in *Xenopus*. *Z. Mikrosk.-anat. Forsh.* 97, 719-734 (1983).
- Kramer-Zucker A.G., Olale F., Haycraft C.J., Yoder B.K., Schier A.F., Drummond I.A., Cilia-driven fluid flow in the Zebrafish Pronephros, Brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 132: 1907-1921 (2005).
- Kranewitter W.J., Ylännä J. and Gimona M., UNC-87 is an actin bundling protein. *J. Biol. Chem.* 276, 6306-6312 (2001).
- Kruithof B.P., Van Den Hoff M.J., Wessels A., Moormann A.F., Cardiac muscle cell formation after development of the linear heart tube. *Dev. Dyn.* 227, 1-13 (2003).
- Kuehl M., Sheldahl L.C., Park M., Miller J.R., Moon R.T., The Wnt/Ca²⁺ pathway- a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*, 16, 279-283 (2000).
- Kuehl M., Sheldahl L.C., Malbon C.C., Moon R.T., Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein-Kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.*, 275, 12701-12711 (2000).
- Kumar A., Velloso C.P., Imokawa Y. and Brockes J.P., Plasticity of retrovirus-labelled myotubes in the newt limb regeneration blastema. *Dev. Biol.* 218, 125-136, (2000).
- Kuroda H., Wessely O., De Robertis E.M., Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, β -Catenin and Cerberus, *PLoS Biol.* 2, 625-34 (2004).
- Lee J. Y., Harland R.M., Actomyosin contractility and microtubules drive apical constriction in *Xenopus* bottle cells. *Developmental Biology* (2007).

Leinweber B., Parissenti A.M., Gallant C., Gangopadhyay S.S., Kirwan-Rhude A, Leavis P.C. and Morgan K.G., Regulation of Protein-Kinase C by the Cytoskeletal Protein Calponin. The J. of Biol. Chem. Vol. 275, No. 51, 40329-40336 (2000).

Leinweber, B., Tang, J. X., Stafford, W. F., and Chalovich, J. M., Calponin interaction with alpha-actinin-actin: evidence for a structural role for calponin. Biophys J 77, 3208-3217 (1999).

Leinweber B., Tang Jay X., Stafford W. F. and Chalovich J. M., Calponin Interaction with α -Actinin-Actin : Evidence for a Structural Role for Calponin. Biophysical Journal Volume 77, 3208-3217 (1999).

Leinweber B.D., Leavis P.C., Grabarek Z., Wang C.-L.A. and Morgan K.G., Extrazellular regulated kinaes (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. Biochem. J. 344, 117-123 (1999).

Lener T., Burgstaller M.G., The role of calponin in the gene profile of metastatic cells: inhibition of metastatic cell motility by multiple calponin repeats. FEBS Letters 556, 221-226 (2004).

Levin M., Johnson R.L., Stern C.D., Kuehn M., Tabin C.j., A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. Cell 82: 803-814 (1995).

Leyns L., Bouwmeester T., Kim S.H. Piccolo S., De Robertis E.M., Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer . Cell 88: 747-756 (1997).

Linder S.. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol. 17, 107-117, (2007).

Linder S., Aepfelbacher M., Podosomes: adhesion hotspots of invasive cells. Trends Cell Biol. 13, 376-385, (2003).

Linker C., Bronner-Fraser M., Mayor R., Relationship between gene expression domains of *Xsnail*, *Xslug* and *Xtwist* and cell movement in the prospective neural crest of *Xenopus*. Dev. Biol. 224: 215-225 (2000).

Lo D.C., Allen F. and Brockes J.P., Reversal of muscle differentiation during limb regeneration in the axolotl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7230-7234, (1993).

Loges N., „Die Funktion von Calponin-2 und –3 während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*: eine Funktionsverluststudie“ (2008).

Maguchi, M., Nishida, W., Kohara, K., Kuwano, A., Kondo, I., and Hiwada, K., Molecular cloning and gene mapping of human basic and acidic calponins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 238-244 (1995).

Mancilla A, Mayor R., Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of *Xslug* induction. *Dev. Biol.* 177: 580-589 (1996).

Mao ,B., Wu W., Davidson G., Marhold J., Li M. et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664-67 (2002).

