

**Knospung-steuernde Gene aus *Hydra vulgaris*:
Ein evolutionsgeschichtlich alter FGFR kontrolliert die
Knospenablösung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stefanie Sudhop

aus Sulingen

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am:
27.06.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	10
2.1	FIBROBLASTEN-WACHSTUMSFAKTOR (FGF)-REZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN	10
2.1.1	<i>Molekulare Struktur von FGF-Rezeptoren (FGFR)</i>	10
2.1.2	<i>Isoformen von FGF-Rezeptoren</i>	13
2.1.3	<i>Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF)</i>	15
2.1.4	<i>Evolution von FGF und FGF-Rezeptoren</i>	18
2.1.5	<i>Aktivierung der FGF-Rezeptoren durch FGF</i>	19
2.1.5.1	Bindung der Liganden an den FGF-Rezeptor	19
2.1.5.2	Aktivierung der Proteinkinase-Domäne	20
2.1.6	<i>Signalübertragung via FGF/FGF-Rezeptoren</i>	21
2.1.6.1	Aktivierung von Phospholipase C _γ (PLC _γ)	21
2.1.6.2	Signalübertragung durch das Adapterprotein FRS2	21
2.1.6.3	Das Adapterprotein Dof in Drosophila	23
2.1.7	<i>Biologische Funktionen der FGF/FGF-Rezeptor-Signalübertragung</i>	23
2.2	HYDRA ALS ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHER MODELLORGANISMUS	25
2.2.1	<i>Körperbau und Lebensweise von Hydra</i>	25
2.2.2	<i>Entwicklungsprozesse in der adulten Hydra</i>	27
2.2.2.1	Hydra, der „immerwährende Embryo“	27
2.2.2.2	Regeneration	28
2.2.2.3	Entwicklung von Polypen aus dissoziierten Einzelzellen	28
2.2.2.4	Knospung	29
2.2.2.4.1	Morphologische Knospenstadien nach Otto und Campbell (1977)	29
2.2.2.4.2	Knospung wird durch Zellwanderung möglich	31
2.2.2.4.3	Knospungsrelevante Gene in Hydra	32
2.2.2.5	Modelle zur Musterbildung in Hydra	34
2.3	ZIEL DER ARBEIT	36
3	Ergebnisse	38
3.1	IDENTIFIZIERUNG KNOSPUNGSRELEVANTER GENE BEI HYDRA	38
3.1.1	<i>Konstruktion von Knospungs- und Fuß-spezifischen cDNA-Banken</i>	39
3.1.2	<i>Mittels Expressionsscreening konnten in allen drei Banken regiospezifisch exprimierte Gene nachgewiesen werden</i>	39
3.1.3	<i>Die Splice Leader-Sequenzen von Hydra vulgaris sind nicht geeignet zur Identifikation von Genen, deren Produkte in Signalkaskaden aktiv sind</i>	48

3.2	CHARAKTERISIERUNG VON <i>KRINGELCHEN</i>	52
3.2.1	<i>kringelchen</i> codiert für einen putativen FGF-Rezeptor.....	52
3.2.2	<i>kringelchen</i> ist ein „single copy“-Gen.....	57
3.2.3	<i>kringelchen</i> wird von mindestens 17 Exons codiert.....	57
3.2.4	<i>kringelchen</i> wird während der Knospung in einem dynamisch regulierten Muster exprimiert.....	59
3.2.5	<i>kringelchen</i> wird auf geringem Niveau im ganzen Polypen exprimiert.....	62
3.2.6	Das Expressionsmuster von <i>kringelchen</i> kann durch Eingriffe in den Knospungsvorgang verändert werden.....	62
3.2.7	Die spezifische biochemische oder translationelle Inhibition von <i>Kringelchen</i> verhindert die Knospenablösung.....	65
3.2.8	Expression von <i>kringelchen</i> während der Regeneration.....	71
3.2.8.1	Im Zuge der Kopfregeneration korreliert die Expression von <i>kringelchen</i> in etwa mit der Etablierung des Organisators.....	71
3.2.8.1.1	Die Kopfdeterminierung ist unter unseren Hälterungsbedingungen verzögert.....	74
3.2.8.2	<i>kringelchen</i> wird während der Fußregeneration transkribiert.....	75
3.2.8.3	<i>kringelchen</i> wird nicht durch Wundheilung induziert.....	79
3.2.8.4	Die <i>kringelchen</i> -Expression wird bei der Regeneration von Hydragewebe aus Einzelzellen dynamisch reguliert.....	79
3.2.9	Analyse des <i>Kringelchen</i> -Proteins in <i>Hydra</i>	82
3.2.9.1	Über polyklonale Antiseren war kein Nachweis des Rezeptors möglich.....	82
3.2.9.2	Die Bindung von biotinyliertem Wirbeltier-FGF an Hydragewebe erzeugt Muster, die mit den Expressionsdomänen von <i>kringelchen</i> überlappen.....	85
3.2.10	Isolierung eines FGF aus <i>Hydra vulgaris</i>	89
3.2.10.1	Über PCR konnte ein cDNA-Fragment aus <i>Hydra vulgaris</i> isoliert werden, das große Ähnlichkeit zur konservierten Core-Region von FGF besitzt.....	89
3.2.10.2	HvFGF wird nicht im Bereich des Hypostoms exprimiert.....	92
4	Diskussion	94
4.1	IDENTIFIKATION VON KNOSPUNGSRELEVANTEN GENEN.....	94
4.1.1	Das Expressionsscreening ist geeignet, Gene zu identifizieren, die während der Knospung aktiv sind.....	94
4.1.2	Die Splice Leader-Sequenzen von <i>Hydra</i> eignen sich nicht zur spezifischen Identifikation von Genen, die während der Morphogenese aktiviert werden.....	96
4.2	FGF/FGFR-SIGNALÜBERTRAGUNG IN HYDRA.....	98
4.2.1	Strukturelle Eigenschaften von <i>Kringelchen</i> identifizieren es als FGF-Rezeptor.....	98
4.2.2	Ein Modell zur Einbindung von <i>Kringelchen</i> in mögliche Signalwege bei <i>Hydra</i>	101
4.2.3	Signale der Verzweigungsmorphogenese: <i>Hydra</i> und Wirbeltiere im Vergleich.....	105

4.2.4	<i>Die Inhibition von Kringelchen verhindert spezifisch die Knopsenablösung.....</i>	107
4.2.5	<i>Kringelchen wird möglicherweise durch eine autokatalytische Rückkopplung reguliert</i>	109
4.2.6	<i>Die Expression von kringelchen steht im Zusammenhang mit der Änderung des Positionswertes.....</i>	112
4.2.7	<i>kringelchen, Hybr1 und die Gene der kanonischen Wnt-Signalkaskaden werden einem mathematischen Modell entsprechend in Aggregaten koexprimiert.....</i>	115
4.3	AUSBLICK.....	116
5	Material und Methoden	118
5.1	MATERIAL.....	118
5.1.1	<i>Versuchstiere</i>	118
5.1.2	<i>Bakterienstämme</i>	118
5.1.3	<i>Insektenzelllinien</i>	118
5.1.4	<i>Vektoren.....</i>	118
5.1.5	<i>Oligonukleotide</i>	118
5.1.6	<i>DNA- und RNA-Größenstandards.....</i>	119
5.1.7	<i>Enzyme.....</i>	119
5.1.8	<i>Antikörper und Seren.....</i>	120
5.1.9	<i>Chemikalien.....</i>	120
5.1.10	<i>Spezielle Chemikalien</i>	121
5.1.11	<i>Gebrauchsfertige Kits</i>	121
5.1.12	<i>Zellkulturmedien.....</i>	121
5.1.13	<i>Spezielle Geräte.....</i>	122
5.1.14	<i>Lösungen und Medien</i>	122
5.1.15	<i>Internetdatenbanken.....</i>	130
5.2	METHODEN.....	130
5.2.1	<i>Hälterung von Hydra.....</i>	130
5.2.2	<i>Experimente an Hydra.....</i>	131
5.2.2.1	<i>Herstellung von Regeneraten</i>	131
5.2.2.2	<i>Herstellung von Aggregaten</i>	131
5.2.2.3	<i>Transplantationsexperimente</i>	131
5.2.2.4	<i>Fußspezifischer Peroxidasetest</i>	131
5.2.2.5	<i>Inkubation mit SU5402.....</i>	132
5.2.2.6	<i>Elektroporation von Antisense-Oligonukleotiden</i>	132
5.2.2.7	<i>In vivo-Bindung von biotinylierten FGF an Hydragewebe</i>	133
5.2.2.7.1	<i>Biotinylierung von FGF.....</i>	133
5.2.2.7.2	<i>In vivo-Bindung</i>	133

5.2.2.8	Mazeration	134
5.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	135
5.2.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	135
5.2.3.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus Hydra	135
5.2.3.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hydra	135
5.2.3.1.3	Isolierung von mRNA aus Hydra	136
5.2.3.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	136
5.2.3.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	136
5.2.3.3	Klonierung	137
5.2.3.3.1	Restriktion von DNA	137
5.2.3.3.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	137
5.2.3.3.3	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	137
5.2.3.3.4	Ligation	137
5.2.3.3.5	Herstellung kompetenter Bakterien	137
5.2.3.3.6	Transformation von Bakterien	138
5.2.3.3.7	Blau-Weiß-Selektion	138
5.2.3.4	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	138
5.2.3.4.1	Agarosegele zur Auftrennung von DNA	138
5.2.3.4.2	Agarosegele zur Auftrennung von RNA	138
5.2.3.4.3	Denaturierende Polyacrylamid (PAA)-Gele	139
5.2.3.5	Sequenzierung von DNA	139
5.2.3.5.1	Sequenzanalyse und Datenbanksuche	139
5.2.3.6	Analyse immobilisierter Nukleinsäuren	139
5.2.3.6.1	Southern Blot	139
5.2.3.6.2	Northern Blot	140
5.2.3.6.3	Radioaktive Markierung von DNA durch „ <i>random priming</i> “	140
5.2.3.6.4	Filterhybridisierung	140
5.2.3.6.5	Detektion von Nukleinsäuren (radioaktiv-markierte Sonden)	140
5.2.3.6.6	Methylenblau-Färbung	140
5.2.3.6.7	Herstellung und Hybridisierung von DNA-Makroarrays	140
5.2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	141
5.2.3.7.1	Standard-PCR	141
5.2.3.7.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	141
5.2.3.7.3	PCR mit degenerierten Primern	142
5.2.3.8	Herstellung von cDNA-Banken	142
5.2.3.9	Genexpressionsscreening	142
5.2.3.9.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung	142

5.2.4	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	144
5.2.4.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Hydra.....	144
5.2.4.2	Herstellung prokaryontisch exprimierter Proteine.....	144
5.2.4.2.1	Expression von rekombinantem Protein.....	144
5.2.4.2.2	Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen.....	144
5.2.4.2.3	Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen.....	145
5.2.4.2.4	Aufreinigung rekombinanter Proteine über NTA-Agarose.....	145
5.2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	145
5.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	146
5.2.4.5	Western Blot (Westermeier, 1991).....	146
5.2.4.6	Immundetektion von immobilisierten Proteinen.....	147
5.2.4.7	Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen.....	147
5.2.4.7.1	Immunisierung von Kaninchen.....	147
5.2.4.7.2	Aufreinigung von Kaninchenseren über Protein A.....	147
5.2.4.7.3	Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenseren über Affinitätschromatographie.....	148
5.2.4.7.3.1	Kopplung von Peptiden an Iodoacetyl.....	148
5.2.4.7.3.2	Affinitätschromatographie von Antikörpern aus Kaninchenseren.....	148
5.2.5	<i>Herstellung von Semidünnschnitten</i>	148
5.2.6	<i>Kultur von Insektenzellen</i>	149
5.2.6.1	Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA.....	149
5.2.6.2	Kultivierung von SF9-Zellen.....	149
5.2.6.3	Transfektion rekombinanter viraler DNA in Insektenzellen.....	149
6	<i>Abkürzungen</i>	151
7	<i>Literatur</i>	154
8	<i>Anhang</i>	178
8.1	SEQUENZDATEN DER AUS DEM GENEXPRESSIONSSCREENING STAMMENDEN CDNAS.....	178
8.2	CDNAS, DIE IM RAHMEN DES <i>SPLICE LEADER-SCREENINGS</i> IDENTIFIZIERT WURDEN.....	183
8.3	GENOMISCHE SEQUENZ VON <i>KRINGELCHEN</i>	187
9	<i>Danksagung</i>	193
10	<i>Erklärung</i>	195

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Erkenntnisse über molekulare Abläufe bei der Musterbildung von Hydra zu erweitern. Da fast alle Musterbildungsprozesse während der Knospung aktiviert werden, stellte dieser Prozess den Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen dar.

Zunächst sollten über unspezifische *Screening*-Verfahren solche Gene identifiziert werden, die möglicherweise an der Steuerung der Knospenbildung beteiligt sind. Über ein *Expressions-Screening* konnten verschiedene Gene isoliert werden, die während der Knospung transkriptionell aktiv sind. Dagegen erwies sich ein *Array-Screening* nach *Splice Leader*-Sequenzen, die am 5'-Ende verschiedener Hydra-mRNAs angefügt sind, als ungeeignet für die gezielte Identifikation von Genen, die als Operons während der Morphogenese aktiviert werden.

In einem zweiten Projekt wurde ein Gen (*kringelchen*) im Detail charakterisiert, das über Sequenzanalysen der Familie der FGF-Rezeptor-Gene zugeordnet werden konnte. *kringelchen* wird während der Knospung hochdynamisch exprimiert: In der frühen Knospe wird es zunächst diffus exprimiert, konzentriert sich aber bald auf die Knospenspitze, die als Organisator fungiert, und bleibt dort nachweisbar bis die Differenzierung der Kopfstrukturen beginnt. Eine zweite ringförmige Expressionsdomäne bildet sich an der Knospenbasis. Die Ablösestelle wird im Elterntier noch etwa zwei Stunden nach Knospenablösung durch exprimierende Zellen markiert. Dieses Expressionsmuster wies auf eine komplexe Funktion von *kringelchen* während der Knospung hin. Ein Regenerationsexperiment gab einen ersten Hinweis darauf, dass die ringförmige Expressionsdomäne an der Knospenbasis mit einer korrekten Knospenablösung korreliert ist. Tatsächlich konnte über Inhibition gezeigt werden, dass *Kringelchen* für eine korrekte Knospenablösung essentiell ist. Allerdings wurden weder Determination und Auswachsen der Knospe noch die Differenzierung von Kopfstrukturen beeinflusst.

Die Analyse der *Kringelchen*-Expression in Regeneraten und sich entwickelnden Zellaggregaten zeigte, dass *kringelchen* im Bereich des Kopforganisators exprimiert ist, aber nicht an der Etablierung dieser Region beteiligt ist, und wies darauf hin, dass *Kringelchen* an der Determinierung von Kopf- und Fußstrukturen beteiligt ist. Da in differenzierten Strukturen keine Expression nachweisbar war, kann *Kringelchen* nicht an der Erhaltung von bestehenden Strukturen, sondern nur an der Neubildung beteiligt sein.

Die Tatsache, dass eine Inhibition von *Kringelchen* allein die Knospenablösung beeinflusst, führte im Zusammenhang mit der Analyse von koexprimierten Genen zu der Hypothese, dass der Hydra-FGFR über unterschiedliche Signalkaskaden wirkt: Für die Knospenablösung ist die Signalweiterleitung über *Kringelchen* an der Knospenbasis

essentiell, während im Bereich des Kopforganisators eine Inhibition kompensiert werden kann.

Eine *in vivo*-Bindung von heterolog exprimiertem aFGF an Hydragewebe führte zu aFGF-Bindungsmustern, die in Teilen mit den Expressionsdomänen von *kringelchen* überlappten, was auf ein FGF-bindendes Hydra-Protein hinwies, bei dem es sich möglicherweise um Kringelchen handeln könnte.

Die Isolierung einer *HvFGF*-cDNA gab einen Hinweis, darauf, dass dieser potentielle Ligand für Kringelchen in verschiedenen Knospenstadien differentiell reguliert wird. Ein Teil der Expressionsdomänen lässt darauf schließen, dass Kringelchen und HvFGF miteinander interagieren können.

Mit Kringelchen ist der erste FGF-Rezeptor eines diploblastischen Organismus im Detail charakterisiert worden. Dieser Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Ablösung der Knospe vom Elterntier, was darauf hindeutet, dass Signalübertragung via FGF/FGFR schon in diploblastischen Organismen an der Regulation der Morphogenese beteiligt ist.

2 Einleitung

Die Entwicklung eines vielzelligen Organismus umfasst eine Vielzahl von Prozessen wie Zellteilung, Musterbildung, Morphogenese, Zelldifferenzierung und Wachstum. Die Steuerung solcher Entwicklungsprozesse erfolgt vor allem durch genetische Mechanismen, wobei häufig eine differentielle Expression von relevanten Genen beobachtet werden kann (Wolpert et al., 2001). Alle bisher untersuchten Tiere benutzen sehr ähnliche molekulare Maschinerien, um basale Entwicklungsprozesse zu steuern (Holland, 1999). Um die Evolution dieser Signalwege und der zugehörigen Entwicklungsprozesse zu verstehen, rückt die Untersuchung entwicklungsrelevanter Gene bei Vertretern phylogenetisch basaler Tiergruppen zunehmend ins Zentrum des Interesses.

2.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Rezeptoren und ihre Liganden

Ein Beispiel für solche im Tierreich konservierten Gene sind die der FGF-Rezeptoren (FGFR). Sie gehören zu den Proteinen, die sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten für viele grundlegende Prozesse der Embryogenese und Organogenese essentiell sind. Im Zusammenspiel mit ihren Liganden, den Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) sind FGFR unter anderem an der Ausbildung des Mesoderms, der Bildung von Gliedmaßen und der Differenzierung verschiedener Gewebe beteiligt. Im adulten Tier sind sie in Wundheilung und Angiogenese involviert, spielen aber auch eine Rolle bei pathologischen Prozessen wie Tumorbildung oder -metastasierung (Übersichtsartikel: Powers et al., 2000; Thisse und Thisse, 2005).

2.1.1 Molekulare Struktur von FGF-Rezeptoren (FGFR)

Bei Vertebraten wurden vier FGF-Rezeptoren identifiziert (FGFR 1-4), denen charakteristische strukturelle Merkmale gemeinsam sind. Diese Rezeptoren sind in einen extrazellulären Teil mit Ligandenbindestelle, eine einzelne Transmembrandomäne und einen intrazellulären Teil, der enzymatisch aktiv ist und konservierte Bindestellen für Ziel- oder Adapterproteine aufweist, gegliedert (Abb. 2.1).

Am N-Terminus des Rezeptors befindet sich ein hydrophobes Signalpeptid, das für den Transport ins Endoplasmatische Retikulum notwendig ist und dort abgespalten wird (Lodish et al., 1995). Die extrazelluläre Domäne ist durch drei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Schleifen (D1-D3) gekennzeichnet, die über Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen aufgebaut

werden. Diese Schleifen sind durch kurze Linkersequenzen voneinander getrennt. An der FGF-Bindung sind die Ig-ähnlichen Domänen D2 und D3, sowie der dazwischen liegende Linkerbereich beteiligt (Plotnikov et al., 1999; Schlessinger et al., 2000; Pellegrini et al., 2000). Die Spezifität der Ligandenbindung wird durch D3 vermittelt. Diese Domäne wird durch alternatives Spleißen funktionsrelevant variiert (siehe 2.1.2) und ist innerhalb der Vertebraten nur wenig konserviert. Die „K18K“-Sequenz, eine Abfolge aus 18 zumeist basischen und hydrophoben Aminosäuren, welche die Bindung von Heparin, einem Stabilisator für die FGF/FGFR-Bindung (Schlessinger et al., 2000), an FGF-Rezeptoren vermitteln, ist im Bereich von D2 lokalisiert (Pellegrini et al., 2000). In diese Sequenz ist ein HAV-Motiv eingebettet, das als Bindestelle für Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) fungiert (Burke et al., 1998). Die erste Ig-ähnliche Schleife und die nachfolgende Linkerregion sind nicht direkt an der Bindung von FGF beteiligt (Plotnikov et al., 2000). Olsen *et al.* (2004) konnten aber zeigen, dass die „saure Box“, die in der Linkerregion zwischen D1 und D2 lokalisiert ist, mit der vorwiegend basischen Heparinbindestelle über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren kann. Durch diese Interaktion gerät D1 in räumliche Nähe zu der Ligandenbindestelle an D2 und D3, wodurch die Fähigkeit des Rezeptors, Heparin oder FGF zu binden, herabgesetzt wird. Es kommt zu einer Autoinhibition (Xu et al., 1992).

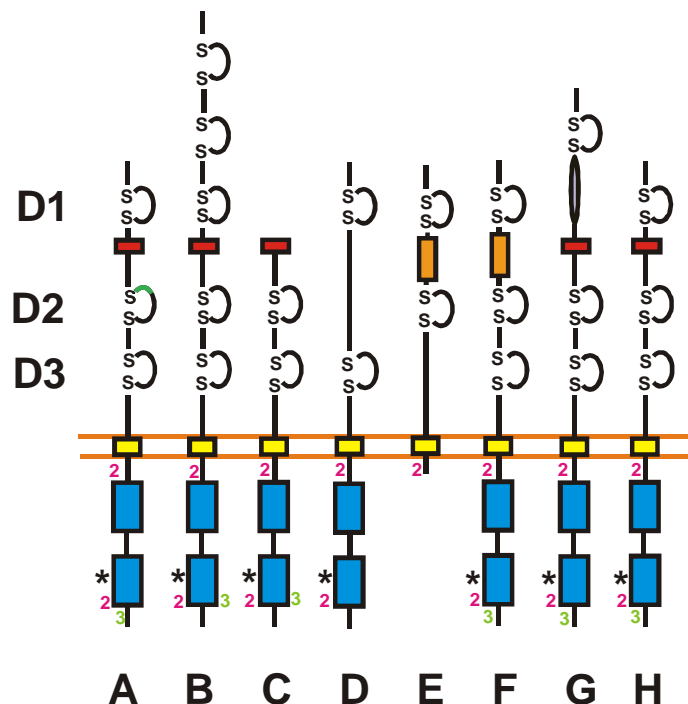


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau von FGF-Rezeptoren verschiedener Organismen. A: FGFR1 bis FGFR4 (Mensch), B: Breathless (*Drosophila melanogaster*), C: Heartless (*Drosophila melanogaster*), D: DjFGFR2 (*Dugesia japonica*), E: NouDarake (*Dugesia japonica*), F: PdFGFR (*Platynereis dumerilii*), G: EGL-15 (*Caenorhabditis elegans*), H: SpFGFR und HrFGFR (*Strongylocentrotus purpuratus* bzw. *Halocynthia roretzi*). Extrazelluläre Domäne: Ig-ähnliche Schleifen durch Disulfidbrücken (SS) gebildet, saure Box (rot), K18K-Region (grün), Transmembrandomäne (gelb). Intrazelluläre Domäne: zweigeteilte Tyrosinkinasedomäne (blau); *: Autophosphorylierungsstellen (Mohammadi et al., 1996), 2: Bindestellen für SH2-Domänen, 3: Bindestellen für SH3-Domänen.

Der cytoplasmatische Teil von FGF-Rezeptoren besitzt einen - verglichen mit anderen Rezeptortyrosinkinasen - besonders langen juxtamembranären Bereich und eine zweigeteilte Tyrosinkinase-Domäne (Johnson und Williams, 1993). Letztere enthält hochkonserviert angeordnete Tyrosinreste, die für die Aktivierung der Kinasedomäne essentiell sind, sowie Konsensussequenzen, über die cytoplasmatische Adapterproteine, z.B. FRS2 (*FGF receptor substrate 2*) oder GRB2 (*growth factor receptor-bound protein*), oder Enzyme mit SH₂- und SH₃-Bindestellen, z.B. Phospholipase C (PLC_γ), das Ras-assoziierte Protein GAP oder die Phosphatidylinosit-3-kinase (PI-3-Kinase) aktiviert werden (Mohammadi et al., 1991) (Abb. 2.1).

Die FGF-Rezeptoren von Invertebraten besitzen im Prinzip den gleichen strukturellen Aufbau wie die FGFR der Vertebraten. Besonders der intrazelluläre Teil dieser Proteine ist im Tierreich hochkonserviert. Eine Ausnahme stellt nur NouDarake dar (Cebria et al., 2002). Diesem FGFR-ähnlichen Protein aus dem Plattwurm *Dugesia japonica* fehlt die Tyrosinkinasedomäne (Abb. 2.1). Statt dessen besitzt es eine sehr kurze, Serin-reiche, intrazelluläre Domäne ohne enzymatische Aktivität, die keine signifikante Ähnlichkeit zu irgendeiner anderen bekannten Sequenz im Tierreich aufweist.

Die extrazelluläre Domäne der Invertebraten-Rezeptoren weicht in einigen Fällen vom „Muster“ der Vertebraten-FGFR ab: Die Anzahl der durch Schwefelbrücken gebildeten Ig-ähnlichen Schleifen kann variieren (Abb. 2.1): Die FGF-Rezeptoren, die beim Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus*, der Seescheide *Halocynthia roretzi* und dem Polychaeten *Platynereis dumerilii* identifiziert wurden, besitzen jeweils drei Ig-ähnliche Domänen (McCoon et al., 1996; Kamei et al., 2000; Steinmetz, 2002). Dies trifft auch auf den aus dem Plattwurm *Dugesia japonica* isolierten DjFGFR1 zu (Ogawa et al., 2002), DjFGFR2 dagegen weist nur zwei solcher Schleifen auf (Ogawa et al., 2002). *Drosophila* besitzt zwei endogene FGF-Rezeptoren, Breathless und Heartless (Shishido et al., 1993), die extrazellulär fünf (Breathless) bzw. zwei (Heartless) Ig-ähnliche Schleifen tragen. Aus dem Nematoden *C. elegans* wurde der FGFR EGL-15 isoliert (DeVore et al., 1995). Dieses Protein trägt die typischen drei Ig-ähnliche Schleifen im extrazellulären Teil. Unmittelbar C-terminal von der ersten Schleife befindet sich eine Peptidsequenz, die über alternatives Spleißen variiert wird (Goodman et al., 2003).

Eine „saure Box“ kommt nicht bei allen Invertebraten-FGFR vor: Bei PdFGFR und NouDarake findet sich im Linkerbereich zwischen D1 und D2 eine Anhäufung saurer Aminosäuren, die allerdings nicht zu einer Box zusammengefasst sind (Steinmetz, 2002; Cebria et al., 2002) (Abb. 2.1).

Die FGF-Rezeptoren der Deuterostomier (Seeigel und Seescheide) besitzen im Bereich von D2 ein Motiv ähnlich der „K18K“-Sequenz aus Vertebraten, das die Bindung von Heparin oder Heparansulfat vermittelt (McCoon et al., 1996; Kamei et al., 2000). Den übrigen FGF-

Rezeptoren der Invertebraten fehlt dieses Motiv, auch wenn sie im entsprechenden Sequenzbereich eine Anhäufung basischer Aminosäuren besitzen, die eine Interaktion mit Heparin vermitteln könnte. Auffälligerweise existiert in keinem einzigen FGF-Rezeptor der Invertebraten ein HAV-Motiv zur Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen.

2.1.2 Isoformen von FGF-Rezeptoren

Durch alternatives Spleißen entsteht bei Vertebraten aus den vier FGFR-Genen eine Vielzahl von FGFR-Isoformen (Abb. 2.2) (Johnson et al., 1990). Für FGFR1 und FGFR2 beispielsweise existieren Varianten, denen Teile oder sogar die gesamte Region N-terminal von D2 fehlen (Powers et al., 2000). Solche Rezeptoren sind dennoch funktional aktiv. Sekretierte Rezeptormoleküle, denen Transmembran- und intrazelluläre Domäne fehlen, und membranständige Isoformen ohne funktionsfähige Tyrosinkinase-Domäne wirken als negative Regulatoren, indem sie extrazellulär freie Liganden binden, ohne dass es dadurch zur Weiterleitung von Signalen kommt (Johnson und Williams, 1993). Tatsächlich wird die Zelle auf diese Art und Weise an FGF depletiert. Über einen ähnlichen Mechanismus kann die Wnt-Signalkaskade reguliert werden: Frizzled-verwandte Proteine (frizzled related proteins, FRP), die eine Bindestelle für Wnt besitzen, kompetieren mit dem eigentlichen Rezeptor Frizzled um Wnt-Liganden ohne die Signalkaskade aktivieren zu können (Rattner et al., 1997).

Weitere Isoformen von Vertebraten-FGFR entstehen durch alternatives Spleißen in der C-terminalen Domäne des Rezeptors. Diese Isoformen werden mit chemotaktischen Funktionen in Verbindung gebracht (Landgren et al., 1998).

Die Spezifität der Bindung von FGF an ihre Rezeptoren wird vornehmlich über D3 vermittelt. Spleiß-Varianten dieser Region besitzen eine unterschiedliche Spezifität für die 23 bei Vertebraten bekannten FGF (vergleiche 2.1.3). Diese Varianten treten gewebespezifisch auf, so dass eine Vielzahl von FGF/FGFR-Komplexen entstehen kann, die in ihrer räumlichen und zeitlichen Expression strikt reguliert werden (Ornitz, 2000). D3 kann bei Wirbeltieren durch drei alternativ verwendete Exons (IgIIIa, IgIIIb, IgIIIc) codiert werden.

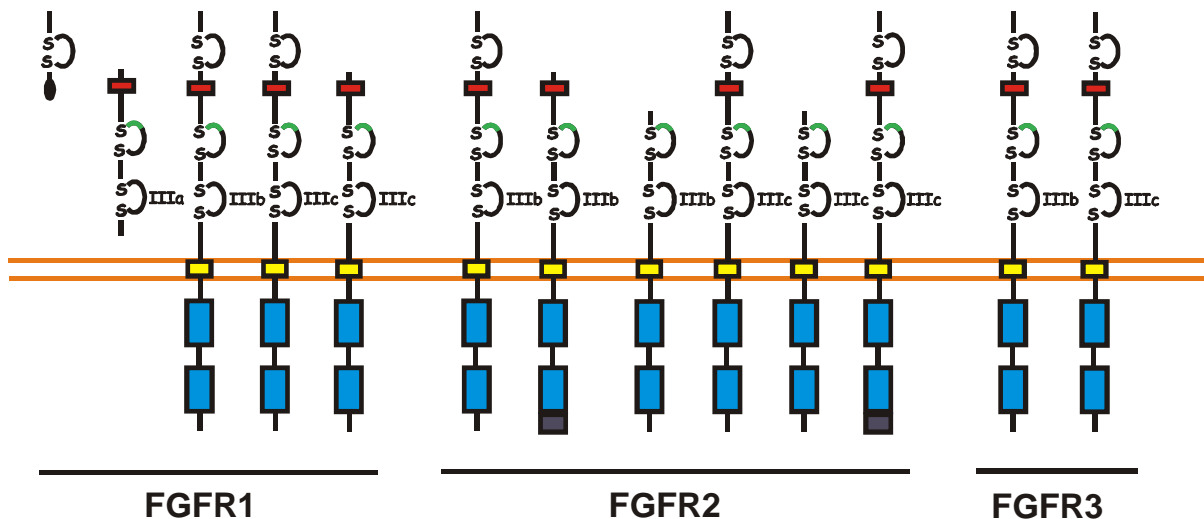


Abb. 2.2: Isoformen von FGF-Rezeptoren, wie sie bei Vertebraten durch alternatives Spleißen entstehen. (modifiziert nach: Johnson und Williams, 1993). Extrazelluläre Domäne: Ig-ähnliche Schleifen durch Disulfidbrücken (SS) gebildet, saure Box (rot), K18K-Region (grün), Transmembrandomäne (gelb). Intrazelluläre Domäne: zweigeteilte Tyrosinkinasedomäne (blau);, grau: alternativer C-Terminus.

Entsprechende Isoformen wurden auch bei *Strongylocentrotus purpuratus* und *Halocynthia roretzi* nachgewiesen (McCoon et al., 1996; Kamei et al., 2000; Shimauchi et al., 2001), und es wird diskutiert, ob, wie bei den Vertebraten, durch alternatives Spleißen von D3 die Spezifität für unterschiedliche Liganden festgelegt wird. (Abb. 2.3). Bei *H. roretzi* variiert zusätzlich zu den D3-Spleißvarianten die Zahl der Ig-ähnlichen Schleifen. Neben einer Rezeptor-Variante mit drei Schleifen, existiert eine weitere, der - wie bei den Wirbeltier-Spleißvarianten - D1 und die saure Box fehlen (Kamei et al., 2000; Shimauchi et al., 2001) (Abb. 2.3).

Der PdFGF-Rezeptor, aus *Platynereis dumerilii*, besitzt eine außergewöhnliche Spleißvariante im Linkerbereich zwischen D1 und D2, wo sich bei den FGFRs der Vertebraten die „saure Box“ befindet: Die leicht saure Domäne von PdFGFRa wird in PdFGFRb durch eine stark basische Proteinsequenz ersetzt (Steinmetz, 2002) (Abb. 2.3). Dies hat mit hoher Wahrscheinlichkeit Folgen für die Autoinhibition des Rezeptors: Während die saure Domäne zwischen D1 und D2 mit der basischen Heparinbindestelle interagiert und so die Schleife D1 in räumliche Nähe zu der FGF-Bindestelle bringt, wird durch die ausgetauschte basische Sequenz das Gegenteil bewirkt. Die beiden basischen, also positiv geladenen Regionen stoßen einander voraussichtlich ab, was zu einer Öffnung der Bindestelle führen müsste und somit die Ligandenbindung erleichtern sollte.

Auch bei *C. elegans* werden durch alternatives Spleißen zwei Isoformen von EGL-15 mit unterschiedlicher Ligandenspezifität gebildet: EGL-15(5A) bindet das FGF EGL-17, EGL-15(5B) interagiert mit LET-756 (Birnbaum et al., 2005). Wie bei PdFGFR werden zwei

unterschiedliche Proteinsequenzen in den Linkerbereich zwischen D1 und D2 eingeführt (Abb. 2.3). Daneben wird auch die C-terminale Domäne (CTD) von *egl-15* alternativ gespleißt, woraus fünf zusätzliche Isoformen entstehen, die sich im C-Terminus unterscheiden. Welche Funktionen diese Rezeptor-Varianten erfüllen, ist nicht bekannt. Die CTD als Ganzes spielt allerdings eine Rolle bei der Chemotaxis der Sex-Myoblasten (Goodman et al., 2003).

Spleißvarianten der FGF-Rezeptoren aus *Dugesia* und *Drosophila* sind nicht bekannt.

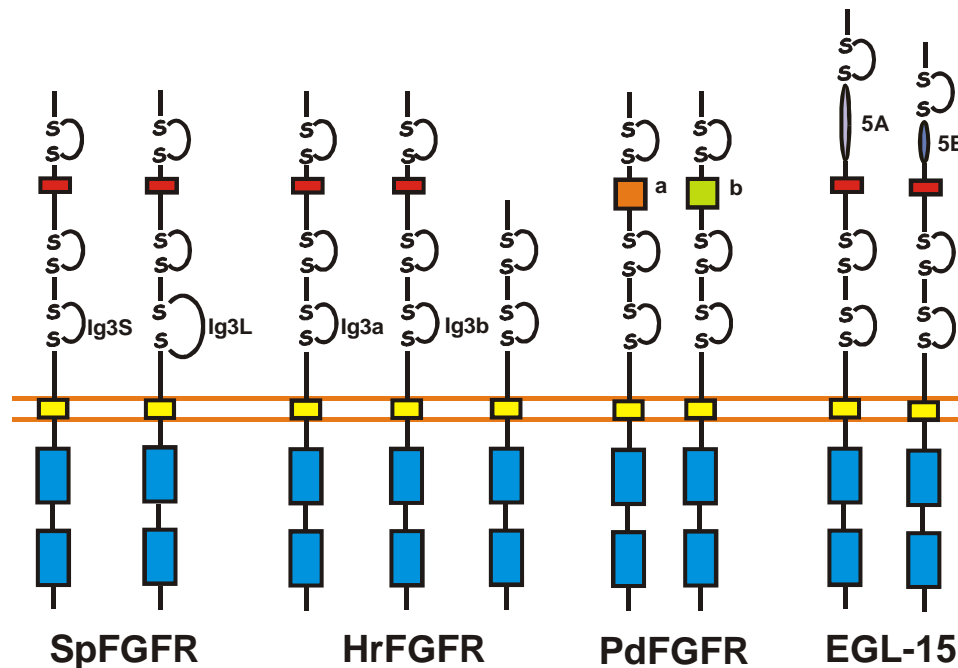


Abb. 2.3: FGF-Rezeptorvarianten bei Invertebraten. (Ergänzt und modifiziert nach: McCoon et al., 1996; Kamei et al., 2000; Steinmetz, 2002; Goodman et al., 2003). Extrazelluläre Domäne: Ig-ähnliche Schleifen durch Disulfidbrücken (SS) gebildet, saure Box (rot), K18K-Region (grün), Transmembrandomäne (gelb). Intrazelluläre Domäne: zweigeteilte Tyrosinkinasedomäne (blau); hellgrün: basische Aminosäuren, orange: Anhäufung basischer Aminosäuren, grau: alternatives Spleißen bei EGL-15.

2.1.3 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF)

FGF, die Liganden der FGFR, sind durch eine zentrale „Core-Region“ charakterisiert, die etwa 120 Aminosäurereste umfasst und sich zu einer typischen, Interleukin-1 β (Il-1 β)-ähnlichen Struktur faltet (Zhu et al., 1991). Über diese „Core-Region“ interagieren die FGF mit den FGF-Rezeptoren und binden an Heparin oder Heparin-ähnliche Glucosaminoglykane (HLGAGs), wodurch die Interaktion von Ligand und Rezeptor verstärkt wird (Burgees und Maciag, 1989; Ornitz, 2000). In Vertebraten sind 23 Mitglieder der FGF-Familie identifiziert worden, die aufgrund phylogenetischer Untersuchungen in sieben Unterfamilien gliedert werden (Tab. 2.1). FGF besitzen eine Aminosäureidentität von 13-71%, wobei

die Ähnlichkeit zwischen Proteinen einer Familie in verschiedenen Organismen, zum Beispiel zwischen FGF2 bei Mensch und Maus, größer ist als die Ähnlichkeit verschiedener FGF innerhalb eines Organismus (Coulier et al., 1997). Die meisten FGF, nämlich FGF3-8, 10, 17-19, 21 und 23 besitzen ein N-terminales Signalpeptid und werden sekretiert (Tab. 2.1). Den Mitgliedern der FGF1-Subfamilie, zu denen FGF1 (saurer FGF) und FGF2 (basischer FGF) gehören, fehlt das Signalpeptid (Jaye et al., 1986). Diese Proteine werden über Exocytose oder aus verletzten Zellen freigesetzt (Ornitz und Itoh, 2001). Sie besitzen ein Kern-Lokalisations-Motiv (Imamura et al., 1990; Bugler et al., 1991) und wurden auch im Zellkern nachgewiesen (Sano et al., 1990). Allerdings ist die Funktion der Wachstumsfaktoren an diesem Ort bisher unklar. Die Proteine der FGF9-Subfamilie besitzen ebenfalls kein Signalpeptid, werden aber trotzdem sehr effizient sekretiert. Man nimmt an, dass für ihre Sekretion eine Abfolge von hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Core-Region verantwortlich ist (Miyamoto et al., 1993; Miyake et al., 1998; Koga et al., 1999). Andere Vertreter der FGF werden nicht sezerniert: FGF22 besitzt zwar ein Signalpeptid, bleibt aber an die Zelloberfläche gebunden (Itoh und Ornitz, 2004). Die Mitglieder der FGF11-Subfamilie werden auch als FGF-homologe Faktoren (FHF) bezeichnet. Sie verlassen die Zelle nicht, können also auch nicht mit FGF-Rezeptoren interagieren (Smallwood et al., 1996). Es wird vermutet, dass es sich bei ihnen um intrazelluläre Komponenten von gewebespezifischen Proteinkinase-Signalmodulen handelt. Schoorlemmer und Goldfarb (2001) konnten zeigen, dass FHF in sich entwickelnden Neuronen einen Komplex mit IB2 (Islet-Brain-2), einem *Scaffold*-Protein für MAPK, bildet. Diese *Scaffold*-Proteine beeinflussen Spezifität und Effizienz der Signalübertagung via MAPK, indem sie Interaktionen von vorgeschalteten Proteinkinasen mit MAPK vermitteln (Burack und Shaw, 2000; Whitmarsh und Davis, 1998). Ohne FHF ist IB2 nicht in der Lage, MAPK zu rekrutieren (Schoorlemmer und Goldfarb, 2001).

Tab. 2.1: FGF-Subfamilien der Vertebraten

	Mitglieder	Merkmale
FGF1-Subfamilie	FGF1, FGF2	Freisetzung über Exocytose oder verletzte Zellen
FGF4-Subfamilie	FGF4, FGF5, FGF6	Signalpeptid
FGF7-Subfamilie	FGF3, FGF7, FGF10, FGF22	Signalpeptid
FGF8-Subfamilie	FGF8, FGF17, FGF18	Signalpeptid
FGF9-Subfamilie	FGF9, FGF16, FGF20	Sekretion über hydrophobe Sequenz
FGF11-Subfamilie	FGF11, FGF12, FGF13, FGF14	intrazellulär lokalisiert
FGF19-Subfamilie	FGF19, FGF21, FGF23	Signalpeptid

Gene, die für FGF codieren, kommen auch in Invertebraten vor, allerdings in weit geringerer Zahl als in Vertebraten. Wie die FGF der Vertebraten sind auch die der Invertebraten durch die Core-Region charakterisiert, die zwischen Vertebraten und Invertebraten deutliche Sequenzähnlichkeit aufweist (Birnbaum et al., 2005) (Abb. 3.25), so dass einigen Invertebraten-FGF eine Verwandtschaft zu den Vertebraten-Subfamilien zugeordnet werden kann.

Popovici et al. (2004) konnten zeigen, dass ein „Rescue“ der *let-756*-Mutante von *C. elegans* durch Einfügen der Core-Region von Mitgliedern der FGF9-Subfamilie aus Säugern in das defekte *let-756*-Gen möglich ist (Popovici et al., 2004). Über diesen Ansatz, funktionale Phylogenie genannt, wird eine Verwandtschaft von LET-756 zur FGF9-Subfamilie der Vertebraten abgeleitet. Eine phylogenetische Zuordnung des zweiten *C. elegans*-FGF EGL-17 ist schwieriger. Dieses Protein kann am ehesten mit der FGF8-Subfamilie in Verbindung gebracht werden (Birnbaum et al., 2005). EGL-17 und LET-756 sind mit einer molekularen Masse von 35 bzw. 48 kDa ein wenig größer als die FGF der Vertebraten, die im Größenbereich von etwa 17 – 34 kDa liegen.

Bei *Drosophila* wurden drei Gene identifiziert, die für FGF-ähnliche Faktoren codieren: *branchless*, *pyramus (fgf8-like2)* und *thisbe (fgf8-like1)* (Sutherland et al., 1996; Stathopoulos et al., 2004; Gryzik und Muller, 2004). Die entsprechenden Proteine sind mit einer Größe zwischen 82 kDa und 86 kDa deutlich größer als ihre Verwandten in Vertebraten (Sutherland et al., 1996; Stathopoulos et al., 2004). Die *Drosophila*-FGF besitzen jeweils zwei Domänen, die der Core-Region der Vertebraten-FGF ähnlich sind, die Ähnlichkeit der zweiten Domäne ist allerdings nur gering ausgeprägt. Aufgrund dieser Domänenstruktur nimmt man an, dass die FGF von *Drosophila* als funktionale Dimere an ihre Rezeptoren binden (Itoh und Ornitz, 2004). *Pyramus* und *thisbe*, die für Liganden von Heartless codieren, werden phylogenetisch der FGF8-Subfamilie der Vertebraten zugeordnet (Stathopoulos et al., 2004). Für *branchless* kann keine Zuordnung in eine dieser Subfamilien getroffen werden. Dieses Gen wird zusammen mit FGF-codierenden Genen, die im Genom verschiedener Baculoviren gefunden wurden, in eine achte FGF-Subfamilie eingeordnet, die bei Vertebraten fehlt (Popovici et al., 2005).

Im Genom der Seescheide *Ciona intestinalis*, einem Vertreter der wirbellosen Chordaten, wurden sechs FGF-Gene identifiziert. Für diese Gene konnte eine Verwandtschaft zu verschiedenen FGF-Subfamilien der Vertebraten abgeleitet werden, was in der Benennung der *Ciona*-Gene deutlich wird: *Ci-fgf3/7/10/22*, *Ci-fgf4/5/6*, *Ci-fgf8/17/18*, *Ci-fgf9/16/22* und *Ci-fgf11/12/13/14*. Die Einordnung des sechsten FGF-codierenden Gens, *Ci-fgfL*, bleibt umstritten. Das entsprechende Protein ist mit einer molekularen Masse von 75 kDa deutlich größer als die übrigen Ci-FGF, die mit 21-31 kDa im Größenbereich der Wirbeltier-FGF

liegen (Satou et al., 2002). Ausgenommen davon ist Ci-FGF8/17/18, dessen Molekulargewicht mit 48 kDa im Bereich der *C. elegans*-FGF liegt (Satou et al., 2002).

2.1.4 Evolution von FGF und FGF-Rezeptoren

FGF und FGF-Rezeptoren sind bislang bei allen untersuchten Eumetazoen nachgewiesen worden.

Die FGF-Familie der Vertebraten ist vermutlich durch zwei Phasen von Genduplikationsereignissen entstanden. Man nimmt an, dass bei primitiven Metazoen bereits ein bis drei FGF-codierende Gene vorhanden waren (archeoFGF) (Itoh und Ornitz, 2004; Popovici et al., 2005). Es folgte eine Expansionsphase, aus der acht proto-FGF hervorgingen, die die Grundlage der heute bekannten acht FGF-Subfamilien darstellen. Der Zeitpunkt dieser FGF-Expansion ist nicht geklärt. Die zwei bis drei FGF, die bei *Drosophila* und *C. elegans* identifiziert wurden, können verschiedenen Subfamilien der Vertebraten-FGF (siehe 2.1.3) zugeordnet werden, was darauf hindeutet, dass die Vervielfachung der FGF-Gene bereits vor der Aufspaltung von Protostomiern und Deuterostomiern erfolgte. Die Anzahl der FGF-Subfamilien in den rezenten Organismen deutet darauf hin, dass einige proto-FGF im weiteren Verlauf der Evolution verloren gingen: Die bisher untersuchten Deuterostomier besitzen maximal sieben FGF-Subfamilien, bei den ursprünglicheren Urchordaten sind es sechs. Im Gegensatz dazu findet man bei den Protostomiern nur drei. Eine zweite Expansion der FGF-codierenden Gene führte zur Entstehung der FGF-Subfamilien der Vertebraten mit jeweils zwei bis vier Mitgliedern (Popovici et al., 2005).

Die enge Verwandtschaft der FGF-Rezeptoren von Vertebraten untereinander legt nahe, dass diese Rezeptoren durch Genduplikation eines ursprünglich einzigen FGFR-Gens entstanden sind. Dabei ist die Ähnlichkeit der FGFR eines Typus, z.B. FGFR1, in verschiedenen Spezies größer als die Ähnlichkeit der unterschiedlichen Rezeptoren innerhalb einer Art (Coulier et al., 1997). Bei Invertebraten ist das anders: Strukturvergleiche der *Drosophila* FGF-Rezeptoren Breathless und Heartless deuten auf eine enge Verwandtschaft der codierenden Gene hin. Ihre Ähnlichkeit zu FGFR anderer Invertebraten ist dagegen deutlich geringer. Eine frühe Duplikation eines einzelnen FGFR-Gens innerhalb der Invertebraten erscheint daher unwahrscheinlich, die Existenz mehrerer FGFR hier ist eher auf ein späteres, unabhängiges Genduplikationsereignis zurückzuführen (Coulier et al., 1997).

2.1.5 Aktivierung der FGF-Rezeptoren durch FGF

Voraussetzung für eine Signalübertragung über FGF-Rezeptoren ist in der Regel eine Liganden-induzierte Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle. Erst durch dieses Ereignis werden die intrazellulären Domänen beider Proteine in eine räumliche Nähe gebracht, die die Aktivierung der Rezeptoren erlaubt (Übersichtsartikel: Eswarakumar et al., 2005).

2.1.5.1 Bindung der Liganden an den FGF-Rezeptor

Für die Bindung von FGF an ihre Rezeptoren wurden verschiedene Modelle entwickelt, bei denen Heparin und Heparansulfat der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle spielen (Ornitz et al., 1992). Die hochaffine Interaktion der Wachstumsfaktoren mit Heparin bzw. Heparansulfaten erfüllt unterschiedliche Funktionen: Zum einen werden die FGF vor Proteolyse und Abbau geschützt (Gospodarowicz und Cheng, 1986; Saksela et al., 1988), zum anderen stellen die an die extrazelluläre Matrix gebundenen FGF ein Reservoir dar, aus dem diese Wachstumsfaktoren bei Bedarf frei gesetzt werden können (Folkman et al., 1988; Bashkin et al., 1989; Flaumenhaft et al., 2005). Drittens wird durch die Bindung der Wachstumsfaktoren an die extrazelluläre Matrix eine freie Diffusion verhindert und somit ihre Reichweite beschränkt (Nybakken und Perrimon, 2002). Zum vierten führt erst die Heparinbindung zu einer Veränderung der FGF- Konformation dahingehend, dass sie mit hoher Affinität an FGF-Rezeptoren binden können (Schlessinger et al., 1995; Yayon et al., 1991).

In welcher Stöchiometrie die FGF-Interaktion am Rezeptor erfolgt, ist noch immer unklar. Pantoliano *et al.* (1994) gehen davon aus, dass ein einzelner FGF in Verbindung mit einem Heparinmolekül eine Art Brücke zwischen zwei FGF-Rezeptoren formt (Abb. 2.4 A). Der Wachstumsfaktor interagiert bivalent mit beiden Rezeptormolekülen, die ihrerseits über die Ig-ähnliche Schleife D3 direkten Kontakt zueinander aufnehmen (Pantoliano et al., 1994, Wilkie et al. 2002). Diese Vermutung wurde unterstützt durch die Erkenntnis, dass FGF zwei Bindestellen zu FGF-Rezeptoren besitzen, eine hochaffine und eine geringer affine (Springer et al., 1994).

Ein alternatives Modell geht davon aus, dass durch Interaktion mit Heparin FGF-Dimere gebildet werden, die dann an die FGF-Rezeptoren binden (Spivak-Kroizman et al., 1994). Jeder Rezeptor tritt dabei mit einem FGF in Wechselwirkung. Die Dimerisierung der Rezeptormoleküle wird in diesem Modell letztlich durch die Heparinverbindung der FGF induziert (Abb. 2.4 B).

Ein drittes Modell berücksichtigt die Tatsache, dass auch FGF-Rezeptoren eine Bindestelle für Heparin besitzen (Plotnikov et al., 1999): Bei der Bindung der Liganden an den Rezeptor

bildet sich ein Komplex aus zwei Rezeptor-Molekülen und zwei FGF-Molekülen, der über Wechselwirkung mit Heparin stabilisiert wird (Abb. 2.4 C). In diesem Komplex bindet jeder FGF-Rezeptor ein FGF, wodurch eine stark positiv geladene Grube im Bereich der Heparinbindestelle von Ligand und Rezeptor entsteht. In dieser Grube wird ein einzelnes Heparinmolekül gebunden, das den Komplex zusammenhält. Zusätzliche Stabilität erhält diese Struktur durch eine direkte Interaktion der beiden beteiligten Rezeptoren, die vermutlich über die Schleife D3 vermittelt wird (Plotnikov et al., 1999). Ob in diesem Modell die beteiligten FGF nur mit einem Rezeptor (Venkataraman et al., 1999) oder auch mit dem zweiten FGF-Rezeptor in Wechselwirkung treten (Plotnikov et al., 1999), wird noch diskutiert.

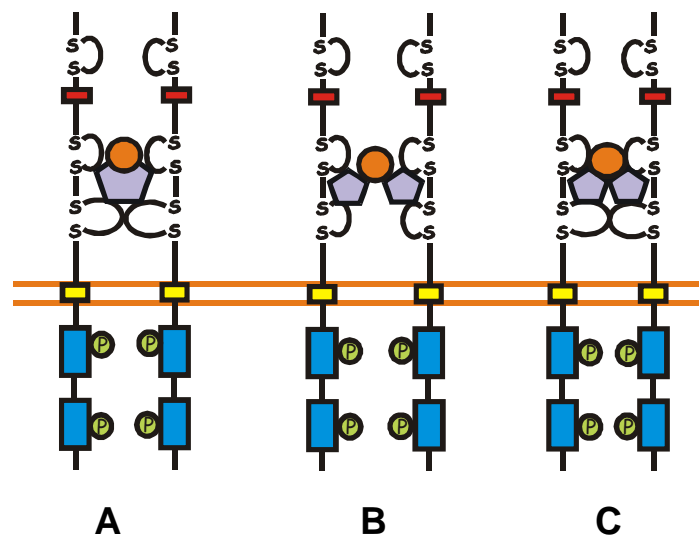


Abb. 2.4: Schematische Darstellung verschiedener Modelle zur Liganden-induzierten Aktivierung von FGF-Rezeptoren. A: Dimerisierung der Rezeptoren durch Bindung eines FGF-Moleküls (Wilkie et al., 2002). B: Zwei durch Heparin verbundene FGF binden an jeweils einen Rezeptoren (Spivak-Kroizman et al., 1994). C: Rezeptor-Dimerisierung erfolgt durch physische Interaktion aller beteiligten Faktoren miteinander (Plotnikov et al., 1999; Venkataraman et al., 1999). grau: FGF-Molekül, orange: Heparin, hellgrün: Phosphorylierung.

2.1.5.2 Aktivierung der Proteinkinase-Domäne

Die Bindung von FGF an die extrazelluläre Domäne eines Rezeptors bedingt die Bildung sowohl von Homodimeren als auch Heterodimeren aus verschiedenen FGFR (Bellot et al., 1991). Durch die Dimerisierung gelangen die Kinase-Domänen der beiden Rezeptoren in Kontakt, was die Transautophosphorylierung der beiden cytoplasmatischen Domänen erlaubt (Lemmon und Schlessinger, 1994). Dabei phosphoryliert jede Proteinkinase bestimmte Tyrosinreste des anderen Partners im Dimer.

2.1.6 Signalübertragung via FGF/FGF-Rezeptoren

Eine Phosphorylierung der FGF-Rezeptoren aktiviert verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle. Dafür werden entweder direkt Zielproteine an ausgewählte phosphorylierte Tyrosine des aktivierten Rezeptors rekrutiert, oder es werden Adapter-Proteine phosphoryliert, die dann einen Komplex mit solchen Zielproteinen bilden.

2.1.6.1 Aktivierung von Phospholipase C_γ (PLC_γ)

Durch Phosphorylierung von Tyr-766 in der intrazellulären Domäne des humanen FGFR1 entsteht eine spezifische Bindestelle für die SH2-Domäne der PLC_γ (Mohammadi et al., 1991). Die Bindung an den aktivierten FGF-Rezeptor führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten an PLC_γ, und somit zur Aktivierung der Phospholipase (Mohammadi et al., 1992) (Abb. 1.5). Aktivierte PLC_γ katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Ong et al., 2001) (Abb. 2.5). IP₃ bindet an den Kalziumkanal und IP₃-Rezeptor in der Membran des glatten Endoplasmatischen Retikulums, was zur Freisetzung von Kalzium ins Cytoplasma führt. Die Kalziumionen wiederum aktivieren je nach Zelltyp unterschiedliche Zielproteine, wie z.B. Calmodulin, PKC oder PLC (Berridge et al., 2000).

DAG ist ein Lipidmolekül, das nach Abspaltung von PIP₂ an der Zellmembran verbleibt. Es aktiviert dort, Ca²⁺-abhängig oder unabhängig, Proteinkinase C-Isoformen (PKC). PKCs phosphorylieren ein breites Spektrum von Zielproteinen und sind in eine Reihe von zellulären Prozessen wie Proliferation, Metabolismus, Differenzierung oder Transkriptionsaktivierung involviert (Kleinig und Maier, 1999).

2.1.6.2 Signalübertragung durch das Adapterprotein FRS2

Im Bereich der juxtramembranären Domäne der Vertebraten-FGFR (siehe 2.1.1) befindet sich eine hochkonservierte Sequenz, die als Bindestelle für die Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) von FRS2 (*EGF receptor substrate 2*) dient (Ong et al., 2000). Das Adapterprotein FRS2 vermittelt die Aktivierung des Ras/MAPK-Pathways über FGFR-Aktivierung (Abb. 2.5). Eine Bindung von FRS2 an den FGF-Rezeptor führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten am C-Terminus des Adapterproteins und somit zu seiner Aktivierung. FRS2 bildet daraufhin einen Komplex mit den Adapterproteinen GRB2/Sos und der Protein-Tyrosin-Phosphatase Shp2. Über Sos wird die GTP-ase Ras und

damit die nachfolgende MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Kaskade aktiviert (Kouhara et al., 1997).

Über die Aktivierung von Gab1 ist FRS2 in der Lage die PI3-Kinase und damit den AKT-Signalweg zu stimulieren (Lamothe et al., 2004). Das Adapterprotein Gab1 ist konstitutiv an GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*) gebunden. Durch Bindung von FRS2 an GRB2 wird Gab1 phosphoryliert. Das so aktivierte Protein bietet eine Bindestelle für verschiedene Signalproteine mit SH2-Domäne, zu denen auch die PI3-Kinase gehört.

FRS2 vermittelt nicht nur die Weiterleitung von Signalen aktivierter FGF-Rezeptoren an nachgeschaltete Signalwege, sondern sorgt auch für die Rekrutierung negativer Regulatoren. An FRS2 gebundenes GRB2 bildet einen Komplex mit Cbl, einem Multidomänenprotein mit Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Durch dieses Protein werden sowohl FRS2 als auch der FGF-Rezeptor mit Ubiquitin markiert und so für die nachfolgende Endozytose und Zerstörung gekennzeichnet (Wong et al., 2002).

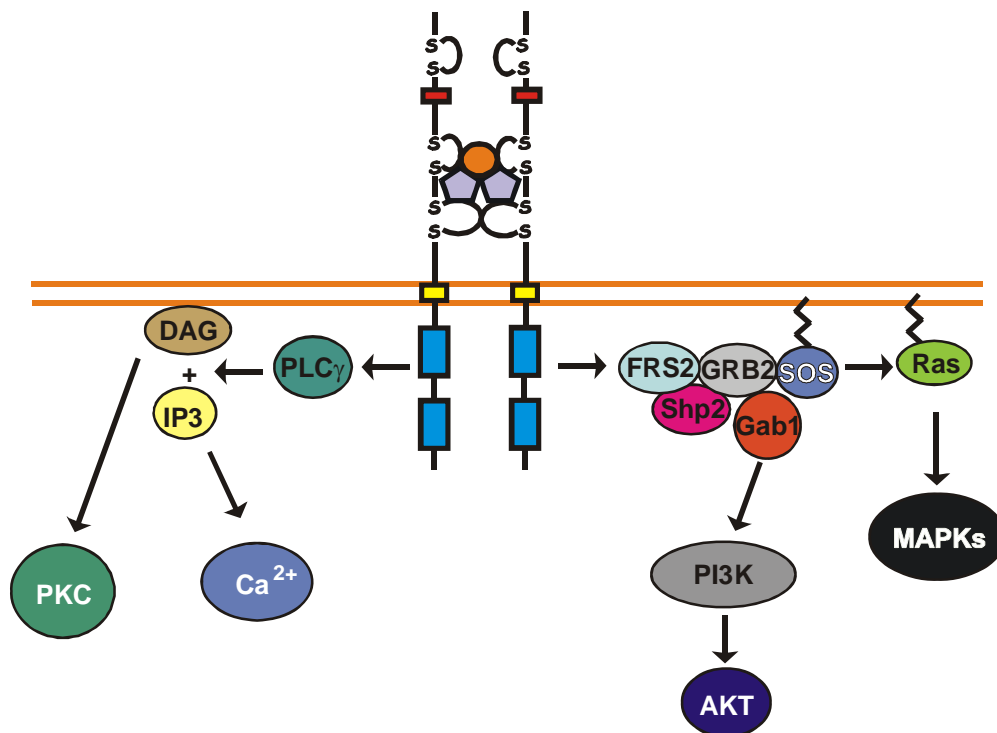


Abb. 2.5: Signaltransduktion über FGF-Rezeptoren. Durch FGF/FGFR-Signalübertragung werden der PLC γ -Signalweg, der PI3-Kinase-, AKT/PKB-Signalweg und der FRS2-Ras-MAP-Kinase-Signalweg aktiviert.

2.1.6.3 Das Adapterprotein Dof in *Drosophila*

Bei *Drosophila* liegt die Vermittlerposition zwischen den FGF-Rezeptoren und den nachgeschalteten MAPK oder AKT/PKB Signalwegen beim Adapterprotein Dof (Vincent et al., 1998), das ausschließlich in den Geweben exprimiert wird, in denen auch die beiden FGF-Rezeptoren Heartless und Breathless zu finden sind. Dof übernimmt damit die Aufgabe, die in Vertebraten durch FRS2 erfüllt wird. Es interagiert über das DBB-Motiv (Dof/BCAP/BANK-Motiv), das außer bei Dof auch bei den Vertebraten-Proteinen BCAP und BANK vorkommt (Wilson et al., 2004) am N-Terminus konstitutiv mit den FGF-Rezeptoren und wird nach deren Aktivierung an Tyr-515 phosphoryliert. Dadurch wird die Phosphatase Corkscrew (Csw), ein Homolog zu Shp2 in Vertebraten, aktiviert, die ihrerseits den Ras-MAPK-Signalweg stimuliert.

Signalübertragung mittels Dof scheint eine Besonderheit von *Drosophila* zu sein. In *C. elegans*, einem Organismus, in dem das FGF-FGFR-System detailliert untersucht worden ist, existiert kein Dof-ähnliches Element. Die Verbindung zwischen dem FGF-Rezeptor EGL-15 und den nachgeschalteten Signalwegen ist noch nicht aufgeklärt. Zwar konnte mit F54D12.6 ein Protein identifiziert werden, das Ähnlichkeiten zu FRS2 aufweist, allerdings spielt es offenbar keine Rolle bei der Signalweiterleitung über FGF-Rezeptoren (Ong et al., 2000).

2.1.7 Biologische Funktionen der FGF/FGF-Rezeptor-Signalübertragung

Durch FGFR aktivierte Signalkaskaden sind essentiell für verschiedene biologische Abläufe. Im adulten Organismus sind dies beispielsweise Wundheilung und Angiogenese (Übersichtsartikel: Powers et al., 2000).

Während der Embryonalentwicklung von Vertebraten und Invertebraten spielen FGF und ihre Rezeptoren eine Rolle in der Gastrulation und der Induktion von Mesoderm, aber auch bei Zellwanderungsprozessen sowie der Morphogenese verzweigter Strukturen und der Determinierung von Grenzen innerhalb embryonaler Gewebe (Übersichtsartikel: Thisse und Thisse, 2005). Mutationen dieser Proteine können zu schwerwiegenden Defekten in der Entwicklung des Skelettsystems, des Zentralen Nervensystems und verschiedener Organe führen (Übersichtsartikel: Thisse und Thisse, 2005).

Beispielsweise ist der *Drosophila* FGF-Rezeptor, Heartless, essentiell für die Determination mesodermaler Zelllinien (Gisselbrecht et al., 1996; Beiman et al., 1996) und für die dorsolaterale Wanderung früher mesodermaler Zellen. Bleibt diese Zellwanderung aus, so können Herzzellen, die dem dorsalen Teil des visceralen Mesoderms entstammen, nicht an den für sie vorgesehenen Platz entlang der Dorsoventralachse gelangen. Es wird kein

Dorsalgefäß ausgebildet (Shishido et al., 1997). Der zweite *Drosophila* FGF-Rezeptor Breathless übernimmt im Zusammenspiel mit seinem Liganden Branchless eine zentrale Funktion in Zellwanderungsprozessen während der Verzweigung des sich entwickelnden Tracheensystems (Rosin und Shilo, 2002). Dabei wird Branchless in Zellgruppen, die die elongierenden Tracheen umgeben, an genau den Stellen exprimiert und sezerniert, an denen sich Abzweigungen bilden sollen. Der FGF-Rezeptor Breathless ist in die Membran der Tracheenvorläuferzellen integriert. Eine Bindung des sezernierten Liganden an den Rezeptor bewirkt eine zielgerichtete Wanderung der Tracheenzellen und führt zu einem charakteristischen Muster von trachealen Verzweigungen (Sutherland et al., 1996; Metzger und Krasnow, 1999).

Auch der *C. elegans* FGFR, EGL-15, ist an der Wanderung von Zellen beteiligt. Die Rezeptor-Isoform EGL-15(5A) (siehe 2.1.2) mit ihrem Liganden EGL-17 reguliert die Wanderung und Wegfindung der Sex-Myoblasten (Burdine et al., 1997; Stern und Horvitz, 1991). Die FGF-Rezeptor-Isoform EGL-15(5B) und sein Ligand LET-756 spielen eine essentielle Rolle in der Homeostase von Flüssigkeit des Pseudocoeloms. Mutanten mit einem hyperaktiven EGL-15(5B)-Rezeptor lagern zuviel Flüssigkeit ein. Diese Tiere sind besonders kurz, immobil und steril (Kokel et al., 1998). Eine verminderte Aktivität des Rezeptors ist embryonal letal (Borland et al., 2001).

Beide Isoformen von EGL-15 sind - wie Heartless in *Drosophila* – auch an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt: Das LET-756/EGL-15(5B)-Signalsystem reguliert das Wachstum und die Positionierung bestimmter Neurone, während die EGL-15(5A)-Isoform die Aufrechterhaltung der Positionierung von Axonen des ventralen Nervenstranges steuert (Bulow et al., 2004).

An der Entwicklung von neuronalem Gewebe sind auch die FGFR aus *Dugesia japonica* beteiligt (Cebria et al., 2002; Ogawa et al., 2002). Das FGF-Rezeptor-ähnliche Protein NouDarake sorgt dafür, dass sich Gehirnstrukturen ausschließlich im Kopfbereich dieser Planarien entwickeln. Ein Ausschalten von *noudarake* hat die Ausbildung von ektopischem Gehirngewebe zur Folge. Dies wiederum kann durch Inhibition der beiden anderen in Planarien identifizierten FGF-Rezeptoren, DjFGFR1 und DjFGFR2, unterdrückt werden (Cebria et al., 2002). Diese Rezeptoren werden bei intakten Planarien im Mesenchym und im Nervensystem exprimiert. Zusätzlich wird das für DjFGFR1-codierende Gen während der Regeneration im Blastem und während der Neubildung von Gehirn und Pharynx aktiviert. Ogawa et al. (2002) nehmen an, dass dieser Rezeptor die Differenzierung, das Wachstum und die gerichtete Wanderung von Stammzellen im Regenerationsprozess steuert.

In der Embryonalentwicklung des Seeigels können Transkripte für SpFGFR mit Beginn der Morphogenese nachgewiesen werden (McCoon et al., 1996; McCoon et al., 1998). Beide Isoformen des Rezeptors sind an der Wanderung mesenchymaler Zellen und an der

Gastrulation beteiligt. Außerdem wird eine Funktion in Proliferation, Wanderung und Differenzierung der Myoblasten angenommen.

Durch das Ausschalten von HrFGFR konnte nachgewiesen werden, dass FGF-Signalübertragung in der Seescheide *Halocynthia roretzi* an der Differenzierung von Notochord- und Mesenchymzellen beteiligt sind (Shimauchi et al., 2001).

