

Neue Werkzeuge für *Hydra*
zur Untersuchung von Rho- und PtdInsP-
vermittelten Signalwegen

Dissertation

zur
Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des
Fachbereich Biologie
der
Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

David Matthäus Apel

aus Marburg

Marburg 2020

Die vorliegende Dissertation wurde von Mai 2016 bis Juli 2020 am Fachbereich der Biologie in der Molekularen Zoologie im Bereich der Morphologie und Evolution von Wirbellosen unter Leitung von Prof. Dr. Monika Hassel angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am _____

Erstgutachter(in): Prof. Dr. Monika Hassel

Zweitgutachter(in): Prof. Dr. Christian Helker

Tag der Disputation: _____

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Summary.....	2
III.	Einleitung	4
III.1	Der Süßwasserpolymp <i>Hydra vulgaris</i>	4
III.2	Reproduktion bei <i>Hydra</i>	7
III.3	Morphallaxis bei <i>Hydra</i>	10
III.4	Der FGF- Rezeptor.....	11
III.5	Das Aktinzytoskelett	13
III.6	Rho- GTPasen	15
III.7	Phosphatidylinositolphosphate	18
III.8	Immobilisierung	24
IV.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	26
V.	Ergebnisse	27
V.1	Analyse der Hv_Rho Proteine	27
V.2	<i>hv_rho</i> ist in morphogenetisch aktivem Gewebe exprimiert	36
V.3	Detektion von Rho- GTPasen.....	42
V.4	Untersuchung der Proteindomänenstruktur der GEFs Trio und Kalirin (Kratzer et al., 2019)	66
V.5	Relaxantien zur detaillierten <i>in vivo</i> Mikroskopie von <i>Hydra</i>	70
V.6	Klonierung, Etablierung und Charakterisierung von PtdIns(4,5)P ₂ -GFP- und PtdIns(3,4,5)P ₃ -GFP- Sensor transgenen <i>Hydra</i> Linien	90
VI.	Diskussion.....	115
VI.1	Rho Proteine in <i>Hydra</i>	115
VI.1.1	RhoA als ursprünglichste Rho- GTPase der RhoABC- Familie.....	115
VI.1.2	Expressionsmuster von <i>hv_rho1-4</i> korrelieren mit morphogenetisch aktivem Gewebe	116
VI.1.3	Beteiligung des Rho-ROCK-Myosin II- vermittelten Signalweges bei der Knospenablösung in <i>Hydra</i> (Holz, Apel et al., 2017)	118
VI.1.4	<i>In-silico</i> Analyse der Rho- GEFs Kalirin und Trio	122

VI.1.5 Rho- GTPasen sind in <i>Hydra</i> vermutlich an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt.....	123
VI.2 Benzocain als wirkungsvolles und schonendes Relaxans für <i>Hydra</i>	128
VI.3 PtdInsPs-GFP- Sensor transgene Hydren als wertvolle Methode zur Detektion der Zellpolarität und zur Verfolgung der PLC- Aktivität und des PI3K- Signalweges in <i>Hydra</i>	133
VI.3.1 Der PtdIns(4,5)P ₂ -GFP- Sensor ermöglicht die Detektion der apikalen Zellpolarität sowie die <i>in vivo</i> Verfolgung der PLC- Aktivität in <i>Hydra</i>	133
VI.3.2 Der PtdIns(3,4,5)P ₃ -GFP- Sensor ermöglicht die Detektion der basalen Zellpolarität sowie die <i>in vivo</i> Verfolgung des PI3K- Signalweges in <i>Hydra</i>	136
VI.3.3 Phänotypdefekte stimmen mit den Phänotypen nach einer LiCl- Behandlung bei <i>Hydra</i> überein	140
VI.3.4 Mögliche Fehlinterpretationen der PtdInsP-GFP- Sensoren in <i>Hydra</i>	142
VII. Ausblick.....	144
VIII. Material und Methoden.....	146
VIII.1 Haltung von <i>Hydra vulgaris</i>	146
VIII.2 Phylogenie und Proteinstruktur- Analyse	147
VIII.3 Immunhistochemische Antikörperfärbung (IHC).....	149
VIII.4 Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin-TRITC.....	151
VIII.5 Einbetten der immunhistochemischen Präparate	152
VIII.6 RBD-GFP Proteinextraktion (in Kooperation mit Prof. Dr. Robert Grosse)	152
VIII.7 Detektion von aktiver RhoA-GTPase mittels RBD-GFP Fusionsproteins.....	155
VIII.8 Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges (publiziert in Holz, Apel et al., 2017).....	158
VIII.9 <i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH)	159
VIII.10 Klonierung der PtdInsP-GFP- Sensoren	166
VIII.11 Klonierung der PtdInsP-GFP- Sensoren in den LigAF- Expressionsvektor.....	176
VIII.12 Transformation der PtdInsP-GFP- Sensoren im LigAF- Vektor in chemokompetente <i>E. coli</i> DH5α Bakterien	179
VIII.13 Erzeugung transgener Hydren durch die <i>Transgenic Hydra Facility</i>	180
VIII.14 Immobilisierung von <i>Hydra vulgaris</i>	180

IX. Literaturverzeichnis	184
X. Abkürzungsverzeichnis.....	200
XI. Abbildungsverzeichnis.....	201
XII. Tabellenverzeichnis.....	205
XIII. Anhangsverzeichnis	206
XIV. Anhang.....	208
XV. <i>Curriculum Vitae</i> und wissenschaftlicher Werdegang.....	234
XVI. Danksagung.....	236
XVII. Erklärung.....	237

I. Zusammenfassung

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Inhibition unterschiedlicher Komponenten des FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges jeweils den gleichen Phänotyp bei *Hydra* erzeugt und das Ablösen der Knospe verhindert. Dabei konnte deutlich gemacht werden, dass die Knospung ein komplexer, zeitlich exakt abgestimmter Prozess ist, der final in einer Akkumulation des Aktins an der Knospbasis resultiert, die mit der Phosphorylierung von Myosin II korreliert (Holz et al., 2017; Holz et al., 2020). Ein Hauptregulator der Aktindynamik und der Aktomyosin-Kontraktion sind die kleinen Rho-GTPasen (Fagotto, 2014; Fagotto et al., 2013; Menke und Giehl, 2012). Durch eine Datenbankanalyse mittels BLAST der humanen RhoA- GTPase konnten vier homologe Rho-GTPasen in *Hydra* identifiziert werden. Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass sich Hv_Rho1-3 deutlich innerhalb der RhoABC- Subfamilie gruppieren, während sich Hv_Rho4 basal zu der Subfamilie einordnet. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass die vier Rho-GTPasen in *Hydra* an morphogenetisch aktiven Geweberegionen exprimiert werden, wobei vor allem Hv_Rho1 und Hv_Rho2 vermutlich an zellulären Prozessen an der Knospbasis beteiligt sind. Um aktives RhoA nachzuweisen kann neben der immunhistochemischen Antikörperfärbung das Fusionsprotein RBD-GFP genutzt werden, welches durch die Rho-Binde-Domäne (RBD) spezifisch an aktives RhoA bindet (Berger et al., 2009). Das exprimierte und aufgereinigte Fusionsprotein RBD-GFP konnte als neue Methode zur Detektion von aktiven RhoA- homologen Rho- GTPasen in fixiertem *Hydra*-Gewebe etabliert werden. Dadurch konnten aktive RhoA- homologe Rho- GTPasen in evaginierenden- (Knospe oder Tentakel) und kontrahierenden Geweben (Knospbasis und Regeneration) nachgewiesen werden.

Die *in-silico* Analyse der Rho- GEFs Kalirin und Trio verdeutlichte eine komplexe und evolutionär interessante Entwicklung der Rho- GEFs, bezüglich dynamischer Verluste und Gewinne von spezifischen Proteindomänen. In *Hydra* konnte interessanterweise lediglich eine Kalirin- homologe Sequenz identifiziert werden, welches möglicherweise die Verbindung zwischen membranständigen Lipiden und Rho- GTPasen vermittelt.

Neben dem Rho-ROCK-Myosin II- Signalweg wurde die Beteiligung der Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsP) an morphogenetischen Prozessen in *Hydra* untersucht. Erzeugte transgene *Hydra*- Linien dienen als wertvolles Werkzeug, um die Aktivität der Phospholipase C (PLC) und der PI3- Kinase *live* und *in vivo* beobachten zu können. So konnte die Aktivität der PLC an der Knospbasis während des Knospungsprozesses sowie die Aktivität der PI3- Kinase an der Schnittstelle während der Regeneration nachgewiesen werden. Weiterhin konnte mit erzeugten PtdInsP-GFP- Sensor Transgenen die apikale Lokalisation des PtdIns(4,5)P₂ sowie die basale Lokalisation des

PtdIns(3,4,5)P₃ nachgewiesen werden.

Zur detaillierten *in vivo* Beobachtung und vor allem zur *in vivo* Mikroskopie der zellulären Lokalisation der PtdInsP-GFP- Sensoren wurden unterschiedliche Relaxantien getestet, wobei lediglich Linalool und Benzocain eine effektive Immobilisierung bei *Hydra* erzielten. Beide Relaxantien hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Prozess der Knospung oder auf den Prozess des Wundverschlusses nach einem Einschnitt. Die Analyse der Aktinfasern verdeutlichte jedoch, dass Linalool im Gegensatz zu Benzocain, das Aktinzytoskelett des Polypen störte, indem es die Faserlänge deutlich verkürzte und zu einer fehlerhaften Faserorientierung führte.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit dem Fusionsprotein RBD-GFP und mit den PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren basierend auf existierenden Werkzeugen für die Analyse der Morphogenese bei Vertebrata und Fliege, zwei interessante methodische Werkzeuge für *Hydra* etabliert werden konnten. Erstmals konnte dadurch die Aktivität der Rho- GTPasen an der Knospbasis während der Knospung sowie die zelluläre Lokalisation von PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ in den ektodermalen Epithelmuskelzellen nachgewiesen werden. Die etablierten Methoden können zukünftig weiterhin der detaillierten Untersuchung der Rho- GTPasen, sowie der PLC- und PI3- Kinase- Signalwege und deren Funktionen während morphogenetischer Prozesse in *Hydra* dienen. Zusätzlich konnte für das Relaxans Benzocain ein Protokoll zur effektiven und Aktinfaser- schonenden Immobilisierung und Relaxierung von *Hydra* erarbeitet werden. Dieses kann zukünftig zur *in vivo* Mikroskopie, aber beispielsweise auch als Relaxans zur mechanischen Manipulation, wie dem gezielten Einschneiden des Polypen zur Regeneration, genutzt werden.

II. Summary

Preliminary efforts of the working group showed that the inhibition of different components of the FGFR-Rho-ROCK-Myosin II signaling pathway results in the same phenotype and prevents bud detachment in *Hydra*. It was demonstrated that budding is a complex, precisely timed process that ultimately results in the accumulation of actin at the bud base, which correlates with myosin II phosphorylation (Holz et al., 2017; Holz et al., 2020). Small Rho-GTPases act as main regulators of actin dynamics and actomyosin contraction (Fagotto, 2014; Fagotto et al., 2013; Menke and Giehl, 2012). A database search of the human RhoA-GTPase using BLAST surprisingly identified four homologous Rho- GTPases in *Hydra*. Phylogenetic studies showed that Hv_Rho1-3 clearly group within the RhoABC subfamily, while Hv_Rho4 is basal to the subfamily. *In-situ*-hybridization revealed that the four Rho-GTPases are expressed in morphologically active tissue regions, whereby Hv_Rho1 and Hv_Rho2 in particular are probably involved in cellular processes at the bud base. In addition to immunohistochemical antibody staining, the fusion protein RBD-GFP is effective to detect

active RhoA. RBD-GFP specifically binds to active RhoA through the Rho-binding-domain (RBD) (Berger et al., 2009). RBD-GFP was expressed, purified and established as a new method to identify active RhoA- homologous Rho- GTPases in fixed *Hydra* tissues, such as evaginating bud or tentacle tissue or contracting tissue at the bud base or during regeneration.

The *in-silico* analysis of the Rho- GEFs Kalirin and Trio illustrated a complex and evolutionarily interesting development of the Rho- GEFs in terms of dynamic losses and gains of specific protein domains. Interestingly only one Kalirin- homologous sequence was detectable in *Hydra*, which possibly mediates the connection between membrane-bound lipids and the Rho- GTPases.

In addition to the Rho-ROCK-Myosin II signaling pathway, the involvement of phosphatidylinositol phosphates (PtdInsP) in morphological processes in *Hydra* was investigated. Generated transgenic *Hydra*- lines serve as a valuable tool to observe the activity of Phospholipase C (PLC) and PI3- kinase *live* and *in vivo*. The use of such transgenic lines demonstrated the activity of PLC at the bud base during budding, as well as a dynamic activity of the PI3- kinase at the interface during regeneration. Furthermore, the PtdInsP-sensors verified the apical localization of PtdIns(4,5)P₂ as well as the basal localization of PtdIns(3,4,5)P₃.

To permit detailed *in vivo* observation and especially the *in vivo* microscopy of PtdInsP-GFP-sensors and their cellular localization, different relaxants were tested. Only linalool and benzocaine achieved an effective immobilization for *Hydra*. Both relaxants showed no significant influence on the process of budding or wound closure after incision. However, analysis of the actin fibers showed that linalool, in contrast to benzocaine, disturbed the polyp's actin cytoskeleton, leading to incorrect fiber orientation and significant reduction of fiber length.

Based on existing tools for the analysis of morphogenesis in vertebrates and flies, the fusion protein RBD-GFP and the PtdInsP-GFP- sensors, were established as two interesting methodological tools for *Hydra*. For the first time, the activity of the Rho- GTPases at the bud base, as well as the cellular localization of PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ in ectodermal epithelial cells, could be demonstrated. The established methods are useful for detailed investigation of the Rho- GTPases, as well as the PLC and PI3- kinase signaling pathways and their functions during morphogenetic processes in *Hydra*. Furthermore, an effective immobilization and relaxation protocol that is gentle on actin fibers was developed for *Hydra* using Benzocaine. In the future, this could be convenient for *in vivo* microscopy and mechanical manipulation, such as incision of the polyp for regeneration.

III. Einleitung

Die Trennung von Geweben ist sowohl bei der Embryogenese als auch bei der Ablösung der Knospe bei *Hydra* ein essentieller Mechanismus. Um mechanische Zugkräfte, Steifigkeit und Druck innerhalb des Gewebes aufzubauen, welches für die Grenzbildung und die Gewebetrennung benötigt wird, ist die Ausbildung von Aktomyosin notwendig (Fagotto, 2014). Neben Aktomyosin ist weiterhin das Aktinzytoskelett maßgeblich an der Bildung von kontraktilen Kräften während morphogenetischer Prozesse beteiligt (Hilpelä und Vartiainen, 2004). Auf subzellulärer Ebene ist Aktomyosin an der Regulation der Endozytose-, der Gastrulation oder auch der Zellmigration beteiligt (Agarwal und Zaidel-Bar, 2019). Weiterhin ist Aktomyosin für die apikale Konstriktion von Geweben verantwortlich, welches ein grundlegender Prozess während der Embryogenese ist und die Faltung von Geweben reguliert (Agarwal und Zaidel-Bar, 2019; Pearl et al., 2017). Ringförmiges Aktomyosin steuert allgemein die Kontraktion teilender Zellen an der Äquatorialebene, ist aber beispielsweise auch an dem Dorsalverschluss des *Drosophila*- Embryos beteiligt. Linear verlaufendes Aktomyosin hingegen konnte bei der Bildung und des Auswachsens von Gefäßsystemen in Maus, *Xenopus* und Hühnchen nachgewiesen werden (Agarwal und Zaidel-Bar, 2019). In diesem Zusammenhang ist der phylogenetisch basale Süßwasserpolyt *Hydra* hoch interessant, da bei *Hydra* gezeigt werden konnte, dass Aktomyosin sowohl bei der Konstriktion des Gewebes an der Knospbasis, als auch bei dem Auswachsen der Tentakel beteiligt ist (Holz et al., 2017; Holz et al., 2020). Die Beteiligung des Rho-ROCK- Myosin II- Signalweges an dem Prozess der Knospablösung konnte durch pharmakologische Inhibitionen belegt werden (Holz et al., 2017), wobei der methodische Nachweis der Aktivität der Rho- GTPasen in *Hydra* bisher fehlte.

Neben dem, über FGFR aktivierten Rho-ROCK- Myosin II- Signalweg (Holz et al., 2017), sind auch Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsPs oder PIPs) an dem Prozess der Knospung bei dem Süßwasserpolyten *Hydra* direkt oder indirekt beteiligt (Hassel und Bieller, 1996). Da auch der zelluläre Nachweis der PtdInsP und deren vermittelter Signalwege bisher in *Hydra* nicht möglich war, sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Methoden und Werkzeuge zur Untersuchung des Rho-ROCK- Myosin II- Signalwegs und PtdInsP beteiligter Signalwege für *Hydra* etabliert und analysiert werden.

III.1 Der Süßwasserpolyt *Hydra vulgaris*

Der Süßwasserpolyt *Hydra* gehört zu dem Phylum der Cnidaria, welcher die Schwestergruppe der Bilateria bildet. Cnidaria existieren, molekularen und fossilen Anzeichen nach, seit ungefähr 540 bis 740 Millionen Jahren (Park et al., 2012) und zeichnen sich auf der einen Seite durch eine weitestgehend simple Morphologie und auf der anderen Seite durch ein komplexes Genrepertoire aus (Galliot, 2012; Steele et al., 2011). Der Körper von *Hydra* besteht aus zwei Epithelschichten, dem äußeren Ektoderm und dem inneren

Endoderm (Entoderm), welche durch eine zellfreie extrazelluläre Matrix, die bei den Cnidaria Mesogloea genannt wird, getrennt wird (Sarras, 2012). Die Epithelschichten setzen sich aus endodermalen-, beziehungsweise ektodermalen multifunktionellen Epithelmuskelzellen zusammen, die stetig durch Zytokinese endodermaler- und ektodermaler Stammzellen erneuert werden. Über basale Zellfortsätze, in denen kontraktile Aktinfasern verlaufen (Myoneme), stehen die der Epithelmuskelzellen in Verbindung und bilden so das Aktinzytoskelett in *Hydra*. Im Ektoderm verlaufen die Aktinfasern longitudinal und im antagonistisch dazu wirkenden Endoderm verlaufen die Aktinfasern horizontal, wodurch komplexe Bewegungen des Polypen ermöglicht werden (Müller und Hassel, 2018).

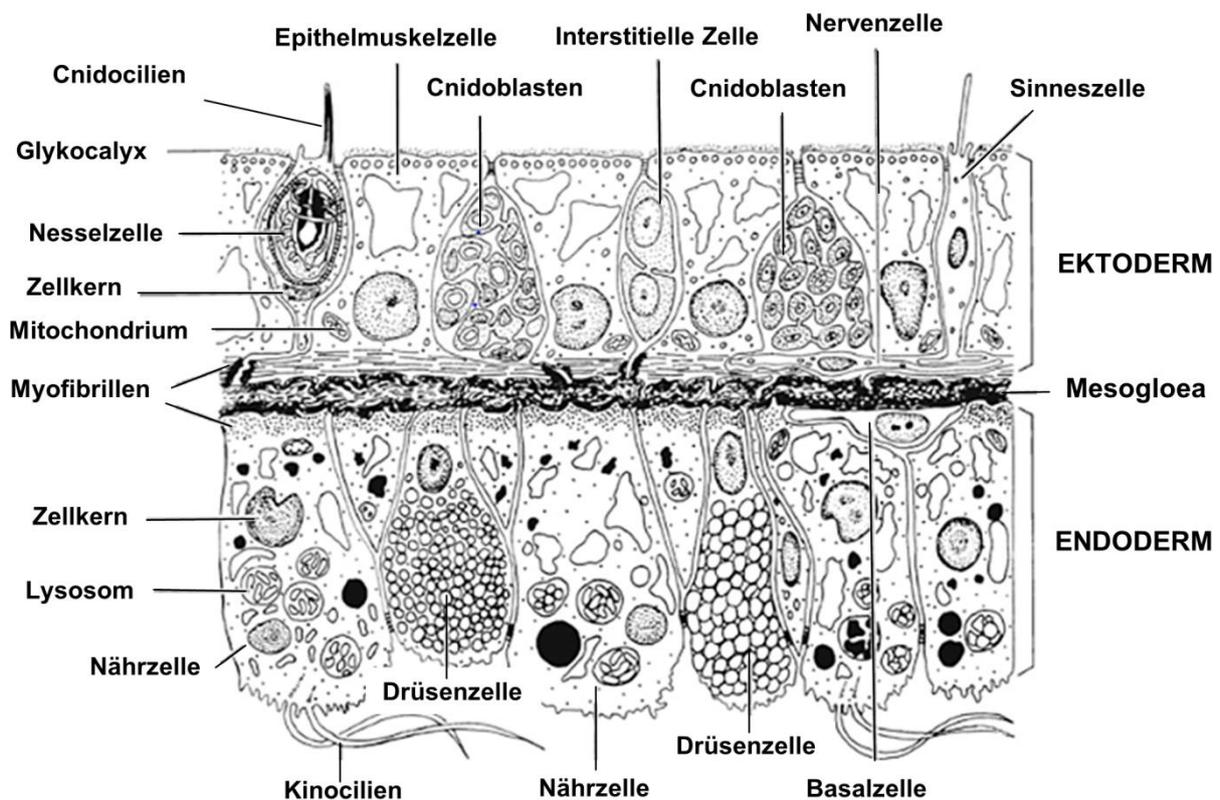


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Zelltypen anhand eines Längsschnittes der Körperwand von *Hydra*. Zelltypen des äußeren Ektoderms und des inneren Endoderms, getrennt von der zellfreien extrazellulären Matrix (Mesogloea) (Verändert nach Storch und Welsch, 2004).

Durch regiospezifische Differenzierung können morphogenetisch unterschiedliche und je nach Körperposition spezifische Epithelzelltypen gebildet werden (Hobmayer et al., 2012; Martínez und Bridge, 2012). Neben den beiden Epithel- Stammzelllinien existiert eine dritte interstitielle Stammzelllinie (I-Zellen). Diese multipotenten Stammzellen sind in der Lage eine Vielzahl spezifischer Zelltypen, wie beispielsweise Gameten, Nematoblasten, sensorische Neurone und ganglionäre Zellen sowie bestimmte Drüsen- und Schleimzellen zu bilden (Abb. 1 und Abb. 2) (Bode, 1996; Hobmayer et al., 2012; Martínez und Bridge, 2012).

Aufgrund seiner einfachen diploblastischen Körperorganisation und der enormen

Regenerationsfähigkeit ist *Hydra* ein Modellorganismus für viele entwicklungsbiologische Aspekte (Galliot, 2012). Der Körper des Polypen lässt sich in einen oral gelegenen Kopf, den zentralen Rumpf mit der Knospungszone und den aboral gelegenen Fuß einteilen (Abb. 2). Am Kopf befindet sich das Hypostom mit der Mundöffnung, welche von einem Tentakelkranz umgeben sind. In den Tentakel konzentrieren sich Nematocyten (Nesselkapseln) mit Cnidocilien, wodurch der Beutefang gewährleistet wird. Der Rumpf besteht aus der Knospungszone und der Gastralregion, wo in dem Gastralraum die extrazelluläre Verdauung und Resorption der Nahrung durch Drüsenzellen stattfindet.

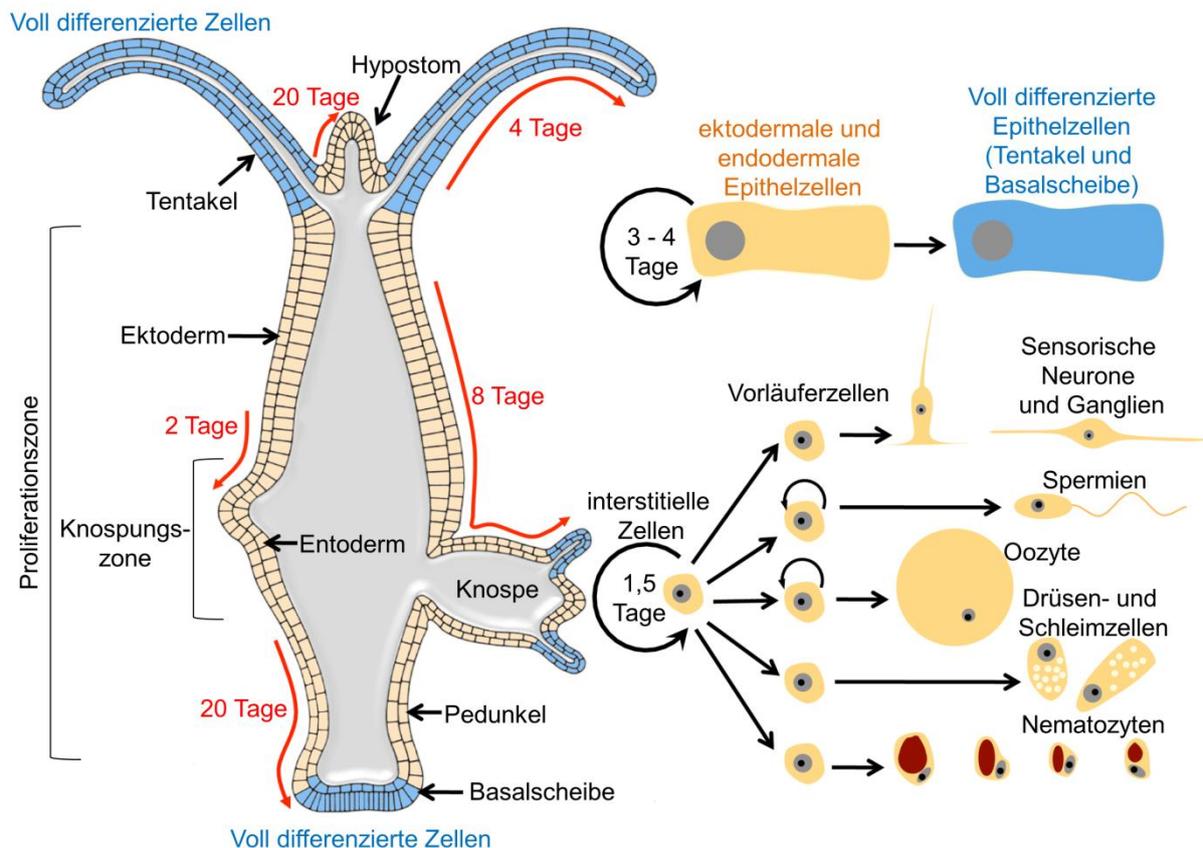


Abbildung 2: Schematische Übersicht des Modellorganismus *Hydra*. Der Körper des Polypen lässt sich in einen Kopf mit Tentakel und Hypostom, einen Gastralbereich mit der Knospungszone und einen Fuß mit der Basalscheibe einteilen. Von der Proliferationszone ausgehend wird das Gewebe passiv in die jeweiligen Körperregionen verschoben/verdriftet (rote Pfeile) (verändert nach Martínez und Bridge, 2012).

Am aboralen Ende befindet sich der Fußstiel (Pedunkel) mit der Fußscheibe (Basalscheibe), die sich aus großen, Schleim sezernierenden Zellen zusammensetzt, mit denen sich der Polyp am Substrat anheften kann.

Die Stammzelllinie der ektodermalen und der endodermalen Epithelzellen unterliegt einer ständigen mitotischen Teilung, die ungefähr 3-4 Tage benötigt (Martínez und Bridge, 2012). Durch die neu gebildeten Zellen entsteht eine kontinuierliche passive Verschiebung/Verdriftung des Gewebes und der Zellen des Polypen. Von der

Proliferationszone ausgehend, die sich zwischen dem Tentakelkranz und der Basalscheibe befindet, werden die Zellen zu den neu entstehenden Knospen, in das Hypostom, die Tentakel und die Basalscheibe verschoben, wo sie verlorene Zellen ersetzen (Abb. 2). Unterhalb des Tentakelkranzes befindet sich ein weitestgehend stationärer Bereich, durch welchen Gewebe nur sehr langsam verschoben werden kann. Wie die Epithelmuskelzellen sind große I-Zellen, die über die gesamte Körpersäule des Polypen verteilt sind, ebenfalls nicht in der Lage aktiv zu wandern (Boehm und Bosch, 2012). Im Vergleich dazu ist eine aktive Zellwanderung jedoch bei den Derivaten der großen I-Zellen, wie beispielsweise den Nematocyten oder den Drüsenzellen, zu beobachten (Boehm und Bosch, 2012). Kleine i-Zellen und Nematoblasten wandern aktiv als Zellverband (4-32 Zellen) von der Proliferationszone ausgehend zu ihrem Bestimmungsort (Campbell, 1974).

III.2 Reproduktion bei *Hydra*

Je nach Verfassung und äußeren Umwelteinflüssen kann sich *Hydra* sowohl sexuell (Abb.3 B, C), als auch asexuell durch Knospung (Abb. 3 A) reproduzieren. Unter ungünstigen Bedingungen differenzieren sich einige, der normalerweise asexuellen Polypen zu Männchen, beziehungsweise Weibchen und bilden Gonaden aus. Die weibliche *Hydra* bildet aus den I-Zellen ektodermal ein einzelnes Ei aus (Abb. 3 B), während das Männchen entlang der Körpersäule mehrere Testes ausbildet (Abb. 3 C), in denen sich aus I-Zellen Spermien differenzieren (Broun und Bode, 2002; Nishimiya-Fujisawa und Kobayashi, 2012).

