

**Achsenbildung in Cnidariern:
Die Rolle der Wnt- und BMP/Chordin-Signaltransduktionswege**

Genehmigte Dissertation
vorgelegt von Fabian Rentzsch aus Frankfurt am Main
am Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
D17

Referent: Prof. Thomas W. Holstein
Koreferent: Prof. Paul Layer

Eingereicht am 4.7.2001
Mündliche Prüfung am 9.11.2001

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
3	RESULTATE	10
3.1	Untersuchung des Wnt-Signaltransduktionswegs in <i>Hydra</i>	10
3.1.1	Expressionsanalyse von HyWnt	10
3.1.2	Expression von HyDsh	16
3.1.3	Expression von Dishevelled und GSK3 während der Oogenese	21
3.2	Untersuchung eines putativen BMP-Signaltransduktionswegs in <i>Hydra</i>	27
3.2.1	Klonierung eines Chordin-ähnlichen Moleküls aus <i>Hydra</i>	27
3.2.2	Expression von HyChd	32
3.2.3	HySmad1-Expression	37
3.3	Organisatorspezifische Expression eines Thrombospondinrepeat Moleküls	41
4	DISKUSSION	46
4.1	HyWnt-Expression markiert Kopforganisationszentren	46
4.2	Die Rolle des Endoderms in der Kopfregeneration	48
4.3	HyWnt, ein potenzieller Aktivator in Reaktions-Diffusions-Modellen	48
4.4	Die Entstehung des Kopforganisators während der Embryogenese	50
4.5	Parallelen zwischen dem <i>Hydra</i> Kopforganisator und dem Spemann-Organisator	51
4.6	Hinweise für eine Beteiligung von HyDsh an verschiedenen Signalwegen	51
4.6.1	Aufregulation von HyDsh korreliert mit Zellmorphologieveränderungen	52
4.7	Der HyWnt-Signalweg und Oogenese	54
4.8	Komponenten eines BMP/Chordin Systems in <i>Hydra</i>	57
4.9	<i>Hydra</i> besitzt ein Chordin-Ortholog	57
4.10	Differentielle Regulation von HyChd in Musterbildungsprozessen	59
4.11	Molekulare Konserviertheit der Keimzellentwicklung	60
4.12	Modell für die Entstehung von Kopforganisatoren in <i>Hydra</i>	61
4.13	Die Evolution der Achsenbildung	62

5 MATERIAL + METHODE	64
5.1 Tiere	64
5.2 Regeneration und Aggregation	64
5.3 Versuche zur Oogenese	65
5.3.1 Induktion der Gametenbildung	65
5.3.2 Lithium- und Hydroxyharnstoff-Behandlung, Acridinorangefärbung	65
5.4 Elimination der interstitiellen Zellen aus <i>Hydra magnipapillata</i> sf-1 Tieren	66
5.5 Klonierung des N-terminalen Bereichs von <i>Hydra Chordin</i>	66
5.5.1 RNA Isolation	66
5.5.2 cDNA-Synthese und 5'RACE Reaktionen	67
5.6 <i>In situ</i> -Hybridisierungen	69
5.6.1 Herstellung der RNA-Sonden	69
5.6.2 Durchführung der <i>in situ</i> -Hybridisierung	69
5.7 Mikroskopie und Photographie	70
6 LITERATUR	71
Verwendete Abkürzungen	79

1 Zusammenfassung

Das Tierreich gliedert sich in über 30 aufgrund ihrer Körperbaupläne unterschiedene Tierstämme. Untersuchungen an verschiedenen Modellorganismen zeigten, dass die molekularen Grundlagen, die die Ausbildung dieser Körperbaupläne steuern, in allen bilateralsymmetrischen Tierstämmen hoch konserviert sind. Besonders die frühen Entwicklungsprozesse, wie die Determination der Körperachsen, werden von Molekülkaskaden reguliert, die großteils zwischen den verschiedenen Tierstämmen austauschbar sind. Da die bilateralsymmetrischen Tiergruppen aus radiärsymmetrischen, also solchen mit nur einer Körperachse, hervorgegangen sind, stellt sich die Frage, ob sich die molekularen Gemeinsamkeiten in der Steuerung der frühen Entwicklung bereits in radiärsymmetrischen Tieren finden lassen. Um diese Frage zu untersuchen, wurden die Wnt- und BMP-Signaltransduktionswege, die in Bilateriern entscheidende Funktionen in der Achsenbildung ausüben, in dem radiärsymmetrischen Süßwasserpolypen *Hydra* untersucht. Die Analyse des Expressionsmusters des sekretierten Signalmoleküls Wnt in adulten Polypen, in der Kopfregeneration, in *de-novo* Musterbildungsprozessen und in der Embryogenese zeigte, dass es in engem Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Kopforisationszentren transkribiert wird. Das Expressionsmuster von Dishevelled, einem cytoplasmatischen Molekül des Wnt-Signalwegs, deutet darauf hin, dass Dishevelled, wie auch in höheren Metazoen, zusätzlich an einem zweiten, Morphogenese regulierenden Signalweg beteiligt ist.

Durch die Klonierung eines Chordin-verwandten Moleküls aus *Hydra* konnten zudem starke Hinweise auf die Existenz eines konservierten Signalweges, der durch den direkten Antagonismus zwischen sekretierten BMP-Liganden und Chordin-Molekülen gekennzeichnet ist, gefunden werden. Die transkriptionelle Aufregulierung von HyChordin in der Knospenbildung und in Regenerationsvorgängen macht eine Beteiligung auch dieses Signalweges an axialen Musterbildungsprozessen wahrscheinlich.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Wnt- und BMP-Signalwege schon in dem an der Basis der Metazoenevolution stehenden, radiärsymmetrischen Cnidaria *Hydra* an Musterbildungsprozessen beteiligt sind. Bereits der letzte gemeinsame Vorfahre von radiär- und bilateralsymmetrischen Tieren verfügte also über mehrere der molekularen Systeme, die in höheren Metazoen die Entstehung zahlreicher komplexer Körperbaupläne ermöglichen. Dies unterstreicht, daß sich die Konserviertheit entwicklungsbiologischer Mechanismen nicht nur auf die Bilateria, sondern auf alle Eumetazoa erstreckt.

2 Einleitung

Im Laufe der Evolution sind aus einfach strukturierten Organismen Tiere mit zunehmend komplexeren Körperbauplänen hervorgegangen. Einer der elementaren Schritte auf diesem Weg war die Entstehung von Bauplänen mit zwei Körperachsen (bilateralsymmetrisch) aus solchen mit nur einer Achse (radiärsymmetrisch). Von den heute lebenden mehr als 30 Tierstämmen stellen lediglich die Schwämme (Porifera) und die Nesseltiere (Cnidaria) Tierstämme mit nur einer Körperachse dar und werden daher als die ursprünglichsten vielzelligen Tiergruppen angesehen. Im Gegensatz zu den Schwämmen besitzen die Cnidaria eine epitheliale Gewebeorganisation und ein Nervensystem, weshalb sie als die evolutiv höherstehende dieser zwei Organismengruppen angesehen werden. Sie gelten als der Tierstamm, der am dichtesten vor der Entstehung bilateralsymmetrischer Baupläne steht und repräsentieren daher quasi den Ausgangspunkt für die Entstehung aller höheren Metazoen. Um zu verstehen, wie aus radiärsymmetrischen Bauplänen bilateralsymmetrische entstehen konnten, ist es notwendig, die Etablierung der Achsen bei Tieren beider Bauplantypen zu kennen.

Die Frage, wie aus einer befruchteten Eizelle ein Organismus mit definiert angeordneten und spezialisierten Zellen, Geweben und Organen entsteht, ist ein zentrales Thema der Biologie. In den vergangenen etwa 20 Jahren wurden durch Untersuchungen an experimentell gut zugänglichen Modellorganismen reichhaltige Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Embryonalentwicklung von Bilateriern gewonnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ungeachtet der großen Vielfalt bilateralsymmetrischer Baupläne die molekularen Mechanismen, die die Bildung der Körperachsen während der Embryonalentwicklung steuern, in vielen Tierstämmen hoch konserviert sind (DeRobertis und Sasai, 1996; Ferguson, 1996; McGinnis und Krumlauf; 1992).

Eines dieser konservierten molekularen Systeme ist der Wnt-Signaltransduktionsweg (Cadigan und Nusse, 1997). Verschiedene Wnt-Moleküle regulieren eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen in höheren Metazoen. Während der frühen Embryonalentwicklung ist der Wnt-Signalweg im Krallenfrosch *Xenopus laevis* sowohl für die Entstehung der dorsoventralen (D/V) Achse als auch für die Regionalisierung der anteriorposterioren (A/P) Achse notwendig (DeRobertis et al., 2000; Gamse und Sive, 2000). Inhibition von Wnt-

Signalen in *Xenopus* Embryonen verhindert die Entwicklung des Spemann-Organisators (Heasman et al., 1994), der für die Musterung von dorsoventraler und anteroposteriorer Achse von zentraler Bedeutung ist (DeRobertis et al., 2000). Eine äquivalente Rolle spielen Wnt-Signale während der Embryonalentwicklung des Zebrafischs (Kelly et al., 2000; Pelegri und Maischein, 1998). Mäuse, denen das Wnt3 Gen fehlt, zeigen schwere Störungen in der Entwicklung der anteriorposterioren Achse (Liu et al., 1999). Auch in Invertebraten regulieren Wnt-Moleküle frühe Musterbildungs- und Determinationsschritte. In der Taufliege *Drosophila melanogaster* ist das Wnt-Homolog Wingless (Wg) an der Etablierung der Polarität embryonaler Segmente beteiligt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980), später reguliert es die Musterbildung in den larvalen Imaginalscheiben (Neumann und Cohen, 1997b; Lecuit und Cohen, 1997). In dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* kontrolliert Wnt im Vierzellembryo die Entstehung der endodermalen Zelllinie (Thorpe et al., 1997; Rochelaeu et al., 1997), im Seeigellembryo regulieren Komponenten eines Wnt-Signalweges Achsenbildungsprozesse (Logan et al., 1999).

Nicht nur die Wnt-Signalmoleküle selbst sind evolutiv konserviert, sondern auch die intrazellulären Komponenten dieses Signalwegs und deren Interaktionen (Abb.1a,b; Cadigan und Nusse, 1997; Seidensticker und Behrens, 2000). Sekretierte Wnts binden an Transmembranrezeptoren der Frizzled-Familie (Bhanot et al., 1996, Yang-Snyder et al., 1996), diese aktivieren daraufhin, vermutlich über trimere G-Proteine (Liu et al., 2001), das cytoplasmatische Protein Dishevelled. Dishevelled wiederum inaktiviert einen Multiproteinkomplex, der Glycogensynthasekinase3 (GSK3), Axin und das Produkt des Tumorsuppressorgens Adenomatous Polyposis Coli (APC) enthält (Abb.1b; Li et al., 1999; Behrens et al., 1998; Salic et al., 2000). In der Abwesenheit eines Wnt-Signals phosphoryliert GSK3 in diesem Komplex β -Catenin und initiiert dadurch die Degradation von β -Catenin über den Ubiquitin-Proteasomen Weg (Abb.1a; Aberle et al., 1997). Die Wnt-induzierte Inhibition von GSK3 verhindert den Abbau von cytoplasmatischem β -Catenin und ermöglicht es diesem Protein, mit Transkriptionsfaktoren der T-Zell Faktor (Tcf) Familie zu interagieren. Die β -Catenin/Tcf-Komplexe translozieren in den Zellkern und aktivieren dort die Transkription von Zielgenen (Abb.1b; Behrens et al., 1996; van de Wetering et al., 1997; Molenaar et al., 1996). Einige Komponenten des Wnt-Signalwegs sind auch an anderen zellulären Prozessen beteiligt. β -Catenin verbindet Cadherin-Zelladhäsionskomplexe mit dem Cytoskelett und ist für die Funktionalität dieser Komplexe essentiell. Frizzled und Dishevelled sind an einem weiteren Signalweg beteiligt, der planare Zellpolarität (PCP)

organisiert (Shulman et al., 1998). In Vertebraten ist für einen ähnlichen Vorgang, die konvergenten Extensionsbewegungen, die zur Streckung der A/P - Achse während der Gastrulation führen, ein Signaltransduktionsweg notwendig, der Wnt11, Frizzled und Dishevelled, jedoch nicht β -catenin und Tcf verwendet (Wallingford et al., 2000; Heisenberg et al., 2000). Dishevelled stellt also einen Verzweigungspunkt für mehrere Signaltransduktionswege dar.

Aus dem radiärsymmetrischen Cnidarier *Hydra vulgaris* wurden orthologe Moleküle zu folgenden Komponenten eines putativen Wnt-Signalweges isoliert: Wnt, Frizzled, Dishevelled, GSK3, β -Catenin und Tcf (Abb.1c; Hobmayer et al., 2000, Minobe et al., 2000; Hobmayer et al., 1996).

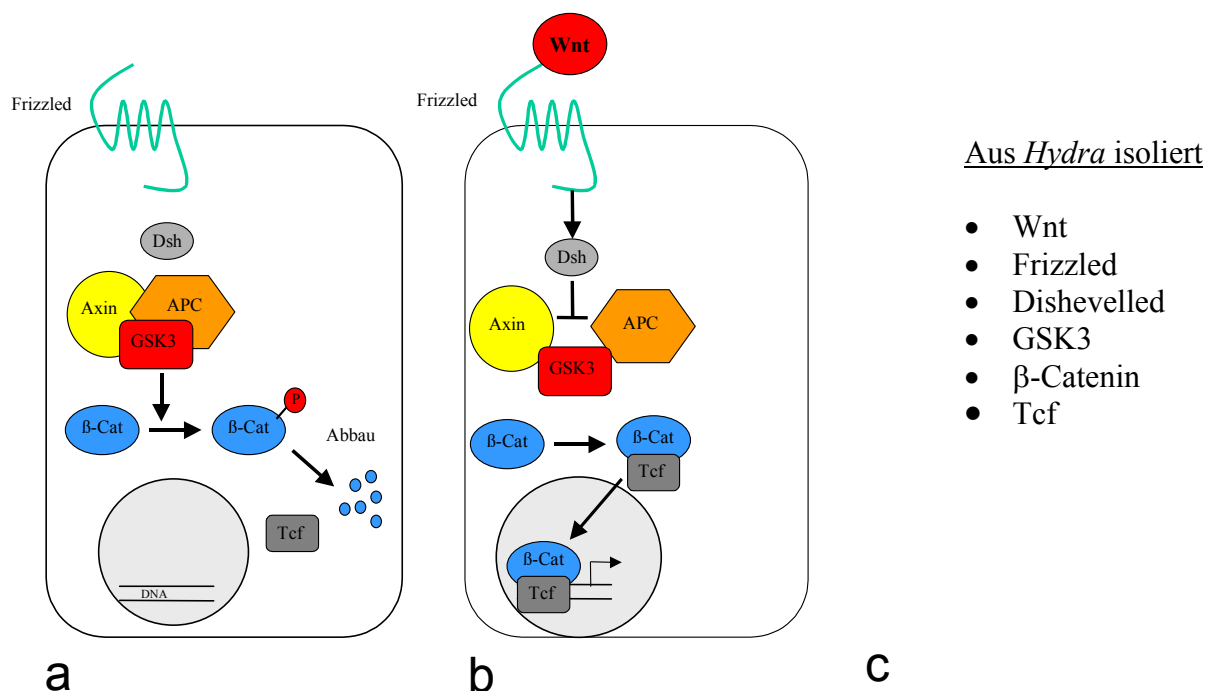


Abb.1: Vereinfachtes Schema des Wnt-Signalwegs.

(a) In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird cytoplasmatische β -Catenin von GSK3 phosphoryliert und dadurch zur Degradation bestimmt. **(b)** Wnt-Liganden führen zur Inhibition von GSK3, β -Catenin wird stabilisiert und kann mit Tcf-Molekülen transkriptionsaktivierende Komplexe bilden. **(c)** Die aus *Hydra* isolierten Komponenten eines putativen Wnt-Signalwegs

Ein zweiter, hochkonservierter Signaltransduktionsweg, der embryonale Musterbildungsprozesse reguliert, ist der BMP-(Bone Morphogenetic Protein) Weg. BMPs gehören zur Superfamilie der TGF β (Transforming Growth Factor) Wachstumsfaktoren. Wie

Wnts auch, regulieren BMP-Liganden zahlreiche Vorgänge während der Embryogenese (Massague, 1998; Whitman, 1998). Am auffälligsten ist die konservierte Rolle von BMPs in der Musterbildung entlang der Dorsoventralachse sowohl in *Drosophila* als auch in Vertebraten. Die Bedeutung der BMPs für die dorsoventrale Musterbildung konnte anhand von BMP-Mutanten in *Drosophila* und im Zebrafisch (Irish und Gelbart, 1987; Kishimoto et al., 1997; Dick et al., 2000), sowie durch Inhibitionsversuche in *Xenopus* gezeigt werden (Hawley et al., 1995; Suzuki et al., 1994). Ein Aktivitätsgradient von BMPs bzw. dem *Drosophila* Homolog Decapentaplegic (Dpp) wird dabei in ein abgestuftes Muster verschiedener Zelldeterminationen übersetzt. In Hinsicht auf die Polarität der Dorsoventralachse haben BMPs unterschiedliche Effekte: In *Drosophila* wirkt Dpp dorsalisierend, während BMPs in *Xenopus* und Zebrafisch ventralisierend wirken. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits von St.Hillaire anhand morphologischer Befunde geäußerte Hypothese, dass sich die Polarität der Dorsoventralachse im Laufe der Evolution umgekehrt hat (St Hillaire, 1822; Arendt und Nübler-Jung, 1994; DeRobertis und Sasai, 1996). Auch in späteren Musterbildungsprozessen spielen BMPs eine wichtige Rolle. Beispielsweise regulieren sie die Achsenbildung in *Drosophila* Imaginalscheiben (Posakony et al., 1990) und die dorsoventrale Musterung des Neuralrohrs in Vertebraten (Liem et al., 1997). Auch in niederen Invertebraten wurden BMP-Moleküle identifiziert: Im Plathelmynten *Dugesia japonica* wird ein BMP4-verwandtes Molekül ausschließlich in dorsalen Zellen exprimiert, was eine Rolle in der D/V-Achsenbildung auch in diesem Vertreter der vermutlich basalsten bilateralsymmetrischen Tiere nahelegt (Orii et al., 1998). In Schwämmen wurden TGF β -Rezeptoren gefunden, bislang allerdings keine sekretierten BMP-Liganden (Suga et al., 1999).

Auch der Ablauf des BMP-Signaltransduktionsweg ist hoch konserviert (Abb.2). Ein entscheidender Schritt in der Regulation der BMP-Aktivität erfolgt bereits im extrazellulären Raum. Sekretierte Antagonisten können die BMP-Moleküle binden und somit die Aktivierung der BMP-Rezeptoren verhindern. Aus dem Antagonismus zwischen BMP-Liganden und ihren sekretierten Inhibitoren ergibt sich die BMP-Signalintensität, die auf eine Zelle an einem bestimmten Ort einwirkt. Während es in Vertebraten verschiedene BMP-Antagonisten gibt (z.B. Noggin und Follistatin; Zimmerman et al., 1996; Hemmati-Brivanlou et al., 1994), scheint nur ein konservierter Antagonist bereits in *Drosophila* zu existieren, nämlich das Chordin-Homolog Sog (short gastrulation; Holley et al., 1995). Eine weitere konservierte Regulationsmöglichkeit schon im extrazellulären Raum stellen die

Metalloproteasen der Tolloid-Familie dar. Sie können durch Spaltung von Chordin BMPs aus BMP/Chordin Komplexen freisetzen und somit die Aktivität der BMPs unterstützen (Piccolo et al., 1997). Freie BMPs binden an membranständige Komplexe aus TypI und II–Rezeptoren, die in ihrem intrazellulären Bereich eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne besitzen. Die Bindung der BMP-Liganden führt zur Aktivierung dieser Kinasedomänen und dadurch zur Phosphorylierung von sogenannten rezeptoraktivierten Smad-Proteinen (R-Smads) durch den TypI–Rezeptor. Phosphorylierte R-Smads interagieren daraufhin mit einem Co-Smad (Smad4) und weiteren Transkriptionsfaktoren, translozieren in den Zellkern und steuern dort die Expression von Zielgenen (Massague, 1998; Whitman, 1998). Auch auf intrazellulärer Ebene gibt es negative Regulationsmöglichkeiten für den BMP-Signalweg. Zum einen wurden inhibitorische Smad-Moleküle (I-Smads, Smad6+7) identifiziert, die die Interaktion der R-Smads mit den BMP-Rezeptoren oder mit Smad4 verhindern (Hayashi et al., 1997; Hata et al., 1998), zum anderen gibt es Transkriptionsrepressoren, die mit R-Smads um DNA Bindungsstellen in Zielgenen konkurrieren (z.B. Brinker; Campbell und Tomlinson, 1999; Jazwinska et al., 1999; Rushlow et al., 2001). Interessanterweise werden diese Antagonisten selbst durch BMP-Signale reguliert, sodass sich negative (Smad6+7) und positive (Brinker) Rückkopplungsmechanismen ergeben.

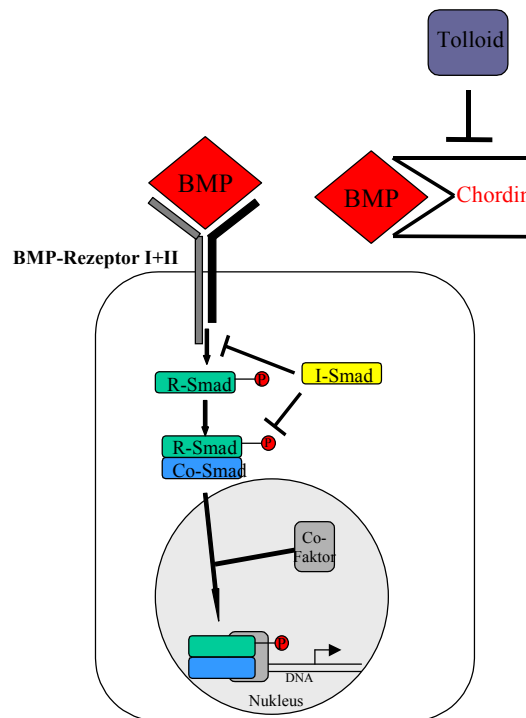


Abb.2: Schematische Darstellung des BMP-Signaltransduktionswegs
Chordin kann BMP-Liganden durch direkte Bindung daran hindern, die BMP-Rezeptoren zu aktivieren. Smad-Proteine werden durch die Rezeptoren aktiviert und wirken als Transkriptionsmodulatoren

Interaktionen zwischen den Wnt- und BMP4-Signaltransduktionskaskaden finden auf verschiedenen Ebenen statt. Die beiden Signalmoleküle können gegenseitig ihre Expression reprimieren, dies geschieht in *Drosophila* Imaginalscheiben (Brook und Cohen, 1996). In *Xenopus* inhibieren Wnt-Signale die Expression von BMP4 im Spemann-Organisator und aktivieren die Transkription des BMP4-Antagonisten Chordin (Baker et al., 1999; Wessely et al., 2001). Zu einem etwas späteren Zeitpunkt hingegen wird im ventralen Bereich der *Xenopus* Gastrula die Expression von Wnt8 durch BMP4 aktiviert (Hoppler und Moon, 1997). Eine zweite Möglichkeit ist die direkte Interaktion von Komponenten der beiden Signalwege. So konnte gezeigt werden, dass β -Catenin mit dem Co-Smad Smad4 und das zur Tcf-Familie gehörende LEF1 mit Smad3, einem R-Smad, interagieren kann und dass diese Interaktionen die transkriptionsregulatorischen Eigenschaften der Moleküle verändern (Nishita et al., 2000; Labbé et al., 2000). Schließlich können gemeinsame Zielgene auch kooperativ oder antagonistisch reguliert werden. Ein Beispiel für kooperative Regulation ist das homöotische Gen *ultrabithorax (ubx)* in *Drosophila*, für dessen Expression im visceralen Mesoderm sowohl *wingless* als auch *dpp* notwendig ist (Riese et al., 1997). Das Homeoboxgen *dve* hingegen wird während der *Drosophila* Endodermentwicklung von *wingless* aktiviert und von *dpp* reprimiert (Fuß und Hoch, 1998).

BMPs und Wnts gehören zu den wenigen Molekülen, von denen gezeigt werden konnte, daß sie als Morphogene wirken können, das heißt, dass sie in Abhängigkeit von ihrer Konzentration entlang eines extrazellulären Gradienten distinkte zelluläre Antworten auslösen können (Zecca et al., 1996; Nellen et al., 1996; Neumann und Cohen, 1997a). Diese Fähigkeit ist von entscheidender Bedeutung für ihre Rolle in Musterbildungsprozessen, da sie erlaubt, von einer lokal begrenzten Expressionsdomäne aus in einem umliegenden Feld die Identität von Zellen zu bestimmen. Die Existenz von Molekülen mit dieser Eigenschaft wurde durch die Morphogenhypothese für Musterbildungsprozesse bereits 1952 von Turing postuliert, konnte aber erst in den letzten Jahren bewiesen werden.

Die Bedeutung dieser hochkonservierten Signaltransduktionswege für die frühe Embryonalentwicklung höherer Metazoa wirft die Frage auf, ob die molekularen Systeme, die die Entwicklung bilateralsymmetrischer Baupläne kontrollieren, bereits in radiärsymmetrischen Tieren vorhanden sind, ob sie dort eine analoge Funktion haben und wie sie miteinander interagieren. Zudem könnte die Analyse speziell des BMP-Weges, der in allen

Bilateriern an dorso-ventraler Achsenbildung beteiligt ist, Aufschlüsse über die evolutive Verwandtschaft der einen Achse der radiärsymmetrischen Tiere zu den zwei Achsen der Bilateria geben.

Der Süßwasserpolymp *Hydra* gehört zum evolutiv alten Phylum Cnidaria, ist also ein radiärsymmetrischer Organismus, dessen eine Körperachse am besten als oral/aboral oder als apical/basal bezeichnet wird. Durch Markierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Orientierung dieser einen Körperachse mit der animal-vegetativen Achse der Oocyte korrespondiert: der orale Pol des adulten Polypen entspricht dem animalen Pol der Oocyte (Freeman, 1981). Der Körper des Polypen kann in drei Regionen unterteilt werden: (1) den Kopf mit einer Mundöffnung und einem ihn umgebenden Ring zum Beutefang dienender Tentakel; (2) den zylinderförmigen, den Gastralraum umschließenden Rumpf und (3) den Fuß mit einer adhäsiven Fußscheibe am aboralen Ende. Für die Musterbildung entlang dieser Achse ist der Kopf der Polypen von zentraler Bedeutung. In Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß ein verpflanzter Kopf in der Lage ist, das Auswachsen einer neuen Körperachse aus Wirtsgewebe zu induzieren (Browne, 1909; MacWilliams, 1983). Der Kopf der *Hydra* hat also eine dem Organisator von Vertebraten äquivalente Funktion. Ein zweites Hauptcharakteristikum der Cnidaria ist, das sie diploblastische Organismen sind, das heißt ihr Körper wird aus nur zwei Keimblättern (Endo- und Ektoderm) gebildet. Im Gegensatz dazu bestehen alle höheren Metazoa (und somit alle bilateralsymmetrischen Tiere) aus drei Keimblättern (Endo-, Ekto- und Mesoderm), sie werden als Triploblasten bezeichnet. Ein wichtige Eigenschaft, die *Hydra* zu einem sehr geeigneten Organismus zur Untersuchung von Musterbildungsprozessen macht, ist die Dynamik ihres Gewebes. Vor allem im zentralen Bereich des Rumpfs findet permanent Proliferation statt. Die entstehenden Zellen werden einerseits zur Bildung von neuen Polypen mittels Knospung verwendet, andererseits per Gewebeschub zu den beiden Enden des Tieres bewegt, wo Zellen kontinuierlich abgestoßen werden. Aus dieser Gewebedynamik ergibt sich die Notwendigkeit, auch im adulten Tier aktiv die Musterbildung entlang der Körperachse aufrecht zu erhalten und somit die Möglichkeit, diese Prozesse am adulten Polypen zu untersuchen. Zudem erlaubt es das hohe Regenerationspotenzial von *Hydra*, experimentell die Bildung neuer Körperachsen zu induzieren. An *Hydra* sollten sich daher Aufschlüsse über die Evolution von Musterbildungsprozessen, speziell während der Achsenbildung, gewinnen lassen.

In dieser Arbeit sollen durch die Analyse der Expressionsmuster von Komponenten der Wnt- und BMP-Signaltransduktionswege in *Hydra* folgende Fragen bearbeitet werden: (1) Sind Wnt- und BMP-Signalwege an der Achsenbildung in *Hydra* beteiligt? (2) Hat der *Hydra* Kopfforganisationsplan auch auf molekularer Ebene Ähnlichkeit zu den Organisationsplänen in Vertebraten? (3) Welche Implikationen ergeben sich für die Evolution von Musterbildungsprozessen?

3 Resultate

3.1 Untersuchung des Wnt-Signaltransduktionswegs in *Hydra*

3.1.1 Expressionsanalyse von HyWnt

Sekretierte Wnt-Signalmoleküle haben eine große Bedeutung für Musterbildungsprozesse in höheren Metazoen (Cadigan und Nusse, 1997). Mehrere Komponenten eines putativen Wnt-Signaltransduktionsweges konnten aus *Hydra* isoliert werden (Abb1; Hobmayer et al, 2000) Um Aufschluss über die Funktion von HyWnt zu gewinnen, wurde mit einer Digoxigenin markierten RNA-Sonde das Transkriptionsmuster in *Hydra* untersucht.

Adulte Polypen und Knospung

In adulten Polypen wird HyWnt im Ekto- und Endoderm an der Spitze des Kopfbereichs, dem Hypostom, exprimiert (Abb.3a). Die HyWnt-Expressionsdomäne umfasst ca. 50-60 Epithelzellen und markiert das apikale Ende des Tieres. Zudem wird HyWnt während der Knospung, *Hydras* asexuellem Fortpflanzungsmodus, exprimiert. Knospung findet in einem distinkten Bereich bei etwa 30% Körperlänge (d.h. bei 30% der Gesamtlänge vom Fuß aus gerechnet) statt. Die Knospung beginnt mit der Bildung einer kreisförmigen Plakode, deren Zellen eine säulenartige Form annehmen und daher zu einer Verdickung des Ektoderms führen (Otto und Campbell, 1977). Aus dem Zentrum der Plakode evaginiert Rumpfgewebe des Muttertieres. Es bildet sich eine senkrecht zur Achse des Mutterpolypen stehende Protrusion, an deren Spitze Tentakel und Hypostom differenzieren. Nach dem vollständigen Auswachsen entsteht am Fuß der Knospe eine Basalscheibe und der junge Polyp löst sich ab. Die Expression von HyWnt während dieses Prozesses ist in Abb.3b-d zu sehen. Sie beginnt als ein nur wenige Zellen umfassender Bereich unmittelbar bevor die Evagination von Rumpfgewebe des Muttertieres beginnt. In Abb.3b ist die Situation kurz nach Evaginationsbeginn gezeigt. Während des Auswachsens der Knospe vergrößert sich der Wnt-positive Bereich, bis er den Umfang der adulten Expressionsdomäne erreicht (Abb.3c,d). Die Transkripte sind in allen Stadien der Knospung nur am apikalen Ende des neuen Polypen zu detektieren, also im späteren neugebildeten Hypostom. Sowohl im adulten Polypen als auch während der Knospung markiert die HyWnt-Expressionsdomäne also den vorhandenen oder entstehenden Kopforganisator.