Die hier aufgeführten Beispiele zeigen, dass einige grundlegende Funktionen von FGF/FGFR innerhalb des Tierreiches konserviert sind. Dies trifft vor allem auf Zellwanderungsprozesse, die Ausbildung von verzweigten Strukturen und die Abgrenzung zwischen verschiedenen Geweben zu. Eine Hauptaufgabe des FGF/FGFR-Signalsystems liegt in der Ausprägung des Mesoderms. Dieser letzte Punkt wirft die Frage auf, ob FGF und ihre Rezeptoren bereits in einfacher strukturierten, diploblastischen Organismen vorkommen, die kein Mesoderm besitzen. Die Untersuchung solcher Tiere könnte helfen, einen ursprünglichen „Prototyp“ von FGF und FGF-Rezeptoren zu finden.

2.2 Hydra als entwicklungsbiologischer Modellorganismus

Ein interessanter Kandidat in dieser Hinsicht ist der Süßwasserpolyt Hydra, der zum Stamm der Cnidarier gehört und bereits seit Mitte des 18. Jahrhunderts für Experimente in der Biologie eingesetzt wird. Sein einfacher Körperbau und sein enormes Regenerationsvermögen haben ihn zu einem etablierten, wenn auch genetisch nicht zugänglichen Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie gemacht.

2.2.1 Körperbau und Lebensweise von Hydra

Hydra besitzt einen einfachen radiärsymmetrischen Körper, der entlang einer einzigen Körperachse in Kopf, Rumpf und Fuß gegliedert ist (Abb. 2.6). Am Kopf befindet sich das Hypostom mit der Mundöffnung, die von vier bis sieben Tentakel umgeben ist. Der Fuß ist unterteilt in einen mehr oder weniger deutlich abgesetzten Stiel und die Basalscheibe, eine Struktur, die durch Sekretion von Mukopolysacchariden das Festhaften am Substrat vermittelt. Die Körperwand zeigt den für die Cnidarier typischen diploblastischen Aufbau aus Ekto- und Entoderm. Beide Zellschichten werden durch eine azelluläre Stützscheibe, die Mesogloea, voneinander getrennt. Sie besteht aus verschiedenen Komponenten, wie Kollagen, Laminin, Heparansulfat und Fibronectin-ähnlichen Proteinen und dient als extrazelluläre Matrix der Erhaltung der Körperform. Sie ist dabei hochelastisch, so dass die Polypen durch Kontraktion der Epithelmuskelzellen ihre Körperform verändern können (Sarras und Deutzmann, 2001). Funktionell hat die Mesogloea Einfluss auf

Entwicklungsprozesse, indem sie Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle bindet, die gezielt durch proteolytische Spaltung freigesetzt werden können (Sarras und Deutzmann, 2001).

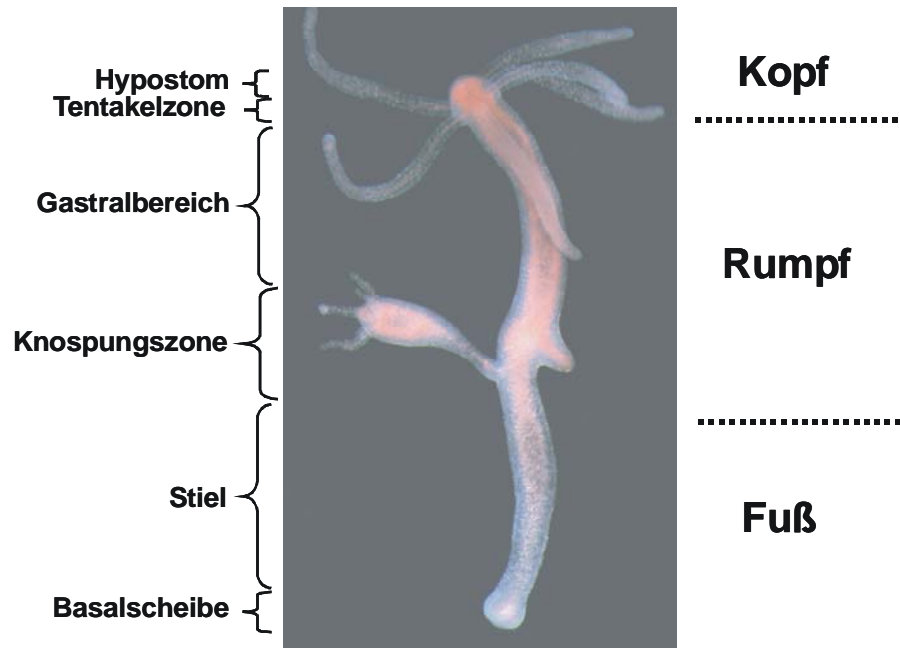


Abb. 2.6: Morphologie von Hydra: Erscheinungsbild eines sich vegetativ fortpflanzenden Polypen.

Der Körper von Hydra setzt sich aus etwa 20 Zelltypen zusammen, die aus drei Zelllinien hervorgehen. Den größten Teil der Zellen machen die Epithelmuskelzellen aus. Die ektodermalen Epithelmuskelzellen bilden mit ihrem ausgeprägten Schlussleistensystem und einer starken Glykokalyx eine effiziente Barriere gegen die Umwelt des Polypen und differenzieren im Kopfbereich zu Nematocyten-tragenden Batteriemutterzellen und im Fußbereich zu Mukopolysaccharid-sezernierenden Basalscheibenzellen. Die entodermalen Epithelmuskelzellen dienen als Gastrodermis der Nahrungsaufnahme. Beide Epithelmuskelzellpopulationen werden aus eigenen Stammzelllinien gebildet. Aus einer dritten Stammzelllinie, den multipotenten interstitiellen Zellen (I-Zellen) gehen die Nervenzellen, die Nesselzellen (Nematocyten), die Geschlechtszellen und einige Drüsenzellen hervor.

Der Lebenszyklus von Hydra beschränkt sich auf die Polypengeneration, die Medusengeneration fehlt im Gegensatz zu den meisten anderen Hydrozoen. In der Regel erfolgt die Fortpflanzung asexuell über Knospung (siehe 2.2.2.4). Bei einer Verschlechterung der Lebensbedingungen können Geschlechtszellen gebildet werden. Die Zygote entwickelt sich ohne Larvenstadium aus einem bestachelten Dauerei innerhalb von ein bis drei Monaten direkt zum Polypen (Martin et al., 1997).

2.2.2 Entwicklungsprozesse in der adulten Hydra

Im Gegensatz zu den meisten triploblastischen Organismen, bei denen Entwicklungsprozesse nur während der Embryonalentwicklung und stark verändert im Zuge von Regenerationsprozessen ablaufen, lassen sich solche Prozesse bei Hydra zeitlebens beobachten.

2.2.2.1 Hydra, der „immerwährende Embryo“

Im Gastralbereich des Polypen proliferieren die Zellen ständig (Holstein et al., 1991). Die neugebildeten Zellen bewegen sich in Richtung der terminalen Strukturen (Abb. 2.7): Das Gewebe oberhalb einer stationären Region, in der kaum Bewegung stattfindet, wird zu den Tentakeln oder zum Hypostom verlagert, unterhalb davon zum Fuß oder zur Knospe (Campbell, 1967b). Die im „Überschuss“ produzierten Zellen werden in die Knospung investiert oder nach Differenzierung in kopf- oder fußspezifische Zellen abgestoßen (Campbell, 1973a): An Hypostom, Tentakeln und Basalscheibe werden die ektodermalen Zellen abgegeben, die entodermalen Zellen gelangen in den Gastralraum und werden verdaut. Auch die Mesogloea wird ständig erneuert (Sarras und Deutzmann, 2001).

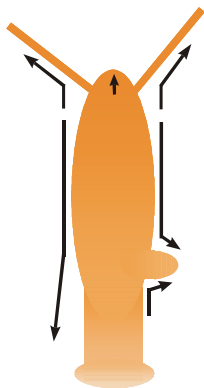


Abb. 2.7: Hydra als „immerwährender Embryo“. Zellbewegungen innerhalb der konstanten Musterbildungsprozesse, die sich im adulten Polypen abspielen.

Durch den ständigen Verlust und die gleichzeitige Proliferation von Zellen befindet sich der Hydrakörper in einem Fließgleichgewicht. Die Zellen verändern ständig ihre Position im Polypen und ihre relative Lage zueinander. Über eine endogene Positionsinformation (siehe 2.2.2.5), auch Positionswert genannt, können die Zellen ihre Lage im Körper von Hydra erkennen (Wolpert, 1971). Über welches molekulare Signal dieser Positionswert vermittelt wird, ist bislang nicht bekannt. Zelldifferenzierungsprozesse sowie Mechanismen der Musterbildung laufen zeitlebens ab. Man kann Hydra aus diesem Grund auch als „immerwährenden Embryo“ bezeichnen.

2.2.2.2 Regeneration

Hydra ist in der Lage, verlorene Körperteile zu regenerieren. Nach einer Amputation von Kopf oder Fuß erfolgt zunächst der Wundverschluss. Anschließend wird ein Organisator gebildet, von dem aus die Entwicklungsprozesse zur Wiederherstellung des verlorenen Körperteils gesteuert werden (Wolpert, 1999; Holstein et al., 2003). In der dritten Phase der Regeneration kommt es zur Ausdifferenzierung von Kopf- oder Fußstrukturen. Die Regeneration geschieht durch Umstrukturierung von vorhandenem Gewebe (Morphallaxis), für die Zellproliferation nicht nötig ist. In Regenerationsexperimenten wurde entdeckt, dass das Gewebe von Hydra eine Polarität besitzt, woraus der Begriff des Positionswertes (siehe oben) abgeleitet wurde. (Wolpert, 1971; Wilby und Webster, 1970; Halow, 1988). Schneidet man einen Polypen in zwei Hälften, so bildet sich an der Schnittkante des oberen Teils ein Fuß aus, während an der Schnittstelle des unteren Teils ein neuer Kopf geformt wird. Ehemals benachbarte Zellen sind demnach in der Lage, ihre Position im Tier zu erkennen und in Abhängigkeit von ihrem relativen Positionswert, unterschiedliche Strukturen auszubilden.

2.2.2.3 Entwicklung von Polypen aus dissoziierten Einzelzellen

Die bisher beschriebenen Entwicklungsprozesse finden an der - zumindest in Fragmenten - intakten Körperachse von Hydra mit den darin definierten Positionswerten statt. *De novo* Musterbildungsprozesse können während der Entwicklung von Polypen aus Einzelzellaggregaten beobachtet werden (Gierer et al., 1972) (Abb. 2.8): Hydren werden dissoziiert, so dass eine Zellsuspension entsteht. Aus den Einzelzellen bildet sich zunächst ein Zellhaufen, in dem ento- und ektodermale Zellen durch Sortierungsprozesse und differenzielle Adhäsion voneinander getrennt werden (Hobmayer et al., 2001). Nach der Reetablierung von Ento- und Ektoderm und der Synthese der Mesogloea entsteht eine Blastula-ähnliche, zweischichtige Hohlkugel. Aus dieser Kugelform heraus werden neue Achsen etabliert, an denen sich Kopf- und Fußstrukturen differenzieren. Dabei geht die Kopfbildung von Zellen aus, die im intakten Tier vor der Dissoziation in relativer Kopfnähe positioniert waren (Sato et al., 1992). Wie bei der Knospung (siehe 2.2.2.4) werden auch während der Entwicklung von Zellaggregaten die entstehenden Körperachsen von der Organisatorregion der Hypostomanlage induziert. Nach einigen Tagen lösen sich intakte Polypen voneinander ab, bei größeren Aggregaten können dies mehrere sein (Gierer et al., 1972; Holstein et al., 2003).

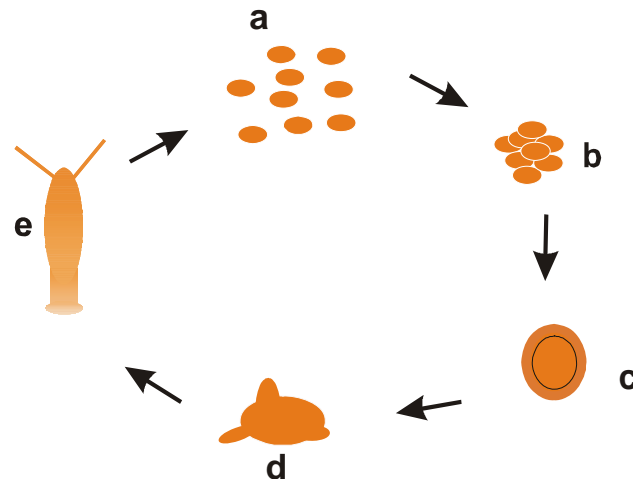


Abb. 2.8: Entwicklung von Polypen aus Zellaggregaten. Dissoziierte Einzelzellen (a) von Hydra finden sich zu einem Zellhaufen (b) zusammen. Es bildet sich eine Hohlkugel (c) aus, an der Kopf- und Fußstrukturen differenzieren (d) und schließlich vollständige Polypen abgelöst werden (e).

2.2.2.4 Knospung

Die Mehrzahl der sich im Gastralbereich ständig neu bildenden Zellen wird für die Knospung, die asexuelle Fortpflanzung von Hydra, verwendet. Dabei wird in der Knospungsregion, die sich bei *Hydra vulgaris* an der Grenze zum unteren Drittel des Gastralbereiches befindet, zunächst eine ringförmige Knospungszone determiniert und an einer bestimmten Stelle lateral eine sekundäre Körperachse etabliert, die senkrecht zur primären Körperachse des Elterntieres orientiert ist. Aus dem Gastralbereich des Elterntieres wandern Zellen in die sich lateral ausstülpnde Knospe ein (Sanyal, 1966). Im weiteren Verlauf differenzieren an der Knospenspitze Kopfstrukturen, an der Basis entsteht ein Fuß. Nach etwa vier bis fünf Tagen löst sich der junge Polyp vom Elterntier ab.

2.2.2.4.1 Morphologische Knospenstadien nach Otto und Campbell (1977)

Otto und Campbell (1977) haben den Knospungsprozess anhand morphologischer Merkmale in zehn voneinander unterscheidbare Stadien aufgeteilt (Abb. 2.9). Den Beginn der Knospung markiert hiernach eine lokale Verdichtung des Ektoderms in der Knospungszone (Stadium 1), aus der sich eine dreieckige Ausstülpung bildet (Stadium 2). Die Knospenstadien 3 bis 5 sind durch die Elongation der Knospe gekennzeichnet, die etwa

3 bis 6 Stunden nach Initiation der Knospung beginnt. In dieser Phase wächst die Knospe deutlich aus, und ihr apikales Ende flacht ab. Stadium 6 ist erreicht, sobald die ersten Tentakelansätze zu erkennen sind, was nach etwa 24 – 30 Stunden der Fall ist. Zu diesem Zeitpunkt besitzt die Knospe eine Mundöffnung und beginnt auf Berührung unabhängig vom Elterntier zu reagieren. Etwa gleichzeitig endet die Einwanderung von Gewebe aus dem Elterntier, die Morphogenese der Knospe selbst hat begonnen. Das Knospenstadium 7 ist durch Wachstum der vorhandenen Tentakel und die Entstehung neuer Tentakel gekennzeichnet. Sobald die Knospenbasis sich verengt, spricht man von Stadium 8. Dies geschieht nach etwa 48 Stunden und stellt den Beginn der Ablösungsphase dar. An dieser Einschnürung differenzieren sich ektodermale Zellen und bilden die Basalscheibe. Der Fuß des jungen Polypen bildet sich aus (Stadium 9). Elterntier und Knospe sind noch miteinander verbunden, allerdings trennt eine deutliche Grenze das elterliche Gewebe von Fußgewebe des jungen Polypen. In Knospenstadium 10 sind die Fußstrukturen vollständig differenziert, Knospe und Elterntier sind nur noch durch eine dünne Gewebebrücke miteinander verbunden, bis sich der junge Polyp schließlich ablöst.

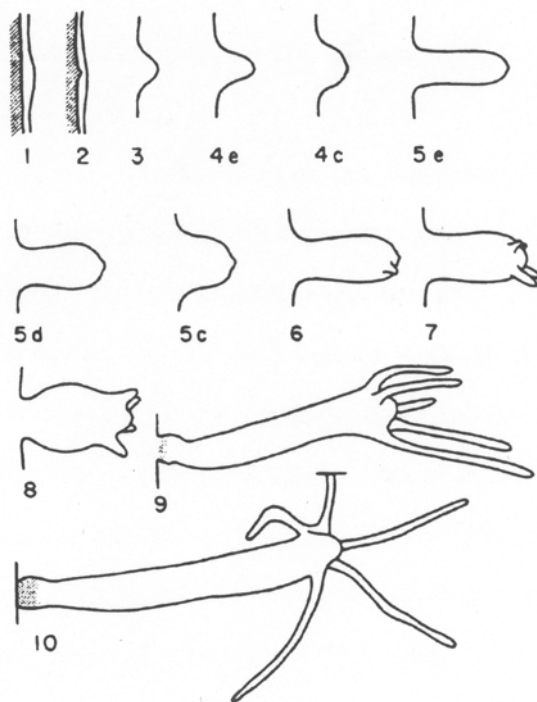


Abb. 2.9: Knospenstadien nach Otto und Campbell (1977). Die einzelnen Knospenstadien werden im Text erklärt. e= elongierte Knospe, c = kontrahierte Knospe, d = flüssigkeitsgefüllte Knospe

2.2.2.4.2 Knospung wird durch Zellwanderung möglich

Die Knospung von Hydra kann in drei Phasen unterteilt werden: Die Initiation, die Elongation und die Ablösung (Otto und Campbell, 1977). In der Initiationsphase werden Zellen aus einem kreisförmigen Areal der elterlichen Knospungszone rekrutiert. Das Schicksal dieser Zellen im späteren Jungpolypen ist zu diesem Zeitpunkt bereits determiniert (Abb. 2.10). Die im Zentrum des Areals befindlichen Zellen sind für die erste Ausstülpung der Knospe verantwortlich und bilden den zukünftigen Kopf. Dabei fungieren die Zellen der Hypostomanlage als Organisator der auswachenden Knospe (Webster und Wolpert, 1966). Zellen, die sich im mittleren Bereich befinden, werden im Gastralbereich der Knospe lokalisiert sein. Aus den Zellen des Randbereiches bildet sich der Fuß (Abb. 2.10).

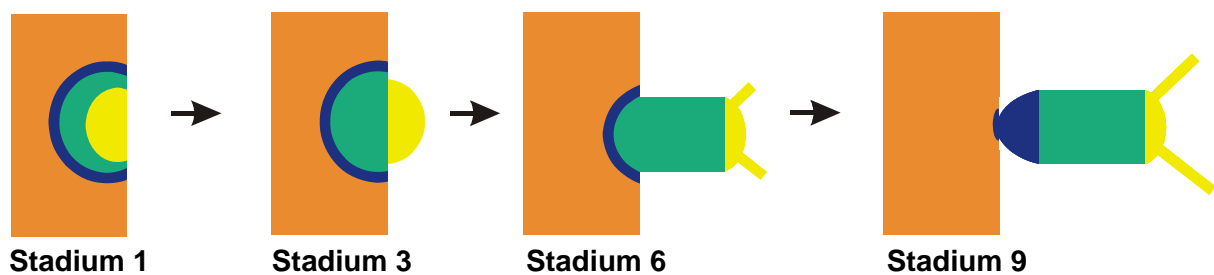


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Rekrutierung von Zellen aus dem Elterntier für die Knospungsmorphogenese (modifiziert nach: Fabila et al., 2002). Zellen aus dem Elterntier wandern in die sich entwickelnde Knospe ein. Das Schicksal dieser Zellen ist bereits vor Beginn der Migration festgelegt.

Das Auswachsen der Knospe erfolgt zunächst ausschließlich durch die Einwanderung von Zellen aus dem Elterntier. Ab dem Knospenstadium 3 sorgen Zellteilungen in der Knospe und weitere Immigration von Zellen für die Elongation (Holstein et al., 1991). Die einwandernden Zellen vollziehen eine drastische Veränderung ihrer Form. Durch Devakuolisierung verlieren sie an Volumen und nehmen eine säulenförmige Gestalt an. Dadurch wird die Fläche, über die sie mit der Mesogloea in Kontakt treten, verringert. Die kontraktilen Fasern der Epithelmuskelzellen, die im Elterntier entlang der oral-aboralen Achse ausgerichtet waren, richten sich in der Elongationsphase vom apikalen Ende ausgehend an der neuen Knospenachse aus (Graf und Gierer, 1980). In einem engen Bereich zwischen Elterntier und Knospenbasis bleiben diese Fasern ungeordnet. Erst mit Bildung der Tentakel in Knospenstadium 6 endet die Zellwanderung. Die weitere Entwicklung der Knospe beruht nun auf Zellteilung und -differenzierung. Die Ablösung des Jungpolypen beginnt mit einer Einschnürung an der Knospenbasis in Stadium 9. Es folgt die Differenzierung der Basalscheibe am proximalen Ende und die Ablösung vom Elterntier.

2.2.2.4.3 Knospungsrelevante Gene in Hydra

Zu Beginn der Knospung sind Gene aktiv, die bei adulten Polypen im Bereich des Hypostoms exprimiert werden. Das Hypostom fungiert - ebenso wie die apikale Spitze der auswachsenden Knospe - als Kopforganisator: Durch Transplantation von hypostomalem Gewebe kann im Rumpfbereich des Empfänger-Polypen eine sekundäre Körperachse induziert und umliegendes Gewebe zur Kopfbildung angeregt werden (Browne, 1909). Zu den frühesten Genen, die im Verlauf der Knospung exprimiert werden, gehören die Vertreter der kanonischen Wnt-Signalkaskade *HyTcf*, *Hy β -Cat* und *HyWnt* (Hobmayer et al., 2000) ebenso wie das *brachyury*-Homolog *HyBra1* (Technau und Bode, 1999) (Abb. 2.11). *HyTcf*, *Hy β -Cat* und *HyBra1* sind schon in der Knospungsregion detektierbar bevor das Auswachsen der Knospe morphologisch sichtbar ist (Hobmayer et al., 2000; Technau und Bode, 1999; Martinez et al., 1997). Die Expression von *HyWnt* beginnt in Knospungsstadium 1, wobei *HyWnt*-mRNA nur in wenigen Zellen des zukünftigen Hypostoms lokalisiert ist. Während der gesamten Knospung bleiben die genannten Gene im apikalen Bereich des Jungpolypen exprimiert. Bei adulten Tieren sind sie im Bereich des Hypostoms lebenslang nachweisbar. Die Expressionsmuster dieser Gene deuten auf eine zentrale Funktion in der Organisatorregion und somit auf eine Beteiligung an der Achseninduktion und -morphogenese hin (Technau, 2001; Hobmayer et al., 2000; Martinez et al., 1997). Im späteren Verlauf der Knospung wird ihnen eine Rolle bei der Differenzierung der Kopfregion zugewiesen. Die Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalweges für die Ausbildung einer sekundären Achse wurde durch weitere Experimente belegt: Durch Injektion von *Hy β -Cat*-mRNA in die ventralen Blastomere von *Xenopus*-Embryonen konnte die Ausbildung einer sekundären Körperachse induziert werden (Hobmayer et al., 2000). Broun et al. (2005) vermuten, dass die kanonische Wnt-Signalkaskade an der Etablierung der Organisatorregion beteiligt ist: Durch spezifische Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) wurden Polypen erzeugt, die an der gesamten Körpersäule in fleckenförmigen Expressionsdomänen mit definierten Abständen zueinander *HyWnt* exprimierten. Damit verbunden entstanden im gesamten Rumpfbereich Organisationszentren, die in Transplantationsexperimenten die Kopfbildung induzieren konnten.

Ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt der Knospung wird das Homöoboxgen *CnOtx* exprimiert (Smith et al., 1999) (Abb. 2.11). Die Expression dieses Gens korreliert mit der Wanderung von Zellen aus dem Elterntier in die Knospe. Es wird ab dem Knospungsstadium 1 in der Knospungsanlage und im umliegenden elterlichen Gewebe, aus dem Zellen für die auswachsende Knospe rekrutiert werden, aktiviert. Je mehr Zellen in die Knospe verlagert worden sind, umso kleiner wird die *CnOtx*-Expressionsdomäne im Elterntier. In der Knospe ist dieses Gen bis Knospungsstadium 4 ubiquitär stark aktiviert, wird dann zunächst an der

Spitze und wenig später im Rumpfbereich des Jungpolypen herabreguliert. In Knospenstadium 9 ist *CnOtx* wie bei adulten Polypen nur noch sehr schwach im Rumpfbereich nachweisbar. Neben seiner Beteiligung an der Zellwanderung kann *CnOtx* keiner weiteren Funktion während der Knospung zugeordnet werden (Smith et al., 1999).

Mit Ausbildung der Tentakelknospen in Stadium 6 beginnt die Differenzierung von Kopfstrukturen, der die Expression differenzierungsrelevanter Gene vorangeht (Abb. 2.11). Zu ihnen gehören das für eine Rezeptortyrosinkinase codierende Gen *sweet tooth* (Reidling et al., 2000) und *HyAlx* (Smith et al., 2000), ein *aristaless*-Homolog, deren Expression in den Tentakel und der unterhalb des Hypostoms gelegenen Tentakelzone lokalisiert ist.

Mit dem Homöoboxgen *CnNk-2* (Grens et al., 1996) wird das erste fußspezifische Gen in Knospenstadium 5 aktiviert (Abb. 2.11). Die Expressionsdomäne dieses Gens ist zunächst in einem ringförmigen Areal im Elterntier, das die Knospenbasis umgibt, lokalisiert. *CnNk-2* ist also in den Zellen aktiv, die später den Knospenfuß ausbilden werden. Mit weiterem Auswachsen der Knospe verlagert sich die Expressionsdomäne in den Bereich des Knospenstiels (Grens et al., 1996). Mit *k10-7* (Hotz, in Vorbereitung), *shin guard* und *manacle* (Bridge et al., 2000) folgt die Expression weiterer fußspezifischer Gene ab Knospenstadium 6 bzw. 7, also kurz bevor mit der Einschnürung der Knospenbasis morphologisch die Bildung des Fußes sichtbar wird. *k10-7* gehört zu den Tenascinen (Hotz, in Vorbereitung), einer Genfamilie, die für Proteine der extrazellulären Matrix codiert. Tenascine sind beteiligt an Zelladhäsionsvorgängen, aber auch an der Abgrenzung von Geweben. Sie können das Actincytoskelett beeinflussen (Midwood und Schwarzbauer, 2002) und somit die Gestalt von Zellen verändern (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004). Bei adulten Hydren wird *k10-7* in der Fußregion exprimiert (Hotz, in Vorbereitung). Das für eine Rezeptortyrosinkinase codierende Gen *shin guard* gilt als Marker für die Stilregion in adulten Polypen, während die Expression von *manacle*, einem Homöoboxgen, für Zellen der Basalscheibe charakteristisch ist (Bridge et al., 2000).

Mit Ausnahme von *CnOtx*, das in die Zellwanderungsprozesse vom Elterntier in die Knospe involviert ist, werden alle Gene, die im Verlauf der Knospung aktiviert werden, auch während der Musterbildungsprozesse exprimiert, die in adulten Tieren ablaufen.

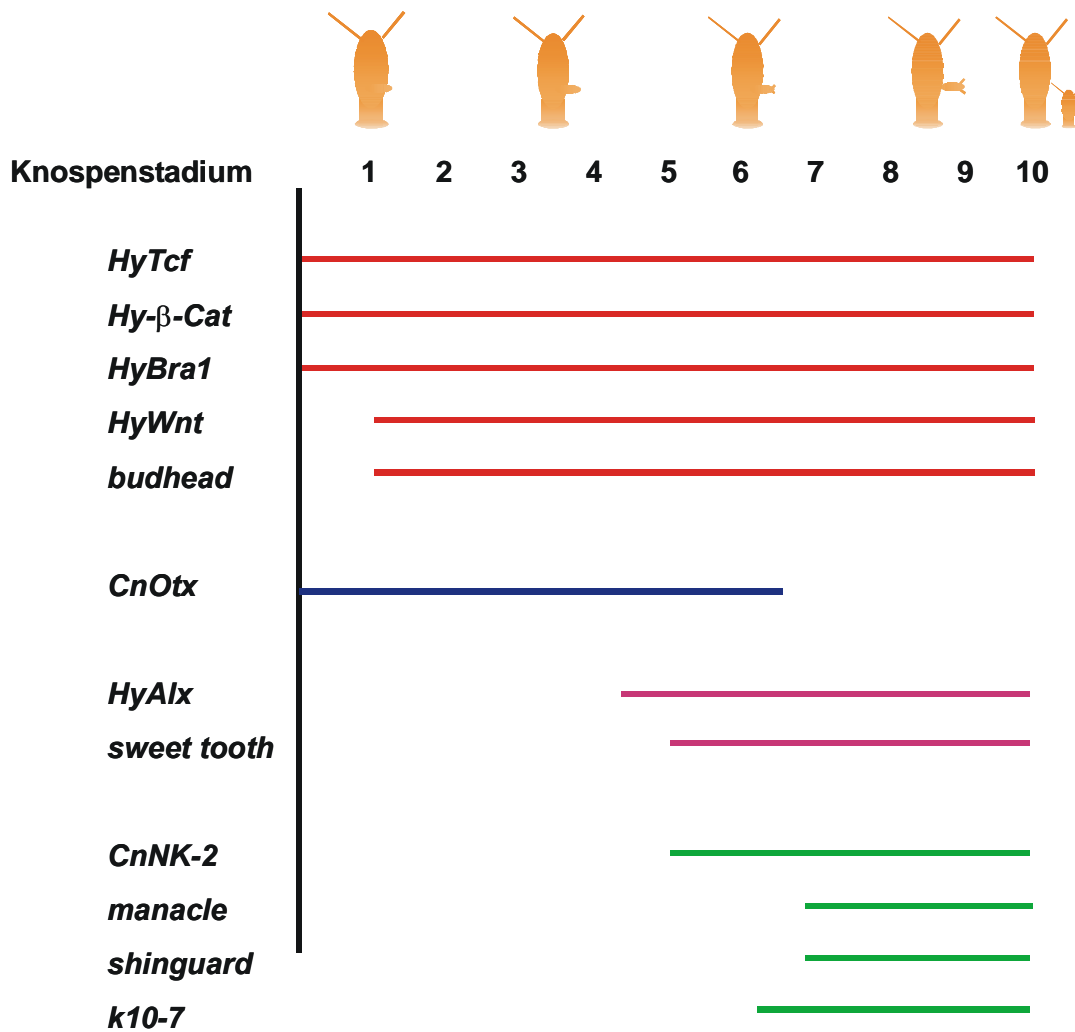


Abb. 2.11: Genexpression während der Knospung. Die Knospung beginnt mit der Expression von Genen, die in adulten Polypen kontinuierlich im Hypostom exprimiert werden (rote Balken) bzw. mit der Wanderung von Zellen in Verbindung gebracht werden (blauer Balken). Es folgt die Expression von Genen, die in Differenzierungsvorgänge im Kopfbereich involviert sind (violette Balken) und schließlich von Genen, die die Fußregion markieren (grüne Balken).

2.2.2.5 Modelle zur Musterbildung in Hydra

Die detaillierte Beobachtung der Musterbildungsprozesse, die in Hydra während Knospung, Regeneration und der Entwicklung von Zellaggregaten, aber auch im adulten Polypen ablaufen, führte schon früh zur Formulierung von theoretischen Modellen. In seinen Arbeiten über die Grundlagen der Morphogenese veröffentlichte Alan Turing 1952 die Theorie des Reaktions-Diffusionsmodells, in dem er postulierte, dass durch die Interaktion zweier Substanzen mit unterschiedlichen Diffusionsraten Muster ausgebildet werden (Turing, 1952). Gierer und Meinhardt griffen dieses Modell auf (Gierer und Meinhardt, 1972). Ihrer Ansicht nach ist für die Musterbildung das Zusammenspiel eines langlebigen Aktivators, der zur

Autokatalyse fähig ist und nur über kurze Strecken diffundieren kann, und eines langreichweitigen, aber kurzlebigen Inhibitors nötig (Abb. 2.12). In diesem Modell wird die Synthese des Inhibitors durch den Aktivator stimuliert, während der Inhibitor in der Lage ist, den Aktivator zu inhibieren. Inhibitor und Aktivator werden zunächst auf einem basalen Level gebildet. Durch zufällige Schwankungen in der Produktion des Aktivators kommt es zu einem lokalen Aktivatormaximum, das durch Autokatalyse noch verstärkt wird, aber durch die verstärkte Synthese des Inhibitors lokal begrenzt bleibt.

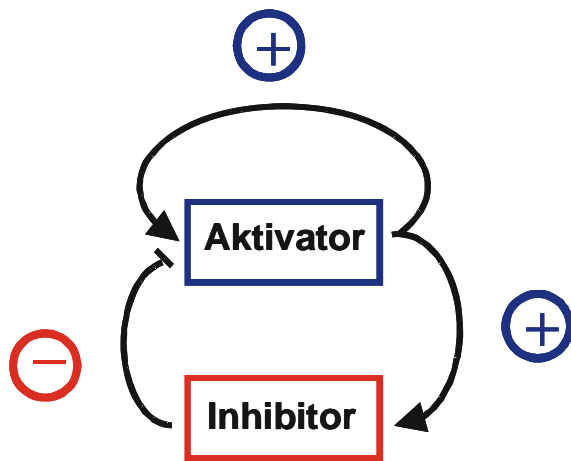


Abb. 2.12: Reaktions-Diffusionsmodell zur Musterbildung in Hydra. Ein Aktivator-Inhibitor-System funktioniert nach dem Prinzip der lokalen Selbstverstärkung und der Hemmung über eine längere Distanz

Im Falle von Hydra werden zwei Organisator-Zentren, eines im Kopf und eines im Fuß, angenommen mit jeweils einem Aktivator-Inhibitor-System. Es entstehen zwei gegenläufige Gradienten: Das Kopfbildungspotential, das im Kopfbereich am stärksten ist und zur Körpermitte abnimmt und das Fußbildungspotential mit einem Maximum im Fußbereich. Beide Systeme sind über den Positionswert gekoppelt und können auf diesen Einfluss nehmen (Gierer und Meinhardt, 1972). Dieses Modell liefert eine gute Erklärung für die Regeneration in Hydra: Durch Amputation des Kopfes geht das Zentrum der Aktivatorproduktion verloren, was auch direkten Einfluss auf die Synthese des Inhibitors hat. Das Zusammenspiel von Aktivator und Inhibitor gerät aus dem Gleichgewicht. Nach einer gewissen Zeit ist der Inhibitor abgebaut. Man könnte annehmen, dass das Gewebe nun in der Lage ist, an jeder beliebigen Position die fehlende Kopf- oder Fußstruktur neu zu bilden. Dies ist aber nicht der Fall. Nach Entfernen des Kopfes „erkennen“ die Zellen an der Schnittstelle, dass sie jetzt den höchsten Positionswert im verbleibenden Gewebe besitzen. Dies regt sie zur Produktion des Kopfaktivators an und das Aktivator-Inhibitor-System wird neu etabliert (Gierer und Meinhardt, 1972; Meinhardt, 1993).

Durch das oben beschriebene Gierer-Meinhardt-Modell lässt sich die Determination der Knospungszone erklären: Eine Knospe bildet sich in einer bestimmten Entfernung von Kopf und Fuß, die durch die gegenläufigen Gradienten definiert wird. Viele andere Fragen in bezug auf die Knospung bleiben aber unbeantwortet. Aus diesem Grund formulierte Berking ein alternatives Modell zur Musterbildung in Hydra, das zum Ziel hat, die Knospung zu erklären (Berking, 2003). Im Gegensatz zu Gierer und Meinhardt (1972), die davon ausgehen, dass Kopf- und Fußaktivator direkt auf die Bildung von Kopf- bzw. Fußstrukturen Einfluss nehmen, glaubt Berking, dass es nur ein Aktivator-Inhibitor-System gibt, das indirekt durch die Veränderung des Positionswertes wirkt. Während der Knospung bewirkt dieses System eine lokale Erhöhung des Positionswertes in der Knospungszone. Es kommt zu einem stabilen Maximum, in dessen Peripherie der Positionswert nahezu auf Null absinkt. Dadurch wird jene ringförmige Geweberegion determiniert, aus der sich später die Knospe entwickelt (siehe 2.2.2.4.2). Der maximale Positionswert im Zentrum bewirkt die Bildung des Hypostoms, während der minimale Positionswert in der Peripherie die Differenzierung der Basalscheibe zur Folge hat (Berking, 2003).

Diese Modelle legen verschiedene Aktivator-Inhibitor-Systeme zugrunde, die letztendlich für die Regulation der Musterbildung in Hydra verantwortlich sind. Die molekularen Grundlagen dieser Systeme sind bis heute noch unbekannt, wenngleich einige Gene identifiziert wurden, die mit der Ausbildung von Organisatorregionen und mit Veränderungen im Positionswert in Verbindung gebracht werden.

2.3 Ziel der Arbeit

Die oben beschriebenen Modelle zur Musterbildung bei Hydra sind vor allem über die Auswertung von Regenerations- und Transplantationsexperimenten und durch Beobachtungen auf zellulärer Ebene entstanden. Die molekularen Prozesse, die der Musterbildung zugrunde liegen, sind dagegen immer noch weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Erkenntnisse über diese molekularen Abläufe erweitert werden. Dabei stand die Knospung im Mittelpunkt der Analysen, denn während der asexuellen Fortpflanzung laufen nahezu alle Musterbildungsprozesse ab, zu denen Hydra fähig ist.

In einem ersten Projekt sollten über *Screening*-Verfahren unspezifisch Gene identifiziert werden, die möglicherweise in die Steuerung der Knospung involviert sind. Dazu wurden zwei voneinander unabhängige Strategien verfolgt:

1. Durch ein Genexpressions-*Screening* sollten Gene identifiziert werden, die während der Knospung transkriptionell aktiv sind.

2. Mit Hilfe von Makroarrays sollte ein Massen-*Screening* zur Detektion knospungsrelevanter Gene durchgeführt werden.

Für das zweite Projekt sollte spezifisch ein Kandidaten-Gen gezielt ausgewählt und charakterisiert werden. Dabei sollte eine detaillierte Analyse von Sequenz und Expressionsmustern erste Aussagen über eine mögliche Funktion dieses Gens zulassen, die mittels funktioneller Untersuchungen eindeutig bestimmt werden sollte.

3 Ergebnisse

Hydra vermehrt sich vor allem vegetativ durch Knospung. Während dieses Prozesses laufen praktisch alle Musterbildungsprozesse ab, derer Hydra fähig ist. Zu Beginn wird die Knospungszone als breiter Ring etwa in Körpermitte determiniert, dann wandern Zellen gezielt zu dem sich in diesem Ring lateral bildenden Knospenprimordium, die Knospe wächst aus, differenziert Kopf- und Fußstrukturen und schließlich erfolgt die Abgrenzung des jungen Polypen vom Elterntier und seine Ablösung (Abb. 2.9) Über die molekulare Steuerung dieser Prozesse ist noch wenig bekannt.

3.1 Identifizierung knospungsrelevanter Gene bei Hydra

Das erste Projekt dieser Arbeit verfolgte das Ziel, Gene zu identifizieren, die an den komplexen Musterbildungsprozessen während der Knospung von *Hydra vulgaris* beteiligt sind und möglicherweise eine regulatorische Funktion besitzen. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, deren Kombination letztendlich zur erfolgreichen Isolation solcher Gene führen sollten:

- 1) Zunächst sollte in einem Genexpressionsscreening mittels *in situ*-Hybridisierung gezielt nach Genen gesucht werden, die während der Knospung von Hydra exprimiert werden. Ein solches Genexpressionsscreening bietet die Möglichkeit, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, indem aus geeigneten Banken zufällige Klone ausgewählt und über *in situ*-Hybridisierung analysiert werden. cDNAs, die eine räumlich oder zeitlich begrenzte Expression aufweisen, stehen für weitere Analysen sofort zur Verfügung. Bei guter Qualität der verwendeten Bank liegen viele der cDNAs in gesamter Länge mit Start- und Stop-Codon vor (Gawantka et al., 1998). Ein solcher Ansatz hatte sich bereits bei *Xenopus* als sehr vielversprechend erwiesen und zur Identifikation von entwicklungsrelevanten Genen geführt (Gawantka et al., 1998).
- 2) Der zweite Ansatz konzentrierte sich auf die Identifikation von Genen, die für Komponenten von Signalkaskaden codieren. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit M. Frohme und J. Hoheisel, DKFZ Heidelberg, Makroarrays erstellt und mit Oligonukleotiden hybridisiert, die gegen zwei *Splice Leader*-Sequenzen (Stover und Steele, 2001) von Hydra gerichtet waren. Diesem Ansatz lag die Beobachtung zugrunde, dass bei den bis zu diesem Zeitpunkt analysierten Transkripten *Splice Leader*-Sequenzen bevorzugt an Transkripten von Genen zu finden waren, deren Produkte für Elemente von Signalkaskaden codierten.

Die im Folgenden zusammengefassten Ergebnisse dieser beiden Projektteile sind fragmentarisch, da ich aufgrund meiner Schwangerschaft zu Beginn des zweiten Promotionsjahres keine radioaktiven Arbeiten mehr durchführen konnte, und sich im Folgenden ein unter Funktionsaspekten sehr viel interessanteres Alternativprojekt entwickelte.

3.1.1 Konstruktion von Knospungs- und Fuß-spezifischen cDNA-Banken

Für das Expressionsscreening wurden drei gerichtet klonierte cDNA-Banken im Lambda ZAP Phagenvektor (Stratagene) hergestellt: Zur Konstruktion der ersten cDNA-Bibliothek wurde mRNA der Knospungsregion von Polypen in unterschiedlichen Knospungsstadien (siehe 2.2.2.4.1) isoliert. Diese cDNA-Bank wird im Folgenden als „Knospenbank“ bezeichnet. Bei einem primären Titer von $2,7 \times 10^5$ *plaque forming units* (pfu) lag die durchschnittliche Größe der in dieser Bank enthaltenen Inserts bei 1,8 kb. Aus dieser Bank wurden in einem Pilotexperiment 384 zufällig ausgewählte Phagen gepickt und deren Inserts nach Amplifikation auf Makroarrays übertragen.

Um die Spezifität der Suche nach Kandidatengen zu erhöhen, wurden für eine weitere cDNA-Bank knospenspezifische Transkripte über eine subtraktive Hybridisierung gezielt angereichert. Diese Bank, im Folgenden als „subtrahierte Bank“ bezeichnet, beinhaltete insgesamt 1500 cDNAs, von denen leider etwa 70% kleiner als 100 bp waren. Alle 1500 cDNAs wurden auf Makroarrays übertragen.

Als dritte Bank wurde die sogenannte „Fußbank“ etabliert. Dafür wurden Fußregionen mit Stiel und Basalscheibe isoliert, aus denen die mRNA isoliert und zur Konstruktion der Bank benutzt wurde. Der Primär-Titer dieser Fußbank betrug $1,1 \times 10^6$ pfu. Die enthaltenen Inserts waren im Durchschnitt 1,1 kb groß. Von dieser Bank wurden keine Arrays hergestellt.

3.1.2 Mittels Expressionsscreening konnten in allen drei Banken regiospezifisch exprimierte Gene nachgewiesen werden

Zur Validierung der Banken und Identifizierung von Genen, die während der Knospung exprimiert werden, wurden zunächst aus den drei Banken insgesamt 121 cDNAs zufällig ausgewählt: 74 aus der subtrahierten Bank, 22 aus der Knospenbank und 25 cDNAs aus der Fußbank. Die Expressionsmuster der entsprechenden Transkripte wurden mittels Ganz-Tier *in situ*-Hybridisierung analysiert. Klone, die eine Expression in der sich entwickelnden Knospe zeigten, wurden ansequenziert. Mit den resultierenden Sequenzen wurden Protein- und DNA-Datenbanken ebenso wie die Datenbank des Hydra EST-Projekts nach verwandten Sequenzen durchsucht.

Aus allen Banken konnten cDNAs mit regiospezifischen Expressionsmustern isoliert werden (Abb. 3.1, Abb. 3.3), wobei die mittels Knospenbank und subtrahierter Bank isolierten Transkripte zum großen Teil nur in der Knospe oder in Knospe und Kopfregion des Elterntieres aktiviert werden, während die Expression der aus der Fußbank stammenden cDNAs in späten Knospungsphasen im Knospenfuß und im elterlichen Fuß detektiert wird (Abb. 3.1).

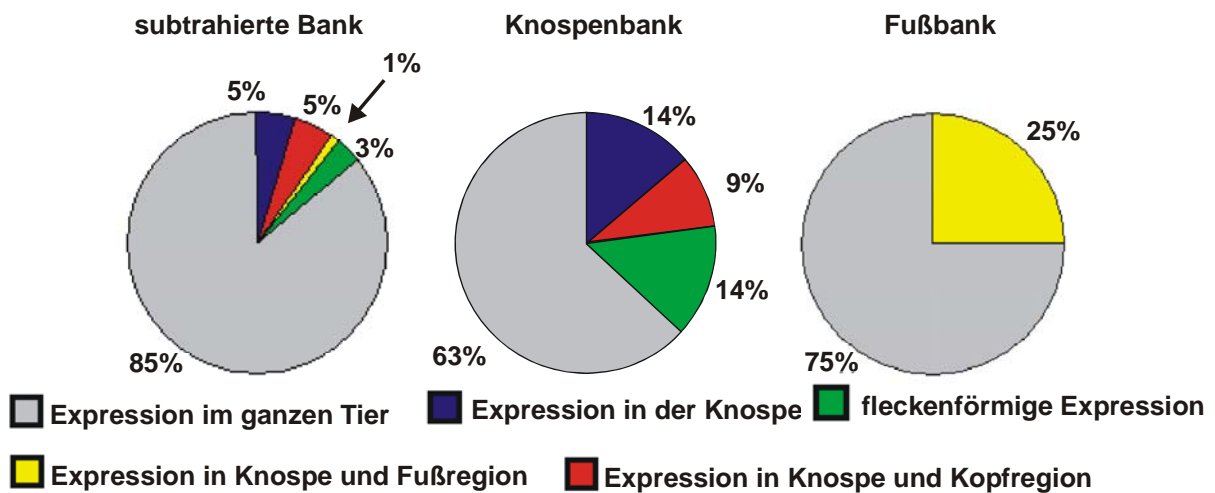


Abb. 3.1: Expressionsdomänen der aus den einzelnen cDNA-Banken isolierten Transkripte im Überblick.

Von allen analysierten Transkripten zeigten sieben ein Expressionsmuster, das auf die Knospungszone beschränkt war (Tab. 3.1, Abb. 3.4 A). Bei sieben weiteren cDNAs aus der Knospenbank und der subtrahierten Bank wurden zusätzlich auch die Kopf- und Rumpfregeion angefärbt (Tab. 3.1, Abb. 3.4.B). Sieben Klone erwiesen sich als spezifisch für die Knospungs- und die Fußregion von Hydra (Tab. 3.1, Abb. 3.4 C). Bis auf eine Ausnahme wurden sie aus der Fußbank isoliert. Desweiteren konnten vier Transkripte, mit fleckenförmigen Expressionsdomänen entlang des Rumpfbereiches identifiziert werden (Tab. 3.1, Abb. 3.4 D). Die übrigen 96 untersuchten cDNAs erzeugten eine mehr oder weniger deutliche, gleichmäßige Färbung der Polypen, waren also ubiquitär exprimiert.

Tab. 3.1: cDNA-Fragmente mit regionspezifischen Expressionsmustern.

cDNA	Herkunft	Größe (bp)	ähnliche Proteine	E-Value
Expression in der Knospungsregion				
<i>CW1</i>	Knospenbank	2000	keine	
<i>CW4</i>	subtr. Bank	<100	bakteriell	
<i>Yes1</i>	Knospenbank	1900	Rab11	1,9e ⁻³⁹
<i>Yes2</i>	Knospenbank	3200	NADH-Dehydrogenase	7,1e ⁻¹³
<i>sub27</i>	subtr. Bank	600	keine	
<i>sub222</i>	subtr. Bank	1300	keine	
<i>sub328</i>	subtr. Bank	<100	bakteriell	
Expression in Kopf- und Knospungsregion				
<i>BM1</i>	Knospenbank	1400	Inositol1,3,5-trisphosphat 5/6-Kinase	2,6e ⁻⁹
<i>CK3</i>	Knospenbank	900	Nicht sequenziert	
<i>CW2</i>	Knospenbank	1400	HvRACK1	7,2e ⁻⁸⁶
<i>sub649</i>	subtr. Bank	1100	Nicht sequenziert	
<i>sub707</i>	subtr. Bank	1300	Nicht sequenziert	
<i>sub729</i>	subtr. Bank	800	RHO/GEF	5,9e ⁻¹¹
<i>sub824</i>	subtr. Bank	700	Nicht sequenziert	
Expression in Fuß- und Knospungsregion				
<i>KH3</i>	Fußbank	2400	keine	
<i>KH4</i>	Fußbank	2100	Junctophilin	8,7e ⁻¹⁹
<i>KH7</i>	Fußbank	1100	keine	
<i>KH9</i>	Fußbank	1300	Rhamnose-bindendes Lektin	2,6e ⁻⁵³
<i>KH12</i>	Fußbank	500	HYM-176	1,1e ⁻⁸⁴
<i>KH15</i>	Fußbank	1500	Arabinofuranosidase	4,2e ⁻¹⁴
<i>sub698</i>	subtr. Bank	900	keine	
fleckenförmige Expression im Rumpfbereich				
<i>Yes3</i>	Knospenbank	1700	Nicht sequenziert	
<i>2a3</i>	Knospenbank	700	Nicht sequenziert	
<i>sub72</i>	subtr. Bank	2100	Nicht sequenziert	
<i>sub169</i>	subtr. Bank	1700	Nicht sequenziert	

Die 21 cDNAs, die eine Expression in der Knospe zeigten, sollten ansequenziert werden. Bei der Sequenzierung der ersten 15 Klone stellte sich heraus, dass es sich bei den aus der subtrahierten Bank stammenden Klonen mit einer Größe von weniger als 100 bp (**CW4** und **sub328**) eindeutig um Fragmente bakterieller Gene (*E. coli*) handelte. Weitere Sequenzdaten aus der Analyse von sehr kurzen cDNAs, die mit Hilfe der *Splice Leader*-Oligonukleotidsequenzen identifiziert worden waren, weil sie kurze Sequenzabschnitte enthielten, die mit Teilen der *Splice Leader*-Sequenzen übereinstimmten (siehe 3.1.3), bestätigten dieses Ergebnis. Man kann also davon ausgehen, dass es sich bei den Inserts der subtrahierten Bank, die kleiner als 100 bp sind, um Klonierungsartefakte handelt.

Weitere cDNAs konnten in drei Kategorien unterteilt werden:

- a) cDNAs ohne Verwandte in bekannten Datenbanken,
- b) cDNAs, deren Genprodukte in allgemeine physiologische Prozesse, wie Zellzykluskontrolle, grundlegende Genexpression oder Strukturaufbau involviert sind,
- c) cDNAs, deren Genprodukte an intrazellulären Signalprozessen teilnehmen.

a) cDNAs ohne Verwandte in bekannten Datenbanken

Beim Vergleich der Sequenzen von **CW1**, **sub27**, **sub222**, **sub698**, **KH3** und **KH7** mit Protein- und DNA-Datenbanken über BLAST konnte für keinen dieser Klone eine signifikante Ähnlichkeit zu einer bekannten Sequenz festgestellt werden (Tab. 3.1).

b) Genprodukte, die im weiteren Sinne in physiologische Prozesse involviert sind

Mit dem Klon **YES2**, der für NADH-Dehydrogenase codiert (Schinko, 2002), und dem Klon **KH15**, der große Ähnlichkeit zum Gen für α -L-Arabinofuranosidase aufweist, konnten zwei Gene identifiziert werden, die an Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Bislang sind 130 Sequenzen für Arabinofuranosidasen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien identifiziert worden (Zverlov et al., 1998). Diese Enzyme gehören zu den Hemicellulasen und spielen durch Spaltung glykosidischer Bindungen eine wichtige Rolle beim Abbau von pflanzlicher Biomasse zu löslichen Zuckern (Vasella et al., 2002).

Die aus der Fußbank isolierte cDNA **KH9** codiert für ein Rhamnose-bindendes Lektin (Tab, 3.1, Abb. 3.3 C). Solche Lektine wurden bisher vor allem in Eiern und Ovarien verschiedener Fischarten gefunden, aber auch in Milz, Serum, Leukozyten und Thrombozyten dieser Tiere (Tateno et al., 2002b). Aufgrund dieser Lokalisation der Rhamnose-bindenden Lektine und ihrer Fähigkeit, gram-negative und gram-positive Bakterien zu erkennen und zu agglutinieren (Tateno et al., 2002a), geht man davon aus, dass diese Proteine dem angeborenen Immunsystem von Fischen zuzurechnen sind. Die Fußregion von Hydra wird aufgrund der Produktion von Mukopolysacchariden, die der Anheftung der Tiere an den Untergrund

dienen (siehe 2.2.1.), gern von Bakterien besiedelt. Ein Lektin, das in der Lage ist, Bakterien zu agglutinieren, könnte ein wichtiges Element antimikrobieller Abwehrmechanismen darstellen. Rhamnose-bindende Lektine bei Hydra wurden in der Doktorarbeit von Tobias Hotz (in Vorbereitung) weiter untersucht.

Wie KH9 wird auch **KH4** in der Fußregion von Knospe und Elterntier exprimiert (Abb. 3.3 C). Dieses Transkript zeigt Ähnlichkeit zu Vertretern aus der Proteinfamilie der Junctophiline. Diese Proteine stabilisieren einen Komplex (*junctional membrane complex* = JMC) zwischen Plasmamembran und endoplasmatischem bzw. sarcoplasmatischem Retikulum (ER/SR), der charakteristisch für alle erregbaren Zelltypen ist (Takeshima et al., 2000) und als strukturelle Bedingung für eine Interaktion zwischen Zelloberfläche und intrazellulären Ionenkanälen angesehen wird (Takeshima et al., 2000). Dieser Komplex wurde eingehend an Skelettmuskelzellen von Säugern untersucht, wo er als „*triad junction*“ bezeichnet wird (Abb. 3.2) (Flucher, 1992): Ein Aktionspotential wird über den Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR) an der Zelloberfläche registriert, der daraufhin ein Signal über die „*triad junction*“ direkt an den Ryanodin-Rezeptor (RyR), dem Ca^{2+} -Kanal des SR, gibt. Die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen für eine Muskelkontraktion wird auf diese Weise induziert (Schneider, 1994). Junctophiline nehmen eine entscheidende Rolle in der Ausbildung des JMC ein: Sie besitzen eine hydrophobe Domäne am C-Terminus, die die Membranen von ER bzw. SR durchspannt. Ein Teil ihrer cytoplasmatischen Domäne ist in der Lage, an die Plasmamembran zu binden (Takeshima et al., 2000). Junctophilin-defiziente Nematoden, *C. elegans*, zeigen eine eingeschränkte Mobilität im Vergleich zu Nematoden des Wildtyps. Yoshida et al. (2001) gehen davon aus, dass durch das Fehlen von Junctophilin die Ausbildung von JMC verhindert wird. Die Signalweiterleitung von DHPR zum SR ist somit gestört, und die Muskelzellen sind nur noch bedingt kontraktionsfähig.

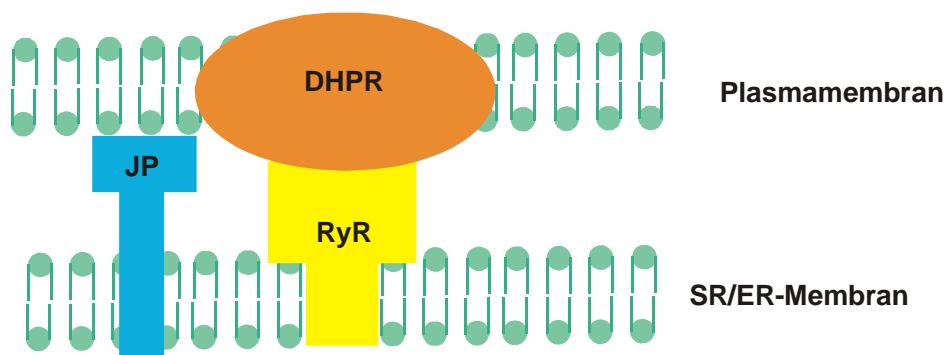


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau einer „*triad junction*“ (modifiziert nach: Ito et al., 2001). Junctophiline sind in der Membran von ER bzw. SR verankert und interagieren mit der Plasmamembran, was Voraussetzung für den Kontakt von RyR und DHPR ist. JP: Junctophilin, RyR: Ryanodin-Rezeptor, DHPR: Dihydropyridin-Rezeptor.

Die Expression von **KH12** beschränkt sich auf die untere Hälfte der Stielregion oberhalb des Fußes (Abb. 3.3 C). Auch hier ist die Expression sowohl im Elterntier als auch in Fußregion der späten Knospe nachweisbar. KH12 zeigt eine nahezu 100%-ige Identität zu dem Präprohormon von Hym-176, einem myoaktiven Neuropeptid aus *Hydra magnipapillata* (Yum et al., 1998a), das die reversible Kontraktion von ektodermalen Epithelmuskelzellen induzieren kann (Yum et al., 1998b). Die stärkste Expression von Hym-176 ist in den Neuronen der unteren Hälfte der Stielregion von *H. magnipapillata* zu finden, während in Neuronen der Basalscheibe keine Expression nachweisbar ist. Dieses Expressionsmuster stimmt mit dem von **KH12** in *H. vulgaris* überein (Abb. 3.3 C). Eine weitere Analyse von **KH12** erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von Tobias Hotz (in Vorbereitung).

c) In Signalkaskaden involvierte Gene

Neben den oben beschriebenen Transkripten konnten vier cDNAs isoliert werden, die Ähnlichkeiten zu Proteinen aufweisen, welche in höheren Organismen direkt oder indirekt in Signalkaskaden involviert sind. Zu diesen cDNAs gehört **CW2**, das in Knospe und Kopfbereich gradiert exprimiert wird, und für ein RACK-1 (*receptor of activated C kinase*) - ähnliches Protein codiert. RACKs sind membranständige Proteine aus der Superfamilie der regulatorischen *WD-repeat* Proteine, die durch Lipide aktivierte und an die Membran translozierte Proteinkinase C binden. (Ron et al., 1994). Normalerweise wird aktivierte PKC innerhalb kurzer Zeit durch Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige Protease verdaut, RACK verhindert dies und sorgt so für eine langdauernde Aktivierung. Entsprechend sind RACKs essentiell für PKC-gesteuerte zelluläre Prozesse wie z.B. Zellteilung, Differenzierung, Transkription oder vesikulären Transport. Das Hydra-Homolog, HvRACK1, wurde bereits 1997 in unserem Labor aus Hydra isoliert und charakterisiert (Hornberger und Hassel, 1997), allerdings weichen die Expressionsmuster von HvRACK1 und **CW2** voneinander ab, obwohl die Sequenzen beider cDNAs identisch sind. In einer Staatsexamensarbeit, in der **CW2** weiter charakterisiert wurde, konnte geklärt werden, dass das 1997 publizierte Expressionsmuster durch eine Verunreinigung der Sonde mit einem Minikollagen zustande gekommen war (Schinko, 2002).

Die cDNA **YES1** codiert für ein putatives Rab11-Protein. Bei Rab11 handelt es sich um eine GTPase, die am intrazellulären Transport von Proteinen mittels Vesikeln beteiligt ist (Zeng et al., 1999). Dabei ist Rab11 unter anderem in Transport und Recycling von Transmembranrezeptoren für Signalmoleküle, z. B. TGF- β -Rezeptor (Mitchell et al., 2004) oder E-cadherin (Moore et al., 2004) involviert. Auch diese cDNA wurde im Rahmen einer Staatsexamensarbeit weiter analysiert (Schinko, 2002).

Mit **BM1** wurde ein Transkript identifiziert, das für eine Inositol-1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase codiert. Dieses Enzym nimmt am Phosphoinositidstoffwechsel teil: Durch Spaltung von

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat durch Phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) entsteht Inositol-1,4,5-Trisphosphat, das als *second messenger* die Mobilisierung intrazellulärer Ca^{2+} -Reserven induziert (Berridge und Irvine, 1989). Inositol-1,4,5-Trisphosphat wird phosphoryliert zu Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat, das wiederum die Vorstufe von Inositol-1,3,4-Trisphosphat darstellt (Übersichtsartikel: Shears, 1989), dem Substrat der Inositol-1,3,4-Trisphosphat-5/6-Kinase (Abdullah et al., 1992). Dieses Enzym phosphoryliert Inositol-1,3,4-Trisphosphat zu Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat und Inositol-1,3,4,6-Tetrakisphosphat. Inositol-1,3,4,6-Tetrakisphosphat ist in der Lage, intrazelluläres Ca^{2+} freizusetzen, allerdings weit weniger effektiv als Inositol-1,3,4-Trisphosphat (Ivorra et al., 1991). Außerdem dient es als Vorläufer für die Synthese von Inositol-1,3,4,5,6-Pentakisphosphat, von dem angenommen wird, dass es in die Signalübertragung zwischen neuronalen Zellen involviert ist (Vallejo et al., 1987).

Der Klon **sub729** wird an der Knospenspitze exprimiert, aber auch im Bereich der Tentakelknospen im Elterntier (Abb. 3.3 B). Dieses Transkript codiert für ein Protein, das Ähnlichkeit zum Guanin-Nukleotidaustauschfaktor RHO/GEF2 aufweist. Als funktionelle Regulatoren katalysieren RHO/GEFs den GDP/GTP-Austausch an RHO-GTPasen, wodurch diese aktiviert werden. Dabei stimulieren RHO/GEFs die Freisetzung des gebundenen GDP von den kleinen GTPasen offenbar durch Bindung und Stabilisierung des nukleotidfreien Zustands der GTPasen (Glaven et al., 1996). Einige RHO/GEFs werden vorzugsweise in spezifischen Zelllinien und Geweben oder nur in bestimmten Phasen der Entwicklung exprimiert, was vermuten lässt, dass diese RHO/GEFs an der Regulation verschiedener zelltyp- und gewebespezifischer Effekte beteiligt sind (Cerione und Zheng, 1996; Whitehead et al., 1997; Stam und Collard, 1999).

Abb. 3.3: Expressionsdomänen der regiospezifisch exprimierten cDNAs. Einige Klone wurden ansequenziert, die Sequenzen wurden über einen Datenbankvergleich (BLASTX, Husar) analysiert. (A) Expressionsmuster in der Knospenregion. (B) Expressionsmuster in Kopf- und Knospenregion. (C) Expressionsmuster in Fuß- und Knospenregion. (D) Fleckenförmige Expressionsmuster im Rumpfbereich.

A



Yes1
1900 bp
rab11
(ras-related protein)



Yes2
3200 bp
NADH-
Dehydrogenase



CW1
2000bp
keine signifikante
Ähnlichkeit



CW4
<100 bp



sub27
600 bp
keine signifikante
Ähnlichkeit



sub222
1300 bp
keine signifikante
Ähnlichkeit

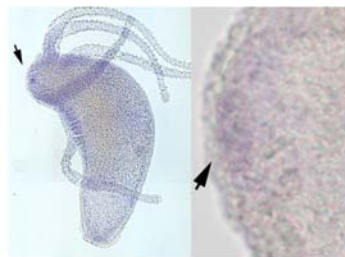


sub328
<100 bp

B



CW2
1400 bp
HvRACK1
(receptor of activated
proteinkinase C)



BM1
1400 bp
Inositol1,3,5-triphosphat5/6-
Kinase



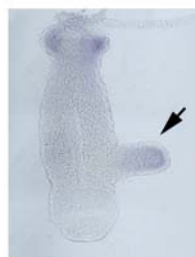
CK3
900 bp



sub649
1100 bp
keine signifikante
Ähnlichkeit



sub707
1300 bp



sub729
800 bp
Rho/Gef



sub824
700 bp

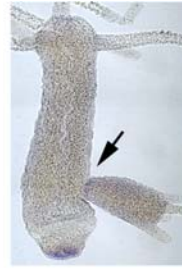
C



KH3
2400 bp
keine signifikante
Ähnlichkeit



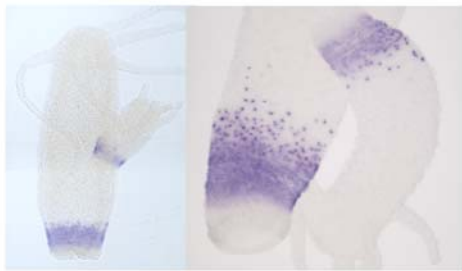
KH4
2100 bp
Junctophilin



KH7
1100 bp
keine signifikante
Ähnlichkeit



KH9
1300 bp
Rhamnose-bindendes
Lektin



KH12
500 bp
HYM-176



KH15
1500 bp
Arabinofuranosidase



sub698
900 bp

D



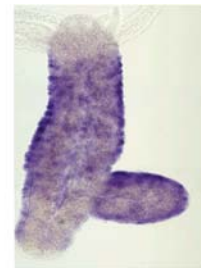
Yes3
1700 bp



2a3
700 bp



sub72
2100 bp



sub169
1700 bp

3.1.3 Die *Splice Leader*-Sequenzen von *Hydra vulgaris* sind nicht geeignet zur Identifikation von Genen, deren Produkte in Signalkaskaden aktiv sind

In der Arbeitsgruppe von Rob Steele (*Department of Biological Chemistry an der UCI, Irvine*) war Ende der 90-er Jahre beim Vergleich verschiedener *Hydra vulgaris*-cDNAs festgestellt worden, dass einige am 5'-Ende identische Sequenzen aufwiesen. Die Vermutung, dass diese Sequenzen durch Trans-Spleißen des 5'-Endes entstehen und somit zumindest einem Teil der Hydra-mRNAs als *Leader*-Sequenzen dienen, bestätigte sich (Stover und Steele, 2001). *Splice Leader*-Sequenzen wurden auch bei Nematoden (Nilsen, 2001), Plathelminthen (Vandenberghé et al., 2001) und Einzellern (Davis, 1996) nachgewiesen. Bei einzelligen Eukaryonten und Nematoden entstehen so aus einigen polycistronischen Transkripten erst durch das Anfügen dieser *Splice Leader*-Sequenzen individuelle mRNAs (Drouin und de Sa, 1995; Davis und Hodgson, 1997). Dieser Vorgang ist sowohl für die Genomorganisation als auch für die Genexpression von Bedeutung, da solche Transkripte koreguliert und -exprimiert werden können (Blumenthal, 1998). Welche Funktion die *Splice Leader* bei Hydra erfüllen, ist nicht bekannt. Polycistronische Transkripte wurden bei Hydra noch nicht gefunden. Trotzdem konnten zwei solcher *Splice Leader*-Sequenzen identifiziert werden: *SL-A* und *SL-B* (Stover und Steele, 2001). Eine Vielzahl der bisher aus Hydra isolierten Sequenzen, die für Transkriptionsfaktoren oder Kinasen codieren, tragen einen dieser *Splice Leader* in ihrem 5' nicht-codierendem Bereich (Rob Steele, persönliche Mitteilung).

Aus diesem Befund entstand die Idee, dass solche Transkripte bei Hydra möglicherweise zu regulatorischen Einheiten zusammengefasst sind, und dass sich somit über die identifizierten *Splice Leader*-Sequenzen neue Gene mit potentieller Relevanz für Signalkaskaden bei *Hydra vulgaris* identifizieren lassen. Für diesen Ansatz wurden anhand der *Splice Leader*-Sequenzen Oligonukleotide hergestellt und als Sonden für die Hybridisierung der Makroarrays benutzt, die aus der Knospenbank und der subtrahierten Bank hergestellt worden waren (siehe 3.1.1) (Abb. 3.4).

