

---

**Die Rolle des Notch-Signaltransduktionsweges  
bei Muster- und Grenzbildungsprozessen  
in *Hydra vulgaris***

**Sandra Tamara Münder**

---

Dissertation  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Sandra Tamara Münder  
aus München

München, den 22.08.2011

Erstgutachter: Prof. A. Böttger  
Zweitgutachter: Prof. B. Conradt  
Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2011

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, August 2011

Sandra Münder

---



*meinem Vater*

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abstract .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>13</b>
2.1 Bedeutung der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Grenzen für die Entwicklung.....	13
2.2 An der Grenzbildung und Aufrechterhaltung involvierte Signalwege .....	14
2.2.1 Bekannte Morphogene aus unterschiedlichen Signalwegen .....	15
2.2.2 Die Bedeutung des Notch- und Eph/Ephrin-Signalweges für die Grenzbildung.....	15
2.2.3 Mechanismen zur Etablierung stabil Signal-sendender und -empfangender Zellen im Notch-Signalweg .....	16
2.2.4 Einfluss von Matrix-Metalloproteasen und des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges auf die Differenzierung und Morphogenese....	22
2.3 Konkrete Beispiele für durch den Notch-Signalweg vermittelte Ausbildung und Aufrechterhaltung von Grenzen während der Entwicklung .....	23
2.3.1 Die Ausbildung der dorso-ventralen Grenze in der Flügel- Imaginalscheibe von <i>Drosophila</i> .....	23
2.3.2 Die Bein-Segmentierung in <i>Drosophila</i> .....	25
2.3.3 Die Segmentierung des Rautenhirns in Vertebraten .....	28
2.4 <i>Hydra</i> als Modellorganismus zur Untersuchung von Muster- und Grenzbildungsprozessen .....	31
2.4.1 Die stetige Gewebedynamik ermöglicht die Untersuchung von Musterbildungsprozessen im adulten Tier.....	32
2.4.2 Entwicklungsrelevante Gewebegrenzen in <i>Hydra</i> .....	35
2.4.2.1 Die Genexpression an kopfspezifischen Grenzen in <i>Hydra</i> ....	36
2.4.2.2 Die Genexpression während der Knospung in <i>Hydra</i> .....	40
2.4.2.3 Die Genexpression während der Kopfgeneration in <i>Hydra</i> ..	47
2.4.3 Theoretische Modelle für Muster- und Grenzbildungsprozesse ..	51
2.4.3.1 Das Gierer-Meinhardt Modell.....	51
2.4.3.2 Übertragung des theoretischen Gierer-Meinhardt Modells auf die Musterbildung in <i>Hydra</i> .....	52
2.4.3.3 Musterbildung durch laterale Aktivierung lokaler, sich ausschließender Signalzustände nach Meinhardt (1982) .....	55

2.4.4	In <i>Hydra</i> identifizierte und untersuchte Signaltransduktionswege	56
2.4.4.1	Der Notch-Signaltransduktionsweg in <i>Hydra</i> .....	56
2.4.4.2	Der Wnt-Signaltransduktionsweg in <i>Hydra</i> .....	62
2.4.4.3	Die Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges für den Kopfororganisator in <i>Hydra</i> .....	66
2.4.4.4	Die Rolle des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in <i>Hydra</i> ..	69
2.4.4.5	Der FGF/FGFR-Signalweg in <i>Hydra</i> .....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>75</b>
3.1	Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Elterntier und Knospe .....	75
3.1.1	Auswirkung der Hemmung des Notch-Signalweges auf die Morphologie knospender Hydren .....	75
3.1.2	Untersuchung der Genexpression an der Grenze zwischen Muttertier und Knospe .....	77
3.1.2.1	Das Notch-Zielgen <i>HyHes</i> .....	77
3.1.2.2	Das HyHES-Protein ist in ekto- und endodermalen Epithelzellen sowie in interstitiellen Stammzellen lokalisiert.....	87
3.1.2.3	<i>HyHes</i> wird während der Knospung in Stadium 8 exprimiert ..	92
3.1.2.4	Relation der Genexpressionen von <i>HyHes</i> , <i>kringelchen</i> , <i>Hydsh</i> und <i>MMP-A3</i> im Knospungsstadium 8 .....	96
3.1.3	Die Hemmung des Notch-Signalweges hat einen Einfluss auf die Genexpression während der Knospung .....	97
3.1.4	Interaktion des Notch-Signalweges mit dem FGF/FGFR-Signalweg während der Knospung .....	104
3.2	Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Bildung einer Grenze zwischen Hypostom-, Rumpf- und Tentakelgewebe .....	107
3.2.1	Auswirkung der Hemmung des Notch-Signalweges auf adulte Kopfstrukturen.....	107
3.2.1.1	Veränderung der Morphologie adulter Kopfstrukturen .....	107
3.2.1.2	Die Hemmung des Notch-Signalweges führt zu einer veränderten Expression kopfspezifischer Gene.....	113
3.2.2	Die Hemmung des Notch-Signalweges führt zu einer Inhibition der Kopfregeneration und zu abnormen apikalen Kopfstrukturen ...	122
3.2.2.1	Veränderung der Morphologie von Kopfregeneraten .....	122
3.2.2.2	Die Genexpression in DAPT-behandelten Kopfregeneraten ist verändert bzw. inhibiert.....	127



3.2.2.3	DAPT-behandelte regenerierende Kappen verlieren die Fähigkeit zur Induktion einer zweiten Körperachse.....	141
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>147</b>
4.1	Bedeutung des Notch-Signalweges für die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe .....	147
4.1.1	<i>HyHes</i> ist ein primäres Zielgen des HvNotch-Rezeptors.....	147
4.1.2	Erst die Genexpression in der späten Knospung markiert eine scharfe Grenze zwischen Muttertier und Knospe.....	149
4.1.3	Auch Gene des Notch-Signalweges werden an der scharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe exprimiert.....	150
4.1.4	Der Notch-Signalweg ist für die Schärfung der Grenze zwischen Muttertier und Knospe in der späten Knospung verantwortlich .	152
4.1.5	Auch ein aktiver FGF/FGFR-Signalweg ist für die Ausbildung einer Grenze zwischen Muttertier und Knospe notwendig .....	154
4.1.6	Modell der ablaufenden Prozesse während der späten Knospung	155
4.2	Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Aufrechterhaltung einer Grenze zwischen Hypostom-, Rumpf- und Tentakelgewebe im adulten Tier .....	159
4.2.1	Die Genexpression und Morphologie adulter Köpfe ist nach DAPT-Behandlung verändert.....	160
4.2.2	Der Notch-Signalweg ist am Erhalt der Tentakelgrenze beteiligt	163
4.2.3	Die Genexpression und Morphologie von Kopfregeneraten ist nach DAPT-Behandlung ebenfalls verändert.....	164
4.2.4	Modell der Aktivität des Notch-Signalweges bei der Musterbildung eines regenerierenden Kopfes .....	169
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>171</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>173</b>
6.1	Materialien .....	173
6.1.1	Chemikalien und Bezugsquellen .....	173
6.1.2	Bakterienstämme .....	175
6.1.3	Enzyme .....	176
6.1.4	Plasmide .....	176
6.1.5	Primer.....	176
6.1.6	Antikörper.....	178

6.1.7	Längen- und Größenstandards .....	179
6.1.8	Geräte .....	180
6.1.9	Kits .....	180
6.1.10	Sonstige Materialien.....	181
6.1.11	Software .....	181
6.1.12	Puffer und Lösungen .....	182
6.2	Molekularbiologische Standardmethoden.....	193
6.2.1	PCR.....	193
6.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	195
6.2.3	Wet Western Blot .....	195
6.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	196
6.3	Methoden für Bakterien.....	196
6.3.1	Bakterielle Expression von Proteinen im kleinen Maßstab.....	196
6.3.2	Bakterielle Expression von Proteinen im großen Maßstab.....	197
6.4	Methoden für Hydra .....	199
6.4.1	Kultivierung von <i>Hydra vulgaris</i> .....	199
6.4.2	Herstellung von cDNA aus <i>Hydra</i> .....	199
6.4.3	Kopfregeneration.....	199
6.4.4	DAPT-Behandlung .....	200
6.4.5	Transplantation von Kopfreferaten .....	201
6.4.6	SU5402-Behandlung.....	201
6.4.7	Biolistische Transformation von Plasmid-DNA .....	201
6.4.8	Nachweis der Peroxidase-Aktivität.....	202
6.4.9	Zellfraktionierung.....	203
6.4.10	Immunfluoreszenzfärbung ganzer Hydren (whole mounts) .....	203
6.4.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	204
6.4.11.1	Sondenherstellung durch PCR.....	204
6.4.11.2	Sondenherstellung durch Linearisierung.....	205
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>209</b>
7.1	Promotorsequenzen .....	209
7.2	Gensequenzen .....	209
7.3	Proteinsequenzen.....	210
7.4	Herstellung und Test des anti-HES-Peptidantikörpers aus Kaninchen	211

7.5 Herstellung und Test des anti-HES-PEYAntikörpers aus Hühnchen....	214
7.6 Untersuchung der Lokalisation des HyHES-Proteins .....	218
7.7 Untersuchung des MMP-A3-Proteins .....	224
7.8 Untersuchung der Gewebeeigenschaft abnormer, adulter Kopfstrukturen in Stadium PIII nach DAPT-Behandlung.....	225
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>229</b>
<b>9 Abkürzungen .....</b>	<b>251</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>253</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>255</b>



## 1 Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg auch in *Hydra* für die Ausbildung und Aufrechterhaltung zweier entwicklungsrelevanter Grenzen benötigt wird. Sowohl während der späten Knospung als auch während der Musterbildung eines Kopfes ist seine Aktivität für die Etablierung zweier benachbarter, scharf zueinander abgegrenzter Signalzentren verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass dies Voraussetzung für die normale Entwicklung von Knospen aber auch für die Strukturierung eines Kopfes in seine drei Teilbereiche ist.

Im Fall der Knospung war nach Inhibition des Notch-Signalweges die Knospenußbildung inhibiert, weshalb sich die Knospen nicht an ihrer Basis einschnüren und vom Elterntier abspalten konnten. Dies resultierte in der Entwicklung stabiler Y-Tiere. Die Expression von *HyHes* und der Matrix-Metalloprotease *MMP-A3* konnte in DAPT-behandelten Tieren nicht mehr detektiert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *HyHes* ein primäres Zielgen des Notch-Signalweges darstellt. Dies konnte auch in einem *in vitro*-Reporterassay bestätigt werden, indem HvNICD die Expression von EGFP ausgehend vom *HyHes*-Promotor über zwei Su(H)-Bindestellen induzieren konnte. Die Expression des FGF-Rezeptors *kringelchen* und des Gerüstproteins *Hydsh* war nach DAPT-Behandlung nicht inhibiert, sondern diffus und unbegrenzt. Eine Expression in klaren, streifenförmigen Domänen an der Knospenbasis wie in unbehandelten Tieren konnte nie beobachtet werden. Demnach wird die Aktivität des Notch-Signalweges im Verlauf der Knospung vermutlich für die Schärfung einer bestehenden Grenze zwischen Muttertier und Knospe benötigt. Dies ermöglicht die definierte, voneinander abgegrenzte Expression von Genen, die einerseits für die voranschreitende Einschnürung der Knospenbasis und andererseits für die Fußdifferenzierung der Knospe verantwortlich sind.

Neben der Knospung wird der Notch-Signalweg auch für den Erhalt adulter Kopfstrukturen und für die *de novo*-Musterbildung eines Kopfes während der

Kopfregeneration benötigt. *Hvnotch* wird in adulten an der Tentakelbasis (an der Grenze zwischen Tentakeln und Tentakelzone) und auch während der Kopfregeneration erhöht exprimiert. Die Inhibition des Notch-Signalweges führte auf morphologischer Ebene zu abnormen Kopfstrukturen und übermäßiger Produktion von Tentakelgewebe. Daraus konnte gefolgert werden, dass der Notch-Signalweg in unbehandelten Tieren die Ausbildung von Tentakelgewebe unterdrückt bzw. verhindert. Dies konnte auch auf molekularer Ebene durch Untersuchung der Expression von *Hywnt3*, *HMMP* und *Hyalx* gezeigt werden. Diese werden in unbehandelten Tieren je spezifisch in einem Teilbereich des Kopfes, nämlich dem Hypostom, den Tentakeln oder der Grenzregion zwischen Tentakeln und Tentakelzone exprimiert. In DAPT-behandelten adulten Tieren und Kopfregeneraten war ihre Expression inhibiert oder verändert und spiegelte die beobachteten Kopf-Fehlbildungen wider. Anhand von Transplantationsversuchen und der Untersuchung der Expression von *Hywnt3* konnte überdies ein Einfluss des Notch-Signalweges auf die *de novo*-Ausbildung eines Kopforgans während der Regeneration beobachtet werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Bedeutung der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Grenzen für die Entwicklung

Während der Entwicklung vielzelliger Organismen müssen Zellen, die zunächst undifferenziert und mehr oder weniger gleichartig vorliegen, in einem definierten Muster zu verschiedenen Zelltypen, Geweben und Strukturen des adulten Organismus ausdifferenzieren. Eine Strategie, um diese Prozesse zu organisieren, besteht darin, einzelne Gruppen von Zellen mit verschiedenen Funktionen und/oder Schicksalen in funktionelle Einheiten, so genannte Kompartimente oder Genexpressionsdomänen, aufzutrennen. Zwischen diesen wird eine scharfe Grenze ausgebildet und später in der Entwicklung aufrechterhalten. An diesen etablierten Grenzen kann es durch kurzreichweitige Signalübertragung zur Induktion spezieller Grenzzellen kommen, die als Organisationszentren fungieren. Sie produzieren selbst wieder Morphogene, die langreichweitig eine progressive, feinere Strukturierung der umliegenden Zellen und damit das Wachstum eines gesamten Gewebes regulieren.

Die Positionierung dieser Grenzen muss bereits vor deren Ausbildung genauestens reguliert werden. Ein möglicher Mechanismus hierfür basiert auf der Ausbildung von Morphogengradienten. Ein theoretisches Modell, das 1972 von Gierer und Meinhardt aufgestellt wurde, erläutert, wie solche Morphogengradienten entstehen und Positionsinformation an Zellen vermitteln (Garcia-Bellido *et al.*, 1973; Gierer und Meinhardt, 1972; Lawrence, 1973, Meinhardt, 1983a und b; Wolpert, 1969). Demnach können Morphogene konzentrationsabhängig einzelne Zielgene oder eine bestimmte Kombination von diesen in nicht-überlappenden, angrenzenden Domänen innerhalb eines morphogenetischen Feldes bestimmter Größe aktivieren (Irvine und Rauskolb, 2001). Derart aktivierte Zielgene werden als Selektorgene bezeichnet und definieren durch ihre Expressionsdomäne einen spezifischen Bereich. Sie bestimmen innerhalb von diesem die Identität und das Schicksal der einzelnen Zellen

(Garcia-Bellido, 1975). Die Grenzen zwischen solchen Genexpressionsdomänen oder Signalzentren sind somit Bereiche, an denen verschiedene Zelltypen bzw. Zellpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen einander gegenüberstehen bzw. direkt benachbart zueinander vorliegen. Die Zellen innerhalb einer Domäne zeigen alle dasselbe Genexpressionsmuster, das sie von dem im benachbarten Bereich unterscheidet.

Um die Integrität, d.h. die Schärfe und Genauigkeit so ausgebildeter Grenzen aufrechterhalten zu können und die weitere Entwicklung des betreffenden Gewebes zu ermöglichen, müssen verschiedene Mechanismen für deren langandauernde Aufrechterhaltung sorgen. Sie basieren auf einer direkten Signalübertragung oder physikalischer Interaktion zwischen den an der Grenze liegenden, benachbarten Zellen. So kann es in der Grenzregion zu Veränderungen in der Zellproliferationsrate, zur Umlagerung der extrazellulären Matrix, zu Unterschieden in der Zelladhäsion bzw. Zell-Zell-Affinität und auch zur Veränderung der mechanischen Spannung kommen, wodurch die effektive und langandauernde Trennung benachbarter Zellen oder Zellpopulationen mit unterschiedlicher Genexpression erzielt wird (Dahmann *et al.*, 2011; Irvine und Rauskolb, 2001).

### **2.2 An der Grenzbildung und Aufrechterhaltung involvierte Signalwege**

Während der Entwicklung eines vielzelligen Organismus bzw. während deren Evolution werden nur sieben Signalwege wiederholt verwendet, um die auftretende zelluläre und morphologische Diversität hervorzubringen bzw. zu koordinieren (Gazave *et al.*, 2009). Hierzu zählen der Wnt-, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )-, Notch-, Hedgehog-, JAK/STAT (Janus Kinase/*Signal transducer and activator of transcription*)-, Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)- und nukleärer Hormonrezeptor- Signalweg. Jeder Signalweg für sich allein, aber auch durch ein komplexes Netzwerk an möglichen Interaktionen zwischen den



einzelnen Signalwegen können verschiedene zelluläre Antworten in unterschiedlichen Geweben bzw. Spezies erzielt werden. Sie sind verantwortlich für die Ausbildung von Gewebepolarität und Körperachsen und koordinieren Musterbildung und Morphogenese. Direkte Zell-Zell-Interaktionen führen dabei über Aktivierung spezifischer Zielgene zur Regulation signal-abhängiger Transkriptionsfaktoren und damit zu einer Veränderung des betreffenden Genexpressionsmusters (Gazave *et al.*, 2009; Pires-daSilva und Sommer, 2003).

### **2.2.1 Bekannte Morphogene aus unterschiedlichen Signalwegen**

Morphogene sind Signalmoleküle, die von einem primären oder sekundären Organisationszentrum, wie spezialisierten Grenzzellen gebildet werden und sich von diesem Zentrum ausgehend graduell innerhalb eines bestimmten Bereichs, eines so genannten morphogenetischen Feldes verteilen. Dadurch vermitteln sie den einzelnen Zellen entlang ihres ausgebildeten Konzentrationsgradienten eine gewisse Positionsinformation und steuern die Entwicklung und Organisation des entsprechenden Gewebes. Sie sind entweder Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*), Hedgehog, Wnt, FGF (*fibroblast growth factor*) oder EGF (*epidermal growth factor*). Auch die Retinsäure ist ein bekanntes Morphogen.

### **2.2.2 Die Bedeutung des Notch- und Eph/Ephrin-Signalweges für die Grenzbildung**

Sowohl der Notch- als auch der Eph/Ephrin- Signalweg sind während Musterbildungsprozessen für die Ausbildung von Grenzen geeignet und notwendig. Die Aktivierung beider Signalwege ist nur durch direkten Kontakt zweier benachbarter Zellen möglich, da die jeweils beteiligten Rezeptoren und Liganden Transmembranproteine oder andersartig in der Membran verankerte Signalmoleküle sind.

Innerhalb einer Population von Zellen kann es zwischen direkt angrenzenden Zellen infolge einer gerichteten, lokalisierten Notch- oder Eph -vermittelten Signalübertragung zur Aufteilung in zwei Teilpopulationen und zur Ausbildung einer Grenze zwischen diesen kommen. Die jeweils Signal-sendenden Zellen (auf denen der Ligand lokalisiert ist) können den gegenüberliegenden Signal-empfangenden (Rezeptor-tragenden) Zellen ein Signal zur Schicksals- oder Verhaltensänderung geben, was sich in einer zwischen den Teilpopulationen unterschiedlichen Genexpression äußert.

Zusätzlich kann es durch bidirektionale Signalübertragung im Falle des Eph/Ephrin-Signalweges zu einer physikalischen Abstoßung von Zellen benachbarter Kompartimente kommen, wodurch die Ausbildung einer scharfen Grenze weiter unterstützt wird. Beide so etablierten, abgegrenzten Kompartimente schließen sich gegenseitig aus und können sich voneinander unabhängig weiterentwickeln und unterschiedliche Strukturen ausbilden. Um eine fortwährende eigenständige Entwicklung der einzelnen Kompartimente zu gewährleisten und eine Vermischung zu verhindern, muss es nach der Etablierung einer scharfen Grenze zwischen ihnen auch zu deren stabiler Erhaltung kommen. Dies basiert unter anderem auf negativen und positiven Rückkopplungsmechanismen innerhalb dieser beiden Signalwege die die induzierte, gerichtete Signalübertragung dauerhaft aktiv halten.

### **2.2.3 Mechanismen zur Etablierung stabil Signal-sendender und -empfangender Zellen im Notch-Signalweg**

Der kritische Schritt zu Beginn der Grenzbildung ist die Etablierung stabil Signal-sendender und Signal-empfangender Zellen, die sich gegenseitig ausschließen, aber zwischen denen gleichzeitig eine gerichtete Signalübertragung stattfinden kann. Dies ist insbesondere im Falle des Notch-Signalweges notwendig, da oftmals der Notch-Rezeptor und seine Liganden auf ähnlichem Niveau in einer Zelle oder auf benachbarten Zellen exprimiert werden. Damit es

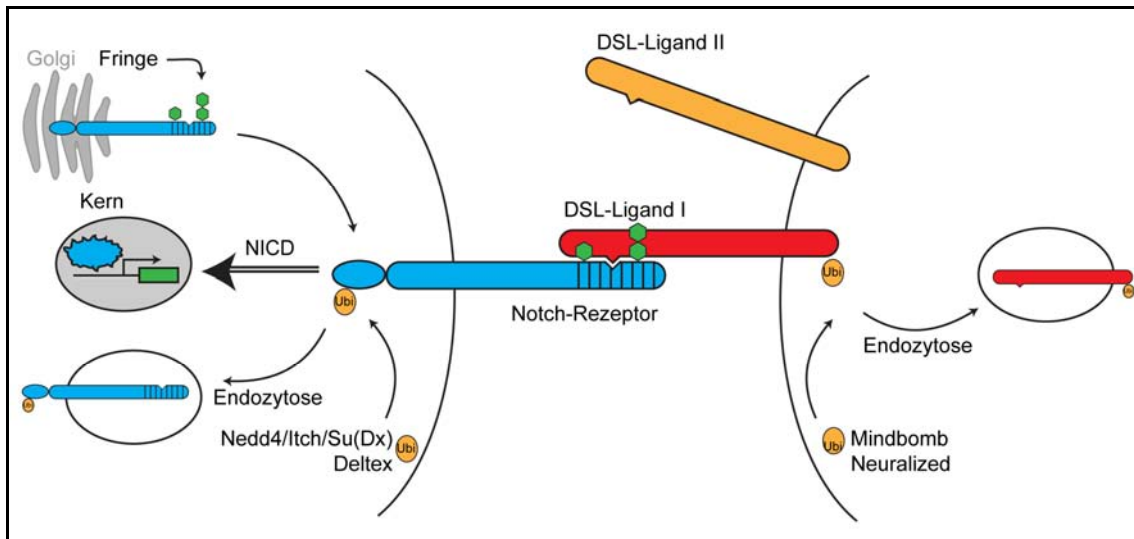
zu einer gerichteten Notch-vermittelten Signalgebung kommen kann, müssen zufällige Schwankungen in der Expression beider Komponenten amplifiziert werden. Dadurch kommt es auf einer Hälfte der beteiligten Zellen zu einem geringen Überschuss einer der beiden Transmembranproteine an der Zelloberfläche, wodurch diese zu Signal-sendenden bzw. empfangenden Zellen werden. Damit sind für die Aktivierung der Signalübertragung oftmals nicht die absolut auftretenden Expressionslevel von Rezeptor und Ligand, sondern vielmehr ihre Relation zueinander ausschlaggebend (Kimble und Simpson, 1997; Greenwald, 1998). Bisher ging man davon aus, dass hierfür transkriptionelle positive bzw. negative „*Feedback-Loops*“ notwendig sind. Diese führen in den Ligand-tragenden Zellen zur Inhibition der Notch-Signalübertragung und in den Rezeptor-tragenden Zellen zur Inhibition der Ligand-Expression (de Celis und Bray, 1997; Greenwald, 1998; Huppert *et al.*, 1997; Kimble und Simpson, 1997; Miller *et al.*, 2009; Muskavitch, 1994).

Es ist bekannt, dass daneben auch auf Proteinebene Regulationsmöglichkeiten bestehen. So kann beispielsweise die Verfügbarkeit der Notch-Rezeptoren und Liganden an der Zelloberfläche reguliert werden, wodurch letztlich die Aktivität und „Richtung“ der Notch-vermittelten Signalübertragung gesteuert werden können. Beschrieben sind posttranslationale Modifizierungen der Rezeptor- und Ligandmoleküle in Form von Ubiquitinierungen oder Glykosylierungen.

Die durch Rezeptor- bzw. Ligand-spezifischen E3-Ubiquitinligasen vermittelte posttranslationale Ubiquitinierung erhöht jeweils die Endozytose und verändert auch den Transportweg der Transmembranproteine durch die Zelle. Für die Ubiquitinierung des Notch-Rezeptors sind die beiden E3-Ubiquitinligasen Nedd4/Itch/Su(Dx) und Deltex verantwortlich (siehe Abb. 2-1). Die resultierende Endozytose führt im Falle von Nedd4 letztendlich zum lysosomalem Abbau des Rezeptors (Sakata *et al.*, 2004). Deltex dagegen hat einen positiven Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors und somit auf die Notch-Signalübertragung (Matsuno *et al.*, 1995). Die beiden für die DSL-Liganden verantwortlichen Enzyme sind Neuralized und Mindbomb (siehe Abb. 2-1). Es konnte gezeigt werden, dass beide die Internalisierung der Liganden bewirken und dass dies für

die Signal-sendende Aktivität der Liganden und somit für die Aktivierung von Notch notwendig ist (Chitnis, 2006). Durch Regulation der Ubiquitinierung und Endozytose werden also sowohl die Verfügbarkeit der Rezeptoren und der Liganden an der Zelloberfläche als auch ihre Signal-Aktivität verändert.

Eine zweite mögliche posttranslationale Modifikation besteht in der Glykosylierung des Notch-Rezeptors (siehe Abb. 2-1). Über diese kann die Bindungsstärke eines Rezeptors an seine Liganden verändert werden. Die Rezeptor-spezifische  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyl-transferase Fringe kann an bestimmte Positionen der extrazellulären Domäne Glykosylreste in einem spezifischen Muster anfügen, wodurch die Affinität der Liganden für den Notch-Rezeptor moduliert wird (siehe Abb. 2-1; Brückner *et al.*, 2000; Haines und Irvine, 2003; Lei *et al.*, 2003; Moloney *et al.*, 2000; Okajima *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2002). In den dorsalen Zellen des Flügels von *Drosophila* bewirkt beispielsweise die Modifizierung des Notch-Rezeptors durch Fringe eine Affinitätssteigerung für die Bindung von Delta und eine Reduktion der Affinität des zweiten Liganden, Serrate, für den Notch-Rezeptor (Brückner *et al.*, 2000; Haines und Irvine, 2003; Lei *et al.*, 2003; Okajima *et al.*, 2003). In Vertebraten gibt es hingegen sowohl Hinweise darauf, dass die Modifizierung des Notch-Rezeptors durch eines der drei Fringe-Homologe (Lunatic, Radical, Manic Fringe) je nach Zelltyp oder Entwicklungsvorgang sowohl positiv als auch negativ auf dessen Affinität zu Delta bzw. Jagged wirken kann (Dale *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2002).

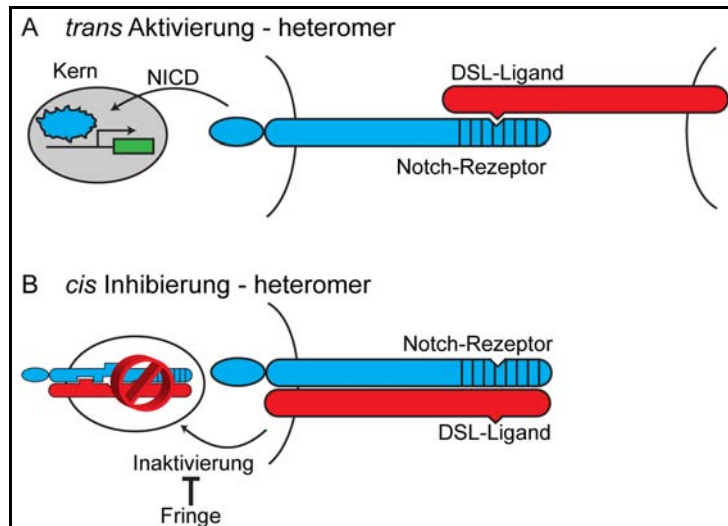


**Abb. 2-1:** Mögliche posttranslationale Modifikationen des Notch-Rezeptors und der DSL-Liganden; Glykosylierung des Notch-Rezeptors (blau) an EGF-Wiederholungen der extrazellulären Domäne durch die  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyl-transferase Fringe innerhalb des Golgi-Apparates; Der Notch-Rezeptor kann durch die Modifizierung nur noch mit einem bestimmten Ligandtyp (hier I, rot) interagieren; Diese Interaktion in *trans* (auf benachbarten Zellen) führt in der Rezeptor-tragenden Zelle zur Aktivierung des Notch-Signalweges; Die Notch intrazelluläre Domäne (NICD) transloziert in den Kern und kann dort die Transkription von Zielgenen induzieren; Monoubiquitinierung des Notch-Rezeptors bzw. der DSL-Liganden durch spezifische E3-Ubiquitinligasen führt zur Endozytose, aber nicht zwangsläufig zum Abbau.

In neuesten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sogar *cis*-Interaktionen zwischen Notch und Delta allein schon ausreichen, um sich gegenseitig ausschließende Signalzustände in Form stabil Signal-sender und -empfangender Zellen zu generieren (Sprinzak *et al.*, 2010). Schon zuvor war bekannt, dass Notch-Liganden den Rezeptor konzentrationsabhängig auf zwei Arten beeinflussen können, in *trans* als Agonisten und in *cis* als Antagonisten. Werden Notch und Delta auf benachbarten Zellen präsentiert, so kommt es zur interzellulären Interaktion (*trans*) und als Folge zur Aktivierung des Notch-Signalweges (siehe Abb. 2-1 und Abb. 2-2A; siehe Abschnitt 2.4.4.1; Jarriault *et al.*, 1995, Jarriault *et al.*, 1998; Heitzler und Simpson, 1991). Auch intrazellulär (*cis*), d.h. auf ein und derselben Zelle können die Liganden mit Notch interagieren, wodurch es jedoch zur Inaktivierung der Notch-Signaltransduktion kommt.

Gleichzeitig kann auch Notch die Liganden zellautonom, in *cis* inhibieren (siehe Abb. 2-2B; Becam *et al.*, 2010; Cordle *et al.*, 2008; de Celis und Bray, 1997; Doherty *et al.*, 1996; Fiuza *et al.*, 2010; Glittenberg *et al.*, 2006; Irvine und Vogt, 1997; Jacobsen *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1997; Matsuda und Chitnis, 2009; Micchelli *et al.*, 1997; Panin und Irvine, 1998; Sakamoto *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 1995). Dieser inhibitorische Effekt von in *cis* auftretenden Ligand-Rezeptor-Komplexen kann über eine Modifizierung des Rezeptors durch Fringe aufgehoben werden. Dadurch werden sie wieder für eine Signalübertragung in *trans* zugänglich (Sakamoto *et al.*, 2002).

Sprinzak *et al.* (2010) konnten experimentell zeigen, dass die Antwort von Notch auf *trans*-Delta graduell erfolgt, d.h. je mehr Delta in *trans* vorhanden ist, desto höher ist die Aktivierung des Notch-Signalweges. Die Antwort auf *cis*-Delta hingegen erfolgt unabhängig von *trans*-Delta schlagartig, sobald ein bestimmter Grenzwert erreicht wurde, d.h. wenn Notch und *cis*-Delta in vergleichbaren Konzentrationen auftreten. Auf diese Weise kann ein ultrasensitiver Wechsel hin zu sich gegenseitig ausschließenden sendenden (viel Delta, wenig Notch) und empfangenden (viel Notch, wenig Delta) Signalzuständen generiert werden. Kleine Unterschiede in den Produktionsraten von Ligand und Rezeptor zwischen verschiedenen Zellen resultieren in einer großen Veränderung der Notch-Aktivität. Dies erleichtert die Ausbildung scharfer Grenzen und lateraler Inhibitionsmuster während der Entwicklung.



**Abb. 2-2:** Mögliche heteromere Komplexbildung zwischen dem Notch-Rezeptor und seinen DSL-Liganden in *cis* (auf derselben Zelle) oder in *trans* (auf unterschiedlichen, benachbarten Zellen) (verändert nach Sprinzak *et al.*, 2010); (A) Die Interaktion eines Notch-Rezeptors und eines DSL-Liganden in *trans* führt zur Aktivierung des Notch-Signalweges in der Rezeptor-tragenden, Signal-empfangenden Zelle; (B) heteromere Komplexe aus Notch-Rezeptor und Ligand sind nicht an der Zellmembran lokalisiert und stehen für eine aktive Signalweiterleitung nicht zur Verfügung; Fringe kann derartige, zellautonome Assoziationen verhindern und den Notch-Rezeptor für eine aktive Signalweiterleitung wieder zugänglich machen.

Der Notch-Signalweg ist außerdem mit verschiedenen, weiteren Signalwegen vernetzt. Oft beschrieben sind beispielsweise eine Interaktion mit dem FGF/FGFR- und dem kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Alle vier Signalwege können dabei jeweils abhängig von Zeit und Ort auf verschiedenen Ebenen, etwa auf Ebene der Transkription oder der Proteine, einen negativen oder positiven Einfluss aufeinander ausüben, dadurch ihre Aktivitäten gegenseitig modulieren und so zu verschiedenen Antworten innerhalb einer Zelle oder Zellpopulation führen (Axelrod *et al.*, 1996; Couso *et al.*, 1995; Diaz-Benjumea und Cohen, 1995; Espinosa *et al.*, 2003; Estrach *et al.*, 2006; Hayward *et al.*, 2005 und 2006; Ikeya und Hayashi, 1999; Jayasena *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009; Munoz-Descalzo *et al.*, 2011, Ross und Kadash, 2001; Small *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2009; Ungerbäck *et al.*, 2011; Uyttendaele *et al.*, 1998; Wesley, 1999).

### 2.2.4 Einfluss von Matrix-Metalloproteasen und des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges auf die Differenzierung und Morphogenese

Nach einer erfolgreichen und stabilen Abgrenzung zweier Kompartimente können sich diese getrennt voneinander weiterentwickeln. Da jedes Kompartiment ein spezifisches Genexpressionsmuster aufweist oder spezielle Grenzzellen als neue Signalzentren ausgebildet wurden, können jeweils innerhalb eines Kompartiments oder entlang der Grenze weitere Gene induziert werden. Es kann beispielsweise zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen oder von Molekülen des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges kommen. Diese haben einen Einfluss auf die Differenzierung und Morphogenese, die zur Ausbildung unterschiedlicher Strukturen innerhalb eines Gewebes führen.

Matrix-Metalloproteasen wurden ursprünglich als Enzyme entdeckt, die für die Proteolyse von Bestandteilen der extrazellulären Matrix verantwortlich sind und so deren Zusammensetzung und Integrität regulieren. Durch die Proteolyse von Matrix-Komponenten werden aber auch kleine bioaktive Peptide erzeugt oder gebundene Wachstumsfaktoren entlassen. Damit sind MMPs auch an der ECM-vermittelten Signalgebung beteiligt. Daneben können sie aber auch viele weitere Nicht-Matrix-Proteine schneiden bzw. degradieren, wie z.B. Cytokine, Chemokine, bestimmte Membranproteine oder Rezeptoren. Dadurch kann die Zellproliferation, Differenzierung und Migration von Zellen gesteuert werden (Clark *et al.*, 2008; Nagase *et al.*, 2006; Page-McCaw *et al.*, 2007; Page-McCaw *et al.*, 2008; Parks *et al.*, 2004).

Der PCP (*planar cell polarity* in *Drosophila*)-ähnliche Signalweg zählt wie der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg zu den nicht-kanonischen,  $\beta$ -Catenin unabhängigen Wnt-Signalwegen (Dale *et al.*, 2009; Karner *et al.*, 2006; Klein und Mlodzik, 2005; Miller, 2002; Nalesso *et al.*, 2011; Zallen, 2007). Er ist in erster Linie für die Polarität, Orientierung, Formveränderung, Bewegungsrichtung und gerichtete Teilung von Zellen durch die Regulation der Organisation des Zytoskeletts verantwortlich. Dadurch besitzt er einen direkten Einfluss auf die Zellmorphogenese,



die korrekte Organisation und letztlich die Funktionalität eines Gewebes oder Organs.

## **2.3 Konkrete Beispiele für durch den Notch-Signalweg vermittelte Ausbildung und Aufrechterhaltung von Grenzen während der Entwicklung**

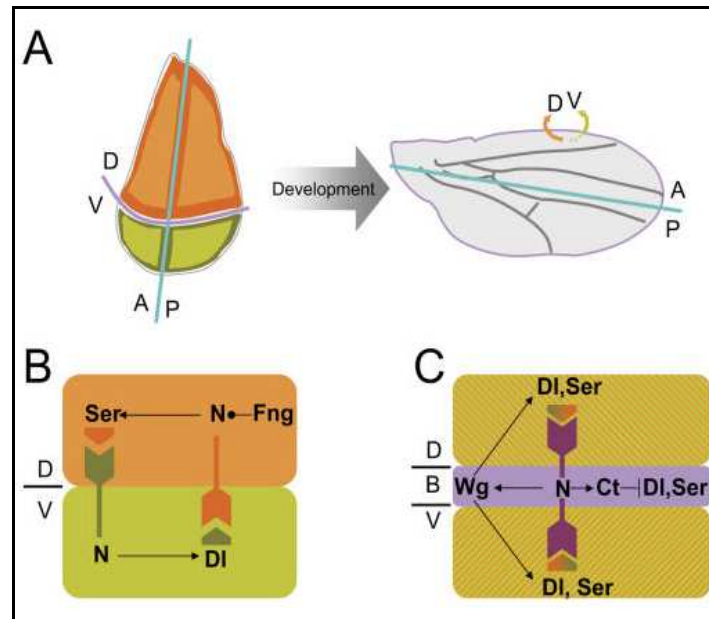
### **2.3.1 Die Ausbildung der dorso-ventralen Grenze in der Flügel-Imaginalscheibe von *Drosophila***

Bei der Entwicklung des Flügelrandes bei *Drosophila* kommt es zur Ausbildung einer Grenze zwischen den dorsalen und ventralen Zellen innerhalb der Flügel-Imaginalscheibe (siehe Abb. 2-3A; Lai, 2004). Die entstehenden Grenzzellen bilden später im Verlauf der Flügelentwicklung den Flügelrand und stellen eine Art Organisationszentrum für das weitere, dorsale Auswachsen des Flügels dar. Die Abgrenzung ist somit für eine korrekte Flügelentwicklung essentiell und basiert auf Signalen, die durch Notch und seine Liganden transduziert werden. Hier ist eine Modulation der Signalübertragung durch posttranslationale Modifikation des Notch-Rezeptors durch die Glykosyltransferase Fringe zu beobachten. Diese erhöht die Bindeaffinität von Delta zum Notch-Rezeptor, die von Serrate hingegen wird erniedrigt.

In der frühen Flügelentwicklung wird Notch in allen Zellen des dorsalen und ventralen Kompartiments gleichmäßig exprimiert. Serrate und Fringe hingegen werden nur dorsal unter der Kontrolle von Apterous, einem Homeodomänen-Transkriptionsfaktor, exprimiert (Bourgouin *et al.*, 1992; Diaz-Benjumea und Cohen, 1993; Irvine und Wieschaus, 1994; Williams *et al.*, 1993). Demgegenüber steht die ausschließlich ventrale Expression von Delta. Durch die Fringe vermittelte Glykosylierung des Notch-Rezeptors in den dorsal gelegenen Zellen kann dieser nur mit den ventral gelegenen Delta-tragenden Zellen und nicht mit umliegenden Zellen interagieren (siehe Abb. 2-3B). Umgekehrt können die dor-

salen Serrate-Liganden nur an den unmodifizierten ventralen Notch-Rezeptor binden. Der Notch-Signalweg wird daher nur in einem dünnen Zell-Streifen zwischen dorsalem und ventralem Kompartiment aktiviert (Panin *et al.*, 1997).

Die Notch-Aktivität bewirkt dann die Expression von *wingless*, damit die Aktivierung des Wnt-Signalweges zu beiden Seiten. Dieser wiederum fördert in einem Rückkopplungsmechanismus die Expression von Serrate und Delta außerhalb der dorso-ventralen Grenze in grenznahen Zellen (siehe Abb. 2-3C). Aufgrund der Koexpression beider Liganden kommt es dort zu einem inhibitorischen Effekt. Die Liganden können in *cis* mit dem Notch-Rezeptor oder mit anderen Liganden interagieren, wodurch beide Komponenten sich gegenseitig hemmen und nicht mehr für eine weitere Signaltransduktion zur Verfügung stehen. Dadurch wird auch in einer bestimmten Entfernung von der Grenze die Expression von *wingless* abgeschaltet (de Celis und Bray, 1997; Micchelli *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 2002). Insgesamt bewirkt die Aktivität des Wnt-Signalweges die lokale Begrenzung der Notch-Aktivität auf den dorso-ventralen Grenzstreifen. Dadurch kann es dort zur Induktion weiterer Gene, wie den Transkriptionsfaktor *vestigial*, ein „*wing selector gene*“, kommen, das das Auswachsen des Flügels und die Ausbildung der Flügelgrenze vorantreibt (Doherty *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996). Ist der Notch-Rezeptor und damit die durch ihn vermittelte Signalübertragung gestört, so kann keine korrekte dorso-ventrale Grenze ausgebildet werden und das Flügelwachstum ist beeinträchtigt. Infolge können Fliegen mit Einkerbungen (engl. *notches*) in den Flügeln beobachtet werden (Mohr, 1919).



**Abb. 2-3:** Signaltransduktion an der dorso-ventralen Grenze während der Flügelentwicklung in *Drosophila* (entnommen aus Buceta *et al.*, 2007). (A) Schematische Darstellung der Flügel-Imaginalscheibe mit dorsalem (D) und ventralem (V) bzw. anteriorem (A) und posteriorem (P) Kompartiment und ihre Entwicklung zu spezifischen Strukturen des adulten Flügels (rechts). (B) Frühe Signaltransduktion an der dorso-ventralen Grenze; dorsal exprimiertes Serrate interagiert ausschließlich mit dem nicht-modifizierten, ventral gelegenen Notch-Rezeptor. Der dorsale durch Fringe modifizierte Notch-Rezeptor kann nur mit dem ventralen Delta-Liganden interagieren. Es kommt zu beiden Seiten der Grenze zur Aktivierung des Notch-Signalweges. (C) Späte Signaltransduktion an der dorso-ventralen Grenze; Der aktive Notch-Signalweg induziert an der Grenze die Expression von *wingless*. Dieses kann in einem positiven *Feedback-Loop* die Expression der DSL-Liganden zu beiden Seiten der Grenze aktivieren. Dadurch kommt es in diesen grenznahen Zellen zur zellautonomen Inhibition des Notch-Signalweges. Die Grenzzellen mit aktivem Notch-Signalweg und resultierender *wingless*-Expression werden auf einen schmalen Streifen begrenzt und induzieren weitere Gene, die für das Wachstum des Flügels notwendig sind.

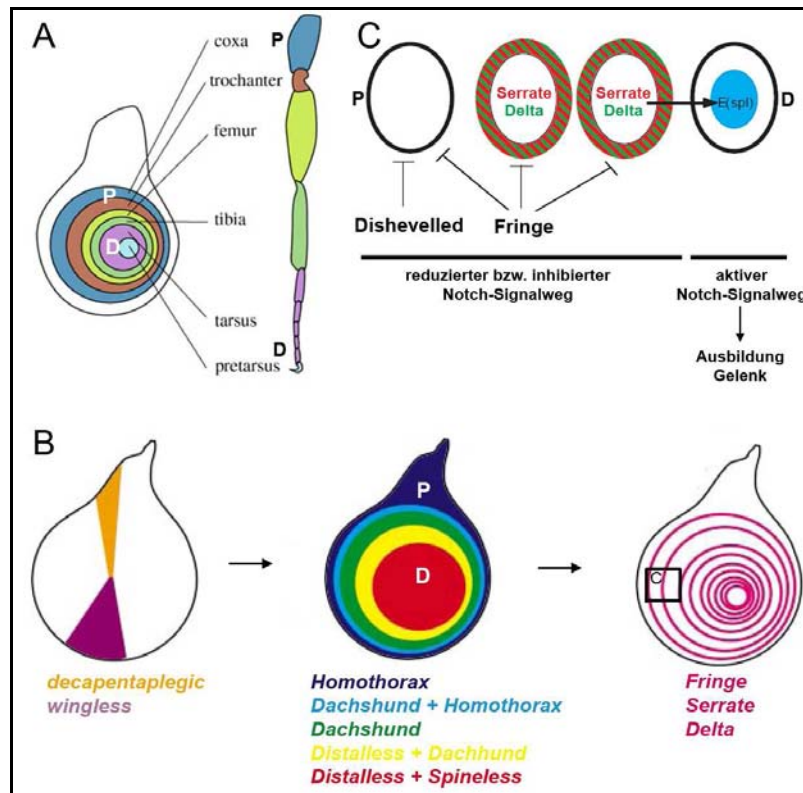
### 2.3.2 Die Bein-Segmentierung in *Drosophila*

Während der Bein-Entwicklung von *Drosophila* wird die Bein-Imaginalscheibe in konzentrische Segmente entlang der proximo-distalen Achse unterteilt (Couso und Bishop, 1998). Diese stülpen sich zeitlich gesehen, beginnend mit den zentral gelegenen, nacheinander aus und bilden die neun Segmente eines

adulten Beines. Zwischen allen Segmenten muss jeweils eine Grenze in Form einer flexiblen, gelenkartigen Verbindung geschaffen werden, um die Funktionalität des zukünftigen Beines zu gewährleisten (siehe Abb. 2-4A).

Die Bein-Imaginalscheibe wird durch einen aktiven Hedgehog-Signalweg in ein anteriores und ein posteriores Kompartiment unterteilt. Es kommt zur Aktivierung von *wingless* in den ventral-anterior gelegenen Zellen und von *decapentaplegic* (BMP-Homolog in *Drosophila*) in dorsal-anterior lokalisierten (siehe Abb. 2-4B; Baker, 1988; Basler und Struhl, 1994; Diaz-Benjumea *et al.*, 1994). Beide wirken als Morphogen, sind daher graduell innerhalb der Beinanlage verteilt und regulieren gemeinsam die großflächige Expression bestimmter Gene, wie z.B. *distalless*, *dachshund* und *homothorax* (siehe Abb. 2-4B; Abu-saar und Mann, 1998; Cohen *et al.*, 1989; Lecuit und Cohen, 1997; Mardon *et al.*, 1994; Reickhof *et al.*, 1997). Diese und andere wiederum bewirken gemeinsam die Induktion der Expression der beiden Notch-Liganden Serrate und Delta und der Glykosyltransferase Fringe. Sie werden jeweils in ringförmigen, segmentierten Domänen immer proximal zu den zukünftigen gelenkartigen Verbindungen exprimiert (siehe Abb. 2-4B; Bachmann und Knust, 1998; de Celis *et al.*, 1998; Rauskolb und Irvine, 1999). Die Liganden können in Folge den Notch-Signalweg nur in zu ihnen distal gelegenen Zellen aktivieren. Dort werden die Notch-Zielgene, wie die es *E(spl)*-Komplexes angeschaltet und die Ausbildung der Gelenke induziert (siehe Abb. 2-4C; de Celis *et al.*, 1998). Gleichzeitig wird in den Ligand-tragenden Zellen durch die Aktivität von Fringe und evtl. zusätzlich durch inhibitorische, zellautonome *cis*-Interaktionen die Aktivierung des Notch-Signalweges verhindert (siehe Abb. 2-4C; Becam *et al.*, 2010; Cordle *et al.*, 2008; de Celis und Bray, 1997; Doherty *et al.*, 1996; Fiuza *et al.*, 2010; Glittenberg *et al.*, 2006; Irvine und Vogt, 1997; Jacobson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1997; Matsuda und Chitnis, 2009; Micchelli *et al.*, 1997; Panin und Irvine, 1998; Sakamoto *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 1995). Darüberhinaus muss gleichzeitig gewährleistet werden, dass nicht auch in zu den Ligand-tragenden proximal lokalisierten Zellen die Notch-Signalübertragung induziert wird. Hierfür könnte ebenfalls die reprimierende Aktivität von Fringe und daneben vielleicht

auch ein inhibitorischer Effekt des Gerüstproteins Dishevelled aus dem Wnt-Signalweg auf den Notch-Rezeptor verantwortlich sein (siehe Abb. 2-4C; Axelrod *et al.*, 1996; Bishop *et al.*, 1999; Held *et al.*, 1986).



**Abb. 2-4:** Übersicht der bei der Entwicklung eines Beines aus der Bein-Imaginalscheibe von *Drosophila* ablaufenden, molekularen Prozesse; (A) Schematische Darstellung der proximo-distalen (P-D) Unterteilung in konzentrische Ringe einer Bein-Imaginalscheibe und spätere Segmente eines adulten Beines (entnommen aus Greenberg und Hatini, 2009); (B) Zeitlicher Ablauf der Genexpression in der Bein-Imaginalscheibe (entnommen aus Rauskolb und Irvine, 1999); *Wingless* wird in den ventral-anterior gelegenen (orange) und *decapentaplegic* in dorsal-anterior lokalisierten Zellen (lila) exprimiert; In Kooperation führen diese zur segmentierten, großflächigen Expression weiterer Gene wie *homothorax*, *dachshund* oder *distalless* (farblich markiert); Diese führen jeweils zur segmentierten, ringförmigen Expression von *Fringe* und der beiden DSL-Liganden; (C) Mögliche Regulation der Aktivierung bzw. Inhibierung des Notch-Signalweges an den Grenzen der konzentrischen Ringe der Imaginalscheibe (verändert nach Bishop *et al.*, 1999); Die Aktivität von *Fringe* und *cis*-autonome Inhibierungsmechanismen führen ausschließlich in jeweils distal gelegenen Zellen zur Aktivierung des Notch-Signalweges und zur Expression der Notch-Zielgene der *E(spl)*-Familie. In jeweils proximalen Zellen kommt es durch die Aktivität von *Fringe* und vielleicht durch einen inhibitorischen Effekt von *Dishevelled* zur Inhibition des Notch-Signalweges.

### 2.3.3 Die Segmentierung des Rautenhirns in Vertebraten

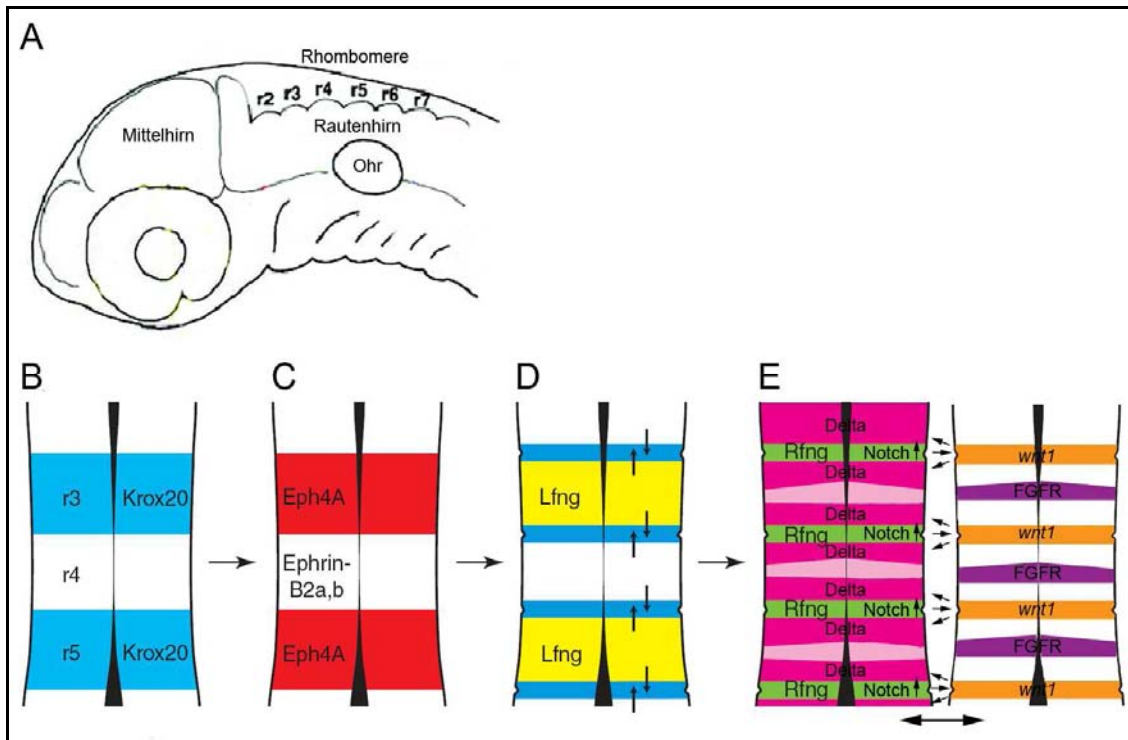
Während der Embryonalentwicklung wird in Vertebraten das Rautenhirn entlang der anterior-posterior Achse in insgesamt 7 einzelne, neuroepitheliale Segmente, so genannte Rhombomere unterteilt (siehe Abb. 2-5A). Die Position und Identität jedes einzelnen Rhombomers ist zu Beginn durch die Expression eines spezifischen Sets von Genen verschiedener Genfamilien definiert und erlaubt die Unterscheidung von geradzahligen und ungeradzahligen Rhombomeren. Durch die Aktivität zweier Gradienten von FGF und Retinsäure werden Transkriptionsfaktoren, wie Krox20 alternierend und restringiert in benachbarten Rhombomeren induziert (siehe Abb. 2-5B). Unter anderem kommt es zu einer Rhombomer-spezifischen Expression einer bestimmten Kombination verschiedener Hox-Gene. Zusätzlich regulieren sie auch die alternierende Expression von Ephrin-Rezeptoren (Eph) und ihren Liganden, den Ephrinen (siehe Abb. 2-5C; Irving *et al.*, 1996; Theil *et al.*, 1998). Durch eine bidirektionale Eph-Ephrin-Signalübertragung kommt es vermutlich durch Veränderung der Zelladhäsion und/oder im Zytoskelett zur Abstoßung und damit zur Trennung der einzelnen Rhombomere (siehe Abb. 2-5C). Bis zu diesem Punkt wurden durch langreichweitige Signale großflächige Domänen der zukünftigen Rhombomere mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern, aber mit noch diffusen Grenzen ausgebildet. Erst durch kurzreichweitige Signaltransduktionsmechanismen an den Grenzregionen können spezielle Grenzzellen und somit letztlich scharfe Grenzen ausgebildet und erhalten werden. Diese Grenzzellen unterscheiden sich von „Nicht-Grenzzellen“ durch einige Eigenschaften, wie größere Interzellularräume, langgezogene Form und die Expression bestimmter molekularer Marker (Cheng *et al.*, 2004).

Sowohl bei der Spezifizierung der Grenzzellen, als auch beim Erhalt der scharfen Grenze spielt der Notch-Signalweg eine entscheidende Rolle. Da beobachtet werden konnte, dass Lunatic Fringe abwechselnd in benachbarten Rhombomeren exprimiert wird, könnten die Grenzzellen vermutlich über einen ähnlichen Mechanismus wie bei der dorso-ventralen Grenzbildung während der Flügelentwicklung in *Drosophila* definiert werden (Blair, 2004). Demnach sind

die Grenzzellen im Vergleich mit den nicht direkt an der Grenze liegenden Zellen durch eine erhöhte Notch-Signaltransduktion gekennzeichnet, was an einer erhöhten Expression von *Hes*-Genen ersichtlich wird (siehe Abb. 2-5C; Baek *et al.*, 2006). Tatsächlich können sogar nur solche Zellen mit erhöhter Notch-Aktivität in die Grenzregion einwandern, da ihre Zellaffinität oder Migrationsfähigkeit verändert ist (Blair, 2004; Cheng *et al.*, 2004). In solchen Grenzzellen kommt es außerdem zur Inhibition der Expression proneuraler Gene und von DSL-Liganden, aber gleichzeitig zur Induktion des Notch-Zielgenes *wnt1*. Dieser Wnt-Ligand kann wiederum in direkt angrenzenden Rhombomer-Zellen die Expression der DSL-Liganden DeltaA und D anschalten (siehe Abb. 2-5E; Amoyel *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2004). Aufgrund dieser hohen Ligand-Konzentration kann es zu einem „dominant-negativen“ Effekt kommen, indem sie in *cis* mit dem Rezeptor interagieren, was in diesen „grenznahen“ Zellen zu einer Hemmung der Notch-Signalübertragung führt (Chitnis *et al.*, 1995; Lewis, 1996). In *trans* jedoch können sie durch Interaktion mit dem durch Radical Fringe modifizierten Notch-Rezeptor den Notch-Signalweg dauerhaft in einem dünnen Band von Grenzzellen anschalten (Blair, 2004). Durch die Aktivität des Notch-Signalweges und der Etablierung eines regulatorischen *Feedback-Loops* kommt es damit zu einer Inhibition der Expression proneuraler Gene und damit der Neurogenese in Grenzzellen und gleichzeitig zu einer Induktion der Neurogenese in grenznahen Zellen.

Auch innerhalb der Rhombomere wird die Neurogenese inhibiert. Für manche Organsimen, wie den Zebrafisch, konnte gezeigt werden, dass hier die DSL-Liganden auf sehr niedrigem Niveau exprimiert werden, gleichzeitig jedoch der FGF-Rezeptor FGFR2 sehr stark (siehe Abb. 2-5E). Ein aktiver FGF/FGFR-Signalweg in den zentral gelegenen Rhombomer-Zellen induziert u.a. Cyp26. Dies ist ein Enzym, das Retinsäure, die bekanntermaßen Neurogenese fördert, degradiert (Gonzalez-Quevedo *et al.*, 2010). Insgesamt sind also ein sequentiell aktiver Notch-, Wnt- und FGF/FGFR-Signalweg für die Ausbildung der Rhombomere im Rautenhirn während der Embryonalentwicklung notwendig.

## 2 Einleitung



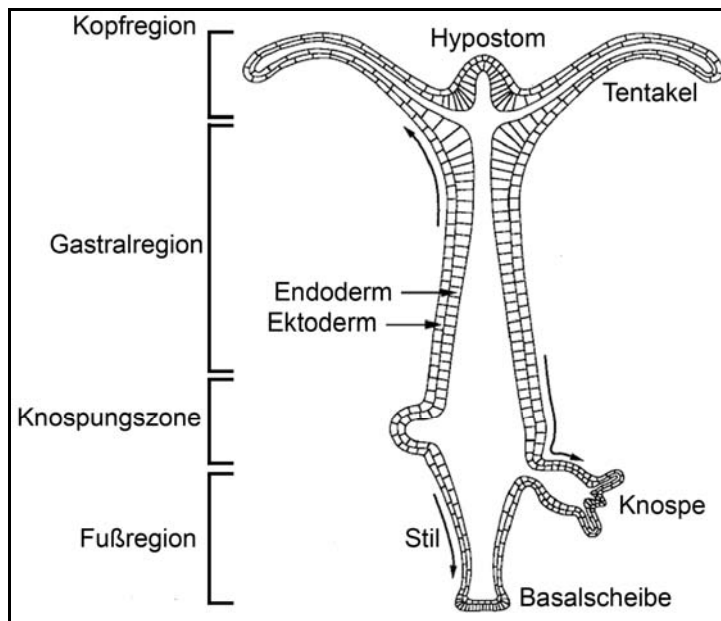
**Abb. 2-5:** Molekulare Prozesse bei der Segmentierung des Rautenhirns des Zebrafisches während der Embryonalentwicklung; (A) Schematische Darstellung des Kopfes eines Zebrafisch-Embryos 24 Stunden nach Befruchtung mit Rhombomeren r1-r7 des Rautenhirns (von lateral) (entnommen aus Knight und Schilling, 2000); (B-E) Schematische Darstellung der Entwicklung der Rhombomere r3 bis r5 des Zebrafisches (verändert nach Blair, 2004); (B) Die großflächige Expression von Transkriptionsfaktoren wie Krox20 (blau) markiert die einzelnen, zukünftigen Rhombomere; (C) Diese Faktoren induzieren die komplementäre Expression von Ephrinrezeptoren und ihren Liganden (Eph4A und EphrinB2a, b; rot bzw. weiß) in alternierenden Rhombomeren; Eine aktive Eph-Ephrin-Signaltransduktion führt zur Abstoßung migrierender Zellen an den Rhombomergrenzen; (D) Spezifische Grenzzellen (blaue Streifen) werden durch kurzreichweitige, vermutlich durch Lunatic Fringe modulierte, Notch-vermittelte Signalübertragung etabliert (schwarze Pfeile); (E) In den Grenzzellen wird Radical Fringe exprimiert (grün); In diesen kommt es zur Aktivierung des Notch-Signalweges (grün), zur Inhibierung proneuraler Gene und zur Induktion des Zielgens *wnt1* (schwarze Pfeile, orange); Im Zentrum der Rhombomere werden die Liganden DeltaA und D nur leicht exprimiert (hellrosa), in grenznahen Zellen jedoch werden sie stark exprimiert (pink), wodurch es zu zellautonomen Inhibition kommt und ein aktiver Notch-Signalweg auf die Grenzzellen beschränkt wird; Zusätzlich wird durch Wnt1 über eine positive Rückkopplung die weitere Induktion der Expression der Liganden in grenznahen Zellen vermittelt (schwarze Pfeile). Im Zentrum der Rhombomere wird durch FGFR-vermittelte Signalübertragung ebenfalls Neurogenese inhibiert (lila).



## 2.4 *Hydra* als Modellorganismus zur Untersuchung von Muster- und Grenzbildungsprozessen

Der circa 700 Millionen Jahre alte Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) umfasst relativ einfach gebaute, vielzellige Tiere (Eumetazoa), die eine sehr frühe Evolutionsstufe verkörpern und sich durch den Besitz von Nesselzellen (Nematocyten) mit darin enthaltenen Kapseln (Nematocysten) kennzeichnen (Bode, 1996; David und Gierer, 1974; Slautterback und Fawcett, 1959; Tardent, 1987). Der Stamm lässt sich insgesamt in vier Klassen einteilen, wobei *Hydra vulgaris* in die der Hydrozoa einzuordnen ist.

Die Gliederung eines Tieres erfolgt aus morphologischen Gründen in vier Körperregionen: Die Kopfregion, die Gastralregion, die Knospungszone und die Fußregion (siehe Abb. 2-6). Die am apikalen Ende befindliche Kopfregion lässt sich weiter in zwei Bereiche unterteilen: die ringförmige Tentakelzone, aus der je nach Ernährungs- und Umweltbedingungen fünf bis neun Tentakel auswachsen und dem Hypostom (Mundkegel), einer kegelförmigen Erhebung, in deren Zentrum sich die einzige Öffnung der Polypen, die Mundöffnung befindet, die gleichzeitig auch als After dient. In der Knospungszone kann es bei günstigen Ernährungsverhältnissen zur Ausbildung von Knospen kommen (siehe Abschnitt 2.4.2.2). Die basal liegende Fußregion lässt sich in einen Stil und die Basalscheibe gliedern. Der flüssigkeitsgefüllte, schlauchförmige Rumpf wird von zwei jeweils einschichtigen Epithelien, dem äußeren Ekto- und dem inneren Endoderm, schützend umgeben (siehe Abb. 2-6). Beide werden durch eine dünne, gallertartige extrazelluläre Stützmatrix, die so genannte Mesoglea verbunden. Diese besteht in ihrer Grundsubstanz aus Glykoproteinen und Proteoglykanen, in die Kollagen eingelagert ist. Sie dient aufgrund ihrer hohen Zugfestigkeit, ihrer enormen Dehnbarkeit und Elastizität der Erhaltung der Körperform (Aufschnaiter *et al.*, 2011; Davis und Haynes, 1968; Deutzmann *et al.*, 2000; Sarras *et al.*, 1991; Sarras *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2008; Shostak *et al.*, 1965).



**Abb. 2-6:** Längsschnitt einer sich vegetativ fortpflanzenden Hydra mit den vier Körperregionen: Kopf-, Gastral-, Knospungs- und Fußregion; Die einzelnen Teilbereiche sind beschriftet: Hypostom, Tentakel, Knospe, Stil, Basalscheibe, Ekto- und Endoderm (verändert nach Grens *et al.*, 1996).

### 2.4.1 Die stetige Gewebedynamik ermöglicht die Untersuchung von Musterbildungsprozessen im adulten Tier

Ein adulter Polyp besteht abhängig von der Spezies aus etwa 30.000 bis 200.000 Zellen, die aus drei verschiedenen Zellpopulationen hervorgehen: den ektodermalen bzw. endodermalen Epithelzellen und den interstitiellen Zellen (I-Zellen). Aus diesen drei Stammzelllinien entwickeln sich die 20 bis 25 verschiedenen Zelltypen eines Polyps (Bode *et al.*, 1973; Bosch und David, 1987).

Außerdem besitzen alle drei Linien nicht nur die Fähigkeit sich fortwährend selbst zu erneuern, sondern sie kommen auch stetig für die auftretenden Zellverluste auf. Die Epithelzellen einer regelmäßig gefütterten Hydra befinden sich kontinuierlich im mitotischen Zellzyklus (Bosch und David, 1984; David und Campbell, 1972). Auch die I-Zellen bilden fortwährend ihre Differenzierungsprodukte nach. Die Zellen einer adulten Hydra vermehren sich somit ständig und

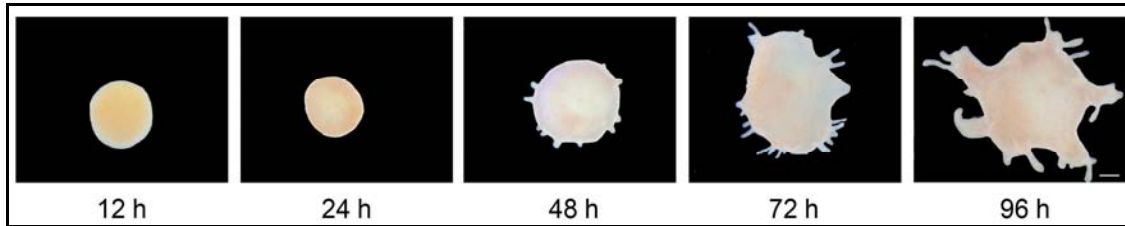
werden kontinuierlich entlang des Rumpfes in Richtung der beiden Körperpole geschoben (siehe Abb. 2-6). Die Zellen des oberen Rumpfes werden dabei in die Tentakelzone und von dort aus über eine Grenze in die Tentakel geschoben, wo sie ihre Teilung einstellen, d.h. in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus arretieren und zu tentakelspezifischen Batteriezellen ausdifferenzieren (Dübel, 1990; Holstein *et al.*, 1991; Technau und Holstein, 1995). Ein Teil des endodermalen Gewebes wird in das Hypostom verschoben, die Zellen bewegen sich allmählich bis hin zur Spitze und gehen dort verloren. Das ektodermale Gewebe des Hypostoms wird hingegen von sich teilenden Epithelzellen an der Basis des Hypostoms generiert. Sie wandern in apikaler Richtung und werden letztlich auch abgeschilfert (Bode, 2003). Die Zellen beider Epithelien des mittleren bis unteren Rumpfes werden in basaler Richtung hin zur Fußscheibe verschoben. Sobald dabei die ektodermalen Zellen die Grenze zwischen Stil und Fußscheibe überqueren, stellen sie ihre Teilungsaktivität ein und differenzieren zu Fußzellen aus. Zusammenfassend werden Zellen also an den Spitzen der Tentakel oder an der Fußscheibe abgestoßen. Der größte Zellverlust (80-85%) jedoch kommt durch die Knospung zustande (siehe Abschnitt 2.4.2.2).

Die Gewebe einer adulten Hydra befinden sich somit in einem so genannten „*steady state*“, in einem Fließgleichgewicht aus ständiger Neuproduktion sowie Verlust von Zellen und Geweben (Otto und Campbell, 1977). Aus diesem Grund müssen bei *Hydra* auch im erwachsenen Tier axiale Musterbildungsprozesse kontinuierlich aktiv sein, um die Morphologie, Größe und Gestalt, eines Tieres aufrecht erhalten zu können. Die Süßwasserpolyphen nehmen hierdurch eine Sonderstellung im Tierreich ein, da sie auch im adulten Zustand molekulare Muster *de novo* ausbilden und erhalten, die ansonsten nur während der Embryonalentwicklung angeschaltet sind, um die Entwicklung und Etablierung unterschiedlicher Kompartimente zu ermöglichen. Eine Hydra kann theoretisch unendlich lange leben, da Zelldifferenzierungsprozesse und Mechanismen der Musterbildung zeitlebens ablaufen (Martinez, 1998).

Die ständig aktiven Musterbildungsprozesse sind auch die Voraussetzung dafür, dass diese Tiere eine fast unbegrenzte Regenerationsfähigkeit besitzen. Diese

wurde bereits 1744 von Abraham Trembley entdeckt und untersucht. Sie beruht auf den drei beschriebenen Stammzelllinien, die sich ständig selbst erneuern bzw. zu sämtlichen Zelltypen einer Hydra ausdifferenzieren können. Dadurch sind sogar adulte Tiere, denen eine bestimmte Körperregion entfernt wird, fähig diese fehlende Struktur innerhalb weniger Tage zu regenerieren, d.h. exakt nachzubilden. Dabei kann eine Hydra selbst aus kleinsten Teilstücken des Rumpfes (wenn diese mindestens 1/8 des Rumpfes groß sind) wieder in der ursprünglichen Polarität regenerieren, d.h. einen Kopf am ursprünglichen apikalen Ende und einen Fuß am ursprünglich basalen Ende. Die extreme Regenerationsfähigkeit ist allerdings auf das Rumpfgewebe beschränkt, ein isolierter Kopf oder eine Fußscheibe allein können nicht regenerieren (Bode, 2003).

Die vielleicht beeindruckendste Form der Regeneration, die in *Hydra* beobachtet werden kann, ist die Zell-Reaggregation. Dies ist ein sich selbst organisierender, *de novo* beginnender Musterbildungsprozess, der spontan nach Dissoziation beginnt. Es kommt zunächst zur Ausbildung einer irregulären Zellmasse ohne jegliche Polarität (Gierer *et al.*, 1972). Nach bereits sechs Stunden entsteht durch Um- und Aussortierung von Zellen ein festes Aggregat mit einer glatten Oberfläche. Die verbleibenden Zellen separieren in Endo- und Ektoderm und ordnen sich durch Zellwanderung neu an. Innerhalb von 20 bis 30 Stunden entwickelt sich eine hohle Kugel, mit deutlich erkennbarer zweischichtiger Hülle und zwischenliegender Mesoglea. Nach 40 bis 48 Stunden bilden sich die ersten, über das Aggregat zufällig verstreute Tentakelknospen und nach 2,5 bis 3 Tagen schließlich die ersten Hypostome. Um diese ordnen sich die Tentakel an, so dass normale Köpfe aus der zentralen Kugel hinausragen. Außerdem kommt es zur Ausbildung von Füßen. Abhängig von der Größe des Aggregats werden mehr oder weniger Köpfe und Füße ausgebildet. Nach insgesamt 5 bis 6 Tagen sind somit alle Strukturen einer Hydra regeneriert und die Tiere können normal fressen. Es kann mehrere Wochen dauern bis wieder einzelne Polypen aus den Aggregaten hervorgehen (siehe Abb. 2-7; Gierer *et al.*, 1972).



**Abb. 2-7:** Entwicklung eines Aggregates über vier Tage hinweg; Maßstab: 0,3mm.

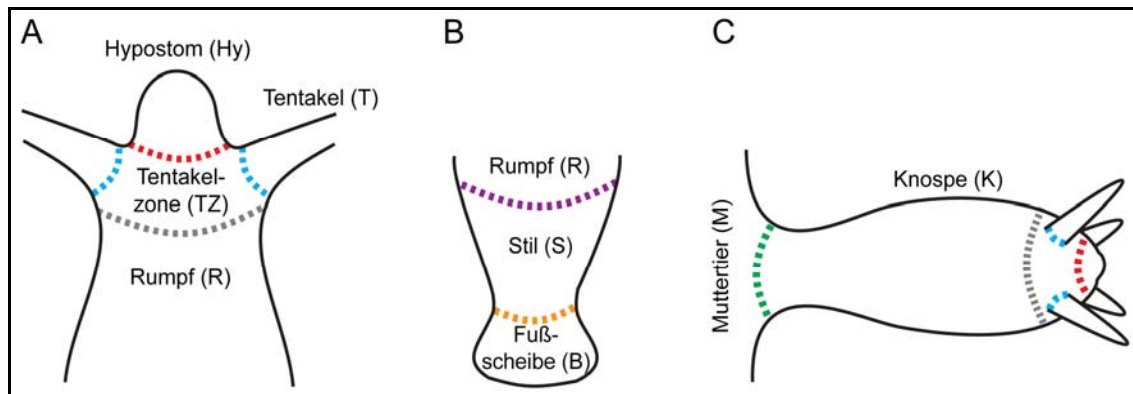
### 2.4.2 Entwicklungsrelevante Gewebegrenzen in *Hydra*

In *Hydra* existieren im adulten, knospenden Tier mehrere wichtige entwicklungsrelevante Gewebegrenzen. Zwei liegen im Kopf zwischen seinen einzelnen Teilbereichen: zwischen der Tentakelzone und den Tentakeln, der Tentakelzone und dem Hypostom bzw. der Tentakelzone und dem Rumpf (siehe Abb. 2-8A). Auch zwischen Rumpf und dem Stil des Fußes bzw. der Basalscheibe eines Polypen befindet sich jeweils eine Grenze (siehe Abb. 2-8B). Eine vierte Grenze wird im Verlauf der Knospung zwischen Muttertier und Knospe ausgebildet (siehe Abschnitt 2.4.2.2, siehe Abb. 2-8C). Alle müssen während der Knospung und im Verlauf von Regenerationsprozessen, wie der Kopf- bzw. Fußregeneration und Reaggregation neu ausgebildet werden (siehe Abschnitt 2.4.2.3). Dadurch wird eine normale Strukturierung einer eigenständigen Knospe oder eines in seine Teilbereiche gegliederten Kopfes bzw. Fußes ermöglicht. Die kopf- und fußspezifischen Grenzen müssen darüberhinaus auch in adulten Tieren aufgrund der beschriebenen Gewebedynamik ständig aufrechterhalten werden, um einen korrekt strukturierten Kopf bzw. Fuß und damit die normale Gestalt einer Hydra gewährleisten zu können. Generell kann festgestellt werden, dass die Prozesse, die apikal für den Erhalt der Kopfstrukturen einer adulten Hydra verantwortlich sind, denen ähneln oder sogar entsprechen, die bei der Knospung (siehe Abschnitt 2.4.2.2) und der Kopfregeneration (siehe Abschnitt 2.4.2.3) eine Rolle spielen.

Aufgrund des relativ einfachen Bauplans einer Hydra und der geringen Zellzahl pro Tier können die Ausbildung und Aufrechterhaltung dieser einzelnen Gren-

## 2 Einleitung

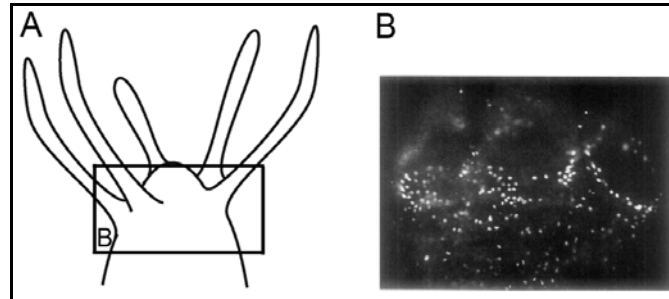
zen gut beobachtet werden. Die Genexpression zahlreicher Signalmoleküle an den genannten Grenzen bzw. innerhalb der einzelnen Teilstrukturen eines Polypen wurde deshalb bereits untersucht.



**Abb. 2-8:** Schematische Darstellung der entwicklungsrelevanten Gewebegrenzen in *Hydra*; (A) Grenzen innerhalb eines adulten Kopfes; (B) Grenzen innerhalb des Fußes; (C) Grenzen innerhalb einer sich entwickelnden Knospe (Stadium 8); Die einzelnen Grenzen sind farblich markiert: Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln (blau), zwischen Tentakelzone und Hypostom (rot), zwischen Tentakelzone und Rumpf (grau), zwischen Rumpf und Stil (lila), zwischen Stil und Fußscheibe (orange) und zwischen Muttertier und Knospe (grün).

### 2.4.2.1 Die Genexpression an kopfspezifischen Grenzen in *Hydra*

An der Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln kommt es zur Transdifferenzierung einwandernder Epithelzellen. Sie nehmen über Transendozytose reife Nematocyten auf und bilden tentakelspezifische Batteriezellen, die sich nicht mehr teilen. Dies konnte anhand BrdU-markierter, epithelialer Hydren gezeigt werden. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der Replikation in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und kann mit Hilfe eines spezifischen anti-BrdU-Antikörpers nachgewiesen werden (Gratzner 1982; Dolbeare *et al.*, 1983). In den untersuchten Tieren wurde eine deutliche ringförmige Grenze zwischen BrdU-markierten, proliferierenden und unmarkierten, nicht-proliferierenden Epithelzellen an der Basis der Tentakel beobachtet (siehe Abb. 2-9; Holstein *et al.*, 1991).



**Abb. 2-9:** BrdU-Markierung des Kopfes einer epithelialen Hydra (Holstein *et al.*, 1991). (A) Schematische Darstellung des Kopfes einer Hydra mit eingezeichneter untersuchten Region der Tentakelzone; (B) Die BrdU-Markierung zeigt eine deutliche ringförmige Grenze zwischen markierten, proliferierenden Epithelzellen (weiß) an der Tentakelbasis und unmarkierten, nicht-proliferierenden in den Tentakeln (schwarz) (entnommen aus Holstein *et al.*, 1991).