Mao B., Wu W., Li Y., Hoppe D., Stannek P. et al., LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411, 321-25 (2001).

Marsden M., De Simone D.W., Regulation of cell polarity, radial intercalation and epiboly in *Xenopus*: novel roles for Integrin and Fibronectin. *Development* 128: 3635-3647 (2001).

Masuda H., Tanaka K., Takagi M., Ohgami K., Sakamaki T., Shibata N. and Takahashi K.J., Molecular cloning and characterization of human non-smooth muscle calponin. *J. Biochem (Tokyo)* 120, 415-424 (1996).

Mataraza J.M., Briggs M.W., Li Z., Entwistle A., Ridley A.J. and Sacks D.B., IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J. Biol. Chem.* 278, 41237-41245 (2003).

Matthew J.D., Khromow A.S. McDuffie M.J., Somlyo A.V., Somlyo A.P. Taniguchi S. and Takahashi K., Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse. *J. Physiol* 529, 811-824 (2000).

Mayor R., Aybar M.J., Induction and development of neural crest in *Xenopus laevis*. *Cell Tissues Res.* 305: 203-209 (2001).

Mayor R., Guerrero N., Young R.M., Gomez-Skarmeta J.L., Cuellar C., A novel function for the *Xslug* gene: control of dorsal mesendoderm development by repressing BMP-4. *Mech. Dev.* 97: 47-56 (2000).

Mayor R., Essex L.J., Bennett M.F. and Sargent M.G., Distinct elements of the *xsna* promotor are required for mesodermal and ectodermal expression. *Development* 119, 661-671 (1993).

- McKay R.M., Peters J.M. and Graff J.M.. The Casein Kinase 1 family: roles in morphogenesis. *Dev. Biol.* 235, 378-387 (2001).
- Medina, A., Reintsch, W., and Steinbeisser, H., *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* 92, 227-237 (2000).
- Medina, A., and Steinbeisser, H., Interaction of Frizzled 7 and Dishevelled in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 218, 671-680 (2000).
- Menice C.B., Hulvershorn J., Adam L.P., Wang C.-L.A. and Morgan K.G., Calponin and mitogen-activated Protein-Kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 272, 25157-25161 (1997).
- Meulemans D. and Bronner-Fraser M., Amphioxus and lamprey AP-2 genes: implications for neural crest evolution and migration patterns. *Development* 129, 4953-4962 (2002).
- El-Mezgueldi M., Strasser P., Fattoum A. and Gimona M., Expressing functional domains of mouse calponin: involvement of the region around alanine 145 in the actomyosin ATPase inhibitory activity of calponin. *Biochemistry* 35, 3654-3661.
- Mezgueldi M., Mendre Ch., Calas B., Kassab Ridha and Fattoum A., Characterization of the Regulatory Domain of Gizzard Calponin, Interactions of the 145-163 Region with F-Actin, Calcium-Binding Proteins and Tropomyosin, *J. Biol. Chem.* 270, 8867-8876 (1995).
- Mezgueldi M., Fattoum A., Derancourt J. and Kassab R., Mapping of the functional domains in the amino-terminal region of calponin. *J. Biol. Chem.* 267, 15943-15951 (1992).
- Miano, J.M., and Olson, E.N., Expression of the smooth muscle cell calponin gene marks the early cardiac and smooth muscle cell lineages during mouse embryogenesis. *J Biol Chem* 271, 7095-7103 (1996).
- Midori Maekawa, Toshimasa Ishizaki, Shuken Boku, Naoki Watanabe, Akiko Fujita, akihiro Iwamatsu, Takashi Obinata, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Shuh Narumiya, Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein-Kinases ROCK and LIM-kinase, *Science* Vol. 285, 06.08. (1999).
- Miller J.R., Rowing C.A., Larabell C.A., Yang-Snyder J.A., Bates R.L. and Moon R.T., Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J. Cell Biol.* 146; 427-437, (1999).

Mino T., Yuasa U., Nakamura F., Naka M. and Tanaka T.. Two distinct actin-binding sites of smooth muscle calponin. *Eur. J. Biochem.* 251, 262-268 (1998).

Mitchell P. J., Timmons P. M., Herbert J. M., Rigby P. W. Tjian R.. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5, 105-119 (1991).