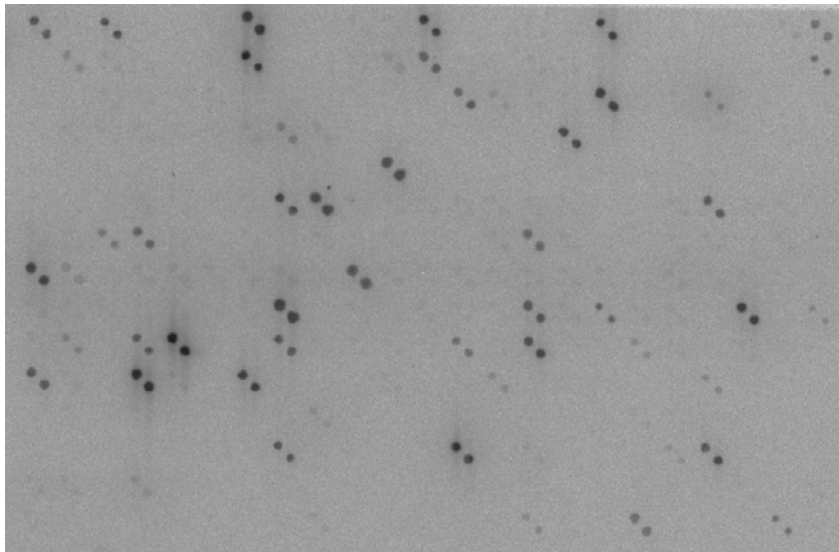


Abb. 3.4: Autoradiographie eines Makroarrays nach Hybridisierung mit einem Oligonukleotid für *Splice Leader B*. Dieser Array umfasst 384 cDNAs aus der Knospenbank, jede cDNA ist doppelt aufgetragen.

Auf diese Weise wurden 384 cDNAs der Knospenbank und 1500 cDNAs der subtrahierten Bank auf das Vorhandensein von *Splice Leader*-Sequenzen untersucht. Von den cDNAs der Knospenbank hybridisierten 45 (~ 12%) mit dem Oligonukleotid *SL-B* und 6 (~1,5%) mit dem Oligonukleotid *SL-A*, von allen Klonen der subtrahierten Bank waren nur 10 (~0,6%) positiv für *SL-B* und 2 (~0,1%) für *SL-A*. Die Ausbeute aus der subtrahierten Bank war deshalb so gering, weil eine große Anzahl der cDNAs kleiner als 100 bp ist (siehe 3.1.2), und es sich bei diesen kleinen Klonen wahrscheinlich um Klonierungsartefakte handelt.

Tab. 3.2: cDNAs, die über Hybridisierung mit Oligos gegen *Splice Leader A* identifiziert und ansequenziert wurden. (sub: cDNAs aus der subtrahierten Bank, kn: cDNAs aus der Knospenbank). ++ = sehr starkes Signal, -- = sehr schwaches Signal

cDNA	Insertgröße (bp)	Signalstärke auf dem Array	Beschreibung	E-Value
<i>kn168</i>	2000	+	Elongationsfaktor 1α	$2,8e^{-30}$
<i>kn170</i>	1400	++	RACK	$1,0e^{-31}$
<i>kn207</i>	700	+	unbekannt	
<i>kn234</i>	1400	++	RACK	$2,3e^{-37}$
<i>kn245</i>	1800	-	unbekannt	
<i>kn282</i>	1000	--	unbekannt	
<i>sub60</i>	1800	++	Elongationsfaktor 1α	$7,4e^{-38}$

Tab. 3.3: cDNAs, die über Hybridisierung mit Oligos gegen *Splice Leader B* identifiziert und ansequenziert wurden. (sub: cDNAs aus der subtrahierten Bank, kn: cDNAs aus der Knospenbank). ++ = sehr starkes Signal, -- = sehr schwaches Signal

cDNA	Insertgröße (bp)	Signalstärke auf dem Array	Beschreibung	E-Value
<i>kn1</i>	1700	++	unbekannt	
<i>kn3</i>	700	++	Elongationsfaktor 1 α	2,7e ⁻¹²⁷
<i>kn7</i>	2000	+	unbekannt	
<i>kn12</i>	1700	++	unbekannt	
<i>kn31</i>	1300	++	Adenylatcyclase Typ 9	1,1e ⁻⁸
<i>kn36</i>	1000	++	Glykosyltransferase	1,5e ⁻⁷
<i>kn65</i>	1200	++	Asparaginsynthetase	4,0e ⁻¹⁴
<i>kn241</i>	700	+	Thyreoglobulinprecursor	4,5e ⁻¹⁴
<i>sub4</i>	800	+	Asparaginsynthetase	1,2e ⁻⁶
<i>sub1343</i>	2000	++	unbekannt	
<i>sub1442</i>	500	+	Prostaglandintransporter	1,3e ⁻⁹

Für die weitere Analyse sollten alle cDNAs, die über die Hybridisierung der Oligonukleotide für *SL-A* und *SL-B* detektiert wurden, ansequenziert und mit Hilfe von Datenbanken analysiert werden. Wie die im Expressionsscreening isolierten cDNAs (3.1.2) können sie in die folgenden Kategorien unterteilt werden:

- a) cDNAs, deren Genprodukte keine Verwandtschaft zu bekannten Proteinen aufweisen
- b) cDNAs deren Genprodukte in allgemeine physiologische Vorgänge involviert sind
- c) cDNAs, deren Genprodukte an Signalkaskaden beteiligt sind

a) cDNAs, deren Genprodukte keine Verwandtschaft zu bekannten Proteinen besitzen
 Von insgesamt 18 sequenzierten cDNAs besitzen sieben (***kn1***, ***kn7***, ***kn12***, ***kn207***, ***kn245***, ***kn282*** und ***sub1343***) keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen (Tab. 3.2, 3.3)

b) cDNAs, deren Genprodukte in allgemeine physiologische Vorgänge involviert sind
 Sieben der analysierten cDNAs codieren für Proteine, die in grundlegende Aufgaben innerhalb der Zelle involviert sind (Tab. 3.2, 3.3): Drei von ihnen können dem Elongationsfaktor 1 α zugeordnet werden (***kn3***, ***kn168*** und ***sub60***), der an der Translation von Proteinen am Ribosom beteiligt ist (Alberts et al., 1994). Weitere Proteine, die an allgemeinen physiologischen Prozessen beteiligt sind, werden von ***kn65*** und ***sub4***

(Asparaginsynthetase: Aminosäurestoffwechsel) sowie **kn36** (Glykosyltransferase: Glykolysierung von Proteinen) und **sub1442** (Prostaglandintransporter: Transport des Gewebshormons Prostaglandin aus der Zelle heraus) codiert.

c) cDNAs, deren Genprodukte in Signalübertragungsvorgänge involviert sind

Nur vier der sequenzierten Transkripte konnten Proteinen zugeordnet werden, die direkt oder indirekt an Signalübertragungsvorgängen teilnehmen: Zwei Transkripte (**kn170** und **kn234**) codieren für RACK, den Rezeptor für aktivierte PKC (Hornberger und Hassel, 1997, siehe auch 3.1.2).

Für die cDNA **kn241** wurde durch die BLAST-Analyse eine Ähnlichkeit zu Thyreoglobulin festgestellt, das Vorläufermolekül von Thyroxin und Triiodothyronin. Beide entstehen durch Iodierung von Tyrosinresten und anschließender Proteolyse von Thyreoglobulin. Thyroxin und Triiodothyronin binden an Transkriptionsfaktoren im Zellkern und stimulieren so die Expression spezieller Gene des Metabolismus (Übersichtsartikel: van de Graaf et al., 2001). Mit **kn31** wurde eine cDNA isoliert, die für ein Adenylatcyklase-Typ-9-ähnliches Protein codiert. Solche Proteine dienen als Effektorenzyme G-Protein-gekoppelter Rezeptoren: Durch Ligandenbindung an einen solchen membrandurchspannenden Rezeptor verändert sich seine Konformation, was bewirkt, dass am intrazellulär assoziierten G-Protein GDT gegen GTP ausgetauscht und das G-Protein in seine drei Untereinheiten aufgespalten wird. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Adenylatcyklase, die cyclisches Adenosin-3,5-monophosphat (cAMP), ein *second messenger*-Molekül für viele Hormone, herstellt. cAMP wiederum kann bestimmte Proteinkinasen aktivieren und in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche Reaktionen bewirken, wie Anregung des Fettstoffwechsels oder Regulation der Steroidhormon-Biosynthese (Hanoune und Defer, 2001). Adenylatcyklasen vom Typ 9 sind beim Menschen vor allem in Gehirn und Muskeln aktiv, bei *C. elegans* werden sie mit Degeneration von Neuronen in Verbindung gebracht (Korswagen et al., 1998).

Obwohl nur ein Teil der Klone, die auf den Makroarrays mit *SL-A* oder *SL-B* hybridisierten, sequenziert und analysiert werden konnte, wird deutlich, dass die *Splice Leader*-Sequenzen nicht als spezifische Marker für Transkripte von Signal-relevanten Genen oder anderer Gengruppen dienen können (dies wurde durch ein *Screening* auf in Datenbanken publizierte Gene im Labor von Rob Steele bestätigt). *SL-A* und *SL-B* stellen somit kein geeignetes Werkzeug zur gezielten Isolation bestimmter Transkripte dar. Dieser Weg wurde daher nicht weiter verfolgt.

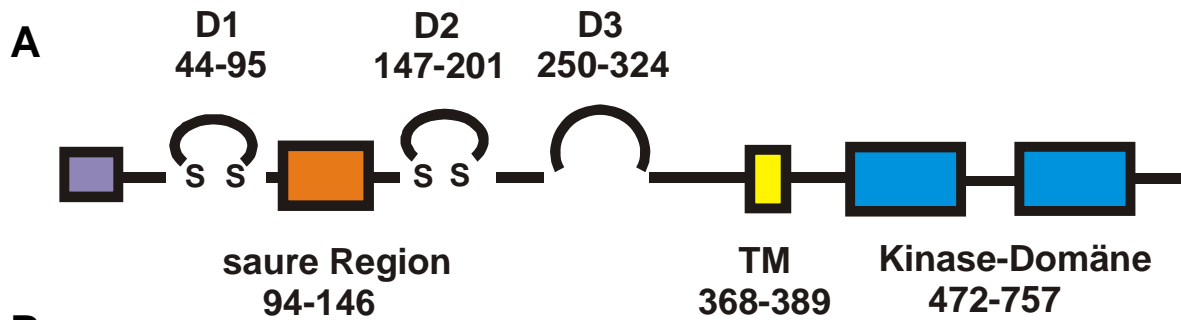
3.2 Charakterisierung von *kringelchen*

Bedingt durch die Notwendigkeit, radioaktive Arbeiten zurückzustellen, beschäftigte ich mich im zweiten Projekt meiner Arbeit mit der Charakterisierung einer hochinteressanten cDNA, die im Rahmen der Doktorarbeit von Annette Bieller (1997) über ein Genexpressions-Screening zufällig ausgewählter Klone aus einer *Hydra vulgaris* cDNA-Bank isoliert worden war. Zur Herstellung dieser cDNA-Bank war mRNA von Polypen verwendet worden, die für vier Tage in 1 mM LiCl inkubiert worden waren. Dies hatte die Bildung ektopischer Fußstrukturen zur Folge (Bieller, 1997). Die ausgewählte cDNA zeigte in Lithium-behandelten Tieren, aber auch in unbehandelten Kontrolltieren, von denen sich kurz zuvor eine Knospe abgelöst hatte, ein ringförmiges Expressionsmuster, woraus der Name *kringelchen* abgeleitet wurde.

3.2.1 *kringelchen* codiert für einen putativen FGF-Rezeptor

Die isolierte cDNA (*GenBank Accession Number*: AY193769) hat eine Länge von 2847 bp und schließt ein offenes Leseraster von 2448 bp ein, dessen 5'-Ende eine bei Hydra bekannte *Splice Leader*-Sequenz (Stover und Steele, 2001, siehe 3.1.3) trägt. Am 3'-Ende der cDNA befindet sich eine Polyadenylierungsstelle (aataaa, 2817-2822 bp) gefolgt vom Poly(A)-Schwanz (Abb. 3.5). *kringelchen* codiert für ein 816 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem hypothetischen Molekulargewicht von 93,4 kDa.

Abb. 3.5: Sequenz von *kringelchen*. (A) Mögliche Struktur von *Kringelchen* abgeleitet aus der Nukleinsäuresequenz. (B) Die vollständige Nukleinsäure-Sequenz von *kringelchen*. Die partielle Sequenz von *Splice Leader B* ist durch rote Schrift markiert. Das Signalpeptid wird durch gelben Hintergrund hervorgehoben. Die Transmembrandomäne ist in grün, die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne in blau dargestellt. Konsensussequenzen von SH2- und SH3-Bindedomänen (Pawson et al., 2001; Ball et al., 2005) sind unterstrichen, die fettgedruckten Tyrosine entsprechen wichtigen Autophosphorylierungsstellen (Mohammadi et al., 1996) in Vertebraten-FGFR. Das Polyadenylierungssignal ist durch hellblauen Hintergrund markiert. Die Ig-ähnlichen Schleifen D1 und D2, ebenso die putative Schleife zwischen Tyr-250 und Phe-324 sind grau unterlegt, die D1 und D2 ausbildenden Cysteine sind eingerahmt.



```

ttttagtccctgtgtaataagatttttatgtttataaaaaaaaaaaatgtttggatttaatgctgtgtatttataaatacaaatgtttgta 90
tatagcaaaatgatatcagattgggtgtgtttgttttggttttataatgtcaagattagtttttgggctgaattttacagagccagttaat 180
M I S D W C V V L V L L M S R L V F G L N F T E P V N 27
tatatatgaaattaggagaagatagttcatctagactattagattgttcagttaatcttctctgttgaattaatcaaaaaatgtattgg 270
Y I L K L G E D S S S R L L D [C] s V N L P V E L I K K I D W 57
acacacaatgatattgttatcaataataaaccttaataaacattatctgaaaatgggtcaaaaactgttattgtctcattaccaatcccat 360
T H N D I V I N N K P N I T L S E N G Q K L V I A H Y Q S H 87
aattctggctggtatgggtgcaaagtaacagctatgaatgaagaatctgttcaagggtatttgatctactgccagcttcagaaaactgag 450
N S G R Y G [C] K V T A M N E E S V Q R V F D L L P A S E T E 117
ggaaccaaacattgaaatgatgctgagaataaaaaatgacatatcgttactgttgagttagtgatgaataaattagatttagattgt 540
G N Q T I E M M L R I K N D I S L L V E L V M N K L D L D [C] 147
accgctgttaggtgcttcacctattaatattacatggataaaaaatgatcggtgatagaagcaaggccaactgttctaattttcgttat 630
T A V G A S P I N I T W I K N D R L I E A R S N L S N F R Y 177
tctttctcaccaaatttttgaaatgaatataaaagaattgcagcttgatgctgtgtatttacaatgtattttggaaaaataaatat 720
S F S P N F L K L S I K E L R L D D A G I Y K [C] I L E N K Y 207
ggcaagatagaaCatataatgatgttgaaatatatgagaaaaatgtctcctaaccaatagtatcttctacagacaaaacataaagtttt 810
G K I E H I M T V E I Y E K M F S K P I V S S T D K H K V F 237
tatgtcaactatggctcagaatlttaactgtccctatatatgttactgtttctaccccacctcactttcaaatgtttacgtttacagc 900
Y V N Y Q T I E M M L R I K N D I S L L V E L V M N K L D L D [C] 267
atgacaagtccaatacaaatgaaactaaattggcacttagggtattaccaacaatgagagaactaactgtcttgagaaagccagaga 990
M T S P N T N E T K L A L R V L P T M R E L T V L E K G Q R 297
agagggcaattcaatctcatatcaagctagattattttttcaataatataatcagagcaagatttttgtaaatataacctttatggctgga 1080
R G N S I S H I K L D Y F F C N A N I S E Q D F G N Y T F M A G 327
aataagtatggttttgatataaccgctttcaaatattgcatacaaaaatataatgcaaaaactgtcttcccgcgcaatgaaatcaagatt 1170
N K Y G F D I Y P F Q I L H T K Y M Q T T V F P P M K S S I 357
aataaaaatcacaagagagaatccgtagaaaaaacagttatttttatgtcataacttcaatgctgtgggctaaatttttgtgctcatt 1260
N K I Y K E E S V E K T V I F I V I T S M L A G L I F V A F 387
gttattttttttatgtcgtgttctgtagcaaaagacaaaatttaaaaaacagtaaacatcaactacatcaaaacttttagaaactgtgattc 1350
V I F F I C R V R S K D K F K N S N I N Y I K P L E T V I L 417
aatcctggggataaatacaactagtggtgttaccatggttacttctgtctctgcttctcctaCtgcaagtcggcgcttcagacattcactta 1440
N L G D N N T S G V T M V T S V S A S Y C S R R F R H S L N 447
aataaatttaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaa 1530
N N L I N D K Q K L N L K I A P D P A W E I K L E Q L E T D 477
tgtttatggggaggggagcttttggtagagttttctgtgcaaacagcaagagatttcaaaatcacactggaggttcaaacagttgctgtc 1620
C L L G E G A F F G R V F R A T A R D L P N H T G V Q T V A V 507
aaaatgctgaaagaagattgtgtgaaacaagattttaaagatttataatctgaaatagaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaaatgaa 1710
K M L K E D C C E Q D L K D F I S E I E V M K S I G K H I N 537
atctgaaatctcagctgcatctcagcaaggaagttatataatagtggtgaaatattgtcgtcatggtaatttgccgtcttttctgt 1800
I L N L L A V S S Q Q G K L Y I V V E Y C R H G N L R S F L 567
aaagacaactgcagctgtatgcaagctaaattctgtgatacaaaaaaaataaacatttgtagcatttaacgtcgttttgcttacaagttgca 1890
K D N R P V M Q A N S V I T K K I T L Y D L T S F C L Q V A 597
agaggaatgaatttttagcttcaaaaaagtgcatccatcgagacatagctgctcgaaatgttctgttggtggaaggttatttaatgaaa 1980
R G M N F L A S K K C I H R D I A A R N V L V G E G Y L M K 627
atgtgtattttggactgcagctgatattcctgaacaagattattatagaaaaatgcacagatgggagattaccctgcaaatggatggca 2070
I A D F G L A R D I H E Q D Y Y R K C T D G R L P V K W M A 657
atgaaagctttgttcgatcgtgtttataactactcaaaagtgatattatggctcatttggaaattttggcatgggaaatgtgaacatttgg 2160
I E A L F D R V Y T T Q S D I W S F G I L A W E I V T F G G 687
tcgccttaccctggaattgcattagaaaaattgtttgatttataaagcaaggctatcgaatggaaagaccacttaattgtactgatgat 2250
S P Y P G I A L E K L F D L L K Q G Y R M E R P L N C T D D 717
atgtatacacttatgctgaattgttggaaagaatcccatcaaacgctcgcagacttttcacaactaattgaagatctagaagaatgcta 2340
M Y T L M L N C W K E I P S K R P T F S Q L I E D L E R M L 747
ttggatcaagttctacagaatataagatcttcaacaatcaaacagcaagcagagctcattttcaacatcattacacacttctgca 2430
L D A S S T E Y I D L Q P I Q P E R T E S F S T S L H T S A 777
agcatgttgaatcacagatttgcacgagaaaaataaattgtgatcatgacgaaatccttcaactcatgaagatggtttatcagaagcagat 2520
S M L N T D L H E K N K C D H D E I S F T H E D G L S E A D 807
atctcttagtcaactgtcagtttcttaattacttcaactgctgtgtgacgttttttagatgtaaaccttgatttatcagtttctcctaa 2610
I L L S H Y A V S * 816
atgtcctgtcattaaactgtatttgcatttgcatttcatcatgaagaatctagagatctatccgattcttctctattaataaacactgtc 2700
atgaagattgtttatataatgaatcattggatcaggaacttcttgaggatcataataaaagtaataactaataatgaaatggccagctaaa 2790
caaaggctcgtaaatctcogatgcaataaataagcttttcaaaaaaaaaaaaaa 2846
    
```

Kringelchen weist charakteristische Merkmale von FGF-Rezeptoren aus Vertebraten auf (Abb. 3.5): Es besitzt ein hydrophobes Signalpeptid (VVLVLLMSRLVFG) an Position 7-19. Darauf folgen zwei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Schleifen (D1 an Position 44-95, D2 an Position 147-201). Die Ig-ähnlichen Schleifen von FGF-Rezeptoren werden durch Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinen ausgebildet (Mohammadi et al., 2005). Im Falle von Kringelchen bilden wahrscheinlich die vier Cysteine an den Positionen 43, 94, 147 und 201 die Schleifen D1 und D2 (siehe Abb. 3.6). In der Region, in der D3 gemäß des Alignments zu erwarten wäre, fehlen Cysteine komplett. Ein Sequenzvergleich dieser Region mit den D3-Sequenzen der humanen FGF-Rezeptoren 1 – 4 zeigt, dass Kringelchen an den Positionen, die den Cysteinen der humanen FGF-Rezeptoren entsprechen, hydrophobe Aminosäuren besitzt, nämlich Tyrosin an Position 250 und Phenylalanin an Position 324 (Abb. 3.6). Diese bilden wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen eine schleifenartige Struktur aus (Burke und Blundell, persönliche Mitteilung), so dass im Fall von Kringelchen D3 unabhängig von Disulfidbrücken ausgebildet werden kann.

Zwischen D1 und D2 befindet sich eine Sequenz aus vorwiegend sauren Aminosäuren, die aber nicht wie bei den FGF-Rezeptoren der Vertebraten als „saure Box“ (siehe 2.1.1) angeordnet sind. Eine HAV-Domäne zur Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen und eine „K18K“-Domäne für die Heparinbindung fehlen bei Kringelchen.

Hingegen sind die Aminosäuren, die die FGF-Bindung vermitteln, konserviert: Untersuchungen an der Kristallstruktur verschiedener FGFR-Bindedomänen im Komplex mit FGF zeigten, dass die Aminosäurereste Pro-285, His-286 und Asn-345 im humanen FGFR1 (hFGFR1) dabei eine Schlüsselrolle einnehmen (Pellegrini et al., 2000; Schlessinger et al., 2000; Plotnikov et al., 1999; Plotnikov et al., 2000). Diesen Aminosäuren entsprechen Pro-258, His-259 und Asn-328 bei Kringelchen. Zwei weitere Aminosäuren, die die Bindung von FGF2 an hFGFR1 vermitteln, Arg-250 und Val-316 (Pellegrini et al., 2000), sind konserviert ausgetauscht gegen Lys-221 bzw. Leu-289 bei Kringelchen (Fig. 3.6 B).

Charakteristisch für FGF-Rezeptoren folgt einer einzelnen Transmembrandomäne (Position 369-393) im intrazellulären Teil von Kringelchen ein vergleichsweise langer juxtamembranärer Bereich von 82 Aminosäuren Länge. Bei anderen Rezeptortyrosinkinasen umfasst diese Region nur etwa 50 Aminosäuren (Johnson und Williams, 1993). Die FGF-Rezeptoren der Vertebraten besitzen eine Bindestelle für das Adapterprotein FRS2 (siehe 2.1.6.2), die in die juxtamembranäre Region eingebettet ist (Ong et al., 2000), Kringelchen fehlt dieses Motiv.

An die Membran-nahe Region schließt sich eine konservierte, zwei geteilte Tyrosinkinase-Domäne (472-757) an. Diese ist stark konserviert im Vergleich zu den Tyrosinkinase-Domänen der humanen FGF-Rezeptoren (Abb. 3.6 C): An den Positionen 481 - 508 ist die Sequenz einer ATP-bindenden Domäne lokalisiert. Zwei konservierte Tyrosine, die den Tyr-

653 und Tyr-654 in FGFR1 aus Vertebraten entsprechen und dort für die Aktivierung der Kinase-Domäne essentiell sind (Mohammadi et al., 2005), befinden sich an den Positionen 642 und 643. Tyr-755 in der Sequenz von Kringelchen entspricht nach dem Alignment dem Tyr-766 des humanen FGFR1, welches dort nach Autophosphorylierung eine Bindestelle der SH2-Domäne (*Src homology domain*) von Phospholipase C- γ darstellt (Mohammadi et al., 1991). Weitere mögliche Interaktionsorte für SH2-bindende Domänen finden sich an den Positionen 408-411 (YIKP) und 719-722 (YTLM). Eine Konsensus-Sequenz für die Bindung von SH3-Domänen ist an den Positionen 760-763 (PIQP) zu finden.

A

```

Kringelchen : RLLDCSVNLEVEELIKKIDWTHNDIVINNKFNITLSENG-QKLVIAHYQSHN---SGRYGCKVIT : 97
hFGFR1 : LQIRCRRLRDDVQSIN---MLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPAD-----SGLYACVT- : 103
hFGFR2 : LEVVRCLLKDAAVIS----WTKDGVHLGPNRRTVLIQEYLQIKGATPRD-----SGLYACTAS : 110
hFGFR3 : VBIISCPPPGGGPMGPTV-MVKDGTGLVPSERVL---VGPQRIDQVNLNASHED---SGAYSCRQR : 112
hFGFR4 : VRIDCCGRAERGGH----WYKEGSR LAPAGRVRGWRG---RLLETASFLPEDA---GRYLCLAR : 104
EGL-15 : IKEDCQTAASKI-SAFVEMYRNDKLLKNDQIDKDKIRKDNRMMLHLKKNIDVSDQGLWSCRWH : 112
Breathless : FQINCSPMDEDAKGVNISMLHITDQILLGGRGRIKLRW--SLTVGQLQPED---AGSYHCELC : 217

```

B

```

Kringelchen : KLDIDCTAVGASPTNITWIKNDLIEARSNLSNFRYSFSPNFKLSIKELRLDDAGIYKCIENKYKIE : 210
hFGFR1 : TVKFRCPSSGTPNPTLRWLNKGEFKPDHRIGG--YKVRATWSLIIMDSVVPSDKCNYTCIENKYGAIN : 240
hFGFR2 : TVKFRCPAGCNPMPTMRWLNKGEFKQEHRIIGG--YKVRNQHWSLIME SVVPSDKCNYTCVENEYGSIN : 241
hFGFR3 : TVRFRCPAAGNPTPSTISWLNKGEFRGEHRIGGIK--LRHQWLSLVME SVVPSDKCNYTCVENREGSIR : 238
hFGFR4 : TVKFRCPAAGNPTPTIRWLNKGEAFHGENRIGGIK--LRHQWLSLVME SVVPSDKCNYTCVENAVGSIR : 234
EGL-15 : TKLNORAKGYPEPQIIMYKNGK-MLKKSARSAGGMEFKFNRSLEVEDAVVADSCEFFHCEALNRVGSAK : 377
Breathless : TVNLACPVYG--KANIITWTKDKK-----ELNRELGVYVQKNWTLRFVEATSEDSGLYNCKVCNAWGCTQ : 472
Heartless : LHTLNCHADGNPEPNIITWYRNGT-----VDWTRGYGSLKRRRWTLTMEDELVPGDCNYTCVCNSLGCIR : 184

```

```

Kringelchen : YIMTVEIYKEMFSKPIVSSSTDKHKVFYVNYGQNLTVPIYTYTAFLPHPHFQML-YVYSMTSPNTNETKLAL : 279
hFGFR1 : HTYQLDVVERSPHRPILQAGLPANKT-YALGSNVE-FMCKVYSDEQPHIQWLKHIEVNGSKI GPDNLPYV : 308
hFGFR2 : HTYHLDVVERSPHRPILQAGLPANAS-TVVGGDVE-FVCKVYSDAQPHIQWLKHIEVNGSKY GPDGLPYL : 309
hFGFR3 : QTYTLDVVERSPHRPILQAGLPANQT-AVLGSDVE-FHCKVYSDAQPHIQWLKHIEVNGSKV GPDGTPYV : 306
hFGFR4 : YNYLLDVVERSPHRPILQAGLPANTT-AVVGSDVE-LLCKVYSDAQPHIQWLKHIVINGSSFGADGFPYV : 302
EGL-15 : KYFHVITVNRMRPPIIVPNILANQS-VNINDTAT-FHCKVYSDLLPHIIVWRINKINGSY SYYNNSAEE : 445
Breathless : FDFSVQINDRTRSAPIIVV--PQNT-YKVNGLV-MKCTVYSDLHPTVSWKRVWLKNASLDGLQSVETQ : 538
Heartless : HDTQVIVSDRVNHKPIIMTG-PLNLT-LVVNSTGS-MHCKYLSDLT SKKAWIFVPCHEMTCNSNRRSIIA : 251

```

```

Kringelchen : RVLPTMRELTVLEKQQRGNSISHIKLDYEFENNISEQDFGNYTFMAGNKYGFEDI : 333
hFGFR1 : QLDKTAGVNT-TDK-----EMEVHLHRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSH : 351
hFGFR2 : RVLKAAGVNT-TDK-----EIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISF : 352
hFGFR3 : TVLKTAGVNT-TDK-----ELEVLSLHNVTFEDAGEYTCLAGNSIGFSH : 349
hFGFR4 : QVLKTADINSS-----EVEVLYLRNVSAEDAGEYTCLAGNSIGLSY : 343
EGL-15 : Y----MFNYTEMDFDKAHVHVHVGDESTLTIFNVSLDDQGTIYACLSGNSLGMSS : 495
Breathless : NLNFTVTN-----DSVVLTLRNVTFDQEGMYSCLASSGLGRSN : 576
Heartless : E-----DKDQLDFVNVVMEQEGNYTCVEENSIGQSN : 282

```

C

Kringelchen	: EETDCLLGGEGAFGRVFRATARDLPHHTG--VQTVAVKMLKEDCCEDLKDDEISEIEVVKSIKGHINIINL :	541
hFGFR1	: IVLGKPLGEGCFQOVVLABAIGLDKDKPNRVTVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMSEMMKMIKHKHNIINL :	544
hFGFR2	: ITLGKPLGEGCFQOVVMAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEEMKMIKHKHNIINL :	550
hFGFR3	: ITLGKPLGEGCFQOVVMAEAVGIDKDKRAAKPVTVAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEEMKMIKHKHNIINL :	541
hFGFR4	: IVLGKPLGEGCFQOVVRAEAFGMDDPARPDQASTVAVKMLKDNASDKDLADLVSEMEVVKLIQRHNIINL :	536
EGL-15	: ISLVHMLGEGAFGEVVKATYKETEIN-----ETAVAVKMLKMSAHEKELIDLVSEMEVVKVIQRHENVRL :	705
Breathless	: ISLGSLGEGAFGRVMAEAEGLPRSPQLAETIVAVKMKKEEHTDTDMASLVREMEVVKMIKGHINIINL :	781
Heartless	: IVLGATLGGEGAFGRVMAEVN-----NAIVAVKMKVEGHTDDDLASLVREMEVVKMIQRHINIINL :	476
Kringelchen	: IAWSSQCGKLYIVVEYCRHGNLRSFLKDNRP-----VMQAN-----SVITKKITLYDLT :	590
hFGFR1	: LGACTQDGFELYVIVEYASKNLREYDQARRPPGLEICYNPS-----HNPEEQLSKDLV :	598
hFGFR2	: LGACTQDGFELYVIVEYASKNLREYDRARRPPGMEYSYDIN-----RVPEEQMTFKDLV :	604
hFGFR3	: LGACTQDGFELYVIVEYAAKGNLREFDRARRPPGLDYSDFTC-----KPPPEQLTFKDLV :	595
hFGFR4	: LGVCTQDGFELYVIVECAAKGNLREFDRARRPPGPDLSPDGP-----RSSEGPLSFVPLV :	590
EGL-15	: LGCCTGAGELYVIVVELCKHGNLRDPLRAHRPKKEEKAKSSQELTDYLEPRKASDKDDIELIPLNLTQRHNV :	775
Breathless	: LGCCSQCGFLWVIVEYAPHGNLKDFLKQNRPGAPQRRSDSDGYLDDKP-----LISVQHLGKELT :	842
Heartless	: LGCCSQNGELYVIVEYAPHGNLKDFTYKNRPFGRDQDRDSS--Q-PPP-----SPPAHVITEKDLT :	534
Kringelchen	: SEICLOVARGMNEFASKKCIHRDLAARNVLVGGVLMKIADFGGLARDIHEODYRKCTDGRLPVKWMAPEA :	660
hFGFR1	: SCAYQVARGMEYFASKKCIHRDLAARNVLVTEEDNVMKIADFGGLARDIHHIDYKKTINGRLPVKWMAPEA :	668
hFGFR2	: SCTYQIARGMEYFASQKCIHRDLAARNVLVTEEDNVMKIADFGGLARDINNIIDYKKTINGRLPVKWMAPEA :	674
hFGFR3	: SCAYQVARGMEYFASQKCIHRDLAARNVLVTEEDNVMKIADFGGLARDVHNIIDYKKTINGRLPVKWMAPEA :	665
hFGFR4	: SCAYQVARGMNYFASRKCIHRDLAARNVLVTEEDNVMKIADFGGLARGVHHIDYKKTINGRLPVKWMAPEA :	660
EGL-15	: QEAWQVAGMNEFASKKCIHRDLAARNVLVGGHVLKTSDFGLSRDVHCNDYRKRNGRLEPKWMAPEA :	845
Breathless	: KEFFQIARGMEYFASRRCIHRDLAARNVLVSDGVYMKIADFGGLARDIQDTEYRKNINGRLEPKWMAPEA :	912
Heartless	: KEAHQIARGMDYFASRRCIHRDLAARNVLVSDDVLKIADFGGLARDIQSTDYRKNINGRLEPKWMAPEA :	604
Kringelchen	: LFDRVTHQSDVWSFGVLLWEIETLGGSPYPGIA-LEKLEDLLKQGYRMERELNCTDDMTLMLNCWREI :	729
hFGFR1	: LFDRI THQSDVWSFGVLLWEIETLGGSPYPCVP-VEBLEFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAV :	737
hFGFR2	: LFDRV THQSDVWSFGVLLWEIETLGGSPYPGIP-VEBLEFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAV :	743
hFGFR3	: LFDRV THQSDVWSFGVLLWEIETLGGSPYPGIP-VEBLEFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAA :	734
hFGFR4	: LFDRV THQSDVWSFGVLLWEIETLGGSPYPGIP-VEBLESLLEGHRMDRPPHCPPELGLMRECWHAHAA :	729
EGL-15	: LDSNVTVESDVSWSYGVLLWEIMTIGGTPEPTIA-MBELYANLKEGYRMEPEHLCPQEVYHLMCSCWREK :	914
Breathless	: LQEKKLDQSDVWSYGVLLWEIMTIGDQPEPHLSABELYSYLITGORMERPAKCSLNIYVVMRQCWHFE :	982
Heartless	: LQEKFDQSDVWSYGVLLWEIMTIGQQPEPTIMSABELYTYLMSGORMERPAKCSMNIYILMRQCWHFN :	674
Kringelchen	: PSKRPTFSQLIEDLERMLLDASSTEVI :	756
hFGFR1	: PSQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNOEVL :	764
hFGFR2	: PSQRPTFKQLVEDLDRILTLTNEEVL :	770
hFGFR3	: PSQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEVL :	761
hFGFR4	: PSQRPTFKQLVEALDKVLLAVS-EEVL :	755
EGL-15	: LEERPSEKTIVDYLDWM----- :	931
Breathless	: SCARPTFAELVESFDGIL----- :	1000
Heartless	: ADDRPEPTEIVEYMDKLL----- :	692

Abb. 3.6: Sequenzvergleich von Kringelchen mit den humanen FGFR1-4 und den Invertebraten-FGFR EGL-15, Breathless und Heartless. Aminosäuren, die identisch zu Kringelchen sind, wurden schwarz hinterlegt, konserviert ausgetauschte Aminosäuren sind grau markiert. (A) Ig-ähnliche Schleife D1 (B) Ig-ähnliche Schleifen D2 und D3. Hydrophobe Aminosäuren im Bereich von Y-250 und F-324 sind rot hinterlegt. (C) Intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne. Bei Triploblasten identifizierte Phosphorylierungsstellen sind blau hinterlegt. Folgende Bezeichnungen und *Accession numbers* wurden verwendet: Kringelchen, *Hydra vulgaris* Kringelchen (AY193769); EGL-15, *C. elegans* Egl-15 (AC46934); Breathless und Heartless, *Drosophila* Breathless (Q09147) und Heartless (Q07407); hFGFR 1-4, humane FGFR1-4 (P11362, P21802, P22607, P22455).

3.2.2 *kringelchen* ist ein „single copy“-Gen

Für eine Southern Blot-Analyse wurden jeweils 10 µg genomischer DNA aus Hydra mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend zur Herstellung eines Southern Blots verwendet. Die Restriktionsverdauungen erfolgten mit den Enzymen *Hind*III, *Nco*I und *Eco*RV, die innerhalb der cDNA-Sequenz von *kringelchen* jeweils eine Schnittstelle besitzen, sowie *Xho*I, für das keine Erkennungssequenz auf der *kringelchen*-cDNA existiert. Nach Hybridisierung mit einer P³²-markierten „full-length“-DNA von *kringelchen* waren zwei Hybridisierungssignale in den Spuren detektierbar, in denen die genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut worden war, die in der codierenden Sequenz von *kringelchen* schneiden. Der Verdau der genomischen DNA mit *Xho*I resultierte nur in einem Einzelsignal (Abb. 3.7). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass *kringelchen* als Einzelkopie im Genom von Hydra vorliegt.

Durch Addition der aus dem *Hind*III-Verdau resultierenden Bandengrößen ergibt sich eine voraussichtliche Gengröße von etwa 13 kb. Dieser Wert korreliert in etwa mit der Größe der Vertebraten-FGFR4 (11,3 kb) und -FGFR3 (16,5 kb) (Kostrzewa und Müller, 1998). Die Gene, die für die übrigen FGFR der Vertebraten codieren, sind dagegen mit 35 kb (FGFR1) und 120 kb (FGFR2) erheblich größer (Zhang et al., 1998).

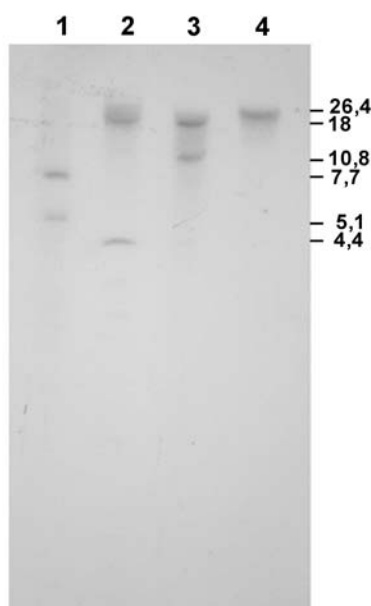


Abb. 3.7: Southern Blot-Analyse von *kringelchen*.

Zur Herstellung des Southern Blots wurden 10 µg genomische DNA aus *Hydra vulgaris* mit *Hind* III (Spur 1), *Nco*I (Spur 2), *Eco*RV (Spur 3) und *Xho*I (Spur 4) komplett verdaut.

*Hind*III, *Nco*I und *Eco*RV schneiden jeweils einmal in der codierenden Sequenz von *kringelchen* an den Positionen 2076, 1383 bzw. 101). Für *Xho*I gibt es keine Schnittstelle. Die Größenbestimmung erfolgte über λ-DNA, die mit *Hind*III verdaut worden war. Größenangaben des Markers in kb.

3.2.3 *kringelchen* wird von mindestens 17 Exons codiert

Das Genom von *Hydra magnipapillata* wird zur Zeit durch ein Genomprojekt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6085>) analysiert. Bei *H. magnipapillata* und *H. vulgaris* handelt es sich um sehr eng verwandte Arten, bei denen ein

Großteil der bis jetzt identifizierten Gene identisch ist. Die Datenbank des *H. magnipapillata*-Genomprojektes wurde mit der cDNA-Sequenz von *kringelchen* durchsucht. In der Tat wurden 14 Sequenzen identifiziert, die *kringelchen*-identische Regionen beinhalten. Mittels überlappender Bereiche dieser Sequenzen wurde eine vorläufige genomische Karte von *kringelchen* erstellt (Abb. 3.8). Diese Karte ist nicht vollständig, drei Sequenzabschnitte der *kringelchen*-cDNA konnten in der genomischen Datenbank nicht wiedergefunden werden. Diese Bereiche müssen durch zusätzliche Exons codiert werden, die bislang durch das Genomprojekt noch nicht erfasst sind.

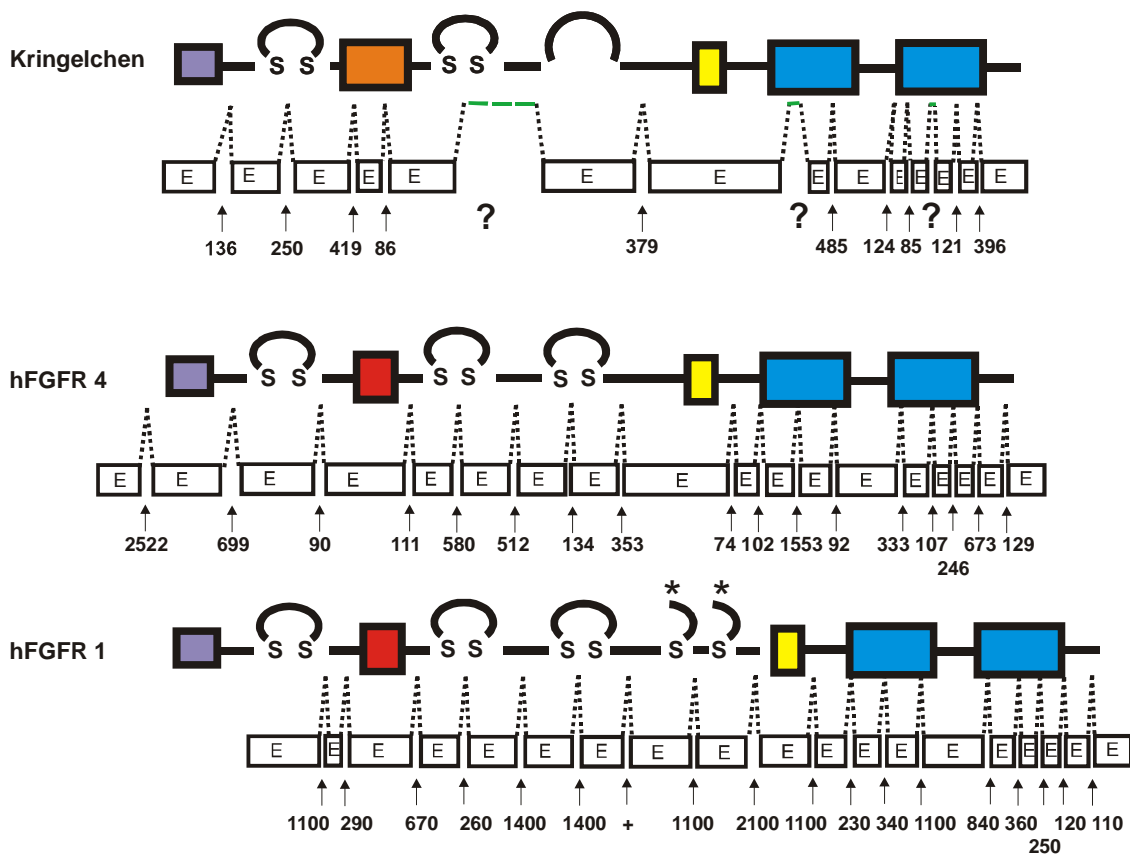


Abb. 3.8: Mögliche genomische Sequenz von *kringelchen* im Vergleich zu den humanen FGFR 1 und 4. Gezeigt wird schematisch das Arrangement von Exons und Introns. Die Pfeile zeigen die Position der Introns an, die Zahlen darunter benennen die Introngröße in Basenpaaren. Die Bereiche von *kringelchen*, denen keine genomische Sequenz zugeordnet werden konnte, sind mit einem ? gekennzeichnet. Die Exon-Intron-Abfolge am 5'-Ende von *hFGFR 1* ist noch ungeklärt. Auch die Größe von Intron 7 (+) ist bei diesem Gen noch offen. Folgende strukturelle Domänen werden dargestellt: Ig-ähnliche Schleifen durch Disulfidbrücken (SS) gebildet, saure Box (rot), Abfolge saurer Aminosäuren (orange), Transmembrandomäne (gelb), zweigeteilte Tyrosinkinasedomäne (blau). Alternative Exons für den C-terminalen Teil von D3 bei *hFGFR 1* sind mit * gekennzeichnet.

Für das *H. magnipapillata* Gen konnten bisher 14 Exons identifiziert werden, zusätzlich müssen noch mindestens drei existieren, um *kringelchen* vollständig zu codieren.

Demzufolge müssen neben den zehn bekannten Introns mindestens sechs weitere vorhanden sein. Dies kommt den Werten der Vertebraten-FGFR mit 18 Exons und 17 Introns (FGFR4) bzw. 20 Exons und 19 Introns (FGFR1-3) sehr nah (Kostrzewa und Müller, 1998; Zhang et al., 1998). Interessant ist, dass im Gegensatz zu den FGF-Rezeptoren der Vertebraten, wo die Ig-ähnliche Schleife D3 durch zwei Exons codiert wird, der Bereich der dritten Schleife von Kringelchen auf einem einzigen Exon liegt. Somit ist alternatives Spleißen in diesem Bereich nicht möglich - anders als bei den Vertebraten FGFR1-3, wo hier die Ligandenspezifität durch Spleißvarianten vermittelt wird (siehe 2.1.2).

Die identifizierten Exons und Introns haben zusammengenommen eine Größe von etwa 6800 bp. Berücksichtigt man die Tatsache, dass noch nicht alle Introns, die bei FGFR-codierenden Genen größer als 2000 bp sein können (Abb. 3.8), identifiziert werden konnten und dass möglicherweise wie bei hFGFR4 noch ein weiteres Exon im nicht-codierenden Bereich existiert, so erscheint eine Gengröße von etwa 13 kb, wie sie aus der Southern Blot-Analyse abgeleitet wurde (3.2.2), durchaus realistisch.

3.2.4 *kringelchen* wird während der Knospung in einem dynamisch regulierten Muster exprimiert

Die Expression von *kringelchen* begann in einer frühen Phase der Knospung (für eine morphologische Beschreibung der einzelnen Knospstadien siehe Abb. 2.9 (Otto und Campbell, 1977)): Sobald sich erste Anzeichen des Auswachsens einer Knospe morphologisch zeigten, wurde *kringelchen* in einem Gebiet aktiviert, das etwa 60 Zellen umfasste (Abb. 3.9 Q). Die Expression war ekto- und entodermal detektierbar, sobald die Evagination der Knospe aus der Knospungsregion begann. (Abb. 3.9 A,B). In Stadium 4 streckte sich die Knospe in die Länge. Zu diesem Zeitpunkt war *kringelchen* vor allem in einem Flecken direkt an der Knospenspitze exprimiert, nur geringe Mengen des Transkriptes ließen sich im übrigen Bereich der Knospe nachweisen. Sobald die Länge der Knospe ihre Breite übertraf, wurde *kringelchen* zusätzlich in einem Ring ektodermaler Zellen detektiert, der die Knospbasis umgab (Abb. 3.9 E-L, P). Dieser Ring war in Stadium 5 bereits stark ausgeprägt und koexistierte für kurze Zeit mit der Expressionsdomäne an der Knospenspitze (Abb. 3.9 G,H).

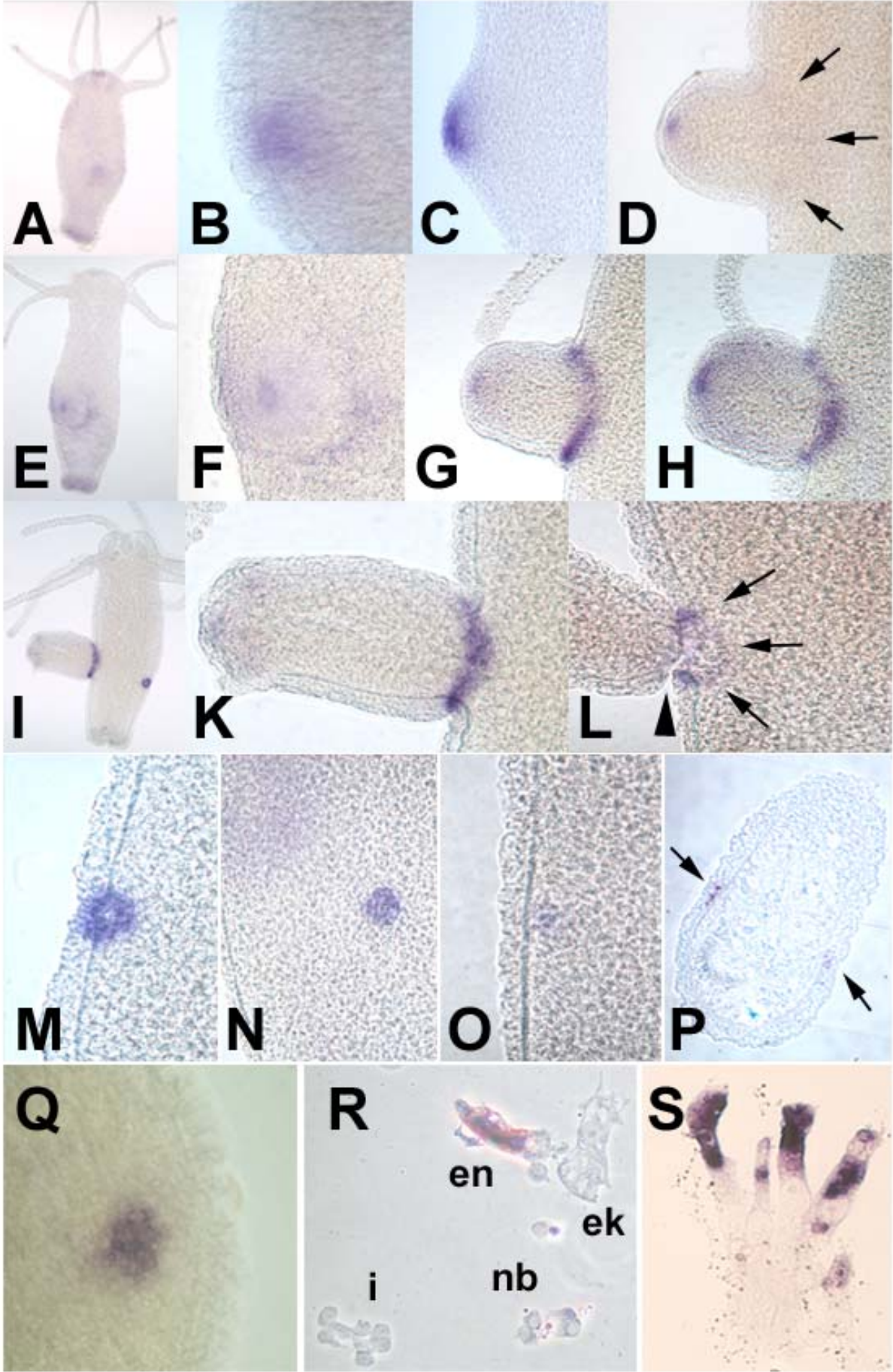
Die ersten Anzeichen der Bildung von Tentakelknospen waren in Knospstadium 6 (etwa 20 Stunden nach Beginn der Evagination) feststellbar. Exakt zu diesem Zeitpunkt verschwand die Expression von *kringelchen* in der Knospenspitze (Abb. 3.9 I,K), während der Ring von exprimierenden Zellen an der Knospbasis weiterhin erhalten blieb. Dieser Ring nahm eine Breite von ca. 5 bis 6 Zellen ein. Bis kurz vor der Ablösung der Knospe wurde *kringelchen* sowohl im Eltertier als auch im jungen Polypen exprimiert (Abb. 3.9 K).

Als sich die Knospe ablöste, hatte sich die ringförmige Expressionsdomäne im Eltertier auf eine Breite von zwei bis drei Zellen reduziert (Abb. 3.9 L). Kurz vor ihrer Ablösung war die Knospe nur noch über eine dünne Gewebebrücke mit dem Eltertier verbunden, und *kringelchen* ließ sich zwar noch im Eltertier, nicht aber in der Knospe nachweisen. Nach Ablösung verblieb im Eltertier um die Ablösestelle herum ein Ring aus etwa 40 *kringelchen*-positiven ektodermalen Zellen. Diese Expressionsdomäne verkleinerte sich innerhalb von 30 Minuten zu einem Fleck (Abb. 3.9 L-O), der nach ein bis zwei Stunden verschwand. Die *kringelchen*-mRNA war dann im Tier über *in situ*-Hybridisierung nicht mehr detektierbar.

Die *in situ*-Hybridisierung von Einzelzellpräparationen zeigte, dass die Expression von *kringelchen* in jeder Phase der Knospung auf Epithelmuskelzellen beschränkt war (Abb. 3.9 R, S). Ob es in ekto- oder entodermalen Zellen nachweisbar war, hing vom Knospstadium ab.

Um auszuschließen, dass das dynamische Expressionsmuster durch den Nachweis von Transkripten hervorgerufen wurde, die für eng verwandte Kinasen oder Kinase-Domänen codieren, waren verschiedene Antisense-Proben aus dem extra- und intrazellulären Bereich von *kringelchen* hergestellt und für die *in situ*-Hybridisierung verwendet worden. Alle antisense-RNAs detektierten unabhängig voneinander das oben beschriebene Expressionsmuster. Dadurch scheint ausgeschlossen, dass dieses Muster durch Kreuzreaktionen von verschiedenen, miteinander verwandten Sequenzen hervorgerufen wurden.

Abb. 3.9: Expressionsmuster von *kringelchen*. (A,B) Knospstadium 1 (Verdickung des Ektoderms und frühe Evagination); (C) Stadium 3 (etwa 5 Stunden nach Beginn der Evagination). (D) Stadium 4; (E-H) Stadium 5 (Tentakel in G und H gehört zum Eltertier); (I-K) Stadium 7 (Tentakelknospen bilden sich aus); (L) Stadium 10 (kurz vor der Ablösung). (M-O) Knospungsregion des Eltertieres kurz nach der Ablösung: (M) direkt nach der Ablösung, (N) 30 Minuten nach der Ablösung, (O) 60 Minuten nach der Ablösung. (P) Semidünnschnitt der Knospungsregion eines Polypen in Stadium 5. (Q) Nahaufnahme einer Knospenspitze in Stadium 2, etwa 60 Zellen sind angefärbt. (R,S) Einzelzellpräparation aus Gewebe der Knospungsregion mit Epithelmuskelzellen, die *kringelchen* exprimieren: (R) Phasenkontrastbild, in dem auch ungefärbte Zelltypen zu erkennen sind (S) Lichtmikroskopische Aufnahme, die eine Gruppe *kringelchen*-positiver Epithelmuskelzellen aus der Knospungsregion zeigt. Die Knospstadien sind nach Otto und Campbell (1977) benannt. i: kleine I-Zellen, nb: Nematoblasten, ek: ektodermale Epithelmuskelzellen, en: entodermale Epithelmuskelzellen.



3.2.5 *kringelchen* wird auf geringem Niveau im ganzen Polypen exprimiert

Wegen einer leichten generellen Färbung des Körpergewebes von Hydra bei der *in situ*-Hybridisierung mit *kringelchen*-Antisense-RNA sollte ein RT-PCR-Experiment klären, ob *kringelchen* auch außerhalb der Knospungsregion exprimiert wird. Dazu wurden knospende und knospenlose Polypen in drei etwa gleichgroße Teile geschnitten: Kopfbereich, Rumpfbereich mit oder ohne Knospe und Fußbereich. Aus diesen Fragmenten wurde die Gesamt-RNA isoliert und in eine RT-PCR eingesetzt. In verschiedenen Zyklen der PCR wurden Proben entnommen und auf eine Amplifikation von *kringelchen* untersucht. Nach 23 PCR-Zyklen war *kringelchen* in vergleichbaren Mengen aus allen Proben amplifiziert worden (Abb. 3.10)

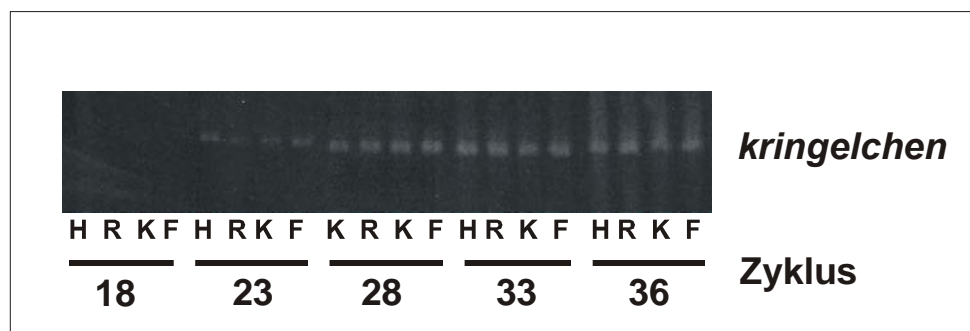


Abb. 3.10: Nachweis von *kringelchen*-mRNA in verschiedenen Körperregionen von Hydra mittels RT-PCR. Als Template für die RT-PCR wurden gleiche Mengen von Gesamt-RNA aus der Kopfregion (H), der Rumpfreion knospenloser Tiere (R), der Rumpfreion von knospenden Polypen verschiedener Knospenstadien (K) und der Fußregion (F) eingesetzt.

Transkripte von *kringelchen* befinden sich also auch im Kopf- und im Fußbereich, ebenso wie im Rumpfbereich von knospenlosen Polypen. Die Transkriptionsrate in diesen Körperregionen ist allerdings so gering, dass *kringelchen* dort nicht über *in situ*-Hybridisierung nachweisbar ist.

3.2.6 Das Expressionsmuster von *kringelchen* kann durch Eingriffe in den Knospungsvorgang verändert werden

Das in allen Phasen der Knospung hochdynamisch regulierte Expressionsmuster führte zu der Vermutung, dass *kringelchen* während des Knospungsprozesses eine oder mehrere Funktionen ausübt. Das Transkript war über *in situ*-Hybridisierung in allen Phasen der Knospung nachweisbar, somit ist *kringelchen* möglicherweise beteiligt an der Bildung der sekundären Körperachse, an der Einwanderung von Zellen aus dem Elterntier in die Knospe, an Proliferation, an der Determination von Kopf- und Fußstrukturen und an der Ablösung der

Knospe. Ähnliche Prozesse werden in Metazoen häufig unter Beteiligung von FGF und ihren Rezeptoren reguliert (siehe 2.1.7).

Über Regenerationsexperimente ist es möglich, in den normalen Knospungsvorgang einzugreifen. Tardent (1972) beschrieb, dass die Knospung mit der Kopfregeneration interferiert. Er beobachtete, dass ein Polyp, der eine junge Knospe (Knospungsstadium 3) trägt, nach Amputation des Kopfes einen neuen Kopf nur dann regenerierte, wenn der Schnitt für die Amputation in der Mitte zwischen junger Knospe und Kopf oder weiter in Richtung Kopf erfolgte. Die Knospe löste sich dann normal ab. Amputierte man den Kopf allerdings direkt oberhalb der jungen Knospe, so blieb die Regeneration eines neuen Kopfes aus. Statt dessen ersetzte die Knospe den früheren Kopf und wurde Teil der primären Körperachse. Durch Abtrennen des Kopfes direkt über der jungen Knospe können also Polypen erzeugt werden, bei denen keine Knospenablösung stattfindet.

Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde beobachtet, in wieweit das Expressionsmuster von *kringelchen* beeinflusst wurde, wenn die Knospenablösung ausblieb. Ein solches Experiment sollte Hinweise darauf geben, ob *kringelchen* in die Knospenablösung involviert ist. Dazu wurden Polypen, die sich in Stadium 3 oder 4 (Otto und Campbell, 1977), also einem frühen Knospenstadium befanden, direkt oberhalb der Knospe dekapitiert, das Expressionsmuster von *kringelchen* wurde während der weiteren Entwicklung der Knospe verfolgt. Dieses Experiment bestätigte zunächst die Befunde von Tardent, dass keine Kopfregeneration stattfindet, wenn dem adulten Polypen der Kopf während der frühen Knospung (Stadium 3 oder 4) entfernt wird. Wurde das Experiment mit Tieren wiederholt, die in der Knospung weiter fortgeschritten waren als Stadium 4, konnte die Knospe den entfernten Kopf nicht mehr ersetzen. Sie löste sich, wie bei nicht manipulierten Tieren, nach einigen Tagen ab, und es wurde ein Kopf regeneriert (Abb. 3.11 A). Die frühe *kringelchen*-Expression blieb in Polypen, in denen die Knospenablösung nach Amputation des Kopfes verhindert wurde, immer unverändert: An der Knospenspitze wurde *kringelchen*, wie in unmanipulierten Kontrolltieren, fleckenförmig exprimiert (Abb. 3.11 B). Das spätere ringförmige Expressionsmuster, das sich bei ungeschnittenen Kontrolltieren in Knospenstadium 5 - 6 ausbildete, war allerdings verändert (Abb. 3.11 C-G): Der Ring war unterbrochen, nur schwach nachweisbar oder fehlte sogar ganz. In einigen Polypen war der Ring nicht gleichmäßig ausgeprägt, sondern durch zusätzliche, fleckenförmige Expressionsdomänen in seiner Peripherie erweitert (Abb. 3.11 E). In vielen Fällen wurde *kringelchen* im gesamten Knospengewebe stark exprimiert (Abb. 3.11 F), was üblicherweise bei knospenden Tieren nicht der Fall ist. Auch Polypen, die in Knospenstadium 8 geschnitten wurden und bei denen sich die Knospe in 90% aller Fälle abgelöste, zeigten häufig eine Expression von *kringelchen* im gesamten Knospengewebe. Diese „Überexpression“ scheint daher durch die Regenerationsprozesse im Elterntier ausgelöst zu werden und hat mit dem Ablösen der

Knospe nichts zu tun. In Tieren, deren Knospe sich ablöste, war die Expression an der Knospenbasis im Vergleich zu intakten Tieren nicht verändert.

Diese Experimente gaben einen Hinweis darauf, dass die korrekte Ausprägung der ringförmigen Expressionszone von *kringelchen* an der Knospenbasis mit einer normalen Knospenablösung korreliert ist.

In einem Kontrollexperiment wurde die Fußregion direkt unterhalb der frühen Knospe (Stadium 3) entfernt (Abb. 3.11 H-L). Fußregeneration verhindert die Knospenablösung nicht, und dieses Experiment sollte zeigen, dass für die Veränderungen im Expressionsmuster von *kringelchen* die fehlende Knospenablösung ursächlich war, und nicht etwa die Induktion von Regenerationsprozessen im Elterntier. In diesen Fußregeneraten war das ringförmige Expressionsmuster von *kringelchen* in seiner normalen Form ausgeprägt. Die ringförmige Expressionsdomäne erschien sogar etwas dicker und intensiver gefärbt (Abb. 3.11 I-L) und die Knospen lösten sich etwas früher als bei ungeschnittenen Kontrolltieren vom Elterntier ab. Eine ektopische Überexpression von *kringelchen* im Knospengewebe (Abb. 3.11 F) konnte bei diesem Experiment nicht beobachtet werden, sondern wurde nur durch Amputation des Kopfes hervorgerufen.

Neben der Expression in der Knospe wurde *kringelchen* auch im regenerierendem Fuß transkribiert (Abb. 3.11 K,L). Dies war auch während der normalen Fußregeneration zu beobachten und deutet darauf hin, dass *kringelchen*-Transkription generell durch Regenerationsvorgänge in Hydra beeinflusst wird (siehe 3.2.8).

Durch das Entfernen des Fußes wird also weder das Expressionsmuster von *kringelchen* während der Knospung verändert noch die Ablösung der Knospe verhindert. Ob das im Vergleich zu Kontrolltieren frühere Ablösen der Knospe mit der stärkeren Expression an der Knospenbasis in Zusammenhang stand, konnte nicht geklärt werden.

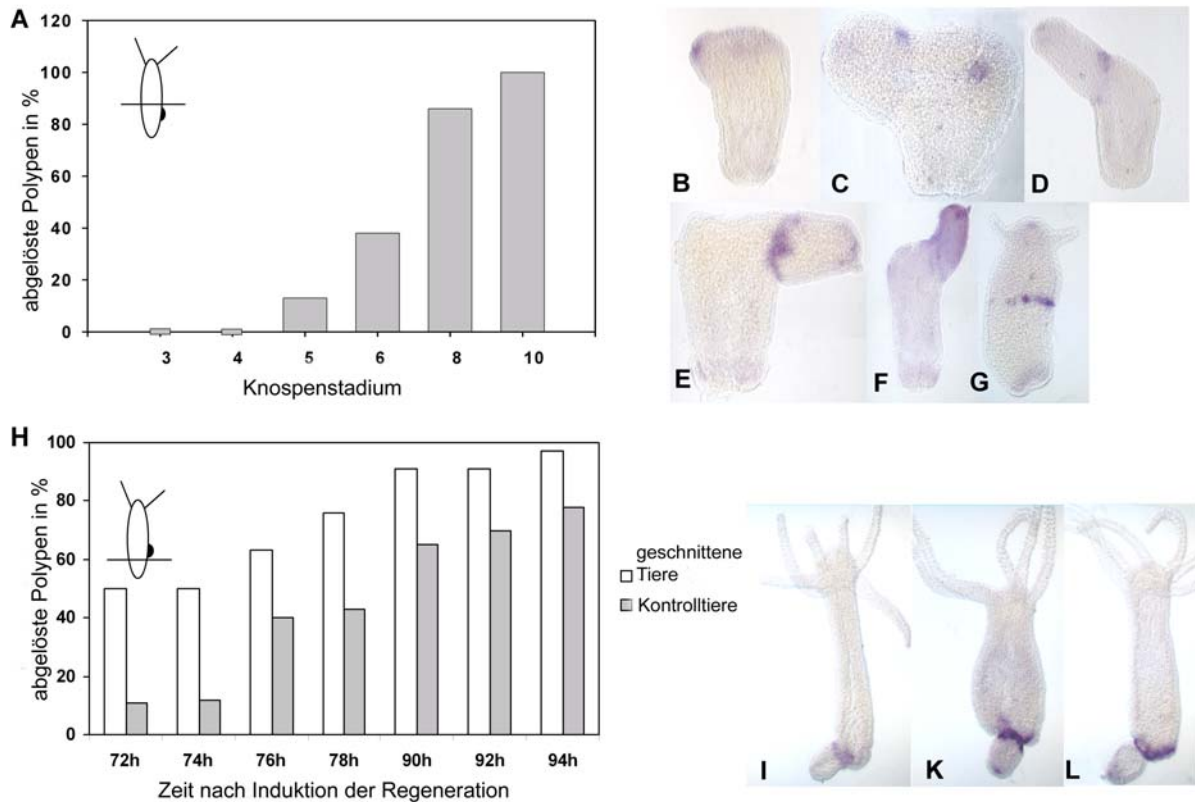


Abb. 3.11: Effekte der Regeneration auf die Knospung und die Expression von *kringelchen*. (A-G) Effekte der Kopfregeneration auf die Knospung und Expression von *kringelchen*. (A) Kopfregeneration und Knospung interferieren, was dazu führt, dass die Knospen sich nicht ablösen, wenn die Regeneration früh in der Knospung induziert wird ($n=100$). (B-G) Expressionsmuster von *kringelchen* in Polypen, bei denen durch Kopfregeneration (Entfernen des Kopfes in Stadium 3) die Knospenablösung verhindert wird: (B) 10 Stunden, (C) 26 Stunden, (D) 22 Stunden, (E) 31 Stunden, (F) 36 Stunden, (G) 57 Stunden nach Induktion der Regeneration. (H-L) Effekte der Fußregeneration auf die Knospung und Expression von *kringelchen*. (H) Durch die Induktion der Fußregeneration wird die Ablösung der Knospe leicht beschleunigt ($n=100$). (I-L) Expressionsmuster von *kringelchen* in Polypen, bei denen in Stadium 3 der Fuß direkt unterhalb der Knospe entfernt wurde, 24 bis 25 Stunden nach der Induktion der Regeneration. Die ringförmige Expressionsdomäne an der Knospenbasis erschien breiter ausgeprägt und stärker gefärbt.