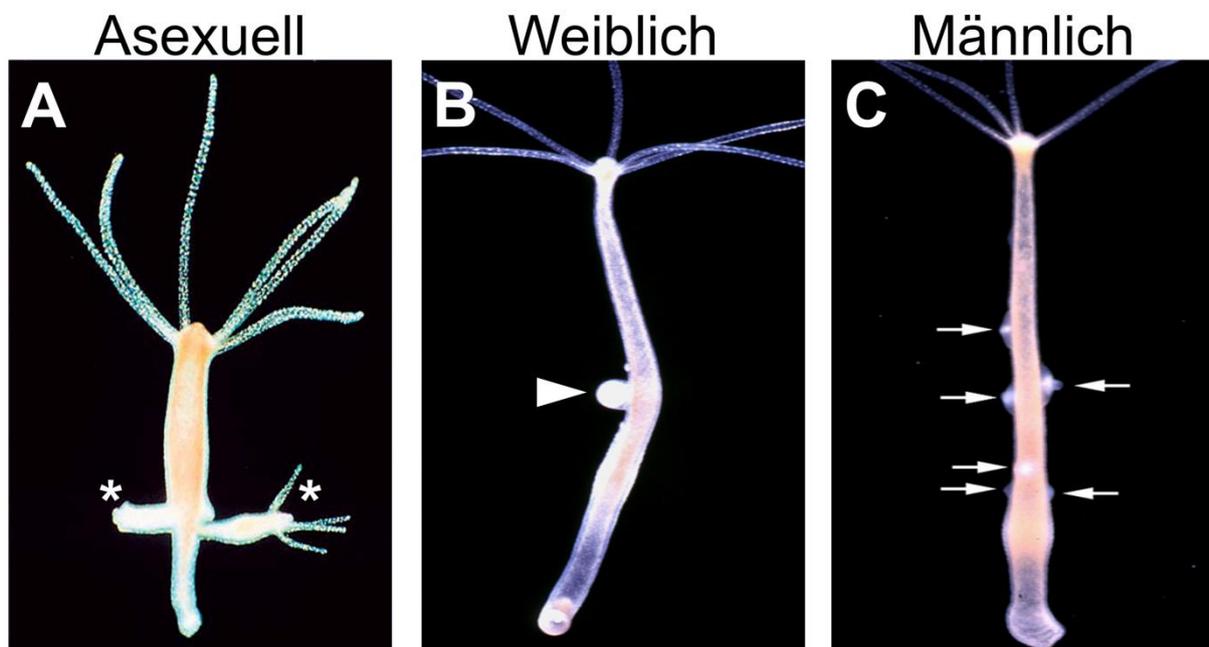


Abbildung 3: Asexueller und sexueller Phänotyp bei *Hydra*. (A) Asexueller Phänotyp. Reproduktion der asexuellen *Hydra* durch Knospung (Sterne). (B, C) Sexueller Phänotyp. (B) Das Weibchen bildet ein Ei aus (weißer Pfeilkopf), während das Männchen (C) zahlreiche Testes ausbildet (weiße Pfeile) (verändert nach Nishimiya-Fujisawa und Kobayashi, 2012; und verändert nach img.nzz.ch/S=W560/O=75/http://s3-eu-west-1.amazonaws.com/nzz-img/2008/01/09/-1.647980.-1199863515.jpg (Bild: Universität Heidelberg)

Aboral von der Gastralregion liegt die Knospungszone von *Hydra*, wo unter idealen äußeren Bedingungen und einem guten Fütterungszustand die asexuelle Vermehrung via Knospung stattfindet. Die Entwicklung der Knospe, bei der morphogenetische Prozesse, wie beispielsweise Gewebeevagination, Zellformveränderung und Konstriktion des Gewebes an der Knospbasis ablaufen müssen, ist ein gut untersuchter Prozess und lässt sich in 10 unterschiedliche Stadien einteilen. Diese Stadien lassen sich weiterhin nochmals in die drei Phasen der Initiation, der Elongation und der Ablösung unterteilen lassen (Otto und Campbell, 1977) (Abb. 4).

Die Initiation der Knospe wird durch ein Zusammenspiel des kanonischen und des nicht-kanonischen Wnt- Signalweges reguliert (Philipp et al., 2009) und ist durch ein sich verdickendes Ektoderm in der Region der zukünftigen Knospe sowie durch ein Eindringen des Endoderms in das verdickte Ektoderm gekennzeichnet (Knospstadium 1-2). Darauf folgt eine sichtbare Formation eines Kegels von ektodermalen und endodermalen Zellen (Knospstadium 3) in der Knospungszone. Diese Phase der Gewebeevagination, beziehungsweise der Elongation wird durch eine Vielzahl von aktiven Signalen, wie beispielsweise dem PKC- Signalweg (Hassel et al., 1998), der PI3- Kinase (Manuel et al., 2006) oder dem kanonischen Wnt- Signalweges (Hobmayer et al., 2000) gesteuert (Abb. 4).

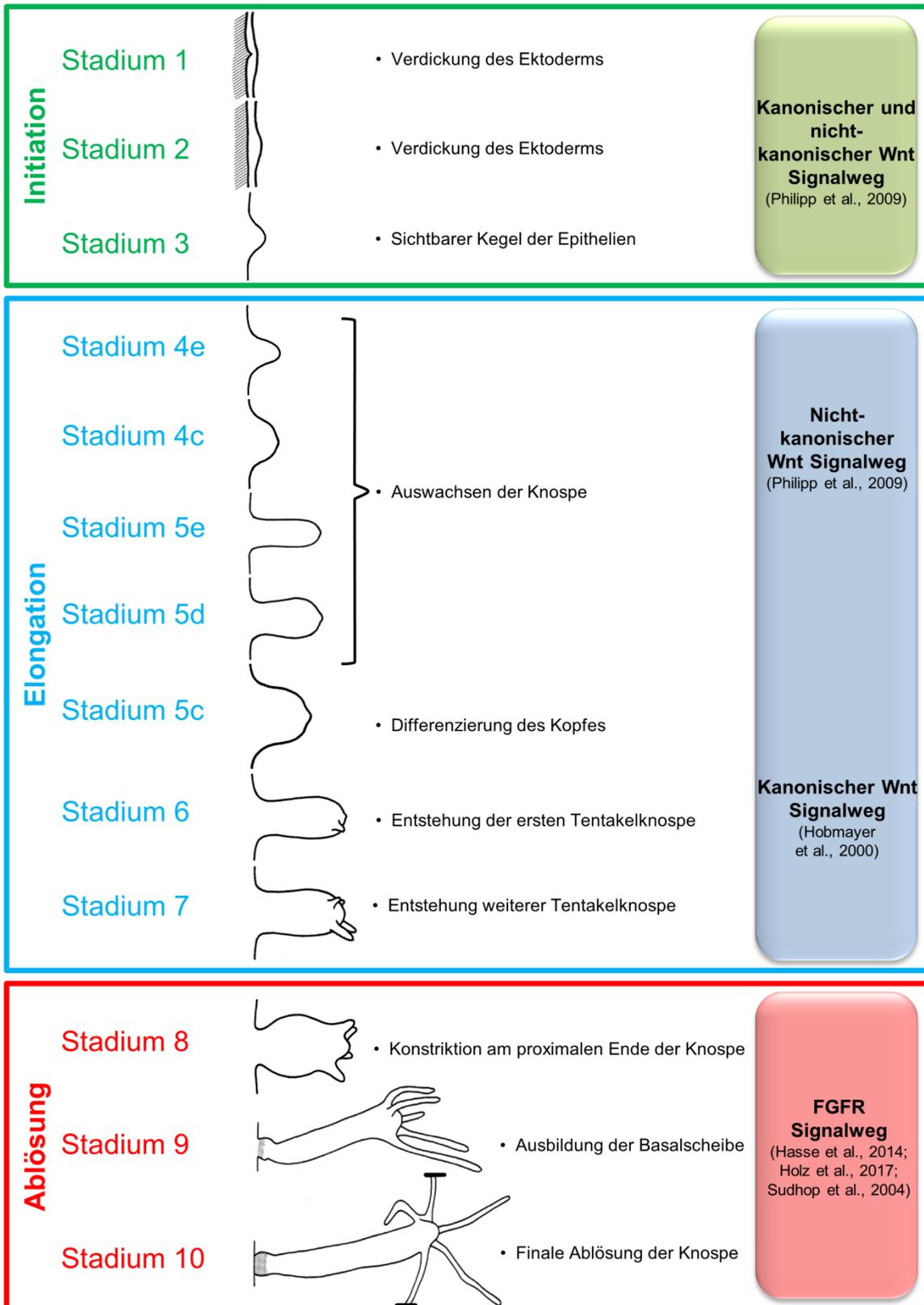


Abbildung 4: Übersicht der Knospenstadien und einiger relevanter Signalwege der Knospungsphasen. Der Prozess der Knospung lässt sich in die Phasen der Initiation (grün), der Elongation (blau) und der Ablösung (rot) und die entsprechenden Knospenstadien 1-10 einteilen. (Knospung verändert nach Otto und Campbell, 1977). Die Initiation und die Elongation der Knospe werden hauptsächlich durch den kanonischen und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg reguliert. Während der Ablösungsphase wird das Gewebe durch eine FGFR exprimierende Zone an der Knospenbasis exportiert, wodurch das Gewebe zur Konstriktion und zur finalen Ablösung der Knospe instruiert wird.

In der Phase der Elongation, von Knospenstadium 4-7, wächst die Knospe aus und am distalen Ende entstehen Tentakelrudimente (Knospenstadium 6) am Hypostom der wachsenden Knospe. In Knospenstadium 7 sind alle Tentakelknospen der jungen Knospe angelegt und teilweise bereits weiter ausgewachsen. Die Etablierung einer Gewebegrenze zwischen Knospe und Muttertier während der Knospenablösung wird vor allem durch ein Zusammenspiel von Notch- und Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor (*fibroblast growth factor receptor* (FGFR))- Signalwegen reguliert (Abb. 4). Expressionsdaten lassen weiterhin eine Beteiligung von Wnt8 an der Bildung der Grenze zwischen Muttertier und Knospe vermuten (Böttger und Hassel, 2012; Münder et al., 2010; Sudhop et al., 2004). Morphogenetisch ist die Phase der Knospenablösung durch eine Konstriktion der proximalen Knospenregion (Knospenstadium 8) und die anschließende Differenzierung der ektodermalen Zellen zur Basalscheibe in der basalen Region der Knospe charakterisiert (Knospenstadium 9). Zuletzt erfolgt die endgültige Differenzierung der Basalscheibe und die vollständig entwickelte Knospe löst sich final durch Neuropeptid- induzierte Muskelkontraktion des „Sphinkter Muskels“ der Basalscheibe vom Muttertier ab (Knospenstadium 10) (Otto und Campbell, 1977; Takahashi et al., 2008; Takahashi et al., 1997; Webster und Hamilton, 1972). Die finale Ablösung der Knospe läuft unter der Beteiligung und der Regulation von FGFR und dessen aktivierten Rho-ROCK-Myosin II und RAS/MEK/ERK- Signalwegen ab (Hasse et al., 2014; Holz et al., 2017; Sudhop et al., 2004).

III.3 Morphallaxis bei *Hydra*

Nicht nur der Aspekt der Knospung, sondern auch die enorme Regenerationsfähigkeit des Polypen macht *Hydra* zu einem interessanten Modellorganismus der Biologie. Aufgrund der kontinuierlichen Reproduktion der Stammzellen ist *Hydra* sowohl in der Lage gesamte Körperteile, wie Tentakel-, Kopf- oder Fuß-, als auch den gesamten Körper aus Einzelzellaggregaten zu regenerieren (Vogg et al., 2019). Nach einer zugefügten Verletzung wird die Wunde circa innerhalb einer Stunde verschlossen. Diese Wundheilung geschieht, indem bereits vorhandene Zellen an der Wunde umgebildet werden. Während dieser Wundheilungsmethode, welche als Morphallaxis bezeichnet wird, findet keine Zellproliferation statt (Holstein et al., 1991; Li et al., 2015). Nachdem die Wundheilung abgeschlossen ist, bildet sich zunächst ein Signalsystem, welches verschiedene unterschiedliche gesteuerte Prozesse zur Neubildung der fehlende Körperstrukturen reguliert (Holstein et al., 2003). Die vollständige Regeneration der Kopfstruktur bei *Hydra* dauert ungefähr 72 Stunden, wobei nach 24-48 Stunden erste Tentakelknospen entstanden sind (Turwankar und Ghaskadbi, 2019). Pharmakologische Inhibition mit dem FGFR- Inhibitor SU5402 führt zu einer deutlich verzögerten Kopfregeneration, was dafür spricht, dass neben dem Wnt- Signalweg (Holstein et al., 2003) sowohl Fibroblasten-Wachstums-Faktoren

(FGFs) und FGF- Rezeptoren an der Kopfregeneration bei *Hydra* beteiligt sind (Turwankar und Ghaskadbi, 2019).

III.4 Der FGF- Rezeptor

FGF- Rezeptoren sind sowohl bei Vertebraten, als auch bei Invertebraten an vielen biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration oder der Grenz- und Musterbildung beteiligt (Kadam et al., 2009; Röttinger et al., 2007; Thisse und Thisse, 2005). Im Allgemeinen bestehen FGF- Rezeptoren aus einer extrazellulären Region mit einer variablen Anzahl von Immunglobulin- Schleifen (Ig- Loops), einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Domäne (Rebscher et al., 2009). Intrazellulär befindet sich die Tyrosin-Kinase-Domäne, welche N- und C- terminal SH2- und SH3- Domänen etabliert. Diese binden Adapter- und Dockingproteine, wie beispielsweise Frs2 (in Vertebraten) oder Dof (in *Drosophila*), worüber intrazelluläre Signalwege, wie der RAS/MAPK- oder der PI3K- Signalweg aktiviert werden können (Abb. 5) (Böttcher und Niehrs, 2005; Pawson et al., 1993; Suryawanshi et al., 2020). Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass der FGFR aus *Hydra*, der aufgrund seiner transienten Expression in einem Ring aus Zellen an der Knospbasis Kringelchen genannt wird (Sudhop et al., 2004), zu der hoch konservierten Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen gehört, welche in den Cnidaria entstanden sind (Bertrand et al., 2009).

Untersuchungen des Expressionsmusters zeigen, dass *kringelchen* während des Knospungsprozesses hoch reguliert-, und bei frühen Knospstadien im Hypostom exprimiert wird. Bei späten Knospen wird *kringelchen* an der Knospbasis exprimiert und ist sogar noch nach der Knospenablösung kurzfristig in einem Ring aus Zellen im Muttertier an der Ablösestelle als Expression nachzuweisen (Sudhop et al., 2004). Neben der starken Expression an der Knospbasis ist der Rezeptor schwach ubiquitär im gesamten Tier exprimiert und durch eine Überexpression des Rezeptors kann eine Autotomie des Gewebes in der Körpersäule von *Hydra* erzielt werden (Hasse et al., 2014; Sudhop et al., 2004).

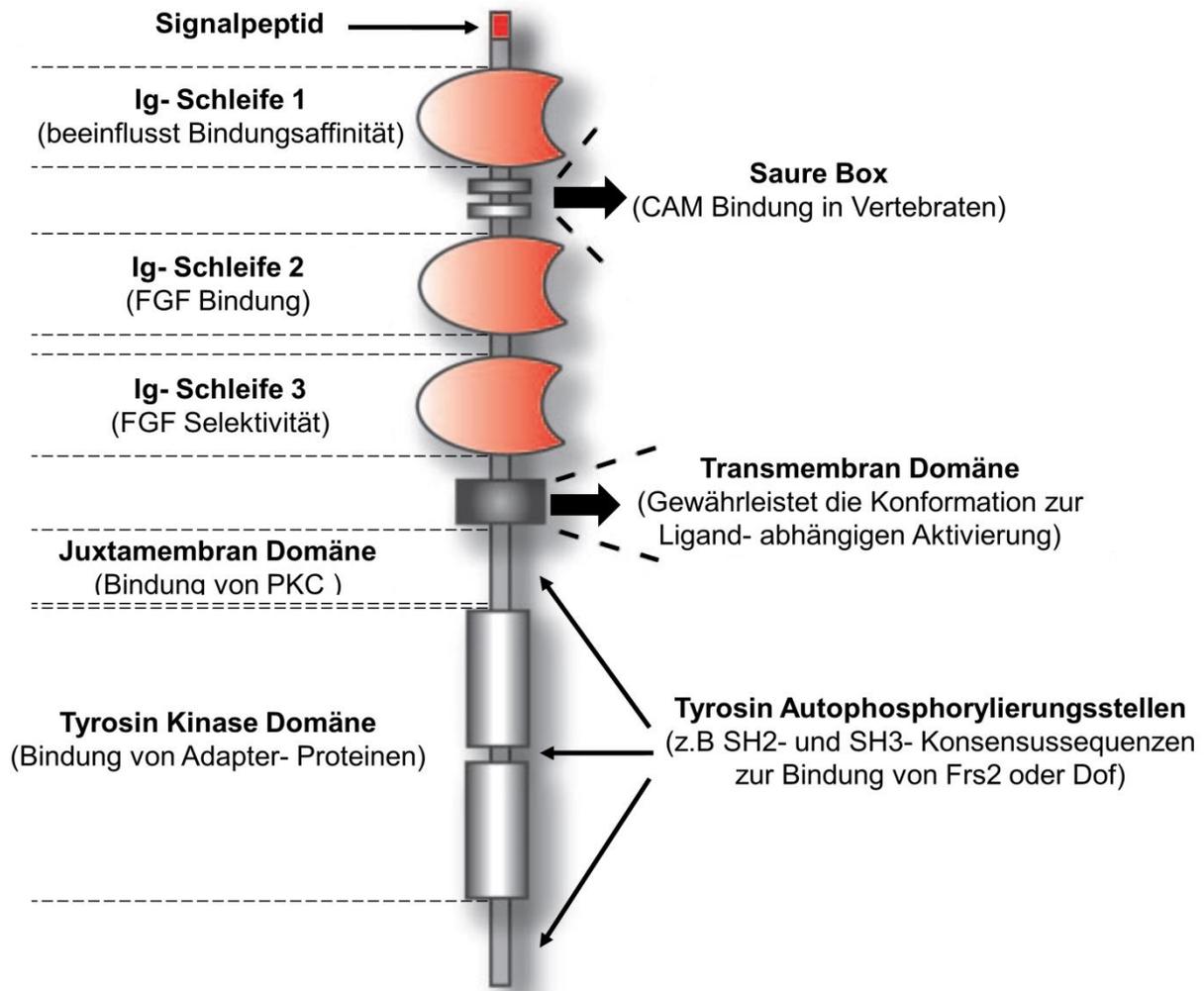


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines typischen Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptors (FGFR). Zu sehen ist das N-terminale Signalpeptid, die Ig-Schleife 1 zur Modifikation der FGF-Bindung, die Ig-Schleife 2 und 3 zur FGF- Bindung, die Transmembran- Domäne zur Aufrechterhaltung der Konformation des Rezeptors und die intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domänen zur Bindung von Adapter- Proteinen (verändert nach (Böttcher und Niehrs, 2005; Mohammadi et al., 1996; Suryawanshi et al., 2020).

Der FGFR (Kringelchen) in *Hydra* besitzt drei Immunglobulin- Schleifen (Ig- Schleifen (Loops)). Zwischen Ig- Schleife 1 und Ig- Schleife 2 ist eine saure Linkersequenz (pKa = 4,14) (Saure Box) lokalisiert, die anders als bei Vertebraten keine Konsensus-Sequenz zur Bindung von Zelladhäsions-Molekülen (*cell adhesion molecules* (CAM)) aufweist. Die intrazelluläre Domäne ist hoch konserviert und beinhaltet eine zweigeteilte Tyrosin Kinase Domäne. Über Bindestellen, die relevant sind für *downstream* Signalwege hat Kringelchen das Potential die PLCy/PKC Kaskade zu aktivieren, welche zusammen mit dem Ras/MAPK-, dem PI3- Kinase- und dem Rho-ROCK-Myosin II Signalweg, die wichtigsten FGFR *downstream* Signalgebungs- Systeme darstellt (Abb. 6) (Sudhop et al., 2004).

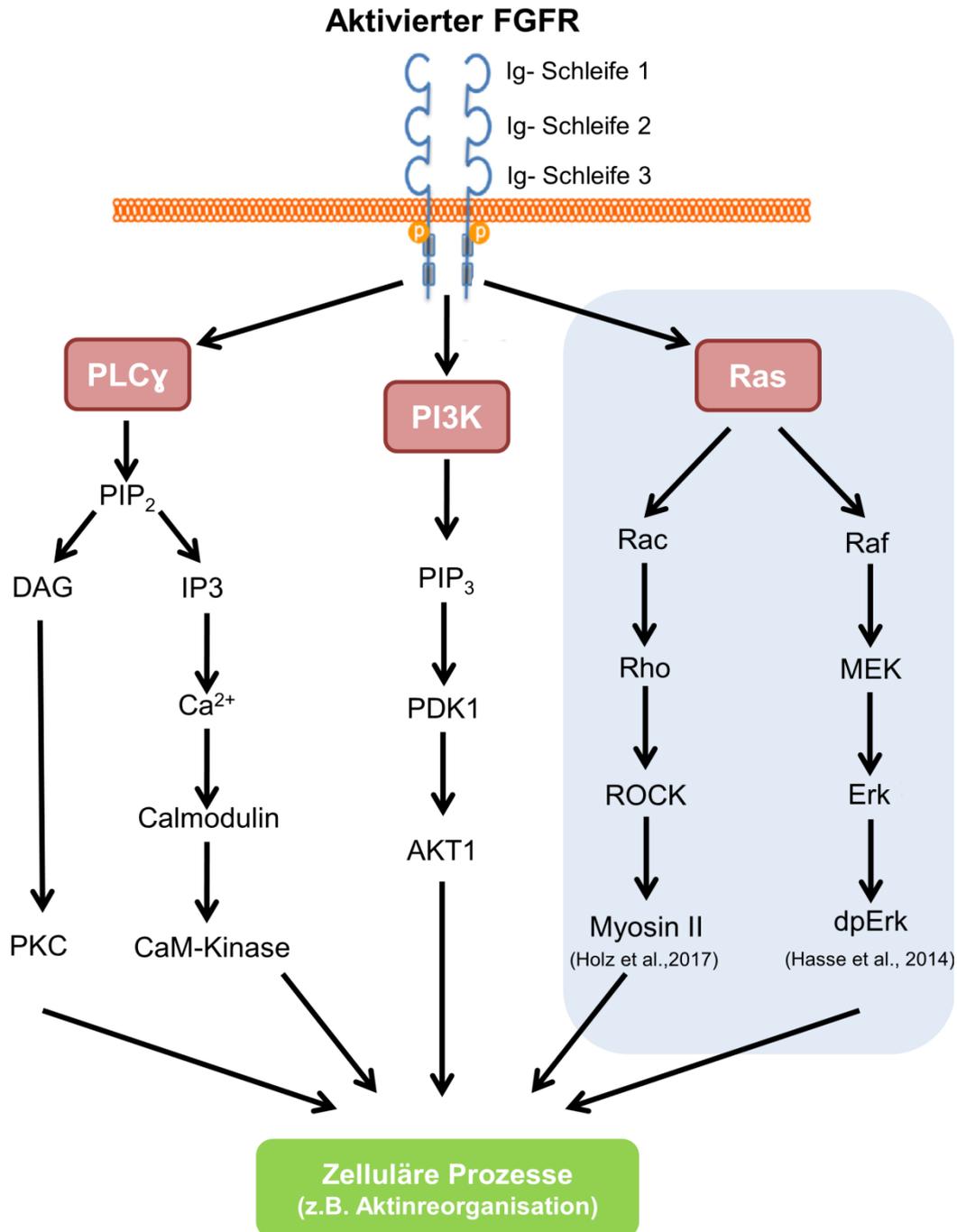


Abbildung 6: Schematische Darstellung von FGF- Rezeptor abhängigen Signalwegen PLC γ , PI3K, Rho-ROCK-Myosin und MEK-ERK. Die Beteiligung des Rho-ROCK-Myosin II- und des MEK-ERK- Signalweges (blau hervorgehoben) konnte bei *Hydra* an dem Prozess der Knospung nachgewiesen werden (Hasse et al., 2014; Holz et al., 2017) (verändert nach (Hallinan et al., 2016).

III.5 Das Aktinzytoskelett

Durch diese Signalwege (Abb. 6) können eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts reguliert werden (Hasse et al., 2014; Holz et al., 2017). Aktin repräsentiert in nicht-muskulären Zellen 1-5 % aller zellulären Proteine, wohingegen es in Muskelzellen bis zu 10 % ausmachen kann. Man kann zwischen dem globulären G-Aktin und dem filamentösen F-Aktin unterscheiden, welches aus der Polymerisation des G-Aktins

resultiert (Pollard, 2016). Dazu bindet G-Aktin zunächst an ATP, wonach es stabile Aktin- Di- oder Trimere bildet, an die weitere Aktin- Monomere anlagern können. Dadurch elongiert das Aktinfilament zu F-Aktin Fasern (Abb. 7). F-Aktin Fasern unterliegen einer ständigen Polymerisation und einer Depolymerisation. Der Aufbau am (+)-Ende des Filaments durch Anlagerung von ATP- gebundenem G-Aktin- Monomeren, wird beispielweise durch Profilin reguliert. Profilin ist ein Aktin-binde-Protein (ABP), welches den Wechsel von ADP- zu ATP- gebundenem Aktin katalysiert. Als entsprechender Antagonist zu Profilin kann ADF/Cofilin angesehen werden, das für den Abbau von Aktinfilamenten zuständig ist. Cofilin bindet bevorzugt an das (-)-Ende von Aktinfilamenten, wo es an dem ständigen Abbau des Aktinfilaments zu ADP-gebundenen G-Aktin Monomeren beteiligt ist (Hohmann und Dehghani, 2019; Skrubber et al., 2018) (Abb. 7).

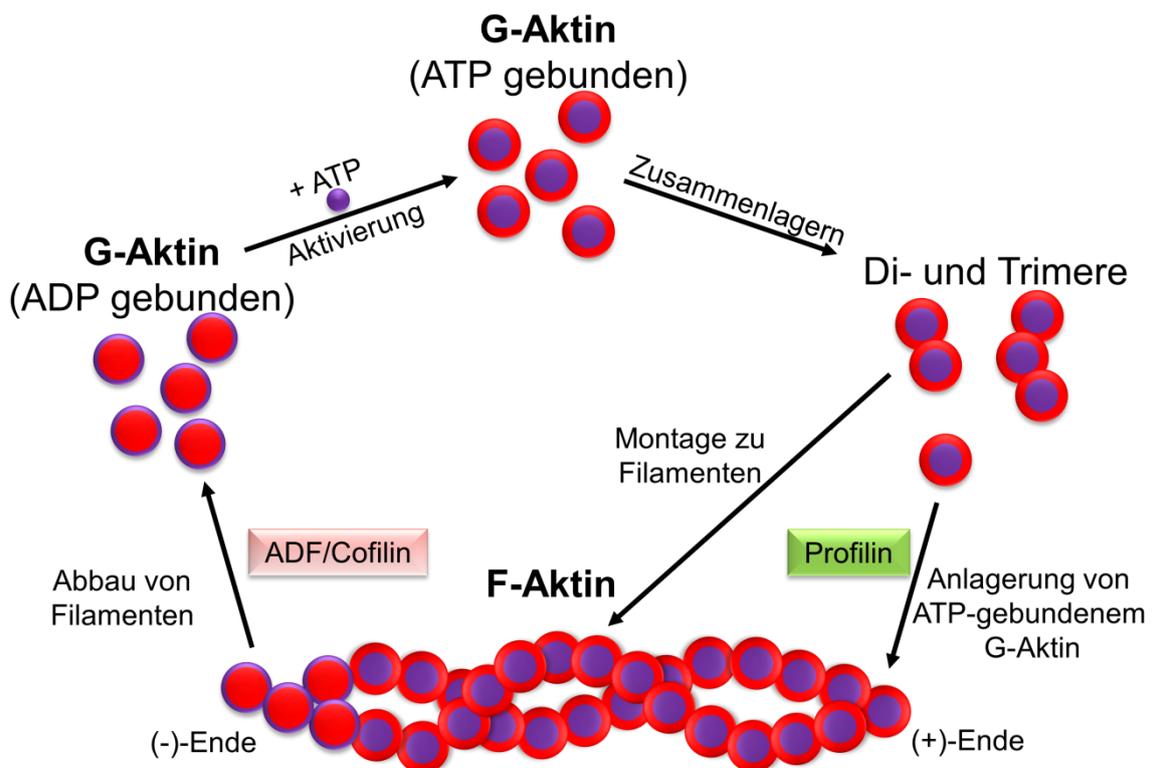


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aktinpolymerisation und der Aktindepolymerisation. Profilin steuert die Anlagerung von G-Aktin an dem (+)-Ende des F-Aktins, während ADF/Cofilin den Abbau des F-Aktins am (-)-Ende regulieren. (verändert nach Hohmann und Dehghani, 2019; Skrubber et al., 2018).

Während das G-Aktin gleichermaßen im Zytoplasma und dem Kernplasma vorkommt, ist die Verteilung des F-Aktins von unterschiedlichen Faktoren, wie beispielweise dem Zelltyp und dessen Funktion abhängig (De Lanerolle und Serebrynnyy, 2011). Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, und somit der Wechsel zwischen der globulären und der filamentösen Form, spielt in vielen zellulären Prozessen, von der Zytokinese bis Zellbewegung und Morphogenese eine wichtige Rolle (Izdebska et al., 2018). Das Aktinzytoskelett setzt sich

unter anderem aus den Kräfte- übertragenden Aktinfilamenten (F-Aktin) und den Kräfte-generierenden Myosin- Motorproteinen zusammen. Diese bilden das Aktomyosin- Netzwerk, welches die Hauptkomponente zur Bildung von zellulären kontraktile Kräfte ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Bildung von zellulären Kräfte abhängig ist von einem zeitlich abgestimmten oszillierenden Zusammenspiel der F-Aktin- Konzentration und der Dynamik von Myosin- Motorproteinen, wobei die F-Aktin- Konzentration die regulierende Rolle der kontraktile Kräfte spielt (Feld et al., 2019). Dadurch entstehen oszillierende Kontraktions- und Stabilisationsphasen, die beispielsweise bei der apikalen Konstriktion von Zellen beobachtet wurde (*ratchet model*) (Martin, 2010). Das Aktomyosin- Zytoskelett ist intrazellulär über Catenin-Cadherin-Komplexe mit der extrazellulären Matrix (ECM) assoziiert. So spielt ein dynamisch polymerisiertes Aktinzytoskelett in Kombination mit der Bildung von Cadherin-Adhäsionsmolekülen bei der Bildung von zellulären Fortsätzen eine wichtige Rolle. Im Vergleich dazu verhindert eine über das Aktinzytoskelett regulierte, starke kortikale Kontraktion die Neubildung von Zellkontakten und Destabilisiert existierende Kontakte. (Fagotto, 2014). Dadurch ist die Regulation des Aktinzytoskeletts zusammen mit der Regulation von Adhäsionsmolekülen sowohl an der Verstärkung von zellulären Verbindungen, als auch an der Lockerung und Trennung von Zellen oder Geweben zuständig (Fagotto, 2014).