Morales I., Phelps A., Riley B., Raines M., Wirrig E., Snarr B., Jin F., van der Hoff M., Hoffman S. and Wessels A., Muscularizing Tissues in the Endocardial cushion of the Avian Heart Are characterized by the Expression of h1-Calponin, *Dev. Dynamics* 235: 1648-1658 (2006).

Morgan R., Hooiveld M.H.W., Pannese M., Dati G., Broders F., Delarue M., Thiery J-P., Boncinelli E. and Durston A., Calponin modulates the exclusion of Otx-expressing cells from convergence extension movements. *Nature Cell Biology*, Vol.1 (1999).

Morgan, R., and Sargent, M. G., The role in neural patterning of translation initiation factor eIF4AII; induction of neural fold genes. *Development* 124, 2751-2760 (1997).

De las Mulas M., Reymundo C., de los Monteros A.E., Millán and Ordás J., Calponin expression and myoepithelial cell differentiation in canine, feline and human mammary simple carcinomas. *Veterinary and Comparative oncology*, Vol.2, Issue 1, Page 24 (2004).

Naka M., Kureishi Y., Muroga Y., Takahashi K., Ito M., and Tanaka T., Modulation of smooth muscle calponin by Protein-Kinase C and calmodulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 933-937 (1990).

De Robertis E.M. and Kuroda H., Dorsal-Ventral Patterning and Neural Induction in *Xenopus Embryos*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 285-308, (2004).

Naka, M., Kureishi, Y., Muroga, Y., Takahashi, K., Ito, M. and Tanaka, T., Modulation of smooth muscle calponin by Protein-Kinase C and Calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 933-937 (1990).

Nakamura F., Mino T., Yamamoto J., Naka M. and Tanaka T., Identification of the regulatory site in smooth muscle calponin that is phosphorylated by Protein-Kinase C. *J. Biol. Chem.* 268, 6194-6201 (1993).

Nakatsuji N., and Johnson K. E., Cell locomotion *in vitro* by *Xenopus laevis* gastrula mesodermal cells. *Cell Motil.* 2, 149-161 (1982).

- Nakatsuji N., Effects of injected inhibitors of microfilament and microtubule function on the gastrulation movement in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 68, 140-150 (1979).
- Niehrs C., Head in the WNT: the molecular nature of spemann's head organizer. TIG 15, 314-319 (1999).
- Nieto M.A., the snail superfamily of zincfinger transcription factors, nat. Rev. Mol. Cell, Biol, 3, 155-166 (2002).
- Nieto M.A., Reorganization the organizer 75 years on. Cell 98, 417-425 (1999).
- Nigam R., Triggle C.R. and Jin J-P., h1- and h2 calponins are not essential for norepinephrine- or sodium fluoride-induced contraction of rat aortic smooth muscle. J Muscle Res Cell Motil 19, 695-703 (1998).
- Nonaka S., Shiratori H., Sijoh Y. and Hamada H., Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. Nature 418: 96-99 (2002).
- North A.J., Gimona M., Lando Z., and Small J.V., Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. J. Cell Sci. 107, 445-455 (1994).
- North A.J., Gimona M., Cross R.A. and Small J.V.. Calponin is localized in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. J. Cell Biol. 107: 437-444 (1994).
- O'Keefe E.J., Briggaman R.A. and Herman B., Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. J. Cell Biol. 105, 807-817 (1987).
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K. M., A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. J. Cell Biol. 170, 793-802 (2005).
- Parker C.A., Takahashi K., Tang J.X., Tao T. and Morgan K.G., Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. J. Physiol. 508, 187-198 (1998).
- Penzo-Mendez A., Umbhauer M., Djiane A., Boucaut J.C., Riou J.F., Activation of Gbetagamma signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during *Xenopus* gastrulation. Dev. Biol. 257, 302-314 (2003).

Pera E.M., Ikeda A., Eivers E., De Robertis E.M., Integration of IGF, FGF and anti-BMP signals via Smad 1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev.* 17: 3023-3028 (2003).

Pera E.M., De Robertis E.M., A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1. *Mech. Dev.* 96: 183-195 (2000).

Peters J.M., McKay R.M., McKay J.P. and Graff J.M., Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* 401, 345-350 (1999).