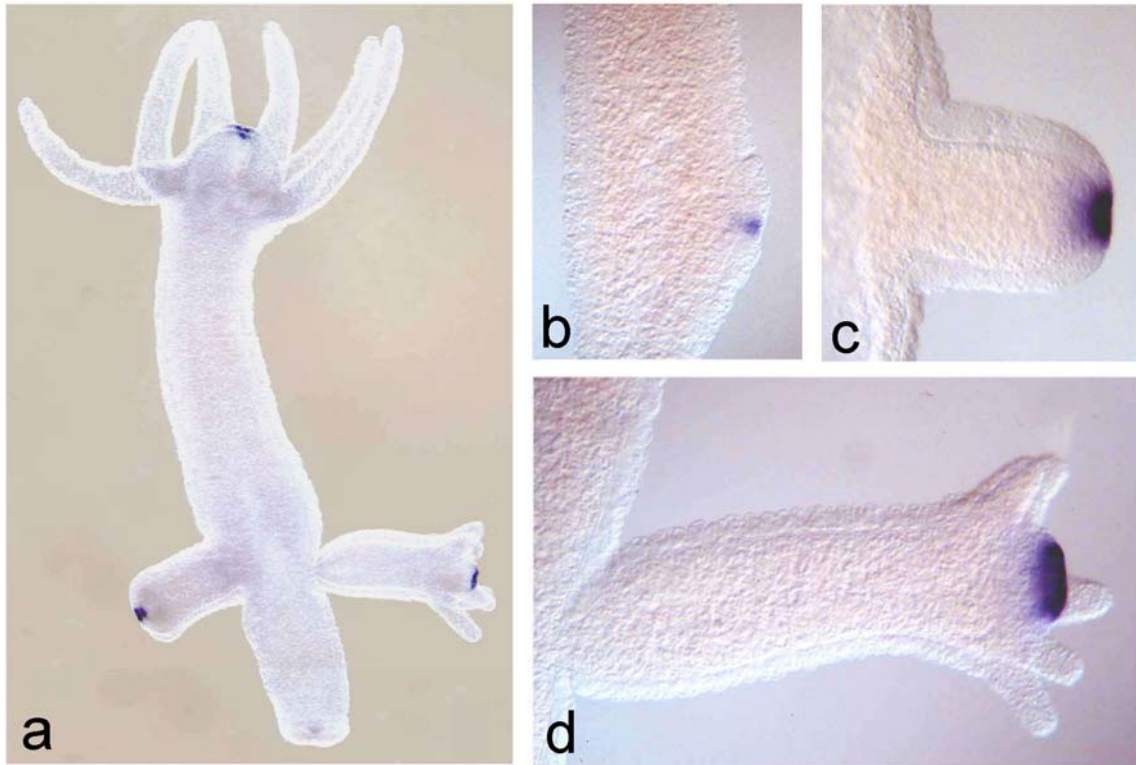


Abb.3: Expression von HyWnt in adulten Polypen und während der Knospung

(a) HyWnt wird in einem kleinen Bereich an der apikalen Spitze des Polypen exprimiert. (b) Während der Knospung beginnt die Expression etwa zeitgleich mit der Gewebeeinvagination und (c,d) bleibt später auf das Hypostom beschränkt

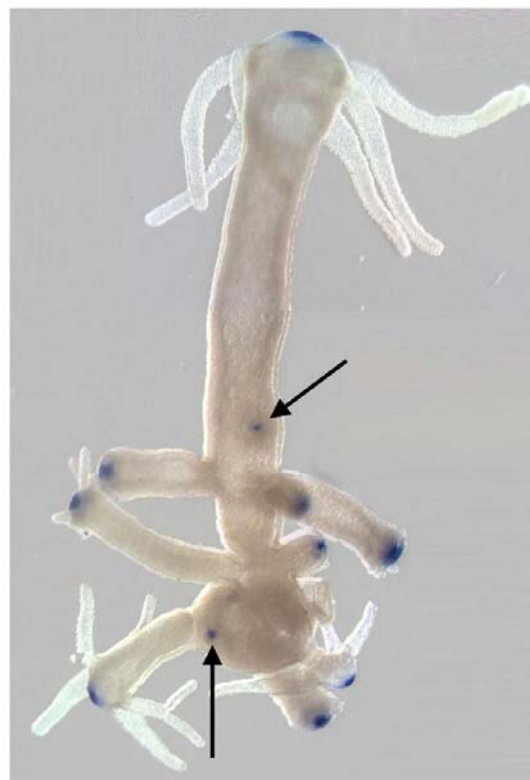


Abb.4: HyWnt Expression in der Hydrantmutante mh-1
Auch der Bildung ectopischer Köpfe geht die Aufregulation von HyWnt voraus (Pfeile).

Auch in einer Hydramutante, die vermehrt ektopische Köpfe bildet (*H. vulgaris* multiheaded1=mh1; Sugiyama und Fujisawa, 1977a), ist jeder Kopf durch die Expression von HyWnt im Hypostom gekennzeichnet (Abb.4). Zudem geht auch der Entwicklung der ektopischen Köpfe eine lokale Aufregulation von HyWnt voraus (Pfeile in Abb.4).

Kopfregeneration

Die kopfspezifische Expression von HyWnt legt die Vermutung nahe, dass dieses Molekül an der Kopfentstehung beteiligt sein könnte. Das hohe Regenerationspotenzial von *Hydra* ermöglicht es, Kopfbildung experimentell zu induzieren. Zerteilt man einen Polypen in eine Kopf- und eine Fußhälfte, so regenerieren die beiden Hälften innerhalb von zwei bis drei Tagen den jeweils fehlenden Teil. Während der Kopfregeneration muß dabei ein neuer Kopforganisator gebildet werden; Gene, die für die Kopfbildung von Bedeutung sind, sollten daher während der Kopfregeneration exprimiert werden. Abb.5 zeigt Beispiele für die Expression von HyWnt während der Kopfregeneration nach Schnitt kurz unter dem Tentakelkranz (80% Körperlänge). Schon eine Stunde nach dem Schneiden ist in den ersten Regeneraten eine Aufregulation zu erkennen (Abb.5a). Die Expressionsdomäne bleibt durchgängig auf die regenerierende Spitze beschränkt. Schließlich wird nach Bildung des neuen Kopfes das ursprüngliche Expressionsmuster im Hypostom wiederhergestellt (Abb.5b-d). Die Geschwindigkeit, mit der ein Kopf nachgebildet wird, ist von der Schnitthöhe abhängig: Je dichter am Kopf geschnitten wird, desto schneller erfolgt die Kopfregeneration (MacWilliams, 1983). Demgemäß sollte die Aufregulation kopfspezifischer Gene ebenfalls von der Schnitthöhe abhängig sein. Die quantitative Analyse zeigt, dass die Kinetik der HyWnt-Aufregulierung diese Voraussage erfüllt (Abb.5g): entsprechend der verzögerten Kopfregeneration nach Dekapitation bei 50% Körperlänge (KL), erfolgt die transkriptionelle Aktivierung von HyWnt um etwa sechs Stunden später als nach Schnitt bei 80% KL.

Im Gegensatz zur Kopfregeneration kann während der Fußregeneration nur in vereinzelten Fällen eine transiente HyWnt-Aufregulation beobachtet werden (Abb.5e,f).

Um zu untermauern, daß die Expression von HyWnt tatsächlich mit Kopfbildung in Zusammenhang steht, wurde die Expression in einer kopfregenerationsdefizienten Hydramutante untersucht. Tiere dieses mutanten Stammes (*H. magnipapillata* reg-16) sind entweder gar nicht in der Lage, einen Kopf zu regenerieren oder aber sie regenerieren ihn mit einer deutlichen Verzögerung (Sugiyama und Fujisawa, 1977b; Achermann und Sugiyama,

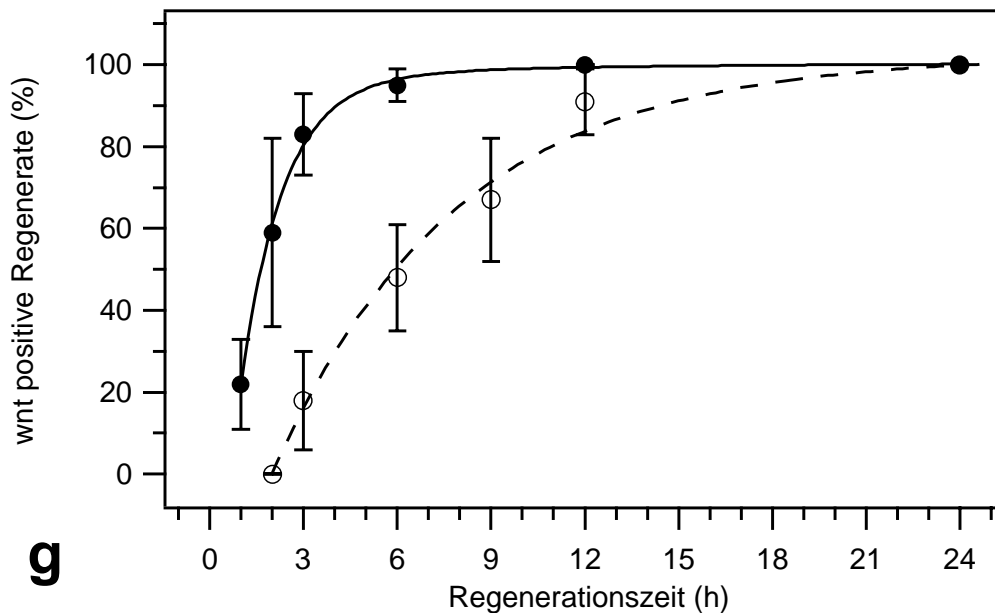
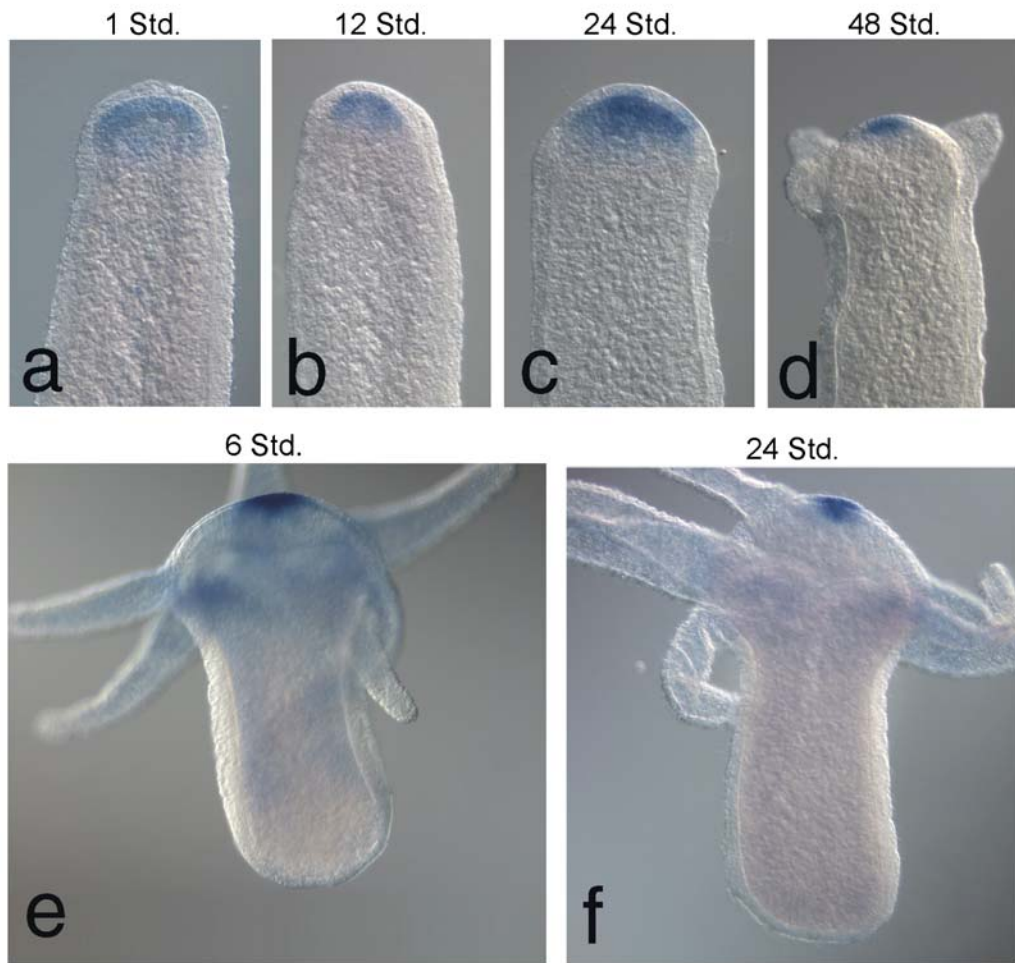


Abb.5: HyWnt-Expression während der Kopf-und Fußregeneration

(a) Bereits nach 1 Std. ist in Kopfregeneraten eine lokale Aufregulation zu erkennen, (b-d) innerhalb von 48 Std. wird das Expressionsmuster adulter Polypen wieder hergestellt. (e,f) In Fußregeneraten ist keine Aufregulation zu beobachten. (g) Nach Schnitten bei 80%KL (•) erfolgt die HyWnt Aufregulation früher als nach Schnitten 50%KL (o)

1985). Im Gegensatz dazu ist die Kopfbildung während der Knospung in dieser Mutante nicht gestört. Reg-16 Tiere wurden bei 80%KL geköpft und die Expression von HyWnt per *in situ*-Hybridisierung verfolgt. Es zeigte sich, dass in Tieren, die keinen Kopf regenerieren, keine Aufregulation von HyWnt in der apikalen Spitze zu beobachten ist (Abb.6a). Im Gegensatz dazu ging in Tieren, die verzögert einen Kopf regenerieren, der Regeneration wie in Wildtyptieren eine Aufregulation von HyWnt voraus (Abb.6b,c). Die ersten Wnt-positiven Regenerate sind erst nach 48Std. zu beobachten (Abb.6d). Die Fähigkeit, einen Kopf zu regenerieren, ist quantitativ mit der vorhergehenden Aktivierung der HyWnt-Transkription korreliert. Dabei geht die Aufregulation von HyWnt auch in dieser Mutante der morphologisch erkennbaren Kopfstehung um ca. 30 Stunden voraus.

De novo-Musterbildung

Während der Regeneration entstehen neue Köpfe aus einer Situation, in der die generelle Polarität der Körpersäule erhalten ist. In einem Reaggregationsversuch kann hingegen die Entstehung neuer Köpfe und Körpersäulen aus einer homogenen, polaritätslosen Situation untersucht werden, es handelt sich also um einen *de novo*-Musterbildungsprozess. In diesem Versuch wird *Hydra* Rumpfgewebe in Einzelzellen dissoziiert und die entstandene Zellsuspension zu kleinen Klumpen (Aggregaten) zentrifugiert (s. Material und Methoden). Etwa 24Std. nach Aggregationsbeginn sind Ekto- und Endoderm wieder als Epithelien organisiert, nach 50-60Std. werden erste Hypostom- und Tentakelstrukturen sichtbar und nach etwa sieben Tagen trennen sich die Aggregate in einzelne Polypen (Gierer et al., 1972). Einzelne Wnt-Spots konnten bereits nach 24Std. beobachtet werden (Abb.7a). Während der weiteren Entwicklung der Aggregate vergrößerten sich die aufregulierten Bereiche und markierten schließlich das Hypostom aller entstehenden Köpfe (Abb.7b,c). Die quantitative Auswertung der Aggregationsversuche zeigt, daß die maximale Anzahl der Wnt-Spots während der Aggregatentwicklung mit der Anzahl der schließlich entstehenden Köpfe übereinstimmt (Abb.7d). Das bedeutet, dass jeder Wnt-positive Bereich die Entstehung eines Kopfes vorausbestimmt.

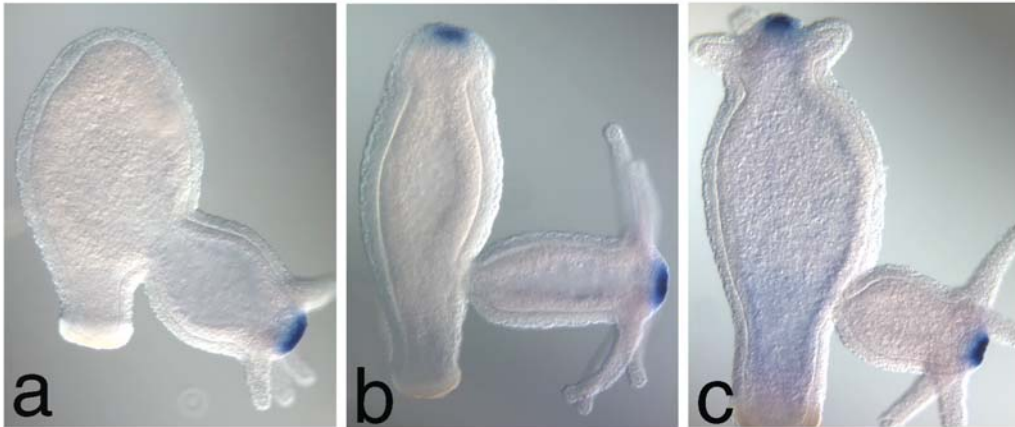


Abb.6: HyWnt-Expression in der Hydramutante *reg-16*

(a) Tiere dieses regenerationsdefizienten Stammes, die keinen Kopf regenerieren, zeigen keine HyWnt-Transkription in regenerierenden Spitzen. (b,c) Tiere, die verzögert einen Kopf regenerieren, regulieren vor der Kopfbildung HyWnt auf. (d) Die Kinetik zeigt, daß erst nach 48 Std. erste HyWnt-positive Regenerate zu beobachten sind und dass nur ca. 30% der Tiere HyWnt aufregulieren und auch einen Kopf regenerieren.

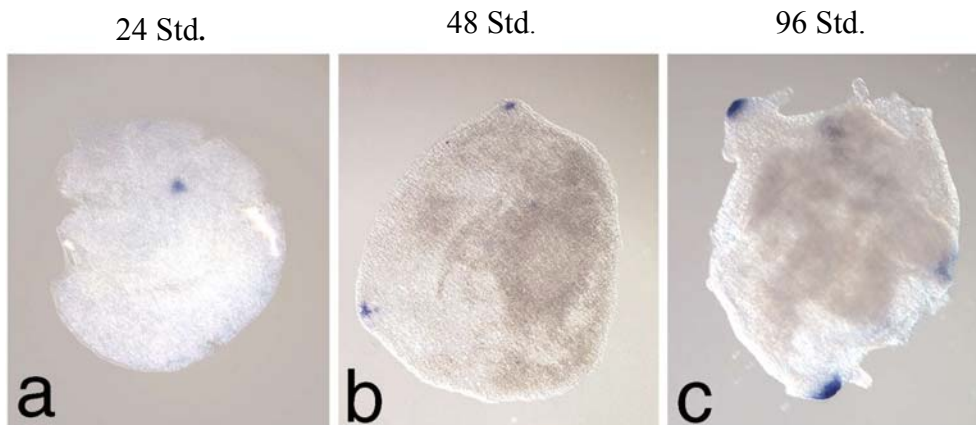
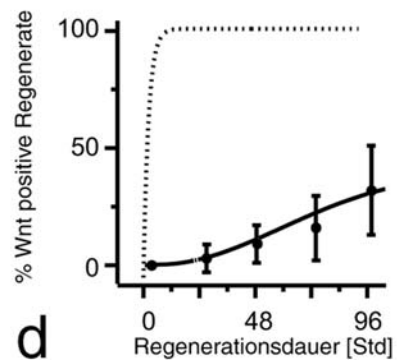
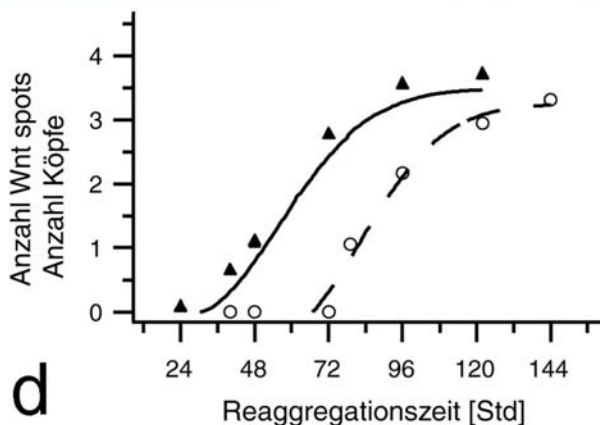


Abb.7: HyWnt-Expression in *de-novo* Musterbildung

(a) In Reaggregationsversuchen sind nach 24 Std. erste HyWnt-spots zu sehen, (b,c,d) die im weiteren Verlauf die entstehenden Köpfe markieren. (d) Die Expression von HyWnt (▲) geht der Entstehung der Köpfe (O) um ca. 36 Std. voraus, jeder Wnt spot markiert einen Kopf.



Die Expressionsanalyse während der Knospenbildung, in den Mutanten *mh-1* und *reg-16*, sowie während der Kopfregeneration und Reaggregation demonstrieren eine strikte Korrelation zwischen der Expression von HyWnt und der Entstehung neuer Kopforganisatoren. Da die HyWnt-Expression dabei der morphologisch sichtbaren Kopfbildung vorangeht, implizieren diese Ergebnisse eine funktionelle Notwendigkeit der HyWnt-Expression für die Kopfbildung in *Hydra*.

Embryogenese

Schließlich wurde die Transkription von HyWnt während der Embryogenese untersucht. Nach den ersten Furchungsteilungen bildet sich hierbei eine Blastula, aus der einzelne Zellen ins Blastocoel migrieren und somit eine solide Gastrula entsteht (multipolare Ingressionsgastrulation). Die Gastrulazellen sekretieren dann eine Kutikula, in der sich der Embryo für zwei bis drei Wochen befindet, bevor die inneren Zellen sich zu einem epithelialen Endoderm arrangieren. Kurz darauf bricht die Kutikula auf und der Primärpolyp schlüpft mit dem apikalen Ende voran heraus (Martin et al., 1997). Die Expression von HyWnt während der verschiedenen Embryonalstadien wurde mit PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) untersucht. In frühen Embryonalstadien (Furchung, Blastula und Gastrula) konnten keine HyWnt-Transkripte detektiert werden, erst im Kutikulastadium sind die Transkripte nachweisbar (Abb.8a). Als Positivkontrolle für die cDNA diente *Hydra* Elongationsfaktor 1α .

Die HyWnt-Expression wurde auch an frisch geschlüpften Primärpolypen mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. Wie in Abbildung 8b zu sehen, ist bereits in sehr jungen Primärpolypen, vor der Bildung der Tentakel, eine Färbung des apikalen Bereichs zu erkennen. Aufgrund der Unzugänglichkeit des Embryos ist während des Kutikulastadiums keine Detektion mit markierten RNA-Sonden möglich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass obwohl die Polarität des Polypen bereits in der Zygote determiniert ist, der Kopforganisator erst in einem späteren Stadium gebildet wird.

3.1.2 Expression von HyDsh

Dishevelled (Dsh) ist im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg die erste bekannte intrazelluläre Komponente nach der Übertragung des Signals durch den Transmembranrezeptor Frizzled (s.Abb1; Cadigan und Nusse, 1997). Die Aktivierung von

Abb.8: HyWnt-Expression in der Embryogenese

(a) HyWnt-Transkripte sind mit RT-PCR erst in Kutikulastadien zu detektieren. (b) Frisch geschlüpfte Primärpolypen exprimieren HyWnt am apikalen Pol, bevor die Tentakel gebildet werden.

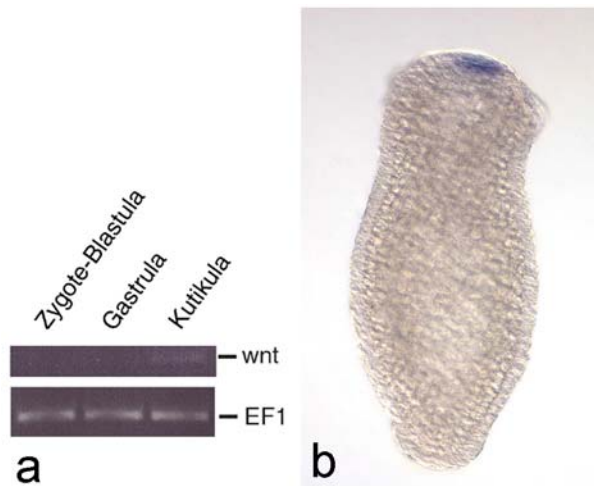
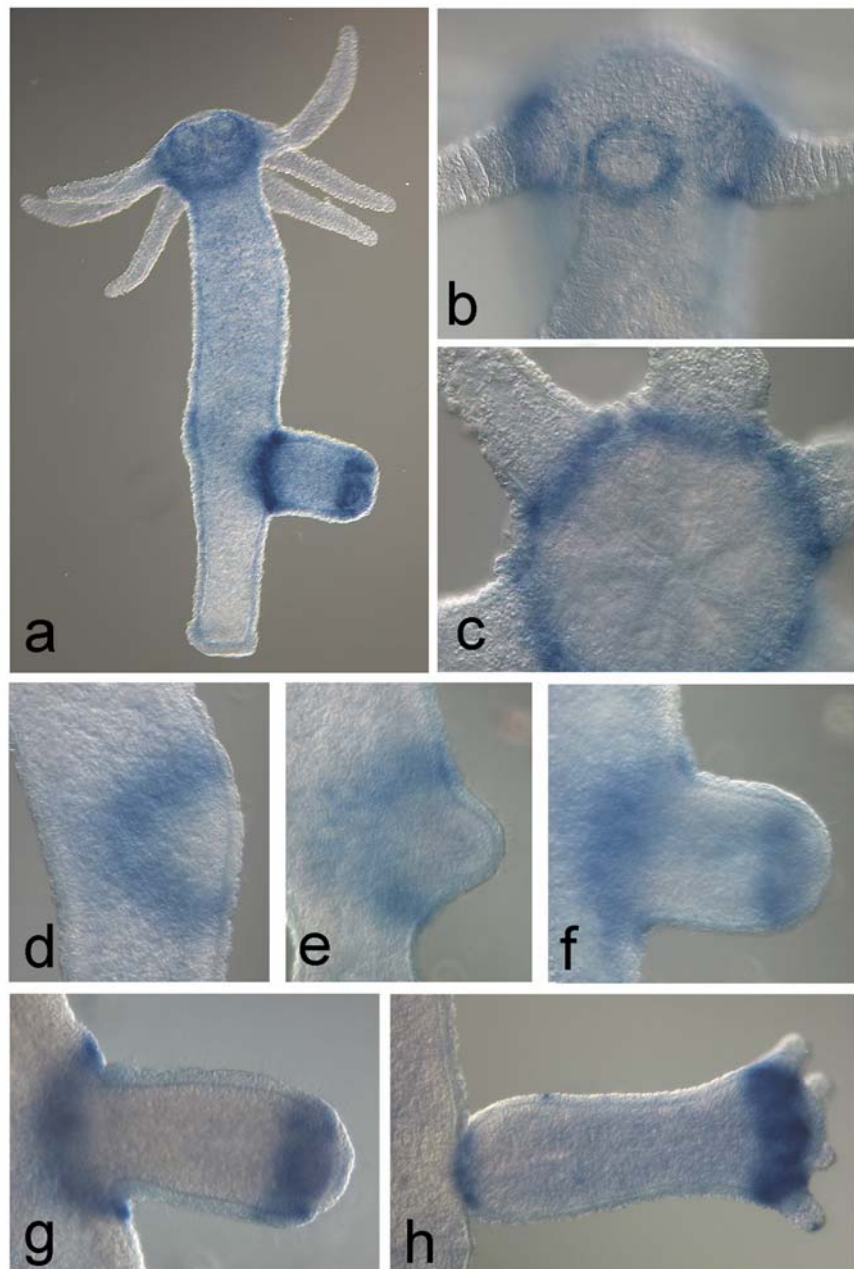


Abb.9: HyDsh-Expression in adulten Polypen und in der Knospung

(a) HyDsh wird im gesamten Polypen exprimiert, (b,c) an der Tentakelbasis ist die Transkription verstärkt. (b) seitliche Ansicht (c) Aufsicht auf das Hypostom. (d-h): Während der Knospung ist HyDsh am Rand der Knospungsplakode aufreguliert, dieser Bereich bildet nach der vollständigen Evagination des Gewebes den Fußbereich des neuen Polypen. (f-h) Eine zweite Zone verstärkter Expression markiert die Tentakelzone. und schließlich die Basis der Tentakel. (d) Stadium 1-2 (e) St. 3-4 (f) St. 5-6 (g) St. 6-7 (h) St.8-9



Dishevelled durch Frizzled kann außerdem einen zweiten, β -Catenin/Tcf-unabhängigen Signalweg aktivieren, den sogenannten Planare Zellpolarität Weg (PCP). Über diesen noch nicht sehr detailliert verstandenen Weg werden sowohl in *Drosophila* als auch in *Xenopus* morphogenetische Prozesse gesteuert (Shulman et al., 1999; Heisenberg et al., 2000; Wallingford et al., 2000). Da das *Hydra* Dishevelled Molekül strukturell hoch konserviert ist (Hobmayer et al., 2000), stellt sich die Frage, ob anhand der Expressionsmuster von HyDsh Hinweise auf Funktionen in den beiden konservierten Signalwegen gefunden werden können.

Adulte Polypen und Knospung

In situ-Hybridisierungen zeigten, daß HyDsh mit Ausnahme der Fußscheibe im gesamten Polypen exprimiert wird (Abb.9a). Eine verstärkte Expression ist in einem schmalen Ring rund um die Basis jedes Tentakels zu sehen (Abb.9b,c). Die verstärkte Expression markiert dabei genau den Übergangsbereich vom Rumpf in den Tentakel (Abb.9c). Während der Knospung zeigt sich ein komplexes Muster der HyDsh-Expression. Ein ringförmige Aufregulationsdomäne ist bereits in den ersten Stadien zu sehen und markiert den Rand der Knospungsplakode (Abb.9d). Während des Auswachsens der Knospe engt sich dieser Ring ein und markiert schließlich einen nur wenige Zellen breiten Ring im proximalsten Bereich der Knospe (Abb.9d-h). Die Lokalisation dieser aufregulierten Zellen im Verlauf der Knospenentwicklung entspricht genau der Bewegung der Zellen am Plakodenrand, wie sie in Markierungsstudien gezeigt werden konnte (Otto und Campbell, 1977). Etwa im Stadium 5 der Knospung wird eine zweite Domäne mit erhöhter HyDsh-Expression im apikalen Bereich der Knospe sichtbar (Abb.9f,g). Diese Domäne markiert die Zone, in der die Tentakel gebildet werden. Kurz vor dem Ablösen des jungen Polypen ist in der Tentakelzone der auch im adulten Tier zu beobachtende Ring um die Tentakelbasis etabliert (Abb.9h). Nach dem Abfallen wird die Transkription im Fußbereich wieder auf das Rumpfniveau herunterreguliert.