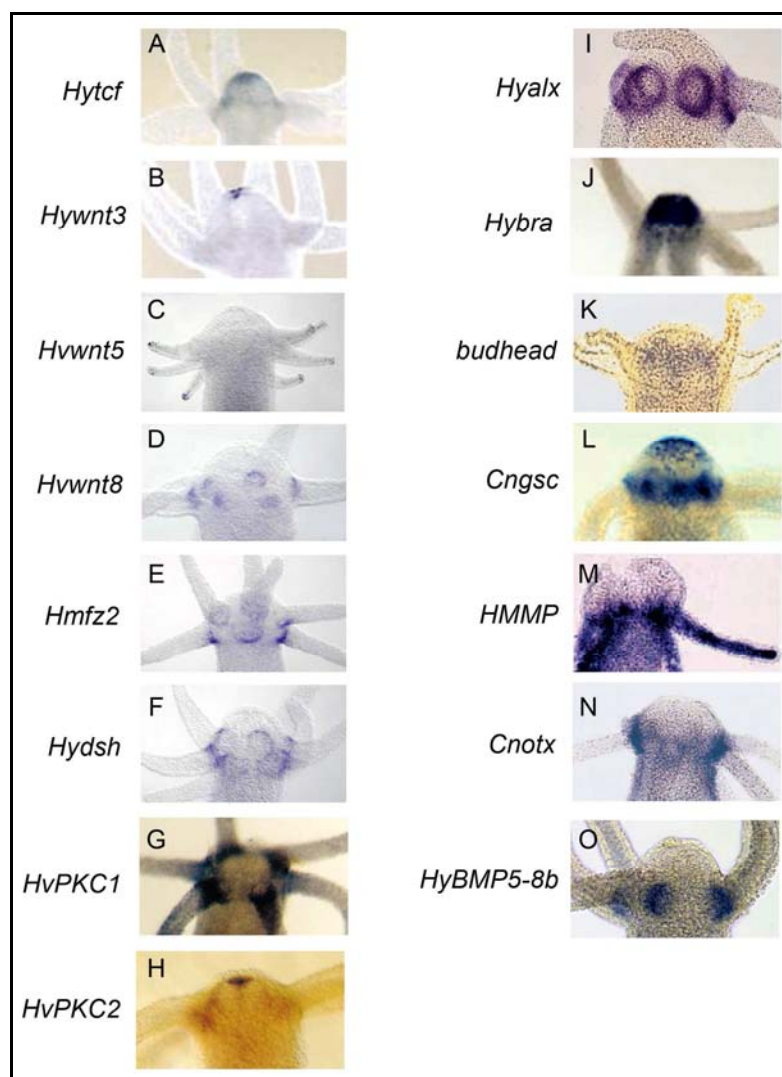
An dieser Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln konnte auch die ringförmige Expression einiger Gene nachgewiesen werden, die diese Gewebegrenze dadurch markieren. Hierzu zählen beispielsweise Gene des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges, wie *Hvwnt8*, *Hmfz2* und *Hydsh*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der Evagination der Tentakel und damit bei ihrem Erhalt spielen (siehe Abb. 2-10D-F; siehe Abschnitt 2.4.4.4; Philipp *et al.*, 2009). Ein ähnliches Expressionsmuster an der Tentakelbasis adulter Tiere zeigt das BMP5-8-Homolog HyBMP5-8b und der Homeoboxdomänen-Transkriptionsfaktor HyAlx (siehe Abb. 2-10I, O; Reinhardt *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2000). *Hyalx* wird in einem drei bis vier Zellen breiten Ring ektodermaler Epithelzellen an der Basis der Tentakel exprimiert, allerdings nur transient. Die *Hyalx*-Expression dauert nur solange an wie die Epithelzellen diese Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln überschreiten und dabei terminal ausdifferenzieren. Diese Expression ist damit direkt mit der Spezifizierung von Gewebe zu Tentakelgewebe assoziiert (siehe Abb. 2-10I; Smith *et al.*, 2000). Ein weiterer Homeobox-Transkriptionsfaktor namens CnOtx wird außer im Rumpf spezifisch in der Tentakelzone und an der Tentakelbasis in ektodermalen Epithelzellen erhöht exprimiert. Eine Expression im Hypostom oder den Tentakeln konnte nicht detektiert werden (siehe Abb. 2-10N; Smith *et al.*, 1999). CnOtx ist vermutlich an der Spezifizierung von anteriorem Gewebe beteiligt. Ebenfalls

erhöht an der Tentakelbasis wird ein Hydra Homolog der Proteinkinase C, HvPKC1 exprimiert. Wie im Rumpf ist *HvPKC1* in Epithelzellen und I-Zellen vorhanden (siehe Abb. 2-10G; Hassel, 1998). Auch die Expression der Matrix-Metalloprotease HMMP konnte nachgewiesen werden. Sie wird in den Tentakeln, an der Basis der Tentakel, an den Tentakelspitzen und direkt über der Basalscheibe erhöht exprimiert (siehe Abb. 2-10M; Leontovich *et al.*, 2000). Sie markiert somit die Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln, zwischen Stil und Fußscheibe, ist aber auch für das gesamte Tentakelgewebe spezifisch. Ihre Expression korreliert also mit den beiden Regionen, in denen morphogenetische Prozesse und die Transdifferenzierung von Zellen stattfinden.

Die Genexpression innerhalb des Hypostoms scheint von Genen des kanonischen Wnt-Signalweges dominiert. Sieben der elf bekannten Wnt-Liganden und die Transkriptionsfaktoren HyTcf und Hy $\beta$ -Catenin werden erhöht in Epithelzellen im Hypostom exprimiert (siehe Abb. 2-10A, B; Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2000). Sie spielen hier eine Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Kopforganisators (siehe Abschnitt 2.4.4.3; Broun *et al.*, 2005; Hobmayer *et al.*, 2000; Gee *et al.*, 2010; Technau *et al.*, 2000). *Hywnt3* ist auf einen punktförmigen Bereich ekto- und endodermaler Epithelzellen (etwa 60% zu 40%) des apikalen Viertels des Hypostoms beschränkt (siehe Abb. 2-10B). HyTcf wird am stärksten im apikalen Bereich des Hypostoms exprimiert und fällt zum basalen hin graduell ab (siehe Abb. 2-10A). Darüber hinaus wird im gesamten Hypostom in endodermalen Epithelzellen das *Hydra* Brachyury-Homolog *Hybra* exprimiert und kennzeichnet dieses dadurch als solches (siehe Abb. 2-10J; Technau und Bode, 1999). Einige weitere Transkriptionsfaktoren werden spezifisch am basalen Hypostom, oberhalb der Tentakelzone in einem dünnen Band endodermaler Epithelzellen exprimiert. Hierzu zählen *budhead*, ein *Hydra* HNP-3 $\beta$  Homolog und das *Hydra* Goosecoid-Homolog *Cngsc*. Sie markieren so die Grenze zwischen Hypostom und Tentakelzone. Die Expressionsdomäne beider Gene reicht zusätzlich leicht in die Tentakelzone zwischen die Tentakel hinein (siehe Abb. 2-10K, L; Broun *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1997).



*HvPKC2* wird ähnlich wie *Hywnt3*, jedoch nur in endodermalen Epithelzellen exprimiert (siehe Abb. 2-10H; Hassel *et al.*, 1998). Die Wnt-Liganden *Hvwnt5* und *Hvwnt8* sind die beiden einzigen Wnt-Liganden, die eine Expression in Verbindung mit den Tentakeln zeigen. *Hvwnt5* wird in den Tentakelspitzen, *Hvwnt8* an deren Basis exprimiert. Letzteres schaltet vermutlich den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zur Organisation der morphogenetischen Veränderungen der Epithelzellen an der Tentakelbasis an (siehe Abschnitt 2.4.4.4; siehe Abb. 2-10C, D; Philipp *et al.*, 2009).



**Abb. 2-10:** Genexpressionsmuster im Kopf adulter Hydren; Entnommen aus: (A-B) Hobmayer *et al.*, 2000; (C-F) Philipp *et al.*, 2009; (G) Hassel, 1998; (H) Hassel *et al.*, 1998; (I) Smith *et al.*, 2000; (J) Technau und Bode, 1999; (K) Martinez *et al.*, 1997; (L) Broun *et al.*, 1999; (M) Leontovich *et al.*, 2000; (N) Smith *et al.*, 1999; (O) Reinhardt *et al.*, 2004.

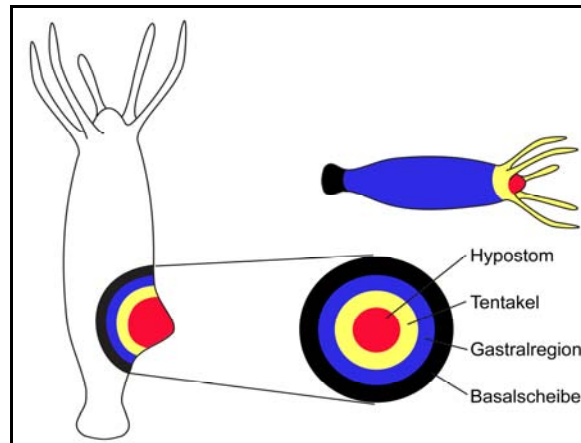
### 2.4.2.2 Die Genexpression während der Knospung in *Hydra*

#### Der Ablauf der vegetativen Vermehrung (Knospung)

*Hydra vulgaris* existiert lediglich in der Polypenform. Sie können sich auf zwei unterschiedliche Arten vermehren. Bei ungünstigen Umweltbedingungen kommt es zu einer sexuellen Vermehrung über Gameten (Martin *et al.*, 1997). Häufig jedoch, bei ausreichendem Nahrungsangebot, erfolgt die Fortpflanzung ungeschlechtlich durch Knospung. Dabei wird durch Rekrutierung von Zellen aus dem Elterntier ein kleiner, vollständiger Polyp als seitlicher, senkrecht zur Körperachse des Elterntieres stehender Auswuchs gebildet. Dieser kann sich etwa drei Tage nach Beginn der Knospung abschnüren und eigenständig leben. Voraussetzung für einen reibungslosen Ablauf der Knospung und eine korrekte Strukturierung der Knospe ist die Neuausbildung aller kopf- und fußspezifischen Gewebegrenzen, wie sie auch im adulten Tier zu finden sind. Außerdem muss es zusätzlich zwischen Muttertier und Knospe zur Ausbildung einer Grenze kommen, die eine eigenständige Entwicklung der Knospe und letztlich ihre Abschnürung vom Muttertier ermöglicht. Die Knospung stellt somit einen ständig in *Hydra* ablaufenden Entwicklungs- und Musterbildungsprozess dar.

Der Knospungsverlauf kann von der Anlage der Knospe bis hin zu deren Abschnürung in drei Phasen unterteilt werden: die Initiation, die Elongation und die Ablösung (Otto und Campbell, 1977). Bei der Initiation erfolgt die Determination einer ringförmigen Knospungszone. Diese befindet sich im unteren Drittel der Gastralregion des Muttertieres, am Übergang vom Stil zum Rumpf. Sie setzt sich aus konzentrischen Ringen zusammen, aus denen elterliche Zellen zentripetal in die sich seitlich ausstülpende Knospe rekrutiert werden (siehe Abb. 2-11; Otto und Campbell, 1977; Tardent, 1972). Die Zellen des innersten Ringes, die die erste Ausstülpung der Knospe bewirken, die Kopfreion mit Hypostom und Tentakeln ausbilden. Die jeweils weiter außen liegenden Ringe liefern Zellen für die Gastralregion und schließlich für die Fußregion, bestehend aus Stil und Basalscheibe (Berking, 2003; Otto und Campbell, 1977). Die Rekrutierung von elterlichem Gewebe endet erst, wenn die Knospe kleine Tentakelrudimente

ausbildet. Dann beginnt die Morphogenese hin zum vollständigen Jungpolypen, der sich vom Muttertier abschnüren kann. Zellen innerhalb der Knospe proliferieren und differenzieren wie in einem adulten Polypen.

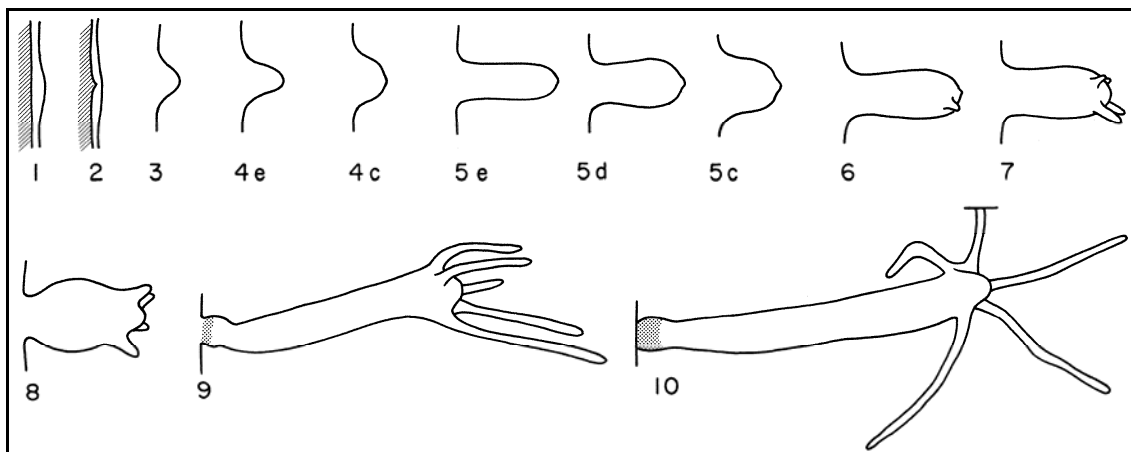


**Abb. 2-11:** Schematische Darstellung der Rekrutierung elterlicher Zellen aus konzentrischen Ringen in die sich entwickelnde Knospe (verändert nach Berking, 2003).

Zusätzlich zu diesen drei Phasen der Knospung, kann man eine weitere Unterteilung des Knospungsprozesses vornehmen. Anhand Otto und Campbell lassen sich aufgrund morphologischer Marker insgesamt zehn verschiedene Stadien unterscheiden, die während des Knospungsprozesses kontinuierlich ineinander übergehen (siehe Abb. 2-12). In Stadium 1, der *Kondensation* kommt es in dem Bereich, in dem sich die zukünftige Knospe ausstülpt zu einer lokalen Verdichtung des Ektoderms. Im zweiten Stadium (*Peak*) bildet das Endoderm unterhalb des verdickten Ektoderms eine spitze, dreiecksförmige Ausstülpung, die sich in das Ektoderm hineinstreckt. In den folgenden Knospenstadien 3 bis 5 kommt es zu einem deutlichen Auswachsen der Knospe. In Stadium 3 (*Hügel*, engl. *Mound*) ragen Ekto- und Endoderm der Knospe zusammen hügelartig aus dem Muttertier hervor. Im vierten Stadium (*Schild*, engl. *Shield*) besitzt die kontrahierte Knospe ein schildartiges Aussehen mit einer Spitze am distalen Ende. Und im fünften Stadium (*Birne*, engl. *Bulb*) hat die Knospe eine birnenförmige Gestalt und ist soweit ausgewachsen, dass ihre Länge gleich oder größer ist als

## 2 Einleitung

der Durchmesser des Rumpfes des Muttertieres. Das sechste Knospungsstadium (*Rudiment*) beginnt, wenn die ersten rudimentären Tentakel auftreten. Außerdem endet die Rekrutierung von Zellen aus dem Muttertier und die Morphogenese der Knospe setzt ein. Die zuvor gebildeten Tentakel wachsen weiter aus, so dass diese in Stadium 7 (*Tentacle*) länger als breit sind und es entstehen zusätzlich auch weitere Tentakel. Beim entspannten Tier ist bereits eine leichte Einschnürung der Basis der Knospe zu erkennen. Kommt es dann zu einer deutlichen Einschnürung, so spricht man von Stadium 8 (*Constriction*). Der Durchmesser an der Knospenbasis ist kleiner als zwei Drittel des Durchmessers der Gastralregion der Knospe. Im Weiteren beginnt in Stadium 9 (*Basalscheibe*, engl. *Basal disc*) die Differenzierung der ektodermalen Epithelzellen in der Basalregion zur Fußscheibe. Trotz weiter voranschreitender Einschnürung der Knospenbasis sind Muttertier und Knospe noch weiterhin miteinander verbunden. Erst im letzten Knospungsstadium 10 (*Unabhängig*, engl. *Independent*) wird die Differenzierung der Basalscheibe abgeschlossen, so dass die Knospe ohne Verbindung zum Muttertier unabhängig vorliegt und sich von diesem ablösen kann.



**Abb. 2-12:** Die Knospenstadien 1 bis 10 entnommen aus Otto und Campbell (1977); c: kontrahiert, e: entspannt, d: ausgestreckt; schraffierte Bereiche in Stadium 9 und 10 markieren differenzierte Fußspezifische Zellen.

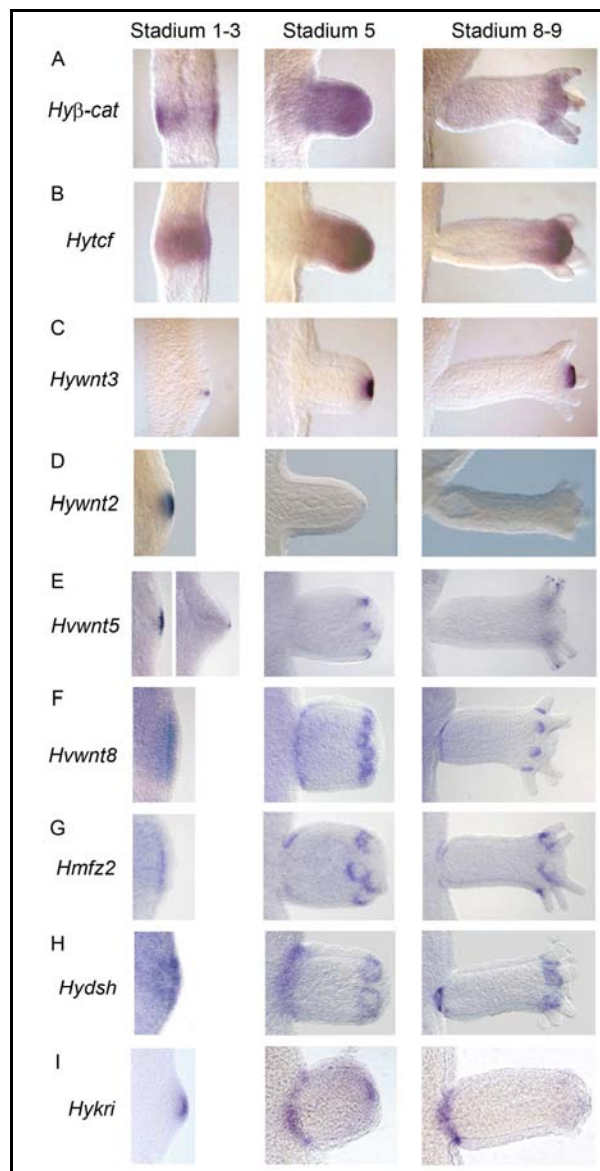
## **Erst die Genexpression in der späten Knospung markiert eine scharfe Grenze zwischen Muttertier und Knospe**

Auch die Genexpression während der Knospung wurde bereits untersucht und beschrieben. Schon vor einer morphologisch sichtbaren Knospenausstülpung werden *Hytcf* und *Hy $\beta$ -catenin* aus dem kanonischen Wnt-Signalweg in einer kreisförmigen Domäne in der zukünftigen Knospen-Evaginationszone coexprimiert (siehe Abb. 2-13A, B, Stadium 1; Hobmayer *et al.*, 2000). Das erste morphologische Anzeichen einer Knospenausstülpung stellt die so genannte Plakode dar. Sie bezeichnet den Bereich der Knospungszone auf dem Muttertier, in dem es zur Verdickung des Ektoderms und zum Auswachsen der Knospe kommt. Innerhalb dieser Plakode werden bereits zahlreiche kopfspezifische Gene aus unterschiedlichen Signalwegen im Ektoderm oder im darunterliegenden Endoderm exprimiert. Hierzu zählen Gene des kanonischen und nichtkanonischen Wnt-Signalweges, des FGF/FGFR-Signalweges und zahlreiche Signalmoleküle, wie Kinasen oder Transkriptionsfaktoren verschiedener Familien (siehe Abb. 2-13C-S). Auffällig ist, dass bereits zu diesem sehr frühen Zeitpunkt hypostomspezifische Gene, wie beispielweise sieben der elf bekannten Wnt-Liganden, darunter *Hywnt3* und *Hywnt2*, die Transkriptionsfaktoren *Hybra* und *budhead* und die Kinase *HvPKC2* im Zentrum der Plakode punktförmig exprimiert werden (siehe Abb. 2-13C, D, K, M, N, Stadium 1-3; Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 1997; Philipp *et al.*, 2009). Tentakel- bzw. Tentakelzonen-spezifische Gene wie *Hvwnt5*, *Hvwnt8*, *Hmfz2*, *Hydsh*, *HvPKC1*, *Hyalx*, *Cngsc*, *HMMP* und *HyBMP5-8b* hingegen werden großflächig und ringförmig oder nur ringförmig eher nur zentrumsnah exprimiert (siehe Abb. 2-13E-H, J, L, M, P, Q, S, Stadium 1-3; Broun *et al.*, 1999; Hassel, 1998; Leontovich *et al.*, 2000; Philipp *et al.*, 2009; Reinhardt *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2000). Dieses Muster bleibt mit voranschreitender Knospenevagination erhalten. Hypostomspezifische Gene werden apikal an der Ausstülpung, tentakel-spezifische Gene im Verhältnis weiter basal exprimiert. Diese Expressionsmuster stimmen gut mit dem Modell konzentrischer Ringe überein, nach dem aus dem Elterntier rekrutierte Zellen des innersten Ringes, im Zentrum der Plakode

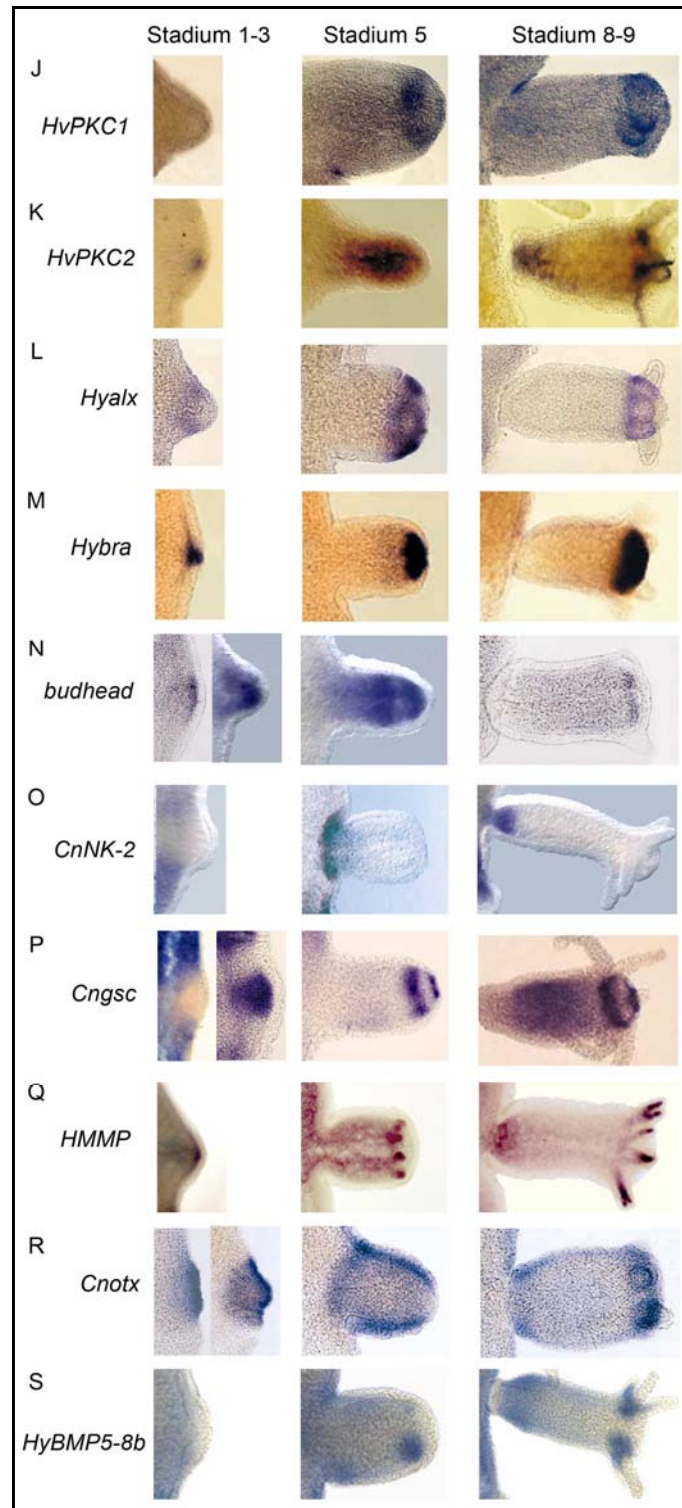
sich als erstes ausstülpfen und das Hypostom bilden werden (siehe Abb. 2-11, roter Bereich). Die Zellen des weiter außen liegenden, zentrumsnahen Ringes wandern etwas später und werden die Tentakel ausbilden und exprimieren deshalb tentakelspezifische Gene (siehe Abb. 2-11, gelber Bereich). Der kreisförmige Bereich konzentrischer Ringe wird damit schon sehr früh im Knospungsprozess durch die Expression spezifischer Gene determiniert (Berking, 2003; Otto und Campbell, 1977). Allerdings kann in derart frühen Knospungsstadien in der Knospungszone noch keine Expression fußspezifischer Gene, wie die des spezifisch im Stil adulter Tiere und später Knospen exprimierten Homeobox-Gens *CnNK-2* im äußersten Ring detektiert werden. Es wird erst in späteren Stadien (etwa Stadium 5) an der Basis der Knospe in den zuletzt in die Knospe einwandernden, zukünftigen Fußzellen der Knospe exprimiert (siehe Abb. 2-13O, Stadium 1-3 und 5; Grens *et al.*, 1996). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das basale Knospengewebe nicht von Beginn an auf dem Elterntier determiniert ist. Das einzige bisher bekannte Gen, dessen Expressionsdomäne den gesamten kreisförmigen Bereich, scheinbar inklusive des äußersten Ringes auf dem Elterntier umfasst, ist das *Hydra* Otx-Homolog *Cnotx* (siehe Abb. 2-13R, Stadium 1-3; Smith *et al.*, 1999). Allerdings ist die Grenze zwischen *Cnotx*-positiven und negativen Zellen eher diffus. Es existiert scheinbar noch keine klare Grenze zwischen zukünftigen Knospenzellen und solchen, die im Elterntier verbleiben.

Ein erster Hinweis auf eine sich ausbildende Grenze zwischen Muttertier und Knospe ist erst ab Knospungsstadium 5 erkennbar. Hier werden Gene des nicht-kanonischen Signalweges und des FGF/FGFR-Signalweges in einer breiten, ringförmigen Domäne an der Knospenbasis exprimiert. Hierzu zählen *Hvwnt8*, *Hmfz2*, *Hydsh*, der *Hydra* FGF-Rezeptor *kringelchen* und *CnNK-2* (siehe Abb. 2-13F-I, O, Stadium 5; Grens *et al.*, 1996; Philipp *et al.*, 2009; Sudhop *et al.*, 2004). Diese breite Expressionsdomäne wird jeweils ab dem Stadium 7, in denen die Knospenmorphogenese beginnt, auf einen schmalen Ring an der Basis der Knospe begrenzt und bleibt bis zum Ende der Knospung erhalten (siehe Abb. 2-13 F-I, O, Stadium 8-9; Grens *et al.*, 1996; Philipp *et al.*, 2009;

Sudhop *et al.*, 2004). In späten Knospungsstadien kann demnach eine Schär-  
fung der Grenze zwischen Muttertier und Knospe beobachtet werden. Es wurde  
bereits gezeigt, dass diese scharfe Grenze für eine korrekte Fußbildung und  
Abspaltung der Knospe notwendig ist (Sudhop *et al.*, 2004). Insgesamt veran-  
schaulichen die beschriebenen Genexpressionsmuster, dass an der Ausbildung  
einer funktionellen, scharfen Grenze während der Knospung miteinander inter-  
agierende Wnt- und FGF/FGFR-Signalwege beteiligt sind.



**Abb. 2-13:** Genexpressionsmuster während der Knospung in drei verschiedenen Stadien; Ent-  
nommen aus: (A-C) Hobmayer *et al.*, 2000; (D) Lengfeld *et al.*, 2009; (E-H) Philipp *et al.*, 2009;  
(I) Sudhop *et al.*, 2004).



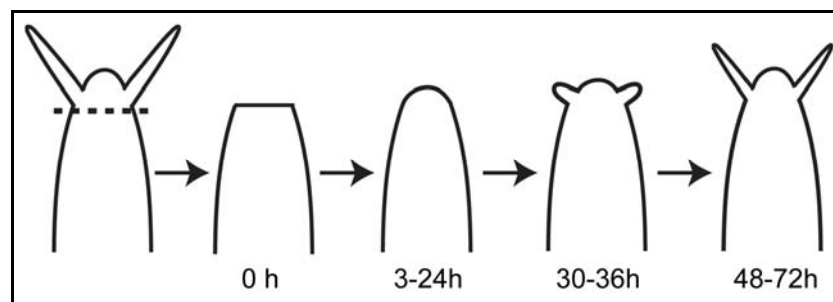
**Abb. 2-13-Fortsetzung:** Genexpressionsmuster während der Knospung in drei verschiedenen Stadien; Entnommen aus: (J) Hassel, 1998; (K) Hassel *et al.*, 1998; (L) Smith *et al.*, 2000; (M) Technau und Bode, 1999; (N) Martinez *et al.*, 1997; (O) Grens *et al.*, 1996; (P) Broun *et al.*, 1999; (Q) S. Münder, nach Leontovich *et al.*, 2000; (R) Smith *et al.*, 1999; (S) Reinhardt *et al.*, 2002.



### 2.4.2.3 Die Genexpression während der Kopfgeneration in *Hydra*

#### Der Verlauf der Kopfgeneration

Die Kopfgeneration ist eine morphallaktische Regeneration, da für die Nachbildung der fehlenden Struktur keine Zellteilungen notwendig sind, sondern „nur“ das verbliebene Gewebe umgeformt wird. Verantwortlich für die Fähigkeit zur Kopfgeneration sind sowohl die ekto-als auch die endodermalen Epithelzellen und nicht die I-Zellen. Trennt man einer Hydra unterhalb der Tentakelgrenze den Kopf ab, so strecken sich die Zellen beider Epithelien innerhalb von drei bis sechs Stunden über das verwundete obere Ende und es kommt so zum Wundverschluss. Nach 30 bis 36 Stunden bilden sich die ersten Tentakelknospen aus und nach insgesamt 48 bis 72 Stunden hat sich wieder ein vollständiger Kopf ausgebildet (siehe Abb. 2-14; Bode, 2003). Generell ist zu beobachten, dass die Kopfgeneration umso länger dauert, je weiter unten entlang des Rumpfes die Tiere dekapitiert bzw. halbiert werden (Wilby and Webster, 1970 a.; MacWilliams, 1983a und b).



**Abb. 2-14:** Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Kopfgeneration in *Hydra*.

#### Die Genexpression während der Kopfgeneration

Ähnlich wie bei der Knospung muss im Verlauf der Kopfgeneration ein neuer Kopf ausgebildet, in seine einzelnen Teilbereiche strukturiert und diese gegeneinander abgegrenzt werden. Anders jedoch als bei der Knospung muss keine

neue Körperachse ausgebildet werden. Die innerhalb des adulten Tieres vorhanden morphogenetisch aktiven Gradienten werden zwar vorübergehend gestört, können jedoch nach der Neuausbildung des im Hypostom befindlichen Kopforgansators schnell wieder ausgebildet werden (siehe Abschnitt 2.4.3.2 und 2.4.4.3). Die in Abschnitt 2.4.2.1 beschriebenen Gene, die auch im adulten Kopf exprimiert sind und für dessen Erhalt eine Rolle spielen, werden auch während der Kopfregeneration in einem spezifischen, dynamischen Muster exprimiert.

Die ersten Gene, die nach Dekapitation in der gesamten regenerierenden Kappe exprimiert werden stammen aus dem kanonischen Wnt-Signalweg. Bereits nach 1,5 bis 3 Stunden können *Hy $\beta$ -catenin*, *Hytcf* und *Hywnt3* detektiert werden (siehe Abb. 2-15A, C und Abb. 3-32E; Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2009). Im Laufe der Regeneration werden *Hytcf* und *Hy $\beta$ -cat* auf das Hypostom und *Hywnt3* auf die Spitze des Hypostoms, entsprechend dem Signal, wie es auch in adulten Tieren auftritt, beschränkt (siehe Abb. 2-15B, D und Abb. 3-32F-H). 3 bis 6 Stunden nach Dekapitation werden zusätzlich zu *Hywnt3* sechs weitere Wnt-Liganden ebenfalls großflächig am regenerierenden Pol exprimiert. Diese erreichen ihr höchstes Expressionslevel etwa nach 12 bis 40 Stunden (Lengfeld *et al.*, 2009). Diese Kinetik der Wnt-Ligand-Genexpression lässt vermuten, dass eine Kaskade konsekutiver Wnt-Aktivierung die Regeneration begleitet und vermutlich an der Ausbildung des Kopforgansators beteiligt ist (siehe Abschnitt 2.4.4.3). Die beiden Wnt-Liganden *Hvwnt5* und *Hvwnt8* werden wie auch *Hmfz2* und *Hydsh* hingegen erst 24-30 Stunden nach Dekapitation in mehreren, kreisförmigen Expressionszentren von 5-10 Epithelzellen an der regenerierenden Spitze exprimiert. Sie definieren so die Stellen, an denen die neuen Tentakelrudimente auswachsen werden (siehe Abb. 2-15E, F und Abb. 3-32K, O, S; Philipp *et al.*, 2009). An der Basis der sich immer weiter ausstülpenden Tentakel bleiben dann *Hvwnt8*, *Hmfz2* und *Hydsh* wie im adulten Tier ringförmig in ihrer Expression und über das Ende der Regeneration hinaus erhalten. *Hvwnt5* wird auf die Spitzen der Tentakel begrenzt (siehe Abb. 2-15F und Abb. 3-32L, P, T; Philipp *et al.*, 2009). Der Transkriptionsfaktor *Hyalx* wird eben-

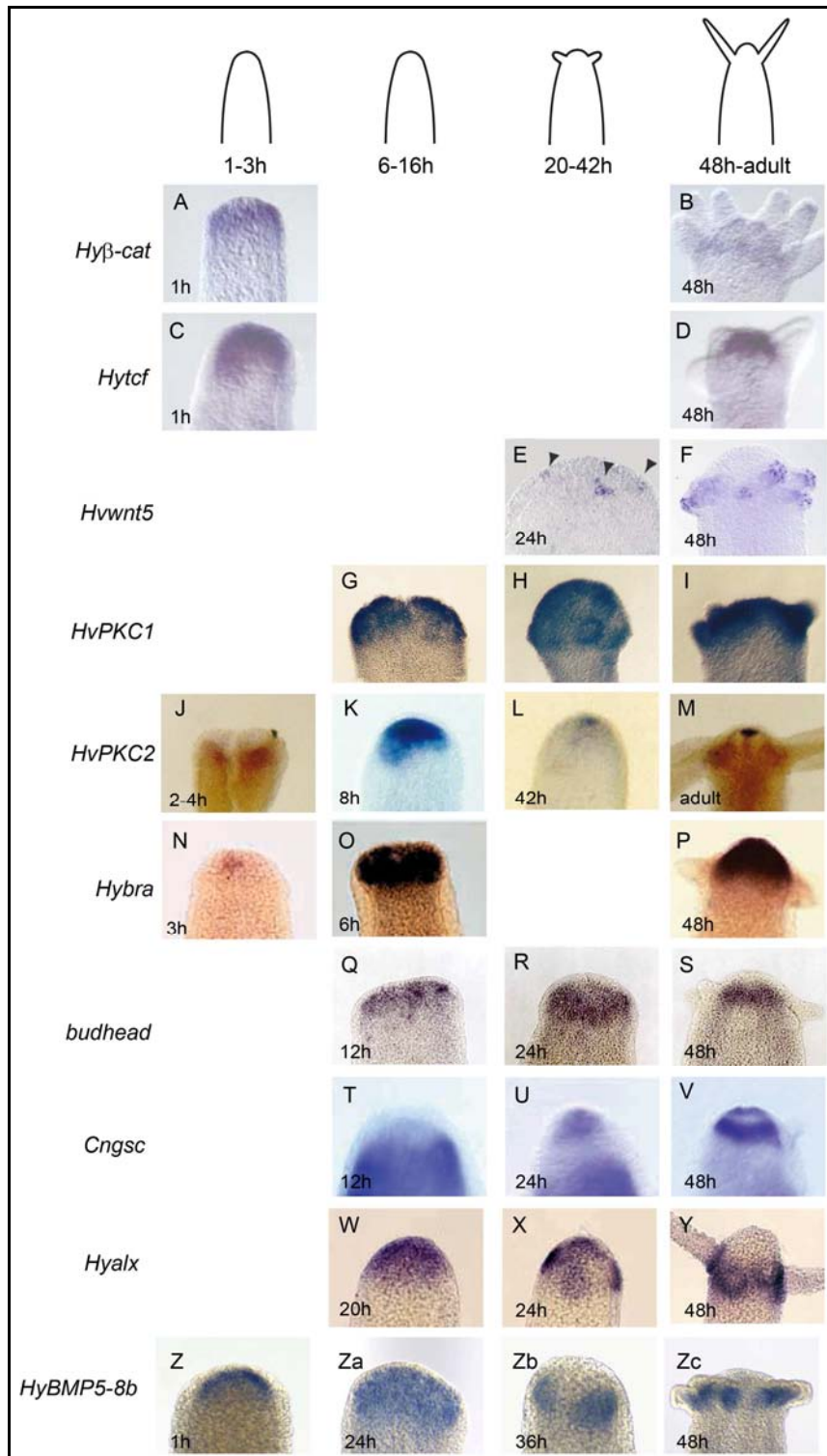
falls relativ spät, erst 20 Stunden nach Dekapitation in der regenerierenden Kappe exprimiert und wird allmählich auf zunächst kreisförmige, dann ringförmige Expressionsdomänen an der Basis der auswachsenden Tentakel wie im adulten Tier beschränkt (siehe Abb. 2-15W-Y und Abb. 3-32V-X; Smith *et al.*, 2000).

Der FGF-Rezeptor *kringelchen*, die Matrix-Metalloprotease *HMMP* und das BMP5-8 Homolog *HyBMP5-8b* werden hingegen schon relativ früh während der Regeneration in der gesamten apikalen Kappe exprimiert (siehe Abb. 2-15Z-Zc und Abb. 3-32A-D und Y-Zb; Leontovich *et al.*, 2000; Dissertation S. Sudhop, 2006; Reinhardt *et al.*, 2002). Im Laufe der Zeit konzentriert sich die Expression beider Gene auf punktförmige Areale, wo sich die Tentakelknospen ausbilden. Die Expression von *HMMP* wird dann auf die einzelnen Tentakel, ihre Spitzen und Basis beschränkt, die von *HyBMP5-8b* auf die Tentakelbasis (siehe Abb. 2-15Zb, Zc und Abb. 3-32Za, Zb; Leontovich *et al.*, 2000; Reinhardt *et al.*, 2002). Die *kringelchen*-Expression hingegen wird zunehmend schwächer, verschwindet ab 48 Stunden vollständig und ist auch in adulten Köpfen nicht mehr exprimiert (siehe Abb. 3-32C, D; Dissertation S. Sudhop, 2006).

Die beiden Kinasen *HvPKC1* und *2* und die hypostomspezifisch exprimierten Gene *Hybra*, *budhead* und *Cngsc* werden zwischen 4 und 12 Stunden am regenerierenden Pol hochreguliert und ab 36 Stunden in ihrer Expression auf die Areale im Hypostom bzw. Kopf begrenzt (siehe Abb. 2-15G-V; Hassel, 1998; Hassel *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1997; Technau und Bode, 1999).

Generell werden damit bei der Kopfregeneration von Beginn an sowohl hypostomspezifische Gene wie *Hywnt3*, *HvPKC2*, *Hybra* und *Cngsc* als auch tentakelspezifische Gene wie *HyBMP5-8b* und *Hyalx* zusammen großflächig in der regenerierenden Kappe exprimiert. Erst später im weiteren Verlauf der Regeneration werden sie auf ihre spezifischen Expressionsdomänen, in denen sie auch im adulten, unverletzten Tier exprimiert werden, beschränkt.

## 2 Einleitung

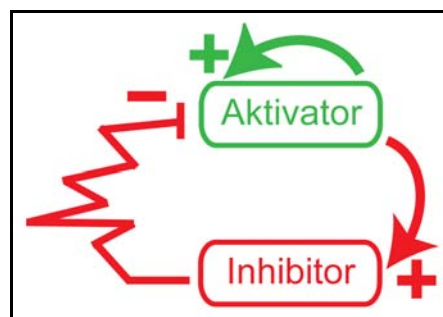


**Abb. 2-15:** Genexpression während der Kopfregeneration. Oben: schematische Darstellung regenerierender Hydren zu verschiedenen Regenerationszeitpunkten; Entnommen aus: (A-D) Hobmayer *et al.*, 2000; (E-F) Philipp *et al.*, 2009; (G-I) Hassel, 1999; (J-M) Hassel *et al.*, 1999; (N-P) Technau und Bode, 1999; (Q-S) Martinez *et al.*, 1997; (T-V) Broun *et al.*, 1999; (W-Y) Smith *et al.*, 2000; (Z-Zc) Reinhardt *et al.*, 2002.

### 2.4.3 Theoretische Modelle für Muster- und Grenzbildungsprozesse

#### 2.4.3.1 Das Gierer-Meinhardt Modell

Ein erstes, theoretisches Modell für die Entstehung morphogenetischer, räumlicher Gradienten lieferte Alan Turing 1952 in seinen Arbeiten über die Grundlagen der Morphogenese mit dem Reaktions-Diffusionsmodell. Nach diesem führt die Interaktion zweier Substanzen mit unterschiedlichen Diffusionsraten über die Zeit hinweg zu räumlichen Konzentrationsgradienten. Dieses Modell erweiterten 1972 Gierer und Meinhardt und sprechen von Musterbildung durch Autokatalyse und weitreichender Inhibition (siehe Abb. 2-16). Der Aktivator ist zur Autokatalyse fähig, ist langlebig und besitzt eine kurze Diffusionsreichweite (siehe Abb. 2-16, grün). Er reguliert zusätzlich zu seiner eigenen Synthese auch die des Inhibitors. Dieser ist jedoch kurzlebig, besitzt eine große Diffusionsreichweite und kann den Aktivator inhibieren (siehe Abb. 2-16, rot). Geht man davon aus, dass anfänglich beide Gegenspieler auf einem basalen Level gebildet werden, so kann durch zufällige Schwankungen in der Synthese des Aktivators ein hoher Wert für diesen erreicht werden. Dieser wird durch seine Fähigkeit zur Autokatalyse noch zusätzlich verstärkt. Gleichzeitig wird jedoch auch der Inhibitor produziert, der das Maximum des Aktivators auf eine kleine Region begrenzt. Im Zusammenspiel der beiden Antagonisten kann somit ein sich selbst-generierendes, selbst-regulierendes System geschaffen werden, das sich aufrechterhalten und je nach Feldgröße verschiedene dynamische Muster ausbilden kann.



**Abb. 2-16:** Musterbildung durch Autokatalyse und langreichweitige Inhibition (gemäß Meinhardt und Gierer, 2000).

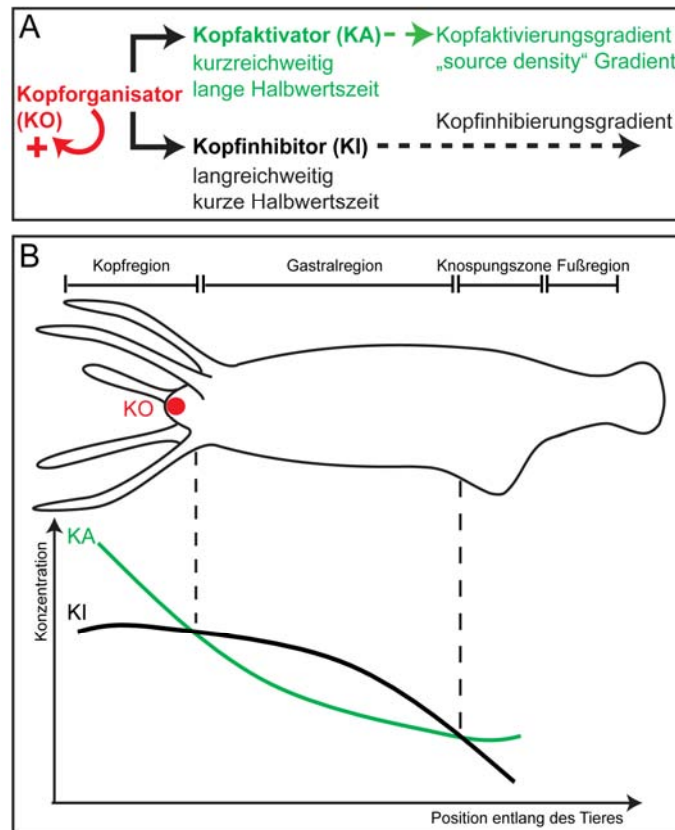
### 2.4.3.2 Übertragung des theoretischen Gierer-Meinhardt Modells auf die Musterbildung in *Hydra*

Das Gierer-Meinhardt Modell der Musterbildung kann direkt auf *Hydra* übertragen werden und die Ergebnisse einiger Regenerations-, Reaggregations- und Transplantationsversuche erklären. In *Hydra* existieren demnach zwei Systeme aus Aktivator und Inhibitor, eines für den Kopf und eines für den Fuß.

Im Falle der Bildung bzw. Erhaltung der Kopfstrukturen lassen sich grundsätzlich drei musterbildende Komponenten unterscheiden (siehe Abb. 2-17A). Der so genannte Kopforganisator ist im Hypostom lokalisiert und weist die typischen Charakteristika eines embryonalen Organisators auf, nämlich die Fähigkeit eine sekundäre Achse zu induzieren, wenn er an eine andere Stelle im Embryo transplantiert wird (MacWilliams, 1983b; Broun und Bode, 2002). Er hat eine Halbwertszeit von nur 12 Stunden und wird deshalb als instabiler Kopffaktivator bezeichnet (MacWilliams, 1983b). Er ist zur autokatalytischen Aktivierung fähig und produziert und übermittelt vermutlich zwei Signale an das Rumpfgewebe, den Kopffaktivator (HA) und den Kopffinhibitor (HI). Beide bilden jeweils einen Gradient aus: den so genannten Kopffaktivierungs- und den Kopffinhibierungsgradienten (siehe Abb. 2-17A, B).

Der Kopffaktivierungsgradient (MacWilliams, 1983b) besitzt eine relativ lange Halbwertszeit von 36 Stunden, hat sein Maximum im Kopf und fällt aufgrund seiner kurzen Reichweite relativ schnell graduell zum basalen Körperpol hin ab. Er wird auch als „*source density*“- Gradient (Gierer und Meinhardt, 1972) oder Gradient eines Positionswertes (Wolpert *et al.*, 1971 und 1972 und 1974) bezeichnet (siehe Abb. 2-17A, B). Dieser Positionswert ist als eine skalierte Gewebeeigenschaft zu verstehen, die die Zellen entlang der apiko-basalen Körperachse über ihre aktuelle Position informiert und so auch ihre Kapazität bestimmt, mit der sie eine bestimmte Körperstruktur, genauer einen Kopf ausbilden können. Der Kopffinhibierungsgradient hat sein Maximum ebenfalls im Kopf und fällt zum basalen Pol hin ab, allerdings aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von nur 2-3 Stunden und seiner langen Reichweite nur sehr schwach

(siehe Abb. 2-17B). Insgesamt entstehen so zwei gegenläufige Gradienten entlang der Körperachse, die eine gewisse Gewebepolarität bewirken.



**Abb. 2-17:** Schematische Darstellung des einfachen Kopf-Musterbildungsmodells; (A) Schema der beteiligten Komponenten und ihrer Interaktionen; Der Kopforganisator (KO) ist zur autokatalytischen Aktivierung fähig und produziert und übermittelt zwei Signale an das Kopf- und Rumpfgewebe: den kurzreichweitigen, langlebigen Kopffaktor (KA) und den langreichweitigen, kurzlebigen Kopfinhibitor (KI); (B) graduierte Verteilung der einzelnen Komponenten entlang der apiko-basalen Körperachse einer Hydra.

Anhand dieses Modells lässt sich erklären, warum Knospung ausschließlich in der als Knospungszone bezeichneten Region des Rumpfes stattfindet. Ein Kopf kann, wie erwähnt, nur dann ausgebildet werden, wenn die Kopffaktierung höher ist als die Kopfinhibierung. Dies ist aufgrund der Eigenschaften der beiden Gradienten nur am unteren Drittel des Rumpfes der Fall (siehe Abb. 2-17B). Ein

## 2 Einleitung

---

weiterer Inhibitor, der im Fuß gebildet wird, verhindert außerdem die Ausbildung von Knospen in noch weiter basal liegenden Bereichen des Tieres.

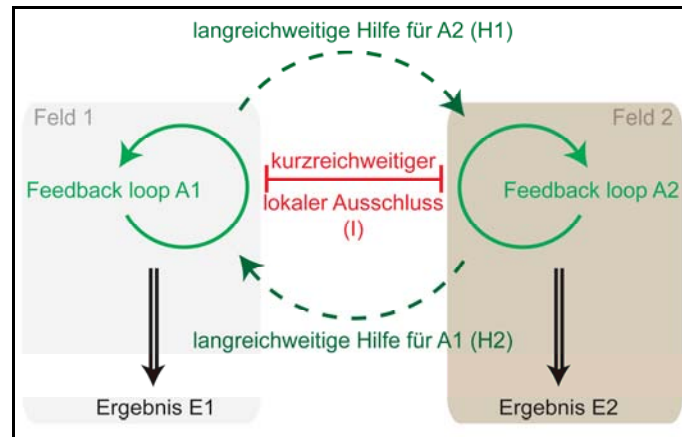
Das Modell kann darüber hinaus auch erklären, dass bei der Regeneration aus Teilstücken des Rumpfes ein Tier immer an der „richtigen“ Stelle die „richtige“, amputierte Körperstruktur nachbilden kann, z.B. einen apikalen Kopf bei der Kopfregeneration. Wird einem Tier der Kopf abgeschnitten, so wird der Kopforganisator, das Syntheszentrum für Kopfaktivator und -inhibitor entfernt. Aufgrund des instabilen Kopfinhibitors, kann die Kopfaktivierung bereits zwei Stunden nach Dekapitation wieder durch die autokatalytische Aktivierung lokalisiert am apikalen Ende des regenerierenden Teilstückes ansteigen. Der lokalisierte Anstieg ist dabei auch auf einen zusätzlichen Faktor resultierend aus der Verwendung zurückzuführen (MacWilliams, 1983b). Nach 8 Stunden hat sich der Kopforganisator, der instabile Kopfaktivator, wieder ausgebildet. Da apikal die Kopfaktivierung größer ist als die Kopfinhibierung kann hier ein Kopf entstehen. Gleichzeitig verhindert die Produktion des Kopfinhibitors die Bildung eines weiteren Kopfes entlang des restlichen Regenerates.

Im Jahr 1993 hatte Meinhardt eine erweiterte und verfeinerte Version des Reaktions-Diffusions-Modells für die axiale Musterbildung ausgearbeitet. Dieses kann noch genauer die Musterbildung des Kopfes in seine beiden Teilbereiche Hypostom und Tentakelzone bzw. Tentakeln während der Kopfregeneration und Knospung erklären. Es basiert auf der Unterscheidung der Musterbildungsprozesse, die jeweils für die Ausbildung eines Teilbereiches verantwortlich sind. Der Kopfaktivator wird in Hypostom- bzw. Tentakelaktivator unterteilt und der Kopfinhibitor in Hypostom- bzw. Tentakelinhibitor. Die beiden Aktivatoren ebenso wie die beiden Inhibitoren bilden dabei jeweils wieder einen Gradienten entlang der Körperachse eines Tieres aus. Durch ihre Interaktion schliessen sich beide Teilstrukturen des Kopfes gegenseitig aus und ihre jeweiligen Positionen entlang der apiko-basalen Körperachse werden festgelegt. Außerdem kann die sequentielle Ausbildung von Tentakeln und Hypostom während der Knospung und Regenerationsprozessen noch genauer erklärt werden.



### **2.4.3.3 Musterbildung durch laterale Aktivierung lokaler, sich ausschließender Signalzustände nach Meinhardt (1982)**

Durch Erweiterungen des einfachen Reaktion-Diffusionsmodells (1972) lieferte Meinhardt 1982 außerdem ein theoretisches Modell für die Mechanismen, die bei der Ausbildung ganz spezifischer Muster innerhalb eines morphogenetischen Feldes während der Entwicklung eine Rolle spielen. Es erklärt, wie zwei benachbarte „Sreifen“ verschiedener Genexpression getrennt durch eine klare Grenze, entstehen können. Die Musterbildung basiert dabei auf lateraler Aktivierung lokaler, sich gegenseitig ausschließender Signalzustände. Die Grundlage bilden zwei Reaktions-Diffusionssysteme (siehe Abb. 2-18, *Feedback-Loops* A1 und A2), die sich jeweils autokatalytisch aktivieren können, sich jedoch gegenseitig durch einen kurzreichweitigen Inhibitor (I) ausschließen. Zusätzlich produziert jedes der beiden Systeme eine Substanz, die langreichweitig die Autokatalyse des jeweils anderen Systems fördert (siehe Abb. 2-18, langreichweitige Hilfe H1 und H2). Ein System für sich allein betrachtet, würde zu einem Schachbrett-Muster von Genaktivitäten führen. Wenn jedoch beide Systeme gegenseitig voneinander abhängig sind, wie es in dem Modell vorausgesetzt wird, so kann dies zu einem Streifenmuster, z.B. alternierender Genaktivität in zwei benachbarten morphogenetischen Feldern mit einer Grenze zwischen diesen führen (siehe Abb. 2-18, Feld 1 mit Ergebnis E1 bzw. Feld 2 mit Ergebnis E2; Meinhardt, 1982).



**Abb. 2-18:** Generelles Schema der Musterbildung durch laterale Aktivierung lokal sich gegenseitig ausschließender Signalzustände (verändert nach Meinhardt, 1982); Zwei autokatalytische Reaktions-Diffusionssysteme A1 und A2 in benachbarten morphogenetischen Feldern 1 und 2 schließen sich gegenseitig durch einen kurzreichweitigen Inhibitor I aus; beide Systeme produzieren zusätzlich jeweils eine langreichweitige Hilfe H1 und H2 für das jeweils angrenzende System; Es kommt zum Ausschluss bei gleichzeitiger Abhängigkeit beider Systeme. Beide Systeme werden dadurch stabilisiert und können als Ergebnis E1 bzw. E2 ausbilden und erhalten, z.B. ein bestimmtes Genexpressionsmuster.

### 2.4.4 In *Hydra* identifizierte und untersuchte Signaltransduktionswege

Diese Arbeit untersucht die Rolle des Notch-Signalweges und seine Interaktion mit den Wnt- und FGF/FGFR-Signalwegen während der Ausbildung von Gewebegrenzen in *Hydra*. Deshalb werden im Folgenden die bekannten Komponenten und Signaltransduktionsmechanismen dieser drei Signalwege in *Hydra* kurz zusammengefasst.

#### 2.4.4.1 Der Notch-Signaltransduktionsweg in *Hydra*

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist ein evolutionär konservierter, parakriner Signalweg, der erst für Metazoen spezifisch ist (Gazave *et al.*, 2009). Der Signalweg bzw. das *Notch*-Gen wurde bereits 1914 anhand einer *Drosophila melanogaster*- Mutante entdeckt, die Einkerbungen (engl. *notches*) in der Flü-

gelkante aufwies (Mohr, 1919). Auch in *Hydra* konnte die Existenz des Notch-Signalweges und seine Konservierung nachgewiesen werden (Käsbauer *et al.*, 2007). Dabei konnten einige der wichtigsten Komponenten, ein Notch-Rezeptor HvNotch, ein Jagged-ähnlicher Ligand HyJagged, der CSL-Transkriptionsfaktor HvSu(H), die katalytische Untereinheit Presenilin des  $\gamma$ -Sekretase-Enzymkomplexes HvPresenilin und eine weitere Untereinheit HvPen-2 identifiziert werden (Käsbauer *et al.*, 2007; Prexl *et al.*, 2011).

Der *Hydra* Notch-Rezeptor HvNotch besitzt eine konservierte Domänenstruktur, ist aber in seiner Gesamtheit eher kurz und relativ einfach gebaut (Fleming, 1998). Er besitzt extrazellulär nur 6 EGF-ähnliche und 3 LNR-Wiederholungen und einen *CC-Linker*. Auf die Transmembrandomäne folgen intrazellulär eine RAM23-Domäne, 6 Ankyrin-Wiederholungen, eine PEST-Region und eine NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz. Eine mutmaßliche S2-Schnittstelle für Metalloproteasen der ADAM-Familie konnte auch identifiziert werden. In *in situ*-Hybridisierungsexperimenten zeigte sich, dass der Rezeptor im adulten Tier ubiquitär im Endo- und Ektoderm exprimiert wird (Käsbauer *et al.*, 2007). Er ist in allen Zellen und Zelltypen eines Polypen an den Membranen und in punktförmigen Strukturen im Zytosol, die vermutlich Endosomen darstellen, lokalisiert (Prexl *et al.*, 2011).

In *Hydra* konnte nur ein Serrate/Jagged-ähnlicher Ligand mit konservierter, Ligand-typischer Domänenstruktur identifiziert werden (Fleming, 1998; Prexl *et al.*, 2011). Nach einem Signalpeptid sind extrazellulär eine DSL-Domäne, 5 EGF-ähnliche Wiederholungen und eine Cystein-reiche von Willebrand Typ C-Domäne, gefolgt von einer Transmembrandomäne und einer nicht-konservierten intrazellulären Region zu finden. Der Ligand ist wie der Rezeptor in allen Zelltypen eines Tieres an den Membranen und in endosomalen Strukturen im Zytosol lokalisiert. Außerdem ist er auch in Nervenzellen (besonders stark in solchen der Fußscheibe) und an der Knospbasis in ektodermalen Epithelzellen des Muttertieres zu finden. Analog hierzu konnte eine erhöhte Expression von *Hyjagged* an der Basis später Knospen (Stadium 8-9) detektiert werden (Prexl *et al.*, 2011).

### **Mechanismus der Signaltransduktion des Notch-Signalweges**

Experimentelle Daten sowie die Suche nach putativen Komponenten des Notch-Signalweges in *Hydra* erlauben den Schluss, dass diese Süßwasserpolypen einen funktionellen Notch-Signaltransduktionsweg aufweisen und der Mechanismus der Signaltransduktion dem bisher bekannten entspricht (siehe Abb. 2-19; Käsbauer *et al.*, 2007).

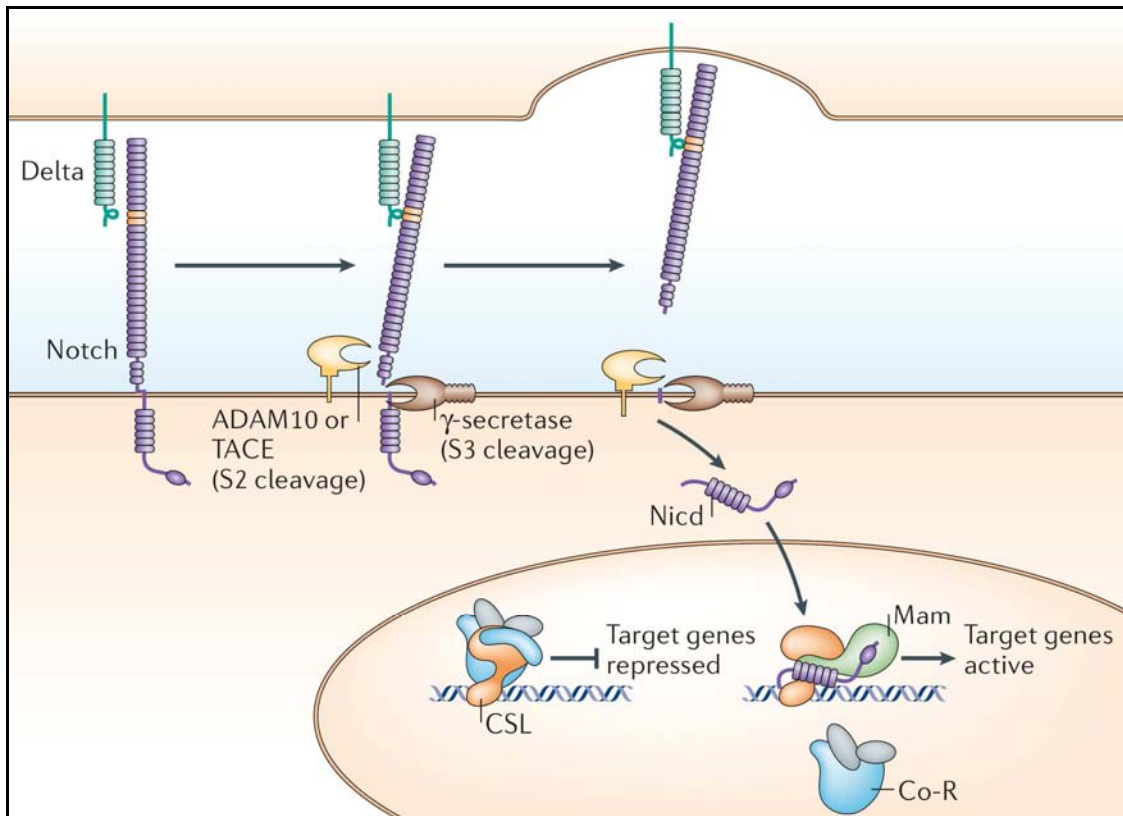
Demnach führt die gegenseitige Bindung der extrazellulären Domänen von Ligand und Notch-Rezeptor auf benachbarten Zellen zur proteolytischen Prozessierung des Rezeptors. Der erste Schnitt an der so genannten S2-Schnittstelle, die im extrazellulären Bereich N-terminal der Transmembrandomäne liegt, wird durch eine membranständige Metalloprotease der ADAM (**a disintegrin and metalloprotease**)-Familie vermittelt (Mumm *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 2007). Es entsteht ein extrazellulär gekürztes, aber noch membrangebundenes Rezeptorfragment (**NEXT**, **Notch extracellular truncation** oder  $N^{AE}$ ). Dieses ist direkt ein Substrat für die darauf folgende Prozessierung an der S3 und S4-Schnittstelle, die auch als RIP (**regulated intramembrane proteolysis**) bezeichnet wird. Ausgeführt wird der Schnitt durch die  $\gamma$ -Sekretase, einen Enzymkomplex, der aus Presenilin als katalytische Einheit, Nicastrin, APH1 und PEN2 besteht (De Strooper *et al.*, 1999; Hass *et al.*, 2009; Mumm *et al.*, 2000; Struhl und Greenwald, 1999; Wolfe, 2006). Durch den zweiten und dritten Schnitt wird die **Notch intrazelluläre, lösliche Domäne (NICD)** ins Zytoplasma entlassen und kann in den Zellkern translozieren (Kopan *et al.*, 1996; Schroeter *et al.*, 1998). Dort kann sie mit den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren der CSL (**CBF1 in Säugern, Su(H) in Drosophila, LAG-1 in C.elegans**)-Familie interagieren (Jarriault *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1995). Dadurch kommt es zur Rekrutierung weiterer allgemeiner und gewebespezifischer Coaktivatoren und gleichzeitig zur Verdrängung bzw. Entlassung repressiver Cofaktoren. Auf diese Weise entsteht aus einem Corepressorkomplex ein Coaktivatorkomplex, der zu einer effizienten transkriptionellen Aktivierung der Notch-Zielgene führt (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994; Jarriault *et al.*, 1995). Die wohl bekanntesten primären Zielgene des Notch-Signalweges sind die *Hairy/Enhancer of split (Hes)*-

Homologe (Bailey und Poskony, 1995; Kageyama und Nakanishi, 1997). Diese sind Transkriptionsrepressoren, die die Expression u.a. proneuraler Gene inhibieren können (siehe Abb. 2-19).

### **Untersuchung des Notch-Signalweges in *Hydra* mittels DAPT**

Käsbauer *et al.* konnten überdies zeigen, dass wie in anderen Organismen, auch in *Hydra* mit Hilfe des synthetischen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitors DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin t-butylester) die Notch-Signalübertragung gehemmt wird und so Funktion und Wirkungsweise des Notch-Signalweges untersucht werden können (Geling *et al.*, 2002; Hadland *et al.*, 2001; Kopan *et al.*, 1996). Die Presenilin-abhängige Proteolyse des Rezeptors und damit die Kerntranslokation der intrazellulären Domäne von Notch in den Kern werden inhibiert. In *Hydra* konnte durch Inhibitionsversuche bereits eine Beteiligung des Notch-Signalweges bei der Differenzierung von Nematocyten und Oocyten nachgewiesen werden (Käsbauer *et al.*, 2007).

## 2 Einleitung



**Abb. 2-19:** Der kanonische Notch-Signaltransduktionsweg (entnommen aus Bray, 2006); Der heterodimere reife Notch-Rezeptor (Notch) auf der Signal-empfangenden Zelle interagiert extrazellulär mit dem membranständigen Ligand (hier Delta) auf der Signal-sendenden Zelle. Durch die Interaktion kommt es zur proteolytischen Prozessierung des Notch-Rezeptors. Der erste Schnitt an der S2-Schnittstelle wird durch die Metalloproteasen der ADAM-Familie (ADAM10 oder TACE (*tumor-necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme*)) vermittelt. Das entstehende extrazelluläre Fragment wird entlassen und in die Ligand-tragende Zelle transendozytiert. Der zweite proteolytische Schnitt an der S3-Schnittstelle erfolgt innerhalb der Transmembrandomäne durch den  $\gamma$ -Sekretase Enzymkomplex (mit Presenilin als katalytische Untereinheit). Dadurch wird die Notch intrazelluläre Domäne (NICD) freigesetzt und gelangt in den Zellkern und kann mit Transkriptionsfaktoren der CSL (CBP1, Su(H), LAG-1)-Familie interagieren. Dies bewirkt den Austausch des Co-Repressorkomplexes (Co-R) gegen einen Coaktivatorkomplex, der unter anderem aus Mastermind (Mam) besteht. Dies führt zur Transkriptionsaktivierung der Notch-Zielgene.

## Transkriptionsfaktoren der HES-Familie

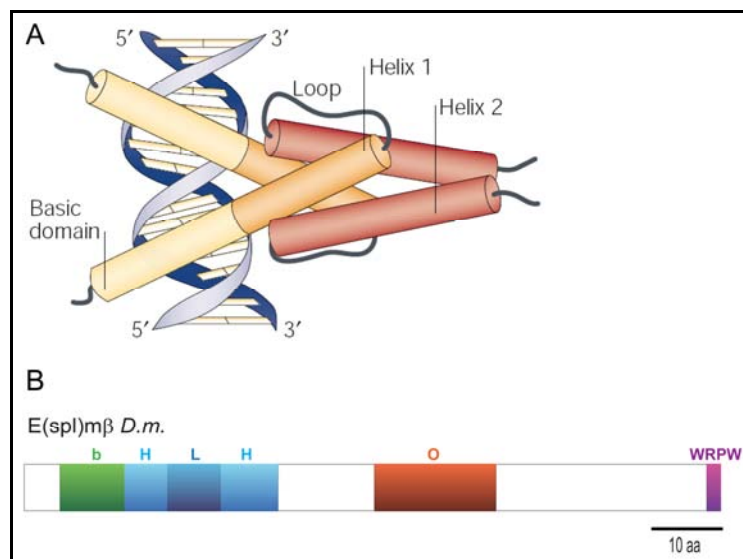
In *Drosophila* wird durch den aktiven Notch-Signalweg ein Genkomplex aktiviert, der als E(spl)-C (**E**nhancer of **s**plit **c**omplex) bezeichnet wird (Bailey und Posakony, 1995; Lecourtois und Schweisguth, 1995). Die Homologen werden in Säugetieren als HES, in Fischen als HER (**H**airy and **E**nhancer of **s**plit **r**elated) und in Fröschen als ESR (**E**nhancer of **s**plit **r**elated) bezeichnet. In *Hydra* konnte nur ein einziger HES-Faktor namens HyHES identifiziert werden (Münder *et al.*, 2011).

*Hes*-Gene besitzen in ihren Promotoren, soweit sie durch den Notch-Signalweg reguliert werden, evolutionär konservierte, palindromische Bindestellen für CSL-Transkriptionsfaktoren. Diese treten in zwei verschiedenen Formen auf, hoch- bzw. niedrigaffine. Hochaffine CSL-Bindestellen besitzen die Konsensussequenz **Y GTG R GAA M** (wobei Y für ein Pyrimidin C bzw. T, R für A oder G steht und M für A oder C) und niedrigaffine die Konsensussequenz **RTG R GAR** (Bailey und Posakony, 1995; Cave *et al.*, 2005; Nellesen *et al.*, 1999). Daneben sind in den Promotoren der *Hes*-Gene auch Bindestellen für aktivierende bHLH-Faktoren, so genannte E-Box Sequenzen, enthalten, die in zwei Gruppen, die Klasse A (CANCTG) und Klasse B (CANGTG) unterteilt werden können (Kageyama *et al.*, 2007a und b; Iso *et al.*, 2003).

Die bekannten HES-Faktoren gehören zur Gruppe E der bHLH-Superfamilie, einer alten Klasse von reprimierenden Transkriptionsfaktoren (Davis und Turner, 2001; Massari und Murre, 2000; Simionato *et al.*, 2007). Sie besitzen vier konservierte, funktionelle Domänen: eine basische Domäne direkt vor der *Helix-loop-Helix* (HLH)- Domäne gefolgt von einer so genannten *Orange*-Domäne und einem C-terminalen WRPW-Motiv (siehe Abb. 2-20B). Die basische Domäne besitzt an Position 6 ein konserviertes Prolin und determiniert die DNA-Bindesepezifität. Die HLH-Domäne setzt sich aus zwei  $\alpha$ -Helices zusammen, die durch eine flexible „Loop-Region“ miteinander verbunden sind (siehe Abb. 2-20A). Sie ist für die Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren verantwortlich, da bHLH-Faktoren nur als Dimere in die große Furche der DNA binden (siehe

## 2 Einleitung

Abb. 2-20A). Sie erkennen eine konservierte, reprimierende Hexanukleotidsequenz, die als N-Box (Konsensus: CACNAG bzw. Klasse C CACGNG) bezeichnet wird (Akazawa *et al.*, 1992; Murre *et al.*, 1994; Ohsako *et al.*, 1994; Sasai *et al.*, 1992). Die Orange-Domäne besteht aus zwei amphiphatischen Helices III/IV und ist an der Regulation der Selektion von Heterodimerpartnern beteiligt (Dawson *et al.*, 1995; Taelman *et al.*, 2004). Das C-terminale Tetrapeptid WRPW (Trp-Arg-Pro-Trp) ist für die Interaktion mit Corepressoren der Transducin-ähnlichen (TLE, *transducin-like*) bzw. Groucho-ähnlichen (Gro) Familie verantwortlich.



**Abb. 2-20:** Protein-Domänenstruktur von HES-Faktoren; (A) Schematische Darstellung der bHLH-Domänen zweier dimerisierter bHLH-Faktoren und ihrer DNA-Bindung in der großen Furche der DNA (entnommen aus Bertrand *et al.*, 2002); (B) Domänenstruktur eines HES-Faktors am Beispiel des E(spl)mβ von *Drosophila melanogaster* (*D.m.*) mit basischer Domäne (grün, b), zwei  $\alpha$ -Helices (hellblau, H), Loop-Region (dunkelblau, L), Orange-Domäne (rot, O) und WRPW-Motiv (lila) (verändert nach Münder *et al.*, 2010).

### 2.4.4.2 Der Wnt-Signaltransduktionsweg in *Hydra*

Der Wnt-Signalweg ist von Nematoden und Insekten bis hin zu Vertebraten konserviert und besitzt vielfältige biologische Funktionen, unter anderem die



Ausbildung primärer Körperachsen während der Entwicklung vielzelliger Organismen (Miller *et al.*, 2001). Auch in *Hydra* konnten alle wichtigen Komponenten des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges und ihre Konservierung nachgewiesen werden: zahlreiche Wnt-Liganden, zwei Frizzled-Rezeptoren, das Gerüstprotein HyDishevelled, Hy $\beta$ -Catenin und der Transkriptionsfaktor HyTcf (Hobmayer *et al.*, 1996; Hobmayer *et al.*, 2000; Minobe *et al.*, 2000; Philipp *et al.*, 2009).

Wnt-Faktoren sind sezernierte und lipid-modifizierte Glykoproteine, die aufgrund eines jeweils typischen Musters von Cysteinresten und zweier sehr kurzer, nur wenig konservierter Domänen, identifiziert und in 13 verschiedene Subfamilien eingeteilt werden können (Kusserow *et al.*, 2005; Miller, 2002; Willert *et al.*, 2003). In *Hydra* konnten insgesamt 11 Liganden identifiziert werden, die gemäß einer phylogenetischen Analyse in die bekannten Subfamilien eingeteilt und nach diesen benannt wurden: HyWnt1, -2, -3, -5, -7, -8, -9/10a, -9/10b, -9/10c, -11 und -16 (Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2009). Homologe zu Wnt4, -6 und -A konnten nicht identifiziert werden.

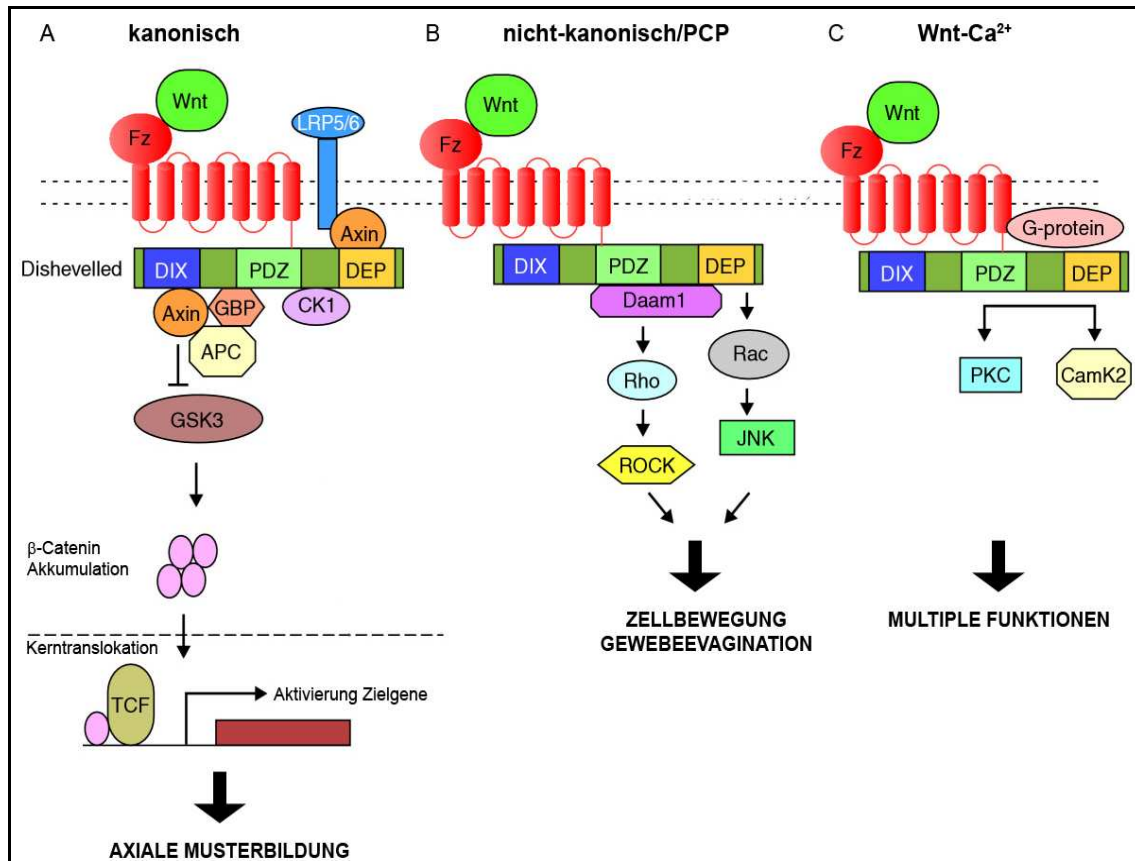
Wnt-Liganden können an Vertreter zweier verschiedener Familien von Zelloberflächen-Rezeptoren binden: die Frizzled (Fz)- und die LDL-Rezeptor-ähnliche Protein (*low-density-lipoprotein-receptor-related protein*, LRP)-Familie. Die Mitglieder beider Rezeptorfamilien sind Korezeptoren und werden für die Bindung der Wnt-Liganden benötigt.

In *Hydra* konnten bisher zwei Frizzled-Serpentinrezeptoren identifiziert werden, HvFrizzled und HmFrizzled2 (HmFz2) (Minobe *et al.*, 2000; Philipp *et al.*, 2009). Sie weisen mit einer N-terminal gelegenen Cystein-reichen Domäne (CRD), sieben Transmembrandomänen und einem am C-Terminus befindlichen PDZ-Domänen-Bindemotiv eine konservierte Domänenstruktur auf.

### **Mechanismus der Signaltransduktion des kanonischen Wnt-Signalweges**

Generell können Wnt-Signale je nach vorliegender Konzentration der Wnt-Liganden oder je nach Kombination eines bestimmten Liganden mit einem der verschiedenen Rezeptoren über mindestens drei verschiedene Wege weitergeleitet werden (Nalesso et al., 2011). Der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg und der PCP (*planar cell polarity* in *Drosophila*)-ähnliche Signalweg zählen zu den nicht-kanonischen,  $\beta$ -Catenin unabhängigen Wnt-Signalwegen (siehe Abb. 2-21B, C). Von den biologischen Funktionen des Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweges ist wenig bekannt. Der Wnt/*polarity*-Weg ist in erster Linie für die Polarität von Zellen durch die Regulation der Organisation des Zytoskeletts verantwortlich. Der am Besten untersuchte Weg ist der kanonische,  $\beta$ -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg, dessen primären Funktionen in der Regulierung von Zellschicksalen und der Etablierung von Organisatorregionen während der axialen Musterbildung bestehen (siehe Abb. 2-21A; Miller, 2002).

Die Signaltransduktion hängt maßgeblich von der intrazellulären, zytosolischen Konzentration von  $\beta$ -Catenin ab. In Abwesenheit eines extrazellulären Wnt-Liganden wird der Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin von einem Multiproteinkomplex aus Axin, APC (*adenomatosis polyposis coli*) und der GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase-3*) gebunden. Axin wirkt hierbei als Gerüstprotein, so dass die GSK-3 $\beta$  zusammen mit der CKI (*casein kinase I*)  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und dadurch dessen Ubiquitinierung und Degradierung über das Proteasom bewirkt. Bindet ein Wnt-Ligand an einen Frizzled-Rezeptor und den Corezeptor LRP, wird Dishevelled (Dsh), ein zytoplasmatisches Gerüstprotein, aktiviert, was letztlich zur Inhibierung der GSK-3 $\beta$  führt.  $\beta$ -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert und abgebaut, sondern kann sich im Zytosol anreichern und in den Zellkern translozieren. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren der TCF (*T-cell factor*)/LEF (*lymphoid enhancer-binding factor*)-Familie und aktiviert so die Genexpression von Wnt-Zielgenen (siehe Abb. 2-21A).