Piccolo S., Agius E., Leyns L., Bhattacharya S., Grunz H., Bouwmeester T., De Robertis E.M., The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals, *Nature* 397, 707-710 (1999).

Piccolo S., Sasai Y., Lu B. and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598 (1996).

Plantier M., Fattoum A., Menn B., Ben-Ari Y., Der Terrosian E. and Represa A., Acidic calponin immunoreactivity in postnatal ret brain and cultures: subcellular localization in growth cones, under the plasma membrane and along glial filaments, *Eur. J. Neurosci.* 11, pp. 2810-2812 (1999).

Pollard T.D. and Borisy G.G., Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465 (Erratum in *Cell* 2003, 113, 549 (2003)).

Ponti A., Machacek M., Gupton S.L., Waterman-Storer C.M. Danuser G.. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*, 305: 1782-1786 (2004).

Reidy M.A., Factors controlling smooth-muscle cell proliferation. *Arch pathol Lab Med.*, 116: 1276-1280 (1992).

Reintsch W.E., Hausen P., Dorsoventral differences in cell-cell interactions modulate the motile behaviour of cells from the *Xenopus* gastrula. *Dev. Biol.* Dec 15; 240(2): 387-403 (2001).

Reversade B., Kuroda H., Lee H., Mays A. and De Robertis E.M., Depletion of BMP2, BMP4, BMP7 and Spemann organizer signals induces massive brain formation in *Xenopus* embryos. *Development* 132, 3381-3392 (2005).

Ridley A.J., Hall A., The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*; 70: 389-399 (1992).

Rohatgi R., Ma L., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T. and Kirschner M.W., The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231 (1999).

Sadaghiani B, Thiebaud Ch, neural crest development in the *Xenopus laevis* embryo, studied by interspecific transplantation and scanning electron microscopy. *Developmental Biology* 124 (1): 91-110 (1987).

Sakai Daisuke, Wakamatsu Yoshio, Regulatory Mechanisms for Neural Crest Formation; *Cells Tissues Organs*, 179: 24-35 (2005).

Sakanaka C., Leong P., Xu L., Harrison S. and Williams L., Casein kinase I ϵ in the Wnt pathway: Regulation of β -catenin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12548-12552 (2002).

Saldivar J.R., sechrist J.W., Krull C.E., Ruffins S. and Bronner-Fraser M., *Development*, 124, 2729-2739 (1997).

Samaha F.F., Ip Hon S., Morrissey E.E., Seltzer J., Tang Z., Solway J. and Parmacek M.S., Developmental Pattern of Expression and Genomic organization of the *Calponin-h1* Gene. A contractile smooth muscle cell marker. *J. of Biol Chem.*, Vol. 271, No. 1, pp. 395-403 (1996).

Sater AK, Jacobson AG : The specification of heart mesoderm occurs during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 105: 821-830 (1989).

Schechtman A.M., The mechanics of amphibian gastrulation I. Gastrulation-producing interactions between various regions of an anuran egg (*Ityla regila*). *University of California Publications in Zoology* 51, 1-39 (1942).

Schroeder T.E: Neurulation in *Xenopus laevis*, an analysis and model based upon light and electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morph.* 23, 427- 462, (1970).

Schultheiss T.M., James R.G., Listopadova A., Herzlinger D., Formation of the nephric duct, In: *The Kidney*, edited by Vize P.D. and Bard J.B.L, San Diego, Academic Press, pp 51-60 (2003).

Schweickert A., Weber T., Beyer T., Vick P., Bogusch S., Feistel K., Blum M., Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr Biol* 17: 60-66, (2007).

Selleck M.A., Bronner-Fraser M.: Origins of the avian neural crest. The role of neural plate- epidermal interactions. *Development* 121: 525-538.
Sellers J.R., Eisenberg E. and Adelstein R.S., *J. Biol. Chem.* 257, 13880-13883 (1995).

Shah, N.M., and Anderson, D.J., Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11369-11374 (1997).

Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C., and Moon, R. T., Protein-Kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.* 9, 695-698 (1999).

Shen H., Wilke T., Ashique A.M., Narvey M., Zerucha T., Savino E., Williams T. and Richman J.M., Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression and its role in outgrowth of fascial prominences and limb buds. *Dev. Biol.* 188, 248-266 (1997).