Regeneration

Auch während der Regeneration wird HyDsh aufreguliert. Bereits eine Stunde nach Dekapitation ist eine verstärkte Transkription an der regenerierenden Spitze zu sehen (Abb.10a). Drei bis sechs Stunden nach dem Schneiden ist unmittelbar unterhalb der regenerierenden Spitze eine ringförmige Aufregulation erkennbar (Abb.10b). Diese Domäne

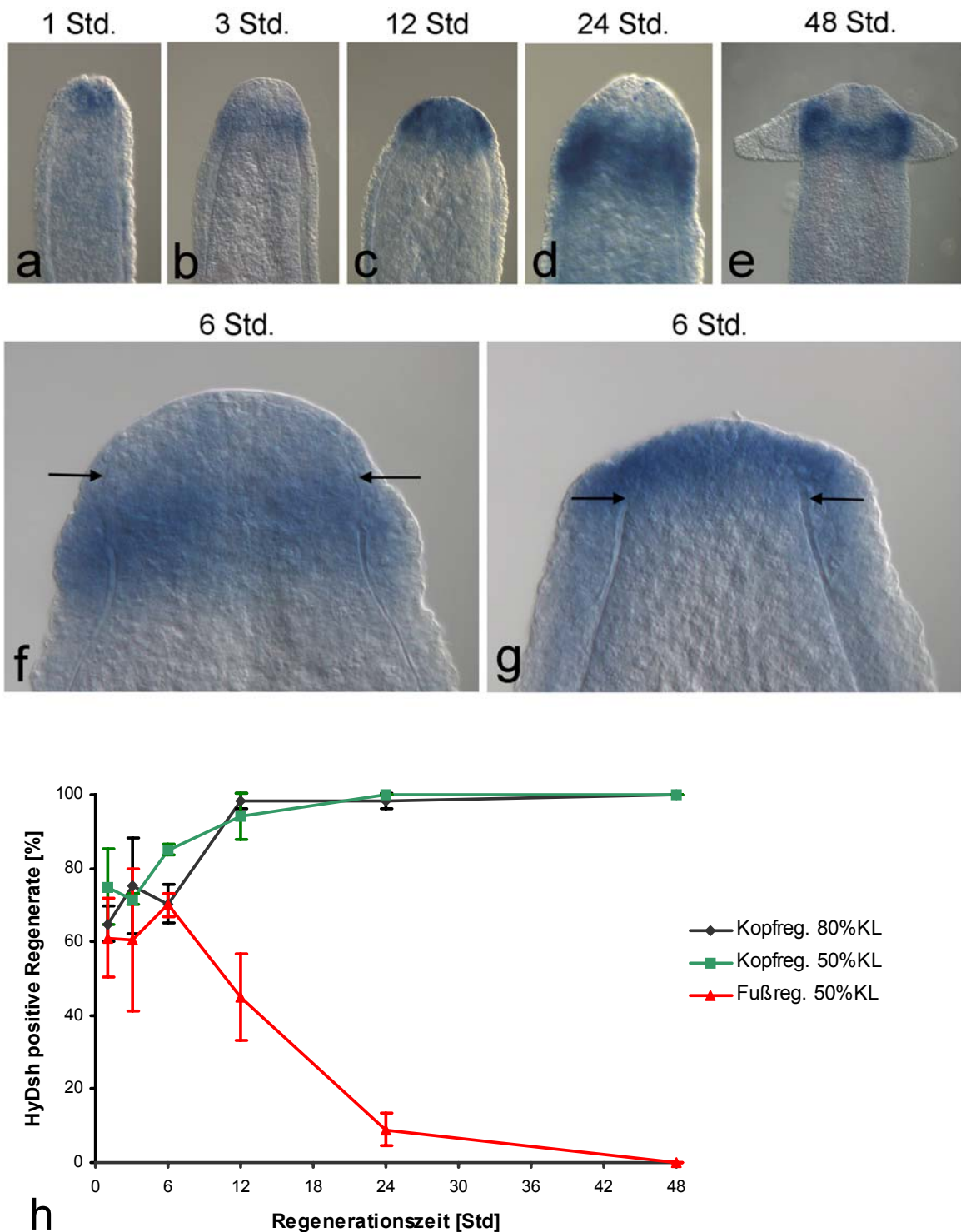


Abb.10: HyDsh-Expression während der Regeneration

(a) Transkriptionelle Aufregulation von HyDsh ist nach 1 Std zu beobachten, (b,f) nach 3-6 Stunden korreliert die Aufregulation mit dem Übergang von cuboidalen zu langgestreckten Ektodermzellen an der regenerierenden Spitze. (c,g) Nachdem die Ektodermzellen an der Spitze wieder ein cuboidale Form angenommen haben, ist die Aufregulation auf die Spitze beschränkt. Pfeile markieren die Endo- und Ektoderm trennende Mesogloea (d,e) Später steht die verstärkte Expression im Zusammenhang mit der Tentakelbildung. (h) Die quantitative Auswertung zeigt, daß die Aufregulation während der Kopfregeneration nicht von der Schnitthöhe abhängt und daß es während der Fußregeneration zu einer transienten Aufregulation kommt. Daten für 50%KL aus zwei, für 80%KL aus drei unabhängigen Experimenten mit 7-30 Regeneraten pro Zeitwert.

befindet sich an der Grenze zwischen den eher cuboidalen Ektodermzellen des Rumpfes und den zu Beginn der Regeneration langgestreckten Zellen, die die Schnittstelle überspannen. Sobald die Ektodermzellen an der regenerierenden Spitze morphologisch denen des Rumpfes wieder ähneln, erscheint der aufregulierte Bereich nicht mehr als Ring, sondern als Kappe. Dies ist im Vergleich zweier Großaufnahmen von 6Std.-Regeneraten zu erkennen (Abb.10f,g). Die Pfeile markieren die Mesogloea, eine azelluläre Matrix, die Endo- und Ektoderm voneinander separiert und anhand der sich die Morphologie der ektodermalen Epithelzellen vergleichen läßt. Das Regenerat in Abb.10g hat sich ein wenig schneller entwickelt als das in Abb.10f, die ektodermalen Zellen an der regenerierenden Spitze sind nicht mehr langgestreckt, sondern haben bereits wieder eine eher cuboidale Form und die HyDsh Expressionsdomäne ist nicht mehr ring-, sondern kappenförmig.

Ab 24Std beschränkt sich die Aufregulation dann auf die Tentakelzone und markiert zunächst als Fleck, dann als Ring die sich bildenden Tentakel (Abb.10d,e). Die frühe Aufregulation ist mit nahezu gleicher Kinetik nach Schnitten bei 50% und 80% Körperlänge zu sehen (Abb.10h), zudem läßt sich während der Fußregeneration eine transiente Aufregulation beobachten (Abb.10h). Auch regenerationsdefiziente Tiere des reg-16-Stammes regulieren HyDsh sechs Stunden nach Dekapitation auf. Zu späteren Zeitpunkten ist eine Aufregulation dann nur noch im Zusammenhang mit Tentakelbildung zu beobachten (nicht gezeigt).

Die Expression von HyDsh während unterschiedlicher Kopfbildungsprozesse unterscheidet sich deutlich von der HyWnt-Expression. Es bleibt dabei festzuhalten, daß HyDsh im gesamten Tier exprimiert wird, und somit auch in allen Bereichen, in denen erhöhte HyWnt-Expression auf die Entstehung von Kopfbildungszentren hinweist. Das Expressionsmuster von HyDsh läßt daher eine Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg zu, impliziert aber zusätzliche, möglicherweise Wnt-unabhängige Funktionen. Gemeinsam haben alle Bereiche, in denen HyDsh im adulten Polypen, während der Knospung und der Regeneration aufreguliert ist, dass sie den Übergang von säulenförmigen zu langgestreckten Zellen markieren. Es scheint daher wahrscheinlich, daß HyDsh für diesen Prozess der Zellformänderung von Bedeutung ist.

3.1.3 Expression von Dishevelled und GSK3 während der Oogenese

Neben der asexuellen Vermehrung durch Knospung können Hydren sich auch sexuell fortpflanzen. Die Bildung von Gameten kann im Hydrastamm AEP durch etwa zehntägigen Nahrungsentzug induziert werden. Die Oogenese beginnt mit einer Akkumulation von oocytenspezifischen Keimbahnzellen unter dem Ektoderm des oberen Rumpfbereichs. Es bilden sich zunächst einzelne kleinere Zellcluster (Stadium1 nach Miller et al., 2000), die schließlich zu einer großen, mehrere Tausend Zellen umfassenden Aggregation fusionieren (Stadium2). In dieser Phase sind die Keimbahnzellen durch einen beschleunigten Zellzyklus (von ca. 72-90Std. auf 24Std.) gekennzeichnet (Holstein und David, 1990; Littlefield, 1991). Eine der Zellen im Zentrum der Aggregation wird dann durch einen nicht genauer bekannten Mechanismus zur Oocyte determiniert. Die umliegenden Keimbahnzellen hören daraufhin auf zu proliferieren und differenzieren zu Nährzellen (Stadium3). Diese Differenzierung beginnt im Zentrum der Aggregation und breitet sich dann konzentrisch aus. Die Nährzellen werden, nachdem sie einen apoptotischen Prozess begonnen haben, von der wachsenden Oocyte phagocytiert (Stadium4). Dabei bildet die Oocyte fingerartige, um den gesamten Rumpf reichende Fortsätze, sogenannte Pseudopodien, aus (Stadium5, Abb.15a). Diese führen die phagocytierten Nährzellen in der nun kugelförmigen Oocyte zusammen (Stadium6), die letztlich das Ektoderm durchbricht, die zweite Meiose durchläuft und befruchtungsfähig ist (Stadium7, Abb.15c; Miller et al.,2000; Honegger,1989).

HyDsh und HyGSK3 zeigen während der Oogenese ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Eine Aufregulation beider Gene kann bereits in kleinen Zellclustern zu Beginn der Aggregation beobachtet werden (Abb.11a,12a). Diese Aufregulation bleibt bis nach der Selektion der Oocyte erhalten (Abb.11b,c;12b,c), anschließend vermindert sich die Aufregulation kreisförmig vom Zentrum des Eifeldes ausgehend (Abb.11d,12d). Dabei bleibt zunächst ein kleiner aufregulierter Bereich am apikalen Pol der Oocyte, schließlich ist im späten Stadium5 die Transkription auf das basale Rumpfniveau reduziert (Abb.11e;12e). Kontrollhybridisierungen mit *Hydra* Elongationsfaktor zeigen eine gleichförmige Expression, die Aufregulation von HyDsh und HyGSK3 ist also kein unspezifisches Phänomen (nicht gezeigt).

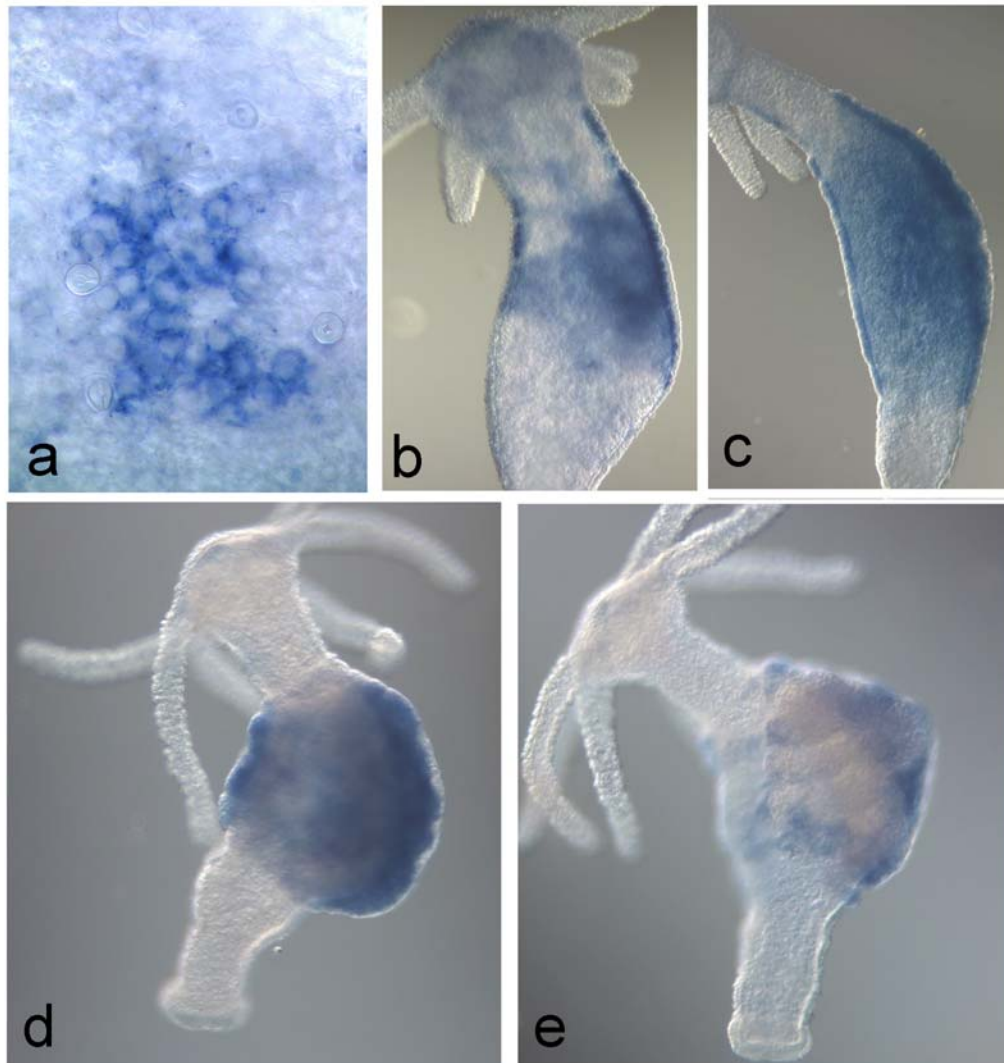


Abb.11: HyDsh-Expression in der Oogenese

(a) Transkriptionelle Aufregulation von HyDsh ist bereits in kleinen Clustern aggregierender Keimbahnzellen zu sehen. (b-d) Die Aufregulation bleibt über das Ende der Proliferation hinaus bis ins Stadium 5 der Oogenese erhalten, wenn die wachsende Oocyte bereits begonnen hat, die differenzierten Nährzellen zu phagozytieren.

(e) Erst kurz vor Erreichen von Stadium 6 wird die Transkription wieder auf das basale Rumpfniveau reduziert.

(b) Stadium 2; (c) Stadium 3; (d) Stadium 5; (e) Stadium 6 (Stadien nach Miller et al, 2000)

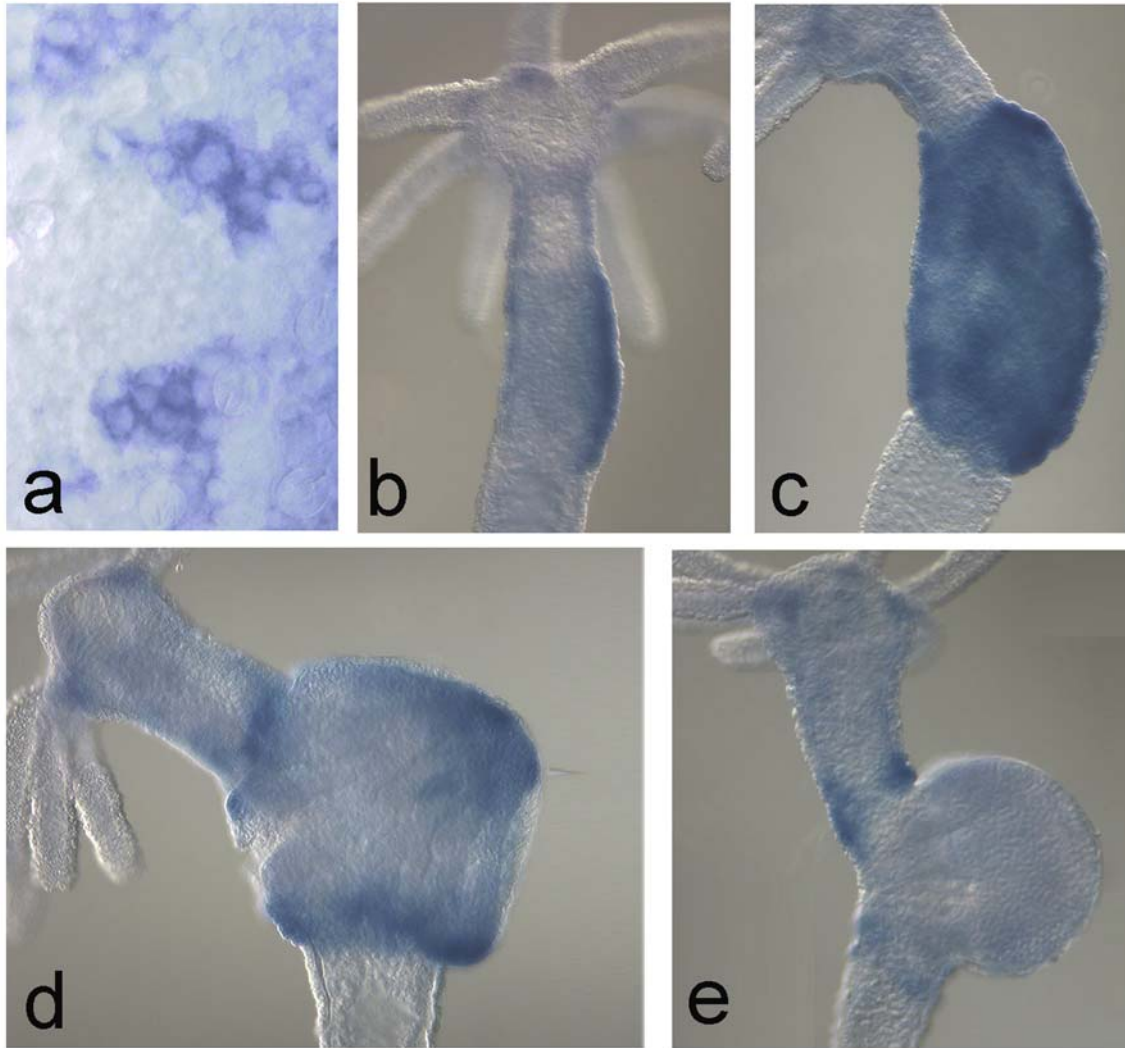


Abb.12: HyGSK3-Expression während der Oogenese

(a) Die Aufregulation von HyGSK3 ist erstmals in kleinen Zellclustern, zum Teil auch in einzelnen Keimbahn Stammzellen, erkennbar. (b,c) Im Verlauf der Aggregation der Keimbahnzellen bleibt die Aufregulation bis nach der Selektion der Oocyte erhalten. (d) Ab Stadium 5 der Oogenese wird die Transkription reduziert, (e) und erreicht im Stadium 6 wieder das Rumpfniveau. (a) 400x Vergrößerung, (b-d) 100x Vergrößerung

10mM HU

1mM LiCl

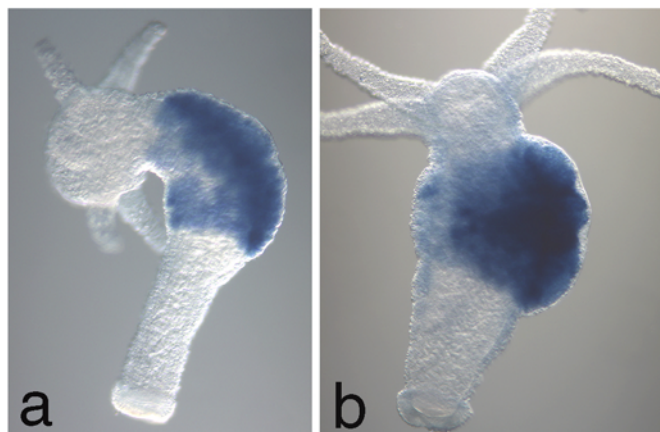


Abb.13: Effekt von HU- und Lithium-Behandlung auf die Expression von HyGSK3

(a) Inkubation weiblicher Polypen ab Oogenesestadium 1-2 mit 10mM HU für 5 Tage eliminiert nicht die HyGSK3 positiven Zellen. (b) Auch nach 120 Std. Behandlung mit 1mM Lithium ist keine signifikante Reduktion der HyGSK3 Transkription erkennbar

Hydroxyharnstoffbehandlung während der Oogenese

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Aufregulation von HyGSK3 und HyDsh und dem beschleunigten Zellzyklus der Keimbahnzellen zu untersuchen, wurden weibliche Polypen mit Hydroxyharnstoff (HU) behandelt. HU blockiert Zellen in der S-Phase und treibt dadurch proliferierende Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose (Sacks und Davis, 1979). Durch zeitlich begrenzte HU-Behandlung können also schnell proliferierende Zellen selektiv eliminiert werden. Nach einer Inkubation von Stadium1-2 Polypen mit 10mM HU für fünf Tage konnten nachwievor HyGSK3 positive Zellen detektiert werden (Abb.13a). Dies zeigt, dass die Aufregulation von HyGSK3 und HyDsh nicht auf schnell proliferierende Zellen beschränkt ist, sondern auch in postmitotischen Zellen anhält.

Behandlung mit dem GSK3-Inhibitor Lithium unterbindet die Oogenese

HyGSK3 wird im adulten Polypen und während der Regeneration gleichförmig exprimiert (Rentsch, 1998). Die auffällige Aufregulation während der Oogenese legt daher eine besondere Funktion für HyGSK3 in diesem Prozess nahe. Um die funktionelle Bedeutung von HyGSK3 zu untersuchen wurden Polypen ab Oogenesestadium1-2 mit Lithiumchlorid (1mM) behandelt. Lithium wirkt in so diversen Organismen wie *Dictyostelium*, Seeigel und *Xenopus* als GSK3-Inhibitor (Klein und Melton, 1996). Auch in *Hydra*-Zellextrakten vermindert Lithium die Phosphorylierung eines GSK3-spezifischen Substrats (B.Reinhardt und H.Bode, pers. Mitteilung). Die Inkubation mit Lithium verursachte deutliche Störungen der Oogenese (Abb.14). Nach sieben Tagen Lithiumbehandlung hatten lediglich 2,5% der Tiere eine morphologisch normale Oocyte gebildet. Im Gegensatz dazu betrug die Quote bei nichtbehandelten Kontrolltieren 78%. Die Lithiumbehandlung verhinderte die Bildung einer regulär geformten Oocyte, stattdessen bildete sich eine unstrukturierte Aggregation von Nährzellen, die unter dem Rumpfektoderm verblieben (Abb.15e). Die typischen, den Rumpf umgreifenden Pseudopodien, mit denen die Oocyte die Nährzellen phagozytiert, konnten nicht beobachtet werden. Der durch Lithium verursachte Phänotyp entspricht keinem Stadium der regulären Oogenese, sodass es sich nicht um eine Arretierung der Oogenese handelt. Zudem zeigte sich, dass Behandlung mit dem Zellzyklusblocker HU keinen deutlichen Einfluß auf die Oogenese hat. Der Effekt von Lithium ist also nicht auf eine Beeinträchtigung des Zellzyklus zurückzuführen. Wurde die Lithiumbehandlung erst nach der Selektion der

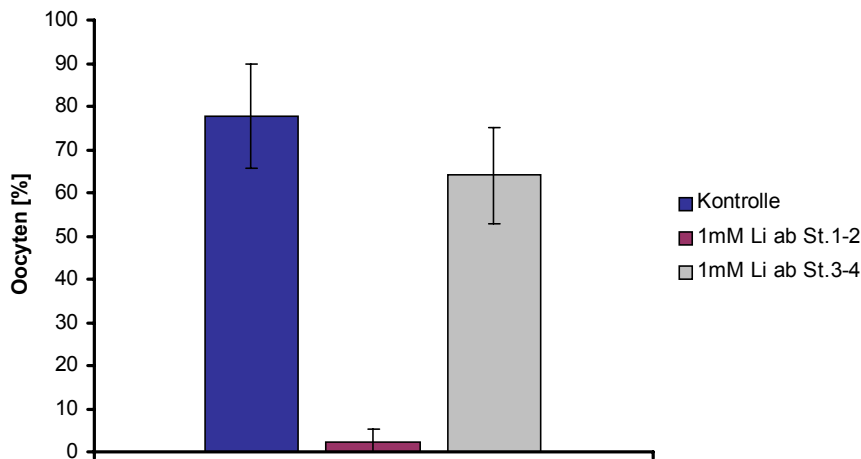
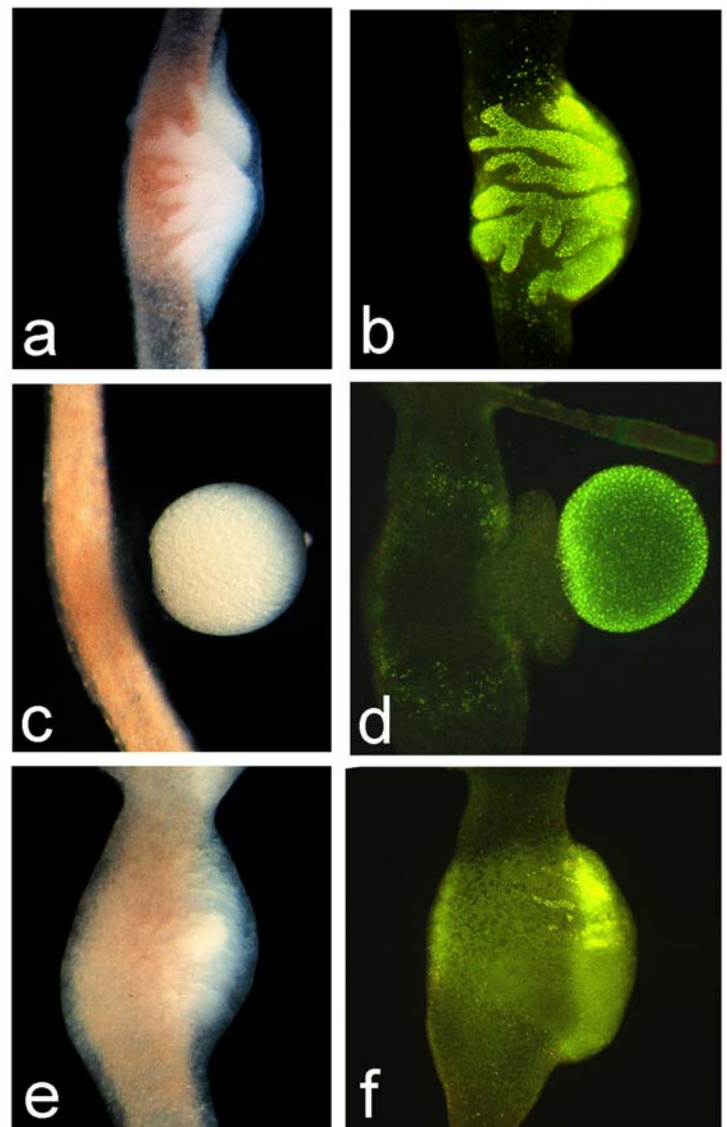


Abb.14: Effekt von Lithium-Behandlung auf die Oogenese

Weibliche Polypen wurden ab Oogenesestadium 1-2 oder 3-4 für 7 Tage mit 1mM Lithiumchlorid inkubiert. Im Vergleich zu Kontrolltieren (blau, 78±12%) wurde die Quote morphologisch normaler Oocyten durch die frühe Lithiumbehandlung (rot) stark reduziert (2,5±2,9%). Behandlung ab Stadium 3-4, also nach Selektion der Oocyte, hatte einen deutlich schwächeren Effekt (grau, 64±11%). Daten für Kontroll- und St. 1-2-Behandlung aus drei, ab St. 3-4 aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 15-40 Tieren.

Abb.15: Auswirkung von Lithium auf die Nährzeldifferenzierung

(a,b) In unbehandelten Tieren bildet die Oocyte fingerförmige Fortsätze, mit denen sie die apoptotischen Nährzellen phagozytiert (St.5). (c,d) Die durch Acridinorange leuchtend grün gefärbten apoptotischen Nährzellen sind auch in der reifen Oocyte (St.7) noch zu erkennen. (e,f) In Lithium behandelten Tieren werden die Nährzellen nicht in eine Oocyte inkorporiert, die Anzahl apoptotischer Nährzellen ist stark reduziert. (a,c,e) Lebendaufnahmen; (b,d,f) Acridinorange färbung. Die einander gegenübergestellten Tiere sind verschiedene Individuen.



Oocyte (Stadium3-4) begonnen, zeigte sich ein deutlich schwächerer Effekt (64% Oocyten), was daraufhin deutet, dass Lithium vor allem die frühen Oogenesestadien beeinflusst. Dies korreliert mit der frühen Aufregulation von HyGSK3.

Lithium stört die Nährzellendifferenzierung

Das erste sichtbare Zeichen der Nährzellendifferenzierung ist die Akkumulation von Nährstoffen wie Lipiden, Glycogen und dotterartigem Material. Die Aufnahme des Cytoplasmas durch die wachsende Oocyte führt zu einem Schrumpfen der Nährzellen, die schließlich die ultrastrukturellen Veränderungen von apoptotischen Zellen zeigen und phagozytiert werden (Honegger et al.,1989). Die Apoptose der Nährzellen bleibt jedoch unvollständig. Obwohl sich die Kernmembran auflöst, kann die für späte Apoptosestadien typische DNA-Fragmentierung nicht mit den üblichen Methoden (TUNEL- und DAPI-Färbung) detektiert werden (U. Technau, pers. Mitteilung). Die Untersuchung von apoptotischen Zellen mit Acridin Orange (AO) zeigt ebenfalls Unterschiede zwischen den apoptotischen Nährzellen und durch HU-Behandlung induzierter Apoptose interstitieller Zellen. AO färbt apoptotische Nährzellen leuchtend grün (Abb.15b,d), während HU-induzierte Apoptose zu einer orangenen Färbung führt (Miller et al.,2000).

Um zu untersuchen, ob Lithiumbehandlung die Differenzierung der Nährzellen stört, wurden Polypen mit AO gefärbt. Lithiumbehandlung über vier Tage führt zu einer deutlichen Reduzierung der AO-positiven Nährzellen (vergl. Abb.15b und 15f), obwohl keine auffällige Verkleinerung des Eifeldes oder der Anzahl der HyGSK3-positiven Nährzellen zu beobachten ist (Abb.13b). Aus diesen Experimenten läßt sich schließen, dass Lithium entweder die Differenzierung der Nährzellen stört und nachfolgend die Oocytenentwicklung, oder dass eine Inhibition der Oocytenentwicklung die reguläre Differenzierung der Nährzellen unterbindet. Zusammengefasst legen das Expressionsmuster von HyGSK3 und der Effekt von Lithium auf die Oogenese eine wichtige Rolle von HyGSK3 in diesem Prozess nahe.

3.2 Untersuchung eines putativen BMP-Signaltransduktionswegs in *Hydra*

3.2.1 Klonierung eines Chordin-ähnlichen Moleküls aus *Hydra*

Der BMP-Signaltransduktionsweg spielt eine entscheidende Rolle in der Musterbildung entlang der Dorsoventralachse sowohl in Vertebraten als auch in Arthropoden. Die Aktivität dieses Signalwegs wird dabei in erster Linie durch den Antagonismus zwischen sekretierten BMP-Molekülen und ebenfalls sekretierten BMP-bindenden Inhibitoren bestimmt. Die Konserviertheit dieses Systems ließ es möglich erscheinen, dass es bereits in basalen Metazoen wie *Hydra* eine Rolle in Musterbildungsprozessen spielt.

Bereits isoliert wurde aus *Hydra* ein Ortholog eines rezeptoraktivierten Smads, hier wird zudem die Klonierung eines Chordin-ähnlichen Moleküls beschrieben. Um Anhaltspunkte über die Funktionen dieser Moleküle zu erhalten, wurde das Expressionsmuster beider Moleküle analysiert.