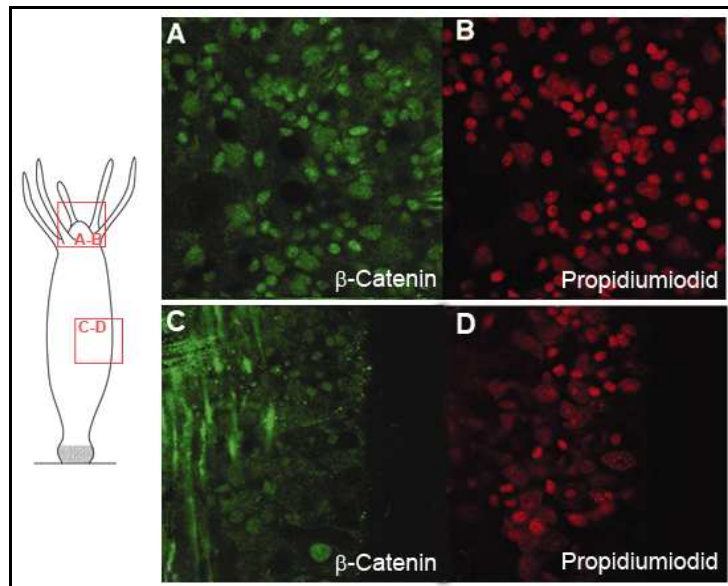
**Abb. 2-21:** Schema der drei verschiedenen Wnt-Signaltransduktionswege (verändert nach Habas und Dawid, 2005); (A) Der kanonische Wnt-Signalweg; Bindet ein Wnt-Ligand (Wnt) an den Rezeptor Frizzled (Fz) und seinen Korezeptor LRP, wird Dishevelled aktiviert, was zur Inhibition der GSK-3 $\beta$  führt.  $\beta$ -Catenin wird nicht mehr phosphoryliert und degradiert, kann sich im Zytosol anreichern und in den Kern translozieren. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie und kann die Genexpression von Wnt-Zielgenen aktivieren. (B) Der nicht-kanonische oder PCP (*planar cell polarity*) Signalweg; Ein Wnt-Ligand bindet unabhängig von LRP-Korezeptoren an den Frizzled-Rezeptor und rekrutiert Dishevelled. Es kommt zur Aktivierung kleiner GTPasen wie Rac und Rho, die wiederum die JNK (Jun N-terminale Kinase) oder die ROCK (*Rho associated kinase*) aktivieren; (C) Der Wnt-Ca<sup>2+</sup>-Signalweg; Interagiert ein Wnt-Ligand mit einem Frizzled-Rezeptor wird die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine vermittelt. Diese rekrutieren Dishevelled, PLC (*phospholipase C*), CamK2 (*calcium-calmodulin kinase 2*) und PKC (*protein kinase C*).

### 2.4.4.3 Die Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges für den Kopforganisator in *Hydra*

Die molekulare Grundlage für die Ausbildung und den Erhalt des Kopforganisationsbildet der kanonische Wnt-Signalweg (Broun *et al.*, 2005; Hobmayer *et al.*, 2000; Gee *et al.*, 2010; Technau *et al.*, 2000). Dies wurde aus den Expressionsmustern von Genen aus diesem Signalweg, aber auch aus Transplantations- und Inhibitionsversuchen geschlossen. Wie bereits dargestellt, werden diese nicht nur in adulten Tieren ausschließlich im Hypostom bzw. der Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln exprimiert, sondern auch bei den drei Prozessen, bei denen es zu einer Neuausbildung des Kopforganisations kommt, nämlich während der Knospung, der Kopfregeneration und Aggregation (siehe Abschnitt 2.4.2.1, 2.4.2.2 und 2.4.2.3; Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2009).

*Hywnt3* stellt während Regenerationsprozessen das erste Wnt-Gen dar, das neben *Hy $\beta$ -cat* und *Hytcf* exprimiert wird. Es könnte daher für die Aktivierung einer konsekutiven Wnt-Genkaskade verantwortlich sein, die zur Ausbildung des Kopforganisations beiträgt. Außerdem könnte es auch weitere Signalwege anschalten, die wiederum die Initiation der axialen Musterbildung regulieren (Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2009; Technau *et al.*, 2000). Bei der Aufrechterhaltung des Kopforganisations in adulten Tieren spielt besonders  $\beta$ -Catenin eine essentielle Rolle, was sowohl anhand  $\beta$ -Catenin transgener Tiere als auch mit Hilfe eines spezifischen anti- $\beta$ -Catenin-Antikörpers gezeigt werden konnte (Broun *et al.*, 2005; Gee *et al.*, 2010). In unbehandelten Polypen konnte nachgewiesen werden, dass  $\beta$ -Catenin im Hypostom vermehrt im Kern der Epithelzellen lokalisiert ist, was für einen aktiven, kanonischen Wnt-Signalweg spricht (siehe Abb. 2-22; Broun *et al.*, 2005). Vermutlich kann nukleäres  $\beta$ -Catenin zusammen mit Tcf an den Promotor von Wnt-Genen binden und diese dadurch in einem positiven Rückkopplungsmechanismus transkriptionell aktivieren. Dies konnte bereits in *Drosophila* und Mäusen gezeigt werden (Deb *et al.*, 2008; Heslip *et al.*, 1997; Lessing und Nusse, 1998). Für *Hydra* bedeutet dies,

dass sich in Zellen des Hypostoms der Wnt-Signalweg trotz auftretender Gewebedynamik und des Zellverlustes ständig selbst aktivieren und erhalten kann.



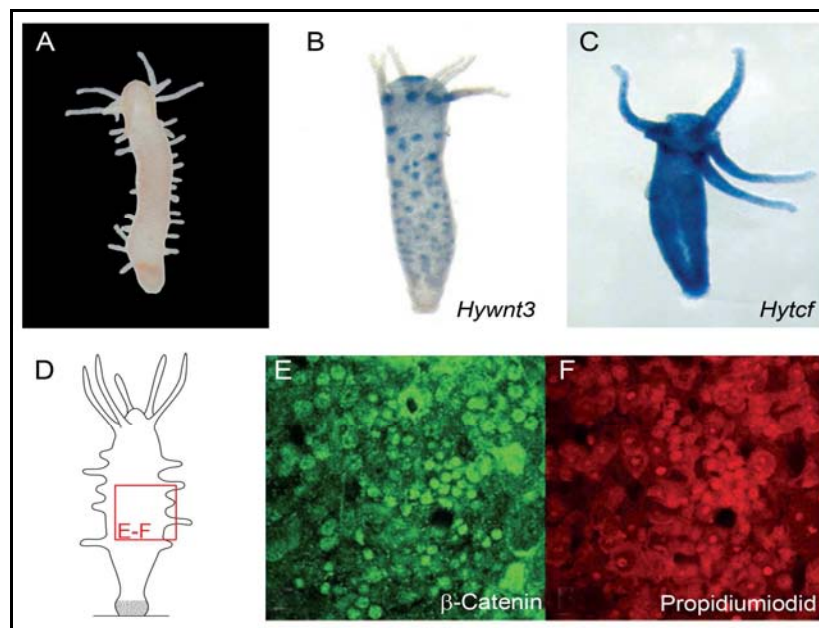
**Abb. 2-22:** Immunfluoreszenzfärbungen unbehandelter Tiere mit dem anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper zeigen eine erhöhte Kern-Lokalisation von  $\beta$ -Catenin im Hypostom (entnommen aus Broun *et al.*, 2005); Links: Schematische Darstellung einer adulten Hydra mit eingezeichneten untersuchten Körperregionen; (A-B) Färbung des Hypostoms; (C-D) Färbung des Rumpfgewebes; (A, C) anti- $\beta$ -Catenin-Antikörperfärbung; (B, D) DNA-Färbung mit Propidiumiodid; Darstellung in Falschfarben: anti- $\beta$ -Catenin-Antikörperfärbung (grün), DNA-Färbung (rot).

Auch durch Inhibitionsversuche konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg die molekulare Grundlage für den Kopforganisator bildet. Werden Hydren mit dem spezifischen GSK-3 $\beta$  Inhibitor Alsterpaullone behandelt, was zu einer artifiziellen Aktivierung des Wnt-Signalweges führt, so kommt es nach 3 bis 4 Tagen entlang des gesamten Rumpfes zur Ausbildung ectopischer Tentakel und nach 9 bis 10 Tagen zur Bildung vollständiger Köpfe (siehe Abb. 2-23A; Broun *et al.*, 2005). Zu beobachten ist außerdem, dass *Hytcf* und *Hywnt3* nicht nur im Hypostom, sondern entlang des gesamten Rumpfes exprimiert werden (siehe Abb. 2-23B, C).  $\beta$ -Catenin ist in solchen Tieren im gesamten Rumpfgewebe im Kern lokalisiert (siehe Abb. 2-23D-F). Dementsprechend haben Teile

## 2 Einleitung

---

des Rumpfes von Alsterpaullone behandelten Tieren alle notwendigen Eigenschaften eines Kopforganisators. Sie besitzen die Fähigkeit zur Induktion einer sekundären Achse nach Transplantation in ein Wirtstier und können die beiden Signale, Kopfinhibitor und Kopfaktivator produzieren und an das Rumpfgewebe übermitteln (Broun *et al.*, 2005). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch  $\beta$ -Catenin transgene Tiere ein ebenfalls erhöhtes Potential an Kopforganisator im Rumpfgewebe aufweisen. Damit konnte die Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges bei der Etablierung eines Kopforganisators in *Hydra* eindeutig nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass der Wnt-Signalweg schon früh in der Evolution vielzelliger Organismen eine Funktion bei der Bildung eines embryonalen Organisators hatte.



**Abb. 2-23:** Veränderungen der Genexpression und Proteinlokalisierung von Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges in Alsterpaullone (ALP)-behandelten Tieren (B, C, E, F entnommen aus Broun *et al.*, 2005); (A) Adultes Tier 3 Tage nach 24-stündiger ALP-Behandlung mit ektopischen Tentakeln am Rumpf; (B, C) Expressionsmuster von *Hywnt3* und *Hytcf* in behandelten Tieren; deutlich erhöhte Expression beider Gene im Rumpf; (D) schematische Darstellung einer ALP-behandelten Hydra mit markierter untersuchter Region; (E-F) Immunfluoreszenzfärbung einer behandelten Hydra mit dem anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper; (E) Die anti- $\beta$ -Catenin-Antikörperfärbung verdeutlicht die Kernlokalisierung von  $\beta$ -Catenin in Rumpfzellen; (F) DNA-Färbung mit Propidiumiodid; Darstellung der einzelnen Kanäle in Falschfarben: anti- $\beta$ -Catenin-Antikörperfärbung (grün), DNA (rot).

#### 2.4.4.4 Die Rolle des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in *Hydra*

Philipp *et al.* (2009) konnten zeigen, dass Gene des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges an der Basis von Knospen und Tentakeln, nicht nur in adulten Tieren, sondern auch während der Kopfregeneration erhöht exprimiert werden (siehe Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.3; siehe Abb. 2-10D-F, Abb. 2-15E, F und Abb. 3-32I-T). Anhand Alsterpaullone-behandelter Tiere konnte überdies bewiesen werden, dass der nicht-kanonische Wnt-Signalweg durch den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert wird und mit diesem während der Initiation und im Verlauf der voranschreitenden Gewebeevasion von Knospen und Tentakeln interagiert. Die Signalweiterleitung erfolgt hierbei über die HvJNK (siehe Abb. 2-21B; Philipp *et al.*, 2009). Wird ihre Aktivität in Hydren durch eine Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor SP600125 inhibiert, so wird die Evagination von Knospen verhindert und die von Tentakeln während der Kopfregeneration stark verzögert. Insgesamt scheint demnach der nicht-kanonische Wnt-Signalweg die Polarität und Bewegungsrichtung von Epithelzellen beider Schichten zu beeinflussen, was wiederum die Knospen- und Tentakelausstülpung mit auslösen und vorantreiben kann. Welche Rolle allerdings der nicht-kanonische Wnt-Signalweg in späten Knospenstadien besitzt, ist nicht genau geklärt.

#### 2.4.4.5 Der FGF/FGFR-Signalweg in *Hydra*

Die „Fibroblasten-Wachstumsfaktoren“ (englisch: *fibroblast growth factor*, FGF) wurden ursprünglich entdeckt, da sie die Proliferation von Fibroblasten vorantreiben konnten (Ornitz und Itoh, 2001). Sie bilden eine große Familie von Wachstumsfaktoren, die sowohl in ihrer Genstruktur als auch Aminosäuresequenz hoch konserviert sind. Alle FGF-Faktoren weisen eine zentrale, konservierte *Core*-Region von etwa 120 Aminosäuren Länge auf, die sich zu einer typischen, Interleukin-1 $\beta$ -ähnlichen Struktur faltet (Dailey *et al.*, 2005). Über diese Region interagieren die FGFs mit den Rezeptoren und binden gleichzeitig auch an Heparin oder Heparin-ähnliche Glucosaminoglykane. Die Assoziation mit diesen Bestandteilen der extrazellulären Matrix ist nicht nur

für eine stabile Ligand-Rezeptor Interaktion notwendig, sondern bietet vermutlich auch einen Schutz vor thermischer Denaturierung oder Abbau und begrenzt gleichzeitig den Wirkungsbereich der Liganden (Ornitz, 2000; Plotnikov *et al.*, 1999). In *Hydra* konnten bisher nur zwei putative FGF-Liganden, jedoch keiner vollständig, identifiziert werden (Dissertation S. Sudhop, 2006). Beide weisen in ihrer *Core*-Region Ähnlichkeiten zu der aus FGF-Faktoren von Vertebraten und Invertebraten auf. Konservierte Aminosäuren für die Interaktion mit dem Rezeptor und weitere für die notwendige Heparin-Interaktion konnten identifiziert werden. Vermutlich läuft damit die Bindung von HvFGFs an einen FGF-Rezeptor ähnlich ab wie die FGF/FGFR-Interaktion in Vertebraten.

Die FGF-Rezeptoren sind eine kleine Familie von Rezeptor-Tyrosinkinase. Vertebraten besitzen nur vier verschiedene Gene (*Fgfr1-4*), die jedoch durch alternatives *Splicing* zahlreiche Isoformen eines Rezeptors generieren (Dailey *et al.*, 2005). In *Hydra* wurde nur ein konserviertes FGF-Rezeptormolekül namens Kringelchen identifiziert und charakterisiert (Sudhop *et al.*, 2004; Dissertation S. Sudhop, 2006). Es besitzt ein N-terminales Signalpeptid, zwei bzw. drei Ig-ähnliche Schleifen, eine Transmembrandomäne, einen langen Juxtamembranbereich und eine zweigeteilte Tyrosin-Kinasedomäne (Johnson und Williams, 1993). Bindestellen für FGF-Liganden und für Adapter- bzw. Dockingproteine sind vorhanden. Theoretisch könnte Kringelchen somit an FGF-Liganden binden.

*Kringelchen* wird auf geringem Niveau im ganzen Polypen exprimiert. Eine erhöhte Expression ist in allen Phasen der Knospung, daneben während der Kopf- und Fußregeneration, aber auch bei der Wundheilung und der Reaggregation zu beobachten (siehe Abschnitt 2.4.2.2 und 2.4.2.3; Sudhop *et al.*, 2004; Dissertation S. Sudhop, 2006). *Kringelchen* ist damit wahrscheinlich an morphogenetischen Prozessen, nicht jedoch am Erhalt bereits ausgebildeter Strukturen beteiligt. Durch Inhibitionsversuche seiner Tyrosinkinaseaktivität mit SU5402 konnte gezeigt werden, dass *Kringelchen* in den späten Knospenstadien eine Rolle spielt und nicht bei der Knospeninduktion. Es ist nicht der entscheidende Faktor für die Elongation oder die apikalen Musterbildung der



Knospe, sondern ist vielmehr an der Einschnürung der Knospenbasis und der Ausbildung einer Grenze hin zum Muttertier beteiligt, was Voraussetzung für eine korrekte Knospenablösung ist (Sudhop *et al.*, 2004).

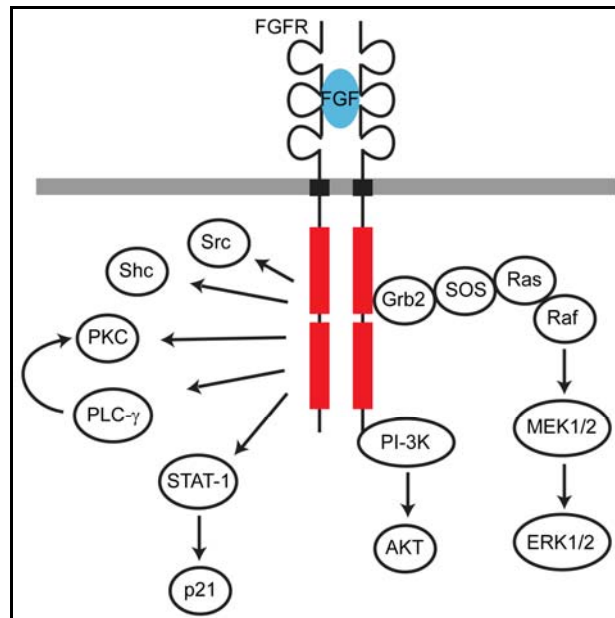
### **Der Signaltransduktionsmechanismus des FGF/FGFR-Signalweges**

Generell wird die Signalübertragung aktiviert, wenn ein FGF-Ligand an die extrazelluläre Domäne eines FGF-Rezeptors bindet (siehe Abb. 2-24; Ornitz *et al.*, 1996). Diese Interaktion wird durch Heparin oder Heparinsulfat- Proteoglykane vermittelt, die sowohl an die Liganden als auch Rezeptoren binden können (Yayon *et al.*, 1991; Schlessinger *et al.*, 2000). Vermutlich werden dabei zuerst FGF-Dimere gebildet, die dann je an einen FGF-Rezeptor binden, was zur Homo- oder auch Heterodimerisierung der Rezeptoren und letztlich zu einem ternären Signalübertragungs-Komplex an der Zelloberfläche führt (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994). Dadurch werden zwei Rezeptormoleküle in räumliche Nähe gebracht, was Voraussetzung für eine Konformationsänderung und die Aktivierung ihrer intrinschen Tyrosinkinaseaktivität ist. Es kommt zu einer gegenseitigen Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in den cytoplasmatischen Domänen beider Rezeptoren (Lemmon und Schlessinger, 1994). Diese phosphorylierten Tyrosine stellen Bindestellen für Proteine dar, die SH2 (*src homology-2*)-, SH3 (*src homology-3*)-, oder PTB (*phosphotyrosine binding*)- Domänen besitzen. Hierzu zählen Adaptorproteine, „Docking“-Proteine oder auch direkt bestimmte Enzyme. An den aktiven Rezeptoren werden so Signalkomplexe ausgebildet und rekrutiert, die eine Kaskade von Phosphorylierungen auslösen und verschiedene, weitere zytoplasmatische Signalwege anschalten können. Hierzu zählen der RAS-MAP-Kinase-Signalweg mit der Kinase ERK, der PI-3-Kinase-AKT-Signalweg, der STAT- und der PLC $\gamma$  (*phospholipase C- $\gamma$* )-Signalweg (siehe Abb. 2-24). Die Aktivierung des FGF/FGFR-Signalsystems führt damit letztlich zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die miteinander interagieren und die unterschiedlichsten zellulären

## 2 Einleitung

---

Auswirkungen haben bzw. die Expression bestimmter Zielgene modulieren können.



**Abb. 2-24:** Schematische Darstellung des FGF/FGFR-Signalweges und die Rekrutierung bzw. Aktivierung verschiedener Zielmoleküle (verändert nach Su *et al.*, 2008).

## **Ziel dieser Arbeit**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Notch-Signaltransduktion in dem Süßwasserpolypen *Hydra vulgaris*. In diesem basalen Organismus können auch im adulten Tier die Mechanismen von Muster- und Grenzbildungsprozessen untersucht werden, da diese aufgrund der fortlaufenden Selbsterneuerung und Dynamik der verschiedenen Gewebe ständig aktiv sein müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb an adulten Polypen die Rolle des Notch-Signalweges und seine Interaktion mit den Wnt- und FGF/FGFR-Signalwegen bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung zweier bekannter Grenzen untersucht werden. Eine betrifft die Grenze zwischen Elterntier und Knospe und die zweite liegt im Kopf einer Hydra zwischen Tentakelzone und Tentakeln. Deshalb wurden die Knospung, adulte Kopfstrukturen und die Kopfregeneration näher betrachtet.

Es wurde jeweils die Auswirkung von Notch-Inhibierung durch DAPT-Behandlung auf die Morphologie der Tiere und auf die Expression verschiedener Gene aus unterschiedlichen Signalwegen untersucht. Überdies sollte auch das Expressionsmuster des HvNotch-Zielgens *HyHes* und die Lokalisation und Verteilung des kodierten HyHES-Proteins analysiert werden.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Elterntier und Knospe

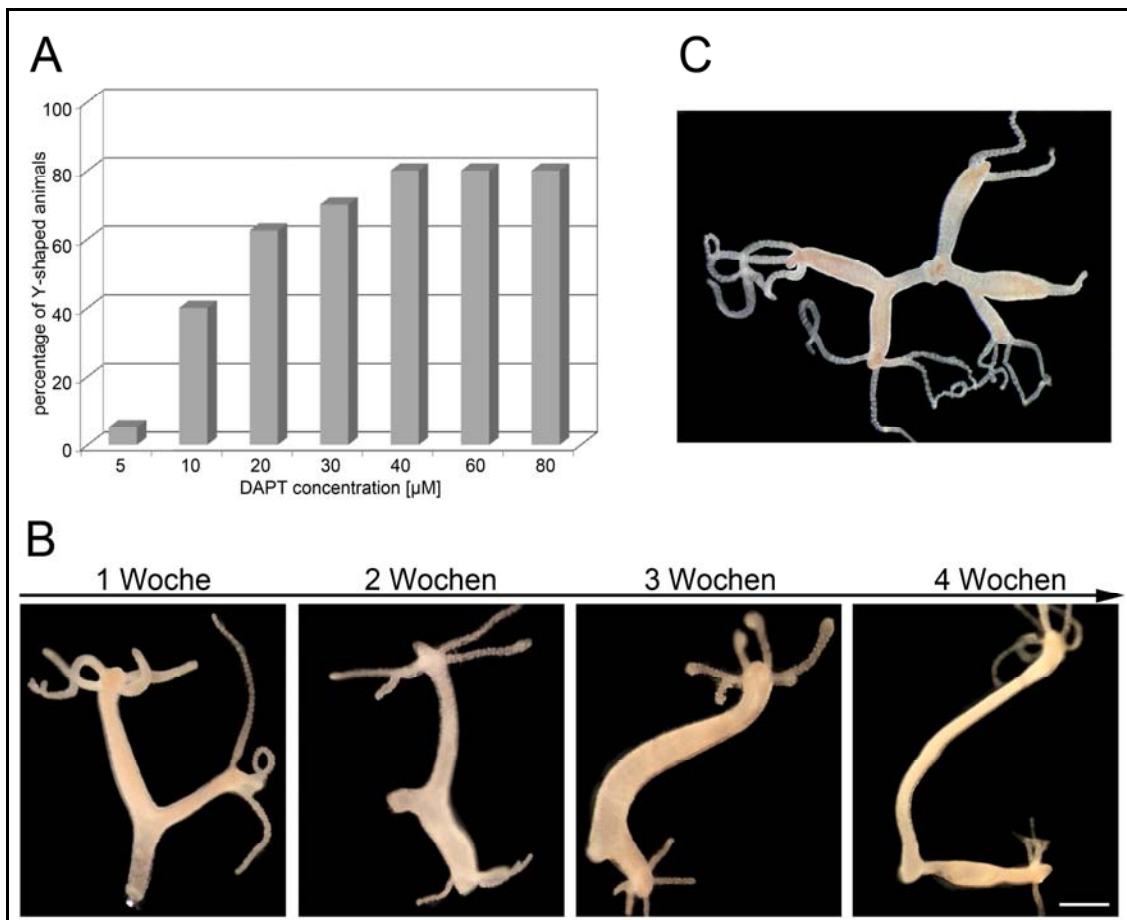
#### 3.1.1 Auswirkung der Hemmung des Notch-Signalweges auf die Morphologie knospender Hydren

Käsbauer *et al.* (2007) konnten bereits zeigen, dass der synthetische  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT auch in *Hydra* die Signal-Weiterleitung eines aktiven Notch-Signalweges verhindert, indem die Translokation der HvNICD in den Kern inhibiert wird. Zuerst wurde untersucht, ob und welchen Einfluss die Inhibierung des Notch-Signalweges auf die Morphologie knospender Tiere und die Grenzbildung während des Knospungsprozesses hat.

Wurden knospende Tiere in den Stadien 4 bis 5 mit DAPT für 48 Stunden behandelt und anschließend in Hydramedium überführt und beobachtet, konnten sich 80% der Knospen an der Basis nicht einschnüren, keinen Fuß ausbilden und sich nicht vom Muttertier ablösen (siehe Abb. 3-1A). Vielmehr blieben die Knospen mit dem Elterntier verbunden und bildeten so genannte Y-Tiere, zweiköpfige Tiere mit einem gemeinsamen Fuß (siehe Abb. 3-1B). Der Prozentsatz der sich entwickelnden Y-Tiere war dabei abhängig vom Knospenstadium zu Beginn der Behandlung und von der eingesetzten DAPT-Konzentration. Je früher im Knospungsprozess und je höher die DAPT-Konzentration war, desto mehr Y-Tiere konnten beobachtet werden (siehe Abb. 3-1A). Die Behandlung mit DAPT war nicht reversibel, obwohl Käsbauer *et al.* (2007) gezeigt hatten, dass 24 Stunden nach Entfernung des Inhibitors, HvNICD wieder in den Kern translozieren kann und damit eine aktive Notch-Signalweiterleitung möglich war. Auch nach vier Wochen konnten die ehemaligen Knospen sich nicht vom Elterntier ablösen, die Y-Tiere blieben vielmehr stabil erhalten. Lediglich die Verbindung beider Tiere wanderte aufgrund der Gewebedynamik adulter Hydren in Richtung des gemeinsamen Fußes (siehe Abb. 3-1B). Außerdem konnten Y-Tiere die regelmäßig gefüttert wurden wieder neue Knospen ausbilden. Diese

### 3 Ergebnisse

Knospen konnten sich völlig normal entwickeln und letztlich vom Y-Elterntier abspalten. Erfolgte allerdings eine wiederholte DAPT-Behandlung jeweils neu gebildeter Knospen in den Stadien 3 bis 5, so konnten diese wieder keinen Fuß ausbilden und sich nicht mehr vom Muttertier lösen, so dass es zur Ausbildung mehrköpfiger Tiere kam (siehe Abb. 3-1C).



**Abb. 3-1:** Die DAPT-Behandlung knospender Tiere führt zu Y-Tieren; (A) Prozentsatz an zu beobachtenden Y-Tieren nach 48 stündiger Behandlung mit verschiedenen DAPT-Konzentrationen; (B) Beobachtung eines Y-Tieres in Hydramedium nach 48 Stunden DAPT-Behandlung über 4 Wochen hinweg; (C) Mehrköpfiges Tier nach wiederholter DAPT-Behandlung; Maßstab: 500 $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Untersuchung der Genexpression an der Grenze zwischen Muttertier und Knospe

#### 3.1.2.1 Das Notch-Zielgen *HyHes*

Da die Inhibierung des Notch-Signalweges die späte Knospung stark hemmt, stellte sich die Frage, ob Notch-Zielgene bei diesem Prozess eine Rolle spielen.

Die am besten in Metazoen untersuchten, primären Zielgene des Notch-Signalweges stellen die Homologen der zur Familie der *Hairy* und *Enhancer of split* gehörenden Transkriptionsrepressoren dar (Bailey und Poskony, 1995; Kageyama und Nakanishi, 1997). In *Hydra* konnte bisher nur ein zu den *Hes*-Genen homologes Gen, namens *HyHes* identifiziert werden (Diplomarbeit Sandra Eberheißinger, verheiratete Münder). Im Vergleich mit den *Hes*-Genen 1, 2, 6 und 7 der Maus besitzt es eine konservierte Exon-Intron-Struktur (Münder *et al.*, 2010).

Die Untersuchung der Aminosäuresequenz und Domänenstruktur des kodierten HyHES-Proteins im Vergleich mit der verschiedener HES-Faktoren aus Invertebraten und Vertebraten ergab, dass es mit einer basischen Helix-loop-Helix-Domäne, einer Orange-Domäne und einem WRPY-Motiv die charakteristische Domänenstruktur eines HES-Faktors besitzt und damit hoch konserviert vorliegt. Eine phylogenetische Analyse belegte zusätzlich, dass es ein Enhancer-of-split- und nicht ein Hairy-Homolog darstellt (Münder *et al.*, 2010).

#### In der Region des *HyHes*-Promotors befinden sich CSL-Bindestellen

In den meisten höheren, vielzelligen Organismen existieren bis zu sieben verschiedene *Hes*-Gene. Davon können jedoch nur einige durch einen aktiven Notch-Signalweg reguliert werden. In der Maus beispielsweise, werden nur drei, nämlich *Hes1*, 5 und 7 durch diesen reguliert (Bessho *et al.*, 2001; Takebayashi *et al.*, 1994; Takebayashi *et al.*, 1995). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht

### 3 Ergebnisse

---

werden, ob das einzige in *Hydra* existierende *Hes*-Gen überhaupt ein Zielgen des Notch-Signalweges darstellt.

Hierfür wurde eine genomische Region von 2,2 kb aufwärts des *Splice*-Akzeptordinukleotids AG analysiert. Dabei konnte ein 120bp langer Abschnitt repetitiver DNA identifiziert werden (siehe Abb. 3-2, gestrichelte Linie). Dieser wurde für die folgende Promotorelement-Analyse nicht mit einbezogen. Händisch und mit Hilfe der Online-Programme TEES (Jonathan Schug und G. Christian Overton, 1997, URL: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>), TFSearch (<http://www.rwcp.or.jp/papia>) und PROMO (Farre *et al.*, 2003; Messeguer *et al.*, 2002) wurde anhand von Konsensussequenzen nach verschiedenen Kernpromotor- und nicht-Kernpromotor-Elementen gesucht. Ihre Positionen wurden jeweils relativ zur Position der *Splice*-Akzeptorsequenz bestimmt und werden daher im Folgenden als negative Zahlen angegeben.

Es konnten mehrere potentielle TATA-Boxen mit der Konsensussequenz TATA(A/T)A(A/T) identifiziert werden (siehe Abb. 3-2, rote Kästen). Auch an den Positionen -27 und -42, an denen sich in Eukaryoten typischerweise TATA-Boxen befinden, ist jeweils eine TATA-Box lokalisiert.

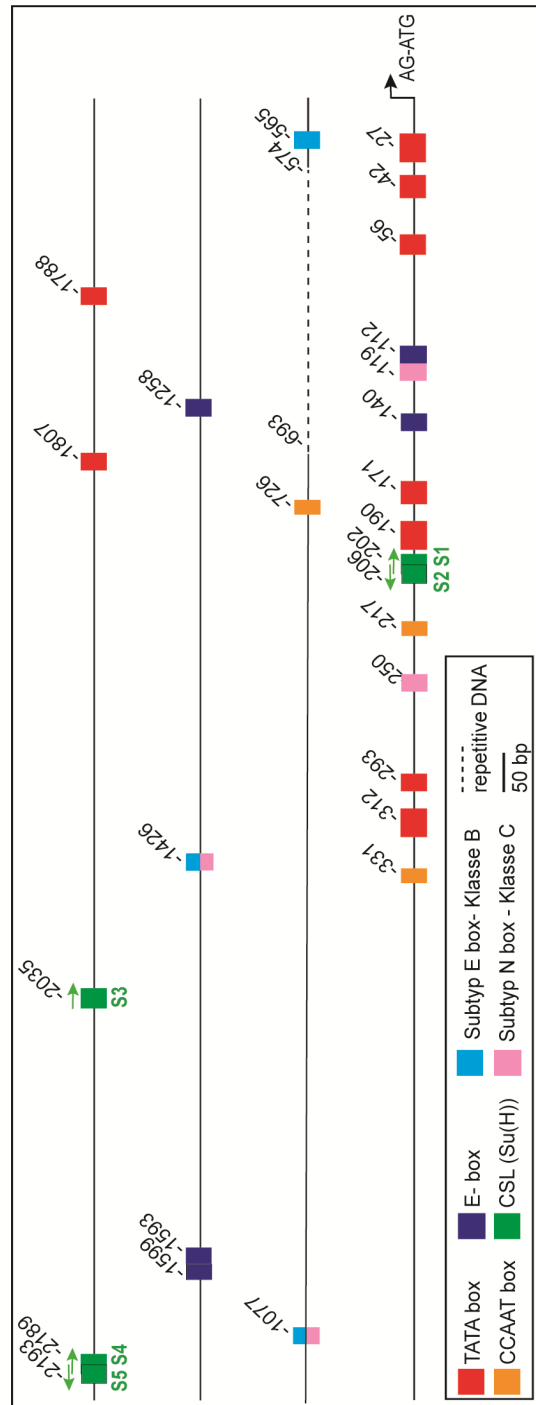
Promotor-nahe Elemente, wie die CAAT- bzw. CAT-Box mit der Konsensussequenz GGCCAATCT liegen typischerweise 120-150bp aufwärts der TATA-Box. Im *HyHes*-Promotor befinden sich insgesamt drei potentielle solcher Elemente an den Positionen -217, -331 und -726 (siehe Abb. 3-2, orange Kästen).

Bindestellen für bHLH-Faktoren, die so genannten E- und N-Boxen wurden ebenfalls analysiert (siehe Abschnitt 2.4.4.1, Transkriptionsfaktoren der HES-Familie). Die E-Boxen stellen aktivierende Promotorelemente mit der Konsensussequenz CANNTG (wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht) dar. Sie können weiter in Klasse A (CANCTG) und Klasse B (CANGTG) eingeteilt werden. Insgesamt sechs solcher E-Boxen, wobei eine der Klasse B zuzuordnen ist, konnten an den Positionen -112, -140, -565, -1258, -1593 und -1599 identifiziert werden (siehe Abb. 3-2, dunkel- und hellblaue Kästen). Die N-Boxen mit ihrer

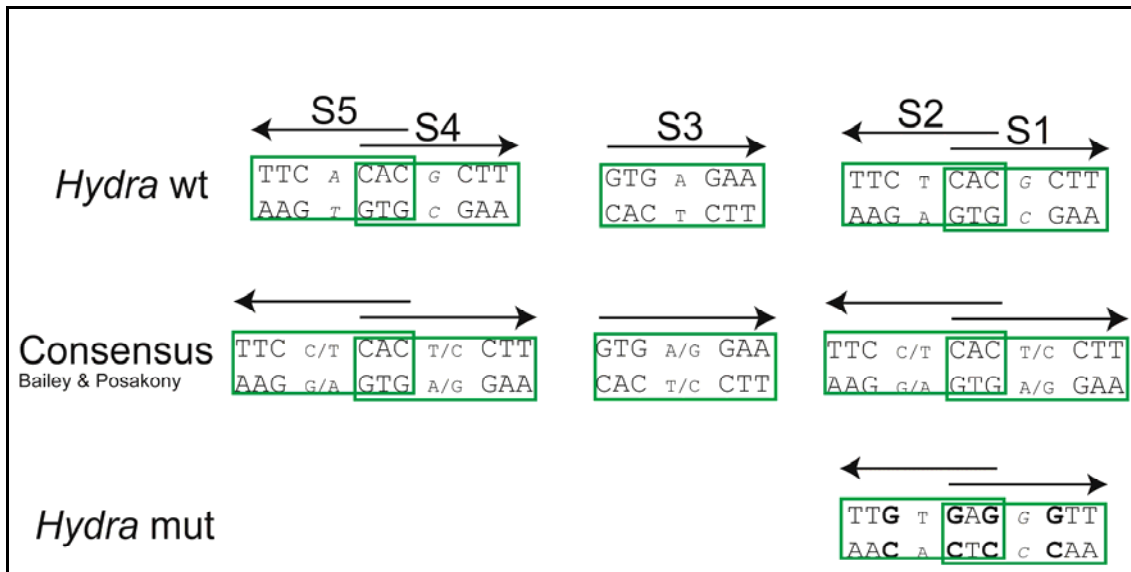


als Klasse C bezeichneten Untergruppe sind transkriptionsreprimierende Elemente mit den Konsensussequenzen CACNAG bzw. CACGNG. An den Positionen -119 und -250 liegt jeweils eine potentielle N-Box der Klasse C (siehe Abb. 3-2, rosa Kästchen). Da N- und E-Boxen in ihrer Sequenz überlappen, müssen die beiden Hexanukleotide an den Positionen -1077 und -1426 sowohl als E- als auch als N-Box angesehen werden (siehe Abb. 3-2, rosa/hellblaue Kästen).

Entscheidend für die Regulation durch eine aktive Notch-Signalübertragung sind Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren der CSL-Familie. Sie haben die Kern-Konsensussequenz GTGNGAA (N für ein beliebiges Nukleotid). Fünf potentielle CSL-Bindestellen konnten identifiziert werden. Sie liegen an den Positionen -202, -206, -2035, -2189 und -2193 (siehe Abb. 3-2, grüne Kästen, S1-S5). Die Bindestellen S1 und S2 bzw. S4 und S5 überlappen jeweils in drei Nukleotiden und sind antiparallel angeordnet (siehe Abb. 3-3). Bailey und Posakony (1995) hatten in den *E(spl)*-Genen von *Drosophila* beobachtet, dass es zwei verschiedene, gegenläufige Orientierungen von CSL-Bindestellen auf dem DNA *sense* Strang geben kann, die durch CSL-Faktoren gleichermaßen erkannt und gebunden werden. GTGNGAA und seine komplementäre Sequenz werden mit einem nach rechts weisenden Pfeil dargestellt, die reverse Sequenz AAGNGTG und sein Komplement mit einem Pfeil nach links. Für die fünf potentiellen CSL-Bindestellen im *HyHes*-Promotor ergibt sich daher das in Abb. 3-3 dargestellte Orientierungsmuster.



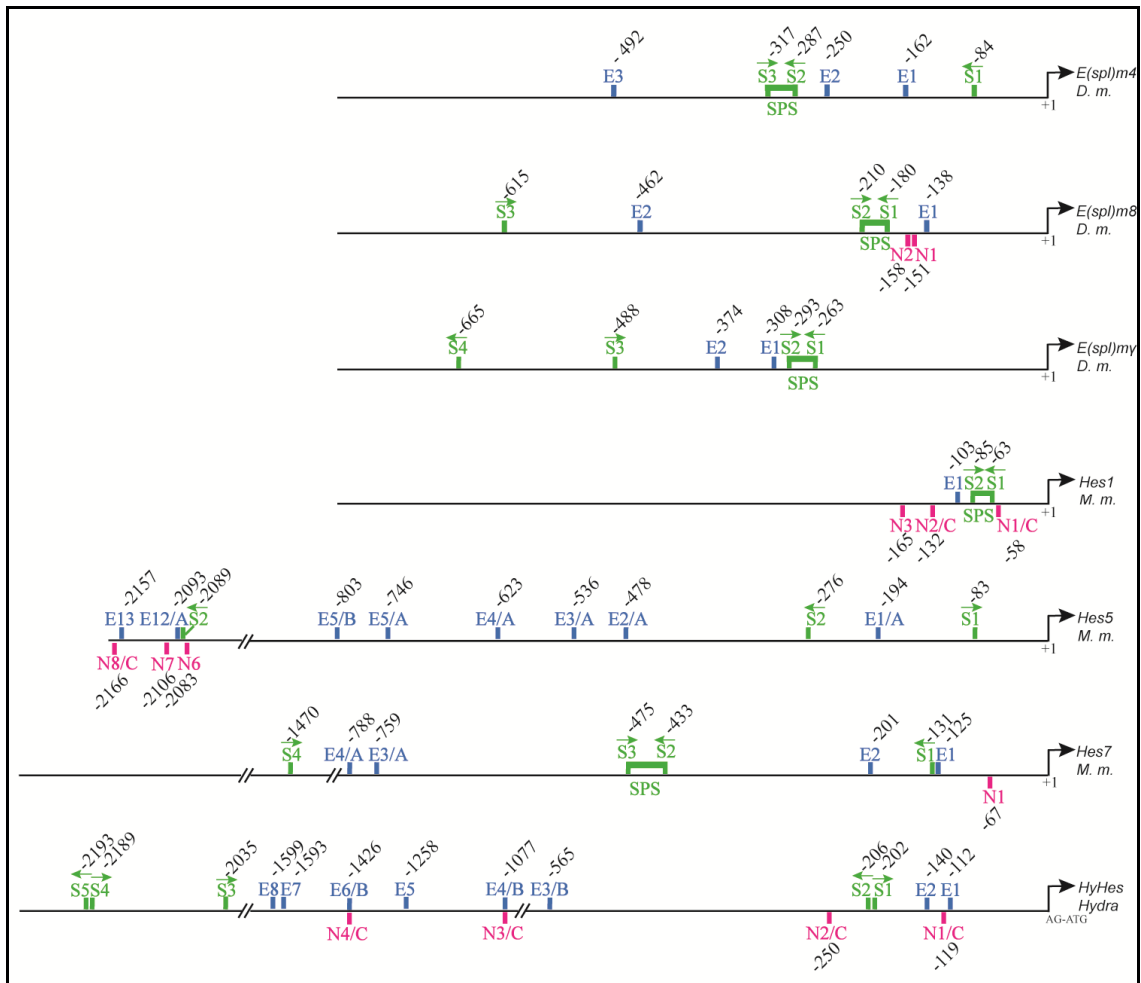
**Abb. 3-2:** Schematische Darstellung der identifizierten, *cis*-regulatorischen Sequenzen in der 2,2kb langen genomischen Region vor dem *Splice*-Akzeptordinukleotid AG der *HyHes*-mRNA; Die verschiedenen Elemente sind farbig dargestellt: TATA-Box (rot), CAAT-Box (orange), N-Box Klasse C (rosa), E-Box (dunkelblau), E-Box Klasse B (hellblau), CSL-Bindestellen (grün). CSL-Bindestellen sind mit S1-S5 nummeriert; Pfeile veranschaulichen die Orientierung der CSL-Bindestellen auf dem DNA *sense* Strang; Hoch-repetitiver Abschnitt als gestrichelte Linie.



**Abb. 3-3:** Analyse der Orientierung der fünf potentiellen *Hydra* Wildtyp (*Hydra* wt) CSL-Bindestellen S1 bis S5 des *HyHes*-Promotors im Vergleich zu den Su(H)-Bindestellen von *Drosophila* (Bailey und Posakony, 1995); Die Sequenzen der mutierten S1 und S2-Bindestellen sind unter „*Hydra* mut“ dargestellt (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Jede CSL-Bindestelle umfasst sieben Nukleotide und ist von einem grünen Rahmen umgeben; Die Pfeile zeigen die Orientierung der CSL-Bindestellen auf dem DNA sense Strang an.

Damit unterscheidet sich die Anordnung der CSL-Bindestellen im Promotor von *HyHes* deutlich von der, die man in E(spl)-Promotoren von *Drosophila* oder einigen *Hes*-Promotoren der Maus finden kann. Wie in Abb. 3-4 ersichtlich, kommen hier meist neben einzelnen CSL-Bindestellen variabler Orientierung zwei gepaarte CSL-Bindestellen vor (*SPS*, *Su(H) paired sites*), die genau 30bp auseinander liegen und zueinander antiparallel angeordnet sind (Bailey und Posakony, 1995; Nellesen *et al.*, 1999).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-4:** Vergleich der Promotorstrukturen ausgewählter *E(spl)*-Gene *m4*, *m8* und *my* von *Drosophila* (*D. m.*, *Drosophila melanogaster*), *Hes1*, 5 und 7 der Maus (*M. m.*, *mus musculus*) und *HyHes* von *Hydra*; Die verschiedenen Promotorelemente sind farbig dargestellt und abgekürzt: CSL-Bindestellen (S, grün), gepaarte CSL-Bindestellen (SPS, grün), E-Boxen (E, blau), Klasse B E-Boxen (E/B, blau), N-Boxen (N, rosa), Klasse C N-Box (N/C, rosa); Negative Zahlen entsprechen der Position der einzelnen Elemente aufwärts des Transkriptions-Startkodons ATG bzw. des *Splice*-Akzeptordinukleotids AG im Falle von *Hydra*; Pfeile über den CSL-Bindestellen zeigen ihre Orientierung auf dem DNA sense Strang; Doppel-Linien bei *Hes5* und 7 der Maus und bei *HyHes* stehen für längere, ausgelassene Nukleotidabschnitte.

### Der *HyHes*-Promotor kann durch HvNICD aktiviert werden

Um zu testen, ob die Expression von *HyHes* unter der Kontrolle von HvNICD und damit des Notch-Signalweges steht, wurden die ersten 600bp genomischer Sequenz aufwärts der *Splice*-Akzeptorsequenz des *HyHes*-Gens, die die beiden potentiellen CSL-Bindestellen S1 und S2 enthalten, in den HoTG-Vektor vor EGFP anstelle des Aktinpromotors kloniert (Böttger *et al.*, 2002). In diesem Reporterplasmid steht damit die Expression von EGFP unter der Kontrolle des *HyHes*-Promotors (siehe Abb. 3-5A, HePG(reen)). Dieses Konstrukt wurde zunächst zusammen mit HoTRed, einem Vektor, in dem mRFPmars ausgehend vom Aktinpromotor exprimiert wird, durch biolistische Transformation in Hydren eingebracht. Transformierte Zellen konnten durch die Expression von mRFPmars identifiziert werden, zeigten aber gleichzeitig niemals eine EGFP-Expression (siehe Abb. 3-5A, HoTRed und Abb. 3-5B-E). Durchschnittlich konnten hierbei pro beschossenem Tier 3-4 transformierte Zellen detektiert werden. Anschließend wurden HvNICD und das konstitutiv aktive N<sup>ΔE</sup> (Notch ohne seine extrazelluläre Domäne, Käsbauer *et al.*, 2007) jeweils in den HoTG-Vektor anstelle von EGFP kloniert (siehe Abb. 3-5A, HoTHvNICD bzw. HoTHvN<sup>ΔE</sup>). HvNICD und N<sup>ΔE</sup> werden hierbei ohne fluoreszierenden Marker ausgehend vom Aktinpromotor überexprimiert. Wurden Hydren jeweils mit einer Kombination aus HePG und HoTHvNICD bzw. HoTHvN<sup>ΔE</sup> cotransformiert, konnte eine EGFP-Expression beobachtet werden (Abb. 3-5F-I und J-M). In beiden Fällen konnte in transformierten Zellen durch eine Färbung mit dem spezifischen anti-Notch-Antikörper die HvNICD im Kern nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-5G, K).

Anschließend wurde ein modifiziertes *HesP*-Plasmid, HeP<sup>S2/1mut</sup>G(reen) kreiert (siehe Abb. 3-3, *Hydra* mut und Abb. 5A, HeP<sup>S2/1mut</sup>G). In diesem wurden die Sequenzen beider CSL-Bindestellen S1 und S2 von TTCTCAGCTT zu TTGTGAGGGTT mutiert (siehe Abb. 3-3, *Hydra* mut). In Hydren, die mit einer Kombination aus HeP<sup>S2/1mut</sup>G und HoTHvNICD cotransformiert wurden, konnte keine Expression von EGFP mehr beobachtet werden, obwohl durch eine anti-

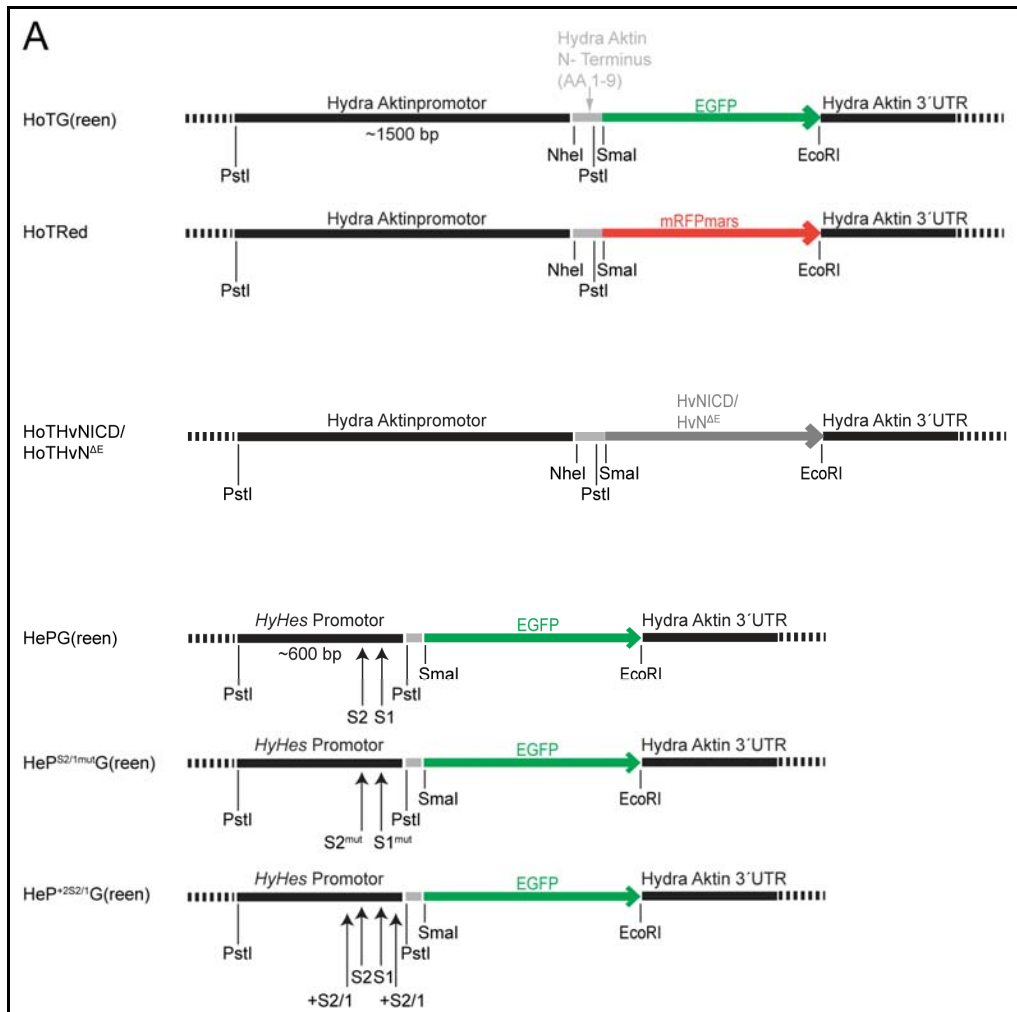
### 3 Ergebnisse

---

HvNotch-Antikörperfärbung HvNICD im Kern detektiert werden konnte (siehe Abb. 3-5V-Y).

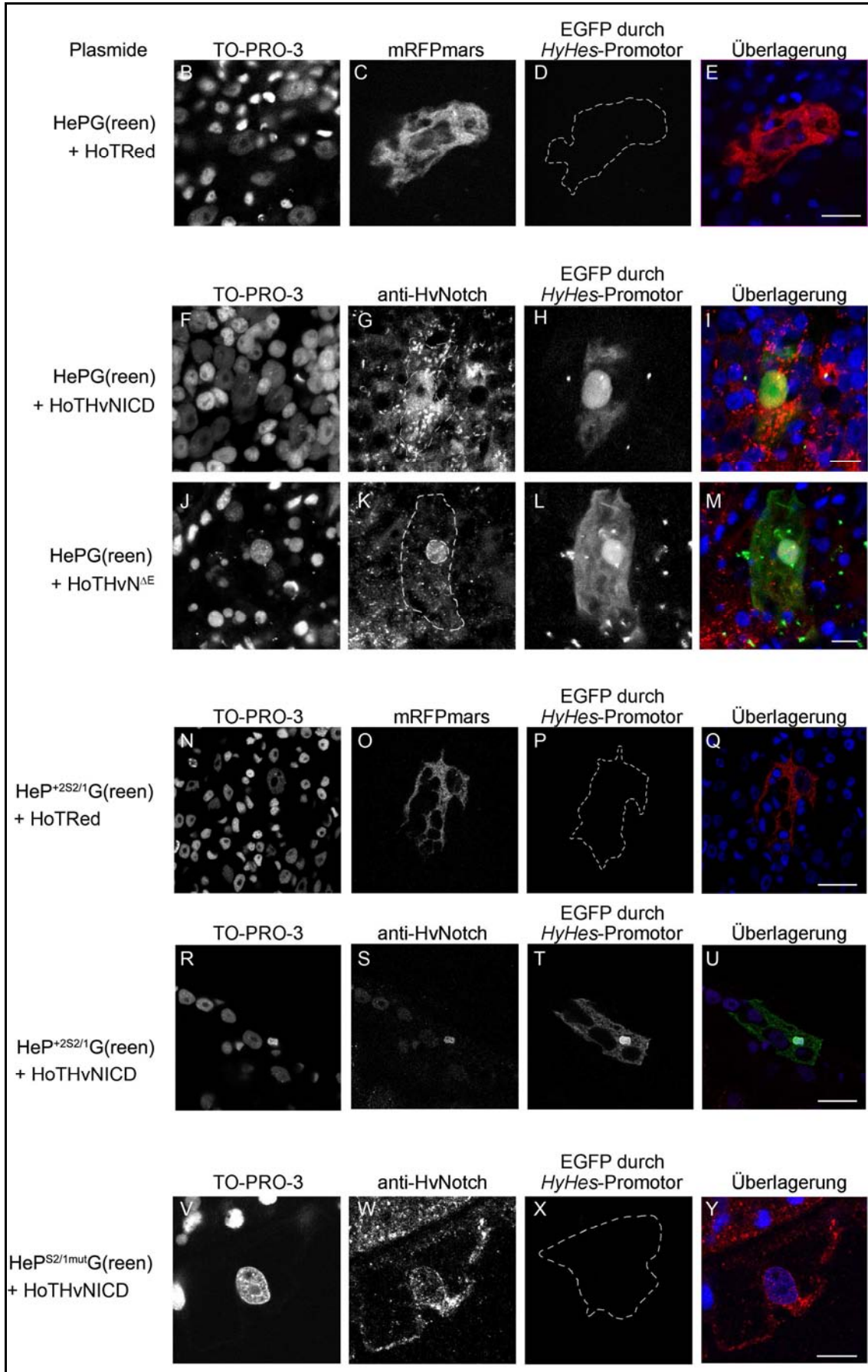
In einem weiteren Plasmid, HeP<sup>+2S2/1</sup>G(reen), wurden zwei zusätzliche, jeweils überlappende Su(H)-Bindestellen, die den Bindestellen S1 und S2 mit der Sequenz TTCTCACGCTT entsprachen, vor und nach diesen in einem Abstand von 30-40bp eingefügt (siehe Abb. 3-5A, HeP<sup>+2S2/1</sup>G). Wenn dieses Plasmid zusammen mit HoTRed durch biolistische Transformation in Hydren eingebracht wurde, so konnte zwar die Expression von mRFPmars detektiert werden, niemals jedoch eine EGFP-Expression (siehe Abb. 3-5N-Q). Nach einer Cotransformation mit HoTHvNICD wurde EGFP exprimiert (siehe Abb. 3-5R-U). Auch hier gelang es mit dem spezifischen anti-HvNotch-Antikörper HvNICD im Kern nachzuweisen (siehe Abb. 3-5S). Im Vergleich mit dem Plasmid HePG(reen) konnten dabei erheblich mehr EGFP-exprimierende Zellen detektiert werden. Die Anzahl der vorhandenen Su(H)-Bindestellen erhöht also scheinbar die Antwort des Promotors auf den aktiven Notch-Signalweg in Form von überexprimiertem HvNICD.

Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass *HyHes* ein primäres Zielgen für den Hydra Notch-Rezeptor HvNotch darstellt. Deshalb wurde im Folgenden seine Verteilung in Hydren, insbesondere in Knospenden, untersucht. Dies erfolgte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene.



**Abb. 3-5:** *In vivo*-Reporterassay zur Untersuchung der Kontrolle des *HyHes*-Promotors durch den Notch-Signalweg; (A) Schematische Darstellung aller Plasmide, die für die biologische Transformation von einzelnen Hydrazellen kloniert und verwendet wurden; Name der verschiedenen Konstrukte jeweils auf der linken Seite.

### 3 Ergebnisse



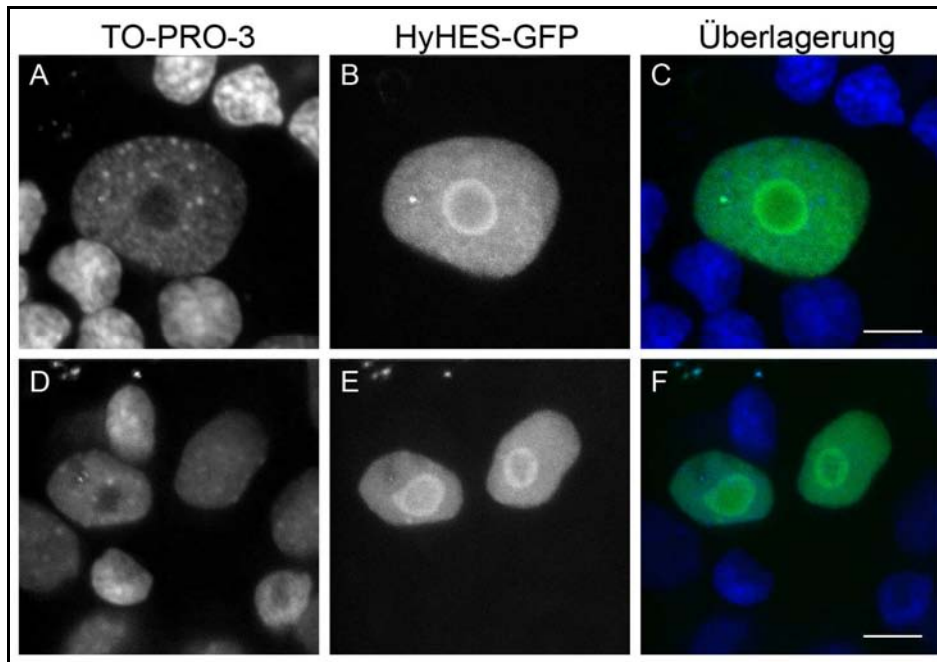


**Abb. 3-5-Fortsetzung:** *In vivo*-Reporterassay zur Untersuchung der Kontrolle des *HyHes*-Promotors durch den Notch-Signalweg; (B-E) Cotransformation von HePG mit HoTRed; (F-I) Co-Transformation von HePG und HoTHvNICD; (J-M) Cotransformation von HePG und HoTHvN<sup>ΔE</sup>; (N-Q) Co-Transformation von HeP<sup>+2S2/1</sup>G und HoTRed; (R-U) Cotransformation von HeP<sup>+2S2/1</sup>G und HoTHvNICD; (V-Y) Cotransformation von HeP<sup>mut</sup>G und HoTHvNICD; (B, F, J, N, R, V) TO-PRO-3; (C, O) mRFPmars; (G, K, S, W) anti-HvNotch-Antikörperfärbung; (D, H, L, P, T, X) EGFP unter der Kontrolle des *HyHes*-Promotors; (E, I, M, Q, U, Y) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA-Färbung mit TO-PRO-3 (blau), mRFPmars bzw. anti-HvNotch-Antikörperfärbung (rot), EGFP (grün); Confokale Projektionen, Maßstab 12 μm.

### 3.1.2.2 Das HyHES-Protein ist in ekto- und endodermalen Epithelzellen sowie in interstitiellen Stammzellen lokalisiert

Für die Untersuchung der Lokalisation und Verteilung des HyHES-Proteins wurden HyHES-GFP-Fusionen sowie zwei anti-HyHES-Antikörper hergestellt.

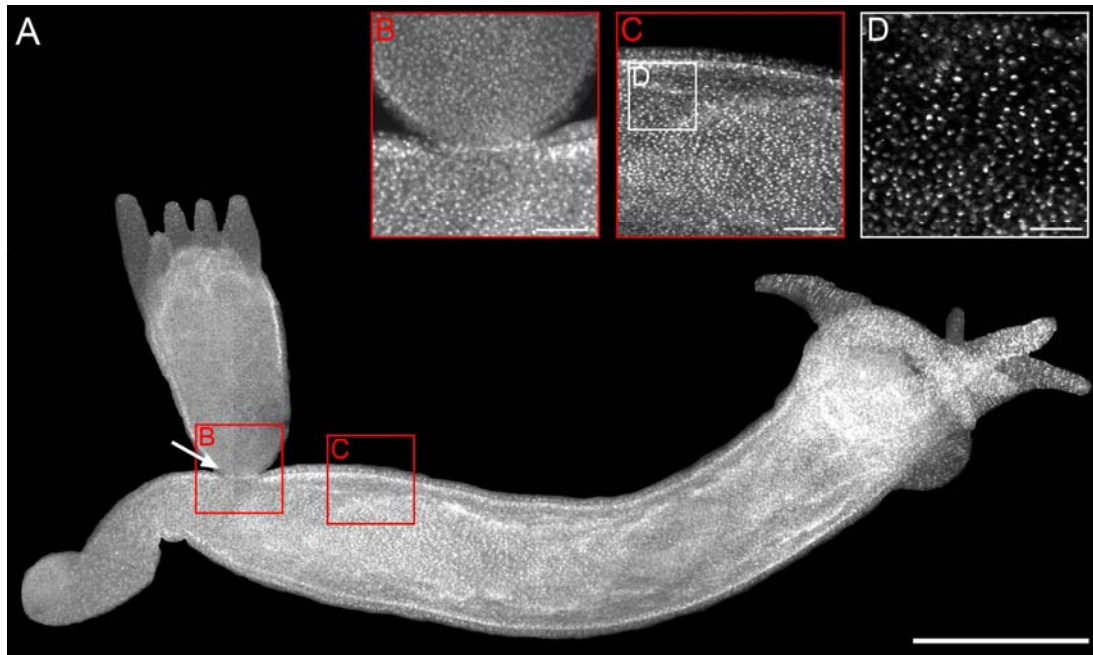
Abbildung 6 zeigt, dass HyHES-GFP in transformierten und fixierten Zellen unabhängig vom Zelltyp hauptsächlich im Nukleoplasma lokalisiert ist, wie man es für einen Transkriptionsfaktor erwartet. Eine Anreicherung ist um den Nukleolus herum zu beobachten (siehe Abb. 3-6B, E).



**Abb. 3-6:** Überexpression von HyHES-GFP in verschiedenen Zelltypen; (A-C) Überexpression in einer Epithelzelle (D-F) Überexpression in einem I-Zellpärchen; (A, D) DNA-Färbung mit TO-PRO-3; (B, E) HyHES-GFP; (C, F) Überlagerung beider Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), HyHES (grün); Confokale Schnitte fixierter Tiere; Maßstab: 5  $\mu$ m.

Für die Untersuchung von endogenem HyHES wurden zwei verschiedene anti-HES-Antikörper durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH hergestellt: ein Peptidantikörper in Kaninchen und ein zweiter Antikörper in Hühnchen. Ihre vollständige Charakterisierung (Sensitivität, Spezifität und Test auf Kreuzreaktion und Erkennung des endogenen HyHES-Proteins) ist im Anhang unter 7.4 und 7.5 beschrieben.

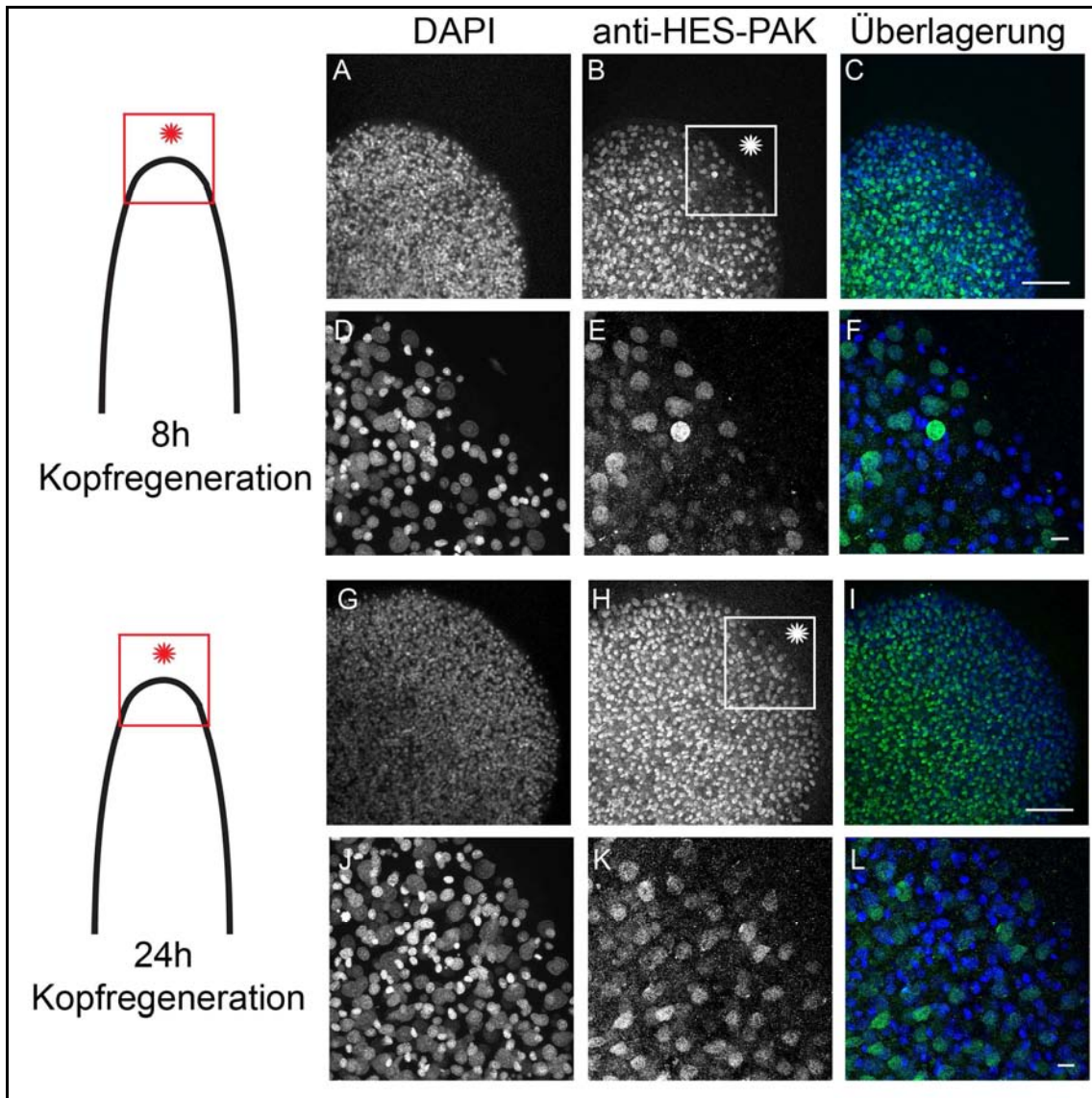
In Immunfluoreszenzfärbungen ganzer Tiere wurde letztlich nur der spezifische anti-HES-Peptidantikörper (anti-HES-PAK) eingesetzt, da er eine geringere Hintergrundfärbung zeigte. Mit seiner Hilfe konnte endogenes HyHES in Zellkernen im gesamten Tier nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-7). An der Knospbasis von Knospen in Stadium 8 wurde eine leicht erhöhte Kernfärbung in ektodermalen Epithelzellen detektiert (siehe Abb. 3-7A (weißer Pfeil), B). Eine deutlich schwächere Färbung als im Rumpf war in den Tentakeln von Knospen und adulter Tiere zu beobachten (siehe Abb. 3-7A).



**Abb. 3-7:** Immunfluoreszenzfärbung einer knospenden *Hydra* (Stadium 8) mit dem anti-HES-Peptidantikörper; Aufnahme am Fluoreszenzbinokular (A) Übersicht; (B) Vergrößerung der Knospenbasis; (C) Vergrößerung eines Ausschnittes der Rumpfregion; (D) Vergrößerung eines Ausschnittes aus C; Maßstab: (A) 1mm, (B und D) 40µm, (C) 80µm.

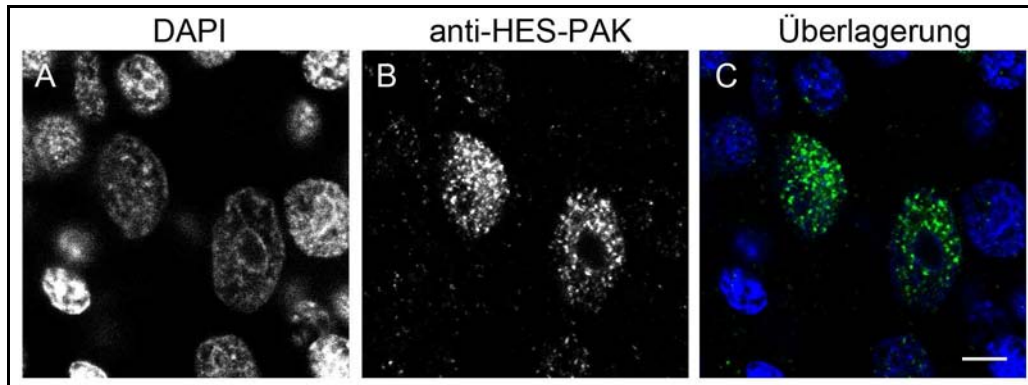
Immunfluoreszenz-Färbungen von unbehandelten Kopfreparaturorganen, die direkt unterhalb des Tentakelkranzes (75% Körperlänge) dekapitiert wurden, zeigten nach 8 und 24 Stunden Regenerationszeit mit dem anti-HES-Peptidantikörper ebenfalls eine gleichmäßige Kernfärbung im gesamten Regenerat. Eine veränderte Expression in den Kernen der apikalen, regenerierenden Kappe konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 3-8). In einigen Kopfreparaturorganen zeigte nach 8 Stunden jedoch eine einzelne, im Zentrum der apikalen Kappe liegende Zelle, eine sehr stark erhöhte Kernfärbung (siehe Abb. 3-8B, E).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-8:** Immunfluoreszenzfärbungen von unbehandelten 8 und 24 Stunden Kopfreparaturorganen mit dem anti-HES-Peptidantikörper; Links: Schematische Darstellung eines Kopfreparaturorganes mit 8 bzw. 24 Stunden Regenerationszeit; zukünftige Hypostomregion mit Stern markiert; (A-F) 8 Stunden Kopfreparaturorgan; (G-L) 24 Stunden Kopfreparaturorgan; (A, D, G, J) DNA-Färbung mit DAPI; (B, E, H, K) anti-HES-PAK-Färbung; (C, F, I, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-HES-PAK-Färbung (grün); Confokale Schnitte; Maßstäbe: (A-C, G-I): 100µm, (D-F, J-L): 10µm.

Bei höheren Vergrößerungen ist zu erkennen, dass in den einzelnen Kernen eine punktförmige Färbung vorliegt, wie sie häufig für Transkriptionsfaktoren gefunden wird (siehe Abb. 3-9).



**Abb. 3-9:** Immunfluoreszenzfärbung ganzer Tiere mit dem anti-HES-Peptidantikörper; (A) DNA-Färbung mit DAPI; (B) anti-HES-PAK-Färbung; (C) Überlagerung in Falschfarben: DNA (blau), anti-HES-PAK-Färbung (grün); Confokale Schnitte; Maßstab: 5µm.

Anschließend wurden Färbungen ekto- und endodermaler transgener Tiere angefertigt. Dabei wurde deutlich, dass die Epithelzellkerne beider Schichten gleichermaßen stark gefärbt sind (siehe Anhang Abb. 7-3; Wittlieb *et al.*, 2006). Co-Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen das I-zellspezifische Protein HyZIC und Färbungen transgener I-Zelllinien-Tiere zeigten, dass endogenes HyHES auch in den Kernen einfacher und doppelter I-Zellen, allerdings schwächer als in Epithelzellkernen zu finden ist (siehe Anhang Abb. 7-4; Prexl *et al.*, 2011; Wittlieb *et al.*, 2006). In Nematoblasten, reifen Kapseln und Nervenzellen konnte HyHES nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang Abb. 7-4 und Abb. 7-5). Endogenes HyHES ist damit zusammenfassend in allen ekto- und endodermalen Epithelzellen und in den Stammzellen der I-Zelllinie exprimiert. Eine leicht verstärkte Expression konnte an der Basis von Knospen in Stadium 8 und eine schwächere in den Tentakeln des adulten Tieren und der Knospe festgestellt werden.

### 3.1.2.3 *HyHes* wird während der Knospung in Stadium 8 exprimiert

Im Anschluss wurde das Expressionsmuster von *HyHes* auf mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierungsexperimenten an knospenden Tieren in den einzelnen Knospenstadien gemäß Otto und Campbell im Detail untersucht (Otto und Campbell, 1977). *HyHes* wird prinzipiell im gesamten Tier auf niedrigem Niveau exprimiert.

In den frühen Knospenstadien 1 bis 7 konnte keine spezifische Expression an der Basis der Knospen detektiert werden (siehe Abb. 3-10A). Erst ab Stadium 8, ab dem die Knospenbasis sich einzuschnüren beginnt, ist eine stark erhöhte Expression auf der Seite der Knospe unmittelbar an das Muttertier angrenzend zu beobachten. Sie ist auf einen schmalen Ring ektodermaler Zellen, der die Knospenbasis vollständig umschließt, beschränkt (siehe Abb. 3-10B, C). Diese Expression ist jedoch nur transient und auf dieses spezifische Knospenstadium 8 begrenzt. Ab Stadium 9, wenn die Knospe mit der Ausbildung fußspezifischer Zellen beginnt, verschwindet das Signal wieder (siehe Abb. 3-10D). Dies wurde im Folgenden durch einen Vergleich der *HyHes*-Expression mit der in Stadium 8 erscheinenden Expression von *MMP-A3* und der in Stadium 9 beginnenden Expression fußspezifischer Marker bestätigt (Münder *et al.*, 2011).

### In Stadium 8 wird neben *HyHes* eine Matrix-Metalloprotease *MMP-A3* exprimiert

Die Einschnürung der Knospenbasis und die Differenzierung von Fußzellen während der späten Knospung sind die morphologisch sichtbaren und kritischen Veränderungen, die zeitlich und strukturell durch die zu dieser Zeit aktiven Signalwege reguliert werden müssen. Während der kontinuierlich voranschreitenden Einschnürung der Knospenbasis wird die Verbindung zwischen Muttertier und Knospe ständig verkleinert. Dies erfordert die Umordnung von Epithelzellen und die regionale Umgestaltung der zugrundeliegenden extrazellulären Matrix (ECM), der Mesoglea. Es konnte in verschiedenen Organismen

gezeigt werden, dass an der Umgestaltung der ECM Matrix-Metalloproteasen (MMPs) beteiligt sein können.

Eine solche Matrix-Metalloprotease namens MMP-A3 wurde durch R. Aufschnaiter im Hydragenom identifiziert und aus cDNA kloniert. Sie weist mit einem Propeptid mit „Cystein-switch“, einer katalytischen Domäne mit konserviertem Zinkbindungsmotiv und einer Hemopexin-Domäne alle typischen und für eine MMP notwendigen, konservierten Domänen auf. Sie besitzt mit 52% eine hohe Sequenzidentität zur bereits charakterisierten HMMP in *Hydra* (siehe Anhang Abb. 7-6; Leontovich *et al.*, 2000). Sie wird spezifisch an der Knospbasis exakt gleichzeitig mit einsetzender Einschnürung exprimiert (siehe Abb. 3-10Q-T, Münden *et al.*, 2010). Anders als *HyHes*, aber genau wie der FGF-Rezeptor *kringelchen* ist sie dann durchgängig bis zum letzten Knospstadium 10 exprimiert (siehe Abb. 3-10D, H, T; Münden *et al.*, 2010; Sudhop *et al.*, 2004).

### ***HyHes* wird nach dem Auftreten fußspezifischer Marker nicht mehr exprimiert**

Durch den Vergleich der *HyHes*-Expression mit der des fußspezifischen Gens *PPOD-1* und dem Nachweis fußzellspezifischer Peroxidase-Aktivität konnte bestätigt werden, dass *HyHes* ab Stadium 9 nicht mehr an der Knospbasis exprimiert wird (siehe Abb. 3-10U-Zb, Hoffmeister und Schaller, 1985; Hoffmeister-Ullerich *et al.*, 2002; Pauly *et al.*, 2003). Die Expression von *PPOD-1* und die Aktivität der Peroxidase dienen als Marker für die Präsenz terminal differenzierter, ektodermaler Epithelzellen der Basalscheibe. Die Peroxidase ist dabei in mukösen Granula enthalten und ihre Aktivität kann durch eine Farbreaktion als schwarz-braunes Endprodukt sichtbar gemacht werden.

Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass das primäre HvNotch-Zielgen *HyHes* an der Grenze zwischen Muttertier und Knospe im Knospungsstadium 8, in dem es zur Einschnürung der Knospbasis kommt, gleichzeitig mit der Mat-

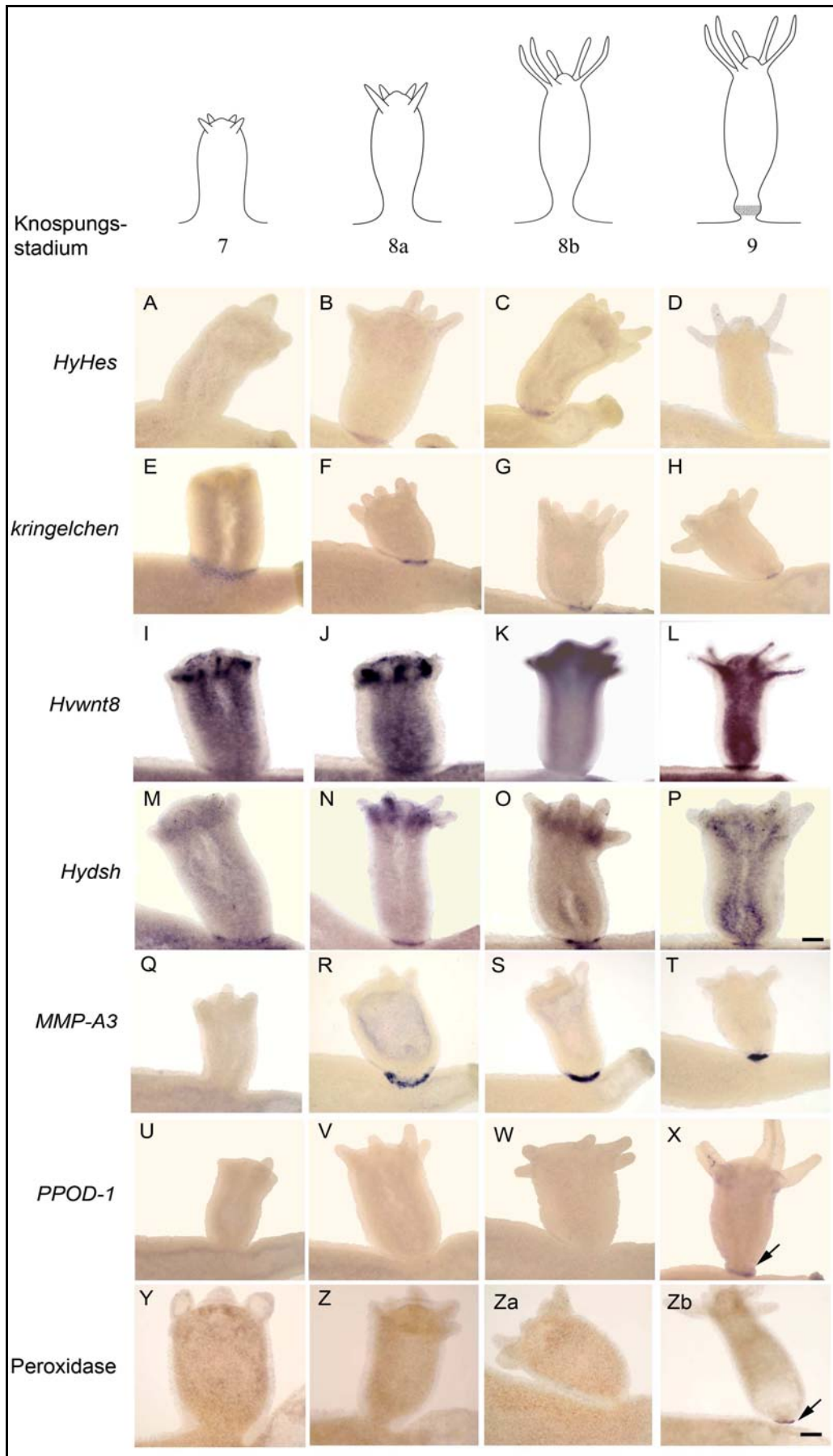
rix-Metalloprotease *MMP-A3* und vor dem Erscheinen fußspezifischer Gene wie *PPOD-1* transient exprimiert wird.

#### **Auch Gene des FGF/FGFR- und Wnt-Signalweges werden während der Knospung exprimiert**

Verschiedene Gene weiterer Signalwege, z.B. des FGF/FGFR- und des Wnt-Signalweges werden ebenfalls an der Knospbasis exprimiert (siehe Abschnitt 2.4.2.2; Sudhop *et al.*, 2004; Philipp *et al.*, 2009). Im Folgenden wurden für diese Gene *in situ*-Hybridisierungen an knospenden Tieren in den Stadien 7 bis 9 parallel angefertigt und verglichen (siehe Abb. 3-10A-P). Sie werden alle weit vor Einschnürung der Knospbasis, ungefähr ab Stadium 5, an der Basis der Knospen ringförmig exprimiert (siehe Abb. 3-10E, I, M). Sie bleiben auch nach Stadium 8 bis hin zur Abspaltung der Knospen exprimiert (siehe Abb. 3-10H, L, P). Auffällig ist außerdem, dass sie jeweils vor dem Einschnürungsstadium 8 an der Knospbasis in einem relativ breiten Streifen exprimiert werden (siehe Abb. 3-10E, I, M). Dieser breite Expressionsbereich wird dann ab Stadium 8 auf einen relativ schmalen, scharf abgrenzbaren Streifen begrenzt (siehe Abb. 3-10F, G, J, K, N, O).

**Abb. 3-10:** *In situ*-Hybridisierungen knospender Tiere in den Stadien 7 bis 9 (gemäß Otto und Campbell) für *HyHes*, *kringelchen*, *Hvwnt8*, *Hydsh*, *MMP-A3*, *PPOD-1* und Peroxidase-Färbung; Obere Reihe: schematische Darstellung der vier verschiedenen Knospstadien; schraffierter Bereich bei Knospstadium 9 markiert die Region sich differenzierender fußspezifischer Zellen; (A-D) *in situ*-Hybridisierung für *HyHes*; (E-H) *in situ*-Hybridisierung für *kringelchen*; (I-L) *in situ*-Hybridisierung für *Hvwnt8*; (M-P) *in situ*-Hybridisierung für *Hydsh*; (Q-T) *in situ*-Hybridisierung für *MMP-A3*; (U-X) *in situ*-Hybridisierung für *PPOD-1*; (Y-Zb) Färbereaktion der Peroxidaseaktivität; Pfeile markieren *PPOD-1* bzw. Peroxidasefärbung in differenzierenden Fußzellen der Basalscheibe; BM-Purple wurde für die Färbereaktionen von *Hvwnt8* und *Hydsh* verwendet, sonst NBT/BCIP (blaue Signale); Maßstab 100µm.

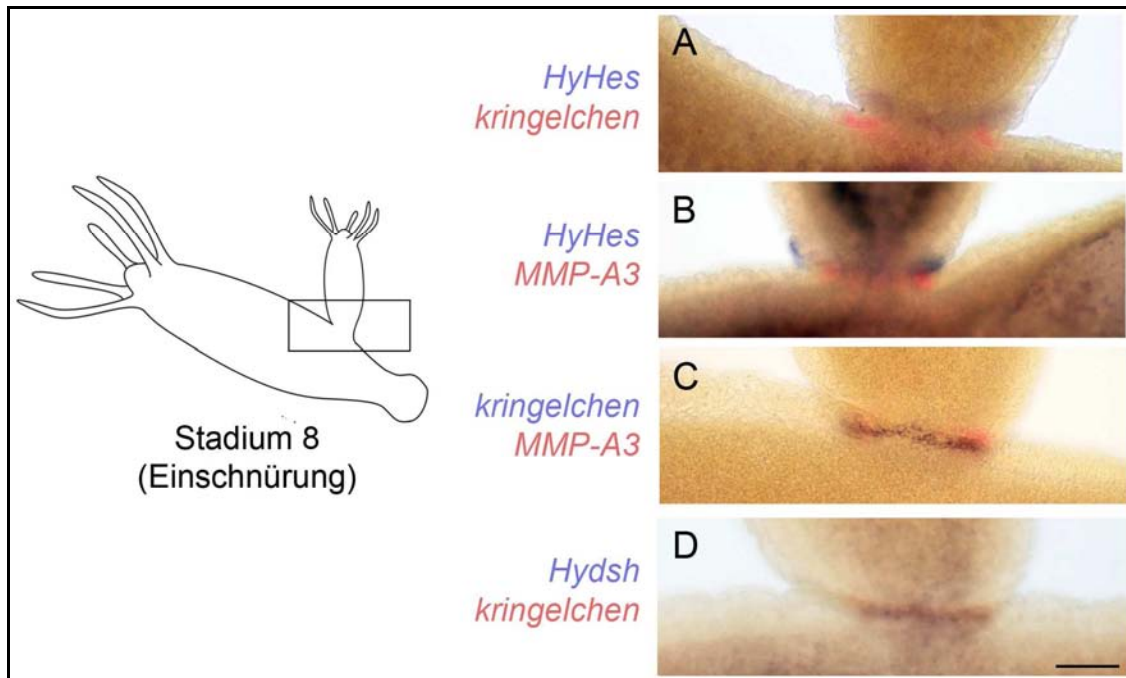




### 3.1.2.4 Relation der Genexpressionen von *HyHes*, *kringelchen*, *Hydsh* und *MMP-A3* im Knospungsstadium 8

Zum genauen Vergleich der Expression der beschriebenen Gene im Verhältnis zueinander, wurden im Folgenden Doppel-*in situ*-Hybridisierungsexperimente an Tieren im kritischen Knospungsstadium 8 durchgeführt (siehe Abb. 3-11). Anhand dieser wird deutlich, dass *HyHes* ringförmig im Ektoderm der Knospenbasis direkt neben parentalen *kringelchen* exprimierenden Zellen zu finden ist (siehe Abb. 3-11A). Eine Überlappung der beiden Expressionszonen konnte nie beobachtet werden. Auch *MMP-A3* und *Hydsh* werden benachbart zu *HyHes* exprimiert (siehe Abb. 3-11B). Folgerichtig wurde die Expression von *MMP-A3* und *kringelchen* bzw. von *Hydsh* und *kringelchen* in denselben Zellen detektiert (siehe Abb. 3-11C, D).

Die Grenze zwischen Knospe und Elterntier wird damit eindeutig durch die beiden benachbarten, sich gegenseitig ausschließenden Expressionsdomänen von *HyHes* einerseits und *kringelchen*, *MMP-A3* und *Hydsh* andererseits markiert.



**Abb. 3-11:** Doppel-*in situ*-Hybridisierungen an knospenden Tieren (Stadium 8) für verschiedene Kombinationen der Gene *HyHes*, *kringelchen*, *MMP-A3* und *Hydsh*; Oben: schematische Darstellung des Knospenstadiums 8 mit deutlicher Einschnürung der Knospenbasis (A) Doppel-*in situ*-Hybridisierung für *HyHes* (blau) und *kringelchen* (rot); (B) Doppel-*in situ*-Hybridisierung für *HyHes* (blau) und *MMP-A3* (rot); (C) Doppel-*in situ*-Hybridisierung für *kringelchen* (blau) und *MMP-A3* (rot); (D) Doppel-*in situ*-Hybridisierung für *Hydsh* (blau) und *kringelchen* (rot); Für die Färbereaktionen wurden NBT/BCIP (blaue Signale) und FastRed (rote Signale) verwendet; Maßstab: 100µm.

### 3.1.3 Die Hemmung des Notch-Signalweges hat einen Einfluss auf die Genexpression während der Knospung

Nachdem sich die Knospen DAPT-behandelter Tiere morphologisch nicht normal entwickeln konnten, sollten die Auswirkungen der Inhibierung des Notch-Signalweges auf die Genexpression während des Knospungsprozesses untersucht werden. Hierfür wurden knospende Tiere in den Stadien 3 bis 5 für 48 Stunden mit DAPT behandelt und in *in situ*-Hybridisierungen für *HyHes*, *MMP-A3*, *kringelchen* und *Hydsh* eingesetzt. Entsprechende Kontrolltiere, die mit 1% DMSO behandelt wurden, befanden sich nach diesen 48 Stunden genau in

### 3 Ergebnisse

---

Knospungsstadium 8. Sie zeigten deutlich die bereits beschriebene *HyHes*-Expression an der eingeschnürten Knospenbasis und einen schmalen Expressionsstreifen für *kringelchen* und *Hydsh* (siehe Abb. 3-12A, E, F). Auch die Matrix-Metalloprotease *MMP-A3* konnte an der Basis der Knospen detektiert werden (siehe Abb. 3-12B).

DAPT-behandelte Tiere hingegen zeigten keine derartige Einschnürung und keine Expression von *HyHes* (siehe Abb. 3-12C). Auch *MMP-A3* wurde nicht mehr exprimiert (siehe Abb. 3-12D). Damit scheint die Expression von *HyHes* und *MMP-A3* unter der Kontrolle des Notch-Signalweges zu stehen. Es ist möglich, dass dieses Ausbleiben der *MMP-A3*-Expression bei Hemmung des Notch-Signalweges die Prozesse der Einschnürung verhindert.

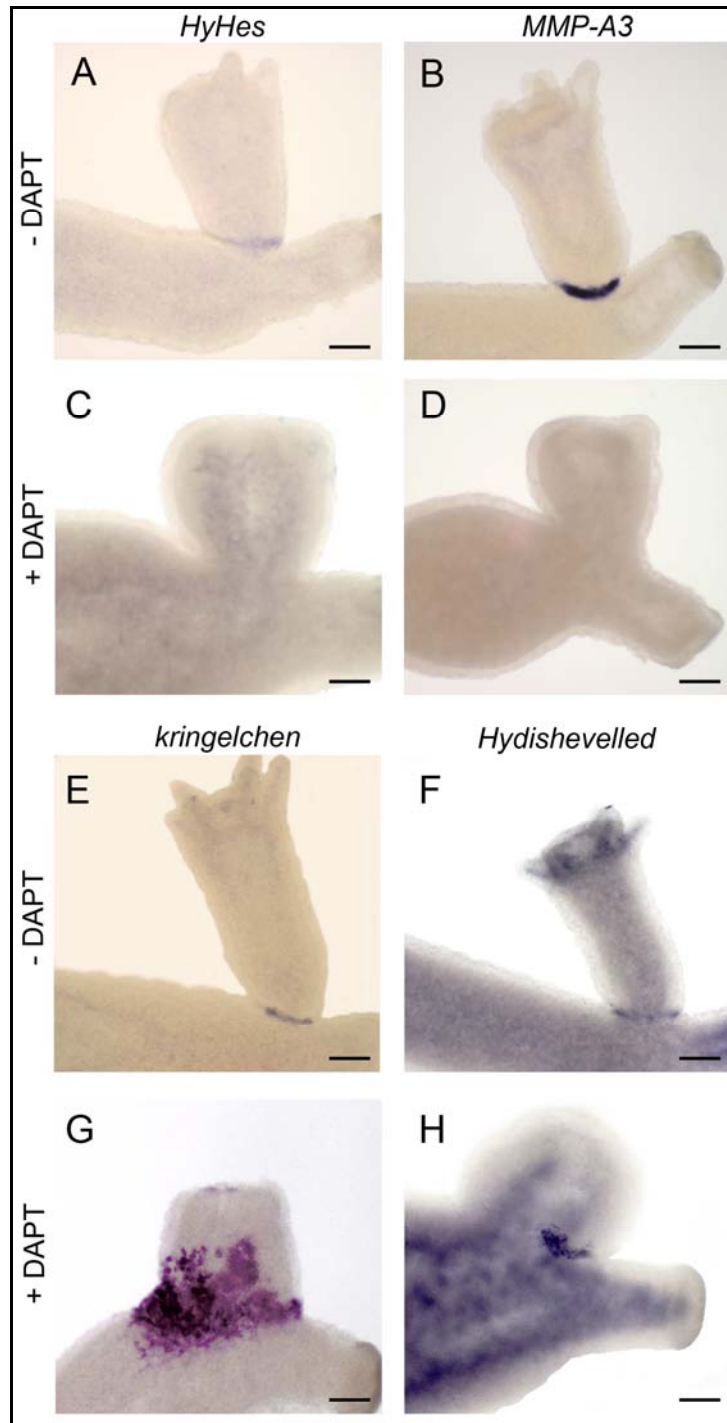
Im Falle von *kringelchen* und *Hydsh* war zu beobachten, dass beide zwar noch exprimiert wurden, allerdings in einem stark veränderten Expressionsmuster.

*Kringelchen*-positive Zellen traten im Muttertier und in der Knospe völlig diffus um die Knospenbasis verteilt auf (siehe Abb. 3-12G, Abb. 3-13C, D-E'' und Abb. 3-14A-C). Eine Beschränkung der Expression auf eine scharfe Bande wie sie in Kontrolltieren immer beobachtet werden kann, konnte nie detektiert werden. In sich entwickelnden Y-Tieren, die nach 48 stündiger DAPT-Behandlung wieder in Hydramedium transferiert wurden und an vier aufeinanderfolgenden Tagen für *in situ*-Hybridisierungsexperimente entnommen wurden, verliert sich zunehmend diese gestörte, diffuse *kringelchen*-Expression (siehe Abb. 3-14). Nach 48 stündiger DAPT-Behandlung ist zunächst das bereits beschriebene diffuse Expressionsmuster zu beobachten (siehe Abb. 3-14A-C). Im Verlauf von zwei Tagen zeigt etwa die Hälfte der Y-Tiere eine deutlich unregelmäßige und reduzierte Expression von *kringelchen* oder sogar keine Expression mehr. Nach insgesamt 4 Tagen, wenn die Y-Tiere vollständig und eindeutig entwickelt sind, ist in keinem Tier mehr eine *kringelchen*-Expression zu beobachten (siehe Abb. 3-14M-O). Diese Veränderung der FGFR-Expression ähnelt der, die nach Inhibition der FGFR-Signalweiterleitung durch SU5402-Behandlung in Y-Tieren beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.4, Sudhop *et al.*, 2004).

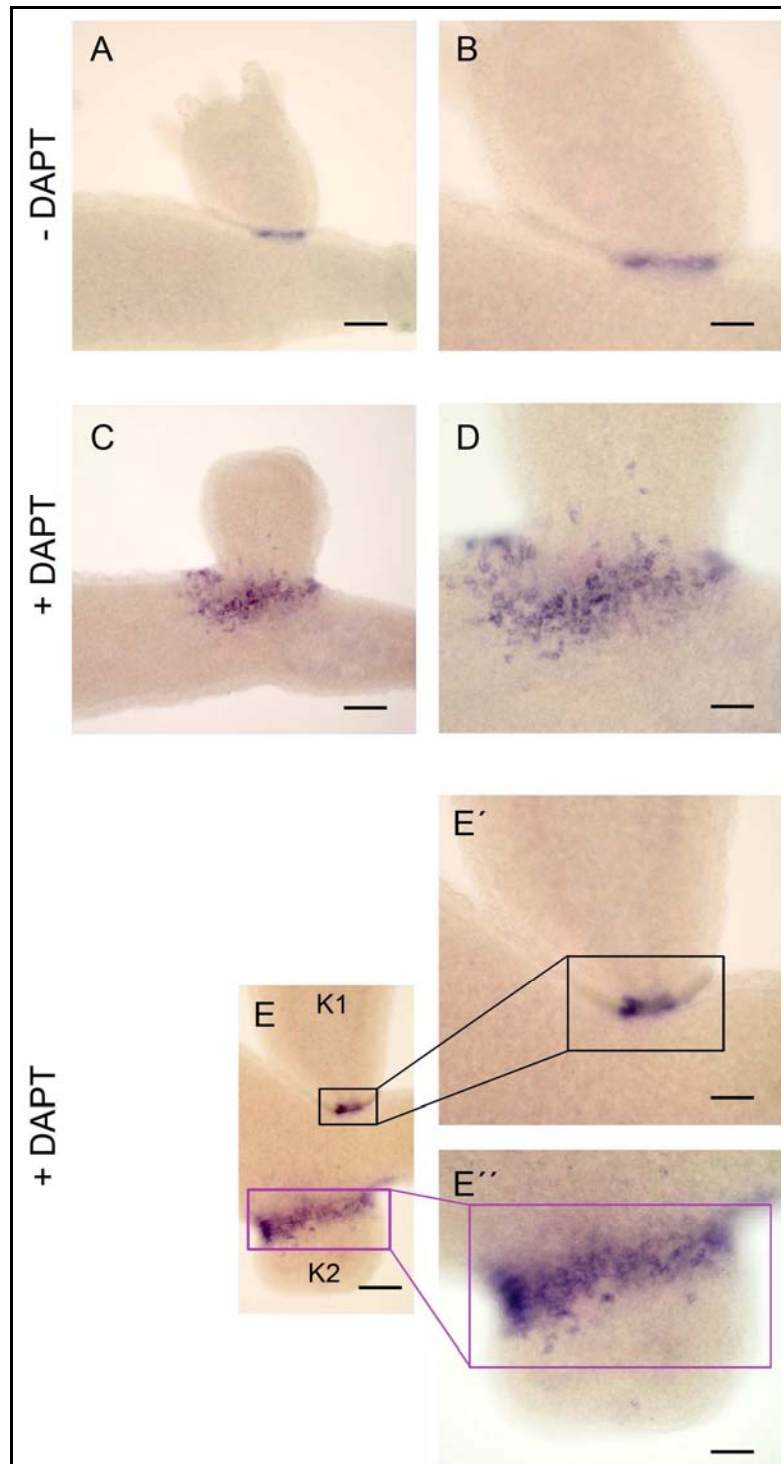
Auch die Expression von *Hydsh* war in 48 Stunden DAPT behandelten Tieren stark verändert. Wurde es noch exprimiert, so nicht mehr als ein die Knospenbasis umschließender Ring. Vielmehr war der Ring unterbrochen und nur wenige, diffus verteilte *Hydsh* exprimierende Zellen konnten an der Knospenbasis beobachtet werden (siehe Abb. 3-12H und Abb. 3-15C-H).

Insgesamt belegen diese Daten, dass eine Grenze, die zwischen Muttertier und Knospe durch die scharfen, benachbarten Expressionsbanden von *HyHes*, *kringelchen*, *Hydsh* und *Hvwnt8* charakterisiert ist, nach der Inhibierung des Notch-Signalweges nicht ausgebildet werden kann bzw. gestört ist.

Ein aktiver Notch-Signalweg scheint dabei für die Grenzausbildung in einem ganz spezifischen Zeitfenster während des späten Knospungsprozesses notwendig zu sein. Denn werden Tiere erst ab Knospungsstadium 7 mit DAPT inkubiert, so entwickeln sich die Knospen völlig normal, können sich einschnüren und auch vom Eltertier ablösen. In solchen späten DAPT-behandelten Knospen ist *kringelchen* völlig normal exprimiert (siehe Abb. 3-13E, E').

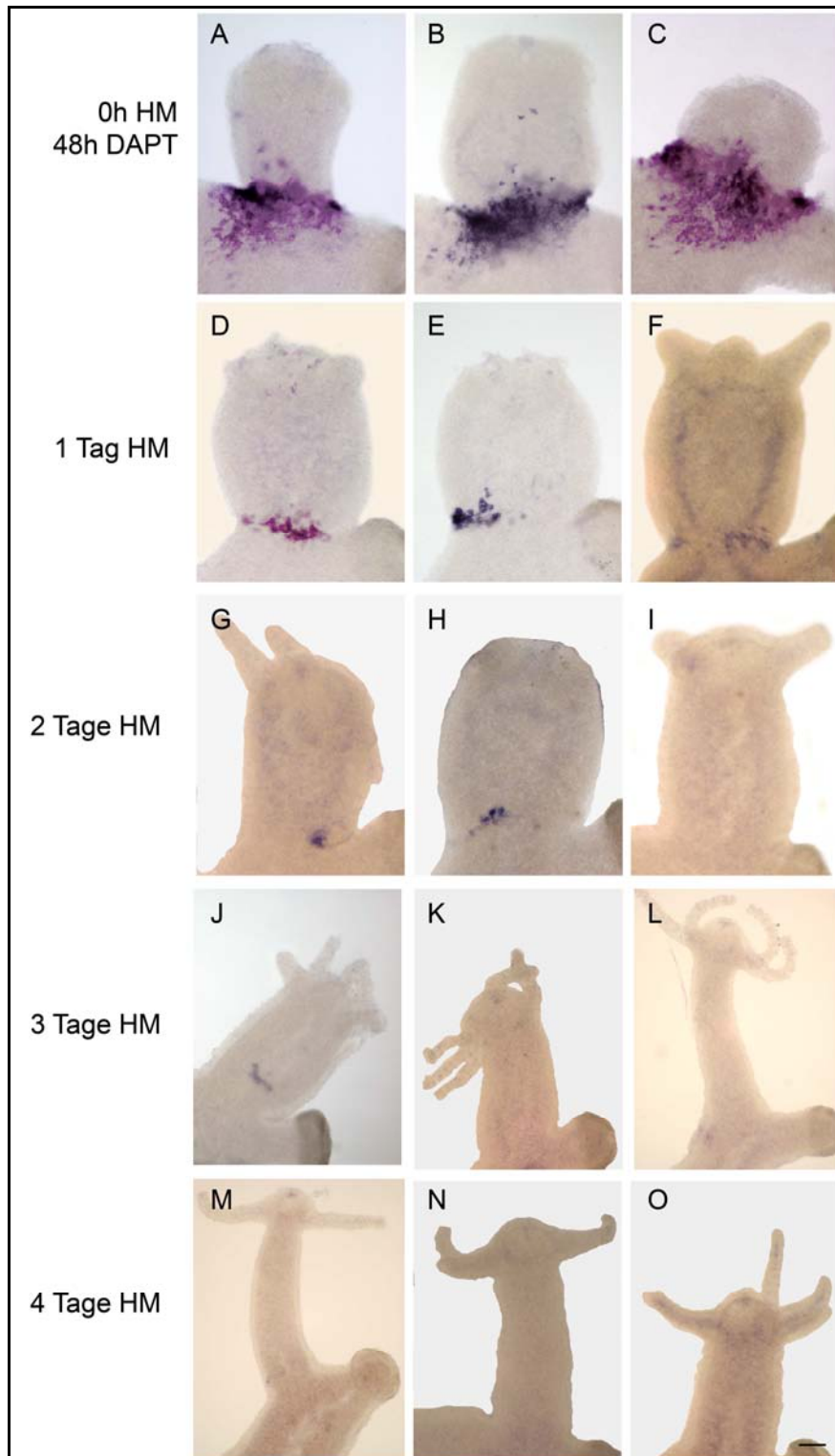


**Abb. 3-12:** *In situ*-Hybridisierungen für *HyHes*, *MMP-A3*, *kringelchen* und *Hydsh* an knospenden DMSO-Kontrolltieren und DAPT-behandelten Tieren; (A-B, E-F) DMSO-Kontrolltiere; (C-D, G-H) 48 Stunden DAPT-behandelte Tiere; (A, C) *In situ*-Hybridisierung für *HyHes*; (B, D) *In situ*-Hybridisierung für *MMP-A3*; (E, G) *In situ*-Hybridisierung für *kringelchen*; (F, H) *In situ*-Hybridisierung für *Hydsh*; Für die Färbereaktionen wurde NBT/BCIP verwendet (blaue Signale); Maßstab 100µm.



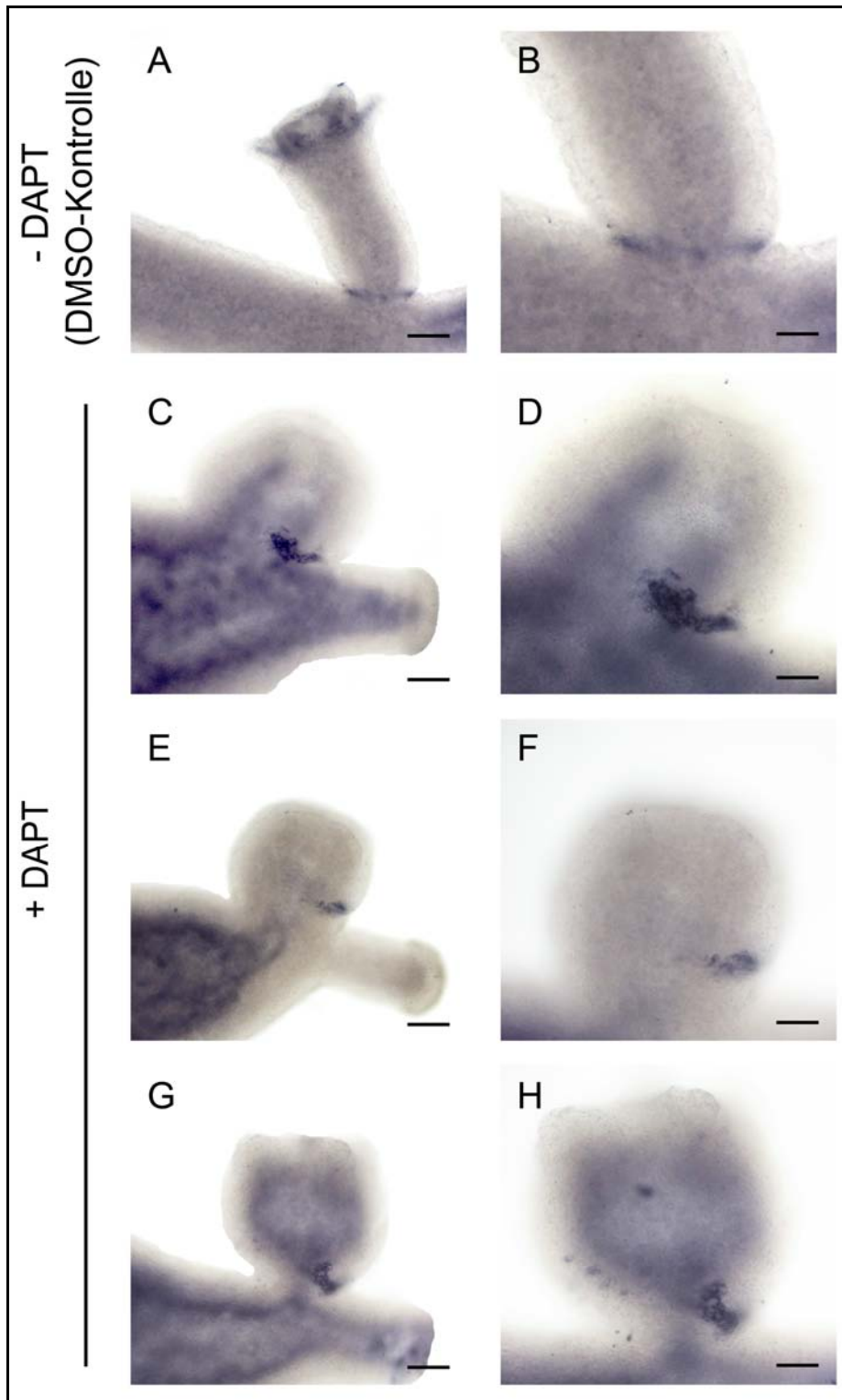
**Abb. 3-13:** *In situ*-Hybridisierung für *kringelchen* an DMSO-Kontrolltieren und 48 Stunden DAPT-behandelten Tieren; (A, B) Kontrolltier; (C-E'') DAPT-behandelte Tiere; (E) DAPT-behandeltes Tier mit zwei Knospen in unterschiedlichen Stadien K1 und K2; K1 befand sich bei Beginn der DAPT-Behandlung in Knospungsstadium 7, K2 in Stadium 3; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktionen verwendet (blaue Signale); Maßstäbe: (A, C, E) 100  $\mu$ m, (B, D, E', E'') 50  $\mu$ m.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-14:** *in situ*-Hybridisierungen an Y-Tieren nach 48 Stunden DAPT-Behandlung und nach 1, 2, 3 und 4 Tagen in Hydramedium für *kringelchen*; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktionen verwendet (blaue Signale); Maßstab: 50µm.





**Abb. 3-15:** *In situ*-Hybridisierung für *Hydsh* an Kontrolltieren und 48 Stunden DAPT-behandelten Tieren; (A, B) Kontrolltier; (C-H) drei verschiedene DAPT-behandelte Tiere; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktionen verwendet (blaue Signale); Maßstäbe: (A, C, E, G) 100 μm, (B, D, F, H) 50 μm.

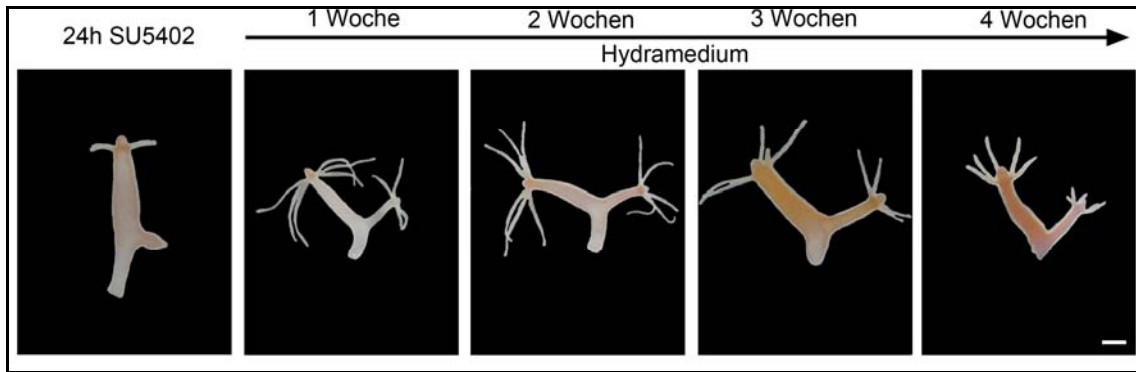
### 3.1.4 Interaktion des Notch-Signalweges mit dem FGF/FGFR-Signalweg während der Knospung

#### Hemmung des FGF/FGFR-Signalweges führt zur Inhibition der Abschnürung von Knospen

Sudhop *et al.* (2004) konnten zeigen, dass auch nach Inhibierung der Tyrosinkinase-Aktivität des FGF-Rezeptors in knospenden Tieren mit dem biochemischen Inhibitor SU5402 Y-Tiere entstehen. Der höchste Prozentsatz an Y-Tieren war analog zur DAPT-Behandlung zu beobachten, wenn Tiere in einem sehr frühen Knospungsstadium (Stadium 3-4) für 24 Stunden mit 10 $\mu$ M Inhibitor inkubiert wurden. Nur dann konnte die Einschnürung der Knospenbasis, die Fußbildung und Abspaltung der Knospen vom Muttertier verhindert werden. In solchen behandelten Y-Tieren war sieben Tage nach der Behandlung die ringförmige Expression von *kringelchen* an der Knospenbasis gestört oder blieb ganz aus (Sudhop *et al.*, 2004). Dies konnte auch nach DAPT-Behandlung beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.1.3).

Nicht untersucht wurde, wie sich die *kringelchen*-Expression direkt nach 24 stündiger SU5402-Behandlung verhält. Diese und die Expression von *MMP-A3* wurden deshalb im Folgenden in nur einen Tag mit SU5402-behandelten Tieren untersucht.

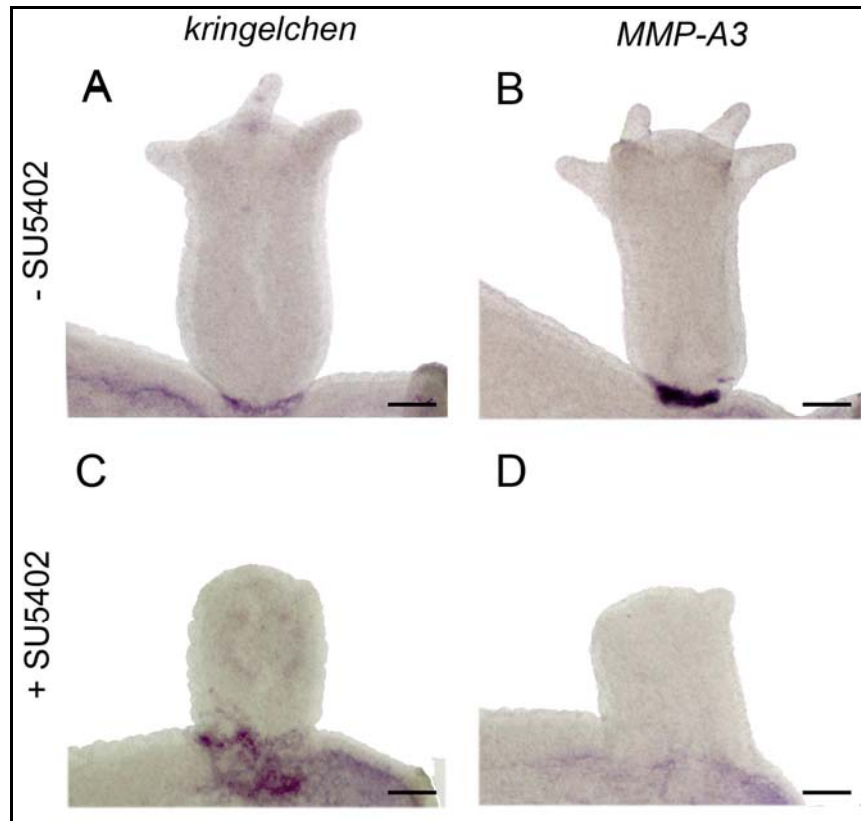
In einem Vorversuch wurden knospende Tiere in Stadium 3 bis 4 mit 10 $\mu$ M SU5402 für 24 Stunden behandelt und die Entwicklung von Y-Tieren über mehrere Wochen hinweg beobachtet. In Abb. 3-16 ist die Entwicklung eines Tieres über insgesamt vier Wochen dargestellt. Genau wie nach DAPT-Behandlung ist die Inhibition der Knospenablösung auch hier nicht reversibel, die Y-Tiere bleiben stabil erhalten. Im Verlauf der Zeit ist außerdem ebenfalls eine Wanderung der Verbindung zwischen beiden Tieren hin zum Fuß zu beobachten, was auf die Gewebedynamik in adulten Tieren zurückzuführen ist.



**Abb. 3-16:** Die SU5402-Behandlung knospender Tiere führt zu Y-Tieren; Beobachtung eines Y-Tieres in Hydramedium nach 24 Stunden Behandlung mit SU5402 über 4 Wochen hinweg; Maßstab: 500µm.

### Die Expression von *kringelchen* ist gestört und von *MMP-A3* inhibiert

Anschließend wurden knospende Tiere erneut 24 Stunden mit SU5402 behandelt und für weitere 24 Stunden in Hydramedium gehalten. Dann wurden sie für *in situ*-Hybridisierungen für *kringelchen* und *MMP-A3* verwendet (siehe Abb. 3-17). Die Kontrolltiere befanden sich nach diesen zwei Tagen im Einschnürungs-Stadium 8 und zeigten für beide Gene das typische, schmale Expressionsband an der Knospenbasis (siehe Abb. 3-17A, B). In behandelten Tieren konnte weder eine Einschnürung noch eine *MMP-A3*-Expression beobachtet werden (siehe Abb. 3-17C, D). Die Expression von *kringelchen* konnte noch detektiert werden, allerdings reduziert und ebenfalls in einem gestörten, diffusen Muster (siehe Abb. 3-17C). Genau wie bei der Hemmung des Notch-Signalweges durch DAPT verhindert die Hemmung der FGFR-Tyrosinkinaseaktivität die Expression von *MMP-A3* und die Einschnürung der Knospenbasis.



**Abb. 3-17:** *In situ*-Hybridisierungen an DMSO-Kontroll- und SU5402-behandelten, knospenden Tieren für *kringelchen* und *MMP-A3*; (A, B) DMSO-Kontrolltiere; (C, D) 24 Stunden SU5402-behandelte und für 1 Tag in Hydramedium gehaltene knospende Tiere; (A, C) *In situ*-Hybridisierung für *kringelchen*; (B, D) *In situ*-Hybridisierung für *MMP-A3*; Für die Färbereaktionen wurde NBT/BCIP verwendet (blaue Signale); Maßstab: 100µm.

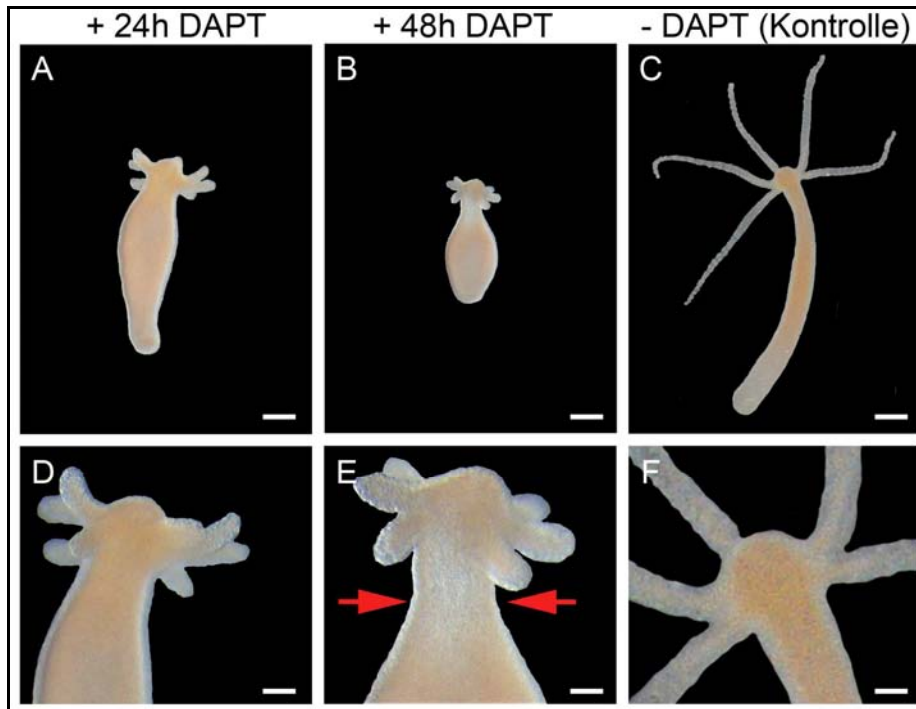
## **3.2 Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Bildung einer Grenze zwischen Hypostom-, Rumpf- und Tentakelgewebe**

### **3.2.1 Auswirkung der Hemmung des Notch-Signalweges auf adulte Kopfstrukturen**

#### **3.2.1.1 Veränderung der Morphologie adulter Kopfstrukturen**

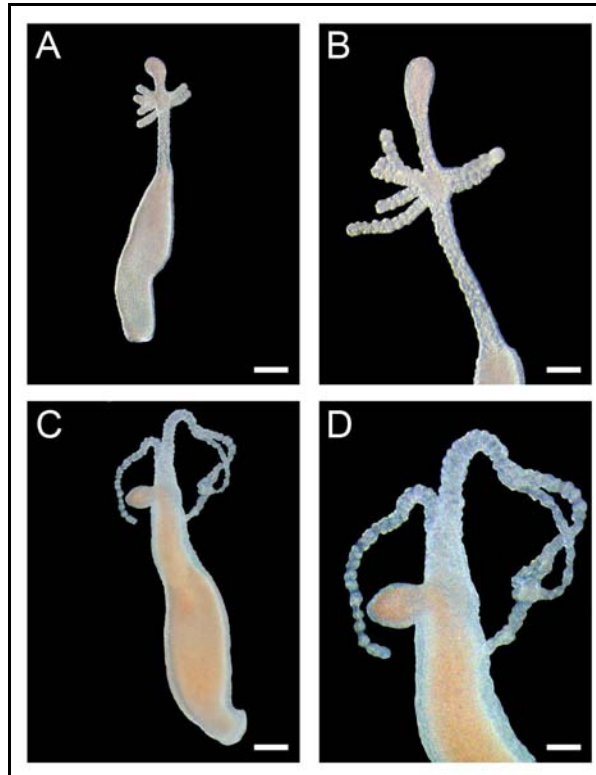
Eine zweite Gewebegrenze in adulten Hydren liegt zwischen der Tentakelzone und den Tentakeln. Sie muss in adulten Tieren aufgrund der Gewebedynamik erhalten werden und während der Kopfregeneration und der Knospung neu etabliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Notch-Signalweg hierbei eine Rolle spielt.

Wenn adulte, nicht knospende Tiere mit 40 $\mu$ M DAPT für 48 Stunden behandelt und anschließend in Hydramedium überführt und beobachtet wurden, konnten verschiedene morphologische Veränderungen festgestellt werden. Schon während der Behandlung ist bei allen DAPT-behandelten Tieren im Vergleich mit DMSO-Kontrolltieren eine Verkürzung sämtlicher Tentakel und des Rumpfes zu beobachten (siehe Abb. 3-18A, B, D, E). Ein hoher Anteil zeigt nach 48 Stunden außerdem eine leichte Einschnürung unterhalb des Tentakelkranzes (siehe Abb. 3-18B, E).



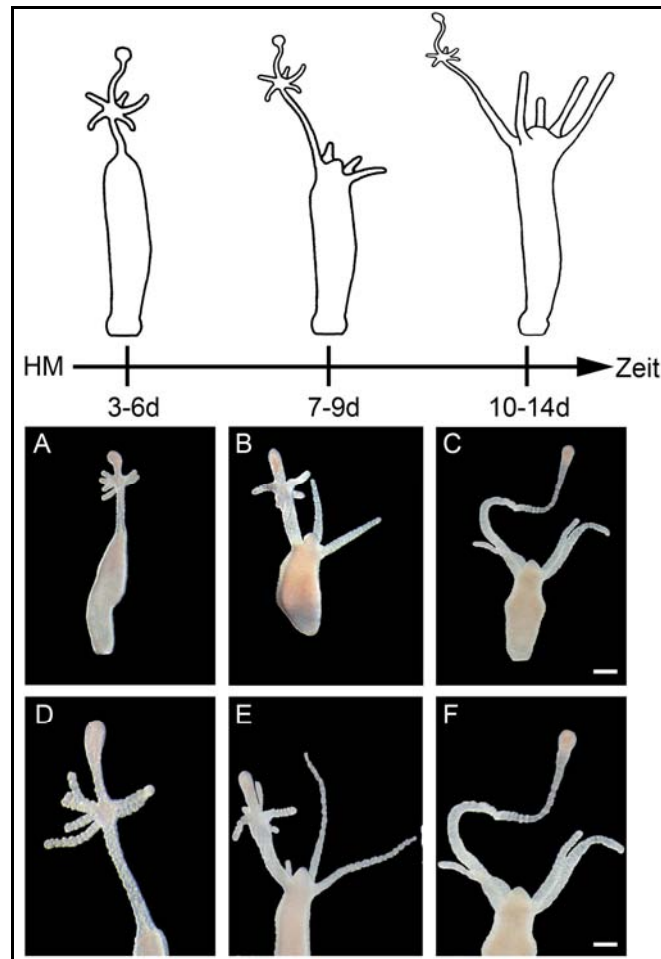
**Abb. 3-18:** Morphologie DAPT-behandelter Tiere nach 24 und 48 Stunden im Vergleich mit einem DMSO-Kontrolltier; (A, B; D, E) DAPT-behandelte Tiere; (B, E) DAPT-behandeltes Tier mit Einschnürung unterhalb des Tentakelkranzes (rote Pfeile); (C, F) DMSO-Kontrolltier; (D-F) Vergrößerungen zu (A-C); Maßstab: (A-C) 500µm, (D-F) 180µm.

Drei bis sechs Tage nach Überführung in Hydramedium weisen insgesamt 12% der DAPT-behandelten Tiere eine dramatisch veränderte Kopfmorphologie auf. Betroffen sind in solchen Tieren die Anzahl und Lokalisation der Tentakel und die Lokalisation des Hypostoms. 8% der Tiere besitzen eine verlängerte, vom Rumpf weg- und hochgeschobene Kopfstruktur (siehe Abb. 3-19A, B). Die Regionen direkt unterhalb des Tentakelkranzes und die unterhalb der Mundöffnung sind enorm verlängert. Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit den beiden kapselspezifischen Antikörpern anti-Nowa und anti-Spinalin konnte bewiesen werden, dass es sich hierbei um überschüssiges Tentakelgewebe handelt (siehe Anhang 7.8; siehe Abb. 7-7, Abb. 7-8 und Abb. 7-9). Die restlichen 4% der Tiere haben scheinbar nur noch einen großen, verzweigten Tentakel und ein zur Seite gekipptes Hypostom (siehe Abb. 3-19C, D).



**Abb. 3-19:** Morphologie 48 Stunden DAPT-behandelter Tiere drei bis sechs Tagen nach Überführung in Hydramedium; (A, B) DAPT-behandeltes Tier mit hochgeschobener Kopfstruktur; (C, D) DAPT-behandeltes Tier mit seitlich gekipptem Hypostom und einem mehrfach verzweigtem Tentakel; (B ,D) Vergrößerungen zu (A, C); Maßstab: (A, C) 250 $\mu$ m, (B, D) 180 $\mu$ m.

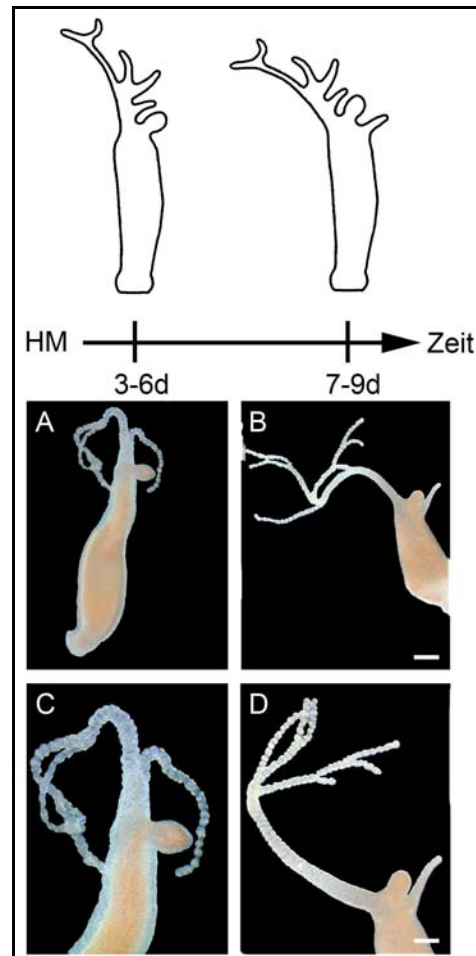
Wenn man die Entwicklung solcher Tiere über zwei Wochen hinweg beobachtet, so normalisieren sich von Tag zu Tag die abnormen Kopfstrukturen. Letztlich besitzen die Tiere wieder einen korrekt lokalisierten und strukturierten Kopf aus Tentakelzone, Tentakelkranz und Hypostom. In Abb. 3-20 ist die Entwicklung eines Tieres mit hochgeschobenen Kopfstrukturen über zwei Wochen hinweg dargestellt. Man kann erkennen, dass etwa nach einer Woche (7-9 Tage) die Tiere am unteren Ende der hochgeschobenen „alten“ Kopfstruktur wieder ein neues Hypostom mit darunterliegendem Tentakelkranz ausbilden (siehe Abb. 3-20B, E). Gleichzeitig degeneriert die ursprüngliche verschobene Kopfstruktur zunehmend zu einem Tentakel des neu ausgebildeten Tentakelkranzes (siehe Abb. 3-20C, F).



**Abb. 3-20:** Zeitliche Entwicklung eines DAPT-behandelten Tieres mit hochgeschobener Kopfstruktur in Hydrated Medium (HM); Oben: Schematische Darstellung der Hydren mit hochgeschobenen Köpfen und ihre morphologischen Veränderungen innerhalb von 14 Tagen; (A, D) 3-6 Tage nach Überführung in HM; (B, E) 7-9 Tage nach Überführung in HM; (C, F) 10-14 Tage nach Überführung in HM; (D, E, F) Vergrößerungen der Kopfregion von (A, B, C); Maßstab: (A-C) 500µm; (D-F) 180µm.

Tiere mit seitlich gekipptem Hypostom und einem großen, verzweigten Tentakel richten im Laufe der Zeit ihr Hypostom wieder auf und entwickeln ebenfalls einen neuen Tentakelkranz (siehe Abb. 3-21B, D). Die Verzweigungen des zuvor einzigen Tentakels wandern aufgrund der Gewebeverschiebung adulter Hydren in Richtung der Tentakelspitzen, bis sie nach etwa zwei Wochen „herausgewachsen“ sind.



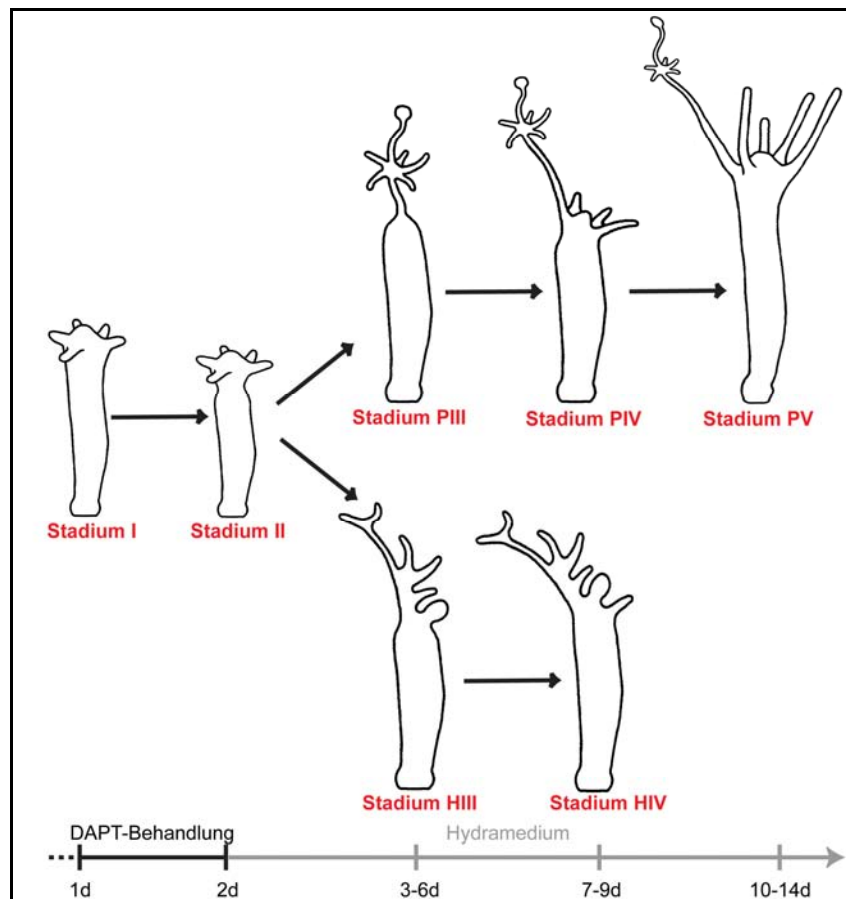


**Abb. 3-21:** Zeitliche Entwicklung eines DAPT-behandelten Tieres mit seitlich gekipptem Hypostom und einzelner, mehrfach verzweigter Tentakel in Hydramedium (HM); (A, C) 3-6 Tage nach Überführung in HM; (B, D) 7-9 Tage nach Überführung in HM; (C, D) Vergrößerungen der Kopfregion von (A, B); Maßstab: (A, B) 500µm; (C, D) 180µm.

Um die verschiedenen Erscheinungsbilder DAPT-behandelter Tiere mit hochgeschobenen Kopfstrukturen und den zeitlichen Verlauf ihrer Entwicklung im Folgenden konsistent unterscheiden zu können, wurde eine Einteilung in verschiedene Stadien vorgenommen. In Abb. 3-22 ist diese Einteilung schematisch dargestellt. Demnach werden Tiere, die 24 Stunden mit DAPT behandelt wurden und bereits verkürzte Tentakel aufweisen in Stadium I eingeteilt. Tiere mit 48-stündiger DAPT-Behandlung, die neben verkürzten Tentakeln und Rümpfen auch eine Einschnürung unterhalb des Tentakelkranzes aufweisen können,

### 3 Ergebnisse

werden Stadium II zugeordnet. Tiere, die nach 3 bis 6 Tagen einen hochgeschobenen Kopf aufweisen, gehören in Stadium PIII und solche mit zur Seite gekipptem Hypostom und einem einzelnen, verzweigtem Tentakel in Stadium HIII. Beginnt sich ab 7 bis 9 Tagen die Kopfstruktur wieder zu normalisieren, indem sich ein neuer Tentakelkranz und ein Hypostom an der richtigen Position ausbilden, befinden sich die Tiere in Stadium PIV bzw. HIV. In das folgende Stadium PV werden Tiere eingeordnet, in denen die hochgeschobene Kopfstruktur schon fast vollständig degeneriert ist und die schon wieder einen normal großen, korrekt platzierten Kopf aufweisen.



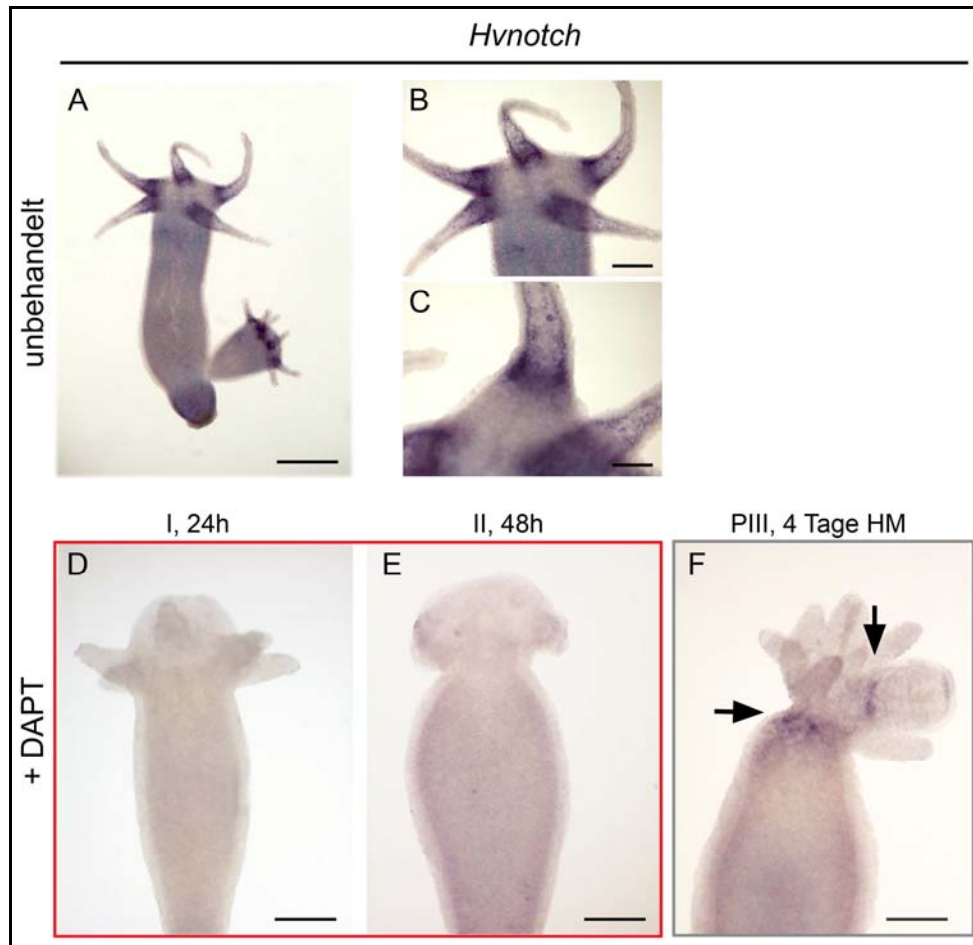
**Abb. 3-22:** Schematische Darstellung der Einteilung von DAPT-behandelten Tieren mit abnormen Kopfstrukturen in definierte Stadien I bis V; Für Tiere mit hochgeschobenem Kopfstrukturen wird das Kürzel P verwendet, für Tiere mit seitlich gekipptem Hypostom und einzeln mehrfach verzweigtem Tentakel das Kürzel H.

### **3.2.1.2 Die Hemmung des Notch-Signalweges führt zu einer veränderten Expression kopfspezifischer Gene**

#### **Die Genexpression von *Hvnotch* ist inhibiert**

Zunächst wurde getestet, ob die Expression von *Hvnotch* nach Inhibierung der Notch-Signaltransduktion mit DAPT beeinträchtigt ist. In unbehandelten Tieren wird *Hvnotch* im gesamten Tier endo- und ektodermal exprimiert (Käsbauer *et al.*, 2007). Eine erhöhte Expression kann an der Basis der Tentakel im Endoderm sowohl in adulten Tieren als auch in Knospen ab Stadium 6 beobachtet werden (siehe Abb. 3-23A-C). In Tieren, die 24 bzw. 48 Stunden mit DAPT behandelt wurden (Stadien I und II), ist keine Expression von *Hvnotch* mehr im Tier bzw. an der Basis der Tentakel zu beobachten (siehe Abb. 3-23D, E). 3-6 Tage nach Entfernung des DAPT-Mediums in Stadium PIII konnte wieder eine Expression von *Hvnotch* detektiert werden, allerdings nicht mehr an der Basis der Tentakel. *Hvnotch* war in zwei ringförmigen Expressionsdomänen ober- und unterhalb des „hochgeschobenen“ Tentakelkranzes exprimiert (siehe Abb. 3-23F).

### 3 Ergebnisse

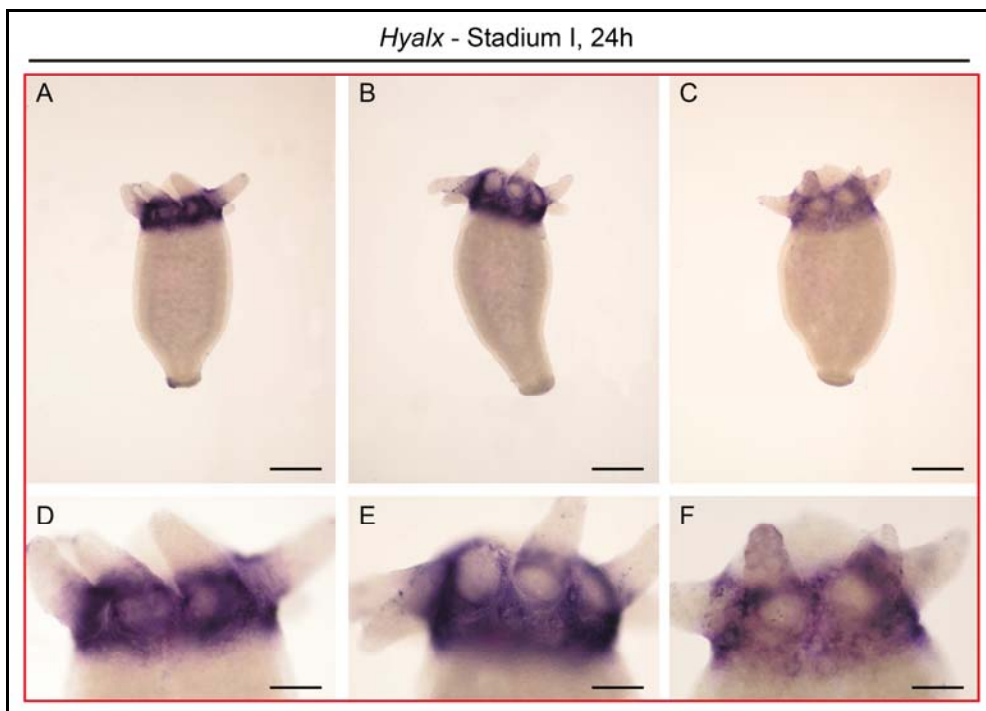


**Abb. 3-23:** *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *Hvnotch*; (A-C) *in situ*-Hybridisierung an unbehandelten Tieren; (D-F) *in situ*-Hybridisierung an für 24 bzw. 48 Stunden DAPT-behandelten Tieren (Stadium I bzw. II, roter Rahmen) und Tier in Stadium PIII (48 Stunden DAPT und 4 Tage in HM, grauer Rahmen); Für die Färbereaktionen wurde BM-Purple eingesetzt; Maßstab: (A) 300µm, (B) 60µm, (C) 30µm, (D-F) 100µm.

Anschließend wurden *in situ*-Hybridisierungsexperimente zum Nachweis der Expression von *Hywnt3*, *Hyalx* und *HMMP* durchgeführt (Hobmayer *et al.*, 2000; Leontovich *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000).

### Die Expression von *Hyalx* ist durch DAPT verändert und markiert eine dislozierte Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln

Die Expression von *Hyalx* war in allen untersuchten Stadien erheblich verändert. Schon in Tieren, die nur für 24 Stunden mit DAPT behandelt wurden, ist die ringförmige *Hyalx*-Expressionszone an der Basis der Tentakel diffus verbreitert und erweitert sich auf die gesamte Tentakelzone und die basale Region innerhalb der einzelnen Tentakel (siehe Abb. 3-24 und Abb. 3-25B).



**Abb. 3-24:** *In situ*-Hybridisierungen für *Hyalx* an 24 Stunden DAPT-behandelten Tieren (Stadium I). Roter Rahmen zeigt, dass die sich Tiere zu Beginn der *in situ*-Hybridisierung noch in DAPT-Medium befanden; (D-F) Vergrößerungen zu (A-C); Diplomarbeit N. Bruckmeier; Für die Färbereaktionen wurde BM-Purple eingesetzt; Maßstab: (A-C) 100 $\mu$ m, (D-F) 40 $\mu$ m.

In 48 Stunden DAPT-behandelten Tieren schließlich verringert sich die Expression an der Basis der Tentakel erheblich und es sind deutlich entweder nur eine einzelne ringförmige Expressionszone unterhalb des Tentakelkranzes oder zwei

### 3 Ergebnisse

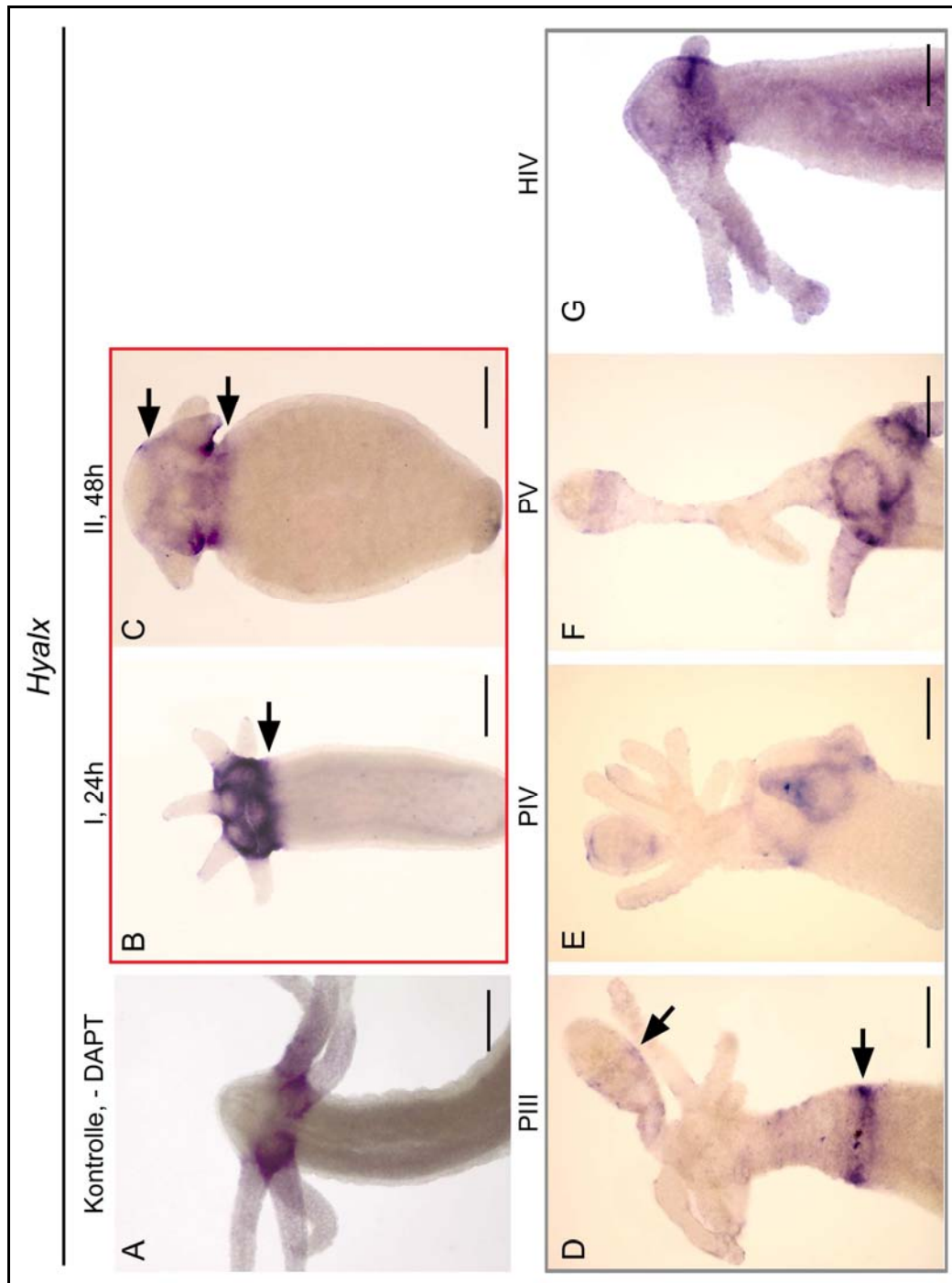
---

solcher Zonen zu beobachten, dann eine direkt unterhalb und eine unmittelbar oberhalb des Tentakelkranzes (siehe Abb. 3-25C).

In Stadium PIII bleiben diese beiden ringförmigen Expressionsbereiche erhalten und scheinen das dazwischen liegende Gewebe einerseits vom apikalen Hypostom und andererseits vom Rumpf abzugrenzen (siehe Abb. 3-25D). Es kann keine Expression mehr an der Basis der „alten“ Tentakel detektiert werden. Damit ähnelt die *Hyalx*-Expression in diesem Stadium, in dem wieder eine aktive Notch-Signalweiterleitung stattfinden kann, der Expression von *Hvnotch* (siehe Abb. 3-23F). Wenn dann in Stadium PIV die Ausbildung eines neuen Kopfes zu erkennen ist und in Stadium V weiter voranschreitet, wird *Hyalx* wieder an der Basis der sich neu ausstülpenden Tentakel exprimiert, auch an der Basis des den „alten“ Kopf hochschiebenden Tentakels (siehe Abb. 3-25E, F).

In den Tieren mit seitlich gekipptem Hypostom in Stadium HIII und HIV zeigt der große, mehrfach verzweigte Tentakel an seiner Basis eine ringförmige *Hyalx*-Expression und wird damit als ein einzelner Tentakel erkannt. Die mit der Zeit an dessen unterem Ende neu ausgebildeten Tentakel exprimieren dann jeweils an ihrer Basis wieder *Hyalx* (siehe Abb. 3-25G).

Im Verlauf der Zeit nach Entfernung des DAPT-Mediums kommt es demnach zur Umstrukturierung und Reorganisation der Kopfstrukturen und damit auch zur Wiederausbildung der kopfspezifischen Grenzen, was durch eine normalisierte Expression grenzspezifischer Gene wie *Hyalx* und auch *Hvnotch* zu erkennen ist.

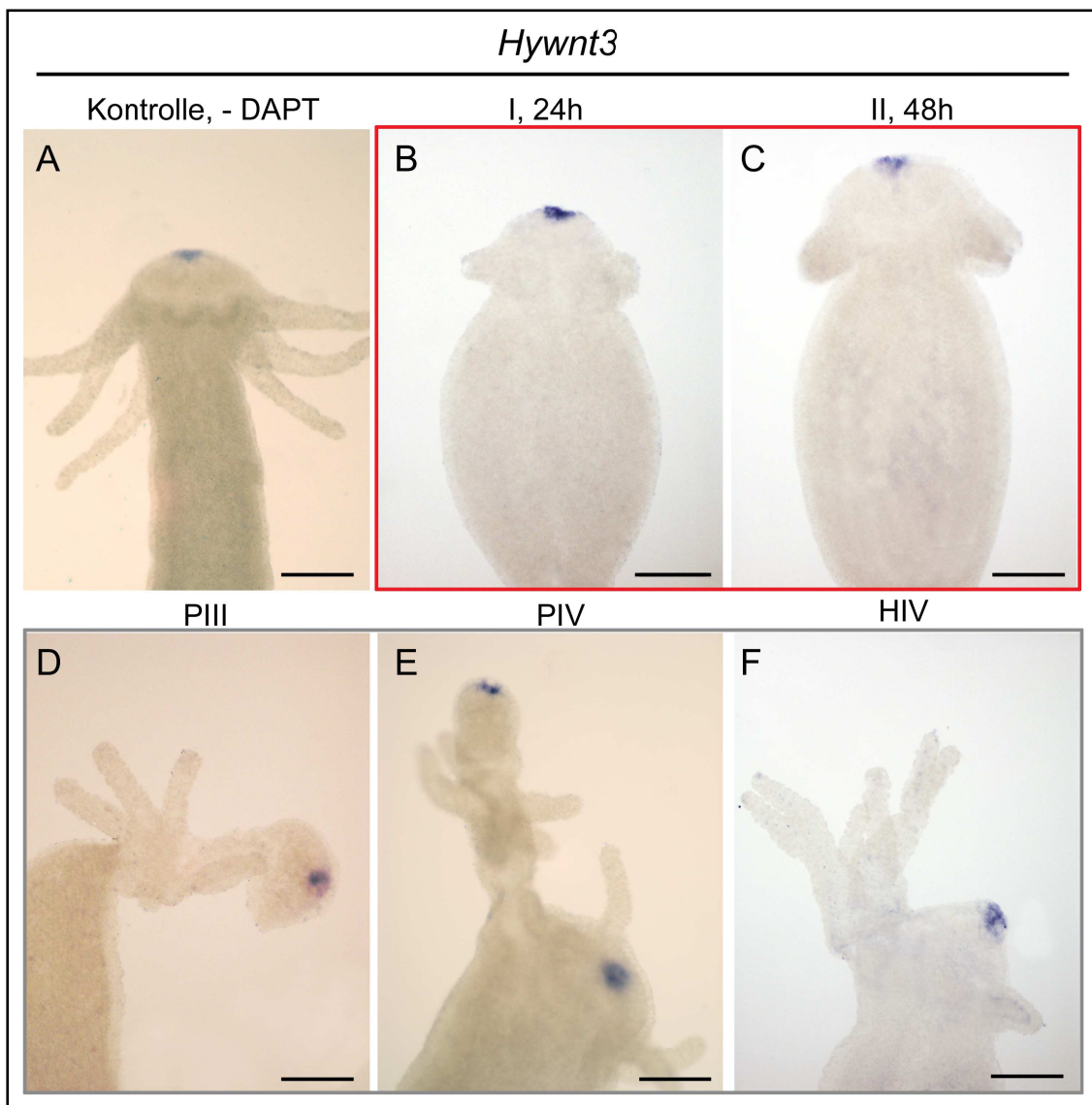


**Abb. 3-25:** *in situ*-Hybridisierungen für *Hyalx* an DMSO-Kontroll- und DAPT-behandelten Tieren in den Stadien I, II, PIII, PIV, PV und HIV; (A) Expression in einem DMSO-Kontrolltier (B, C) Expression in Stadium I und II (24 bzw. 48h in DAPT, roter Rahmen); (D-G) Expression in Stadium PIII, PIV, PV und HIV (nach DAPT-Behandlung in Hydramedium, grauer Rahmen); (B-F) Diplomarbeit N. Bruckmeier; Pfeile markieren jeweils neu auftretende ringförmige Expressionszonen von *Hyalx*; Für die Färbereaktionen wurde BM-Purple eingesetzt (blaue Signale); Maßstab: 100 $\mu$ m.

#### **Die Expression von *Hywnt3* im Hypostom bleibt erhalten**

Die Expression von *Hywnt3* war in keinem der untersuchten Stadien beeinträchtigt (siehe Abb. 3-26). In DAPT-behandelten Tieren in Stadium PIII wird *Hywnt3* an der distalen, kugelförmigen Spitze des hochgeschobenen Kopfes exprimiert (siehe Abb. 3-26D). Die Identität des Hypostoms scheint damit trotz veränderter Position nicht beeinträchtigt zu sein. *In situ*-Hybridisierungen an Tieren in Stadium PIV belegen außerdem, dass am unteren Ende des an einem Tentakel hochgeschobenen „alten“ Kopfes ein neuer Kopf mit Hypostom und Tentakelkranz ausgebildet wird. In Abb. 3-26E sind deutlich zwei punktförmige *Hywnt3*-Signale erkennbar. In späteren Stadien, wenn die hochgeschobene Kopfstruktur fast vollständig degeneriert ist, weist nur noch das „neu“ ausgebildete Hypostom ein *Hywnt3*-Signal auf. In DAPT-behandelten Tieren des Stadiums HIV ist ebenfalls nur ein *Hywnt3*-Signal detektierbar, was belegt, dass das seitlich gekippte Hypostom lediglich seine Position, nicht jedoch seine Identität verändert hat (siehe Abb. 3-26F).

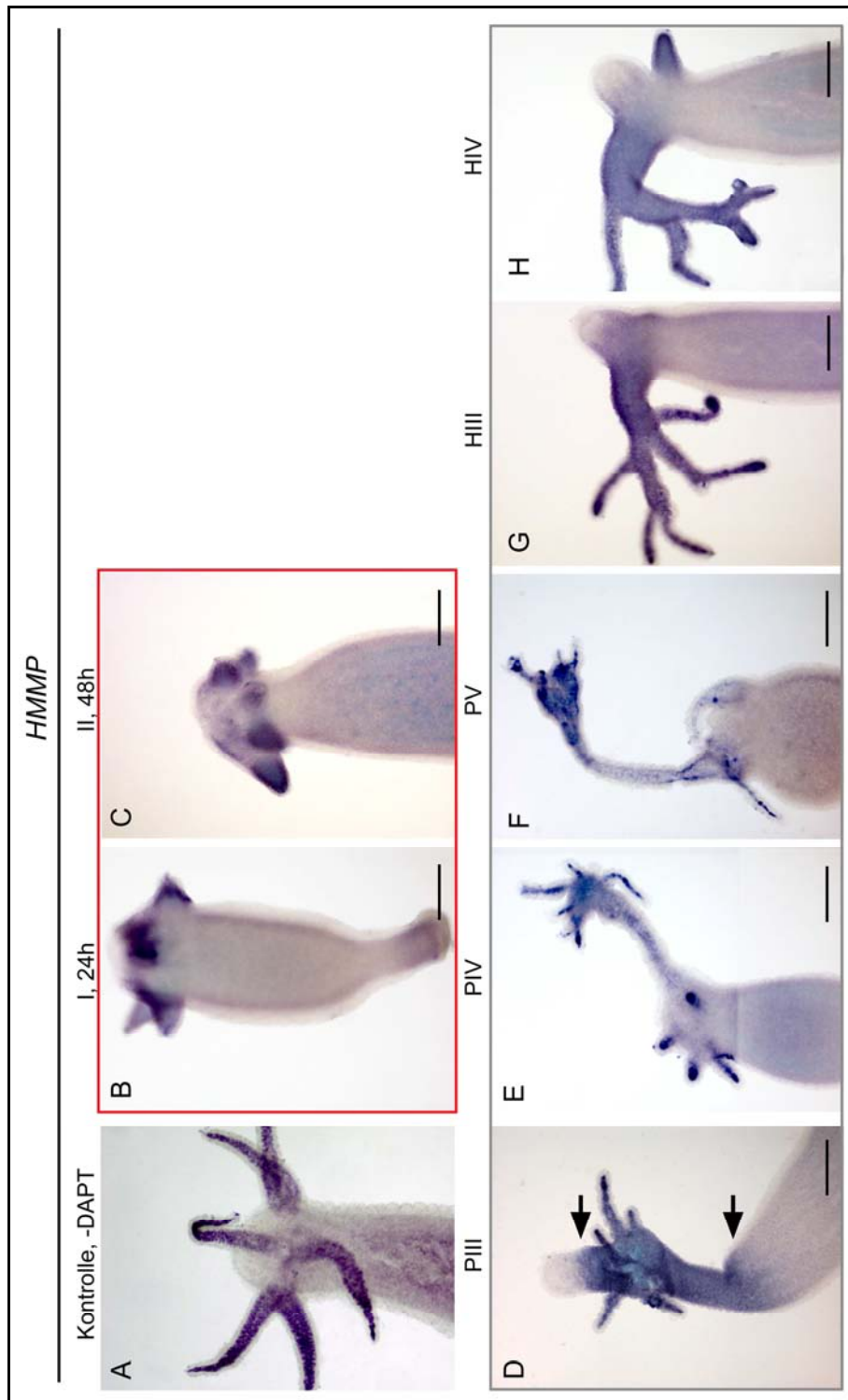




**Abb. 3-26:** *in situ*-Hybridisierungen für *Hywnt3* an DMSO-Kontroll- und DAPT-behandelten Tieren in den Stadien I, II, PIII, PIV und HIV; (A) Expression an einem DMSO-Kontrolltier; (B, C) Expression in Stadium I und II (24 bzw. 48h in DAPT, roter Rahmen); (D-F) Expression in Stadium PIII, PIV und HIV (nach DAPT-Behandlung in Hydramedium (grauer Rahmen)); (D-E) Diplomarbeit N. Bruckmeier; Für die Färbereaktionen wurde NBT/BCIP verwendet; Maßstab: 100µm.