3.2.7 Die spezifische biochemische oder translationelle Inhibition von *Kringelchen* verhindert die Knospenablösung

Während der Knospung von Hydra laufen verschiedene morphogenetische Prozesse wie Achsenbildung, Zellwanderung, Differenzierung und Ablösung der Knospe ab (siehe 2.2.2.4). *kringelchen* wird dabei in einem hochdynamischen Muster exprimiert, was eine Vielzahl von Funktionen dieses Gens im Verlauf der Knospung vermuten lässt.

Über zwei unabhängige Inhibitionsexperimente sollte geklärt werden, welche Aufgaben *kringelchen* während der Knospung übernimmt. Im ersten Ansatz wurde über SU5402, einen spezifischen Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität von FGF-Rezeptoren, biochemisch die

Signalweiterleitung, die abhängig von der Phosphorylierung des Rezeptors ist, blockiert (Mohammadi et al., 1997). Eine Weiterleitung von Signalen durch Kringelchen über andere Mechanismen wäre weiterhin möglich. Im Gegensatz dazu wurde durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden gegen *kringelchen* die Translation des FGF-Rezeptors verhindert, der somit für keinerlei Wechselwirkung zur Verfügung stand. In beiden Experimenten wurde die Knospenablösung (und nur diese) verhindert (Abb. 3.12, Abb. 3.14). SU5402, ein Indolinon-Derivat (Abb. 3.12 A), blockiert die ATP-bindende Region der Tyrosinkinase-Domäne von FGF-Rezeptoren, so dass keine Phosphorylierung von Substratproteinen erfolgen kann. Der Inhibitor ist hochspezifisch für FGF-Rezeptoren: Die Inhibitorkonzentration, bei der die Aktivität des Rezeptors um 50% herabgesetzt wird (IC_{50}) liegt für FGFR bei 10 bis 20 μ M in Gegenwart von 1 mM ATP. Der PDGF-Rezeptor wird erst in Konzentrationen größer als 60 μ M schwach inhibiert, während andere Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel der Insulinrezeptor oder der EGF-Rezeptor gar nicht inhibiert werden (Mohammadi et al., 1997). Kringelchen besitzt im Gegensatz zu anderen Tyrosinkinasen acht der neun Aminosäurereste, die laut Kristallstrukturanalyse im Falle des humanen FGFR1 die Bindung von SU5402 an die Tyrosinkinasedomäne vermitteln (Abb. 4.4) (Mohammadi et al., 1997). Die Voraussetzungen für eine spezifische Inhibition von Kringelchen sind somit gegeben.

Für das Inhibitionsexperiment wurden Polypen in den Knospenstadien drei, fünf und sieben für 24 Stunden mit 10 μ M SU5402 behandelt (Abb. 3.12 B). In diesem Experiment entwickelten sich die Knospen zunächst genauso wie die Knospen unbehandelter Kontrolltiere. Allerdings verhinderte SU5402 bei behandelten Tieren die Einschnürung der Knospenbasis und die Ablösung der Knospe vom Elterntier. Dieser Effekt zeigte sich am stärksten bei der Behandlung von jungen Knospen (Stadium 3, Abb. 3.12 C). Hier blieb bei etwa 70% der behandelten Tiere die Knospenablösung aus, Fußgewebe wurde nicht differenziert. Behandlung mit dem Inhibitor in Stadium fünf verhinderte die Ablösung bei 60%, in Stadium sieben nur bei 45% der Tiere. Eine Behandlung von Polypen in späteren Stadien (fünf und sieben) der Knospung resultierte generell in der Entstehung von „mildereren“ Phänotypen, bei denen die Knospe einen kleinen lateralen anstatt dem ringförmigen Fuß an der Basis bildete, bzw. bei denen sich die Knospenbasis zwar verengte, eine Ablösung der Knospe aber ausblieb (Abb. 3.12 D). Eine SU5402-Behandlung von Polypen in Knospenstadium acht oder später zeigte keinen Effekt. Die Ablösung der Knospe muss zu diesem Zeitpunkt schon irreversibel programmiert sein.

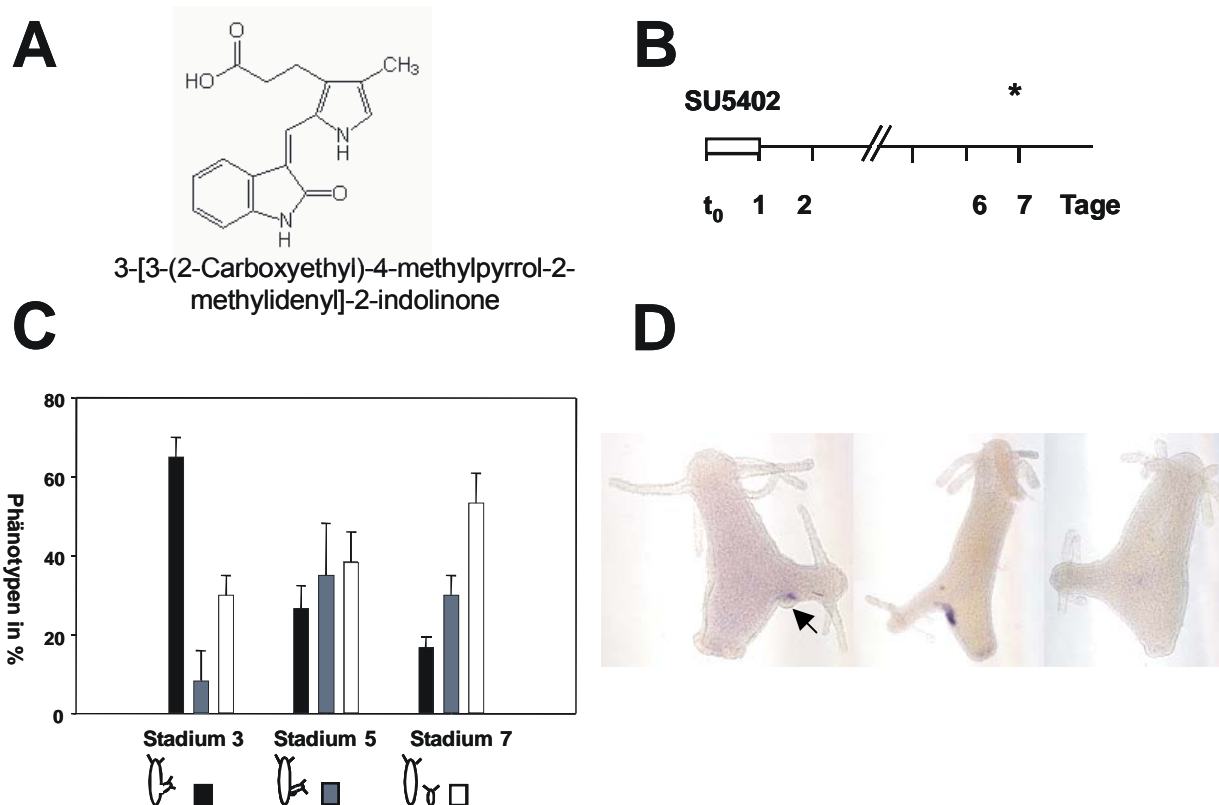


Abb. 3.12: Inhibition der Knospenablösung und Expressionsmuster von *kringelchen* nach Behandlung mit SU5402. (A) Strukturformel von SU5402. (B) Behandlungsschema für SU5402. Polypen in den Knospenstadien 3, 5 und 7 wurden für 24 Stunden mit SU5402 behandelt. Der Stern markiert Tag 6 nach Ende der Behandlung, an dem die *in situ*-Hybridisierung erfolgte. (C) Effekte der SU5402-Behandlung auf Polypen der verschiedenen Knospenstadien. Der stärkste Effekt (Nichtablösung der Knospe, schwarzer Balken) wurde erzielt bei der Behandlung von Knospenstadium 3. Schwarze Balken: starker Phänotyp (verzweigte Tiere ohne laterale Fußstrukturen), graue Balken: milder Phänotyp (verzweigte Tiere mit lateralen Fußstrukturen), weiße Balken: Knospenablösung. (D) *In situ*-Hybridisierung mit einer *kringelchen*-Antisense-Sonde auf Tiere, die in Knospenstadium 3 mit SU5402 behandelt wurden. Der Pfeil markiert eine laterale Fußstruktur.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob SU5402 auch die ganz frühen Knospungsphasen beeinflussen kann. Dazu wurden „schwängere“ Polypen mit dem Inhibitor behandelt, also knospenlose Tiere, bei denen die Knospung bereits induziert, aber morphologisch noch nicht sichtbar war. Möglich wurde dies, da die Fütterung der Polypen die Knospung reproduzierbar induzierte und eine Synchronisierung des Knospungsvorganges ermöglichte: Unsere Tiere wurden an fünf Tagen in Folge unter der Woche gefüttert, an zwei Tagen hungerten sie. Während der Hungerperiode befand sich die Mehrzahl der Polypen in Knospungsstadium acht bis zehn, die Knospen lösten sich in den folgenden zwei Tagen ab. In der Mitte der Fütterungsperiode befanden sich daher neben den kleinen Jungpolypen vor allem große und knospenlose Tiere in der Kultur, bei denen man davon ausgehen konnte, dass die neue Knospe bereits durch Fütterung induziert war. (Abb. 3.13 A).

Für das Inhibitionsexperiment wurden jeweils 200 solcher knospenloser Tiere in eine Petrieschale überführt und in Gegenwart von 1 mM ATP mit 10 μ M SU5402 behandelt. In einer zweiten Petrischale befanden sich 200 knospenlose Kontrolltiere, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Tiere, an denen nach 24 Stunden morphologisch erste Anzeichen einer Knospe zu erkennen waren, wurden aussortiert und weiter beobachtet. Es zeigte sich, dass über einen Beobachtungszeitraum von 48 Stunden etwa die gleiche Anzahl von Tieren aus der Inhibitor-Gruppe und der Kontrollgruppe Knospen bildete, welche sich später normal vom Elterntier ablösen (Abb. 3.13 B). Die Behandlung „knospenschwangerer“ Tiere mit SU5402 hatte also keinen Effekt auf den Knospungsprozess .

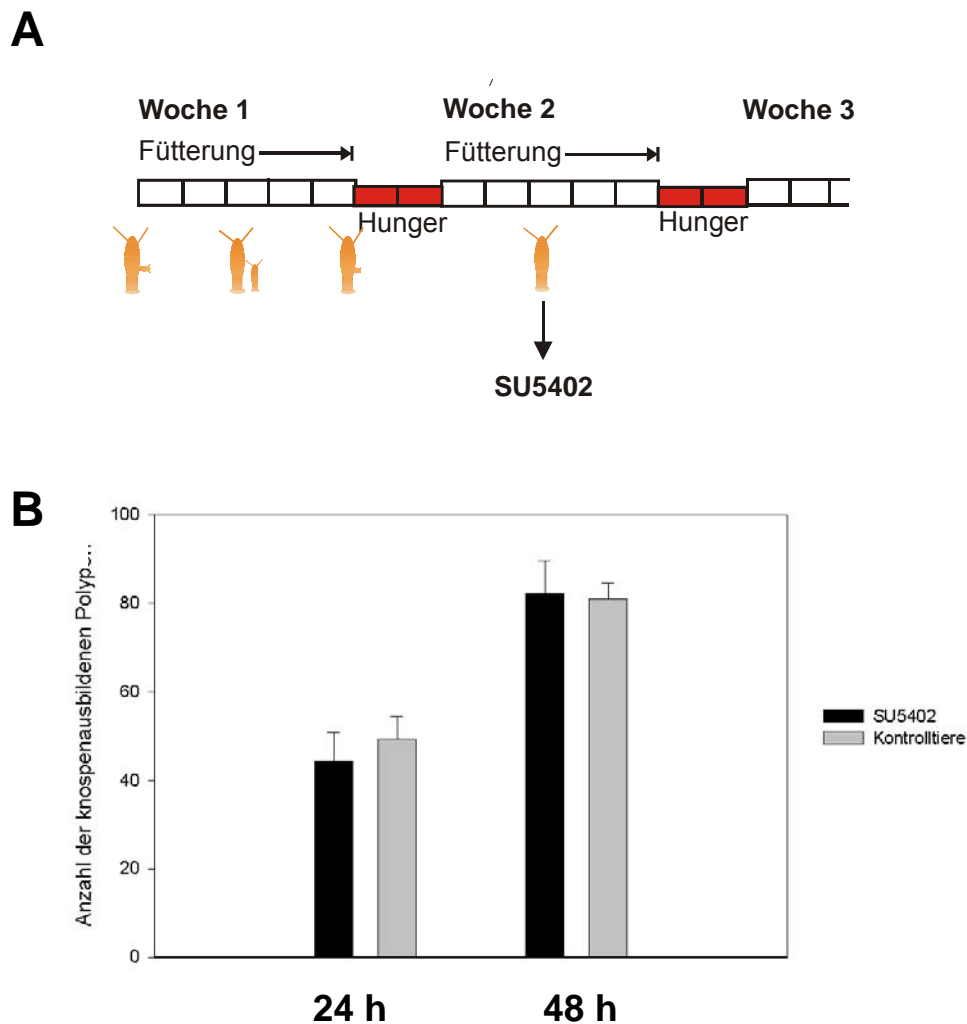


Abb. 3.13: SU5402-Behandlung von „knospenschwangeren“ Polypen. (A) Fütterungsschema. Bei großen, knospenlosen Tieren in der Wochenmitte war die Knospung bereits induziert. (B) Effekte der SU5402-Behandlung. Weder nach 24 h noch nach 48 h war ein signifikanter Unterschied in der Knospenausbildung zwischen SU5402-Tieren und Kontrolltieren zu beobachten.

Ein zweiter Inhibitionsversuch erfolgte über eine Behandlung von Polypen mit Antisense-Oligonukleotiden, die gegen *kringelchen* gerichtet waren. Diese Oligonukleotide binden an die *kringelchen*-mRNA und verhindern dadurch spezifisch die Translation des Proteins. Zunächst musste eine geeignete Methode gefunden werden, um die Antisense-Oligonukleotide in Hydra-Zellen einzuschleusen: Es zeigte sich, dass eine Transfektion mit Hilfe verschiedener, käuflich zu erwerbender Reagentien (DOSPER und DOTAP (Boehringer Mannheim), Effectene und SuperFect (Qiagen)) nicht geeignet war. Erst durch Austesten und Modifikation verschiedener Elektroporationsprotokolle konnte ein Verfahren entwickelt werden, dass die Elektroporation der Oligonukleotide ermöglichte (siehe 5.2.2.6).

In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden jeweils 20 Polypen (Knospungsstadium drei) elektroporiert (Abb. 3.14 A), die Phänotypen der 39 überlebenden Tiere wurden analysiert (Abb. 3.14). Nur etwa 40% dieser Tiere lösten ihre Knospe ab, bei den meisten war die Knospenablösung unterbunden (Abb. 3.14 B). Es bildeten sich verzweigte Tiere, bei denen *kringelchen* nicht nachweisbar war. Der Phänotyp war denen, die aus der Behandlung mit SU5402 resultierten, sehr ähnlich. Auch die Antisense-Oligonukleotide hatten weder einen Einfluss auf das Auswachsen der Knospe noch auf die Kopfdifferenzierung. Allerdings waren die nicht-abgelösten Knospen bei den mit Antisense-Oligonukleotiden behandelten Tieren länger und dünner als es für Knospen kurz vor der Ablösung von unbehandelten Tieren üblich ist (Abb. 3.14.C). Dieser Effekt wurde durch SU5402 nicht hervorgerufen. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen des Kringelchen-Proteins möglicherweise einen Einfluss auf die Proportionen der Knospe hat, was durch eine Inhibition der Signalweiterleitung nicht erreicht wird. Eine Elektroporation mit Kontrolloligonukleotiden hatte keinen Effekt auf die Entwicklung oder Ablösung der Knospe.

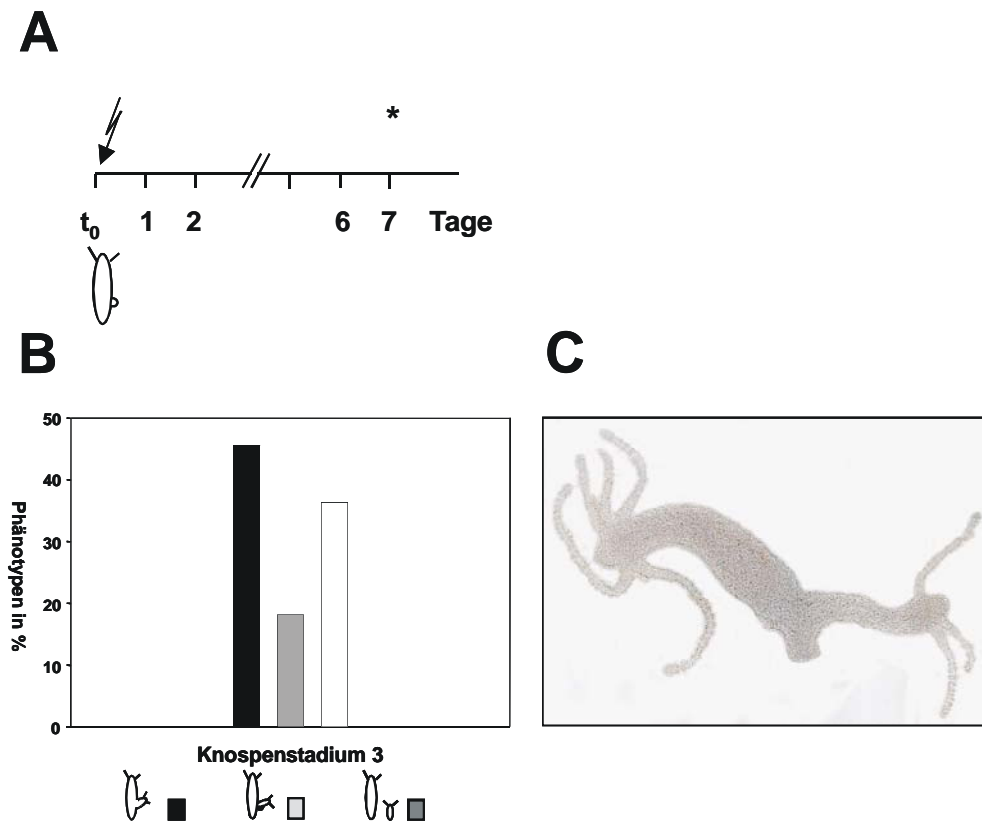


Abb. 3.14: Inhibition von *kringelchen* mittels Elektroporation von Antisense-Oligonukleotiden. (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Polypen in Knospenstadium 3 wurden mit Antisense-Oligonukleotide gegen *kringelchen* elektroporiert und anschließend zunächst für einen Tag bei 4 °C, danach bei 18 °C weitere 5 Tage gehalten. Am Tag 7 (*) erfolgte die *in situ*-Hybridisierung. (B) Effekte der Elektroporation von Tieren in Knospenstadium 3 mit Antisense-Oligonukleotiden. Von 60 elektroporierten Polypen überlebten 39. Schwarzer Balken: verzweigte Tiere ohne lateralen Fuß (starker Phänotyp), grauer Balken: verzweigte Tiere mit lateralen Fußgewebe (milder Phänotyp), weißer Balken: Knospenablösung (C) *In situ*-Hybridisierung mit einer *kringelchen*-Antisense-Probe auf Polypen, die nach Elektroporation mit Antisense-Oligonukleotiden eine verzweigte Gestalt besitzen. Es war keine *kringelchen*-Expression nachweisbar.

Die Untersuchung der Expression von *kringelchen* bei den verzweigten Tieren, die mit Antisense-Oligonukleotiden oder SU5402 behandelt worden waren, zeigte, dass durch beide Versuchsansätze die ringförmige Expressionsdomäne an der Knospenbasis verändert worden war und in einigen Tieren sogar ganz fehlte (Abb. 3.12 D, 3.14 C). Somit war das Ergebnis der Inhibitionsexperimente dem der vorher beschriebenen Regenerationsexperimente, bei denen das Entfernen des Kopfes die Knospenablösung verhindert hatte, sehr ähnlich: Die korrekte Ausprägung der *kringelchen*-Expression an der Knospenbasis korrelierte mit der Knospenablösung. Löste sich die Knospe nicht ab, so war die ringförmige Expressionsdomäne unregelmäßig oder unterbrochen ausgeprägt oder fehlte sogar ganz.

Für eine Überprüfung der Hypothese, dass die ringförmige Expression von *kringelchen* an der Knospbasis entscheidend mit der Knospablösung zusammenhängt, wäre eine lokale Inhibition nur in dieser Region wünschenswert. Dies ist bei Hydra aber nicht möglich.

3.2.8 Expression von *kringelchen* während der Regeneration

Während der Knospung werden fast alle Musterbildungsprozesse, zu denen Hydra fähig ist, aktiviert: Durch Ausbildung einer neuen Körperachse und Differenzierung von Kopf und Fußstrukturen wird ein Jungpolyp gebildet, der sich schließlich vom Elterntier abgrenzt und ablöst (siehe 2.2.2.4). Solche Musterbildungsprozesse können auch durch Regeneration induziert werden (siehe 2.2.2.2): Schneidet man einen Polypen in zwei Hälften, so wird sich innerhalb weniger Tage am apikalen Ende der unteren Hälfte ein neuer Kopf bilden (Kopfregerat) und an der oberen Hälfte basal ein neuer Fuß (Fußregerat). An der bestehenden Achse werden also die fehlenden Körperteile regenerativ ersetzt. Man kann dabei drei Phasen, nämlich a) den Wundverschluss, b) die Determinierung und schließlich c) die Differenzierung von Kopf und Fuß beobachten. Während der Regeneration von Zellaggregaten aus Einzelzellen, einem Extremfall der Regeneration, kann zusätzlich die Ausbildung neuer Körperachsen untersucht werden (siehe 2.2.2.3). Da *kringelchen* in allen Phasen der Knospung exprimiert wird (Sudhop et al., 2004), war anzunehmen, dass das Gen auch bei verschiedenen Musterbildungsprozessen während der Regeneration aktiviert wird.

3.2.8.1 Im Zuge der Kopfreeneration korreliert die Expression von *kringelchen* in etwa mit der Etablierung des Organisators

Wird Hydra in zwei Hälften geschnitten, so bildet sich am apikalen Ende der unteren Hälfte innerhalb von zwei bis drei Tagen ein neuer Kopf mit Hypostom und Tentakel. Die Expression von *kringelchen* wurde während dieses Regenerationsprozesses mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert. Etwa eine Stunde nach dem Halbieren der Polypen schien *kringelchen* an der Schnittstelle schwach exprimiert zu werden (Abb. 3.15 A), diese Expression war aber nach zwei bis drei Stunden, sobald die Wunde sich verschlossen hatte, wieder verschwunden. Es erwies sich, dass diese scheinbare Expression aus einem Einrollen der Wundränder resultierte, wodurch es zu einer Überlagerung des *kringelchen* schwach exprimierenden Ektoderms kam (siehe 3.2.8.3). Erst nach 16 Stunden wurde *kringelchen*-RNA in deutlich höherer Menge exprimiert. Das Transkript konnte am apikalen Ende des Kopfregerats diffus im Entoderm nachgewiesen werden (Abb. 3.15.B). Das Signal verstärkte sich innerhalb der nächsten Stunden (Abb. 3.15 C) und konzentrierte sich

nach etwa 22 Stunden an der Spitze des Regenerats (Abb. 3.15 D), wo es nach 28 Stunden in einem fleckenförmigen Areal detektiert wurde (Abb. 3.15 E). Die ehemals flache Schnittstelle hatte sich zu diesem Zeitpunkt abgerundet, *kringelchen* konnte im entodermalen Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B-E). Eine verstärkte ektodermale Expression an der Spitze des Regenerats wurde nach 30 Stunden beobachtet (Abb. 3.15 F,G). Gleichzeitig war zu erkennen, dass im Bereich der Schnittstelle die Mesogloea neu gebildet wurde, Ektoderm und Entoderm aber noch nicht vollständig voneinander getrennt waren (Abb. 3.15 F,G). 42 Stunden nach Induktion der Regeneration beschränkte sich die Expression auf das Entoderm, *kringelchen* wurde in den Zellen des sich entwickelnden Hypostoms und der Tentakelknospen exprimiert (Abb. 3.15 H, I). Die Mesogloea war jetzt so weit ausgebildet, dass sie beide Zellschichten voneinander trennte. In den auswachsenden Tentakeln wurde *kringelchen* nicht exprimiert, wohl aber in den Tentakelknospen (Abb. 3.15 I). Nach etwa 60 Stunden Regenerationszeit, wenn die typische kegelförmige Struktur des Hypostoms vollständig ausgebildet und Tentakel vorhanden waren, konnte *kringelchen* nicht mehr detektiert werden (Abb. 3.15 J).

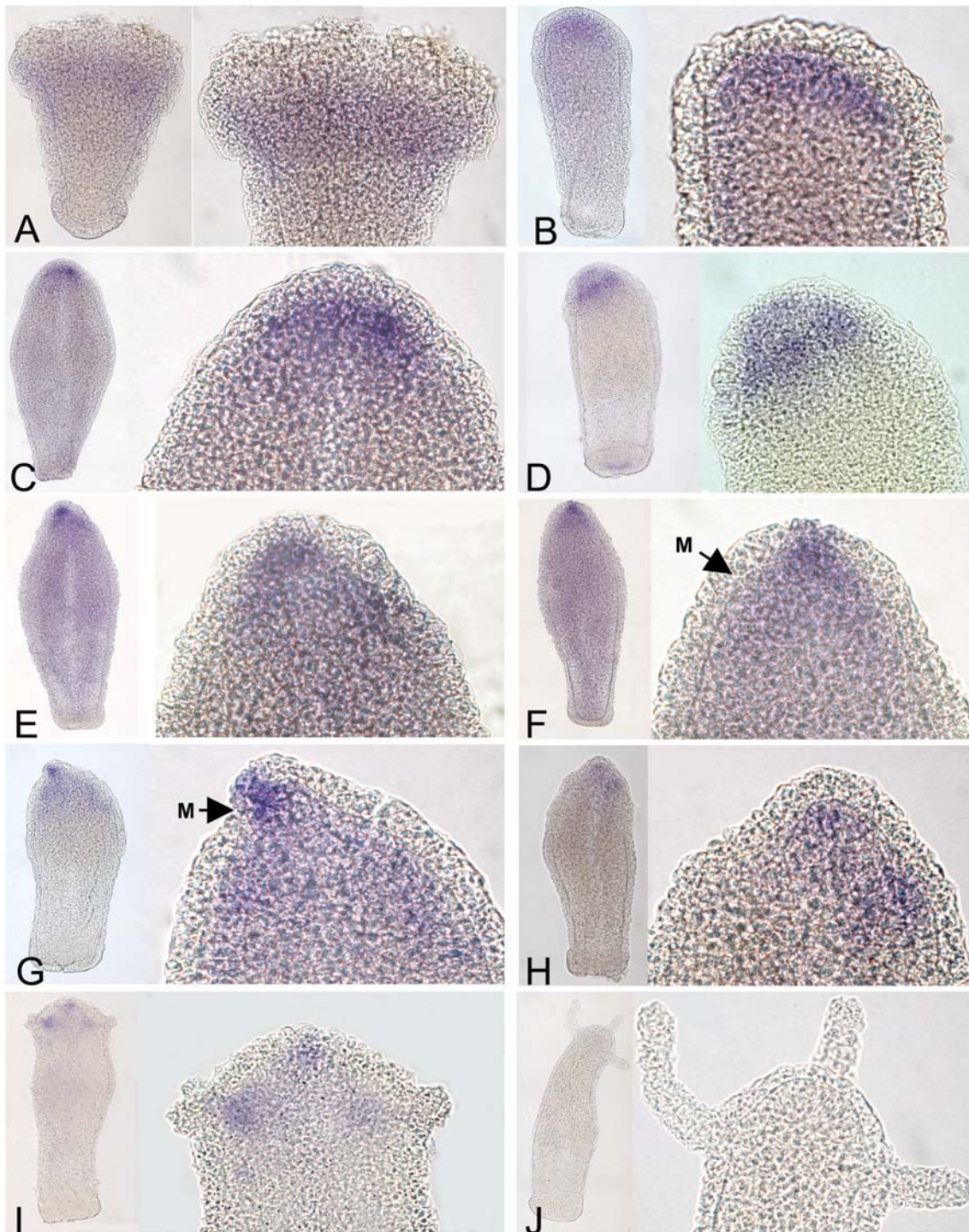


Abb. 3.15: Expressionsmuster von *kringelchen* während der Kopfregeneration. Die Polypen wurden in der Körpermitte durchtrennt und die *kringelchen*-Expression im Verlauf der Kopfregeneration mittels *in situ*-Hybridisierung verfolgt. (A) 1 Stunde, (B) 16 Stunden, (C) 22 Stunden, (D) 24 Stunden, (E) 28 Stunden, (F) 30 Stunden, (G) 36 Stunden, (H) 42 Stunden, (I) 50 Stunden, (J) 60 Stunden nach der Induktion der Regeneration. M: Mesogloea.

3.2.8.1.1 Die Kopfdeterminierung ist unter unseren Hälterungsbedingungen verzögert

Der Zeitpunkt der ersten deutlichen Expression von *kringelchen* nach 16 Stunden Regenerationszeit warf die Frage auf, in welcher Phase der Regeneration sich die Kopfregerate zu diesem Zeitpunkt befanden. Die Regeneration von Hydra wird in drei Phasen unterteilt: In Phase eins wird die Wunde verschlossen, in der zweiten Phase erfolgt die Determinierung des verlorenen Körperteils und in der dritten Phase differenzieren sich Kopf- oder Fußstrukturen (siehe 2.2.2.2). Folgt man den Angaben der Literatur, dann ist die Determinierungsphase etwa nach acht Stunden Regenerationszeit mit Ausbildung der Organisatorregion abgeschlossen (Broun und Bode, 2002; Holstein et al., 2003). Dies gilt allerdings nur, wenn die Regeneration von Hydra bei einer Temperatur von etwa 20 bis 22°C abläuft. Unter unseren Haltungsbedingungen bei 17-18°C laufen die Regenerationsprozesse verzögert ab (siehe auch 3.2.8.2), so dass nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden konnte, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die Expression von *kringelchen* in den Kopfregeraten aktiviert wurde, die Bildung des Kopforanisators bereits abgeschlossen war. Ein Transplantationsexperiment sollte diesen Punkt klären: Große knospenlose Tiere wurden, wie auch zur oben beschriebenen Analyse der Kopfregeneration, halbiert. Die unteren Hälften begannen mit der Regeneration eines neuen Kopfes. Diesen Kopfregeraten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die apikalen Spitzen entfernt, die dann an die Rumpfregeion von knospenlosen Empfängerpolypen transplantiert wurden. Die Transplantate, in denen der Kopforanisator bereits ausgebildet war, sollten in der Lage sein, am Empfängertier eine sekundäre Körperachse zu induzieren (Abb. 3.16 A, B). Durch dieses Experiment konnte geklärt werden, wie lange unter unseren Kulturbedingungen die Ausbildung des Kopforanisators in Kopfregeraten von Hydra benötigt. Im Vergleich zu Regeneraten, die bei 22°C gehalten wurden, verzögerte sich die Regeneration durch eine Haltung der Tiere bei 18°C deutlich. Unter diesen Bedingungen waren 13 bis 16 Stunden Regenerationszeit notwendig bis bei etwa 50% der Tiere der Kopforanisator ausgebildet war, erst nach 18 Stunden war die Mehrzahl der Transplantate fähig, im Wirtstier Kopfstrukturen zu induzieren. Wurden die Regenerate bei 22°C inkubiert, so betrug die Regenerationszeit bis zur Etablierung des Kopforanisators nur etwa 10 Stunden (Abb. 3.16 C). Die Expression von *kringelchen* im Kopfregerat nach 16 h korreliert also ungefähr mit dem Zeitpunkt, an dem der Kopforanisator etabliert ist.

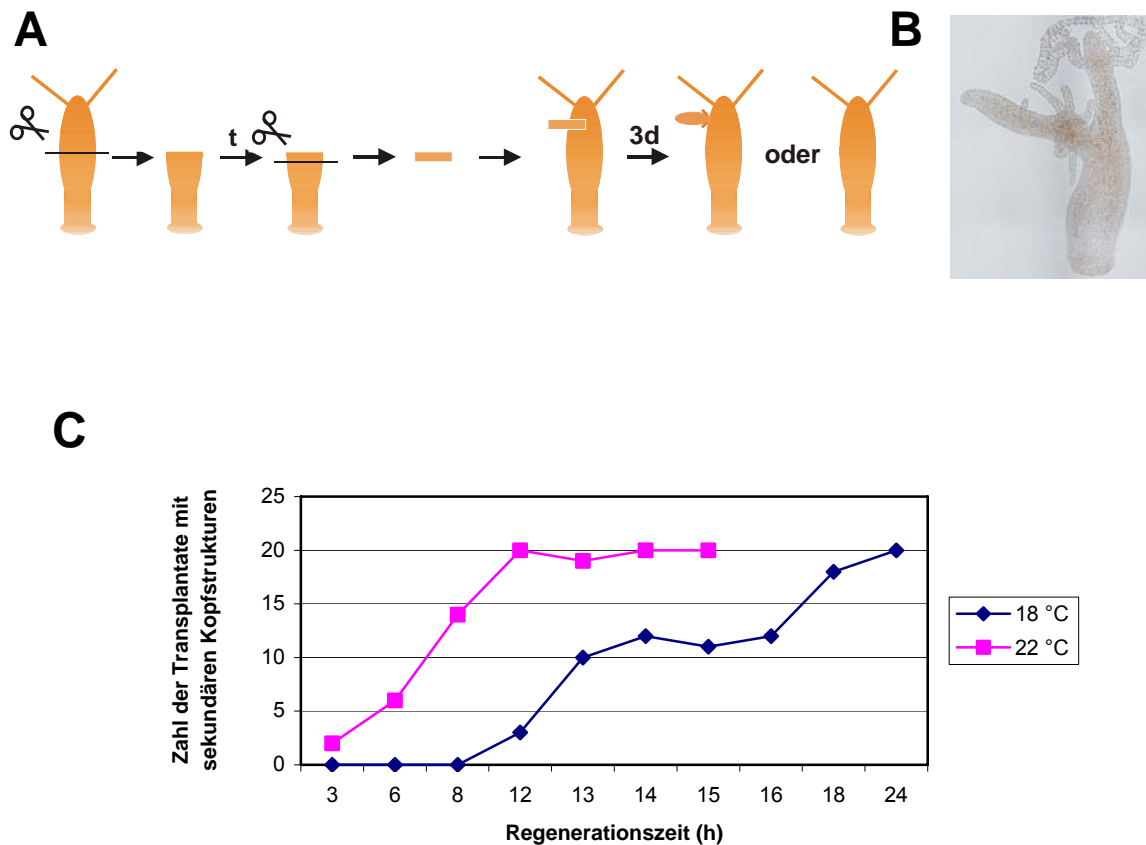


Abb. 3.16: Zeitverlauf zur Entwicklung des Kopforganisators in Kopfregeraten. (A) Schematische Darstellung des Transplantationsexperiments. t: Zeitpunkt nach der Dekapitation, an dem die regenerierende Spitze isoliert wurde, 3d: 3 Tage. (B) Polyp, bei dem durch Transplantation eine zweite Körperachse induziert wurde. (C) Zeitverlauf der Ausbildung des Kopforganisators. An den Empfängertieren, bei denen eine sekundäre Körperachse induziert wurde, bildeten sich sekundäre Kopfstrukturen aus. Pro Experiment wurden 20 Tiere verwendet.

3.2.8.2 *kringelchen* wird während der Fußregeneration transkribiert

Für die Regeneration eines Fußes benötigt *Hydra* weniger Zeit, als für die Kopfregeneration. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Fußregeneration bei einer Temperatur von 20 °C nach 24 bis 30 Stunden beendet ist (Mookerjee und Bhattacharjee, 1967; MacWilliams et al., 1970). Kriterium dafür ist die Fähigkeit des Polypen, sich wieder an ein Substrat festzuheften. Dieses Festheften wird durch Mukopolysaccharide erreicht, die in den ektodermalen Epithelzellen der Basalscheibe des Fußes produziert und sezerniert werden (MacWilliams et al., 1970). Die Anwesenheit von Bakterien oder Pilzen kann dieses Festheften allerdings verhindern oder zeitlich verzögern (Hoffmeister und Schaller, 1985). Die Beobachtung von Fußregeneraten zeigte, dass unter unseren Haltungsbedingungen bei 18°C mindestens 30 bis 32 Stunden nach Induktion der Regeneration verstreichen mussten, ehe ein Festhaften der Tiere am Substrat wieder möglich war. Die Fußscheibe schien zu

diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgeprägt zu sein, denn im Gegensatz zum adulten Fuß, der eine wulstige, basal abgeflachte Form besitzt, war der Fuß in Regeneraten nach dieser Zeit noch basal abgerundet. Um herauszufinden, wie lange die Fußregeneration unter unseren Hälterungsbedingungen dauert, wurde die Peroxidaseaktivität von Fußregeneraten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Halbieren der Tiere untersucht. Die reifen Mukopolysaccharid-produzierenden Epithelzellen der Basalscheibe besitzen eine starke Peroxidaseaktivität, die über eine Farbreaktion dargestellt werden kann (Hoffmeister und Schaller, 1985). Diese Peroxidaseaktivität ist ein Marker für die Differenzierung dieser Zellen, die nur in der Basalscheibe von Hydra vorkommen, und wird häufig benutzt, um das Wiederauftreten von fußspezifischen Zellen während der Regeneration zu verfolgen. Im Verlauf der Fußregeneration können Peroxidaseaktivität und Festhaften an das Substrat (durch sezernierte Mukopolysaccharide) nahezu zeitgleich nachgewiesen werden (Hoffmeister und Schaller, 1985).

Nachdem Polypen in zwei Hälften geschnitten worden waren, konnten die ersten Peroxidase-enthaltenden einzeln liegenden Zellen nach etwa 21 Stunden in der regenerierenden Fußregion nachgewiesen werden (Abb. 3.17 A). In den folgenden Stunden nahm die Anzahl solcher Zellen zu (Abb. 3.17 B,C). Nach etwa 30 Stunden waren die gefärbten Zellen in einem ringförmigen Areal am basalen Ende des regenerierenden Fußes angeordnet (Abb. 3.17 D). Zu diesem Zeitpunkt waren die ersten Regenerate in der Lage, sich am Untergrund festzuheften. Die Färbung verstärkte sich (Abb. 3.17 E), bis sie nach etwa 36 Stunden nahezu die gleiche Intensität aufwies, wie in ungeschnittenen Kontrolltieren (Abb. 3.17 F). Die Basalscheibe war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu ungeschnittenen Kontrolltieren vollständig ausgeprägt, die ektodermalen Fußepithelzellen zeigten ihre charakteristische säulenförmige Gestalt und gleichmäßige Anordnung (Abb. 3.17 F). Wie erwartet, war das Auftreten von Zellen mit Peroxidaseaktivität fußspezifisch und konnte im Zuge der Kopfregeneration nicht beobachtet werden.

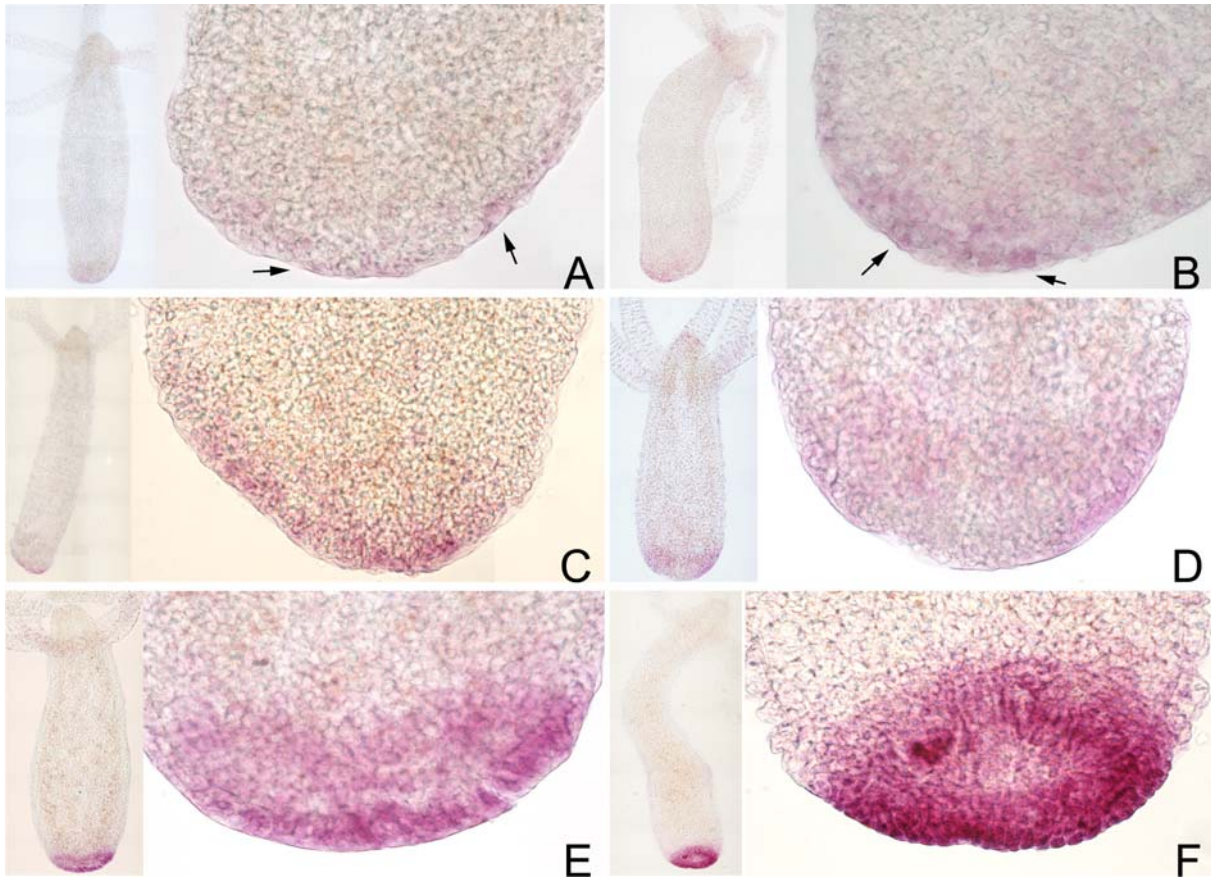


Abb. 3.17: Peroxidase-Färbung von Fußregeneraten. Peroxidase-Färbung ist ein Marker für ausdifferenzierte Zellen der Basalscheibe (Hoffmeister und Schaller, 1985). Mit dieser Methode kann während der Fußregeneration das Auftreten ausdifferenzierter Zellen verfolgt werden. (A) 21 Stunden, (B) 26 Stunden, (C) 28 Stunden, (D) 30 Stunden, (E) 32 Stunden, (F) 36 Stunden nach Induktion der Regeneration.

Um eine mögliche Beteiligung von *kringelchen* an der Fußregeneration zu untersuchen, wurden Polypen in zwei Hälften geschnitten. Über *in situ*-Hybridisierung wurde die Expression dieses Gens in Fußregeneraten über einen Zeitraum von 38 Stunden verfolgt. Wie bei den Kopfregeneraten war auch bei den Fußregeneraten eine scheinbare *kringelchen*-Expression nach einer Stunde detektierbar (Abb. 3.18 A). Doch auch dieses Signal kam durch Einrollen der Wundränder und Überlagerung des Ektoderms zustande. Eine Transkription von *kringelchen* wurde erst etwa 18 Stunden nach Amputation im Ento- und Ektoderm des regenerierenden Fußes detektierbar (Abb. 3.18 B). Dieser Zeitpunkt korrelierte ungefähr mit dem Auftreten der ersten Zellen mit Peroxidase-Aktivität (Abb. 3.17 A). Das *kringelchen*-Signal verstärkte sich und erreichte nach ca. 24 Stunden seine maximale Ausprägung (Abb. 3.18 C, D). Nach 28 Stunden konnte *kringelchen*-RNA vor allem im Ektoderm nachgewiesen werden, das Signal hatte an Intensität verloren (Abb. 3.18 E). Zu diesem Zeitpunkt begann sich die vormals abgerundete Regenerationsstelle (Abb. 3.18 B-D) umzugestalten und näherte sich in ihrer Form der wulstigen, basal abgeflachten Gestalt der ausdifferenzierten Basalscheibe (Abb. 3.18 E) an. Nach etwa 30 Stunden hatte sich die

Basalscheibe abgeflacht, *kringelchen* wurde ektodermal in der Peripherie des sich bildenden Fußes exprimiert (Abb. 3.18 F). Diese ektodermale Expression war nach 34 Stunden verschwunden, *kringelchen*-RNA konnte nur noch in einem fleckenförmigen Areal im Entoderm der bereits abgeflachten Basalscheibe nachgewiesen werden (Abb. 3.18 G). Die ektodermalen Epithelzellen hatten zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Säulenform angenommen, die bei Hydra für Zellen der Basalscheibe charakteristisch ist. Erst nach etwa 38 Stunden war die Basalscheibe morphologisch mit der von intakten Tieren vergleichbar, die ektodermalen, Mukopolysaccharid-produzierenden Zellen besaßen eine säulenförmige Gestalt und waren in der Basalscheibe gleichmäßig angeordnet. *kringelchen* wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr exprimiert (Abb. 3.18 H).

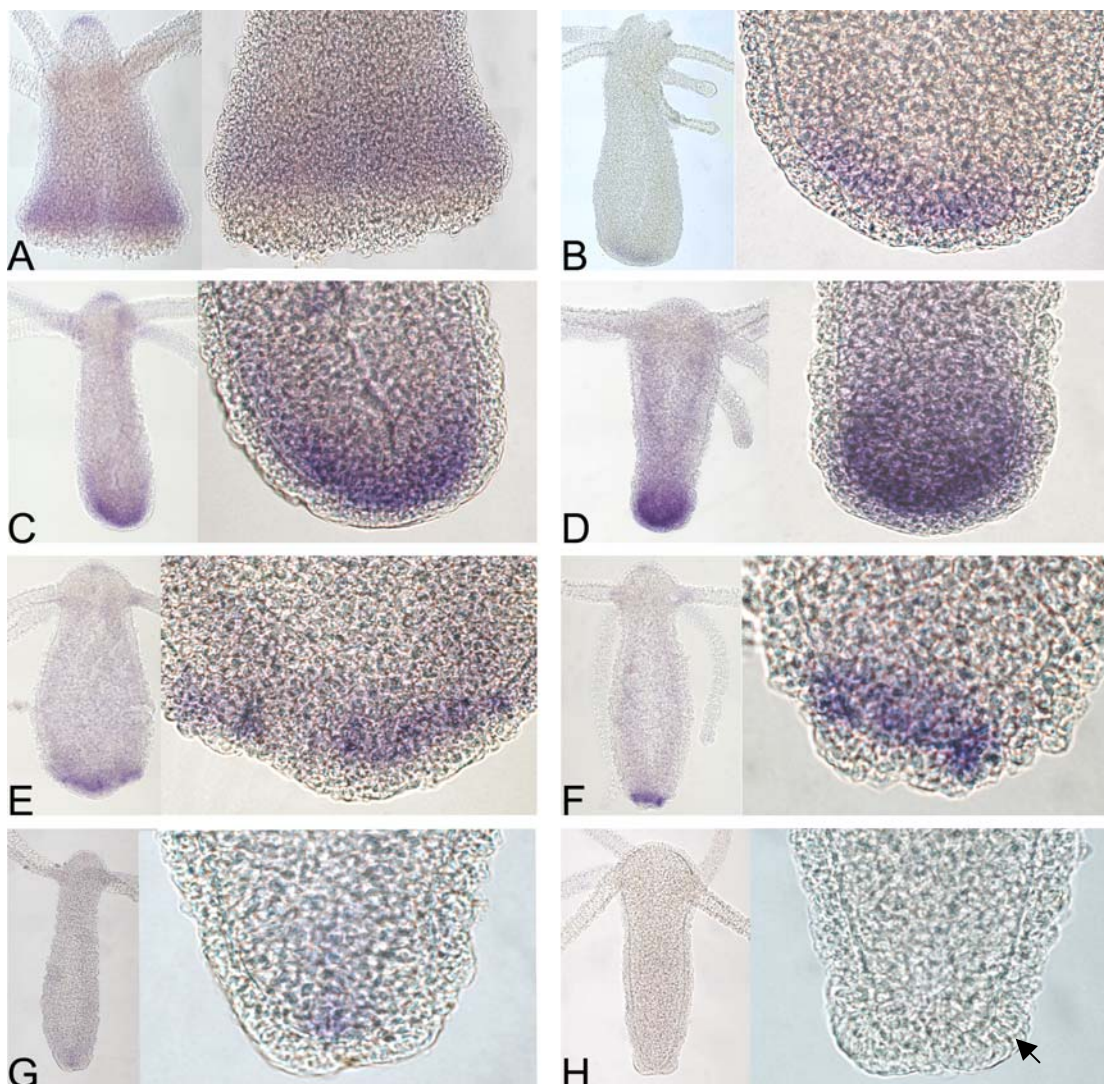


Abb. 3.18: Expression von *kringelchen* während der Fußregeneration. Die *kringelchen*-Expression wurde im Verlauf der Fußregeneration mittels *in situ*-Hybridisierung verfolgt. (A) 1 Stunde, (B) 18 Stunden, (C) 22 Stunden, (D) 24 Stunden, (E) 28 Stunden, (F) 30 Stunden, (G) 34 Stunden, (H) 38 Stunden nach Induktion der Regeneration, es sind säulenförmige Zellen in gleichmäßiger Anordnung erkennbar (Pfeil), wie sie für die ausdifferenzierte Basalscheibe charakteristisch sind.

3.2.8.3 *kringelchen* wird nicht durch Wundheilung induziert

Sowohl in Kopf- als auch in Fußregeneraten wurde etwa eine Stunde nach Amputation ein schwaches *kringelchen*-Signal detektiert, das etwa drei Stunden später, nachdem die Wunde verschlossen war, wieder verschwand (Abb. 3.15 A, Abb. 3.18 A). Da sich das Ektoderm früh immer einrollt und dadurch eine Überlagerung zustande kommt, bestand die Möglichkeit, dass diese Signale nicht auf eine transkriptionelle Aktivierung von *kringelchen* zurückzuführen waren. In einem Kontrollexperiment wurden daher Polypen im Rumpfbereich Verletzungen durch Schnitte zugefügt. Bis zum Zeitpunkt des Wundverschlusses nach etwa vier Stunden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Tiere fixiert und mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. *kringelchen* wurde zu keinem Zeitpunkt im Bereich der Wunde exprimiert (Abb. 3.19), was darauf hindeutet, dass das Gen bei Hydra nicht in Wundheilungsprozesse involviert ist und der Eindruck einer frühen Expression in Regeneraten durch ein Artefakt entstanden war.

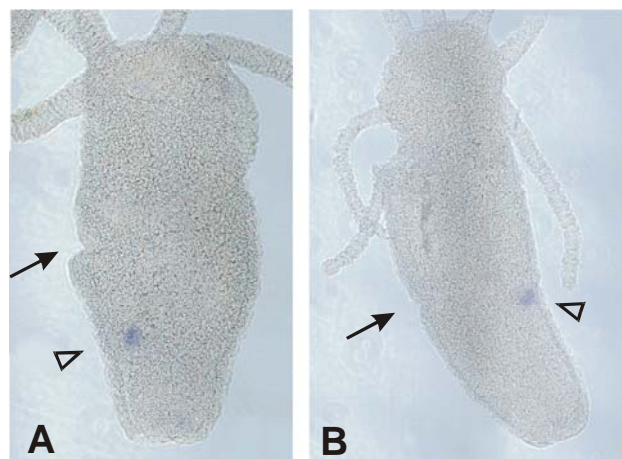


Abb. 3.19: Expression von *kringelchen* während der Wundheilung. Die Tiere wurden mit einem Skalpell im Rumpfbereich verletzt und einer *in situ*-Hybridisierung mit *kringelchen*-Antisense-Probe unterzogen. Der Pfeil markiert die Wunde, der offene Pfeil kennzeichnet die Ablösestelle einer Knospe, an der *kringelchen* exprimiert wird (siehe 3.2.4). (A) 2 Stunden nach Verwundung. (B) 4 Stunden nach Verwundung.

3.2.8.4 Die *kringelchen*-Expression wird bei der Regeneration von Hydragewebe aus Einzelzellen dynamisch reguliert

Hydra kann nicht nur fehlende Körperteile regenerieren. Auch aus dissoziierten Einzelzellen von Hydra, die sich zu einem Aggregat zusammenfinden, entstehen nach einigen Tagen wieder intakte Polypen (Noda, 1971). Die Morphogenese erfolgt *de novo*: Die Zellen müssen sich umorganisieren und sortieren, wobei durch Trennung von ektodermalen und entodermalen Zellen eine zweischichtige Hohlkugel entsteht. An diesem frühen Aggregat müssen Achsen neugebildet werden, an denen sich später Kopf- und Fußstrukturen

ausbilden können (Gierer et al., 1972) (siehe 2.2.2.3). Während der Entwicklung solcher Einzelzellaggregate können also frühe Musterbildungsprozesse, die in die Ausbildung neuer Körperachsen involviert sind, analysiert werden. Dies ist während der Regeneration von Kopf- oder Fußstrukturen nicht möglich, da bei solchen Regeneraten die ursprüngliche Körperachse erhalten bleibt (siehe 2.2.2.2).

Die *kringelchen*-Expression an der Spitze der auswachsenden Knospe (siehe 3.2.4) und an der regenerierenden Körperachse im Zuge der Regeneration (siehe 3.2.8) deutete auf eine Beteiligung des Gens am Auswachsen einer Körperachse bzw. der Determinierung der Körperenden hin. Eine Inhibition durch SU5402 hatte auf diese Prozesse allerdings keinen Effekt. Die Analyse von *kringelchen*-Transkripten während der Entwicklung von Einzelzellaggregaten sollte zeigen, ob *kringelchen* auch bei der Neubildung von Achsen exprimiert wird. In diesem System konnte allerdings SU5402 nicht verwendet werden, da die Aggregate zerfielen, sobald sie mit dem Inhibitor behandelt wurden.

Zur Herstellung von Aggregaten wurden Polypen durch mechanische Dissoziation in Einzelzellen zerlegt. Aufgrund von amöboider Zellbewegung und selektiver Zelladhäsion (Sato et al., 1992) bildeten sich zunächst kleine Zellklumpen, die nach etwa 12 Stunden zu einem Aggregat zusammenfanden. Da die frühen Einzelzellaggregate einen relativ losen Zellverband darstellen, konnten *in situ*-Hybridisierungen in den frühen Phasen der Aggregation nicht durchgeführt werden. Eine mögliche Beteiligung von *kringelchen* an den Umorganisations- und Aussortierungsprozessen von Zellen, wie sie während der frühen Aggregation ablaufen, konnte daher leider nicht untersucht werden. Die kompakten Aggregate bildeten nach etwa 24 Stunden eine Hohlkugel, die von Entoderm und Ektoderm umgeben war. In dieser Hohlkugel wurde *kringelchen* zunächst ubiquitär schwach, aber deutlich nachweisbar, exprimiert (Abb. 3.20 A). Kurze Zeit später konzentrierte sich die Expression auf zufällig über das Aggregat verteilte kleine Flecken (Abb. 3.20 B), von denen nur einige transkriptionell hochaktive Zentren bestehen blieben (Abb. 3.20 C-D). An den Stellen, an denen nach etwa 42 bis 48 Stunden Gewebeausstülpungen entstanden, wurde *kringelchen* stark exprimiert (Abb. 3.20 C-D). Diese Ausstülpungen deuteten auf das Auswachsen von Körperachsen hin, an denen sich nach etwa 90 Stunden erste differenzierte Strukturen zeigten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression schwächer, es entstanden Reihen und Ringe von exprimierenden Zellen, die die sich differenzierenden Strukturen vom übrigen Gewebe abgrenzten (Abb. 3.20 E, F). Auffällig war, dass anders als bei allen vorangegangenen Experimenten eine Expression von *kringelchen* auch in den Tentakel detektiert wurde (Abb. 3.20 E, F). Eine Ablösung einzelner Polypen erfolgte nach sechs Tagen, nach sieben bis acht Tagen hatten sich die Polypen voneinander getrennt. Noch vor der Trennung, war die Expression von *kringelchen* in den differenzierten Strukturen und im Rumpfbereich nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.20 G).

Aus einem Aggregat entstanden, je nach Größe, zwei bis sechs Polypen. Die Entwicklungsgeschwindigkeit der Aggregate war dabei stark von ihrer jeweiligen Größe abhängig: Kleinere entwickelten sich schneller als größere. Aus diesem Grund können die Zeitangaben nur als ungefähre Werte angesehen werden.

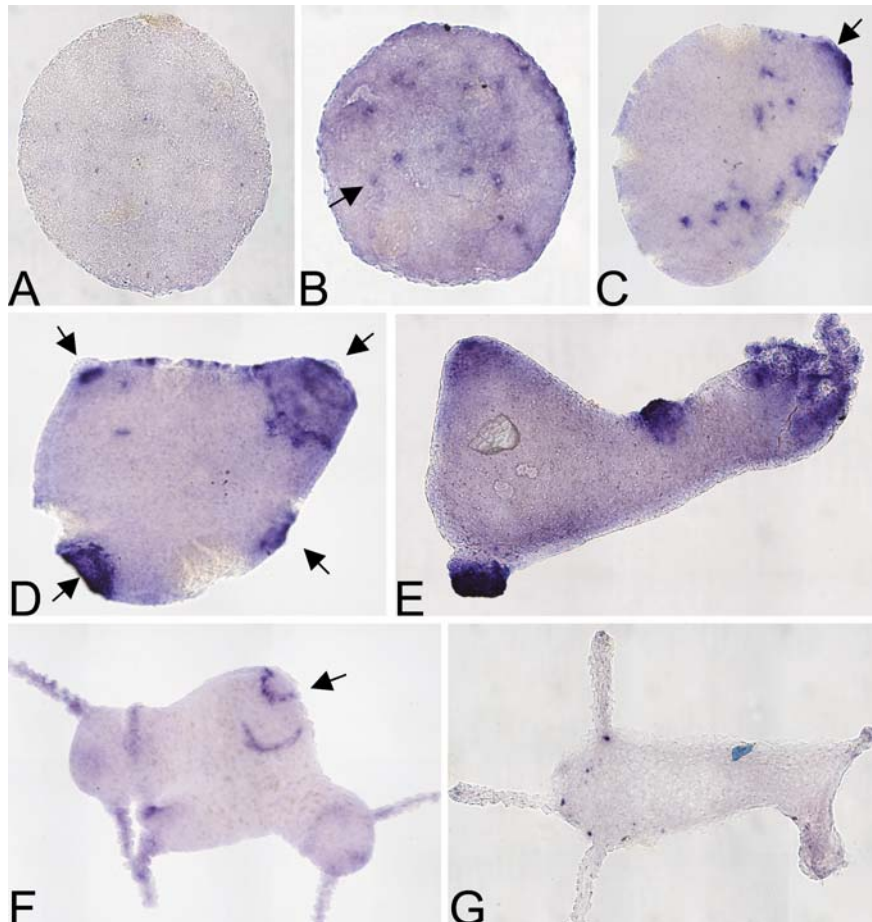


Abb. 3.20: Expression von *kringelchen* während der Entwicklung von Zellaggregaten. Dissoziierte Hydrazelle können zu Zellhaufen aggregieren, aus denen sich Polypen regenerieren. Während dieses Vorganges wurde die Expression von *kringelchen* über *in situ*-Hybridisierung verfolgt. Die Entwicklungskinetik von solchen Aggregaten ist stark von ihrer Größe abhängig, daher wird auf exakte Zeitangaben verzichtet. (A) Hohlkugel mit diffuser Expression von *kringelchen* (nach etwa 24 h). (B) Hohlkugel mit punktförmigen Expressionsdomänen (Pfeil) nach etwa 36 h. (C-D) Beginnende Gewebeausstülpung (Pfeil) nach etwa 42 h und konzentrierte *kringelchen*-Expression. (E) In den sich bildenden Kopf- und Fußstrukturen (Pfeil) wurde *kringelchen* exprimiert (nach etwa 90 h). (F) *kringelchen* wurde in linien- oder ringförmigen Mustern (Pfeil) exprimiert (nach etwa 100 h). (G) Im ausgebildeten Kopf und Fuß wird *kringelchen* nicht mehr exprimiert.

3.2.9 Analyse des Kringelchen-Proteins in Hydra

In den oben beschriebenen Experimenten wurde die Expression von *kringelchen* in verschiedenen Musterbildungsprozessen bei Hydra im Detail untersucht. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit sich die Expressionsmuster mit der Lokalisation des Proteins decken.

3.2.9.1 Über polyklonale Antiseren war kein Nachweis des Rezeptors möglich

Die Detektion von Kringelchen in Hydra sollte über polyklonale Antiseren erfolgen. Zur Herstellung dieser Antiseren wurden mehrere, voneinander unabhängige Strategien verfolgt: Es sollten a) Peptidantikörper gegen ausgewählte Kringelchen-Sequenzen und b) Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit heterolog exprimierten Kringelchen-Proteinen hergestellt werden.

Für den ersten Ansatz wurden zwei 12 bis 13 Aminosäuren lange Peptide konzipiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Sigma-Genosys). Beide Peptidsequenzen wurden mit Hilfe des HUSAR-Software Pakets auf ihre Antigenizität überprüft.

Die Peptidsequenz Kring-LII entstammt dem C-terminalen Bereich der Ig-ähnlichen Schleife D2 (AA 179-192) (Abb. 3.21). Diese Sequenz wurde ausgewählt, da sie zum einen hydrophil und somit im gefalteten Protein wahrscheinlich an der Oberfläche lokalisiert ist, so dass die Möglichkeit besteht, dass Antikörper gegen diese Region auch den nativen Rezeptor erkennen. Das zweite Argument für die Auswahl dieser Sequenz war, dass die C-terminale Region von D2 in Wirbeltier-FGF-Rezeptoren an der Ligandenbindung beteiligt ist (siehe 2.1.1). Gegen diese Region gerichtete Antikörper wären im Idealfall also nicht nur in der Lage, den Rezeptor zu lokalisieren, sondern könnten gleichzeitig die vermutete Ligandenbindestelle blockieren und eventuell so *in vivo* Kringelchen-vermittelte Signalwege inhibieren.

Das zweite Peptid (C-Term) entsprach dem C-Terminus des Rezeptors (AA 797 – 807) (Abb. 3.21). Der C-Terminus von Proteinen ist im allgemeinen für die Herstellung von Peptid-Antiseren, die auch das native Protein erkennen sollen, gut geeignet, da er häufig an der Oberfläche des Proteins exponiert und sehr flexibel ist (Halow, 1988).

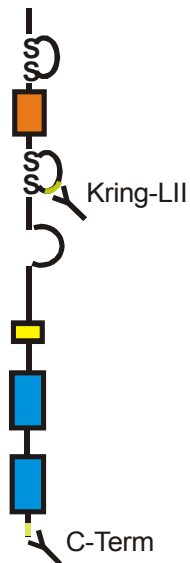


Abb. 3.21: Ausgewählte Peptidsequenzen zur Antikörperherstellung.

Für erste Tests wurden aus beiden Antisera über Affinitätschromatographie die Kringelchen-spezifischen Antikörper aufgereinigt. Die gegen das Peptid Kring-LII gerichteten Antikörper detektierten im Western Blot die bakteriell exprimierte extrazelluläre Domäne von Kringelchen (Abb. 3.22 A). Da die Regeneration von Kopf- und Fußstrukturen *kringelchen* transkriptionell aktivieren (siehe 3.2.8), wurden zur Detektion von Kringelchen in Hydra Western Blots verwendet, auf denen Proteinextrakte aus Hydra-Regeneraten aufgetrennt worden waren. Die Antikörper gegen Kring-LII detektierten auf diesen Blots ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa, was in etwa der anhand der Nukleinsäuresequenz prognostizierten Größe von 93,4 kDa entspricht (Abb. 3.22 B). Diese Ergebnisse konnten allerdings nach dem Laborumzug von Heidelberg nach Marburg nicht reproduziert werden.

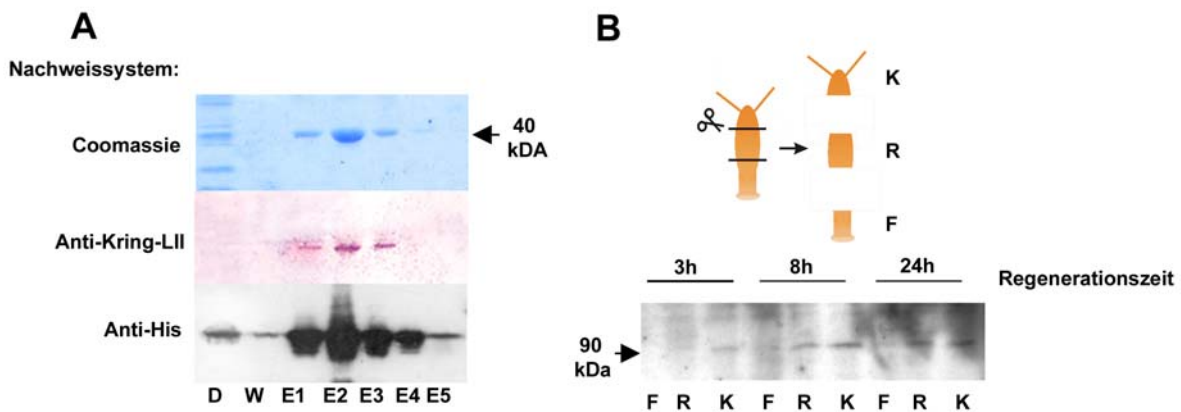


Abb. 3.22: Nachweis von Kringelchen über polyklonale Antikörper. (A) Heterolog exprimiertes Kringelchen-Protein wurde von Anti-Kring-LII erkannt. Die extrazelluläre Domäne von Kringelchen wurde als Fusionsprotein mit His-Tag prokaryontisch exprimiert und auf einem 12,5%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Eine Coomassie-Färbung detektierte dieses Protein bei etwa 40 kDa im Gel. Die Proteine wurden durch Blotten auf Nitrocellulosemembran übertragen. Sowohl ein Anti-His-Antikörper (1: 2000 verdünnt) als auch die aus dem Anti-Kring-LII über Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörper (1:500 verdünnt) detektierten das Protein. D: Säulendurchlauf, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktion. (B) Anti-Kring-LII detektierte ein Protein in Hydra. Polypen wurden gedrittelt, nach 3, 8 und 24 Stunden wurde das Gesamt-Protein der regenerierenden Hydra-Fragmente gewonnen, in einem 12,5%-igen PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. Die aus dem Anti-Kring-LII aufgereinigten Antikörper detektierten ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa. Dies entspricht der prognostizierten Größe von Kringelchen nach Abspaltung des Signalpeptids.

Die gegen den C-Terminus von Kringelchen generierten Antikörper waren in Western Blot-Analysen weder in der Lage, die prokaryontisch-exprimierte intrazelluläre Domäne des Rezeptors zu detektieren, noch ein Protein im Hydra-Extrakt zu erkennen.