Struktur von HyChd

In einem Hefe Two-Hybrid Screen zur Identifikation von Interaktionspartnern von *Hydra* β -Catenin wurde, vermutlich durch eine unspezifische Interaktion, von Kerstin Kuhn ein 1323 Basepaare (bp) langes cDNA-Fragment isoliert, das für einen offenen Leserahmen von 360 Aminosäuren und 243bp 3'untranslatierten Bereich kodiert. Der offene Leserahmen des Fragments enthält drei cysteinreiche (CR) Domänen, die eine starke Ähnlichkeit zu denen des BMP-Antagonisten Chordin haben. Da solche Domänen auch in anderen Molekülen vorkommen, war es wichtig, den fehlenden N-terminalen Bereich dieses Transkripts zu charakterisieren. Chordin-artige Proteine sind nicht nur durch das Vorhandensein von CR-Domänen, sondern auch durch deren Anordnung gekennzeichnet. Daher sollte anhand der Gesamtstruktur des abgeleiteten Proteins eine bessere Einschätzung der Verwandtschaft zu Chordin-Molekülen möglich sein. Mit zwei aufeinanderfolgenden 5'RACE-(Rapid Amplification of cDNA Ends)Versuchen gelang es, das cDNA Fragment um 2446bp in Richtung des 5'Endes, also dem N-terminalen Bereich, zu verlängern (Abb.16). An Nukleotidposition 113-115 befindet sich ATG-Startcodon, in dem davorliegenden Bereich findet sich in jedem Leseraster ein Stopcodon. Es ist daher davon auszugehen, dass dieses Methionin-codierende ATG den Translationsstart und der zwischen dem Methionin und dem

GACGGAAAAAACACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATTGTGATCAATTATGGGATTCCATTACGTATTGATCAAAA	90
CAACTGCTTACAAGCTTTGTACATGAAGAGCATGAACTGTTACTTTTTGCAATTATTATTCTTTGGAGTTTACAGCAAACCCGCCACAAA	180
M K S M K L L L L Q L L F F G V Y S K P A T K	23
AGTAATTTCTAGATGCATCTGATAAAACCTGTCTCCCTGCAATGAAGAATGCCAACTTTAGACAAATGTGAATTTGGAACAATAAAAAGA	270
V I L D A S D K T C P P C N E E C P T L D K C E F G T I K E	53
AAAATGTGGTTGCTGTAAGGTTTGCATTCGAAATGAAGGAGATATTTGTGGTGAATTAATGAAATTTATGGAATTTGCAAAGAAGGCTT	360
K C G C C K V C I R N E G D I C G G I N E I Y G I C K E G I	83
AGTTTGTAAAGTTCGACATCCGTTTTCTCTTAAAAATTTAAATCTAGAGATGTCAGATAAAAATAGGGCGCTGTGAGACAGAGCTTTGCAG	450
V C K V R H P F S L K N L N L E M S D K I G R C E T E L C S	113
CAGTACAACATGCGGAAGGCATCAGTGGTGAAGGTTGATAATGAGTTACCAACATGTTATTGTCAGAAATGACTGTGAATCGGATGAAGA	540
S T T C G R H Q W C K V D N E L P T C Y C R N D C E S D E E	143
AAAATGTGTGATAATGATGGTAATAAGTATAAAAAATATGTGAAGTTCGCGAGTAAAGAATGTAAGTTCACAAAAAATTCGCGACTT	630
K M C D N D G N K Y K N I C E L R S K E C K L Q Q K I P H F	173
TTATGCAAAGATTGCCAACGTAAGTTCGAGAAAGTAAATAGAAACAATGAGTCTGGTGTGTTTCTAAACACAACCAGGATGTGTGAAAA	720
S C K D C Q R T A E S K L E T I E S G V V L N T T R M C E K	203
AGAAGAATGTGTAATGGGGTATTTAAAGTATCATTAGACAGTACTTGTTTAAAGGCAGAAGGTTTTACTTGTTCGGAAGGTTCAAACAT	810
E E C V N G V F K V S L D S T C L K A E G F T C S E G S N I	233
TCATCAGGATATCACCTGCCAGTAGGATATTAAGTATAACAAAATAGAGCTTAACCTGAGTATGGATATCCAAATCTTGGACA	900
H Q D I T C P V G Y Y C N I T K L E L N P E Y G Y P N L C Q	263
ATGTTCTGCAATTGATAGCTCTGAAGTTTGTAAACTTGACCAGACTACTGGTGTCTGCTGCGCTTATTTCCAAGATGGCATTTTGACAT	990
C S A I D S S E V C K L A P D T G A C C A Y F P R W H F D I	293
TTCTACTGGTACTTGCAAAGAGTTTATTTATGGTGGTTGCCAGGGTAAACAAAAATAATTTCAAGTCAAAGATGAATGCTTTAGATTGTG	1080
S T G T C K E F I Y G G C Q G N K N N F K S K D E C L R L C	323
TGGAGATAGATAAGCCTTTAGCAGCAATGAATGCGTTTCTTTTGTGGGTATGCCAATGTTTCTTTTGTGCTGGCAAAGTCCA	1170
G D R Y K P L A A M P M N A F P F V G M P M F P F A G K V Q	353
GGAAAGACCAATGAGTGAATAAATCAATGACCATAAGTGGATTAGTTATTTTACCACAAACCATCCAAATTCCTCCAAATCGTGTTTAGT	1260
E R P M S D K S M T I S G L V I L P Q T I Q I P P K S C L V	383
TGTTCAATTTCCAAGATGTCACCTTTAGCAGATGTTGCATCCCGGATTATAGCTACTCAAATGTACATTTTCTGAGGTCACCCTAAAGA	1350
V H F Q D V T L A D V A S R I I A T Q I V H F S E V T T K D	413
TGTAATTTGATTATAAGATTAATAAGATTAAGTAAAGTGCCTTACCAGAAGATATCGGTAGAATATACTCTGTTAGAGCATTTCTAAA	1440
V I D Y K I N K I N S K M P L P E D I G R I Y S V R A F L N	443
CATTGGTGGTGCAGCAGAACAGTATGATGGTAGATCTATTCAAAAGAAAGATTATCTTTTTCAGATGAGAGAACCACAGTTATGTTAAG	1530
I G W C S R T V D D G R S I Q K K D Y L S D E R T T V M L S	473
TAATGACAAAGATGAATTTATAAAAGATATTACTATAAAATGTTATGACTGTGATAAAACAGATTTGCATACTGATATACAAATGGGATT	1620
N D K D E F I K D I T I K C Y D C D K T D L H T D I Q M G F	503
TCCAATGGAAGAACCTGAATTTGAACTAGAAAAGAAGAAGAAATCTGATTTTAGTGGTGTGATGATACGGATTCCAAATTTTCTTATGA	1710
P M E E P E F E L E K K E E S D F S G D D D T D S K F S Y D	533
TGGACCTCAAATGAGCAGCAGTGTGATAGAAAATAAGAGGTTTCAGTTAAATCTCTAATATCACTGAAAGCGTATTAAAAAAGATTCTTG	1800
G P Q M S S T V I E I R G S V K F S N I T E S V L K K D S C	563
CCTTTGGATCTCTTTGAGTGTGTCACATTACAAGACGCAAAAATCTATAACTCTTTCTTCAACATTTACGGATATGTCGTTCTACAAAGT	1890
L W I S L S D V T L Q D A K S I T L S S T F T D M S F Y K V	593
AGGTAAGAAATTTCAATATGTTCTTCAGTCAATGAAACCGATGAATGAAGAATTTAGTTCGTAATTTATGTTGTTCAAGCTGTTTAAATAA	1980
G K S I Q Y V L Q S M K P M N E E L S R T Y V V Q A V L N N	623
CGGATGGTGTATAAAAAAGGTTTCAGATAAATGGCTCAAAAAAGGGGATTTTAAATACAGTAACCCACACTATTAATTTAAATAAGGA	2070
G W C Y K K G S D K W L K K G D F L N T V T H T I N L N K E	653
ATCAACACAGCTATAATTTAGATGTTAACGTAATATGCTATGAATGTGAAACCAAGAAGATTTATCATCGGCCTCAAATCTCTAAATAA	2160
S N S Y N L D V N V I C Y E C E T K E D L S S A S K S L N N	683
TGTAATGAAATGATGTTGGTAAATGGTACATTATTCTTCTGATGTACCTAAAGTCAATGCATCGTCTTGGCTTGGATTGTTTCAATTCAG	2250
G N E M M W V N G T L F F P D V P K V N A S S C L I V S F R	713
AGATGTTTCTATTGCTGATTATAAGTCAAAAATCTCGCCATGCTTGTGTTAAGCGTATCACAATTTAAAGACAAAGAATATAACTATGT	2340
D V S I A D Y K S K T L A M L V L S V S Q F K D K E Y N Y V	743
TCTCCAGATAAAAAAGCCATCCGATTTTACTGGACGTTTTAGTGTACATGCAGTACTAAATGTAAACTGGTGCTCGTCAGATTTCATCTCA	2430
L Q I K K P S D L S G R F S V H A V L N V N W C S S D S S Q	773
AAAATGGATTGAAAAAGGAGACTACTTGGACGTTACTTCTTACCAAGTTGATCTTAAAGAAAATACAAACACTTATAGCCAAGATGTGCA	2520
K W I E K G D Y L T V T S Y Q V D L K E N T N T Y S Q D V H	803

Abb.16: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von HyChd, Legende siehe folgende Seite

```

CCTAATTTGTTACAGCTGTATATCAAGTTCTCAGAAAGAAGATAGCAAAAAGTTTTGCCTGGATAAAAAAAAAAACAATAACTCGCAAACA 2610
L I C Y S C I S S S Q K E D S K K F C L D K K N N I T R K H 833
CGATGAAACATGGCTAGCTGATCCATGTACTACATGTGTGTGTGATGATGGATTTTCAGCCTGTGCAATTA AAAAGTTGTGTGCTAACTG 2700
D E T W L A D P C T T C V C D D G F S A C A I K S C V S N C 863
CCCTACACCAATTCCAAAACCAGGAGAATGTTGTTCTCAATGCTCAAGTACATGTTTATATGAAAATAAATTTTACAATGAAGGAGATGA 2790
P T P I P K P G E C C S Q C S S T C L Y E N K F Y N E G D E 893
ATGGTCCCCAGATTTCATGTACTAAATGCAATTGCATTAATGGGGAGAAAATTATGCTCAGTTGTTGATTGTCTACCAGATAGCATGTTGCC 2880
W S P D S C T K C N C I N G E K L C S V V D C L P D S M L P 923
GTGCAAAAACTCTGTTTGTGATAGAAGGTAATGTTGTCAGATCATGCTCTATACTGATGTCATCACCAGTAAAACAAGAATGTTTCTATGA 2970
C K N P V L I E G N C C R S C P I L M S S P V K Q E C F Y E 953
ACAAACAAAACAAAACCTTATCAAGATGGTGTGAGTGGACTTCGCCAGATTTTTCGCGTTTCATGTGTTTGTGACAAAAGGTAATACCATGTG 3060
Q T N K T Y Q D G D E W T S P D F C A S C V C D K G N T M C 983
TGCAACACCAATGTGTGCTTTACCNCCTGCTCAGAAGATAAGATAATTAATATCCAGGCAGATGTTGCCCTATTTGTCCTGAGACAAA 3150
A T P M C A L P P C S E D K I I N I P G R C C P I C P E T N 1013
TGTTTGTAAAGACCTTAAACCAATCGAGCATATACTGAGGGAGAAAATATGGCAAAATTCAGATTGTAATGTTGTAGATGTACTTCAA 3240
V C K D L N T N R A Y T E G E I W Q N S D C N V C R C T S N 1043
TGACACAGTTTGTGAAAAACCATTAGCTGATTATGAAAAGTTGTGAAAAAAGGTTAAGTTAACAAAAAATTGTCCTGCATTCTGCTTTAT 3330
D T N C E K P L A D Y E S C E N K V K L T K N C P A F C F I 1073
TGAAACGGACAGCAAGCCTAAATGTGAAGATAGTAGTAATTATTACTCAGTCGGACAAGAAATAGAAAAGAGATTGCAATAAATGTATATG 3420
E T D S K P K C E D S S N Y Y S V G Q E I E R D C N K C I C 1103
TGTTGAGCAAGGCAAAATGGGAATGTACTAAACGTAGTTGTCCTATTATGATAGAGGGCTTACCATCTGGAGCAACAGATGAAGCTGAAGT 3510
V E Q G K W E C T K R S C P I M I E G L P S G A T D E A E V 1133
AGCAGATGATGGTCCA TGA C T C T C A T T A C A G T T T T T A A T G T T A A G T A T A T A T T T A T T A T C G T G T T T T T C T C C A T T T T T A T T T G T A 3600
A D D G P * 1138
TTGCCTTATAATTTATGTTTTATTAAATGTTTAATATATATTTTGCAC T T T T A T A T T G C T A A A G T G A T G T T T T T A A A A T T T T T A G A T 3690
TTTTTAAATATATATTATAAATAATTATTTTAAATATACAATACATAGTAAAGATTTTATGAATAAATGACATACAT 3766
    
```

Abb.16 fortgesetzt: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von HyChd
 Start- und Stopcodon sind rot dargestellt, Nukleotid- und Aminosäurepositionen am
 rechten Rand aufgeführt, Bereiche mit Homologien zu bekannten Proteindomänen
 sind wie folgt gekennzeichnet:

- = Chordin Domänen
- = Signalpeptid
- = IGF Bindungsdomäne
- = Follistatindomäne
- = von Willebrand Faktor Typ C Domäne

5'Ende liegende, 112 Nukleotide lange Abschnitt einen Teil des 5'untranslatierten Bereichs darstellt. Das gesamte, aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Protein besteht aus 1138 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 128kDa. Von Aminosäureposition 5-14 ist eine typische Signalsequenz zur Sekretion des Proteins vorhanden (KLLLLQLLFF). Diese besteht aus mehreren hydrophoben Aminosäuren (Leucin[L], Phenylalanin[F]), denen eine basische (Lysin[K]) vorangeht. Von Aminosäure (AS) 33-85 befindet sich ein Abschnitt mit starker Ähnlichkeit zu Domänen, die in anderen Proteinen zur Bindung von IGF (Insulin-like growth factor) benutzt werden (Kim et al., 1997). Diese Ähnlichkeit beruht hauptsächlich auf der Anordnung von 11 Cysteinen, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung intramolekularer Disulfidbindungen besonders wichtig für die räumliche Struktur des Proteins sind. Der Bereich von AS 107-174 enthält 10 Cysteine, die in genau demselben Abstand zueinander stehen wie die einer Follistatin-Domäne. Follistatin ist ein sekretiertes Molekül, das an TGFβ-Moleküle der Activin- und BMP-Subfamilien bindet und sie dadurch inaktiviert (Nakamura et al., 1990; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Fainsod et al., 1997). Die Region von Aminosäure 270-324 ist in bis zu 53% der Aminosäuren identisch zu Proteaseinhibitor-Domänen vom Kunitztyp. Diese Domänen finden sich in zahlreichen, sehr diversen Molekülen. Ob sie im jeweiligen Molekül tatsächlich als Proteaseinhibitoren fungieren, ist bislang nicht geklärt. Der Bereich von AS 325-831 zeigt keine auffälligen Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Die daran anschließenden CR-Domänen gehören zum Chordin-Typ. Auch hier ist das Muster der Cysteine für die Klassifizierung entscheidend. Ein Vergleich der CRs des Hydraproteins mit denen von *Xenopus* Chordin zeigt, daß sämtliche Cysteine und speziell die charakteristischen Motive CXXCXC und CCXXC (C=Cystein, X=andere Aminosäure) konserviert sind (Abb.17). C-terminal von den Chordin-Domänen gibt es noch zwei weitere kurze CR-Domänen, die Ähnlichkeit zu sogenannten von Willebrand Faktor C-(vWFC) Domänen haben. Die Gesamtstruktur des Hydraproteins ähnelt der der *Xenopus* und *Drosophila* Chordin-Moleküle (Abb.18). Die Länge ist vergleichbar (1138 AS im Vergleich zu 1038 bzw. 941AS), drei CR-Domänen vom Chordin-Typ sind im C-terminalen Bereich zu finden, der zentrale Abschnitt ist nicht konserviert und der N-terminale Bereich enthält cysteinreiche Domänen, die im Hydramolekül allerdings nicht vom Chordin-Typ sind. Die aufgeführten Ähnlichkeiten zu Chordin-Molekülen aus anderen Organismen lassen die Bezeichnung des beschriebenen Hydramoleküls als HyChd gerechtfertigt erscheinen.

```

HyCR1  : CLDKKNNITRKHDETWLADP-----CTTCVCD----- 27
HyCR2  : CLYEN--KFYNEGDEWSPDS-----CTKCNCI----- 25
HyCR3  : CFYEQTNKTYQDGEWTSWPDF-----CASCVCD----- 27
XenCR1 : CTFGG--KFYSLEDSWHPDLGEPFGVMHCVLCYCEPQRSRRG 40
XenCR2 : CSFEG--QLRAHGSRWAPDY-DR----KCSVCSCQ----- 29
XenCR3 : CFFDGDRSWKAAGTRWHPFV-PPFGLIKCAICTCK----- 35
XenCR4 : CRFGR--HWYPNHERWHPTV-PPFGEMKCVTCTC----- 31

HyCR1  : --DGFSACAI--KSCVSN----CPTP--IPKPGECCSSQC : 56
HyCR2  : --NGEKLCSV--VDCLPDSMLPCKNP--VLIEGNCCRSC : 58
HyCR3  : --KGNTMCAT--PMCALPP---CSEDKIINIPGRCCPIC : 59
XenCR1 : KPSGKVSCKNIKHDCPSPS---CANP-ILL-PLHCCKTC : 74
XenCR2 : KRT--VICDP--IVCPPLN---CSQP-VHL-PDQCCPVC : 58
XenCR3 : GSTGEVHCEK--VTCPKLS---CTNP-IRANPSDCCKQC : 67
XenCR4 : -AEGITQCR--RQECTGTT---CGTG-SKR-D-RCCTKC : 61
    
```

Abb.17: Vergleich der CR-Domänen von HyChd und *Xenopus* Chordin
 Die für die Klassifizierung dieser Domänen entscheidenden Cysteine (C) sind schwarz hinterlegt, ihre Anordnung in HyChd entspricht der in den Chordin Molekülen aus *Xenopus* und *Drosophila*. Weitere konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt

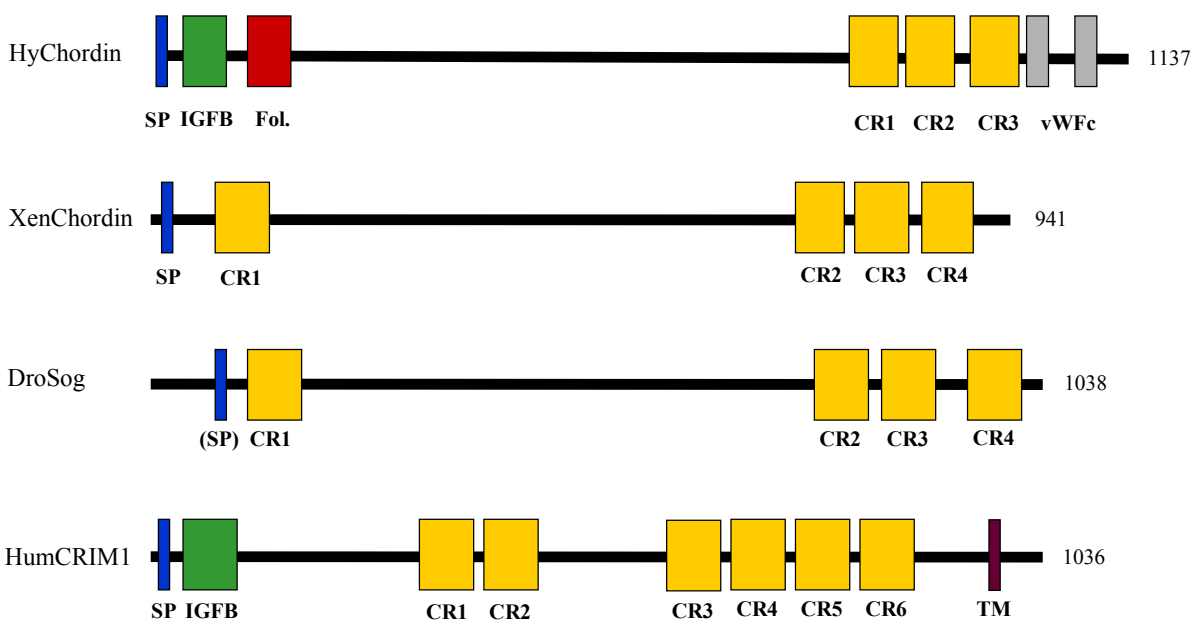


Abb.18: Vergleich der Molekülstruktur verschiedener Chordin-verwandter Moleküle
 Die Länge des Gesamtproteins und die Anordnung der 3 C-terminalen CR-Domänen von HyChd ist der von *Xenopus* Chordin und dem *Drosophila* Homolog Sog sehr ähnlich. Im N-terminalen Bereich befindet sich anstatt einer Chordin-Domäne eine Follistatin-Domäne. Eine IGF-Bindungsdomäne ist im humanen CRIM1 Protein zu finden, die Anordnung der CR-Domänen und das Vorhandensein einer Transmembrandomäne unterscheiden CRIM1 jedoch deutlich von HyChd. SP=Signalpeptid; IGFB=Insulin-like growth factor binding; Fol=Follistatindomäne; CR=cysteinreiche Domäne vom Chordin-Typ; TM=Transmembrandomäne. Rechts ist die Länge der Moleküle in Aminosäuren angegeben.

3.2.2 Expression von HyChd

Adulte Polypen und Knospung

Mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen den C-terminalen Bereich wurde das Transkriptionsmuster von HyChd untersucht. Erste Versuche an ganzen Polypen wurden dabei von Kerstin Kuhn durchgeführt (nicht publizierte Daten). Eine genauere Untersuchung zeigte, dass HyChd ausschließlich im Endoderm der Polypen exprimiert ist (Abb.19a,c). In den Tentakeln ist eine Aufregulation erkennbar (Abb.19b). Während der Knospung wird die HyChd-Transkription ebenfalls stark aufreguliert. Die verstärkte Expression ist erstmals im Knospenstadium² sichtbar (Abb.19d) und beginnt somit etwa zur gleichen Zeit wie die von HyWnt. Im Gegensatz zu HyWnt bleibt die Expression aber nicht auf die apikale Spitze der auswachsenden Knospe beschränkt, sondern erstreckt sich über das gesamte Endoderm der Knospe, mit einer scharfen Grenze am Übergang zum Rumpf des Mutterpolypen (Abb.19e,f). Die Aufregulation bleibt bis zum Abfallen der Knospe erhalten, anschließend ist die verstärkte Transkription auf die Tentakel beschränkt. Um die Aufregulation in der Knospe deutlich zu machen, wurden die in Abbildung 19d-e gezeigten Tiere im Vergleich zu denen in Abb.19a-c deutlich kürzer gefärbt.

Regeneration

Während der Kopfregeneration wird HyChd an der regenerierenden Spitze deutlich aufreguliert (Abb.20a,b). Diese Aufregulation ist noch erhalten, wenn sich bereits ein neuer Kopf gebildet hat, verschwindet jedoch kurz darauf (vergleiche Abb.20c und 20d, sowie Abb.20h). Die Kinetik der Aufregulation ist jedoch nicht von der Schnitthöhe abhängig (Abb.20h), zudem wird HyChd transient auch während der Fußregeneration verstärkt exprimiert (Abb.20e,f). Das bedeutet, dass die Aufregulation von HyChd nicht spezifisch für einen bestimmten Regenerationsprozess ist. Die Dauer der Aufregulation (über 48Std. in der Kopf-, etwa 24Std. in der Fußregeneration, Abb.20h), macht es jedoch auch unwahrscheinlich, daß es sich um einen verletzungsbedingten Effekt handelt. Diese Einschätzung wird durch Untersuchungen an der kopfregenerationsdefizienten Mutante reg-16 unterstützt. Auch hier ist während der Kopfregeneration eine deutliche Aufregulation bereits zum frühesten untersuchten Zeitpunkt, nach sechs Stunden, sichtbar (Abb.21a). Diese

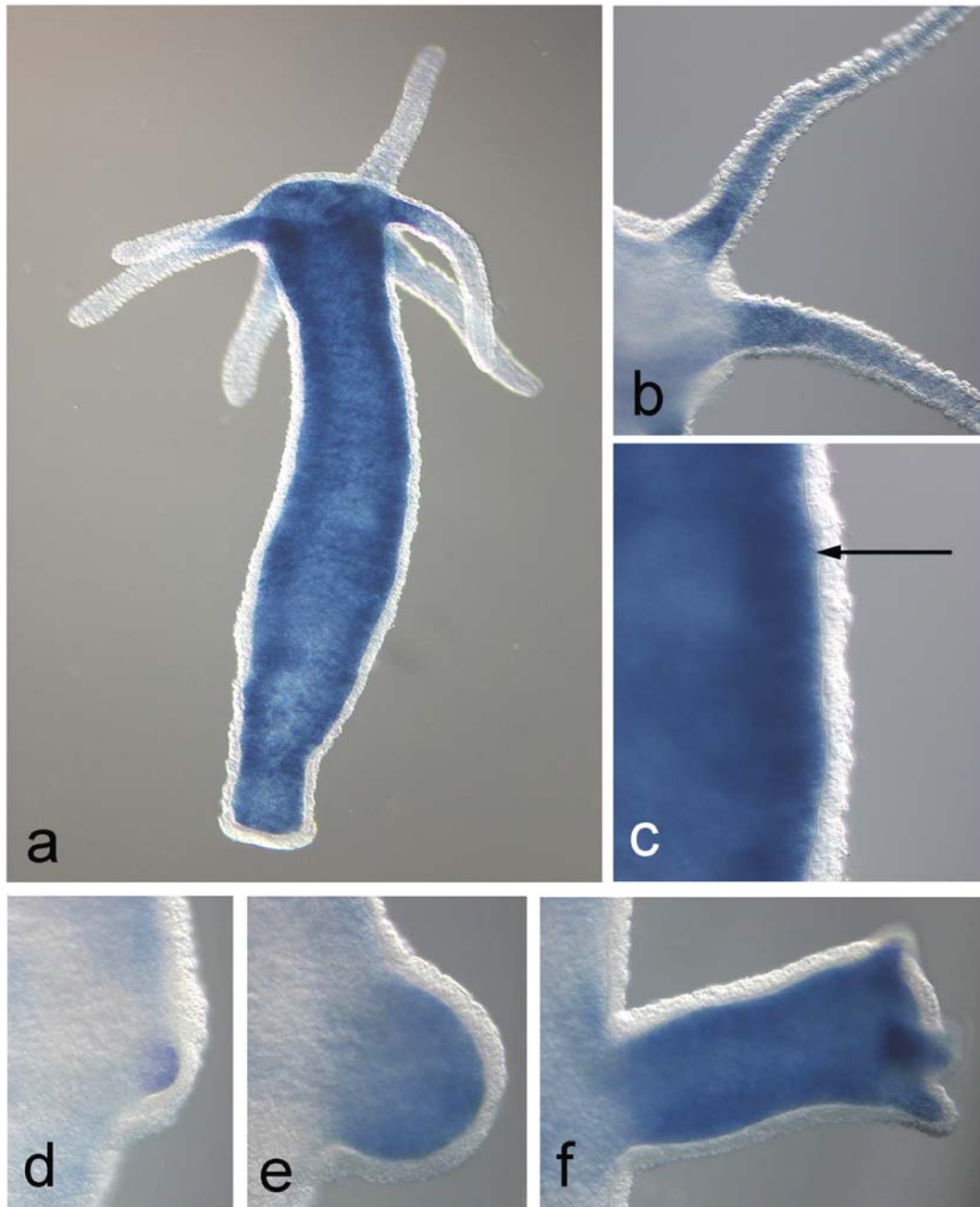


Abb.19: Expression von HyChd in adulten Polypen und während der Knospung

(a) Im adulten Polypen ist das gesamte Endoderm gefärbt. (c) Vergrößerte Ansicht des Rumpfes, der Pfeil markiert die Mesogloea, rechts davon das ungefärbte Ektoderm. (b) Aufsicht auf das Hypostom, im Endoderm der Tentakel ist eine verstärkte Expression zu erkennen. (d) In der Knospung ist eine lokale Aufregulation erstmals im Stadium 2-3 sichtbar. (e,f) Während des Auswachsens ist die gesamte Knospe durch stark erhöhte Transkription von HyChd gekennzeichnet (e) Stadium 4; (f) Stadium 7-8

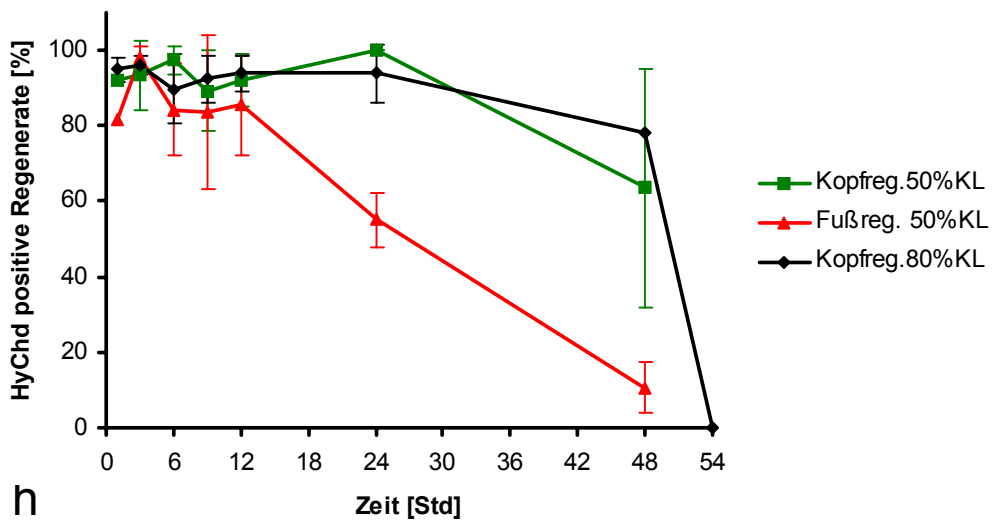
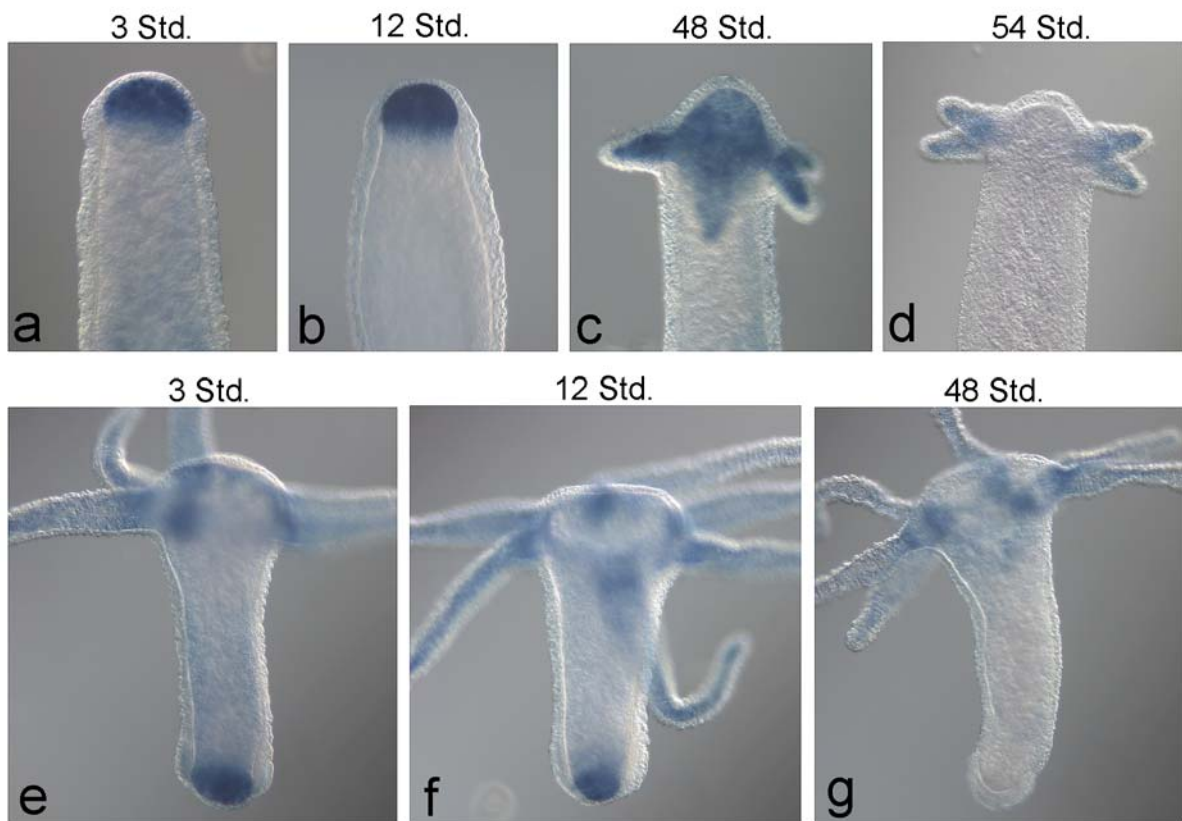


Abb.20: HyChd-Expression während der Kopf- und Fußregeneration

(a) Eine deutliche Aufregulation ist während der Kopfregeneration nach 3 Std. zu erkennen, (b,c) die im Verlauf der Regeneration erhalten bleibt, (d) erst nachdem der neue Kopf gebildet worden ist, wird die Transkription auf das Rumpfniveau gesenkt, in den Tentakeln ist die auch im adulten Tier zu sehende Aufregulation zu sehen. (e,f) In der Fußregeneration kommt es zu einer transienten Aufregulation, (g) die nach 48 Std nicht mehr zu beobachten ist. Kopfregenerate bei 80%KL, Fußregenerate bei 50%KL geschnitten. (h) Die quantitative Auswertung zeigt, dass der Zeitverlauf der verstärkten Transkription nicht von der Schnitthöhe abhängig ist. Die Aufregulation in der Fußregeneration geht früher zurück als die in der Kopfregeneration. Daten in (h) aus jeweils drei unabhängigen Experimenten mit 11-21 Regeneraten pro Zeitwert.

Aufregulation bleibt in Tieren, die keinen Kopf regenerieren, bis zu 96Std. erhalten (Abb.21b,c), also wesentlich länger als die beobachtbare Wundheilung dauert (ca. 1 Std.). Die Aufregulation verschwindet jedoch nach der Bildung eines neuen Kopfes, unabhängig vom Zeitpunkt der Kopfregeneration.

De novo-Musterbildung

In Reaggregationsversuchen ist anfangs eine gleichförmige Expression im Endoderm zu beobachten (Abb.22a). Später zeigt sich eine erhöhte Transkription in Rumpfbereichen, an deren Spitze ein Kopf gebildet wurde und in den Tentakeln (Abb.22b).

HyChd wird also während der Knospung, der Regeneration und in der *de novo*-Musterbildung an Stellen aufreguliert, von denen Musterbildungsprozesse ausgehen. Die Korrelation zwischen der Dauer der Aufregulierung und dem Entstehen eines neuen Kopfes in normalen und regenerationsdefizienten Polypen könnte auf eine Notwendigkeit der HyChd-Expression für die Initiierung von Musterbildungsprozessen zurückzuführen sein. Für die Aufrechterhaltung der etablierten Polarität der Körperachse im adulten Tier scheint hingegen keine erhöhte Transkription von HyChd notwendig zu sein.