#### **Die Expression von *HMMP* markiert auch nach DAPT-Behandlung in abnormen Kopfstrukturen Tentakelgewebe**

In Tieren, die 24 bzw. 48 Stunden mit DAPT behandelt wurden, ist die *HMMP*-Expression in den Tentakeln unverändert vorhanden (siehe Abb. 3-27B, C). Die *in situ*-Hybridisierungen an DAPT-behandelten Tieren in Stadium PIII zeigten eine Färbung des hochschiebenden Tentakels, des „alten“ Tentakelkranzes und des Bereichs bis unterhalb des Hypostoms (siehe Abb. 3-27D). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die gesamte, „alte“ hochgeschobene Kopfstruktur bis auf die distale Hypostomregion aus Tentakelgewebe besteht. Dies ist genau der Bereich, der zwischen den beiden beobachteten ringförmigen *Hyalx*-Expressionszonen liegt (siehe Abb. 3-25D). Damit markiert *Hyalx* wie in DMSO-Kontrolltieren die Grenzen zu Tentakelgewebe. Wie erwartet konnte dann für *HMMP* in den folgenden Stadien PIV und PV eine Färbung der neu evaginierten Tentakel am unteren Ende des hochschiebenden Tentakels beobachtet werden. Auch hier bleibt das Hypostom ungefärbt (siehe Abb. 3-27E, F). Zusätzlich konnte in DAPT-behandelten Tieren in Stadium HIII und HIV gezeigt werden, dass die einzige, mehrfach verzweigte Struktur *HMMP* exprimiert und damit einen Tentakel darstellt (siehe Abb. 3-27G, H). Auch hier ist in sich neu ausbildenden Tentakeln am unteren Ende des „alten“ verzweigten Tentakels eine *HMMP*-Expression zu beobachten.



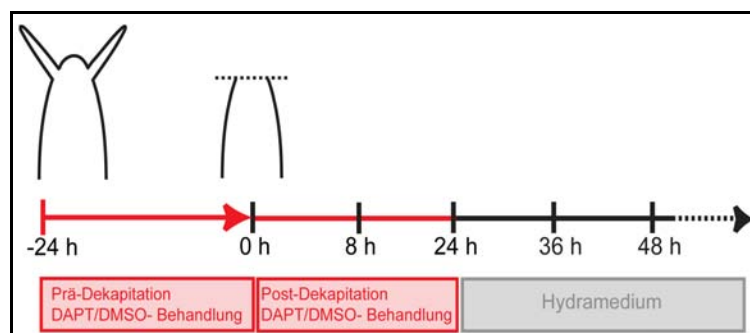
**Abb. 3-27:** *in situ*-Hybridisierungen für *HMMP* an DMSO-Kontroll- und DAPT-behandelten Tieren in den Stadien I, II, PIII, PIV, PV, HIII und HIV; (A) Expression in einem DMSO-Kontrolltier; (B) Expression in Stadium I und II (24 bzw. 48h in DAPT, roter Rahmen); (D-H) Expression in Stadium PIII, PIV und PV (nach DAPT-Behandlung in Hydramedium, grauer Rahmen); Für die Färbereaktionen wurde BM-Purple verwendet (blaue Signale); Maßstab: 100µm.

## 3.2.2 Die Hemmung des Notch-Signalweges führt zu einer Inhibition der Kopfregeneration und zu abnormen apikalen Kopfstrukturen

### 3.2.2.1 Veränderung der Morphologie von Kopfregeneraten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass adulte Kopfstrukturen nach Inhibierung des Notch-Signalweges stark beeinträchtigt sind, sollte untersucht werden, ob dies auch auf während der Kopfregeneration neu ausgebildete Köpfe zutrifft.

Hierfür wurden zunächst noch intakte Tiere 24 Stunden mit 70 $\mu$ M DAPT behandelt (Prä-Dekapitation DAPT-Behandlung). Dies sollte sicherstellen, dass zum Zeitpunkt der Dekapitation keine aktive Notch-Signaltransduktion mehr stattfindet. Erst dann wurden die Polypen bei 75% ihrer Körperlänge, also direkt unterhalb des Tentakelkranzes dekapiert (nach Lengfeld *et al.*, 2009 bzw. Hobmayer *et al.*, 2000). Die geköpften und regenerierenden Tiere wurden anschließend für weitere 24 Stunden mit DAPT behandelt (Post-Dekapitation DAPT-Behandlung) und dann wieder für die restliche Regeneration in Hydramedium überführt. Die entsprechenden Kontrolltiere wurden jeweils mit DMSO-Kontrollmedium behandelt und unbehandelte Tiere befanden sich zu jeder Zeit in Hydramedium. Der Ablauf des gesamten Versuches ist schematisch in Abb. 3-28 dargestellt.



**Abb. 3-28:** Schematische Darstellung der Kopf-Regenerationsversuche in DAPT- bzw. DMSO-Kontrollmedium. Intakte Tiere wurden 24 Stunden mit DAPT- bzw. DMSO-Medium vorinkubiert (Prä-Dekapitation Behandlung) und anschließend bei 75% ihrer Körperlänge dekapiert. Die Kopfregenerate wurden dann erneut für 24 Stunden mit DAPT- bzw. DMSO-Medium inkubiert (Post-Dekapitation Behandlung) und im Anschluss für die weitere Regeneration in Hydramedium überführt. Nach 8, 24 und jeweils alle 12 Stunden zusätzlicher Regenerationszeit wurden Tiere zur Dokumentation entnommen.

Schon auf phänotypischer Ebene konnten Unterschiede zwischen unbehandelten, DMSO- und DAPT-behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 3-29). Am schnellsten konnten die unbehandelten Tiere regenerieren. Sie wiesen bereits nach 34 Stunden wieder ein spitz geformtes apikales Ende und die ersten Tentakelknospen auf. Nach 48 bis 60 Stunden besaßen sie wieder völlig intakte Köpfe.

Im Vergleich hierzu verlief die Regeneration in DMSO-behandelten Tieren etwas langsamer. Die erste Ausbildung von Tentakelknospen trat verglichen mit den unbehandelten Tieren leicht verzögert auf. Die Dauer der Verzögerung schwankte zwischen den einzelnen Tieren und belief sich auf etwa 2 bis 12 Stunden (siehe Abb. 3-29). Trotzdem zeigten die DMSO-Kontrolltiere wie die unbehandelten bereits nach 48 bis 60 Stunden wieder vollständig ausgebildete Köpfe (siehe Abb. 3-29).

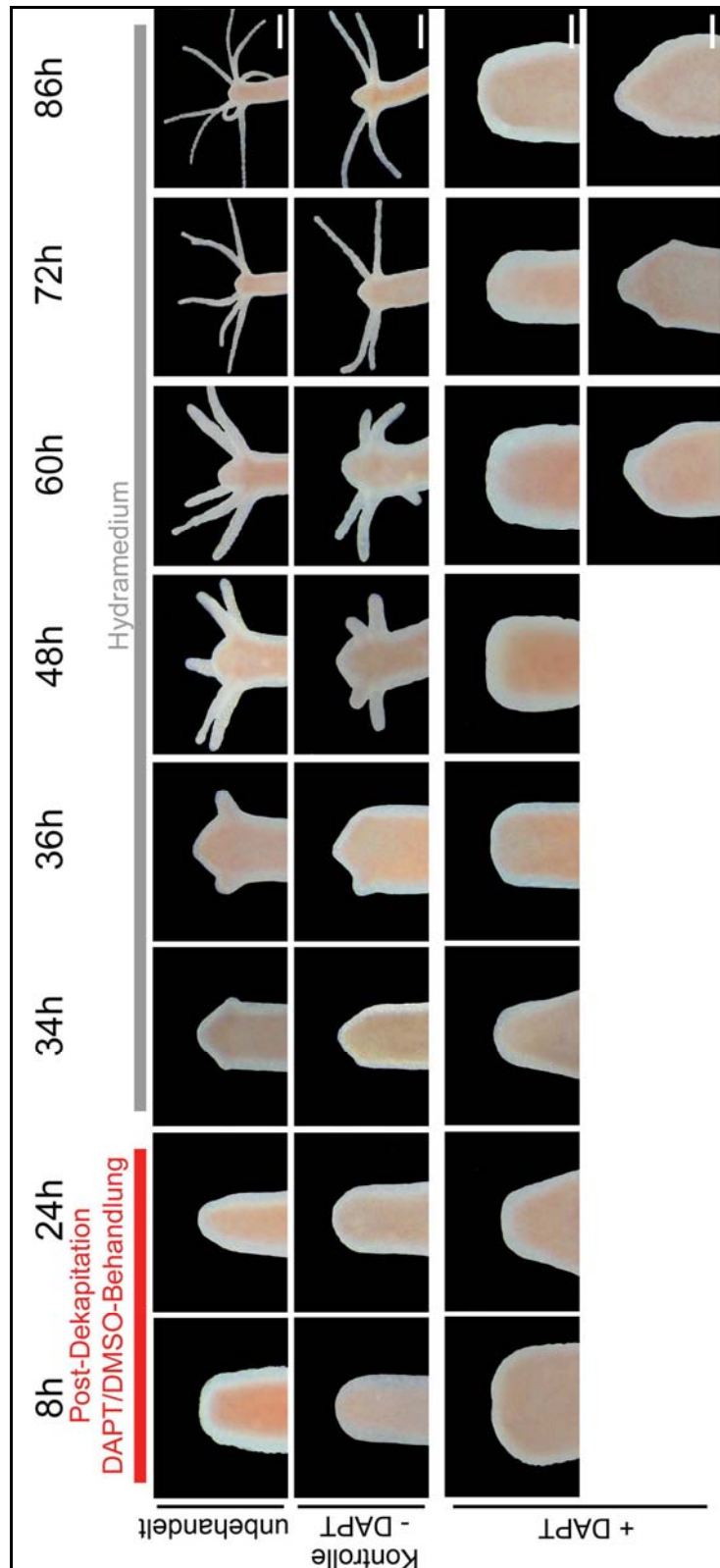
Die Kopfregeneration in DAPT-behandelten Tieren war erheblich verzögert oder sogar völlig inhibiert. Bereits der Wundverschluss schien deutlich langsamer zu erfolgen. Bis 48 Stunden wiesen die Hydren keinerlei Anzeichen einer Ausbildung von Tentakelknospen auf (siehe Abb. 3-29). Allerdings traten bei genau 48 Stunden Regenerationszeit in 30% der Kopfregenerate abnorme, apikale Strukturen auf, die als nicht-regenerierte Köpfe gewertet wurden (siehe Abb. 3-30). Erst zwischen 60 bis 72 Stunden schienen sich die ersten normalen Kopfstrukturen in etwa 22% bzw. 46% der Tiere zu entwickeln (siehe Abb. 3-29 und Abb. 3-30). Die restlichen 78% bis 54% der Kopfregenerate zeigten zwischen diesen Zeitpunkten entweder gar keine Anzeichen einer normalen Kopfregeneration oder aber sie besaßen völlig abnorme, apikal lokalisierte Strukturen (siehe Abb. 3-31). Bei einer Regenerationszeit von 60 Stunden traten in 47% und bei 72 Stunden etwa 27% der Tiere solche ungewöhnlichen Kopfstrukturen auf (siehe Abb. 3-30 und Abb. 3-31). Hierbei handelte es sich um ein oder zwei seitlich liegende, spitze Auswüchse oder zentral liegende, tentakelähnliche Strukturen. In keinem der Kopfregenerate konnte ein Hypostom identifiziert werden (siehe Abb. 3-29 und Abb. 3-31). Scheinbar konnten solche abnormen Kopfstrukturen im Laufe der weiteren Regeneration zu einem intakten Kopf umorganisiert wer-

### 3 Ergebnisse

---

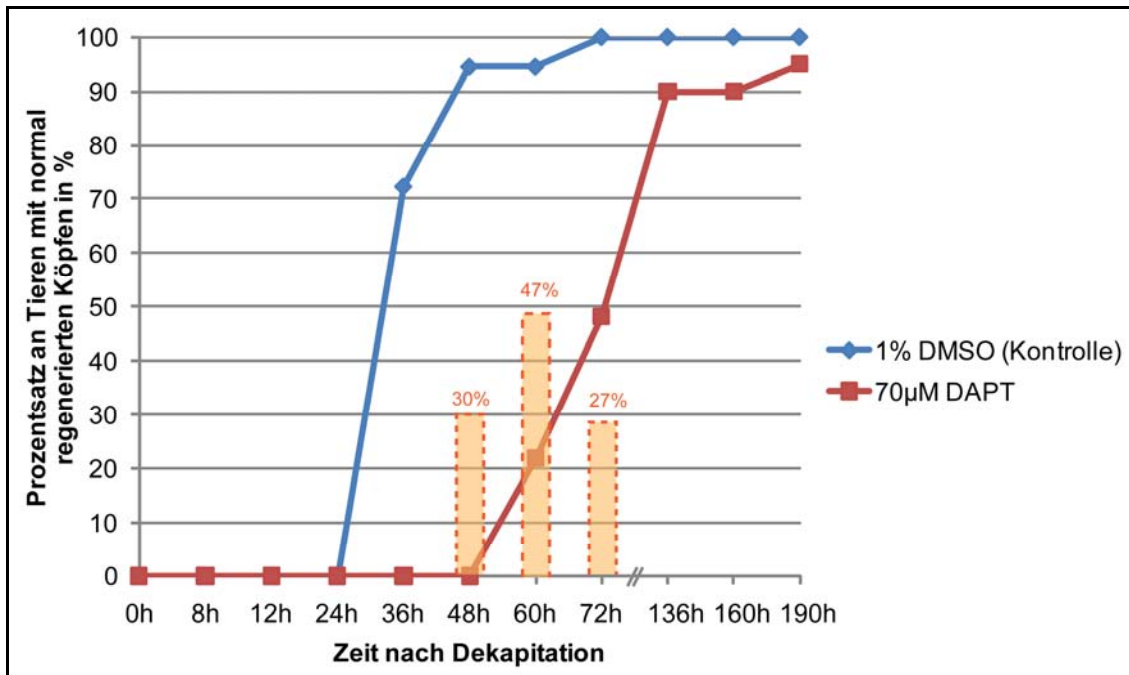
den, denn nach 136 Stunden besaßen fast alle Tiere (90%) wieder beinahe vollständige Köpfe (siehe Abb. 3-30). Als intakte Köpfe wurden sie gewertet, da sie ein erkennbares Hypostom und einen darunterliegenden Tentakelkranz aufwiesen. Allerdings war oftmals die Anzahl der Tentakel reduziert. Häufig traten nur drei Tentakel auf. Diese Aberrationen konnten im Lauf der Zeit allerdings behoben werden, so dass nach 190 Stunden die Tiere wieder eine normale Anzahl von Tentakeln aufwiesen (siehe Abb. 3-30).

Da in DMSO-behandelten Tieren bereits nach 36 Stunden erste Anzeichen einer normalen Kopfregeneration in Form von sich ausbildenden Tentakelknospen ausgemacht werden konnten, in DAPT-behandelten Tieren aber erst nach 60 Stunden, umfasst die Verzögerung der Kopfregeneration in diesen Tieren mindestens die Zeit, die nach der Dekapitation noch mit DAPT behandelt wurde, also 24 Stunden. Das heißt, dass während der gesamten DAPT-Behandlung, also solange eine Notch-Signalübertragung gehemmt war, die Tiere gar nicht regenerieren konnten.



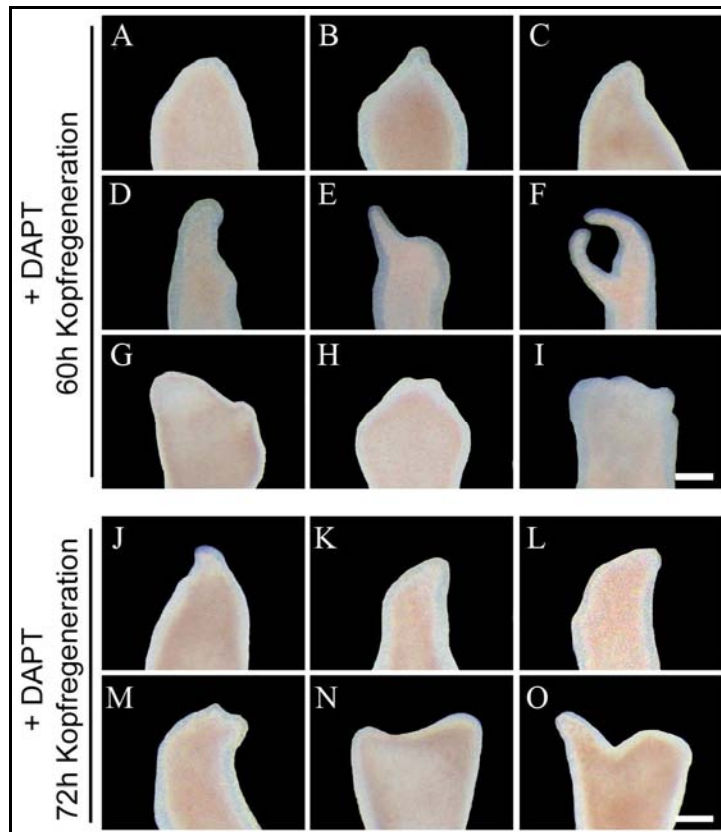
**Abb. 3-29:** Übersicht über die Kopf-Regenerationsreihen unbehauelter, DMSO- und DAPT-behandelter Tiere; Der DAPT/DMSO-Post-Behandlungszeitraum rot und der in Hydramedium grau eingezeichnet; Maßstab: 90µm.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-30:** Kopfregeneration in DMSO- und DAPT-behandelten Tieren; Prozentsatz an Tieren mit normal regenerierten Köpfen aufgetragen gegen die nach Dekapitation vergangene Zeit; Abnorme Kopfstrukturen wurden als nicht regeneriert gewertet. Ihr Anteil ist im Diagramm für 48, 60 und 72 Stunden Regenerationszeit in Prozent angegeben (orange Balken). Nach 48 Stunden gab es keine normal regenerierten Köpfe, 30% allerdings zeigten abnorme Kopfstrukturen.





**Abb. 3-31:** Vielfalt abnormer Kopfstrukturen in 60 bzw. 72 Stunden Kopfregeneraten; (A-I) abnorme Kopfstrukturen DAPT-behandelter Kopfregenerate nach 60 Stunden Regenerationszeit; (J-O); nach 72 Stunden Regenerationszeit; (D-F) Diplomarbeit S. Tischer; Maßstab: 90µm.

### 3.2.2.2 Die Genexpression in DAPT-behandelten Kopfregeneraten ist verändert bzw. inhibiert

#### Genexpression in unbehandelten Kopfregeneraten

In Abschnitt 2.4.2.3 wurden bereits die Genexpressionsmuster zahlreicher Gene aus verschiedensten Signalwegen während der Kopfregeneration beschrieben (siehe Abb. 2-15 und Abb. 3-32). In dieser Arbeit sollte durch *in situ*-Hybridisierungen untersucht werden, ob und in welchem Muster *Hvnotch* und sein Zielgen *HyHes* während des Kopfregenerationsprozesses exprimiert werden. Außerdem sollte ihre Expression mit der von bereits bekannten Genen verglichen werden.

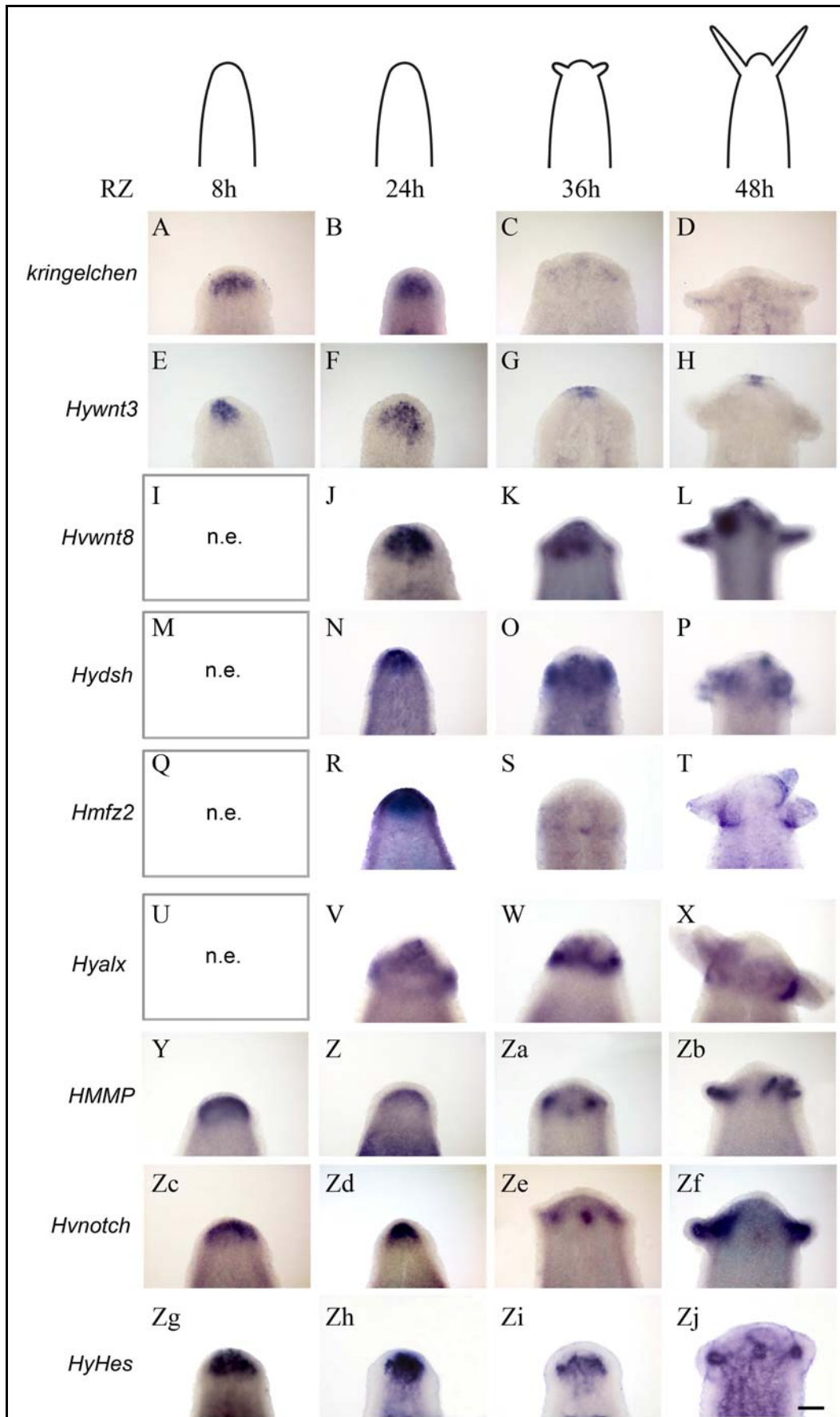
### 3 Ergebnisse

---

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *Hvnotch* als auch *HyHes* in un-behandelten Kopfreparaturen exprimiert werden. Hierfür wurden Hydren direkt unterhalb des Tentakelkranzes (2/8 bzw. 75% Körperlänge) dekapitiert und die Regeneration in Hydramedium beobachtet. Nach 8, 24, 36 und 48 Stunden wurden Kopfreparate entnommen und *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Beide Gene werden bereits 8 Stunden nach Dekapitation apikal in der gesamten regenerierenden Kappe endodermal exprimiert (siehe Abb. 3-32Zc-Zj). Ab 36 Stunden Regenerationszeit werden beide Gene dann nur noch an den Stellen im Endoderm punktförmig exprimiert, an denen sich die ersten Tentakelknospen ausbilden werden (siehe Abb. 3-32Ze, Zi). Wie im adulten Tier wird ihre Expression in 48 Stunden regenerierten Köpfen auf die Tentakel bzw. die Basis der Tentakel beschränkt (siehe Abb. 3-32Zf, Zj). Dies ähnelt dem Expressionsmuster von *Hywnt8*, *Hydsh*, *Hmfz2*, *Hyalx*, *HyBMP5-8b* und *HMMP* während der Kopfreparatur (siehe Abschnitt 2.4.2.3).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass neben Transkriptionsfaktoren und anderen Signalmolekülen, Gene aus drei verschiedenen Signalwegen, dem FGF/FGFR-, Wnt- und eben auch aus dem Notch-Signalweg während der Kopfreparatur exprimiert werden (siehe Abb. 2-15 und Abb. 3-32). Ihre Expression beginnt jeweils großflächig in der regenerierenden Kappe und wird ab 36 Stunden Regenerationszeit auf die Bereiche des Kopfes begrenzt, in denen sich auch in adulten Tieren exprimiert werden (siehe Abb. 3-32; Lengfeld *et al.*, 2009; Sudhop *et al.*, 2004; Philipp *et al.*, 2009).

**Abb. 3-32:** *in situ*-Hybridisierungen an un-behandelten Kopfreparaturen; Oben: Schematische Darstellung von Kopfreparaturen unterschiedlicher Zeitpunkte; Nach 8, 24, 36 und 48h Regenerationszeit (RZ) wurden Kopfreparate für *in situ*-Hybridisierungen entnommen; die jeweiligen Gene sind links angegeben; n.e. für „bei diesem Regenerationszeitpunkt nicht exprimiert“; Für *Hvwnt8*, *Hydsh*, *Hmfz2*, *Hyalx*, *HMMP* und *Hvnotch* wurde BM-Purple für die Färbereaktion eingesetzt (blaue Signale); für *kringelchen* und *Hywnt3* wurde NBT/BCIP verwendet (blaue Signale); Maßstab: 60µm.



#### **Die Expression kopfspezifischer Gene ist in DAPT-behandelten Kopfregeraten stark verändert**

Da nach DAPT-Behandlung auf morphologischer Ebene eine dramatisch verzögerte, gestörte oder sogar inhibierte Kopfregeneration beobachtet werden konnte, sollte festgestellt werden, ob auch auf molekularer Ebene Veränderungen auftreten.

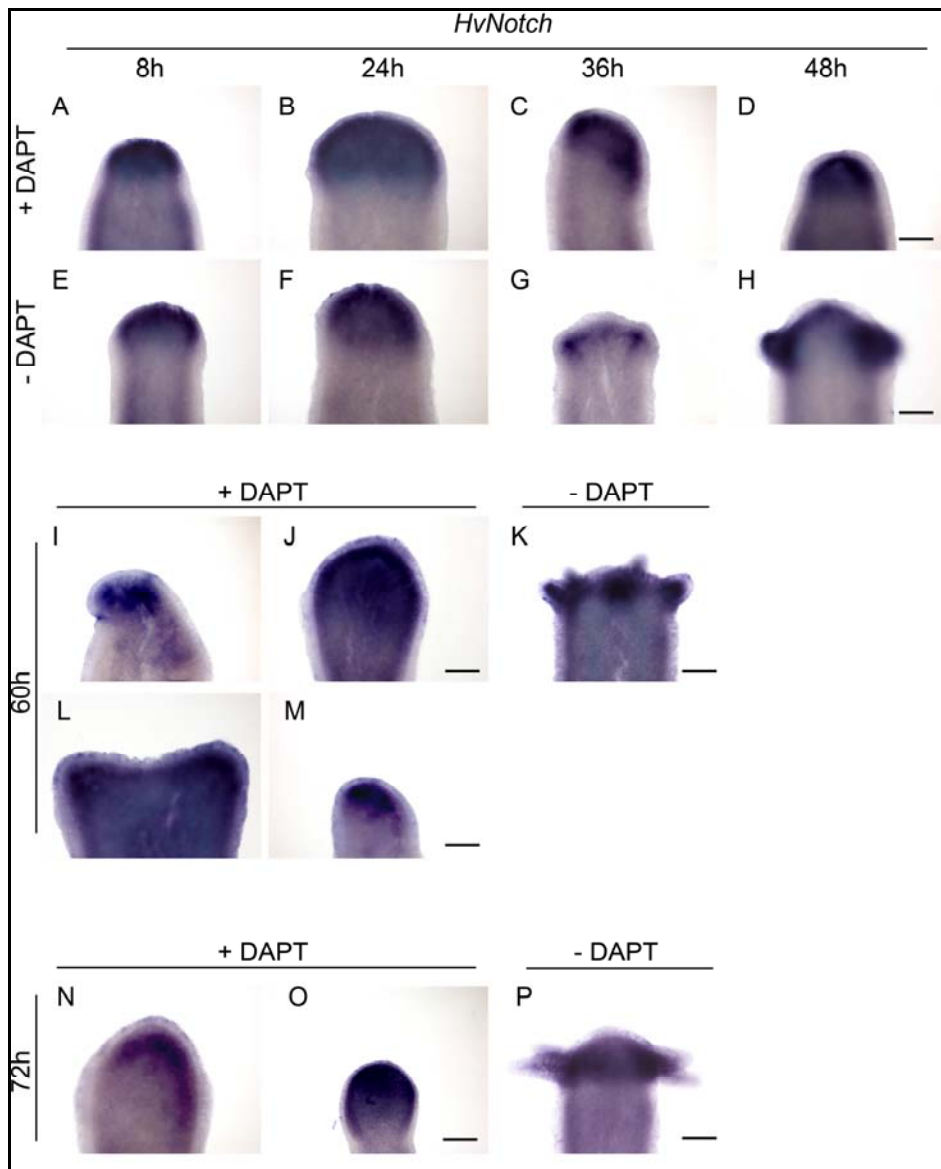
Hierfür wurden an DMSO- bzw. DAPT-behandelten Kopfregeraten zunächst *in situ*-Hybridisierungen mit *Hvnotch* und *HyHes* durchgeführt. Die Kopfregerate wurden wie in Abschnitt 3.2.2 und Abb. 3-28 dargestellt mit DAPT- bzw. DMSO-Kontrollmedium behandelt und nach 8, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden Regenerationszeit für *in situ*-Hybridisierungen entnommen. Frühere Regenerationszeitpunkte wurden nicht untersucht, da hier oftmals verletzungsbedingte Signale in den *in situ*-Hybridisierungsexperimenten auftreten.

#### **Die Expression von *HyHes* und *Hvnotch* ist verändert**

In den DMSO-behandelten Kontrolltieren ist wie in den unbehandelten Tieren (siehe Abb. 3-32Zc-Zf) mit fortschreitender Kopfregeneration ein sich dynamisch veränderndes Expressionsmuster zu beobachten. Zu Beginn wird *Hvnotch* in der gesamten apikalen Kappe exprimiert und kann später nur noch punktförmig an den Positionen, an denen die Tentakelknospen entstehen, detektiert werden. Ab einer Regenerationszeit von 48 Stunden wird es dann wie in adulten Tieren in den Tentakeln bzw. erhöht an der Tentakelbasis exprimiert (siehe Abb. 3-33E-H).

In DAPT-behandelten Kopfregeraten ist zu jedem der untersuchten Regenerationszeitpunkte eine Expression von *Hvnotch* vorhanden (siehe Abb. 3-33A-D, I-P). In DAPT-behandelten Tieren kann bis zu einer Regenerationszeit von 48 Stunden ausschließlich eine endodermale Expression in der gesamten, apika-

len Kappe beobachtet werden (siehe Abb. 3-33A-D). Bei Regenerationszeiten von 60 bzw. 72 Stunden zeigen sich abhängig von abnormen, regenerierenden „Kopf“-Phänotypen unterschiedliche Ausprägungen der *Hvnotch*-Expression. Sie deuten erneut die Entstehung von Tieren mit einem oder zwei Tentakeln an, da in den abnormen zentralen oder seitlichen Auswüchsen jeweils apikal eine *Hvnotch*-Expression zu beobachten ist (siehe Abb. 3-33I, L, M-O).



**Abb. 3-33:** *in situ*-Hybridisierungen für *Hvnotch* an DMSO- bzw. DAPT-behandelten Kopfregeneraten nach 8, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden Regenerationszeit; BM-Purple wurde für die Färbereaktionen eingesetzt (blaue Signale); Maßstab: 60µm.

### 3 Ergebnisse

---

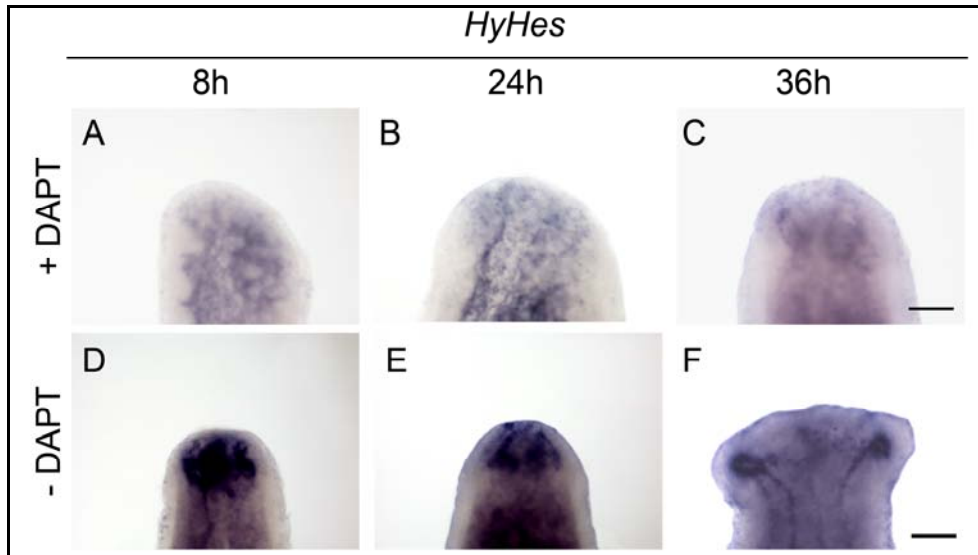
Damit konnte gezeigt werden, dass in DAPT-behandelten Kopfreparaturen die Expression des Notch-Rezeptors im Gegensatz zur Situation in adulten, intakten Tieren nicht beeinflusst ist. Dies bedeutet allerdings nicht, dass in solchen Tieren der Notch-Signalweg aktiv ist, denn die Anwesenheit des Notch-Rezeptors allein reicht nicht für dessen Aktivierung aus.

Deshalb wurde im Folgenden die Expression des Notch-Zielgens *HyHes* untersucht. Diese könnte ein Maß für die Aktivität der Notch-vermittelten Signaltransduktion sein.

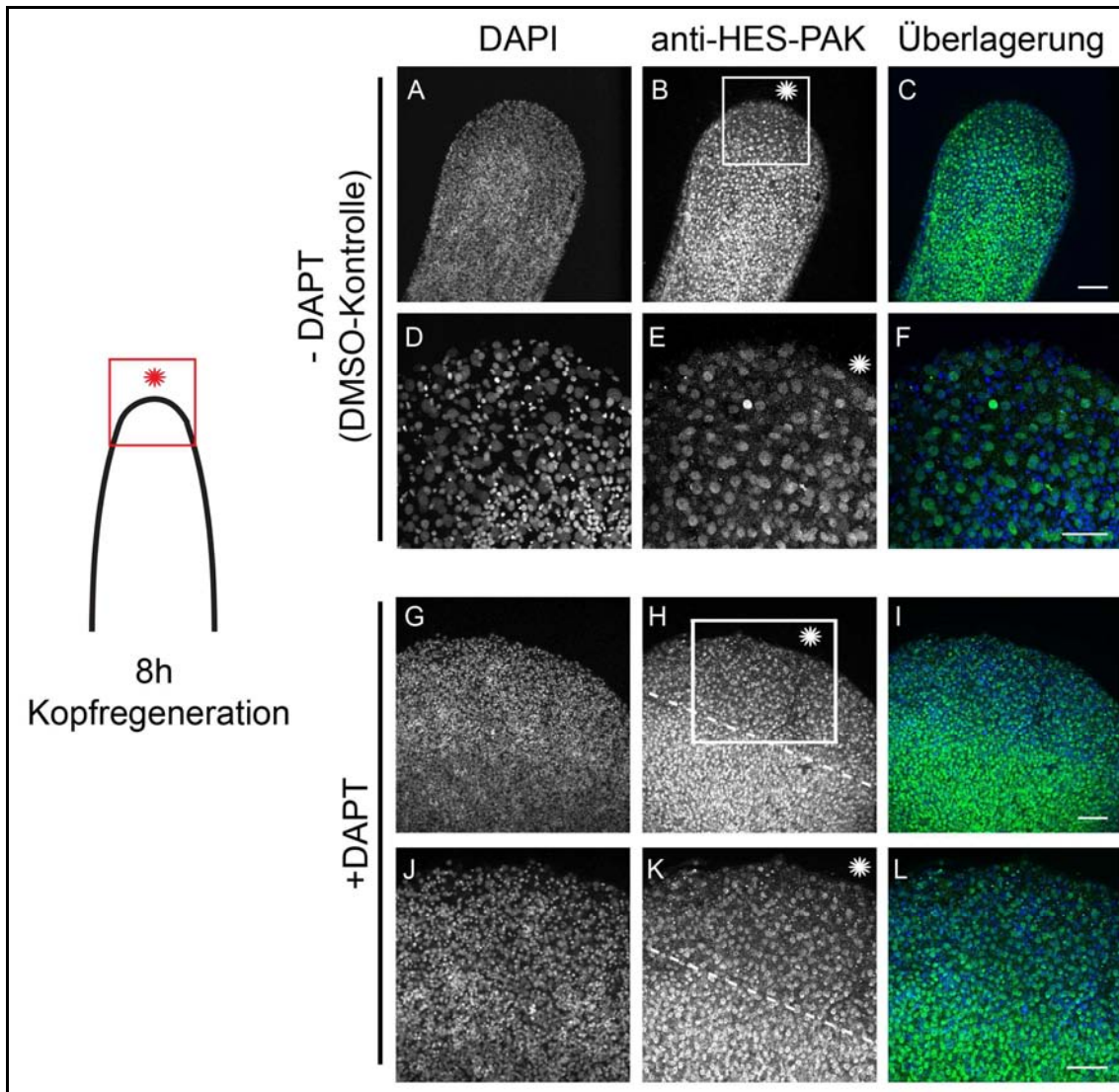
In DMSO-behandelten Kopfreparaturen konnte dasselbe Expressionsmuster wie während der Kopfregeneration unbehauelter Tiere beobachtet werden (siehe Abb. 3-32Zg-Zj und Abb. 3-34D-F). In den DAPT-behandelten Kopfreparaturen, die zwischen 8 und 48 Stunden Regenerationszeit untersucht wurden, war in etwa 50% der Tiere keine *HyHes*-Expression zu beobachten (siehe Abb. 3-34A-C). Die andere Hälfte zeigte eine normale oder erniedrigte Expression.

Mit Hilfe des anti-HES-Peptidantikörpers wurde parallel untersucht, ob auch auf Protein-Ebene eine Reduktion der Expression des HyHES-Proteins in DAPT-behandelten Kopfreparaturen beobachtet werden kann. Hierfür wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von DMSO- und DAPT-behandelten Kopfreparaturen nach 8 Stunden Regenerationszeit angefertigt. Für HyHES konnte in DMSO-Kontroll-Regeneraten nach 8 Stunden Regenerationszeit keine veränderte Expression in den Kernen ektodermaler Epithelzellen in der apikalen Kappe beobachtet werden (siehe Abb. 3-35A-F). In einigen Kopfreparaturen zeigte jeweils eine einzelne, im Zentrum der apikalen Kappe liegende Zelle eine sehr stark erhöhte Kernfärbung (siehe Abb. 3-35B, E). In DAPT-behandelten 8 Stunden-Kopfreparaturen dagegen sind die Kerne der apikalen Kappe noch gefärbt, allerdings weniger stark. Eine deutliche Grenze zum Rumpf hin mit starker HyHES-Expression ist erkennbar (siehe Abb. 3-35G-L). Dies spiegelt die Expressionsdaten wider.

Damit ist die Expression des Notch-Zielgens *HyHes* während der Kopfregeneration durch DAPT unterdrückt. Dies zeigt, dass DAPT in dieser Situation tatsächlich auf die kanonische Notch-Signalweiterleitung wirkt.



**Abb. 3-34:** *in situ*-Hybridisierungen für *HyHes* an DMSO- bzw. DAPT-behandelten Kopfregeneraten nach 8, 24 und 36 Stunden Regenerationszeit. NBT/BCIP wurde für die Färbereaktionen eingesetzt (blaue Signale); Maßstab: 60µm.



**Abb. 3-35:** Immunfluoreszenzfärbungen von DMSO-Kontroll- und DAPT-behandelten 8 Stunden Kopfregeraten mit dem anti-HES-Peptidantikörper; links: Schematische Darstellung eines Kopfregerates mit 8h Regenerationszeit; zukünftige Hypostomregion mit Stern markiert; (A-F) DMSO-Kontroll-Kopfregerat; (G-L) DAPT-behandeltes Kopfregerat; (H, K) Grenze zwischen apikaler, regenerierender Kappe und Rumpf mit gestrichelter Linie dargestellt; (A, D, G, J) DNA-Färbung mit DAPI; (B, E, H, K) anti-HES-PAK-Färbung; (C, F, I, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-HES-PAK-Färbung (grün); Confokale Schnitte; Maßstäbe: 100µm.

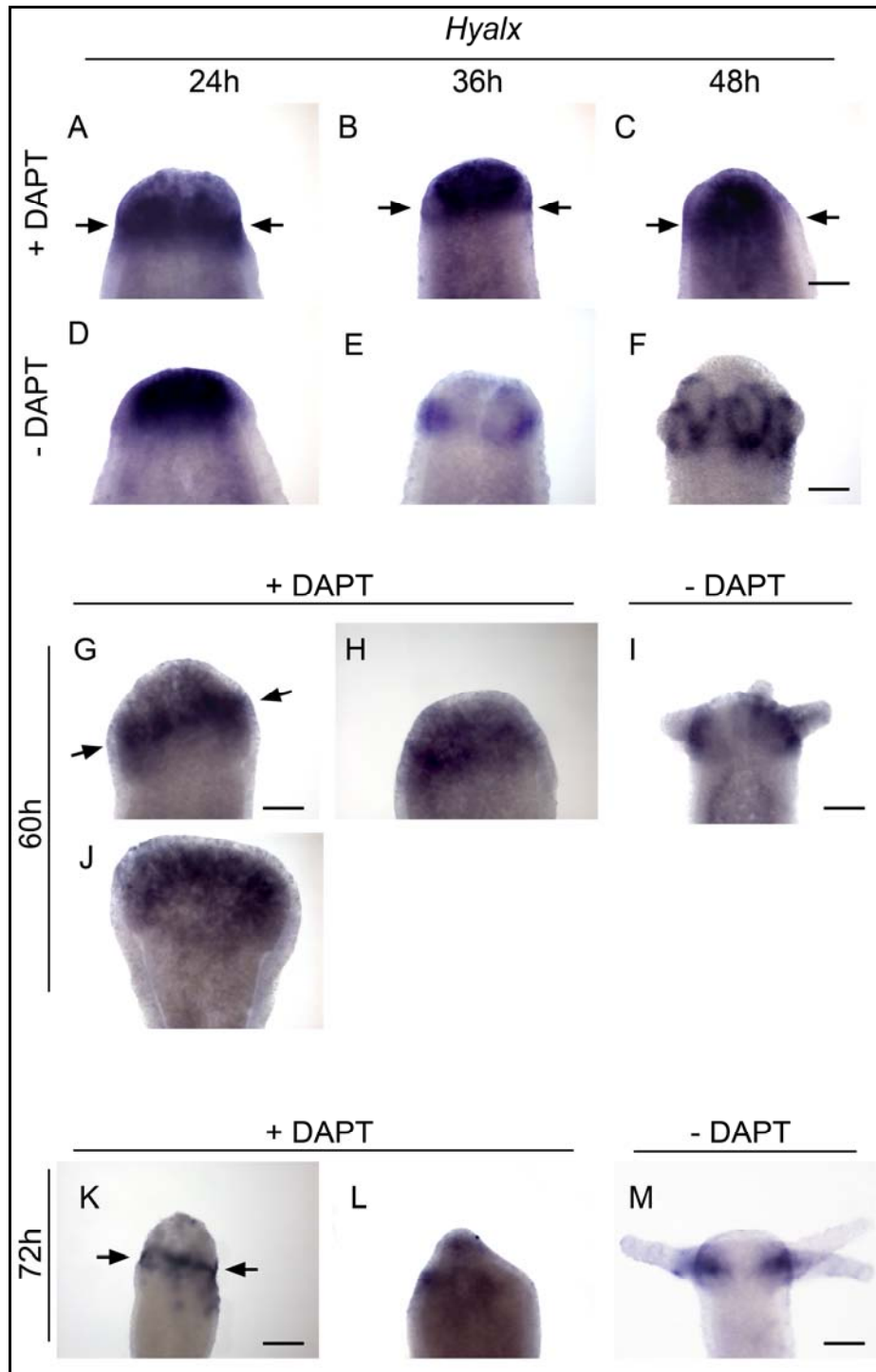


---

### **Die Expression von *Hyalx* ist gestört und markiert eine veränderte Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln**

Für *Hyalx* konnte in DMSO-Kontrolltieren dasselbe Expressionsmuster wie zuvor in unbehandelten Regeneraten beobachtet werden (siehe Abb. 2-15W-Y, Abb. 3-32U-X und Abb. 3-36D-F).

Seine Expression ist unabhängig von der Behandlung mit DAPT nach 24 Stunden Regenerationszeit in der gesamten regenerierenden Kappe zu detektieren (siehe Abb. 3-36A). Während diese im weiteren Verlauf der Regeneration in unbehandelten und DMSO-Kontroll-Regeneraten auf einen basalen Ring (auf Höhe der zukünftigen Tentakelzone) zunächst auf punktförmige Domänen und später auf die Tentakelbasis beschränkt wird, bleibt sie in DAPT-behandelten als Kappe bestehen (siehe Abb. 3-36B, C, E, F). Erst gegen Ende der DAPT-Behandlung und besonders nach der Entfernung des Inhibitors wird die *Hyalx*-Expression in DAPT-behandelten Kopfregeneraten oftmals auf einen das Tier schmalen, umlaufenden Ring begrenzt (siehe Abb. 3-36A-C, G, K, schwarze Pfeile). *Hyalx* markiert hierdurch das über diesem Ring liegende Gewebe als Tentakelgewebe. Ab einer Regenerationszeit von 60 Stunden bis 72 Stunden ist *Hyalx* in unterschiedlichen Ausprägungen und Mustern exprimiert. Die Diversität reicht hierbei von Tieren mit Expression in der gesamten apikalen Kappe (siehe Abb. 3-36H, J) bis hin zu einem breiten Band unterhalb des zukünftigen Bereichs des Hypostoms (siehe Abb. 3-36G, K). Teilweise schien das vorhandene Signal punktförmig stärker lokalisiert zu sein (siehe Abb. 3-36G, L).



**Abb. 3-36:** *in situ*-Hybridisierungen für *Hyalx* an DMSO- bzw. DAPT-behandelten Kopfregeranten nach 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden Regenerationszeit; BM-Purple wurde für die Färbereaktionen eingesetzt (blaue Signale); Maßstab: 60µm.

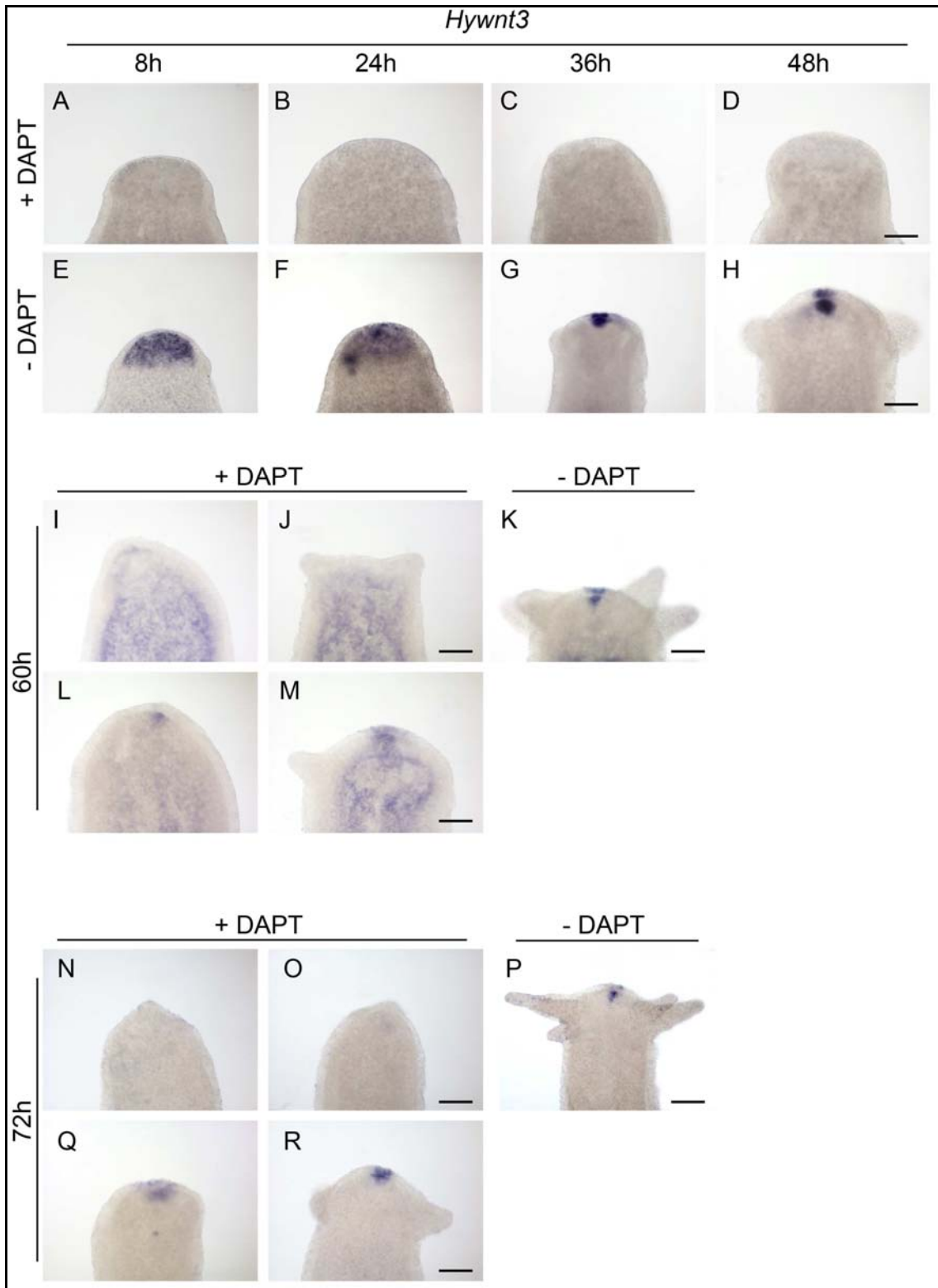
---

### Die Expression von *Hywnt3* ist inhibiert

*Hywnt3* wird in Kontrolltieren während der Kopfregeneration in demselben dynamischen Expressionsmuster wie in unbehandelten exprimiert (siehe Abb. 3-32E-H und Abb. 3-37E-H).

In DAPT-behandelten Kopfregeneraten konnte in den ersten 48 Stunden der Regeneration kein *Hywnt3*-Signal detektiert werden (siehe Abb. 3-37A-D). Dies spiegelt wider, dass die entsprechenden Tiere auch auf phänotypischer Ebene keinerlei Anzeichen einer neuen Kopfbildung, wie etwa Tentakelknospen zeigten. Nach 60 bzw. 72 Stunden andauernder Regeneration konnten wieder verschiedene Phänotypen mit beinahe normalen, aber auch abnormen Kopfstrukturen beobachtet werden. Die *in situ*-Hybridisierungen zeigten dementsprechend unterschiedliche *Hywnt3*-Expressionsmuster. Bei beiden Zeitpunkten gab es Tiere ohne jegliche Färbung (siehe Abb. 3-37I, J, N, O). Daneben traten Tiere auf, die *Hywnt3* exprimierten, aber in einem veränderten Muster. Hierbei war *Hywnt3* nur punktförmig, apikal an der regenerierenden Kappe ausschließlich im Endoderm exprimiert (siehe Abb. 3-37L, Q). Lediglich ein geringer Anteil von Polypen wies die charakteristische, auf das Hypostom begrenzte Expression auf (siehe Abb. 3-37M, R).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-37:** *in situ*-Hybridisierungen für *Hywnt3* an DMSO- bzw. DAPT-behandelten Kopfrege-  
neraten nach 8, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden Regenerationszeit; NBT/BCIP wurde für die Färbe-  
reaktionen eingesetzt (blaue Signale); Maßstab: 60µm.

---

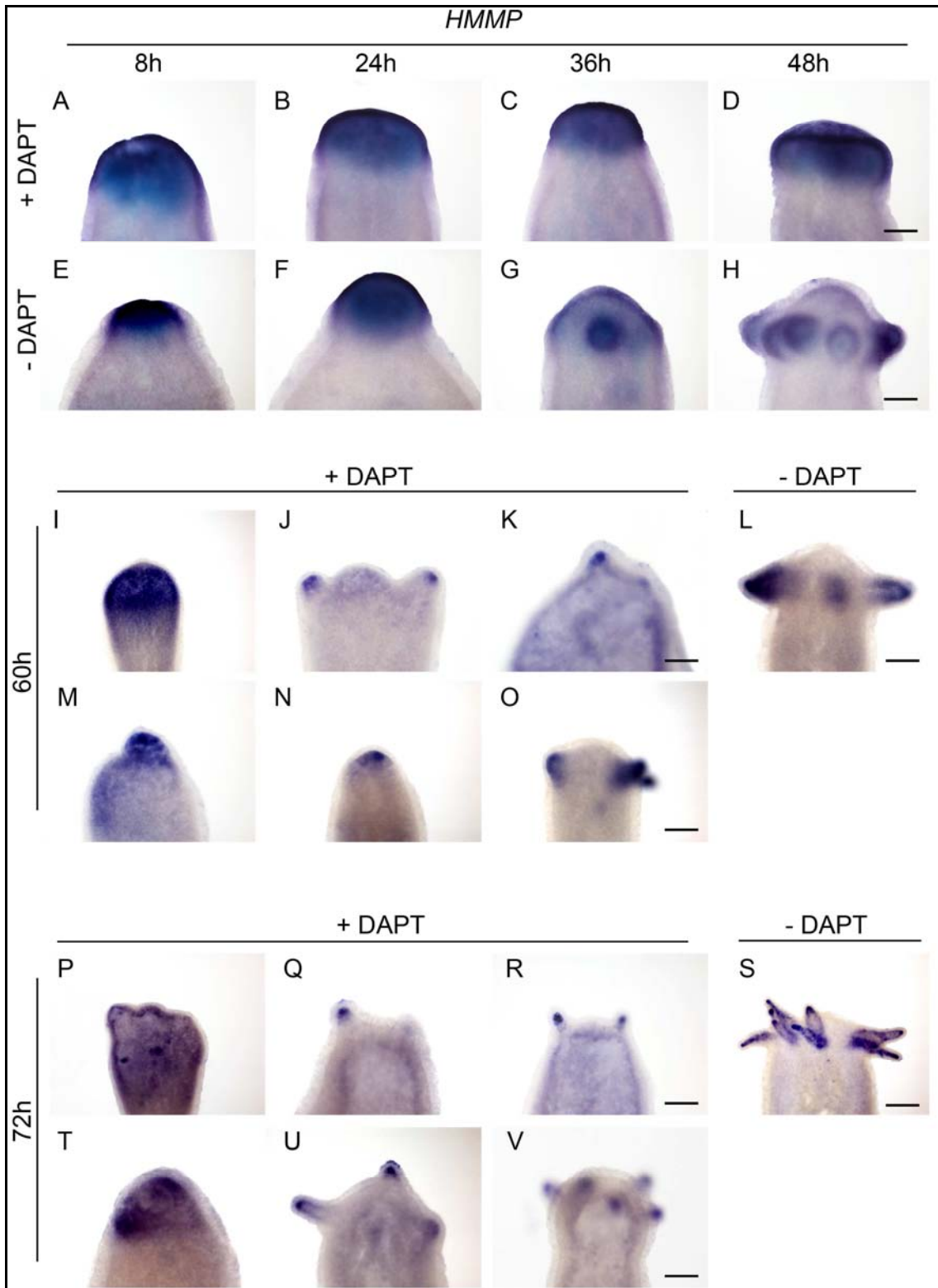
### Die Expression des tentakelspezifischen Gens *HMMP* ist gestört

Anschließend wurde das Gen *HMMP* als Marker für Tentakelgewebe in *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt. Es wird in unbehandelten und DMSO-behandelten Kopfreparaturen in demselben Muster exprimiert (siehe Abb. 3-32Y-Zb und Abb. 3-38E-H).

*In situ*-Hybridisierungen an DAPT-behandelten Tieren zu den gewählten Regenerationszeitpunkten zeigten, dass *HMMP* zwar weiterhin exprimiert wird, aber genau wie *Hyalx* in einem veränderten Muster. Nach 8, 24, 36 und 48 Stunden Regenerationszeit ist *HMMP* in der gesamten apikalen, regenerierenden Kappe im Ekto- und Endoderm exprimiert (siehe Abb. 39A-D). Ab einer Regenerationszeit von 60 Stunden wird *HMMP* abhängig vom Phänotyp der Kopfreparate in unterschiedlichen Mustern exprimiert. Es wurde entsprechend dem Fortschritt der Tentakelmorphogenese entweder fortwährend in der gesamten apikalen Kappe oder in kleinen tentakelähnlichen Ausstülpungen bzw. in mehr oder weniger korrekt angeordneten Tentakeln exprimiert (siehe Abb. 39I-V).

Daraus kann man schließen, dass die für die 60 und 72 Stunden Regenerationszeitpunkte zuvor beschriebenen, zentralen oder seitlichen, abnormen Auswüchse DAPT-behandelter Kopfreparate Tentakelgewebe darstellen und sich Tiere mit einem oder nur zwei Tentakeln ohne jegliches Hypostom entwickeln. Im gesamten Gewebe, das jeweils im Vergleich oberhalb der ringförmigen, das Tier umlaufenden *Hyalx*-Expressionszone in DAPT-behandelten Kopfreparaturen liegt, wird *HMMP* exprimiert und kennzeichnet es dadurch als Tentakelgewebe (siehe Abb. 3-36G und 3-38N bzw. 3-36L und 3-38M).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-38:** *in situ*-Hybridisierungen für *HMMP* an DMSO- bzw. DAPT-behandelten Kopfgeneraten nach 8, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden Regenerationszeit; BM-Purple wurde für die Färbereaktionen eingesetzt (blaue Signale); Maßstab: 60µm.

### 3.2.2.3 DAPT-behandelte regenerierende Kappen verlieren die Fähigkeit zur Induktion einer zweiten Körperachse

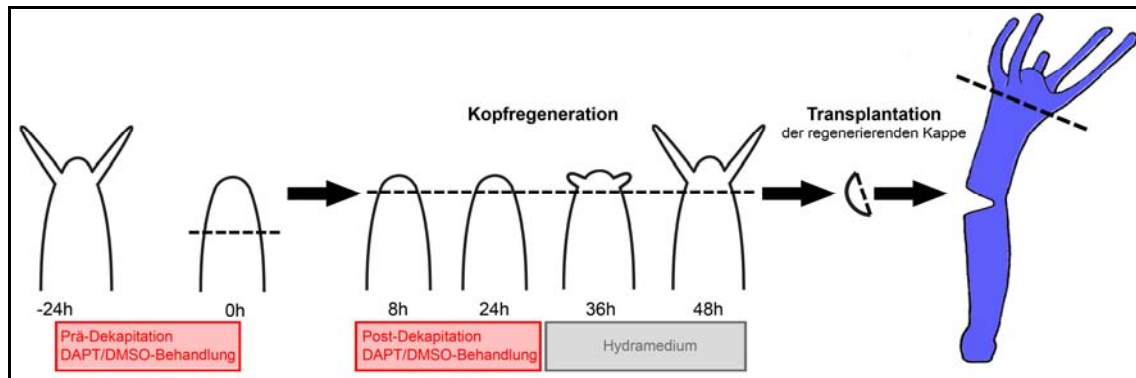
*Hywnt3* stellt eines der ersten Gene dar, das während der Kopfregeneration eines unbehandelten Tieres exprimiert wird und eine Wnt-Genkaskade aktiviert, die zur Etablierung eines Kopforganisators in *Hydra* und zur Organisation der Körperachse führt (siehe Abschnitt 2.4.2.3 und 2.4.4.3; Bode *et al.*, 2009; Hobmayer *et al.*, 2000).

Da die Expression von *Hywnt3* in den regenerierenden, apikalen Kappen DAPT-behandelter Kopfregenerate bis zu einer Regenerationszeit von 48 Stunden nicht detektiert werden konnte, wurden Transplantationsversuche durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Kappe eines regenerierenden Kopfes mit *Hywnt3*-Expression ein hohes Potential zur Induktion einer sekundären Achse besitzt, wenn es in die Mitte eines intakten Wirtstieres transplantiert wird (Bode *et al.*, 2009; MacWilliams, 1983a und b; Wilby und Webster, 1070). Es sollte deshalb getestet werden, ob im Vergleich mit DMSO-Kontroll-Kopfregeraten regenerierende Kappen von DAPT-behandelten Tieren überhaupt eine sekundäre Achse induzieren können.

In Abb. 3-39 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Zunächst wurden intakte Tiere wieder für 24 Stunden mit DAPT bzw. die Kontrolltiere mit 1%DMSO behandelt, bevor sie bei der Hälfte (4/8) ihrer Körperlänge zweigeteilt wurden (Prä-Dekapitation DAPT/DMSO-Behandlung). Im Anschluss wurden die sich regenerierenden Hydren weitere 24 Stunden in DAPT- bzw. DMSO-Kontrollmedium inkubiert und dann in Hydramedium überführt (Post-Dekapitation DAPT/DMSO-Behandlung). Nach 8, 24, 36 und 48 Stunden Regenerationszeit wurde den Kopfregeraten die apikale Kappe (5/8) entfernt und in die Mitte (50% Körperlänge) eines blauen Wirtstieres transplantiert. Kurz vor der Transplantation wurde diesem ebenfalls der Kopf entfernt, allerdings direkt unterhalb des Tentakelkranzes (75% Körperlänge). Dies sollte den durch den Kopforganisator des Wirtstieres produzierten Kopfinhibitor entfernen und so die Entwicklung des Transplantats und die Ausbildung einer sekundären Achse er-

### 3 Ergebnisse

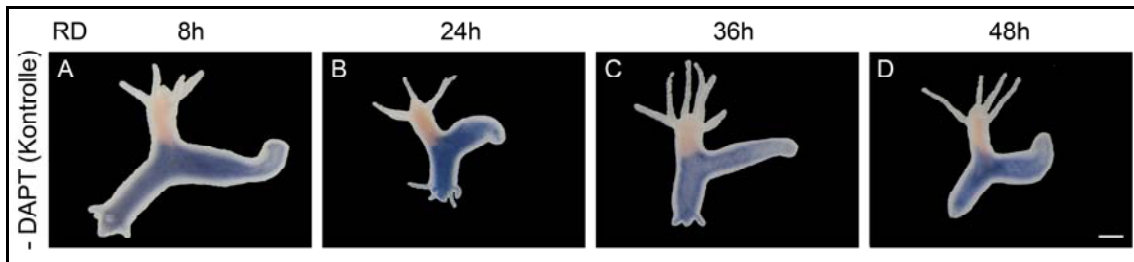
leichtern und das Experiment insgesamt empfindlicher machen. Die Transplantate wurden jeweils nach 2 Tagen auf die Ausbildung einer sekundären Achse untersucht, da in einem Vorversuch gezeigt werden konnte, dass zu diesem Zeitpunkt die zweite Achse vollständig etabliert ist.



**Abb. 3-39:** Schematische Darstellung des Transplantationsversuches zum Test der Fähigkeit DMSO- bzw. DAPT-behandelter Kopfgenerate sekundäre Achsen auszubilden.

100% der DMSO-behandelten Transplantate bildeten zu jedem der vier untersuchten Zeitpunkte sekundäre Achsen aus, d.h. einen Kopf mit Hypostom und darunterliegendem Tentakelkranz aus langen Tentakeln. Auch das Wirtstier hatte innerhalb der zwei Tage bis zur Auswertung immer einen intakten Kopf regeneriert (siehe Abb. 3-40 und Abb. 3-42). Allerdings verlief die Regeneration des Wirtskopfes langsamer als die der sekundären Achse, was an kürzeren Tentakeln zu erkennen ist. Zu beobachten ist außerdem, dass nach Transplantation eines 48 Stunden regenerierten Kopfes oftmals das Wirtstier gar keinen Kopf mehr nachbildete. Der implantierte Kopf wies ja bereits zum Zeitpunkt der Transplantation ein Hypostom und kurze Tentakel auf, weshalb er vermutlich direkt als primäres Organisationszentrum fungierte.



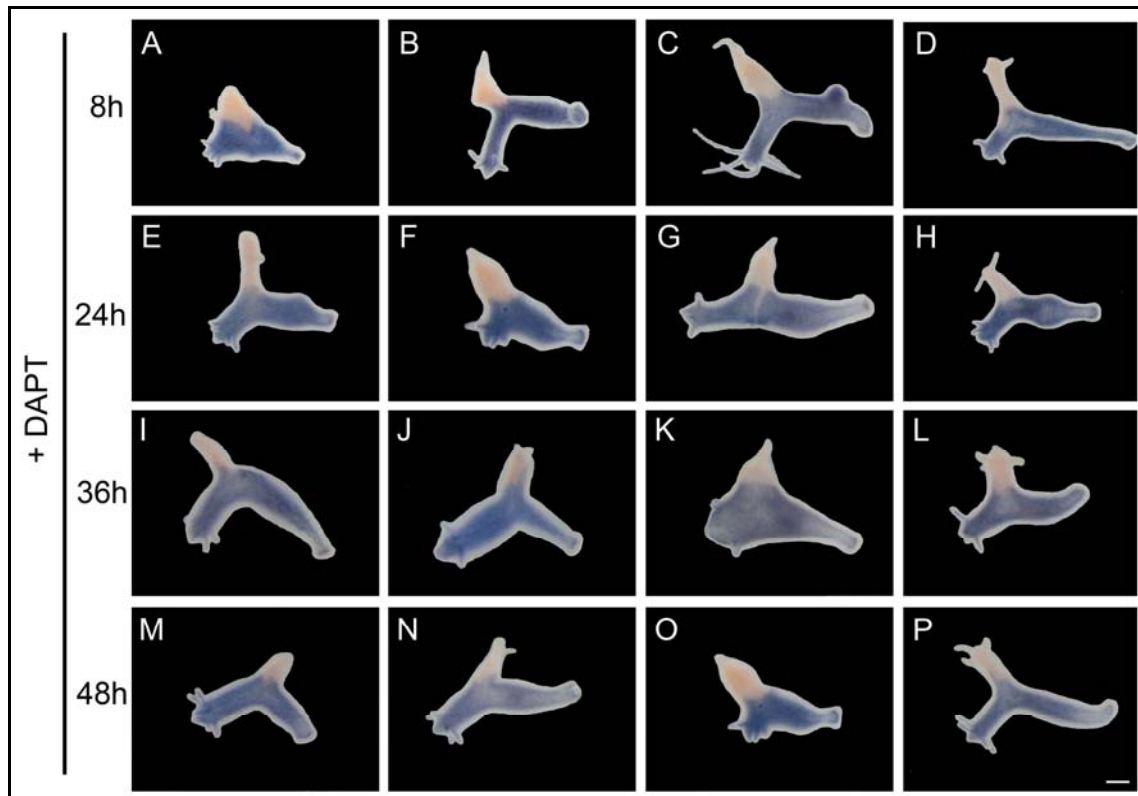


**Abb. 3-40:** Morphologie DMSO-behandelter Transplantate nach 8, 24, 36 und 48 Stunden Kopf-Regenerationsdauer (RD); Maßstab: 300µm.

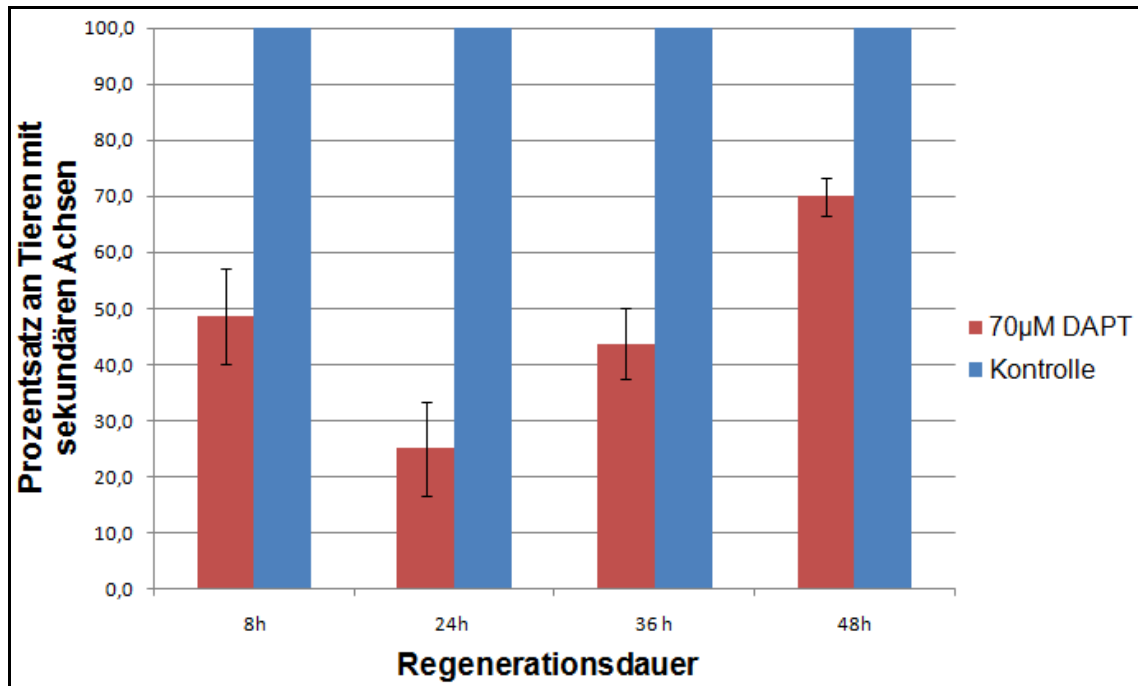
In DAPT-behandelten Tieren ließ sich eine Reduktion des Induktionspotentials sekundärer Achsen abhängig von der Regenerationsdauer feststellen. Lediglich 48% der nach 8 Stunden transplantierten Kopfgenerate und nur 33% der 24-stündigen Regenerate konnten noch eine sekundäre Achse induzieren. Die jeweils verbleibenden 52% bzw. 67% der Transplantate konnten keine zweite Achse induzieren und wiesen abnorme Morphologien auf (siehe Abb. 3-41 und Abb. 3-42). Ähnlich wie nach DAPT-Behandlung der Kopfgenerate zuvor konnten entweder gar keine Regenerationsanzeichen ausgemacht werden, oder sie bildeten einen einzelnen Tentakel oder aber sonstige abnorme, sogar zangenartige Strukturen aus (siehe Abb. 3-31, Abb. 3-41 und Abb. 3-42). Dies war auch bei 46% bzw. 30% der Transplantate mit 36 und 48 Stunden Kopfregenerationsdauer der Fall (siehe Abb. 3-41 und Abb. 3-42). Die jeweils verbleibenden 44% bzw. 70% konnten sekundäre Achsen ausbilden.

Damit konnte gezeigt werden, dass DAPT-behandelte Transplantate insgesamt ein reduziertes Potential zur Ausbildung sekundärer Achsen besitzen und dass dieses in Transplantaten mit 24 Stunden Regenerationsdauer am niedrigsten ist. In Transplantaten von 36 und 48 Stunden Regeneraten nimmt dann der Anteil derjenigen wieder zu, die sekundäre Achsen induzieren können. Insgesamt scheint somit durch eine DAPT-Behandlung die Fähigkeit regenerierender Kappen zur Induktion sekundärer Achsen gestört, aber nicht völlig inhibiert zu sein.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3-41:** Induktionspotential sekundärer Achsen DMSO- und DAPT-behandelter Kopfregerate unterschiedlicher Regenerationsdauer; (A-P) Übersicht über die beobachteten Phänotypen der Transplantate; (A-D) 8 Stunden Regenerationszeit; (E-H) 24 Stunden Regenerationszeit; (I-L) 36 Stunden Regenerationszeit; (M-P) 48 Stunden Regenerationszeit; Maßstab: 300 $\mu$ m.



**Abb. 3-42:** Prozentsatz an Tieren mit sekundären Achsen nach Transplantation unterschiedlich lang regenerierter DMSO- bzw. DAPT-behandelter Kopfkappen; Die Regenerationszeiten betragen 8, 24, 36 und 48 Stunden.



## 4 Diskussion

In *Hydra* sind auch im erwachsenen Tier axiale Musterbildungsprozesse ständig aktiv. Dies ermöglicht die Regeneration und die Aufrechterhaltung der Größe und Gestalt eines Polypen, aber auch die Neuausbildung und Erhaltung von Grenzen zwischen verschiedenen Geweben bzw. Körperregionen bei beiden Prozessen.

Im adulten, knospenden Tier existieren zwei wichtige solcher Grenzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Eine Grenze zwischen Elterntier und Knospe und eine weitere liegt im Kopf zwischen Hypostom, Rumpf und Tentakeln. Durch Inhibitionsversuche mit DAPT konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg bei der Etablierung und Aufrechterhaltung beider Grenzen neben dem Wnt- und FGF/FGFR-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt. *HyHes* wird im knospenden Tier an der Grenze zwischen Muttertier und Knospe und *Hvnotch* im adulten Kopf an der Tentakelbasis erhöht exprimiert (siehe Abb. 3-10B, C und Abb. 3-23A-C). Die Expression beider Gene kann daneben auch während der Kopfregeneration detektiert werden (siehe Abb. 3-32Zc-Zj). *HyHes* stellt vermutlich bei beiden Prozessen ein primäres Zielgen des *Hydra* Notch-Rezeptors HvNotch dar.

### 4.1 Bedeutung des Notch-Signalweges für die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe

#### 4.1.1 *HyHes* ist ein primäres Zielgen des HvNotch-Rezeptors

Durch eine *in vivo*-Reporteranalyse konnte bewiesen werden, dass *HyHes* ein primäres Zielgen von HvNotch darstellt. Im Promotor des *HyHes*-Gens existieren insgesamt fünf Bindestellen für einen Transkriptionsfaktor der CSL-Familie (siehe Abb. 3-2, Abb. 3-3 und Abb. 3-4; S1-S5). Diese sind jedoch nicht wie in den Promotoren der *E(spl)*-Gene von *Drosophila* oder der *Hes*-Gene der

Maus als typisch gepaarte, antiparallele Bindestellen (SPS - *Su(H) paired sites*) angeordnet. Die Bindestellen S1 und S2 bzw. S4 und S5 überlappen jeweils in drei Nukleotiden und liegen antiparallel zueinander vor. Es konnte bewiesen werden, dass die Expression von Genen, die unter Kontrolle der ersten 600bp des *HyHes*-Promotors stehen, damit eine Region, die die beiden *Su(H)*-Bindestellen S1 und S2 enthält, durch einen aktiven Notch-Signalweg in Form von überexprimiertem *HvNICD* oder  $N^{AE}$  aktiviert werden kann (siehe Abb. 3-5F-M). Durch Mutagenese beider Bindestellen konnte außerdem gezeigt werden, dass diese für die Aktivierung der Genexpression ausreichend und notwendig sind (siehe Abb. 3-5V-Y). Darüber hinaus konnte die Antwort des Promotors auf einen aktiven Notch-Signalweg durch Einbringen zweier, zusätzlicher CSL-Bindestellen erhöht werden (siehe Abb. 3-5N-U).

Die Analyse des *HyHes*-Promotors zeigte auch, dass dieser weitere, wichtige Elemente enthält, die für die Regulation der Expression von *Hes*-Genen notwendig sind. Insgesamt können sechs bzw. acht putative, so genannte E-Boxen, wovon eine bzw. drei in die Gruppe B einzuordnen sind, identifiziert werden (siehe Abb. 3-2 und Abb. 3-4). An diese können aktivierende Transkriptionsfaktoren der bHLH-Superfamilie binden. Es ist bekannt, dass *NICD*, *CSL*-Transkriptionsfaktoren und andere gewebe- bzw. zellspezifische aktivierende bHLH-Faktoren, wie z.B. proneurale Proteine, synergistisch zusammenwirken müssen, um die Expression von *Hes*-Genen effektiv anschalten zu können (Cave *et al.*, 2005; Maeder *et al.*, 2007; Singson *et al.*, 1994). Diese Möglichkeit ist für *HyHes* durch die Identifizierung der E-Box-Sequenzen damit theoretisch gegeben. Daneben kommen zwei bzw. vier putative N-Boxen der Klasse C vor. An diese können reprimierende bHLH-Transkriptionsfaktoren, worunter die HES-Proteine selbst fallen, binden. Dadurch könnte *HyHES* seine eigene Expression in einem autokatalytischen „*Feedback-Loop*“ hemmen. Dies ist Voraussetzung dafür, dass HES-Faktoren z.B. während der Somitogenese in der Embryonalentwicklung von Vertebraten, als molekulare Oszillatoren wirken können (Kramatschek und Campos-Ortega, 1994).

#### 4.1.2 Erst die Genexpression in der späten Knospung markiert eine scharfe Grenze zwischen Muttertier und Knospe

Die vegetative Fortpflanzung, die so genannte Knospung, ist ein ständig in *Hydra* ablaufender Entwicklungs- und Musterbildungsprozess. In deren Verlauf wird durch Rekrutierung von elterlichem Gewebe aus konzentrischen Ringen am unteren Drittel des Rumpfes, in der Knospungszone einer adulten Hydra, ein neuer, kleiner Polyp ausgebildet (siehe Abb. 2-11 und Abb. 2-12; Berking, 2003; Otto und Campbell, 1977). Voraussetzung für dessen vollständige Entwicklung ist die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe.