Shih, J., and Keller, R., Patterns of cell motility in the organizer and dorsal mesoderm of *Xenopus laevis*. *Development* 116, 915-930 (1992).

Shirinsky V.P., Biryukov K.G., Hettasch J.M. and Sellers J.R., Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin. *J. Biol. Chem.* 267, 15886-15892 (1992).

Shook D.R., Majer C. and 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).

Skoglund P., Rolo A., Chen X., Barry M., Gumbiner and Ray Keller, Convergence and extension at gastrulation require a myosin IIB-dependent cortical actin network. *Development* 135, 2435-2445 (2008).

Slack, C., Lurix, K., Lewis, S., and Lichten, L., Prenatal genetics: the evolution and future directions of screening and diagnosis. *J. Perinat. Neonatal. Nurs.* 20, 93-97 (2006).

Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B., and Moon, R. T., Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* 182, 114-120 (1997).

Slusarski, D. C., Corces, V. G., and Moon, R. T., Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-413 (1997).

- Small J.V. and Resch G., The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *C. Opinion in Cell Biology*, 17: 517-523 (2005).
- Somlyo A.P. and Somlyo A.V., Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature (London)* 372, 231-236 (1994).
- Spemann H. and Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux'Arch. Entw. Mech. Org.* 100: 599-638, (1924).
- Stern C.D., editor. *Gastrulation*. Cold Spring Harbor Press; Cold Spring Harbor, NY, (2004).
- Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G., Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14, 303-311 (2004).
- Stafford III. W.F., Mabuchi K., Takahashi K. and Tao T., Physical characterization of calponin. *J. Biol. Chem.* 270, 10576-10579 (1995).
- Stradal T., Kranewitter W., Winder S.J. and Gimona M., CH domains revisited. *FEBS Lett.* 431, 134-137 (1998).
- Strasser P., Gimona M., Moessler H., Herzog M. and Small J. V., Mammalian Calponin. *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Lett.* Vol. 330; 1,13-18 (1993).
- Sutherland C., Winder S.J. and Walsh M.P., Smooth muscle calponin: inhibition of skeletal actomyosin ATPase and effect of caldesmon. *J. Cell Biol* 111, 429a (1990).
- Svitkina T.M., Verkhovsky A.B., McQuade K.M., and Borisy G.G., Analysis of the Actin-Myosin II System in Fish Epidermal Keratinocytes: Mechanism of Cell Body Translocation, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 139, Nr.2, 397-415 (1997).
- Szymanski P.T. and Tao T., Localization of Protein Regions involved in the interaction between Calponin and Myosin. *J. Biological Chem.* Vol. 272, No. 17, 11142-11146 (1997).
- Takahashi, K., Yamamura, H., Awata, N., and Takahashi, K., [Role of calponin in the generation and differentiation of blood vessels - increased bone formation in mice lacking smooth muscle calponin -]. *Clin. Calcium.* 11, 450-454 (2001).

- Takahashi S., Yokota C., Takano K., Tanegashima K., Onuma Y. et al., Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development*, 127, 5319-29, (2000).
- Takahashi K., Yoshimoto R., Fuchibe K., Fujishige A., Mitsui-Saito M., Hori M., Ozaki H., Yamamura H., Awata N., Taniguchi S., Katsuki M., Tsuchiya T. and Karaki H., Regulation of shortening velocity by calponin in intact contracting smooth muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 150-157 (2000).
- Takahashi, K., Tazunoki, T., Okada, T., Ohgami, K., Miwa, T., Miki, A., and Shibata, N., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. *J Biochem* 120, 18-21 (1996).
- Takahashi, K., and Nadal-Ginard, B., Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J. Biol. Chem.* 266, 13284-13288 (1991).
- Takahashi, K., Abe, M., Hiwada, K., and Kokubu, T., A novel troponin T-like protein (calponin) in vascular smooth muscle: interaction with tropomyosin paracrystals. *J. Hypertens. Suppl.* 6, S40-43 (1988).
- Takahashi, K., Hiwada, K., and Kokubu, T., Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T-like protein. *Hypertension* 11, 620-626 (1988).
- Takeuchi K., Takahashi K., Abe M., Nishida W., Hiwada K., Nabeya T. and Maruyama K., Co-localization of immunoreactive forms of calponin with actin cytoskeleton in platelets, fibroblasts and vascular smooth muscle. *J. Biochem* 109: 311-316 (1991).
- Tamai K., Semenov, M. Kato Y., Spokony R., Liu C., Katsuyama Y., Hess F., Saint-Jeannet J.P. and He X., LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 407, 530-535 (2000).
- Tamai K., Yokota C., Ariizumi T. and Asashima M., Cytochalasin B inhibits morphogenetic movement and muscle differentiation of activin-treated ectoderm in *Xenopus*. *Dev Growth Differ* 41, 41-49 (1999).
- Tang, J., Hu, G., Hanai, J., Yadlapalli, G., Lin, Y., Zhang, B., Galloway, J., Bahary, N., Sinha, S., Thisse, B., *et al.*, A critical role for calponin 2 in vascular development. *J Biol Chem* 281, 6664-6672 (2006).
- Tang D.-C., Kang H.-M., Jin J.-P., Fraser E.D. and Walsh M.P.. Structure-function relations of smooth muscle calponin. The critical role of serine 175. *J.Biol. Chem.* 271, 8605-8611 (1996).