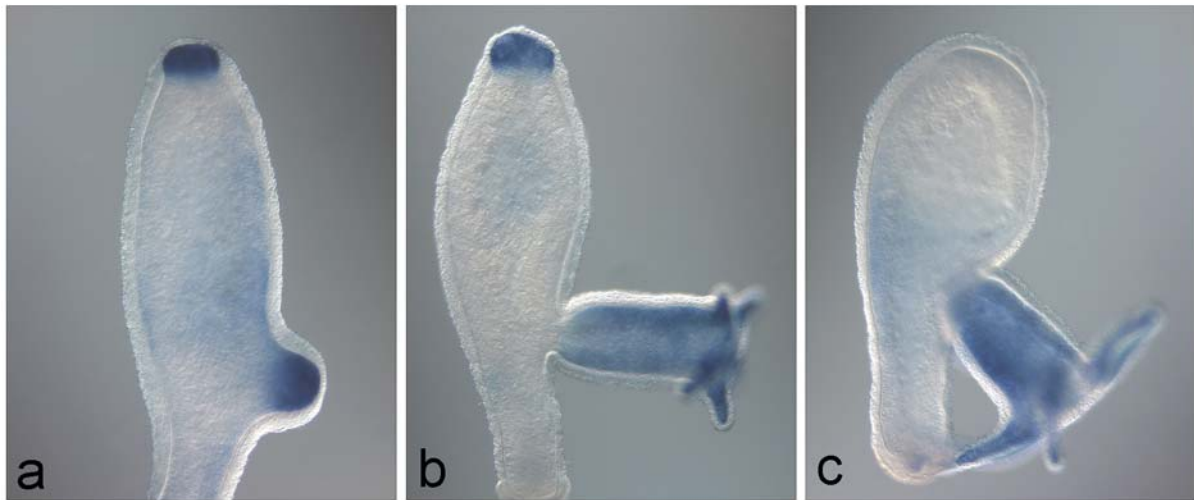


Abb.21: Expression von HyChd in der Hydrantmutante reg-16

(a) Trotz der verzögerten Kopfregeneration ist bereits 6 Std. nach Dekapitation eine HyChd-Aufregulation in der regenerierenden Spitze zu sehen (97%, n=32). (b) Die Aufregulation bleibt 72-96 Std. erhalten, (c) ist später aber nicht mehr zu beobachten. Nach Regeneration eines Kopfes wird die Transkription unabhängig vom Zeitpunkt der Regeneration herunterreguliert.

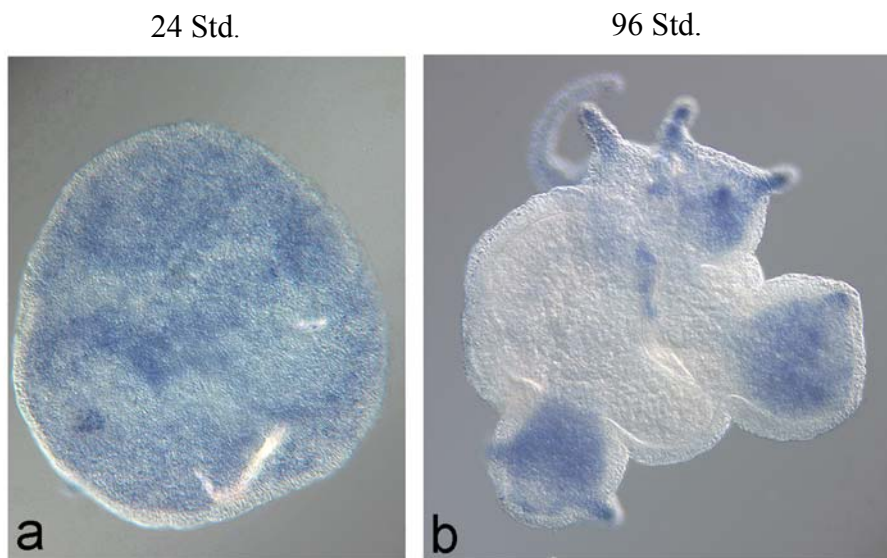


Abb.22: Expression von HyChd in Reaggregationsversuchen

(a) Nach 24 Std. ist eine gleichförmige, auf das Endoderm beschränkte Expression zu sehen. Die Abwesenheit ektodermaler Expression demonstriert, dass die beiden Epithelien zu diesem Zeitpunkt voneinander separiert sind. (b) In späteren Reagregaten ist eine verstärkte endodermale Expression in den Rumpfbereichen zu erkennen, in denen neue Köpfe entstanden sind. Zudem ist die Expression in den Tentakeln verstärkt.

3.2.3 HySmad1-Expression

Smad-Proteine sind die entscheidenden intrazellulären Komponenten aller TGF β -Signaltransduktionswege. Die rezeptoraktivierten Smads (R-Smads) können aufgrund struktureller und funktioneller Untersuchungen in zwei verschiedene Klassen unterteilt werden. Smad2 und 3 wirken in TGF β - und Activin/Nodal-Signalwegen, Smad1,5 und 8 in BMP-Signalwegen (Massagué, 1998). Aufgrund der sehr hohen Konserviertheit der Smad-Moleküle konnte Bert Hobmayer ein Smad-Ortholog aus *Hydra* isolieren. Eine genaue Sequenzanalyse zeigte, daß es sich um ein R-Smad handelt, daß vermutlich zur Smad1/5/8 Gruppe gehört (Rentzsch et al., 2001).

Adulte Polypen, Knospung und Regeneration

In situ Hybridisierungen mit HySmad1 zeigen eine gleichförmige Expression in Endo- und Ektoderm des Rumpfes (Abb.23a), die bei Verwendung einer Kontrollsonde nicht zu sehen ist (Abb.23b). Im Ektoderm des Hypostoms ist die Transkription reduziert (Abb.23a), in der Fußscheibe und im Ektoderm der Tentakel kann keine Expression detektiert werden (Abb.23a,c). Im Rumpfbereich zeigt ein Subpopulation von Nematocyten eine verstärkte Expression (Abb.23d), was auf eine mögliche Beteiligung von HySmad1 an der Differenzierung dieser Nematocyten hinweist. Während der Knospung und in Kopf- und Fußregeneration ist keine Veränderung des Transkriptionsniveaus zu beobachten. Die etwaige Aktivierung eines BMP-Signalwegs scheint also in diesen Prozessen, ähnlich wie in höheren Metazoen, auf posttranskriptioneller Ebene stattzufinden. Dort sind Smad-Proteine in allen Zellen vorhanden, werden jedoch nur in der Nähe von BMP-Signalzentren durch C-terminale Phosphorylierung aktiviert (Faure et al., 2000).

Oogenese

Im Gegensatz dazu lässt sich in weiblichen Polypen in der Oogenese eine dynamische Aufregulation von HySmad1 beobachten. Diese Aufregulation beginnt im frühen Stadium der Aggregation oocytenspezifischer interstitieller Zellen und bleibt bis ins Oogenesestadium 5

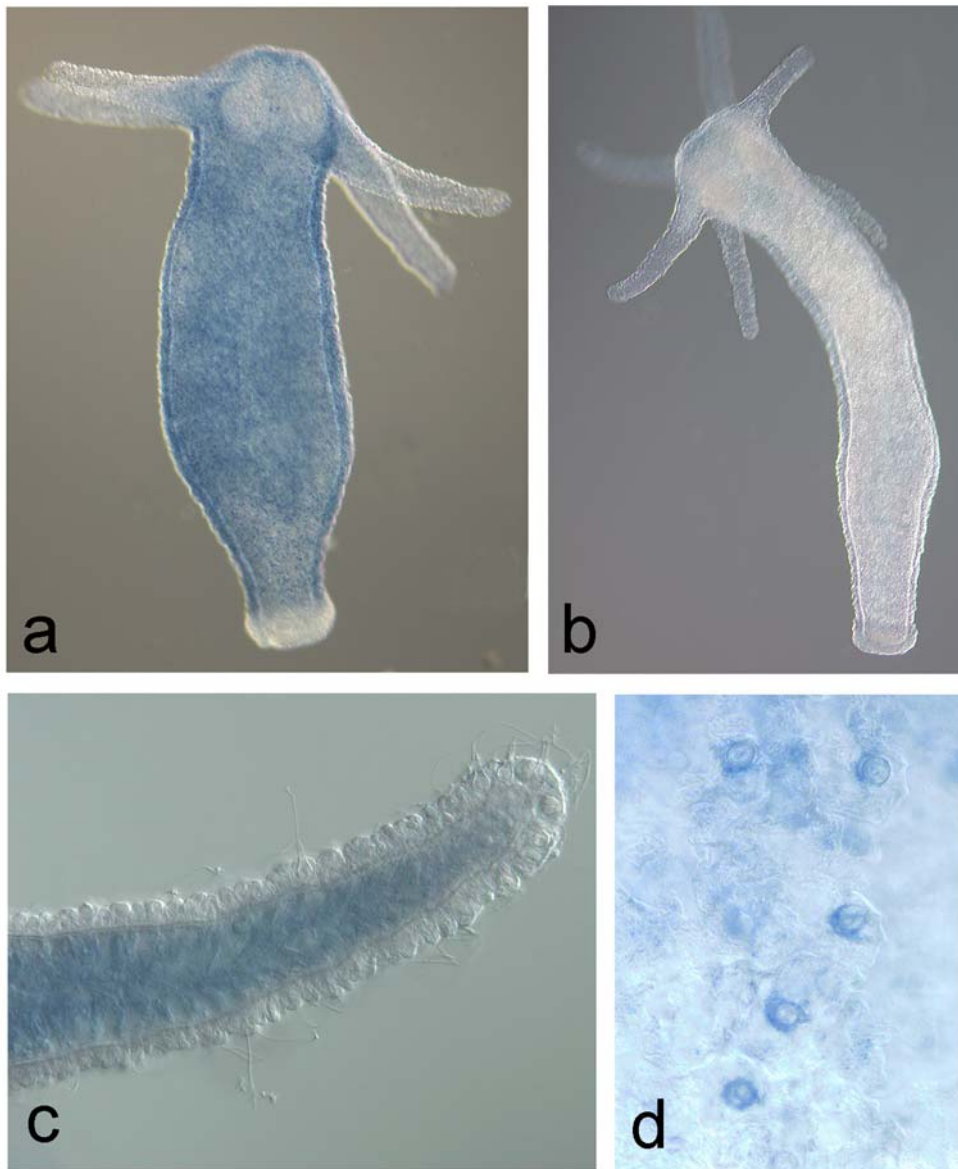


Abb.23: HySmad1-Expression in adulten Tieren

(a) HySmad1 wird im gesamten Polypen, mit Ausnahme des Fußes, exprimiert. Die Expression im Ektoderm des Hypostoms ist deutlich reduziert. **(b)** Hybridisierung mit einer Kontroll-(sense) Sonde, es ist keine Färbung sichtbar. **(c)** Nach verlängerter Farbreaktion ist auch im Endoderm der Tentakel eine schwache HySmad1-Expression detektierbar. **(d)** Eine Subpopulation von Nematocyten im Rumpfbereich zeigt eine verstärkte Transkription.

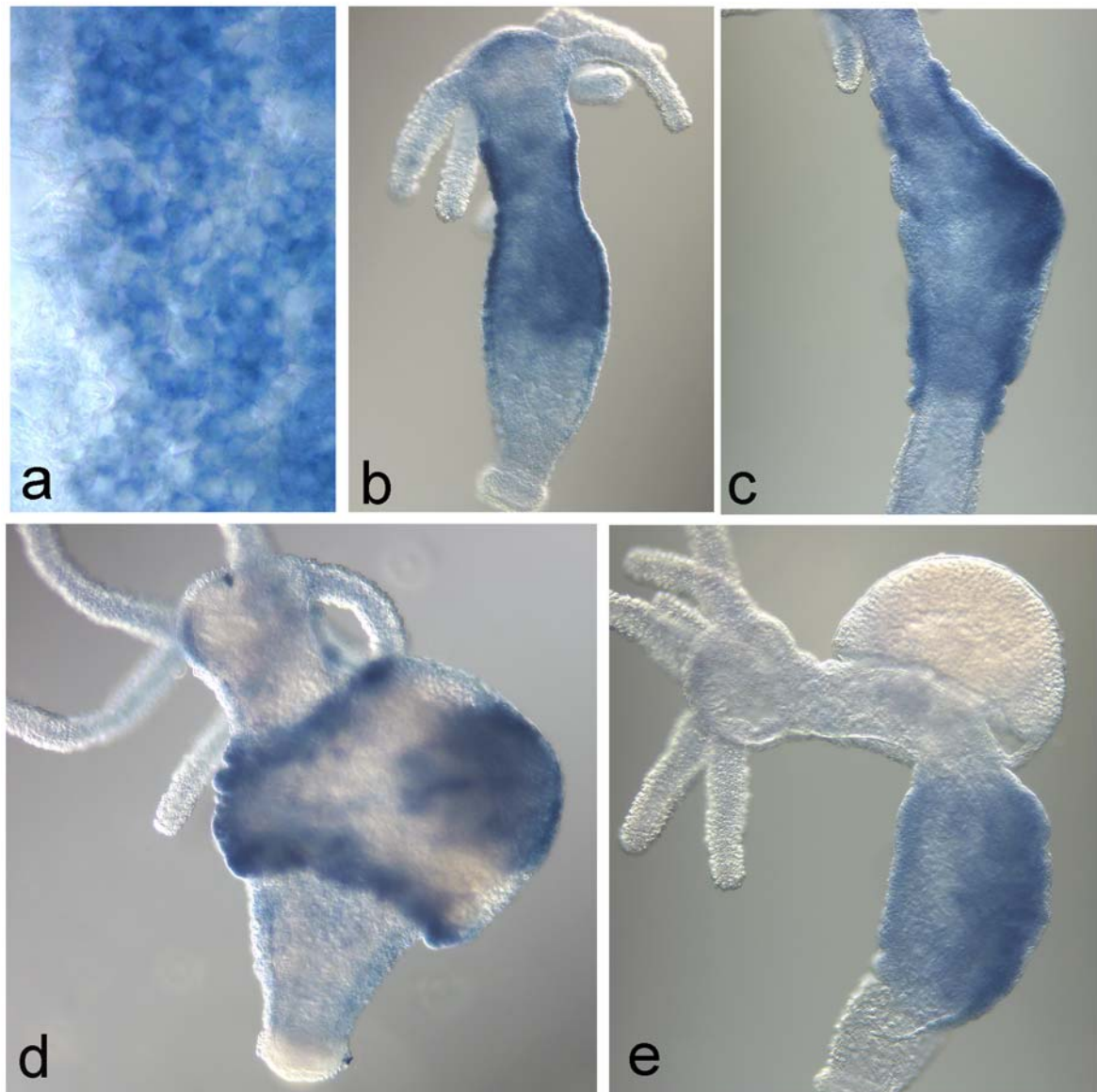


Abb.24: Expression von HySmad1 während der Oogenese

(a) Erhöhte Expression ist zu Beginn der Aggregation oocytenspezifischer interstitieller Zellen zu beobachten. (b,c) Die Aufregulation hält in Stadium 2-4 an, (d) im Stadium 5 beginnt die Reduktion der Transkription. (e) In einem weiblichen Polyp mit zwei Oocyten (oben Stadium 6, unten Stadium 3) ist der Unterschied zwischen frühen und späten Oogenesestadien besonders offensichtlich.

erhalten, bevor die Expression wieder auf das auch im Rumpfgewebe vorhandene Niveau zurückgeht (Abb.24a-e). Die transkriptionelle Aktivierung von HySmad lässt vermuten, dass BMP-Signale, ähnlich wie in *Drosophila* und Säugern, eine Funktion in der Keimzellentwicklung haben. In *Drosophila* wird das BMP4-Homolog Dpp für die Proliferation und Erhaltung von Keimzellen benötigt (Xie und Spradling, 1998); Mäuse ohne BMP4-Gen entwickeln keine Keimzellen (Lawson et al., 1999). Möglicherweise ist also eine Funktion von BMP-Signalwegen in der Oogenese bereits in evolutiv sehr alten Tieren entstanden.

3.3 Organisatorspezifische Expression eines Thrombospondinrepeat Moleküls

In dem bereits erwähnten Two-Hybrid-Screen zur Identifizierung von Hy β -Catenin Interaktionspartnern wurde von Kerstin Kuhn ein cDNA-Fragment isoliert, das zehn aufeinanderfolgende cysteinreiche Domänen vom Thrombospondin Repeat Typ1 (TSR1) enthält (nicht publizierte Daten). Dies schien im Zusammenhang mit BMP-Signalwegen in *Hydra* interessant, weil Thrombospondin-1 in Säugern TGF β -Moleküle durch Verdrängen eines inhibitorisch Peptids aktivieren kann (Crawford et al., 1998, Lawler, 2000). Obwohl die TSR1-Domänen für die Aktivierung von TGF β entscheidend sind, konnten die für die TGF β Bindung und Aktivierung entscheidenden Aminosäuremotive in dem *Hydra*-Protein nicht gefunden werden. Zudem enthält das TGF β -aktivierende Thrombospondin-1 weitere Domänen, die in dem *Hydra*-Fragment nicht vorkommen. TSR1-Domänen kommen auch in zahlreichen anderen Proteinen der extrazellulären Matrix vor, ihnen gemeinsam ist die Fähigkeit, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zu beeinflussen und dadurch Zellmigration und axonale Wegfindung in der Entwicklung des zentralen Nervensystems zu regulieren (Adams und Tucker, 2000). Eine endgültige strukturelle Einordnung des cDNA-Fragments wird erst möglich sein, wenn die noch fehlenden N- und C-terminalen Bereiche des Moleküls kloniert sind. Das Molekül wird daher im folgenden als Thrombospondin Repeat Protein bezeichnet (HyTSRP).

Adulte Polypen und Knospung

Bei Verwendung eines nicht diffusiblen Substrats für die *in situ*-Detektion der Transkripte zeigte sich, daß HyTSRP nur in einer Subpopulation endodermaler Hypostomzellen exprimiert wird (Abb.25a). Bei Aufsicht auf das Hypostom sind die einzelnen markierten Zellen deutlich erkennbar (Abb.25b). Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich von denen verschiedener Moleküle, die in den endodermalen Epithelzellen des Hypostoms exprimiert werden, wie HyBra1, Cnno2 oder Hyp1 (Technau und Bode, 1999; Mochizuki et al., 2000; Hermans-Borgmayer et al., 1996). Der Blick von unten in ein abgetrenntes Hypostom (Abb.25c) zeigt, dass die Expression auf ins Lumen des Gastralraums hereinragende, lamellenartige Ausfaltungen des Endoderms beschränkt ist. In diesem Bereich befinden sich mucussekretierende Drüsenzellen. Dass die Expression von HyTSRP nicht in Epithelzellen lokalisiert ist, konnte zudem durch Untersuchungen an einer temperatursensitiven Hydramutante gezeigt werden. Diese Mutante, *Hydra magnipapillata* sf-1, verliert bei

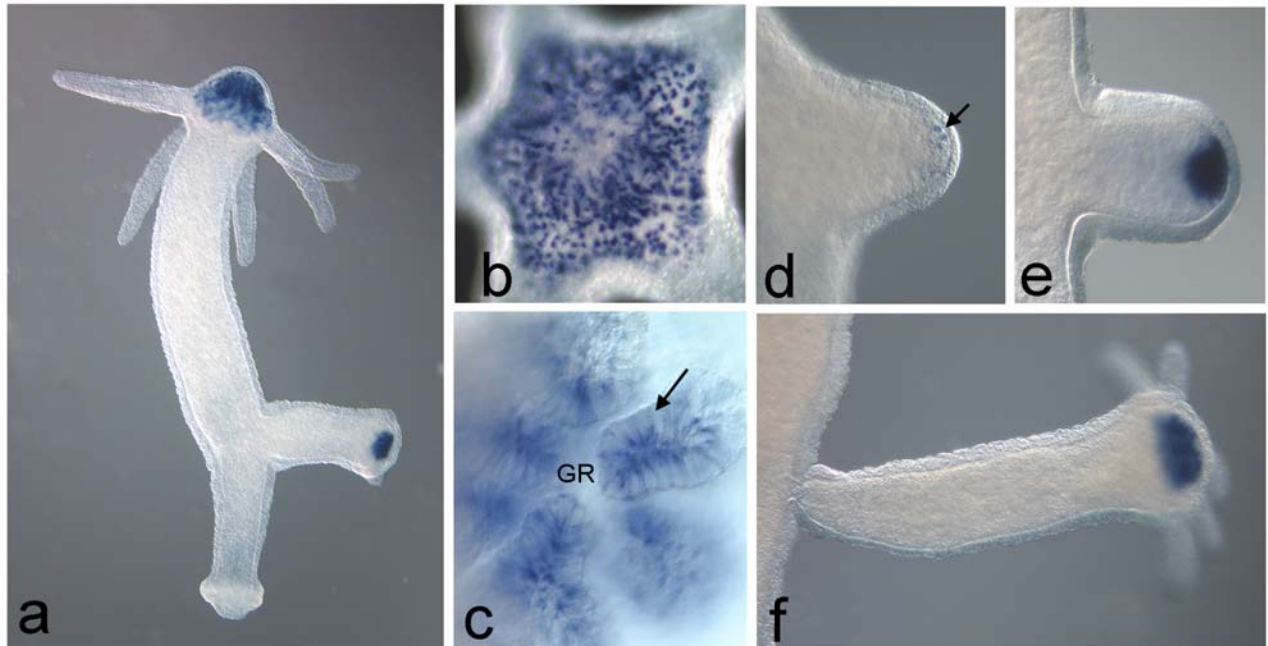
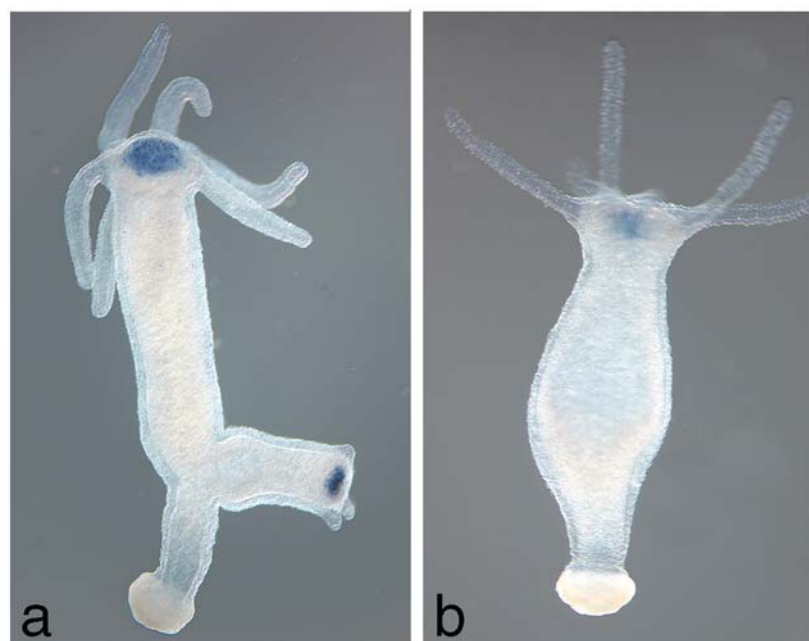


Abb. 25: Expression von HyTSRP in adulten Polypen und während der Knospung

(a) HyTSRP-Transkripte können ausschließlich im Endoderm des Hypostoms detektiert werden. **(b)** Bei Aufsicht auf das Hypostom ist zu erkennen, dass die HyTSRP-exprimierenden Zellen eine Subpopulation im Hypostom darstellen. **(c)** Ein abgetrenntes Hypostom von unten, also vom Gastralraum aus betrachtet, HyTSRP wird in lamellenförmig in den Gastralraum (GR) ragenden Ausstülpungen des Endoderms exprimiert (Pfeil), an dieser Position befinden sich mucusekretierende Drüsenzellen. **(d)** Im Stadium 4 der Knospenbildung sind einzelne Zellen (Pfeil) im apikalen Bereich der Knospe angefärbt, **(e)** ab Stadium 5 ist der gesamte zukünftige endodermale Hypostombereich gefärbt, **(f)** im letzten Knospenstadium (9) entspricht das Muster dem adulten Polypen. **(b)** 200x Vergrößerung; **(c)** 400x Vergrößerung

Abb.26: HyTSRP-Expression in sf-1 Polypen

(a) Unbehandeltes Kontrolltier
(b) Polyp nach 48 Std. Inkubation bei 26°C, durch diese Behandlung verlieren Tiere dieses Stamms ihre interstitiellen Stammzellen, anschließend gehen die Differenzierungsprodukte der I-Zellen durch normalen Turnover verloren.



Temperaturen über 23°C ihre interstitiellen Stammzellen. Dadurch gehen nach und nach auch sämtliche aus diesen Stammzellen hervorgehenden Differenzierungsprodukte, also Nervenzellen, Nematocyten und Drüsenzellen, verloren (Sugiyama und Fujisawa, 1978). Tiere dieses Stamms wurden für 48 Std. bei 26°C gehalten und anschließend für 4Tage bei der Standardkulturtemperatur von 18°C. Die Elimination der interstitiellen Zellen wurde in Mazeraten kontrolliert. Die Hitzebehandlung der sf-1 Tiere führte zu einer deutlichen Reduktion der HyTSRP Expression im Vergleich zu nicht hitzebehandelten sf-1 Tieren (vergleiche Abb.26a,b). Dies belegt, daß HyTSRP in aus interstitiellen Zellen hervorgehenden Zelltypen exprimiert ist. Die Lokalisation der Zellen im hypostomalen Endoderm zeigt, dass es sich dabei vermutlich um spezielle Drüsenzellen, die sogenannten Mucuszellen, handelt.

Während der Knospenbildung ist die Expression von HyTSRP im Stadium4 zunächst in nur wenigen, verstreuten Zellen im Endoderm des apikalen Knospenbereichs zu erkennen (Abb.25d). Der auf einzelne Zellen beschränkte Expressionsbeginn in diesem Stadium, in dem die grundlegenden Musterbildungsprozesse bereits stattgefunden haben, lässt vermuten, dass die Transkription eher mit einem Differenzierungsvorgang in Verbindung steht. In späteren Knospenstadien bleibt die größer werdende Expressionsdomäne auf das zukünftige Hypostom begrenzt (Abb.25e,f).

Regeneration

Überraschenderweise wird HyTSRP in Regenerationsversuchen nicht nur in Drüsenzellen nach der Differenzierung von kopfspezifischen Zellen exprimiert. Drei bis sechs Stunden nach Regenerationsbeginn ist sowohl in Kopf- als auch in Fußregeneraten eine deutliche Aufregulation im Endoderm zu beobachten (Abb.27a,d). Die quantitative Auswertung der Regenerationsexperimente zeigt, dass die Aufregulation im Kopf während des Regenerationsverlaufs erhalten bleibt, die in regenerierenden Füßen jedoch schnell wieder verschwindet (Abb.27f). Exemplarische Regenerate sind in Abb.27a-e gezeigt. Eine mögliche Erklärung für die frühe Aufregulation von HyTSRP in Regeneraten könnte durch eine Beteiligung an der Wundheilung nach der Schnittverletzung gegeben werden. In Analogie zu der Rolle von TSR-Proteinen in Vertebraten (Adams und Tucker, 2000) ist es denkbar, dass die Sekretion von HyTSRP aus dem Endoderm notwendig ist, damit die ektodermalen Zellen sich über das zuerst geschlossene Endoderm strecken können.

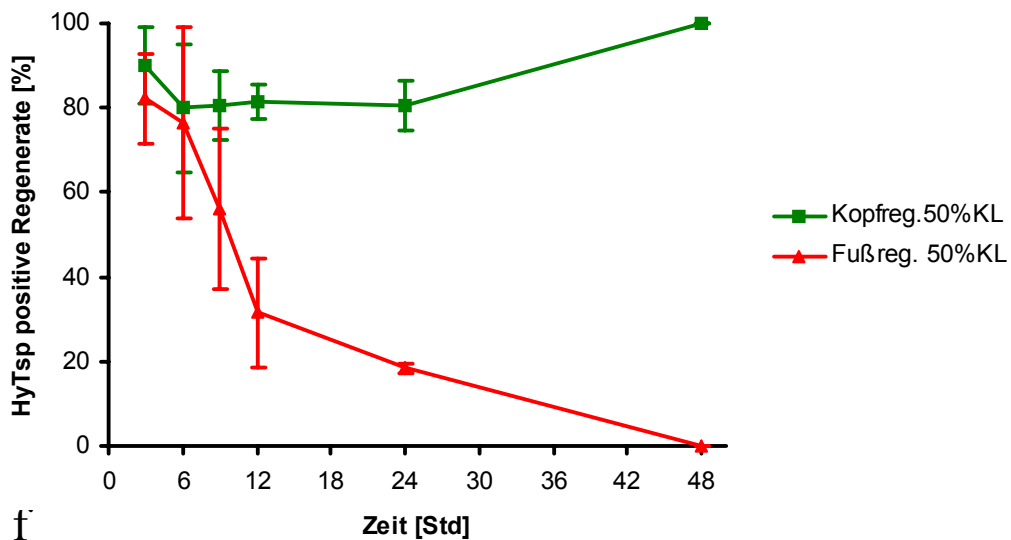
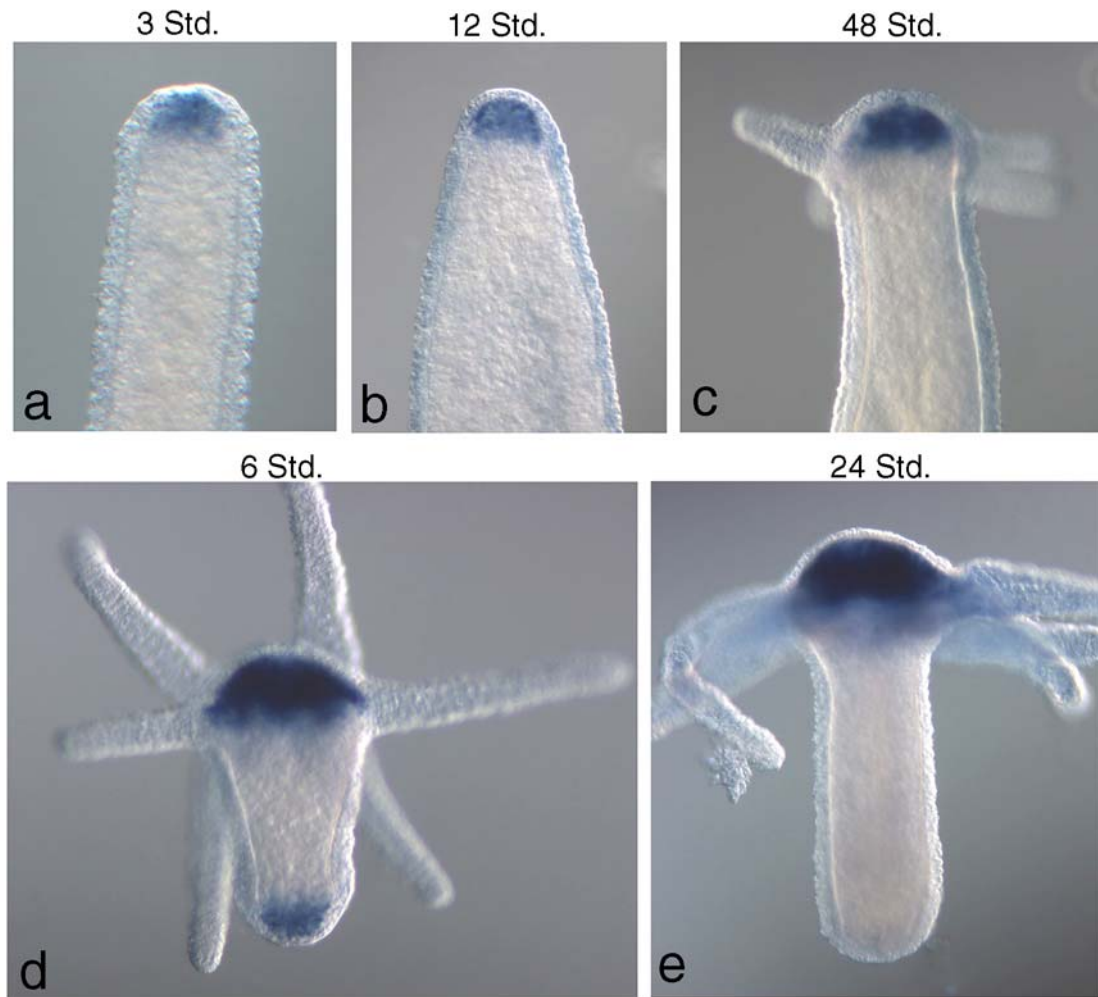


Abb.27: HyTSRP-Expression während der Regeneration

(a) Nach drei Stunden ist in fast allen Kopfregeraten eine starke Aufregulation im Endoderm festzustellen. (b,c) Diese bleibt während des gesamten Regenerationsprozesses erhalten. (d) Fußregenerate zeigen eine transiente endodermale Aufregulation von HyTSRP, (e) die nach 24 Std. in fast allen Regeneraten wieder verschwunden ist. (f) Die quantitative Analyse der Regenerationsexperimente macht deutlich, dass die apikale Expression in Kopfregeraten erhalten bleibt, die basale Aufregulation in Fussregeneraten hingegen nach 12-24 Std. verschwindet. Daten für (f) aus drei unabhängigen Experimenten mit 10-21 Regeneraten pro Zeitwert.