Wie in der Einleitung dargestellt, sind bereits am dem ersten Knospungsstadium zahlreiche kopfspezifische Gene aus verschiedenen Signalwegen in einem bestimmten Muster exprimiert (Abschnitt 2.4.2.2). Hierzu zählen hypostomspezifische Gene (*Hyβ-cat*, *Hytcf*, *Hywnt3*, *Hykri*, *HvPKC2*, *Hybra*, *budhead*, *Cngsc*; siehe Abb. 2-13A-C, I, K, M, N, P, Stadium 1-3) und Gene, die an der Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln oder direkt in den Tentakeln exprimiert werden (*Hvwnt5*, *Hvwnt8*, *Hmfz2*, *Hydsh*, *HvPKC1*, *Hyalx*, *HMMP*, *Cnotx*, *HyBMP5-8b*; siehe Abb. 2-13E-H, J, L, Q-S, Stadium 1-3;). Die Expression von fußspezifischen Genen, wie *CnNK-2* kann jedoch noch nicht beobachtet werden (siehe Abschnitt 2.4.2.2; siehe Abb. 2-13O, Stadium 1-3). Das zukünftige, basale Knospengewebe scheint demnach nicht wie das apikale von Beginn an auf dem Muttertier determiniert zu sein. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass zwischen zukünftigen Knospenzellen und solchen, die im Muttertier verbleiben, noch keine scharfe Grenze beobachtet werden kann. Das einzige Gen, das mit seiner kreisförmigen Expressionsdomäne wohl den gesamten kreisförmigen Bereich konzentrischer Ringe auf dem Muttertier abdeckt, aus dem Zellen in die Knospe rekrutiert werden, ist *Cnotx* (siehe Abschnitt 2.4.2.2; siehe Abb. 2-13R, Stadium 1-3). Der Übergang zwischen positiven und negativen Zellen ist aber eher diffus und veranschaulicht die Existenz einer noch unscharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe.

Wenn jedoch die Knospe die ersten Tentakelknospen ausbildet, der Einstrom elterlicher Zellen endet und die knospeneigene Morphogenese und Differenzierung beginnt, muss es zur deutlichen Ausbildung und Schärfung einer solchen Grenze kommen, um eine vom Elterntier unabhängige Entwicklung und Fußbildung der Knospe zu ermöglichen. Die ersten Anzeichen einer am basalen Ende der Knospe lokalisierten Grenze sind in etwa ab der Hälfte des Knospungsprozesses, ab Stadium 5 zu erkennen. Ab diesem Zeitpunkt kann die Expression fußspezifischer Gene, wie *CnNK-2* detektiert werden (siehe Abb. 2-13O, Stadium 5; Grens *et al.*, 1996). Auch Gene des nicht-kanonischen Wnt- und des FGF/FGFR-Signalweges werden parallel an der Knospbasis exprimiert (*Hvwnt8*, *Hmfz2*, *Hydsh* und *kringelchen*; siehe Abb. 2-13F-I, Stadium 5 und Abb. 3-10E, I, M; Philipp *et al.*, 2009; Sudhop *et al.*, 2004). Auffällig ist, dass alle Gene zunächst in einem relativ breiten, diffusen Band, das sowohl Zellen des Elterntieres als auch der Knospe umfasst und die Knospbasis ringförmig umschließt, exprimiert werden.

Wenn sich dann in Knospungsstadium 8 die Knospbasis einzuschnüren beginnt, wird die Expression der drei Gene *Hvwnt8*, *Hydsh* und *kringelchen* auf ein relativ schmales, scharfes Band begrenzt (siehe Abb. 2-13F-I, Stadium 8-9 und Abb. 3-10F, G, J, K, N, O). Das Gewebe des Muttertieres wird ab diesem Stadium nun deutlich und scharf von dem der Knospe abgegrenzt. Es wurde bereits gezeigt, dass eine derart geschärfte Grenze für die Morphogenese am Fuß der Knospe und für ihre Abspaltung vom Muttertier benötigt wird (Sudhop *et al.*, 2004).

### **4.1.3 Auch Gene des Notch-Signalweges werden an der scharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe exprimiert**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HvNotch-Zielgen *HyHes* erst ab dem „Einschnürungs-Stadium 8“ an der Knospbasis exprimiert wird, und zwar in einem schmalen Streifen ektodermalen Epithelzellen (siehe Abb. 3-10B,



C). Auch eine leicht erhöhte Proteinexpression konnte in diesem Stadium mit Hilfe eines spezifischen anti-HES-Peptidantikörpers beobachtet werden (siehe Abb. 3-7A, B). Die *HyHes*-Expression ist transient und auf dieses Stadium beschränkt. Sobald die Knospe in Stadium 9 beginnt, fußspezifische Zellen auszubilden, was anhand der Expression fußspezifischer Gene wie *PPOD-1* oder der Aktivität einer Peroxidase gezeigt wurde, konnte *HyHes* nicht mehr detektiert werden (siehe Abb. 3-10X, Zb). Auch die Expression der Matrix-Metalloprotease *MMP-A3* konnte in Knospungsstadium 8 zum ersten Mal während des Knospungsprozesses detektiert werden (siehe Abb. 3-10Q-T). Sie bleibt aber anders als *HyHes* bis zum Ende der Knospung durchgehend an der sich einschnürenden Knospenbasis exprimiert. Damit korreliert der Beginn der *HyHes* und *MMP-A3*-Expression direkt mit der einsetzenden Einschnürung der Knospenbasis und dem Moment, in dem die Schärfung der Grenze zwischen Elterntier und Knospe stattfindet.

Mit dieser Schärfung ist die Ausbildung zweier benachbarter, streifenförmiger und deutlich voneinander getrennter Genexpressionsdomänen gemeint. Dies konnte durch Doppel-*in situ*-Hybridisierungsexperimente in Knospungsstadium 8 gezeigt werden. *kringelchen*, *MMP-A3* und *Hydsh* werden in denselben Zellen auf dem Muttertier an der Basis der Knospe jeweils benachbart zu *HyHes* auf der Knospe exprimiert (Abb. 3-11). Vermutlich wird in den *HyHes*-positiven Zellen auch *Hvwnt8* exprimiert. Dies erscheint aufgrund der *in situ*-Hybridisierungen sehr wahrscheinlich (siehe Abb. 2-13F, Stadium 5 und 8-9; Abb. 3-10J, K).

Nach der Ausbildung einer stabilen, scharfen Grenze kann es dann in beiden Genexpressionsdomänen zur unabhängigen Entwicklung spezifischer Strukturen kommen. Auf der Seite der Knospe wird die Expression fußspezifischer Gene wie *PPOD-1* und damit die Ausdifferenzierung von Fußzellen ermöglicht. Auf der Seite des Muttertieres kann die immer weiter voranschreitende Einschnürung und letztlich die Abschnürung der Knospe weiter vorangetrieben werden. Hierfür könnte die Aktivität der Matrix-Metalloprotease *MMP-A3* durch Umgestaltung oder Abbau von Komponenten der Mesoglea verantwortlich sein. Auf-

grund der Konservierung ihres aktiven Zentrums und ihrer Domänenstruktur und der Ähnlichkeit zu der bereits beschriebenen HMMP (siehe Anhang Abb. 7-6; Leontovich *et al.*, 2000), scheint dies wahrscheinlich.

### **4.1.4 Der Notch-Signalweg ist für die Schärfung der Grenze zwischen Muttertier und Knospe in der späten Knospung verantwortlich**

Käsbauer *et al.* (2007) konnten zeigen, dass der Mechanismus der Notch-Signalübertragung wie in anderen Organismen über die Prozessierung des Notch-Rezeptors verläuft und somit in *Hydra* konserviert ist. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Signalübertragung durch den synthetischen Presenilin-Inhibitor DAPT verhindert werden kann, da die Kerntranslokation der HvNICD nicht stattfinden kann.

Die Behandlung knospender Hydren mit DAPT für 48 Stunden in ausreichender Konzentration führte zu einer Inhibition der Einschnürung und Fußbildung der Knospe. Sie blieben mit dem Elterntier verbunden und bildeten eine stabile zweite Körperachse, wodurch sich so genannte Y-Tiere entwickelten (Abb. 3-1A, B). Wurden diese regelmäßig gefüttert, so konnten sie wieder neue Knospen ausbilden, die sich völlig normal entwickelten und letztlich vom Y-Elterntier abspalten konnten. Wurden neu gebildete, frühe Knospen allerdings wieder mit DAPT behandelt, so wurde wiederholt die Inhibition der Knospenfußbildung beobachtet und es entstanden mehrköpfige Tiere (siehe Abb. 3-1C).

Tatsächlich scheint die Inhibition der Fußbildung der Knospen infolge einer DAPT-Behandlung auf den Knospungsprozess beschränkt zu sein. Münder *et al.* (2010) konnten zeigen, dass weder in adulten, DAPT-behandelten Tieren noch in behandelten Knospen von Y-Tieren die Fußregeneration inhibiert ist. Der Notch-Signalweg muss demnach einen anderen Prozess als die Fußbildung während der Knospung beeinflussen. Aufgrund der enormen Bedeutung des Notch-Signalweges für Grenzbildungsprozesse und der beschriebenen

Genexpressionsmuster während der Knospung lag die Vermutung nahe, dass er eine Rolle bei der Ausbildung der scharfen Grenze zwischen Elterntier und Knospe während der Knospung besitzen könnte, was Voraussetzung für die Knospenfußbildung ist.

Nach DAPT-Behandlung war nicht nur die Morphologie knospender Tiere, sondern auch die Genexpression verändert. Nach 48-stündiger DAPT-Behandlung knospender Tiere konnte in *in situ*-Hybridisierungen weder die Expression von *HyHes* noch die von *MMP-A3* detektiert werden (siehe Abb. 3-12C, D). Dies geht einher mit der Tatsache, dass in DAPT-behandelten Tieren kein Knospungsstadium 8, in dem die Einschnürung der Knospenbasis stattfindet, erreicht wird. In diesem werden aber beide Gene in unbehandelten Tieren exprimiert. Dies ist damit ein indirekter Beweis dafür, dass *HyHes* das Zielgen des aktiven Notch-Signalweges im späten Knospungsprozess darstellt.

Die Expression des FGF-Rezeptors *kringelchen* war dagegen in DAPT-behandelten Tieren nicht inhibiert, allerdings fand sie sich im Vergleich mit unbehandelten bzw. DMSO-Kontrolltieren in einem völlig veränderten Muster (siehe Abb. 3-12G, Abb. 3-13C-E'' und Abb. 3-14A-C). Statt eines scharf begrenzten Bandes, das eine klare Grenze zwischen Knospe und Elterntier markiert, waren *kringelchen*-positive Zellen diffus in der Knospe und im Elterntier im Bereich der Knospenbasis verteilt. Verfolgt man die Expression von *kringelchen* in sich entwickelnden Y-Tieren nach der Entfernung des DAPT-Mediums weiter, so nimmt die Anzahl der *kringelchen*-exprimierenden Zellen von Tag zu Tag dramatisch und unregelmäßig ab. Nach insgesamt vier Tagen konnte *kringelchen* in keinem der Y-Tiere mehr detektiert werden (siehe Abb. 3-14).

Auch die Expression von *Hydsh* konnte in *in situ*-Hybridisierungen DAPT-behandelter, knospender Tiere nicht als schmale, ringförmige Expressionsbänder an der Knospenbasis detektiert werden. Der Ring war vielmehr nur noch stellenweise als vereinzelte *Hydsh*-positive Zellen erhalten, zum Teil sogar völlig verschwunden (siehe Abb. 3-12H und Abb. 3-15).

### 4.1.5 Auch ein aktiver FGF/FGFR-Signalweg ist für die Ausbildung einer Grenze zwischen Muttertier und Knospe notwendig

Die nach DAPT-Behandlung beobachteten *kringelchen*-Expressionsmuster ähnelten denen, die Sudhop *et al.* (2004) nach Inhibierung der Tyrosinkinase-Aktivität des FGF-Rezeptors Kringelchen durch SU5402 in sieben Tage alten Y-Tieren beobachtet hatten. Sie konnten zeigen, dass auch infolge der Inhibierung der FGFR-vermittelten Signalweiterleitung die *kringelchen*-Expression und die Einschnürung, Fußbildung und Abspaltung der Knospen vom Elterntier verhindert sind, was zur Entstehung von Y-Tieren führt. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abb. 3-16).

Überdies konnte hier gezeigt werden, dass die Expression von *kringelchen* bereits in 24 Stunden SU5402-behandelten, knospenden Tieren an der Knospenbasis ebenfalls in einem veränderten, diffusen Muster zu finden ist. In einigen Tieren war sie sogar völlig verschwunden (siehe Abb. 3-17C). Auch die Expression von *MMP-A3* war, allerdings in sämtlichen SU5402-behandelten Tieren, inhibiert (siehe Abb. 3-17D). Dies war zu erwarten, da genau wie bei einer Behandlung mit DAPT durch SU5402 das typische Einschnürungs-Knospungsstadium 8 fehlt. Wahrscheinlich wird deshalb in solchen Tieren auch *HyHes* nicht mehr exprimiert.

Dies bedeutet, dass für die Grenzbildung zwischen Muttertier und Knospe auch eine dem FGF-Rezeptor nachgeschaltete aktive Signalweiterleitung benötigt wird. Dies konnte bereits auf einem anderen Weg gezeigt werden. Nach Inhibierung der Src-Kinase, die durch einen aktiven FGF-Rezeptor aktiviert werden kann, mit dem spezifischen Inhibitor PP2/AG1879 früher, knospender Hydren (Stadium 3-5) konnten die Knospen ebenfalls keinen Fuß ausbilden und sich nicht vom Elterntier abspalten. Die führte wie nach Behandlung mit DAPT oder SU5402 zur Entstehung von Y-Tieren (Fabila *et al.*, 2002).

Insgesamt zeigen damit die Ergebnisse, dass für die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Knospe und Muttertier aktive Notch- und FGF/FGFR-

Signalwege gebraucht werden. Wird einer der beiden Signalwege spezifisch inhibiert, findet keine Einschnürung und Fußbildung der Knospe statt, was zur Entwicklung von Y-Tieren führt. *HyHes* und *MMP-A3* werden vermutlich in beiden Fällen nicht mehr exprimiert. Gene, wie *kringelchen* und *Hydsh*, die normalerweise auf der Seite des Muttertieres in einem schmalen Band exprimiert werden, erweitern zunächst ihre Expressionszone zu einem diffusen Muster. Dies spiegelt wider, dass keine Schärfung der Grenze zwischen Elterntier und Knospe erfolgt. Schlussendlich wird bei ausbleibender Fußmorphogenese der Knospe die Expression zuerst von *kringelchen*, dann von *Hydsh* ganz abgeschaltet.

#### 4.1.6 Modell der ablaufenden Prozesse während der späten Knospung

Basierend auf den dargestellten Ergebnissen kann ein Modell zur Rolle des Notch-Signalweges und seiner Interaktion mit den Wnt- und FGF/FGFR-Signalwegen bei der Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Muttertier und Knospe während der späten Knospung erstellt werden.

Ab Knospungsstadium 5 werden neben fußspezifischen Genen (wie *CnNK-2*) auch Gene des FGF/FGFR- und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in einem breiten Band an der Knospenbasis exprimiert (*kringelchen*, *Hvwnt8*, *Hydsh*; siehe Abb. 4-1A). Sie markieren dadurch eine Grenze zwischen Elterntier und Knospe. Diese ist jedoch noch sehr breit und unscharf. Dies wird besonders an der Verteilung *kringelchen*-positiver Zellen deutlich. Diese wechseln sich relativ regelmäßig mit *kringelchen*-negativen Zellen in einem schachbrettartigen Muster ab. Dies erinnert an ein einzelnes, zunächst unabhängiges und autokatalytisches Reaktions-Diffusionssystem des theoretischen Modells der „Musterbildung durch laterale Aktivierung, sich gegenseitig ausschließender Signalzustände“ von Meinhardt (1982) (siehe Abschnitt 2.4.3.3; siehe Abb. 2-18). Ein zweites solches System könnte durch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg gebildet werden, da auch seine Komponenten in einem ähnlichen Muster wie *kringelchen* exprimiert werden.

Kommt es zur Interaktion und Abhängigkeit beider Systeme in Form eines lokalen, gegenseitigen Ausschlusses bei gleichzeitiger langreichweitiger Förderung der Autokatalyse des jeweils anderen Systems, so kann dies nach Meinhardt (1982) zu einem Streifenmuster alternierender Genaktivität in zwei benachbarten morphogenetischen Feldern führen (siehe Abschnitt 2.4.3.3; siehe Abb. 2-18). Dies ist letztlich ab dem späten Knospungsstadium 8 der Fall. Hier ist eine Schärfung der Grenze an der Knospenbasis zu beobachten, die dazu führt, dass zwei deutlich voneinander getrennte, schmale Genexpressionsdomänen, eine auf dem Muttertier mit *kringelchen*, *MMP-A3* und *Hydsh* und eine auf der Knospe mit *HyHes* und *Hvwnt8* etabliert werden (siehe Abb. 4-1B).

Wie bei anderen, beschriebenen Grenzbildungsprozessen kann der Notch-Signalweg, da er ausschließlich zwischen benachbarten Zellen wirkt, diesen stabilen Ausschluss beider Signalsysteme ermöglichen. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass es hierfür zunächst zur Etablierung zweier unterschiedlicher Signalzustände in Form stabil Signal-sender (Ligand-tragender) und Signal-empfangender (Rezeptor-tragender) Zellen kommen muss (siehe Abschnitt 2.2.3). Prexl *et al.* (2011) konnten zeigen, dass der Notch-Ligand *Hyjagged* auf dem Muttertier an der Knospenbasis in Zellen erhöht exprimiert wird, die den *kringelchen*-positiven Zellen ähneln (siehe Abb. 4-1B). In diesen Zellen des Elterntieres könnte damit ein aktiver FGF/FGFR-Signalweg für die Induktion des Notch-Liganden verantwortlich sein. Bei der Ausbildung von Abzweigungen der Tracheen in *Drosophila* konnte ein solcher Zusammenhang von FGF/FGFR-Signaltransduktion und der Transkription eines DSL-Liganden bereits beschrieben werden (Ikeya und Hayashi, 1999). Zusätzlich kann es in diesen Zellen auch durch weitere Mechanismen, wie der beschriebenen zellautonomen *cis*-Inhibition oder posttranslationale Modifikationen des DSL-Liganden und des Notch-Rezeptors dazu kommen, dass der Rezeptor inaktiviert wird und sie mehr *HyJagged* auf ihrer Oberfläche tragen, so dass sie zu stabil Signal-sender Zellen werden (de Celis und Bray, 1997; Miller *et al.*, 2009; Sprinzak *et al.*, 2010). Außerdem ist denkbar, dass auch durch die Aktivität von *HyDsh* in diesen Zellen die Aktivierung des Notch-Signalweges durch Inhibition des

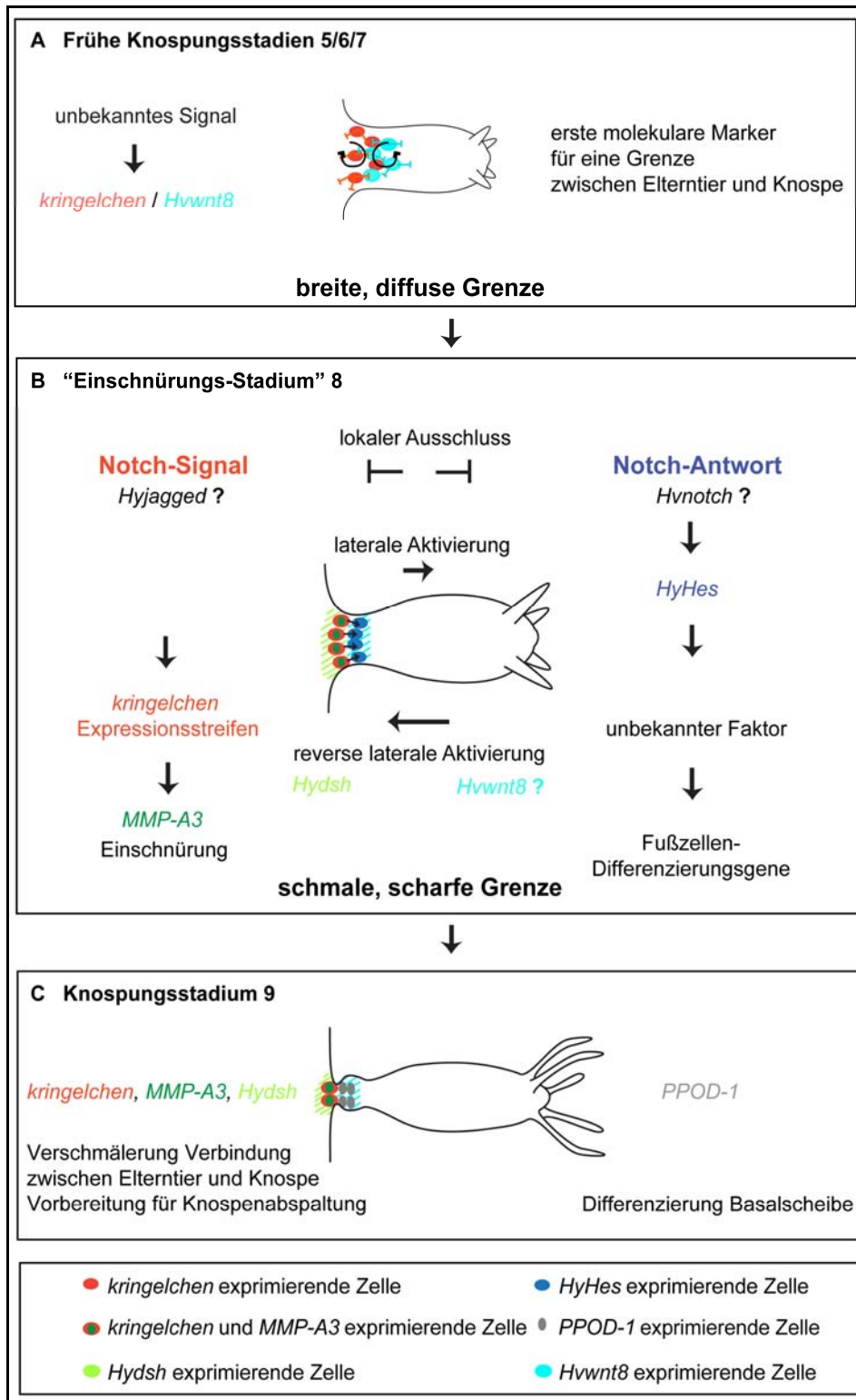
---

Notch-Rezeptors, der im Tier ubiquitär exprimiert wird, verhindert wird (Axelrod *et al.*, 1996; Käsbauer *et al.*, 2007).

Die direkt angrenzenden Zellen auf der Knospe müssen demnach zu stabil Signal-empfangenden Zellen werden. Anders als für den Liganden, konnte für den Notch-Rezeptor *Hvnotch* selbst keine erhöhte Expression an der Knospenbasis detektiert werden. Dafür ist das Zielgen *HyHes* stark exprimiert, was bedeutet, dass in diesen Zellen der Notch-Signalweg aktiv ist. Dieser kann vermutlich in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die Expression des Liganden reprimieren, wodurch sie stabil Signal-empfangende Zellen darstellen (de Celis und Bray, 1997; Miller *et al.*, 2009).

Durch eine derart stabile, gerichtete Notch-vermittelte Signalübertragung wird damit der lokale Ausschluss, also die Trennung der Zellen beider Signalzentren mit einer zwischenliegenden scharfen Grenze ermöglicht. Gleichzeitig wird natürlich aber auch die Expression von *HyHes* in einem der Signalzentren gefördert. Dies könnte also einem der durch Meinhardt postulierten, lateralen Aktivierungssignalen entsprechen. Das entsprechend reverse Signal könnte durch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg und seine Komponenten *HvWnt8*, *HmFz2* und *HyDsh* gebildet werden (Abb. 4-1B). Es könnte zur Stabilisierung der *MMP-A3*-Expression innerhalb des zweiten Signalzentrums beitragen.

Beide Signalzentren können sich deshalb letztlich unabhängig voneinander weiter entwickeln. Auf der Seite der Knospe kann es zur Induktion fußspezifischer Gene wie *PPOD-1* und damit zur Ausdifferenzierung von Fußzellen kommen. Auf der Seite des Muttertieres kann die Abschnürung der Knospe weiter vorangetrieben werden, vermutlich durch die Aktivität der Matrix-Metalloprotease *MMP-A3* (siehe Abb. 4-1C).



**Abb. 4-1:** Modell des Einflusses des Notch-Signalweges auf die späte Knospung in *Hydra*; Schematische Übersicht über die Interaktion der FGF/FGFR-, Wnt- und Notch-Signalwege und sequentielle Genexpression von *kringelchen*, *Hvwnt8* (Philipp *et al.* (2009), *Hydsh*, *MMP-A3* und *PPOD-1* während der Knospungsstadien 5 bis 9 gemäß Otto und Campbell (1977);



## 4.2 Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Aufrechterhaltung einer Grenze zwischen Hypostom-, Rumpf- und Tentakelgewebe im adulten Tier

Die Kopfregion einer adulten Hydra setzt sich aus insgesamt drei Teilbereichen zusammen. Apikal liegt das Hypostom mit Mundöffnung. Darunter befindet sich die Tentakelzone, von der die einzelnen Tentakel abgehen (siehe Abb. 2-6). Diese einzelnen Bereiche sind jeweils durch eine Gewebegrenze voneinander getrennt (siehe Abb. 2-8A). Damit diese Struktur und Unterteilung eines adulten Kopfes aufgrund der ständigen Gewebedynamik erhalten werden kann, müssen diese Grenzen fortwährend aufrechterhalten werden.

Jeder Teilbereich des Kopfes und die beiden genannten Grenzen sind jeweils durch die Expression spezifischer Gene gekennzeichnet (siehe Abschnitt 2.4.2.1). Apikal im Hypostom werden *Hytcf*, *HvPKC2*, *Hybra*, *budhead*, *Hywnt3* und weitere sechs Wnt-Liganden exprimiert (siehe Abb. 2-10A, B, H, J, K; Hassel *et al.*, 1999; Hobmayer *et al.*, 2000; Lengfeld *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 1997). Am basalen Hypostom, an der Grenze zur Tentakelzone, sind die Expression von *budhead* und *Cngsc* beschrieben. Ihre Expressionsdomänen reichen zusätzlich noch in die Tentakelzone und umrahmen dadurch apikal die einzelnen Tentakel (siehe Abb. 2-10K, L; Broun *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1997). In den Spitzen der Tentakel sind *Hvwnt5* und *HMMP* zu finden. *HMMP* ist außerdem im gesamten Tentakelgewebe exprimiert (siehe Abb. 2-10C, M; Leontovich *et al.*, 2000; Philipp *et al.*, 2009). An der Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln werden *Hvwnt8*, *Hmfz2*, *Hydsh*, *HvPKC1*, *Hyalx*, *HMMP*, *Cnotx* und *HyBMP5-8b* exprimiert (siehe Abb. 2-10D-G, I, M-O; Hassel, 1999; Leontovich *et al.*, 2000; Philipp *et al.*, 2009; Reinhardt *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000;). *Hyalx* wird hierbei in einem schmalen Ring ektodermaler Epithelzellen transient an der Basis der Tentakel in der Tentakelzone exprimiert und ist für die Spezifizierung von Gewebe zu Tentakelgewebe mit verantwortlich. Denn an dieser Grenze müssen aus dem Rumpf einwan-

dernde Epithelzellen ihre Proliferation einstellen und zu tentakelspezifischen Batteriezellen ausdifferenzieren (siehe Abb. 2-9; Holstein *et al.*, 1991).

### **4.2.1 Die Genexpression und Morphologie adulter Köpfe ist nach DAPT-Behandlung verändert**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben einer niedrigen Expression im gesamten Tier, *Hvnotch* an der Basis der Tentakel adulter Tiere endodermal erhöht exprimiert detektiert werden kann (siehe Abb. 3-23A-C).

In 24 und 48 Stunden DAPT-behandelten Tieren war die *Hvnotch*-Expression im gesamten Tier inklusive der Tentakelbasis inhibiert (siehe Abb. 3-23D, E). Dies könnte darauf hindeuten, dass in solchen DAPT-behandelten Tieren keine aktive Notch-vermittelte Signalweiterleitung stattfindet. In Vertebraten wurden bereits gezeigt, dass der Promotor des Notch-Rezeptors selbst Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der CSL-Familie beinhaltet (Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009). Dadurch wird ein positiver, autokatalytischer Rückkopplungsmechanismus möglich, der eine enorme erhöhte Aktivierung der Notch-Signaltransduktion ermöglicht. Der Verlust der Expression des Notch-Rezeptors in DAPT-behandelten Tieren könnte deshalb ein Hinweis darauf sein, dass in adulten Hydren die Expression des Notch-Rezeptors autokatalytisch an den Tentakelbasen hochreguliert wird und dies auch für den Erhalt der adulten Kopfstrukturen notwendig ist.

Bereits nach einer 24-stündigen DAPT-Behandlung war auch die Expression von *Hyalx* beeinträchtigt. Es wurde nicht mehr nur ringförmig an der Basis der Tentakel, sondern auch in der gesamten Tentakelzone und basal innerhalb der Tentakel verbreitert und diffus exprimiert (siehe Abb. 3-24 und Abb. 3-25B). Nach insgesamt 48 Stunden ging die Expression an der Basis der Tentakel ganz verloren und nur eine einzelne oder zwei ringförmige, schmale Expressionszonen ober- und unterhalb des Tentakelkranzes blieben erhalten (siehe Abb. 3-25C). Dieses Muster bestand in 12% der behandelten Tieren auch nach Ent-

fernung des DAPT-Mediums für drei bis sechs Tage fort (siehe Abb. 3-25D-G). Anscheinend ist nach Inhibierung des Notch-Signalweges durch DAPT die Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln, die durch die Expression von *Hyalx* gekennzeichnet ist, gestört bzw. nicht mehr existent.

Diese veränderte *Hyalx*-Expression spiegelte die morphologisch sichtbaren Veränderungen der Kopfstrukturen nach DAPT-Behandlung wider. Es kam zu einer Verkürzung aller Tentakel und zu einer Einschnürung der oberen Rumpfregion direkt unterhalb des Tentakelkranzes (siehe Abb. 3-18). Außerdem kam es im Laufe der Zeit nach der DAPT-Behandlung in 12% der behandelten Polypen zur übermäßigen Ausbildung tentakelartiger Strukturen (siehe Abb. 3-19).

In 4% der Tiere war infolge nur noch ein einzelner, mehrfach verzweigter Tentakel und ein seitlich gekipptes Hypostom zu beobachten (siehe Abb. 3-19C, D). In diesem gesamten, großen Tentakel wurde *HMMP* exprimiert und an seiner Basis *Hyalx* (siehe Abb. 3-25G und Abb. 3-27G, H).

In weiteren 8 % der DAPT-behandelten Tiere kam es zu einer Verlängerung der Region, die sich zwischen den beiden ringförmigen *Hyalx*-Expressionszonen befand: zwischen Rumpf und Tentakelkranz als auch zwischen Tentakelkranz und Hypostom (Abb. 3-19A, B und Abb. 3-25D). Dass es sich bei dieser auswachsenden Region wirklich um zusätzlich ausgebildetes Tentakelgewebe handelt, wurde auf mehreren Wegen bewiesen. Zum einen wurde an den Grenzen dieser Region *Hyalx* exprimiert und dieses ist für die Transdifferenzierung zu tentakelspezifischen Batteriezellen und damit die Spezifizierung von Tentakelgewebe verantwortlich (siehe Abb. 3-25D). Außerdem kam es in diesem Bereich zu einer übermäßigen Expression des tentakelspezifischen Gens *HMMP* (siehe Abb. 3-27D). Auch auf Proteinebene konnten durch Immunfluoreszenzfärbungen ganzer Tiere mit zwei kapselspezifischen Antikörpern die Tentakel-eigenschaften bestätigt werden (siehe Anhang Abb. 7-7, Abb. 7-8 und Abb. 7-9). Entlang dieses sich zunehmend verlängernden Tentakels wurden das Hypostom und der Tentakelkranz jeweils vom Rumpf weg bzw. „hochgeschoben“. Obwohl sich die Position des Hypostoms hierbei drastisch veränderte, war sei-

ne Identität nicht beeinflusst, was an der beständigen *Hywnt3*-Expression in der apikalen Spitze deutlich wurde (siehe Abb. 3-26).

Die Wirkung des Inhibitors war jedoch, anders als bei der Knospung, reversibel. Alle behandelten Tiere, die abnorme Kopfstrukturen aufwiesen, konnten im Verlauf von etwa zwei Wochen nach Entfernung des Inhibitors wieder völlig intakte, normal strukturierte Köpfe mit einem Hypostom und darunterliegender Tentakelzone mit abgehenden Tentakeln ausbilden. Die abnormen Kopfstrukturen degenerierten innerhalb dieser Zeit zunehmend und wurden aufgrund der Gewebedynamik in Richtung der Tentakelspitzen verschoben und wuchsen sich so allmählich zu einem normalen Tentakel aus (siehe Abb. 3-20, Abb. 3-21 und Abb. 3-22). Parallel hierzu konnte auch eine zunehmende Normalisierung der Genexpression von *Hvnotch*, *Hyalx* und *HMMP* beobachtet werden. Sie wurden wieder im gewohnten Muster an der Basis der Tentakel bzw. in den Tentakeln exprimiert (Abb. 3-25E-F, Abb. 3-26E-F und Abb. 3-27E-H). *Hvnotch* wurde bereits 3-6 Tage nach Entfernung von DAPT in Tieren des Stadiums PIII in zwei ringförmigen Domänen genau wie *Hyalx* exprimiert (siehe Abb. 3-23F und Abb. 3-25D). Dies bedeutet, dass in solchen Tieren vermutlich auch wieder eine aktive Notch-Signalübertragung und eine autokatalytische Transkriptionsaktivierung des Rezeptors möglich geworden sind. Dies scheint plausibel, da Käsbauer *et al.* (2007) zeigen konnten, dass 24 Stunden nach DAPT-Behandlung HvNICD wieder in den Kern translozieren kann und damit eine aktive Notch-Signalweiterleitung möglich ist.

Wenn nach einer gewissen Zeit (7-9 Tage nach DAPT-Behandlung) die „alte“ Kopfstruktur weit genug vom Rumpf weggeschoben wurde und nur noch als ein Tentakel erkannt wurde, konnte es zur Ausbildung eines neuen Kopfes am Ende dieses ausgewachsenen Tentakels kommen. Ein neu etablierter Kopforganisator und eine wieder korrekt platzierte Notch-Signaltransduktion konnten dann die Normalisierung der Genexpression an den kopfspezifischen Grenzen und damit die Einteilung des Kopfes in seine Teilbereiche bewirken.

#### 4.2.2 Der Notch-Signalweg ist am Erhalt der Tentakelgrenze beteiligt

Insgesamt kann man daraus schließen, dass der Notch-Signalweg an der Musterbildung eines adulten Kopfes maßgeblich beteiligt ist. Aus den DAPT-Inhibitionsversuchen geht hervor, dass sich seine Funktion dabei auf die Inhibierung der Ausbildung von Tentakelgewebe zwischen den einzelnen Tentakeln und auch außerhalb dieser Tentakelzone zu beziehen scheint. Dies wiederum ist für die Aufrechterhaltung der scharfen Grenze zwischen proliferierenden Zellen der Tentakelzone und den nicht-proliferierenden, ausdifferenzierten der Tentakel notwendig. Ihre Existenz wird wie an der Knospbasis in Stadium 8 durch die schmale, ringförmige Expression spezifischer Gene, wie der von *Hyalx* sichtbar. Eine aktive Notch-Signalübertragung wird also nicht für die Expression von *Hyalx* gebraucht, sehr wohl aber für seine Begrenzung auf die Tentakelbasis.

Da innerhalb eines adulten Kopfes weder eine spezifisch erhöhte Expression des einzigen bisher bekannten HvNotch-Zielgens *HyHes* noch des Liganden *Hyjagged* beobachtet werden konnte, ist unklar, in welchen Zellen genau eine aktive Notch-Signalübertragung stattfindet. Lediglich die erhöhte *Hvnotch*-Expression an der Tentakelbasis basierend auf der Möglichkeit einer autokatalytischen Transkriptionsregulation könnte einen Hinweis auf einen aktiven Notch-Signalweg liefern. Da dieser allerdings nur zwischen direkt benachbarten Zellen wirken kann, müsste er einen indirekten Effekt auf die entfernt lokalisierten Zellen der Tentakelzone haben, um dort die Expression von *Hyalx* zu inhibieren und auf einen Ring an der Tentakelbasis zu begrenzen. Denkbar wäre, dass ein an der Tentakelbasis aktiver Notch-Signalweg lokal die Expression eines sezernierten Signalmoleküls, wie eines Wachstumsfaktors aktiviert. Dieser könnte sich graduiert im Gewebe der Tentakelzone ausbreiten und die *Hyalx*-Expression und damit die Transdifferenzierung der Epithelzellen zu tentakelspezifischen Batteriezellen inhibieren. Der Wirkmechanismus des aktiven Notch-Signalweges würde sich somit an der Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakeln von dem an der Knospbasis unterscheiden. Dies könnte darauf beru-

hen, dass im Falle der Knospung die Grenze völlig neu gebildet werden muss. Im adulten Kopf dagegen muss sie „lediglich“ aufrechterhalten werden.

Die einzigen Gene, die in der Tentakelzone und mit relativer Sicherheit benachbart zu *Hvnotch* exprimiert werden und deshalb als direkte Zielgene in Frage kommen, sind *Cnotx*, *Cnox-3*, *budhead* und *Cngsc* (Bode, 2001; Broun *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). Sie werden an der Grenze zwischen Tentakelzone und Tentakel und in den einzelnen Tentakeln schlagartig nicht mehr exprimiert. Sie könnten somit in den *Hvnotch*-positiven Zellen, wie *kringelchen* an der Knospbasis in den *HyHes*-exprimierenden Zellen, durch einen aktiven Notch-Signalweg inhibiert werden. Auf diese Weise würde der Notch-Signalweg die Expression von Genen, die spezifisch in der Tentakelzone bzw. dem Hypostom, aber eben nicht in den Tentakel exprimiert werden sollen durch den Erhalt einer scharfen Grenze am Übergang beider Gewebe begrenzen. In diesem Fall würde der Notch-Signalweg auf eine ähnliche Weise wie an der Knospbasis direkt zwischen benachbarten Zellen wirken.

### **4.2.3 Die Genexpression und Morphologie von Kopfgeneraten ist nach DAPT-Behandlung ebenfalls verändert**

Während der Kopfgeneration müssen neben den einzelnen Teilbereichen des Kopfes mit allen Gewebegrenzen auch der Kopforganisor und seine Signale zunächst völlig neu ausgebildet und im Anschluss wie im adulten Tier erhalten werden. Die Genexpressionsmuster vieler kopfspezifischer Gene, die auch im adulten Tier exprimiert sind, wurden ebenfalls bereits während des Kopfgenerationsprozesses beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.3; siehe Abb. 2-10, Abb. 2-15 und Abb. 3-32). Besonders früh, schon 1 bis 1,5 Stunden nach Dekapitation werden die drei Gene *Hyβ-cat*, *Hytcf* und *Hywnt3* des kanonischen Wnt-Signalweges in der sich regenerierenden, apikalen Kappe eines unbehandelten Tieres exprimiert (siehe Abb. 2-15A, C und Abb. 3-32E; Hobmayer *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass *Hywnt3* das erste Wnt-Gen einer Wnt-

Genkaskade während der Regeneration darstellt, das weitere Signalwege anschalten kann, die die axiale Musterbildung und damit auch die Strukturierung des Kopfes regulieren (Gee *et al.*, 2010). Dies bedeutet, dass auf eine erhöhte *Hywnt3*-Expression zwangsläufig die Ausbildung eines Kopfes mit seinen verschiedenen Teilbereichen folgt (siehe Abschnitt 2.4.4.3; Hobmayer *et al.*, 2002; Technau *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch *Hvnotch* und *HyHes* bereits 8 Stunden nach Dekapitation in der gesamten, apikalen Kappe unbehauelter Regenerate erhöht exprimiert werden (siehe Abb. 3-32Zc, Zd, Zg, Zh). Dies konnte allerdings für *HyHes* nur auf mRNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene mit dem anti-HES-Peptidantikörper beobachtet werden (siehe Abb. 3-8). Beide werden dann nach 36 Stunden auf punktförmige, weiter basal liegende Bereiche begrenzt, an denen die Tentakelknospen auswachsen. Ab 48 Stunden sind sie dann wie im adulten, nicht regenerierenden Tier exprimiert (siehe Abb. 3-32Ze, Zf, Zi, Zj). Damit ähnelt ihr Expressionsmuster dem anderer Gene, die spezifisch an der Basis von Tentakeln oder in Tentakeln lokalisiert sind, wie *Hvwnt5*, *Hvwnt8*, *Hmfz2*, *Hydsh*, *HMMP*, *Hyalx* und *HyBMP5-8b* (siehe Abb. 2-15W-Zc, E, F und Abb. 3-32I-Zb). Auch der FGF-Rezeptor *kringelchen*, der in adulten Tieren nicht im Kopf erhöht exprimiert wird, ist aber während der Kopfregeneration ebenfalls in einem ähnlichen dynamischen Muster exprimiert (siehe Abb. 3-32A-D; Dissertation S. Sudhop, 2004).

Die DAPT-Behandlung von Kopfregeneraten hatte zwei morphologisch sichtbare Auswirkungen, einerseits auf den zeitlichen Verlauf der Regeneration und andererseits auf die Lokalisation und Struktur der apikal regenerierenden „Köpfe“. In DAPT-behandelten Kopfregeneraten war im Vergleich mit DMSO-Kontrolltieren die Regeneration mindestens um 24 Stunden, also die Zeit, die nach Dekapitation mit DAPT behandelt wurde, verzögert (siehe Abb. 3-29 und Abb. 3-30). In manchen Fällen war die Regeneration sogar völlig inhibiert. Neben dieser Verzögerung bzw. Inhibition der Regeneration konnte beobachtet werden, dass Kopfregenerate nach Entfernung des DAPT-Mediums ab 48 Stunden Regenerationszeit auch abnorme, ungewöhnliche „Kopfstrukturen“

ausbildeten. Es konnten einfache, runde apikal regenerierende Pole, aber auch ein oder zwei seitlich liegende, spitze bis hin zu tentakel- und zangenartige Auswüchse beobachtet werden (siehe Abb. 3-30 und Abb. 3-31). Diese abnormen Strukturen konnten sich aber im Verlauf der weiteren Regeneration wieder zu intakten Köpfen umorganisieren (siehe Abb. 3-30).

Auch auf Genexpressionsebene waren in DAPT-behandelten Kopfreparaturen starke Veränderungen zu beobachten, die die diversen Phänotypen der Kopfreparatur und auch das Ausbleiben bzw. Verzögern der Regeneration widerspiegeln. Die Expression von *Hvnotch* war erstaunlicherweise zu keinem Regenerationszeitpunkt inhibiert (siehe Abb. 3-33). Sie war lediglich verändert bzw. blieb zu jedem untersuchten Zeitpunkt unabhängig vom Phänotyp in den apikal gelegenen, regenerierenden Strukturen großflächig exprimiert (siehe Abb. 3-33). Obwohl seine Expression nach DAPT-Behandlung nicht inhibiert war, bedeutet dies nicht, dass in solchen Tieren der Notch-Signalweg aktiv war. Es bedeutet lediglich, dass vermutlich, anders als in adulten Köpfen, die autokatalytische Aktivierung des Notch-Rezeptors, die wahrscheinlich durch DAPT inhibiert werden kann, während der Regeneration keine entscheidende Rolle spielt. Die *Hvnotch*-Expression kann vermutlich durch die Aktivität anderer Signalwege, wie etwa des FGF/FGFR-Signalweges stark erhöht werden. So wird beispielsweise der FGF-Rezeptor *kringelchen* in unbehandelten Tieren auch schon sehr früh während der Kopfreparatur in der apikalen Kappe erhöht exprimiert und könnte durch seine Aktivität wie während der Knospung postuliert, die Expression von *Hyjagged* und dadurch die HvNotch-vermittelte Signalübertragung induzieren.

Ein Beleg, dass die Notch-vermittelte Signalübertragung in DAPT-behandelten Tieren inhibiert ist und die Ursache für die gestörte bzw. sogar inhibierte Kopfreparatur darstellt, lieferten Untersuchungen der Expression von *HyHes*. Es wurde in Kopfreparaturen von 8, 24 und 36 Stunden Regenerationszeit nicht mehr exprimiert (siehe Abb. 3-34). Demnach stellt *HyHes* nicht nur während der Knospung, sondern auch während der Kopfreparatur ein Zielgen des Notch-Signalweges dar. Auch auf Proteinebene konnte mit Hilfe des spezifischen anti-



HES-Peptidantikörpers in Kopfreparaturen 8 Stunden nach Dekapitation eine Reduktion der HyHES-Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-35).

Die Expression von *Hyalx* und *HMMP* war in DAPT-behandelten Kopfreparaturen nicht inhibiert, aber erheblich verändert. Bis zu einer Regenerationszeit von 48 Stunden verblieben die *Hyalx*- und *HMMP*-Expression in der gesamten, regenerierenden Kappe (siehe Abb. 3-36A-C und Abb. 3-38A-D). Beide wurden nicht punktförmig auf die Stellen in der zukünftigen Tentakelzone begrenzt, an denen die ersten Tentakelknospen normalerweise auswachsen. Im Falle von *Hyalx* war oft zusätzlich zur Expression in der regenerierenden Kappe eine verstärkte Expression in einem unterhalb der Kappe liegenden Ring zu erkennen (siehe Abb. 3-36A-C, G, L). Gleichzeitig wurde in solchen Kopfreparaturen oberhalb dieser ringförmigen *Hyalx*-Expressionsdomäne *HMMP* weiterhin großflächig exprimiert (siehe Abb. 3-38A-D, I, M, N, T). Das gesamte Gewebe am regenerierenden Pol und die neu aus dem Rumpf einwandernden Zellen scheinen damit Tentakelcharakteristika zu behalten bzw. zu erhalten und nicht durch ein sich entwickelndes Hypostom und den dort lokalisierten Kopforganisator verdrängt zu werden. Dies bedeutet auch, dass keine korrekte Strukturierung des Kopfes in seine drei Teilbereiche mit den spezifischen Grenzen erfolgen konnte. Dies führte zur Entwicklung von Tieren mit keinerlei Kopfstrukturen oder mit abnormen, apikalen tentakelartigen Strukturen ohne jegliches Hypostom.

Das dramatischste Ergebnis war, dass die *Hywnt3*-Expression, die mit dem Hypostom bzw. dem Kopforganisator assoziiert ist, bis zu einer Regenerationszeit von 48 Stunden völlig inhibiert war (siehe Abb. 3-37A-D). Auch in späteren Regenerationsstadien (60 und 72 Stunden) war *Hywnt3* meist weiterhin nicht oder nur verändert exprimiert (siehe Abb. 3-37I-R).

Die fehlende *Hywnt3*-Expression wurde auch in DAPT-behandelten, regenerierenden Hydren in Transplantationsversuchen deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass DAPT-behandelte Transplantate abhängig von der Regenerationsdauer insgesamt ein stark reduziertes Potential zur Ausbildung normaler, sekundärer Achsen besaßen. Viele DAPT-behandelte Transplantate bildeten

entweder keinerlei Kopfstrukturen oder völlig abnorme Auswüchse aus (siehe Abb. 3-41 und Abb. 3-42). Diese erinnerten an die abnormen Strukturen, die nach DAPT-Behandlung in Kopfreparaturen beobachtet werden konnten (siehe Abb. 3-31).

Das Induktionspotential war in Transplantaten mit 24 Stunden Regenerationsdauer am niedrigsten (siehe Abb. 3-41). Diese transplantierten Kopfreparate hatten die längst mögliche DAPT-Behandlung von 48 Stunden inklusive der „Prä-Dekapitation DAPT-Behandlung“ erfahren. In Transplantaten von 36 und 48 Stunden Regeneraten nimmt der Anteil derjenigen wieder zu, die sekundäre Achsen induzieren können (siehe Abb. 3-41). Diese Kopfreparate befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation bereits wieder 12 bzw. 24 Stunden in Hydromedium.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *Hywnt3* unter der Kontrolle eines aktiven Notch-Signalweges stehen könnte. Wird die Notch-vermittelte Signalübertragung durch DAPT inhibiert, würde dies zum Ausbleiben der *Hywnt3*-Expression führen und dies infolge zur fehlenden bzw. verzögerten Kopfreparation.

Allerdings muss man bedenken, dass DAPT als synthetischer Presenilin-Inhibitor auch auf andere Signalwege einen Einfluss hat. Die Adhäsionsmoleküle der Cadherin-Familie werden beispielsweise wie der Notch-Rezeptor durch Presenilin geschnitten. Dadurch wird das mit ihnen assoziierte Signalmolekül  $\beta$ -Catenin ins Zytosol entlassen, was einem aktiven Wnt-Signalweg entspricht (Marambaud *et al.*, 2002). Infolge einer DAPT-Behandlung könnte also neben einer Inhibierung der Notch-vermittelten Proteolyse auch die Freisetzung von  $\beta$ -Catenin ins Zytosol und damit die kanonische Wnt-Signaltransduktion inhibiert oder zumindest vermindert sein (Marambaud *et al.*, 2002; Serban *et al.*, 2005).

In Zukunft ist es daher notwendig, den Notch-Signalweg spezifisch beispielsweise durch RNAi zu inhibieren, um die Effekte von DAPT auf die Kopfreparation eindeutig auf die ausbleibende Notch-vermittelte Signaltransduktion zurückführen zu können.

#### 4.2.4 Modell der Aktivität des Notch-Signalweges bei der Musterbildung eines regenerierenden Kopfes

Während der Kopfregeneration werden bis zu einer Regenerationsdauer von etwa 20 Stunden Gene des Notch-, FGF/FGFR- und kanonischen Wnt-Signalweges in der gesamten regenerierenden Kappe unbehauelter Tiere großflächig exprimiert. Dies bedeutet, dass zunächst hypostom- und tentakelzonen- bzw. tentakelbasis-spezifisch exprimierte Gene gleichzeitig und in demselben Bereich exprimiert werden. Ihre Expressionsdomänen werden dann im weiteren Verlauf allmählich auf spezifische Bereiche begrenzt. Hypostomspezifische Gene wie *Hywnt3* werden auf die apikale Hälfte des regenerierenden Pols beschränkt. Gene, die spezifisch in der Tentakelzone, der Tentakelbasis oder in den Tentakeln exprimiert werden, müssen auf einen basal liegenden Bereich verdrängt werden. Dies ist Voraussetzung für die anschließende, unabhängige Entwicklung beider Geneexpressionsdomänen. Apikal kann es zur Ausbildung des Hypostoms und weiter basal zur Evagination der Tentakel aus der Tentakelzone kommen. Außerdem können die spezifischen Gewebegrenzen zwischen den einzelnen Strukturen ausgebildet werden.

Aus den veränderten Morphologien und Genexpressionsmustern nach DAPT-Behandlung kann man schließen, dass die Aktivität des Notch-Signalweges während der Kopfregeneration wohl bereits für den ersten Schritt benötigt wird. Seine Funktion könnte hierbei, wie schon während der Knospung, darin bestehen, die Expression kopfspezifisch exprimierter Gene auf ihre jeweiligen, spezifischen Expressionsdomänen zu begrenzen. So könnten durch seine Aktivität wieder zwei benachbarte Signalzentren, eines mit hypostomspezifischer und ein zweites mit tentakelspezifischer Genexpression und zwischen ihnen eine stabile Grenze etabliert werden. Dadurch kann an der „richtigen“ Stelle am regenerierenden Pol die entsprechende Kopfstruktur ausgebildet werden.

Da *Hvnotch* und *HyHes* wie *Hyalx* und andere tentakelbasis- oder tentakelspezifisch exprimierte Gene auf punktförmige Bereiche eines basalen Rings am regenerierenden Pol begrenzt werden, könnte in diesen Zellen durch einen ak-

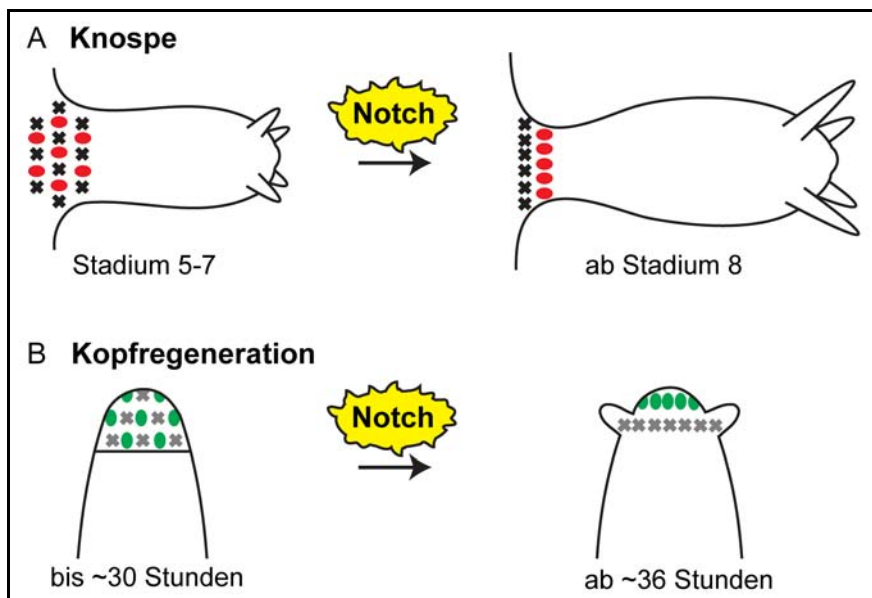
tiven Notch-Signalweg die Expression hypostomspezifischer Gene inhibiert werden. Dadurch würde deren Expression auf den apikalen Bereich der regenerierenden Kappe begrenzt werden. Über dieselben Mechanismen, die schon bei der Knospung beschrieben wurden, würde eine etablierte stabile und gerichtete Notch-Signalübertragung den lokalen Ausschluss beider Signalzentren und damit die Trennung der benachbarten Zellpopulationen bewirken.

Gleichzeitig wird deutlich, dass wie bereits an der Tentakelbasis adulter Tiere eine aktive Notch-Signalübertragung nicht für die Expression von *Hyalx*, sehr wohl aber für seine Begrenzung benötigt wird. In DAPT-behandelten Tieren ist *Hyalx* noch exprimiert, allerdings bleibt es großflächig in der gesamten, regenerierenden Kappe erhalten und kann eben nicht auf einen basalen Ring verdrängt werden. Nach Inhibierung des Notch-Signalweges durch DAPT wird somit die Ausbildung von Tentakelgewebe im apikalen Bereich nicht verhindert. Dies jedoch scheint Voraussetzung für eine effektive, erhöhte Expression hypostomspezifischer Gene, wie *Hywnt3*. Seine Expression ist in DAPT-behandelten Kopfreparaturen inhibiert. Es könnte sein, dass die inhibitorische Wirkung von Notch auf die Expression tentakelspezifischer Gene Voraussetzung dafür ist, dass hypostomspezifische Gene wie *Hywnt3* aktiviert bzw. hochreguliert werden können.

Fasst man die Ergebnisse bezüglich adulter Köpfe und der Kopfreparatur zusammen, so kann man feststellen, dass ein aktiver Notch-Signalweg bei der Kopf-Musterbildung eine entscheidende Rolle spielt. Er ist jeweils für die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen zwei verschiedenen Zellpopulationen bzw. Geweben verantwortlich. Dies wiederum ist Voraussetzung für den Erhalt der Struktur eines adulten Kopfes, aber auch für die Neuausbildung und Strukturierung eines Kopfes in die einzelnen Teilbereiche während der Kopfreparatur.

## 5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *Hydra* ein aktiver Notch-Signalweg bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung zweier entwicklungsrelevanter Grenzen eine entscheidende Rolle spielt. Sowohl während der Knospung als auch bei der *de novo* Musterbildung eines Kopfes wird durch seine Aktivität die Expression von Genen, die zunächst überlappend in einer breiten Zone erfolgt, auf zwei benachbarte, schmale Domänen begrenzt (siehe Abb. 5-1). Dies ist Voraussetzung für die weitere, unabhängige Entwicklung beider Kompartimente.



**Abb. 5-1:** Schematische Darstellung und Vergleich der Aktivität des Notch-Signalweges bei der Grenzbildung während der Knospung und Kopfregeneration; Die großflächige, breite Expression verschiedener Gene wird jeweils durch eine aktive Notch-Signalübertragung auf zwei benachbarte, schmale Domänen mit zwischenliegender Grenze beschränkt; (A) Vorgänge an der Knospbasis; Trennung von Genen auf dem Muttertier (schwarze Kreuze) und solchen der Knospe (rote Kreise); (B) Vorgänge während der Kopfregeneration; Trennung hypostom- (grüne Kreise) und tentakelspezifischer Gene (hierzu zählen Gene, die spezifisch in der Tentakelzone, der Tentakelbasis oder in den Tentakeln exprimiert werden; graue Kreuze).



## 6 Material und Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Acetanhydrid	Sigma
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Biorad
AG501-X8 20-50m (Resin)	Biorad
Agarose PeqGold Universalagarose	PeqLab
Agarose	Biozym
Ammoniumacetat	Sigma
Ampicillin	Serva
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
Atermia nauplii	Sanders Brine Shrimp
Bacto Agar	BD
Bacto™ Pepton	Difco
BCIP	Roche
Blockreagenz	Roche
BM-Purple AP Substrate	Roche
Bromphenolblau	Fluka
BSA	Roth
Calciumchlorid	Roth
CHAPS	Sigma
Chloramphenicol	Serva
DAPI	Sigma
DAPT	Calbiochem
DEPC	Sigma, Roth
DIG RNA labeling mix	Roche
DMSO	Sigma
dNTP mix	PeqLab
DTT	Sigma
EDTA	Roth
EGTA	Sigma
Essigsäure p.a.	Roth
Ethanol p.a.	Roth

## 6 Material und Methoden

---

Ethidiumbromid	Sigma
Evansblau	Sigma
FastRed TR/Naphtol AS-MIX Tablets	Sigma
Ficoll Typ 400	Sigma
Fluorescein RNA labeling mix	Roche
Formaldehyd	Fluka
Formamid	Fluka
Glucose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidinium-HCl	Sigma
Hefeextrakt	Oxoid
Heparin Sodium	Serva
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol p.a.	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Fluka
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Roth
Leupeptin	Sigma
Lithiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka
Maleinsäure	Sigma
Manganchlorid	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
MOPS	Roth
Methanol p.a.	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natronlauge	Merck
NBT	Roche



Ni Sepharose High Performance	Amersham Biosciences
Paraformaldehyd	Sigma
Pefabloc SC	Roche
Pepstatin A	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Ponceau S	Sigma
RNase-Inhibitor	Fermentas
Roti-Nanoquant-Lösung	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
Spermidin	Fluka
SU5402	Calbiochem
TEMED	Merck
Tetrazyklin	Sigma
TO-PRO 3	Molecular Probes
Torula yeast RNA	Sigma
Triethanolamin	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
Tween 20	Roth
Urethan	Fluka
30% Wasserstoffperoxid	Sigma
Vectashield	Vector Laboratories

### 6.1.2 Bakterienstämme

XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI}^q\text{Z } \Delta M15 \text{ Tn10 (Tet')}]$
BL21 (DE3)-RIL	E.coli B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-)gal $\lambda$ (DE3)
One Shot® TOP10	F- mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\phi 80lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 \text{ recA1 araD139 } \Delta(araleu) 7697 \text{ galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG}$
DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> -T1R	F- $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 \text{ recA1endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 tonA (confers resistance to phage T1)}$
SoloPack Competent Cells	siehe Angaben des Herstellers: Stratagene, Catalog # 200185. Beinhaltet im Kit: StrataClone <sup>TM</sup> Blunt PCR Cloning Kit /Catalog #240207

## 6 Material und Methoden

---

### 6.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme mit Reaktionspuffer	New England Biolabs
DNase I (RNase frei)	Roche
DNase I	Sigma
Proteinase K	Sigma
RNase A	Quiagen
Shrimp alkaline Phosphatase mit Reaktionspuffer	GE Healthcare, NEB
Taq DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer	PeqLab
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	NEB
T4-DNA-Ligase mit Reaktionspuffer	NEB
T3-RNA-Polymerase	Ambion
T7-RNA-Polymerase	Ambion
SP6-RNA-Polymerase	Ambion

### 6.1.4 Plasmide

HoTG	AG Böttger
HoTRed	AG Böttger, M. Lasi, München
pBluescript II SK	Fermentas
pBluescript II KS	Fermentas
pRSETA	Invitrogen
pCR-BluntII-TOPO	Invitrogen
pPCR-Script Amp SK	Stratagene
pBC-SK	Stratagene
pSC-B-amp/kan	Stratagene

### 6.1.5 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer zur Klonierung von spezifischen Genen in bestimmte Zielvektoren können der nachfolgenden Tabelle 1 entnommen werden.

**Tabelle 1:** Primer zur Klonierung spezifischer Gene

<b>Gen</b>	<b>Zielvektor</b>	<b>Primer-Name</b>	<b>Primer-Sequenz</b>
<i>Hyalx</i>	pBS SK+	Hyalx-Bam_for	CGGGATCCAT GATACACAAA CCTATGGCAA AG
		Hyalx-Eco_rev	GGAATTCTTA ATGAAAAATAA CTATATCTTA AAGAATG
<i>HyHes</i>	pBS SK+	HyHes-Xho_for	CCGCTCGAGA TGACGGACAC AGAAAGACAT CC
		HyHes-Eco_rev	GGAATTCCTT ATTTCGTACGG TCGCCAAACT A
<i>HyHes</i>	HoTG	HyHes-Nhe_for	CTAGCTAGCAT GACGGACACA GAAAGACATCC
		HyHes-Sma_rev	TCCCCCGGGT TCGTACGGTC GCCAAACTAA ATTAC
<i>HyHes</i>	pRSET-A	HyHes-Xho_for	CCGCTCGAGA TGACGGACAC AGAAAGACAT CC
		HyHes-Eco_rev	GGAATTCCTT ATTTCGTACGG TCGCCAAACT A
<i>HMMP</i>	pBS KS+	HMMP-Bam_for	CGGGATCCAT GTTCATTTTCG TTAGGGTTTA ATTTG
		HMMP-Xho_rev	CCGCTCGAGT TATTTATTTTCG GAAAGTTCAA CCATG
<i>HyHesP (Promotor)</i>	pCR-BluntII- TOPO	nHesP-short_for	CATTGCACCC AAGTGTTTTGA GGAAAA
		nHesP_rev	GGATGTCTTT CTGTGTCCGT CAT
<i>HyHesP (Promotor)</i>	HoTG	HesP-short-Pst_for	AACTGCAGAT TGCACCCAAG TGTTTGAGGA
		HesP-Pst_rev	CCAATGCATT GGTTCCTGCAG CCGTCATTTT TAATAA
<i>HyHesP-mut</i>	HoTG	HesP-short-mut_for	CAATCGCGCT TTTGCTAAAA TTGTGAGGGT TAAAAGTTTA TTATGTC
		HesP-short-mut_rev	GACATAATAA ACTTTTAACC CTCACAATTT TAGCAAAAGC GCGATTG
<i>HyHesP- adSuH1-mut</i>	HoTG	HesP-adSuH1- mut_for	CAACACGCGC CGTTTAATTC TCACGCTTAG CCGTAAACCA ATC
		HesP-adSuH1- mut_rev	GATTGGTTTA CGGCTAAGCG TGAGAATTAA ACGGCGCGTG TTG
<i>HyHesP- adSuH3-mut</i>	HoTG	HesP-adSuH3- mut_for	CTTTAAATAG ACGTTTACTT CTCACGCTTT TATAGTGTGC AAAC
		HesP-adSuH3- mut_rev	GTTTGCACAC TATAAAAAGCG TGAGAAGTAA ACGTCTATTT AAAG
<i>Hvnotch</i>	HoTG	Nfull-Nhe_for	CTAGCTAGCA TGGGTCAACC AAGATTTTAT ATAG
		NICD-Eco_rev	CGGAATTCTT AAGGAGAGG AAAAAGATGC
<i>HvNICD</i>	HoTG	NICD-Sma_for	TCCCCCGGGA TGAAAAAGAT GCGATTTTCG
		NICD-Eco_rev	CGGAATTCTT AAGGAGAGGA AAAAAGATGC
<i>HvNAE</i>	HoTG	Nfull-Nhe_for	CTAGCTAGCA TGGGTCAACC AAGATTTTAT ATAG
		NICD-Eco_rev	CGGAATTCTT AAGGAGAGG AAAAAGATGC

## 6 Material und Methoden

Primer, die für die Herstellung von auf PCR basierenden Sonden verwendet wurde, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2:** Spezifische Primer zur Herstellung PCR-basierender Sonden

Gen	Primer-Name	Primer-Sequenz
<i>kringelchen</i>	Kri_for	ATGATATCAG ATTGGTGTGT T
	Kri_rev	TTAAGAAACT GCATAGTGAC T
<i>MMP-A3</i>	MMP-A3_for	TGAGAGTTTT CAAGACGAAC CAGTTG
	MMP-A3_rev	GAACGATTTT CTCCACTGCT
<i>Hywnt3</i>	Hywnt3a-Bam_for	CGGGATCCAT GGCACGACG CGTTATAAAG
	Hywnt3a-Eco_rev	GGAATTCTTT ACAGGTGTAT TCAGGCGTC
<i>Hvwnt8</i>	Hywnt8-Kpn_for	GGGGTACCAT TGGCTTAAAG GCATTTACCG
	Hywnt8-Xho_rev	CCGCTCGAGA ACTACTGTAC AACACCAGCG

Der folgenden Tabelle 3 können sonstige verwendete Primersequenzen entnommen werden.

**Tabelle 3:** Sonstige verwendete Primer

Primer-Name	Primer-Sequenz
T3-mac	AATTAACCCT CACTAAAGG
T3-long	CAATTAACCC TCACTAAAGG GAACAAAAGC
T7-mac	GTAATACGAC TCACTATAGG GC
T7-long	GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTGGA GC
SP6-long	CATTTAGGTG ACACTATAGA ATAC
5' GFPiseq	CACCATCTAATTCAACAAGAATTG
Aktin2-seq3'	GCGCTCAAGCGATTCACC

### 6.1.6 Antikörper

Der folgenden Tabelle 4 können die verwendeten Primärantikörper, deren Verdünnungen und Hersteller entnommen werden.

**Tabelle 4:** Verwendete Primärantikörper mit Quellorganismen, Verdünnungen und Herstellern; WB für Western Blot, IF für Immunfluoreszenzfärbung

Primärantikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-HES-Peptidantikörper	Kaninchen	1:5000 (WB) 1:500 (IF)	Dauids Biotechnologie
Anti-HES-PEYAntikörper	Hühnchen	1:1000 (WB) 1:500 (IF)	Dauids Biotechnologie
Anti-DIG-AP	Maus	1:2000	Roche
Anti-FITC-AP	Maus	1:1000	Roche

**Tabelle 4-Fortsetzung:** Verwendete Primärantikörper mit Quellorganismen, Verdünnungen und Herstellern; WB für Western Blot, IF für Immunfluoreszenzfärbung

Primärantikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-GFP	Maus	1:1000	Roche
Anti-Spinalin	Kaninchen	1:500	
Anti-Nowa (=Anti-H22)	Maus	unverdünnt	AG Holstein
Anti-Xpress	Maus	1:5000	Invitrogen
Anti-ZIC7A12	Ratte	Unverdünnt	E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München

Der folgenden Tabelle 5 können die verwendeten Sekundärantikörper, deren Verdünnungen und Herkunft entnommen werden.

**Tabelle 5:** Quellen, Verdünnungen und Hersteller verwendeter Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-Hühnchen-AMCA	Esel	1:100	Dianova
Anti-Hühnchen-IRDye800	Ziege	1:10.000	Licor
Anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	1:200	Molecular Probes
Anti-Kaninchen-Cy3	Ziege	1:500	GE Healthcare
Anti-Kaninchen-IRDye800	Ziege	1:10.000	Licor
Anti-Ratte-Cy3	Esel	1:300	Dianova
Anti-Maus-F(ab) <sub>2</sub> -Alexa488	Ziege	1:200	Invitrogen
Anti-Maus-Cy3	Schaf	1:500	Dianova
Anti-Maus-IRDye800	Ziege	1:10.000	Licor

### 6.1.7 Längen- und Größenstandards

Gene Ruler DNA ladder mix  
PeqGold Protein Marker IV

MBI Fermentas  
PeqLab

## 6 Material und Methoden

---

### 6.1.8 Geräte

Bandelin Sonoplus SD9	Bandelin
Branson Digital Sonifier Model 450-D	G.Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Primus 25 advanced Thermocycler	PeqLab
Dounce Homogenisator S 775	B.Braun/Melsungen AG
Gene Pulser	BioRad
Gene Pulser Pulse Controller	BioRad
Gene Pulser Capacitance Extender	BioRad
GeneQuant RNA/DNA Calculator	Amersham Pharmacia Biotech
Leica MZ16FA	Leica Microsystems
Leica TCS SP Confocal laser-scanning Mikroskop	Leica Microsystems
Nikon Eclipse 80i	Nikon GmbH
Odyssey Infrared Imager	Licor
Olympus SZX10	Olympus
PDS-1000/He Particle Delivery System	BioRad
UV/Vis Spectrophotometer DU730	Beckmann Coulter
Ultrazentrifuge	Beckmann
Robocycler Gradient 96	Stratagene
SDS-Gellauf- und Blot- Apparaturen Mini Protean II	BioRad
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Tisch	MWG Biotech, INTAS

### 6.1.9 Kits

First-Strand cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare
RNeasy Mini Kit	Quiagen
NucleoBond PC500	Macherey-Nagel
PeqGOLD Gel extraction kit	PeqLab
StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	Stratagene
QuickPrep Micro mRNA Purification Kit	GE Healthcare
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen
Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit	Invitrogen
Quickchange site directed mutagenesis kit	Stratagene

### 6.1.10 Sonstige Materialien

Biodyne B Transfer Membrane	Pall
Faltenfilter	Sartorius Stedim Biotech
Goldkugeln 1,0µm	BioRad
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences
<i>Macrocarrier</i>	BioRad
<i>Rupture disks</i>	BioRad
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell

### 6.1.11 Software

Adobe Photoshop CS2	
Adobe Illustrator CS3	
ClustalX 2.0	
<i>Hydra-Genom</i>	<a href="http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/">http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/</a>
ImageJ 1.37k	
Leica Application Suite 3.4.1	
Leica Confocal Imaging Software Version 2.5	
Leica Confocal Imaging Software Cremers	
Lucia Image G5 executable	
Odyssey V3.0	
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
PROMO 3.0	<a href="http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3">http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3</a>
SignalP 3.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
TEES	<a href="http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess">http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess</a>
TFSearch	<a href="http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html">http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html</a>
TMHMM 2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM</a>

### 6.1.12 Puffer und Lösungen

#### Agarosegelelektrophorese

DNA-Auftragspuffer	30% (v/v)	Glycerin
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau
	0,25mg/ml	Xylenblau
Ethidiumbromidfärbelösung	3,3mg/ml	Ethidiumbromid
	0,7x	MOPS-Lösung
10x MOPS-Lösung	440mM	MOPS
	84mM	Natriumacetat
	10mM	EDTA
	pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
50x TAE-Puffer	2M	Tris
	50mM	EDTA
	pH 8,3 mit Essigsäure einstellen	

#### Antikörperfärbungen

Blocklösung (Mazerate)	0,5% (w/v)	BSA
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	in 1x PBS	
Blocklösung (whole mounts)	1% (w/v)	BSA
	0,1% (v/v)	Triton X-100
	in 1x PBS	
DAPI/TO-PRO-Färbelösung	1µg/ml DAPI	
	1µg/ml	TO-PRO 3
	in 1x PBS	
Lavdowsky-Fixativ	3,6% (v/v)	Formaldehyd
	3,8% (v/v)	Essigsäure
	48% (v/v)	Ethanol
25x PBS	3M	NaCl
	1M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O
	0,3M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	pH 7,2 – 7,4 einstellen	
	Permeabilisierungslösung	0,5% (v/v)
in 1x PBS		



2% PFA/HM	2% (w/v) in Hydramedium	PFA
2% PFA/PBS	2% (w/v) in 1x PBS	PFA
2% Urethan	2% (w/v) in Hydramedium	Urethan

**Bakterienmedien**

10% Glycerin	10% (v/v) sterilfiltrieren	Glycerin in H <sub>2</sub> O
LB Agar	20g/l Bacto Agar in LB-Medium autoklavieren	
LB-Medium	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v) pH 7,0 einstellen autoklavieren	Bacto™ Pepton Hefeextrakt NaCl
LB-Ampicillin-Medium	100µg/ml	Ampicillin in LB-Medium
LB-Chloramphenicol-Medium	100µg/ml	Chloramphenicol in LB-Medium
LB-Tetracyclin-Medium	5µg/ml	Tetracyclin in LB-Medium
SOC-Medium	2% (w/v) 0,5% (w/v) 8,6mM 2,5mM pH 7,0 einstellen autoklavieren	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl
	10mM	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
	20mM	Glucose (sterilfiltriert)
Tfb I-Lösung	30mM 0,1M 10mM 15% (v/v) 50mM pH 5,8 einstellen sterilfiltrieren	KAc RbCl CaCl <sub>2</sub> Glycerin MnCl <sub>2</sub>

## 6 Material und Methoden

---

Tfb II-Lösung	10mM	MOPS
	75mM	CaCl <sub>2</sub>
	10mM	RbCl
	15% (v/v)	Glycerin
	pH 6,5 einstellen	
	sterilfiltrieren	
Ψb-Medium	0,6mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Bacto-Pepton
	pH 5,6 mit KOHeinstellen	
	autoklavieren	
TSS	10% (w/v)	PEG 8000
	3% (v/v)	1M MgCl <sub>2</sub>
	5% (v/v)	DMSO
	in LB-Medium	
	sterilfiltrieren	
	bei 4°C aufbewahren	

### Bakterielle Expression von Proteinen

100x Cocktail C10	1mg/ml	Pepstatin A
	1mg/ml	Aprotinin
	1mg/ml	Leupeptin
	DBB/I	
DBB/I	2,4mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5M	NaCl
	17,6mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	6M	Guanidin-HCl
	25mM	Imidazol
	pH 7,4 einstellen	
DEB-Elutionspuffer	2,4mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5M	NaCl
	17,6mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	6M	Guanidin-HCl
	500mM	Imidazol
	pH 7,4 einstellen	
DNase I-Lösung	5mg/ml	DNase I in H <sub>2</sub> O
IPTG-Lösung	100mM	IPTG

	in ddH <sub>2</sub> O	
	sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C	
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1M	MgCl <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O
<i>Osmotic shock buffer</i>	20mM	Tris pH 8,0
	2,5mM	EDTA
	10mM	DTT/Pefabloc/C10
	in ddH <sub>2</sub> O	
100x Pefabloc	50mg/ml	Pefabloc SC in ddH <sub>2</sub> O
RNase A-Lösung	5µg/ml	RNase A

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Roti-Nanoquant-Arbeitslösung	0,2x	Roti-Nanoquant-Lösung in ddH <sub>2</sub> O
------------------------------	------	--

### Biolistische Transformation

2,5M CaCl <sub>2</sub>	2,5M	CaCl <sub>2</sub>
50% Glycerin/Hydramedium	50% (v/v)	Glycerin in Hydramedium

### DAPT-Behandlung

DAPT-Stocklösung	10mM	DAPT in DMSO
40µM DAPT/1% DMSO	0,4% (v/v)	DAPT-Stocklösung
	0,6%	DMSO in Hydramedium
70µM DAPT/1% DMSO	0,7%	DAPT-Stocklösung
	0,3%	DMSO in Hydramedium
1% DMSO	1% (v/v)	DMSO in Hydramedium

### Hydramedium

Hydramedium	0,1mM	KCl
	1mM	NaCl
	0,1mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O

## 6 Material und Methoden

---

1mM	Tris
1mM	CaCl <sub>2</sub>

### ***In situ*-Hybridisierung**

Anti-DIG-Antikörperlösung	1:2000	Anti-DIG-AP in Blocklösung
Anti-FITC-Antikörperlösung	1:1000	Anti-FITC-AP in Blocklösung
0,25% Acetanhydrid	0,25% (v/v)	Acetanhydrid in Triethanolamin
0,5% Acetanhydrid	0,5% (v/v)	Acetanhydrid in Triethanolamin
10x Blockreagenz	100mg/ml bei -20°C aufbewahren	Blockreagenz in MAP
Blocklösung	1x	Blockreagenz in MAB-BSA
1% CHAPS	1% (w/v)	CHAPS in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
0,1% CHAPS/2x SSC	0,1% (v/v)	CHAPS in 2x SSC
50x Denhardt's	28mM 25mM 1% (w/v) in DEPC-ddH <sub>2</sub> O bei -20°C aufbewahren	Polyvinylpyrrolidon Ficoll Typ 400 BSA V
DEPC Behandlung	0,2% (v/v)	DEPC in gesuchter Lösung gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren
DEPC-behandelte Schottflaschen	Schottflaschen mit DEPC behandeln gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren, Flasche ausleeren und trocknen	
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	0,2% (v/v) DEPC	in ddH <sub>2</sub> O gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren
DEPC-Hydramedium	0,2% (v/v) DEPC	in Hydramedium gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren
0,5M EDTA	0,5M	EDTA in DEPC-ddH <sub>2</sub> O pH 8,0 mit NaOH-DEPC einstellen
FastRed-Färbelösung	1 Tablette FastRed TR/Naphtol AS-MIX	in 1ml DEPC-ddH <sub>2</sub> O
Formamid, deionisiert	2,5g/ml	BioRad AG 501-X8 20-50m in Formamid 1h auf Falkondreher inkubieren durch Faltenfilter filtrieren bei -20°C aufbewahren

## 6 Material und Methoden

---

Glycin-Arbeitslösung	40mg/ml	Glycin in PBT
10x Glycin-Stocklösung	40mg/ml	Glycin in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
	Bei 4°C aufbewahren	
Glycin/HCl	100mM	Glycin
	0,1%	Tween 20
	pH 2,2 mit HCl einstellen	
Heparin	10mg/ml	Heparin Sodium in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
	bei -20°C aufbewahren	
100% Hybridisierungslösung	50% (v/v)	deionisiertes Formamid
	5x	20x SSC
	0,1% (v/v)	Tween 20
	0,1% (v/v)	1% CHAPS
	1x	50x Denhardt's
	100µg/ml	10mg/ml Heparin
	200µg/ml	10mg/ml tRNA
	in DEPC-ddH <sub>2</sub> O	
	bei 4°C aufbewahren	
50% Hybmix/PBT	50% (v/v)	HybMix in PBT
75% Hybmix/2x SSC	75% (v/v)	HybMix in 2xSSC
50% Hybmix/2x SSC	50% (v/v)	HybMix in 2xSSC
25% Hybmix/2x SSC	25% (v/v)	HybMix in 2xSSC
4M LiCl	4M	LiCl in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
MAB	100mM	Maleinsäure
	150mM	NaCl
	pH 7,5 mit NaOH einstellen	
	DEPC-Behandlung	
MABB	2% (w/v)	BSA in MAB
MAB-BSA	1% (w/v)	BSA in MAB
75% MeOH/PBT	75% (v/v)	Methanol in PBT
50% MeOH/PBT	50% (v/v)	Methanol in PBT
25% MeOH/PBT	25% (v/v)	Methanol in PBT
1M MgCl <sub>2</sub>	1M	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O in ddH <sub>2</sub> O
	DEPC-Behandlung	
5M NaCl	5M	NaCl in ddH <sub>2</sub> O
	DEPC-Behandlung	
5M NaOH	5M	NaOH in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
NBT-BCIP-Färbelösung	0,64% (v/v)	NBT

## 6 Material und Methoden

---

	0,35%	BCIP
	in NTMT	
NTMT	0,1M	NaCl
	0,1M	Tris/HCl pH 9,5
	50mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1% (v/v)	Tween 20
	in DEPC-ddH <sub>2</sub> O	
	pH 9,5 einstellen	
4% PFA in Hydramedium	4% (w/v)	Paraformaldehyd
	in DEPC-Hydramedium	
	bei -20°C aufbewahren	
4% PFA in PBT	4% (w/v)	Paraformaldehyd in PBT
1x PBS (Hochsalz)	0,15M	NaCl
	80mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	21mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	in ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,34 mit NaOH einstellen	
	DEPC-Behandlung	
PBS-Glycerin (1:2)	66,7% (v/v)	Glycerin
	0,3x	PBS
PBT	0,1% (v/v)	Tween 20 in 1x PBS
Proteinase K-Arbeitslösung	10µg/ml	Proteinase K-Lösung in PBT
1000x Proteinase K-Lösung	10mg/ml	Proteinase K in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
	bei -80°C aufbewahren	
Sondenlösung	0,005-0,2ng/µl	Sonde in HybMix
20x SSC	3M	NaCl
	0,3M	Na-Citrat x 2H <sub>2</sub> O
	in ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,0 mit HCl einstellen	
	DEPC-Behandlung	
10x TE-Puffer	100mM	Tris, pH 7,5
	10mM	EDTA, pH 8,0
	autoklavieren	
tRNA	0,5% (w/v)	Torula yeast RNA
	1,13mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,13mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O

	in DEPC-ddH <sub>2</sub> O	
	1h bei 60°C lösen	
	OD <sub>260</sub> messen gegen DEPC-ddH <sub>2</sub> O	
	aliquotieren und bei -20°C lagern	
0,1M Triethanolamin	0,1M	Triethanolamin in DEPC-ddH <sub>2</sub> O
	pH 8,0 mit NaOH-DEPC einstellen	
1M Tris/HCl pH 9,5	1M	Tris in ddH <sub>2</sub> O
	pH 9,5 mit HCl einstellen	
	DEPC-Behandlung	
2% Urethan	2% (w/v)	Urethan in Hydramedium

### Isolation genomischer DNA aus Hydra

Isolationspuffer I	100mM	Tris
	200mM	MgCl <sub>2</sub>
	5mM	EDTA
	2% (w/v)	SDS
	pH 8,5 einstellen	
	200µg/ml	Proteinase K
Isolationspuffer II	10mM	Tris
	1mM	EDTA
	pH 7,5 einstellen	
	200µg/ml	RNaseA
70% EtOH	70% (v/v)	Ethanol in ddH <sub>2</sub> O
3M NaAc	3M	NaAc

### Peroxidase

2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O in ddH <sub>2</sub> O
2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O in ddH <sub>2</sub> O
1M Natrium-Phosphatpuffer	0,4M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	0,65M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,1M Natrium-Phosphatpuffer	0,1% (v/v)	1M Natrium-Phosphatpuffer in ddH <sub>2</sub> O
4%PFA/Natrium- Phosphatpuffer	4% (w/v)	PFA in 0,1M Natriumphosphatpuffer

## 6 Material und Methoden

---

5% Sucrose/0,1M Natrium-Phosphatpuffer	5% (w/v)	Sucrose in 0,1M Natrium-Phosphatpuffer
Peroxidase-Färbelösung	0,02% (v/v)	Diaminobenzidine
	0,003% (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	0,25%	Triton-X-100
	0,03% (w/v)	1% CoCl <sub>2</sub>
	in 1xPBS	
0,25%Triton/PBS	0,25% (v/v)	Triton-X-100 in 1xPBS

### Plasmid-Minipräparation

Lösung I	50mM	Glucose
	25mM	Tris, pH 8,0
	10mM	EDTA, pH 8,0
	autoklavieren	
	Lagerung bei 4°C	
Lösung II	0,2N	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Lösung III	5M	KAc
	11,5% (v/v)	Essigsäure
	Lagerung bei 4°C	
RNase A-Lösung	20µg/ml	RNase A

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10% APS	10% (w/v)	APS in ddH <sub>2</sub> O
50% Glycerol	50% (v/v)	Glycerol in in ddH <sub>2</sub> O
2x Ladepuffer	85mM	1,5M Trispuffer pH 6,8
	18% (v/v)	Glycerin
	3,6% (w/v)	SDS
	9% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	Lagerung bei -20°C	
4x Ladepuffer	170mM	1,5M Tris-Puffer pH 6,8
	36% (v/v)	Glycerin
	7,2% (w/v)	SDS



## 6 Material und Methoden

	18% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,2% (w/v)	Bromphenolblau
	Lagerung bei -20°C	
1x Laufpuffer	25mM	Tris
	190mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
	pH 8,3 einstellen	
Sammelgel	4,8% (v/v)	Acrylamid : Bislösung (29:1)
	123mM	1,5M Tris-Puffer pH 6,8
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0,001% (v/v)	TEMED
12% Trenngel	12%	Acrylamid : Bislösung (29:1)
	375mM	1,5M Tris pH 8,8
	0,1% (w/v)	SDS
	2,5% (v/v)	Glycerin
	0,036% (w/v)	APS
	0,0015% (v/v)	TEMED
1,5M Tris-Puffer pH 6,8	1,5M	Tris
	0,4% (w/v)	SDS
	pH 6,8 einstellen	
1,5M Tris-Puffer pH 8,8	1,5M	Tris
	0,4% (w/v)	SDS
	pH 8,8 einstellen	

### SU5402-Behandlung

SU5402-Stocklösung	10mM	SU5402 in DMSO
ATP-Stocklösung	100mM	ATP in H <sub>2</sub> O
1mM ATP	0,01% (v/v)	ATP-Stocklösung
10µM SU5402/1% DMSO/1mM ATP	0,1% (v/v)	SU5402-bzw. ATP-Stocklösung

### Subzelluläre Fraktionierung

100x Cocktail C10	1mg/ml	Pepstatin A
-------------------	--------	-------------

## 6 Material und Methoden

---

	1mg/ml	Aprotinin
	1mg/ml	Leupeptin
1M DTT-Lösung	1M	DT in ddH <sub>2</sub> O
	Lagerung bei -20°C	
Mitochondrienpuffer	5mM	Tris, pH 7,4
	1mM	EGTA
	250mM	Saccharose
	1% (v/v)	C10/Pefabloc
	pH 7,4 einstellen	
100x Pefabloc	50mg/ml	Pefabloc SC (AEBSF)
	in ddH <sub>2</sub> O	
	bei -20°C aufbewahren	

### Wet Western Blot

10x Blotpuffer	250mM	Tris
	1,9M	Glycin
	in ddH <sub>2</sub> O	
1x Blotpuffer (zur Verwendung)	10% (v/v)	10x Blotpuffer
	20% (v/v)	Methanol (techn.)
	in ddH <sub>2</sub> O	
5% Blocklösung	5% (w/v)	Magermilchpulver
	in 1xTBST	
0,1% Ponceau	0,1% (w/v)	Ponceau S
	5% (v/v)	Essigsäure
	in ddH <sub>2</sub> O	
10x TBS	250mM	Tris
	1,4M	NaCl
	27mM	KCl
	in ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,4 mit Salzsäure einstellen	
10x TBST	200mM	Tris
	1,4M	NaCl
	1% (v/v)	Tween 20
	in ddH <sub>2</sub> O	
	pH 7,6 mit Salzsäure einstellen	

## 6.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 6.2.1 PCR

#### Standard-PCR

Ein 20  $\mu\text{l}$  bzw. 50 $\mu\text{l}$ -Standard-PCR Reaktionsansatz wurde hergestellt aus ca. 100ng/ $\mu\text{l}$  der zu amplifizierenden DNA, 10x Taq-Reaktionspuffer, dNTPs, den spezifischen Vor- und Rückwärtsprimern und Taq-DNA-Polymerase. Die genaue Zusammensetzung eines 50 $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatzes können der Tabelle 6 und das PCR-Protokoll kann der Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 6:** 50 $\mu\text{l}$ - Standard-PCR Reaktionsansatz

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration
DNA	variabel	~100ng/ $\mu\text{l}$
Vorwärtsprimer	2,5 $\mu\text{l}$	0,5pmol/ $\mu\text{l}$
Rückwärtsprimer	2,5 $\mu\text{l}$	0,5pmol/ $\mu\text{l}$
10xTaq-Reaktionspuffer	5 $\mu\text{l}$	1x
dNTPs	1 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{M}$
Taq-DNA-Polymerase	0,2 $\mu\text{l}$	1U
Destilliertes Wasser	ad 50 $\mu\text{l}$	

**Tabelle 7:** PCR-Programm zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes

Segment	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
Erste Denaturierung	1	95 $^{\circ}\text{C}$	5min
Denaturierung	30	95 $^{\circ}\text{C}$	0,5min
Annealing		Spezifische Annealingtemperatur	1min
Elongation		72 $^{\circ}\text{C}$	1min/kb
Finale Elongation	1	72 $^{\circ}\text{C}$	7min

#### Touchdown-PCR

Zur Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte oder spezifischer kodierender Sequenzen aus cDNA wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt.