III.6 Rho- GTPasen

Eine Vielzahl von Molekülen, welche über die Regulation des Aktomyosin- Netzwerk beteiligt sind, wurde identifiziert. Dazu zählen unter anderem kleine GTPasen der Ras- Protein-Superfamilie, von denen mittlerweile über 100 verschiedene Vertreter identifiziert wurden, die sich in die fünf Untergruppen der Ras-, Rab-, Arf-, Ran- und Rho- GTPasen einteilen lassen (Aspenström et al., 2004; Street und Bryan, 2011). Diese Subgruppen können wiederum in weitere Untergruppen eingeteilt werden. Rho- (*Ras homologue*) GTPasen, von denen bei Mammalia 22 Mitglieder bekannt sind, können beispielsweise in fünf Unterfamilien (Rho, Rac, Cdc42, Rnd und RhoBTB), eingeteilt werden, die jeweils unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Aelst et al., 1997; Aspenström et al., 2004; Jaffe und Hall, 2005). Hauptsächlich aufgrund ihrer spezifischen Beteiligung an Aktin- regulierenden zellulären Prozessen stehen die Rho- GTPasen Rho, Rac und Cdc42 bisher im Fokus der Forschung (Aspenström et al., 2004). Aktiviertes Rho, beispielsweise reguliert die Kontraktion des Aktomyosin-Netzwerks durch eine Ansammlung von Aktomyosin-Filamenten und Aktinstressfasern. Mitglieder der Rho- GTPase Rho können wiederum in die Untergruppen RhoA, RhoB und RhoC eingeteilt werden, die zwar 85 % Identität in den Aminosäuresequenzen aufweisen aber unterschiedliche Aufgaben erfüllen können. So ist RhoA ein Hauptregulator der Aktomyosin- Kontraktion, während RhoB hauptsächlich in Endosomen lokalisiert, und am Transport von Zytokinen beteiligt ist und RhoC vermutlich für die Zellmigration zuständig ist (Wheeler und

Ridley, 2004). Im Vergleich zu Rho führt eine Aktivierung von Cdc42 (cell division control protein 42) zu der Ausbildung von Aktin- reichen Filopodien und im Fall von einer Rac- Aktivierung zu der Ausbildung von Aktin- reichen Lamellipodien. Rho, Cdc42 und Rac sind weiterhin an der Bildung und Ansammlung von Adhäsions-Verbindungen (*Adherens junctions*) beteiligt, indem sie die *Junctions* durch die Ansammlung von Aktinfilamenten stabilisieren (Hordijk et al., 1997; Magie et al., 2002). Auch bei der Polarität von migrierenden Zellen erfüllen die Rho- GTPasen unterschiedliche Funktionen. Während Rho hauptsächlich am Hinterende von migrierenden Zellen lokalisiert ist, sind Cdc42 und Rac beide am Vorderende in Filopodien nachzuweisen (Sartorel et al., 2018; Street und Bryan, 2011; Vaidžiulytė et al., 2019; Wheeler und Ridley, 2004).

Generell liegen Rho- GTPasen in einer inaktiven, GDP- gebundenen Form und in einer aktiven, GTP- gebundenen Form vor, wodurch sie als molekularer Schalter agieren können. Die Aktivierung wird durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) kontrolliert, die aufgrund von aktivierten membrangebundene Rezeptoren, den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (Kawano et al., 2014; Schmidt und Hall, 2002). Im gesamten Tierreich wurden eine Vielzahl von unterschiedlichen Rho- GEFs identifiziert, die weitestgehend alle durch eine C-Terminal gelegene *Dbl homology* (DH) - *Pleckstrin homology* (PH) Domänen-Struktureinheit charakterisiert sind (Schmidt und Hall, 2002). Neben dem DH-PH Domänenmodul besitzen die meisten GEFs weitere funktionelle Proteindomänen, wie beispielsweise SH2-, SH3-, PDZ- und weitere PH- Domänen, wodurch die GEFs in der Lage sind an *upstream* Rezeptoren oder Signalgebungsmoleküle zu binden (Schmidt und Hall, 2002). Von diesen PH- Domänen ist bekannt, dass sie in der Lage sind sowohl an membrangebundenen phosphorylierten Phosphoinositiden (PtdIns), als auch direkt an Proteine binden können (Lemmon und Ferguson, 2015; Rebecchi und Scarlata, 1998; Schmidt und Hall, 2002). Als Antagonist zu den Rho- GTPase aktivierenden GEFs agieren *GTPase- activating proteins* (GAPs), welche GTP wiederum zu GDP austauschen und so die GTPase inaktivieren (Bernards, 2003). Weiterhin werden Rho- GTPasen durch *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) reguliert, die eine spontane Aktivierung der GTPase verhindern (Olofsson, 1999) (Abb. 8).

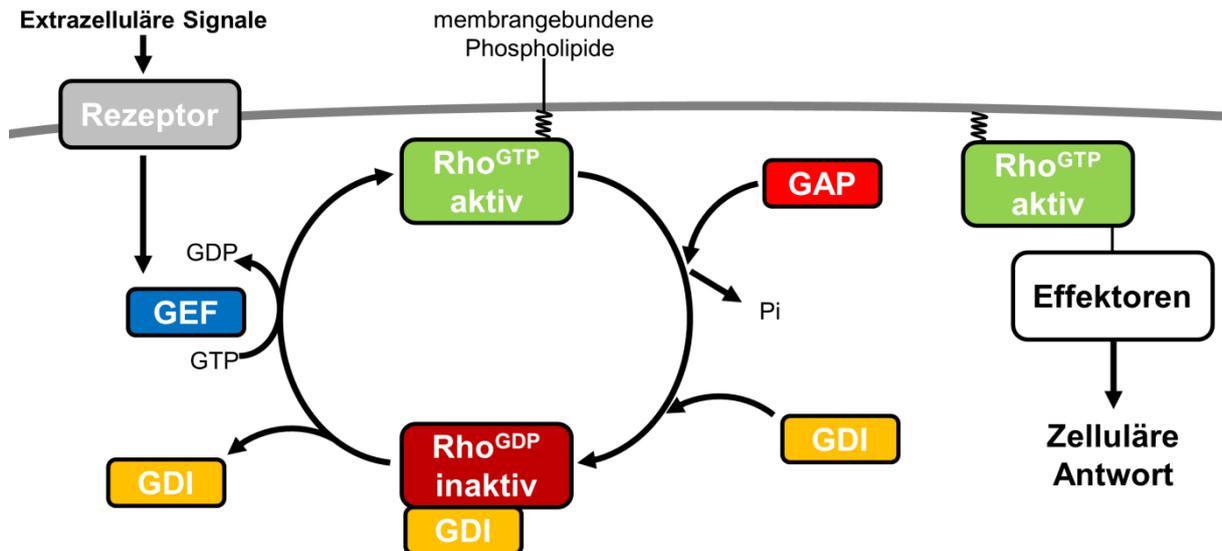


Abbildung 8: Schematische Darstellung der zyklich verlaufenden Aktivierung und Inaktivierung der Rho- GTPasen. GEFs (blau) vermitteln die Aktivierung- und GAPs (rot) die Inaktivierung der Rho- GTPasen. Weiterhin ist die Bindung aktiver Rho- GTPasen über membrangebundene Phospholipide zur Signaltransduktion dargestellt (verändert nach (Jaffe und Hall, 2005; Kawano et al., 2014)).

Aktive Rho- GTPasen sind in der Lage mit unterschiedlichen Effektor- Molekülen zu interagieren, die verschiedene zelluläre Antworten vermitteln (Bustelo et al., 2007). So kann an aktives Rho, beispielsweise das Scaffoldprotein Rhotekin binden, welches aus einer Rho-Binde-Domäne (RBD), einer *pleckstrin homology* (PH) Domäne, zwei Prolin- reichen Regionen und einem C-Terminal gelegenen PDZ- (PSD-95, Discs-large, und ZO-1) Motiv besteht. An das PDZ- Motiv können eine Vielzahl von Proteinen binden, die allgemein in der Regulation der Zellmorphologie, der Migration oder von Signalgebungsprozessen beteiligt sind (Ito et al., 2018). Von der PH- Domäne ist hingegen bekannt, dass sie sowohl an Phosphatidylinositol-,4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) als auch an Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) binden kann, wodurch eine Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Prozessen reguliert werden kann (Yoshida et al., 2009; Lemmon und Ferguson, 2015). Die RBD des Rhotekins interagiert ausschließlich mit GTP- gebundenem aktiven Rho und inhibiert sowohl die intrinsische, als auch die über GAPs vermittelte Möglichkeit der erneuten Aktivierung der Rho- GTPase (Reid et al., 1996). Diese Eigenschaft des Rhotekin-RBDs kann genutzt werden den GTP- gebundenen Zustand des Rhos mittels des rekombinanten Proteins zu detektieren (Berger et al., 2009; Ren et al., 1999).

III.7 Phosphatidylinositolphosphate

Bei der Regulation der Dynamik und der Organisation des Aktinzytoskeletts spielen neben den Rho- GTPasen vor allem Plasmamembran- ständige Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsPs oder PIPs), insbesondere Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ($\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$) eine zentrale Rolle. Über mindestens drei unterschiedliche Mechanismen können PtdInsPs die Aktindynamik regulieren: (i) Aktin-bindende-Proteine (ABPs) interagieren mit PtdInsPs, (ii) PtdInsPs kontrollieren die subzelluläre Lokalisation von Proteinen, die das Aktinzytoskelett mit der Plasmamembran verbinden und (iii) PtdIns regulieren Rho- GTPase aktivierende Proteine (Saarikangas et al., 2010). PtdInsPs bieten also eine Plattform, Rho- GTPasen wie Rho, Cdc42 und Rac über deren spezifischen GEFs zu rekrutieren. Dadurch wird die Aktivität der Rho- GTPasen reguliert, wodurch unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden, die beispielsweise über ROCK oder Arp2/3 weitergeleitet werden. Dies korreliert oft mit einer Akkumulation von F-Aktin an Membranbereichen mit hoher PtdInsPs- Konzentration (Abb. 9) (Saarikangas et al., 2010; Wang et al., 2015; Yoshida et al., 2009).

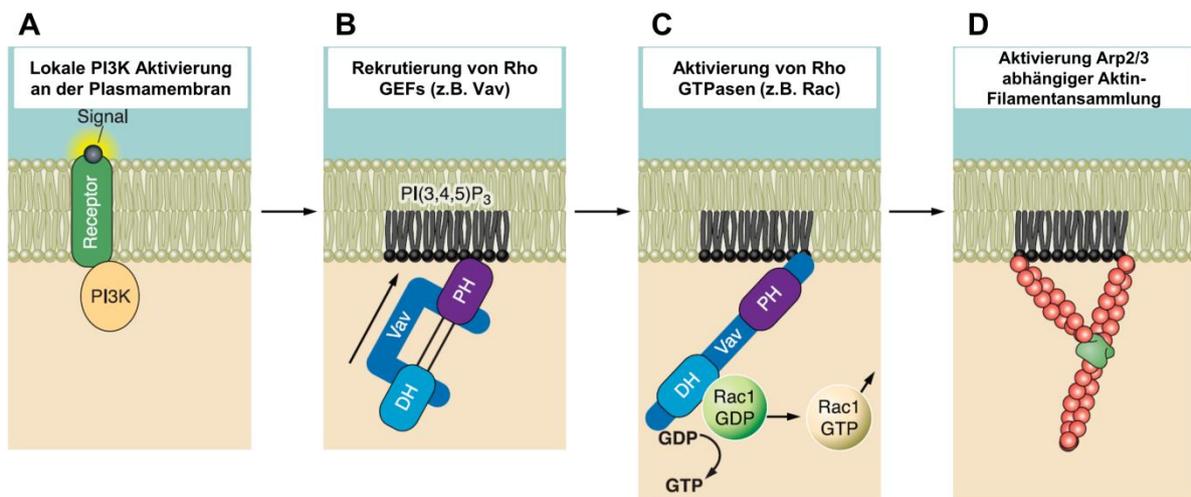


Abbildung 9: Schematische Darstellung der über $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ gesteuerte Aktinakkumulation an der Zellmembran. (A) Lokale Aktivierung der PI3- Kinase an der Zellmembran führt zu einer Konzentration von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. (B) An $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ können Rho- GEFs wie beispielsweise Vav binden. (C) Über diese Rho- GEFs werden Rho- GTPasen, wie beispielsweise Rac aktiviert. (D) Durch aktivierte Rho- GTPasen findet die Ansammlung von Aktinfilamenten statt (verändert nach Saarikangas et al., 2010).

Gleichzeitig können PtdInsPs, beziehungsweise deren Hydrolyseprodukte, die Inositolphosphate (IP), auch als *second-messenger* dienen. Dies ist nach der Hydrolyse von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ durch die Phospholipase C (PLC) der Fall, bei der die *second-messenger* IP_3 und DAG entstehen (Abb. 10). Alternativ regulieren PtdInsPs auch direkt die Aktivität von Aktin-bindenden-Proteinen, wodurch sie das Aktinzytoskelett bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen steuern (Fiume et al., 2019; Rhee, 2001; Saarikangas et al., 2010). Phosphatidylinositol (PtdIns oder PI) besteht aus einem zytoplasmatischem Inositolring der über eine Phosphatgruppe mit der membranständigen Fettsäurekette verbunden ist (Abb.

10). An den Positionen D-3, D-4 und D-5 kann der Inositolring reversibel durch Kinasen und Phosphatasen phosphoryliert und durch Phospholipasen dephosphoryliert werden, wodurch sieben unterschiedliche PtdInsPs: PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂), und PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) (Abb. 10) generiert werden. Allgemein sind PtdIns und dessen, an unterschiedlichen Positionen phosphorylierte Derivate (PtdInsPs) (Abb. 10), an einer Reihe von zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, der Zellmigration, der Zytoskelettorganisation, dem Membrantransport, der intrazellulärer Signalgebung und der Apoptose beteiligt (Di Paolo und De Camilli, 2006; Fiume et al., 2019; Niggli, 2005; Tan et al., 2015). Mutationen oder Fehlfunktionen von PtdInsPs-modifizierenden Enzyme (Kinasen, Phosphatasen und Lipasen) werden mit vielen humanen Erkrankungen, wie Krebs, Immunsystemstörungen und Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht (Balla, 2013; Behjati et al., 2014; Burke, 2018; Goncalves et al., 2018; Hammond und Burke, 2020). Eine Vielzahl von unterschiedlichen PtdIns- Kinasen und PtdIns- Phosphatasen, welche die sieben PtdInsPs generieren können, sind mittlerweile bekannt. Die bekanntesten Vertreter sind dabei die Familie der PI3- Kinasen, die PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ phosphorylieren und die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), die PtdIns(3,4,5)P₃ wiederum zu PtdIns(4,5)P₂ dephosphoryliert (Hammond und Burke, 2020). Die sieben unterschiedlichen PtdInsPs sind in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten, wie der Plasmamembran, den Endosomen, dem endoplasmatischem Retikulum, dem Golgi-Apparat und der Kernmatrix nachzuweisen (Czech, 2003; Fiume et al., 2019; Hammond et al., 2009; Hammond und Burke, 2020; Tan et al., 2015; Van Meer et al., 2009), in denen die PtdInsPs unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Allgemein ist bekannt, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Sekretion aus dem Golgi- Apparat-, bei der Endozytose- und für die Membranfluidität spielen. Auch sind sie an der Rekrutierung und allosterischen Aktivierung von Proteinen beteiligt und regulieren membranintegrierte Proteine (Hammond und Burke, 2020; Wang et al., 2019).

Die bekanntesten PtdInsPs, PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃, sind beide an/in der Plasmamembran und dem Zellkern lokalisiert, wo sie jedoch unterschiedliche Aufgaben erfüllen. PtdIns(4,5)P₂ ist hauptsächlich an der Zellmigration, an der Membranfluidität (Endo- und Exozytose), an der Plasmamembran-Zytoskelett-Verbindung, an der Regulation der Aktindynamik sowie an der Regulation der Transkription beteiligt. Im Vergleich dazu ist PtdIns(3,4,5)P₃ für die Zellmigration, die Proliferation und das Zellüberleben zuständig, indem es ein Effektor vieler *downstream* Bestandteile des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) Signalwegs darstellt (Czech, 2000; Fiume et al., 2019).

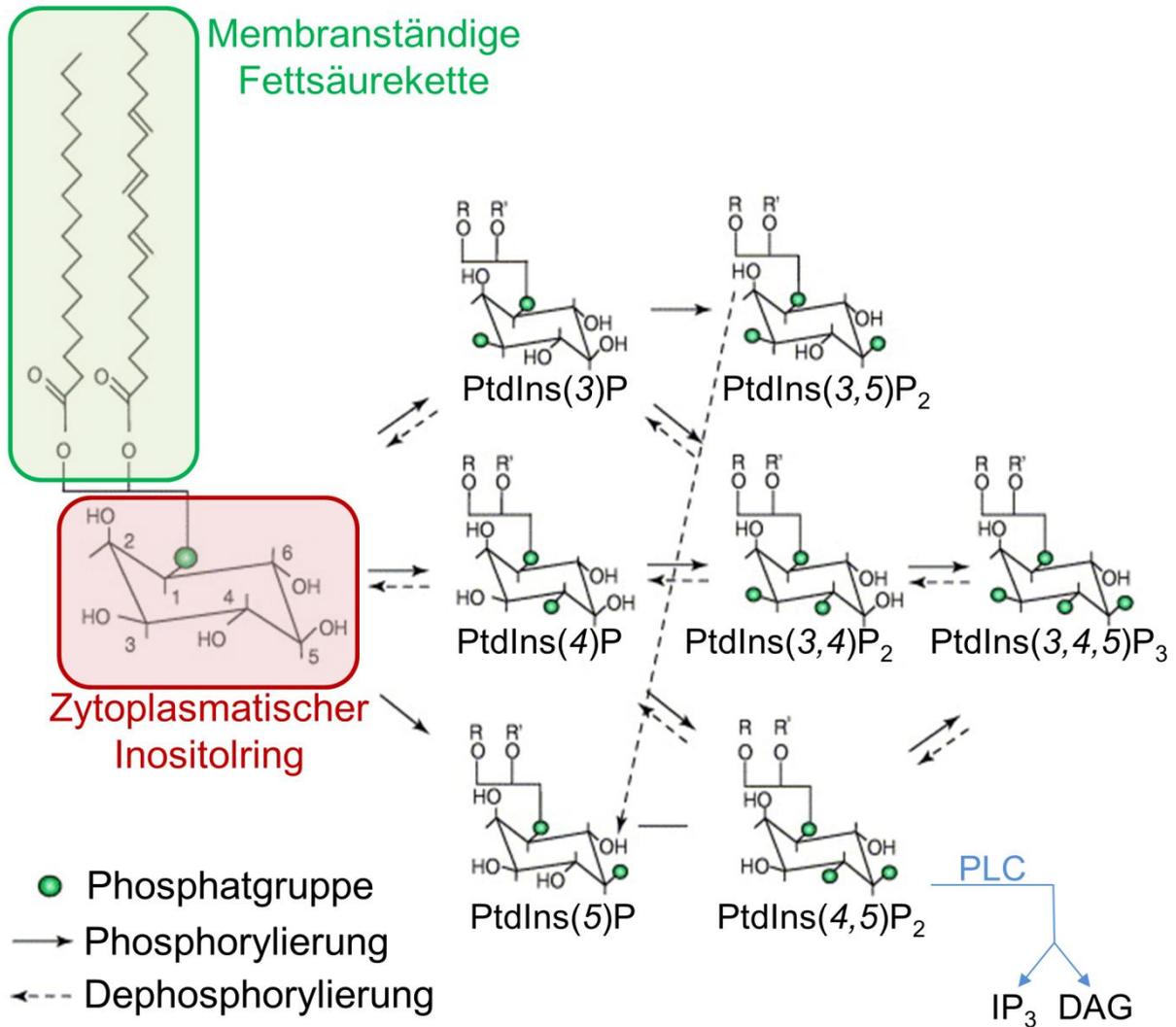


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Synthese der sieben unterschiedlichen Phosphatidylinositolphosphate. Weiterhin dargestellt ist die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ durch die Phospholipase C (PLC) zu den beiden *second messenger* IP₃ und DAG (verändert nach Carlton und Cullen, 2005; Saarikangas et al., 2010).

Trotz ihrer essentiellen Funktion bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen machen die beiden PtdInsPs PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ zusammen weniger als 1 % aller Membranphospholipide aus (Czech, 2000). Phosphatidylinositolphosphate vermitteln ihre Aufgaben, indem sie PtdIns- bindende Proteine über spezifische Lipid-Interaktions-Motive wie der *pleckstrin homology* (PH) Domäne, der Phox (PX) Domäne oder der FYVE Domäne an spezifischen subzellulären Kompartimenten binden (Fiume et al., 2019).

So sprechen viele verschieden extrinsische Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren als Ligand zu entsprechenden Rezeptoren) oder intrinsische Stimuli (z.B. zellulärer Stress), PtdInsPs direkt oder indirekt über PtdInsPs- bindende Proteine an. PtdIns(4,5)P₂ beispielsweise dient selbst als Regulator für PtdIns(4,5)P₂- bindende Proteine, die vielseitig an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind (Abb. 11), gleichzeitig kann es auch von der Phospholipase C_γ zu den beiden *second messengers* Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG)

generiert werden, welche wieder für den PI- Zyklus recycelt werden können (Saarikangas et al., 2010; Sun et al., 1999).

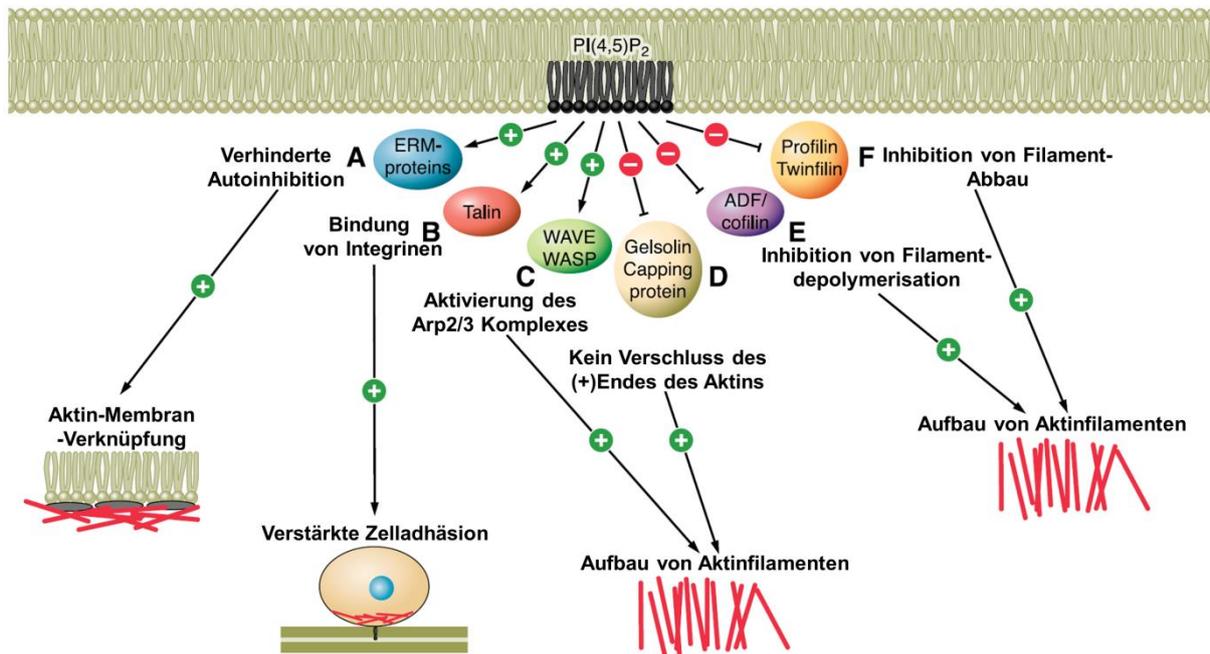


Abbildung 11: Schematische Darstellung der PtdIns(4,5)P₂ abhängigen Regulierung der Aktinfilamente. (A) Die Interaktion der Plasmamembran und des Aktinzytoskeletts wird durch die Aktivierung von ERM- Proteinen verstärkt. (B) Die Zelladhäsion zu der Extrazellulären Matrix (ECM) wird durch die Bindung von Talin an Integrinen verstärkt. (C) Die Aktivität der WAVE und WASP Proteinfamilie wird durch PtdIns(4,5)P₂ verstärkt, wodurch über Arp2/3 Aktinfilamente aufgebaut werden. (D) PtdIns(4,5)P₂ inhibiert Capping Proteine wie Gelsolin. (E, F) PtdIns(4,5)P₂ inhibiert ADF/Cofilin und Profilin/Twinfilin, wodurch die Aktindepolymerisation verringert wird (verändert nach Saarikangas et al., 2010).

Im Zytoplasma frei gesetztes IP₃ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ am endoplasmatischen Retikulum. Ca²⁺ bedingt zusammen mit DAG die Aktivierung der Ca²⁺- abhängigen Proteinkinasen C (PKC) (Kaleli et al., 2020). Dies geschieht, indem membrangebundenes DAG sowohl PKC, als auch Rho- GEFs an die Plasmamembran rekrutiert und so *downstream* Signalwege, wie beispielsweise den RAS/RAF/MEK/ERK- Signalweg stimuliert (Roberts et al., 2004) (Abb. 12). Der RAS/RAF/MEK/ERK- Signalweg reguliert unter anderem die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum, die Apoptose, und die Embryogenese, ist aber auch an dem Knospungsprozess *downstream* des FGF- Rezeptors bei *Hydra vulgaris* beteiligt (Hasse et al., 2014; Santarpia et al., 2012). Gleichzeitig bewirkt IP₃ die Aktivierung von Ca²⁺/Calmodulin (CaM), was zusammen mit der PKC die Aktomyosin-Kontraktibilität beeinflusst. Ca²⁺/CaM aktiviert die Myosin regulierende-Leichte-Kette-Kinase (MLCK), wodurch die MLC phosphoryliert wird, was eine Kontraktion des Aktomyosins bewirkt (Logan und Mandato, 2006).

Eine Akkumulation von F-Aktin und von phosphoryliertem Myosin an der Knospbasis an den auswachsenden Tentakelknospen konnte bei *Hydra* nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die Kontraktion des Aktomyosin- Komplexes an der Knospbasis bei *Hydra* als

grundlegender Mechanismus für den finalen Ablösungsprozess der Knospe identifiziert werden (Holz et al., 2017). Somit konnte die Beteiligung von Signalwegen, welche von PtdIns reguliert werden können, an morphologischen Prozessen, wie den auswachsenden Tentakeln und der Ablösung der Knospe nachgewiesen werden. Aber auch eine direkte Beteiligung der PtdIns, respektive deren Hydrolyseprodukte an der Morphologie, speziell an der Knospen-, der Tentakel- und Achsenformation bei *Hydra vulgaris* konnte durch eine Inkubation der Tiere mit Lithiumchlorid (LiCl) belegt werden. LiCl beeinträchtigt den PI-Zyklus indem es das Recycling von IP₃ zu Phosphatidylinositolphosphaten (PtdInsPs) verhindert, wodurch sich Inositolphosphate (IPs) im Gewebe anreichern. Dies bedingt ektopische Knospen, Sekundärachsen, und ektopische Tentakel in *Hydra* (Hassel et al., 1998; Hassel und Berking, 1990; Hassel und Bieller, 1996).

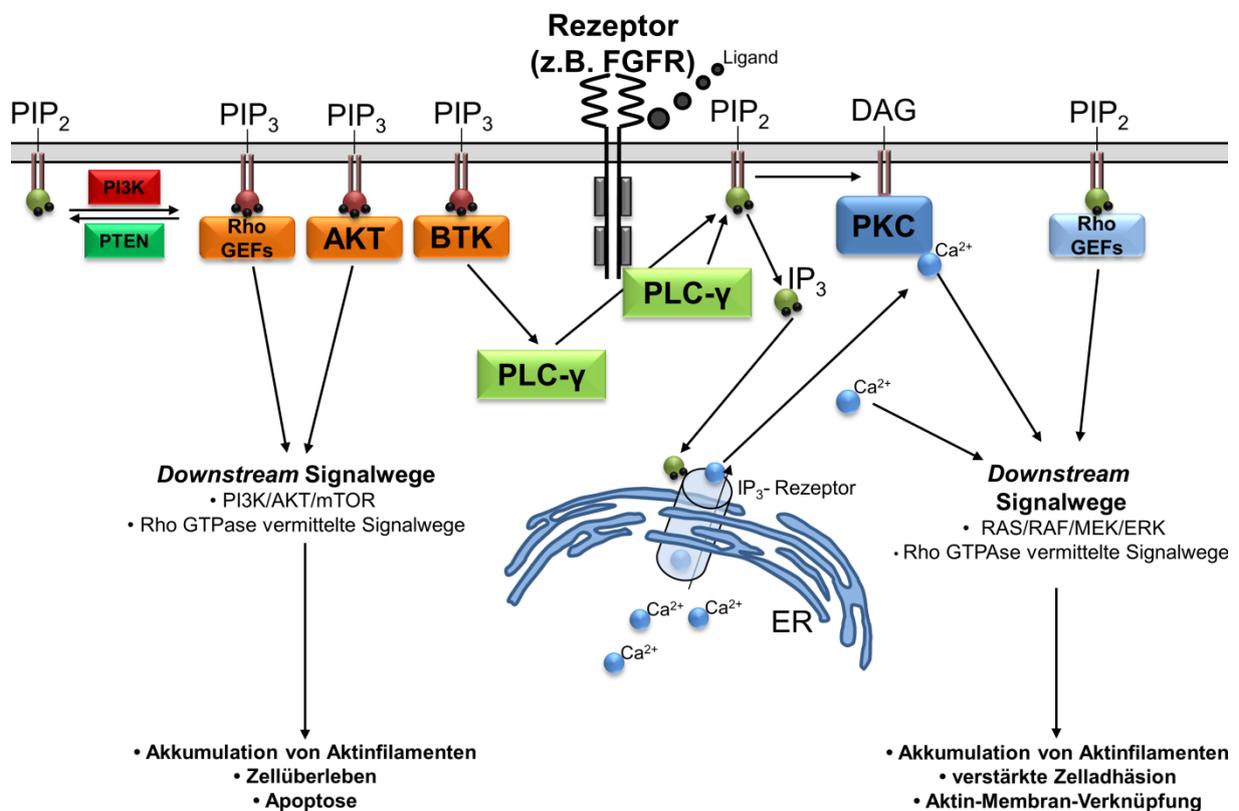


Abbildung 12: Schematische Darstellung PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ abhängiger Signalwege. (verändert nach Antal und Newton, 2013; Hanna und El-Sibai, 2013; Irvine, 1998; Perez-Garcia et al., 2018; X. Wang et al., 2015).

Im Vergleich zu PtdIns(4,5)P₂ bindet PtdIns(3,4,5)P₃ über dessen spezifische PH- Domäne hauptsächlich die Proteinkinase AKT und die *Bruton's tyrosine kinase* (BTK). In B-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Bindung der BTK an PtdIns₃ (IP₃), die Phosphorylierung der Phospholipase C induziert, wodurch die PLC wiederum PtdIns(4,5)P₂ zu DAG und IP₃ hydrolysiert (Irvine, 1998). Die Proteinkinase AKT spielt hingegen vor allem bei dem PI3K/AKT/mTOR Signalweg eine Rolle. Dieser beinhaltet mindestens 254 Komponenten und ist an einer Vielzahl von zellulären Aufgaben beteiligt. Diese Aufgaben sind zum Großteil mit

Zellzyklusprozessen, mit der Genexpression und mit der Apoptose assoziiert sind (Abb. 12) (Ersahin et al., 2015).