De novo-Musterbildung

In Reaggregationsversuchen ist nach 48 Std. erstmals eine lokale Aufregulation zu sehen (Abb.28b), die Expressionsdomäne von HyTSRP bleibt während der weiteren Entwicklung der Aggregate auf Zellen im Endoderm entstehender Köpfe beschränkt (Abb.28c,d).

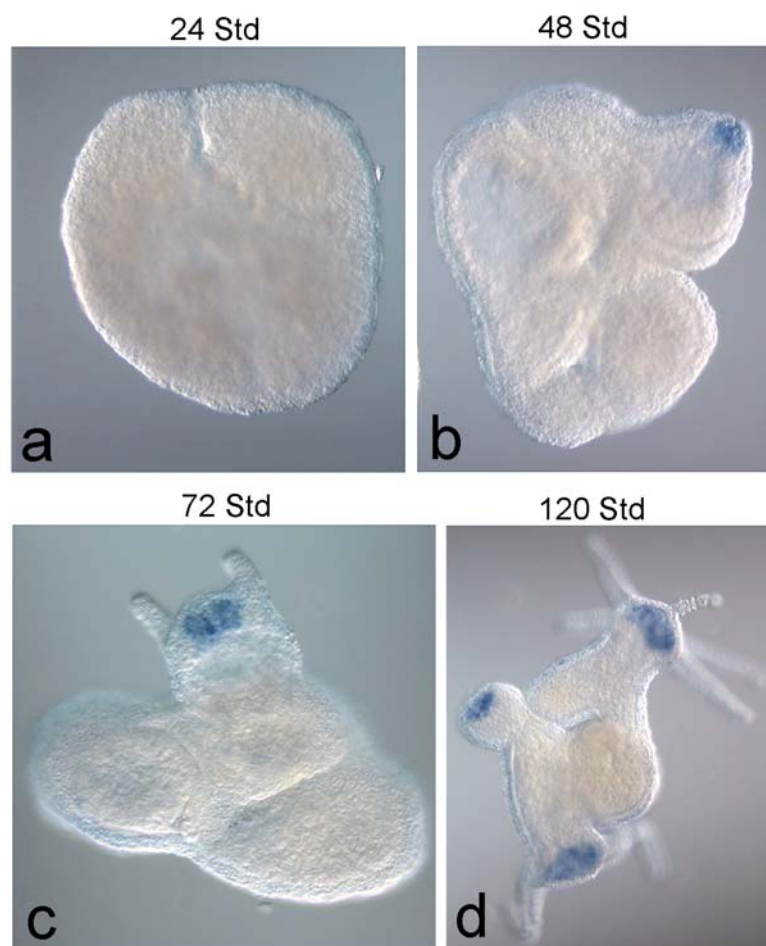


Abb.28: HyTSRP-Expression in Reaggregaten
(a-d) Nach 48 Std. ist erstmals eine lokale Aufregulation zu sehen, die im späteren Verlauf auf das Endoderm neu entstandener Köpfe beschränkt

Die detaillierte Analyse des Expressionsmusters zeigt also, dass HyTSRP im adulten Tier, während der Knospenbildung und der Reaggregation einen Differenzierungsmarker für einen speziellen Typ von Drüsenzellen, die hypostomalen Mucuszellen, darstellt. Die frühe Aufregulation während der Regeneration deutet an, daß HyTSRP zudem auch an weiteren Prozessen beteiligt ist. Obwohl das Expressionsmuster keinen direkten Hinweis auf eine Beteiligung von HyTSRP an BMP-vermittelten Musterbildungsprozessen gibt, ist eine Funktion in möglichen TGF β -regulierten Differenzierungsprozessen durchaus möglich.

4 Diskussion

Für das Verständnis der Evolution von Körperbauplänen ist es von Bedeutung, die molekularen Mechanismen, die zur Etablierung der Körperachsen führen, in Tieren mit verschiedenen Bauplänen zu untersuchen. Die Konserviertheit der achsenbildenden molekularen Systeme in höheren bilateralsymmetrischen Tieren deutet darauf hin, dass die grundlegenden Merkmale der Baupläne von einem limitierten Satz konservierter Molekülkaskaden reguliert werden, die bereits sehr früh in der Evolution entstanden sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden zwei solche konservierte Signalwege, der Wnt- und der BMP4-Signaltransduktionsweg, in dem evolutiv sehr alten, radiärsymmetrischen Süßwasserpolypen *Hydra* analysiert.

4.1 HyWnt-Expression markiert Kopforganisationszentren

Wnt-Moleküle sind sekretierte Glycoproteine, die keine extrazelluläre Prozessierung benötigen, um biologisch aktiv zu werden (Cadigan und Nusse, 1997). Das erleichtert die Interpretation der Transkriptionsanalysen, da man davon ausgehen kann, dass das Transkriptionsmuster widerspiegelt, von welchen Zellen HyWnt als biologisch aktives Molekül sekretiert wird. Die hier beschriebenen Expressionsanalysen zeigen, dass die Expression von HyWnt in allen untersuchten Situationen mit dem Entstehen oder der Aufrechterhaltung von Kopforganisationszentren korreliert. Im adulten Polypen und während der Knospung ist die Expression auf die apikale Spitze begrenzt, Bereiche, deren Organisatorfunktion in lateralen Transplantationsversuchen demonstriert werden konnte (Browne, 1909; MacWilliams, 1983). Während der Knospung geht der punktförmigen Aktivierung von HyWnt eine die gesamte Knospungszone umfassende Aufregulation der beiden Wnt-Effektoren Hy β -Catenin und HyTcf voraus (Hobmayer et al., 2000). Diese ringförmige Aufregulation definiert offensichtlich einen Bereich, der für die Verarbeitung des Wnt-Signals kompetent ist. Die punktförmige HyWnt-Expressionsdomäne markiert dann innerhalb dieses kompetenten Feldes den Punkt, an dem die Evagination der Knospe tatsächlich beginnt und ein Kopforganisator entsteht. Ob die Einengung der Hy β -Catenin- und HyTcf-Domäne dem Beginn der HyWnt-Expression vorangeht oder ihr nachfolgt, ist nicht eindeutig geklärt. Die prinzipielle Möglichkeit eines positiven Rückkopplungsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Tcf-Expression durch das Wnt-Signal nur an der apikalen Spitze der auswachsenden Knospe wird durch Versuche an Hühnerembryonen bekräftigt. In deren

Extremitätenknospen wurde eine transkriptionelle Aktivierung des Tcf-verwandten Transkriptionsfaktors LEF1 durch Wnt3a beobachtet (Kengaku et al., 1998).

Auch während der Kopfregeneration, in der ein neuer Kopforganisator gebildet werden muss, korreliert die Aufregulation von HyWnt mit dem Erwerb der Organisatoreigenschaften der regenerierenden Spitze, wie er in Transplantationsexperimenten dargestellt worden ist. Bei diesen Experimenten erreichten die regenerierenden Spitzen (geschnitten bei 75%KL) nach 7 Stunden ihr maximales Kopfaktivationspotenzial, gemessen als Fähigkeit, nach lateraler Transplantation das Auswachsen einer neuen Achse zu induzieren (MacWilliams, 1983). Diese Kinetik stimmt gut mit der Aufregulation von HyWnt überein. Nach Schnitten bei 80%KL zeigen nach 6Std. 100% der Regenerate HyWnt-Expression an der Spitze. Das etwas frühere Erreichen des 100%-Werts im Vergleich zum Erwerb des maximalen Kopfaktivationspotenzials lässt sich auf den etwas weiter apikal liegenden Schnittpunkt in den Expressionsversuchen erklären. Auch ein weiteres Charakteristikum der Musterbildung in *Hydra*, das gradientenförmige Kopfregenerationspotenzial entlang der Körperachse, wird in der Aufregulation von HyWnt widerspiegelt. Nach Schneiden bei 50% der Körperlänge erfolgt die Aufregulation, ebenso wie die Kopfregeneration, später als nach Schnitten bei 80% Körperlänge, also dicht unter dem Kopf. Ein weiterer Beleg dafür, dass HyWnt mit der Entstehung von Kopforganisationszentren in Zusammenhang steht, ist die strikte Korrelation der verspäteten Kopfregeneration mit der vorhergehenden HyWnt-Expression in der regenerationsdefizienten Mutante reg-16. Die Kopfspezifität von HyWnt wird besonders dadurch deutlich, dass es während der Fußregeneration nur in einzelnen Fällen vorübergehend aufreguliert wird. Im Gegensatz dazu werden andere Kopfmarker wie HyBral (Technau und Bode, 1999) oder HyTcf (K.Kuhn und C. Laue, pers. Mitteilung) auch während der Fußregeneration transient aufreguliert. Hy β -Catenin und HyTcf werden in Regenerationsexperimenten deutlich früher aufreguliert als HyWnt. Die Expression von Hy β -Catenin erreicht bereits eine halbe Stunde nach dem Schneiden ihr Maximum und bleibt dann für 48Std. erhöht (Hobmayer et al., 2000). Das Kopfaktivationspotenzial hingegen beginnt erst 2Std. nach Regenerationsbeginn anzusteigen und erreicht nach 6-7 Std. sein Maximum (MacWilliams, 1983). Wie bei der Knospenbildung verleiht die Aktivierung von Hy β -Catenin und HyTcf den regenerierenden Spitzen also die Kompetenz, das Wnt-Signal adäquat umzusetzen, stellt selbst aber kein instruktives Signal zur Kopfbildung dar. Erst die lokale Expression von HyWnt liefert dann dieses kopfspezifische instruktive Signal, das möglicherweise auch über einen bereits im Zusammenhang mit der Knospung erwähnten

Rückkopplungsmechanismus die Aufrechterhaltung der HyTcf Expression im Kopfbereich gewährleistet. Im Fußregenerat würde demgemäß die fehlende HyWnt-Expression das beobachtete Herunterregulieren von HyTcf zur Folge haben.

4.2 Die Rolle des Endoderms in der Kopfregeneration

Während der Regeneration ist HyWnt-Expression zunächst nur im Endoderm zu sehen, in der Knospung beginnt sie hingegen in Ekto- und Endoderm. Ein grundlegender Unterschied zwischen diesen beiden Situationen ist die Gewebeverletzung bei der Regeneration. Das Endoderm schließt sich nach dem Schneiden zuerst, bevor sich das Ektoderm als langgestreckte Zellen über das Endoderm spannt. Dieser initiale Vorsprung des Endoderms könnte die frühere endodermale Expression begünstigen. Zudem konnte in Versuchen mit Ekto-/Endoderm Chimären gezeigt werden, dass das Endoderm entscheidenden Einfluss auf die Kopfbildung hat. Trennt man das Ekto- und Endoderm zweier Hydrastämme mit unterschiedlicher durchschnittlicher Tentakelanzahl voneinander und kombiniert anschließend das Ektoderm des einen Stammes mit dem Endoderm des anderen Stammes, so bestimmt die Herkunft des Endoderms die Anzahl der Tentakel der chimären Tiere (Wanek et al., 1986). Möglicherweise reflektiert der frühere Expressionsbeginn von HyWnt im Endoderm der Regenerate diese Führungsrolle des Endoderms. Unterstützt wird diese Vermutung durch die frühe endodermale Expression anderer kopfspezifischer Gene, wie HyBra1, dem HNF3-Ortholog *budhead* oder dem Homeoboxgen *paired-like A* in der Regeneration (Technau und Bode, 1999; Martinez et al., 1997; Gauchat et al., 1998).

4.3 HyWnt, ein potenzieller Aktivator in Reaktions-Diffusions-Modellen

In Knospung und Regeneration entstehen neue Kopforganisatoren aus Gewebe mit einer vorgegebenen Polarität. In Reaggregationsversuchen kann man dagegen die Bildung von Kopforganisatoren aus einem in Bezug auf Positionsinformation nahezu homogenen Grundzustand untersuchen. Auch in diesem Experiment markieren HyWnt-Expressionsdomänen die entstehenden Köpfe lange bevor diese morphologisch sichtbar werden. Die initiale Größe der Expressionsdomänen korreliert gut mit der minimalen Anzahl von Zellen, die notwendig sind, um als Organisator fungieren zu können. Diese Anzahl wurde bestimmt, in dem verschieden große Klumpen markierter Zellen aus regenerierenden Spitzen

hergestellt und in Aggregate eingesetzt wurden. Diese Klumpen bestehen somit aus Zellen mit erhöhtem Kopfaktivationspotenzial. Es konnte gezeigt werden, dass die zur Kopfbildung nötige minimale Größe solcher Klumpen 5-15 Zellen betrug (Technau et al., 2000). Erst wenn also eine genügend große Anzahl von Zellen mit erhöhter HyWnt-Expression in einem Aggregat dicht beieinander liegen, sind sie in der Lage, als Kopforganisator zu fungieren.

Musterbildung aus einem homogenen Feld, wie bei der Reaggregation dissoziierten Hydragewebes, kann mit Reaktions-Diffusions Modellen erklärt werden (Gierer und Meinhardt, 1972; MacWilliams, 1983). Diese Modelle postulieren für die Entstehung eines Kopforganisationszentrum einen kurzreichweitigen, autokatalytischen Aktivator, der zudem die Produktion eines langreichweitigen Inhibitors stimuliert. Der Kopf ist also zugleich Ort des höchsten Niveaus von Aktivator und Inhibitor. Durch diese Konstellation entsteht ein sich selbst erhaltendes lokales Aktivitätszentrum mit einem umgebenden Bereich langsam abnehmender Inhibition. Eine vorhandener Kopf unterdrückt daher die Bildung eines neuen Kopfes in seiner Umgebung, so wie es im adulten Polypen zu beobachten ist. Durch Abschneiden des Kopfes, wie in Regenerationsexperimenten, wird die Quelle von Aktivator und Inhibitor entfernt; da das Kopfaktivationspotenzial einen abnehmenden Gradienten vom Kopf ausgehend bildet, entsteht an der regenerierenden Spitze ein neues Kopfaktivationszentrum.

HyWnt ist ein guter Kandidat für ein als Aktivator wirkendes Molekül: (1) Die Expression ist in allen Situationen, in denen Kopforganisatoren gebildet werden, auf den Bereich dieses Organisations begrenzt. (2) Wnts sind sekretierte Proteine, die als Morphogene das Verhalten umliegender Zellen verändern können (Zecca et al., 1996; Neumann und Cohen, 1997). (3) In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass das Wnt-Homolog Wingless (Wg) seine eigene Expression aktiviert (Yoffe et al., 1995, Hooper, 1994) und dass der *wg*-Promotor Konsensus Bindungsstellen für Tcf enthält (Lessing und Nusse, 1998), somit also eine direkte Autokatalyse möglich ist. Allerdings ist es für das Konzept des Aktivators nicht unbedingt notwendig, dass die Autokatalyse direkt durch Tcf erfolgt, eine Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors, der dann die *wnt*-Expression verstärkt, ist auch vorstellbar. Ein Transkriptionsfaktor, der in einer solchen indirekten Autokatalyse eine Rolle spielen könnte, ist das Brachyury Ortholog HyBra1. Die Expression von HyBra1 ist ebenfalls auf Kopforganisationszentren beschränkt (Technau und Bode, 1999), zudem wird Brachyury in

der Maus durch Wnt-Signale aktiviert (Liu et al., 1999; Yamaguchi et al., 1999; Arnold et al., 2000) und kann seinerseits die Expression von wnt-Genen aktivieren (Tada und Smith, 2000; Makita et al., 1998).

4.4 Die Entstehung des Kopforganisators während der Embryogenese

Während der Embryogenese beginnt die Expression von HyWnt im späten Kutikulastadium. Die Polarität eines schlüpfenden Primärpolypen ist hingegen schon im unbefruchteten Ei festgelegt. Durch Markierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass der vom Muttertier aus betrachtet distale Pol dem späteren apikalen Ende, also dem Kopf, entspricht (Freeman, 1981; Martin et al., 1997). Diese Polarität wird durch eine Asymmetrie der nach der Gastrulation sekretierten Kutikula widergespiegelt. Die Sekretion der Kutikula beginnt im proximalen Bereich, nach Beendigung der Sekretion ist sie im proximalen Bereich dicker als im distalen Bereich. Kurz vor dem Schlüpfen entstehen Risse in der Kutikula, es kommt zu einem Einströmen von Flüssigkeit in das Innere des Embryos. Dieses Einströmen beginnt vermutlich an der dünnsten Stelle der Kutikula, dem distalen Pol. Schließlich bricht die Kutikula am distalen Pol auf und der Embryo schlüpft mit dem Kopf voran heraus (Martin et al., 1997). Ob zwischen der Asymmetrie der Kutikula und der Bildung des Kopfes ein kausaler Zusammenhang besteht, ist nicht geklärt. Auch wann genau der Kopforganisor des Embryos entsteht, ist unklar. HyWnt-Transkripte lassen sich erst kurz vor dem Schlüpfen der Primärpolypen nachweisen. Interessanterweise wird auch ein zweiter wichtiger Kopfmarker, HyBra1, erst in diesem Stadium exprimiert (Technau und Bode, 1999). Die späte Expression dieser beiden Kopfmarker läßt vermuten, dass die Entstehung des Kopforganisators erst wesentlich später als die Etablierung der Polarität des Embryos erfolgt. Die Expression der beiden Kopfmarker korreliert mit der Entstehung des endodermalen Epithels aus der zuvor losen inneren Zellmasse. Das Endoderm bildet sich unabhängig von der Dauer des Kutikulastadiums zwei Tage, bevor der Embryo schlüpft (Martin et al., 1997). Auch in Reaggregationsversuchen beginnt die Transkription von HyWnt und HyBra1 erst nach der Trennung der Zellen in zwei Epithelschichten (Technau et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass die epitheliale Gewebeorganisation eine Voraussetzung für die Entstehung von Kopforganisationszentren ist.

4.5 Parallelen zwischen dem *Hydra* Kopforganisor und dem Spemann-Organisor

Die Verwendung eines Wnt-Signalwegs zur Etablierung des Organisors in *Hydra* zeigt Parallelen zur Bildung des Spemann-Organisors im *Xenopus* Embryo. Eine Anreicherung nuklearen β -Catenins im späteren dorsalen Bereich des Embryos ist eine der frühesten molekularen Veränderungen, die der Bildung des Spemann-Organisors vorausgehen (Larabell et al., 1997). Depletion von β -Catenin verhindert die Bildung des Organisors und dadurch die Bildung der Dorsoventralachse (Heasman et al., 1994). Analog dazu wird auch in *Hydra* der Wnt-Signalweg zur Etablierung von Organisorzentren genutzt. Die Verwendung von Wnt-Molekülen zur Etablierung von Organisorzentren ist also evolutiv sehr alt und veranschaulicht, dass grundlegende Schritte der Musterbildung in allen Metazoen von hochkonservierten Molekülen gesteuert werden.

4.6 Hinweise für eine Beteiligung von HyDsh an verschiedenen Signalwegen

Dishevelled (Dsh) ist die erste bekannte intrazelluläre Komponente der Wnt-Signaltransduktionskaskade, nachdem das Signal durch Transmembranrezeptoren aus der Frizzled-Familie ins Zellinnere übertragen worden ist (Seidensticker und Behrens, 2000). Neben der Funktion im kanonischen Wnt/ β -Catenin/Tcf-Signaltransduktionsweg ist Dishevelled auch an einem zweiten Signalweg beteiligt. Dieser sogenannte PCP-Signalweg (Planar Cell Polarity) wurde zunächst in *Drosophila* beschrieben, wo er die Polarität innerhalb der planaren Ebene von Epithelien reguliert und dadurch z.B. das gerichtete Auswachsen von Haaren auf den Flügeln oder die Anordnung der Ommatidien im Komplexauge steuert (Shulman et al., 1998). In Vertebraten existiert ein ähnlicher Signalweg, der die morphogenetischen Veränderungen während der konvergenten Extension im Rahmen der Gastrulation reguliert. Auch dabei kommt es zu einer Polarisierung der Zellen, die in der Folge entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos interkalieren und dadurch zur Streckung dieser Achse führen (Wallingford et al., 2000). Sowohl in *Drosophila* als auch in *Xenopus* sind bestimmte Mitglieder der Frizzled-Rezeptorfamilie in dem PCP-Signalweg beteiligt. In *Xenopus* und Zebrafisch dient Wnt11 als Ligand in diesem Signalweg (Glinka et al., 1996; Heisenberg et al., 2000), während in *Drosophila* bislang nicht geklärt werden konnte, welches Molekül als Ligand für Frizzled in der planaren Zellpolarität wirkt. Im Gegensatz zum kanonischen Wnt-Signalweg sind weder β -Catenin noch Tcf im PCP-

Signalweg involviert. Die Umsetzung des PCP-Signals führt sowohl zu einer polarisierten Veränderung des Zytoskeletts als auch zu Änderungen der Genexpression (Shulman et al., 1998; Winter et al., 2001). Zusätzlich zu diesen Funktionen kann Dishevelled auch durch direkte Interaktion mit Actinfilamenten und Mikrotubuli die Stabilität des Zytoskeletts beeinflussen (Krylova et al., 2000; Torres und Nelson, 2000).

4.6.1 Aufregulation von HyDsh korreliert mit Zellmorphologieveränderungen

Verschiedene Domänen der Dishevelled-Proteine sind für die Funktionen im Wnt- und PCP-Signalweg notwendig: die N-terminale DIX- und die zentrale PDZ-Domäne werden im Wnt-Signalweg benötigt, die C-terminale DEP-Domäne im PCP-Signalweg (Yanagawa et al., 1995; Boutros et al., 1998; Axelrod et al., 1998). Diese drei funktionell relevanten und konservierten Domänen sind in HyDsh vorhanden (Hobmayer et al., 2000). Die grundlegenden strukturellen Voraussetzungen für eine Beteiligung an den beiden oben aufgeführten Signalwegen sind also gegeben, tatsächlich stellt die Existenz dieser hochkonservierten Domänen einen Hinweis auf eine Beteiligung an verschiedenen Signalwegen dar. HyDsh wird im gesamten Tier exprimiert, eine deutliche transkriptionelle Aufregulation ist an Stellen zu sehen, an denen eine Veränderung der Zellgestalt erfolgt. Eine dieser Stellen ist der Übergang vom Rumpf in die Tentakel, dort nehmen die Zellen, die per Gewebes Schub in die Tentakel gedrückt werden, eine gestreckte Form an. Eine zweite Stelle ist die Knospungsplakode: dort verdickt sich das Ektoderm, d.h. die ektodermalen Zellen verlängern sich in Bezug auf die Körperachse in der proximo-distalen Richtung. Diese Zellen werden im Verlauf der Knospung per Gewebes Schub passiv in die evaginierende Knospe geschoben, in der reifen Knospe bilden sie schließlich den Fußbereich (Otto und Campbell, 1977). Die HyDsh Aufregulation bleibt in diesen Zellen erhalten, bis sich die Knospe vom Muttertier ablöst. Ein dritter Prozess, bei dem es zu einer transienten Veränderung der Zellmorphologie kommt, ist die Regeneration. Hierbei strecken sich zunächst cuboidale ektodermale Zellen des Rumpfes über die Schnittstelle. Auch hier ist eine Aufregulation von HyDsh zu beobachten. Dass die Aufregulation von HyDsh mit der kopfspezifischen Expression von HyWnt in Zusammenhang steht, scheint unwahrscheinlich. Speziell während der Knospungsbildung ist zu sehen, dass die Expressionsdomäne von HyWnt nicht mit der Aufregulation von HyDsh überlappt. Dennoch ist eine Beteiligung von HyDsh in einem kanonischen Wnt-Signalweg möglich, da HyDsh in allen Regionen, in denen Wnt-Signalzentren vorhanden sind oder entstehen, ebenfalls exprimiert werden. Eine Regulation

von Dishevelled auf transkriptioneller Ebene ist auch in anderen Organismen für eine Funktion im kanonischen Wnt-Signalweg nicht notwendig.

Eine Aufregulation von HyDsh ist in verschiedenen Zonen, in denen Veränderungen der Zellmorphologie stattfinden, zu beobachten. Dies zeigt, dass die Funktion von HyDsh eher in morphogenetischen Prozessen liegt und nicht in der Determination einer bestimmten, positionsspezifischen Struktur, wie zum Beispiel den Tentakeln. Die Aufregulation an der Tentakelbasis gleicht zwar der von HyAlx, einem *aristalless*-verwandten Homeoboxgens, HyAlx wird aber auch während der Knospung nur in Zusammenhang mit Tentakelbildung exprimiert (Smith et al., 2000). Vielmehr lässt die Aufregulation von HyDsh einen generellen Zusammenhang mit cytoskelettmodulierenden Prozessen vermuten. Interessanterweise definiert die HyDsh-Domäne jeweils nur den Bereich, in dem sich die Zellmorphologie verändert: Innerhalb der Knospungsplakode haben beispielsweise alle ektodermalen Zellen eine kolumnare Form und sind durch die Expression von CnOtx, einem *orthodenticle*-Ortholog, gekennzeichnet (Smith et al., 1999); die Aufregulation von HyDsh ist jedoch auf den Randbereich, also den Übergang zu den eher cuboidalen Zellen des Rumpfes, beschränkt. Diese Korrelation der Expression mit der Veränderung der Zellmorphologie suggeriert eine Funktion von HyDsh in der Umsetzung eines Signals für diese Veränderung. Ob es diese Funktion als Überträger in einem Signalweg oder als ein das Cytoskelett modifizierender Effektor eines Signalwegs ausübt, bleibt vorerst unklar. Eine Möglichkeit, durch Analogie zu höheren Metazoa Aufschluß über die genaue Funktion von HyDsh zu erlangen, wäre die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des HyDsh-Proteins. Im Rahmen von PCP-signaling wird Dsh phosphoryliert und lokal zur Plasmamembran transloziert (Axelrod et al., 1998; Axelrod, 2001; Wallingford et al., 2000; Rothbacher et al., 2000). Eine direkte Interaktion mit Microtubuli oder Actinfilamenten wäre durch Colokalisationsstudien detektierbar (Torres und Nelson, 2000; Krylova et al., 2000).

Wie Wnt die Funktion von Dishevelled und Dishevelled dann die von β -Catenin im kanonischen Wnt-Signalweg reguliert, ist noch nicht im Detail bekannt. Vermutlich bewirkt eine Stimulierung durch Wnt die Rekrutierung des GSK3-Inhibitors GBP (GSK3 binding protein) mittels Dishevelled zu einem Komplex aus GSK3, Axin, APC (Adenomatous polyposis coli) und β -Catenin (Li et al., 1999; Salic et al., 2000). In diesem Komplex wird β -Catenin im nicht Wnt-stimulierten Zustand durch GSK3 phosphoryliert und dadurch zur

Degradation über den Ubiquitin-Proteasom Weg bestimmt (Aberle et al., 1997). Die Inhibition von GSK3 durch GBP nach Wnt Stimulation führt zu vermindertem Abbau von cytoplasmatischem β -Catenin und nachfolgend zu verstärkter transkriptioneller Aktivität von β -Catenin/Tcf-Komplexen (Salic et al., 2000). Die Funktion von Dishevelled im kanonischen Wnt-Signalweg ist also vermutlich nur mit Veränderungen innerhalb des Cytoplasmas verbunden. Voraussetzung für solche subzelluläre Lokalisationsstudien wäre die Herstellung eines HyDsh spezifischen Antikörpers.

4.7 Der HyWnt-Signalweg und Oogenese

Sowohl HyDsh als auch HyGSK3 werden während der Oogenese dynamisch aufreguliert. Diese Aufregulation ist erstmals sichtbar, wenn die oocytenspezifischen Stammzellen zu proliferieren beginnen und bleibt während deren Aggregation erhalten. Erst nachdem eine dieser Stammzellen zur Oocyte selektiert ist und begonnen hat die anderen, zu Nährzellen differenzierten Stammzellen zu phagozytieren, wird die Expression von HyDsh und HyGSK3 auf ein basales Niveau herunterreguliert. Behandlung mit dem GSK3-Inhibitor Lithium verhindert die Oocytenentwicklung nahezu vollständig. Im Vergleich zu Kontrolltieren ist die Differenzierung der Nährzellen gestört, was sich in einer stark verminderten Anzahl apoptotischer Nährzellen manifestiert. Aktivität von HyGSK3 ist also notwendig für den Ablauf der Oogenese.

Verschiedene mechanistische Erklärungen bieten sich für die Rolle von HyDsh und HyGSK3 in der Oogenese an. (1) Eine Funktion in der Regulation der Cytoskelettplastizität der Oocyte. (2) Eine proapoptotische Funktion in der Nährzelldifferenzierung. (3) Die Beteiligung eines Wnt-Signalwegs in der Oogenese.

Sowohl Dishevelled als auch GSK3 sind in höheren Metazoen an der Regulation der Cytoskelettstabilität beteiligt (Krylova et al., 2000; Torres und Nelson, 2000; Lucas et al., 1998; Wagner et al., 1996). Im Verlauf der Phagozytose der Nährzellen durch die wachsende Oocyte ist eine große Plastizität des Cytoskeletts notwendig, allerdings wird die Expression von HyDsh und HyGSK3 bereits vor dem Ende der morphologischen Veränderungen der Oocyte wieder herunterreguliert, was gegen eine Funktion der beiden Proteine in Zusammenhang mit Cytoskelettveränderungen spricht. Denkbar ist jedoch, daß HyDsh und

HyGSK3 nur für das Wachsen der Oocyte, nicht aber für das Zurückziehen der Pseudopodien benötigt wird.

GSK3 kann abhängig vom zellulären Kontext pro- oder antiapoptotisch wirken (Hoeflich et al., 2000; Hetman et al., 2000; Pap und Cooper, 1998; Li et al., 2000). Eine Verhinderung der Apoptose durch Inhibition von GSK3 wurde in Vertebratenzellkultur beschrieben. Da der Beginn eines apoptotischen Programms ein grundlegender Bestandteil der Nährzellendifferenzierung ist, könnte die Verhinderung der Apoptose durch Inhibition von HyGSK3 dazu führen, daß die Oocyte die Nährzellen nicht phagozytiert und sich nicht weiterentwickelt. Allerdings hat Lithium generell einen proapoptotischen Einfluß auf Hydragewebe, sodass die proapoptotische Funktion von HyGSK3 auf die spezielle Situation während der Nährzellendifferenzierung beschränkt wäre.

Eine weitere Möglichkeit, die Aufregulation von HyDsh und HyGSK3 zu erklären, ist eine Funktion des Wnt-Signalwegs in der Oogenese. Diese Vermutung wird durch die synchrone Aufregulation auch von Hy β -Catenin und HyTcf gestützt (C.Laue, persönliche Mitteilung). Speziell die Expression von HyTcf ist interessant: HyTcf wird in adulten Tieren, während der Knospung und Regeneration nur in Zusammenhang mit der Entstehung von Wnt-Signalzentren exprimiert (Hobmayer et al., 2000), somit deutet die Expression von HyTcf auf eine Rolle für einen Wnt-Signalweg auch in der Oogenese hin. Allerdings konnte keine HyWnt-Expression während der Oogenese detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Existenz weiterer, bislang nicht identifizierter *Hydra* Wnt-Moleküle sein, die während der Oogenese exprimiert werden. Da in dem basalen Cnidarier *Nematostella vectensis* Fragmente von sechs verschiedenen Wnt-Genen gefunden wurden (K. Sturm und B. Hobmayer, pers. Mitteilung), scheint es durchaus möglich, dass auch in *Hydra* noch weitere Wnts vorkommen. Die Rolle eines Wnt-Signalwegs in der Oogenese könnte zum Beispiel in der schrittweisen Selektion der Oocyte aus den aggregierten Stammzellen liegen (Miller et al., 2000). An dieser Selektion ist auch das *orthodenticle* Ortholog CnOtx beteiligt, das in einer Subpopulation im Zentrum der aggregierten Keimzellen exprimiert wird (Miller et al., 2000). Interaktionen zwischen Otx-Molekülen und Wnt-Signalwegen konnten sowohl in *Drosophila* als auch in Vertebraten gezeigt werden (Royet und Finkelstein, 1996; Rhinn et al., 1998; Morgan et al., 1999), möglicherweise ist also für die Oocytenselektion ein Zusammenspiel dieser Faktoren notwendig.