Dabei wird die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur an die zu erwartenden Primer-Schmelztemperaturen erhöht. Nach einer anfänglichen 5-minütigen Denaturierung bei 95 $^{\circ}\text{C}$  erfolgt eine Phase mit insgesamt 30 Zyklen. Jeder Zyklus setzt sich aus 0,5min Denaturierung bei 95 $^{\circ}\text{C}$ , 1min Annealing bei einer bestimmten Annealing-Temperatur und 1 Minute pro kb Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bei 72 $^{\circ}\text{C}$  zusammen. Die Annealing-Temperaturen werden so gewählt, dass man in den ersten

## 6 Material und Methoden

---

beiden Zyklen 5°C über der Primer-spezifischen Schmelztemperatur beginnt und diese in 2°C-Schritten alle zwei Zyklen erniedrigt. Dieses Schema wird für insgesamt 10 Zyklen wiederholt. Die letzten 20 Zyklen erfolgen dann bei einer gleichbleibenden Annealing-Temperatur, die 5°C unter der Primer-spezifischen Schmelztemperatur liegt. Abschließend erfolgte eine finale Elongation 7 Minuten bei 72°C (siehe Tabelle 8).

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 100ng/µl der zu amplifizierenden DNA, 0,5pmol/µl der spezifischen Primer und *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* zusammen.

**Tabelle 8:** Schema einer Touchdown-PCR

Segment	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	5min
2	2	95°C	0,5min
		Schmelztemp. + 5°C	1min
		72°C	1min/kb
3	2	95°C	0,5min
		Schmelztemp. + 3°C	1min
		72°C	1min/kb
4	2	95°C	0,5min
		Schmelztemp. + 1°C	1min
		72°C	1min/kb
5	2	95°C	0,5min
		Schmelztemp. - 1°C	1min
		72°C	1min/kb
6	2	95°C	0,5min
		Schmelztemp. - 2°C	1min
		72°C	1min/kb
7	2	95°C	0,5min
		Schmelztemp. - 3°C	1min
		72°C	1min/kb
8	20	95°C	0,5min
		Schmelztemp. - 5°C	1min
		72°C	1min/kb
9	1	72°C	7min

### Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits* von Stratagene durchgeführt. Dabei wurden jeweils 50ng der doppelsträngigen, zu mutierenden DNA eingesetzt. Die Bedingungen einer Mutagenese-PCR wurden modifiziert und können folgender Tabelle 9 entnommen werden.

**Tabelle 9:** PCR-Programm einer Mutagenese-Reaktion

Segment	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	5min
2	12-18	95°C	0,5min
		55°C	1min
		68°C	2min/kb

### 6.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-PAGE wurden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Zuerst wurde ein 12%iges Trenngel gegossen, das nach 20 Minuten Polymerisation mit einem Sammelgel überschichtet wurde, welches etwa nach 15 Minuten auspolymerisiert war. Die aufzutragenden Proteinproben wurden mit 2x oder 4x Auftragspuffer versetzt, 5 Minuten bei 100°C aufgeköcht und pro Spur bis zu 20µl auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden pro SDS-Gel in eine Spur 3µl des *PeqGOLD Protein-Marker IV (Prestained)* geladen. Der Lauf des Gels erfolgte in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer bei 80V bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Danach wurde die Spannung auf 180V erhöht und das Gel so lange laufen gelassen, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Nach Entfernung der Glasplatten und des Sammelgels konnte im Weiteren ein Wet Western Blot durchgeführt werden (siehe Abschnitt 6.2.3).

### 6.2.3 Wet Western Blot

Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine *HyBond ECL Nitrocellulose Membran* in 1x Blotpuffer über Nacht bei 20mA oder für 2 Stunden bei 200mA. Zur Überprüfung des erfolgreichen Blotvorganges wurde die Membran anschließend 2 Minuten mit Ponceau gefärbt, wodurch alle transferierten Proteine unspezifisch angefärbt wurden. Die Membran wurde dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 5% Milchpulver in 1xTBST blockiert, bevor sie für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Primäantikörper inkubiert wurde. Nachdem durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten in 1xTBST ungebundener Antikörper entfernt wurde, konnte die Membran mit Sekundäantikörper überschichtet und ebenfalls 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert werden. Wie zuvor wurde die Membran anschließend dreimal 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen und schließlich mit Hilfe des *Odyssey Infrared Imagers* detektiert.

### 6.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine BSA-Eichkurve erstellt. Dazu wurden aus einer BSA-Stammlösung mit 0,5mg/ml je 200µl BSA-Lösungen mit 0µg, 5µg, 10µg, 15µg und 20 µg BSA hergestellt und mit 800µl Roti-Nanoquant-Arbeitslösung gemischt. Alle Ansätze wurden gegen ddH<sub>2</sub>O im *UV/Vis Spectrophotometer* bei den Wellenlängen 590nm und 450nm gemessen. Der Quotient der gemessenen Werte bei beiden Wellenlängen wurde gegen die BSA-Proteinmenge aufgetragen und diente als Eichkurve.

Von der zu bestimmenden Proteinprobe wurden ebenfalls 200µl mit 800µl Roti-Nanoquant-Arbeitslösung vermischt und bei 590nm und 450nm gegen ddH<sub>2</sub>O gemessen. Nach Ermittlung des Quotienten beider gemessener Werte und der zuvor erstellten Eichkurve konnte die Konzentration der vorliegenden Probe ermittelt werden.

## 6.3 Methoden für Bakterien

### 6.3.1 Bakterielle Expression von Proteinen im kleinen Maßstab

#### Induktion der Expression

Chemisch kompetente Bakterien des *E.coli*- Stammes BL21 (DE3)- RIL von Statagene wurden mit 400ng des gewünschten Konstrukt transformiert und auf LB-Selektions-Agarplatten ausplattiert. Mit einer Kolonie wurde dann eine Übernachtskultur von 4ml LB-Selektionsmedium angeimpft. Am folgenden Tag wurde zu 20ml frischem LB-Selektionsmedium 1ml der Übernachtskultur gegeben und bei 37°C, 200rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 inkubiert. Dann wurde mit 1mM IPTG induziert und weiter bei 37°C und 200rpm inkubiert. Vor der Induktion sowie 1, 2 und 4 Stunden nach der Induktion und am Morgen des folgenden Tages wurden jeweils 2ml der Kultur entnommen und bei 12 000g, 4°C für 3 Minuten abzentrifugiert.

#### Aufschluss der Bakterien

Die Bakterienpellets der verschiedenen Zeitpunkte wurden jeweils in 250µl *Osmotic shock*-Puffer resuspendiert und je drei Mal aufeinander folgend drei Mal 10 Sekunden lang auf Eis mit Hilfe des *Sonopuls SD9*-Geräts sonifiziert. Die so aufgeschlossenen Bakterien wurden dann 10 Minuten bei 12.000g und 4°C abzentrifugiert. Zum Überstand wurden je direkt 200µl 2x Lade-puffer gegeben. Die Sedimente wurden jeweils in 50µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 50µl 2x SDS-Auftragspuffer versetzt. Alle Proben wurden bei einer SDS-Gelelektrophorese und einem

Western Blot eingesetzt und so der Zeitpunkt nach der IPTG-Induktion ermittelt, bei welchem die größte Menge des gewünschten Proteins von den Bakterien exprimiert worden war.

### 6.3.2 Bakterielle Expression von Proteinen im großen Maßstab

#### Induktion der Expression

Zuerst erfolgte die Transformation hitzeschock-kompetenter Bakterien des *E.coli*- Stammes BL21 (DE3)-RIL von Stratagene mit 400ng des gewünschten Plasmids und das Ausplattieren auf LB-Selektions-Agarplatten. Mit einer Kolonie wurde eine 120ml Übernachtskultur angeimpft. Am folgenden Tag wurden zwei Liter LB-Selektionsmedium mit je 50ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C, 200rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression des gewünschten Proteins durch 1mM IPTG. Die Bakterien wurden solange bis zu dem Zeitpunkt weiter bei 200rpm und 37°C geschüttelt, bei dem durch die kleine Expression die größte exprimierte Proteinmenge ermittelt werden konnte. Dann wurde die gesamte Kultur 30 Minuten bei 4000rpm und 4°C abzentrifugiert und das *Pellet* in 40ml DBB/I resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### Aufschluss der Bakterien

Die in DBB/I resuspendierten *Pellet* wurden auf Eis aufgetaut und anschließend ebenfalls auf Eis fünfmal 10 Sekunden (mit je 10 Sekunden Pause) mittels des Ultraschallgerätes *Branson Digital Sonifier* aufgeschlossen. Dann wurden 1µl RNase A-Lösung, 20µl DNase I-Lösung sowie 100µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben, bevor die Suspension auf einem Falkondreher bei 4°C für 30 Minuten inkubiert wurde. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 3500rpm und 4°C zentrifugiert und vom Überstand 50µl abgenommen und mit 50µl 2x SDS-Ladepuffer versetzt. Der restliche Überstand wurde weiter aufgereinigt.

#### Aufreinigung mittels Zentrifugation - Vorbereitung des Slurrys

Pro Liter induzierter und abzentrifugierter Bakterienkultur wurden 200µl Nickel Sepharose *beads* bei 500g 3,5 Minuten zentrifugiert. Das *Pellet* wurde mit 1ml ddH<sub>2</sub>O versetzt und darin durch Rotation auf dem Drehrad vorsichtig und vollständig gelöst. Anschließend wurde erneut 3,5 Minuten bei 500g zentrifugiert und das *Pellet* in 200µl DBB/I aufgenommen.

### **Binden der Probe**

Die gewaschenen Nickel Sepharose *beads* wurden dann zum zuvor gewonnenen, aufgeschlossenen Bakterienüberstand gegeben und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert, damit die His-*getaggt*en Proteine an die *beads* binden konnten. Danach wurde erneut 3,5 Minuten bei 500g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Das *Pellet* wurde weiter gewaschen.

### **Waschen des Mediums**

Zum Waschen des *Pellets* wurde 1ml DBB/l zugegeben, resuspendiert und wiederum vorsichtig durch Rotation auf dem Drehrad 3 Minuten lang gemischt. Anschließend wurde erneut 3,5 Minuten bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abgenommen, mit 2x Ladepuffer versetzt und für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt. Das *Pellet* wurde auf diese Weise noch weitere zwei Mal gewaschen, wobei die dabei entstandenen Überstände jeweils entnommen und mit 2x Auftragspuffer versetzt wurden.

### **Elution**

Zur Elution der an die Nickel Sepharose *beads* gebundenen Proteine wurden zum *Pellet* des letzten Waschschrilles 400µl DEB-Elutionspuffer zugegeben, vorsichtig durch 5-minütige Rotation auf dem Drehrad gemischt und 3,5 Minuten bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 2x Ladepuffer versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Der Elutionsschritt wurde weitere viermal wiederholt, wobei jeweils die Überstände abgenommen, mit 2x Ladepuffer versetzt und eingefroren wurden.

### **Dialyse**

Zur Entfernung störender Salze, insbesondere des Guanidin-HCl wurden alle gewonnenen Überstände und Eluate dialysiert. Hierfür wurden in die Deckel der Eppendorf-Reaktionsgefäße mit sterilen Skalpell Löcher eingeschnitten, die Proben überführt und ein zugeschnittenes Stück Dialyseschlauch bestimmter Porengröße (die aufgereinigten Proteine sollten natürlich zurückgehalten werden) zwischen Deckel und Reaktionsgefäß eingeklemmt. Anschließend wurden die Gefäße in einem Schwimmer kopfüber in 1xPBS gerührt. Nach 1 und 5 Stunden wurde die Pufferlösung erneuert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde wie unter Abschnitt 6.2.4 dargestellt bestimmt und konnten dann für SDS-PAGE und Western Blot-Analyse verwendet werden.



## 6.4 Methoden für Hydra

### 6.4.1 Kultivierung von *Hydra vulgaris*

*Hydra vulgaris* wurde bei 18°C in Hydramedium kultiviert. Die Tiere wurden täglich mit frisch geschlüpften *Artemia nauplii* gefüttert und ca. 4 Stunden nach der Fütterung mit frischem Hydramedium gewaschen. Einmal pro Woche wurden die Hydren außerdem in eine neue Kulturschale umgesetzt.

### Herstellung blau-gefärbter Hydren

*Artemia nauplii*, die in mit Evansblau versetztem Salzwasser frisch geschlüpft waren und deshalb den Farbstoff in ihren Darm aufgenommen hatten, wurden an Hydren verfüttert. Diese erhielten dadurch einen blau gefärbten Rumpf und konnten eindeutig von den „rosa“ Hydren unterschieden werden.

### 6.4.2 Herstellung von cDNA aus *Hydra*

Zur Herstellung von cDNA wurde zunächst mRNA aus Hydren mit Hilfe des *Quick Prep Micro mRNA Purification Kits* isoliert. Dazu wurden 100 Tiere in 0,6ml *Extraction buffer* 20 Mal zerspritzt. Zu dieser Suspension wurden 1,2ml *Elution buffer* hinzugefügt und weiter gemäß den Angaben des Kit-Herstellers verfahren. Die Elution der mRNA erfolgte zweimal in 0,2ml vorgewärmten *Elution buffer*. Nachdem die Konzentration der mRNA-Lösung mittels des *UV Nanovues* bestimmt wurde, wurden 150ng zur cDNA-Synthese mit Hilfe des *First-Strand cDNA Synthesis Kits* eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

### 6.4.3 Kopfregeneration

Unbehandelte, mindestens einen Tag ungefütterte Tiere wurden dekapitiert und über 190 Stunden hinweg ihre Entwicklung beobachtet und dokumentiert. Die Dekapitation erfolgte dabei mit einem scharfen Skalpell und entsprechend Lengfeld *et al.* (2009) und Hobmayer *et al.* (2000) bei 75% der Körperlänge (2/8), damit direkt unterhalb des Tentakelkranzes, oder bei 50% der Körperlänge (4/8).

## 6 Material und Methoden

---

Die kopfregenerierenden Tiere wurden für die statistische Auswertung in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt. Es wurde zwischen Tieren „ohne regenerierten Kopf (nicht regeneriert)“, wozu auch Tiere mit abnormal regenerierten Kopfstrukturen gezählt wurden, und solchen mit „normal regenerierten Kopfstrukturen“ unterschieden. Tiere, bei denen sich deutlich das Hypostom als domähnliche Struktur ausbildete und bei denen mindestens zwei normale Tentakelknospen aus der Tentakelzone auswuchsen, wurden als „normal regenerierte Köpfe“ bezeichnet. Nicht genau definierbare oder bizarre Strukturen ohne Hypostom, fehlender Tentakelknospen oder mit fehllokalisierter Tentakelbildung wurden als „abnormal nicht regenerierte Köpfe“ bezeichnet. Tiere, bei denen lediglich die Wundheilung zu einer geschlossenen Kappe erfolgt war, wurden ebenfalls als „nicht regenerierte Köpfe“ eingeordnet.

### 6.4.4 DAPT-Behandlung

Für die DAPT-Behandlung wurden ein Tag ungefütterte Hydren, knospenlos oder mit Knospen in spezifischen Stadien, mit DAPT bestimmter Konzentration in Hydramedium und 1% DMSO behandelt (DAPT-Lösung). Als Kontrolltiere dienten parallel ebenfalls ein Tag ungefütterte Tiere, die mit 1% DMSO in Hydramedium gehalten wurden (Kontroll-DMSO-Lösung). Die DAPT- bzw. Kontroll-DMSO-Behandlung wurde insgesamt für 24 oder 48 Stunden durchgeführt, wobei die DAPT- bzw. DMSO-Lösung alle 12 Stunden erneuert wurde.

#### DAPT-Behandlung knospender Tiere

Hydren mit Knospen in den Stadien 3 bis 5 wurden mit 40 $\mu$ M DAPT-Lösung behandelt. Als Kontrolltiere dienten parallel ebenfalls ein Tag ungefütterte, knospende Tiere derselben Knospenstadien in Kontroll-DMSO-Lösung. Die DAPT-Behandlung erfolgte entweder über 24 oder 48 Stunden und die Tiere dienten jeweils direkt für *in situ*-Hybridisierungsexperimente.

#### DAPT-Behandlung von Kopfregeneraten

Für die Kopfregenerationsreihen wurden knospenlose, mindestens einen Tag ungefütterte Hydren verwendet. Es erfolgte zunächst eine DAPT-Behandlung vor der Dekapitation ganzer Tiere für 24 Stunden (Prä-Dekapitation DAPT-Behandlung) mit 70 $\mu$ M DAPT- bzw. Kontroll-DMSO-Lösung. Das Köpfen erfolgte direkt unter dem Tentakelkranz oder die Tiere wurden halbiert. Anschließend wurden die geköpften Tiere weitere 24 Stunden mit DAPT behandelt (Post-Dekapitation DAPT-Behandlung), bevor sie in frisches Hydramedium überführt wurden. Kopfregenerate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Dekapitation entnommen und für *in situ*-Hybridisierungsreaktionen (siehe Abschnitt 6.4.11) oder Transplantationsversuche (siehe

Abschnitt 6.4.5) eingesetzt. Die Entnahme erfolgte nach 8, 24, 36 oder 48 Stunden (siehe Abb. 3-28).

### 6.4.5 Transplantation von Kopfgeneraten

Kopfgenerate wurden wie in den Abschnitten 6.4.3 und 6.4.4 dargestellt mit DAPT- bzw. Kontroll-DMSO-Lösung behandelt und hergestellt. Die Tiere wurden dabei halbiert, d.h. bei 50% der Körperlänge geschnitten. Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten, 8, 24, 36 bzw. 48 Stunden nach der Dekapitation wurde die sich regenerierende, apikale Kappe (5/8) mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und in die Mitte (50% Körperlänge) eines blauen Wirtstiers transplantiert. Der Gastralraum des Wirtstieres wurde hierbei nur zu 2/3 eingeschnitten und die Kappe mit dem distalen Teil voran hineintransplantiert. Zusätzlich wurde dem Wirtstier der Kopf direkt unterhalb des Tentakelkranzes entfernt und verworfen. 24 Stunden nach Transplantation wurden die Transplantate ausgewertet (siehe Abb. 3-39). Es wurde jeweils der Prozentsatz an Transplantaten ermittelt, bei denen das transplantierte Kopfgenerat die Ausbildung einer sekundären Achse induzieren konnte.

### 6.4.6 SU5402-Behandlung

Tiere mit Knospen in den Stadien 3 bis 5 wurden 24 Stunden mit 10 $\mu$ M des FGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors SU5402 inkubiert, bevor sie in Hydramedium transferiert und in diesem weitere 24 Stunden gehalten wurden. Im Anschluss wurden die behandelten Tiere für *in situ*-Hybridisierungsexperimente verwendet.

### 6.4.7 Biolistische Transformation von Plasmid-DNA

#### Vorbereitung der *Microcarrier*

Für die Herstellung der Goldstocklösung wurden 30mg Goldpartikel von 1 $\mu$ m Durchmesser abgewogen und 1ml 70% Ethanol gegeben. Dann wurde 5 Minuten kräftig gevortext und anschließend der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, so dass sich die Goldkugeln mit dem Alkohol voll saugen konnten. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000g für nur 5 Sekunden. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das *Pellet* aus Goldkugeln wurde insgesamt dreimal mit 1ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen, 1 Minute gevortext, 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen und 5 Sekunden bei 1000g abzentrifugiert. Abschließend

## 6 Material und Methoden

---

wurde das *Pellet* in 500µl sterilem 50% Glycerin-Hydratedium aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die Goldlösung hatte damit eine Konzentration an Gold von 3mg/50µl.

### **Fällung der Plasmid-DNA auf *Microcarrier***

40µl der Goldstocklösung wurden 5 Minuten gevortext. Anschließend wurden mindestens 10µg und maximal 20µg der gewünschten Plasmid-DNA in maximal 15µl zugegeben und gut gemischt. Zum Fällung der DNA auf die Goldpartikel wurden dann 50µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> und 20µl 0,1M Spermidin zugegeben und auf dem Schüttelteller 10 Minuten gut durchmischt. Anschließend wurde 5 Sekunden bei 500g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Gold-*Pellet* wurde in 140µl 70% Ethanol aufgenommen, kurz durch Vortexen gemischt, wiederum bei 500g 5 Sekunden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das *Pellet* mit 140µl 100% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das *Pellet* in 50µl bzw. 75µl 100% Ethanol aufgenommen. Je 25µl dieser Gold-DNA-Lösung wurden auf einen *Macrocarrier* mittig aufgetropft und luftgetrocknet.

### **Biolistische Transformation**

Die Transformation von je 60 bis 100 ungefütterten Hydren erfolgte mit dem *PDS-1000/He Particle Delivery System* von BioRad bei einem Druck von 850 bis 900psi.

Für den Beschuss wurde eine in 100% Isopropanol p.a. getränkte *rupture disc* in die *Disk Retaining Cap* gelegt und anschließend die *Cap* mit Schraubschlüssel in der Kammer festgedreht. Der *Macrocarrier* im *Macrocarrier Holder* und der *stopping screen* wurden in die *Macrocarrier Launch Assembly* eingelegt und ein mittlerer Abstand zur *Disk Retaining Cap* gewählt. Der *Stopping Screen Support* befindet sich damit auf einer mittleren Position. Die Petrischale mit den in möglichst wenig Hydratedium gehaltenen Hydren wurde in der Mitte der *Target Shelf* gestellt und in oberster Position eingeschoben. Schließlich wurde Vakuum angelegt und der Feuerknopf solange betätigt, bis die *rupture disc* zerbrach. Dieser Vorgang wurde zwei- bis dreimal mit denselben Hydren wiederholt. Die Tiere wurden dann in frisches Hydratedium überführt und bei 18°C im Dunkeln gehalten. Am folgenden Tag wurde am Fluoreszenzbinokular die Expression von grün bzw. rot fluoreszierendem Protein untersucht.

#### **6.4.8 Nachweis der Peroxidase-Aktivität**

Mindestens 24 Stunden ungefütterte Hydren wurden für 2 bis 3 Minuten in 2% Urethan in Hydratedium relaxiert und anschließend über Nacht bei 18°C in 4% PFA/0,1M Natriumphos-

phatpuffer fixiert. Dann wurden die Tiere 24 Stunden mit 5% Sucrose/0,1M Natriumphosphatpuffer gewaschen. Die Färbung erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit der Peroxidase-Färbelösung, bevor sie 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 0,25% Triton/PBS gewaschen wurden. Abschließend wurden die Tiere auf gelatinisierten Objektträgern in PBS/Glycerin (1:2) eingebettet und die Präparate bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 6.4.9 Zellfraktionierung

500 einen Tag ungefütterte Hydren wurden 20 Minuten auf Eis in 2ml Mitochondrienpuffer in einem *Dounce*-Homogenisator inkubiert, bevor sie insgesamt mit 35 Stößen gepottet wurden. Nach Überführen in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden zunächst die Kerne von 250 Tieren durch Zentrifugation bei 1000g und 4°C für 10 Minuten *pelletiert*. Der Überstand wurde entnommen und bei 16 000g, 4°C 30 Minuten die Mitochondrien abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und bei 100.000g und 4°C eine Stunde zentrifugiert. Das *Pellet* enthielt die Mikrosomen und der Überstand das Zytoplasma von 250 Hydren. Alle vier Fraktionen wurden jeweils mit 2x bzw. 4x SDS-Ladepuffer versetzt, bei -20°C gelagert oder direkt 5 Minuten bei 100°C für die SDS-PAGE aufgekocht.

#### 6.4.10 Immunfluoreszenzfärbung ganzer Hydren (whole mounts)

Zunächst wurden einen Tag ungefütterte Hydren in 2% Urethan für 2 bis 3 Minuten relaxiert. Pro Vertiefung einer *96-well* Flachbodenplatte wurde eine Hydra verwendet. Anschließend wurden sie 1 Stunde in Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach verwendetem Primärantikörper wurden die Tiere auf spezifische Weise fixiert (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Für spezifische Primärantikörper eingesetzte Fixative

Primärantikörper	Fixativ
anti-Hes (Hühnchen)	Lavdowsky
anti-Hes (Hase)	Lavdowsky
anti-Nowa (H22)	4% PFA/Hydramedium
anti-Spinalin	4% PFA/Hydramedium
anti-ZIC7A12	Lavdowsky oder 4% PFA/Hydramedium

Nach der Fixierung wurden die Tiere 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei 100rpm und Raumtemperatur in Permeabilisierungslösung permeabilisiert und anschließend 20 Minuten bei

## 6 Material und Methoden

Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert. Die Tiere wurden dann mit 100µl Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Tiere dreimal 10 Minuten mit 1xPBS gewaschen und dann erfolgte die Inkubation mit 100µl des Sekundärantikörpers für 2 Stunden im Dunkeln. Schließlich wurde erneut dreimal 10 Minuten mit 1xPBS im Dunkeln gewaschen, mit 100µl DAPI/TO-PRO3-Färbelösung 5 Minuten gefärbt, kurz mit 1xPBS gewaschen und auf einem Objektträger in Vectashield eingebettet. Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

### 6.4.11 *In situ*-Hybridisierung

#### 6.4.11.1 Sondenherstellung durch PCR

Zu Beginn wurden pro Gen zwei 20µl-Standard-PCR-Reaktionen durchgeführt, antisense und sense (siehe Abschnitt 6.2.1). Pro PCR-Ansatz wurden dabei jeweils ein Gen-spezifischer sowie ein RNA-Polymerase-Bindestellen-spezifischer Primer eingesetzt. Die für jedes Gen spezifischen Primerkombinationen für die antisense und sense-Ansätze können Tabelle 11 entnommen werden. Die PCR-Produkte wurden dann auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des *PeqGOLD Gel Extraction Kits* in 20µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurden die eluierten PCR-Produkte durch eine 50µl Standard-PCR reamplifiziert. Ein Aliquot dieser Reamplifikation wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, um die Abwesenheit unspezifischer Amplifikate sicherzustellen. Die Reamplifikate wurden direkt für eine *in vitro*-Transkriptionsreaktion eingesetzt.

**Tabelle 11:** Spezifische Primerkombinationen zur Amplifikation von antisense und sense-PCR-Produkten

Gen	Sonde	Primerkombination	Annealing-Temperatur
<i>kringelchen</i>	Anti-sense	Kri_for	50°C
		T7-mac	
	sense	Kri_rev	50°C
		T3-mac	
<i>MMP-A3</i>	Anti-sense	MMP-A3_for	55°C
		SP6-long	
	sense	MMP-A3_rev	58°C
		T7-long	
<i>Hywnt3a</i>	Anti-sense	Hywnt3a-Bam_for	50°C
		T3-mac	
	sense	Hywnt3a-Eco_rev	58°C
		T7-long	
<i>Hvwnt8</i>	Anti-sense	Hywnt8-Kpn_for	58°C
		T7-long	
	sense	Hywnt8-Xho_rev	50°C
		T3-mac	

### 6.4.11.2 Sondenherstellung durch Linearisierung

Für jedes Plasmid wurden zwei Restriktionsverdau angelegt, antisense und sense. Der antisense Ansatz diente in der *in vitro*-Transkription zur Synthese einer antisense Sonde, die komplementär zur mRNA ist und an diese somit hybridisieren kann. Der sense Verdau diente zur Synthese einer sense Kontroll-Sonde, die nicht komplementär zur mRNA ist und damit nicht an diese hybridisieren kann.

Für jeden Restriktionsverdau wurden 50µg einer spezifischen Plasmid-Maxipräparation eingesetzt. Der Verdau erfolgte für jeden der beiden Ansätze mit zwei Restriktionsenzymen, die so gewählt wurden, dass sie nur einfach innerhalb des Plasmids und nur auf einer Seite des spezifischen Inserts schnitten. Je 20µg des spezifischen antisense und sense Verdaus desselben Plasmids wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des *PeqGOLD Gel Extraction Kits* oder des *QIAquick Gel Extraction Kits* in 20µl Elutionspuffer eluiert. Bei der anschließenden *in vitro*-Transkription wurde 1µg des antisense- bzw. sense-Eluates eingesetzt. Die für spezifische Gene eingesetzten Restriktionsenzyme zur Linearisierung können Tabelle 12 entnommen werden.

**Tabelle 12:** Spezifische Kombinationen von Restriktionsenzymen für die Linearisierung von antisense bzw. sense- Ansätzen und die jeweils in der *in vitro*-Transkription eingesetzte RNA-Polymerase

Gen	Sonde	Restriktionsenzyme	RNA-Polymerase
<i>Hyalx</i>	Anti-sense	BamHI / NotI	T7
	sense	EcoRI / KpnI	T3
<i>Hydsh</i>	Anti-sense	NcoI / SacII	SP6
	sense	NotI / SacI	T7
<i>Hmfz2</i>	Anti-sense	NotI / SacI	T7
	sense	NcoI / SacII	SP6
<i>HyHes</i>	Anti-sense	KpnI / XhoI	T7
	sense	BamHI / EcoRI	T3
<i>HMMP</i>	Anti-sense	BamHI / NotI	T3
	sense	KpnI / XhoI	T7
<i>Hvnotch</i>	Anti-sense	KpnI / XhoI	T3
	sense	BamHI / SacI	T7
<i>PPOD-1</i>	Anti-sense	KpnI / XhoI	T3
	sense	XbaI / BamHI	T7

### *In vitro*-Transkription

Ein *in vitro*-Transkriptionsreaktionsansatz setzte sich zusammen aus 1µg linearisierter DNA bzw. 7µl Reamplifikations-PCR, 10x Transkriptionspuffer, *DIG* bzw. *Fluorescein RNA Labeling Mix*, 20U RNase Inhibitor und 40U der entsprechenden RNA-Polymerase. Falls notwendig wurde der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O-DEPC auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht. Nach dreistündiger

## 6 Material und Methoden

---

Inkubation bei 37°C wurden weitere 20U spezifischer RNA-Polymerase hinzugefügt und erneut zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 2µl DNase I (RNase-frei) und Inkubation bei 37°C für 45 Minuten abgebaut. Die so amplifizierte RNA-Sonden wurden entweder mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* oder durch Fällung aufgereinigt.

### **Aufreinigung der RNA-Sonden**

Bei der Aufreinigung über *RNeasy Spin Columns* wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Elution erfolgte in 30µl RNase-freiem Wasser und schlussendlich wurden 20U RNase Inhibitor zum Schutz der fertiggestellten Sonde hinzugefügt.

Zur Fällung synthetisierter RNA-Proben wurden dem *in vitro*-Transkriptionsansatz direkt 2,5µl 4M LiCl-Lösung, 2µl 0,5M EDTA-Lösung und 75µl eisgekühlter 100% Ethanol-DEPC hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann entweder über Nacht bei -20°C oder mindestens 1 Stunde bei -80°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14 000g, 4°C für 30 Minuten. Das entstandene RNA-*Pellet* wurde zweimal mit 50µl eisgekühltem 70% Ethanol-DEPC gewaschen und schlussendlich nach Trocknung in 20µl ddH<sub>2</sub>O-DEPC aufgenommen und mit 20U RNase-Inhibitor versetzt.

### **Dot Blot**

Zum Test der erfolgreichen *in vitro*-Transkription und zur Bestimmung der einzusetzenden RNA-Sondenmenge wurde ein Dot Blot angefertigt. Hierfür wurden von den aufgereinigten Sonden Verdünnungen von 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500 und 1:3000 hergestellt, ebenso von einer Kontrollsonde mit bekannter Konzentration. Je 1µl jeder Verdünnungsstufe wurde auf eine *PALL Biodyne B Transfer Membrane* aufgetropft und getrocknet. Nach Quervernetzung der RNA-Sonden mit der Membranoberfläche mit Hilfe des *UV Stratalinker 1800* von Stratagene wurde die Membran zunächst 1 Minute mit MAB gewaschen und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur bei 200rpm in MABB geblockt. Dann erfolgte eine Inkubation mit der anti-DIG bzw. anti-FITC-Antikörperlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Membran 1 Minute mit NTMT gewaschen, bevor sie 10 Minuten mit NBT-BCIP-Färbelösung gefärbt wurde. Die Färbereaktion wurde mit 1x TE-Puffer gestoppt und die Membran zur Dokumentation getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Bestimmung der zu verwendenden Sondenmenge ergab sich aus dem Vergleich mit der Kontrollsonde.



### ***In situ*-Hybridisierungsreaktion**

Sofern nicht weiter angegeben erfolgten die Inkubationen in 1ml der entsprechenden Lösung, bei Raumtemperatur und 80 rpm.

Mindestens ein Tag ungefütterte Hydren wurden 2-3 Minuten in 2% Urethan entspannt und anschließend in 4% PFA/Hydramedium zur Fixierung überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 4°C wurde die Lösung durch frisches 4% PFA/Hydramedium ersetzt und die Tiere bei 4°C über Nacht vollständig fixiert.

Die fixierten Tiere wurden dreimal für je 5 Minuten in 1xPBS (Hochsalz) gewaschen. Dann wurden die Hydren zuerst durch eine aufsteigende Methanolreihe dehydriert und wieder durch eine absteigende Reihe rehydriert. Hierfür wurden die Tiere je 5 Minuten mit 25% MeOH/PBT, 50% MeOH/PBT, 75% MeOH/PBT, zweimal 100% MeOH/PBT, 75% MeOH/PBT, 50% MeOH/PBT und zuletzt wieder mit 25% MeOH/PBT behandelt. Im Anschluss daran wurden die Proben dreimal je 5 Minuten mit PBT gewaschen.

Zur Permeabilisierung wurden die Hydren 10 Minuten mit ProteinaseK-Arbeitslösung behandelt. Die Reaktion wurde durch eine anschließende kurze und eine 5-minütige Behandlung mit Glycin-Arbeitslösung abgestoppt. Danach wurde erneut zweimal 5 Minuten mit PBT gewaschen, bevor die Hydren zweimal für je 5 Minuten mit 0,1M Triethanolamin inkubiert wurden. Daraufhin folgten 5 Minuten in 0,25% Acetanhydrid in TEA, weitere 5 Minuten in 0,5% Acetanhydrid in TEA und zweimaliges Waschen für 5 Minuten in PBT.

Die zweite Fixierung der Hydren erfolgte 20 Minuten lang in 4% PFA/Hydramedium bei Raumtemperatur ohne Schütteln. Zur Entfernung des PFAs wurde anschließend fünfmal je 5 Minuten mit PBT gewaschen.

Zunächst erfolgte bei 55°C in einer feuchten Kammer eine 10-minütige Inkubation in 750µl 50% HybMix/PBT, dann wurde 10 Minuten in 750µl 100% HybMix inkubiert und schließlich mindestens 2 Stunden in frischem 100% HybMix.

Je 750µl bzw. 600µl der gewünschten Sondenlösung (0,005 – 0,2ng/µl in HybMix) wurden zunächst 2 Minuten bei 95°C aufgekocht und bei 55°C 10 Minuten inkubiert, bevor sie auf die prähybridisierten Hydren gegeben und über Nacht bzw. bis zu zwei Tage bei 55°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurden.

Die Sonden wurden durch Waschen mit 750µl frischer 100% HybMix, 75% HybMix/2x SSC, 50% HybMix/2x SSC und 25% HybMix/2x SSC in einer feuchten Kammer bei 62°C entfernt.

## 6 Material und Methoden

---

Dann wurden die Hydren zweimal 30 Minuten mit 0,1% CHAPS/2x SSC bei 62°C inkubiert und zweimal 10 Minuten mit MAB bei Raumtemperatur gewaschen.

Die post-hybridisierten Hydren wurden eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend mindestens eine Stunde in 600µl Blocklösung bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht in 600µl anti-DIG- bzw. anti-FITC-Antikörper-Lösung bei 4°C. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde insgesamt sechsmal 30 Minuten mit MAB gewaschen.

Die mit MAB gewaschenen Hydren wurden zweimal 5 Minuten in NTMT gewaschen, bevor sie in NBT-BCIP- bzw. BM-Purple- bzw. FastRed Färbelösung bis zur gewünschten Färbung bei 37°C inkubiert wurden. Die Färbereaktion wurde bei Färbung mit NBT/BCIP oder BM-Purple durch 20 Minuten in 100% Ethanol-DEPC gestoppt und zuletzt zweimal 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Nach Färbung mit FastRed wurden die Tiere nur zweimal fünf Minuten in ddH<sub>2</sub>O-DEPC gewaschen. Die Hydren wurden abschließend in einem Tropfen PBS-Glycerin (1:2) auf einem Objektträger eingebettet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **Doppel-*in situ*-Hybridisierungsreaktion**

Doppel-*in situ*-Hybridisierungsexperimente erfolgten bis zur Farbreaktion identisch zu den einfachen Hybridisierungsreaktionen. Die erste, „blaue“ Färbung mit NBT-BCIP-Färbelösung bzw. BM-Purple wurde durch Waschen für 20 Minuten in 100% EtOH abgestoppt. Durch anschließend 10 minütige Inkubation in Glycin-HCl wurde die an den ersten Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase zerstört. Dann wurde insgesamt viermal kurz und zweimal 10 Minuten in MAB gewaschen. Es folgte eine Inkubation in Blocklösung bei Raumtemperatur für eine Stunde und eine mindestens einstündige Inkubation bei 4°C, bevor die Hydren über Nacht bei 4°C in die anti-FITC-Antikörperlösung gegeben wurden. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde insgesamt sechsmal 30 Minuten mit MAB gewaschen. Zur Vorbereitung der zweiten Färbung wurde dann zweimal fünf Minuten mit NTMT inkubiert und schließlich mit *Fast Red TR/Naphthol AS-MX* bei 37°C gefärbt. Abschließend wurde zweimal 5 Minuten mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Tiere in PBS-Glycerin (1:2) eingebettet.

## 7 Anhang

### 7.1 Promotorsequenzen

#### *HyHes*-Promotor-short

```

CATTGCACCC AAGTGTTTGA GGAAAATAAT TGTAATAGTG ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
TTTTTTGTTA ATATATTTTG CAATCTGATT TAATACAAGT TTTTCACTGT TTTTTTAAAT AATTTTGGTA
TGAGGTAGTG TGGTAAATTG AACAACATAA TAAACTTTA TTTATTTACT TTAAACCTTA AAAACATGGT
CTGTGGCTAT TGTAGCAAAT AATTTAAAAC TAGCCAATCA GAGATCAAAA TTTCTTTAAA AAAAATTCTA
TTATAATCAT TTTTCATTGT TTAAACTGAT AATAACTCGA CCAACACGCG CCGTTTAAAG CCGTAAACCA
ATCGCGCTTT TGCTAAAATT CTCACGCTTA AAAGTTTAT ATGTCATAAT GGCTTTAAAT AGACGTTTAC
TTATAGTGTG CAAACAATTG TCGCTTGGAA GTAGGCACGG GTCAC TTGAA AGTCTATTAA CAAATTTTCA
ATATGCTGTG CAGGAATGAA GGAATTATTA AATAAGATTC TTTTATTAA TTAATTTTTT ATTATTTGCA
ACTACTTTTC CTTTAGAAAA TAAAATAAAA ATTATTAAAA ATGACGGACA CAGAAAGACA TCC

```

Su(H)-Bindestelle unterstrichen

#### *HyHes*-Promotor-short mutiert: **S2/1mut**

... CTAAAATTGTGAGGGTTAAAAAGT ...

#### *HyHes*-Promotor-short mutiert: **+2S2/1**

```

..... CCAACACGCG CCGTTTAATT CTCACGCTTA GCCGTAAACC AATCGCGCTT TTGCTAAAAT
CTCACGCTT AAAAGTTTAT TATGTCATAA TGGCTTTAAA TAGACGTTTA CTTCTCACGC TTTTATAGTG
TGCAACAAT .....

```

### 7.2 Gensequenzen

Eingetragene Sequenzen:

Genname	GenBank accession number
<i>HMMP</i>	AF162688.1
<i>Hmfz2</i>	EU442372.1
<i>Hvwnt8</i>	AM279158.1
<i>Hvnotch</i>	EU152252.1
<i>Hyalx</i>	AF295531.1
<i>Hydsh</i>	AF272674.1
<i>Hywnt3</i>	XM_002158386.1
<i>kringelchen</i>	AY193769
<i>PPOD-1</i>	AY034095

**Neue Sequenzen:****HyHes**

ATGACGGACA CAGAAAGACA TCCAATGAAG GAAAAAAGAA GGGCTAACAA ACCGTTGTTA GAAAGAAAAC  
 GGCGTGCACG CATAAACAAAC AGTCTAAACG ACATGAAACA CTTAGTTTTG TCTTTTTTGA ACAAGGATGC  
 AACTAAGTTT ACAAAAATGG AGAAAGTCGA TATTCTAGAT ATGACTGTTC ATTATTTACA ACAACAGTTT  
 AAAAGCAGAG GAGAACAATA TTCTTCTGTT TATCGATCTG GCTACGAAGA TTGTAAACAC GCTATGTACC  
 AAAATATTAT GGCTATGGAT ATAGACCTTC AAACAAAATA TCAAATTATG AGTCAAATGT CAACGGCATT  
 TGAAAATTCT CACCATTAT CTACCCACC ACCTAGTCCT TCTTCAGAAC GATCAAGCAG TCCTTTAATT  
 AACTATACAT CTACGCGTAT TTTTCTCCG TCTCCAACT TGCCTAAGCA GAAAAATTCG CCAAAAAAAT  
 GTAATTTAGT TTGGCGACCG TACGAATAA

**MMP-A3**

TGAGAGTTTT CAAGACGAAC CAGTTGATTA TGAAAATACA TTTAAAAGAAT CGCTACAAAA CTTACAAACA  
 TTTGCCGGAA TTCCTGCATC TGGAATATTG GATGCTCCAA CAAAAGAGTT AATTCAGACA CCTAGATGTG  
 GTATGCCTGA TTTTTCAAGT AACACTGGAA CTCTATTAGG CTCAAGGAAA AGACGGTATG CACTGCAAGG  
 ATCAGCTTGG AAAAAAACAA ACCTTACTTG GAAATTACTA AATGACAACA ATGATGGTTT AACACGTGAA  
 CAAGTTGAAG ACGTACTAAT AGAAGCCTTT TCAAAATGGG AAAAAGTATC CTCTTTAAAT TTTAAAAAAT  
 TAGATTTACA AAGTAGCGAG AAAGTTGACA TAGAAGTAAA ATTTGTACAA AATTATCATC AGGATCCATA  
 TGTTTTGAT GGACTTGGTG GAACGTTAGC TCACGCCTTT TATCCTCACA CAAATGAAGG TTTATCTGGT  
 GATGTACACT TTGACGATGC AGAAATGTTT ACCATTGGTT CATCAACTGG CCGTAATTTG CTATGGGTTG  
 CTGTTTCATGA GATAGGACAT AGCATAGGAT TAGAGCATTC AAACGTAAAG GATGCAATTA TGTTTCCTTA  
 TTACAGAGGA AACAAAGGAA ATGATTTTCC ATTGACTGAT GATGATATTC TTGGAATACA AACTCTTTAT  
 GGTTCAAAAA AGAAAATACC CACCCAACCA CCGAATAAGG AAAATATATC AAAACCAAAT AAATCAAAAA  
 GTCGTTGTC GAGTCGCATC ATGGCAGCAG TTTTTGACAA ACAAAGTGA CTTACCTACT TTTTCAACAA  
 AGATAAAATG TATATAATCA ATGAACATCT TAGTAACACC GATGGTCCCT ATGAAATAAG AAAGTTTTTT  
 CCCGAACCTCG GTTACGTGGA TGCAGTTTAT TTAATAAAAA AAGATCAACT TATCTTATTC AATGGAACAA  
 GATACTATAT ATATGCAAGT ATGGCTAGTC GTAGCTTTAT TGAAAGCGGT TCAATTTTCA ACAAATATAA  
 GGGGTAAAA CAAGACATTA AACATATTGA CGCTATTTTT ATATGGTATC TCAACGGAAA GACGTATATA  
 CTTGCTGGAA AAGAATATTA CCGTTACGAT GACTACAGCC AATCAATGGA TTTGAGCTAC CCTCGTGACA  
 TTAAAAAACA CTTAGTTGGT GTACCAGAAA ATGTAGATTC GGCTTTTGTG TGGAAAAATA AAGTACTATA  
 CATCTTCAA GAATCGTTAT TTTATCGGAC TAACGAAAAG TTTACGTTT TAAAAGATTA TCCCAAACCA  
 ATTGCTAATG TGTGGATTCA ATGTAATGCA GATCTTGTAT TTGATGAAGT AAGCAGTGA GGAATCCTT C

**7.3 Proteinsequenzen****HyHES**

MTDTERHPMK EKRRANKPLL ERKRRARINN SLNDMKHLVL SFLNKDATKF TKMEKVDILD MTVHYLQQQF  
 KSRGEQYSSV YRSGYEDCKH AMYQNMAMD IDLQTKYQIM SQMSTAFENS HHLSTPPPSP SSERSSSPLI  
 NYTSTRIFLP SPNLPKQKNS PKKCNLVWRP YE

**MMP-A3**

ESFQDEPVDY ENTLKESLQN LQTFAGIPAS GILDAPTKEL IQTPRCGMPD FSSNTGTLG SRKRRYALQG  
 SAWKKTNLTW KLLNDNNDGL TREQVEDVLI EAFSKWEKVS SLNFKKLDLQ SSEKVDIEVK FVQNYHQDPY  
 VFDGLGGTFLA HAFYPHTNEG LSGDVHFDDA EMFTIGSSTG RNLLWVAVHE IGHSIGLEHS NVKDAIMFPY  
 YRGNKGNDFP LTDDDLILGIQ TLYGSKKKIP TQPPNKENIS KPNKSKSRCP SRIMAAVFDK QSGLTFFNK  
 DKMYIINEHL SNTDGPYEIR KFFPELGYVD AVYLNKKDQL ILFNGTRYII YASMASRSFI ESGSIFNKYK  
 GLKQDIKHID AIFIWYLNKG TYILAGKEYY RYDDYSQSM LSYPRDIKKH LVGVPEVNDV AFVWKNKVLVY  
 IFKESLFYRT NEKFHVLDY PKPIANVVIQ CNADLVFDEV SSGGNR

## **7.4 Herstellung und Test des anti-HES-Peptidantikörpers aus Kaninchen**

### **Herstellung**

Zur Herstellung des anti-HES-Antikörpers in Kaninchen wurde das Peptid RHPMKEKRRANKPLLER bei der Firma Davids Biotechnologie GmbH synthetisiert. Dieses wurde dann durch dieselbe Firma zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

### **Bestimmung des Titers**

Zur Bestimmung der einzusetzenden, optimalen Antikörperverdünnungsstufe wurde die Erkennung von jeweils 0,5µg rekombinantem HyHES-Protein bei unterschiedlichen Antikörperverdünnungen durch SDS-PAGE und Western Blot getestet (siehe Abb. 7-1A). Es wurden hierbei die folgenden Antikörper-Verdünnungen hergestellt: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10.000, 1:50.000 und 1:100.000. Parallel wurde als Vergleich und Kontrolle das Xpress-Epitop des rekombinanten HyHES durch den anti-Xpress Antikörper nachgewiesen. Die optimale Verdünnungsstufe war 1:5000 (siehe Abb. 7-1A). Parallel wurde auf dieselbe Weise getestet bzw. sichergestellt, dass das entsprechende Präimmun nicht das rekombinante Protein erkennt.

### **Bestimmung der Sensitivität**

Zur Bestimmung der Antikörper Sensitivität wurde eine Verdünnungsreihe des rekombinanten HyHES-Proteins von 1µg, 500ng, 100ng, 50ng, 10ng, 5ng, 1ng und 0,5ng hergestellt. Der anti-HES-Peptidantikörper (1:5000) benötigte in einem Western Blot für eine spezifische Erkennung mindestens 50ng des rekombinanten HyHES-Proteins (siehe Abb. 7-1B).

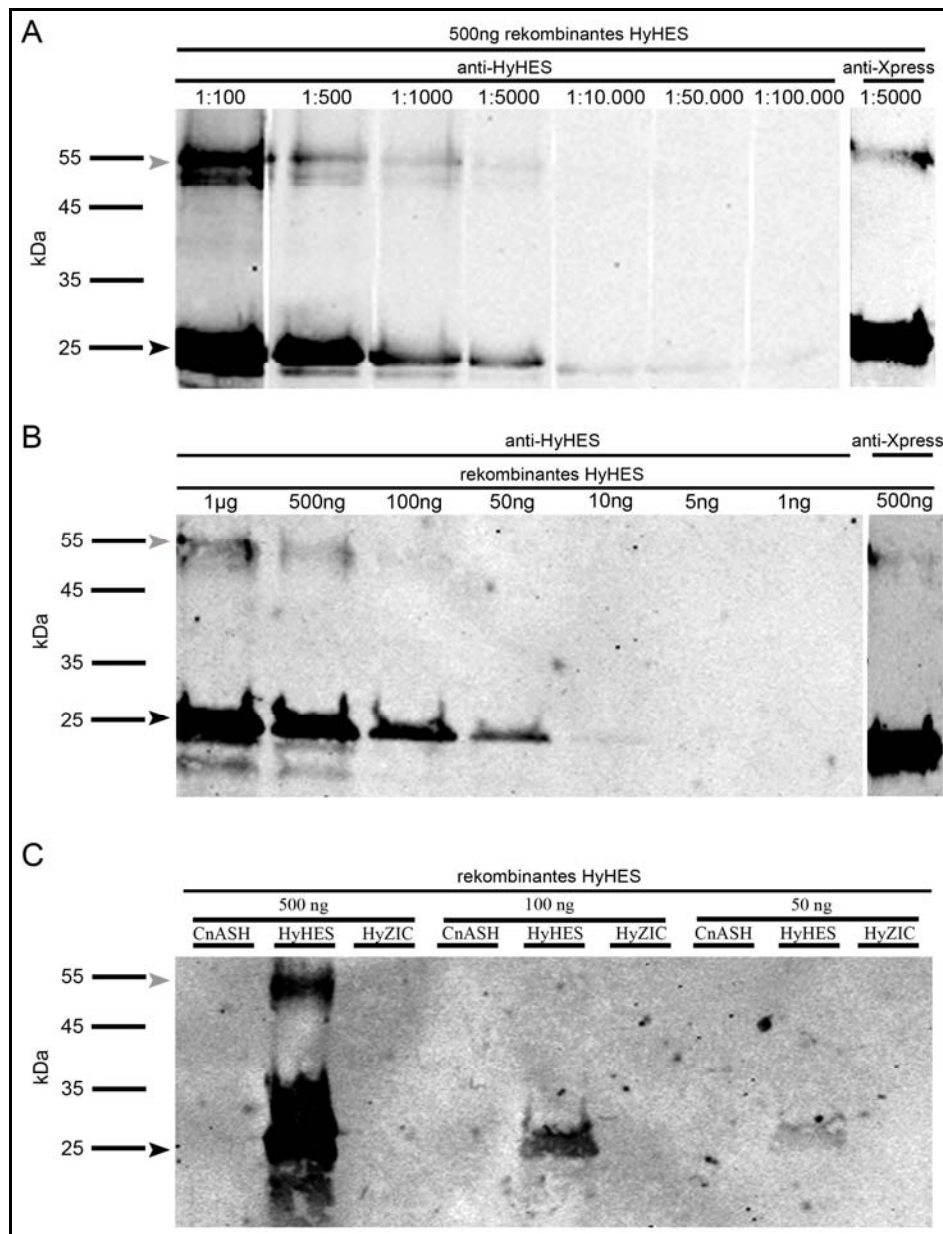
### **Bestimmung der Spezifität - Kreuzreaktion**

Die Kreuzreaktion mit zwei Nematocyten-spezifischen Proteinen, rekombinanten HyZIC und CnASH, das ebenfalls eine basische Helix-loop-Helix Domäne besitzt, wurde getestet (siehe Abb. 7-1C). Es wurden 500ng, 100ng bzw. 50ng der drei rekombinanten Proteine HyHES, CnASH und HyZIC auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der anti-HES-Peptidantikörper (1:5000) detektierte immer nur das rekombinante HyHES-Protein.

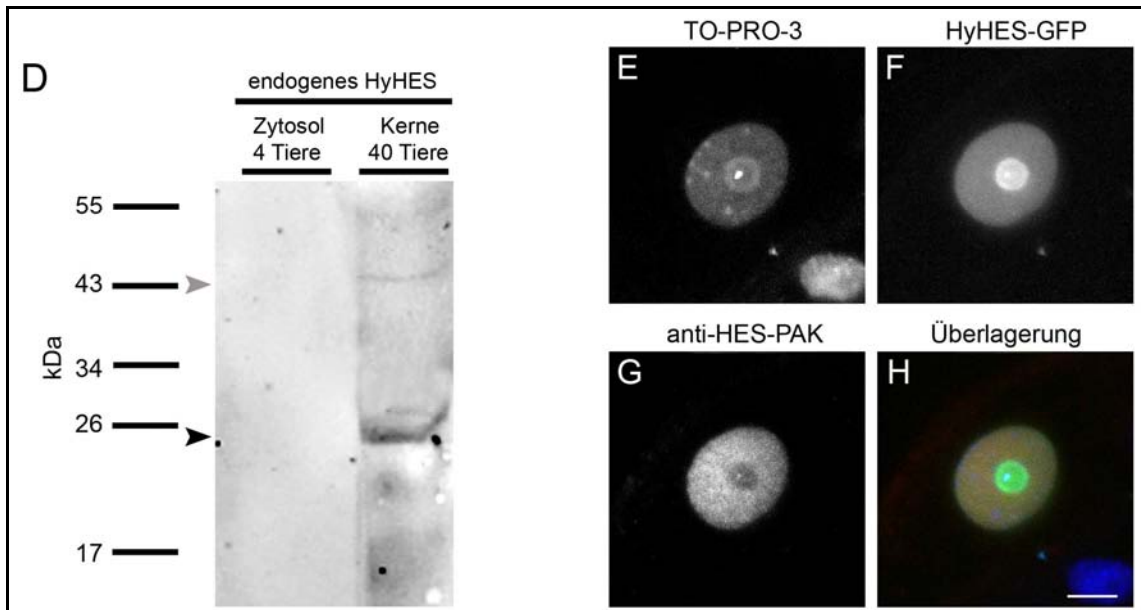
### **Nachweis der Erkennung von endogenem HyHES**

Die Kern- und Zytoplasma von 4 bzw. 10 Tieren wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und der Antikörper 1:5000 in einem Western Blot eingesetzt. In der Kernfraktion wurde eine dem endogenen HES-Protein entsprechende Bande bei ~21kDa erkannt und eine zweite sehr viel schwächere Bande bei etwa 42kDa, die einem HyHES-Dimer entsprechen könnte (siehe Abb. 7-1D).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass der anti-HES-Peptidantikörper in Hydrazellen überexprimiertes HyHES-GFP-Fusionsprotein detektieren kann. Dazu wurden Hydren mit Hilfe der Goldkanone mit dem Konstrukt HoTHyHES transformiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-HES-Peptidantikörper 1:500 unterzogen (siehe Abb. 7-1E-H).



**Abb. 7-1:** Test der Qualität des anti-HES-Peptidantikörpers aus Kaninchen; (A) Erkennung von rekombinantes HyHES durch verschiedene anti-HES-Peptidantikörperverdünnungen; (B) Sensitivitätstest; Ausdünnung und Nachweis des rekombinantes HyHES; (C) Kreuzreaktionstest; Nachweis des rekombinantes HyHES neben rekombinantes CnASH und HyZIC; Monomerbande mit schwarzem Dreieck, putative Dimerbande mit grauem Dreieck gekennzeichnet. rekombinantes HyHES: ~25kDa, CnASH ~25kDa, HyZIC ~ 55kDa.



**Abb. 7-1-Fortsetzung:** Test der Qualität des anti-HES-Peptidantikörpers aus Kaninchen; (D) Erkennung von endogenem HyHES im Western Blot; endogenes HyHES ~21kDa, potentielles Dimer ~42kDa; (E-H) Immunfluoreszenzfärbung einer mit HyHES-GFP transformierten Hydrazelle; Maßstab: 5µm.

## 7.5 Herstellung und Test des anti-HES-PEYAntikörpers aus Hühnchen

### Herstellung

Die Herstellung des anti-HES-PEYAntikörpers in Hühnchen erfolgte bei der Firma Davids Biotechnologie GmbH. Das rekombinante HyHES-Protein wurde wie unter Abschnitt 6.3.2 dargestellt gewonnen, über Nickel Sepharose aufgereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. 1mg/ml des aufgereinigten, rekombinanten HyHES wurde dann zur Immunisierung von Hühnchen verwendet.



### **Bestimmung des Titers**

Von dem anti-HES-PEYAntikörper aus Hühnchen wurden Verdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10.000 und 1:50.000 hergestellt. Dann wurde in einem Western Blot getestet, bei welcher Verdünnungsstufe der Antikörper noch 1µg rekombinantes HyHES detektieren kann. Dies war bis zu einer Verdünnung von 1:1000 der Fall. Als Kontrolle diente der Nachweis von 1µg rekombinatem HyHES durch den anti-Xpress-Antikörper (siehe Abb. 7-2A). Gleichzeitig wurde auf dieselbe Weise getestet bzw. sichergestellt, dass das entsprechende Präimmun nicht das rekombinante Protein erkennt.

### **Bestimmung der Sensitivität**

Es wurde eine Verdünnungsreihe des rekombinanten HyHES von 500ng, 100ng, 10ng, 5ng, 1ng, 0,5ng, 0,1ng und 10pg hergestellt. Der anti-HyHES-PEYAntikörper (1:1000) benötigte im Western Blot für eine spezifische Erkennung mindestens 100ng des rekombinanten HyHES-Proteins. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig wieder das Xpress-Epitop des rekombinanten Proteins mittels des anti-Xpress-Antikörpers nachgewiesen (siehe Abb. 7-2B).

### **Bestimmung der Spezifität – Kreuzreaktion**

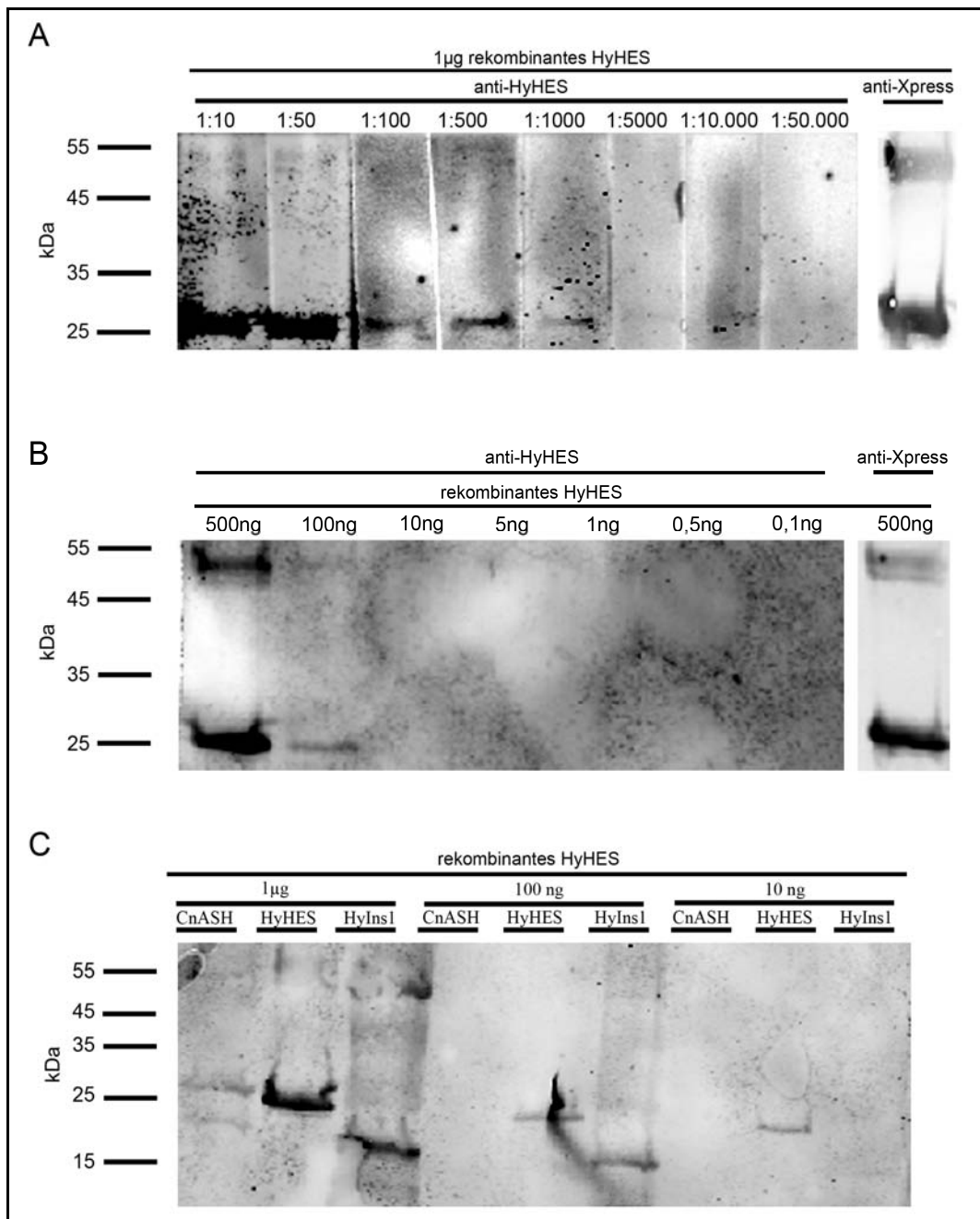
Zur Bestimmung der Spezifität des Antikörpers wurde seine Kreuzreaktion mit rekombinatem Insulin1 und CnASH getestet. Es wurden 1µg, 100ng bzw. 10ng der drei rekombinanten Proteine HyHES, CnASH und Ins1 auf ein SDS-Gel aufgetragen und schließlich mit dem anti-HyHES-PEYAntikörpers (1:1000) nachgewiesen. Erst bei 10ng aufgetragenem Protein war eine spezifische Erkennung des rekombinanten HyHES-Proteins gegeben (siehe Abb. 7-2C).

### **Nachweis der Erkennung von endogenem HyHES**

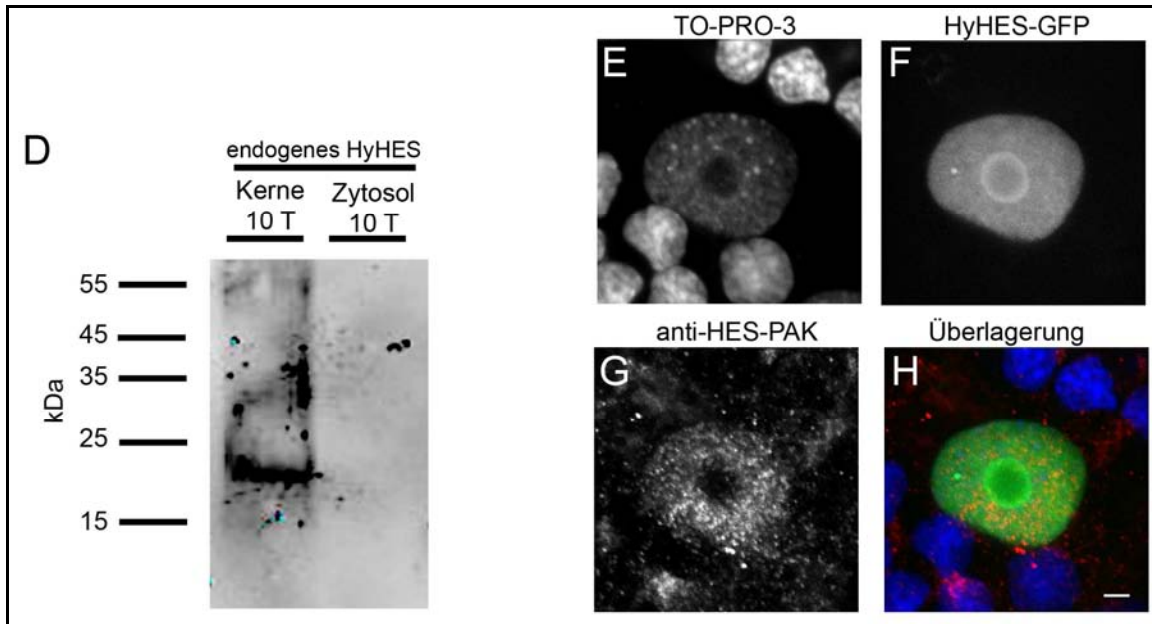
Die Kern- und Zytoplasma von je 10 Tieren wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und der anti-HES-PEYAntikörper (1:1000) in einem Western Blot eingesetzt. In der Kernfraktion wurde eine dem endogenen HES-Protein entsprechende Ban-

de bei ~21kDa erkannt und eine zweite sehr viel schwächere Bande, die einem HyHES-Dimer entsprechen könnte, bei etwa 42kDa (siehe Abb. 7-2D).

Daneben konnte der anti-HES-PEYAntikörper in Hydrazellen überexprimiertes HyHES-GFP Fusionsprotein detektieren. Dazu wurden Hydren mit Hilfe der Goldkanone mit dem Konstrukt HoTHyHES transformiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-HES-PEYAntikörper (1:500) unterzogen (siehe Abb. 7-2E-H).



**Abb. 7-2:** Test der Qualität des anti-HES-PEYAntikörper aus Hühnchen; (A) Erkennung von rekombinantes HyHES durch verschiedene HyHES-Antikörperverdünnungen; (B) Sensitivitätstest; Ausdünnung und Nachweis des rekombinantes HyHES; (C) Kreuzreaktionstest; Nachweis des rekombinantes HyHES neben rekombinantes CnASH und HyIns1; rekombinantes HyHES: ~25kDa, CnASH ~25kDa, Ins1 ~15kDa.

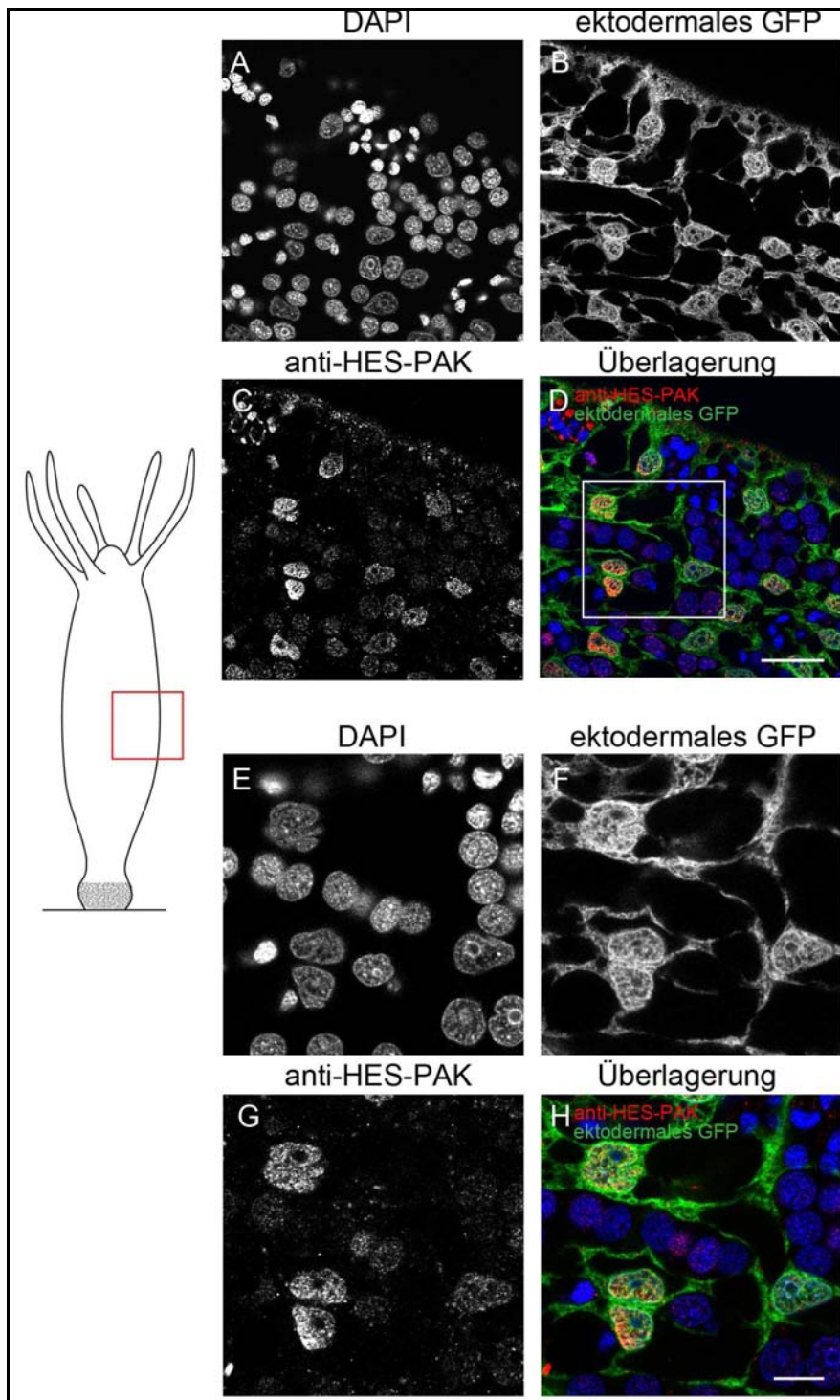


**Abb. 7-2-Fortsetzung:** Test der Qualität des anti-HyHES-Peptidantikörpers aus Hühnchen; (D) Erkennung von endogenem HyHES im Western Blot bei einer anti-HES-PEYAntikörperverdünnung von 1:1000; endogenes HyHES  $\sim$ 21kDa, potentielles Dimer  $\sim$ 42kDa; (E-H) Immunfluoreszenzfärbung einer mit HyHES-GFP transformierten Hydrazelle bei einer anti-HES-PEYAntikörperverdünnung von 1:500; Maßstab: 2,5 $\mu$ m.