Taniguchi S., Takeoka M., Ehara T., Hashimoto S., Shibuki H., Yoshimur N., Shigematsu H., Takahashi K. and Katsuki M., Structural fragility of blood vessels and peritoneum in calponin h1-deficient mice, resulting in an increase in hematogenous metastasis and peritoneal dissemination of malignant tumor cells. *Cancer Res* 61, 7627-7634 (2001).

Tatin F., Varon C., Génot E., Moreau V., A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J. Cell Science*, Feb. 15; 119: 769-81 (2006).

Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L., and Moon, R. T., Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* 133, 1123-1137 (1996).

Trabelsi-Terzidis H., Fattoum A., Represa A., Dessi F., Ben-Ari Y. and Der Terossian E., Expression of an acidic isoform of calponin in rat brain: Western blots on one- or two-dimensional gels and immunolocalization in cultured cells. *Biochem. J.* 306; 211-215 (1995).

Trainor P.A., Specification and Patterning of Neural Crest Cells During Caraniofascial Development. *Brain Behav. Evol.* 2005; 66: 266-280 (2005).

Trainor, P. A., Sobieszczuk, D., Wilkinson, D. and Krumlauf, R., Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development* 129, 433-442 (2002).

Tree, D. R., Ma, D., and Axelrod, J. D., A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 217-224 (2002).

Tribulo, C., Aybar, M. J., Nguyen, V. H., Mullins, M. C., and Mayor, R., Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification. *Development* 130, 6441-6452 (2003).

Turner D. and Rupp R.,
www.xenbase.org/WWW/Marker_pages/PlasMaps/CS2%2BMT.html

Ueki N., Sobue K., Kanda K., Hada T. and Higashino K., Expression of high and low molecular weight caldesmon during phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. s. A.*, 84, 9049-9053 (1987).

Uyen Tran, Su Yu Li u. E.M. De Robertis,
(*Xenopus* Whole Mount *In Situ* Hybridization, Oktober 2003).

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A. et al., The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351 (2001).

Vize P.D., Jones E.A. and Pfister R., Development of the *Xenopus* Pronephric System. *Developmental Biology* 171,531-540 (1995).

Vize, P. D., Melton, D. A., Hemmati-Brivanlou, A., and Harland, R. M., Assays for gene function in developing *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* 36, 367-387 (1991).

Watanabe T., Wang S., Noritake J., Kazumasa S., Fukata M., Takefuji M., Nakagawa M., Izumi N., Akiyama T. and Kaibuchi K., Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42 and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. *Developmental Cell*, Vol. 7, 871-833 (2004).

Wallingford J.B. and Habas R., The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421-4436 (2005).

Wallingford, J. B., and Harland, R. M., Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development* 129, 5815-5825 (2002).

Walsh M.P., Carmichael J.D. and Kargacin G.J.. Characterization and confocal imaging of calponin in gastrointestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 265: C1371-C1378 (1993).

Weaver C., Farr G.H., Pan W., Rowing B.A., Wang J. et al., GBP binds kinesin light chain and translocates during cortical rotation in *Xenopus* eggs. *Development* 2003, 148, 691-702, (2003).