Für den zweiten Ansatz zur Herstellung von Antiseren wurde heterolog exprimiertes Kringelchen-Protein zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Dazu sollte Kringelchen zunächst im Baculo-Expressionssystem (GIBCO) hergestellt werden. Dieser Ansatz wurde aufgegeben, da die verwendeten SF9-Zellen nach Infektion mit dem *kringelchen*-enthaltenden Viruspartikeln abstarben, so dass kein Protein isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Für eine prokaryontische Expression wurden jeweils die extrazelluläre und die intrazelluläre Domäne von *kringelchen* in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) kloniert und in *E.coli* M15-Zellen (Qiagen) exprimiert. Beide Proteine waren mit einem His-Tag versehen. Sie wurden über eine Nickel-Säule aufgereinigt und auf ein präparatives SDS-Gel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, homogenisiert und nach Zugabe von Adjuvans zur Immunisierung der Kaninchen verwendet. Die gewonnenen Seren konnten erst nach dem Umzug des Labors in Marburg getestet werden. Sie waren im Western Blot nicht in der Lage, die jeweilige, prokaryontisch-exprimierte Kringelchen-Domäne

reproduzierbar zu detektieren. Auch immunhistologische Experimente zum Nachweis von Kringelchen im Tier schlugen fehl.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Peptidantiseren, ebenso wie Seren, die durch Immunisierung mit den prokaryontisch-exprimierten Rezeptordomänen erzeugt worden waren, durch den Laborumzug von Heidelberg nach Marburg Schaden genommen haben.

3.2.9.2 Die Bindung von biotinyliertem Wirbeltier-FGF an Hydragewebe erzeugt Muster, die mit den Expressionsdomänen von Kringelchen überlappen

Für eine alternative Strategie zur Lokalisation von Kringelchen in Hydra wurde ein Versuchsansatz zur Bindung von markiertem FGF an Hydragewebe entwickelt. Hierbei sollte der Rezeptor indirekt durch die Bindung von markiertem Liganden nachgewiesen werden. Dieser Ansatz kann nur funktionieren, wenn Kringelchen in der Lage ist, ein FGF zu binden. Dies war nicht zuletzt durch die - im Vergleich zu anderen FGFR - außergewöhnliche Ausbildung der für die Ligandenbindung essentiellen Ig-ähnlichen Schleife D3 (siehe 3.2.1) ungewiss.

Für die FGF-Bindung an Hydragewebe wurde Maus-aFGF ausgewählt, das aus Zellkulturüberständen von Cos-Zellen gewonnen (Jaye et al., 1988) und von F. Coulier (INSERM, Marseille) zur Verfügung gestellt worden war. aFGF ist in der Lage, an alle bekannten Wirbeltier-FGF-Rezeptor-Varianten zu binden (Burke et al., 1998). Um aFGF später im Gewebe detektieren zu können, wurde es mit Biotin markiert. Heterologe Bindungsassays gibt es bislang nicht.

Für eine Bindung dieses markierten Proteins an Hydragewebe musste zunächst ein Versuchsansatz etabliert werden, der eine ausreichende Permeabilisierung des Gewebes ermöglichte, da Kringelchen wahrscheinlich an den basalen und lateralen Membranabschnitten der Epithelzellen lokalisiert ist, die Kontakt zum interstitiellen Raum besitzen. Außerdem musste das Nachweissystem dahingehend optimiert werden, dass eine weitgehend Hintergrund-freie Detektion von gebundenem aFGF möglich wurde. Dies erwies sich zunächst als schwierig, da Hydra unspezifische Bindestellen für Streptavidin besitzt. In einem Gesamt-Proteinextrakt konnten vier Proteine im Größenbereich von etwa 100 bzw. 150 kDa identifiziert werden, die mit Streptavidin interagieren (Abb. 3.23). Auch ein Anti-Biotin-Antikörper erwies sich wegen einer starken Hintergrundfärbung für den Nachweis von gebundenen, biotinylierten aFGF als ungeeignet. Erst nach Austesten verschiedener Blockierungsmethoden konnte durch spezifisches Absättigen mit ungekoppeltem Streptavidin ein nahezu Hintergrund-freier Nachweis von gebundenem aFGF über an alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin (Streptavidin-AP) erfolgen.

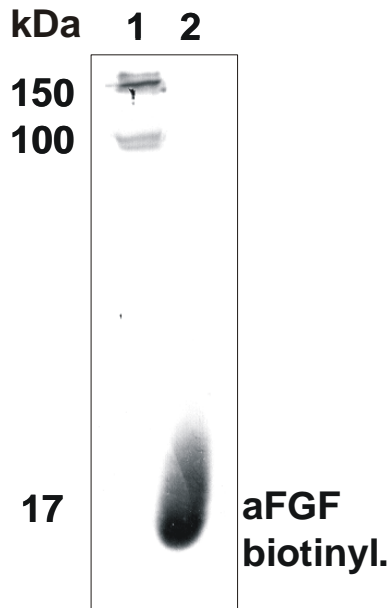


Abb. 3.23: Nachweis von Streptavidinbindestellen in Hydra.

In Spur 1 wurde ein Gesamtproteinextrakt von *H. vulgaris* auf einem 12,5%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Blotten auf Nitrocellulosemembran übertragen. Nach Inkubation mit Streptavidin-AP und anschließender Farbreaktion konnten vier Proteine detektiert werden. In Spur 2 war biotinyliertes aFGF aufgetragen worden, das erwartungsgemäß bei etwa 17 kDa nachgewiesen wurde.

Es wurde schließlich unter meiner Betreuung von Annedore Jungwirth (Staatsexamen) eine Versuchsanordnung entwickelt (siehe 5.2.2.7), in der die Polypen zur Auflockerung des Zellverbandes zunächst mit speziellem Dissoziations-Medium (Gierer et al., 1972) vorbehandelt wurden. Die Inkubation mit dem markierten aFGF erfolgte in einem mit Heparin und DMSO angereicherten Dissoziations-Medium. Heparin wurde zugefügt, da bei Vertebraten eine Bindung von FGF an den Rezeptor unter Beteiligung von Heparin oder Heparansulfat erleichtert erfolgt (siehe 2.1.5), DMSO diente der zusätzlichen Permeabilisierung des Hydragewebes (Fraser et al., 1987; Bolzer et al., 1994). Im Anschluss daran wurden endogene Streptavidinbindestellen durch Inkubation mit Streptavidin abgesättigt. Nach mehreren Waschschrritten wurde gebundenes aFGF durch „Crosslinking“ mit dem Hydragewebe vernetzt, der Nachweis des biotinylierten aFGF erfolgte mittels Streptavidin, das an eine alkalische Phosphatase gekoppelt war.

Über diese Versuchsanordnung war es möglich eine Bindung von aFGF an Hydragewebe nachzuweisen (Abb. 3.24). Die Bindungsmuster von aFGF überlappten in einigen Knospungsstadien mit den Expressionsdomänen von *kringelchen*. Wie unten gezeigt, war *kringelchen* zu Beginn der Knospung in Stadium 3 in der auswachsenden Knospe transkriptionell aktiv (Abb. 3.24 C). Ein der *in situ*-Hybridisierung ähnliches Muster wurde durch aFGF-„Crosslinking“ in der Knospungsregion erzeugt (Abb. 3.24 A,B). Im weiteren Verlauf der Knospung konzentrierte sich die Expressionsdomäne von *kringelchen* auf die Knospenspitze, wobei sich das Areal exprimierender Zellen von Knospens Stadium 3 zu Stadium 5 deutlich verkleinerte (Abb. 3.24 F). Ähnlich verhielt sich das durch aFGF-Bindung erzeugte Muster: In Stadium 5 wurde aFGF in einem fleckenförmigen Areal in der auswachsenden Knospe nachgewiesen (Abb. 3.24 D,E), das sich im weiteren Verlauf an der Spitze konzentrierte. An der Basis der sich entwickelnden Knospe, wo ab dem Stadium 5 eine Expression von *kringelchen* detektierbar war, konnte eine Bindung von aFGF in keinem

Fall nachgewiesen werden. Bei der Negativkontrolle, die ohne biotinyliertes aFGF durchgeführt worden war, trat keine Färbung auf. Ringförmige aFGF-Bindungsmuster in der unteren Knospenregion von knospenlosen Polypen (Abb. 3.24 G-I) ähnelten stark den *kringelchen*-Expressionsdomänen, die in Elterpolypen an den Stellen auftraten, an denen sich Knospen abgelöst hatten (Abb. 3.24 J).

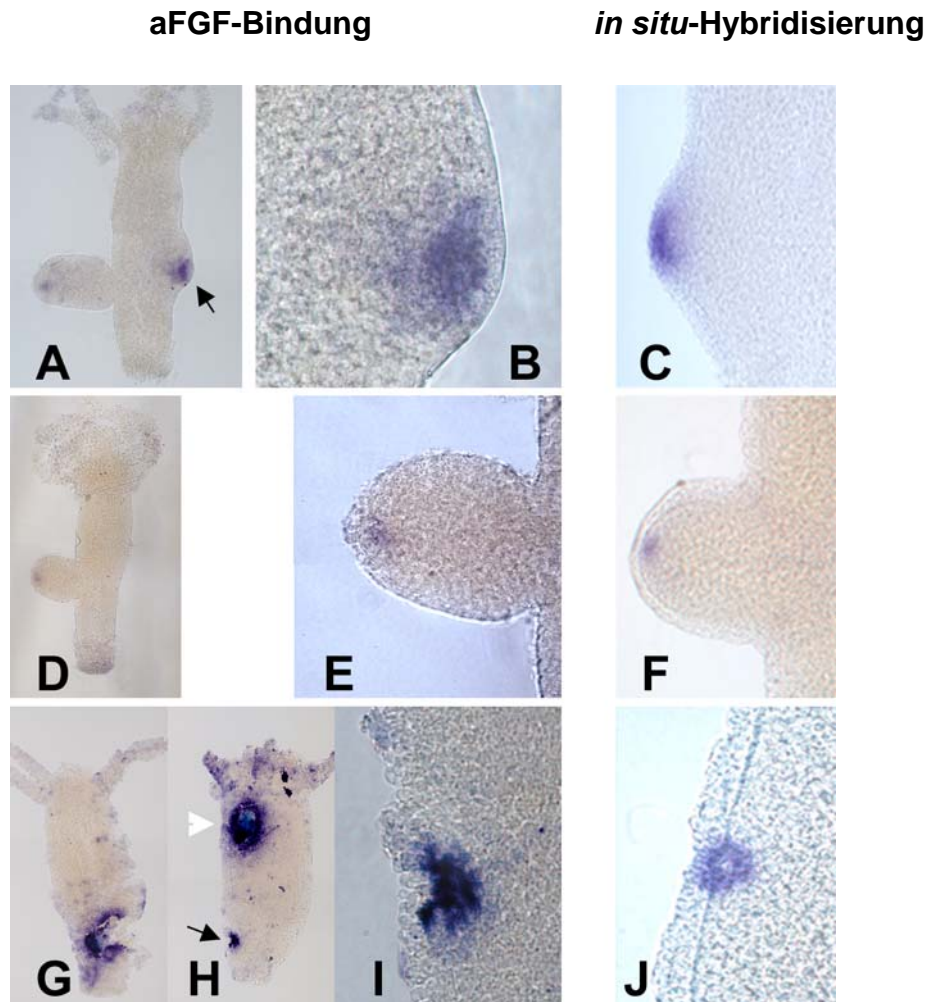


Abb. 3.24: *In vivo*-Bindung von biotinyliertem aFGF an Hydragewebe. (A - C) Stadium 3. (A) aFGF-Bindung an der frühen Knospenspitze. (B) Nahaufnahme von A. (C) *in situ*-Hybridisierung mit *kringelchen*-Antisense-RNA. (D - F) Stadium 4-5. (D) aFGF-Bindung an der Knospenspitze. (E) Nahaufnahme. (F) *In situ*-Hybridisierung mit *kringelchen*-Antisense-RNA. (G - J) Ablösestellen im Eltertier (G,H) Mögliche Ablösestellen nach der Bindung von aFGF. Die starke Färbung des Polypen in H unterhalb des Kopfes (weißer Pfeil) stellt ein Artefakt dar. (I) Nahaufnahme der Knospenablösestelle aus H. (J) Ablösestelle in der *in situ*-Hybridisierung mit *kringelchen*-Antisense-RNA. Abb. G-I stammen aus der Staatsexamensarbeit von A. Jungwirth (2001).

Dieses Experiment zeigte zum einen, dass Hydragewebe in der Lage ist aFGF zu binden. Zum anderen gab die partielle Korrelation der aFGF-Bindungsmuster mit den Expressionsdomänen von *kringelchen* während der Knospung einen guten Hinweis darauf, dass es zu einer Interaktion von aFGF mit Kringelchen kommt.

Um diese Ergebnisse abzusichern, sollte der Bindungsassay mit prokaryontisch exprimierten bFGF, das wie aFGF eine hohe Affinität zu verschiedenen FGF-Rezeptor-Isoformen besitzt (Powers et al., 2000), sowie zwei bakteriell-exprimierten FGF-ähnlichen Proteinen aus der Koralle *Acropora* wiederholt werden. Die beiden im EST-Projekt von *Acropora* identifizierten Sequenzen (*Ach2* und *AcY601*) wurden uns als Klone von D. Miller, Townsville (Australien) zur Verfügung gestellt. Sie waren die ersten, aus diploblastischen Organismen isolierten Transkripte, die signifikante Ähnlichkeit zu der Core-Region von FGF (siehe 2.1.3) aufweisen. Aufgrund der engen Verwandtschaft von *Acropora* und Hydra lag die Vermutung nahe, dass die *Acropora*-FGF denen in Hydra ähnlicher sind als die Liganden der Vertebraten und mit größerer Wahrscheinlichkeit an Kringelchen binden.

Die Expression von bFGF, AcY601 und Ach2 erfolgte nach Klonierung der jeweiligen Sequenzen in dem Expressionsvektor pQE-30 in *E.coli*-M15-Zellen (beides Qiagen). Die Proteine wurden anschließend aufkonzentriert und zum späteren Nachweis mit Biotin markiert. Hierbei ergab sich das Problem, dass diese Proteine aufgrund ihrer basischen Eigenschaften (bFGF: pKa= 11,76; AcY601: pKa= 9,81 ; Ach2: pKa= 10,11) in Lösungen mit neutralem pH-Wert ausfielen. Die Protokolle für Aufreinigung und Biotinylierung mussten daher für eine erfolgreiche Biotin-Markierung von bFGF, AcY601 und Ach2 modifiziert werden (siehe 5.2.2.7.1).

Im Bindungstest konnte weder für bFGF noch für die *Acropora*-FGF eine Bindung an Hydragewebe nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den erfolgreichen Experimenten zur Bindung von aFGF an Hydra wurde im Falle von bFGF, AcY601 und Ach2 das Protokoll in zwei Punkten variiert: Erstens wurden die Proteine in Bakterien exprimiert, während das verwendete aFGF aus dem Zellkulturüberstand von Cos-Zellen aufgereinigt worden war, also aus einem eukaryontischen System stammte. Es besteht die Möglichkeit, dass die Faltung der bakteriell exprimierten Liganden nicht korrekt verlaufen ist und dadurch eine Bindung an Kringelchen nicht möglich war. Um dies zu überprüfen sollen in Zukunft die in Bakterien exprimierten Liganden in Zellkultur auf PC12-Zellen getestet werden, bevor weitere Bindungsassays an Hydra durchgeführt werden. Bei den PC12-Zellen handelt es sich um eine neurale Zelllinie, bei der durch Stimulation mit bestimmten Wachstumsfaktoren, z.B. FGF, das Auswachsen von Dendriten induziert werden kann. Es ist bekannt, dass prokaryontisch exprimiertes bFGF diesen Effekt induzieren kann (Kroither et al., 1995).

Eine zweite Abweichung vom Protokoll liegt in den veränderten Hälterungsbedingungen der Versuchstiere. Zur Herstellung des Hydramediums wurde in Heidelberg, wo die aFGF-

Bindung durchgeführt wurde, Quellwasser benutzt, während in Marburg doppeldestilliertes Wasser als Basis für das Kulturmedium verwendet wird. Es stellte sich heraus, dass das Gewebe der Hydren, die in Medium aus doppeldestilliertem Wasser gehalten wurden, durch Inkubation mit Dissoziations-Medium, DMSO oder dem *Crosslinking*-Reagenz im Vergleich zu den in Quellwasser-Medium gehaltenen Tieren weniger stark permeabilisiert wurde. Erneuten Bindungsversuchen muss daher eine erneute Optimierung der Gewebepерmeabilisierung vorausgehen.

3.2.10 Isolierung eines FGF aus *Hydra vulgaris*

Die Struktur von Kringelchen weicht im Bereich der dritten Ig-ähnlichen Schleife von den Rezeptoren der Vertebraten ab: Die dort lokalisierten Cysteinreste, über die bei den meisten untersuchten Metazoen die für die FGF-Bindung essentielle Schleife D3 ausgebildet wird, fehlen dem Hydra-Rezeptor (siehe 3.2.1). Sehr wahrscheinlich ist, dass eine solche Schleife alternativ durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgeprägt werden kann (siehe 3.2.1 und Burke und Blundell, Cambridge, persönliche Mitteilung). Damit wäre die Voraussetzung für eine Ligandenbindung gegeben. Auch die Ergebnisse des oben beschriebenen Versuchsansatzes zur Bindung von aFGF an Hydragewebe geben einen starken Hinweis darauf, dass Kringelchen FGF binden kann. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass auch bei Hydra FGF als Liganden für Kringelchen fungieren.

3.2.10.1 Über PCR konnte ein cDNA-Fragment aus *Hydra vulgaris* isoliert werden, das große Ähnlichkeit zur konservierten Core-Region von FGF besitzt

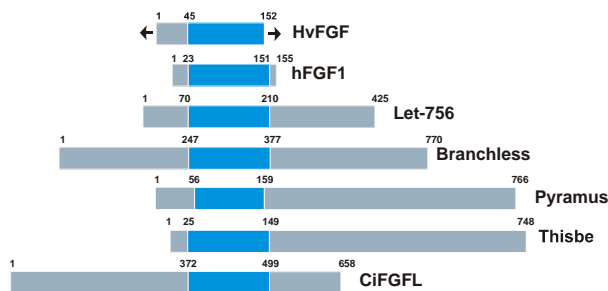
Die Familie der FGF ist durch eine konservierte Core-Region charakterisiert. Innerhalb einer Subfamilie ist diese Region hochkonserviert, zwischen den einzelnen Familien ist die Ähnlichkeit weit geringer (siehe 2.1.3). Bezieht man die FGF von Invertebraten in solche Vergleiche mit ein, so weicht die Core-Region stärker von der der Vertebraten ab, allerdings bleiben einige Charakteristika in fast allen Fällen unverändert (Abb. 3.25).

In einem ersten Versuch zur Isolierung von FGF aus *Hydra vulgaris* wurden Sequenz-Alignments der Core-Region von verschiedenen Vertebraten-FGF analysiert und gegen hochkonservierte Sequenzbereiche degenerierte Primer entworfen, die allerdings in der PCR nicht zur Amplifikation eines FGF-Fragmentes führten. Auch degenerierte Primer, die anhand von FGF-ähnlichen Sequenzen der Koralle *Acropora* isoliert worden waren, führten nicht zum Erfolg. Erst auf Basis einer FGF-ähnlichen Sequenz, die im EST-Projekt von *Hydra magnipapillata* detektiert worden war, konnten Primer entworfen werden, die aus einer

unserer cDNA-Bibliotheken von *Hydra vulgaris* ein DNA-Fragment amplifizierten, das Ähnlichkeit zur Core-Region von FGF aufweist (Abb. 3.25).

Abb. 3.25: Sequenz von HvFGF. (A) Schematischer Aufbau einiger FGF (modifiziert nach: Popovici et al., 2005). Die Core-Region ist in blau dargestellt. Die Pfeile deuten an, dass es sich bei HvFGF um ein partielles Fragment handelt, das sowohl am N- als auch am C-Terminus unvollständig ist. Aminosäurepositionen an Anfang und Ende von Core-Region und des Gesamtproteins sind durch Zahlen markiert. (B) Die bekannte Nukleinsäuresequenz von HvFGF. In der abgeleiteten Aminosäureabfolge ist die Core-Region grau markiert. (C) Sequenzvergleich der Core-Region von HvFGF mit der Core-Region von FGF verschiedener Organismen. Aminosäuren, die in irgendeinem Organismus identisch zu HvFGF sind, sind schwarz unterlegt, konserviert ausgetauschte Aminosäuren sind grau markiert. Aminosäurereste, die mit FGFR in Wechselwirkung treten, sind blau hervorgehoben, Interaktionsstellen mit Heparin rot. Folgende Bezeichnungen und *Accession numbers* wurden verwendet: HvFGF: *Hydra vulgaris* FGF-ähnliches Protein; hFGF1: humanes FGF1 (AAH32697); hFGF2: humanes FGF2 (NP001997); Branchless, Pyramus und Thisbe: *Drosophila melanogaster* FGF (AAC47427), (AAS90558) bzw. (AAS90559); LET756 und EGL17: *Caenorhabditis elegans* Let-756 und Egl-17 (NP490403) bzw. (AAD00574); DiFGFL, CiFGF3/7/10, CiFGF4/5/6, CiFGF8/17/18, CiFGF9/16/20, CiFGF11/12/13: *Ciona intestinalis* FGF with large molecular mass (NP 001027650), FGF3/7/10/22 (NP 001027763), FGF4/5/6 (NP 001027747), FGF8/17/18 (NP 001027648), FGF9/16/20 (NP 001027649), FGF11/12/13/14 (NP 001027733).

A



B

```

          CC
CAT GAT TTT ACG TTG CAA AAG GCA TGG AGC GCA ACT CAG AGA AAA CCT   50
H  D  F  T  L  Q  K  A  W  S  A  T  Q  R  K  P                               16
GAA AAA TAA GAA AAA CTT CAT AAA CCT ATA CTT ACA AAA GAA GTT AAT   98
E  K  N  E  K  L  H  K  P  I  L  T  K  E  V  N                               32
CTT ATT TTT GAT AAA TGG GGA AAC TGC AAG CTA GCA TTG TTG TAT TGT   146
L  I  F  D  K  W  G  N  C  K  L  A  L  L  Y  C                               48
CGA AAC GGT TTT TAC ATT CAT ATT AAA AGT AAC ATG GTG GTT GGG GTT   204
R  N  G  F  Y  I  D  I  K  S  N  M  V  V  G  V                               54
TCT TAT AAA AGT TTC ATA ACA AAT GAA ACA GGT TTA TTT CAA ATA GAA   252
S  Y  K  S  F  I  T  N  E  E  T  G  L  F  Q  I  E                               80
ACA TAT GGC AAA AGT TTT GTT ATG TTA AAG CAT GTA GAA TCA AAT AAC   300
T  Y  G  K  S  F  V  M  L  K  H  V  E  S  N  N                               96
TAT ATT GCG ATG AAT AAT GAA GGA AAA CTG CAC GCG TTG GAA ACA AAG   348
Y  I  A  M  N  N  E  G  K  L  H  A  L  E  T  K                               112
ACG GAC GAA TGT TTA TTC TAT TAT TAT CTG GAG AAA GGA GAA TAC GCA   396
T  D  E  C  L  F  Y  Y  Y  L  E  K  G  E  Y  A                               128
ACT TTT TCT TCA GCA AAA TAT TTT GTT AAC GAT TAT TAC GAT TTG TAC   444
T  F  S  S  A  K  Y  F  V  N  D  Y  Y  D  L  Y                               144
ATA AGT TTA AGA ATC ACG GGA AAA                                       468
I  S  L  R  I  T  G  K                                       152
    
```

C

```

HvFGF      L Y C R N ----- G T Y I D I K S N ----- H W G G S Y K S F I T W E T G L F Q I ----- D T Y C K - S P M L K H
AcH2      L F M E R N ----- G T P L R I N A D G ----- T D D G ----- T T E R N S P F A R L E F H S V G T G ----- L L M L G
AcY601    L S S K H ----- G T L R I T E D R ----- D E G ----- I A D E N K Y V S U E M T S V G A G ----- E U T R G
Branchless L Y I K S ----- R I L Q L R D G ----- V W M G ----- T Q D E N S E F T I L R S T V D V G ----- R I K I Q S
Pyramus   L S K H S ----- E L A L H I N S H G ----- K Q T A E N I L R T Y Q - Y P M M A M N D V F S L D - F K I T I Y S
Thisbe    H H S Q C A H ----- N K A I H I A A E G ----- T S S U D T S Q I Q N -- I T I V G F P D Y L N M E - Y K I A E Y A
Let756    L F C R S G - T W L E M L P I D M P D D G S T R V K Q M G ----- T K E E S S K F S I V E F U S V A M S ----- L Q S I R G
Eg117    L F N E C S ----- Q G M L Q S F L G S ----- L M T R G ----- Y P D K H C L T D W M T U G S W D G ----- K P R U Q H
CIFGFL    L Y I E R S ----- S T T M R I L P S G ----- R D H G ----- S R D I D V Y C I V R F Q T I G Q K G M L I K I R G
CIFGF3/7/10 L Y M R M ----- H Y I P I H Q D G ----- K D R G ----- S Y N K S P Q T E I E V Q S V A A G G - V R F Y S
CIFGF4/5/6 L Y C R V G ----- I G W L E D R K D G ----- K Q T A ----- R H Q S T K M G E I E D F S H K N G ----- V G G I R S
CIFGF8/17/18 L Y S K R T ----- S M R I P L L G K ----- K D D G R ----- G R R G S M R A K L I I H S K G L W G ----- R I M I Q G
CIFGF9/16/20 L Y C R N ----- G E M L Q I L R M G ----- R I S G ----- T Q E S H M O Y A V L E F I S T G I G ----- S L T I R G
CIFGF11/12/13 L Y S R H ----- G T Y D I D R E N G ----- G M K G ----- V D D D S E S T I E Y L I P V G L R ----- I V S I Q H
hFGF1     L Y C S R G ----- G H I L R I L P D G ----- T D D G ----- T R D R S D Q H I Q L Q L S F S V G ----- E D Y I E S
hFGF2     L Y C R M G ----- G T L R I H P D G ----- R D D G ----- V R E K S D P H I K I Q L I E R G ----- V G S I M G
    
```

```

HvFGF      Q E S N N Y I A M M E G L R N E ----- L E T K T ----- D E C L F Y Y L E R G E W A T F S S A K Y P M D Y Y --
AcH2      I A S Q R Y L S I S D R G R L Q G V V E P S ----- R N T U G R E V H E T N O H S Y F S Y E H S S -----
AcY601    K M S K R F I E M S S T G S L Y T ----- T D E K G ----- D E C U D K E - I Y E A A E N S Y R S E K T S P D -----
Branchless L A T C L Y L C M D A C P V P Y G ----- S K D P T ----- D D C U N E N M M G L Q M W M S S T Y H S Q A R R -----
Pyramus   A D U D Y Y L C F - H H C R L V G ----- K R N A G ----- K E C H R E G C I I M G N Q N - F S S A - S M P -----
Thisbe    K P T R R L C F M D N W R L V G ----- M R E L R ----- D T C Y M E T I V R G Y F V - D R S V - V D L -----
Let756    V E T R N F I C M D P S G K W E T P S S M Y S ----- T E C U G L E E M M E N Y M L Y A C A G G D R F M P -----
Eg117    A Q S R K F L C M D K R A R I T L R F N G S D A ----- K C T I E E V R D N G T S R L R S S W K P E -----
CIFGFL    E K S G L Y M S M K R N G L W M T R D Y M N P ----- D T T D E H I Y S F S E W D A Y R S O T Q R -----
CIFGF3/7/10 P S T G R P S M R H S K L E G ----- S R N Y R ----- K I D D P E R R Q D - P Y E T E R S L H Q F G M R R R R -----
CIFGF4/5/6 E R H R R Y U C M D K R G R I T T ----- R R S F R ----- H D C E G R E E L A N G V T F A S O L G S D H Q W R -----
CIFGF8/17/18 Q U T E R F L C M D K R G R V ----- G E M Y R K A I N D - P K C L F E E M L E N Y E D A F S N S R E R D -----
CIFGF9/16/20 Q A S G L Y M S M S K G R L Y A ----- S E T T F N ----- R P C I F Y E T V L E N N Q M Q E D S F A H R N G S K K -----
CIFGF11/12/13 S E T T L Y I A M M S E G L Y T ----- T D U Y T ----- M E C K R E S U M D N Y Y U V T S C I I K Q L Q S G -----
hFGF1     T E T G Q Y L A M D T D G L L Y G ----- S Q D P N ----- D E C L F L E R L E E N N Y T W I S E R H A E K N -----
hFGF2     Q C A M R P M A M K E D G R L L E ----- S K C O N ----- D E C L F E R L E S M Y Y T W R S R K Y T S -----
    
```

```

HvFGF      ---- D E Y I S L R K G H I R R A M
AcH2      ---- W L I G I K K N G R A R G Q
AcY601    ---- W T A I S K C C Q A T G P
Branchless ---- V F L A I N G S G Q P R R T Q
Pyramus   ---- V I R U G F K G N I P I G L M
Thisbe    ---- Q R R U G F T H R G P V G P K
Let756    ---- W I D L R S G E P R R G P
Eg117     ---- L Y L G I N G R G F Q M P L
CIFGFL    ---- P F U A F W R A G E S U R S R
CIFGF3/7/10 S K A R E W I G I D R G R S R R G R
CIFGF4/5/6 ---- L G Y E L A M S R G R P R R G K
CIFGF8/17/18 ---- W H I G F H S M G R P R R G P
CIFGF9/16/20 ---- C H I A G H R R P Q G C
CIFGF11/12/13 -- R P W N U G H S A D G I P U R G S
hFGF1     ---- W F U G E K M G S C R R G P
hFGF2     ---- W Y U A L E R T G Q Y L G S
    
```

Bei *HvFGF* handelt es sich um eine Teilsequenz, der sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende fehlen (Abb. 3.25 A,B). Die ersten 45 Aminosäuren weisen keinerlei Ähnlichkeit zu einem bekannten Protein auf. Solche ausgedehnten N-terminalen Bereiche sind bei den meisten Invertebraten-FGF vorhanden (Abb. 3.25 A), ihre Funktion ist bisher ungeklärt (Ornitz und Itoh, 2001). Obwohl von *HvFGF* bislang nur eine Teilsequenz bekannt ist, zeigt sich, dass der noch unvollständige N-Terminus dieses Proteins den N-terminus von Vertebraten-FGF an Länge übertrifft (Abb. 3.25 A). Ob das Hydra-FGF eine ähnliche Größe erreicht, wie die FGF von *Drosophila* oder *C. elegans*, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Der C-terminale Teil von *HvFGF* (46-152 AA) weist deutliche Ähnlichkeit zur Core-Region von FGF auf (Abb. 3.25 B). Die Core-Region ist allerdings nicht vollständig, im Vergleich zu anderen FGF fehlen etwa zwölf Aminosäuren am C-Terminus. In BLAST-Analysen war die Ähnlichkeit von *HvFGF* zu FGF2 der Vertebraten mit 40% Aminosäureidentität und weiteren 15% konservierten Aminosäuren in der Core-Region am größten (Abb. 3.25 C). Von den zwölf Aminosäuren, die bei FGF1 und FGF2 mit FGF-Rezeptoren interagieren (Plotnikov et al., 2000; Pellegrini et al., 2000), sind fünf bei *HvFGF* vorhanden und zwei weitere konserviert ausgetauscht. Auch zwei von vier identifizierten Heparininteraktionsstellen (Plotnikov et al., 2000; Pellegrini et al., 2000) sind vorhanden, die beiden anderen sind konserviert (Abb. 3.25 C). Damit sind bei *HvFGF* mehr Aminosäuren erhalten, die bei Vertebraten-FGF funktionsrelevant sind, als bei den FGF aller übrigen Invertebraten (Abb. 3.25 C). Somit könnte die Bindung von *HvFGF* an einen FGF-Rezeptor ähnlich ablaufen wie die FGF/FGFR-Interaktion bei Vertebraten.

3.2.10.2 *HvFGF* wird nicht im Bereich des Hypostoms exprimiert

Über *in situ*-Hybridisierung wurde das Expressionsmuster von *HvFGF* in knospenden Polypen analysiert: Bei knospelosen Polypen war *HvFGF* fast im gesamten Tier entodermal nachweisbar, nur im Bereich des Hypostoms wurde keine Genaktivität detektiert (Abb. 3.26 A). Während der Knospung verkleinerte sich die Expressionsdomäne im Eltertier von distal nach proximal: Die expressionsfreie Domäne erstreckte sich nun in einem breiten Band unterhalb der Kopfregion (Abb. 3.26 C). Von Beginn der Knospung - erkennbar anhand einer Verdickung des Ektoderms in der Knospungsregion (Knospungsstadium 1) - bis etwa zu Stadium 7 blieb die Knospe ausgeschlossen von *HvFGF*-Transkription (Abb. 3.26 B-D). Erst mit Einschnürung der Knospenbasis wurde eine schwache Expression in der Knospe detektierbar, die sich im weiteren Verlauf verstärkte (Abb. 3.26 E, F). Auch im Eltertier verstärkten sich die Signale im oberen Rumpfbereich (Abb. 3.26 E, F). Unmittelbar vor dem Ablösen der Knospe glich die Expressionsdomäne von *HvFGF* im Eltertier wie auch in der Knospe dem Expressionsmuster von knospelosen Polypen: Im gesamten Tier fand man

eine starke entodermale Expression, ausgenommen war nur der Hypostomkegel (Abb. 3.26 G). Im Verlauf der Knospung verändert sich also in Abhängigkeit von Knospungsstadium die Expression im Elterntier.

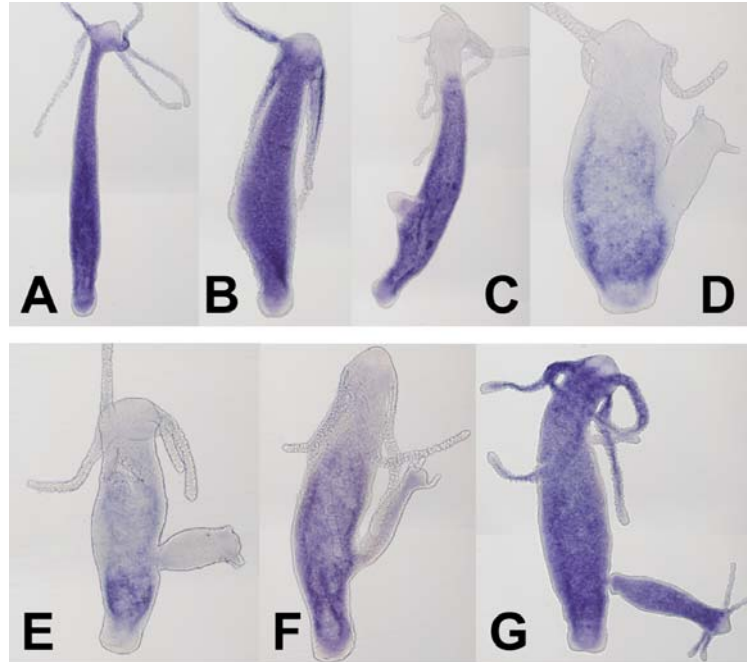


Abb. 3.26: Expression von *HvFGF* während der Knospung von Hydra. (A) Ubiquitäre Expression im knospenlosen Polypen, von der nur der Hypostomkegel ausgenommen war. (B) Knospenstadium 1. (C) Knospenstadium 4, Knospenspitze ist frei von Expression, ebenso wie die Kopfregion des Elterntieres. (D) Knospenstadium 7, keine Expression in der Knospe und in der Kopfregion des Elterntieres. Die Expression im übrigen Körper wurde schwächer. (E) Knospenstadium 8. (F) Knospenstadium 9, schwache Expression in der Knospe und im Kopfbereich des Elterntieres. (G) Knospenstadium 10, das Expressionsmuster sowohl in der Knospe als auch im Elterntier glich jetzt der Expression von *HvFGF* in knospenlosen Polypen.

4 Diskussion

Die Knospung bei Hydra bietet die Möglichkeit, verschiedene Musterbildungsprozesse von der Rekrutierung elterlichen Gewebes bis hin zur Morphogenese eines neuen Polypen molekular zu analysieren (siehe 2.2.2.4). In den letzten Jahre wurde eine Reihe von Genen isoliert, die in morphogenetische Vorgänge bei Knospung und Regeneration involviert sind (Übersichtsartikel: Steele, 2002). Dennoch ist bis heute ungeklärt, welche Gene oder genetischen Netzwerke an der eigentlichen Regulation der Knospung von der Etablierung einer knospungskompetenten Zone bis zur Ablösung des Jungpolypen beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Projekte verfolgt, die die Erkenntnisse über die molekularen Abläufe während der Knospung erweitern sollten. Das erste Projekt hatte die groß angelegte Isolierung von neuen, an der Knospung beteiligten Genen aus Hydra zum Ziel, im zweiten wurde mit *kringelchen* ein Gen im Detail charakterisiert, dessen Expressionsmuster auf eine wichtige Funktion während der Knospung hinwies.

4.1 Identifikation von knospungsrelevanten Genen

Um Gene zu isolieren, die an den komplexen Musterbildungsprozessen während der Knospung beteiligt sind, wurde zum einen ein Genexpressionsscreening zur gezielten Identifikation von knospungsrelevanten Genen mittels *in situ*-Hybridisierung durchgeführt, und zweitens die Isolierung von Transkripten, die eine *Splice Leader*-Sequenz (Stover und Steele, 2001) besitzen, vorangetrieben. Diesem Ansatz lag die damalige Vermutung zugrunde, dass *Splice Leader* bei Hydra bevorzugt an mRNAs zu finden sind, die für Elemente von Signalkaskaden codieren.

4.1.1 Das Expressionsscreening ist geeignet, Gene zu identifizieren, die während der Knospung aktiv sind

Da die differentielle Expression von Genen ein zentraler Steuerungsmechanismus in der Entwicklung eines Embryos und bei Regenerations- und Differenzierungsprozessen ist (Wolpert, 2001), wurde das Expressionsscreening zur Identifikation von Genen, die die Knospung bei Hydra steuern, entsprechend mit drei verschiedenen cDNA-Banken durchgeführt. In einer Bank wurden knospenspezifisch exprimierte Gene über die subtraktive Hybridisierung gegen cDNA aus der Kopf- und Fußregion angereichert, eine zweite wurde aus mRNA verschiedener Knospungsstadien und eine dritte cDNA-Bank aus mRNA der Fußregion hergestellt.

Die subtrahierte Bank erwies sich aufgrund der hohen Anzahl an Klonierungsartefakten nur bedingt tauglich für das Expressionsscreening. Sie bestand zu mehr als 70% aus Inserts < 100 bp, die als Fragmente bakterieller Gene identifiziert wurden (siehe 3.1.2). 13 dieser cDNAs wurden mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert, nur zwei von ihnen (CW4 und sub328) erzeugten ein Expressionsmuster. Möglicherweise handelt es sich bei ihnen um Fragmente aus dem 3'-nicht-codierenden Bereich von Hydra-Transkripten, denen fälschlicherweise eine bakterielle Herkunft zugeordnet wurde. Von den übrigen 61 getesteten cDNAs mit einer Größe von mehr als 500 bp zeigten etwa 25% eine Expression in der Knospungsregion. Zukünftige Analysen sollten sich auf die großen Klone (>500 bp) dieser Bank beschränken.

Anders die beiden cDNA-Banken aus Knospen- und Fuß-RNA, deren Qualität (mittlere Insertgröße von 1,8 bzw. 1,1 kb) ein Genexpressionsscreening problemlos zuließ. Von den cDNAs der Knospenbank lag der Anteil regiospezifisch exprimierter mRNAs bei 40% (Abb. 3.1) bei den aus der Fußbank stammenden cDNAs zeigten etwa 30% eine spezifische Expression im Fußbereich von Knospe und Elterntier. Diese Werte für regiospezifisch exprimierte Gene liegen im Bereich dessen, was von Gawantka et al. (1998) für *Xenopus*-Entwicklungsstadien beschrieben wurde. Im Fall von Hydra ist somit eine gute Anreicherung von lokal exprimierten Transkripten in einer cDNA-Bank schon dadurch zu erreichen, dass zur Synthese der Bank mRNA aus einer bestimmten Körperregion verwendet wird.

Die Expressionsmuster der analysierten Klone spiegeln repräsentativ die Phasen der Knospenentwicklung (siehe 2.2.2.4.2) bei Hydra wieder: Aus der Knospenbank und der subtrahierten Bank wurden Transkripte isoliert, die zu Beginn der Knospung in der Knospungsregion (CW1), in der evaginierenden Knospe (sub729, CW2) und in der späten Knospe (sub27, KI2) aktiviert werden. Es gibt Transkripte, die nur im Knospenfuß (sub698) oder an der Knospenspitze (MS2), der späteren Kopfregion, nachweisbar sind. Alle regiospezifisch exprimierten cDNAs der Fuß-cDNA-Bank wurden erwartungsgemäß im aboralen Bereich der Knospe, wo die Fußbildung erfolgt, transkriptionell aktiviert.

Nur wenige der untersuchten Gene wurden ausschließlich in der Knospe aktiviert (Abb. 3.3), die Mehrzahl zeigte auch eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Expression im Elterntier. Dies ist dadurch zu erklären, dass Musterbildungsprozesse bei Hydra nicht nur in der Knospe, sondern auch im Elterntier ablaufen, um an den Körperenden verloren gegangene Zellen zu ersetzen (siehe 2.2.2.1), weshalb Hydra auch als immerwährender Embryo bezeichnet wird (Campbell, 1967a; Campbell, 1967b).

Von den 21 während der Knospung aktivierten und ansequenzierten cDNAs sind vier direkt oder indirekt an Signalübertragungsvorgängen beteiligt. Dies trifft für *HvRACK1* sowie die Homologen zu *rab11*, *rho/gef* und *Inositol-1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase* zu (siehe 4.2.2). Auch wenn zu wenig Klone für eine quantitative Auswertung analysiert worden sind, zeigt

dieses Ergebnis, dass über ein solches Expressionsscreening die Identifizierung von Genen, die in die Regulation der Knospung involviert sind, erfolgen kann.

Im großen Maßstab durchgeführt, also bei der Analyse von mehreren 100 bis mehreren 1000 cDNAs (Thisse et al., 2004; Quiring et al., 2004), wäre es sogar möglich gewesen Gengruppen mit gemeinsamen räumlichen und/oder zeitlichen Expressionsmustern zu identifizieren. Beim Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass die Gene einer solchen Koexpressionsgruppe für verschiedene Proteine eines einzigen Signaltransduktionsweges codieren (Fürthauer et al., 1997): Aufgrund ihrer überlappenden Expressionsdomänen während der Embryonalentwicklung wurden die Gene *fgf8*, *fgf3*, *sprouty2*, *sprouty4* und *sef* einer Koexpressionsgruppe zugeteilt. Spätere funktionelle Analysen zeigten, dass *sprouty* und *sef* als Antagonisten der Ras/MAPK-vermittelten Signaltransduktion über FGF agieren (Fürthauer et al., 2001; Fürthauer et al., 2002; Tsang et al., 2002; Fürthauer et al., 2004).

Das Genexpressionsscreening ist somit eine erfolgreiche Methode zur Isolierung regiospezifisch exprimierter Transkripte, die allerdings den Nachteil hat, sehr zeit- und kostenintensiv zu sein. Effektiver könnten cDNA-Arrays eingesetzt werden, die mit komplexen Sonden aus bestimmten Körperregionen hybridisiert werden. Auf diese Weise ließe sich eine große Anzahl von Transkripten in wenigen Arbeitsschritten analysieren und vorsortieren (Livesey, 2002). Dieser Ansatz konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da der Umgang mit radioaktiv markierten Sonden, wie sie für eine solche Hybridisierung nötig wären, zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war.

Es ist zu beachten, dass Gene mit lokal begrenzter Expression nicht unbedingt auch wichtige Regulatorfunktionen übernehmen. Andererseits würde durch Selektion auf rein regiospezifisch exprimierte Gene eine Vielzahl wichtiger Gene mit regulatorischen Funktionen übersehen, nämlich die ubiquitär exprimierten wie zum Beispiel *Hyfrizzled*. Das Gen codiert für einen Rezeptor des Signalmoleküls HyWnt und wird im ganzen Körper von Hydra exprimiert (Minobe et al., 2000). Solche Gene sollten in einem zweiten Ansatz mit Hilfe der *Splice Leader*-Sequenzen aus Hydra isoliert werden (3.1.3).

4.1.2 Die *Splice Leader*-Sequenzen von Hydra eignen sich nicht zur spezifischen Identifikation von Genen, die während der Morphogenese aktiviert werden

Obwohl bei Hydra bis heute keine polycistronischen mRNAs nachgewiesen wurden, findet man am 5'-Ende vieler Transkripte eine von zwei *Splice Leader*-Sequenzen (SL-A bzw. SL-B) (Stover und Steele, 2001). *Splice Leader*-Sequenzen sind bei Sarcomastigophoren (Davis, 1996), Plathelminthen (Vandenberghé et al., 2001) und Nematoden (Nimmo und Woollard, 2002) bei der Prozessierung von polycistronischen Transkripten bestimmter Gen-

Cluster oder Operons von Bedeutung, aus denen erst durch Anfügen der *Splice Leader*-Sequenzen monocistronische mRNAs entstehen (Blumenthal, 1998). Bei *C. elegans* sind 25% aller Gene in polycistronische Transkriptionseinheiten zusammengefasst (Blumenthal, 1998), die zum Teil Gene enthalten, die funktionell miteinander gekoppelt sind und koreguliert werden müssen.

Da zu Beginn dieser Arbeit die Mehrzahl der bekannten *Splice Leader*-tragenden Transkripte für Proteine codierten, die an Signaltansduktionskaskaden beteiligt sind, entstand die Hypothese, dass solche Gene bei Hydra in entsprechende, eventuell koregulierte Transkriptionseinheiten zusammengefasst seien und ihre Transkripte somit über die *Splice Leader*-Sequenzen gezielt isoliert werden könnten. Dazu wurden Makroarrays, auf die cDNAs aus der subtrahierten Bank und aus der Knospenbank aufgetragen worden waren, mit Oligonukleotiden hybridisiert, die gegen die Sequenz von *SL-A* bzw. *SL-B* gerichtet waren.

Von den 1884 untersuchten cDNAs waren 55 positiv für *SL-B* und acht für *SL-A*. Diese Zahlen wären sicherlich höher ausgefallen, wenn in der subtrahierten Bank, deren 1500 cDNAs vollständig auf Arrays übertragen worden waren, nicht die große Zahl an Klonierungsartefakten aufgetreten wäre. Dennoch bestätigen diese Werte die Beobachtung von Stover und Steele (2001), dass *SL-B* häufiger an Transkripten von Hydra zu finden ist als *SL-A*. Zur Detektion von Genen, deren Produkte an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind, eignen sich diese Sequenzen allerdings nicht, da auch viele Transkripte von Haushaltsgenen *Splice Leader* besitzen (Stover und Steele, 2001). Die Beobachtung, dass *Splice Leader*-tragende Transkripte vermehrt für Proteine aus Signalkaskaden codieren, ist darauf zurückzuführen, dass solche Transkripte damals im Zentrum des Interesses verschiedener Arbeitsgruppen standen und gezielt isoliert und analysiert worden waren. Mittlerweile kann eine gezieltere Identifikation von Genen, die für Proteine aus Signalkaskaden codieren, mit Hilfe der Daten aus dem EST- (http://mpc.uci.edu/hampson/public_html/blast/jf9/) und dem Genomprojekt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6085>) von *Hydra magnipapillata* erfolgen, die seit Kurzem zur Verfügung stehen. Hier können Hydra-Homologe bekannter Regulatorgene identifiziert, nach Konzeption entsprechender Primer aus cDNA-Banken amplifiziert und anschließend detailliert untersucht werden. Ein solcher Ansatz wurde nicht verfolgt, da in der Zwischenzeit mit *kringelchen* ein Gen identifiziert worden war, das, wie meine Arbeit zeigt, entscheidend in die Knospung involviert ist.

4.2 FGF/FGFR-Signalübertragung in Hydra

In der Entwicklung triploblastischer Organismen spielen FGF-Rezeptoren und ihre Liganden eine essentielle Rolle (Yamaguchi und Rossant, 1995; Kimmelman et al., 1988; Slack et al., 1996). Mit Kringelchen wurde zum ersten Mal ein FGFR aus Diploblasten isoliert und im Detail analysiert.

4.2.1 Strukturelle Eigenschaften von Kringelchen identifizieren es als FGF-Rezeptor

Zu den charakteristischen Merkmalen von FGF-Rezeptoren der Triploblasten gehören im intrazellulären Bereich die zweigeteilte Tyrosinkinase-Domäne mit den Interaktionsstellen für nachgeschaltete Signalmoleküle, eine einzelne Transmembrandomäne und im extrazellulären Teil drei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Schleifen (D1 – D3), von denen D2 und D3 an den Liganden binden (siehe 2.1.1). All diese Charakteristika finden sich auch bei Kringelchen. Die Sequenz der zweigeteilten Tyrosinkinase-Domäne ist zu etwa 65% identisch mit der von Vertebraten, in essentiellen Abschnitten sind es sogar fast 100% (Abb. 3.6). Wie bei höher evolvierten FGFR sind zwei Interaktionsstellen für SH2-Domänen vorhanden, die z.B. eine Bindung der SH2-Domäne von PLC γ ermöglichen können (Mohammadi et al., 1991). Die Existenz einer Konsensus-Sequenz für SH3-bindende Domänen lässt vermuten, dass eine Interaktion mit PI3-Kinase möglich ist. N-terminal schließt sich an die Tyrosinkinase-Domäne ein juxtamembranärer Bereich an, der mit 82 Aminosäuren etwa genauso groß ist wie bei FGFR von Triploblasten, während diese Region bei allen anderen Tyrosinkinasen deutlich kürzer ist (Johnson und Williams, 1993). An ihn grenzt eine einzelne Transmembrandomäne.

Die extrazelluläre Domäne von *kringelchen* ist weniger hoch konserviert. Nur etwa 35% der Aminosäuren im Bereich von D1-D3 sind identisch zu denen von Rezeptoren triploblastischer Tiere. Konserviert ausgetauschte Aminosäuren finden sich in Clustern an den Positionen, die für die charakteristische, durch Cysteine vermittelte Schleifenstruktur der FGFR höherer Metazoen verantwortlich sind. Kringelchen besitzt im gesamten extrazellulären Bereich nur fünf Cysteine. Vier von ihnen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung der Ig-ähnlichen Schleifen D1 und D2 beteiligt (Abb. 3.5), denn ihr relativer Abstand zueinander und der sie umgebende Aminosäurekontext entspricht dem der Cysteine, die diese Aufgabe bei anderen FGF-Rezeptoren übernehmen. Die Sequenz im Bereich zwischen D1 und D2 zeichnet sich durch einen hohen Anteil von sauren Aminosäuren aus. Eine saure Box, die bei den FGF-Rezeptoren der Vertebraten für eine Autoinhibition verantwortlich gemacht wird, fehlt allerdings (Abb. 3.5, 3.6): Diese, bei neutralem pH-Wert negativ geladenen, Aminosäurereste der sauren Box interagieren

wahrscheinlich mit positiv geladenen Aminosäuren im Bereich von D2. Dadurch wird die Ig-ähnliche Schleife D1 in räumliche Nähe zur Ligandenbindestelle gebracht und erschwert so die Bindung von FGF (Plotnikov et al., 1999). Da der isoelektrische Punkt der Linker-Region zwischen D1 und D2 im Fall von Kringelchen bei pK_A 4,41 liegt, könnte dieser Bereich funktionell wie eine saure Box wirken.

Bei FGF-Rezeptoren von Vertebraten findet man C-terminal zur sauren Box eine Bindestelle für Heparin, die „K18K“-Sequenz, in die ein HAV-Motiv eingebettet ist, über das Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen vermittelt werden (Nagendra et al., 2001). Das HAV-Motiv fehlt allen bekannten Rezeptoren der Wirbellosen und auch Hydra (siehe 2.1.1).

Ähnliches gilt für die „K18K“-Region der Wirbeltier-FGFR, die mittels sechs Lysinen eine positiv geladene Grube bildet, in der der Koaktivator Heparin bindet (Schlessinger et al., 2000; Plotnikov et al., 2000; Pellegrini et al., 2000). Eine leicht variierte „K18K“-Sequenz findet sich zwar auch im FGFR der Seescheide *H. roretzi*, fehlt aber wiederum den FGF-Rezeptoren der anderen Wirbellosen. Dies deutet darauf hin, dass mit der Aufspaltung der Deuterostomier die Bindung von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) und Heparin an FGFR funktionell an Gewicht gewann.

Es ist aber umstritten, ob die typische „K18K“-Region als konservierte Sequenz für eine Heparinbindung unbedingt notwendig ist, vielmehr scheint eine positiv geladene Grube als Voraussetzung für die Interaktion mit Heparin auszureichen (Plotnikov et al., 2000; Schlessinger et al., 2000; Pellegrini et al., 2000). Die FGF-Rezeptoren des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* und des Polychaeten *Platynereis dumerilii* zeigen ebenso wie Breathless aus *Drosophila* und das FGFR-ähnliche Protein NouDarake aus *Dugesia japonica* im Bereich der „K18K“-Region eine Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren (McCoon et al., 1996; Steinmetz, 2002; Shishido et al., 1993; Cebria et al., 2002). Sie besitzen vier bis fünf Lysine und Arginine an konservierten Positionen. Nicht nachgewiesen ist bisher, ob Heparin hier binden kann.

Im Fall von Kringelchen ist eine solche Interaktion fraglich, denn dieser Rezeptor besitzt nur drei positiv geladene Aminosäurenreste im Bereich der putativen Heparinbindestelle, von denen keine zur „K18K“-Sequenz konserviert ist. Allerdings gilt das Gleiche für EGL-15, den *C. elegans*-FGFR: In einem Strukturmodell von EGL-15 im Komplex mit Heparin und FGF entsprach die Verteilung geladener Aminosäuren der, die im Komplex aus humanem FGFR1 FGF1 und Heparin identifiziert wurde (Nagendra et al., 2001). Die Heparinbindefähigkeit ist also zwischen *C. elegans*- und humanen FGF-Rezeptoren konserviert, obwohl erhebliche Sequenzunterschiede bestehen. Für Kringelchen bedeutet dieses Ergebnis, dass erst Struktur- und Funktionsanalysen eine abschließende Aussage darüber zulassen würden, ob der Hydra-Rezeptor in der Lage ist, Heparin zu binden und ob die Interaktion mit Heparin eine ursprüngliche Fähigkeit von FGFR ist.

Neben all diesen offenen Fragen war zu Beginn der Arbeit unklar, ob Kringelchen überhaupt ein FGFR ist: Eine Ig-ähnliche Schleife D3 kann bei Kringelchen nicht -wie bei anderen FGFR üblich- über Schwefelbrücken gebildet werden, denn im Bereich zwischen D2 und der Transmembrandomäne gibt es keine Cysteine. D3 ist bei Wirbeltier-Rezeptoren für die Bindung von FGF essentiell. Im Verlauf dieser Arbeit erhärtete sich die Hypothese, dass eine FGF-Bindung an den Hydra-Rezeptor erfolgen kann: Eine detaillierte Sequenzanalyse zeigte, dass bei Kringelchen aller Wahrscheinlichkeit nach durch hydrophobe Wechselwirkungen eine Schleifenstruktur analog zu D3 ausgebildet wird. Anstelle der Cysteine, die D3 im FGFR von triploblastischen Organismen ausbilden, befinden sich im entsprechenden Sequenzbereich des Hydra-FGFRs die Aminosäuren Tyr-249 und Phe-324. Es fällt auf, dass durch eine einfache Punktmutation an Position zwei aus den Cystein-Codons (TGT, TGC) jeweils ein Tyrosin-Codon (TAT, TAC) oder ein Phenylalanin-Codon (TTT, TTC) entstehen kann. Hydra besitzt im Gegensatz zu den höher entwickelten Organismen, deren Genom GC-reich ist, ein AT-reiches Genom mit einem Anteil von bis zu 70% AT in codierenden Sequenzen (Galliot und Schummer, 1993). Es ist vorstellbar, dass die Cystein-Codons im GC-reichen Genom entstanden oder bei Hydra sekundär verloren gingen. Im ersten Fall hätte die Ausbildung von Schwefelbrücken die Rezeptorstruktur entscheidend stabilisiert, eine unter evolutionären Gesichtspunkten attraktive Hypothese zur Optimierung der Rezeptor-Liganden-Interaktion.

Sowohl Tyr-249 als auch Phe-324 sind in eine Umgebung von hydrophoben Aminosäureresten eingebettet. Ein erstes Strukturmodell von Kringelchen bestätigte die Hypothese, dass über diese Sequenzbereiche vermutlich eine schleifenartige Struktur ähnlich zu D3 bei Vertebraten-FGFR ausgebildet wird und zeigte außerdem, dass die Konformation der möglichen Ligandenbindestelle von Kringelchen ähnlich der von humanen FGF-Rezeptoren ist (Burke und Blundell, Cambridge, persönliche Mitteilung), obwohl nur eine geringe Sequenzidentität existiert: Von 22 konservierten Aminosäuren, die in Kristallstrukturanalysen von humanen FGF-Rezeptoren als Interaktionsstellen mit FGF identifiziert wurden, sind bei Kringelchen sechs vorhanden und vier weitere konserviert ausgetauscht. Die Ligandenbindestellen von *Breathless (Drosophila)* und vom *C. elegans*-FGFR Egl-15 besitzen eine ähnlich geringe Sequenzähnlichkeit zu der humaner Rezeptoren. Dennoch konnte in einem 3D-Modell gezeigt werden, dass diese FGFR im Bereich der Ligandenbindestelle eine ähnliche Konformation einnehmen und die strukturellen Voraussetzungen zur Bindung von FGF besitzen (Nagendra et al., 2001). Dies zeigt, dass die Konservierung der Sequenz nicht entscheidend ist für die FGF-Bindung.

Für eine Interaktion von Kringelchen mit FGF sprechen auch Ergebnisse, die durch die *in vivo*-Bindung von aFGF an Hydra-Gewebe erzielt wurden (Abb. 3.24). Die resultierenden Bindungsmuster des markierten aFGF entsprachen in den frühen Knospungsphasen und

nach Ablösung der Knospe in etwa den Expressionsmustern von *kringelchen*, was darauf hindeutet, dass das aFGF an den Hydra-Rezeptor gebunden hat.

Einen weiteren, funktionellen Hinweis gab ein *Rescue*-Experiment in *Drosophila*: Kringelchen wurde heterolog in *heartless*-mutanten Fliegen exprimiert. Erste Analysen zeigten eine Heilung des frühen mutanten Phänotyps (Hüsken, 2004). Kringelchen kann somit die Funktion von Heartless zumindest partiell übernehmen und ist möglicherweise in der Lage mit einem der beiden Liganden von Heartless zu interagieren.

Nicht zuletzt ist die Isolierung eines FGF aus Hydra ein weiterer Hinweis darauf, dass Kringelchen in der Lage ist solche Liganden zu binden: Mit *HvFGF* wurde ein cDNA-Fragment isoliert, das deutliche Ähnlichkeit zur Core-Region von Metazoen-FGF besitzt (Abb. 3.25). Dabei war in der BLAST-Analyse die Ähnlichkeit zu FGF2 der Vertebraten am Größten. Von 12 Aminosäureresten, die Interaktionen zwischen FGF und FGFR in Vertebraten vermitteln (Plotnikov et al., 2000; Schlessinger et al., 2000; Pellegrini et al., 2000), sind bei *HvFGF* sieben konserviert bzw. funktionskonserviert ausgetauscht. Kein anderer FGF eines Invertebraten zeigt eine ähnlich große Übereinstimmung. Dennoch nehmen die bisher analysierten FGF wirbelloser Organismen eine Struktur ein, die der der Vertebraten-FGF sehr ähnlich ist. Stathopoulos et al. (2004) konnten zeigen, dass die Core-Region der *Drosophila*-FGF Pyramus (FGF8-like 2) und Thisbe (FGF8-like 1) nur wenig Sequenzidentität zu der von Wirbeltieren aufweist, die Sequenzregionen, die für die Faltung des Proteins verantwortlich sind, aber deutlich höher konserviert sind. Wie bei den FGFR ist auch im Fall der FGF die Struktur für ihre Interaktionsfähigkeit ausschlaggebend. Es spricht also alles dafür, dass *HvFGF* mit einem FGFR, also auch Kringelchen, interagieren könnte, die funktionellen Studien hierfür stehen allerdings noch aus.

4.2.2 Ein Modell zur Einbindung von Kringelchen in mögliche Signalwege bei Hydra

Fasst man die Expressionsdaten zusammen, die bei der Untersuchung von Knospung, Regeneration und Entwicklung von Zellaggregaten gewonnen wurden, so wird *kringelchen* während der Musterbildung bei Hydra in verschiedenen Domänen exprimiert: Erstens tritt eine leichte und diffuse Expression in den Frühphasen von Knospung (Stadium 1, Abb. 3.9) und Aggregatentwicklung auf (Abb. 3.20), also bei Prozessen, bei denen eine Achsenneubildung erfolgt. Als zweites zeigt sich in der Knospe, in Kopfreparatur und in sich entwickelnden Zellaggregaten eine fleckenförmige Expressionsdomäne im Bereich des Kopforganisators (Abb. 3.9, 3.15, 3.20). Die dritte Expressionsdomäne wird in Regionen der Fußdifferenzierung detektiert (Abb. 3.9, 3.18), die vierte markiert die Ablösestelle des Jungpolypen vom Elterntier (Abb. 3.9).

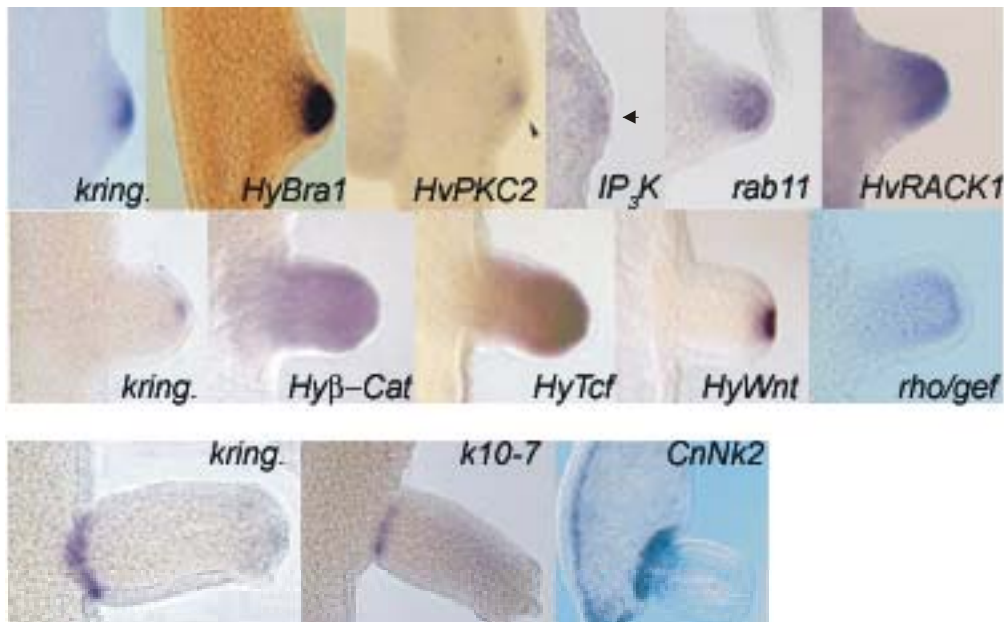


Abb. 4.1: Koexprimierte Gene während der Knospung. *kring.*: *kringelchen*, *IP₃K*: *Inositol-1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase*.

Diese Domänen überlappen zumindest teilweise mit Expressionsmustern von anderen Hydra-Genen, die an Musterbildungsprozessen beteiligt sind (Abb. 4.1). Am Beispiel der Embryonalentwicklung des Zebrafisches konnte gezeigt werden, dass die Gene einer Ko-Expressionsgruppe in einem funktionellen Zusammenhang stehen können. (Tsang et al., 2002; Fürthauer et al., 2002). Dies ist möglicherweise auch bei Hydra der Fall, zumal die Vertebraten-Homologe der meisten mit *kringelchen* koexprimierten Gene (Abb. 4.1) für ein Zusammenspiel mit FGF-Signalkaskaden bekannt sind (siehe Abb. 2.5 und Dailey et al., 2005). Im Bereich des Hypostoms werden die Gene des kanonischen Wnt-Signalweges, nämlich *HyWnt*, *Hyβ-Cat* und *HyTcf* (Hobmayer et al., 2000) und das *brachyury*-ähnliche Gen *HyBra1* (Technau und Bode, 1999) in mit *kringelchen* überlappenden Mustern exprimiert. Sie gehören zu den frühesten Genen, die im Verlauf der Knospung, bei der Entwicklung von Aggregaten und der Kopfregeneration aktiviert werden. Aus diesem Grund wird angenommen, dass sie an der Bildung des Kopforganisations beteiligt sind (Technau und Bode, 1999; Hobmayer et al., 2000). *HvPKC2* (Hassel et al., 1998) und *HvRACK1* (Hornberger und Hassel, 1997) sind ebenfalls in die Kopfentwicklung involviert. Auch sie werden an den apikalen Enden von Knospe und Kopfregenerat zusammen mit *kringelchen* detektiert. Durch das Expressionsscreening (siehe 3.1.2) konnten Hydra-Homologe zu *rab11*, *rho/gef* und *Inositol1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase (IP₃K)* isoliert werden, die ebenfalls im Bereich der Knospenspitze aktiviert werden und in einen gemeinsamen Signalweg involviert sein könnten (siehe 4.2). Unter Berücksichtigung der in Vertebraten bekannten Signalübertragungsvorgänge könnte es bei Knospung, Regeneration und der Entwicklung

von Aggregaten im Bereich des Kopforganisators zu einer Interaktion von Signalen, die via Kringelchen übertragen werden, mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Hydra kommen. Die Aktivierung dieser Signalkaskade erfolgt durch die Bindung von HyWnt an seinen Rezeptor Frizzled, dessen Gen ubiquitär in Hydra exprimiert wird (Minobe et al., 2000). Über eine Aktivierung von HyDsh wird HyGSK3 inhibiert. Erst durch diese Inhibition kann Hy β -Cat im Cytoplasma angereichert und anschließend in den Zellkern transferiert werden, wo es zusammen mit HyTcf die Transkription von Zielgenen steuert (Hobmayer et al., 2000). Über Aktivierung von Kringelchen durch Bindung eines FGF könnte die Inhibition von HyGSK3 unterstützt werden, denn der phosphorylierte Rezeptor könnte über die SH2-Bindestellen PLC γ und damit auch HvPKC2 aktivieren, die im aktivierten Zustand an HvRACK1 gebunden ist. HvPKC2 wäre, wie für andere PKC-Isoformen gezeigt (Garrido et al., 2002) in der Lage, HyGSK3 zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren. Dabei könnte HyBra1 die Transkription von HvFGF und/oder Wnt regulieren. Ein ähnlicher Mechanismus läuft während der Gastrulation bei *Xenopus* ab (Tada und Smith, 2001): Die Expression von *eFGF* (*Xenopus embryonic fibroblast growth factor*) wird durch *Xbra* aktiviert. *eFGF* hält in einer autoregulatorischen Schleife wiederum die Expression von *Xbra* aufrecht (Isaacs et al., 1994). Ein weiteres direktes Zielgen von *Xbra* ist *Xwnt11* (Tada und Smith, 2000), das seinerseits aber keine *Xbra*-Expression induzieren kann. Am Beispiel der Gliedmaßenentwicklung von Vertebraten ist allerdings gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren der Brachyury-Familie Zielgene von Wnt sein können (Liu et al., 2003b)

Die Expression eines *rho/gef*-ähnlichen Gens und einer Inositol1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase zeigen an, dass während der frühen Knospung wahrscheinlich auch die Ras-MAPK-Kaskade und das Phosphoinositol-Signaltransduktionssystem aktiv sind. Beide Signalübertragungswege können über FGFR angesprochen werden (Abb. 2.5). Dem PI-PKC-System kommt eine besondere Bedeutung bei der Ausbildung von Kopfstrukturen zu, da eine Überaktivierung zur Ausbildung ectopischer Kopfstrukturen führt (Müller, 1989). Der dieses System aktivierende Mechanismus ist bislang ungeklärt, eine Aktivierung über Kringelchen wäre eine durchaus mögliche Lösungsvariante dieses Problems.