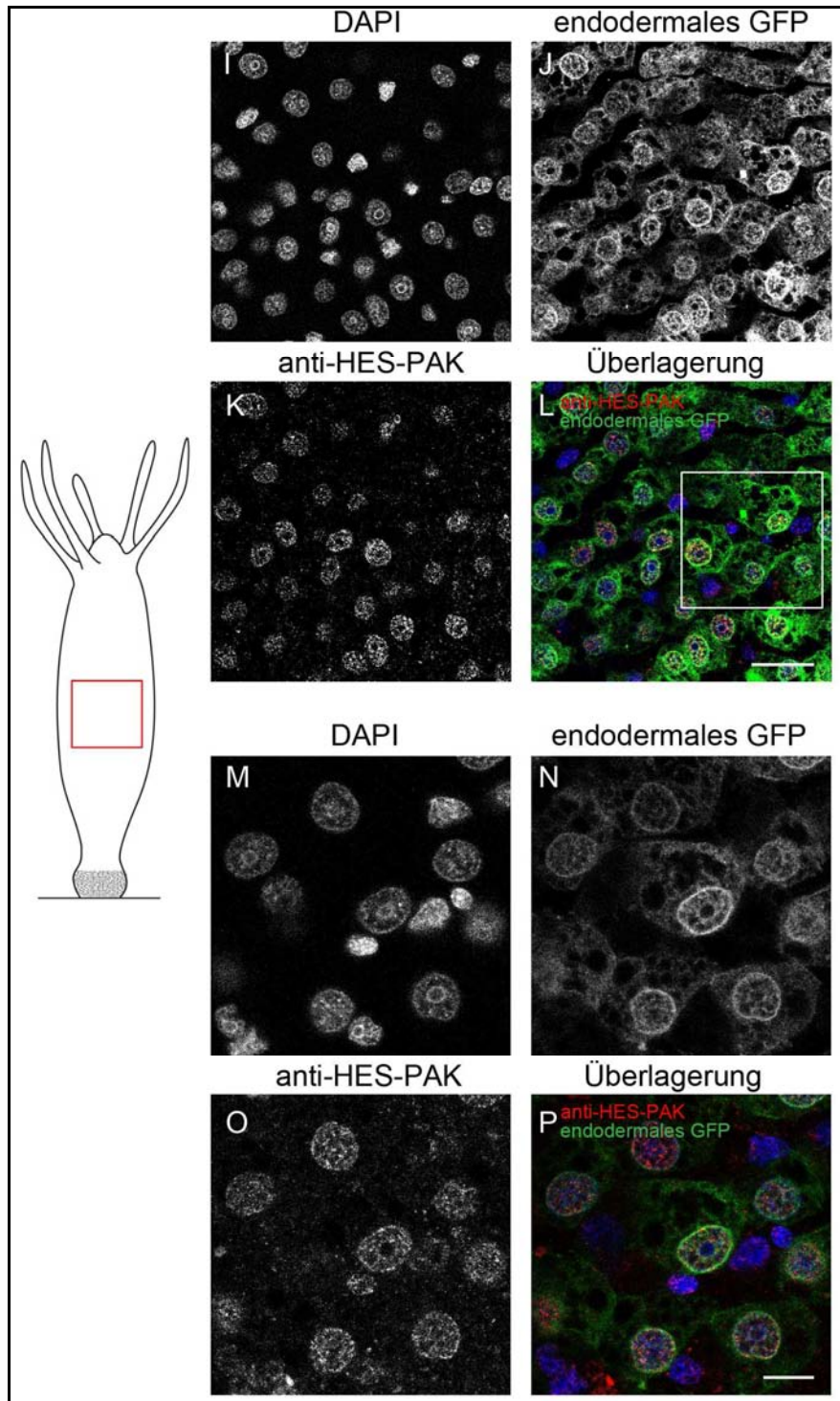
## 7.6 Untersuchung der Lokalisation des HyHES-Proteins

Einfache Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-HES-Peptidantikörper von drei transgenen Linien, in denen EGFP nur in ektodermalen, endodermalen Epithelzellen oder der I-Zelllinie und ihren Differenzierungsprodukten unter Kontrolle des Aktin-Promotors exprimiert wird (siehe Abb. 7-3 und Abb. 7-5; Wittlieb *et al.*, 2006).

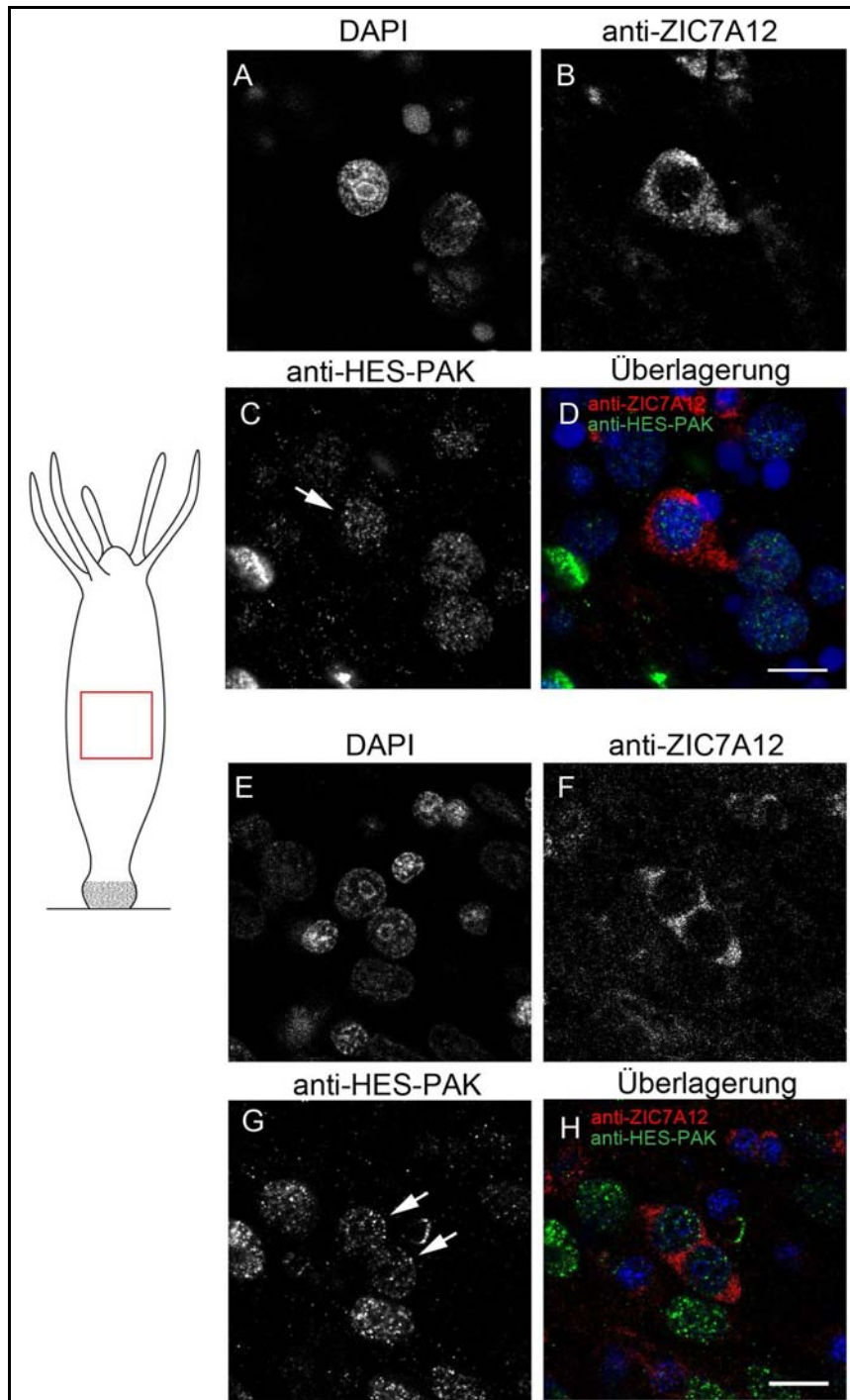
Coimmunofluoreszenzfärbungen mit dem anti-HES-Peptidantikörper und einem Antikörper anti-ZIC7A12 gegen das I-zellspezifische Protein HyZIC (siehe Abb. 7-4; Prexl *et al.*, 2011).



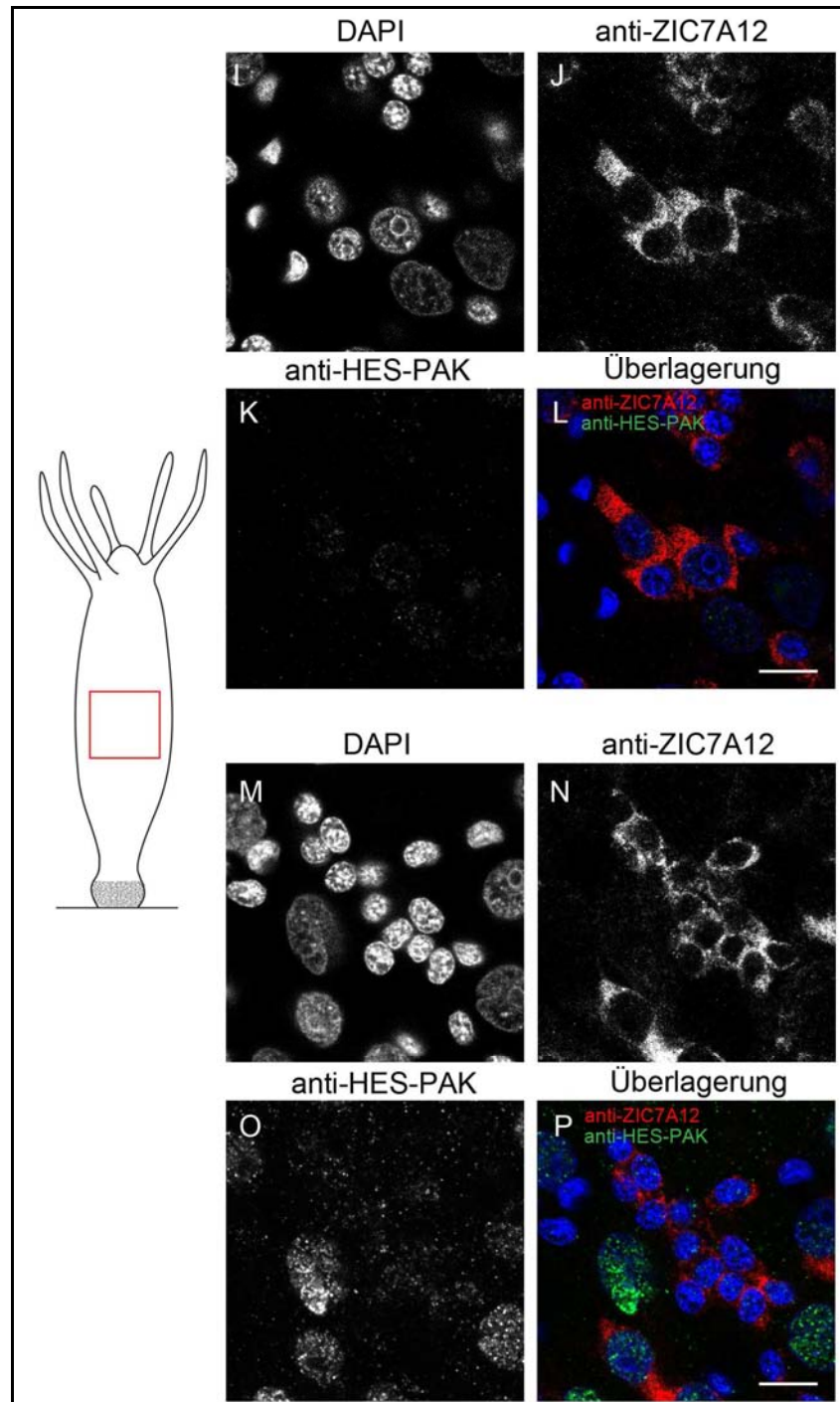
**Abb. 7-3:** Immunfluoreszenzfärbung ectodermaler, transgener Tiere mit dem anti-HES-Peptidantikörper nach Lavdovsky-Fixierung; (A, E) DNA-Färbung mit DAPI; (B, F) GFP in ectodermalen Epithelzellen; (C, G) anti-HES-PAK-Färbung; starke Färbung der Zellkerne aller ectodermaler Epithelzellen; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), GFP in ectodermalen Epithelzellen (grün); anti-HES-PAK-Färbung (rot); Confokale Schnitte; Maßstab: 20µm.



**Abb. 7-3-Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbung endodermaler, transgener Tiere mit dem anti-HES-Peptidantikörper; (I, M) DNA-Färbung mit DAPI; (J, N) GFP in endodermalen Epithelzellen; (K, O) anti-HES-PAK-Färbung; starke Färbung der Zellkerne aller endodermaler Epithelzellen; (L, P) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), GFP in endodermalen Epithelzellen (grün); anti-HES-PAK-Färbung (rot); Confokale Schnitte; Maßstab: 20µm.

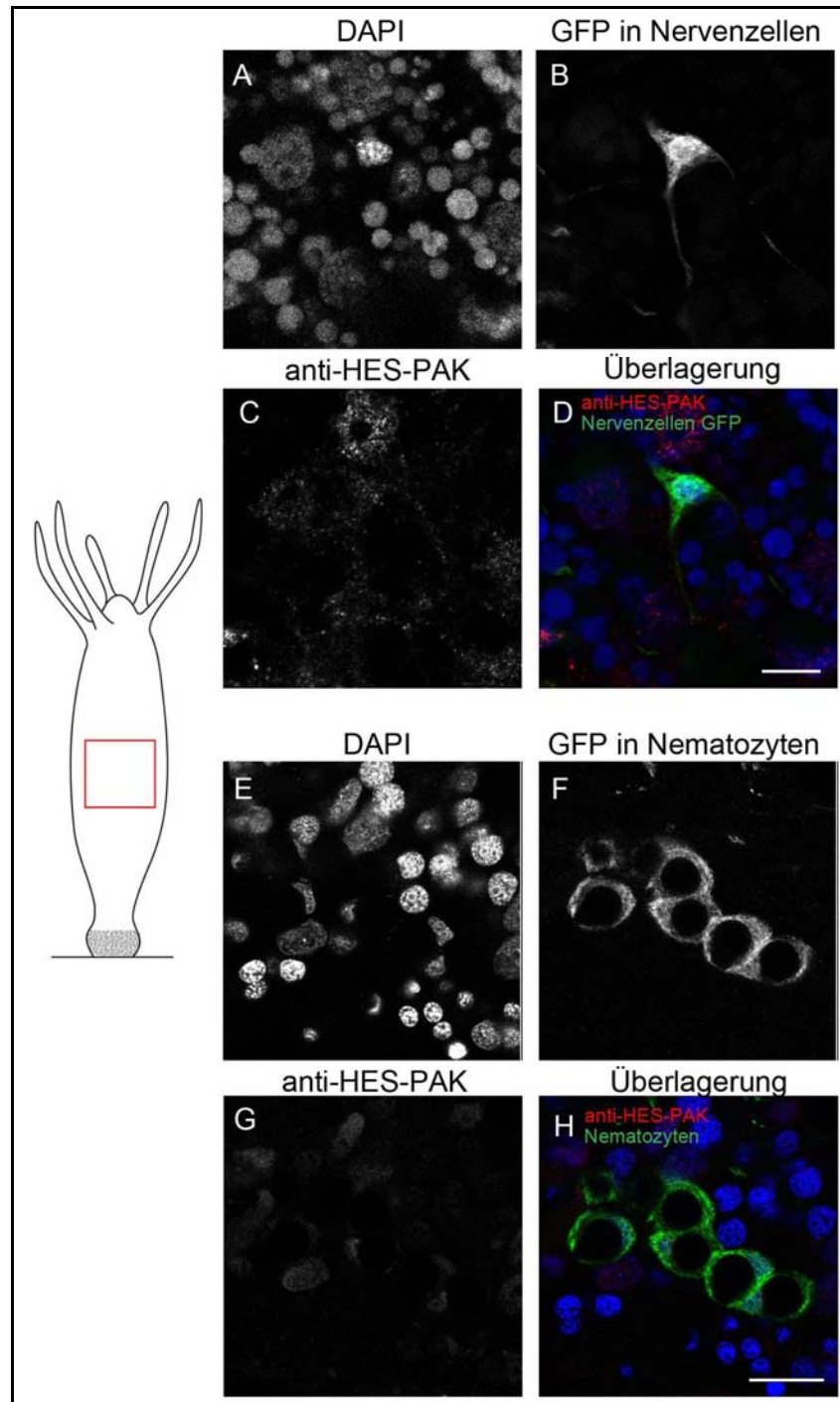


**Abb. 7-4:** Coimmunofluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit anti-HES-Peptidantikörper und anti-ZIC7A12-Antikörper; (A-D) einzelne I-Zelle; (E-H) doppelte I-Zellen; (A, E) DNA-Färbung mit DAPI; (B, F) anti-ZIC7A12-Färbung; (C, G) anti-HES-PAK-Färbung; schwache Färbung der Zellkerne einfacher und doppelter I-Zellen; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-ZIC7A12-Färbung (rot), anti-HES-PAK-Färbung (grün); Pfeile markieren leicht gefärbte I-Zellkerne; Confokale Schnitte; Maßstab: 10µm.



**Abb. 7-4-Fortsetzung:** Coimmunofluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-HES-Peptidantikörper und dem anti-ZIC7A12-Antikörper; (I-L) vier Nematoblasten; (M-P) Nest aus 16 Nematoblasten; (I, M) DNA-Färbung mit DAPI; (J, N) anti-ZIC7A12-Färbung; (K, O) anti-HES-PAK-Färbung; keine Färbung der Zellkerne von Nematoblasten-Nestern; (L, P) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-ZIC7A12-Färbung (rot), anti-HES-PAK-Färbung (grün); Confokale Schnitte; Maßstab: 10µm.

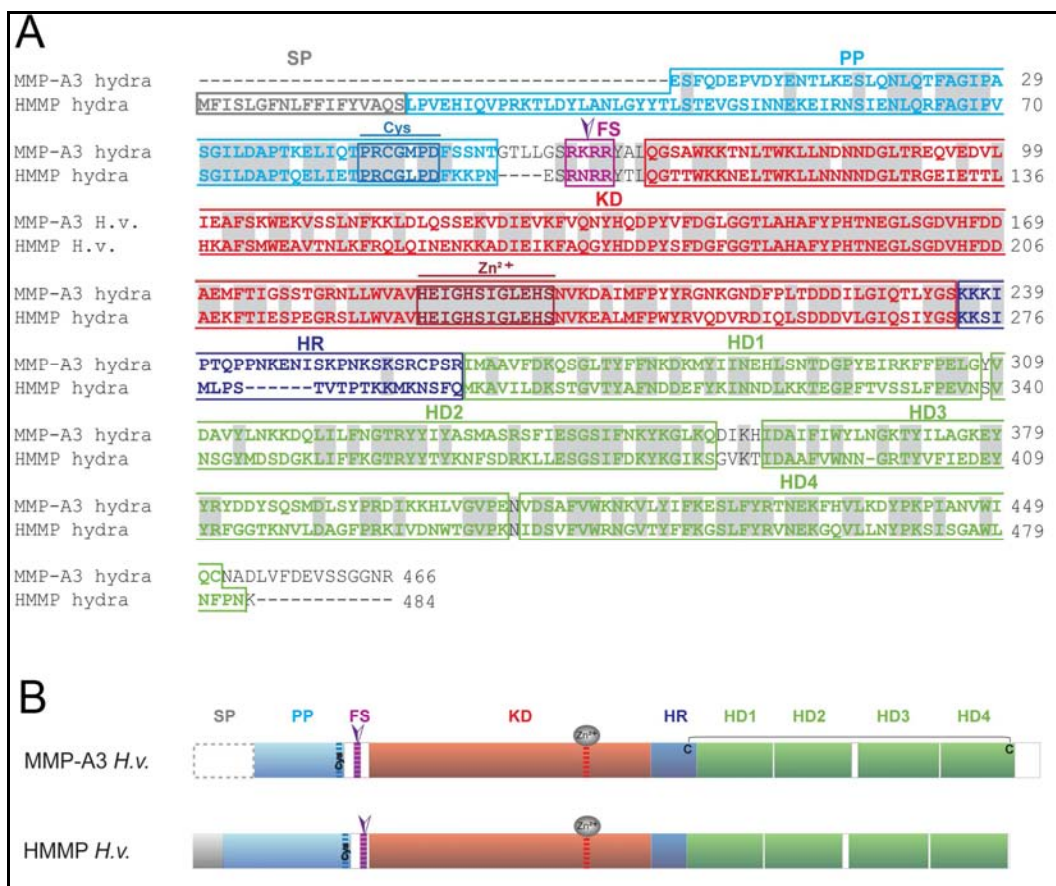




**Abb. 7-5:** Immunfluoreszenzfärbung ganzer Tiere mit dem anti-HES-Peptidantikörper nach Lavdovsky-Fixierung; (A, E) DNA-Färbung mit DAPI; (B, F) GFP in Nervenzellen und Nematocyten; (C, G) anti-HES-PAK-Färbung; keine Färbung der Zellkerne von Nervenzellen und reifer Nematocyten; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), GFP in Nervenzellen und Nematocyten (grün); anti-HES-PAK-Färbung (rot); Confokale Schnitte; Maßstäbe: (A-D) 10 $\mu$ m, (E-H) 20 $\mu$ m.

## 7.7 Untersuchung des MMP-A3-Proteins

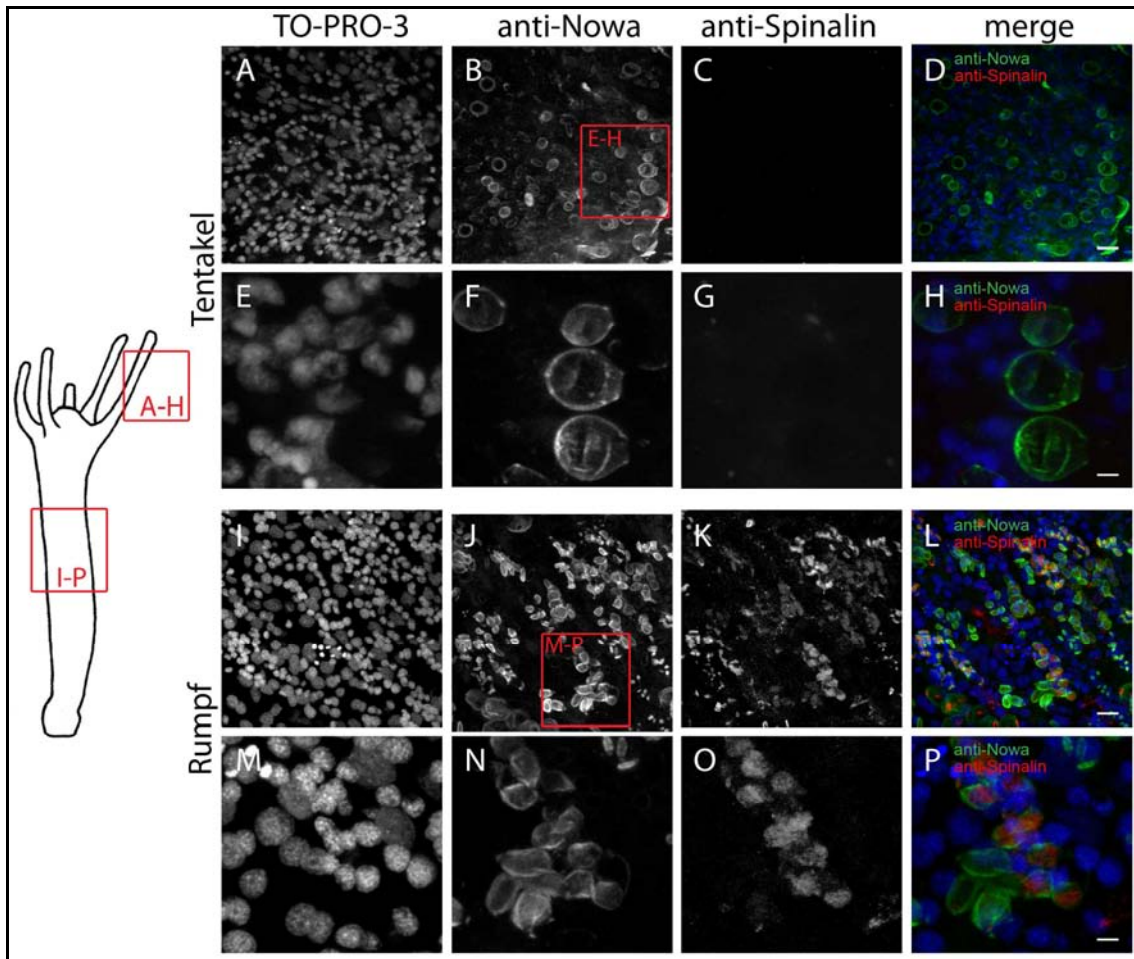
Im Vergleich der Proteinsequenzen weist die neu identifizierte Matrix-Metalloprotease MMP-A3 eine Sequenzidentität von 52% zur HMMP auf (siehe Abb. 7-6).



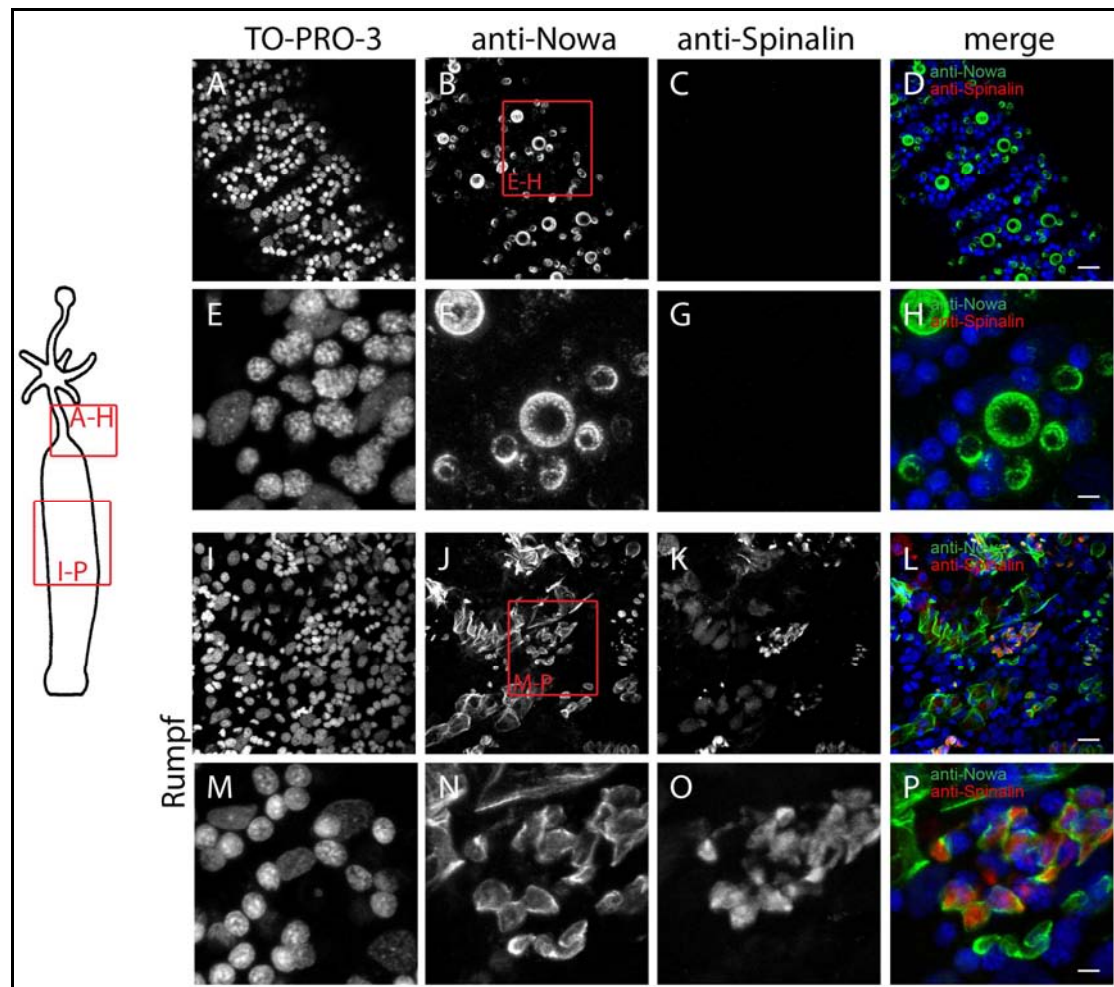
**Abb. 7-6:** Vergleich der Proteine MMP-A3 und HMMP von *Hydra vulgaris*. (A) Paarweise Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen von MMP-A3 und HMMP von *Hydra*; MMP-A3 liegt N-terminal unvollständig vor; Signalpeptid (SP, grau), Propeptid (PP, hellblau) mit konserviertem Cystein-switch (Cys, dunkelblau), Konvertase-Schnittstelle (KS, Dreieck, lila), katalytische Domäne (KD, hellrot) mit konserviertem Zink-Bindungsmotiv (Zn<sup>2+</sup>, dunkelrot), Hinge-Region (HR, dunkelblau) und Hemopexin-Domäne (HD1-4, grün); Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt; (B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von MMP-A3 und HMMP von *Hydra vulgaris* (*H.v.*); Einzelnen Domänen sind wie unter A beschrieben farbig markiert und benannt; Fehlender N-Terminus von MMP-A3 mit gestrichelter Box veranschaulicht. Cystein-switch (Cys), putative Konvertase-Schnittstelle (lila Dreieck) und Zink-Bindungsmotiv (Zn<sup>2+</sup>) eingezeichnet; Für MMP-A3 sind außerdem die beiden konservierten Cysteine (C) mit möglicher Disulfidbrücke (schwarze Bogen zwischen den beiden C) dargestellt.

## 7.8 Untersuchung der Gewebeeigenschaft abnormer, adulter Kopfstrukturen in Stadium PIII nach DAPT-Behandlung

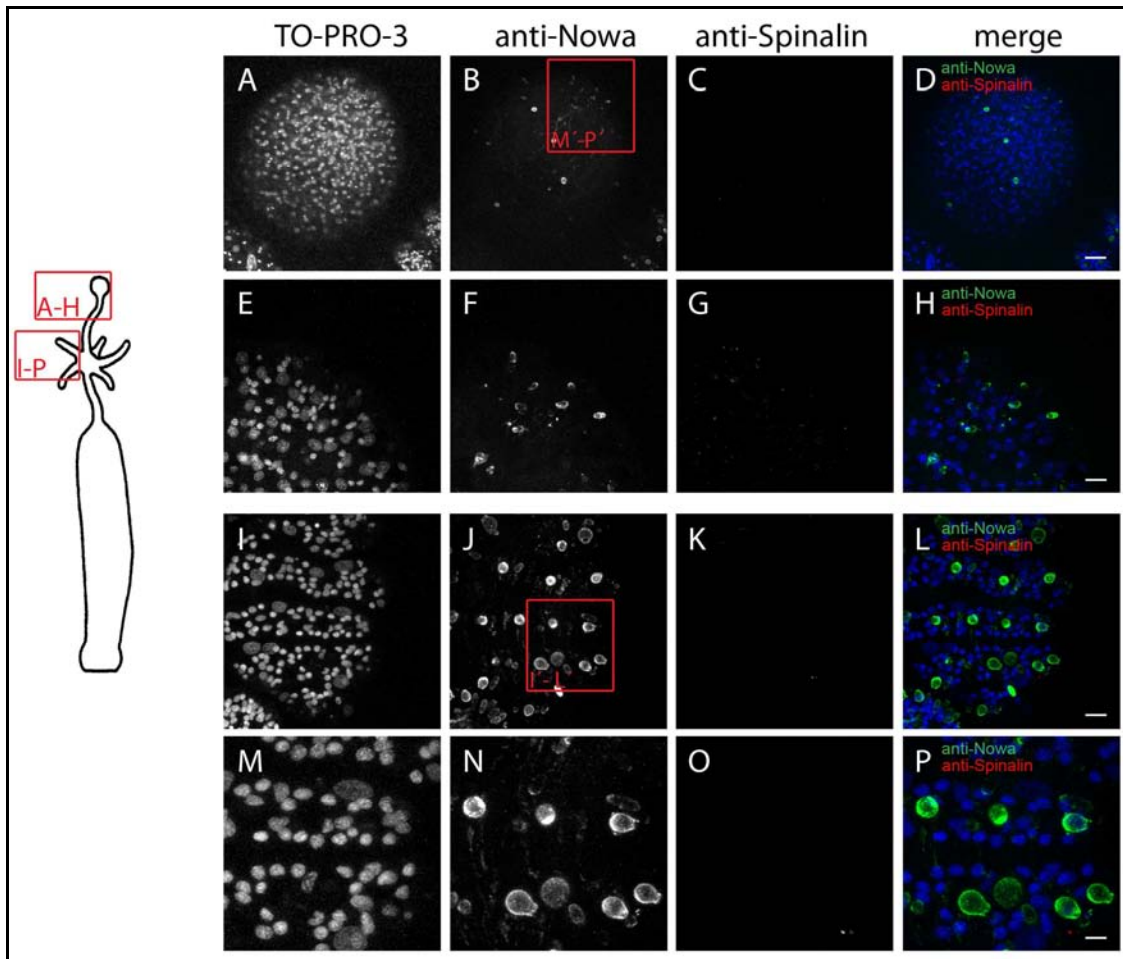
Coimmunfluoreszenzfärbungen mit den beiden Kapsel-spezifischen Antikörpern anti-Nowa und anti-Spinalin an Tieren mit abnormen Kopfstrukturen in Stadium PIII (siehe ) bzw. an DMSO-Kontrolltieren (siehe ). Der anti-Nowa-Antikörper richtet sich gegen das *Nematocyst outer wall antigen*, das in allen Differenzierungsphasen zugänglich ist. Es können frühe differenzierende Nematocyten entlang des Rumpfes, als auch ausgereifte Kapseln in den Tentakeln nachgewiesen werden (Engel *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2002). Anti-Spinalin hingegen richtet sich gegen das Spinalin-Protein, das die dornenförmigen Strukturen des invertierten Schlauches und auch die Stylette der Stenotelen bildet. Das Antigen ist nur in differenzierenden Nematocyten, nicht mehr jedoch in ausgehärteten, mit einem Kapseldeckel verschlossenen Kapseln zugänglich (Hellstern *et al.*, 2006). Dies ermöglicht die Unterscheidung von Rumpfgewebe mit differenzierenden Nematocyten und fertigen Kapseln und von Tentakelgewebe mit ausschließlich ausdifferenzierten Kapseln unterschieden werden.



**Abb. 7-7:** Coimmunfluoreszenzfärbung von DMSO-Kontrolltieren mit dem anti-Nowa und anti-Spinalin-Antikörpern (Diplomarbeit N. Bruckmeier); links: Darstellung einer Hydra; untersuchte Regionen sind markiert (rote Kästen); (A-H) Färbung eines Tentakels; nur eine anti-Nowa-Färbung ausgereifter Kapseln; keine Färbung mit anti-Spinalin; (I-P) Färbung im Rumpf; (A, E, I, M) DNA-Färbung mit TO-PRO-3; (B, F, J, N) anti-Nowa-Färbung; (C, G, K, O) anti-Spinalin-Färbung; (D, H, L, P) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-Nowa-Färbung (grün), anti-Spinalin-Färbung (rot); confokale Schnitte; Maßstab: (A-D, I-L) 16 $\mu$ m, (E-H, M-P) 4 $\mu$ m.



**Abb. 7-8:** Coimmunfluoreszenzfärbung von DAPT-behandelten Tieren in Stadium PIII mit dem anti-Nowa und anti-Spinalin-Antikörpern (Diplomarbeit N. Bruckmeier); links: Darstellung einer Hydra in Stadium PIII; untersuchte Regionen sind markiert (rote Kästen); (A-H) Färbung des hochschiebenden Gewebes zwischen Rumpf und „altem“ Tentakelkranz; die ausschließliche anti-Nowa-Färbung ausgereifter Kapseln und die fehlende anti-Spinalin-Färbung kennzeichnet dieses Gewebe als Tentakelgewebe; (I-P) Färbung im Rumpf; Färbungen für beide Antikörper erkennbar; (A, E, I, M) DNA-Färbung mit TO-PRO-3; (B, F, J, N) anti-Nowa-Färbung; (C, G, K, O) anti-Spinalin-Färbung; (D, H, L, P) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-Nowa-Färbung (grün), anti-Spinalin-Färbung (rot); Confokale Schnitte; Maßstab: (A-D, I-L) 16µm, (E-H, M-P) 4µm.



**Abb. 7-9:** Coimmunfluoreszenzfärbung von DAPT-behandelten Tieren in Stadium PIII mit dem anti-Nowa und anti-Spinalin-Antikörpern (Diplomarbeit N. Bruckmeier); links: Darstellung einer Hydra in Stadium PIII; untersuchte Regionen sind markiert (rote Kästen); (A-H) Färbung der des apikalen hochschiebenden Gewebes zwischen „altem“ Tentakelkranz und „altem“ Hypostom; die ausschließliche anti-Nowa-Färbung ausgereifter Kapseln und die fehlende anti-Spinalin-Färbung kennzeichnet dieses Gewebe als Tentakelgewebe; (I-P) Färbung des hochgeschobenen Tentakelkranzes; anti-Nowa-Färbung ausgereifter Kapseln aber keine anti-Spinalin-Färbung kennzeichnet dieses Gewebe als Tentakelgewebe; (A, E, I, M) DNA-Färbung mit TO-PRO-3; (B, F, J, N) anti-Nowa-Färbung; (C, G, K, O) anti-Spinalin-Färbung; (D, H, L, P) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-Nowa-Färbung (grün), anti-Spinalin-Färbung (rot); Confokale Schnitte; Maßstab: (A-D) 40µm; (E-H, I-L) 16µm; (M-P) 4µm.

## 8 Literaturverzeichnis

**Abu-Shaar, M. und Mann, R. S.** (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* 125, 3821-3830

**Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S., Kageyama, R.** (1992). Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 267, 21879-85

**Amoyel, M., Cheng, Y-C., Jiang, Y-J., Wilkinson, D.G.** (2005). Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development* 132, 775-785

**Aufschnaiter, R., Zamir, E.A., Little, C.D., Özbek, S., Münder, S., David, C.N., Li, L., Sarras, M.P. Jr., Zhang, X.** (2011). In vivo imaging of basement membrane movement: ECM patterning shapes Hydra polyps. *Journal of Cell Science*, [im Druck]

**Axelrod, J. D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., Perrimon, N.** (1996). Interaction between *wingless* and *Notch* signalling pathways mediated by *dishevelled*. *Science* 271, 1826-1832

**Bachmann, A. und Knust, E.** (1998). Dissection of cis-regulatory elements of the *Drosophila* gene *Serrate*. *Dev. Genes Evol.* 208, 346-351

**Baek, J.H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T., Kageyama, R.** (2006). Persistent and high levels of *Hes1* expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development* 133, 2467-2476

**Bailey, A.M. und Posakony, J.W.** (1995). Suppressor of *Hairless* directly activates transcription of *Enhancer of split* complex genes in response to *Notch* receptor activity. *Genes & Development* 9, 2609-2622

**Baker, N. E.** (1988). Embryonic and imaginal requirements for *wingless*, a segment-polarity gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 125, 96-108

**Basler, K. und Struhl, G.** (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein. *Nature* 368, 208-214

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Becam, I., Fiuza, U-M., Martinez Arias, A., Milan, M.** (2010). A role of receptor Notch in ligand cis-Inhibition in *Drosophila*. *Current Biology* 20, 554-560

**Berking, S.** (2003). A model for budding in hydra: pattern formation in concentric rings. *J Theor Biol.* 7, 37-52.

**Bertrand, N., Castro, D. S., Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.

**Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R., Kageyama, R.** (2001). Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes to Cell* 6, 175-185

**Bishop, S.A., Klein, T., Martinez Arias, A., Couso, J. P.** (1999). Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development* 126, 2993-3003

**Blair, S.S.** (2004). Developmental biology: Notching the hindbrain. *Curr Biol.* 27, R570-572

**Bode, H.R., Berking, S., David, C. N., Gierer, A., Schaller, H., Trenkner, E.** (1973). Quantitative analysis of cell types during growth and morphogenesis in *Hydra*. *Wilhelm Roux' Archly* 171,269-285

**Bode, H.R.** (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *Journal of Cell Science* 109, 1155-1164

**Bode, H.R.** (2003). Head Regeneration in *Hydra*. *Developmental Dynamics* 226, 225-236

**Bode, H.R.** (2009). Axial Patterning in *Hydra*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009,1, 1-10

**Böttger, A., Alexandrova, O., Cikala, M., Schade, M., Herold, M., David, C.N.** (2002). GFP expression in *Hydra*: lessons from the particle gun. *Dev. Genes. Evol.* 212, 302-305

**Bosch T.C und David C.N.** (1984). Growth regulation in *Hydra*: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Developmental Biology* 104, 161-171

**Bosch, T.C und David, C.N.** (1987). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Developmental Biology* 121, 182-191



**Bourgouin, C., Lundgren, S.E., Thomas, J.B.** (1992). Apterous is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron*. 9, 549-61

**Bray, S.J.** (2006). Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 7, 678-689

**Broun, M., Sokol, S., Bode, H.R.** (1999). *Cngsc*, a homologue of *gooseoid*, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra*. *Development* 126, 5245-54

**Broun, M. und Bode, H.R.** (2002). Characterization of the head organizer in *hydra*. *Development* 129, 875-884

**Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., Bode, H.R.** (2005). Formation of the head organizer in *hydra* involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132, 2907–2916

**Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411-415

**Buceta, J., Herranz, H., Canela-Xandri, O., Reigada, R., Sagues, F., Milan, M.** (2007). Robustness and stability of the gene regulatory network involved in DV boundary formation in the *Drosophila* wing. *PLoS ONE* 2, e602

**Cave, J.W., Loh, F., Surpris, J.W., Xia, L., Caudy, M.A.** (2005). A DNA Transcription Code for Cell-Specific Gene Activation by Notch Signaling *Current Biology* 15, 94-104

**Chang, Y-C., Amoyel, M., Qiu, X., Jiang, Y-J., Xu, Q., Wilkinson, D.G.** (2004). Notch activation regulates the segregation and differentiation of rhombomere boundary cells in the zebrafish hindbrain. *Dev. Cell* 6, 539-555.

**Cheng, Y-C., Amoyel, M., Qiu, X., Jiang, Y-J., Xu, Q., Wilkinson, D.G.** (2004). Notch activation regulates the segregation and differentiation of rhombomere boundary cells in the zebrafish hindbrain. *Dev Cell* 6, 539–550

**Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., Kintner, C.** (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761–766

## 8 Literaturverzeichnis

---

- Chitnis, A.** (2006). Why is Delta endocytosis required for effective activation of notch? *Developmental Dynamics* 235, 886-894
- Clark, I.M., Swingler, T.E., Sampieri, C.L., Edwards, D. R.** (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, 1362–1378
- Cohen, S. M., Bronner, G., Kuttner, F., Jürgens, G., Jäckle, H.** (1989). Distal-less encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 338, 432-434
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J.Z., Roversi, P., Wilkin, M.B., de Madrid, B.H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., et al.** (2008). A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15,849–857
- Couso, J.P., Knust, E., Martinez Arias, A.** (1995). Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr Biol.* 5, 1437-48.
- Couso, J.P. und Bishop, S.A.** (1998). Proximo-distal development in the legs of *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 345-352
- Dahmann, C., Oates, A.C., Brand M.** (2011). Boundary formation and maintenance in tissue development. *Nat Rev Genet.* 12, 43-55.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., Basilico, C.** (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signalling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 233-247
- Dale, J.K., Maroto, M., Dequeant, M.L., Malapert, P., McGrew, M., Pourquie, O.** (2003). Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 42, 275 – 278
- Dale, R.M., Sisson, B.E., Topczewski, J.** (2009). The emerging role of Wnt/PCP signaling in organ formation. *Zebrafish* 6, 9-14
- David, C.N. und Campbell, R.D.** (1972). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *Journal of Cell Science* I, 557-568
- David, C.N. und Gierer, A.** (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 16, 359-375.

**Davis, L.E. und Haynes, J.F.** (1968). An ultrastructural examination of the mesoglea of *Hydra*. *Zellforsch Mikrosk Anat* 92, 149-158

**Davis, R.L. und Turner, D.L.** (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357

**Dawson, S.R., Turner, D.L., Weintraub, H., Parkhurst, S.M.** (1995). Specificity for the Hairy/Enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes for transcriptional repression. *Molecular and cellular Biology* 15, 6923-6931

**Deb, A., Davis, B.H., Guo, J., Ni, A., Huang, J., Zhang, Z., Mu, H., Dzau, V.J.** (2008). SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autofeedback loop of Wnt3a. *Stem cells* 26, 35-44

**de Celis, J.F. und Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 3241-51

**de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J., Bray, S. J.** (1998). Notch signaling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* 125, 4617-4626

**De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroe-ter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., et al.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522

**Deutzmann, R., Fowler, S., Zhang, X., Boone, K., Dexter, S., Boot-Handford, R. P., Rachel, R., Sarras, M. P. Jr.** (2000). Molecular, biochemical and functional analysis of a novel and developmentally important fibrillar collagen (Hcol-I) in *Hydra*. *Development* 127: 4669-4680.

**Diaz-Benjumea, F. J., Cohen, B., Cohen, S. M.** (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal–distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* 372, 175-179

**Diaz-Benjumea, F.J. und Cohen, S.M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorso-ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 121, 4215-4225

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan. Y.N.** (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev.* 10, 421-34

**Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M.G., Gray, J.P.** (1983). Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:5573

**Dübel, S.** (1990). Terminal differentiation of head- and foot-specific epithelial cells occurs at the same location in *Hydra* tissue without polarity. *Developmental Biology* 138, 243-245

**Engel, U., Pertz, O., Fauser, C., Engel, J., David, C.N., Holstein, T.W.** (2001). A switch in disulfide linkage during minicollagen assembly in *Hydra* nematocysts. *EMBO Journal* 20, 3063-3073

**Engel, U., Özbek, S., Engel, R., Petri, B., Lottspeich, F., Holstein, T.W.** (2002). Nowa, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains, is involved in nematocyst formation in *Hydra*. *Journal of Cell Science* 115, 3923-3934

**Espinosa, L., Inglés-Esteve, J., Aguilera, C., Bigas, A.** (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem.* 278, 32227-35

**Estrach, S., Ambler, C.A., Lo Celso, C., Hozumi, K., Watt, F.M.** (2006). Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis. *Development* 133, 4427-38

**Fabila, Y., Navarro, L., Fujisawa, T., Bode, H.R., Salgado, L.M.** (2002). Selective inhibition of protein kinases blocks the formation of a new axis, the beginning of budding, in *Hydra*. *Mechanisms of Development* 119, 157-164

**Farre, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J.E., Rosello, L., Alba, M.M., Messeguer, X.** (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 31, 3651-3653

**Fiuza, U-M., Klein, T., Martinez Arias, A., Hayward, P.** (2010). Mechanisms of ligand-mediated inhibition in notch signaling activity in *Drosophila*. *Developmental Dynamics* 239, 798-805

**Fleming, R.J.** (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9, 599-607

**Fortini, M.E. und Artavanis-Tsakonas, S.** (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* 79, 273-282

**Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nature New Biol.* 245, 251–253

**Garcia-Bellido, A.** (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found. Symp.* 0, 161–182

**Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G.S., Brunet, F., Ereskovsky, A.V., Degnan, B.M., Borchiellini, C., Vervoort, M., Renard, E.** (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology* 9, 249

**Gee, L., Hartig, J., Law, L., Wittlieb, J., Khalturin, K., Bosch, T.C.G., Bode, H.R.** (2010).  $\beta$ -catenin plays a central role in setting up the head organizer in hydra. *Developmental Biology* 340, 116–124

**Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., Haass, C.** (2002). A gammasecretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* 3, 688-694

**Gierer, A. und Meinhardt, H.** (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12, 30-39

**Gierer, A., Berking, S., Bode, H.R., David, C.N.; Flick, K., Hansmann, G., Schaller, C.H., Trenkner, E.** (1972). Regeneration of Hydra from reaggregated cells. *Nature New Biology* 239, 98-101

**Glittenberg, M., Pitsouli, C., Garvey, C., Delidakis, C., Bray, S.** (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *EMBO J.* 25, 4697–4706

**Gonzalez-Quevedo, R., Lee Y., Poss K.D., Wilkinson D.G.** (2010). Neuronal regulation of the spatial patterning of neurogenesis. *Dev. Cell.* 18, 136-47

**Gratzner, H.G.** (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Greenberg, L. und Hatini, V.** (2009). Essential roles for lines in mediating leg and antennal proximodistal patterning and generating a stable Notch signaling interface at segment borders. *Dev Biol.* 330, 93-104

**Greenwald I.** (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12, 1751-62

**Grens, A., Gee, L., Fisher, D.A., Bode, H.R.** (1996). *CnNK-2*, an NK-2 homeobox gene has a role in patterning the basal end of the axis in hydra. *Developmental Biology* 180, 473–488

**Habas, R. und Dawid, I.B.** (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of Biology* 4:2

**Hadland, B. K., Manley, N. R., Su, D., Longmore, G. D., Moore, C. L., Wolfe, M. S., Schroeter, E. H., Kopan, R.** (2001). Gamma-secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7487-7491

**Haines, N. und Irvine, K.D.** (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 4, 786-797

**Hass, M.R., Sato, C., Kopan, R., Zhao, G.** (2009). Presenilin: RIP and beyond. *Semin Cell Dev Biol.* 20, 201-10

**Hassel, M.** (1998). Upregulation of a *Hydra vulgaris* cPKC gene is tightly coupled to the differentiation of head structures. *Dev Genes Evol* 207, 489-501

**Hassel, M., Bridge, D.M., Stover, N.E., Kleinholz, H., Steele, R.E.** (1998). The level of expression of a protein kinase C gene may be an important component of the patterning process in Hydra. *Dev Genes* 207, 502–514

**Hayward, P., Brennan, K., Sanders, P., Balayo, T., DasGupta, R., Perrimon, N., Martinez Arias, A.** (2005). Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity. *Development* 132, 1819-30

**Hayward, P., Balayo, T., Martinez Arias, A.** (2006). Notch synergizes with axin to regulate the activity of armadillo in Drosophila. *Dev Dyn.* 235, 2656-66

**Heitzler, P. und Simpson, P.** (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092

**Held, L., Duarte, C., Derakhshanian, K.** (1986). Extra tarsal joints and abnormal cuticular polarities in various mutants of *Drosophila melanogaster*. Roux's Arch. Dev. Biol. 195, 145-157

**Heslip, T.R., Theisen, H., Walker, H., Marsh, J.L.** (1997). Shaggy and disheveled exert opposite effects on Wingless and Decapentaplegic expression and on positional identity in imaginal discs. Development 124, 1069-1078

**Hellstern, S., Stetefeld, J., Fauser, C., Lustig, A., Engel, J., Holstein, T.W., Özbek, S.** (2006). Structurefunction analysis of spinalin, a spine protein of Hydra nematocysts; FEBS Journal 273, 3230–3237

**Hobmayer, E., Hatta, M., Fischer, R., Fujisawa, T., Holstein, T.W., Sugiyama, T.** (1996). Identification of a Hydra homologue of the beta-catenin/plakoglobin/armadillo gene family. Gene. 172, 155-9

**Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., Cramer von Laue, C., Snyder, P., Rothbacher, U., Holstein, T.W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. Nature 407, 186-189

**Hoffmeister, S. und Schaller, H. C.** (1985). A new biochemical marker for footspecific cell differentiation in hydra. Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.194, 453-461

**Hoffmeister-Ullerich, S., Herrmann, D., Kielholz, J., Schweizer, M., Schaller, H.C.** (2002). Isolation of a putative peroxidase, a target for factors controlling foot-formation in the coelenterate hydra. European Journal of Biochemistry 269, 4597-4606

**Holstein, T.W., Hobmayer, E., David, C.N.** (1991). Pattern of epithelial cell cycling in hydra. Developmental Biology 148, 602-611

**Huppert, S.S., Jacobsen, T.L., Muskavitch, M.A.** (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. Development 124, 3283-91

**Ikeya, T. und Hayashi, S.** (1999). Interplay of Notch and FGF signaling restricts cell fate and MAPK activation in the *Drosophila* trachea. Development 126, 4455-4463

**Irvine, K.D. und Wieschaus, E.** (1994). Fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. Cell. 79, 595-606.

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Irvine, K. D. und Vogt, T. F.** (1997). Dorsal–ventral signaling in limb development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 867–876

**Irvine, K.D. und Rauskolb, C.** (2001). Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 189-214.

**Irving, C., Nieto, M. A., Da Gupta, R., Charnay, P., Wilkinson, D. G.** (1996). Progressive spatial restriction of *Sek-1* and *Krox-20* gene expression during hindbrain segmentation. *Developmental Biology* 173, 26-38

**Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y.** (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the notch signalling pathway. *Journal of cellular physiology* 194, 237-255

**Jacobsen, T. L., Brennan, K., Martinez Arias, A., Muskavitch, M. A. T.** (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* 125, 4531-4540

**Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., Israel, A.** (1995). Signalling downstream of an activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358

**Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquié, O., Logeat, F., Strong, C.F., Brou, C., Seidah, N.G., Isra, I.A.** (1998). Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol.* 18, 7423-31

**Jayasena, C.S., Ohyama, T., Segil, N., Groves, A.K.** (2008). Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode. *Development* 135, 2251-61

**Jin, Y.H., Kim, H., Oh, M., Ki, H., Kim, K.** (2009). Regulation of Notch1/NICD and Hes1 expressions by GSK-3alpha/beta. *Mol Cells.* 31, 15-19

**Johnson, D., Lee, P., Lu, J., Williams, L.** (1990). Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol. Cell Biol.* 10, 4728-4736

**Kageyama, R. und Nakanishi, S.** (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current Opinion in Genetics & Development* 7, 659-665

**Kageyama, R., Masamizu, Y., Niwa, Y.** (2007a). a. Oscillator mechanism of notch pathway in the segmentation clock. *Developmental dynamics* 236, 1403-1409



**Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T.** (2007b). b. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 134, 1243-1251

**Käsbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C.N., Dall'Armi, E., Staudigl, A., Stiening, B., Böttger, A.** (2006). The Notch signaling pathway in the cnidarian Hydra. *Developmental Biology* 303, 376-390

**Karner, C., Wharton, K.A. Jr., Carroll, T.J.** (2006). Planar cell polarity and vertebrate organogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 17, 194-203

**Kim, J., Sebring, A., Esch, J.J., Kraus, M.E., Vorwerk, K., Magee, J., Carroll, S.B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382, 133-8

**Kimble, J. und Simpson, P.** (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13, 333-61.

**Klein, T., Brennan, K., Arias, A.M.** (1997). An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev Biol.* 189, 123-34.

**Klein, T.J. und Mlodzik, M.** (2005). Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 155-76

**Knight, R.D. und Schilling, T.F.** (2000). Cranial neural crest and development of the head skeleton. *Madame Curie Bioscience Database, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.* Bookshelf ID: NBK6075

**Kopan, R., Schroeter, E.H., Weintraub, H., Nye, J.S.** (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *PNAS* 93, 1683-1688

**Kramatschek, B. und Campos-Ortega, J.A.** (1994). Neuroectodermal transcription of the *Drosophila* neurogenic genes *E(spl)* and *HLH-m5* is regulated by proneural genes. *Development* 120, 815-826

**Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H.A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M.Q., Holstein, T.W.** (2005). Unexpected complexity of the *Wnt* gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156-160

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Lai, E.C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973

**Lawrence, P.A.** (1973). A clonal analysis of segment development in *Oncopeltus* (Hemiptera). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30, 681–699

**Lecourtois, M. und Schweisguth, F.** (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev.* 9, 2598-608

**Lecuit, T. und Cohen, S. M.** (1997). Proximal–distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* 388, 139-145

**Lei, L., Xu, A., Panin, V.M., Irvine, K.D.** (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. *Development* 130, 6411-21

**Lemmon, M.A. und Schlessinger, J.** (1998). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 19, 459-463

**Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., Law, L., Schmidt, H.A., Özbek, S., Bode, H.R., Holstein, T.W.** (2009). Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Developmental Biology* 330, 186–199

**Leontovich, A.A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagase, H., Sarras, M.P. Jr.** (2000). A novel *Hydra* matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development* 127, 907-920.

**Lessing, D. und Nusse, R.** (1998). Expression of wingless in the *Drosophila* embryo: a conserved cis-acting element lacking conserved Ci-binding sites is required for patched-mediated repression. *Development* 125, 1469-76

**Lewis, J.** (1996). Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 3-10.

**MacWilliams, H.K.** (1983a). Hydra transplantation phenomena and the mechanism of Hydra head regeneration. I. Properties of the head inhibition. *Developmental Biology* 96, 217-238

**MacWilliams, H.K.** (1983b). Hydra transplantation phenomena and the mechanism of Hydra head regeneration. II. Properties of the head activation. *Developmental Biology* 96, 239-257

**Maeder, M.L., Polansky, B.J., Robson, B.E., Eastman, D.A.** (2007). Phylogenetic footprinting analysis in the upstream regulatory regions of the *Drosophila* enhancer of split genes. *Genetics*. 177, 1377-94

**Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., Robakis, N.K.** (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 21, 1948-56

**Mardon, G., Solomon, N. M., Rubin, G. M.** (1994). *Dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* 120, 3473-3486

**Martin, V. J., Littlefield, C. L., Archer, W. E., Bode, H. R.** (1997). Embryogenesis in Hydra. *The Biological Bulletin* 192, 345-363

**Martinez, D.E., Dirksen, M.L., Bode, P.M., Jamrich, M., Steele, R.E., Bode, H.R.** (1997). *Budhead*, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in Hydra. *Dev Biol.* 192, 523-36

**Martínez, D.E.** (1998). Mortality patterns suggests lack of senescence in Hydra. *Experimental Gerontology* 33, 217-225

**Massari, M. E. und Murre, C.** (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-440

**Matsuda, M. und Chitnis, A.B.** (2009). Interaction with Notch determines endocytosis of specific Delta ligands in zebrafish neural tissue. *Development* 136, 197-206.

**Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M., Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121, 2633-2644

**Meinhardt, H.** (1982). *Models of biological pattern formation*, Academic Press, London, 1982

**Meinhardt, H.** (1983a). A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 76, 115-37

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Meinhardt, H.** (1983b). Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev. Biol.* 96, 375-85

**Meinhardt, H. und Gierer, A.** (2000). Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *BioEssays* 22, 753-760

**Messeguer, X., Escudero, R., Farre, D., Nunez, O., Martinez, J., Alba, M.M.** (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18, 333-334

**Micchelli, C.A., Rulifson, E.J., Blair, S.S.** (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* 124, 1485-95

**Micchelli, C. A., Esler, W. P., Kimberly, W. T., Jack, C., Berezovska, O., Kornilova, A., Hyman, B. T., Perrimon, N., Wolfe, M. S.** (2003). Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*. *Faseb J.* 17, 79-81

**Miller, J.R.** (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3 (1)

**Miller, A.C., Lyons, E.L., Herman, T.G.** (2009). *Cis*-inhibitions of Notch by endogenous Delta biases the outcome of lateral inhibition. *Curr. Biol.* 19, 1378-1383

**Minobe, S., Fei, K., Yan, L., Sarras, J.M., Werle, M., Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., von Laue, C.C., Snyder, P., Rothbacher, U., Holstein, T.W.** (2000). Identification and characterization of the epithelial polarity receptor frizzled in *Hydra vulgaris*. *Dev. Genes Evol.* 210, 258–262.

**Mohr, O.L.** (1919). Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics.* 4, 275-282

**Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., Vogt, T.F.** (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406, 369-75

**Münder, S., Käsbauer, T., Prexl, A., Aufschnaiter, R., Zhang, X., Towb, P., Böttger, A.** (2010). Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*. *Developmental Biology* 344, 331-345

**Muñoz-Descalzo, S., Tkocz, K., Balayo, T., Arias, A.M.** (2011). Modulation of the ligand-independent traffic of Notch by Axin and Apc contributes to the activation of Armadillo in *Drosophila*. *Development* 138, 1501-6

**Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R.** (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates  $\gamma$ -secretaselike proteolytic activation of Notch1. *Molecular Cell* 5, 197-206

**Murre, C., Bain, G., van Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R., Stuiver, M.H.** (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 218, 129-135

**Muskavitch, M.A.** (1994). Delta-notch signaling and *Drosophila* cell fate choice. *Dev Biol.* 166, 415-30

**Nagase, H., Visse, R., Murphy, G.** (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69, 562 – 573

**Nalesso, G., Sherwood, J., Bertrand, J., Pap, T., Ramachandran, M., De Bari, C., Pitzalis, C., Dell'accio, F.** (2011). WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *J Cell Biol.* 193, 551-64

**Nellesen, D.T., Lai, E.C., Posakony, J.W.** (1999). Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of enhancer of split complex genes to common transcriptional activators. *Dev. Biol.* 213, 33–53

**Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., Weinmaster, G.** (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *Journal of Cell Biology* 176, 445-458

**Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I., Caudy, M.** (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* 8, 2743-55

**Okajima, T., Xu, A., Irvine, K.D.** (2003). Modulation of Notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42340-42345

**Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., Goldfarb, M.** (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 271, 15292-7

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Ornitz, D.M.** (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22, 108-12

**Ornitz, D.M. und Itoh, N.** (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, Reviews

**Otto, J.J. und Campbell, R.D.** (1977). Budding in *Hydra attenuata*: Bud stages and fate map. *Journal of Experimental Zoology* 200, 417-428

**Page-McCaw, A., Ewald, A.J., Werb, Z.** (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 221–233

**Page-McCaw, A.** (2008). A Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 19, 14-23

**Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., Irvine, K.D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-910

**Parks, W.C., Wilson, C.W., Lopéz-Boado, Y.S.** (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 617-629

**Pauly, B., Stiening, B., Schade, M., Alexandrova, O., Zoubek, R., David, C.N., Böttger, A.** (2003). Molecular cloning and cellular distribution of two 14-3-3 isoforms from Hydra: 14-3-3 proteins respond to starvation and bind to phosphorylated targets. *Exp. Cell Res.* 285, 15-26

**Philipp, I., Aufschnaiter, R., Özbek, S., Pontascha, S., Jenewein, M., Watanabe, H., Rentzsch, F., Holstein, T.W., Hobmayer, B.** (2009). Wnt/ $\beta$ -Catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan Hydra. *PNAS* 106, 4290–4295

**Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., Irvine, K.D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-910

**Panin, V. M. und Irvine, K. D.** (1998). Modulators of Notch signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 609–617

**Pires-daSilva, A. und Sommer, R.J.** (2003). The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature Reviews Genetics* 4, 39-49

**Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Mohammadi, M.** (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98, 641-50.

**Prexl, A.** (2010). Dissertation: Der Notch-Signaltransduktionsweg in Hydra: Auswirkungen auf die Knospung und Nematocyten-Differenzierung. LMU München: Fakultät für Biologie

**Prexl, A., Münder, S., Loy, B., Kremmer, E., Tischer, S., Böttger, A.** (2011). The putative Notch ligand HyJagged is localised at membranes and in endosomes of all cells in adult *Hydra* and upregulated at the boundary between bud and parent. *BMC Cell Biology*, [im Druck]

**Rauskolb, C. und Irvine, K.D.** (1999). Notch-mediated segmentation and growth control of the *Drosophila* leg. *Developmental Biology* 210, 339-350

**Reickhof, G., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M., Mann, R. S.** (1997). Nuclear translocation of Extradenticle requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91, 171-183

**Reinhardt, B., Broun, M., Blitz, I. L., Bode, H.R.** (2004). *HyBMP5-8b*, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in hydra. *Developmental Biology* 267, 43-59

**Ross, D.A. und Kadesch, T.** (2001). The notch intracellular domain can function as a coactivator for LEF-1. *Mol Cell Biol.* 21, 7537-44

**Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S., Katsube, K.** (2002). Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Developmental Biology* 241, 313-326

**Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., Hayashi, S.** (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of Notch and suppresses its ligand-independent activation. *Current Biology* 14, 2228-2236

**Sanders, P.G., Muñoz-Descalzo, S., Balayo, T., Wirtz-Peitz, F., Hayward, P., Arias, A.M.** (2009). Ligand-independent traffic of Notch buffers activated Armadillo in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 7

**Sarras, M.P. Jr., Meador, D., Zhang, X.M.** (1991). Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. II. Influence of collagen and proteoglycan components on head regeneration. *Developmental Biology* 148, 495-500

**Sarras Jr., M.P., Yan, L., Grens, A., Zhang, X., Agbas, A., Huff, J.K., St. John, P.L., Abrahamson, D.R.** (1994). Cloning and biological function of laminin in *Hydra vulgaris*. *Developmental Biology* 164, 312–324.

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., Nakanishi, S.** (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila hairy* and *Enhancer of split*. *Genes Dev.* 6, 2620-2634

**Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yapon, A., Linhardt, R.J., Mohammadi, M.** (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* 6, 743-750

**Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R.** (1998). Notch-1 signalling requires ligand induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386

**Serban, G., Kouchi, Z., Baki, L., Georgakopoulos, A., Litterst, C.M., Shioi, J., Robakis, N.K.** (2005). Cadherins mediate both the association between PS1 and beta-catenin and the effects of PS1 on beta-catenin stability. *J Biol Chem.* 280, 36007-12

**Shimizu, H., Zhang, X., Zhang, J., Leontovich, A., Fei, K., Yan, L., Sarras Jr., M.P.** (2002). Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development* 129, 1521-1532

**Shimizu, H., Aufschnaiter, R., Li, L., Sarras, M.P. Jr., Borza, D.B., Abrahamson, D.R., Sado, Y., Zhang X.** (2008). The extracellular matrix of *Hydra* is a porous sheet and contains type IV collagen. *Zoology* 111, 410-418

**Shostak, S., Patel, N.G., Burnett, A.L.** (1965). The role of mesoglea in mass cell movement in *Hydra*. *Developmental Biology* 12, 434-450

**Simionato, E., Ledent, V., Richards, G., Thomas-Chollier, M., Kerner, P., Coornaert, D., Degnan, B. M., Vervoort, M.** (2007). Origin and diversification of the basic helixloop- helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evol Biol* 7, 33

**Singson, A., Leviten, M.W., Bang, A.G., Hua, X.H., Posakony, J.W.** (1994). Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev.* 8, 2058-71

**Slautterback, D.B. und Fawcett, D.W.** (1959). The development of the cnidoblasts of *Hydra*. An electron microscope study of cell differentiation. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 5, 441-452



**Small, D., Kovalenko, D., Soldi, F., Mandinova, A., Kolev, V., Trifonova, R., Bagala, C., Kacer, D., Battelli, C., Liaw, L., Prudovsky, I., Maciag, T.** (2003). Notch activation suppresses fibroblast growth factor-dependent cellular transformation. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 16405-16413

**Smith, K.M., Gee, L., Blitz, I.L., Bode, H.R.** (1999). *CnOtx*, a member of the *Otx* gene family, has a role in cell movement in *Hydra*. *Developmental Biology* 212, 392–404

**Smith, K.M., Gee, L., Bode, H.R.** (2000). *HyAlx*, an *aristaless*-related gene, is involved in tentacle formation in *hydra*. *Development* 127, 4743-4752

**Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J., Elowitz, M.B.** (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 6; 465(7294), 86-90

**Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J., Lax, I.** (1994). Heparin- induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF dimerization, activation and cell proliferation. *Cell* 79, 1015-1024

**Struhl, G. und Greenwald, I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525

**Su, N., Du, X., Chen, L.** (2008). FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases. *Front Biosci.* 13, 2842-65

**Sudhop, S., Coulier, F., Bieller, A., Vogt, A., Hotz, T., Hassel, M.** (2004). Signalling by the FGFR-like tyrosine kinase, *Kringelchen*, is essential for bud detachment in *Hydra vulgaris*. *Development* 131, 4001-11

**Sudhop, S.** (2006). Dissertation: Knospung-steuernde Gene in *Hydra vulgaris*: Ein evolutionsgeschichtlich alter FGFR kontrolliert die Knospensablösung.

**Taelman, V., Van Wayenbergh, R., Sölter, M., Pichon, B., Pieler, T., Christophe, D., Bellefroid, E.J.** (2004). Sequences downstream of the bHLH domain of the *Xenopus* hairy-related transcription factor-1 acts as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *Dev. Biol.* 276, 47-63

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., Honjo, T.** (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 5, 1416-1423.

**Takebayashi, K., Sasai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S., Kageyama R.** (1994). Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. *J. Biol. Chem.* 269, 5150-5156

**Takebayashi, K., Akazawa, C., Nakanishi, S., Kageyama, R.** (1995). Structure and promoter analysis of the gene encoding the mouse Helix-loop-Helix factor HES-5. *J. Biol. Chem.* 270, 1342-1349

**Tardent, P.** (1987). *Hydra*. Veröffentlichung der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich, Heft Nr.5

**Technau, U. und Bode, H.R.** (1999). *HyBra1*, a *brachyury* homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development* 126, 999-1010

**Technau, U. und Holstein, T.W.** (1995). Head formation in *Hydra* is different at apical and basal levels. *Development* 121, 1273-1282

**Theil, T., Frain, M., Gilardi-Hebenstreit, P., Flenniken, A. M., Charnay, P., Wilkinson, D. G.** (1998). Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) gene is under direct transcriptional control of Krox-20. *Development* 125, 443-452.

**Thomas, U., Jonsson, F., Speicher, S. A., Knust, E.** (1995). Phenotypic and molecular characterization of *SerD*, a dominant allele of the *Drosophila* gene *Serrate*. *Genetics* 139, 203-213

**Ungerbäck, J., Elander, N., Grünberg, J., Sigvardsson, M., Söderkvist, P.** (2011). The Notch-2 gene is regulated by Wnt signaling in cultured colorectal cancer cells. *PLoS One* 18

**Uyttendaele, H., Soriano, J.V., Montesano, R., Kitajewski, J.** (1998). Notch4 and Wnt-1 proteins function to regulate branching morphogenesis of mammary epithelial cells in an opposing fashion. *Dev Biol.* 196, 204-17

**Wesley, C.S.** (1999). Notch and wingless regulate expression of cuticle patterning genes. *Mol Cell Biol.* 19, 5743-58

**Wilby, O.K. und Webster, G.** (1970). a. Experimental studies on axial polarity in hydra. J. Embryol. exp. Morphol. Vol. 24, 595-613

**Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. 3rd, Nusse, R.** (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature 423, 448-52

**Williams, J.A., Paddock, S.W., Carroll, S.B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete sub-regions. Development 117, 571-84

**Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J., Anton-Erxleben, F., Bosch, T.C.G.** (2006). Transgenic *Hydra* allow *in vivo* tracking of individual stem cells during morphogenesis. PNAS 103, 6208-6211

**Wolfe, M.S.** (2006). The g-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. Biochemistry 45, 7931-7939

**Wolpert, L.** (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. J Theor Biol 25, 1-47

**Wolpert, L.** (1971). Positional information and pattern formation. Curr. Top. Devi Biol. 6, 183-224.

**Wolpert, L., Hicklin, J., Hornbruch, A.** (1971). Positional information and pattern regulation in hydra. Symp. Soc. exp. Biol. 25, 391-415

**Wolpert, L., Clarke, M. R. B., Hornbruch, A.** (1972). Positional signalling along hydra. Nature New Biology, Lond. 239, 101-105.

**Wolpert, L., Hornbruch, A., Clarke, M. R. B.** (1974). Positional information and positional signalling in hydra. Am. Zool. 14, 647-663

**Yashiro-Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M.E., Shestova, O., Xu, L., Fang, T.C., Chiang, M.Y., Intlekofer, A.M., Blacklow, S.C., Zhuang, Y., Pear, W.S.** (2009). Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transkription by antagonizing E2A. Genes and Development 23, 1665-1676

## 8 Literaturverzeichnis

---

**Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M.** (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 64, 841-8

**Yuan, J.S., Tan, J.B., Visan, I., Matei, I.R., Urbanellis, P., Xu, K., Danska, J.S., Egan, S.E., Guidos, C.J.** (2010). Lunatic Fringe prolongs Delta/Notch-induced self-renewal of committed  $\alpha\beta$  T cell progenitors. *Blood*, 117, 1184-95

**Zallen, J.A.** (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129, 1051-1063

**Zhang, N., Norton, C.R., Gridley, T.** (2002). Segmentation defects of Notch pathway mutants and absence of a synergistic phenotype in lunatic fringe/radical fringe double mutant mice. *Genesis* 33, 21-28

## 9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung	kb	Kilobasen
AP	Alkalische Phosphatase	kDa	Kilo-Dalton
APS	Ammoniumpersulfat	mg	Milligramm
ATP	Adenosintri-phosphat	min	Minuten
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat	MOPS	3-[N-morpholino] propan-sulfonat
BLAST	<i>Basic local Alignment and Search Tool</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
bp	Basenpaare	µg	Mikrogramm / 10 <sup>-6</sup> Gramm
BrdU	Bromdesoxy-Uridin	µl	Mikroliter / 10 <sup>-6</sup> Liter
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	µm	Mikrometer / 10 <sup>-6</sup> Meter
°C	Grad Celsius	µM	Mikromolar / 10 <sup>-6</sup> Mol/Liter
C-	Carboxy-	N-	Amino-
cDNA	<i>complementary DNA</i>	NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
CHAPS	3-((3-Choramidopropyl1)-dimethyl-ammonio)-1-propansulfat	nt	Nukleotide
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine-t-butyl ester	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
DEPC	Diethylcarbonat	PFA	Paraformaldehyd
DIG	Digoxigenin	RFP	rot fluoreszierendes Protein
DTT	Dithiothreitol	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	<i>rounds per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	sec	Sekunden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein	Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
h	Stunde	TEMED	Tetramethylethylendiamin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	u.a.	unter anderem



## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Dr. Roland Aufschnaiter und Prof. Dr. Xiaoming Zhang von der Universität Innsbruck bzw. der University of Kansas Medical Center für die erfolgreiche Zusammenarbeit und den *MMP-A3*-Klon bedanken. Professor Dr. Monika Hassel von der Philipps-Universität Marburg danke ich sehr für die Bereitstellung des *kringelchen*-Klons. Auch Jörg Wittlieb von der Christian-Albrechts-Universität möchte ich für die Bereitstellung der transgenen Hydren danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Angelika Böttger. Schon seit meiner Diplomarbeit haben mich ihre Begeisterungsfähigkeit, Offenheit und unermüdliche Diskussionsbereitschaft begleitet und angespornt. In ihrem Labor herrschte immer eine freundliche und fröhliche Atmosphäre, die ein freies Arbeiten, Denken und das Austesten neuer Ideen möglich machte.

Auch bei Prof. Dr. Harry MacWilliams und Prof. Dr. Charles David möchte ich mich besonders für ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit und ihre Unterstützung bedanken. Durch ihre spannenden Vorlesungen wurde meine Begeisterung für die Zellbiologie geweckt und immer weiter vertieft.

Ein ganz besonderes Mitglied der AG Böttger, die mich seit meinem Forschungspraktikum als Betreuerin begleitet hat, ist Dr. Andrea Prexl. Sie war nicht nur eine geduldige und immer hilfsbereite Kollegin, sondern ist inzwischen auch zu einer meiner besten Freundinnen geworden. Danke für die wissenschaftlichen Diskussionen, die Cosmopolitan-Abende nach mißglückten und gelungenen Versuchen und Deine immerwährende Unterstützung, beruflich wie privat.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bedanken, die mich all die Jahre begleitet haben. Vor allem Margherita Lasi, Tina Käsbauer, Anita Wagner und den drei Mädels aus meinem Büro: Astrid Heim, Erika Fichter und Susanne Tischer. Auch an alle meine lieben Diplomandinnen, Bachelor-Mädels und Praktikantinnen ein großes Dankeschön. Gern werde ich mich an unsere „Hydra-Waschparties“ erinnern.

Auch meinen Freundinnen und Freunden außerhalb des Labors möchte ich mich für ihre Geduld, das Mitzittern und Feiern danken, besonders Isabell Gmal, Michaela Grunert, Elisabeth Kuhn und Carolin Schächterle. Ich bin froh, dass wir trotz vieler Arbeit unseren Kontakt nie verloren haben.

## Danksagung

---

Aus vollstem Herzen möchte ich mich außerdem bei meiner liebsten Freundin Irene Hasler bedanken, die einfach immer, in jeder Lebenslage, zu jeder Tages- und Nachtzeit für mich da ist. Vielen Dank an Dich und meine lieben Freunde Rainer Frank und Florian Hasler für die lustigen, leckeren Freitagabend-Stammtische, die für mich immer Erholung waren und aus denen ich neue Kraft, nicht nur für meine Promotion, schöpfen konnte und kann.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, meiner Mama, meiner Zwillingsschwester Daniela, meinen Großeltern, meinen Schwiegereltern und der Liebe meines Lebens, meinem Mann Wolfgang Münder, für ihre Liebe, Geduld, Unterstützung und Aufmunterung bedanken.



## Publikationen

**Münder, S.**, Käsbauer, T., Prexl, A., Aufschnaiter, R., Zhang, X., Towb, P., Böttger, A. (2010). Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*. *Developmental Biology* 344, 331-345

Prexl, A., **Münder, S.**, Loy, B., Kremmer, E., Tischler, S., Böttger, A. (2011). The putative Notch ligand HyJagged is localised at membranes and in endosomes of all cells in adult *Hydra* and upregulated at the boundary between bud and parent. *BMC Cell Biology*, [im Druck]

Aufschnaiter, R., Zamir, E.A., Little, C.D., Özbek, S., **Münder, S.**, David, C.N., Li, L., Sarras, M.P. Jr., Zhang, X. (2011). In vivo imaging of basement membrane movement: ECM patterning shapes *Hydra* polyps. *Journal of Cell Science*, [im Druck]