Weinstein D.C., Marden J., Carnevali F. and Hemmati-Brivanlou A., FGF-mediated mesoderm induction involves the Src-family kinase Laloo, *Nature* 394, 904-908 (1998).

Wessely O., Agius E., Oelschläger M., Pera E.M., De Robertis E.M., Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 234, 161-173, (2001).

Winder S.J. and Ayscough K.R., Actin-binding proteins, *Journal of Cell Science* 118, 651-654 (2005).

Winder S.J., Allen B.G., Clement-Chomienne O., and Walsh M.P., Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. *Acta Physiol. Scand.* 164, 415-426 (1998).

Winder S.J., and Walsh M.P., Calponin. *Curr.Top. Cell. Regul.* 34, 33-61 (1996).

Winder S.J., Allen B.G., Fraser E. D., Kang H.M., Kargacin G.J., and Walsh M. P., Calponin phosphorylation in vitro and in intact muscle. *Biochem. J.* 296 (Pt 3), 827-836 (1993).

Winder S.J., Walsh M.P., Vasulka C. and Johnson J.D., Calponin-calmodulin interaction: properties and effects on smooth and skeletal muscle actin binding and actomyosin ATPases. *Biochemistry* 32, 13327-13333 (1993).

Winder S.J., and Walsh M.P., Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell Signal* 5, 677-686 (1993).

Winder S.J., Kargacin G.J., Bonet-Kerrache A.A., Pato M.D and Walsh M.P.. Calponin: localisation and regulation of smooth muscle actomyosin MgATPase. *Jap. J. Pharmacol.* 58, 29-34 (1992).

Winder S.J., Pato M.D. and Walsh M.P., Purification and characterization of calponin phosphatase from smooth muscle, *Biochem. J.* 286, 197-203 (1992).

Winder S.J., Sutherland C. and Walsh M.P., A comparison of the effects of calponin on smooth and skeletal muscle actomyosin systems in the presence and absence of caldesmon. *Biochem. J.* 288 (Pt 3), 733-739 (1992).

Winder, S.J., Sutherland, C., and Walsh, M.P., Biochemical and functional characterization of smooth muscle calponin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 304, 37-51 (1991).

Winder S. and Walsh M., Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265, 10148-10155 (1990).

Winder S.J., and Walsh M.P., Structural and functional characterization of calponin fragments. *Biochem. Int.* 22, 335-341 (1990).

Winder S.J. and Walsh M.P., Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell. Signal.* 5, 677-686 (1993).

Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Kares, R., Axelrod, J. D., and Luo, L., Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105, 81-91 (2001).

Winklbauer R., Schürfeld M., Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Development* 126, 3703-3713 (1999).

Winkelbauer Rudolf, Mesodermal Cell Migration during *Xenopus* Gastrulation, *Developmental Biology* 142, 155-168 (1990).

Wu X., Jung G. and Hammer J.A., Functions of unconventional myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 42-51 (2000).

Yamamura H., Hirano N., Koyama H., Nishizawa Y. and Takahashi K., Loss of smooth muscle calponin results in impaired blood vessel maturation in the tumor-host microenvironment. *Cancer Science*, Vol. 98 Issue 5, 757 (2007).

Yoshikawa H., Tniguchi S.-i., Yamamura H., Mori S., Sugimoto M., Miyado K., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Shibata N. and Takahashi K., Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells* 3, 685-695 (1998).

Verwendete Lehrbücher:

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition (2002).

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition (2004).

Neil A. Campbell/Jane B. Reece, *Biologie*, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin (2003).

Dennis Bray, *Cell Movements*, Second Edition, Garland Publishing (2001).

Early Development, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1998).

Gilbert, S.F. *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts (2000).

Hausen P., Riebesell M., *The Early Development of *Xenopus laevis**, an Atlas of the Histology, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1991).

Müller Werner A., Hassel M., *Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen*, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag (1999).

Nieuwkoop P.D. and Faber J., *Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin)*, Garland Publishing, Inc. New York and London (1994).

Pflugfelder Dr. O., Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte und Entwicklungsphysiologie der Tiere. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1970).

Richard P. Harvey, Nadja Rosenthal, HEART development, Academic Press (1999).

Wolpert L., Beddington R., Brockes J., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Entwicklungsbiologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, (1999).