Mit *Hvrab11* wird in der Knospe ein Gen exprimiert, das am Recycling und am gerichteten Transport von Transmembranrezeptoren innerhalb einer Zelle beteiligt ist (Mitchell et al., 2004; Moore et al., 2004), und somit für das Recycling von Kringelchen in Betracht kommt. Beim Receptor-Recycling werden aktivierte Rezeptoren internalisiert, in Endosomen dephosphoryliert, und kehren dann in die Membran zurück.

Zu den Genen, deren Expressionsmuster bei der Bildung von Fußstrukturen überlappen, gehören *k10-7*, das für ein Tenascin-ähnliches Protein codiert (Hotz, in Vorbereitung) und das Homöoboxgen *CnNK-2* (Grens et al., 1996). Beide Gene werden im Bereich der Knospenbasis ab Stadium 6 bzw. Stadium 5 exprimiert. *CnNK-2* nimmt eine zentrale Rolle in

der Steuerung der Fußbildung ein und wird für die Veränderung des Positionswertes im sich entwickelnden Fuß verantwortlich gemacht (Thomsen et al., 2004). Die Funktion von *k10-7* ist bislang ungeklärt, möglicherweise ist dieses Gen in die drastischen Formveränderung involviert, die Epithelzellen erfahren, wenn sie zu fußspezifischen Zellen differenzieren. Bei Vertebraten wurde eine Regulation der Zellform durch Tenascine nachgewiesen (Midwood und Schwarzbauer, 2002).

Bei der Fußbildung der Knospe kommt es möglicherweise zu einer Kringelchen-abhängigen Induktion von *k10-7*. Eine FGF-abhängige Expression von *tenascin* konnte bei Vertebraten nachgewiesen werden (Suzuki et al., 2002; Rouzankina et al., 2004). Auch die Gene der NK-Transkriptionsfaktor-Familie gehören in Vertebraten zu den Zielgenen von FGF-Signalen (Barron et al., 2000; Alsan und Schultheiss, 2002), so dass eine Induktion von *CnNK-2* über Kringelchen möglich erscheint.

Diese Daten machen deutlich, dass an der Regulation von morphogenetischen Prozessen bei Hydra konservierte Signalwege beteiligt sind, auf die ein Hydra-FGF-Rezeptor einwirken könnte, und dass Kringelchen über verschiedene nachgeschaltete Faktoren Einfluss auf unterschiedliche Prozesse in der Knospung nehmen kann.

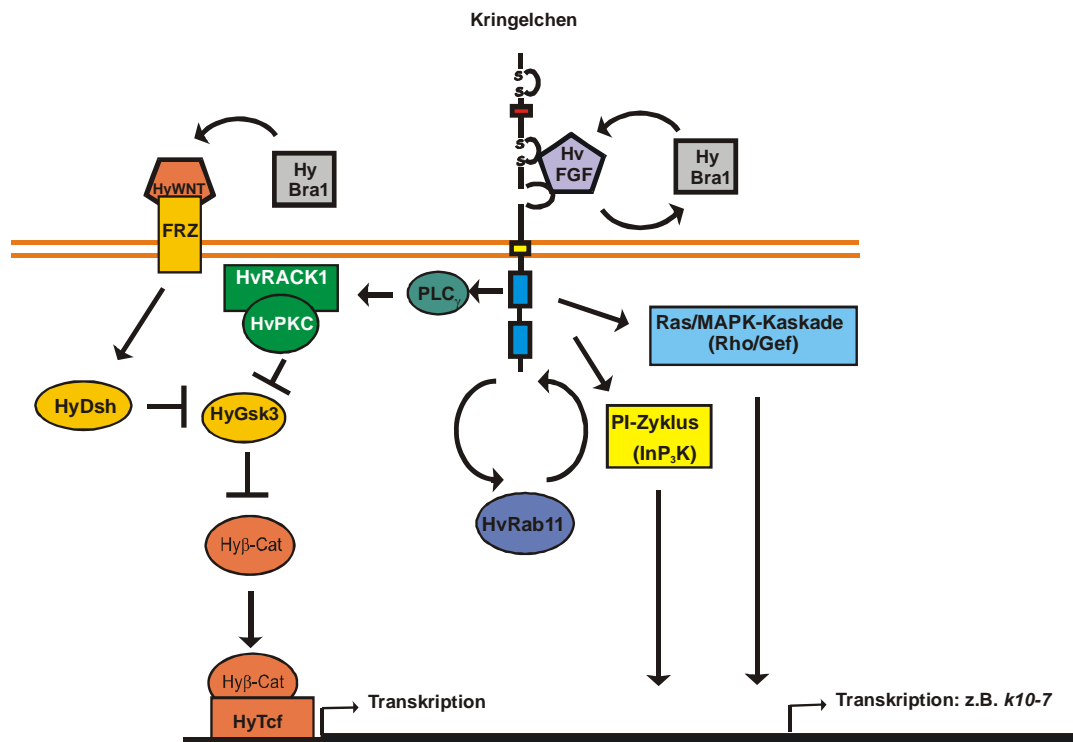


Abb. 4.2: Ein mögliches Modell zur Einbindung von Kringelchen in die Signaltransduktionswege von Hydra, denen Relevanz bei der Musterbildung zugesprochen wird.

4.2.3 Signale der Verzweigungsmorphogenese: Hydra und Wirbeltiere im Vergleich

Das oben aufgestellte Modell ist noch hypothetisch, auffällig sind aber morphologische Charakteristika, die die Rolle von Kringelchen funktionell in die Nähe der höher evolvierten FGFR stellen. Beispielsweise lassen sich Prozesse, die der Entwicklung einer Gliedmaßenknospe bei Wirbeltieren entsprechen, im Verlauf der Knospung bei Hydra wiederfinden (Abb. 4.3 A,B): Zunächst erfolgt eine Determination der Region, an der die sekundäre Körperachse ausgebildet wird. Bei Vertebraten kommt es dabei zu einer Wechselwirkung von FGF-Signalübertragung mit der kanonischen Wnt-Kaskade (Tickle und Münsterberg, 2001). Die an der Determination der Knospungszone bei Hydra beteiligten Faktoren sind noch unbekannt. Allerdings werden *HyTcf* und *Hyβ-Cat* in der Knospungsregion exprimiert, bevor ein Auswachsen der Knospe morphologisch erkennbar ist (Hobmayer et al., 2000) und sind möglicherweise an der Determinierung der Knospungsregion beteiligt. Das korrekte Auswachsen der sekundären Körperachse wird durch eine apikal lokalisierte Organisatorregion gesteuert - bei Wirbeltieren ist dies die apikale Epidermisleiste, bei Hydra übernehmen die Zellen der Knospenspitze diese Funktion - und ist nur durch Einwanderung von Zellen möglich: Während der Knospung von Hydra wandern Zellen aus dem Gastralraum des Elterntieres ein, bei Wirbeltieren wandern die künftigen Muskelzellen aus den Somiten zur Extremitätenknospe (Li und Muneoka, 1999). Interessanterweise spielt Signalübertragung über FGF und ihre Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei der frühen Extremitätenentwicklung (Tickle und Münsterberg, 2001; Wilkie et al., 2002). Ein Zusammenspiel von FGF8 (via FGFR2-Isoform IIIb), FGF10 (via FGFR2-Isoform IIIc) und Wnt steuert die Determinierung des Gliedmaßenfeldes (Abb. 3.3 C): Im Bereich der entstehenden Extremitäten ist *FGF10* zunächst ubiquitär im mesenchymalen Mesoderm exprimiert. Man nimmt an, dass ein Wnt-Signal dafür verantwortlich ist, dass dort, wo Extremitäten auswachsen sollen, die *FGF10*-Expression erhalten bleibt. FGF10 induziert über Wnt-3a die Expression von *FGF8* im epithelialen Ektoderm und stimuliert das Auswachsen der Extremitätenanlage. Dabei kommt es zu einer positiven Rückkopplung: Das in den Zellen der apikalen Ektodermisleiste produzierte FGF8 stimuliert die Produktion von FGF10 im Mesoderm, das wiederum die Produktion von ektodermalen FGF8 anregt (Kawakami et al., 2001) (Abb. 4.3.C). Signalübertragung mittels FGF-Rezeptoren fungiert also bei der Gliedmaßenbildung der Vertebraten als selbstverstärkendes, induzierendes Element, das - zusammen mit der Wnt-Signalkaskade - die Ausbildung der sekundären Achse, die Wanderung der Zellen und die Elongation der Gliedmaßenknospe kontrolliert.

Die Expression von *kringelchen* und Mitgliedern der kanonischen Wnt-Kaskade in der Organisatorregion legt die Vermutung nahe, dass die Knospung bei Hydra über einen ähnlichen Mechanismus gesteuert wird.

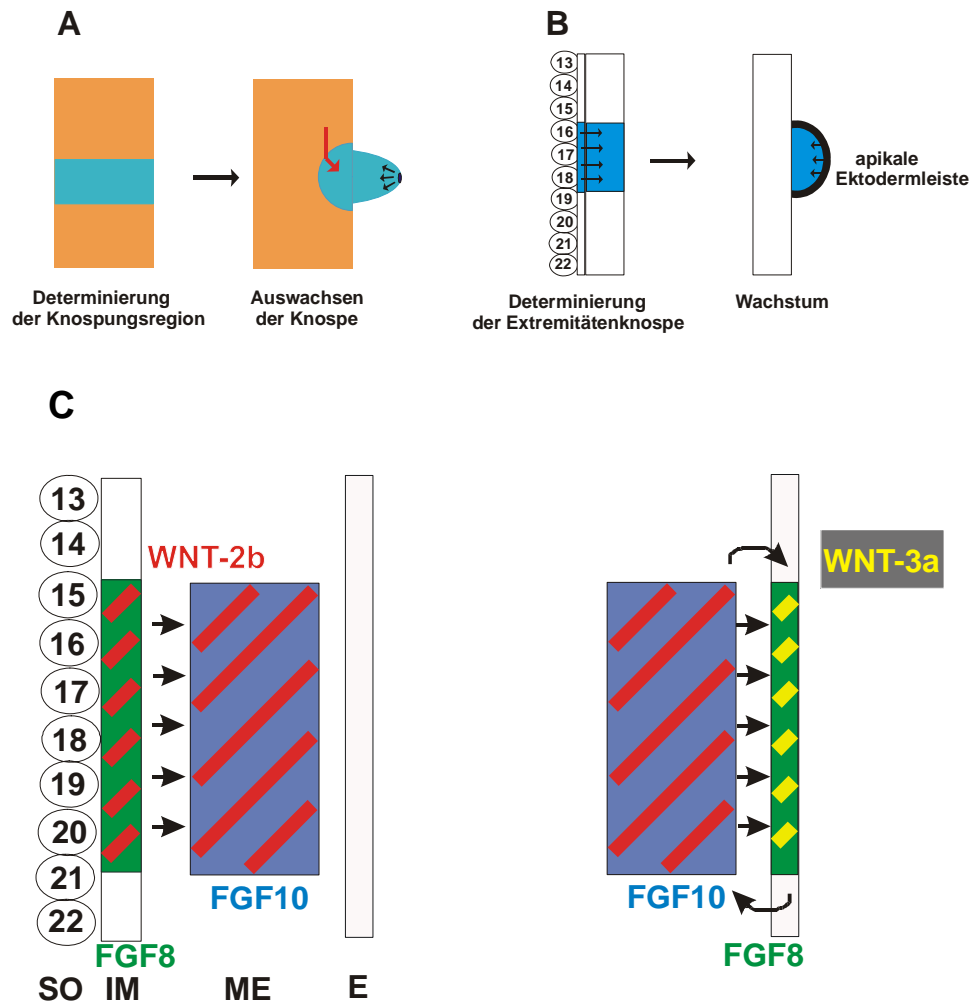


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der frühen Knospung bei Hydra im Vergleich zur Entwicklung der Extremitätenknospe beim Huhn. (A) Frühe Knospung bei Hydra. Die Knospungsregion (blau) wird durch unbekannte Faktoren determiniert. Das Auswachsen der Knospe wird durch den Organisator (schwarz und Pfeile) an der Knospenspitze gesteuert. Der rote Pfeil symbolisiert die Einwanderung von Zellen in die Knospungsregion. (B) Frühe Extremitätenknospe beim Huhn. Die Extremitätenknospe (blau) wird im mesenchymalen Ektoderm determiniert. Die apikale Ektodermleiste (schwarz und Pfeile) organisiert das Wachstum der Knospe. (C) Vereinfachtes Modell der frühen Extremitätenbildung bei Vertebraten (Abbildung modifiziert nach: Kawakami et al., (2001) und Martin (2001)). Während der Induktion werden *FGF8* und *Wnt-2b* (für die vorderen Gliedmaßen, die Induktion der hinteren Gliedmaßen erfolgt unter Beteiligung von *Wnt-8c*) im intermediären Mesoderm exprimiert. Daneben findet man *Wnt-2b* auch im mesenchymalen Mesoderm. *WNT-2b*-Signale, die über β -Catenin vermittelt werden, induzieren und erhalten die Expression von *FGF10* in der Region des mesenchymalen Mesoderms, wo sich die Extremitätenknospe bildet. Durch *FGF10* wird die Expression von *Wnt-3a* induziert, das wiederum die Aktivität von *FGF8* stimuliert. Es kommt zu einer positiven Rückkopplung bei der sich *FGF10* und *FGF8* gegenseitig aktivieren.

4.2.4 Die Inhibition von Kringelchen verhindert spezifisch die Knospenablösung

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Experimente zur Inhibition von Kringelchen durchgeführt und mittels Inkubation von Polypen mit dem FGFR-Inhibitor SU5402 die Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors biochemisch blockiert. Die Ergebnisse dieser Experimente weisen allerdings auf eine weniger komplexe Funktion von Kringelchen während der Knospung hin als durch die *in situ*-Hybridisierung suggeriert wird. Nur die Ablösung der Knospe war von der Inhibition betroffen.

Allerdings könnte dies auch dadurch erklärt werden, dass in den frühen Phasen der Knospung eine Inhibition von Kringelchen im Bereich des Kopforgansators durch redundante Signalwege kompensiert werden könnte. Folgt man dem oben beschriebenen Modell (Abb. 4.2) so würde durch Aktivierung von Kringelchen und PLC γ /PKC eine Inhibition von HyGSK3 erreicht, ein Effekt, der auch über HyDsh erzielt würde. Im Gegensatz dazu scheint eine Aktivität von Kringelchen für die Knospenablösung essentiell zu sein.

Die Interpretation der Inhibitions-Experimente durch SU5402 setzt allerdings voraus, dass dieser Inhibitor in Hydra genauso spezifisch auf Kringelchen wirkt, wie es für FGF-Rezeptoren höherer Organismen der Fall ist. Bei Hydra kann eine Inhibition der Knospenablösung auch durch weniger spezifische Protein/Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Genistein, Staurosporin und H-7 erreicht werden (Fabila et al., 2002; Perez und Berking, 1994). Den gleichen Effekt erzielen allerdings auch Aktivatoren von PKC, wie z.B. DAG und TPA (Müller, 1989; Perez und Berking, 1994; De Petrocellis et al., 1991). Und selbst eine Behandlung mit Lithium verhindert die Ablösung der Knospe (Hassel und Berking, 1990). LiCl kann über Hemmung von GSK3 die Wnt-Kaskade beeinflussen und wirkt auch auf PKC: Hassel und Bieller (1996) konnten zeigen, dass die Applikation von Lithiumchlorid bei Hydra dosisabhängig mit einer Aktivierung oder Inhibition des Phosphatidyl-Inositol-Zyklus (PI-Zyklus) korreliert ist. Dies kann über verschiedene Zwischenschritte Einfluss auf die Aktivität von PKC nehmen (Alberts et al., 1994). Diese Daten zeigen, dass unspezifische Inhibitoren für Protein-/Tyrosinkinase mit der Knospenablösung interferieren und dass möglicherweise auch PKC eine Rolle im Ablösungsprozess spielt.

Es sprechen allerdings einige Argumente dafür, dass die über Inkubation mit SU5402 erzeugten Effekte spezifisch auf die Inhibition von Kringelchen zurückzuführen sind. Zum einen ist die Spezifität von SU5402 für die bisher untersuchten FGF-Rezeptoren sehr hoch (Mohammadi et al., 1997). Nur der PDGF-Rezeptor reagiert *in vitro* schwach auf SU5402-Behandlung (Mohammadi et al., 1997), die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) liegt mit 60 μ M deutlich höher als bei FGF-Rezeptoren (10 μ M).

Die Inhibition von FGF-Rezeptoren wird durch neun konservierte Aminosäuren in der Tyrosinkinasedomäne vermittelt (Mohammadi et al., 1997). Acht dieser Aminosäuren sind bei Kringelchen vorhanden (Abb. 4.4), bei nicht inhibierbaren Rezeptortyrosinkinasen (außer VEGFR) fehlen mindestens zwei dieser Aminosäuren. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass SU5402 mit der Tyrosinkinasedomäne von Kringelchen interagieren kann und somit die Signaltransduktion über diesen Rezeptor blockiert.

Kringelchen	LETDCLLGEGAFGRVFRATARDLPNHTG--VQTVAVKMLKEDCCEQDLKDFISEIEVMKS	
hFGFR1	LVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSDLISEMEMMKM	
hPDGFR	LVLGRTLGGGAFGQVVEATAHGLSHSQA--TMKVAVKMLKSTARSSKQALMSELKIMSH	
hINSR	ITLLRELGGSGFGMVYEGNARDI IKG--EAETRVAVKTVNESASLRERIEFLNEASVMKG	
hEGFR	FKKIKVLGGGAFGTVYKGLWIPEGEK---VKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMAS	
hVEGFR	LKLGKSLGRGAFGKVVQASAFGIKKSPT--CRTVAVKMLKEGATASEYKALMTELKILTH	
Kringelchen	IGKHINILNLLAVSSQQG-KLYIVVEYCRHGNI LRSFLKD-----	: 569
hFGFR1	IGKHKNILNLLGACTQDG-PLYVIVEYASKGNLREYLQA-----	: 572
hPDGFR	LGPLNVDNLLGACTKGG-PIYIITEYCRYGDLVDYLHRNKHTFL	: 716
hINSR	FTCHH-VVRL LGVVSQKQ-PTLVVMEELMAHGDLKSYLRS-----	: 1128
hEGFR	V-DNPVHCRL LGICLTS--TVQLITQLMPFGCLLDYVREH-----	: 805
hVEGFR	IGHHLNVDNLLGACTKQGGPLMVI VEYCKYGNLSNYLKSKRDLFF	: 969

Abb. 4.4: Sequenzalignment der SU5402-Bindestelle von hFGFR1. Die Aminosäuren, die die Bindung an den Inhibitor vermitteln, sind markiert. Kringelchen: Hydra-FGFR (*Accession number*: AY193769); hFGFR1: humaner FGFR1 (*Accession number*: P11362); hPDGFR: humaner „platelet derived growth factor receptor“ (*Accession number*: NP_002600); hINSR: humaner Insulin-Rezeptor (*Accession number*: Gi:4557884), hEGFR: humaner „epidermal growth factor receptor“ (*Accession number*: Gi:29725609), hVEGFR: humaner „vascular endothelial growth factor receptor“ (*Accession number*: AAC16449).

Für eine spezifische Inhibition von Kringelchen durch SU5402 sprechen auch die Ergebnisse, die durch die Elektroporation von Antisense-Oligonukleotiden, die gegen *kringelchen* gerichtet waren, gewonnen wurden. Durch dieses Experiment wurde spezifisch die Translation von Kringelchen-Protein verhindert. Da die durch Antisense-Oligonukleotide hervorgerufenen Phänotypen denen glichen, die aus der Inhibitor-Behandlung resultierten, ist davon auszugehen, dass die Knospenablösung in den mit SU5402-behandelten Polypen in der Tat auf eine Inhibition von Kringelchen zurückzuführen ist. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass weder Southern- noch Northern Blot-Analysen noch die Ergebnisse von Datenbankrecherchen einen Hinweis auf einen weiteren FGF-Rezeptor bei Hydra gaben.

Durch die Inhibition von Kringelchen entstanden verzweigte Polypen, die keinen oder zumindest keinen korrekt ausgebildeten Fuß an der Knospenbasis aufwiesen (Abb. 3.12, 3.14). Es war keine morphologische Abgrenzung von Elterntier und Knospe zu erkennen. Im Gegensatz dazu kam es bei Kontrolltieren mit Beginn des Ablösungsprozesses zu einer Einschürung an der Knospenbasis, wodurch eine morphologische Grenze entstand (Berking,

1977). Entlang dieser Grenze bildete sich die Basalscheibe des Fußes aus, was Voraussetzung für eine Ablösung ist (Berking, 2003). Bei den Kringelchen-inhibierten Tieren sah es so aus, als habe die Inhibition eine klare Abgrenzung zwischen der Knospe und dem Gewebe des Elterntieres verhindert.

Für diese Hypothese spricht, dass die Ausbildung von Gewebegrenzen eine wichtige Aufgabe von FGF-Rezeptoren darstellt. Dubrulle und Pourquie (2002) zeigten, dass Signalübertragung via FGFR während der Somitenentwicklung beim Huhn für die Positionierung der Grenzen zwischen den einzelnen Somiten verantwortlich ist. Gleiches gilt bei der Somitogenese von Zebrafisch: Eine Inhibition von FGFR1 führt zu einer Verschiebung der Somitengrenze nach posterior, wodurch größere Somiten entstehen (Sawada et al., 2001). Bei Vertebraten wird FGFR1 während der Gehirnentwicklung an der Grenze zwischen Rhombencephalon und Mittelhirn exprimiert (Trokovic et al., 2005). Ohne FGFR1 findet keine strikte Abgrenzung beider Kompartimente statt. Eine ähnliche Funktion hat das FGFR-ähnliche Protein *NouDarake*, in der Entwicklung von *Dugesia*. Ein „*Knock-Out*“ von *NouDarake* führte zu einer Verschiebung der Gehirnstrukturen nach posterior, die Ausbildung von Grenzen innerhalb des Gehirns war gestört (Cebria et al., 2002). Diese Daten zeigen, dass das Etablieren von Grenzen eine Funktion von FGFR in triploblastischen Organismen ist. Diese Aufgabe wird in der Knospung bei Hydra möglicherweise von Kringelchen übernommen.

4.2.5 Kringelchen wird möglicherweise durch eine autokatalytische Rückkopplung reguliert

Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die Inhibition von Kringelchen im größeren Kontext hat. Die Inhibitionsexperimente zeigten, dass Kringelchen zwischen Knospenstadium 3 und 7 inhibiert werden musste, um die Ablösung der Knospe zu verhindern. Verzweigte Polypen, die nach Inhibition ihre Knospe nicht ablösten, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Tieren ein verändertes Expressionsmuster von *kringelchen* an der Knospenbasis: Entweder waren an dieser Stelle keine Transkripte nachweisbar oder sie konnten nur in einem kleinen, fleckenförmigen Areal detektiert werden (Abb. 3.12, 3.14). In unbehandelten Tieren dagegen fand man ab Knospenstadium 5 ein ringförmiges Expressionsmuster von *kringelchen* an der Knospenbasis (Abb. 3.9). Eine Inhibition von Kringelchen wirkte sich also negativ auf die eigene Transkription aus. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der fehlenden Transkription an der Knospenbasis von Inhibitor-Tieren kein Hydra-Rezeptor vorhanden ist, dessen Aktivität blockiert werden kann. Aus dieser Beobachtung resultierte die Hypothese, dass die Aktivierung von Kringelchen über eine positive Rückkopplung die eigene Expression stimuliere. Ohshiro et al. (2002)

postulieren, dass ein positiver Rückkopplungsmechanismus an der Regulation von *Breathless* während der Tracheenentwicklung bei *Drosophila* beteiligt ist. Sie zeigten, dass *breathless* zu den Zielgenen gehört, die durch Signalübertragung über *Breathless* und *Branchless* aktiviert werden, und vermuten, dass durch Genregulation über positive Rückkopplung die Grundlage für eine kontinuierliche Rezeptorproduktion in den Tracheenzellen geschaffen wird. Auch bei der Gliedmaßenentwicklung von Vertebraten hat Signalübertragung durch FGF/FGFR einen positiven Effekt auf die Transkription von FGF- bzw. FGFR-codierenden Genen (Hajihosseini et al., 2004; Kim et al., 1998; Liu et al., 2003). Allerdings wurde hier eine direkte Rückkopplung wie bei *Breathless* nicht nachgewiesen.

Eine positive Rückkopplung in der Regulation von *kringelchen* könnte wie folgt funktionieren (Abb. 4.5): RT-PCR-Experimente zeigten, dass *kringelchen* auf sehr geringem Niveau, unterhalb der Nachweisgrenze für *in situ*-Hybridisierung, im ganzen Körper von Hydra exprimiert wird (Abb. 3.10). In der Knospungsregion würde eine lokale Aktivierung der Rezeptoren zu einer Hochregulation von *kringelchen* in den Expressionsdomänen führen, die durch *in situ*-Hybridisierung detektiert werden. Durch die Inhibition von *Kringelchen* ab Knospenstadium 3 würde diese Rückkopplung unterbrochen werden. Die Ausbildung der Expressionsdomäne an der Knospenbasis, die in unbehandelten Tieren ab Knospenstadium 5 durch *in situ*-Hybridisierung nachweisbar ist, wäre verhindert, was zur Folge hätte, dass kein Rezeptor-Protein gebildet würde. Nach dieser Hypothese würde die Inhibition von *Kringelchen* letztlich zu einer Abwesenheit des Proteins führen. Die Hypothese besitzt allerdings nur dann Gültigkeit, wenn der *Kringelchen*-Rezeptor tatsächlich dort lokalisiert ist, wo er aufgrund des Expressionsmusters vermutet wird. Die Ergebnisse aus der *in vivo*-Bindung von aFGF an Hydra (Abb. 3.24) deuten darauf hin, dass aFGF bindendes Protein in einigen Phasen der Knospung dort vorhanden ist, wo *kringelchen* exprimiert wird. Ob dieses Protein *Kringelchen* ist, muss aber durch Kollokalisierung mittels Antikörpern verifiziert werden.

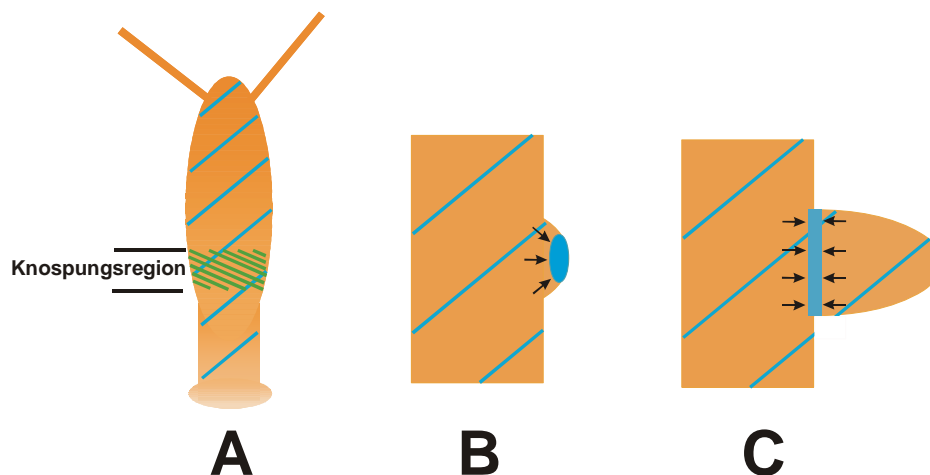


Abb. 4.5: Hypothese der positiven Rückkopplung in der Regulation der *kringelchen*-Expression (schematische Darstellung). (A) In knospungslosen Polypen wird *kringelchen* auf geringem Niveau im gesamten Körper exprimiert, was durch die blauen Streifen angedeutet wird. In grün ist die Expressionsdomäne von *HyWnt* in der Knospungsregion dargestellt. (B) Bei der Knospung wird *Kringelchen* aktiviert (Expressionsdomäne: blau), wodurch die Expression des codierenden Gens über positive Rückkopplung stimuliert würde. (C) Die Expressionsdomäne von *kringelchen* an der Knospungsregion bildet sich ab Knospungsstadium 4 aus. Auch dabei käme es nach Aktivierung der vorhandenen Rezeptoren zu einer autokatalytischen Hochregulation der Genexpression.

Eine Inhibition von *Kringelchen* hat ausschließlich Auswirkung auf die Knospungsablösung, weder das Auswachsen der Knospe noch die Entwicklung von Regeneraten werden beeinflusst. Die oben erwähnten Koexpressionsgruppen (siehe 4.2.2) deuten darauf hin, dass in den Frühphasen von Knospung und Aggregatentwicklung, sowie im Bereich des Kopforganisators ein Zusammenspiel von *Kringelchen* mit der kanonischen Wnt-Signalkaskade erfolgen könnte, bei dem die Signalübertragung über den Hydra-FGF-Rezeptor und die Aktivierung von HvPKC eine Inhibition von HyGSK3 verstärken könnte. In einem solchen Szenario wäre die Aktivität von *Kringelchen* nicht essentiell für einen korrekten Ablauf der Kopfbildung, da die Hemmung von HyGSK3 auch über die Wnt-Kaskade erfolgen könnte.

Im Bereich der Knospungsregion und im Verlauf der Fußregeneration kommt es wahrscheinlich zu einer Interaktion mit anderen Faktoren, wodurch möglicherweise eine *Kringelchen*-abhängige Induktion des Tenascin-ähnlichen Gens *k10-7* (Hotz, in Vorbereitung) erfolgt, das - wie bei Vertebraten berichtet (Suzuki et al., 2002; Rouzankina et al., 2004; Midwood und Schwarzbauer, 2002) - als Zelladhäsionsmodulator fungieren und somit in die Abgrenzung des Knospengewebes vom Elterntier involviert sein könnte. Möglicherweise ist *k10-7* beteiligt an den Veränderungen der Zellform, wie sie bei der Entwicklung des Fußgewebes in Hydra stattfinden (Thomsen et al., 2004). Bei Vertebraten konnte nachgewiesen werden, dass Tenascin Einfluss auf das Cytoskelett nehmen und somit an der Regulation der Zellform mitwirken können (Midwood und Schwarzbauer, 2002).

Ein weiteres mögliches Zielgen stellt *CnNk2* dar, das für einen Transkriptionsfaktor codiert, der eine zentrale Rolle in der Steuerung der Fußbildung einnimmt (Grens et al., 1996; Thomsen et al., 2004). Die korrekte Expression von CnNK2 ist wichtig für die Regeneration und Differenzierung von Fußstrukturen und wird für die Herabsetzung des Positionswertes während der Fußbildung verantwortlich gemacht (Grens et al., 1996; Thomsen et al., 2004). Die Vermutung liegt nahe, dass Kringelchen über zwei unterschiedliche „Downstream-Signalwege“ wirkt, wobei eine Inhibition des Rezeptors im Bereich des Kopforanistrators - möglicherweise durch die kanonische Wnt-Kaskade - kompensiert werden könnte, während eine fehlende Signalweiterleitung über Kringelchen im Verlauf der Knospenablösung und der daran gekoppelten Fußbildung nicht durch redundante Signalwege ausgeglichen werden kann. Dies wird unterstützt durch die Expression von *HvFGF*, einem möglichen Liganden für Kringelchen: Das Hydra-FGF wird nie im Bereich des Kopforanistrators exprimiert, die Aktivierung von Kringelchen muss an diesem Ort über einen anderen Liganden erfolgen. Dagegen erscheint aufgrund der Expressionsmuster eine Koloaliation von HvFGF und Kringelchen im Bereich der Knospenbasis und an der Ablösestelle im Elterntier durchaus möglich, so dass es hier zu einer Interaktion kommen könnte. Es erscheint also wahrscheinlich, dass der Hydra-FGF-Rezeptor verschiedene Liganden binden kann, was darauf hindeutet, dass weitere FGF-ähnliche Proteine in Hydra existieren. In der Koralle *Acropora* wurden im Zuge eines EST-Projektes bis jetzt drei FGF-ähnliche Proteine isoliert (D. Miller, persönliche Mitteilung), bei der Seeanemone *Nematostella* sind sogar fünf bekannt (U. Technau, persönliche Mitteilung) so dass auch bei Hydra zu erwarten ist, dass mehr als ein FGF existiert.

Die meisten FGFR-Isoformen der Vertebraten sind ebenso wie der *Drosophila*-FGF-Rezeptor Heartless mit seinen Liganden Pyramus und Thisbe in der Lage verschiedene FGF zu binden (Dailey et al., 2005). Die räumliche und zeitliche Expression der verschiedenen Liganden sorgt in der Regel für die zielgenaue Aktivierung der FGFR über die dann unterschiedliche zelluläre Prozesse induziert werden können (Dailey et al., 2005). Auch für die Aktivierung von Kringelchen kann angenommen werden, dass durch verschiedene Liganden unterschiedliche Reaktionen auf Zellebene induziert werden.

4.2.6 Die Expression von *kringelchen* steht im Zusammenhang mit der Änderung des Positionswertes

Die Inhibitionsexperimente haben gezeigt, dass Kringelchen für die Knospenablösung von zentraler Bedeutung ist. Andere Phasen der Knospung wurden durch diese Versuche aber nicht beeinflusst: Weder beim Auswachsen der Knospen noch in der Differenzierung von Kopf- oder Fußstrukturen konnten Veränderungen beobachtet werden. Dies steht im klaren

Gegensatz zu dem Expressionsmuster von *kringelchen*. Auch wenn bisher Antikörper-Daten fehlen, die zeigen, wo das Protein lokalisiert ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass die hochdynamisch regulierte Expression dieses Gens in allen Phasen der Knospung ohne Bedeutung für den Knospungsprozess sein soll. Die Analyse der Expression von *kringelchen* während der Regeneration und der Entwicklung von Polypen aus Einzelzellaggregaten gab Hinweise auf weitere Funktionen dieses Gens.

Es zeigte sich, dass die Expression von *kringelchen* im Verlauf des Knospungsprozesses an den Orten nachweisbar ist, wo eine Veränderung des Positionswertes stattfindet bzw. wo die Organisation von angrenzendem Gewebe erfolgen muss.

Der Positionswert ist eine interne Information anhand der die Zellen ihre relative Lage im Körper von Hydra erkennen können (Gierer und Meinhardt, 1972) und stellt eine entscheidende Größe für die Differenzierung von Kopf- und Fußstrukturen dar: Während der Knospung und der Regeneration kann nur ein Kopf gebildet werden, wenn der Positionswert des apikalen Gewebes hoch genug ist, während die Fußbildung eine Verminderung dieses Wertes voraussetzt (Müller, 1993). Welches molekulare Signal diesen Positionswert vermittelt, ist bisher nicht bekannt.

Während Knospung und Kopfregeneration wurde *kringelchen* im Bereich des Kopfforganisators exprimiert, bis es zu einer Differenzierung von Kopfstrukturen kam: Sobald die ersten Tentakelansätze sichtbar wurden und der Positionswert so weit erhöht worden war, dass eine Kopfbildung erfolgen konnte, wurde das Gen deaktiviert. Auch bei der Ausbildung von Fußstrukturen wurde *kringelchen* nur so lange transkribiert, wie der Positionswert am basalen Ende von Fußregenerat oder Knospe vermindert wurde. In den differenzierten Fußstrukturen, die einen minimalen Positionswert besitzen, ist das Gen nicht mehr aktiv, wohl aber transient im Elterntier, wo die die Ablösestelle umgebenden Zellen sich erst wieder in den Gewebeverband einfügen müssen. Folgt man dem Modell von Berking (2003) zur Musterbildung bei Hydra (siehe 2.2.2.5), so steht auch die ringförmige Expression an der Ablösestelle der Knospe mit einer Änderung des Positionswertes im Zusammenhang. Hiernach muss für eine Knospenablösung in einem Ring von Zellen an der Knospenbasis der Positionswert verringert werden, damit die Fußbildung möglich wird. Dann könnte die Knospenablösung dadurch erfolgen, dass ein Ring von Zellen an der Knospenbasis mit der darauf sitzenden Knospe vom Elterntier abgestoßen wird, ähnlich wie beim Zellverlust, der an den Körperenden von Hydra stattfindet (Campbell, 1973b). Eine Ablösung der Knospe durch Apoptose von Zellen kann dagegen ausgeschlossen werden, denn weder durch Acridinorange-Färbung (Daten nicht gezeigt), noch durch einen TUNEL- Assay (Stefanie Seipp, persönliche Mitteilung) konnten apoptotische Zellen in diesem Bereich nachgewiesen werden.

Nach der Knospenablösung bliebe der Positionswert des parentalen Gewebes, das vorher mit der Knospe verbunden war, zunächst erniedrigt. Tatsächlich lassen sich in dieser Region Nervenzellen nachweisen, die eigentlich spezifisch für die Stilregion des Fußes von Hydra mit niedrigem Positionswert sind (Berking, 2003). Demnach würde die Expression von *kringelchen* so lange erhalten bleiben, bis die Zellen an der Ablösestelle ihren Positionswert dem des umliegenden Gewebes angeglichen haben.

Es zeigt sich, dass die Expression von *Kringelchen* dort nachweisbar ist, wo sich der Positionswert verändert. Damit unterscheidet sich die Aktivität dieses Gen von der anderer Musterbildungs-relevanter Gene: *HyWnt*, *Hyβ-cat* und *HyTcf* (Hobmayer et al., 1996; Hobmayer et al., 2000) werden, ebenso wie *HyBra1*, (Technau und Bode, 1999), während Knospung und Regeneration schon früh im Bereich des Kopforganisators exprimiert und bleiben es auch im ausdifferenzierten Kopf zeitlebens an der Stelle, die den maximalen Positionswert erreicht. Auch die meisten Gene, die an der Fußregeneration und der Fußbildung im Zuge der Knospung beteiligt sind, bleiben im ausgebildeten Fuß aktiv (Grens et al., 1996; Hoffmeister, 1996; Hoffmeister-Ullerich, 2001; Bridge et al., 2000). Diese Genaktivität ist möglicherweise bedingt durch den ständigen Verlust von Zellen an den Körperenden von Hydra und die kontinuierliche Produktion von Zellen, die in Richtung Kopf oder Fuß verlagert werden und dort zu kopf- bzw. fußspezifischen Zellen differenzieren (siehe 2.2.2.1). Nur durch ihre ständige Erneuerung können Kopf- und Fußstrukturen trotz des permanenten Zellverlustes erhalten bleiben (Campbell, 1967b; Campbell, 1973b). An den Differenzierungsprozessen, die dieser Erhaltung dienen, ist *kringelchen* nicht beteiligt, ansonsten müsste dieses Gen auch in adulten Tieren exprimiert werden. Die Funktion von *kringelchen* steht also im direkten Zusammenhang mit der Neubildung von Strukturen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die *kringelchen*-Expression in Aggregaten, die dissoziierten Einzelzellen entstammen und vollständige Polypen bilden (Gierer et al., 1972). In diesen Aggregaten laufen alle Musterbildungsprozesse wie Achsenbildung oder Kopf- und Fußbildung *de novo* ab, wobei allerdings auch die Sortierung von Zellen eine Rolle spielt (siehe 2.2.2.3). In den zu Beginn kugelförmigen Aggregaten existiert zunächst keine Polarität. Innerhalb von 24 Stunden findet ein Adhäsions-vermitteltes, differentielles Aussondern von Zellen statt, wodurch eine zweischichtige Kugel, bestehend aus Ektoderm und Entoderm gebildet wird (Technau et al., 2000). Erst nachfolgend entstehen Kopf- und Fußstrukturen. Die sich formierenden Köpfe organisieren eine neue Körpersäule, und schließlich lösen sich intakte Polypen von den Zellaggregaten ab.

4.2.7 *kringelchen*, *Hybra1* und die Gene der kanonischen Wnt-Signalkaskaden werden einem mathematischen Modell entsprechend in Aggregaten koexprimiert

Wie bei Kopf- und Fußregeneraten wurde *kringelchen* auch in den Aggregaten dort exprimiert, wo sich Kopf oder Fuß entwickelten. Während das Gen in Regeneraten erst nach 16-18 Stunden, also in der Phase der Determinierung von Kopf- und Fußstrukturen aktiviert wurde (Abb. 3.15, 3.18), war es in Aggregaten bereits in der zweischichtigen Hohlkugel ubiquitär exprimiert (Abb. 3.20). Zunächst bildeten sich diffus über das Aggregat verteilt kleine Flecken als Orte vermehrter Expression. Von ihnen blieben nur wenige Zentren mit verstärkter Expression bestehen, aus denen sich im weiteren Verlauf der Entwicklung Kopf- oder Fußstrukturen ausbildeten. Eine mögliche Erklärung für dieses Expressionsmuster bietet ein mathematisches Modell, das sich mit der Neubildung von Organisator-Regionen befasst (Meinhardt, 2000). Als Organisator wird eine Gruppe von Zellen bezeichnet, die in der Lage ist, das Schicksal des umgebenden Gewebes zu kontrollieren. In Aggregaten, in denen die einzelnen Zelltypen gleichmäßig verteilt sind, also keine Polarität oder Symmetrie vorliegt, müssen solche Organisator-Regionen *de novo* gebildet werden. Dies kann nach Meinhardt (2000) nur durch das Zusammenspiel eines autokatalytisch aktivierbaren, kurzreichweitigen Aktivators mit einem Inhibitor, der über größere Entfernungen wirksam ist, erfolgen. Dabei wird die Produktion des Inhibitors vom Aktivator kontrolliert, während der Inhibitor wiederum die Produktion des Aktivators abschwächt (siehe 2.2.2.5). In einem solchen Modell ist eine homogene Verteilung der Substanzen instabil. Kleinste Erhöhungen der Aktivatorkonzentration führen durch Autokatalyse zu einer Zunahme dieser Substanz. Gleichzeitig wird ein Überschuss des Inhibitors produziert, der im umliegenden Gewebe die Bildung des Aktivators inhibiert. Erst wenn Aktivator und Inhibitor in einem dynamischen Gleichgewicht vorhanden sind, kommt es zu einem stabilen, sich selbst regulierendem Muster. Die Zentren, an denen die Aktivatorkonzentration maximal ist, agieren dann als Organisatoren (Meinhardt, 2000; Meinhardt, 1996). Das Expressionsmuster von *kringelchen* in Aggregaten korreliert mit diesen Annahmen: Die zunächst ubiquitär auftretende Expression verstärkte sich in willkürlich über das Aggregat angeordneten kleinen Flecken. Dieses Expressionsmuster war nicht stabil. Erst die Zentren mit verstärkter Expression blieben bestehen und führten zur Ausbildung von Kopf oder Fuß. Diese Beobachtung legt nahe, dass *kringelchen* während der Neubildung von Organisator-Regionen transkribiert wird.

4.3 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte Kringelchen aufgrund seiner strukturellen Merkmale eindeutig in die FGFR-Proteinfamilie eingeordnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor essentiell ist für die korrekte Ablösung der Knospe vom Elterntier. Die Expression von *kringelchen* wurde bei verschiedenen Musterbildungsprozessen im Detail untersucht. In weiteren Analysen sollte jetzt das Kringelchen-Protein in den Mittelpunkt gerückt werden.

Offen ist noch immer die Frage, ob die Expressionsdomäne des Gens mit der Lokalisation des Rezeptors bei Hydra übereinstimmt. Dies muss über immunhistochemische Untersuchungen mit geeigneten Antikörpern geklärt werden. Zu diesem Zweck sind bereits neue Antikörper gegen zwei Peptide aus dem Bereich D3 bzw. dem C-Terminus von *kringelchen* hergestellt worden.

Auch fehlt bislang der sichere Nachweis, dass Kringelchen wie ein FGFR funktioniert, also über die Bindung eines FGF-Liganden aktiviert wird und daraufhin *Downstream*-Signalwege induziert. Dies könnte über Experimente an Baf3-Zellen gezeigt werden: Diese Zellen besitzen keine FGF-Rezeptoren und können nur in Anwesenheit von Interleukin B wachsen. Wird allerdings ein FGF-Rezeptor zur Expression gebracht und das Medium mit FGF angereichert, so ist ein Interleukin-unabhängiges Wachstum möglich (Ornitz et al., 1996). Sollte dieser Effekt auch durch die Expression von Kringelchen erreicht werden, kann man davon ausgehen, dass der Hydra-Rezeptor in diesem Zellkultursystem wie ein FGFR funktioniert. Sollte durch Kringelchen kein Interleukin-unabhängiges Wachstum erreicht werden, so könnten über Expression von Chimären (z.B. extrazelluläre Domäne von Kringelchen und intrazelluläre eines hFGFR oder umgekehrt) einzelne Regionen des Hydra-FGFR auf ihre Funktionalität hin untersucht werden.

In diesem Zellkultursystem wäre es auch möglich, zu untersuchen, ob HvFGF in der Lage ist, mit Kringelchen zu interagieren. Dazu müsste im Vorfeld die vollständige cDNA von *HvFGF* isoliert werden, um das Protein exprimieren zu können. Eine Anreicherung des Mediums von Kringelchen-exprimierenden BAF3-Zellen mit rekombinanten HvFGF wird ein Interleukin-unabhängiges Wachstum bewirken, sofern es zu einer Bindung kommt.

Neben der Charakterisierung des Proteins sollte versucht werden, nachgeschaltete Signalwege von Kringelchen aufzuklären. Dies könnte geschehen, in dem man – mit Hilfe der Daten aus dem EST- und dem Genomprojekt- solche Gene aus Hydra isoliert, deren Homologe in Vertebraten an FGF/FGFR-Signalübertragungsprozessen beteiligt sind, z.B. *sprouty* und *sef* (seit kurzem bei uns von T. Rentrop untersucht), die als Antagonisten wirken (Thisse und Thisse, 2005) oder *flrt*, ein Protein, das in *Xenopus* die Aktivität des FGFR verstärkt (Böttcher und Niehrs, 2005). Die Analyse ihrer Expressionsmuster in

unbehandelten Polypen und in Tieren, in denen Kringelchen-Signalübertragung inhibiert wurde, könnte einen ersten Hinweis darauf geben, ob diese Gene auch bei Hydra in FGFR-Signalübertragung involviert sind. Von besonderem Interesse wäre die Isolierung von *FRS*- oder *Dof*-ähnlichen Genen aus Hydra. Bei Vertebraten ist FRS essentiell für die FGFR-abhängige Aktivierung des ras/MAPK-Kinase-Signalweges, bei *Drosophila* wird diese Aufgabe von Dof übernommen. Bei allen anderen Invertebraten ist bislang unklar, welches Protein diese Kopplung übernimmt. Über die Analyse von FRS- und Dof-ähnlichen Proteinen könnte möglicherweise ein „ursprüngliches“ Adapterprotein für FGFR identifiziert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Versuchstiere

Für alle Versuche wurde *Hydra vulgaris* (P. Tardent, Zürich) verwendet.

5.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> M15	Qiagen
<i>E. coli</i> DH10 bac	GIBCO

5.1.3 Insektenzelllinien

SF9	GIBCO
-----	-------

5.1.4 Vektoren

pBluescript SK(+/-)	Stratagene
pQE-30, 31, 32	Qiagen
pFastbac	GIBCO

5.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys (vormals ARK) synthetisiert.

Bezeichnung	5' → 3'
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
Kring 1	ACGCGTCGACATGATATCAGATTGGTGTGTT
Kring6-BamHI	CGCGGATCCAATGAAGAATCTGTTCAAAGGG
Kring7-BamHI	CGCGGATCCTTCTCTAAACCAATAGTATCTTC
KriQE-Ex	ATATCAGATTGGTGTGTTG
Kring2-pVL	CTAGCATACGGATTCCTCTTTGTAG
KriQE-In	CTTGCTGGGCTAATTTTTG
KriQE2	CTAAGAAGAATATCTGCTTC
SL-A	CAAACCTTCTATTTTCTTAATAAAG
SL-B	AAATAGTCCCTGTGTAATAAG
HvFGF151-130	GTTTCGACAATACAACAATGC
HvFGF365-385	TCTATTATTATCTGGAGAAAGGAG

5.1.6 DNA- und RNA-Größenstandards

DNA-Marker: λ /HindIII	MBI Fermentas
pBR322/MspI	MBI Fermentas
RNA-Marker: RNA High Range	MBI Fermentas
Protein-Marker: Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas

5.1.7 Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Promega
CIAP (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme	Amersham, Roche, MBI Fermentas
Sequenase	Amersham
T4 Ligase	Roche
T3 RNA-Polymerase	Roche
T7 RNA-Polymerase	Roche
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega

5.1.8 Antikörper und Seren

	Firma	Bestellnummer
Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment	Roche	1093274
anti-FGFR1 IgG	Sigma	F 5421
anti-Kaninchen IgG (alkalische Phosphatase-gekoppelt)	Dianova	111-055-003
anti-Kaninchen IgG (Meerrettichperoxidase gekoppelt)	Amersham	NIF824
anti-Kring _{Ex} Serum (polyklonal, IgG aus Kaninchen)	Eigenherstellung	
anti-Kring _{In} Serum (polyklonal, IgG aus Kaninchen)	Eigenherstellung	
anti-Maus IgG (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)	Amersham	NIF825
FKS	PAA	
RGS-Anti-His IgG	Qiagen	34698
Schafserum	PAA	

5.1.9 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Difco, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma in p.A.-Qualität bezogen. Die Radiochemikalien stammten von Amersham oder Hartmann.

5.1.10 Spezielle Chemikalien

Blocking Reagent	Boehringer Mannheim
BM Purple	Roche
BS ³	Pierce
BSA Fraktion V, pH 7, standard grade, lyophilisiert	Serva
DER (<i>diglycidyl ether of propylene glycol</i>)	Agar Scientific
ERL (<i>4-vinylcyclohexene dioxide</i>)	Polysciences
Euparal	Roth
Freund's Adjuvans, komplett	Sigma
Freund's Adjuvans, inkomplett	Sigma
NSA (nonenyl succinic anhydride)	Agar Scientific
NTA-Nickelagarose	Qiagen
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth
S-1 (<i>dimethylaminoethanol</i>)	Agar Scientific
SU5402	Calbiochem
Streptavidin	Calbiochem
Streptavidin-AP	Roche

5.1.11 Gebrauchsfertige Kits

Cycle Sequencing Kit	Amersham
EZ-Link [™] Iodoacetyl-LC-Biotin Kit	Pierce
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QuickPrep Micro mRNA Purification Kit	Amersham
Random DNA-Labeling Kit	MBI Fermentas
Subtractor Kit	Invitrogen
UltraLink [™] Iodoacetyl Kit	Pierce
ZAP-cDNA Synthesis Kit	Stratagene
ZAP Express-cDNA Synthesis Kit	Stratagene

5.1.12 Zellkulturmedien

Grace's Insektenmedium supplementiert	GIBCO
Grace's Insektenmedium nicht supplementiert	GIBCO

Spezielle Materialien

Protran® Nitrocellulose Transfer Membran (0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Whatman-Papier (3 mm)	Whatman-Biometra
Röntgenfilm: Hyperfilm	Amersham
BiodyneB-Membran	Pall
Microcon Centrifugal Filter Devices YM-10	Millipore

5.1.13 Spezielle Geräte

BioGridder	BioRobotics
Easyject Plus	Equibio
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA
Mikroskop TE2000-S	Nikon
Microtom 26690	Leitz
Reinstwassersystem Typ Ultra clear	SG
Semi-Dry Blot Apparatur	cti

5.1.14 Lösungen und Medien

Alle Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders verzeichnet, mit ddH₂O angesetzt.

Kulturmedium für *Hydra vulgaris*:

Die Lösungen A und B wurden 1:1000 mit Quellwasser (Labor Heidelberg) bzw. mit ddH₂O (Labor Marburg) verdünnt.

Lösung A (1000x Stammlösung):	147 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	7,5 g KCl
	20 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	ad 1l ddH ₂ O

Lösung B (1000x Stammlösung):	84 g/l NaHCO ₃
-------------------------------	---------------------------

Lösungen für Versuche an Hydra

Zitratpuffer (0,1 M):	65,5 ml 0,1 mM Zitronensäure
	34,5 ml 0,1 mM Natriumzitat

Dissoziationsmedium: 3,6 mM KCl
(modifiziert nach: Gierer, 1972) 6 mM CaCl x 2H₂O
1,2 mM MgSO₄ x 2H₂O
6 mM Na₃-Citrat
6 mM Na-Pyruvat
6 mM Glukose
12,5 mM TES
0,05 mg/ml Rifampicin
in Hydramedium, pH 6,9

Mazerationslösung: Glycerin: Eisessig: Wasser im Verhältnis
(modifiziert nach: David, 1972) 1:1:13

Medien für Arbeiten mit Bakterien und Phagen

NZY-Medium: 5 g NaCl
5 g Hefeextrakt
2 g MgSO₄ x 7 H₂O
10 g NZ-Amin (Casein Hydrolysat)
ad 1l, pH 7,5

NZY-Agarplatten : 1,5 g Agar in NZY-Medium

NZY-Topagarose : 0,7% Agarose in NZY-Medium

LB-Medium: 10 g Bactotrypton
5 g Hefextrakt
5 g NaCl
ad 1l, pH 7

SM-Medium: 5,8 g NaCl
2 g MgSO₄ x 7 H₂O
50 ml Tris-HCl, pH 7,5
5 ml 2% Gelatine
ad 1l

Medienzusätze wurden sterilfiltriert und den autoklavierten Medien in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

Ampicillin:	50 µg/ml
Kanamycin:	50 µg/ml
Tetracyclin:	12,5 µg/ml
IPTG:	0,5 mM
X-Gal:	40 µg/ml

Medien zur Kultivierung von SF9-Zellen

Vollmedium:	Grace's Insektenmedium supplementiert 10% FKS 50 U/ml Penicillin 50 U/ml Streptomycin
Transfektionsmedium:	Grace's Insektenmedium supplementiert ohne Zusätze

Lösungen zur Analyse von DNA

TBE (10x Stammlösung):	0,9 M Tris-Borsäure 20 mM EDTA pH 8,2
TE (1x):	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 1 mM EDTA
TENS:	0,1 M NaOH 0,5% SDS in TE lösen
Denaturierungslösung: (Southern Blot)	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung: (Southern Blot)	1 M Tris-HCl, pH 8 1,5 M NaCl

Denhardts (50 x):	5 g Ficoll 400 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml in ddH ₂ O
Hybridisierungslösung: (Southern Blot)	6 x SSC 5 x Denharts 0,5% SDS 50% Formamid 20 µg/ml Heringssperma-DNA
SSC (20 x):	3 M NaCl 0,15 M Natriumcitrat
SSPE (20 x):	3,6 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 20 mM EDTA

Lösungen zur Analyse von RNA

MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH7
RNA-Probenpuffer:	900 µl Formamid 100 µl MOPS-Puffer 161 µl Formaldehyd (37%) 20 µl Bromphenolblau (1%) 20 µl Xylencyanolblau (1%)

Lösungen für die *in situ*-Hybridisierung

Lösungen für das Arbeiten mit RNA wurden mit DEPC-behandeltem ddH₂O angesetzt.

DEPC-H ₂ O:	0,1% Diethylpyrocarbonat in ddH ₂ O über Nacht bei RT inkubieren, autoklavieren
------------------------	---

Blocklösung:	80% MAB-B 20% Schafserum
Hybridisierungslösung:	50% Formamid 5 x SSC 200 µg/ml Torula-RNA 0,1% Tween 20 0,1% CHAPS 1 x Denhardts 100 µg/ml Heparin
MAB:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
MAB-B:	MAB + 1% BSA
NTMT:	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,1% Tween
Fixans:	4% Paraformaldehyd (PFA) in Hydramedium
PBS:	150 mM NaCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ 21 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,34
PBT:	PBS + 0,1% Tween

Lösungen für die Analyse von Proteinen

Alkalische Phosphatase-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Block-Puffer:	45 ml 1 x PBS 0,5 ml FKS (fötales Kälberserum) 0,25 ml Tween 20 0,5 g BSA
Blot-Puffer:	48 mM Tris-HCl, pH 8,8 39 mM Glycin 0,0375% SDS 20% Methanol
Bradford-Reagenz:	100 mg Coomassie Blue G 250 in 50 ml 95% (v/v) Ethanol und 100 ml 85% (w/v) H ₃ PO ₄ lösen, ad 1l mit ddH ₂ O
ECL-A:	200 ml 0,1M TRIS-HCl (pH 8,6) 50 mg Luminol
ECL-B:	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
ECL-Arbeitslösung:	1 ml ECL-A 100 µl ECL-B 0,3 µl H ₂ O ₂ (30%)
Färbelösung (Coomassie):	160 ml Stammfärbelösung 40 ml Methanol
Laemmli-Laufpuffer (10 x):	250 mM Tris-HCl, pH 8,3 1,92 M Glycin 1% SDS

Laemmli-Probenpuffer (2 x):	2% SDS 20% Glycerin 2% β -Mercaptoethanol 20 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,04 M Bromphenolblau
Laemmli-Sammelgelpuffer:	1 M Tris-HCl, pH 6,8
Laemmli-Trenngelpuffer:	1 M Tris-HCl, pH 8,8
PBS (10 x):	87,7 g NaCl in 1l 0,1 M Phosphatpuffer
Phosphatpuffer (0,1 M):	0,1 M Na_2HPO_4 0,1 M NaH_2PO_4 mischen bis pH 7,4 erreicht wird
Ponceau-Färbelösung:	0,2% Ponceau in 3% TCA
Stammlösung I (Coomassie):	5% Coomassie Brilliant Blue G250 in dH_2O
Stammlösung II (Coomassie):	2% (w/v) Phosphorsäure 10% NH_4SO_4 in dH_2O
Stammfärbelösung (Coomassie):	0,1% Stammlösung I in Stammlösung II
Substrat-Mix:	66 μl NBT (50 mg NBT/ml 70% DMF) 33 μl BCIP (50 mg BCIP/ml DMF)
Waschpuffer:	0,05% Tween 20 in 1 x PBS

Lösungen zur Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen aus *E.coli* M15

Puffer B (denaturierend):	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 6 M GuHCl pH 8
Puffer B (nativ):	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8
Puffer C (denaturierend):	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Harnstoff pH 6,3
Puffer C (nativ):	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8
Puffer D (denaturierend):	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Harnstoff pH 5,9
Puffer E (denaturierend):	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Harnstoff pH 4,5

Puffer D + E (nativ):	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	250 mM Imidazol
	pH 8

Lösungen zur Isolierung von Antikörpern aus Kaninchenseren über Affinitätschromatographie oder Protein A

Laufpuffer: 0,1 M Natriumphosphat, pH 8

Elutionspuffer : 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,8

Neutralisationspuffer: 2 M Tris-HCl, pH 8,7

5.1.15 Internetdatenbanken

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

http://mpc.uci.edu/hampson/public_html/blast/jf6/index.php/selfResults/all_blocks.html

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6085>

HUSAR-Softwarepaket, DKFZ Heidelberg

5.2 Methoden

5.2.1 Hälterung von Hydra

Die Hälterung der Versuchstiere erfolgte wie beschrieben in Hassel et al. (1998) bei einer Temperatur von etwa 17-18 °C. Das Hydra-Medium wurde in Heidelberg auf der Basis von Quellwasser angesetzt, nach dem Umzug des Labors nach Marburg wurde ddH₂O verwendet.

5.2.2 Experimente an Hydra

5.2.2.1 Herstellung von Regeneraten

Für Regenerationsversuche wurden, soweit nicht anders angegeben, knospenlose Polypen verwendet, die 24 Stunden nicht gefüttert worden waren. Diese Tiere wurden mit einer Kanüle halbiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 4% Paraformaldehyd fixiert.

5.2.2.2 Herstellung von Aggregaten

Von Polypen, die 24 Stunden nicht gefüttert worden waren, wurden Kopf und Fuß entfernt. Die Tiere wurden viermal in sterilem Hydramedium gewaschen und danach in einer geringen Menge Dissoziationsmedium für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Über Auf- und Abpipettieren erfolgte eine mechanische Dissoziation. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde in 96-well-Mikrotiterplatten mit Spitzboden aliquotiert. Durch saches Klopfen dieser Platten wurden die Zellen zum Absinken gebracht. Die Platten wurden abgedeckt und für vier Stunden bei 18 °C unter sanftem Taumeln inkubiert. In den folgenden 20 Stunden wurde das Dissoziationsmedium sukzessive durch steriles Hydramedium ersetzt. Zur weiteren Beobachtung wurden die Aggregate in Petrischalen, die steriles Hydramedium enthielten, überführt. Medienwechsel erfolgte täglich.

5.2.2.3 Transplantationsexperimente

Für die Transplantationsexperimente wurden knospenlose Empfängertiere, die im Vorfeld für 24 Stunden ohne Futter waren, im oberen Drittel angeschnitten und unter Hydramedium auf eine Insektennadel aufgezogen. Als Transplantate wurden die apikalen Enden von Kopfreparaturen unterschiedlicher Regenerationsdauer abgeschnitten und so auf die Insektennadel aufgezogen, dass die Wundflächen von Empfänger und Transplantat Kontakt hatten. Nach 2 Stunden wurde die Insektennadel entfernt, die transplantierten Polypen wurden in den nächsten Tagen beobachtet.

5.2.2.4 Fußspezifischer Peroxidasetest

Fußspezifisches Gewebe wurde mittels einer Peroxidasefärbung (Hoffmeister und Schaller, 1985) identifiziert. Für diesen Test wurden die zu untersuchenden Tiere in eine Petrieschale gesetzt. Das Kulturmedium wurde komplett entfernt und durch 0,1 M Zitratpuffer mit 0,1% 2,2-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure-6-)-Ammonium-Salz (ABTS, Sigma) und

0,003% Wasserstoffperoxid ersetzt. Sobald eine Blaufärbung zu erkennen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 40 mM Natriumazid/ml Peroxidasetest-Lösung gestoppt.

5.2.2.5 Inkubation mit SU5402

Für jedes Inhibitionsexperiment wurden 60 Polypen für 24 h in einer Lösung aus Hydramedium mit 10 µM SU5402 (Calbiochem), 1 mM ATP und 0,1% DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Tiere in Hydramedium überführt und weiter beobachtet. Die Kontrollinkubationen erfolgten in der gleichen Lösung, allerdings ohne SU5402. Die SU5402-Stammlösung (10 mM in DMSO) wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Für jedes Experiment wurde eine frisch angesetzte ATP-Lösung verwendet.

5.2.2.6 Elektroporation von Antisense-Oligonukleotiden

Für die Antisense-Experimente wurden von der Firma Eurogentech mit Phosphothiorat modifizierte Antisense-Oligonukleotide synthetisiert und über HPLC gereinigt. Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, wurden diese Oligonukleotide nach den Vorgaben von Brysch und Schlingensiepen (1994) entworfen. Die Überlegung für den Entwurf der Oligonukleotide war folgende: Drei unmodifizierte Nukleotide am 5' Ende erlauben die Phosphorylierung der Oligonukleotide, die eine Qualitätskontrolle in einem 20%igem Sequenzgel möglich macht. Die nächsten drei oder vier Positionen wurden mit Phosphothioat modifiziert als Schutz vor Nukleaseaktivität. Die folgenden sechs bis sieben Nukleotide blieben unmodifiziert, um eine RNase-H-Spaltung der resultierenden Hybride zu erlauben. Um zu vermeiden, dass zu viele modifizierte Nukleotide direkt aufeinander folgen, was unspezifische Interaktionen fördern kann, blieb das Nukleotid an Position 15 unmodifiziert. Die letzten drei Nukleotide am 3' Ende wurden wieder als Schutz vor Nukleasen modifiziert.

Folgende Phosphothiorat modifizierte Oligonukleotide, die komplementär zur 5'-codierenden Region von *kringelchen* sind, wurden hergestellt: Oligo 1 (Position 165-182, entspricht den Nukleotiden 65-82 der codierenden Region, modifizierte Nukleotide sind mit Sternchen gekennzeichnet): AAT T*A*A* CTG GCT CT*G T*A*A*; Oligo 2 (Position 217-234, entspricht den Nukleotiden 117-134 im codierenden Bereich): TGA A*G*C* T*GG CAG TA*G A*T*C*. Als Kontrolle wurden Oligonukleotide eingesetzt, in denen drei oder vier Positionen gegeneinander ausgetauscht waren. Spezifische Interaktionen werden so verhindert, ohne dass die Basenzusammensetzung des Oligonukleotids verändert wird. So wurde z. B. in dem Kontrolloligonukleotid 1c das Nukleotid an Position drei nach Position sechs getauscht, das Nukleotid an Position sechs nach Position zehn, Position zehn nach Position 14 und Position 14 wiederum nach Position drei getauscht: Oligo 1c (ausgetauschte Nukleotide sind

unterstrichen): AAC T*A*I* CGT ACT CG*G T*A*A*. Im Kontrolloligonukleotid 2c wurde Nukleotid vier nach Position sieben getauscht, sieben nach zwölf und zwölf nach vier: TGA G*G*C* A*GG CAA TA*G A*T*C*.

Die Antisense-Oligonukleotide wurden über Elektroporation in jeweils 20 Polyphen eingebracht (100 µl Volumen, 4 mm Küvette). Dafür wurde der Easyject Plus Elektroporator (Equibio) mit folgenden Einstellungen verwendet: 1500 µF, 400 V, 99 Ω. Nach der Elektroporation wurden die Tiere über Nacht bei 4 °C und danach bei 18 °C gehalten (modifiziert nach: Lohmann et al., 1999).

5.2.2.7 *In vivo*-Bindung von biotinylierten FGF an Hydragewebe

5.2.2.7.1 Biotinylierung von FGF

Für die Biotinylierung wurden *bFGF*, *AcY601* und *Ach2* in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) kloniert und in *E. coli*-M15 (Qiagen) exprimiert. Diese Zellen wurden nach Angaben des Herstellers nativ aufgeschlossen, und die Proteine mittels Nickel-Agarose aufgereinigt (QiaExpressionist, Qiagen). aFGF stammte aus dem Zellkulturüberstand von exprimierenden Cos-Zellen und wurde von F. Coulier (INSERM Marseille) zur Verfügung gestellt.

Vor der Biotinylierung sollten die aufgereinigten Wachstumsfaktoren mit Hilfe von *Microcon Centrifugal Filter Devices YM-10* (Millipore) in einen *Sample Buffer* (0,1M Phosphatpuffer, 5 mM EDTA, pH 6) aufgenommen und auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt werden. Bei diesem Schritt fielen die Wachstumsfaktoren mit einem deutlich basischen pKa (*bFGF*, *AcY601*, *Ach2*) auf der Säule aus. Erst durch eine Verwendung von modifiziertem Phosphatpuffer (10 mM Phosphat, 0,3 M NaCl, pH 8) konnte eine Aufkonzentrierung dieser Wachstumsfaktoren erfolgen. Die Biotinylierung der konzentrierten Proteine erfolgte anschließend mit dem EZ-LinkTMIodoacetyl-LC-Biotin Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 500 mg Protein pro Markierungsansatz eingesetzt.