Im kanonischen Wnt-Signalweg sind Dishevelled, β -Catenin und Tcf positive Regulatoren, GSK3 ist hingegen ein negativer Regulator. Die gleichzeitige Aufregulation positiver und negativer Regulatoren erscheint paradox. Zwei Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an: (1) Die Aufregulation von HyGSK3 erfolgt in einem anderen Zusammenhang als die der positiven Regulatoren. In Säugerzellen wird die Aktivität von GSK3 sowohl durch Insulin als auch durch Wnt inhibiert, die Inhibition wirkt sich aber auf unterschiedliche Ziele aus. Inhibition durch Insulin bewirkt eine verminderte Phosphorylierung der Glycogensynthase, hat aber keinen Effekt auf die Stabilität von β -Catenin. Umgekehrt bewirkt Wnt eine Destabilisierung von β -Catenin, hat jedoch keinen Einfluß auf die Glycogensynthase (Ding et al., 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene GSK3-Pools für verschiedene Funktionen genutzt werden. Ähnlich könnte die Aufregulation von HyGSK3 in der Oogenese unabhängig von einer Funktion in einem Wnt-Signalweg stattfinden, z.B. als proapoptotischer Faktor in der Nährzellendifferenzierung. (2) HyGSK3 könnte aber auch eine Funktion als positiver Regulator eines Wnt-Signalwegs haben. Diese Situation ist in *Dictyostelium* zu beobachten, wo Mutationen in GSK3 und β -Catenin zu identischen Phänotypen führen (Harwood et al., 1995; Grimson et al., 2000). Auch in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* kann GSK3 als positiver Regulator eines β -Catenin Orthologs wirken (Schlesinger et al., 1999). Effekte des GSK3-Inhibitors Lithium unterstützen eine positive Funktion von HyGSK3 im Wnt-Signalweg: Sowohl in der Kopfgeneration als auch in Reaggregationsversuchen unterdrückt Lithium die Kopfbildung, ohne die Expression von HyWnt zu verändern. Da die Expression HyWnt eine Funktion in der Kopfaktivierung suggeriert, lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, dass die Inhibition von HyGSK3 durch Lithium die Funktion des HyWnt-Signalwegs unterdrückt. In welcher der postulierten Rollen HyGSK3 für die Oogenese wichtig ist, kann bislang nicht abschließend beurteilt werden.

4.8 Komponenten eines BMP/Chordin Systems in Hydra

Der BMP-Signaltransduktionsweg ist evolutiv hochkonserviert und wird sowohl in Arthropoden als auch in Vertebraten zur Musterbildung entlang der Dorsoventralachse benutzt (DeRobertis und Sasai, 1996). Selbst im basalsten bilateralsymmetrischen Tierstamm, den Plattwürmern, scheint BMP an dorsoventraler Musterbildung beteiligt zu sein (Orii et al., 1998). Konserviert zumindest zwischen Arthropoden und Vertebraten ist auch der Antagonismus zwischen BMP-Molekülen und ihrem ebenfalls sekretierten Antagonisten Chordin. Dieser auf direkter Bindung und Inhibition von BMPs durch Chordin beruhende Antagonismus bestimmt letztlich das tatsächliche BMP-Aktivitätsniveau.

4.9 Hydra besitzt ein Chordin-Ortholog

Die Konserviertheit der Chordin Moleküle in verschiedenen Organismen ist nicht an einer besonders hohen Aminosäureidentität der Gesamtproteine ablesbar, sondern an der Struktur einzelner cysteinreicher (CR) Domänen und an deren Anordnung im Molekül (Francois und Bier, 1995). Diese cysteinreichen Domänen sind einzeln in der Lage, BMPs zu binden, in ihrer Gesamtanordnung in den Chordin-Molekülen ist diese Fähigkeit jedoch weit größer (Larrain et al., 2000). Das aus *Hydra* isolierte chordin-ähnliche Molekül weist die meisten der entscheidenden Charakteristika von Chordin Molekülen auf. Die Gesamtlänge entspricht mit 1137 Aminosäuren (AS) etwa der der Chordin-Orthologe aus *Xenopus* (941AS) und *Drosophila* (1038AS). Im C-terminalen Bereich befinden sich kurz hintereinander drei cysteinreiche Domänen die der Konsensussequenz der Chordin-Domänen entsprechen. Besonders die Motive CXXCXC und CCXXC (C=Cystein, X= andere Aminosäure) sind charakteristisch und in jeder der Domänen enthalten. Die Bedeutung dieser drei Domänen konnte auch dadurch gezeigt werden, dass aus der Maus ein Molekül isoliert wurde, das lediglich aus drei hintereinanderliegenden Chordin-Domänen besteht und das als direkt bindender Antagonist von BMPs wirkt (Nakayama et al., 2001). In den *Drosophila* und Vertebraten Chordin-Molekülen ist eine weitere Chordin-Domäne im N-terminalen Bereich vorhanden. *Hydra* Chordin hat im N-terminalen Bereich mehrere cysteinreiche Abschnitte, die allerdings nicht dem Chordin-Typ entsprechen. Interessant sind vor allem zwei dieser cysteinreichen Motive: die IGF-(Insulin-like growth factor) Bindungs-Domäne und die Follistatin-Domäne. Ein Protein mit CR-Domänen und einer N-terminalen IGF-Bindungsdomäne wurde in Säugern beschrieben, dort ist CRIM1 (cystein-rich motorneuron),

möglicherweise durch Inhibition von BMPs, an der Entwicklung des zentralen Nervensystems beteiligt (Kolle et al., 2000). Die CR-Domänen von CRIM1 entsprechen dem Chordin-Typ, allerdings enthält CRIM1 sechs dieser CR-Domänen (statt vier), zudem hat CRIM1 eine Transmembrandomäne, ist also kein diffusibles Molekül wie Chordin. Eine Hydrophobizitätsanalyse ergab keinen Hinweis auf eine Transmembrandomäne im Hydra Protein (nicht gezeigt). Ob CRIM1-ähnliche Moleküle evolutiv konserviert sind, ist noch nicht geklärt. Ein Molekül mit sehr ähnlicher CR-Domänen-Struktur wurde auch im Nematoden *C.elegans* gefunden, allerdings enthält dieser partielle Klon keine IGF-Bindungsdomäne. Das IGF bindende Protein IGFBP5 wird im Xenopusembryo im Spemann-Organisator exprimiert und hat eine positive Funktion in einem IGF-Signalweg, der für die die Ausbildung von Kopfstrukturen wichtig ist (Pera und DeRobertis, 2001). Ob die IGF-Bindungsdomäne in HyChd tatsächlich IGFs bindet und HyChd somit eine Rolle in BMP- und IGF-Signalwegen spielt, ist im Moment nicht klar.

Ebenfalls sehr interessant ist die Follistatin-Domäne des Hydra Moleküls. Follistatin ist ein sekretierter Antagonist von TGF β -Molekülen der Activin- und BMP-Familie (Nakamura et al., 1990; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Fainsod et al., 1997) und besteht aus drei Follistatin-Domänen mit charakteristischem Cysteinmuster. Follistatin ist in der Lage BMP4 direkt zu binden (Fainsod et al., 1997), es scheint daher möglich, dass die Follistatin-Domäne in HyChd die fehlende N-terminale Chordin-Domäne ersetzt. Die Kombination von Follistatin und Chordin-Domänen könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass ein putativer TGF β -Ligand in *Hydra* strukturelle Eigenschaften von Activin- und BMP-Molekülen vereint. Die Charakterisierung von *Hydra* TGF β -Molekülen wird Aufschluß über diese Vermutung bringen.

Zusammengenommen lässt sich sagen, daß HyChd ein sekretiertes Molekül ist, das mehrere putative BMP-bindende Chordin-Domänen enthält und auch in seiner Gesamtstruktur Chordin-Molekülen stark ähnelt. Eine Funktion von HyChd als extrazellulärer BMP-Antagonist scheint daher wahrscheinlich.

4.10 Differentielle Regulation von HyChd in Musterbildungsprozessen

BMPs werden als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert, die erst durch proteolytische Prozessierung in ihre aktive Form gebracht werden. Möglicherweise stellt diese Prozessierung einen limitierenden Faktor für das Vorhandensein biologisch aktiver BMPs dar (Constam und Robertson, 1999; Dick et al., 2000). Für Chordin und das *Drosophila* Homolog Sog wurde hingegen bislang keine Notwendigkeit einer Prozessierung gefunden, sodass ihre Transkription vermutlich direkt zu ihrer Sekretion als aktive Moleküle führt. Daher sollte die Untersuchung des Transkriptionsmusters von HyChd Aussagen über eventuelle Funktionen ermöglichen.

HyChd wird im gesamten Endoderm des adulten Polypen exprimiert und in den Tentakeln aufreguliert. Während der Knospung ist eine deutlich verstärkte Expression in der gesamten sich entwickelnden Knospe zu beobachten. Diese gleichförmige Expression in der Knospe zeigt, dass HyChd nicht wie HyWnt ein kopfspezifisches Signal darstellt, sondern einen Bereich definiert, in dem Musterbildung stattfinden kann. Diese Vermutung wird durch die Expression in Regenerationsversuchen unterstützt: Sowohl in der Kopf-, als auch in der Fußregeneration, also nicht in festem Zusammenhang mit einem positionsabhängigen Musterbildungsprozess, wird HyChd aufreguliert. Dass diese Aufregulation nicht einfach auf einen Wundheilungseffekt zurückzuführen ist, wird besonders an den regenerationsdefizienten Tieren des reg-16 Stammes deutlich. Bei diesen bleibt die apikale Aufregulation während der Regeneration bis zu 96Std. erhalten, also wesentlich länger, als für die Wundheilung nötig (ca. 1Std.). Ein Teil der reg-16 Tiere beginnt nach frühestens 48Std., einen Kopf zu regenerieren. Wie auch in normalen *Hydra vulgaris* Polypen folgt der Bildung des Kopfes die Herunterregulierung der HyChd-Expression auf Rumpfniveau. Das bedeutet, dass unabhängig davon, wann ein neuer Kopforganisor gebildet wird, die HyChd-Expression nach Bildung dieses Organisors herunterreguliert wird. Eine mögliche Funktion von HyChd wäre es also, in eng umgrenzten Bereichen, in denen Musterbildungsprozesse stattfinden sollen, einen Grundzustand herzustellen, der es dem Gewebe ermöglicht, auf ein instruktives Signal wie z.B. HyWnt, zu reagieren. HyChd käme diesem Modell zufolge also eine permissive Rolle in Musterbildungsprozessen in *Hydra* zu.

Obwohl Musterbildung in *Hydra* aufgrund der bereits erwähnten Gewebedynamik auch im adulten Polypen stattfindet, ist im Hypostom adulter Tiere keine Aufregulation festzustellen. Dies zeigt, daß ein erhöhter Chordin-Level nur zur Initiation von Musterbildungsprozessen,

nicht aber zur Aufrechterhaltung der axialen Polarität im adulten Tier notwendig ist. Interessanterweise wird HySmad1, der intrazelluläre Transduktor von BMP-Signalen, im Ektoderm des Hypostoms nur sehr schwach exprimiert, während es in der auswachsenden Knospe und in Regeneraten im apikalen Bereich ebenso stark exprimiert wird wie in allen anderen Bereichen des Tieres. Möglicherweise ist also die Fähigkeit zur Verarbeitung eines BMP-Signals im adulten Kopf vermindert, sodass ein basales HyChd-Expressionsniveau zur Inhibition von BMP-Signalen ausreicht. Ähnlich wie HyChd ist auch Hy β -Catenin nur während der Knospung und der Regeneration aufreguliert, nicht aber im Hypostom adulter Polypen. Dies unterstreicht, dass Entstehung und Aufrechterhaltung von Kopforganismen keine molekular vollständig identischen Prozesse sind.

Die Vorstellung, dass HyChd einen für Musterbildungssignale kompetenten Grundzustand herstellt, wird dadurch unterstützt, daß Chordin in anderen Organismen selbst keine rezeptorvermittelte Funktion hat, sondern ausschließlich durch die Verhinderung von BMP-Signalen wirkt.

4.11 Molekulare Konserviertheit der Keimzellentwicklung

Die transkriptionelle Aufregulation von HySmad1 in Keimbahnzellen während der Oogenese läßt vermuten, daß ein TGF β -Signalweg in diesem Prozeß eine Rolle spielt. Zusammen mit den Expressionsdaten für HyDsh, HyGSK3 (s. oben), sowie Hy β -Catenin und HyTcf (C. Laue, unpublizierte Daten) ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass ein Wnt- und ein BMP-Signalweg auch in der Oogenese interagieren. Auch zeigt sich eine starke Konserviertheit der an der Keimzellentwicklung beteiligten Moleküle: Durch Smads vermittelte BMP-Signale sind auch in Arthropoden und Vertebraten für die Keimzellentwicklung von entscheidender Bedeutung (Xie und Spradling, 1998; Lawson et al., 1999; Chang und Matzuk, 2001), eine Funktion von Smads in diesem Prozess ist also möglicherweise bereits sehr früh in der Evolution entstanden. Die Vorstellung konservierter Mechanismen in der Keimzellentwicklung wird durch die Expression von *nanos*- und *vasa*-Orthologen in Keimbahnzellen von *Hydra*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* und Vertebraten unterstützt (Mochizuki et al., 2000, 2001; Matova und Cooley, 2001).

4.12 Modell für die Entstehung von Kopforganismen in *Hydra*

Die Expressionsanalyse von Molekülen der Wnt- und der BMP4-Signaltransduktionskaskaden in *Hydra* kann zu folgendem Modell für die Etablierung von Kopforganisationszentren während der Knospung und der Regeneration zusammengefaßt werden. Die Aufregulation von Hy β -Catenin und HyTcf definiert ein distinktes morphogenetisches Feld, die Knospungszone im unteren Bereich des Rumpfes, bzw. die Spitze von Kopf- und Fußregeneraten. Innerhalb dieses Feldes wird durch die Expression von HyChd ein permissives Signal für die generelle Entstehung von Organismen und durch die Aufregulation von HyWnt ein instruktives Signal für die Entstehung eines spezifischen Kopforganismens gegeben.

Die Funktion von Wnt in der Entstehung des *Hydra*-Organismens und die Expression von Chordin im sich entwickelnden Organismus ist der Situation im Spemann-Organismus des *Xenopus* Embryos frappierend ähnlich. Dort ist Wnt ebenfalls für die Entstehung des Organismens notwendig und induziert die Expression des dorsalisierenden Faktors Chordin im Organismus (DeRobertis et al., 2000). Ein wichtiger Unterschied, der sich aus dem oben dargestellten Modell ergibt ist, dass in *Hydra* die Expression von Chordin der von HyWnt zumindest in der Regeneration vorausgeht und somit nicht durch HyWnt induziert werden kann. Die Aufregulation von Hy β -Catenin und HyTcf, die der Expression von HyChd vorausgeht, sollte - anders als in *Xenopus* - alleine nicht in der Lage sein, die HyChd Expression zu steuern. Erstens wäre es nicht erklärbar, weshalb die HyChd Expression lokal begrenzt ist, während Hy β -Catenin und HyTcf in der gesamten Knospungszone aufreguliert werden, zweitens ist durch Transplantationsexperimente eindeutig gezeigt worden, dass regenerierende Spitzen zum Zeitpunkt der Aufregulation von Hy β -Catenin und HyTcf noch keine Organismeneigenschaften haben (MacWilliams, 1983). Obwohl also in der Entwicklung des *Hydra* Kopforganismens Orthologe der im Spemann-Organismus verwendeten Moleküle eine Rolle spielen, scheinen ihre molekularen Interaktionen verschieden zu sein. Die Charakterisierung von BMP-Molekülen in *Hydra* wird weitere Aufschlüsse über diese Interaktionen erbringen.

4.13 Die Evolution der Achsenbildung

Mehrere hochkonservierte molekulare Systeme sind in bilateralsymmetrischen Tieren an der Bildung der Körperachsen beteiligt. Die Übereinstimmungen dieser molekularen Steuerungsmechanismen in der Entwicklung von Deuterostomiern (vor allem Vertebraten) und Protostomiern (v.a. Arthropoden) haben zu einem Bild eines gemeinsamen Vorfahren aller Bilateria, dem sogenannten Urbilateria, geführt (DeRobertis und Sasai, 1996). Entscheidende Merkmale dieses Urbilateria sind unter anderem die Verwendung von Hox-Genen für die Musterung der antero-posterioren Achse und die eines BMP/Chordin-Systems für die Etablierung der Dorsoventralachse (Abb. 29; DeRobertis und Sasai, 1996; Knoll und Carroll, 1999).

Für die Steuerung der Achsenbildung in Tieren mit nur einer Achse ergeben sich daraus verschiedene vorstellbare Szenarien: (1) nur eines der molekularen Systeme ist bereits vorhanden und reguliert die Achsenbildung, die anderen Systeme sind erst später in der Evolution entstanden und für die Steuerung der Achsenbildung eingesetzt worden. (2) Die verschiedenen Systeme sind bereits vorhanden, aber nur eines funktioniert in der Achsenbildung, die anderen haben andere Funktionen und finden erst in bilateralsymmetrischen Tieren Verwendung in Achsenbildungsprozessen. (3) Die verschiedenen Systeme sind vorhanden und wirken kooperativ in der Achsenbildung in radiärsymmetrischen Tieren, in bilateralsymmetrischen Tieren werden sie dann getrennt für die Musterbildung entlang verschiedener Achsen eingesetzt.

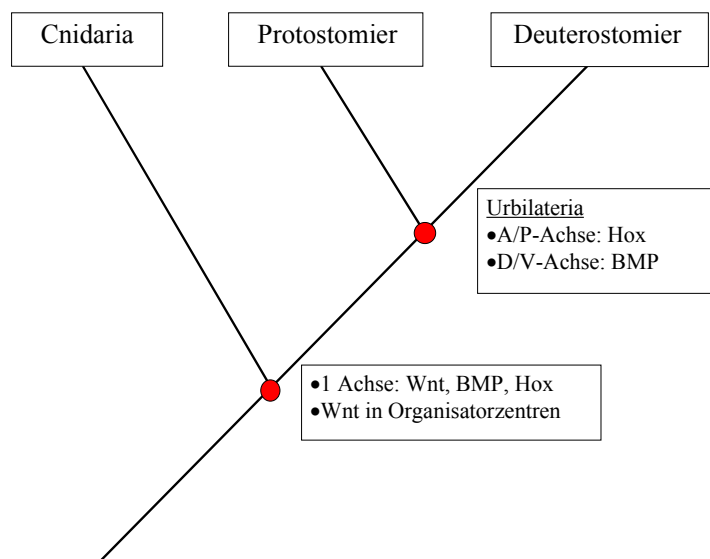
Aufgrund der enormen Unterschiede zwischen den Körperbauplänen radiärsymmetrischer Tiere und dem des postulierten Urbilateria wurde bislang vermutet, dass diese Unterschiede auf massive genetische Veränderungen, wie z.B. die Entstehung neuer molekularer Regulationssysteme zurückzuführen sind (Knoll und Carroll, 1999). Diese Einschätzung entspricht in ihren Grundzügen dem ersten aufgeführten Szenario.

Die Untersuchung verschiedener konservierter, an der Achsenbildung höherer Metazoa beteiligter molekularer Systeme in *Hydra* unterstützt hingegen das dritte Szenario. Wie in dieser Arbeit dargestellt, deuten die Expressionsmuster von HyWnt und HyChd auf eine Beteiligung eines Wnt- und eines BMP/Chordin-Signalwegs an axialer Musterbildung in *Hydra* hin. Zudem scheinen auch Orthologe der HOM/HOX-Gene eine Rolle in der Achsenbildung in *Hydra* zu spielen. In allen untersuchten Bilateriern kontrollieren

Transkriptionsfaktoren der HOM/HOX-Homeobox-Familie die Identität verschiedener Körperabschnitte entlang der antero-posterioren Achse (McGinnis und Krumlauf, 1992; Slack et al., 1993). In *Hydra* werden Gene dieser Familie in Musterbildungsprozessen wie der Kopfregeneration differentiell reguliert (Shenk et al., 1993a,b; Gauchat et al., 2000). Somit scheint die Etablierung und die Erhaltung der Polarität der einen Körperachse von *Hydra* durch molekulare Systeme, die in Bilateriern strikt mit der dorso-ventralen (BMP) oder der antero-posterioren Achse (HOM/HOX) korreliert sind, reguliert zu werden (Abb29).

Abb.29: Evolution von Achsenbildungsmechanismen

Während im Urbilateria verschiedene konservierte molekulare Systeme für die Etablierung von A/P- und D/V-Achse verwendet werden, sind diese Systeme im letzten gemeinsamen Vorfahren von radiär- und bilateralsymmetrischen Tieren bereits vorhanden und an axialen Musterbildungsprozessen beteiligt



Ebenfalls wurde postuliert, dass molekular konservierte Organisationszentren erst nach der Abspaltung der Cnidaria entstanden (Knoll und Carroll, 1999). Im Gegensatz dazu zeigt die hier vorgestellte Untersuchung, dass die bekannte Organisatorfunktion des Hydrakopfes in engem Zusammenhang mit der Expression eines hochkonservierten Moleküls, HyWnt, steht. Wnt-Signalzentren mit Organisatorfunktion sind also nicht erst im Urbilateria, sondern bereits im gemeinsamen Vorfahren von Bilateriern und Cnidariern vorhanden (Abb.29). Die grundlegenden molekularen Gemeinsamkeiten in der Entwicklung der diversen Baupläne erstrecken sich somit nicht nur auf die Bilateria, sondern vermutlich auf alle Eumetazoa.

5 Material + Methode

5.1 Tiere

Als Standard Versuchstier wurde *Hydra vulgaris* (Stamm Basel) verwendet, zudem wurden für Regenerationsversuche Tiere des regenerationsdefizienten Stammes *Hydra magnipapillata* reg-16 (Achermann und Sugiyama, 1985), zur Untersuchung zelltypspezifischer Genexpression der temperatursensitive Stamm *Hydra magnipapillata* sf-1 (Sugiyama und Fujisawa, 1978) und zu Studien an ektopischen Köpfen der Stamm *Hydra magnipapillata* multiheaded-1 (Sugiyama und Fujisawa, 1977a) verwendet. Alle Tiere wurden bei $18\pm 1^\circ\text{C}$ gehalten, mit frisch geschlüpften Krebslarven (*Artemia salinas*) gefüttert; das Kulturmedium (1mM CaCl_2 , 0,1mM MgCl_2 , 0,1mM KCl, 1mM NaH_2CO_3 , pH 7,8) wurde zweimal täglich gewechselt. Vor Regenerations- und Reaggregationsexperimenten, sowie vor RNA-Isolationen und in-situ Hybridisierungen wurden die Tiere an mindestens fünf aufeinanderfolgenden Tagen gefüttert, die Versuche wurden 24 Std. nach der letzten Fütterung begonnen.

5.2 Regeneration und Aggregation

Regenerationsversuche wurden an knospenlosen Polypen durchgeführt, die Schnitte erfolgten bei 50 bzw. 80% der Rumpflänge vom Fuß aus gemessen. Nach dem Schneiden wurden die Regenerate in Petrischalen mit frischem Hydramedium (mindestens 1ml pro Regenerat) überführt und bei 18°C gehalten. Regenerationsversuche an reg-16 Polypen wurden an Tieren im Knospentadium 2 durchgeführt. Im Vergleich zu *Hydra vulgaris* bleiben gleichaltrige reg-16 Tiere länger knospenlos, der Beginn der Knospung stellt daher ein geeignetes Kriterium dar, um Standardtiere in gleichem Entwicklungsstadium für die Experimente zu verwenden.

Für Aggregationsversuche wurden ca. 300 Polypen Kopf und Fuß abgetrennt, um Bereiche mit erhöhtem Musterbildungspotenzial zu eliminieren. Das Rumpfgewebe wurde mehrmals mit Dissoziationsmedium (3,6mM KCl, 6mM CaCl_2 , 1,2mM MgSO_4 , 6mM NaCitrat, 6mM NaPyruvat, 6mM Glucose, 12,5mM TES, 50mg/l Rifampicin, pH6,9) gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Dissoziationspipette zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert, zum Abtrennen kleinerer Zellbestandteile bei 1000g zentrifugiert (Beckmann GS6,

21cm swing-out Rotor) und das Pellet in ca. 25ml Dissoziationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 0,4ml Plastikröhrchen (Fa. Roth) gefüllt und für fünf Minuten mit 1000g zentrifugiert. Die so hergestellten Reaggregate blieben zunächst in reinem Dissoziationsmedium und wurden dann innerhalb von 24 Std. schrittweise in Hydramedium überführt. Aus 300 Polypen wurden 50-55 Aggregate hergestellt. Die Reaggregate wurden einmal täglich in frisches Hydramedium gesetzt und von Verunreinigungen befreit.

5.3 Versuche zur Oogenese

5.3.1 Induktion der Gametenbildung

Versuche zur Oogenese wurden am *Hydra vulgaris* Stamm AEP durchgeführt. Die Bildung von Gameten wurde durch 7-10 tägigen Futterentzug induziert, anschließend wurden die Tiere drei Wochen lang zweimal wöchentlich gefüttert und die benötigten Oogenesestadien abgesammelt. Zur Herstellung von Embryonen wurden weibliche AEP-Polypen im Oogenesestadium 5-6 (Miller et al., 2000), also kurz vor der Beendigung der Oogenese, mit männlichen Polypen vom Stamm PA-2 in eine Petrischale gesetzt. Im Vergleich zur Befruchtung von AEP-Weibchen durch AEP-Männchen führte die Befruchtung durch PA-2 Männchen zu einer deutlich höheren Quote schlüpfender Primärpolypen. Beide Stämme stammen von früher beschriebenen Hydrastämmen ab (Martin et al., 1997)

5.3.2 Lithium- und Hydroxyharnstoff-Behandlung, Acridinorangefärbung

Die Effekte von Lithium auf die Oogenese wurden durch Zugabe von Lithiumchlorid zum Hydramedium untersucht (Endkonzentration 1mM LiCl). Während der Lithiumbehandlung wurden die Tiere jeden zweiten Tag gefüttert.

Hydroxyharnstoff (Fa. Sigma) zur Untersuchung der Rolle von Proliferation in der Oogenese wurde in einer Endkonzentration von 10mM verwendet.

Acridinorangefärbungen wurden an lebenden Polypen durchgeführt. Die Tiere wurden für drei Minuten in einer 10µg/ml Acridinorangefärbung (Fa. Sigma) in Hydramedium inkubiert, anschließend 5x 5Minuten mit Hydramedium gewaschen. Alle Schritte wurden in mit

Alufolie abgedeckten 24-well Zellkulturplatten durchgeführt. Zum Mikroskopieren wurden die Polypen in PBS (0,15M NaCl, 0,08M Na₂HPO₄, 0,02M NaH₂PO₄, pH 7,34) mit 1% Heptanol (zur Relaxierung) auf einen Objektträger gebracht und mit einem auf Wachsfüßen abgestützten Deckglas abgedeckt. Die Präparate wurden mit einer Wellenlänge von 450-490nm (Bandpassfilter) angeregt und durch einen 520nm Longpassemissionsfilter betrachtet und fotografiert.

5.4 Elimination der interstitiellen Zellen aus Hydra magnipapillata sf-1 Tieren

Aus Tieren des *Hydra magnipapillata* Stammes sf-1 können die interstitiellen Stammzellen durch eine Hitzebehandlung selektiv entfernt werden (Sugiyama und Fujisawa, 1978). Die Elimination der Stammzellen führt dazu, dass sukzessive auch die aus den Stammzellen hervorgehenden Differenzierungsprodukte (Nervenzellen, Nematocyten und Drüsenzellen) verlorengehen. Um die Stammzellen zu entfernen, wurden die Tiere für 72 Std. bei 26°C gehalten, anschließend noch 96 Std. bei 18°C und täglicher Fütterung. Diese Behandlung führte zur vollständigen Elimination der Stammzellen und zu einer starken Reduktion, aber nicht kompletten Entfernung, der Differenzierungsprodukte. Dies wurde durch Begutachtung der Zellkomposition mehrerer Tiere nach Mazeration festgestellt (David, 1973).

5.5 Klonierung des N-terminalen Bereichs von Hydra Chordin

5.5.1 RNA Isolation

Um das in einem Two-Hybrid-Screen isolierte Chordin-Fragment zu komplettieren, wurden zwei aufeinander folgende 5'RACE-Versuche durchgeführt.

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Hydren wurde das RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die Isolation wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Pro Extraktionssäule wurden 30 Tiere in 600µl Lysepuffer homogenisiert. Die RNA wurde mit 50µl DEPC-H₂O pro Säule eluiert. Aus der Gesamt-RNA wurde polyA⁺-RNA mit dem Nucleotrap mRNA Kit der Fa. Macherey-Nagel extrahiert. Zu jeweils zwei Gesamt-RNA Präparationen (zusammen 100µl) wurden 35µl einer Oligo(dT)-Latexkugelsuspension gegeben und 5min bei 68°C inkubiert, anschließend wurde die polyA⁺-Selektion nach der

Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 70µl DEPC-H₂O. Die RNA wurde mit ½ Volumen 3M Natriumacetat pH5,2 und 2,5 Volumen Ethanol übernacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70% Ethanol wurde die polyA⁺-RNA in 10µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration laut Photometerbestimmung betrug 84ng/µl.

5.5.2 cDNA-Synthese und 5'RACE Reaktionen

Ca. 330ng polyA⁺-RNA wurden in die cDNA Synthese eingesetzt. Die Synthese wurden bei 42°C mit dem SMART System der Fa. Clontech und SuperScript II Reverser Transkriptase der Fa. Gibco durchgeführt. Mit dem SMART System wird am 5'-Ende der Transkripte ein Oligonukleotid bekannter Sequenz ansynthetisiert (5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG 3'), das die Amplifikation des gesuchten Fragments mit einem genspezifischen und einem dem Oligonukleotid komplementären Primer ermöglicht. Das Gesamtvolumen der cDNA Synthese betrug 12µl. Für die 5'RACE-Experimente (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde spezifische cDNAs mit sequenzspezifischen Primern hergestellt. Für 5'RACE1 war der cDNA-Synthese Primer; 5'R1 5'CACACATGTAGTACATGGATCAGCTAGCC 3'. Primer für 5'RACE1 PCR-Reaktion1: 5'R2 (genspezifisch) 5'CTGAGAACTTGATATACAGCTG 3' und Q(II): GCAGTGGTAACAACGCAGAG 3'. In die 50µl PCR Reaktionen wurden je 5pmol Primer und 1µl cDNA (1:4 verdünnt) eingesetzt. PCR Bedingungen: 95°C 5min.(1 Zyklus), 95°C 1min, 53°C 1min, 72°C 2min (30 Zyklen), 72°C 3min. (1 Zyklus). PCR2: Primer 5'R3 (genspezifisch): 5'CAAATTAGGTGCACATCTTGGC 3' und Q (II). 3µl aus PCR1 wurden als template verwendet, Reaktionsbedingungen wie PCR1.

Primer für die cDNA Synthese für RACE2: 5'R4 5'CAGGAAAGAATAATGTACCATTACCCAC 3'. Für PCR1: 5'R5 (genspezifisch): 5'GGCCGATGATAAATCTTCTTTGG3' und Q(II). Für PCR2: 5'R6 (genspezifisch): 5'CTTTGGTTTCACATTCATAGC3' und Q(II). Die Reaktionen wurden wie RACE1 durchgeführt, mit der Ausnahme, das die Annealingtemperatur 58°C betrug. Die jeweils größten sichtbaren Banden (RACE1 ca. 550bp, RACE2 ca. 2,1kb) wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt (NucleoTrap Kit, Fa. Macherey-Nagel), in den pGEMT-Vektor der Fa. Promega ligiert und nach Standardmethoden in *E.coli* XL-1 Bakterien transformiert (Sambrook et al., 1989). Plasmidpräparationen einzelner Kolonien wurden mit dem Nucleo Spin Miniprep Kit (Fa. Macherey-Nagel) durchgeführt und durch Apal/SacI-Restriktionsverdau überprüft.