Weiterhin spielen PtdInsPs und die PtdInsPs- regulierende Enzyme, PI3K und PTEN eine große Rolle bei der Zellpolarität, während der Zytokinese und während der Zellmigration (Janetopoulos und Devreotes, 2006). So ist sowohl PtdIns(3,4,5)P₃, als auch die PI3K hauptsächlich am vorderen Pol von migrierenden Zellen lokalisiert, während PtdIns(4,5)P₂ und PTEN am hinteren Pol der migrierenden Zelle nachzuweisen sind (Janetopoulos und Devreotes, 2006; Wu et al., 2014). Bei Epithelzellen hingegen ist PtdIns(3,4,5)P₃ und PI3K basal lokalisiert, während PtdIns(4,5)P₂ und PTEN apikal nachzuweisen sind (Shewan et al., 2011).

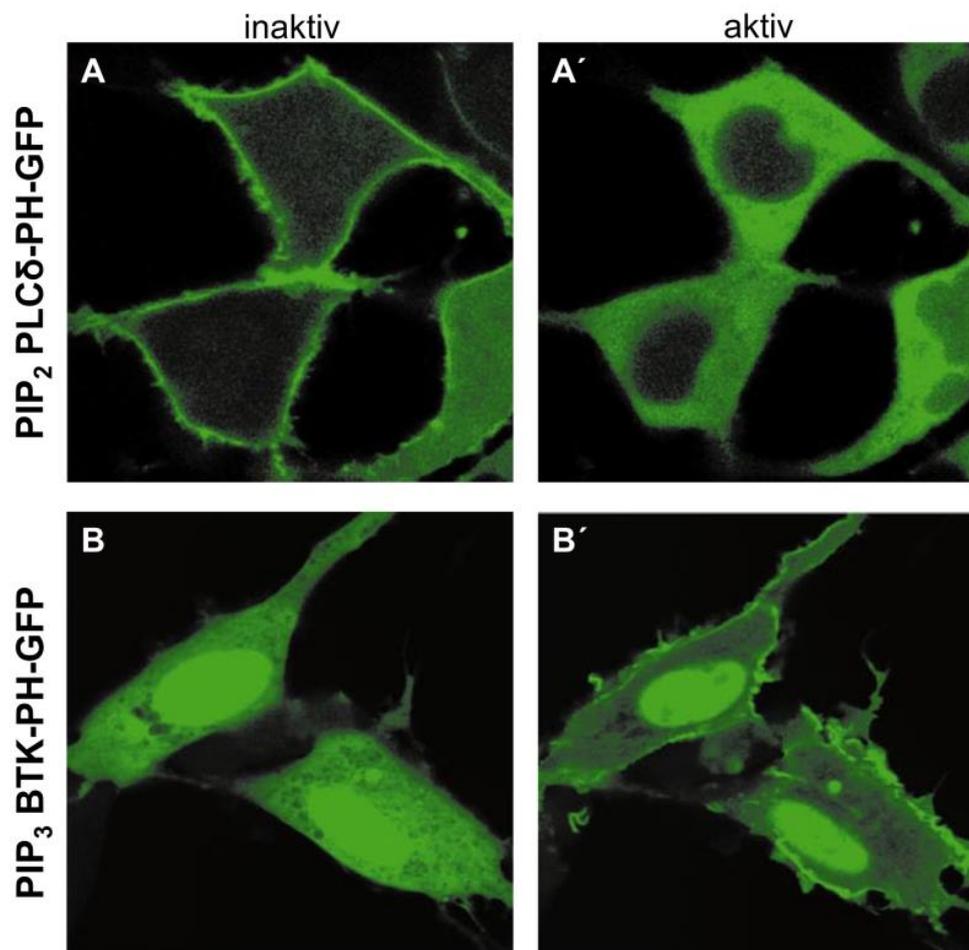


Abbildung 13: Zelluläre Lokalisation der GFP- markierten PtdInsP- Sensoren. (A) PtdIns(4,5)P₂-Sensor (PLCδ-PH-GFP) ist im inaktivierten Zustand an der Membran gebunden. (A') Nach der Aktivierung des Signalweges (Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂) transloziert das Sensorsignal in das Zytoplasma. (B) Im Gegensatz zu PtdIns(4,5)P₂ liegt der PtdIns(3,4,5)P₃- Sensor (BTK-PH-GFP) im Zytoplasma vor. (B') Nach Stimulation des Signalweges transloziert das PtdIns(3,4,5)P₃-Sensorsignal an die Zellmembran (verändert nach Balla et al., 2000).

Durch die ständige Phosphorylierung und Dephosphorylierung an den Polen der Zelle durch PI3K und durch PTEN wird ein PtdInsP- Gradient, und dadurch eine Zellpolarität erzeugt. Am Vorderende der migrierenden Zelle binden ABPs über die PtdInsP- spezifischen Bindemotive an das PtdIns(3,4,5)P₃, wodurch es zu einer Aktinpolymerisation und einem Umbau des

Aktinzytoskeletts kommt, welches benötigt wird, um Pseudopodien und Lamellipodien zu generieren (Servant et al., 2010; Wu et al., 2014). Die spezifischen Bindemotive der PtdInsPs- binden Proteine können in Zellkulturen zur subzellulären Visualisierung der PtdInsPs genutzt werden. Dazu wird der Bereich der Lipid- bindenden Sequenz der Bindemotive mit dem grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) fusioniert um eine Proteinchimäre (Sensor) zu erzeugen (Balla et al., 2000). So können für die Visualisierung der PtdInsPs eine Vielzahl von Proteindomänen genutzt werden (Várnai und Balla, 2008). Hauptsächlich wird für die Darstellung von PtdIns(4,5)P₂ die PH- Domäne der PLC genutzt, wohingegen für PtdIns(3,4,5)P₃ oft die PH- Domänen der *Brutons's tyrosine* Kinase verwendet wird. In Zellkulturen konnte so gezeigt werden, dass PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor Plasmamembran- gebunden vorliegt (Abb. 13 A) und durch Stimulation der Hydrolyse in das Zytoplasma transloziert (Abb. 13 A').

Im Vergleich dazu detektiert der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor in Kontrollzellen PtdIns(3,4,5)P₃ im Zytoplasma (Abb. 13 B) und erst durch Stimulation durch Antagonisten, welche die Produktion des Lipids auslösen, kommt es zu einer Translokation an die Plasmamembran (Abb. 13 B'). Da die PtdInsPs einige grundlegende Bindesequenzen (z.B. PLC-PH, Tubby, GRP1-PH, ARNO-PH, BTK-PH, etc.) besitzen und relativ klein sind, kann es zu einer unspezifischen Akkumulation der PtdInsP-GFP- Sensoren im/am Nukleus kommen (Balla et al., 2000; Hammond und Burke, 2020; Várnai und Balla, 2008).

III.8 Immobilisierung

Um *in vivo* Prozesse, wie beispielsweise die Zell- und Gewebedynamik bei verschiedenen morphogenetischen Prozessen, hoch auflösend mikroskopieren zu können, ist eine Immobilisierung der lebenden Hydren unabdingbar. Die zur Immobilisierung verwendeten Relaxantien dürfen dabei die Morphologie und Physiologie der Tiere nicht beeinflussen. In der Vergangenheit wurden eine Vielzahl von immobilisierenden Stoffen, wie Magnesiumchlorid (MgCl₂), das Lokalanästhetikum Lidocain, das azyklische Monoterpen Linalool, oder das Lokalanästhetikum Benzocain, vor allem an Fischen und an Cephalopoden getestet (Collymore et al., 2016; Gomes et al., 2001; Heldwein et al., 2014; Medeiros Júnior et al., 2019; Messenger et al., 1985).

Magnesiumchlorid- Salze sind gut wasserlöslich und werden in der Medizin als Magnesium- Ionen Quelle genutzt, welche essentiell für eine Vielzahl von zellulären Prozessen sind (Dalooe und Behbahani, 2019). Seit Jahrzehnten ist es auch als narkotisierendes Molekül für marine Invertebraten bekannt und fand in der Vergangenheit vor allem als isotonische Lösung für die Immobilisierung von Cephalopoden Verwendung (Pantin, 1948). Es wird als günstiges, stabiles, nicht- toxisches und einfach nutzbares Relaxans mit wenigen Nebenwirkungen für Cephalopoden beschrieben (Messenger et al., 1985). Weiterhin wurde die relaxierende Wirkung von MgCl₂ auch bei Vertebraten, speziell anhand der glatten

bronchialen Muskulatur von Kaninchen bestätigt (Dalooe und Behbahani, 2019). Lidocain ($C_{14}H_{22}N_2O$) (Anhang 29) hingegen wird in der Medizin hauptsächlich als Lokalanästhetikum verwendet. Es ist ebenfalls gut wasserlöslich und wird bei zahlreichen Fischarten als Relaxans verwendet (Carrasco et al., 1984; Collymore et al., 2014; Collymore et al., 2016). Es induziert die Anästhesie in aquatischen Tieren schnell und die Tiere erholen sich relativ schnell (Ross und Ross, 2008). Allerdings konnte an Zebrafisch gezeigt werden, dass Lidocain eine sehr geringe Sicherheitsspanne aufweist, da 30 % der Versuchstiere bei 350 mg/L sofort starben (Collymore et al., 2014). Deswegen wird Lidocain auch als schnelles und effektives Mittel zur Euthanasie adulter Zebrafische verwendet (Collymore et al., 2016). Lidocain wirkt als Natrium-Kanal-Blocker in den Zellmembranen von Nervenzellen, wodurch die Reizweiterleitung der Nerven geblockt oder gehemmt wird (Sheets und Hanck, 2003). Benzocain ($C_9H_{11}NO_2$) (Anhang 28) ist ein Ethylester (Ethyl 4-Aminobenzoat (IUPAC)) und wird wie Lidocain als Lokalanästhetikum verwendet. Es findet meistens in der Zahnmedizin, aber auch in zahlreichen anderen medizinischen Bereichen, hauptsächlich als lokalanästhetisches Spray Verwendung (Khair-ul-Bariyah et al., 2019). Im medizinischen Kontext konnte gezeigt werden, dass es bei mäßig dosierter akuter Verwendung nicht toxisch ist, kann jedoch zu Nebenwirkungen wie Methämoglobinämie (Hegedus und Herb, 2005) oder Kontaktdermatitis (Sidhu et al., 1999) führen. Aufgrund seiner lokalanästhetischen und stark relaxierenden Wirkung, bei gleichzeitig geringen Kosten und einer einfachen Handhabung, wird Benzocain zur Schmerzlinderung in der Aquakultur von Fischen und bei Amphibien als Sedativ in der Forschung verwendet (Akbulut et al., 2012; Gomes et al., 2001; Romaneli et al., 2018; Skår et al., 2017; Smith et al., 2018). Das Relaxans blockiert reversibel die Natrium-Kanäle, welches zu einer Inhibition des Aufbaus und der Weiterleitung von Nervimpulsen führt (Neumcke et al., 1981; Suwalsky et al., 2004). Der azyklische Monoterpenalkohol Linalool ($C_{10}H_{18}O$) ist Bestandteil vieler pflanzlicher ätherischer Öle (Aprotosoie et al., 2014) und wird wegen seines zitrusartigen Duftes in vielen Kosmetikprodukten verwendet (Letizia et al., 2003). An vielen Vertebraten und Invertebraten konnte die anästhetische Wirkung von Linalool nachgewiesen und für Forschungszwecke genutzt werden (Boothe et al., 2017; Heldwein et al., 2014; Linck et al., 2009; Taheri Mirghaed et al., 2016). Der genaue Wirkungsmechanismus von Linalool ist bisher ungewiss, jedoch ist die anästhetische Wirkung vermutlich auf die Interaktion mit nikotinische Acetylcholinrezeptor- Ionenkanäle (Ghelardini et al., 1999; Re et al., 2000) und einen spasmolytischen Effekt auf die glatte Muskulatur (Lis-Balchin und Hart, 1999) zurückzuführen. Während viele andere Sedativa Nebenwirkungen aufweisen, wurde Linalool als vielversprechende und weitestgehend nebenwirkungslose Alternative für Forschungsprojekte an Fischen und auch für *Hydra* beschrieben (Bianchini et al., 2017; Goel et al., 2019).

IV. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

(a) Da Vorarbeiten gezeigt hatten, dass Rho und der Rho-ROCK-Myosin II- vermittelte Signalweg an dem morphogenetischen Prozess der Knospung in *Hydra* beteiligt ist, ist die detaillierte Untersuchung der Rho- GTPasen Hauptbestandteil meiner Arbeit. Zur Analyse der Beteiligung der Rho- GTPasen an morphogenetischen Prozessen in *Hydra* war es Ziel die vier Rho- GTPasen Hv_Rho1-4 zu charakterisieren. Dies beinhaltet die phylogenetische Untersuchung sowie die Analyse der Expressionsmuster der vier Rho- GTPasen Hv_Rho1-4 aus *Hydra*. Weiterhin war es Ziel eine mögliche regiospezifische Aktivität der Rho- GTPasen bei unterschiedlichen morphogenetischen Prozessen, wie der Knospung und der Regeneration in *Hydra* nachzuweisen. Dazu wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Grosse (Pharmakologisches Institut am Fachbereich Medizin; Philipps-Universität-Marburg) das Fusionsprotein RBD-GFP prokaryontisch exprimiert und aufgereinigt. Dieses bindet an aktives RhoA (Berger et al., 2009) und wurde zur immunhistochemischen Färbung an fixierten Hydren verwendet.

(b) Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass PI- Zyklus der Phospholipide direkt oder indirekt den Prozess der Knospung und der Musterbildung bei *Hydra* beeinflussen können (Hassel und Berking, 1990; Hassel und Bieller, 1996). Daher war die *in vivo* Analyse von Phosphatidylinositol-,4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) in *Hydra* ein weiterer Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Um die, durch PtdIns(4,5)P₂- und PtdIns(3,4,5)P₃- vermittelte Aktivität der PLC und der PI3- Kinase *in vivo* beobachten und untersuchen zu können war es Ziel PtdIns(4,5)P₂- GFP- Sensor und PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor transgene *Hydra*- Linien zu erzeugen, zu etablieren und zu charakterisieren. Um klären zu können, welche Funktionen die Phospholipide in *Hydra* erfüllen, ist die Untersuchung der (sub)zellulären Lokalisation notwendig. Daher wurden PtdInsP-GFP- Sensoren, die von Prof. Dr. Dominik Oliver (Abteilung der Neurophysiologie; Philipps-Universität-Marburg) zur Verfügung gestellt wurden, in einen *Hydra*- spezifischen Expressionsvektor umklontiert. Anschließend wurde in Kooperation mit der *Transgenic Hydra Facility* (Dr. Alexander Klimovich (AG Prof. Dr. Thomas Bosch, Zoologisches Institut der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel)) per Mikroinjektion transgene Hydren erzeugt.

(c) Um die PtdInsP-GFP- Sensoren und vor allem deren (sub)zelluläre Lokalisation zuverlässig nachweisen zu können, ist es essentiell den agilen Süßwasserpolyphen zu immobilisieren. Deshalb sollten Relaxantien mit unterschiedlichen biochemischen Angriffspunkten, wie MgCl₂, Lidocain, Benzocain und Linalool auf ihre relaxierende Wirkung sowie eine mögliche Interferenz mit dem Aktinzytoskelett von *Hydra* untersucht werden.

V. Ergebnisse

V.1 Analyse der Hv_Rho Proteine

Für die Analyse der Aminosäuresequenzen wurden, basierend auf den annotierten humanen Proteinsequenzen (wird als *Query* bezeichnet) der kleinen GTPasen RhoA, RhoB und RhoC, wurde zunächst nach homologen Sequenzen in *Hydra*, und folgend auch im gesamten Tierreich (Porifera, Cnidaria, Plathelminthes, Mollusca, Annelida, Arthropoda und Vertebrata mit den Chordata) mittels NCBI- Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gesucht. Für die Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes wurde basierend auf den humanen Sequenzen der Rho- GTPasen Cdc42, Rac und Rnd nach homologen Sequenzen in den genannten Tierstämmen gesucht (Anhang 1 und Anhang 2). Dabei wurden nur die Sequenzen zur Analyse berücksichtigt, die die höchste *Query-Coverage* (beschreibt die Ähnlichkeit der Länge der Aminosäuresequenzen zueinander) sowie die höchste prozentuale Identität (beschreibt die Identität der Aminosäuren der Sequenzen zueinander) zu der *Query*- Sequenz aufwiesen. Dabei konnten in *Hydra* vier vielversprechende Sequenzen identifiziert werden, die zur Sequenzanalyse sowie zur Analyse der Proteindomänen verwendet wurden. Bei Invertebraten werden Rho- Proteine numerisch benannt, weswegen die Sequenzen folglich als Hv_Rho1 (XP_002156827.1), Hv_Rho2 (XP_012555672.1), Hv_Rho3 (XP_012565650.1) und Hv_Rho4 (XP_002158739.1) bezeichnet wurden. Zunächst wurden die Proteindomänen der humanen RhoABC- GTPasen mit den entsprechenden Proteinen aus *Hydra* verglichen.

V.1.1 Hv_Rho1 und Hv_Rho2 besitzen alle charakteristischen Proteindomänen einer Rho- GTPase

Für die Publikation „Bud Detachment in *Hydra* Requires Activation of Fibroblast Growth Factor Receptor and a Rho–ROCK–Myosin II Signaling Pathway to Ensure Formation of a Basal Constriction“ (Holz, Apel et al., 2017) wurden RhoA- homologe Rho- GTPasen in *Hydra* und den genannten Tierstämmen identifiziert und *in-silico* untersucht. Darunter fiel der Vergleich der Proteinsequenzen (Alignment) (Abb. 18), die Analyse der Proteindomänen (Abb. 14 bis Abb. 17), sowie die Berechnung des phylogenetischen Stammbaumes der Rho- GTPasen (Abb. 19).

Basierend auf den existierenden und vorhergesagten Aminosäuresequenzen der humanen RhoABC- und der *Hydra* Hv-Rho1-4 Sequenzen wurden die Proteindomänen mittels NCBI- *Conserved Domain Search* bestimmt und mit SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) bestätigt. Für die Darstellung der spezifischen Proteindomänen mittels IBS: *Illustrator for Biological Sequences* (Abb. 14 bis Abb. 17) wurden die Daten der NCBI- Datenbank genutzt.

Das Kozak- Kriterium besagt, dass für eine effektive Einleitung der Translation an Position -3 vor dem Start-Codon ein Adenin (A) oder ein Guanin (G) positioniert sein muss. Dies ist bei den Sequenzen von Hs_RhoA, Hs_RhoC und Hv_Rho4 der Fall. Wenn jedoch kein A oder G an Position -3 vorliegt, ist ein G an Position +4 essentiell für eine Translation (Kozak, 1989), was bei den Sequenzen von Hs_RhoB, Hv_Rho1 und Hv_Rho2 erfüllt ist. Lediglich bei Hv_Rho3 ist das Kozak- Kriterium nicht erfüllt.

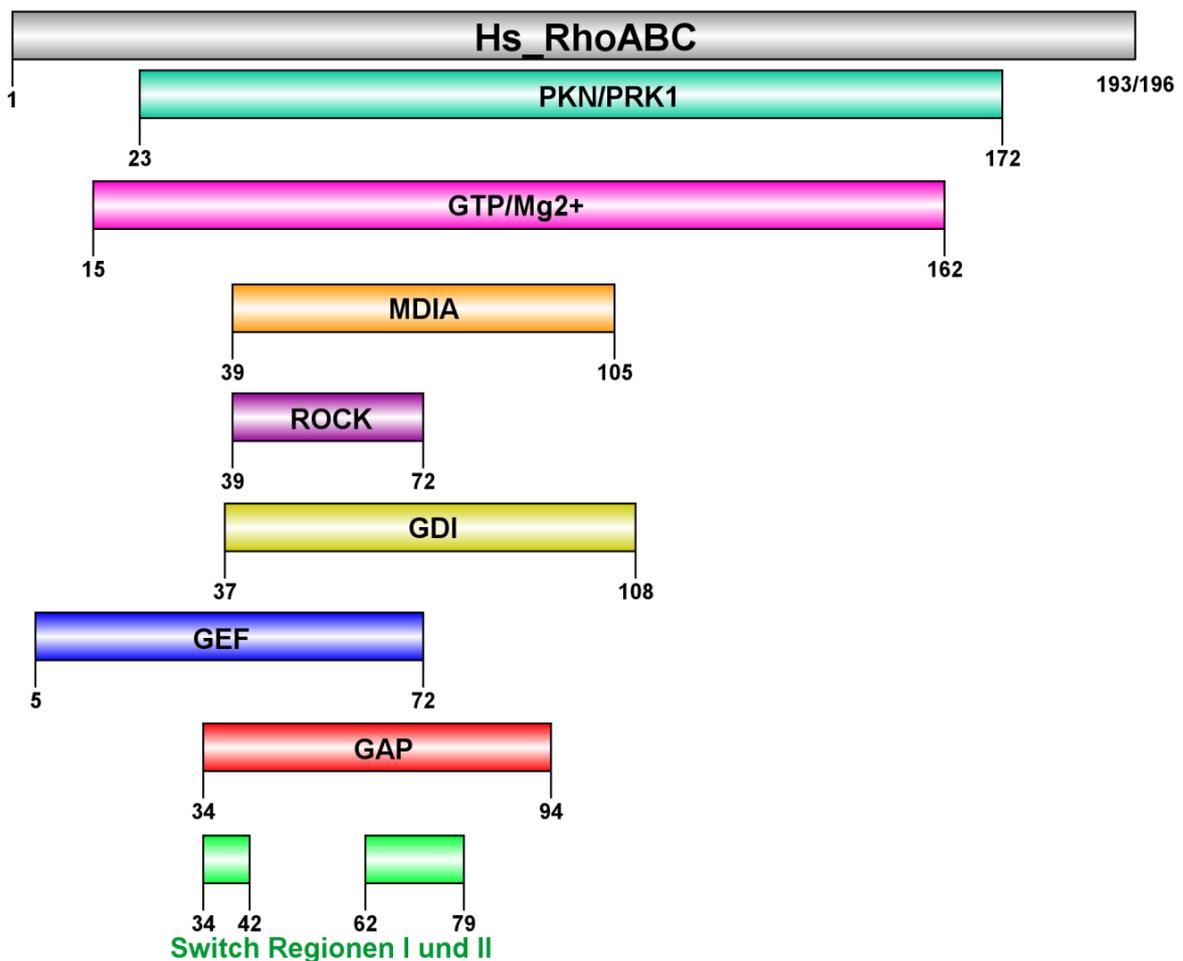


Abbildung 14: Darstellung der Proteindomänen der humanen Rho- GTPasen RhoA, RhoB und RhoC. Charakterisierende Proteindomänen der Rho- GTPasen: PKN/PRK1- Effektor-Interaktionsdomäne (dunkelgrün); GTP/Mg²⁺- Bindestelle (rosa); MDIA- Interaktionsstelle (orange); ROCK- Effektor- Interaktionsdomäne (violett); GDI- Interaktionsdomäne (gelb); GEF- Interaktionsdomäne (blau); GAP- Interaktionsdomäne (rot); *Switch*- Regionen I und II (hellgrün). Größe der humanen Rho- Proteine: RhoA (193 AA), RhoB (196 AA) und RhoC (193 AA).

Der Vergleich von dem humanen RhoA (AAM21117.1) mit dem humanen RhoB (CAA29968.1) und dem humanen RhoC (AAM21119.1) zeigte, dass jeweils die gleichen Proteindomänen an übereinstimmenden Positionen zu finden sind (Abb. 14). Dabei ist Hs_RhoB mit 196 Aminosäuren (*amino acids*: AA) etwas länger als Hs_RhoA und Hs_RhoC mit lediglich 193 AA (Tab. 1). Zur Darstellung wurden jeweils die erste und die letzte Interaktionsstelle der Proteindomänen angegeben (Abb. 14 bis Abb. 17). Alle für Rho-

GTPasen typischen Domänen finden sich in den drei menschlichen RhoABC- Proteinen: PKN/PRK1- Effektor- Interaktionsdomäne, GTP/Mg²⁺- Bindestellen, Mdia- Effektor- Interaktionsdomäne, ROCK- Effektor- Interaktionsdomäne, GDI- Interaktionsdomäne, GEF- Interaktionsdomäne, GAP- Interaktionsdomäne und die beiden *Switch*-Regionen I und II (Abb. 14).

Vergleichend dazu konnten auch bei Hv_Rho1 (XP_002156827.1) und bei Hv_Rho2 (XP_012555672.1), welche beide 192 AA lang sind, die gleichen Proteindomänen in identischer Konstellation identifiziert werden (Abb. 15).

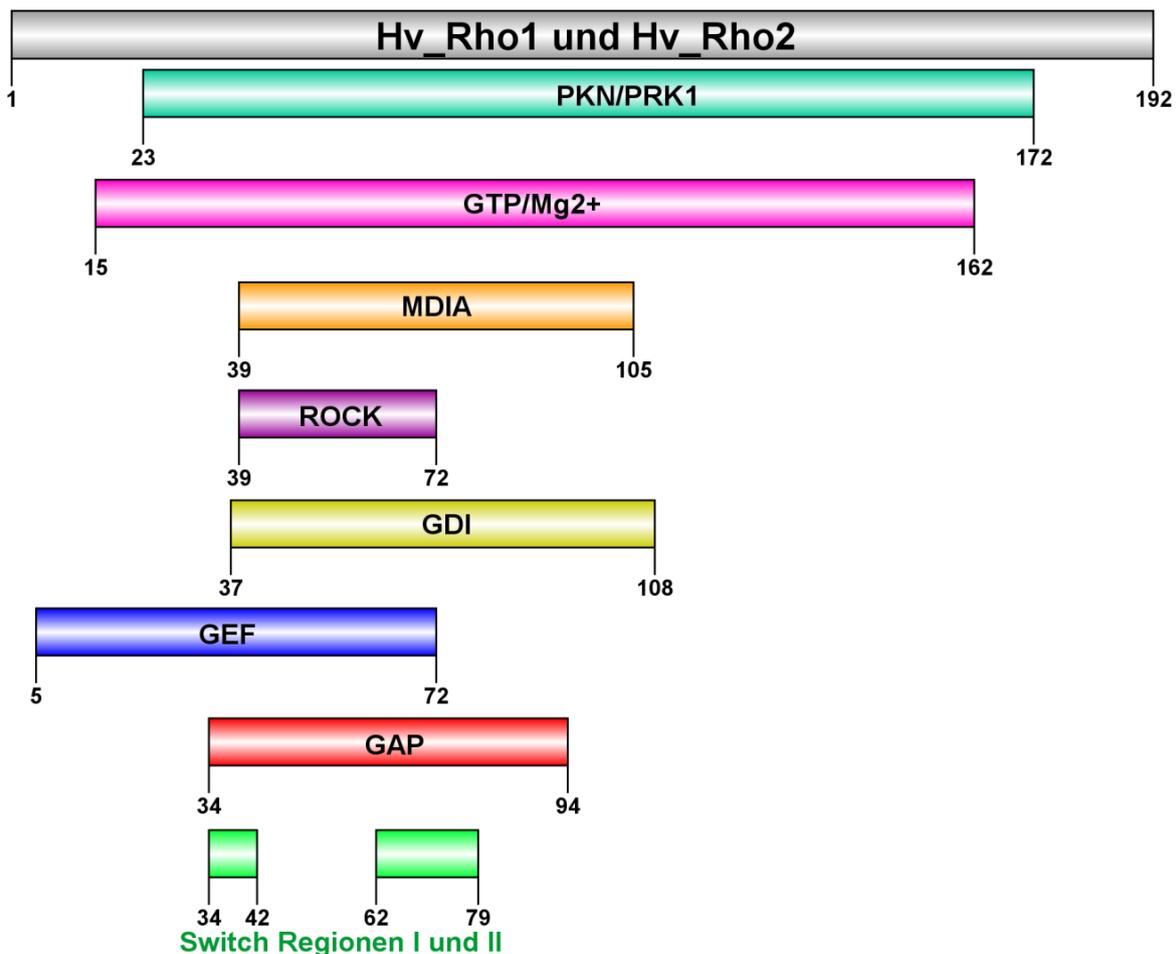


Abbildung 15: Darstellung der Proteindomänen der Rho- GTPasen Hv_Rho1 und Hv_Rho2 aus *Hydra*. Charakterisierende Proteindomänen der Rho- GTPasen: PKN/PRK1- Effektor- Interaktionsdomäne (dunkelgrün); GTP/Mg²⁺- Bindestelle (rosa); MDIA- Interaktionsstelle (orange); ROCK- Effektor- Interaktionsdomäne (violett); GDI- Interaktionsdomäne (gelb); GEF- Interaktionsdomäne (blau); GAP- Interaktionsdomäne (rot); *Switch*- Regionen I und II (hellgrün).

Im Gegensatz zu den humanen RhoABC- und den beiden *Hydra vulgaris* Rho1 und Rho2- Proteinen konnten bei Hv_Rho3 (XP_012565650.1), welches 211 AA lang ist, und bei Hv_Rho4 (XP_002158739.1), welches 206 AA lang ist, lediglich die beiden *Switch*-Regionen I und II identifiziert werden (Abb. 16 und Abb. 17).