5.2.2.7.2 In vivo-Bindung

Für diesen Versuch wurden Polyphen verschiedener Knospungsstadien eingesetzt, die 24 Stunden ohne Futter waren. Alle Inkubationsschritte fanden bei 18 °C statt, Ausnahmen werden angegeben. Diese Tiere wurden zunächst für 30 Minuten in Dissoziationsmedium (Gierer et al., 1972) inkubiert. Zum Blocken folgte eine 20 minütige Behandlung mit unmarkiertem Streptavidin (1:5000 verdünnt in Dissoziationsmedium ⇔ 117,6 µU/ml), danach wurde dreimal mit Dissoziationsmedium gewaschen. Die Inkubation mit dem biotinylierten Liganden erfolgte in angereichertem Dissoziationsmedium (60 mM KCl, 10 U/ml Heparin, 20 mM HEPES, pH7,4, 1% BSA gelöst in Dissoziationsmedium) bei

Konzentrationen zwischen 2 ng und 20 ng Protein pro Probe für zwei Stunden. Optional wurde die Inkubation mit den Liganden in Anwesenheit von 2% DMSO durchgeführt. Danach wurden die Tiere zweimal in Dissoziationsmedium und einmal in PBS gewaschen. Anschließend folgte das *Crosslinking* in 2 mM BS³ (Pierce) für 30 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris, pH 7,5 (Endkonzentration: 20 mM) gestoppt. Über zwei Waschschrte in PBS für jeweils zehn Minuten wurden Reste des *Crosslinkers* ausgewaschen. Es folgte eine Hitzbehandlung zum Deaktivieren von endogenen alkalischen Phosphatasen: Die Tiere wurden in 5 mM EDTA gelöst in PBS überführt und für zehn Minuten bei 85 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde zweimal in PBS und zweimal in Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) für je zehn Minuten gewaschen. Die Tiere wurden dann für zwei Stunden in einer Lösung aus 5% *Blocking Reagent* (Boehringer Mannheim) gelöst in Waschpuffer blockiert. Nach zweimaligem Waschen in Waschpuffer wurden die Tiere für eine Stunde mit Streptavidin-AP (Roche, 1:5000 verdünnt in Waschpuffer) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer und eine Fixierung des Gewebes mit 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Tiere zweimal für fünf Minuten in NTMT (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM TRIS, pH 9,5) inkubiert und in einem weiteren Schritt mit 1 mM Levamisol gelöst in NTMT behandelt, um noch aktive endogene alkalische Phosphatasen zu inhibieren. Die Farbreaktion erfolgte unter Verwendung von *BM Purple* (Roche). Sobald eine eindeutige Färbung zu erkennen war, wurde die Reaktion durch NTMT gestoppt. Zum Entwässern wurden die Tiere zunächst in 70% Ethanol, dann in 100% Ethanol überführt und anschließend in Euparal (Roth) eingebettet.

5.2.2.8 Mazeration

Über die hier beschriebene Methode werden Polypen in Einzelzellen zerlegt, die sich dann in einem minimalen Flüssigkeitsvolumen befinden (David, 1972). Dazu wurden die Tiere auf einen beschichteten Objektträger gelegt. Kulturmedium wurde vollständig entfernt und durch einen Tropfen Mazerationslösung ersetzt. Anschließend folgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer für 1,5 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Tiere auf dem Objektträger mit einer Kanüle vorsichtig zerlegt, zum Fixieren mit 4% PFA überschichtet und für zwei Stunden bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss daran wurde eine *in situ*-Hybridisierung (siehe 5.2.3.9.1) auf den Objektträgern durchgeführt.

5.2.3 Molekularbiologische Methoden

5.2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Für die Isolierung von Nukleinsäuren aus *Hydra vulgaris* wurde im Allgemeinen ca. 100 - 150 mg Gewebe (Abtropfgewicht) von mindestens 24 h nicht gefütterten Polypen als Ausgangsmaterial verwendet. Die Lagerung der DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Hydra

Das Gewebe wurde in 500 μl 10 mM Tris (pH 8,0)/ 0,1 M EDTA durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Zellen und Zellkerne wurden anschließend durch Zugabe von 0,5% SDS aufgebrochen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K unter Schwenken für 2 - 3 h bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließender Chloroform-Phenol-Extraktion (Sambrook und Russell, 2001) bei Raumtemperatur. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 M NaCl und doppeltem Volumen Ethanol. Die DNA wurde aufgespindelt, in 75%igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris (pH 8,0) aufgenommen und gelöst. Es schloss sich ein RNase-Verdau (20 $\mu\text{g/ml}$ für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) und eine Entfernung des Enzyms durch Chloroform-Phenol-Extraktion und anschließende Ethanolfällung an.

5.2.3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hydra

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurde die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987) verwendet. Im ersten Schritt wurden die Polypen dreimal in sterilfiltriertem Hydramedium gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Kulturmediums wurden die Tiere in 1 ml Lyselösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5% Sarkosyl, pH 7) + β -Mercaptoethanol (Endkonzentration= 0,1 M) homogenisiert. Es folgte die Zugabe von 200 μl 3 M Natriumacetat (pH 4), 1 ml wassergesättigtem Phenol und 0,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1), wobei die Lösungen nach jedem Schritt kräftig miteinander gemischt wurden. Anschließend wurde noch einmal stark gevortext und der Ansatz für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 9500 rpm für 30 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht ausgefällt. Nach einer zweiten Zentrifugation (9500 rpm, 30 Minuten, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde das Pellet in 300 μl Lyselösung aufgenommen. Nach Zugabe von 300 μl

Isopropanol wurde die RNA erneut pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 300 µl DEPC-Wasser gelöst.

5.2.3.1.3 Isolierung von mRNA aus Hydra

100 Tiere oder eine äquivalente Menge an Gewebefragmenten wurden in sterilfiltriertem Kulturmedium gewaschen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach vollständigem Entfernen des Kulturmediums erfolgte die Aufreinigung der mRNA unter Verwendung des QuickPrep Micro mRNA Kits (Amersham) nach Angaben des Herstellers.

5.2.3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden die entsprechenden Bakterien über Nacht propagiert. Die Bakterienflüssigkulturen wurden in 1,5 ml-Eppendorfgläser überführt und kurz bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Dann wurden 300 µl TENS zugegeben, ausgiebig gevortext (nicht länger als 2 min in TENS stehen gelassen, dann auf Eis), 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben, gevortext, 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 900 µl kaltem 100% Ethanol, einer 20 minütigen Inkubation bei -20°C und einer 20 min Zentrifugation bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde abgegossen und der Rest der Flüssigkeit mit Zellstoff abgenommen. Zum Waschen der DNA wurden 150 µl 70% Ethanol zum Pellet gegeben und 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 10 Minuten bei 50°C im Heizblock getrocknet und in 20 µl ddH_2O resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA zur Sequenzierung erfolgte über das Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen).

5.2.3.2 **Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Quantifizierung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm (Sambrook und Russell, 2001). Für die DNA-Konzentration gilt: 1 OD bei 260 nm entspricht 50 µg DNA pro ml; für die RNA-Konzentration gilt: 1 OD bei 260 nm entspricht 40 µg RNA pro ml. Durch gleichzeitiges Messen der Proteinabsorption bei 280 nm lässt sich der Grad der Verunreinigung einer Lösung feststellen. Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

5.2.3.3 Klonierung

5.2.3.3.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Hilfe von Typ-II-Restriktionsendonukleasen nach allgemeinen Standardvorschriften (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Solche Enzyme spalten DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen. Für die Restriktionsansätze wurden die Empfehlungen der Enzymhersteller befolgt.

5.2.3.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Selbstligation von geschnittenen Plasmiden zu verhindern, wurden sie am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase (CIAP: *calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte nach Aufreinigung der geschnittenen Plasmide durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung in einem Volumen von 50 µl durch Zugabe von 5 U Enzym pro 10 pmol DNA. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37 °C.

5.2.3.3.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde eine Elektroelution (Sambrook und Russell, 2001) oder die „*crush and soak*“-Methode (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. In einigen Fällen erfolgte die DNA-Fragment-Gewinnung mit dem GFX-DNA-Purification Kit (Amersham).

5.2.3.3.4 Ligation

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurden die von Sambrook et al. (1989) vorgeschlagenen Methoden verwendet. Ligationen erfolgten in einem Volumen von 10 µl. Bei einer Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurde 1 U T4-Ligase pro Ansatz verwendet, bei glatten Enden waren es 5 U.

5.2.3.3.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Präparation kompetenter Bakterien wurden die Methoden von Nishimura et al. (1990) und Inoue et al. (1990) verwendet. Die *E.coli*-Zellen des Stammes M15 wurden nach Angaben des Herstellers (Qiagen) behandelt.

5.2.3.3.6 Transformation von Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu jeweils 50 µl Bakterien wurden 5 bis 10 µl Ligationsansatz (ca. 50 bis 100 ng DNA) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde dem Ansatz 200 µl vorgewärmtes LB-Medium zugefügt. Zur phänotypischen Expression wurden die Bakterien unter Schütteln 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. 10 bis 100 µl der Bakterienkultur wurden zur Selektion der positiven Transformanden auf LB-Platten mit selektivem Antibiotikum ausgestrichen und für 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

5.2.3.3.7 Blau-Weiß-Selektion

Bei vielen Klonierungsvektoren befindet sich die Klonierungsstelle (MCS: *multiple cloning site* oder Polylinker) innerhalb der codierenden Sequenz für das Enzym β -Galaktosidase. Durch erfolgreiche Ligation eines DNA-Fragments in den Vektor wird die Expression dieses Enzyms verhindert.

Für Selektion auf β -Galaktosidase-Expression wurden die transformierten Bakterien auf LB_{AMP}-Platten mit 0,5 M IPTG und 40 µg/ml X-Gal ausplattiert. Die β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von X-Gal zu einem blauen Farbstoff, wobei IPTG die Expression des Enzyms induziert. Bakterienkolonien, die ein Plasmid mit erfolgreich ligiertem DNA-Fragment enthalten, blieben weiß, Kolonien ohne Insert im Vektor färbten sich dagegen blau.

5.2.3.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

5.2.3.4.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100 bp bis 20 kB wurden 0,7 – 2,5%ige horizontale Agarosegele in 1 x TBE verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer (Sambrook und Russell, 2001) versetzt und bei 10 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für etwa 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg EtBr/ml 1x TBE) gefärbt. Aufgrund der Interkalation von EtBr konnte die DNA durch UV-Anregung sichtbar gemacht werden.

5.2.3.4.2 Agarosegele zur Auftrennung von RNA

RNA wurde in 1,5%-igen Agarosegelen in MOPS-Puffer mit einer Formaldehydkonzentration von 6% elektrophoretisch aufgetrennt (bei 80 mA). Die RNA-Probe wurde vor dem Auftrag mit 2 Volumen RNA-Probenpuffer (Sambrook und Russell, 2001) versetzt und bei 65 °C für 5

Minuten erhitzt. Nach dem Gellauf wurde das Gel 10 Minuten in DEPC-H₂O geschwenkt und anschließend in einer EtBr-Lösung (0,5 µg/ml DEPC-H₂O) gefärbt. Gele für Northern-Blotting wurden nicht gefärbt.

5.2.3.4.3 Denaturierende Polyacrylamid (PAA)-Gele

Denaturierende PAA-Gele mit einer PAA-Konzentration von 6% wurden zur Sequenzierung von DNA-Proben verwendet. Die Gele wurden nach Sambrook et al. (2001) hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE bei einer Stromstärke von 25 – 30 mA. Im Anschluss daran wurden die Gele für 30 Minuten in einer Lösung aus 10% Essigsäure und 10% Methanol fixiert und anschließend auf 3MM Filterpapier (Whatman) im Vakuum-Trockner getrocknet.

5.2.3.5 **Sequenzierung von DNA**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al. (1977) radioaktiv mit dem T7-Polymerase-Sequenzierung Kit (Amersham). Später wurde ein automatischer Sequenzierer (ABI 310, ABI PRISM™) verwendet oder auf die Angebote der Firma SeqLab zurückgegriffen.

5.2.3.5.1 Sequenzanalyse und Datenbanksuche

Zur vollständigen Analyse der Sequenzen stand das HUSAR-Software-Paket (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung. Außerdem wurden alle Sequenzen mit den Daten aus dem Hydra EST-Projekt verglichen:

(http://mpc.uci.edu/hampson/public_html/blast/jf6/index.php/selfResults/all_blocks.html)

5.2.3.6 **Analyse immobilisierter Nukleinsäuren**

5.2.3.6.1 Southern Blot

Die zu transferierenden Gele wurden zur Depurinierung der genomischen DNA zunächst für 10 Minuten in 0,2 N HCl inkubiert und anschließend für 30 Minuten denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), woran sich eine Neutralisation (3 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7) für weitere 30 Minuten anschloss. Danach erfolgte der Kapillartransfer der DNA auf eine trocken aufgelegte Nylon- oder Nitrocellulosemembran über Whatman-Filter und Saugpapier mit 10 x SSC als Transferpuffer. Nach einer Transferzeit von 12-15 Stunden wurde die Membran für 10 Minuten in 2 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und die DNA durch 30 minütiges Backen bei 80 °C auf der Membran fixiert (Southern, 1975).

5.2.3.6.2 Northern Blot

Die RNA aus denaturierenden Formaldehydgelen wurde direkt auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran überführt. Der Transfer erfolgte über Whatmen-Filter und Saugpapier mit 20 x SSC als Transferpuffer. Nach einer Transferzeit von etwa 12 bis 15 Stunden wurde die RNA durch Backen (30 Minuten bei 80 °C) auf der Membran fixiert (Thomas, 1983).

5.2.3.6.3 Radioaktive Markierung von DNA durch „random priming“

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem Random DNA-Labeling Kit (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers. In einen Markierungsansatz wurden 50 bis 100 ng hitzedenaturierte DNA-Fragmente eingesetzt.

5.2.3.6.4 Filterhybridisierung

Radioaktiv markierte Proben wurden nach Sambrook et al. (2001) bei 42 °C hybridisiert und je nach gewünschter Stringenz gewaschen. Als Hybridisierungslösung wurde verwendet: 6 x SSC, 5 x Denhardts, 0,5% SDS, 100 µg/ml Heringssperma-DNA, 50% Formamid.

5.2.3.6.5 Detektion von Nukleinsäuren (radioaktiv-markierte Sonden)

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die leicht getrockneten Membranen in Saranfolie eingeschlagen und auf Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham) exponiert. Es wurden „intensifying screens“ benutzt, die Exposition erfolgte bei –80 °C.

5.2.3.6.6 Methylenblau-Färbung

An Filter gebundene Nukleinsäuren lassen sich durch Methylenblau anfärben. Hierzu wurden die Filter 15 Minuten in 5% Essigsäure und anschließend 10 Minuten in Methylenblau-Färbelösung (0,04% Methylenblau, 0,5 M Na-Acetat, pH 5,2) inkubiert. Es folgte ein 10 minütiges entfärben in dH₂O.

5.2.3.6.7 Herstellung und Hybridisierung von DNA-Makroarrays

Die gesamten 1500 Phagen der subtrahierten Bank wurden ebenso wie 384 zufällig ausgewählte Phagen der Knospenbank in Reaktionsgefäße vereinzelt, mit 500 µl SM-Puffer und 10 µl Chloroform überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Jeweils 2 µl der Phagenlösungen wurden zur Amplifikation der Inserts in 96-well-Platten überführt. Die PCR erfolgte nach einem Standard-Protokoll mit den Primern T3 und T7. Die PCR-Produkte wurden wie beschrieben in Hauser et al. (1998) mittels eines BioGridders (BioRobotics) in

zweifacher Ausführung auf eine BiodyneB-Membran (Pall) übertragen, die vorher in einer Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH getränkt worden war. Nach dem Auftragen der Amplikons wurden die Membranen für 30 Minuten bei 80°C und anschließend mit UV (120mJ/ cm²) bestrahlt.

Für die Hybridisierung mit Oligonukleotiden wurden die Membranen über Nacht in 600 mM NaCl mit 20 pmol des jeweiligen Oligonukleotids bei 10°C inkubiert (verwendete Oligonukleotide: SL-A: 5'-caa act tct att ttc tta ata aag-3', SL-B: 5'-aaa tag tcc ctg tgt aat aag-3', beide markiert mit ³³P). Nach einem Waschschrift mit 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,2 erfolgte die Exposition.

5.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5.2.3.7.1 Standard-PCR

Die Amplifikation eines DNA-Fragments (Mulis und Faloona, 1987) mittels zweier spezifischer Primer wurde in der Regel nach folgendem Schema durchgeführt: In einem 25 µl-Ansatz wurden je 0,4 mM dNTPs, der *Taq*-spezifische Amplifikationspuffer, die Primer (je 10 pmol), 1 U *Taq*-DNA-Polymerase und etwa 5 bis 20 ng DNA eingesetzt. Die Amplifikation wurde über 30 bis 35 Zyklen durchgeführt. Das Temperaturprofil hing von der Primerkonzeption sowie der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes ab. Ein typisches Profil ist: 1 Minute Denaturierung bei 94 °C, 1 Minute „*primer annealing*“ bei 50 bis 65 °C (+/- 5 °C zum T_M-Wert der Primer), 3 Minuten DNA-Synthese bei 72 °C. Die Kontrolle der PCR erfolgte über ein Agarosegel. Als Kontrollen wurden folgende Blindansätze verwendet: Primer ohne DNA, nur 1. bzw. 2. Primer. Als „*template*“ wurden verwendet: Plasmid-DNA, Phagen aus cDNA-Banken und Bakterienkolonien. Der T_M-Wert des Primers berechnet sich annäherungsweise aus: $T_M = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$.

5.2.3.7.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR dient Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial, so dass vor der eigentlichen PCR eine cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase durchgeführt werden musste. Beide enzymatischen Reaktionen können sowohl hintereinander als auch in einem Ansatz durchgeführt werden. Für letztere Reaktion wurden 100 ng Gesamt-RNA 5 Minuten bei 65 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und in den RT-PCR-Ansatz gegeben. Dieser wurde auf Eis angesetzt: 5 µl 10 *Taq*-RT-Puffer (Promega), 5 µl 2% Gelatine, 50 pM Primer (sense und antisense), 1 U Reverse Transkriptase (Promega), 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega) ad 50 µl ddH₂O. In der Regel wurde folgendes Temperaturprofil gewählt: 25 Minuten 37 °C, 2 Minuten 95 °C, gefolgt von bis zu 30 Zyklen: 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 1 Minute „*primer annealing*“ bei 50 bis 65 °C, 1 bis 3 Minuten DNA-Synthese bei 72 °C.

5.2.3.7.3 PCR mit degenerierten Primern

Bei dieser PCR-Anwendung sind die verwendeten Primer nicht an jeder Position durch exakt eine Base determiniert. Vielmehr können an einzelnen Positionen mehrere Basen auftreten. Hierzu ergibt sich für die T_M -Wert-Bestimmung und das Temperaturprofil der PCR nur eine Annäherung an die Optimalbedingungen, die in jedem Einzelfall ausgetestet werden müssen. In der Regel wird die PCR mit dem minimal zu erwartendem T_M -Wert gestartet.

5.2.3.8 **Herstellung von cDNA-Banken**

Für das Genexpressionsscreening wurden drei gerichtet klonierte λ ZAP[®]cDNA-Banken von *Hydra vulgaris* hergestellt: Zur Synthese der Knospen-Bank wurden 3 μ g poly(A)⁺-RNA verwendet, die aus isolierten Knospen verschiedener Entwicklungsstadien (Otto und Campbell, 1977) isoliert wurde. Zur Konstruktion der subtrahierten Bank wurden unter Verwendung des Subtractor Kits (Invitrogen) 1 μ g poly(A)⁺-RNA aus ausgeschnittenen Knospen verschiedener Stadien von 10 μ g poly(A)⁺-RNA aus Kopf- und Fußregion von *Hydra* subtrahiert, um so knospenspezifische Transkripte anzureichern. Beide Banken wurden mit dem ZAP[®] cDNA Synthesis Kit der Firma Stratagene hergestellt.

Als Basis für die Fuß-Bank dienten 5 μ g poly(A)⁺-RNA, gewonnen aus der Fußregion von Polypen. Für diese Bank wurde das ZAP[®]Express cDNA Synthesis Kit (Stratagene) verwendet.

5.2.3.9 **Genexpressionsscreening**

Für die Suche nach knospenspezifisch exprimierten Genen wurde aus jeder cDNA-Bank eine unterschiedliche Anzahl von zufällig ausgewählten Phagen isoliert. Über PCR mit T3- und T7-Primern konnten die Inserts amplifiziert und danach in digoxigenin-markierte antisense-RNA (Roche) transkribiert werden (Hassel et al., 1998). Die Analyse der Expressionsmuster erfolgte über Ganz-Tier *in situ*-Hybridisierung.

5.2.3.9.1 In situ-Hybridisierung

Die Hybridisierung und Detektion von RNA-Transkripten in *Hydra* wurde mittels synthetischer Antisense-RNA-Sonden durchgeführt (Grens et al., 1995). Alle Lösungen wurden mit DEPC-ddH₂O angesetzt.

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden die Polypen zunächst mit 2% Urethan betäubt und anschließend über Nacht bei 4 °C in 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation in 100% EtOH bei RT, gefolgt von einer Alkoholreihe: 100% EtOH, 75%

EtOH/25% PBT, 50% EtOH/50% PBT, 25% EtOH/75% PBT und 3x 100% PBT jeweils für 5 Minuten bei RT. Im Anschluss daran wurde das Gewebe durch einen partiellen ProteinaseK-Verdau für die markierte Antisensesonde durchgängig gemacht, indem die Tiere für 10 Minuten in 10 µg Proteinase K/ml PBT inkubiert wurden. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (4 mg/ml) gestoppt. Es folgten zwei Waschrinne in PBT. Zur Reduktion unspezifischer Signale folgte eine Behandlung mit Essigsäureanhydrid: Zunächst wurde zweimal für 5 Minuten in Triethanolamin (0,1 M, pH 7,8) gewaschen. Die letzte Waschlösung wurde gegen 2,5 µl Essigsäureanhydrid/ml Triethanolamin ausgetauscht und 5 Minuten unter schwachen Schütteln inkubiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Es folgten zwei Waschrinne in PBT bevor die Tiere in 4% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei RT erneut fixiert und anschließend 5 x in PBT gewaschen wurden. Danach wurden endogene alkalische Phosphatasen durch eine Hitzebehandlung bei 85 °C in 5 mM EDTA verdünnt in PBT eliminiert.

Vor der Hybridisierung wurden die Polypen mit PBT/ Hybridisierungslösung (1:1 gemischt) für 10 Minuten bei RT gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte in Hybridisierungslösung für 2 Stunden bei 55°C. Zur Hybridisierung wurde die Lösung durch 100 µl frische Hybridisierungslösung ersetzt, in der 10 bis 100 ng der hitzdenaturierten und Digoxigenin-UTP (DIG)-markierten RNA-Sonden enthalten waren. Hybridisiert wurde über Nacht. Anschließend folgten mehrere halbstündige Waschrinne bei 55°C: 50% reduzierte Hybridisierungslösung/ 50% 2x SSC und zweimal 2 x SSC + 0,1% CHAPS. Daran schlossen sich zwei Waschrinne in MAB und eine 60 minütige Inkubation in MAB-B an, alles bei RT. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurden die Tiere dann bei 4°C für 2 Stunden in Block-Lösung inkubiert. Anschließend wurde an Hydra präabsorbierte Antikörperlösung (Anti-Dig-AP (Roche), 1:2000 verdünnt) über Nacht (4°C) auf die Tiere gegeben. Vor der Farbreaktion wurden überschüssige Antikörper durch Waschen mit MAB über Nacht bei 4 °C entfernt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit NTMT und einmal mit 1mM Levamisol in NTMT jeweils für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde als Färbelösung BM Purple (Roche) auf die Tiere gegeben. Nachdem die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurden die Tiere zweimal für 10 Minuten in NTMT und 5 Minuten in 70% EtOH gewaschen. Für die Lagerung der gefärbten Tiere erfolgte in 100% EtOH bei 4 °C. Die Hydren wurden auf Objektträger überführt und in Euparal (Roth) eingebettet.

5.2.4 Proteinbiochemische Methoden

5.2.4.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Hydra

Für die Herstellung eines Gesamtproteinextraktes wurden 6 Tiere oder eine äquivalente Anzahl von isolierten Gewebefragmenten nach Entfernen des Hydramediums in 20 µl heißen SDS-Ladepuffer aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vollständig homogenisiert. Es folgte eine Denaturierung für 5 Minuten bei 100°C. Nach kurzer Zentrifugation konnte der proteinhaltige Überstand im SDS-Gel aufgetrennt werden.

5.2.4.2 Herstellung prokaryontisch exprimierter Proteine

5.2.4.2.1 Expression von rekombinantem Protein

Zur heterologen Expression von rekombinantem Protein in *E. coli* wurden die jeweiligen Sequenzen in die Expressionsvektoren pQE-30 oder pQE-31 (beides Qiagen) kloniert und in den Bakterienstamm *E.coli* M15 (Qiagen) transformiert.

Die Transformanten wurden auf selektive Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Überprüfung der Insertgröße durch PCR und des korrekten Leserahmens durch Sequenzierung wurden ein positiver Klon und als Negativkontrolle ein Klon, der nur den Expressionsvektor, nicht aber das Insert enthielt, in je 5 ml LB_{AMP/KAN}-Medium (100 µg Ampicillin und 25 µg Kanamycin/ml LB) über Nacht angezogen. Aus diesen Kulturen wurden die eigentlichen Expressionskulturen (200 ml LB_{AMP/KAN}-Medium) angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 37 °C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bis 0,8 angezogen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Die Kulturen wurden bei 37 °C unter kräftigem Schütteln vier bis fünf Stunden bis zur Ernte weiter inkubiert. Um die Zellen von Kulturmedium zu trennen, folgte eine Zentrifugation (4000 x g, 4 °C, 20 Minuten). Die Bakterienpellets wurden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.2.4.2.2 Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

Die Bakterienpellets wurden zunächst für 15 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend in 5 ml Puffer B (nativ) pro Gramm Gewicht resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde diese Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert und direkt im Anschluss dreimal für 10 Sekunden bei etwa 300 W sonifiziert. Über eine 20 minütige Zentrifugation (10000 x g, 4 °C) wurden Zelltrümmer pelletiert, aus dem Überstand wurden über NTA-Agarose (Qiagen) Proteine mit His-Tag aufgereinigt (siehe 5.2.4.2.4).

5.2.4.2.3 Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Für Proteine, die sich im nativen Zustand nicht aus den Bakterienpellets aufreinigen ließen, wurde die Isolierung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die bei -80 °C gelagerten Pellets wurden zunächst für etwa 15 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend in 5 ml Puffer B pro Gramm Trockengewicht resuspendiert. Diese Suspension wurde dreimal für 10 Sekunden sonifiziert und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zelllyse wurden die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei $10000 \times g$ vom Zytosol abgetrennt. Das Pellet wurde verworfen, der Protein-haltige Überstand bei -80 °C gelagert (QIAexpressionist™, fünfte Ausgabe; März 2001).

5.2.4.2.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine über NTA-Agarose

Die über pQE-30 exprimierten Proteine sind Fusionsproteine, die einen His-Tag am 3'-Ende besitzen. Diese Proteine können über NTA-Agarose (Nickel Nitrilotriacetic Acid Agarose, Qiagen) aufgereinigt werden. Dazu wurde die NTA-Agarose in einem Verhältnis von 1:4 zu dem Bakterienlysat gegeben. Die Suspension wurde eine Stunde unter Schütteln bei RT inkubiert und danach auf eine Säule gegeben, an deren unterem Ende eine kleine Menge Glaswolle gestopft worden war. Zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Protein wurde die Säule zweimal mit Puffer C gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 x 0,5 ml Puffer D und 4 x 0,5 ml Puffer E. Die Eluate wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf einer Veränderung des Absorptionsverhaltens einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung. Nach der Proteinbindung der Coomassie-Lösung verschiebt sich deren Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm (Bradford, 1976).

Zur Konzentrationsbestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe einer Proteinlösung bekannter Konzentration erstellt und vermessen. Mit Hilfe der resultierenden Eichgerade konnte durch Interpolation die Konzentration der unbekanntes Proteinlösung bestimmt werden. Dazu wurde die Proteinlösung mit PBS in einem Endvolumen von 100 μl verdünnt und mit 900 μl Bradford-Lösung versetzt. Als Referenz wurde ein Ansatz verwendet, der 100 μl PBS und 900 μl Bradford-Lösung enthielt. Die Ansätze wurden durchgemischt und nach etwa 10 Minuten bei 595 nm gegen die Referenz vermessen.

5.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung von Proteingemischen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht es, Proteine ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Das diskontinuierliche Gelsystem erzeugt an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, hervorgerufen durch pH-Sprung und verringerte Porengröße, eine Fokussierung der Proteine und damit eine Erhöhung des Auflösungsgrades.

Die SDS-Gele werden in Abhängigkeit der zu analysierenden Proteine wie folgt angesetzt:

	Trenngel				Sammelgel
	7,5%	10%	12,5%	15%	
Rotiphorese® Gel 30	7,5ml	10ml	12,5ml	15ml	1,67ml
ddH ₂ O	8,8ml	8,2ml	6,5ml	4,5ml	6,9ml
Trenngelpuffer	7,5ml	7,5ml	7,5ml	7,5ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	1,25 ml
10% SDS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,1ml
10% APS	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
TEMED	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl

5.2.4.5 Western Blot (Westermeier, 1991)

Mittels Western-Blotting werden Proteine auf eine Membran transferiert und an diese gebunden. Sie sind somit zugänglich für Antikörper.

In einer Semi-Dry-Blot-Apparatur wurde auf drei Whatmanpapiere, die in Blot-Puffer getränkt worden waren, eine mit Wasser benetzte Nitrocellulosemembran gelegt. Das zu blottende Gel und anschließend wieder drei Lagen Whatmanpapier wurden auf dieser Membran platziert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 1.5 mA/cm² Nitrocellulose für eine Stunde.

Nach dem Transfer wurde das Gel für eine Stunde in 12% TCA fixiert und mit Coomassie-Lösung gefärbt, die auf der Membran befindlichen Proteine wurden über Ponceau-Färbung (Sambrook und Russell, 2001) sichtbar gemacht.

5.2.4.6 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Zum Nachweis spezifischer Proteine durch Antikörper wurde die geblottete Nitrocellulosemembran zunächst über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln in Blockpuffer inkubiert. Daran schloss sich die Inkubation des Erstantikörpers für eine Stunde bei RT an. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen, bevor die einstündige Inkubation des Zweitantikörpers folgte. Die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper (Amersham) wurden dazu 1: 5000 in 10%-iger Milchpulverlösung verdünnt, der an alkalische Phosphatase gekoppelte anti-Rabbit-Antikörper (Dianova) wurde 1:1000 in Waschpuffer verdünnt. Es folgten drei zehnmütige Waschschrirte in PBT. Bei einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper wurde die Membran für eine Minute im ECL-Arbeitslösung inkubiert, bevor sie ohne Luftblasen in Folie eingeschweißt und in eine Filmkassette geklebt wurde. Zur Exposition wurde Hyperfilm (Amersham) verwendet. Wurde ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper verwendet, so musste die Membran fünf Minuten in NTMT äquiliibriert werden bevor sie bis zur gewünschten Färbung bei Raumtemperatur in Substrat-Mix inkubiert wurde.

5.2.4.7 Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

5.2.4.7.1 Immunisierung von Kaninchen

Für eine Immunisierung wurden weiße Neuseeländer Weibchen mit einem Gewicht von 2 bis 2,5 kg verwendet. Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen mit einer Kanüle etwa 5 ml Präimmunserum aus der Ohrvene entnommen. Nach der Blutgerinnung (3 h bei 37 °C) wurde der Blutkuchen abzentrifugiert und das Serum in Aliquots bei -80 °C eingefroren. Die Immunisierung der Tiere erfolgte mit einem Gemisch aus 200 µl Freund's kompletten Adjuvans und 200 µl Acrylamidgel, das etwa 0,4 mg Protein enthielt, subkutan in den Nacken. Nach 21, 42 und 63 Tagen wurde eine Zweit-, Dritt- und Viertimmunisierung durchgeführt. Dabei galten die Bedingungen der Erstimmunisierung, lediglich das komplette Freund's Adjuvans wurde gegen inkomplettes Adjuvans ersetzt. Jeweils eine Woche nach einer Immunisierung wurden den Kaninchen ca. 5 ml Testblut aus der Ohrvene entnommen und das Serum gewonnen. 75 Tage nach der Erstimmunisierung erfolgte das Entbluten der Tiere.

5.2.4.7.2 Aufreinigung von Kaninchenseren über Protein A

Protein A besitzt vier Bindungsstellen für Immunglobulin (Ig) und eignet sich daher zur Aufreinigung von IgGs aus polyklonalen Seren. Dazu wurde das Protein A an

Sepharosekügelchen gekoppelt. Von dieser Matrix wurden 250 µl auf eine Säule gegeben und am unteren und oberen Ende von einer Fritte gehalten. Die Säule wurde mit 10 x 1 ml Laufpuffer äquilibriert. Erst dann wurden 500 µl Serum, das 1 : 5 mit Laufpuffer verdünnt worden war, auf die Säule aufgetragen. Es folgten 10 Waschrunde mit je 1 ml Laufpuffer, um unspezifisch gebundene Bestandteile des Serums zu entfernen. Die Elution der gebundenen IgGs erfolgte mit 4 ml Elutionspuffer, der in 500 µl-Fractionen gesammelt wurde. Jede Fraktion wurde mit 25 µl Neutralisationspuffer versetzt und mit BSA stabilisiert (Endkonzentration: 1 mg/ml). Die IgG-haltigen Fractionen wurden auf einen 12%-igem PAA-Gel überprüft.

5.2.4.7.3 Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum über Affinitätschromatographie

5.2.4.7.3.1 *Kopplung von Peptiden an Iodoacetyl*

Zur Herstellung von Affinitätschromatographiesäulen für die gezielte Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum wurden Peptide unter strikter Einhaltung der Herstellerangaben an Ultralink Iodoacetyl (Pierce) gekoppelt. Ultralink Iodoacetyl wurde mit 6 Volumen Puffer äquilibriert und in eine geeignete Säule überführt. Das zu koppelnde Peptid wurde mit 1 ml desselben Puffers gelöst und zum Säulenmaterial gegeben. Die Kopplung dauerte 45 Minuten bei RT. Nach Absetzen des Säulenmaterials wurde mit 3 Volumen Puffer gewaschen und im Anschluss in demselben Puffer mit Zusatz von 50 mM Cystein geblockt. Die Säule wurde nach erneutem Waschen bei 4°C gelagert.

5.2.4.7.3.2 *Affinitätschromatographie von Antikörpern aus Kaninchenserum*

Die Aufreinigung der Antikörper aus den Seren erfolgte unter Verwendung von Affinitätsäulen (siehe oben), auf die 1 ml Kaninchenserum (1:5 verdünnt in Laufpuffer) aufgetragen wurden. Die Säule wurde anschließend mit 10 Volumen Laufpuffer gewaschen. Mittels eines Elutionspuffers mit niedrigem pH-Wert wurden die Antikörper von der Säule eluiert, in 300 µl-Aliquots aufgefangen und sofort mit je 30 µl Neutralisationspuffer gepuffert. Die Antikörperkonzentration wurde bei 280 nm bestimmt ($OD_{280} = 1,4 \rightarrow 1 \text{ mg IgG/ml}$). Durch Zugabe von BSA (Endkonzentration = 1 mg/ml) wurden die Antikörperfractionen stabilisiert und bei -80°C gelagert.

5.2.5 Herstellung von Semidünnschnitten

Nach erfolgter *in situ*-Hybridisierung (siehe 5.2.3.9.1) wurden angefärbte Polypen in 1% Agar-Agar eingebettet. Die Agarblöcke mit den Polypen wurden über Nacht in 70% Ethanol äquilibriert. Am nächsten Tag wurden sie zweimal für 45 Minuten mit Dioxan gewaschen.

Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Hälfte des Dioxans ersetzt durch Spurr Standard Einbettungskunststoff: 13 g NSA (Agar Scientific), 5 g ERL (Polysciences), 4 g DER (Agar Scientific), 0,2 g S-1 (Agar Scientific). In dieser Mischung blieben die Agarblöcke für 90 Minuten. Anschließend wurde die Hälfte der Lösung abgenommen und durch Spurr Standard ersetzt. Es folgte eine 90 minütige Inkubation. Die Agarblöcke wurden dann für eine Über-Nacht-Inkubation in reines Spurr Standard Einbettungsmedium überführt. Am nächsten Tag wurde der Kunststoff erneuert. Nach etwa acht Stunden wurden die Agarblöcke in Formen überführt und mit Spurr Standard überschichtet. Zur Polymerisation wurden die Proben in den Formen für 16 Stunden bei 70 °C erhitzt. Mit einem Glasmesser wurden an einem Pyramitome (LKB Biotech) 2 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, die mit einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger übertragen wurden. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop.

5.2.6 Kultur von Insektenzellen

5.2.6.1 Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA

Die gesamte codierende Sequenz von *kringelchen* wurde in den Klonierungsvektor pFastbac (GIBCO) ligiert. Nach Transformation in *E.coli XLBlue* wurde das rekombinante Plasmid präpariert und mittels Restriktionsanalyse verifiziert. Anschließend wurde der rekombinante pFastback in kompetente DH10 bac-Zellen (GIBCO) transformiert, aus denen dann über alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) die rekombinante Bacmid-DNA präpariert werden konnte.

5.2.6.2 Kultivierung von SF9-Zellen

Adhärenz wachsende SF9-Zellen wurden in Vollmedium bei 27 °C kultiviert. Aus einer dichtgewachsenen Zellkulturschale konnten die Zellen mechanisch durch Spülen mit neuem Medium abgelöst, bis 1:20 in Vollmedium verdünnt und in neue Schalen überführt werden. Unter diesen Bedingungen brauchten sie etwa 6 Tage bis zur Konfluenz. Ein Medienwechsel war in dieser Zeit nicht notwendig, erfolgte aber bei Zellen, die zur Transfektion vorgesehen waren alle zwei bis drei Tage und am Tag direkt vor der Transfektion.

5.2.6.3 Transfektion rekombinanter viraler DNA in Insektenzellen

Für die Transfektion mit rekombinanter Bacmid-DNA wurden adhärenz wachsende SF9-Zellen, die zu 80% konfluent gewachsen waren, verwendet. Diese Zellen wurden einmal mit Transfektionsmedium gewaschen und mit 5 ml Transfektionsmedium überschichtet, in das

der Transfektionsansatz (40 µl der Bacmid-DNA aus 4.2.6.1 in 500 µl Transfektionsmedium werden vermisch mit 50 µ Lipofektin in 500 µl Transfektionsmedium und 30 Minuten bei RT inkubiert) gegeben wurde. Nach fünf Stunden Inkubation bei 27 °C wurde das Transfektionsmedium durch 10 ml Vollmedium ersetzt. Es folgte eine Inkubation von für 72 h bei 27 °C, nach der das virenhaltige Medium (=Virenstocklösung) abgenommen wurde. Die Lagerung der Virenstocklösung erfolgte bei -70 °C. Um einen ausreichenden Virentiter für die Proteinexpression zu erhalten, musste die Virenstocklösung amplifiziert werden: Hierzu wurde ein Aliquot der Virenstocklösung auf 80% konfluente Zellen gegeben, die dann für 72 h bei 27 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde das virenhaltige Medium abgenommen und bei 4°C oder -20 °C gelagert.

Die Proteinexpression sollte in Spinnerflaschen in Suspensionskulturen mit einem Volumen von 50 ml ablaufen. Leider starben die SF9-Zellen schon nach Transfektion mit dem *kringelchen*-enthaltenden Bacmid ab, so dass keine Proteinexpression erfolgen konnte.

6 Abkürzungen

A	Adenin
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosinnukleotidtriphosphat
dCTP	Desoxycytosinnukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	doppeldestiliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST(s)	“ <i>Expressed Sequence Tag(s)</i> “
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR	FGF-Rezeptor
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
hFGFR	humaner FGF-Rezeptor
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
I-Zellen	interstitielle Zellen
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt

LB	Luria Bertani
LB _{AMP}	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LiCl	Lithium-Chlorid
M	molar
mA	Milliampère
MAB	Maleinsäurepuffer
MAB-B	Maleinsäurepuffer mit 1% BSA
max.	maximal
MCS	„multiple cloning site“ oder Polylinker
MeOH	Methanol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
mRNA	Messenger-RNA
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
Ni-Agarose	Nickel Nitrilotriacetic Acid Agarose
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Ω	Ohm
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum-Temperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	„single stranded“ (einzelsträngige)
T	Thymin, Temperatur
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N,N,N',N'- Tetraethylendiamin
T _m	Primer-Schmelztemperatur (Schmelztemperatur)
TPA	12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit(s) oder Uracil
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (<i>weight</i>) pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-glucuronid

7 Literatur

Abdullah,M., Hughes,P., Craxton,A., Gigg,R., Desai,T., Marecek,J., Prestwich,G., and Shears,S. (1992). Purification and characterization of inositol-1,3,4-triphosphat 5/6-kinase from rat liver using an inositol hexakisphosphate affinity column. *J. Biol. Chem.* 267, 22340-22345.

Alberts,B., Bray,J., Raff,M., Roberts,K., and Watson,J. (1994). *Molecular Biology of the cell.* Garland Publishing, Inc.).

Alsan,B. and Schultheiss,T. (2002). Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development* 129, 1935-1943.

Ball,L., Kühne,R., Schneider-Mergener,J., and Oschkinat,H. (2005). Erkennung Prolinreicher Motive (PRMs) durch Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen. *Angew. Chem.* 117, 2912-2930.

Barron,M., Gao,M., and Lough,J. (2000). Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev. Dyn.* 218, 393.

Bashkin,P., Doctrow,S., Klagsbrun,M., Svahn,C., Folkman,J., and Vlodavsky,I. (1989). Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28, 1737-1743.

Beiman,M., Shilo,B.Z., and Volk,T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* 10, 3003-3017.

Bellot,F., Crumley,G., Kaplow,J., Schlessinger,J., Jaye,M., and Dionne,C.A. (1991). Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO Journal* 10, 2849-2854.

Berking,S. (1977). Bud formation in Hydra: Inhibition by an endogenous morphogen. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 181, 215-225.

Berking,S. (2003). A model for budding in Hydra: Pattern formation in concentric rings. *J. Theor. Biol.* 222, 37-52.

Berridge,M.J. and Irvine,R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.

Berridge,M.J., Lipp,P., and Bootman,M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.

Bieller,A. (1997) Musterbildung und Genexpression unter Einfluss von Lithium-Ionen bei Hydra. Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Birnbaum,D., Popovici,C., and Roubin,R. (2005). A pair as a minimum: The two fibroblast growth factors of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Dyn.* 232, 247-255.

Blumenthal,T. (1998). Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *Bioessays* 20, 480-487.

Bolzer,A., Melzer,R., and Bosch,T. (1994). A SEM analysis of DMSO treated hydra polyps. *Biol. Cell.* 81, 83-86.

Borland,C., Schutzman,J., and Stern,M.J. (2001). Fibroblast growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 23, 1120-1130.

Böttcher, RT., Niehrs,C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr. Rev.* 26 (1) 63-77

Bradford,M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.

Bridge,D.M., Stover,N.A., and Steele,R.E. (2000). Expression of a novel receptor tyrosine kinase gene and a paired-like homeobox gene provides evidence of differences in patterning at the oral and aboral ends of hydra. *Dev. Biol.* 220, 253-262.

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

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

Browne,E. (1909). The production of new hydrants in Hydra by insertion of small grafts. *J. Exp. Zool.* 8, 1-23.

Brysch,W. and Schlingensiepen,K. (1994). Design and application of antisense oligonucleotides in cell culture, *in vivo*, and as therapeutic agents. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14, 557-568.

Bugler,B., Amalric,F., and Prats,H. (1991). Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell Biol.* 11, 573-577.

Bulow,H., Boulin,T., and Hobert,O. (2004). Differential functions of the *C.elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron* 42, 367-374.

Burack,W. and Shaw,A. (2000). Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr. Op. Cell. Biol.* 12, 211-216.

Burdine,R., Chen,E., Kwok,S., and Stern,M.J. (1997). *egl-17* encodes an invertebrate fibroblast growth factor family member required specially for sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2433-2437.

Burgees,W. and Maciag,T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 575.

Burke,D., Wilkes,D., Blundell,T.L., and Malcolm,S. (1998). Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem. Sci.* 23, 59-62.

Campbell,R.D. (1967a). Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. I. Patterns of cell division. *Dev. Biol.* 15, 487-502.

Campbell,R.D. (1967b). Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J. Morphol.* 121, 19-28.

Campbell,R.D. (1973). Vital marking of single cells in developing tissues: India ink injection to trace tissue movements in hydra. *J. Cell Sci.* 13, 651-661.

Cebria,F., Kobayashi,C., Umesono,Y., Nakazawa,M., Mineta,K., Ikeo,K., Gojobori,T., Itoh,M., Taira,M., Sanchez-Alvarado,A., and Agata,K. (2002). FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* 419, 620-624.

Cerione,R.A. and Zheng,Y. (1996). The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 216-222.

Chiquet-Ehrismann,R. and Tucker,R. (2004). Cells in focus. Connective tissues: Signalling by tenascines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1085-1089.

Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Coulier,F., Pontarotti,P., Roubin,R., Hartung,H., Goldfarb,M., and Birnbaum,D. (1997). Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J. Mol. Evol.* 44, 43-56.

Dailey,L., Ambrosetti,D., Mansukhani,A., and Basilico,C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 233-247.

David,C.N. (1972). Quantitative method for maceration of Hydra tissue. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 171, 259-268.

Davis,R.E. and Hodgson,S. (1997). Gene linkage and steady state RNAs suggest trans-splicing may be associated with a polycistronic transcript in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 25-39.

Davis,R. (1996). Spliced leader RNA trans-splicing in metazoa. *Parasitol. Today* 12, 33-40.

De Petrocellis,L., Di Marzo,V., Arca,B., Gavagnin,M., Minei,R., and Cimino,G. (1991). The effect of diterpenoidic diacylglycerols on tentacle regeneration in *Hydra vulgaris*. *Comp Biochem. Physiol C.* 100, 603-607.

DeVore,D.L., Horvitz,H.R., and Stern,M.J. (1995). An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migrations of the sex myoblasts in *C. elegans* hermaphrodites. *Cell* 83, 611-620.

Drouin,G. and de Sa,M.M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.* 12, 481-493.

Eswarakumar,V.P., Lax,I., and Schlessinger,J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 139-149.

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

Flaumenhaft,R., Moscatelli,D., Saksela,O., and Rifkin,D. (2005). Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: Matrix as a source of growth for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J. Cell Physiol.* 140, 75-81.

Flucher,B. (1992). Structural analysis of muscle development: Transverse tubules, sarcoplasmic reticulum and the triad. *Dev. Biol.* 154, 245-260.

Folkman,J., Klagsbrun,M., Sasse,J., Wadzinski,M., Ingber,D., and Vlodavsky,I. (1988). A heparin-binding angiogenic protein -basic fibroblast growth factor- is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.* 130, 393-400.

Fraser,S., Green,C., and Bode,H. (1987). Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra. *Science* 237, 49-55.

Fürthauer,M., Lin,W., Ang,S., Thisse,B., and Thisse,C. (2002). *Sef* is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF-signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 174.

Fürthauer,M., Reifers,F., Brand,M., Thisse,B., and Thisse,C. (2001). *Sprouty4* acts *in vivo* as a feedback-induced antagonist of FGF signalling in zebrafish. *Development* 128, 2175-2186.

Fürthauer,M., Thisse,C., and Thisse,B. (1997). A role for FGF-8 in the dorso-ventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development* 124, 4253-4264.

Fürthauer,M., Van Celst,J., Thisse,C., and Thisse,B. (2004). Fgf signalling controls the dorso-ventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 131, 2853-2864.

Galliot,B. and Schummer,M. (1993). 'Guessmer' screening strategy applied to species with AT-rich coding sequences. *Trends Genet.* 9, 3-4.

Garrido,J.L., Godoy,J.A., Alvarez,A., Bronfman,M., and Inestrosa,N.C. (2002). Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *FASEB J.* 16, 1982-1984.

Gawantka,V., Pollet,N., Delius,H., Vingron,M., Pfister,R., Nitsch,R., Blumenstock,C., and Niehrs,C. (1998). Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech. Dev.* 77, 95-141.

Gierer,A., Berking,S., Bode,H., David,C.N., Flick,K., Hansmann,G., Schaller,H., and Trenkner,E. (1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nat. New Biol.* 239, 98-101.

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

Gisselbrecht,S., Skeath,J., Doe,C., and Michelson,A.M. (1996). *Heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 10, 2993-3002.

Glaven,J.A., Whitehead,I.P., Kay,R., Nomanbhoy,T., and Cerione,R.A. (1996). Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 27374-27381.

Goodman,S., Branda,C., Robinson,M., Burdine,R., and Stern,M.J. (2003). Alternative splicing affecting a novel domain in the *C.elegans* EGL-15 FGF receptor confers functional specificity. *Development* 130, 3757-3766.

Gospodarowicz,D. and Cheng,J. (1986). Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell Physiol.* 128, 475-484.

Graf,L. and Gierer,A. (1980). Size, shape, and orientation of cells in budding hydra and regulation of regeneration in cell aggregates. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 188, 141-151.

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

Grens,A., Mason,E., Marsh,J.L., and Bode,H.R. (1995). Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the Hydra *achaete-scute* homolog has proneural activity in *Drosophila*. *Development* 121, 4027-4035.

Gryzik,T. and Muller,H.-A.J. (2004). *FGF8-like1* and *FGF8-like2* encode putative ligands of the FGF receptor Htl and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Curr. Biol.* 14, 659-667.

Hajihosseini,M.K., Lalioti,M.D., Arthaud,S., Burgar,H.R., Brown,J.M., Twigg,S.R., Wilkie,A.O., and Heath,J.K. (2004). Skeletal development is regulated by fibroblast growth factor receptor 1 signalling dynamics. *Development* 131, 325-335.

Harlowe,E. (1988). *Antibodies; A Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor).

Hanoune,J. and Defer,N. (2001). Regulation and the role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 145-174.

Hassel,M. and Berking,S. (1990). Lithium ions interfere with pattern control in *Hydra vulgaris*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 198, 382-388.

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

Hauser,N.C., Vingron,M., Scheideler,M., Krems,B., Hellmuth,K., Entian,K.D., and Hoheisel,J.D. (1998). Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1209-1221.

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

Hobmayer,B., Snyder,P., Alt,D., Happel,C.M., and Holstein,T.W. (2001). Quantitative analysis of epithelial cell aggregation in the simple metazoan *Hydra* reveals a switch from homotypic to heterotypic cell interactions. *Cell. Tissue Res.* 304, 147-157.

Hobmayer,B., Hatta,M., Fischer,R., Fujisawa,T., Holstein,T.W., and Sugiyama,T. (1996). Identification of a *Hydra* homologue of the beta-catenin/plakoglobin/armadillo gene family. *Gene* 172, 155-159.

Hoffmeister-Ullerich,S.A. (2001). The foot formation stimulating peptide pedibin is also involved in patterning of the head in *hydra*. *Mech. Dev.* 106, 37-45.

Hoffmeister,S.A. (1996). Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from *Hydra vulgaris*. *Development* 122, 1941-1948.

Hoffmeister,SA. and Schaller,HC. (1985). A new biochemical marker for foot-specific cell differentiation. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194, 453-461.

Holland,P. (1999). The future of evolutionary developmental biology. *Nature* 402, C41-C44.

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

Holstein,T.W., Hobmayer,E., and Technau,U. (2003). Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev. Dyn.* 226, 257-267.

Hornberger,M. and Hassel,M. (1997). Expression of *HvRACK1*, a member of the RACK1 subfamily of regulatory WD40 proteins in *Hydra vulgaris*, is coordinated between epithelial and interstitial cells in a position-dependent manner. *Dev. Genes Evol.* 206, 435-446.

Hotz, T. (in Vorbereitung) Isolierung und Charakterisierung regiospezifisch exprimierter Gene bei *Hydra vulgaris*. Dissertation an der Philipps-Universität Marburg.

Hüsken, K. (2004) *Drosophila melanogaster* als heterologes Testsystem für den potentiellen FGF-Rezeptor Kringelchen aus *Hydra vulgaris*. Diplomarbeit an der Philipps-Universität Marburg.

Imamura,T., Engleka,K., Zhan,X., Tokita,Y., Forough,R., Roeder,D., Jackson,A., Maier,J., Hla,T., and Maciag,T. (1990). Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 249, 1567-1570.

Inoue,H., Nojima,H., and Okayama,H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Isaacs,H.V., Pownall,M.E., and Slack,J.M. (1994). eFGF regulates *Xbra* expression during *Xenopus* gastrulation. *EMBO J.* 13, 4469-4481.

Ito,K., Komazaki,S., Sasamoto,K., Yoshida,M., Nishi,M., Kitamura,K., and Takeshima,H. (2001). Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* 154, 1059-1067.

Itoh,N. and Ornitz,D.M. (2004). Evolution of the FGF and FGFR gene families. *Trends Genet.* 20, 563-569.

Ivorra,I., Gigg,R., Irvine,R.F., and Parker,I. (1991). Inositol1,3,4,6-tetrakisphosphate mobilizes calcium in *Xenopus* oocytes with high potency. *Biochem. J.* 273, 317-321.

Jaye,M., Howk,R., Burgees,W., Ricca,G., Ing-Ming,C., Ravera,M., O'Brien,S., Modi,W., Maciag,T., and Drohan,W. (1986). Human endothelial cell growth factor: Cloning, nucleotide sequence, and chromosomal localization. *Science* 233, 541-545.

Jaye,M., Lyall,R., Mudd,R., Schlessinger,J., and Sarver,N. (1988). Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J.* 7, 963-969.

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

Johnson,D. and Williams,L. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60, 1-41.

Jungwirth, A (2001) Etablierung eines Testsystems zur *in vivo* Bindung eines heterologen Liganden an einen *Hydra-Fibroblast-Growth Factor Receptor*. Staatsexamensarbeit an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Kamei,S., Yajima,I., Yamamoto,H., Kobayashi,A., Makabe,K., Yamazaki,H., Hayashi,S., and Kunisada,T. (2000). Characterization of a novel member of the FGFR family, HrFGFR, in *Halocynthia roretzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 503-508.

Kawakami,Y., Capdevilla,J., Büscher,D., Itoh,T., Esteban,C., and Belmonte,J. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104, 891-900.

Kim,J., Lin,J., Xu,R., and Kung,H. (1998). Mesoderm induction by heterotrimeric AP-1(c-Jun and c-Fos) and its involvement in mesoderm formation through the embryonic fibroblast growth factor/Xbra autokatalytic loop during the early development of *Xenopus* embryos. *J. Biol. Chem.* 273, 1542-1550.

Kimmelman,D., Abraham,J.A., Haaparanta,T., Palisi,T.M., and Kirschner,M.W. (1988). The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: Its role as a natural mesoderm inducer. *Science* 242, 1053-1056.

Kleinig,H. and Maier,U. (1999). *Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag).

Koga,C., Adati,N., Nakata,K., Mikoshiba,K., Furuhashi,Y., Sato,S., Tei,H., Sakaki,Y., Kurokawa,T., Shiokawa,K., and Yokoyama,K. (1999). Characterization of a novel member of the FGF family, FGF-20, in *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 756-765.

Kokel,M., Borland,C., DeLong,L., Horvitz,H., and Stern,M. (1998). *clr-1* encodes a receptor tyrosine phosphatase that negatively regulates an FGF receptor signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 12, 1425-1437.

Korswagen,HC., van der Linden,A., and Plasterk,R. (1998). G protein hyperactivation of the *Caenorhabditis elegans* adenylyl cyclase SGS-1 induces neuronal degeneration. *EMBO J.* 17, 5059-5065.

Kostrzewa,M. and Müller,U. (1998). Genomic structure and complete sequence of the human *FGFR4* gene. *Mamm. Genome* 9, 131-135.

Kouhara,H., Hadari,Y.R., Spivak-Kroizman,T., Schilling,J., Bar-Sagi,D., Lax,I., and Schlessinger,J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702.

Kroiher, M., Raffioni, S., and Steele, R.E. (1995). Single step purification of biologically active recombinant rat basic fibroblast growth factor by immobilized metal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1250, 29-34.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., and Schlessinger, J. (2004). The docking protein Gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT antiapoptotic pathway. *Mol. Cell Biol.* 24, 5657-5666.

Landgren, E., Klint, P., Yokote, K., and Claesson-Welsh, L. (1998). Fibroblast growth factor receptor-1 mediates chemotaxis independently of direct SH2-domain protein binding. *Oncogene* 17, 283-291.

Lemmon, M. and Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 19, 459-463.

Li, S. and Muneoka, K. (1999). Cell migration and chick limb development: Chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Dev. Biol.* 211, 335-347.

Liu, A., Li, J., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L., and Joyner, A. (2003a). FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development* 130, 6175-6185.

Liu, C., Nakamura, E., Knezevic, V., Hunter, S., Thompson, K., and Mackem, S. (2003b). A role for the mesenchymal T-box gene *Brachyury* in AER formation during limb development. *Development* 130, 1327-1337.

Livesey, R. (2002). Have microarrays failed to deliver for developmental biology? *Genome Biol.* 3, 2009.1-2009.5.

Lodish, H., Baltimore, D., Berg, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995). *Molecular cell biology*. Scientific American Books Inc.).

Lohmann,J.U., Endl,I., and Bosch,T.C. (1999). Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev. Biol.* 214, 211-214.

MacWilliams,H., Kafatos,F., and Bossert,W. (1970). The feedback inhibition of basal disk regeneration in Hydra has a continuously variable intensity. *Dev. Biol.* 23, 380-398.

Martin,G. (2001). Making a vertebrate limb: New players enter from the wings. *Bioessays* 23, 865-868.

Martin,V.J., Littlefield,C.L., Archer,W.E., and 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., and Bode,H.R. (1997). *Budhead*, a *fork head/HNF-3* homologue, is expressed during axis formation and head specification in *hydra*. *Dev. Biol.* 192 , 523-536.

McCoon,P., Angerer,R., and Angerer,L. (1996). SpFGFR, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, is developmentally regulated during early sea urchin development. *J. Biol. Chem.* 271, 20119-20125.

McCoon,P., Blackstone,E., Angerer,R., and Angerer,L. (1998). Sea urchin FGFR muscle-specific expression: Posttranscriptional regulation in embryos and adults. *Dev. Biol.* 200, 171-181.

Meinhardt,H. (1993). A model for pattern formation of hypostome, tentacles, and foot in hydra: how to form structures close to each other, how to form them at a distance. *Dev. Biol.* 157, 321-333.

Meinhardt,H. (1996). Models of biological pattern formation: common mechanism in plant and animal development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 123-134.

Meinhardt,H. (2000). Models for organizer and notochord formation. *C. R. Acad. Sci. III* 323, 23-30.

Metzger,R. and Krasnow,M. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284, 1635-1639.

Midwood,K. and Schwarzbauer,J. (2002). Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol. Biol. Cell* 13, 3601-3613.

Minobe,S., Fei,K., Yan,L., Sarras-Jr,M., and Werle,M. (2000). Identification and characterization of the epithelial polarity receptor "Frizzled" in *Hydra vulgaris*. *Dev. Genes Evol.* 210, 258-262.

Mitchell,H., Choudhury,A., Pagano,R.E., and Leof,E.B. (2004). Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11. *Mol. Biol. Cell* 15, 4166-4178.

Miyake,A., Konishi,M., Martin,F., Hernday,N., Ozaki,K., Yamamoto,S., Mikami,T., Arakawa,T., and Itoh,M. (1998). Structure and expression of a novel member, FGF-16, of the fibroblast growth factor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 148-152.

Miyamoto,M., Naruo,K.-I., Seko,C., Matsumoto,S., Kondo,T., and Kurokawa,T. (1993). Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretory property. *Mol. Cell Biol.* 13, 4251-4259.

Mohammadi,M., Dikic,I., Sorokin,A., Burgess,W.H., Jaye,M., and Schlessinger,J. (1996). Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 16, 977-989.

Mohammadi,M., Dionne,C.A., Li,W., Li,N., Spivak,T., Honegger,A.M., Jaye,M., and Schlessinger,J. (1992). Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature* 358, 681-684.

Mohammadi,M., Honegger,A.M., Rotin,D., Fischer,R., Bellot,F., Li,W., Dionne,C.A., Jaye,M., Rubinstein,M., and Schlessinger,J. (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Fg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol. Cell Biol.* 11, 5068-5078.

Mohammadi,M., McMahon,G., Sun,L., Tang,C., Hirth,P., Yeh,B.K., Hubbard,S.R., and Schlessinger,J. (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276, 955-960.

Mohammadi,M., Olsen,S.K., and Ibrahimi,O.A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 107-137.

Mookerjee,S. and Bhattacharjee,A. (1967). Regeneration time at the different levels of Hydra. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 158, 301-314.

Moore,R.H., Millman,E.E., Alpizar-Foster,E., Dai,W., and Knoll,B.J. (2004). Rab11 regulates the recycling and lysosome targeting of beta2-adrenergic receptors. *J. Cell Sci.* 117, 3107-3117.

Mulis,K. and Faloona,F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335-350.

Müller,W.A. (1989). Diacylglycerol-induced multihead formation in Hydra. *Development* 105, 309-316.

Müller,W. (1993). Pattern control in Hydra: basic experiments and concepts. *Exp. Theor. Adv. in Biol. PatternFormation* 237-252.

Nagendra,H.G., Harrington,A.E., Harmer,N.J., Pellegrini,L., Blundell,T.L., and Burke,D.F. (2001). Sequence analyses and comparative modelling of fly and worm fibroblast growth factor receptors indicate that the determinants for FGF and heparin binding are retained in evolution. *FEBS Lett.* 501, 51-58.

Nilsen,T.W. (2001). Evolutionary origin of SL-addition trans-splicing: Still an enigma. *Trends Genet.* 17, 678-680.

Nimmo,R. and Woollard,A. (2002). Widespread organisation of *C. elegans* genes into operons: Fact or function ? *Bioessays* 24, 983-987.

Nishimura,A., Morita,M., Nishimura,Y., and Sugino,Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* 18, 6169.

Noda,K. (1971). Reconstitution of dissociated cells of Hydra. *Zoology* 80, 99-101.

Nybakken,K. and Perrimon,N. (2002). Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 280-291.

Ogawa,K., Kobayashi,C., Hayashi,T., Orii,H., Watanabe,K., and Agata,K. (2002). Planarian fibroblast growth factor receptor homologs expressed in stem cells and cephalic ganglions. *Dev. Growth Differ.* 44, 191-204.

Ong,S.H., Guy,G.R., Hadari,Y.R., Laks,S., Gotoh,N., and Schlessinger,J. (2000). FRS proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol. Cell Biol.* 20, 979-989.

Ong,S.H., Hadari,Y.R., Gotoh,N., Guy,G.R., Schlessinger,J., and Lax,I. (2001). Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6074-6079.

Ornitz,D.M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. *Bioessays* 22, 108-112.

Ornitz,D.M. and Itoh,N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, REVIEWS 3005.

Ornitz,D.M., Xu,J., Colvin,J.S., McEwen,D.G., MacArthur,C.A., Coulier,F., Gao,G., and Goldfarb,M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 271, 15292-15297.

Ornitz,D.M., Yayon,A., Flanagan,J., Svahn,C., Levi,E., and Leder,P. (1992). Heparin is required for cell-free binding of fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 240-247.

Otto,J.J. and Campbell,R.D. (1977). Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. *J. Exp. Zool.* 200, 417-428.

Pantoliano,M., Horlick,R., Springer,B., Van Dyk,D., Tobery,T., Wetmore,D., Lear,J., Nahapetian,A., Bradley,J., and Sisk,W. (1994). Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry* 33, 10229-10248.

Pawson,T., Gish,G.D., and Nash,P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 11, 504-511.

Pellegrini,L., Burke,D.F., von Delft,F., Mulloy,B., and Blundell,T.L. (2000). Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407, 1029-1034.

Perez,F. and Berking,S. (1994). Protein kinase modulators interfere with bud formation in *Hydra vulgaris*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203, 284-289.

Plotnikov,A.N., Hubbard,S.R., Schlessinger,J., and Mohammadi,M. (2000). Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 101, 413-424.

Plotnikov,A.N., Schlessinger,J., Hubbard,S.R., and Mohammadi,M. (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98, 641-650.

Popovici,C., Conchonaud,F., Birnbaum,D., and Roubin,R. (2004). Functional phylogeny relates LET-756 to FGF9. *J. Biol. Chem.* 279 , 40146-40152.

Popovici,C., Roubin,R., Coulier,F., and Birnbaum,D. (2005). An evolutionary history of the FGF superfamily. *Bioessays* 27, 849-857.

Powers,C.J., McLeskey,S.W., and Wellstein,A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat.. Cancer* 7, 165-197.

Quiring,R., Wittbrodt,B., Henrich,T., Ramialison,M., Burgtorf,C., Lehrach,H., Wittbrodt,J. (2004). Large-scale expression screening by whole mount *in situ* hybridization. *Mech.Dev.* 121 (7-8) 965-970

Rattner,A., Hsieh,J.C., Smallwood,P.M., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Nathans,J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2859-2863.

Reidling,J.C., Miller,M.A., and Steele,R.E. (2000). Sweet Tooth, a novel receptor protein-tyrosine kinase with C-type lectin-like extracellular domains. *J. Biol. Chem.* 275, 10323-10330.

- Ron,D., Chen,CH., Caldwell,J., Jamieson,L., Orr,E., and Mochly-Rosen,D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the β -subunit of G proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 834-839.
- Rosin,D. and Shilo,B.Z. (2002). Branch-specific migration cues in the *Drosophila* tracheal system. Bioessays 24, 110-113.
- Rouzankina,I., Abate-Shen,C., and Niswander,L. (2004). *Dlx* genes integrate positive and negative signals during feather bud development. Dev. Biol. 265, 219-233.
- Saksela,O., Moscatelli,D., Sommer,A., and Rifkin,D. (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. J. Cell Biol. 107, 743-751.
- Sambrook,J. and Russell,D. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Sanger,F., Micklen,S., and Coulson,A. (1977). DNA sequencing with chain determination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 74, 5463-5467.
- Sano,H., Forough,R., Maier,J., Case,J., Jackson,A., Engleka,K., Maciag,T., and Wilder,R. (1990). Detection of high levels of heparin binding growth factor-1(acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. J. Cell Biol. 110, 1417-1426.
- Sanyal,S. (1966). Bud determination in *Hydra*. Indian J. Exp. Biol. 4, 88-92.
- Sarras,M.-P.J. and Deutzmann,R. (2001). Hydra and Niccolo Paganini (1782-1840)--two peas in a pod? The molecular basis of extracellular matrix structure in the invertebrate, Hydra. Bioessays 23, 716-724.
- Sato,M., Tashiro,H., Oikawa,A., and Sawada,Y. (1992). Patterning in hydra cell aggregates without sorting of cells from differential axial origins. Dev. Biol. 151, 111-116.
- Satou,Y., Imai,K., and Satoh,N. (2002). FGF genes in the basal chordate *Ciona intestinalis*. Dev. Genes Evol. 212, 432-438.

Sawada,A., Shinya,M., Jiang,Y.J., Kawakami,A., Kuroiwa,A., and Takeda,H. (2001). Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 128, 4873-4880.

Schinko, E. (2002) Charakterisierung von mRNAs, die während der Knospung von Hydra verstärkt exprimiert werden: Expressionsmuster in morphogenetisch aktiven Tieren und Sequenzanalyse. Diplomarbeit an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Schlessinger,J., Lax,I., and Lemmon,M. (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors ? *Cell* 83, 357-360.

Schlessinger,J., Plotnikov,A.N., Ibrahimi,O.A., Eliseenkova,A.V., Yeh,B.K., Yayon,A., Linhardt,R.J., and Mohammadi,M. (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* 6, 743-750.

Schneider,M. (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 463-484.