Die Sequenzierung der Klone erfolgte durch PCR mit Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977) und markierten Standardprimern (T7 und sp6). Die zentralen Bereiche des 5'RACE2-Fragments wurden mit internen Primern und markierten Didesoxynukleotiden sequenziert. Primer 5'Seq (sense): 5'GCGCTGTGAGACAGAGCTTTGC 3'; Primer 3'Seq (antisense): 5'GTGCTGCTCATTTGAGGTCC 3'. Die Sequenzreaktionen wurden mit Thermo-Sequenase-Kits der Fa. Pharmacia durchgeführt und auf einem automatischen Sequenziergerät aufgetrennt (ALF ExpressII, Fa Pharmacia). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der OMIGA 1.1.3. Software der Fa. Oxford Molecular, Datenbankanalysen wurden über das BLAST-Programm (National Center for Biotechnology Information) durchgeführt.

Eine schematische Darstellung der erhaltenen cDNA-Fragmente und der verwendeten Primer ist in Abb.30 zu sehen. Der überlappende Bereich zwischen dem Two-Hybrid-Klon und dem 5'RACE1-Fragment betrug 82 Basenpaare (bp), der zwischen dem 5'RACE1- und dem 5'RACE2-Fragment 42bp. Beide überlappende Bereiche zeigten eine 100% Sequenzübereinstimmung.

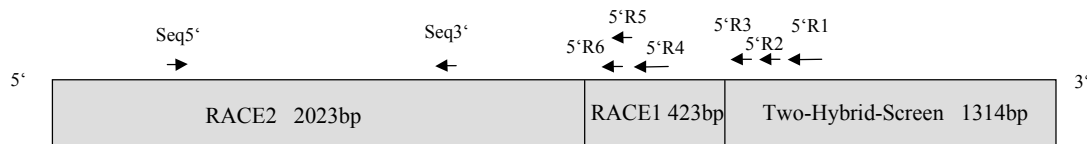


Abb.30: Übersicht über die klonierten Fragmente von HyChd

Gegen das 5'Ende des Klons aus dem Two-Hybrid-Screen wurden genestete reverse Primer hergestellt, die zusammen mit dem gegen das anligierte SMART Oligonukleotid gerichteten Primer für PCR-Reaktionen verwendet wurden. Nach Klonierung des 5'RACE1-Fragments wurde analog verfahren, um das 5'RACE2- Fragment zu erhalten.

5.6 In situ-Hybridisierungen

5.6.1 Herstellung der RNA-Sonden

Um die Transkripte der zu untersuchenden Gene zu detektieren, wurden Digoxigenin-markierte einzelsträngige antisense-RNA-Sonden hergestellt. Aus den jeweiligen Klonen wurden mit den Standardprimern M13forward und M13reverse PCR-Produkte hergestellt, die das klonierte cDNA-Fragment und Promotoren für T7 und sp6 RNA Polymerasen enthalten. Die antisense-Sonden wurden je nach Orientierung des cDNA-Fragments mit einer dieser beiden RNA-Polymerasen synthetisiert. In der Synthesereaktion wurden Digoxigenin-markierte Uracilnukleotide verwendet, das Digoxigenin kann mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Die verwendeten Sonden waren komplementär zu folgenden cDNA-Fragmenten: HyWnt 534 Nukleotide (nt) von Aminosäure (AS) 185-362, dies entspricht der C-terminalen Hälfte des Moleküls. HyDsh: 1283nt entsprechend AS 288-715, die PDZ- und die DEP-Domäne einschließend. HyGSK3: 1558nt, das gesamte Molekül (442 Aminosäuren) umfassend HyChd: 1323nt entsprechend AS 779-1138 und dem 3'untranslatierten Bereich (UTR), dieser Abschnitt beinhaltet die drei cysteinreichen Chordin-Domänen. HySmad1: 816nt von AS 151-422, dies entspricht der Linker- und der MH2-Domäne. HyTSRP: ca. 1800nt, alle 10 Thrombospondin Typ1-Domänen umfassend.

5.6.2 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung

Tiere wurden mit 2%Urethan in Hydramedium (HM) 1min relaxiert, dann mit frischem 4% Paraformaldehyd in HM 24 Std. fixiert. Die fixierten Tiere wurden anschließend in Methanol bei -20°C bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt.

Nach der schrittweisen Rehydrierung (je 5min 75%,50%,25% Methanol in PBT[PBS + 0,1% Tween]) wurden die Tiere 3x5min in PBT gewaschen. Um das Gewebe für die Sonden besser zugänglich zu machen, wurde für 10min mit Proteinase K (Fa. Sigma) inkubiert (10µg/ml in PBT, Fa.Sigma) und die Reaktion anschließend mit Glycin gestoppt (4mg/ml in PBT). Nach Äquilibrierung in 0,1M Triethanolamin (TEA, 2x5min) wurde jeweils 5min mit 2,5µl/ml und 5µl/ml Essigsäureanhydrid in 0,1M TEA inkubiert. Nach Refixierung (20min 4%

Paraformaldehyd in HM) und 5x5min waschen in PBT wurden die Tiere in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5xSSC, 200µg/ml aufgereinigte Hefe-RNA, 1x Denhardt's, 100µg/ml Heparin, 0,1 % Tween, 0,1% CHAPS, 10% DEPC-H₂O) gebracht (10min 50/50 Hyb.-Lsg./PBT, 10min Hyb.-Lsg.). Die anschließende Prähybridisierung (100% Hyb.-Lsg.) erfolgte für mindestens 2 Std. bei 55°C im Wasserbad. Die Sonden wurden in einer Endkonzentration von 0,05ng/µl (HyWnt, HyDsh, HySmad1, HyGSK3), bzw. 0,025ng/µl (HyChd und HyTSRP) verwendet. Hybridisiert wurde 60-64 Std. bei 55°C. Nicht hybridisierte Sonde wurde zunächst mit schrittweise verdünnter Hybridisierungslösung (je 5min 100%, 75%, 50%, 25% in 2xSSC), schließlich mit 2xSSC + 0,1% CHAPS (3x30min) gewaschen. Alle Waschschritte erfolgten bei 55°C. Nach Äquilibrierung in Maleinsäuepuffer (MAB, pH 7,5, 2x10min) wurde ein Präblockierungsschritt durchgeführt (1 Std. MAB + 1% Rinderserumalbumin[BSA]), danach die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen (mindestens 2 Std. bei 4°C, 1% Blockierungsreagenz [Fa. Roche] in MAB). Zur Bindung an die markierten RNA-Sonden wurde ein Anti-Digoxigenin Antikörper mit konjugierter Alkalischer Phosphatase (Fa. Roche) in einer Verdünnung von 1:4000 in Blockierungslösung verwendet (4°C über Nacht). Ungebundener Antikörper wurde durch 12x30min + 1x über Nacht waschen mit MAB entfernt. In der anschließenden Farbreaktion wird durch die alkalische Phosphatase ein Substrat (NBT/BCIP, Fa. Roche) umgesetzt, wodurch sich ein blauer Niederschlag bildet. Für die Farbreaktion wurden die Tiere in alkalischen NTMT-Puffer (100mM NaCl, 100mM TRIS, pH 9,5; 50mM MgCl₂, 0,1% Tween, 1mM Levamisol [Fa. Sigma]) überführt (3x5min). Die Substratlösung wurde 1:75 in NTMT verdünnt, die Reaktion bei 37°C im Dunkeln durchgeführt. Die Präparate wurden periodisch unter einem Binokular betrachtet und die Reaktion nach variabler Färbedauer (meist zwischen 20 und 90min) mit 100% Ethanol beendet.

Zur Auswertung wurden die Tiere in PBS/Glycerin (1:9) gebracht und auf Objektträger montiert.

5.7 Mikroskopie und Fotografie

Die visuelle Auswertung der Präparate erfolgte an einem Axiovert 100 Mikroskop der Fa. Zeiss. Bilder wurden mit einer digitalen Spot Kamera, gesteuert durch die MetaMorph Software (Fa. Visitron), aufgenommen.

6 Literatur

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997). β -catenin is a target for the ubiquitine-proteasome pathway. *EMBO J* 16(13): 3797-3804
- Achermann, J., Sugiyama, T. (1985). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra* X. Morphogenetic potentials of a regeneration-deficient strain (reg-16). *Dev Biol* 107: 13-27
- Adams, J.C., Tucker, R.P. (2000). The Thrombospondin Type 1 Repeat (TSR) superfamily: Diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218: 280-299
- Arendt, D., Nübler-Jung, K. (1994). Inversion of dorsoventral axis? *Nature* 371: 26
- Arnold, S.J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B.G., Kemler, R. (2000). Brachyury is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mech Dev* 91: 249-258
- Axelrod, J.D. (2001). Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Gen Dev* 15: 1182-1187
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T., Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and *Wingless* signaling pathways. *Gen Dev* 12: 2610-2622
- Baker, J.C., Beddington, R.S.P., Harland, R.M. (1999). Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits *BMP4* expression and activates neural development. *Gen Dev* 13: 3149-3159
- Behrens, J., Jerchow, B.-A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D., Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an Axin homolog, Conductin, with β -Catenin, APC, and GSK3 β . *Science* 280: 596-599
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmaier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642
- Bhanot, P., Brink, M., Harryman Samos, C., Hsieh, J.-C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a *Wingless* receptor. *Nature* 382: 225-230
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I., Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar cell polarity and *wingless* signaling. *Cell* 94: 109-118
- Brook, W.J., Cohen, S.M. (1996). Antagonistic interactions between *wingless* and *decapentaplegic* responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science* 273: 1373-1377
- Browne, E.N. (1909). The production of new hydranths in *Hydra* by the insertion of small grafts. *J Exp Zool* 7: 1-24
- Cadigan, K.M., Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Gen Dev* 11:3286-3305
- Campbell, G., Tomlinson, A. (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by *brinker*. *Cell* 96: 553-562
- Chang, H., Matzuk, M.M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 104: 61-67
- Constam, D.B., Robertson, E.J. (1999). Regulation of Bone Morphogenetic Protein activity by prodomains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144(1): 139-149
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M.F., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell* 93: 1159-1170
- David, C.N. (1973). A quantitative method for maceration of *Hydra* tissue. *Roux Arch Dev Biol* 171: 259-268

- DeRobertis, E.M., Larrain, J., Oelgeschläger, M., Wessely, O. (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Gen* 1:171-181
- DeRobertis, E.M., Sasai, Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380: 37-40
- Dick, A.S., Hild, M., Bauer, H., Imai, Y., Maifeld, H., Schier, A.F., Talbot, W.S., Bouwmeester, T., Hammerschmidt, M. (2000). Essential role for Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Dev* 127: 343-354
- Ding, V.W., Chen, R.-H., McCormick, F. (2000). Differential regulation of Glycogen Synthase Kinase3 β by Insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem* 275(42). 32475-32481
- Fainsod, A., Deißler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H., Blum, M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene *follistatin* is an antagonist of *BMP-4*. *Mech Dev* 63: 39-50
- Faure, S., Lee, M.A., Keller, T., ten Dijke, P., Whitman, M. (2000). Endogenous pattern of TGF β superfamily signaling during early *Xenopus* development. *Dev* 127: 2917-2931
- Ferguson, E.L. (1996). Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates. *Curr Opin Gen Dev* 6: 424-431
- Francois, V., Bier, E. (1995). *Xenopus* chordin and *Drosophila* short gastrulation genes encode homologous proteins functioning in dorsal-ventral axis formation. *Cell* 80: 19-20
- Freeman, G. (1981). The role of polarity in the development of the hydrozoan planula larva. *Roux's Arch Dev Biol* 190: 168-184
- Fuß, B., Hoch, M. (1998). *Drosophila* endoderm development requires a novel homeobox gene which is a target of Wingless and Dpp signalling. *Mech Dev* 79: 83-97
- Gamse, J., Sive, H. (2000). Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neuroectoderm as a paradigm. *BioEssays* 22:976-986
- Gauchat, D., Kreger, S., Holstein, T.W., Galliot, B. (1998). *prdl-a*, a gene marker for *Hydra* apical differentiation related to triploblastic paired-like head-specific genes. *Dev* 125: 1637-1645
- Gierer, A., Berking, S., Bode, H.R., David, C.N., Flick, K.M., Hausmann, G., Schaller, H., Trenkner, E. (1972). Regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Nature New Biol* 239: 98-101
- Gierer, A., Meinhardt, H. (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12: 30-39
- Grimson, M.J., Coates, J.C., Reynolds, J.P., Shipman, M., Blanton, R.L., Harwood, A.J. (2000). Adherens junction and β -catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature* 408: 727-731
- Harwood, A.J., Plyte, S.E., Woodgett, J., Strutt, H., Kay, R.R. (1995). Glycogen Synthase Kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell* 80: 139-148
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Gen Dev* 12: 186-197
- Hawley, S.H.B., Wünnenberg-Stapleton, K., Hashimoto, C., Laurent, M.N., Watabe, T., Blumberg, B.W., Cho, K.W.Y. (1995). Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Gen Dev* 9: 2923-2935
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.-Y., Grinell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Wrana, J.L., Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* 89: 1165-1173
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C.Y., Wylie, C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of β -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79:791-803
- Heisenberg, C.-P., Tada, M., Rauch, G.-J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405: 76-81

- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., Melton, D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of Activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77: 283-295
- Hermans-Borgmeyer, I., Schinke, B., Schaller, H.C., Hoffmeister-Ullrich, S.A.H. (1996). Isolation of a marker for head-specific cell differentiation in *Hydra*. *Differentiation* 61: 95-101
- Hetman, M., Cavanaugh, J.E., Kimelman, D., Xia, Z. (2000). Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20: 2567-2574
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C.M., Cramer von Laue, C., Snyder, P., Rothbächer, U., Holstein, T.W. (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407: 186-189
- Hobmayer, E., Hatta, M., Fischer, R., Fujisawa, T., Holstein, T.W., Sugiyama, T. (1996). Identification of a *Hydra* homologue of the β -catenin/plakoglobin/armadillo gene family. *Gene* 172: 155-159
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.-S., Jin, O., Woodgett, J.R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 406: 86-90
- Holley, S.A., Jackson, P.D., Sasai, Y., Lu, B., DeRobertis, E.M., Hoffmann, F.M., Ferguson, E.L. (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving *sog* and *chordin*. *Nature* 376: 249-253
- Holstein T.W., David, C.N. (1990). Cell cycle length, cell size, and proliferation rate in *Hydra* stem cells. *Dev Biol* 142: 392-400
- Honegger, T.G., Zürrer, D., Tardent, P. (1989). Oogenesis in *Hydra carnea*: A new model based on light and electron microscopic analyses of oocyte and nurse cell differentiation. *Tissue&Cell* 21: 381-393
- Hooper, J.E. (1994). Distinct pathways for autocrine and paracrine Wingless signalling in *Drosophila* embryos. *Nature* 372: 461-464
- Hoppler, S., Moon, R.T. (1997). BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the *Xenopus* mesoderm. *Mech Dev* 71: 119-129
- Irish, V.F., Gelbart, W.M. (1987). The *decapentaplegic* gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Gen Dev* 1: 868-879
- Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S., Rushlow, C. (1999). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* 96: 563-573
- Kelly, C., Chin, A.J., Leatherman, J.L., Kozlowski, D.J., Weinberg, E.S. (2000). Maternally controlled β -catenin-mediated signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Dev* 127: 3899-3911
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., de la Pena, J., Johnson, R.L., Izpisua Belmonte, J.C., Tabin, C.-J. (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 280: 1274-1277
- Kim, H.-S., Nagalla, S.R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C.T., Rosenfeld, R.G. (1997). Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): Characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Nat Acad Sci* 94: 12981-12986
- Kishimoto, Y., Lee, K.-H., Zon, L., Hammerschmidt, M., Schulte-Merker, S. (1997). The molecular nature of zebrafish *swirl*: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Dev* 124: 4457-4466
- Klein, P.S., Melton, D.A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Nat Acad Sci* 93: 8455-8459
- Knoll, A.H., Carroll, S.B. (1999). Early animal evolution: Emerging views from comparative biology and geology. *Science* 284: 2129-2137

- Kolle, G., Georgas, K., Holmes, G.P., Little, M.H., Yamada, T. (2000). CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis. *Mech Dev* 90: 181-193
- Krylova, O., Messenger, M.J., Salinas, P.C., (2000). Dishevelled-1 regulates microtubule stability: A new function mediated by Glycogen Synthase Kinase 3 β . *J Cell Biol* 151: 83-93
- Labbé, E., Letamendia, A., Attisano, L. (2000). Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways. *PNAS* 97(15): 8358-8363
- Larabell, C.A., Torres, M., Rowning, B.A., Yost, C., Miller, J.R., Wu, M., Kimelman, D., Moon, R.T. (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in β -Catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* 136: 1123-1136
- Larrain, J., Bachiller, B., Lu, B., Agius, E., Piccolo, S., DeRobertis, E.M. (2000). BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Dev* 127: 821-830
- Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Op Cell Biol* 12:634-640
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., Hogan, B.L.M. (1999). BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Gen Dev* 13: 424-436
- Lecuit, T., Cohen, S.M. (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* 388: 139-145
- Lessing, D., 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. *Dev* 125: 1469-1476
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C.D., Mao, J., Farr, G.H., Sussman, D.J., Jonkers, J., Kimelman, D., Wu, D. (1999). Axin and FRAT1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* 18 (15): 4233-4240
- Li, M., Wang, X., Meintzner, M.K., Laessig, T., Birnbaum, M.J., Heidenreich, K.A. (2000). Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase3 β . *Mol Cell Biol* 2: 9356-9363
- Liem, K.F., Tremmi, G., Roelink, H., Jessell, T.M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGF- β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91: 127-138
- Littlefield, C.L. (1991). Cell lineages in *Hydra*: Isolation and characterization of an interstitial stem cell restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Dev Biol* 143: 378-388
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R., Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Gen* 22: 361-365
- Liu, T., DeConstanzo, A.J., Liu, X., Wang, H., Hallagan, S., Moon, R.T., Malbon, C.C. (2001). G Protein signaling from activated rat frizzled-1 to the β -catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* 292: 1718-1722
- Logan, C.Y., Miller, J.R., Ferkowicz, M.J., McClay, D.R. (1999). Nuclear β -catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Dev* 126: 345-357
- Lucas, F.R., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., Salinas, P.C. (1998). Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by Wnt-7a or lithium. *J Cell Sci* 111: 1351-1361
- MacWilliams, H.K. (1983). *Hydra* transplantation phenomena and the mechanism of *Hydra* head regeneration II. Properties of the head activation. *Dev Biol* 96: 239-257
- Makita, R., Mizuno, T., Koshida, S., Kuroiwa, A., Takeda, H. (1998). Zebrafish *wnt11*: pattern and regulation by the yolk cell and No Tail activity. *Mech Dev* 71: 165-176

- Martin, V.J., Littlefield, C.L., Archer, W.E., Bode, H.R. (1997). Embryogenesis in *Hydra*. Biol Bull 192: 345-363
- Martinez, D.E., Dirksen, M.-L., Bode, P.M., Jamrich, M., Steele, R.E., Bode H.R. (1997). *Budhead*, a forkhead/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in *Hydra*. Dev Biol 192: 523-536
- Massague, J. (1998). TGF β signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-791
- Matova, N., Cooley, L. (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. Dev Biol 231: 291-320
- McGinnis, W., Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. Cell 68: 283-302
- Miller M.A., Technau, U., Smith, K.M., Steele, R.E. (2000). Oocyte development in *Hydra* involves selection from competent precursor cells. Dev Biol 224: 326-338
- Minobe, S., Fei, K., Yan, L., Sarras, M.P., Werle, M.J. (2000). Identification and characterization of the epithelial polarity receptor "Frizzled" in *Hydra vulgaris*. Dev Gen Evol 210: 258-262
- Mochizuki, K., Nishima-Fujisawa, C., Fujisawa, T. (2001). Universal occurrence of the *vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. Dev Gen Evol 211: 299-308
- Mochizuki, K., Sano, H., Kobayashi, S., Nishima-Fujisawa, C., Fujisawa, T. (2000). Expression and evolutionary conservation of *nanos*-related genes in *Hydra*. Dev Gen Evol 210: 591-602
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. Cell 86: 391-399
- Morgan, R., Hooiveld, M.H.W., In der Rieden, P., Durston, A.J. (1999). A conserved 30bp element in the *Wnt-5a* promoter is sufficient both to drive its early embryonic expression and to mediate its repression by *otx2*. Mech Dev 85: 97-102
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., Sugino, H. (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. Science 247: 836-838
- Nakayama, N., Han, E.E., Scully, S., Nishinakamura, R., He, C., Zeni, L., Yamane, H., Chang, D., Yu, D., Yokota, T., Wen, D. (2001). A novel Chordin-like protein inhibitor of Bone Morphogenetic Proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. Dev Biol 232: 372-387
- Nellen, B., Burke, R., Struhl, G., Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. Cell 85: 357-368
- Neumann, C., Cohen, S.M. (1997a). Morphogens and pattern formation. BioEssays 19(8): 721-729
- Neumann, C.-J., Cohen, S.M. (1997b). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. Dev 124: 871-880
- Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H., Cho, K.W.Y. (2000). Interaction between Wnt and TGF- β signalling pathways during formation of Spemann's organizer. Nature 403: 781-785
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. Nature 275: 795-801
- Orii, H., Kato, K., Agata, K., Watanabe, K. (1998). Molecular cloning of Bone Morphogenetic Protein (BMP) from the planarian *Dugesia japonica*. Zool Sci 15: 871-877
- Otto, J.J., Campbell, R.D. (1977). Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. J Exp Zool 200: 417-428
- Pap, M., Cooper, G.M. (1998). Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. J Biol Chem 273(32): 19929-19932
- Pelegri, F., Maischein, H.-M. (1998). Function of zebrafish β -catenin and Tcf-3 in dorsoventral patterning. Mech Dev 77: 63-74
- Pera, E.M., DeRobertis, E.M. (2001). A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos reveals a role for IGF signalling in anterior development. Abstract GFE-Tagung Ulm 2001

- Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L., DeRobertis, E.M. (1997). Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* 91: 407-416
- Posakony, L.G., Raftery, L.A., Gelbart, W.M. (1990). Wing formation in *Drosophila melanogaster* requires *decapentaplegic* gene function along the anterior-posterior compartment boundary. *Mech Dev* 33: 69-82
- Rentzsch, F. (1998). Klonierung und Charakterisierung der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) aus *Hydra*. Diplomarbeit Universität Frankfurt
- Rentzsch, F., Holstein, T.W., Hobmayer, B. (2001). Identification and expression of *HySmad1*, a member of the R-Smad family of TGF β signal transducers, in the diploblastic metazoan *Hydra*. eingereicht bei Dev Gen Evol
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Le Meur, M., Ang, S.-L. (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Dev* 125: 845-856
- Riese, J., Yu, X., Munneryn, A., Eresh, S., Hsu, S.-C., Grosschedl, R., Bienz, M. (1997). LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from *wingless* and *decapentaplegic*. *Cell* 88: 777-787
- Rocheleau, C.E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.-H., Ali, M., Priess, J.R., Mello, C.C. (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* 90: 707-716
- Rothbacher, U., Laurent, M.N., Deardorff, M.A., Klein, P.S., Cho, K.W.Y., Fraser, S.E. (2000). Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBO J* 19: 1010-1022
- Royet, J., Finkelstein, R. (1996). *hedgehog*, *wingless* and *orthodenticle* specify adult head development in *Drosophila*. *Dev* 122: 1849-1858
- Rushlow, C., Colosimo, P.F., Lin, M.-C., Xu, M., Kirov, N. (2001). Transcriptional regulation of the *Drosophila* gene *zen* by competing Smad and Brinker inputs. *Gen Dev* 15: 340-351
- Sacks, P.G., Davis, L.E. (1979). Production of nerveless *Hydra attenuata* by Hydroxyurea treatment. *J Cell Sci* 37: 189-203
- Saint Hillaire, E.G. (1822). Considérations générales sur la vertèbre. *Mem du Mus hist Nat* 9: 89-119
- Salic, A., Lee, E., Mayer, L., Kirschner, M.W. (2000). Control of β -Catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the Wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 5: 523-532
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schlesinger, A., Shelton, C.A., Maloof, J.N., Meneghini, M., Bowerman, B. (1999). *Wnt* pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo without requiring gene transcription in the responding cell. *Gen Dev* 13: 2028-2038
- Seidensticker, M.J., Behrens, J. (2000). Biochemical interactions in the *wnt* pathway. *Biochim Biophys Acta* 1495: 168-182
- Shenk, M.A., Bode, H.R., Steele, R.E. (1993b). Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX homeobox gene in *Hydra*, is correlated with axial pattern formation. *Dev* 117: 657-667
- Shenk, M.A., Gee, L., Steele, R.E., Bode, H.R. (1993a). Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX gene, is suppressed during head formation in *Hydra*. *Dev Biol* 160: 108-118
- Shulman, J.M., Perrimon, N., Axelrod, J.D. (1998). Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity. *Trends Gen* 14(11): 452-458
- Slack, J.M., Holland, P.W., Graham, C.F. (1993). The zootype and the phylotypic stage. *Nature* 361: 490-492
- 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*. *Dev Biol* 212: 392-404

- Smith, K.M., Gee, L., Bode, H.R. (2000). *HyAlx*, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in *Hydra*. *Dev* 127: 4743-4752
- Suga, H., Ono, K., Miyata, T. (1999). Multiple TGF- β receptor related genes in sponge and ancient gen duplications before the parazoan-eumetazoan split. *FEBS Let* 453: 346-350
- Sugiyama, T., Fujisawa, T. (1977a). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra* I. Sexual reproduction of *Hydra magnipapillata* and isolation of mutants. *Dev Growth Diff* 19(3): 187-200
- Sugiyama, T., Fujisawa, T. (1977b). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra* III. Characterization of a regeneration-deficient strain. *J Embryol Exp Morph* 42: 65-77
- Sugiyama, T., Fujisawa, T., (1978). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra*. II. Isolation and characterization of an interstitial cell-deficient strain. *J Cell Sci* 29: 35-52
- Suzuki, A., Thies, R.S., Yamayi, N., Song, J.J., Wozney, J.M., Murakami, K., Ueno, N. (1994). A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Nat Acad Sci* 91: 10255-10259
- Tada, M., Smith, J.C. (2000). *Xwnt11* is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Dev* 127: 2227-2238
- Technau, U., Bode, H.R., (1999). *HyBral*, a *Brachyury* homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Dev* 126: 999-1010
- Technau, U., Cramer von Laue, C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., Bode, H.R., Holstein, T.W. (2000). Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates. *Proc Nat Acad Sci* 97(22): 12127-12131
- Thorpe, C.J., Schlesinger, A., Carter, J.C., Bowerman, B. (1997). Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* 90: 695-705
- Torres, M.A., Nelson, W.J. (2000). Colocalization and redistribution of Dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *J Cell Biol* 149: 1433-1442
- Turing, A.M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Phil Trans Roy Soc (London)* 237: 37-72
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M., Clevers, H. (1997). *Armadillo* coactivates transcription driven by the product of the segment polarity gene dTCF. *Cell* 88: 789-799
- Wagner, U., Utton, M., Gallo, J.-M., Miller, C.C.J. (1996). Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 β influences tau binding to microtubules and microtubule organisation. *J Cell Sci* 109: 1527-1543
- Wallingford, J.B., Rowing, B.A., Vogeli, K.M., Rothbächer, U., Fraser, S.E., Harland, R.M. (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405: 81-85
- Wanek, N., Nishima, C., Achermann, J., Sugiyama, T. (1986). Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra* XIII. Identification of the cell lineages responsible for the reduced regenerative capacity in a mutant strain, reg-16. *Dev Biol* 115: 459-468
- Wessely, O., Agius, E., Oelgeschlaeger, M., Pera, E.M., DeRobertis, E.M. (2001). Neural induction in the absence of mesoderm: β -Catenin dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev Biol* 234: 161-173
- Whitman, M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily. *Gen Dev* 12: 2445-2462
- Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D., Luo, L. (2001). *Drosophila* Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* 105: 81-91
- Xie, T., Spradling, A.C. (1998). *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* 94: 251-260

- Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikada, Y., Wu, N., McMahon, A.P. (1999). T(Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Gen Dev* 13: 3185-3190
- Yanagawa, S.-I., van Leuwen, F., Wodarz, F., Klingensmith, J., Nusse, R. (1995). The Dishevelled protein is modified by *wingless* signaling in *Drosophila*. *Gen Dev* 9: 1087-1097
- Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J., Moon, R.T. (1996). A *frizzled* homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6:1302-1306
- Yoffe, K.B., Manoukian, A.S., Wilder, E.L., Brand, A.H., Perriman, N. (1995). Evidence for *engrailed*-independent *wingless* autoregulation in *Drosophila*. *Dev Biol* 170: 636-650
- Zecca, M., Basler, K., Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* 87: 833-844
- Zimmerman, L.B., DeJesus-Escobar, J.M., Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599-606

Abkürzungen

Namen von Genen, Proteinen und Proteindomänen

Alx	aristaless homologes Gen
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bra	Brachyury
Chd	Chordin
CR	chordinartiger cysteinreicher repeat
CRIM1	cystein rich motoneuron
DEP	Dishevelled/egl-10/pleckstrin –Domäne (Proteinmotiv)
DIX	Dishevelled/Axin-Domäne (Proteinmotiv)
Dpp	Decapentaplegic
Dsh	Dishevelled
GBP	GSK3 binding protein
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
IGF	Insulin-like Growth Factor
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
Mad	Mothers against decapentaplegic
Otx	orthodenticle homologes Gen
PCP	planar cell polarity
PDZ	PSD-95/discs large/Zonula occludens1-Domäne (proteinmotiv)
R-, Co-. I-Smad	rezeptoraktiviertes, kollaborierendes, inhibitorisches Smad
Smad	Kunstwort aus SMA und Mad
Sog	short gastrulation
Tcf	T-Cell Factor
TGFbeta	Transforming Growth Factor beta
TM	Transmembrandomäne
TSRP	Trombospondin Repeat Protein
vWFc	von Willebrand Factor Typ C (Proteinmotiv)
Wg	wingless
Wnt	Kunstwort aus wingless und int-1

Chemikalien und allgemeine Abkürzungen

AO	Acridin Orange
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
CHAPS	3-(3-choloamidopropyl)diethylammonio-1propansulfonat (nichtionisches Detergens)
cDNA	(zu mRNA) komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat (RNase-Inhibitor)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HU	Hydroxyharnstoff
I-Zellen	interstitielle Zellen
KL	Körperlänge
MAB	Maleinsäurepuffer
Nt	Nukleotid
NTMT	NaCl, Tris, MgCl ₂ , Tween (Puffer)
PBS	Phosphate buffered saline (Puffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion)
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
SSC	Natriumchlorid, Natriumcitrat-Puffer
SP	Signalpeptid
St.	Stadium
Std	Stunden
TEA	Triethanolamin (Puffer)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Puffer)

Lebenslauf

- 7.6.1969 geboren in Frankfurt am Main
- 1975-1979 Ludwig Uhland-Schule, Neu-Isenburg
- 1979-1988 Albert Schweitzer-Schule, Offenbach am Main, Abschluss mit Abitur
- 9/1988- 4/90 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisverband Offenbach
- WS 1990-1/98 Studium der Biologie and der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
1992 Vordiplom, 1997 Diplomprüfungen in Zoologie, Humangenetik und Pharmazie, 1997-98 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Zell- und Entwicklungsbiologie bei Prof. Holstein, Titel: "Klonierung und Charakterisierung der Glycogen Synthase Kinase3 (GSK3) aus Hydra"
- 1998-2001 Promotion in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie (Prof. Holstein) am Zoologischen Institut der Technischen Universität darmstadt; Titel: "Achsenbildung in Cnidariern: Die Rolle der Wnt- und BMP/Chordin-Signaltransduktionswege"

Danksagung

Zu viele Menschen haben einen Beitrag zum Gelingen (?) dieser Arbeit geleistet, als dass ich sie alle namentlich erwähnen könnte.

Danken möchte ich Prof. Thomas Holstein für die ausgezeichneten Bedingungen, unter denen ich diese Arbeit anfertigen konnte. Ihm und Dr. Bert Hobmayer, die dieses Projekt in die Wege geleitet haben, gilt auch mein Dank für die kompetente Unterstützung und Betreuung in allen Phasen dies Projekts.

Vielen Dank auch an Christoph Laue, Dr. Barbara Kostron, Dr. Kerstin Kuhn, Beate Reinhardt und Dr. Ulrich Technau für die Mitteilung unveröffentlichter Daten.

Der größte und wichtigste Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Labormitgliedern für die vielgestaltige Unterstützung wissenschaftlicher und vor allem nichtwissenschaftlicher Art. Sekt folgt! Das gilt auch für all diejenigen, die mir außerhalb des Labors zur Seite gestanden haben, vielen Dank, Ihr habt's geschafft.