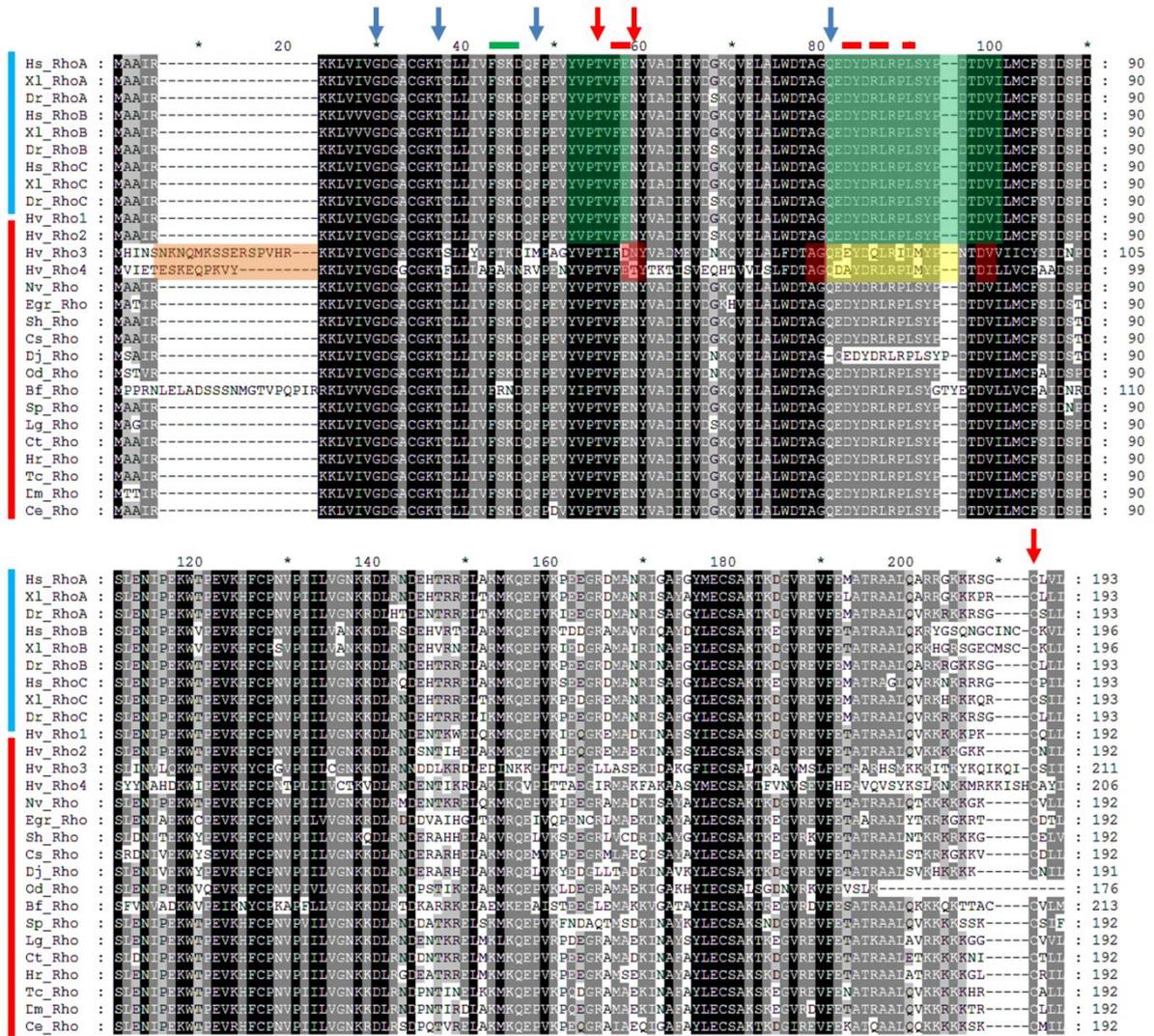


Abbildung 18: Darstellung des Alignments der untersuchten Rho- GTPasen aus Vertebraten- und Invertebraten Organismen. Durch das NCBI Proteindomänen- Tool identifizierte *Switch*-Regionen I und II von Hs_RhoABC und Hv_Rho1/2 (grün hinterlegt). Durch das NCBI Proteindomänen- Tool identifizierte *Switch*-Regionen I und II von Hv_Rho3/4 (rot hinterlegt). Unterschiede innerhalb der *Switch*-Regionen II bei Hv_Rho3/4 (gelb hinterlegt). Zusätzliche N-terminale Aminosäuren bei Hv_Rho3/4 (orange hinterlegt). Essentielle Bereiche der GTPase-Funktion (blaue Pfeile). Erkennungssequenzen für molekulare Inhibitoren (rote Pfeile). Bindestellen für Rho- Effektoren (grüner Balken). Zielsequenzen für molekulare Inhibitoren oder Toxine (rote Balken). Sequenzen der Vertebrata (blauer vertikaler Balken). Sequenzen der Invertebrata (roter vertikaler Balken).

Allgemein wird anhand des Alignments der Rho- GTPasen ersichtlich, dass die Vertebratensequenzen untereinander deutlich höher konserviert sind als zu den Sequenzen der Invertebraten (Abb. 18), obwohl alle Rho- GTPasen allgemein eine hohe Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Vor allem die N- terminale Hälfte, in der die charakteristischen Merkmale der Rho- GTPasen lokalisiert sind (Wheeler und Ridley, 2004) ist stark konserviert. In der C- terminalen Hälfte hingegen weisen die Sequenzen allgemein deutlich größere Divergenzen auf. Die für die GTPase Funktion des Proteins zuständigen Bereiche sind bei den untersuchten Proteinen praktisch identisch (Abb. 18; blaue Pfeile). Die humanen

RhoABC- Sequenzen sind untereinander hoch konserviert und Hv_Rho1/2 weisen kaum Unterschiede zu den humanen Sequenzen auf. Im Vergleich zu Hv_Rho1/2 sieht man, dass sich Hv_Rho3/4 auch in der konservierten N- terminalen Hälfte deutlich von den anderen Sequenzen abweichen. So unterscheiden sich Hv_Rho3 und Hv_Rho4 deutlich von den anderen Rho- Sequenzen in Bereichen, die als Erkennungssequenz für kleine molekulare Inhibitoren dienen, die für die Bindung von Rho- Effektoren verantwortlich sind und auch in dem Sequenzbereich, der die Bindestellen für ROCK darstellt. Die, durch das NCBI Proteindomänen- Tool identifizierte *Switch*-Regionen I von Hv_Rho3/4 ist deutlich kleiner und versetzt (Abb. 18; rot hinterlegt) zu den humanen Sequenzen und zu Hv_Rho1/2, obwohl das Alignment zeigt, dass die Proteinsequenz der *Switch*-Region I auch bei Hv_Rho3/4 konserviert ist. In dem konservierten Sequenzabschnitt der *Switch*-Region II unterscheiden sich Hv_Rho3/4 hingegen deutlich von Hs_RhoABC und Hv_Rho1/2 (Abb. 18; gelb hinterlegt). Im Vergleich dazu weisen die anderen Invertebraten Rhos und vor allem Hv_Rho1 und Hv_Rho2 in all diesen Regionen keine oder deutlich geringere Unterschiede zu den humanen Sequenzen auf. Die zusätzlichen N- terminalen Sequenzabschnitte von Hv_Rho3 und Hv_Rho4, bei denen es sich vermutlich um nicht erkannte Introns handelt, fehlen sowohl den humanen RhoABC, als auch den vorhergesagten Hv_Rho1 und Hv_Rho2 Proteinen (Abb. 18; orange hinterlegt).

Auffällig ist auch, dass neben Hv_Rho3/4 der Chordata *Branchiostoma floridae* als einziger Organismus im konservierten N- terminalen Abschnitt zusätzliche Aminosäuren aufweist. Des Weiteren ist zu erkennen, dass Hv_Rho3/4 sowie von *Branchiostoma floridae* und der Plattwurm *Dugesia japonica* in der N- terminalen Hälfte der Sequenzen, vor allem im Bereich der *Switch*-Region II deutliche Unterschiede zu den restlichen Sequenzen aufweisen und damit vermutlich nicht eng verwandt sind.

Egal welches humane RhoABC- Proteine als *Query* für den Protein- BLAST genutzt wurde, konnten jeweils die vier untersuchten Rho- Proteine aus *Hydra* als entsprechende homologe Sequenzen ermittelt werden. Daher wurden die Sequenzen jeweils mittels MEGA-X miteinander verglichen, um herauszufinden zu welcher humanen Sequenz die ermittelten *Hydra*- Sequenzen am ähnlichsten sind. Diese Daten, die Indizien über den Verwandtschaftsgrad der Proteine liefern, wurden tabellarisch dargestellt (Tab. 1). Dabei wurden die identischen Aminosäuren von den Aminosäuren, die ähnliche Eigenschaften (Struktur, Polarität etc.) aufweisen unterschieden (Tab. 1; Wert in Klammern). Zusammengefasst kann man sagen, dass Hv_Rho1 und Hv_Rho2 jeweils circa zu 80 % identisch und zu circa 90 % ähnlich zu den humanen RhoABC- Sequenzen sind. Im Gegensatz dazu sind Hv_Rho3 und Hv_Rho4 jeweils immer zu circa 50 % identisch und zu 70 % ähnlich. Anhand des direkten Vergleiches der Aminosäuresequenzen aus *Hydra* kann

man auch erkennen, dass Hv_Rho1 und Hv_Rho2 mit 93 % Identität und 95 % Ähnlichkeit sehr nah verwandt sind.

Tabelle 1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen RhoABC und der Rho- GTPasen Hv_Rho1-4 aus *Hydra*. Aufgetragen ist die Länge der Aminosäuresequenzen (AA: *Amino acids*) sowie ihre prozentuale Identität und Ähnlichkeit zueinander.

	Hs_RhoA	Hs_RhoB	Hs_RhoC	Hv_Rho1	Hv_Rho2	Hv_Rho3	Hv_Rho4
Hs_RhoA	193 AA	82 (88) %	91 (95) %	87 (93) %	86 (91) %	53 (69) %	51 (64) %
Hs_RhoB	161 (173) AA	196 AA	82 (87) %	79 (87) %	79 (86) %	49 (69) %	48 (62) %
Hs_RhoC	177 (185) AA	161 (171) AA	193 AA	84 (93) %	84 (91) %	52 (69) %	51 (63) %
Hv_Rho1	168 (180) AA	155 (172) AA	163 (180) AA	192 AA	93 (95) %	53 (72) %	50 (64) %
Hv_Rho2	167 (177) AA	156 (169) AA	164 (177) AA	180 (184) AA	192 AA	53 (71) %	51 (64) %
Hv_Rho3	113 (147) AA	105 (146) AA	111 (146) AA	113 (152) AA	113 (150) AA	211 AA	41 (57) %
Hv_Rho4	106 (132) AA	99 (128) AA	106 (131) AA	105 (132) AA	106 (132) AA	87 (122) AA	206 AA

V.1.3 Hv_Rho1 und Hv_Rho2 gruppieren sich innerhalb der RhoABC-Gruppe (Holz, Apel et al., 2017)

Anhand des Alignments der Rho- GTPasen RhoABC, Cdc42, Rac und Rnd wurde ein phylogenetischer Stammbaum berechnet (Abb. 19). Zusätzlich wurden Sequenzen der Vertebraten Rho- Untergruppen (RhoD, RhoF, RhoG, RhoH, RhoJ, RhoQ und RhoU) und Sequenzen der Rho- GTPasen Untergruppe RhoBTB hinzugefügt, welche als phylogenetische *Outgroup* des Stammbaums diente. RhoBTB ist ein atypisches Protein der Rho- GTPasen, welches vermutlich als Tumorsuppressor dient (Ji und Rivero, 2016) und mit knapp 700 AA (Hs_RhoBTB; NP_055651.1) deutlich länger ist als die Sequenzen der andern Rho- GTPasen. Da sich die RhoBTBs stark von den restlichen Rho- GTPasen unterscheiden, können sie als sichere Außengruppe (*Outgroup*) angesehen werden, woran sich der berechnete Stammbaum aufbauen kann. Der Stammbaum zeigt, dass sich die unterschiedlichen Rho- GTPasen getrennt gruppieren, also in einzelne verzweigte Äste des Stammbaumes auftrennen. Als basalste Gruppe wurde die Rho- Untergruppe RhoH erkannt, die direkt an der Basis einen isolierten Ast darstellt. Davon abgehend kann man die weiteren Äste als Primäräste, Sekundäräste und Tertiäräste unterscheiden, welche die evolutionären Aufspaltungen darstellen. Beispielsweise kann man RhoABC, Rnd und RhoD/F auf einem Primärast zusammenfassen, während sich Rac, Cdc42, RhoG und RhoJ/U/Q auf dem

zweiten großen Primärast zusammen gruppieren. Folgend sieht man, dass alle RhoABC-Sequenzen auf einem Sekundärast gruppiert sind, wobei dort Hv_Rho4 einen einzelnen isolierten Tertiärast bildet. Weiterhin spalten sich von diesem Primärast Rnd und RhoD/F ab, welche sich auf Tertiärästen einzeln gruppieren.

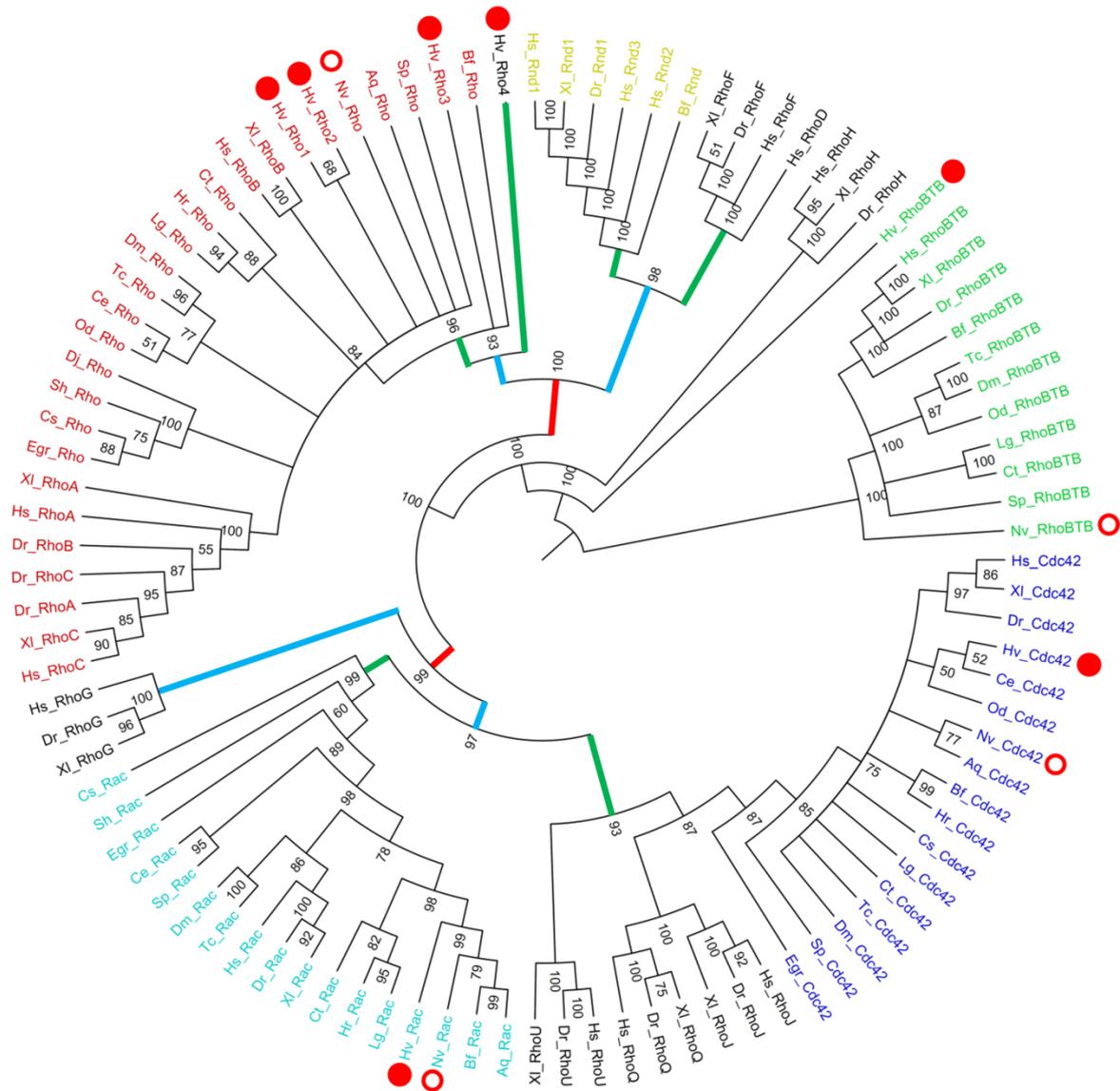


Abbildung 19: Phylogenetischer Stammbaum (MrBayes, MCMC) der Rho- GTPase Proteinfamilien Rho, Rac, Cdc42 und RhoBTB. Die Unterfamilien RhoABC (rot), Rac (türkis), Rnd (gelb), Cdc42 (blau), und RhoBTB (grün) wurden phylogenetisch aufgetrennt. Die Äste des Stammbaumes lassen sich in Primäräste (rote Linie), Sekundäräste (blaue Linie) und Tertiäräste (grüne Linie) einteilen. Aq, *Amphimedon queenslandica*; Bf, *Branchiostoma floridae*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Cs, *Clonorchis sinensis*; Ct, *Capitella teleta*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dj, *Dugesia japonica*; Dr, *Danio rerio*; Egr, *Echinococcus granulosus*; Hr, *Helobdella robusta*; Hs, *Homo sapiens*; Hv, *Hydra vulgaris* (red dots); Lg, *Lottia gigantea*; Nv, *Nematostella vectensis* (red circles); Od, *Oikopleura dioica*; Sh, *Schistosoma haematobium*; Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*; Tc, *Tribolium castaneum*; XI, *Xenopus laevis*. Sequenzen der Cnidaria *Hydra* (gefüllter roter Kreis) und *Nematostella* (roter Kreis) sind hervorgehoben. Accession-Nummern im Anhang 1 und Anhang 2.

Auf dem zweiten Primärast kann man erkennen, dass sich RhoG in einem eigenständigen Sekundärast von den restlichen Sequenzen abspaltet. Die anderen Sequenzen Rac, Cdc42 und RhoJ/U/Q bilden einen separaten Sekundärast, der sich tertiär und folgend weiter in die einzelnen Gruppen aufspaltet.

Allgemein lässt sich festhalten, dass sich alle untersuchten Sequenzen von RhoABC, Cdc42, Rac, Rnd und RhoBTB (als *Outgroup*) auf separaten Ästen über mehrere evolutionäre Aufspaltungsereignissen gruppieren. So kann man deutlich erkennen, dass sich vor allem Hv_Rho1 und Hv_Rho2 als Orthologe innerhalb der RhoABC- Familie gruppieren. Im Gegensatz dazu gruppieren sich Hv_Rho3 und die Rho- Sequenz von *Branchiostoma floridae* (Bf_Rho), zwar basal, aber noch innerhalb des RhoABC- Astes. Im Vergleich dazu gruppiert sich Hv_Rho4, basal auf einem isolierten Ast außerhalb der RhoABC- Familie.

V.1.3 Die pharmakologische Inhibition von Rho, ROCK und Myosin II verhindert die Konstriktion der Knospenbasis und die Knospenablösung bei *Hydra* (Holz, Apel et al., 2017)

Um einen möglichen Einfluss des Rho-ROCK-Myosin II Signalweges auf den Prozess der Knospung in *Hydra* zu untersuchen wurden im Rahmen meiner Masterarbeit pharmakologische Inhibitionen durchgeführt. Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden, basierend auf diesen Daten die Statistik zur Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II-Signalweges an Knospen- tragenden Hydren für die Publikation Holz et al., 2017 überarbeitet (Holz et al., 2017; Fig. 7 B, C). Weiterhin wurden an RhoA- (mittels Rhosin), an ROCK- (mittels Rockout) und an Myosin II- (mittels Blebbistatin) inhibierten Hydren, die jungen Knospen trugen (Knospenstadium 3-5), eine Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin-TRITC durchgeführt (Holz et al., 2017; Fig. 8). Die Inhibitionen mit Rhosin, Rockout und Blebbistatin (Informationen zu den Inhibitoren im Anhang 24) erzeugten alle den gleichen Phänotyp, indem sie die Ablösung bei *Hydra* je nach Knospenstadium verhinderten oder verzögerten. Dabei verhinderte eine 48-stündige Inhibition von jungen Knospen (Knospenstadium 3-5) die Konstriktion der Knospenbasis und die Knospe etablierte sich als sekundäre Achse am Elterntier. Die typische Akkumulation der Aktinfasern konnte an der Knospenbasis aufgrund der fehlenden Konstriktion nicht beobachtet werden. Stattdessen bildete sich eine breite Gewebebrücke zwischen den beiden Achsen aus, in welche die longitudinal orientierten Aktinfasern gleichermaßen verliefen (Holz et al., 2017; Fig. 8 A-C).

Im Vergleich dazu führte eine 48-stündige Inhibition von Hydren mit späten Knospen (Knospenstadium 5–7) dazu, dass eine Konstriktion des Gewebes an der Knospenbasis einsetzte, sich die Knospen jedoch meist nicht final vom Elterntier ablösen konnten. Stattdessen verschob sich die Knospe passiv mit dem normalen Gewebedrift ungewöhnlich

weit zur Fußscheibe des Muttertiers, wo sie über eine dünne Gewebebrücke verbunden blieben und sich nicht oder nur deutlich verzögert ablösen konnten. Eine diffuse und chaotische Akkumulation des F-Aktins in der dünnen, aus wenigen Zellen bestehende, Gewebebrücke war nachzuweisen (Holz et al., 2017; Fig. 8 D-F).

V.2 *hv_rho* ist in morphogenetisch aktivem Gewebe exprimiert

Mittels *in-situ*-Hybridisierung wurde das Expressionsmuster der vier Rho- GTPasen in *Hydra* untersucht. Dazu wurden für die *in-situ*-Hybridisierung sowohl knospenlose Hydren, als auch Hydren mit Knospen in unterschiedlichen Stadien verwendet. Die Beschreibung der Expressionsmuster von *hv_rho1-4* an morphogenetisch aktiven Geweben erfolgte zum Teil im Rahmen der Betreuung der Masterstudentin Lea Hüttinger (Abb. 21 und Abb. 23).

V.2.1 *hv_rho1* Expression an der Tentakelbasis und in der Knospungsregion

Für *hv_rho1-3* wurde das Expressionsmuster in späten Knospenstadien bereits beschrieben (Holz, Apel et al., 2017). Der bekannte Einfluss von Rho auf die Organisation des Aktinzytoskeletts lässt vermuten, dass Rho bei *Hydra* an der Regulation der Konstriktion an der Knospenbasis beteiligt ist. Hier sollte daher die Fragestellung untersucht werden, ob die vier *Rhos* in *Hydra* in jedem morphogenetisch aktivem Gewebe zugleich, oder ob sie jeweils spezifisch exprimiert werden. Neben der Knospenbasis sind morphogenetisch aktive Regionen, wie die Tentakelbasis, die evaginierenden Tentakel die Testes besonders geeignet für solche Untersuchungen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *hv_rho1* eine schwache ubiquitäre Expression in endodermalen Zellen der gesamten Körpersäule aufweist. Eine differentielle Hochregulation der Transkripte findet in ektodermalen Zellen der Knospe und des Muttertieres an der Knospenbasis ab dem Knospenstadium 8 statt (Holz et al., 2017).

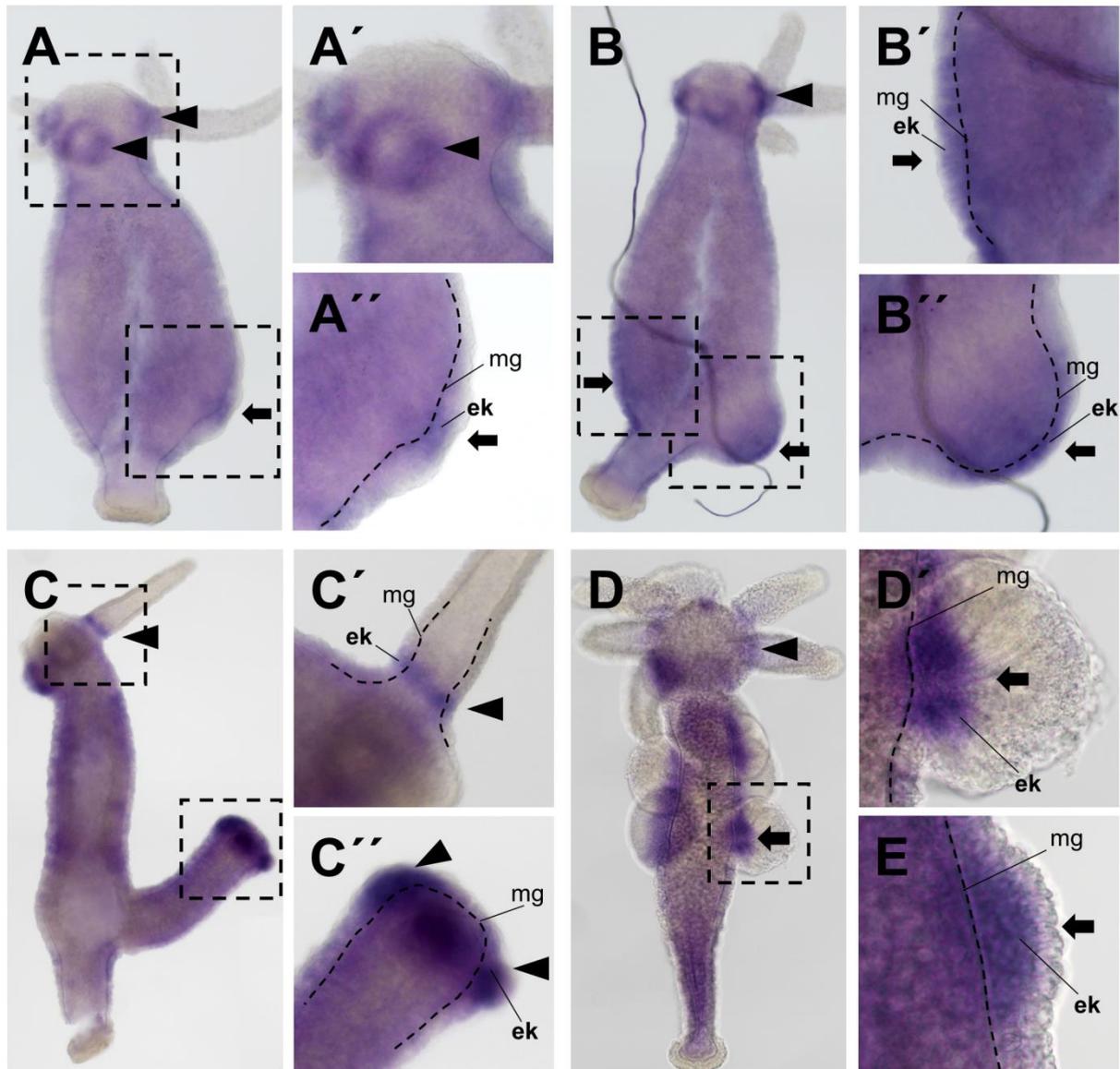


Abbildung 20: Genexpressionsmuster von *hv_rho1*. (A-D) Ektodermale Expression an der Tentakelbasis, beziehungsweise an der auswachsenden Tentakelknospe (schwarzer Pfeilkopf). Ektodermale Expression an der Spitze der auswachsenden Knospe (schwarze Pfeile). (D, D', E) Ektodermale Expression in den Testes (schwarze Pfeile). Mesogloea (mg), Ektoderm (ek).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lediglich in der Fußscheibe des Polypen keine *hv_rho1* Expression nachzuweisen ist. Die beschriebene Expression an der Tentakelbasis konnte als ringförmige Expressionsdomäne, welche die Tentakelbasis umschließt, definiert werden (Abb. 20 A, A', B, C, C'). Neben dem bereits beschriebenen Expressionsmuster konnte eine Expression von *hv_rho1* in ektodermalen Zellen an der Spitze von auswachsenden Knospen detektiert werden (Abb. 20 A, A'). Im Knospenstadium 3-5 ist die Hochregulation der mRNA zum einen wiederum in ektodermalen Zellen der auswachsenden Knospenspitze und zum anderen auf der Knospe-entgegen-gesetzten Seite im Ektoderm der Körpersäule des Muttertieres nachweisbar (Abb. 20 B, B'). Neben einer Expression an der Tentakelbasis ist auch eine starke Hochregulation in ektodermalen Zellen

auswachsenden Tentakelknospen erkennbar (Abb. 20 A, A', B, C, C', E). Die adulten Tentakel sind hingegen frei von *hv_rho1* Genexpression (Abb. 20 A, B, C, C'). Zusätzlich konnte in männlichen Hydren (Abb. 20 D) *hv_rho1* in jungen (Abb. 20 E) und adulten Testes (Abb. 20 D, D') an der Basis der fächerartig angeordneten ektodermalen Zellen nachgewiesen werden. Die terminal differenzierte Fußscheibe des adulten Tieres weist, wie die terminal differenzierten Tentakel, keine *Hv_Rho1* Transkripte auf (Abb. 20 A, B, C, D).

V.2.2 *hv_rho2* ist an der Tentakelbasis und an evaginierenden Tentakelknospen hochreguliert

Wie für *Hv_Rho1* wurde auch das Expressionsmuster von *hv_rho2* bei Hydren mit späten Knospen bereits beschrieben (Holz et al., 2017). Für *hv_rho2* konnte dabei eine hauptsächlich ektodermale Expression in der gesamten Körpersäule zwischen der Knospungs- und der Tentakelzone nachgewiesen werden. Weiterhin ist eine verstärkte Expression auf der Knospe-entgegen-gesetzten Seite in ektodermalen Zellen der Körpersäule des Muttertieres erkennbar. Eine Hochregulation der Transkripte an der Knospenbasis ist bei späten Knospen, im Vergleich zu *hv_rho1*, nicht zu detektieren gewesen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob *hv_rho2* neben der ubiquitären ektodermalen Expression und der Hochregulation auf der Knospe-entgegen-gesetzten Seite auch in morphogenetisch aktiven Regionen spezifisch reguliert wird. Dabei zeigte sich, dass vergleichbar zu *hv_rho1* auch *hv_rho2* stark an der Basis der Tentakel exprimiert wird, in den terminal differenzierten Tentakel jedoch ebenfalls keine Expression nachzuweisen ist. Dabei scheint die Expression die Tentakelbasis, ähnlich wie bei *hv_rho1*, ringförmig zu umschließen (Abb. 21 A, B).