Schoorlemmer,J. and Goldfarb,M. (2001). Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr. Biol.* 11, 793-797.

Shears,S. (1989). Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation. *Biochem. J.* 260, 313-324.

Shimauchi,Y., Murakami,S., and Satoh,N. (2001). FGF signals are involved in the differentiation of notochord cells and mesenchyme cells of ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 128, 2711-2721.

Shishido,E., Higashijima,S., Emori,Y., and Saigo,K. (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: One is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117, 751-761.

Shishido,E., Ono,N., Kojima,T., and Saigo,K. (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* 124, 2119-2128.

Slack, J.M., Isaacs, H.V., Song, J., Durbin, L., and Pownall, M.E. (1996). The role of fibroblast growth factors in early *Xenopus* development. *Biochem. Soc. Symp.* 62, 1-12.

Smallwood, P., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J., Hendry, S., Gilbert, D., Copeland, N., Jenkins, N., and Nathans, J. (1996). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: New members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9850-9857.

Smith, K.M., Gee, L., Blitz, I.L., and 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., and Bode, H.R. (2000). *HyAlx*, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in hydra. *Development* 127, 4743-4752.

Souther, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M., Dikic, I., Ladbury, J., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J., and Lax, I. (1994). Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF dimerization, activation and cell proliferation. *Cell* 79, 1015-1024.

Springer, B., Pantoliano, M., Barbera, F., Gunyuzlu, P., Thompson, L., Herblin, W., Rosenfeld, S., and Book, G. (1994). Identification and concerted function of two receptor binding surfaces on basic fibroblast growth factor required for mitogenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 26879-26884.

Stam, J.C. and Collard, J.G. (1999). The DH Protein Family, exchange Factors for Rho-like GTPases. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 22, 51-83.

Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., and Levine, M. (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 18, 687-699.

Steele, R.E. (2002). Developmental signaling in Hydra: What does it take to build a "simple" animal? *Dev. Biol.* 248, 199-219.

- Steinmetz, P. (2002) Identifizierung und Funktionsanalyse eines Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR) bei der Entwicklung von *Platynereis dumerilii*. Diplomarbeit an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Stern, M.J. and Horvitz, H.R. (1991). A normally attractive cell interaction is repulsive in two *C.elegans* mesodermal cell migration mutants. *Development* 113, 797-803.
- Stover, N.A. and Steele, R.E. (2001). Trans-spliced leader addition to mRNAs in a cnidarian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5693-5698.
- Sudhop, S., Coulier, F., Bieller, A., Vogt, A., Hotz, T., and Hassel, M. (2004). Signalling by the FGFR-like tyrosine kinase, Kringelchen, is essential for bud detachment in *Hydra vulgaris*. *Development* 131, 4001-4011.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., and Krasnow, M. (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87, 1091-1101.
- Suzuki, S., Li, A., Ikemoto, M., and Imamura, T. (2002). Expression of tenascin-c long isoforms is induced in the hypothalamus by FGF-1. *Mol. Neurosc.* 13, 1041-1045.
- Tada, M. and Smith, J.C. (2001). T-targets: Clues to understanding the functions of T-box proteins. *Dev. Growth Differ.* 43, 1-11.
- Tada, M. and Smith, J.C. (2000). *Xwnt11* is a target of *Xenopus* Brachyury: Regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* 127, 2227-2238.
- Takehima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: A novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* 6, 11-22.
- Tardent, P. (1972). Experimente zum Knospensbildungsprozess von *Hydra attenuata* (PALL.). *Rev. Suisse Zool.* 79, 355-375.
- Tateno, H., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. (2002a). Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 604-612.

- Tateno,H., Shibata,Y., Nagahama,Y., Hirai,T., Saneyoshi,M., Ogawa,T., Muramoto,K., and Kamiya,H. (2002b). Tissue-specific expression of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1427-1430.
- Technau,U. (2001). Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* 23, 788-794.
- Technau,U. and Bode,H.R. (1999). *HyBra1*, a *Brachyury* homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development* 126, 999-1010.
- Technau,U., Cramer-von-Laue,C., Rentzsch,F., Luft,S., Hobmayer,B., Bode,H.R., and Holstein,T.W. (2000). Parameters of self-organization in Hydra aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12127-12131.
- Thisse,B., Heyer,V., Lux,A., Alunni,V., Degrave,V., Seilliez,I.,Krichner,J., Parkhill,JP., Thisse,C. (2004). Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale *in situ*-hybridisation screening. *Meth. Cell Biol.* 77, 505-519.
- Thisse,B. and Thisse,C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev. Biol.* 287, 390-402.
- Thomas,P. (1983). Hybridisation of denaturated RNA and small DNA fragments trasferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 5201-5205.
- Thomsen,S., Till,A., Wittlieb,J., Beetz,C., Khalturin,K., and Bosch,T.C. (2004). Control of foot differentiation in Hydra: *In vitro* evidence that the NK-2 homeobox factor CnNK-2 autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene. *Mech. Dev.* 121, 195-204.
- Tickle,C. and Münsterberg,A. (2001). Vertebrate limb development - the early stages in chick and mouse. *Curr. Op. Gene. Devel.* 11, 476-481.
- Trokovic,R., Jukkola,T., Saarimaki,J., Peltopuro,P., Naserke,T., Weisenhorn,D.M., Trokovic,N., Wurst,W., and Partanen,J. (2005). Fgfr1-dependent boundary cells between developing mid- and hindbrain. *Dev. Biol.* 278, 428-439.
- Tsang,M., Friesel,R., Kuhdoh,T., and Dawid,I. (2002). Identification of *Sef*, a novel modulator of FGF signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 165-169.

Turing,A. (1952). The chemical basis of morphogenesis. Phil. Trans. R. Soc. London 237, 37-72.

Vallejo,M., Jackson,T., Lightman,S., and Hanley,M. (1987). Occurrence and extracellular actions of inositol pentakis- and hexakisphosphate in mammalian brain. Nature 330, 656-658.

van de Graaf,S.A., Ris-Stalpers,C., Pauws,E., Mendive,F.M., Targovnik,H.M., and de Vijlder,J.J. (2001). Up to date with human thyroglobulin. J. Endocrinol. 170, 307-321.

Vandenbergh,A.E., Meedel,T.H., and Hastings,K.E. (2001). mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. Genes Dev. 15, 294-303.

Vasella,A., Davies,G.J., and Bohm,M. (2002). Glycosidase mechanisms. Curr. Opin. Chem. Biol. 6, 619-629.

Venkataraman,G., Raman,R., Sasisekharan,V., and Sasisekharan,R. (1999). Molecular characteristics of fibroblast growth factor-fibroblast growth factor receptor-heparin-like glycosaminoglycan complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 3658-3663.

Vincent,S., Wilson,R., Coelho,C., Affolter,M., and Leptin,M. (1998). The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling. Mol. Cell 2, 515-525.

Webster,G. and Wolpert,L. (1966). Studies on pattern regulation in hydra. I. Regional differences in time required for hypostome determination. J. Embryol. Exp. Morphol. 16, 91-104.

Westermeier,R. (1991). Elektrophorese-Praktikum. (Weinheim: Verlag Chemie GmbH).

Whitehead,I., Campbell,S., Rossman,K.L., and Der,C.J. (1997). Dbl family proteins. Biochim. Biophys. Acta 1332, F1-F23.

Whitmarsh,A. and Davis,R. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold. Trends Biochem. Sci. 23, 481-485.

Wilby,O.K. and Webster,G. (1970). Experimental studies on axial polarity in hydra. J. Embryol. Exp. Morphol. 24, 595-613.

Wilkie,A.O., Patey,S.J., Kan,S.H., van den Ouweland,A.M., and Hamel,B.C. (2002). FGFs, their receptors, and human limb malformations: Clinical and molecular correlations. *Am. J. Med. Genet.* 112, 266-278.

Wilson,R., Battersby,A., Csiszar,A., Vogelsang,E., and Leptin,M. (2004). A functional domain of Dof that is required for fibroblast growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2236-2276.

Wolpert,L. (1971). Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 6, 183-224.

Wolpert,L., Beddington,R., Jessel,T., Lawrence,P., Meyerowitz,E., and Smith,J. (2001). *Principles of development.* (Oxford: Oxford University Press).

Wong,A., Lamothe,B., Lee,A., Frost,A., Schlessinger,J., Lax,I., and Li,A. (2002). FRS2 \square attenuates FGF receptor signaling by Gbr2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6684-6689.

Xu,J., Nakahara,M., Crabb,J., Shi,E., Matuo,Y., Fraser,M., Kan,M., Hou,J., and McKeehan,W. (1992). Expression and immunochemical analysis of rat and human fibroblast growth factor receptor (flg) isoforms. *J. Biol. Chem.* 267, 17792-17803.

Yamaguchi,T.P. and Rossant,J. (1995). Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 485-491.

Yayon,A., Klagsbrun,M., Esko,J., Leder,P., and Ornitz,D.M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841-848.

Yum,S., Takahashi,T., Hatta,M., and Fujisawa,T. (1998a). The structure and expression of a preprohormone of a neuropeptide, Hym-176 in *Hydra magnipapillata*. *FEBS Letters* 439, 31-34.

Yum,S., Takahashi,T., Koizumi,O., Ariura,Y., Kobayakawa,Y., Mohri,S., and Fujisawa,T. (1998b). A novel neuropeptide, Hym-176, induces contraction of the ectodermal muscle in *Hydra*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 584-590.

Zeng,J., Ren,M., Gravotta,D., De Lemos-Chiarandini,C., Lui,M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Xu,G., Shen,T.H., Morimoto,T., Adesnik,M., and Sabatini,D.D. (1999). Identification of a putative effector protein for rab11 that participates in transferring recycling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 840-845.

Zhang,Y., Gorry,M., Post,J., and Ehrlich,G. (1998). Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*) gene and comparative analysis of the human *FGFR* gene family. Gene **230**, 69-79.

Zhu,X., Komiya,H., Chirino,A., Faham,S., Fox,G., Arakawa,T., Hsu,B., and Rees,D. (1991). Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. Science 251, 90-93.

Zverlov,V., Liebl,W., Bachleitner,M., and Schwarz,W. (1998). Nucleotide sequence of *arfB* of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of α -L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases. FEMS Microbiol. Lett. 164, 337-343.

8 Anhang

8.1 Sequenzdaten der aus dem Genexpressionscreening stammenden cDNAs

BM1

ACACCAATCAGAGATGAGAGGTCGGGAAAAGAGTTACCAATACGGAGCACATTTTTTTAACATTCT
GAGAAAATGATTCCGCTTAGAGTGGGAATATGTATAGTGGACTACACCAGAAATAAACTTCAATTG
CCTCACTTGCTTGAAAACTTTGTGATGATGGAAGTATGGAATTTATTGTCATTGATATGAATAAGA
GTTTGACTGAACAAGGTCCGTTTGTATGTCATTATCCAAAAGGTTTTGGAATGGTACAACGTTGGGA
ANAACAAGGAAATGCGAAGTTACGGAACTTGTGAGTTATGTCCGTTCTCACCAATCNATTAATAAT
GCTTGACCCTATAGAAGAAACAGTCCGATTGGCTGATAGATTTTACTCCATGGAAGTCATGAGAA
CTGTCAATTCACAATGAAAGGAATACAGGTTTTTGTCCAAAATATATATTTCTTGATGATTCTAAT
GTTNAAAACGCTTTAGATGTGATTGCTGCGGGTGGCATTAAAGTTTCCAATCATAACTAAGCCCCCT
GTCACTCGATGTGATGCTGAAGCTCATGATATGTGCGATTATTTTNTTCTGAAANGCGCGCATGTGA
TATTGNTGCTC

Inositolphosphat-1-3-5-triphosphat-5/6-Kinase (E-Value = $2,6e^{-9}$)

CW1

AATATCCGATATTCAGTAAACCAATATACAACCTCCGTGGTATGGGTGCTCGATATACAGATTTTT
CAAAATGAAGATGAATACAAAACTCGATGAAAACGGGTCATATGTGGTGCAAACCTTCTAATTGGT
GAACACTGGAGTTCTGATGTAGCACTCATTGATGGGAACTAAAATGGCAATGTCATGCAATTGTT
ACGCGTTAAATGATGGAATCTTTGACTACTGGGAAATAAAAGAAAATAAGTTTCTAGATGAAAAA
TAAAAGATTTTCGTCGAACAAATGTTTCCAGGATACACTGGGATGTTGAACCTTGAAACAATAAATG
GCGTAATAATTGAAATCCATTTACGATTTGCTGATCAATGGCCTGATTTATACGGCGAATGGTTTG
TTCCTTCCTTGGTAAATTTATATGCAAATAAAGAATTCTCTATCGGTACATCTAAAAGAAATGGGTA
TAGTGTGTTTTGTTTGATAAACCACGTCAACACGTAAAACCTACCCCGGAATTAATAAAAGGTTA
AAAGAAGAATACTCGCATGTAAGTAGCATTCAATTGACATTTAATGAGCATGCGCCTGTTAGTTCT
ACTCAATGGCACCAGGAGGACTTATGATTGCTGTAATTAATGGATTTGATTTGTGTGAATGTA
AGTTAGAGAAAACTGTCCAAGTGTGCTGAATAAATTGAATTTCTGTATAAGTGAGTTAAGT
GGCCCTTACAAACNAAATCTCAACCAAACCTTGCANAAGAATTTAATNTGGTTGGCATNAAAAA
ATAATCCTAAGCNATCTTTTTTTAAGCCATGAAGAAAAATTTT

CW2

AAAACACTAAATAAAATCCGAAAGGATCCCTGCAATCGAGAATGGAGCAAATGACTTTACGTGG
AACACTAAAAGGCCATAATGGCTGGGTAACGCAAATTGCAACAACACCTCAAAATCCCGACTTAA
TTCTTTTCAGCCTCCCGAGATAAAACACTTATTCAGTGGCAGCTGACAAGAGATGATCAAACAAATT
ATGGGTTCCCAAAAAAATGTTTAACTGGGCATAACCATTTTGTCTGATGTAGTCCTTTCTCAG
ATGGCCAGTTTGCACTTTCCTGTTTCGTGGGACAAGACATTGCGTCTTTGGGACCTAAATCAGGGA
ATTACGACTAAGCAATTTGTTGGACACACAAAGGATGTTTTGAGTGTTGCATTTTCAGCTGATAAT
CGCANAAATTCAAGCTCAAGACCAATCATTTGGCCACACTGGTTTTTGAATGCTGGACTGTTTCAC
CTGATGGTTCTCTTTGTGCTTCAGGTGGCAAAGATGGCAATGCTATGTTGGGGACCTAAATGAAG
GAAAACACTTGTATACTCTTGATGGCGGAAATGTAATCAACGCCTTGTGCTTTAGTCCCAACAGGT
ACTGGTTGTGTGCTGCAACTGGTCCTATGATTAATTTGGGATTTGGAAATGAAATCTGTTGTTG
ATGAGTTAAACCCGGAGTAATTGGTATTAGTACTAAATCTAGAGCTGCTGATTGTATTTTCATTAG
CTTGGTCAGCTGATGGCCAAACATTGTTTGCAGGGTATACTGATAATCTTATCCGTGTCTGGCAA
GTAACACGGTCTTCTCAGTAATATTTAACTGAAATATATTGCTAAGGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

HvRACK1 (receptor of activated PKC) (E-Value = $7,2e^{-86}$)

Accession-Number: X97800

YES1

TCCAACAGAAGAAGCTAAAGCTTTTGCAGAAAAAATGAACTCTCATTTATTGAACTTCTGCTTTG
GATTCTACAAATGTAGAAGTTGCGTTTTGAAAATTTTTAGAAGAAATTTACCATATTGTATCTCAA
AGCAGATACATAATGCTTCAAATCGAACGGGAAATCAACCGAGCGATAACGTTCAAACAATCCAG
TAGCACCAACTGTAGAAATCGATCAACGAAAGTCAGTTAAATGCTGGCAAACCTTGAAAATTTATTT
ATTTGCAATTTTTTATACTGNTCAAATTCGAATTCTCAATAGGGCAACCTATTTTAAACAAGGATAT
GGTATTA AGTATATGGTTATAACTTTT TCTGGGAAAA CTTTTTTANTTTTTATTTTCGGANAAANATT
GGTTTTTAAT ATAAATTTTT TTTTAAA

Rab 11 (E-Value = $1,9e^{-39}$)

YES2

ATGACTGTGAAGGATGATGAGTATGATTATTTATTTAAAGTTGTATTGATTGGTGATTCTGGCGTA
GGAAAATCAAATCTGCTTTCGCGTTTCACTCGCAATGAGTTTAACTTGAATCCAAATCTACTATTG
GTGTTGAATTTGCTACAAGAAGCATTTCAGCTTCAAGTTGGAGGAAAATTATAAAAGCTCAAATTTG
GGGATACTGCTGGTCAAGAAAGGTACAGAGCAATAACCAGTGCTTATTATCGTGGTGCTGTTGGT
GCTCTGTTAGTTTATGATATTGCAAACATATAACTTATGAAAATGTTGAGAGGTGGCTGAAAGAA
CTTAGAGATCATGCTGATGCAAATATAGNTATTATGTTGGTTGGAAATAAATCAGATCTGCGCCAT
CTAAGAGCTGTTCCAACAGAAGAAGCTAAAGCTTTTGCAGAAAAAATGAACTCTCATTTATTGAA
ACTTCTGCTTTGGATTCTACAAATGTAGAAGTTGCGTTTTGAAAATTTTTAGAAGAAATTTACCATA
TTGTATCTCAAAGCAGATACATAATGCTTCAAATCGAACGGGAAATCAACCGAGCGATAACGTTT
AAACAATCCAAGTAGCACCAACTGTAGAAATCGATCAACGAAAGTCAGTTAAATGCTGGCAAACCT
GAAAATTTATTTATTTGCAATTTTTTATACTGNTCAAATTCGAATTCTCAATAGGGCAACCTATTTT
AACAAGGATATGGTATTAAGTATATGTTATAACTTTTTCTGGGAAAACTTTTTANTTTTTATTTTCG
GANAAANATTGGTTTTTAATATA AATTTTTTTTTTAAA

NADH-Dehydrogenase (E-Value = $7,1e^{-13}$)

sub729

GTTTGTAGCATGCANTACACAACTTGACACTTTGCGATTACTGTGATGGATTACTTGGGGTATT
GGAAGTCAAGGATACCAATGTCAAGTTTGTGAAATCAATGTGCATAAGCGAGTTTGTTC AAGAGT
CTTCCAGATCAATGTCCTGGTCTTGGACCAAATCAAAAAACCTTCAAAGGATTTAAGATTAAG
CAGAACCTACCTTTACCTATTAAGCCTTCTGGTTCTACTTTTACCTACCTAAAGCCTTCTGGTTATG
ATGATACTACAGATGTTATTGGGGAGAAGGGACGTGCTAATTCATCTGCAAGTGATCCAAGTATG
GCAGTTCCTGATGACAGTGTGATCAGCATCTTGATGTTGACAAGGAAAGACCAAGTACACCTCA
AGAGGACTCTCATTCTAAAAAGACAAAATCCACTAGTTTGTGATTGCCCAAANAAGCAAAGCCAAT
GGTTGGAGGANGAACATTACCTGNAATGAAAAGTGATACTTTCAATGGTGGTTCAACACANACCT
CTAATTTACGTCCTATTCTTGGTTGTGATTCACCGCCTCCAGAAATTCAGTGAATTCAGAGGAA
GAGTTAGACTCTGACTTANAGGTGGAGGCTGANACTCCNAACTGGCAAGATTCAGCTGATAAAAA
GGGTTTAAAAG AACTCNAAGGANAGAGATCAA

Guanin-Nukleotidaustauschfaktor RHO/GEF2

(E-Value = $5,9e^{-11}$)**KH3**

CGGCACGAGGGGTTTACAACTTATCGATTCTTCTGCTTTAATGACATGGTATTTACCAAATTG
ATAATGAAATATGTGGAGACCATGTTCAATTTGACAGCTGACTGGTTTTGTAACAATGATAAATCATA
TAAAAAGAGCAACTACAAAGTATGCNNGATCTAATGTTTATGAAATAGCTTACAGTTCTGCAAAC
AATTTAGTTTATTTAATTAGCTTATTCGAAGAGTGTGGTAATGGAGTTTGTGAAAAATCAAAGAGT
TTTGTTCCTCAAATCAAGTATTTAAAATATTGGAGTTTGGTCTTTGTAAGGGTAGCCTATACAAACG
TATGGATTCATTATGTTTTAATAACGTTATCTACCCTGCAAATGATAATGAAGTATGTGGAGATATT
GTGCATTCAAAAACGTTATGCTTCTGTTTTAACAATAAGTCATACAAGAGAAATCAGTTTGGTATTG
CAGTAATGACGTTTTTAAATTTAAGTAACTCAATATGTAATGGGGGAATAATTTTATGTTTAAAGCGTT
TATGAAATTTGTGGTCAAGTCATTCATTTAAAAGCTGATCGATTTTGTTTAATGAAGTTTCTTTTAA
GAAAAGTGATTTTAGTATTTGCGCAGGCAACCTTTTTTCACTTAGTTCTTCATTTGNTATGACAAC
AAAGTTTA TGAA

KH4

GGCACGAGGGTACTACTAGTGAAGGTCACGTGCTTGATGTTTTCGATGAAAATGCGGAAAATGA
TTTAGCTCACAACAAGCTGAAGAATTTGCAGAACAGTCAAAGGACTTCAAAGTCATCAACAAGC
TTGTCGTTTAAATGGAACNTGGTTTTAAACACAGCAATAGTGTAAAGATTATAAAGTCGAAGTTTA
CAAAGGATCCTGGGAACAAGATCAAAGAGAAGGTTTTGGTGTGTTATTATGATAATGGCTCGAT
TATATCGGTCACTGGAAGCAAAACAAACGCCATGGTTATGGACTATATGTTAGTGTGATGGTAAA
AAAAATGGGGGAAAATGGTTTAAATGACAGTTTGTACTTACTCGGCTGAAAAATTTTCGTCTCACT
TTTTGAGAAGAAAAACAACGAATAATATTTGCCGCCATGGAAGCATCAACGTGTGCAACTTCTA
AAGTAAGTCTTGCAATAAAACGGGCAATTGCTGCTAAACAAGTAGCAGATTGTGCCAAAAAAGCT
GCAGATGTTGCTGAGGAACATGCCAAAGTGGCTGAAACTGCAGCTACAAAGTTTACATGGCATCC
ATCATTTAAAGTGTTTATATTACCAAACCAACCTTACAAAGATCACTTAACGAAAAGAGCAACCAT
TCACCGAAACTTTTTGTCTCATTCTAA

Junctophilin

(E-Value = $8,7e^{-19}$)

KH9

GGCACGAGGATTTGGTGATCCATGCGTAGGAACATACAAATACCTCGAAGTGCAATTTAGATGTA
AACCACAAGTACCTTTTGCACCTGAGCATGTGAAGGAAGCAATTTAAAAATTGATTGCAACGGGAAA
GGATTAATTGAAATAGTTGATGCAAATTATGGAAGGACTGTGTCAGGAGTTTGCCCTGGAGCAA
TGACTTAAATACAAAATGTGATAACAAAAAAGTCGCTGGAAGTAATACACAATATCTGCTCTGG
AAAGTCGTCATGTATTATAACAGCATCCAACGCAGTATTTGGTGATCCATGCGTAGGAACATACAA
ATACCTCGAAGTGCAATTTAGATGTAAACCGCAAGTACCTTTCCGACGAGCATGTGAAGGAAGCA
ATCTGAAAATTGATTGCAACGGGAAAGGATTAATTGAAATACTTGATGCAAATTATGGGAGGACTG
TGGCG GGAGTTTGCCCTGGTGCAAATGACTTAAATACAAAGTGTGATAACAAAAAAGTCGCTA
GAAATTATACACAATCTTTGCTCTGCAAAGTCATCATGTGTTATTACAGCATCCAACGCAGTGT
GGTGATCCATGCGTAGGAACATACAAATACCTTGAAGTGCAATACAGATGTAAATCACAAGTACCT
ATTGCACGANCTGTGAAGGAAGCGATCTA

Rhamnose-bindendes Lektin (E-Value = $2,6e^{-53}$)

KH12

GGCACGAGGCTGGTTTTAACATCTACGTGGTTTTGTCTGTCAACTCATTGCCTTTTCCGCGACGAT
GAAGATACCGATAACGAAATCGATGGCGACATTAGCGAATTAGAAAATGAATATCAAACCAATCAA
GTTTATGATTATAACAAATTTAAAAACCAAGCAGACTTGAAAATCAAAGCTAGAAATCACTATGCTC
TTTCATTTTTCTGGGCCTAAAGTTGGTCGTGATGTTAATTTTCACTCAGTTTTATCTCCATCCGAC
GAATCAAGAAAATCATTCAATAATTACCATGAAAACGGATACCGACATGATAAACCTGCATTTTTAT
TTAAAGGATATAAACCTGGAGATCAAACACAAAAGAATTTGTAACCTTCATTTAGTTTTTCAATTACC
TTTATGCTATTTATTTAATGTAATCATGTGATATTTGTATAATTTTAAAGATTTATTAAGATAAGATTA
GTTCTAACTACAAAAA

Hym-176 (E-Value = $1,1e^{-84}$)
Accession-Number : [BAA33852](#)

<i>HYM-176</i>	ACGAGCTCGTGCCGATTCCGGCACGAGCGGCACGAGGAAAATCG	42
<i>HYM-176</i>	ATCTAGCTAGTTGAAAACTCTCGACACATAATTATTACAAAGTAAAGAACGAA	97
<i>HYM-176</i>	GTAAAAA ATG TCA AAA ATA AAT AAA CTA ACA ATG TAC GTG TTC	140
	<u>M S K I N K L T M Y V F</u>	
<i>KH12</i>	CTG GTT TTA AAC ATC TAC GTG GTT TTG TCT GTC	33
<i>HYM-176</i>	TAT GCA TAT CTG GTT TTA AAC ATC TAC GTG GTT TTG TCT GTC	182
	<u>Y A L L V L N I Y V V L S V</u>	
<i>KH12</i>	AAC TCA TTG CCT TTT CGC GAC GAT GAA GAT ACC GAT AAC GAA	75
<i>HYM-176</i>	AAC TCA TTG CCT TTT CGC GAC GAT GAA GAT ACC GAT AAC GAA	224
	<u>N S L P F R D D E D T D N E</u>	
<i>KH12</i>	ATC GAT GGC GAC ATT AGC GAA TTA GAA AAT GAA TAT CAA ACC	117
<i>HYM-176</i>	ATC GAT GGC GAC ATT AGC GAA TTA GAA AAT GAA TAT CAA ACC	266
	<u>I D G D I S E L E N E Y Q T</u>	
<i>KH12</i>	AAT CAA GTT TAT GAT TAT AAC AAA TTT AAA AAC CAA GCA GAC	159
<i>HYM-176</i>	AAT CAA GTT TAT GAT TAT AAC AAA TTT AAA AAC CAA GCA GAC	308
	<u>N Q V Y D Y N K F K N Q A D</u>	
<i>KH12</i>	TTG AAA ATC AAA GCT AGA AAT CAC TAT GCT CCT TTC ATT TTT	201
<i>HYM-176</i>	TTG AAA ATC AAA GCT AGA AAT CAC TAT GCT CCT TTC ATT TTT	350
	<u>L K I K A R N H Y A P F I F</u>	
<i>KH12</i>	CCT GGG CCT AAA GTT GGT CGT GAT GTT AAT TTT CAC TCA GTT	243
<i>HYM-176</i>	CCT GGG CCT AAA GTT GGT CGT GAT GTT AAT TTT CAC TCA GTT	392
	<u>P G P K V G R D V N F H S V</u>	
<i>KH12</i>	TTA TCT CCA TCC GAC GAA TCA AGA AAA TCA TTC AAT AAT TAC	285
<i>HYM-176</i>	TTA TCT CCA TCC GAC GAA TCA AGA AAA TCA TTC AAT AAT TAC	434
	<u>L S P S D E S R K S F N N Y</u>	
<i>KH12</i>	CAT GAA AAC GGA TAC CGA CAT GAT AAA CCT GCA TTT TTA TTT	327
<i>HYM-176</i>	CAT GAA AAC GGA TAC CGA CAT GAT AAA CCT GCA TTT TTA TTT	476
	<u>H E N G Y R H D K P A F L F</u>	
<i>KH12</i>	AAA GGA TAT AAA CCT GGA GAT CAA ACA CAA AAG AAT TTG TAA	369
<i>HYM-176</i>	AAA GGA TAT AAA CCT GGA GAT CAA ACA CAA AAG AAT TTG TAA	518
	<u>K G Y K P G D Q T Q K N L *</u>	
<i>KH12</i>	CTTCATTTAGTTTTTCAATTACCTTTATGCTATTTATTTAATGTAATCATGTGATA	425
<i>HYM-176</i>	CTTCATTTAGTTTTTCAATTACCTTTATGCTATTTATTTAATGTAATCATGTGATA	574
<i>KH12</i>	TTTGTATAATTTTAAAGATTTTATTAAGATAAGATTAGTTCTAACTACAn	473
<i>HYM-176</i>	TTTGTATAATTTTAAAGATTTTATTAAGATAAGATTAGTTCTAACTA	620

Fig. 8.1: Sequenzvergleich von *KH12* aus *Hydra vulgaris* mit *Hym-176* aus *Hydra magnipapillata*. Identische Nukleotide sind schwarz unterlegt. Unter der Nukleinsäure-sequenzen ist die abgeleitete Aminosäurenabfolge aufgeführt. Die Aminosäuresequenz von Hym-176 ist fett gedruckt und unterstrichen, die Sequenz eines weiteren Peptids (Hym-357) ist unterstrichen.

KH15

GGCACGAGGCCTCGTGCCGATTCCGGCACGAGGCGATTTGATATACATTGGATACACTTACACATT
 TTCTTCCTACACTTATCAAGACTATCGCATTGGTGTGAAAGATGACGGAGTGCTTGTGGGAATTAA
 ATACATGAGTGCNTGATGAATATGTAGTTACAAAAGGTTTGAACGGACAAAACGGGACTGTATCTT
 TTCAGTCCGGCTAAAGACAGCAACAAGTATCTACGTCATCAAAATTTTATTTTAAAACCTCATCAATA
 CGACAACCTAATTTGTTTAAAAATGATGCGTCGTTTTTTGTTTCGCGAAAATCAGTATTTAATGAT
 TTCGTTGCCTTCGAGTCAACTAATTATCCTAATTATTTCTACGACAACAAAATTTTAAATTTGGTGT
 GCAATCAGAAATGGACTTGGAACTTACATAATGGATGCTAGCTTCCAACCATTACAATGTGGAAA
 AAATAAAATTGGATATTCCTTTTCATTTGAATCTTATAACGCTTTTCAATATCGAATTGGTGTAAACA
 AGGACTTAACTGTATCCTTAATTTATATGGGTGGTGGATGAATTCATTTGTGAAAGGTTTAAAT
 GGACAGGTTAACAGTGTATCTTTTCAATCGGTTGCAAATGAGAGCATGTACTTGTGTGAACAGAG
 CTCTATCTTAAGAATGGGTAGTTTTGTCA

Arabifuranosidase

(E-Value = $4,2e^{-14}$)

8.2 cDNAs, die im Rahmen des *Splice Leader-Screenings* identifiziert wurden

kn1

CTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGTGTCTGATTTTCCTCCAACCTTACATAAAAAAATGGATGCATTT
GAGGAGTCATTAACAGAAGTTGAAGATGTTTTAAAGCCATTTTTAAAGATCCTATGCAGATTTGCA
TGAAAAGATAACAGAGCATTGGGTAAAGCAAAGTTAGACTTGATAATTGCATATCTGCAAACCTCAC
TGTTTTGGACTTATTTAGATAACACAGGGGATCGGACCCAAAGAATCATCCAATCAAAGATGCAG
CTTATCGAATCAACATGTATGAATCGTGTCAACAATTGAGAAGAAAA

kn3

AACACATCTAAACTTGTTTTAAGTATTTGTGTCAATAAGATCAGGAGCAATAGTGACAAATGTCTAA
CAAAGTGAAGCCTCACATCAACATCGTTGTCATCGGACATGTGCGACTCAGGAAAATCAACAAGTA
CTGGCCACATGATTTACAAATGTGGTGGTATCGACAAACGACAAATCGAAAAATTCGAGAAAGAA
GCCAGGAAATGGGAAAAGGATCATTCAATATGCCTGGGTTTTAGATAAACTTAAGGCAGAACG
TGAAAGAGGTATCACCATCGATATTGCACTATGGAAGTTTGAACTACTAAATACGTAGTTACTAT
TATTGATGCTCCTGGACATCGTGACTTCATTA AAAACATGATCACAGGTACCTCTCAGGCTGATTG
TGCCGTA CT CATCGTTGCAAGCAGTACTGGAGAGTTTGAAGCTGGTATTTCTAAAAATGGTCAAA
CCAGAGAACATGCTCTTTTGGCTTTTACTCTAGGTGTTAAACAAATGATTGTTGCTGTTAATAAAAT
TGACAACACTGAACCACCATACAGCGAAGCTCGATTTAATGAAATCAAAAAAGAAATTAGTGCCTA
CGTTAAAAAAGTTGGGTATGATCCTAAGACT

Elongationsfaktor 1 α

(E-V = 2,7e⁻¹²⁷)

kn7

ACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGTTATAAAAAATGTATTGGTTTGTGTTTTTACTGTTTCGCTTTAA
AGCAAGTGGTTGGCAGCACCTTATTGCAGTGTGAATGGTGTAAATCCAGGTCATGAGCCGTACCC
TAATATTGTTTCAATAATGACTGGATATAACATTCTTCAAGGAAATCCATTTACTTCATCTCATACTA
GTGATCCAGGTTTCTCAACAGGATACATTTTTGTTCCAACCTTATAAAACACCATCTGGTAGCTATG
GCCTTCATGGTGGAG

kn12

TGAAACTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGAAATTATGTCTTTGTTTCCTGATTTGTCTGATGCATTTGA
GGGACCTCAAGAGATTGAAAGTTTGTGTATGTAATGTGCTGAATGATCAAATAAATCGATAAGTCG
ATATTCGATAGCTGATCTAGCAAAATATAATATAGATATTTACAGTAGATTAGATAGCTAGATAGAT
CGTAAATGCTAGCTTTGATCGATATAAATGCTAGTACGTAGAAATATCTATATCTATTATATCTTAT
CTGACTGT

kn31

CCCCGGGCTGTAGGCACGTGTA AATGCATCATGTTCTTCTACTTGAACCTTTTTATGGGGGTT
CTCATAAACA ACTGATTGATTATTTGGTCGAAATTTTACATGCAAAAGATATAGAAGTCACTAAAT
CACAATGACTGATAAAAAGTGGCACTGGAGATTAAGGACTAGTGCATTATATTTTGCAGAACACAT
TCCTAAAGAGAGGGATTTTAGCTGTATTTTTGTCTCATCAGTAATTA ACTTGGCAGAGTTGATTGG
TTTGC

Adenylatcyklase

(E-Value = 1,1e⁻⁸)

KN36

GAGACTAGTTCTCTCTCTCTCTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATTGTTAAAGTTAAAAAA
AAACACCACAGAAATTAATCAAAGATGCATGTATCACCATATATCAATAAAGTTTTTCATAGTAGCAA
AAGTTTATAAATATTCAATATAGTTGATAAAAAATTTTCTAAAGTAGTGGTAATGGCAGAGCTAAAT
AAAATCGAAAAGGATAAAGATTCATTTACTGTTAATGATTTAGTACTGTGTTATGAGCCAGATCCCA
TAAAGCAAGAGCCCCTCTCGAA

Glykosyltransferase (E-Value = $1,5e^{-7}$)

KN65

TGCAGGTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATTCATATACTAGAAAATGTGTGGCATCTGGGCTTTGTT
TGGTTATGACCATAGTGCATGTTGAGAGCTTCATCATGCTTTAGAGTTGGCACATCGAGGTCCAG
ATTTTTTTCGTATTGAATCCTTGCCCCATTTTCAGCATAACAGTTCTTGCATTTTCATCGTTTATCAATC
ATGGATGATTTAACTGGTCAACAACCAA

Asparaginsynthetase (E-Value = $4,0e^{-14}$)

kn168

GTAGGTATCGACAAACGACAAATCGAAAATTCGAGAAAGAAGCCCAGGAAATGGGAAAAGGATCA
TTTAAATATGCCTGGGTTTTAGATAAACTTAAGGCTGAACGTGAAAGAGGTATCACCATCGATATT
GCACTATGGAAGTTTGAACTACTAAATACTAGTACTATATGATGCTCTGACATGTGACTCATAAA
ATATGATCACAGGTACTTTAGCTGATGTCGATCTATGCTCAGCGTACTG

Elongationsfaktor 1α (E-Value = $2,8e^{-30}$)

KN170

AAAATACTAAATAAAATCCGCAAACCTTCTATTTTCTTAATAAAGGATCCCTGCAATCGAGAATGGA
GCAAATGACTTTACGTGGAACACTAAAAGGCCATAATGGCTGGGTAACGCAAATTGCAACAACAC
CTCAAAATCCCGACTTAATTCTTTTCAGCCTCCCGAGATAAAACACTTATTCAGTAACAGCTGACAA
GAGATGATCAAACAAATTATGGGTTCCCAAAA

HvRACK1 (E-Value = $1,0e^{-31}$)

kn207

AAGTCTCAATCATGTTACTAAAGAACTTTTGTAACAACTTCTTCACGATATACAAGTAAATGATAG
TCAGAGATTGCTGGATCATGAGCGACATCTAAGC

KN234

AAAACACTAAATAAAATCCGAAAGGATCCCTGCAATCGAGAATGGAGCAAATGACTTTACGTGG
AACACTAAAAGGCCATAATGGCTGGGTAACGCAAATTGCAACAACACCTCAAAATCCCGACTTAA
TTCTTTTCAGCCTCCCGAGATAAAACACTTATTCAGTGGCAGCTGACAAGAGATGATCAAACAAATT
ATGGGTTCCCAAAAAAATGTTTAACTGGGCATAACCATTTTGTCTGATGTAGTCCTTTCTCAG
ATGGCCAGTTTGCACTTTCCTGTTTCGTGGGACAAGACATTGCGTCTTTGGGACCTAAATCAGGGA
ATTACGACTAAGCAATTTGTTGGACACACAAAGGATGTTTTGAGTGTTGCATTTTCAGCTGATAAT
CGCA

HvRACK1

(E-Value = $2,3e^{-37}$)**kn241**

GGTGCATATCTTGAAAATAATGAGTGCAAAGATTGTCCAATTGGATTTTATAAAGAACTGCTGGG
TTCGAGAAATGCCAACCGTGTGCATTAGGTTTAAACAATAAAAAACAGGAGCTGTAACAAAGAAT
CAATGCAAAAACGATTGCACTCTTGGTCAAGAAGTGGTTAACAATACATGTCGGCCCTGCCGTAT
GGGTTACTATAGAAATAATGATAGTCAACCTGTATGCTTACCTTGCCTTACAACCAATCAACATAT
AACT

Thyreoglobulin-precursor

(E-Value = $4,5e^{-14}$)**kn245**

GCTTTTGTAGTCCCTGTGTAATAAGCAATTAATAAAAAATGTCTGATTTTCTCCAACCTTACATAANA
AAATGGATGCATTTGAGGAGTCATTAACAGAAGTTGAAGATGTTTTAAAGCCATTTTAAAGATTC
CTATTGCAGATTTGCATGAAAAGATAACAGATCATTGGGTAAAGCAAAGTTAGA

kn282

GGCACGAGTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGAAAACAATGAAGTGATTGCTGTAATTATGA
CCTTGTTAATTGCTGCTTATCGAAAAAAGTGCAACCTAGTATGCACAAAGATTTGGGCACCAGTT
TGTGGTCACGATGGGAAAAACATACGCCATGGAATGTACGTTAAAAATCCGAATCTTGCGATAGTC
AGAAACCCATTGTTAAAGTGTATGATCGCAAATGTAACCTAAAGGTAATCGAAATTTTCTTGAC
TGAATGTATCTCCAGTTTTCTGGTTCGCAAAAA

sub4

CTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATTCATATACTAGAAAATGTGTGGCATCTGGGCTTTNTTTGGTT
ATGACCATAGTGCATGTTCCAGAGCTTCATCATGCTTTAGGATTGGCACATCGAGGTCCAGATTTT
TTC

Asparaginsynthetase

(E-Value = $1,2e^{-6}$)**sub60**

GGAAAATCAACAAGTACTGGCCACATGATTTACAAATGTGGTGGTATCGACAAACGACAAATCGA
AAAATTCGAGAAAGAAGCCAGGAAATGGGAAAAGGATCATTTAAATATGCCTGGGTTTTAGATAA
ACTTAAGGCTGAACGTGAAAGAGGTATACCATCGATGTGCACTATGGAGTTTGAACACTAAATA
CTAGTTACTATTATTGATCTCCTGGACTCGTGACCTTCTATTAATAATATGATCACAGGTACCTCTCA
TGGATGATGTCGTCTCAGTGGCAAGCGTACTGAGAGTT

Elongationsfaktor 1 α (E-Value = $7,4e^{-38}$)

sub1343

AAGCTCAAAGGATCTGAAAATCATGTTTCAGGGTGGCATGTTGTGAACAAAATTTGTTCAAAGTT
AGTATTAATAATCACCAAAGGACATAATTGCCACCAAAAATCGGCATAGGATTAGCACACTTTTTCC
ATCTCTTGATGTAGAAGAAAAAGATAAAGAGTTATTTTACTCCCATATGGACACACTGAAAAATG
AATCAAGACTTTATCAGGCTCCATTGGCATTATTGGAATTAACACGTGTTGGGAAGCAACTAATGG
AATTGATTGCTGGACAATCTGATGTGATCAGGACTGCCTACAAAGACTCT

sub1442

GCAATTAATAAAAATGTCTGATTTTCCTCCAACCTTACATAAAAAAATGGATGCATTTGAGGAGTCA
TTAACAGAAGTTGAAGATGTTTTAAAGCCATTTTAAAGATCCTATTGCAGATTTGCATGAAAAGAT
AACAGATCATTGGGTAAACGAAAGTTAGACTTGATTATTGCATATTCTGCAAACACTCACTGTTT

Prostaglandintransporter

(E-Value = $1,3e^{-9}$)

8.3 Genomische Sequenz von *kringelchen*

```

cDNA -----
genomisch  GCGAACCGGGGACTGGACTTATTTTATGTGTTTTCTAATCTTTACAAGCTGTTTGTATA

cDNA -----
genomisch  TCTATTGTGTACAGTGTCTAATATTACACTACTTATAGCTATGGTTACTGATATCATTAA

cDNA -----
genomisch  AATTCTAAAAAATTAGTTTCAACTTAAAATATATAATTTAGTTAAAGAGAACAATGTGTT

cDNA -----
genomisch  ACAGGAAATAATTGGTGATTCAAATTTTTTTGTAGATTTTATGTAAAAAAAAAAAAA

cDNA -----
genomisch  AAATTGTTGGATTTAATGCTGTGATTTTATAAATACAAATGTTGTATATAGCAAATGAT
AAATTGTTGGATTTAATGCTGTGATTTTATAAATACAAATGTTGTATATAGCAAATGAT

cDNA -----
genomisch  ATCAGATTGGTGTGTTGTTTTGGTTTTTATTAATGTCAAGATTAG -----
ATCAGATTGGTGTGTTGTTTTGGTTTTTATTAATGTCAAGATTAGGTATAGTTTATTTCTT

cDNA -----
genomisch  TTATTTTCATATTTTCAACATATATGTAATTGAAGCATTTAAGTTAATGATGCAAAATTTTA

cDNA -----
genomisch  GCAAATTTTTTATAAAATATTATAAATTAATTTTGATATTTTTTTTTAGTTTTTGGGCTG
TTTTTGGGCTG

cDNA -----
genomisch  AATTTTACAGAGCCAGTTAATTATATATTGAAATTAGGAGAAGATAGTTCATCTAGACTA
AATTTTACAGAGCCAGTTAATTATATATTGAAATTAGGAGAAGATAGTTCATCTAGACTA

cDNA -----
genomisch  TTAGATTGTTTCAGTTAATCTTCCTGTTGAATTAATCAAAAAATTGATTG -----
TTAGATTGTTTCAGTTAATCTTCCTGTTGAATTAATCAAAAAATTGATTGGTAAAGTTAAA

cDNA -----
genomisch  ATAAGTTATTTAAAGAATAACTCAAATAACAATAACTAATACTAATTTGACATCAT

cDNA -----
genomisch  CTGTGTTATTGTTGTTTTTTTTTAAACTTTTTTTTTTATATGTTATATGTGTAATAAGTT

cDNA -----
genomisch  TTTGACTGTCAAGTATAATAATTTGATAGTATCTATTCCATGTGTGTATTAATTTTTTT

cDNA -----
genomisch  GAACTTTTGTGTAAGTATATTTTGAGTTGTTAAATATCTTTGTAGGACACACAATG
GACACACAATG

cDNA -----
genomisch  ATATTGTTATCAATAATAAACCTAATAATAACATTATCTGAAAATGGTCAAAAACTTGTTA
ATATTGTTATCAATAATAAACCTAATAATAACATTATCTGAAAATGGTCAAAAACTTGTTA

cDNA -----
genomisch  TTGCTCATTACCAATCCCATAAATCTGGTCGTTATGGGTGCAAAGTAACAGCTATGAATG
TTGCTCATTACCAATCCCATAAATCTGGTCGTTATGGGTGCAAAGTAACAGCTATGAATG

cDNA -----
genomisch  AAGAATCTGTTCAAAGGGTATTTGATCTACTGCCAGCTTCAG -----
AAGAATCTGTTCAAAGGGTATTTGATCTACTGCCAGCTTCAGGTAAATTTTTATGTGTA-A

cDNA -----
genomisch  TAATGTTATTATTATTG-ACTTAATATTTTAAATGCAATTGTCAAGTATGAATTAATGTA

cDNA -----
genomisch  GTTTTGATTTATGTTACAAGTTTAAATGTTTTTAAATTTCTAAATATTTGTTAAATGGTA

cDNA -----
genomisch  TAAGTGCTAATTTTTCTTTATTTTTTATAATGTTTTTAAAGTTAAAAATGTTTGAAGT

cDNA -----
genomisch  TGTAACATAAAAAGGAATAACATAAAAAATTAAGATAGGAAAAGTACTTTTTAAATTA-

cDNA -----
genomisch  -AAAAAATTTATTTAA-ACATTATTTTTTTAAATATTTGTTTGAAGAAATTTATGTTG

```

cDNA
genomisch -----
TCTCTATGTCTTTTCCATTATTTGTAGACATTTATTTTAAAAATAAATCAAGTTCTATT

cDNA
genomisch -----AAACTGAGGGAAACCAAACCATG-----
TTATGTTTGA~~AAACTGAGGGAAACCAAACCATG~~GTAAGCAAATAATATATTTCTAAAAAA

cDNA
genomisch -----AAATG
TTTTATTTGTTTATTAAGTGATACAAAAAGTATATATATTTCTATTTTATTATAG~~AAATG~~

cDNA
genomisch ~~ATGCTGAGAATAAAAAATGACATATCGTTACTTGTGAGTTAGTGATGAATAAATTAGAT~~
~~ATGCTGAGAATAAAAAATGACATATCGTTACTTGTGAGTTAGTGATGAATAAATTAGAT~~

cDNA
genomisch ~~TTAGATTGTACCGCTGTAGGTGCTTCACCTATTAATATTACATG~~-----
~~TTAGATTGTACCGCTGTAGGTGCTTCACCTATTAATATTACATG~~GTAATTTTTATAAGTA

cDNA
genomisch -----
TATCCTGCTGTGTTTTGGGCAGCAATAGTTATGACTTATGTTAAACTCTTTC-CCAATTT

cDNA
genomisch -----
TTTACTTCTAACCTTTTAGATGAACACTAAACAAGAATAAACTGCAAGAATAAAGTGT

cDNA
genomisch -----
TTGTTTTCTTCATCTTATTTTATATAACATTTTATTATTAGTTTCTGATTATTATAAAA

cDNA
genomisch -----GATAAAAAATGATCGGCTGATAGAA-----
TTTTTTTGATTTTTTTGTTTAAATCTTATACAT-----

cDNA
genomisch ~~GCAAGGTCCAACCTGTCTAATTTTCGTTATTTCTTCTACCAAATTTTTGAAATTAAGT~~

cDNA
genomisch ~~ATAAAGAATTGCGACTTGATGATGCTGGTATTTACAAATGTATTTGGAAAATAAATAT~~

cDNA
genomisch ~~GGCAAGATAGAACATATAATGACTGTTGAAATATATGAGAAAATGTTTCTCTAAACCAATA~~

cDNA
genomisch ~~GTATCTTCTACAGACAAACATAAAG~~-----

cDNA
genomisch -----TTTTTTATGTCAACTATGGTCAGAATTTAACTGTCCCTATATATG
GTAGGCTTGCAGTAG~~TTTTTTATGTCAACTATGGTCAGAATTTAACTGTCCCTATATATG~~

cDNA
genomisch ~~TTACTGCATTTCTACCCACCCCTCACTTTCAAATGTTATACGTTTACAGCATGACAAGTC~~
~~TTACTGCATTTCTACCCACCCCTCACTTTCAAATGTTATACGTTTACAGCATGACAAGTC~~

cDNA
genomisch ~~CAAATACAAATGAACTAAATTTGGCACTTAGGGTATTACCAACAATGAGAGAATAACTG~~
~~CAAATACAAATGAACTAAATTTGGCACTTAGGGTATTACCAACAATGAGAGAATAACTG~~

cDNA
genomisch ~~TCTTGGAGAAAGGCCAGAGAAGAGGCAATTCATTTCTCATATCAAGCTAGATTATTTTT~~
~~TCTTGGAGAAAGGCCAGAGAAGAGGCAATTCATTTCTCATATCAAGCTAGATTATTTTT~~

cDNA
genomisch ~~TCAATAATATATCAGAGCAAGATTTTGGTAATTATACCTTTATGGCTGGAAAATAAGTATG~~
~~TCAATAATATATCAGAGCAAGATTTTGGTAATTATACCTTTATGGCTGGAAAATAAGTATG~~

cDNA
genomisch ~~GTTTTGATATATACCCGTTTCAAATATTGCATACAA~~-----
~~GTTTTGATATATACCCGTTTCAAATATTGCATACAA~~GTAATATCTTTTACTTGCATTTA

cDNA
genomisch -----
TTTTATTTTTTTTAGTTGCTAAGTTATAAAAAATAAATTTTCATTTTAAATTTTAAAA

cDNA
genomisch -----
GGATTTTATTTTTCGCTTGTATATCTTCTTTTTTTTTTAATTAGTAGTTCACGTTTTTGT

cDNA
genomisch -----
AATAATATTTAAAAAATTTGAAAAAATGAATAGACTCTTTTAAATTTATATTTTAGCAA

cDNA
genomisch -----
GAAAATACATACGTATAATTTGTTATTAATTTGATTTACAGATGGGTTTTACAATTTT

cDNA
genomisch -----

genomisch TTTTAAAAAGTTTTGAGAATTTTGAATTAATTTTGAAGTAAATTAATAGTAATCTTAAG

cDNA -----AATATATGCAAACAACTGTCTTCCCGCCAATG
genomisch TTGGGTAATTAACTTTTTTTTCAATAGAAATATATGCAAACAACTGTCTTCCCGCCAATG

cDNA AAATCAAGTATTAATAAAATCTACAAAGAGGAATCCGTAGAAAAACAGTTATTTTTATT
genomisch AAATCAAGTATTAATAAAATCTACAAAGAGGAATCCGTAGAAAAACAGTTATTTTTATT

cDNA GTCATAACTTCAATGCTTGCTGGGCTAATTTTTGTTGCATTTGTTATTTTTTTTTATTGTT
genomisch GTCATAACTTCAATGCTTGCTGGGCTAATTTTTGTTGCATTTGTTATTTTTTTTTATTGTT

cDNA CGTGTTTCGTAGCAAAGACAAATTTAAAAACAGTAACATCAACTACATCAAACCTTTAGAA
genomisch CGTGTTTCGTAGCAAAGACAAATTTAAAAACAGTAACATCAACTACATCAAACCTTTAGAA

cDNA ACTGTGATTCTTAATCTTGGGGATAATAACACTAGTGGTGTACCATGGTTACTTCTGTCT
genomisch ACTGTGATTCTTAATCTTGGGGATAATAACACTAGTGGTGTACCATGGTTACTTCTGTCT

cDNA TCTGCTTCCATGCCAGTCGGCGTTTCAGACATTCACTTAATAATAATTTAATAAATGAT
genomisch TCTGCTTCCATGCCAGTCGGCGTTTCAGACATTCACTTAATAATAATTTAATAAATGAT

cDNA AAGCAAAAATTGAATTTAAAAATAGCTCCAGATCCTGCTTGGGAGATAAACTTGAACAA
genomisch AAGCAAAAATTGAATTTAAAAATAGCTCCAGATCCTGCTTGGGAGATAAACTTGAACAA

cDNA TTAGAAACAGATTGTTTATTGGGAGAGGGAGCTTTTGGTAGAGTTTTTCGTGCAACAGCA
genomisch TTAGAAACAGATTGTTTATTGGGAGAGGGAGCTTTTGGTAGAGTTTTTCGTGCAACAGCA

cDNA AGAGATTTACCAAATCACACTGGAGTTCAAACAGTTGCTGTCAAATGCTGAAAG-----
genomisch AGAGATTTACCAAATCACACTGGAGTTCAAACAGTTGCTGTCAAATGCTGAAAGGTAAA

cDNA -----
genomisch CAGTTTGAAATCATTAAAAATGTTAATATTTTAATAATTGTGTTTTTAGTGCCTTTAGC

cDNA -----
genomisch TTGCATATTGCAATTATCTATTTTGTATACTTTTATTTAACTTTTCTTGTTTTTTATTAG

cDNA -----
genomisch TAGTATATCACAATAAATCAACTCAAATTATAGTATATTAATAATCCATTGAACTCAGAT

cDNA -----
genomisch TGTAGTATATATAATCCATTCAACTCTAGTTGTAGTATAATACAATCAATCAACTCAA

cDNA -----
genomisch GTTTTAGTATACTAAAATTCATTCAACTCAAATTGTAGTATATTACAATTCCTTTAGCTG

cDNA -----
genomisch AGTTTGTGTTTTAAAATGCAAAAGTATTAGTTTAGTATTAATTTAAAACAATATGATAA

cDNA -----
genomisch TGCATTGTTGTTATAAAATTACTAAATCATATGTTTATAATTTATTATTATAAAATTGCT

cDNA -----
genomisch GAATCGATTCTCTTGATCAGTAAATGCTTGTAGTCAGACGCTACATATAAAATAATGGAA

cDNA -----
genomisch CATTCTCATTTTGTACAGAGTGTTCATATATTATAGTAGTTAAAATTTACGGCACTGAAC

cDNA -----
genomisch TGCTTAGTACTCATTCAAGACAAAATAGTAGACTACTAGAGTGTACTTAGCATGTGTCTAG

cDNA -----AAGATTGTTGTGAACAAG-----
genomisch ATAATGCTGCAGCATG-----TAAGCTTGGAGGTT

cDNA -----ATTTAAAAGATTTTATATCTGAAATAGAAGTAATGAAATCTATAGGAAAACATA
genomisch TGACAGATTTAAAAGATTTTATATCTGAAATAGAAGTAATGAAATCTATAGGAAAACATA

cDNA TCAATATTCTGAATTTACTTGCAGTGTCTCATCTCAGCAAG-----
genomisch TCAATATTCTGAATTTACTTGCAGTGTCTCATCTCAGCAAGGTATGAAGATAAGAATGAATT

cDNA
genomisch -----
AATTTTTGGTTAACCATAACAATTTATATATACATAACAAACATGTTTTGACATAAAAT

cDNA
genomisch -----
TTGTAGTTGATTTAATAGTTGCATTAAAGTTTTTACAATTTATACAAAGTATTGCCATAT

cDNA
genomisch -----
TTTTTCATCTCTCAAGGTATTACCATATTGATACCATATTTTAGTTTTGCCTGGTTGCTAT

cDNA
genomisch -----
GGTTGCTATAAGTATCTCATGTTGACACTTTTTGAGTTCTCCAGTTCTTAATGATTTATA

cDNA
genomisch -----
TAATTTTTTCTAAGTTTTTTGGAAGATTAAGGGAGTATTTTAAATATAAGATAAACTGGT

cDNA
genomisch -----
ATAATTTTCTGCAAATGTTAGGAAACCTTTTTTTTTTTTGCATGGTATCTTTTAATAACT

cDNA
genomisch -----
TTTGATGCCTCAATGCAAATATGTATCAAATTTGATTTTTTAAATGAGTTTATTAAAT

cDNA
genomisch -----
GGATTTTAGGAAAGTTATATATAGTGGTTGAATATTGTCGTCATGGTAATTTGCGCTCTT

cDNA
genomisch -----
TTCTGAAAGACAATCGACCTGTATGCAAGCTAATTCTGTGATAACAAAAATAACAT

cDNA
genomisch -----
TTCTGAAAGACAATCGACCTGTATGCAAGCTAATTCTGTGATAACAAAAATAACAT

cDNA
genomisch -----
TGTACGATTTAACGTCGTTTTGCTTACAAGTTGCAAGAGGAATGAATTTTTTAGCTTCAA

cDNA
genomisch -----
TGTACGATTTAACGTCGTTTTGCTTACAAGTTGCAAGAGGAATGAATTTTTTAGCTTCAA

cDNA
genomisch -----
AAAAG-----
AAAAGGTAACCAAATGACTTTTTTTTTAGTTTACAGTCTATAAGTTTAAATTAACAGTTT

cDNA
genomisch -----
ATAAGTTATGCTTATGTTGCATAGTAGTGGTTGCATTAAGTTAAACTGTATCTTTTTTTA

cDNA
genomisch -----
TGCATCCATCGAGACATAGCTGCTCGAAATGTTCTTGTGGTGAAGGTTATTTAATGAA

cDNA
genomisch -----
GTGCATCCATCGAGACATAGCTGCTCGAAATGTTCTTGTGGTGAAGGTTATTTAATGAA

cDNA
genomisch -----
AATTGCTGATTTTGGACTTGACCGTGATATTCATGAACAAGATTATTATAGAAAATCCAC

cDNA
genomisch -----
AATTGCTGATTTTGGACTTGACCGTGATATTCATGAACAAGATTATTATAGAAAATCCAC

cDNA
genomisch -----
AGAT-----
AGATGTAAAAATTTTTGTAAATTTTCACTCTAAAGTTATTTCTTTTGTCTTCTCTATTT

cDNA
genomisch -----
AAATCTTTTTATTATTATATTAGGGCGATTACCCGTCAAATGGATGGCAATTGAAGCT

cDNA
genomisch -----
AAATCTTTTTATTATTATATTAGGGCGATTACCCGTCAAATGGATGGCAATTGAAGCT

cDNA
genomisch -----
TTGTTTCGATCGTGTTTATACTACTCAAAGTGATAT-----
TTGTTTCGATCGTGTTTATACTACTCAAAGTGATATGTATGTTCTTTTTTTTTTATTGAAAC

cDNA
genomisch -----
AGACTTTTTTTTTTTTTTAAATATTTTTTGTCTCTTAATTAACAAATTTTTTTTTTTT

cDNA
genomisch -----
GTATACAAGTATATTTTTATAGATGGTCATTTGGAATTTTGGCATGGGAAATGTAACAT

cDNA
genomisch -----
TTGGTAAAAAAAATTTTTTCAATGCTATATGTAATATATTCATATGTAATGTATATGT

cDNA
genomisch -----
GTGTAT

cDNA
genomisch -----
ATATATATATATATATATATATATATATATATACAGCGCTCGAAGTGGAGAAAAAAAAT

cDNA
genomisch -----
AAAGGGGATGGTATTCATAAATTAATAAACATTACGCCTAATCATTGTTTGTATAAA

cDNA -----ATGGTCATTTGGAA
genomisch GAGATTTACAAAAATGAATTATTATCATTGTTGTATAGAGAA-----

cDNA TTTTGGCATGGGAAATTGTAACATTTGGTGGATCGCCTTACCCTGGAATTGCATTAGA--
genomisch -----CT

cDNA -----AAAAATTGTTGATTTATTAAAGCAAGGCTATCGAAT
genomisch ACGGGTTGCAGTGGATTGCATTAGAAAAATTGTTGATTTATTAAAGCAAGGCTATCGAAT

cDNA GGAAAGACCACTTAATTGTACTGATGATAT-----
genomisch GGAAAGACCACTTAATTGTACTGATGATATGTTGGTTTTTTTTTGTCTATTTATTTTAC

cDNA -----
genomisch TTTTATAAAAACAAATATTTTACAATAATTTATATTGTTACAAATAAGTATTTGTTATTA

cDNA -----GTATACACTTATGCTGAATTGTTGGAAAGAAATCCCATC
genomisch TTTTTTTATTTTCATTTTCGCAGGTATACACTTATGCTGAATTGTTGGAAAGAAATCCCATC

cDNA AAAACGTCCGACATTTTCCAACTAATTGAAGATCTAGAAAGAAATGCTATTTGGATGCAAG
genomisch AAAACGTCCGACATTTTCCAACTAATTGAAGATCTAGAAAGAAATGCTATTTGGATGCAAG

cDNA TTCTACA-----
genomisch TTCTACAGTAAGTAATTGAATAAAAATTTAATAAAGCTTTTCTACTAATCTGTTATTTA

cDNA -----
genomisch TTTTTCAATGAAAATAAGAAAAACAAGAAACAATTTTTAGTTAAGTAATTTAAATGCTA

cDNA -----
genomisch ACAATTAACACAAGAGTTGGTTGTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTAAAAGTTGTGTTATTTG

cDNA -----
genomisch TAAACTGAACCCTAATTCTCCTAATTATTGTCATGTTCTTAATTGTTGAAATATTAAGAA

cDNA -----GAATATATAGATC
genomisch GTTGAAAAACCTTTCTATGATAAGCTGCATGTTTCGTTTATTTTGTAGGAATATATAGATC

cDNA TTCAACCAATTCAACCAGAACGCACAGAGTCATTTTCAACATCATTACACACTTCTGCAA
genomisch TTCAACCAATTCAACCAGAACGCACAGAGTCATTTTCAACATCATTACACACTTCTGCAA

cDNA GCATGTTGAATACAGATTTGCACGAGAAAAATAAATGTGATCATGACGAAATATCCTTCA
genomisch GCATGTTGAATACAGATTTGCACGAGAAAAATAAATGTGATCATGACGAAATATCCTTCA

cDNA CTCATGAAGATGGTTTATCAGAAGCAGATATTTCTTCTTAGTCACTATGCAGTTTCTTAAT
genomisch CTCATGAAGATGGTTTATCAGAAGCAGATATTTCTTCTTAGTCACTATGCAGTTTCTTAAT

cDNA TACTTCAACTGCTTGTGACGTTTTTAGATGTAACTTGATTTATCAGTTTCTCTAAATGA
genomisch TACTTCAACTGCTTGTGACGTTTTTAGATGTAACTTGATTTATCAGTTTCTCTAAATGA

cDNA TTGCCTTGTCAATTAACGTGATTGCAATTTGACTTTTCATCATGAAGAATCTAGAGATCTAT
genomisch TTGCCTTGTCAATTAACGTGATTGCAATTTGACTTTTCATCATGAAGAATCTAGAGATCTAT

cDNA CCGATTCTTCTCTATTAATAAAACACTGTCATGAAGATTGTTTATATATGAATCATTGGAT
genomisch CCGATTCTTCTCTATTAATAAAACACTGTCATGAAGATTGTTTATATATGAATCATTGGAT

cDNA CAGGAACTTCTTGAGGATCATAATAAAAGTAATACTAAATATGAAATTGCCAGCTAAAAC
genomisch CAGGAACTTCTTGAGGATCATAATAAAAGTAATACTAAATATGAAATTGCCAGCTAAAAC

cDNA CAAAGGTTTCGTAATTTTTCGATGCGAATAAATGAGCTTTTC-----
genomisch CAAAGGTTTCGTAATTTTTCGATGCGAATAAATGAGCTTTTCAAAAAAGGAAAAAATAAC

cDNA -----
genomisch ACTGAAAAGTGAATGTCTTAAAATTTATGATTTGTTTAAATCGTATATATGTATATATAT

cDNA -----
genomisch AAATATGTATATTTATTTTCATATTTTTTGTAATAAATAATTTTTTTTTTAGCATGTTTTGCA

cDNA -----
genomisch GAGTTATTTCTTAAGAAAATGTTAGCATACCATTTTTTAGCATTTTCATCTTTTGATTCCG

cDNA	-----
genomisch	TGTTCTAGCGTACATATATGTTTATCTTCGTTTATTTTTAAAAACAAAAATTCCTAAA
cDNA	-----
genomisch	TGATTTTTACAATTTATTTTTTAGAAGCCATATATTTATGATATAGTATTATGATGTTGA
cDNA	-----
genomisch	TATATATAGAATCCATTTATTTATGATATAAACTATGATGGTACTGATGGTATGATGTTT
cDNA	-----
genomisch	ATATATATCAATATAGTAACATTGTCATTCCAATAAAACTTTTAAATCTTAAATATAAA
cDNA	-----
genomisch	TTTCATACAATGGGAATTAAGTTTTGAGCGCTAAAGATAAAGTTCTTAAACGGGTGGAAA
cDNA	-----
genomisch	AAATAAT

Fig. 8.2 Sequenzvergleich der cDNA-Sequenz von *kringelchen* mit der genomischen Sequenz des *Hydra magnipapillata*-Gens. Identische Bereiche in der genomischen und der cDNA-Sequenz sind schwarz unterlegt. Rot markiert sind solche cDNA-Sequenzabschnitte, denen keine genomische Sequenz zugeordnet werden konnte.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung während meiner Doktorandenzeit die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben:

Frau Prof. Dr. M. Hassel möchte ich danken für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn HD. Dr. Martin Klingenspor und Prof. Dr. Batschauer bedanke ich mich vielmals für die Bereitschaft, Mitglieder der Prüfungskommission zu sein.

Herrn Prof. Dr. Kirchner möchte ich dafür danken, dass er mir ein Refugium zur Verfügung gestellt hat in dem ich ungestört Arbeiten konnte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die Finanzierung der ersten drei Promotionsjahre im Rahmen des Graduiertenkollegs „Signalsysteme und Genexpression in entwicklungsbiologischen Modellorganismen“.

Für ein angenehmes Arbeitsklima möchte ich den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danken: Andreas Wölfelschneider, Christina Wagner, Angelika Vogt, Katja Hess, Katrin Hüsken, Christian Hasse, Kathrin Sobjinski und Verena Dathe. Besonders hervorheben möchte ich dabei Annedore Jungwirth, die mich sehr unterstützt hat, Tobias Hotz, meinen „langjährigen Laborgefährten“, und Heide M. Brandtner für ihre ganz besondere Unterstützung.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die die Anfertigung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben: Bei meinen Eltern, für ihre fortwährende Unterstützung, bei Mirko, der immer für mich da war und ganz besonders bei Frederik, dem besten Sohn der Welt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Sudhop,S., Coulier,C., Bieller,A., Vogt,A., Hotz,T., and Hassel,M. (2004).

Signalling by FGFR-like tyrosine kinase, Kringelchen, is essential for bud detachment in
Hydra vulgaris. Development. 131, 4001-4011

10 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Knospung-steuernde Gene aus *Hydra vulgaris*:
Ein evolutionsgeschichtlich alter FGFR kontrolliert die
Knospenablösung**

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Monika Hassel (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg,

Stefanie Sudhop