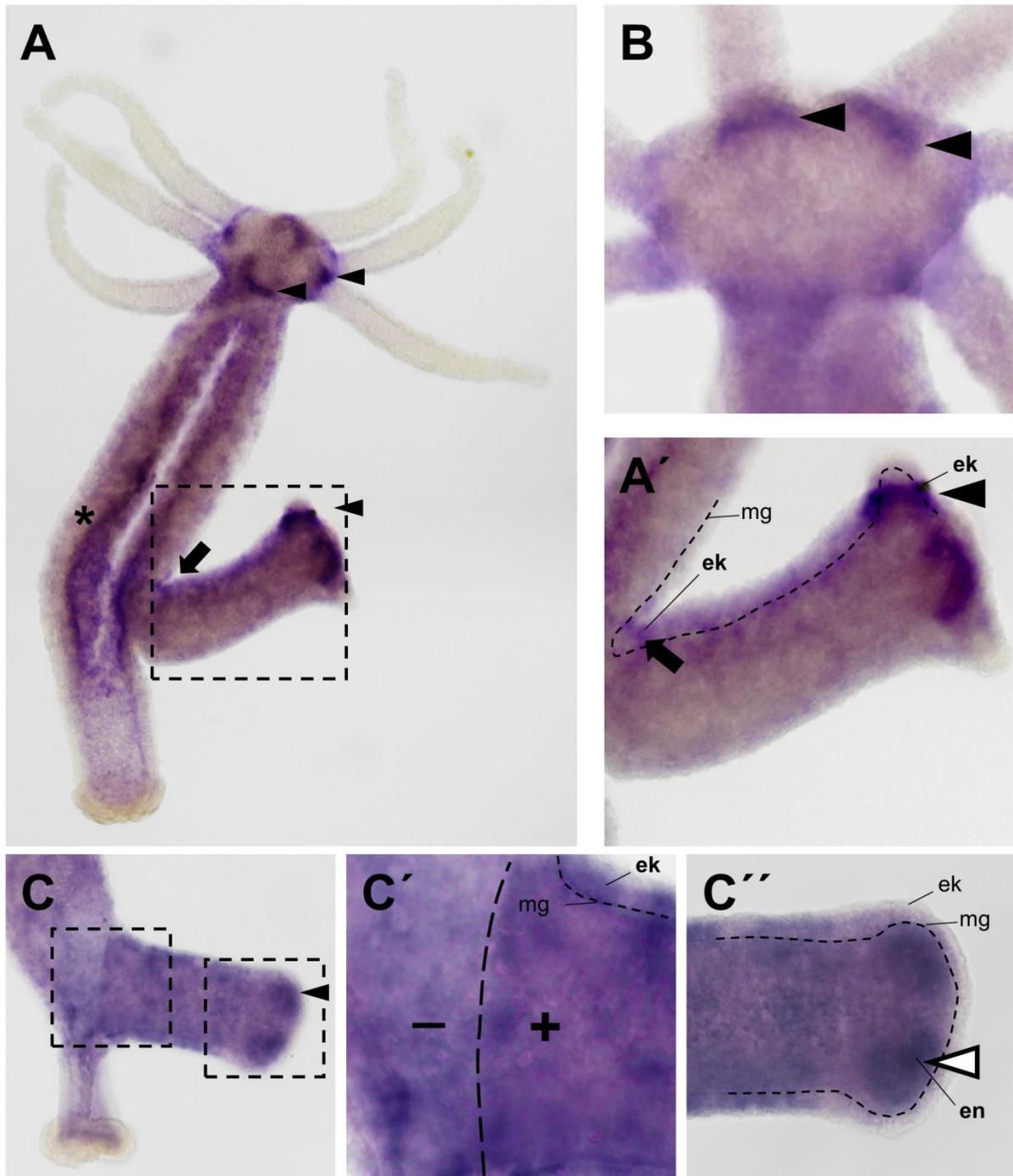


Abbildung 21: Genexpressionsmuster von *hv_rho2*. (A, B) Ektodermale Expression an der Tentakelbasis (schwarzer Pfeilkopf). (A) Ektodermale Expression an der Knospenbasis (schwarzer Pfeil). Einriss des Gewebes (Stern). (C, C') Schwache Expression in der Körpersäule des Muttertieres (-). Starke Expression in der Körpersäule der auswachsenden Knospe (+). (C') Endodermale Expression der auswachsenden Tentakel (weißer Pfeilkopf). Mesogloea (mg), Ektoderm (ek), Endoderm (en). (Auswertung der Daten von Lea Hüttinger; von mir betreute MSc Studentin).

In endodermalen Zellen ist eine Hochregulation der mRNA in evaginierenden Tentakelknospen (Knospenstadium 6) zu erkennen (Abb. 21 C, C''). Diese beschränkt sich im Laufe des Knospungsprozesses bei späteren Knospen auf ektodermale Zellen der Tentakelbasis (Abb. 21 A, B). Während der Elongationsphase der Knospung ist bezüglich

des Expressionsniveaus eine Grenze zwischen dem Gewebe der Mutter und der verhältnismäßig starken Expression im Gewebe der auswachsenden Knospe zu erkennen (Abb. 21 C, C'). Die Fußscheibe zeigt wie schon für *hv_rho1* auch bei *hv_rho2* keine Expression (Abb. 21 A, C). Einrisse des Gewebes während der *in-situ*-Hybridisierung können zu unspezifischer Färbung des Gewebes führen (Abb. 21 A).

V.2.3 *hv_rho3* ist exklusiv in Zellen der Mundöffnung exprimiert

Die Expression von *hv_rho3* konnte in wenigen endodermalen Zellen der Mundöffnung am Hypostom von *Hydra* bereits nachgewiesen werden (Holz et al., 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass außer den Zellen des Hypostoms kein Gewebe in *Hydra* eine spezifische Expression von *hv_rho3* aufweist.

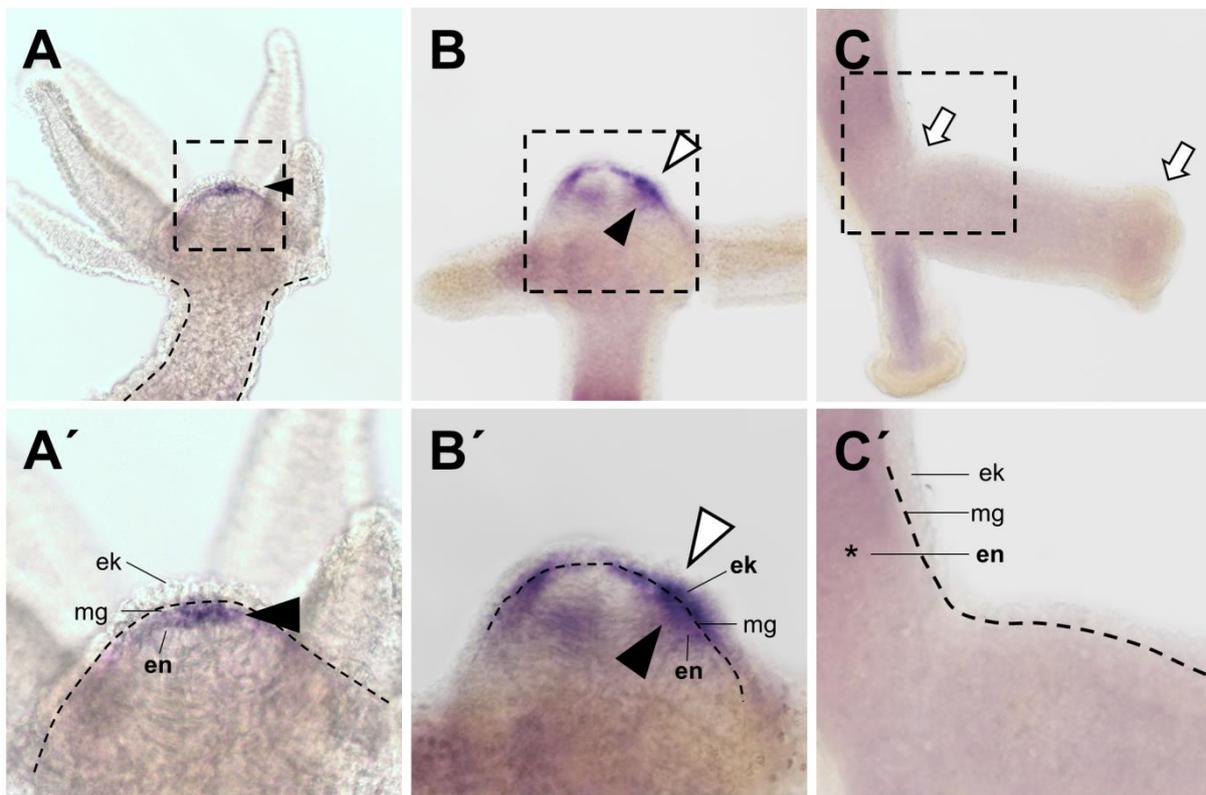


Abbildung 22: Genexpressionsmuster von *hv_rho3*. (A-B') Endodermale Expression in Zellen an der Mundöffnung (schwarze Pfeilköpfe). (B, B') Ektodermale Expression in Zellen an der Mundöffnung (weiße Pfeilköpfe). (C, C') Keine Expression an der Knospenbasis und der Tentakelbasis, beziehungsweise der auswachsenden Tentakel, im Vergleich zu der Expression von *hv_rho1* und *hv_rho2* (weiße Pfeile). Leichte unspezifische Hintergrundfärbung des Endoderms (Stern). Mesogloea (mg), Ektoderm (ek), Endoderm (en).

Neben der endodermalen Expression in Zellen der Mundöffnung (Abb. 22 A, A') konnte erstmals eine zusätzliche ektodermale Expression in Zellen der Mundöffnung und des Hypostoms detektiert werden (Abb. 22 B, B'). Weder an der Knospenbasis, noch an der Tentakelbasis konnte eine Expression von *hv_rho3* nachgewiesen werden (Abb. 22 C). In

der Körpersäule war lediglich eine leichte endodermale ubiquitäre Expression zu erkennen (Abb. 22 C').

V.2.4 *hv_rho4* zeigt Expressionsmuster um die Mundöffnung herum und in evaginierenden Knospen

Im Rahmen der Betreuung der Masterstudentin Lea Hüttinger wurde erstmals das Expressionsmuster von *hv_rho4* beschrieben.

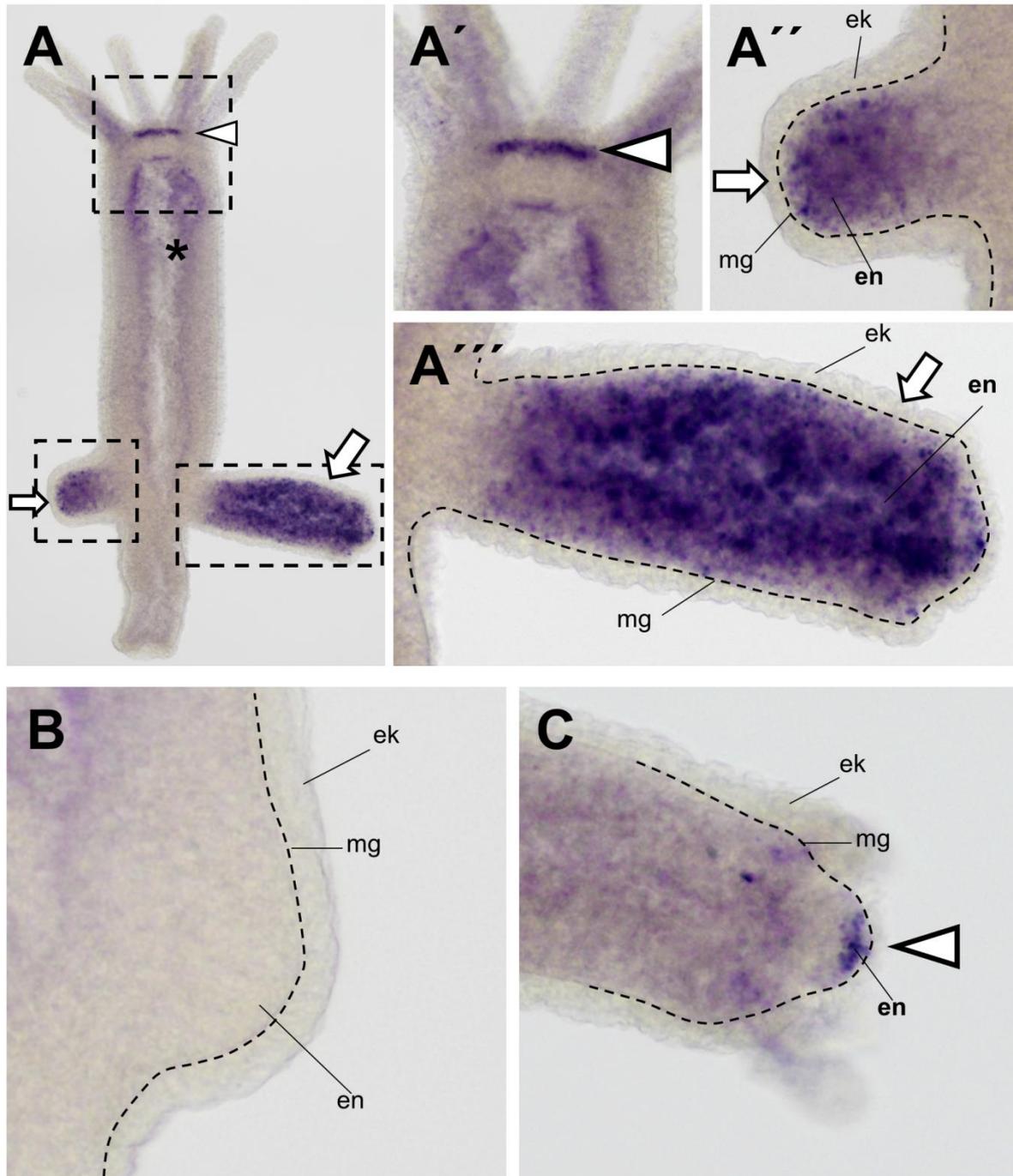


Abbildung 23: Genexpressionsmuster von *hv_rho4*. (A-C) Endodermale Expression in Zellen an der Mundöffnung (weiße Pfeilköpfe). Endodermale Expression des Gewebes der auswachsenden Knospen (weiße Pfeile). Mesogloea (mg), Ektoderm (ek), Endoderm (en). (Auswertung der Daten von Lea Hüttinger; von mir betreute MSc Studentin).

Dabei wurde untersucht, ob *hv_rho4*, wie *hv_rho1-3*, an morphogenetisch aktiven Geweben, wie der Knospenbasis oder der Tentakelbasis exprimiert wird.

Eine spezifische Hochregulation von *hv_rho4* ist in Zellen der Mundöffnung (Abb. 23 A, A'), vergleichbar mit dem Expressionsmuster von *hv_rho3* (Abb. 22), nachzuweisen. In der Initiationsphase konnte keine *hv_rho4* Expression im Gewebe der auswachsenden Knospe detektiert werden (Abb. 23 B). Im Vergleich dazu konnte ein starkes griesiges Expressionsmuster der mRNA in endodermalen Zellen der Knospe in der Elongationsphase nachgewiesen werden (Abb. 23 A, A'', A'''). Bei Knospen, die sich in der Phase der Ablösung befinden, ist lediglich eine schwache Expression im endodermalen Gewebe der Knospe nachzuweisen (Abb. 23 C). In diesem Knospenstadium ist wie beim adulten Tier eine endodermale Expression in Zellen der Mundöffnung erkennbar (Abb. 23 C). Eine Hochregulation der Expression an der Basis von Tentakel, sowie in evaginierenden Knospen, wie bei *hv_rho1* und *hv_rho2*, ist nicht nachzuweisen gewesen. Einrisse des Gewebes während der *in-situ*-Hybridisierung können zu unspezifischer Färbung des Gewebes führen (Abb. 23 A).

V.3 Detektion von Rho- GTPasen

Die fehlenden Proteindomänen von Hv_Rho3 und Hv_Rho4 sowie die weitestgehend fehlende Expression an morphogenetisch aktiven Regionen, lassen darauf schließen, dass es sich bei Hv_Rho3/4 vermutlich um Sonderformen in *Hydra* handelt, die keine typische Rho- GTPase- Funktion erfüllen. Aufgrund der spannenden Expressionsmuster von *hv_rho1/2* sowie basierend auf Inhibitorbehandlungen, die die Beteiligung des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges an den Knospungsprozess bei *Hydra* zeigten (Holz et al., 2017), sollte eine Methode zur Detektion von aktivem Rho im Gewebe des Süßwasserpolyphen etabliert werden.

Neben immunhistochemischen Antikörperfärbungen der aktiven und inaktiven Rho- GTPasen konnte bereits gezeigt werden, dass mittels des Fusionsproteins RBD-GFP die Detektion von aktivem RhoA in fixiertem *Xenopus* Gewebe möglich ist (Berger et al., 2009). An die Rho-Binde-Domäne (RBD) des Scaffold-Proteins Rhotekin, welches ausschließlich an aktives RhoA bindet, ist ein grün-fluoreszierendes-Protein (GFP) fusioniert. Um die RhoA Orthologe in *Hydra* (Hv_Rho1-4) nachzuweisen wurde das aufgereinigte Fusionsprotein RBD-GFP zur Färbung der aktiven Rho- GTPase/n an fixierten Hydren genutzt und mit immunhistochemischen anti-RhoA- Antikörperfärbungen verglichen.

V.3.1 Detektion der RhoA- GTPase mittels Antikörperfärbung

Mittels Antikörperfärbung können aktive und inaktive Proteine detektiert werden. Gegen Rho-GTPasen sind zahlreiche Antikörper käuflich erwerbbar, die häufig gegen den variablen C-Terminus der Rho- GTPasen gerichtet sind. Der verwendete RhoA- Antikörper von Cytoskeleton (siehe Material und Methoden VIII.3) ist gegen das aktive und das inaktive humane RhoA- Protein gerichtet und weist in dem Bindeepitop zu allen Hv_Rho- GTPasen Unterschiede auf (Abb. 24). Das Epitop weist die höchste Ähnlichkeit zu den Hv_Rho1- und Hv_Rho2-, und die geringste Ähnlichkeit zu den Hv_Rho3- und Hv_Rho4 Sequenzen auf (Abb. 24). Im Proteinblast des Epitops wurden Hv_Rho2 und Hv_Rho1 als am besten übereinstimmende Sequenzen identifiziert mit einem *maximal Score* von 47,7 (Hv_Rho2) und 47,3 (Hv_Rho1). Hv_Rho3 und Hv_Rho4 weisen einen deutlichen schlechteren *maximal Score* zu dem Epitop des Antikörpers auf.



Abbildung 24: Alignment der humanen RhoA- GTPase und der Rho- Proteine aus Hydra, zum Vergleich des Epitops des getesteten anti-RhoA- Antikörpers. Das Epitop des anti-RhoA- Antikörpers (Cytoskeleton) ist grün hervorgehoben.

Der Antikörper ist gegen die C- terminal gelegene α -Helices des Proteins gerichtet (Abb. 25). In der Region dieser Helices unterscheiden sich die Proteinsequenzen von Mensch und Hydra deutlich (Abb. 24), wodurch jedoch die Faltung der Proteine weitestgehend unbeeinflusst bleibt (Abb. 25).

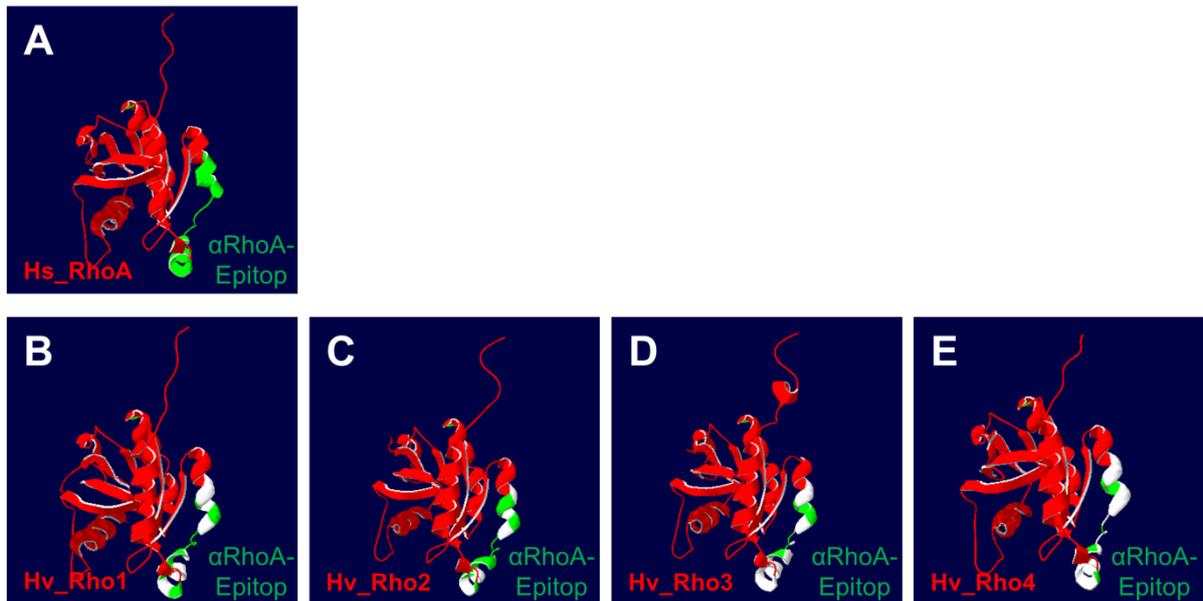


Abbildung 25: Darstellung des anti-RhoA- Antikörperepitops anhand der Proteinstruktur von Hs_RhoA und den vier Rho- GTPasen aus *Hydra*. (A-E) Die Rho- GTPasen sind jeweils rot dargestellt und die Binderegionen des Antikörperepitops sind grün markiert. Lücken und Unterschiede in der Sequenz sind weiß dargestellt.

Obwohl der anti-RhoA- Antikörper im Western Blot keine Detektion von RhoA- Orthologen in *Hydra* zeigte (nicht gezeigte Daten; Daten von der von mir betreute MSc Studentin Lea Hüttinger), wurde der Antikörper aufgrund der sehr ähnlichen Proteinfaltung der Rho-Proteine in der Region des komplexen Antikörperepitops, an unterschiedlichen Knospenstadien in *Hydra* getestet (Abb. 26). Dabei zeigte sich, dass der Antikörper eine ubiquitäre Hintergrundfärbung des Gewebes erzeugte (Abb. 26 A-F). Bei evaginierenden Knospen im Stadium 2-3 ist ein leicht verstärktes Antikörper- Signal in der Knospungsregion zu erkennen (Abb. 26 A), während in der auswachsenden Knospe kein verstärktes Signal zu detektiert ist (Abb. 26 A''). Bei elongierenden Knospen im Stadium 2-3 ist ein verstärktes Signal des anti-RhoA- Antikörpers an der Spitze der auswachsenden Knospe und umliegenden Gewebe des Muttertieres auf der Knospenseite zu erkennen (Abb. 26 B, B'').

Korrelierend mit dem leicht verstärkten Signals des Antikörpers an evaginierenden Knospen ist dort ebenfalls eine Reorientierung der Aktinfasern zu beobachten (Abb. 26 A', A'''). Auch in elongierenden Knospen korreliert ein verstärktes Antikörpersignal mit der Reorientierung der Aktinfasern (Abb. 26 B', B''').

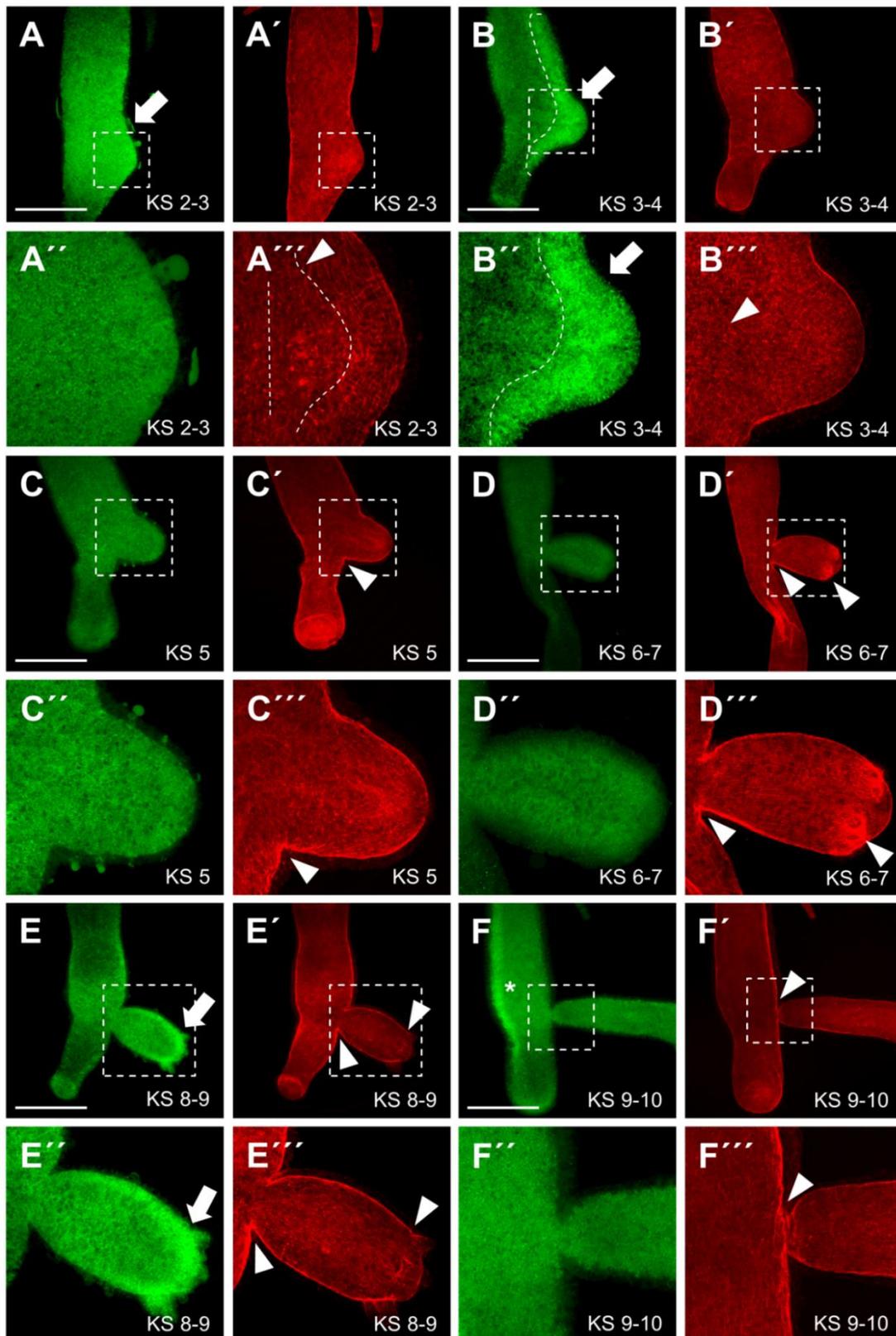


Abbildung 26: Antikörperfärbung des anti-RhoA- Antikörpers sowie Nachweis von F-Aktin mittels Phalloidin an unterschiedlichen Knospenstadien. (A-F) Färbung des anti-RhoA-Antikörpers, detektiert durch einen FITC- markierten Sekundärantikörper. (A'-F') Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin-TRITC. Verstärktes Signal des anti-RhoA- Antikörpers (weiße Pfeile). Detektion des anti-RhoA- Antikörpers auf der Knospe-gegenüber-liegende-Körperwand des Muttertieres (Stern). Akkumulation oder eine Reorientierung der Aktinfasern (weiße Pfeilköpfe). KS: Knospenstadium. Maßstabsbalken: 500 μm . (Daten sind in Zusammenarbeit mit Lea Hüttinger entstanden; von mir betreute MSc Studentin).

In der Elongationsphase des Knospungsprozesses (Stadium 4-7) ist kein verstärktes Signal des Antikörpers in der auswachsenden Knospe, den auswachsenden Tentakelknospen oder im Gewebe des Muttertieres in der Knospungszone zu erkennen (Abb. 26 C, C'', D, D''). Hingegen ist in dieser Phase sowohl eine Akkumulation von F- Aktin an der Knospbasis, als auch eine Reorientierung der F- Aktinfasern bei auswachsenden Tentakelknospen zu erkennen (Abb. 26 C', C''', D', D'''). In der Phase der Knospenablösung (Stadium 8-10) ist ein verstärktes RhoA- Antikörpersignal im oralen und lateralen Bereich der auswachsenden Knospe und an der Basis der bereits evaginierten Tentakel zu erkennen (Abb. 26 E, E'). Im letzten Stadium der Knospung ist auf der Knospe-entgegen-gesetzten Seite im Muttertier ein verstärktes Signal des Antikörpers nachzuweisen (Abb. 26 F), nicht aber an der Knospbasis (Abb. 26 F'). Hier findet sich in der finalen Ablösungsphase jedoch eine deutliche Akkumulation und Reorientierung der Aktinfasern (Abb. 26 E', E''', F', F'''). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der getestete Antikörper ein Signal in auswachsenden Knospen und im Gewebe des Muttertieres in der Knospungsregion zeigt, welches mit einer Reorientierung der Aktinfasern korreliert. Eine Akkumulation und eine Reorientierung der Aktinfasern ist auch an der Basis der auswachsenden Knospe, an der Basis der Tentakelknospen und an der Basis der späten, sich ablösenden Knospe nachzuweisen, während dort kein verstärktes anti-RhoA- Antikörpersignal detektiert werden konnte.

V.3.2 Analyse der Rho- Proteinstruktur

Um eine Aussage über die Bindungsfähigkeit der vier RhoA Orthologe aus *Hydra* (Hv_Rho1-4) mit dem Fusionsprotein RBD-GFP treffen zu können, wurden die Proteinstrukturen der Rho- GTPasen mithilfe des Swiss-Model Tools berechnet und anschließend mit DeepView / Swiss-PdbViewer dargestellt (Abb. 27) (siehe Material und Methoden VIII.2). Als Vergleich und Kontrolle zu den Rho- GTPasen aus *Hydra* wurden speziell die Proteinstrukturen der humanen Rho- GTPasen mit einbezogen, an denen die Bindung der RBD nachgewiesen ist (Chen et al., 2010). Die Übereinstimmung der Proteinfaltung wurde ermittelt und tabellarisch dargestellt (Tab. 2). Dabei wurde die strukturelle Ähnlichkeit der gefalteten Proteine in Ångström (Å) ermittelt, welches ein Längen- oder Abstandsmaß von Aminosäuren und Strukturen in Proteinkristallen ist. Je näher der Å- Wert an 0 ist, desto ähnlicher ist die Faltung der Proteine. Die Faltung der vier *Hydra* Rho- GTPasen wurden mit der Faltung der RhoABC- GTPasen aus *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* und *Danio rerio* sowie verschiedener Invertebraten aus unterschiedlichen Stämmen berechnet und miteinander verglichen. Die ähnlichste Faltung zu den humanen Proteinen, beziehungsweise zu den Rho- Proteinen aus *Hydra* wurde dabei jeweils grün hervorgehoben, während die abweichenden Strukturmerkmale rot hinterlegt sind (Tab. 2).

Im Vergleich zeigte sich, dass Hs_RhoA und Hs_RhoC beinahe identisch falten und sich lediglich um 0,06 Å voneinander unterscheiden (Tab. 2). Zu Hs_RhoB unterscheiden sich sowohl Hs_RhoA, als auch Hs_RhoC mit jeweils 0,86 Å (Tab. 2).

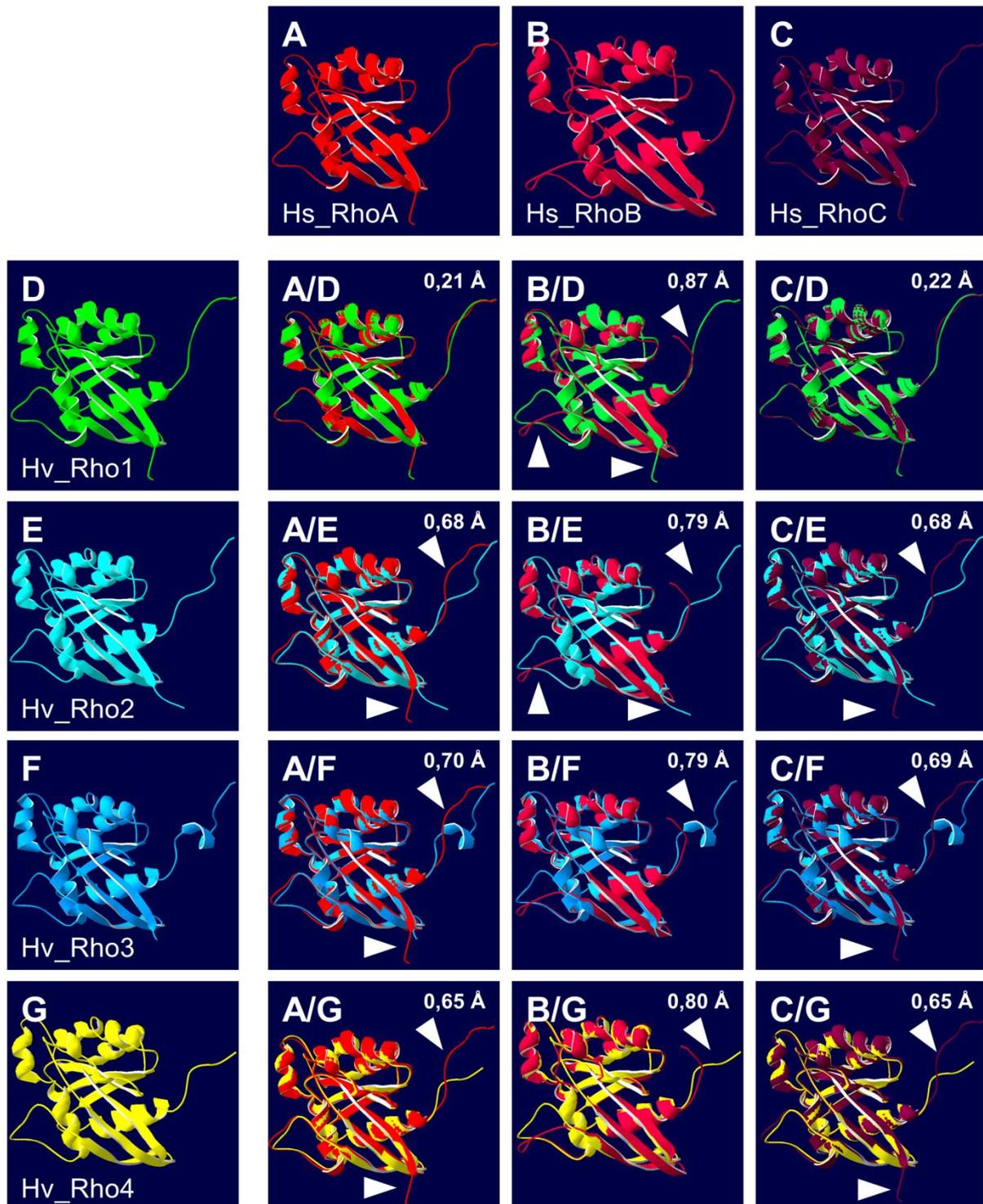


Abbildung 27: Vergleich der berechneten Tertiärstruktur der humanen RhoABC- GTPasen mit Rho1-4 aus *Hydra*. Hs_RhoA in hellrot; Hs_RhoB in rot; Hs_RhoC in dunkelrot; Hv_Rho1 in grün; Hv_Rho2 in hellblau; Hv_Rho3 in dunkelblau; Hv_Rho4 in gelb. Unterschiede der Proteinstruktur sind in Ångström (Å) angegeben. Ersichtliche Strukturunterschiede sind durch weiße Pfeilköpfe markiert.

Durch den Vergleich der Proteinfaltung der Rho- GTPAsen aus *Hydra* und der humanen Rho- GTPAsen zeigte sich, dass die Proteinstruktur von Hv_Rho1 zu Hs_RhoA am ähnlichsten ist mit einer Abweichung von 0,21 Å (Abb. 27 A/D) (Tab. 2).

Im Unterschied dazu weichen Hv_Rho2 mit 0,68 Å-, Hv_Rho3 mit 0,70 Å- und Hv_Rho4 mit 0,65 Å von der humanen RhoA- Proteinstruktur ab (Abb. 27 A/E, A/F, A/G) (Tab. 2). Zu der humanen RhoB- Proteinstruktur zeigen die Proteinstrukturen aus *Hydra* mit 0,79 Å – 0,87 Å eine deutlich größere Abweichung, während die Abweichung zu Hs_RhoC ungefähr der Abweichung zu Hs_RhoA entspricht (Abb. 27) (Tab. 2). Der Vergleich der Rho- GTPAsen aus *Hydra* untereinander zeigte, dass sich die Struktur der Rho- GTPAsen Hv_Rho2, Hv_Rho3 und Hv_Rho4 deutlich von der Struktur von Hv_Rho1 unterscheiden (0,65 Å - 0,70 Å), während sie untereinander jeweils eine ähnlichere Proteinstruktur aufweisen (0,23 Å - 0,30 Å) (Tab. 2). Bei der Untersuchung der Proteinfaltung der Vertebraten- Rho- Proteine zeigte sich, dass die die Faltung des RhoB- Proteins von *Danio rerio* große Unterschiede zu der Faltung von Hs_RhoB aufweist. Allerdings faltet Dr_RhoB sehr ähnlich zu Hs_RhoA und Hs_RhoC. RhoB aus *Xenopus laevis* hingegen faltet erwartungsgemäß strukturell am ähnlichsten zu Hs_RhoB (Tab. 2). Alle untersuchten Proteinfaltungen der Invertebraten entsprechen am ehesten der Faltung des Hs_RhoAs oder Hs_RhoCs, lediglich das untersuchte Rho- Protein des Cephalochordaten *Branchiostoma floridae* weist als einziger Invertebrat eine vergleichbare Faltung mit dem human RhoB auf. Allgemein weicht die Faltung von Bf_Rho stark von der Faltung der humanen Rho- Proteine und der Rho- Proteine aus *Hydra* ab (Tab. 2).

Der Vergleich mit der Proteinfaltung der Rho- Proteine aus *Hydra* zeigt, dass die Rho- Proteine der Vertebraten am ehesten mit der Faltung von Hv_Rho1 und Hv_Rho2 zu vergleichen sind. Im Gegensatz dazu entspricht die Faltung der Rho- Proteine der Invertebraten tendenziell eher der Faltung von Hv_Rho2 und Hv_Rho3. Keines der untersuchten Rho- Proteine weist eine ähnliche Faltung wie Hv_Rho4 auf (Tab. 2).

Tabelle 2: Vergleich der berechneten Unterschiede in der Proteinstruktur der Vertebraten- und Invertebraten- Rho- GTPasen. Hervorgehoben sind die humanen Sequenzen, sowie die Sequenzen aus *Hydra*. Grün markiert sind jeweils die Proteine mit der ähnlichsten Proteinstruktur zueinander und rot hervorgehoben sind die Proteine mit der geringsten Ähnlichkeit bezüglich ihrer Proteinstruktur. Aq: *Amphimedon queenslandica*; Bf: *Branchiostoma floridae*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Ct: *Capitella teleta*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dr: *Danio rerio*; Egr: *Echinococcus granulosus*; Hs: *Homo sapiens*; Hv: *Hydra vulgaris*; Lg: *Lottia gigantea*; Nv: *Nematostella vectensis*; Sp: *Saccoglossus purpuratus*; XI: *Xenopus laevis*.

	Hs_RhoA	Hs_RhoB	Hs_RhoC	Hv_Rho1	Hv_Rho2	Hv_Rho3	Hv_Rho4
Hs_RhoA	/	/	/	/	/	/	/
Hs_RhoB	0,86 Å	/	/	/	/	/	/
Hs_RhoC	0,06 Å	0,86 Å	/	/	/	/	/
Hv_Rho1	0,21 Å	0,87 Å	0,22 Å	/	/	/	/
Hv_Rho2	0,68 Å	0,79 Å	0,68 Å	0,65 Å	/	/	/
Hv_Rho3	0,70 Å	0,79 Å	0,69 Å	0,70 Å	0,23 Å	/	/
Hv_Rho4	0,65 Å	0,80 Å	0,65 Å	0,66 Å	0,23 Å	0,30 Å	/
XI_RhoA	0,07 Å	0,86 Å	0,09 Å	0,22 Å	0,68 Å	0,70 Å	0,65 Å
XI_RhoB	0,93 Å	0,81 Å	0,94 Å	0,93 Å	0,67 Å	0,66 Å	0,67 Å
XI_RhoC	0,68 Å	0,77 Å	0,68 Å	0,69 Å	0,08 Å	0,28 Å	0,22 Å
Dr_RhoA	0,65 Å	0,78 Å	0,65 Å	0,65 Å	0,23 Å	0,29 Å	0,29 Å
Dr_RhoB	0,06 Å	0,86 Å	0,05 Å	0,22 Å	0,68 Å	0,69 Å	0,65 Å
Dr_RhoC	0,06 Å	0,86 Å	0,03 Å	0,22 Å	0,68 Å	0,69 Å	0,65 Å
Ce_Rho	0,66 Å	0,78 Å	0,66 Å	0,67 Å	0,55 Å	0,52 Å	0,59 Å
Dm_Rho	0,68 Å	0,79 Å	0,67 Å	0,68 Å	0,19 Å	0,18 Å	0,28 Å
Ct_Rho	0,78 Å	0,79 Å	0,78 Å	0,78 Å	0,51 Å	0,48 Å	0,49 Å
Lg_Rho	0,65 Å	0,79 Å	0,65 Å	0,65 Å	0,22 Å	0,17 Å	0,21 Å
Sp_Rho	0,68 Å	0,78 Å	0,67 Å	0,68 Å	0,10 Å	0,30 Å	0,25 Å
Bf_Rho	0,85 Å	0,84 Å	0,85 Å	0,85 Å	0,82 Å	0,83 Å	0,83 Å
Egr_Rho	0,73 Å	0,81 Å	0,73 Å	0,73 Å	0,71 Å	0,68 Å	0,71 Å
Nv_Rho	0,63 Å	0,81 Å	0,63 Å	0,66 Å	0,51 Å	0,52 Å	0,53 Å
Aq_Rho	0,64 Å	0,76 Å	0,64 Å	0,64 Å	0,51 Å	0,52 Å	0,53 Å

Allgemein ist anhand der Analyse der Proteinfaltung zu erkennen, dass die Faltung der Invertebraten Rho- Proteine am ehesten der Faltung des humanen RhoAs und des humanen RhoCs entspricht. Die Faltung der Vertebraten Rhos hingegen entspricht am ehesten der Faltung von Hv_Rho1 und Hv_Rho2, wohingegen die Proteine der Invertebraten tendenziell eher wie Hv_Rho2 oder Hv_Rho3 falten.

V.3.3 Detektion von aktivem Rho in der Knospungsregion während des Knospungsprozesses in *Hydra* mittels RBD-GFP

Basierend auf den Daten der anti-RhoA- Antikörperfärbung, welche auf eine Detektion des aktiven und inaktiven Rhos in der auswachsenden Knospe bei *Hydra* schließen lassen, folgte der Nachweis von aktiviertem Rho in *Hydra*. Dazu wurde das Fusionsprotein RBD-GFP

prokaryontisch exprimiert und aufgereinigt, welches in fixiertem *Xenopus*- Gewebe zur Detektion von aktivem RhoA verwendet wird (Berger et al., 2009).

Zunächst wurde die vermutliche Bindefähigkeit der Rho- Proteine an die Rho-Bindungsdomäne (RBD) des Scaffold- Proteins Rhotekin analysiert. Da das für die Färbung genutzte RBD-GFP aus Maus stammt, wurde die Proteinfaltung des entsprechenden Sequenzabschnittes des Rhotekins aus Maus berechnet. Als Kontrolle diente das gefaltete RhoA aus *Xenopus*, an welches das RBD-GFP- Fusionsprotein bewiesenermaßen binden kann (Berger et al., 2009). Die RBD kann nur an die Rho- GTPase binden, wenn die *Switch*-Regionen I und II (SR I und II) der Rho- GTPase bei dem gefalteten Protein zugänglich sind (Chen et al., 2010). Daher wurden die Lage der SR I und II in dem gefalteten Rho- GTPasen in *Xenopus* und *Hydra* untersucht, um eine Aussage über eine mögliche Bindung an das RBD treffen zu können (Abb. 28). Dabei zeigte sich, dass RhoA aus *Xenopus* und die beiden Rho- GTPasen Hv_Rho1 und Hv_Rho2 aus *Hydra* (Abb. 28; rot), offen liegende SR I und II (Abb. 28; grün) in dem gefalteten Protein besitzen, an welche das RBD aus Maus (Abb. 28; gelb) binden kann/könnte (Abb. 28 A-C). Im Vergleich dazu sind Hv_Rho3 und Hv_Rho4 (Abb. 28; grün) so gefaltet, dass die erkannten SR I und II (Abb. 28; rot) im Inneren des gefalteten Proteins liegen (Abb. 28 D, E), was eine Bindung des RBDs erschweren oder unmöglich machen würde.

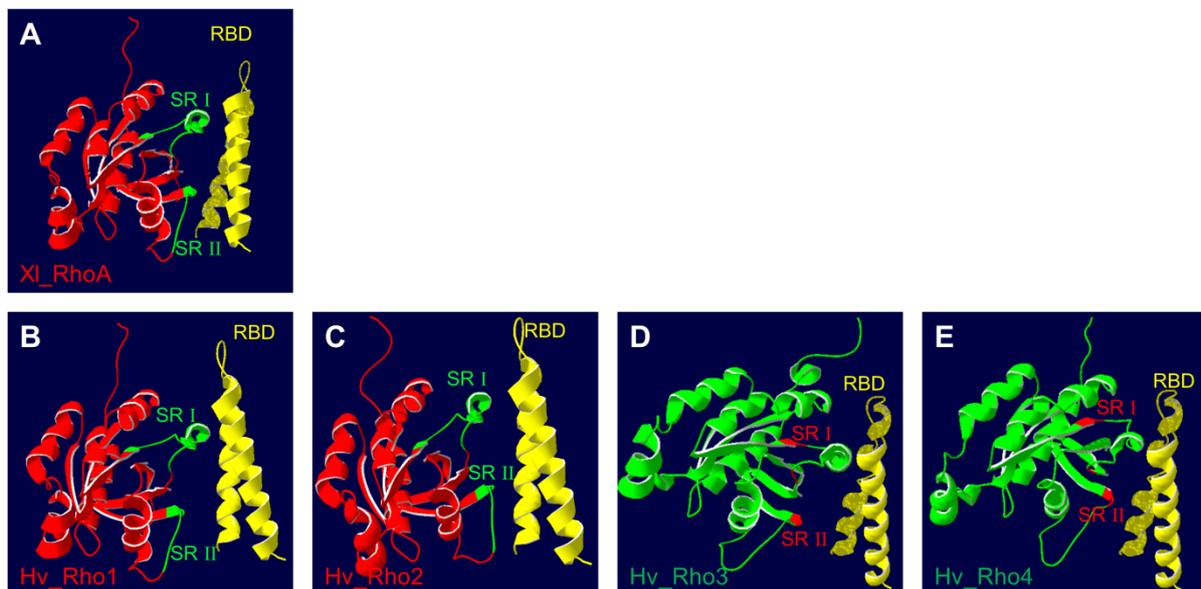


Abbildung 28: Analyse einer möglichen Bindungsfähigkeit der Rho-Binde-Domäne (RBD) aus Maus an die Rho- GTPasen *Hydra*. (A) An die offen liegenden *Switch*-Regionen I und II (SR I und II; grün) des RhoA aus *Xenopus* (rot) kann von dem RBD aus Maus (gelb) gebunden werden. (B, C) Die Rho- GTPasen Hv_Rho1/2 (rot) besitzen offen liegende *Switch*-Regionen I und II (SR I und II; grün) die vermutlich von dem RBD aus Maus (gelb) gebunden werden können. (D, E) Hv_Rho3/4 (grün), deren *Switch*-Regionen I und II (rot) nicht offen liegen und daher vermutlich nicht von dem RBD aus Maus (gelb) gebunden werden können (nach Chen et al., 2010).

Um eine mögliche Beteiligung von aktiven Rho- GTPasen an morphogenetischen Prozessen, wie der Knospung, in *Hydra* zu untersuchen wurde eine Färbung mit RBD-GFP an Tieren mit unterschiedlichen Knospenstadien durchgeführt. Das RBD-GFP- Signal ist ubiquitär in *Hydra vulgaris* verteilt, über den gesamten Prozess der Knospung hinweg lässt sich jedoch ein verstärktes RBD-GFP- Signal an der Knospenbasis und umliegendes Gewebe nachweisen (Abb. 29). Zu Beginn des Knospungsprozesses (Knospenstadium 0-1) ist ein verstärktes RBD-GFP- Signal gürtelförmig um die Knospungszone nachweisen (Abb. 29 A, A'). In der späten Initiationsphase (Knospungsphase 2-3) und in der frühen Elongationsphase (Knospenstadium 4-5) lässt sich das RBD-GFP- Signal im gesamten Gewebe der auswachsenden Knospe nachweisen. Gleichzeitig zieht das Signal in das umliegende Gewebe des Muttertieres in der Knospungsregion (Abb. 29 B-D, B'-D').

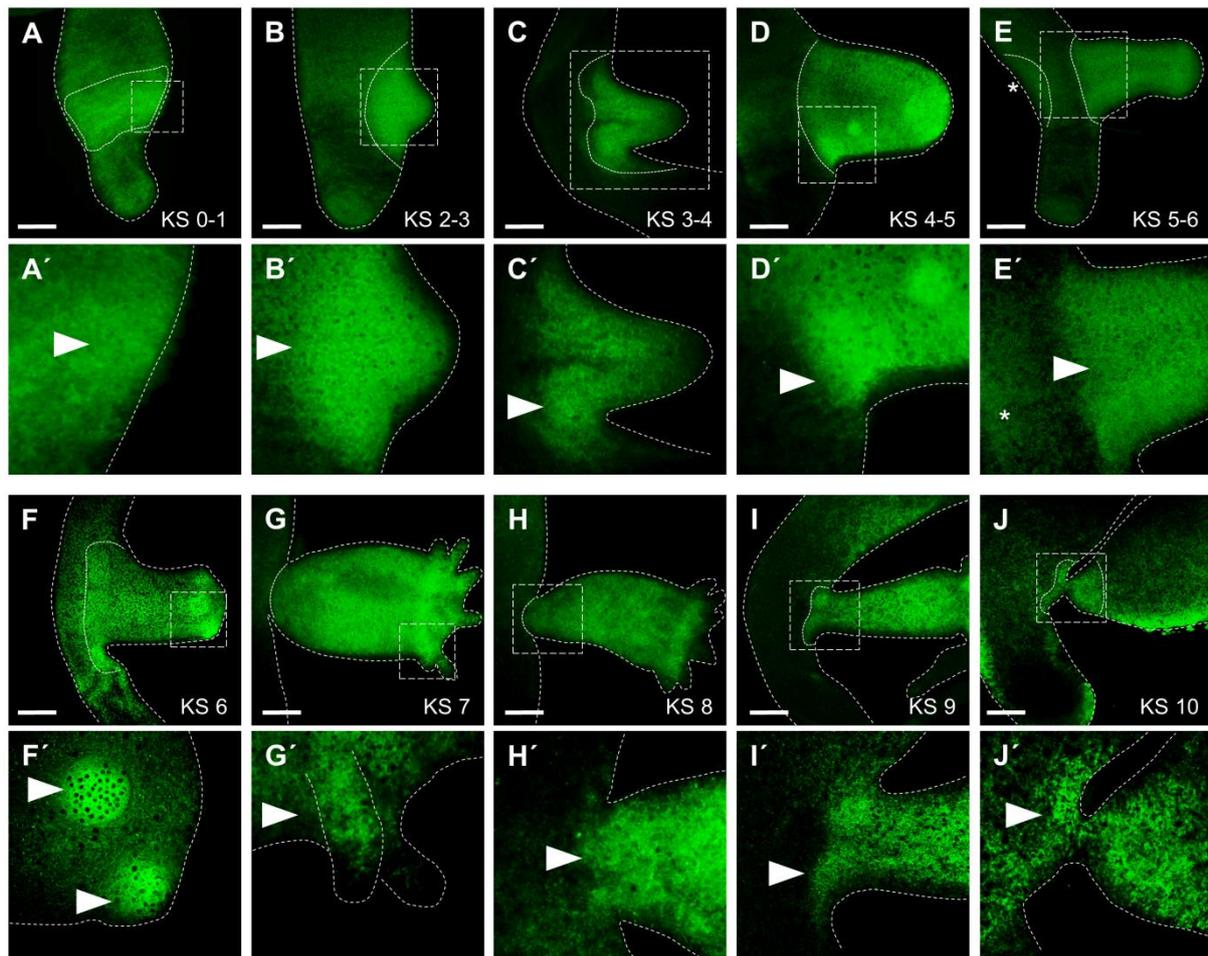


Abbildung 29: Immunhistochemische Detektion des RBD-GFPs an Hydran mit unterschiedlichen Knospenstadien. (A-J) Verstärktes RBD-GFP- Signal in der Knospungszone (weiße Pfeilköpfe). (E) Verstärktes RBD-GFP- Signal auf der Knospe-gegenüber-liegenden Seite der Körperwand im Muttertier (Stern). KS: Knospenstadium. Maßstabsbalken: 250 μ m.

In der späten Elongationsphase (Knospenstadium 6-8) verschiebt sich das Signal meist mit einer klaren Grenze zum Muttertier auf das Gewebe der auswachsenden Knospe (Abb. 29 E, G, E', G' und Abb. 31 A'). In evaginierenden Tentakelknospen (Abb. 32 F, F') sowie in frisch

ausgewachsenen Tentakel (Abb. 29 G, G') lässt sich ein verstärktes RBD-GFP- Signal detektieren. Im Gewebe des Muttertieres an der Knospungsregion ist das RBD-GFP- Signal deutlich schwächer nachweisbar (Abb. 29 E-G und Abb. 31 A').

Die Intensität des RBD-GFP- Signals in der Knospungszone wurde in Relation gesetzt. Dazu wurden Proben der Stadien 1, 2 – 3, 5 – 6 und 9 (Abb. 29 A, B, E, I) untersucht (Abb. 30) und der Signalstärke im Programm FIJI Farbwerte zugeordnet (Abb. 30 E). Diese Werte kann man entlang einer Messgeraden durch die Knospungszone (Abb. 30 A'-D') auswerten und in Bezug setzen. Dies wurde weiterhin speziell an Knospen in der Elongationsphase und der Ablösungsphase durchgeführt, welche mittels hochauflösender konfokaler-Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM) untersucht wurden (Abb. 31).

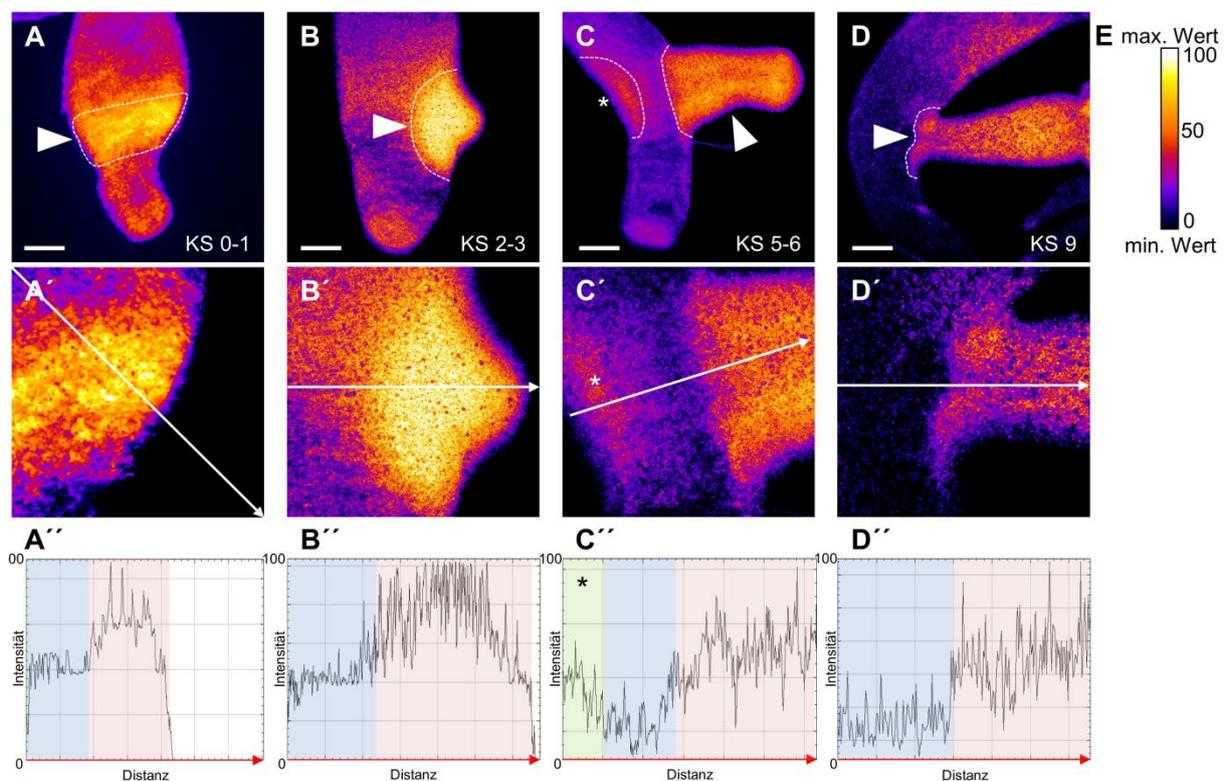


Abbildung 30: Detektion der Signalintensität der immunhistochemischen Färbung mittels RBD-GFP während des Knospungsprozesses bei *Hydra*. (A-D) Verstärktes RBD-GFP- Signal in der Knospungszone (weiße Pfeilköpfe). (C) Verstärktes RBD-GFP- Signal auf der Knospe-gegenüberliegenden Seite der Körperwand im Muttertier (Stern). (E) Skala der Signalintensität. (A'-D') Messgerade entlang des untersuchten Gewebes (weißer Pfeil). (A''-D'') Messung der Signalintensität des RBD-GFP- Signals entlang der Messgeraden in A'-D'. Intensität des RBD-GFP- Signals im Gewebe außerhalb der Knospungszone (blau hinterlegt). Intensität des RBD-GFP- Signals in Gewebe der Knospungszone (rot hinterlegt). Intensität des RBD-GFP- Signals auf der Knospe-gegenüberliegenden Seite in der Körperwand des Muttertieres (grün hinterlegt). Maßstabsbalken: 250 μ m.

Entsprechend dieser Auswertung bindet Gewebe der auswachsenden Knospe in der frühen Initiationsphase (Abb. 30 A, A') teilweise doppelt so viel RBD-GFP wie das umliegende Körpergewebe (Abb. 30 A''). Auch in der späten Initiationsphase (Abb. 30 B, B') bindet die kürzlich ausgewachsene Knospe deutlich mehr RBD-GFP als umliegendes Gewebe (Abb. 30

B''). Bei der Elongationsphase (Abb. 30 C, C') hingegen ist zu erkennen, dass neben der auswachsenden Knospe (Abb. 30 C'') auch auf der Knospe-gegenüber-liegenden Seite der Körperwand im Muttertier (Abb. 30 C, C) ein verstärktes RBD-GFP- Signal nachzuweisen ist (Abb. 30 C''), welches entsprechend der Position (gegenüber und oberhalb der auswachsenden Knospe; siehe Abb. 2) möglicherweise mit einer entstehende Knospe korreliert. Das Gewebe des Muttertieres zwischen den stark RBD-GFP- bindenden Regionen weist hingegen kaum RBD-GFP auf (Abb. 30 C'' und Abb. 31 A'''). In der Ablösungsphase (Abb. 30 D, D' und Abb. 31 A'', B'') ist im Bereich der Knospenbasis eine deutliche Grenze zwischen der Signalintensität des RBD-GFP zwischen dem Muttertier und der sich ablösenden Knospe erkennbar. Dabei bindet das Gewebe der Knospenbasis und der auswachsenden, beziehungsweise der ablösenden Knospe mehr als doppelt so viel RBD-GFP wie das Gewebe des Muttertieres (Abb. 30 D'' und Abb. 31 A''', B'''). Mittels konfokaler-Laser-Scan-Mikroskopie (kLSM) ist zu erkennen, dass Bereiche mit starkem RBD-GFP- Signal mit einer Reorientierung der Aktinfasern bei elongierenden Knospen (Abb. 31 A) und mit einer Akkumulation der Aktinfasern bei sich ablösenden Knospen kolokalisieren (Abb. 31 B). In der Ablösungsphase (Knospenstadium 8-10) ist das RBD-GFP- Signal an der Knospenbasis diffuser und weniger deutlich zwischen Muttertier und Knospe abgegrenzt (Abb. 29 H', I'). Vor allem in der finalen Phase der Ablösung ist RBD-GFP sowohl in dem Gewebe der Knospe, als auch in dem Gewebe des Muttertieres an der Basis der Knospe zu detektieren (Abb. 29 I, J, I', J'). Das Signal beschränkt sich in dem letztem Stadium der Knospenablösung (Knospenstadium 10) auf einen kleinen definierten Bereich des Muttertieres sowie auf die Zellen der gesamten Basalscheibe der Knospe (Abb. 31 B', B'').

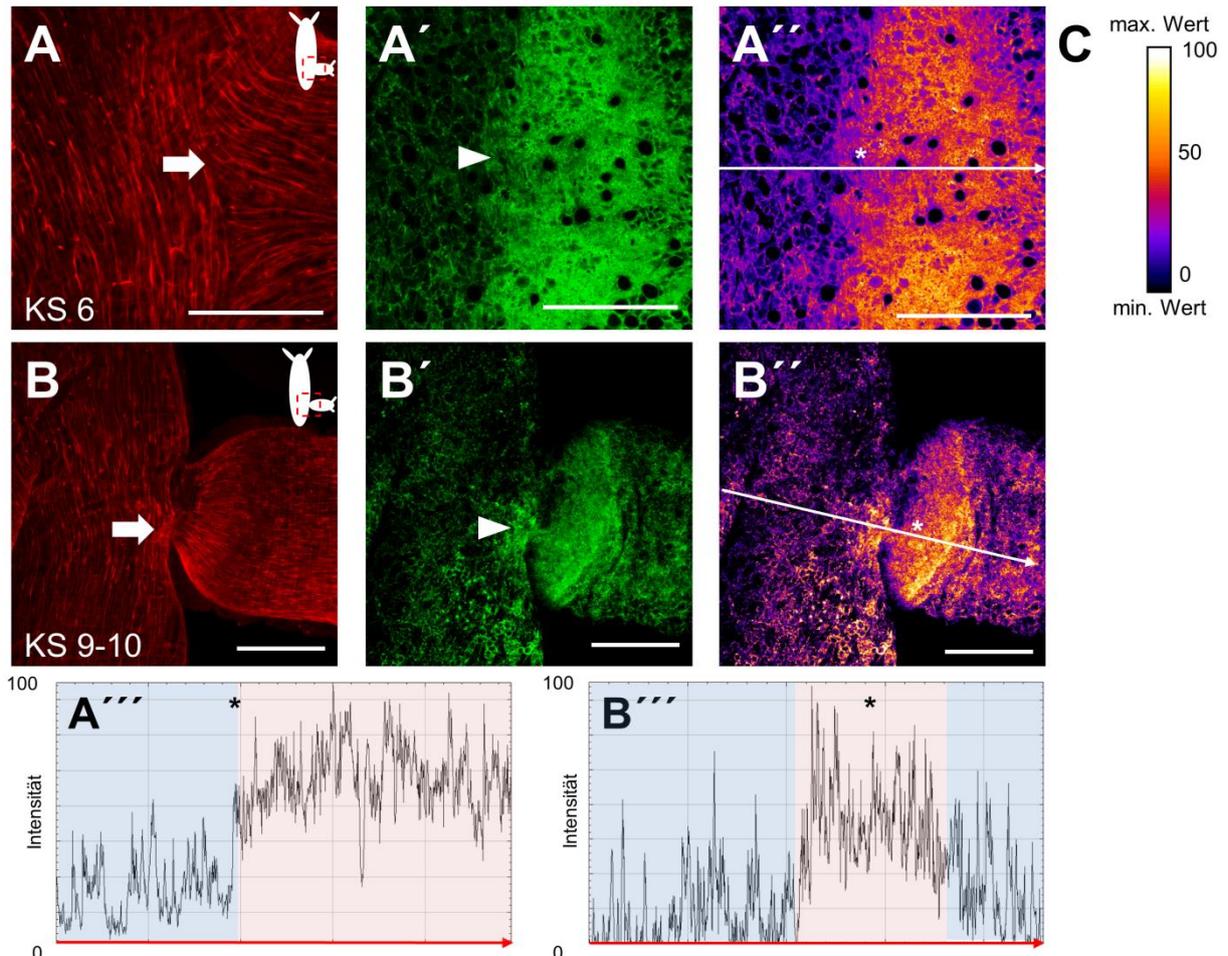


Abbildung 31: Detektion des RBD-GFP- Signals und von F-Aktin mittels konfokaler-Laser-Scan-Mikroskopie anhand Hydren mit mittleren und späten Knospen. (A, B) Detektion von F-Aktin mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A', B') Detektion des RBD-GFPs. Verstärktes RBD-GFP- Signal (weiße Pfeilköpfe). (A'', B'') Intensitätsanalyse des RBD-GFP- Signals entlang einer Messgeraden (weiße Pfeile). Anstieg des RBD-GFP- Signals an der Knospenbasis (Stern). (A''', B''') Messung der Intensität des RBD-GFP- Signals entlang einer Messgeraden in A'' und B''. (C) Skala der Signalintensität. Maßstabsbalken: 100 μm .

Zusammengefasst kann festhalten werden, dass RBD-GFP in der Elongationsphase der Knospung stark an der Knospenbasis und in der auswachsenden Knospe bindet. Dabei bildet das Signal eine klare Grenze zum Gewebe des Muttertieres in dem RBD-GFP deutlich schwächer bindet. Dieser Übergang korreliert mit einer Reorientierung der longitudinal orientierten ektodermalen Aktinfasern am Übergang zur rechtwinklig auswachsenden Knospe. Während der finalen Phase der Knospenablösung beschränkt sich das RBD-GFP- Signal auf einen kleinen Bereich des Gewebes des Muttertieres an der Knospenbasis und auf das Gewebe der entstehenden Basalscheibe der Knospe. Dieser Bereich korreliert wiederum mit einem Zusammenziehen der Aktinfasern zum Ablösen der Knospe.

V.3.4 Verstärktes RBD-GFP- Signal in evaginierendem Gewebe der Tentakelknospen

Die Tentakel des auswachsenden Jungpolypen bilden sich in einer kurzen Phase während der Knospenelongation (Knospenstadium 6) (Abb. 29 F, F' und Abb. 32).

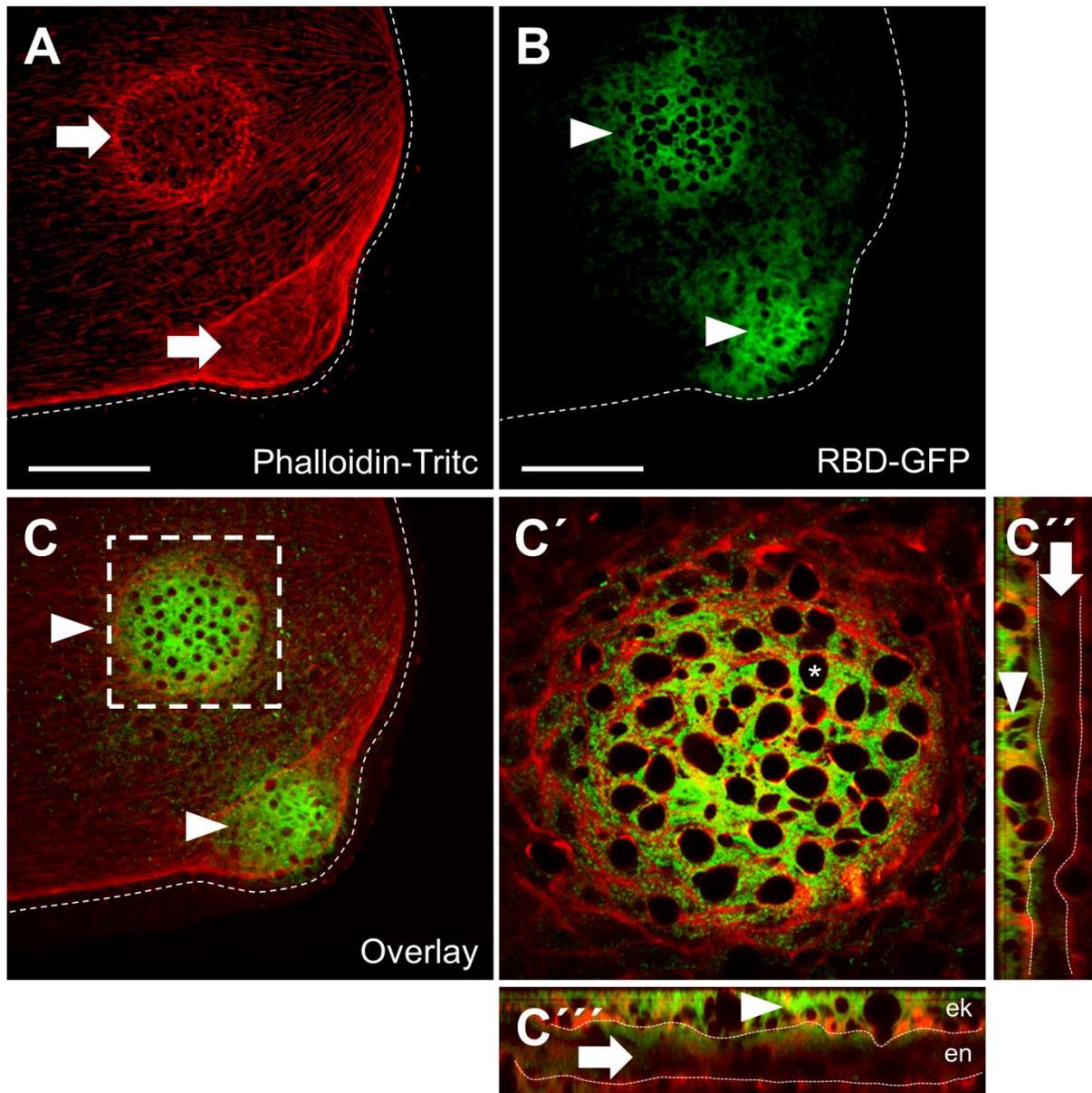


Abbildung 32: Detektion des RBD-GFP- Signals und von F-Aktin mittels konfokaler-Laser-Scan-Mikroskopie an evaginierenden Tentakel von Jungpolypen. (A) Detektion von F-Aktin mittels Phalloidin. Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (B) Detektion des RBD-GFPs. Verstärktes RBD-GFP- Signal (weiße Pfeilköpfe). (C) Overlay des RBD-GFP- Signals und des F-Aktins. RBD-GFP- Signal an den auswachsenden Tentakel (weiße Pfeilköpfe). (C') Digitale Vergrößerung aus C. Ungefärbte Nematocyten der jungen Tentakel (Stern). (C'', C''') Orthogonale Ansicht des kLSM-Stacks. Starkes ektodermales RBD-GFP- Signal an den auswachsenden Tentakel (weißer Pfeilkopf). Schwaches endodermales RBD-GFP- Signal in den auswachsenden Tentakel (weißer Pfeil). Gestrichelte Linien zeigen die Mesogloea an. Ektoderm (ek), Endoderm (en). Maßstabsbalken: 100 µm.

In evaginierenden Tentakelknospen lässt sich ein verstärktes RBD-GFP- Signal detektieren (Abb. 32 B), welches mit einer Reorientierung der Aktinfasern (Abb. 32 A) kolokalisiert (Abb. 32 C, C'). Durch eine orthogonale Ansicht des kLSM- Stacks der evaginierenden Tentakelknospe wird deutlich, dass sich das RBD-GFP- Signal hauptsächlich auf das Ektoderm (Abb. 32 C'', C''') beschränkt und im Endoderm (Abb. 32 C'', C''') nur schwach nachweisbar ist. Die Nesselzellkapseln (Nematocyten) der auswachsenden Tentakel heben sich deutlich von der RBD-GFP- und der Phalloidin- Färbung ab (Abb. 32 C, C').

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass RBD-GFP verstärkt in ektodermalen Epithelmuskelzellen von auswachsenden Tentakeln an einer Knospe detektiert werden kann. Dies korreliert mit der Lokalisation von ungeordneten Aktinfasern in den evaginierenden Tentakelknospen.

V.3.5 Detektion von aktivem Rho während des Regenerationsprozesses in *Hydra*

Die Versuche zur Detektion des RBD-GFP- Signals während der Regeneration von *Hydra* wurden zusammen mit der Bachelorstudentin Laura Annemüller im Rahmen ihrer Betreuung durchgeführt.

Der mögliche Einfluss von Rho- GTPasen an dem Prozess der Regeneration des Kopfes und des Fußes in *Hydra* wurde durch die Detektion von RBD-GFP an sich regenerierenden Hydren über insgesamt 48 Stunden bis zur vollständigen Regeneration untersucht (vollständiger Regenerationsverlauf im Anhang 5-10). Um die Beteiligung des Aktinzytoskeletts zu untersuchen wurde zusätzlich eine Phalloidin-TRITC Färbung durchgeführt sowie eine standardmäßige DAPI- Färbung zur Orientierung. Dargestellt wird das typische ubiquitäre RBD-GFP- Signal in der Körpersäule an einem ungeschnittenen Polypen (Abb. 33 A), welches als Referenz angesehen werden kann. Weiterhin wird der Prozess der Regeneration unmittelbar nach dem zugefügten Schnitt (Abb. 33 B, C), acht Stunden nach dem Schnitt (Abb. 33 D, E) sowie 30 Stunden nach dem Schnitt dargestellt (Abb. 33 F, G). Unmittelbar nach dem zugefügten Schnitt ist ein verstärktes RBD-GFP- Signal sowie eine Akkumulation des F-Aktins direkt an der Schnittstelle nachzuweisen (Abb. 33 B, C). Im Laufe der Regeneration ist das verstärkte RBD-GFP- Signal an der Schnittstelle und auch im umliegenden Gewebe nachzuweisen, wo ebenfalls eine Akkumulation, beziehungsweise eine Reorientierung der Aktinfasern auftritt (Abb. 33 D, G).

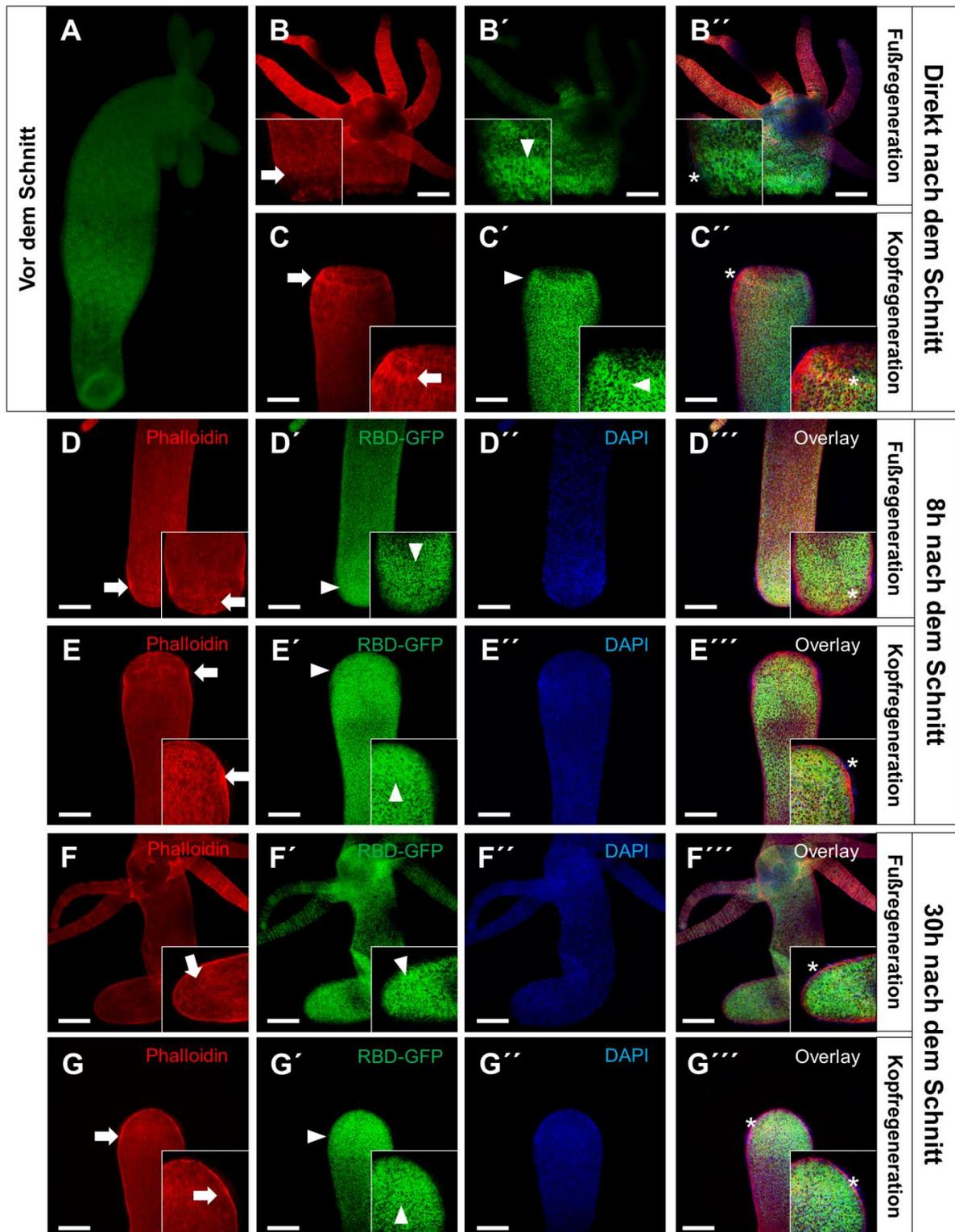


Abbildung 33: Detektion von RBD-GFP, F-Aktin und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. (A) Übersicht des RBD-GFP- Signals an einem ungeschnittenen Polypen als Referenz. (B, C) Die Proben wurden unmittelbar nach dem zugefügten Schnitt fixiert. (D, E) Die Proben wurden acht Stunden nach dem zugefügten Schnitt fixiert. (F, G) Die Proben wurden 48 Stunden nach dem zugefügten Schnitt fixiert. (B-G) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung der Aktinfasern (weiße Pfeile). (B'-G') Detektion des RBD-GFP-Signals. Graduell verlaufendes RBD-GFP- Signal (lotrechter weißer Pfeilkopf). Verstärktes RBD-GFP-Signal (horizontaler weißer Pfeilkopf). (D''-G'') Färbung der Zellkerne durch DAPI. (B''-G'') Overlay der Kanäle zur Detektion der Kolokalisation (Stern). Maßstabsbalken: 250 μ m. (Auswertung der Daten von Laura Annemüller; von mir betreute BSc Studentin).

Allgemein lässt sich während der Regeneration RBD-GFP über 48 Stunden an der Regenerationsstelle des Kopfes und Fußes unterschiedlich stark und zu unterschiedlichen Zeiten nachzuweisen ist (Abb. 33 B'-G' und Anhang 5-10). Dabei ist oft ein graduell verlaufendes RBD-GFP- Signal zu erkennen, welches direkt an der Schnittstelle und umliegenden Gewebe am stärksten ist, weiter entfernt von der Schnittstelle aber deutlich an Signalstärke verliert (Abb. 33 B'-G' und Anhang 5-10). An der Schnittstelle ist über den gesamten Regenerationsprozesses eine Akkumulation von Aktinfasern zu erkennen (Abb. 33 B-G und Anhang 5-10), welche mit dem RBD-GFP- Signal kolokalisiert ist, was im Overlay der beiden Kanäle als gelbes Signal deutlich wird (Abb. 33 B''-G''' und Anhang 5-10). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass RBD-GFP während des gesamten Regenerationsprozesses von Kopf und Fuß an den jeweiligen Schnittstellen sowie später auch im umliegenden Gewebe verstärkt detektiert werden kann (Abb. 33 und Anhang 5-10). Die Region des verstärkten RBD-GFP- Signals korreliert mit einer Akkumulation, beziehungsweise einer Reorientierung der F-Aktinfasern an der Schnittstelle.

V.3.6 Inhibition der Rho- GTPase mit Rhosin reduziert das RBD-GFP-Signal

RhoA wird durch den spezifischen Inhibitor Rhosin inhibiert (Shang et al., 2012). In einem Kandidaten- *Screening* mit dem Ziel Hinweise auf eine Involvierung des FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges zu erhalten, hatte der Inhibitor bei *Hydra* die Knospenablösung verhindert (Holz et al., 2017). Auch wenn dies kein direkter Beweis für die Inhibition der Rho-GTPase in *Hydra* ist wurde nun überprüft, ob Behandlung der Hydren mit Rhosin einen Einfluss auf das RBD-GFP- Signal hat (Abb. 34). Dafür wurden Hydren mit mittleren Knospenstadien mit dem Inhibitor behandelt (siehe Material und Methoden VIII.7.3.2) Die Tiere wurden für unterschiedliche Zeiten mit Rhosin inhibiert und anschließend mittels RBD-GFP-, Phalloidin- und DAPI- angefärbt (Abb. 34). Für eine Vergleichbarkeit wurden die Färbungen am gleichen Tag mit den gleichen Lösungen angesetzt und die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit der gleichen Belichtungsdauer und Helligkeits (Gain)- Einstellung aufgenommen.

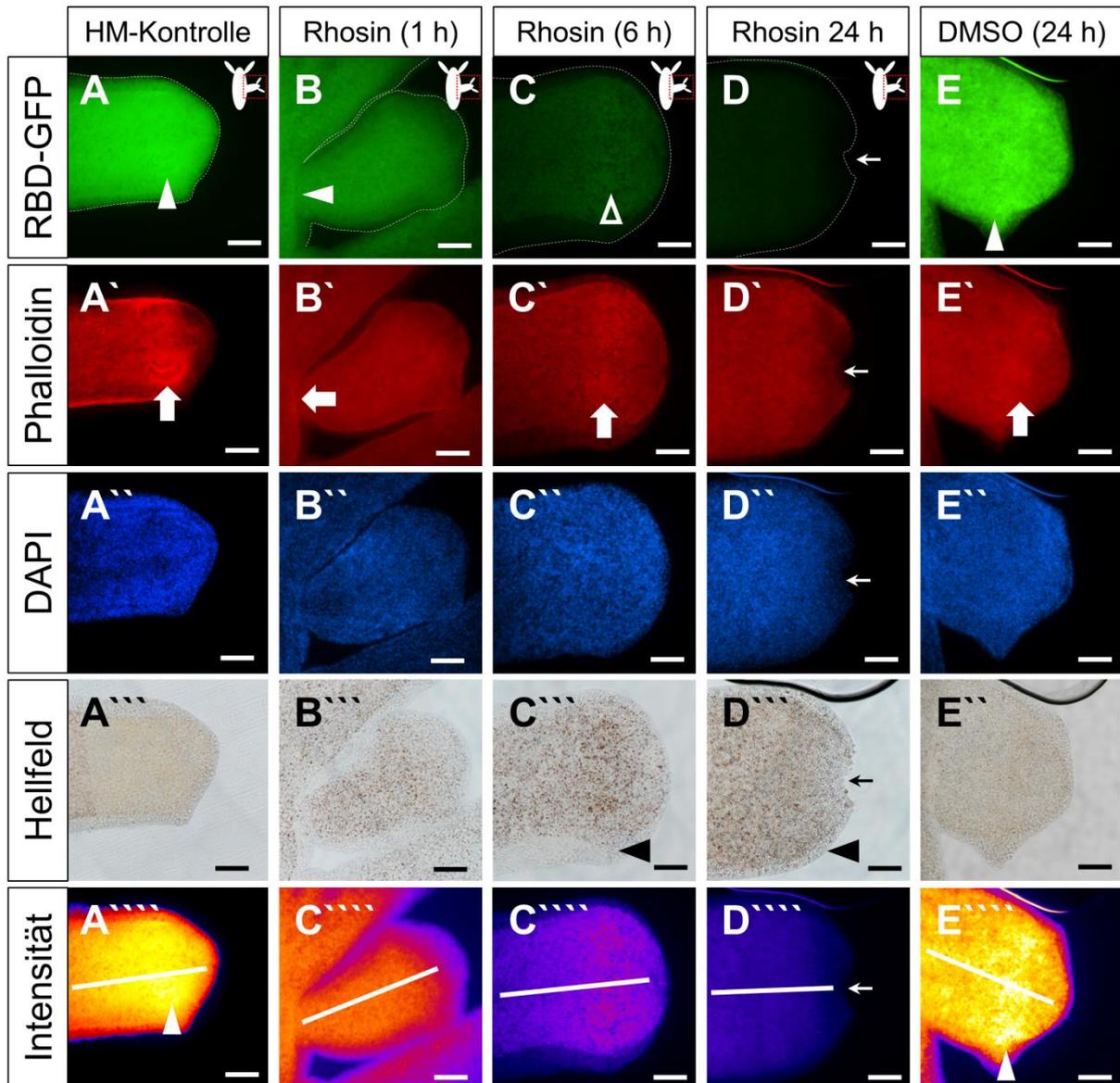


Abbildung 34: Abnahme des RBD-GFP- Signals durch ein kontinuierliche 24-stündige Inhibition mit dem RhoA- Inhibitor Rhosin an Knospen mittleren Stadiums. (A-E) Detektion des RBD-GFP- Signals an Rhosin (100 μ M) inhibierten Hydren mit Knospen im Stadium 4-6. Verstärktes RBD-GFP- Signal an der Knospensbasis und der evaginierenden Tentakel (weißer Pfeilkopf). Schwaches RBD-GFP- Signal an evaginierenden Tentakel (schwarze Pfeilköpfe). (A'-E') Färbung von F-Aktin mittels Phalloidin. Akkumulation und die Reorientierung der Aktinfasern (weißer Pfeil) . (A''-E'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-E''') Hellfeld- Aufnahmen der Knospen. Tentakel der Knospe bilden sich durch die Behandlung mit Rhosin zurück (schwarzer Pfeilkopf). (A''''-E''') Intensitätsanalyse des RBD-GFP- Signals. Verstärktes RBD-GFP- Signal in den evaginierenden Tentakel der Jungpolypen (weißer Pfeilkopf). Messgerade durch die evaginierende Knospe zur Messung der Signalintensität (Abb. 35) (D-D''') Eingerissenes Hypostom nach der 24- stündigen Inhibition mit Rhosin (Pfeil). Maßstabsbalken: 100 μ m.

An den Färbungen ist zu erkennen, dass die Inhibition mit Rhosin keinen Einfluss auf das Phalloidin-TRITC- und das DAPI- Signal hat (Abb. 34 A'-E''). Anhand der Färbung des F-Aktins kann man reorientierende Aktinfasern in den auswachsenden Tentakelknospen sowie eine Akkumulation des F-Aktins an der Knospensbasis erkennen (Abb. 34 A'-E'). Während bei der HM- und der Lösungsmittel- (DMSO) Kontrolle ein starkes RBD-GFP- Signal, vor

allen in den evaginierenden Tentakel der Jungpolypen nachweisbar ist (Abb. 34 A und E) nimmt dieses durch die Inhibition mit Rhosin deutlich ab (Abb. 34 B-D), bis nach 24 Stunden kaum noch RBD-GFP- Signal nachweisbar ist (Abb. 34 D). Die insgesamt deutlich reduzierte Färbung des RBD-GFPs lässt sich auch im Bereich der evaginierenden Tentakelknospen nach einer sechsstündigen Inhibition mit Rhosin nur noch sehr schwach nachweisen (Abb. 34 C). Anhand der Hellfeld- Aufnahmen ist zu erkennen, dass die evaginierenden Tentakel des Muttertieres und des Jungpolypen im Laufe der Inhibition mit Rhosin reduziert werden (Anhang 26). Weiterhin bedingt die Inhibition, dass das Hypostom der Knospe offen steht (Abb. 34 D-D''') und nicht wie bei der Kontrolle oder den kürzeren Inhibitionen geschlossen ist.

Entlang einer Messgeraden durch die evaginierende Knospe (Abb. 34 A''''-E''''') wurde die Intensität des RBD-GFPs gemessen. Dabei ist zu erkennen, dass die Behandlung mit Rhosin zu einer kontinuierlichen Reduktion der Intensität des RBD-GFP- Signals führt (Abb. 35). Nach einer sechsstündigen Inhibition sank die Signalintensität auf circa 50 % des Ausgangswertes und nach einer 24 stündigen Inhibition besaß das RBD-GFP- Signal lediglich nur noch circa 33 % des Ausgangswertes. Eine 24-stündige Inkubation mit dem DMSO, welches als Lösungsmittel des Inhibitors Rhosin diente, hatte keine Reduktion des RBD-GFP- Signals zur Folge (Abb. 35).

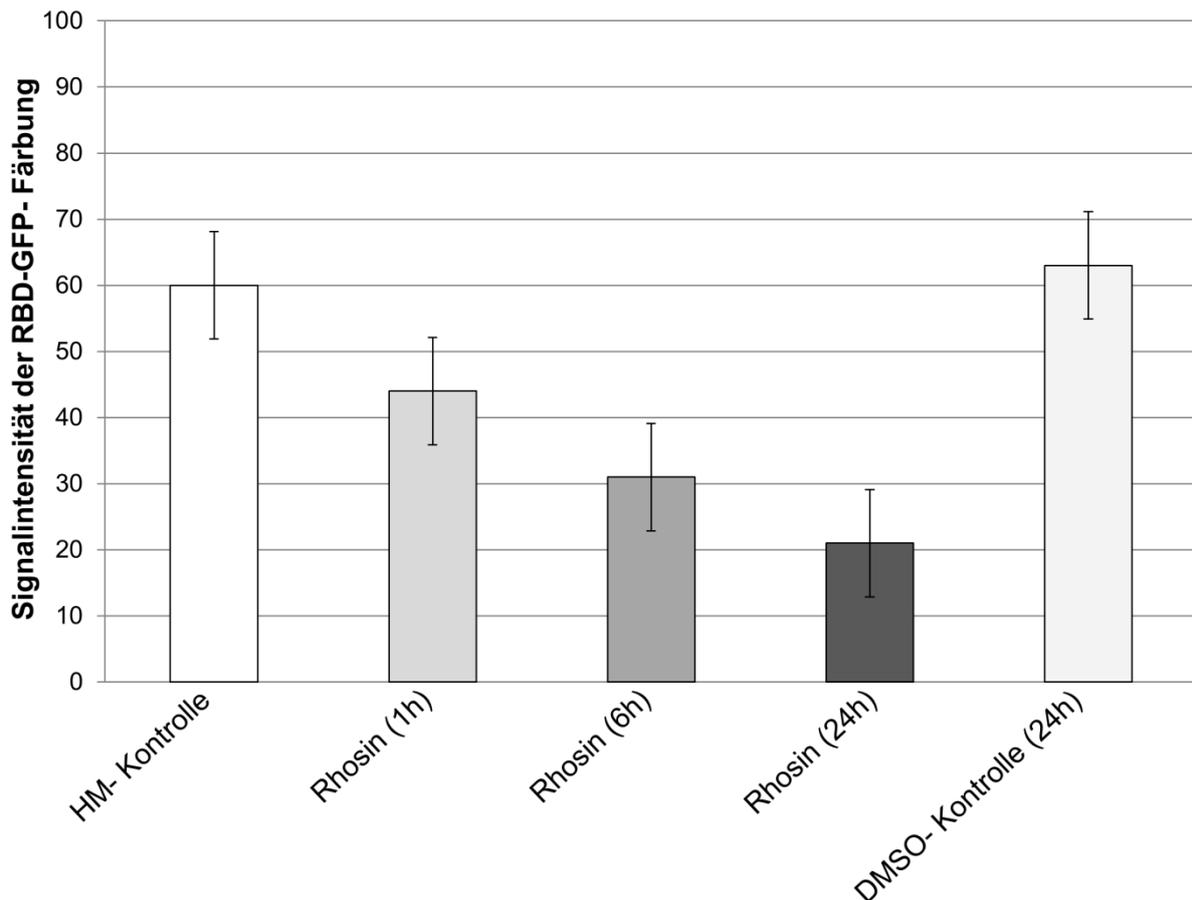


Abbildung 35: Analyse der Signalintensität des RBD-GFP- Signals entlang einer Messgeraden longitudinal durch auswachsende Knospen gelegt, nach Behandlung mit dem RhoA- Inhibitor Rhosin. Kontinuierliche Abnahme der Signalintensität im Vergleich zu den Kontrollen des Hydramediums (HM) und des Lösungsmittels (DMSO), nach 24-stündiger Inkubation. *Whisker* geben den Standardfehler an.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Behandlung mit dem RhoA- GTPase Inhibitor zu einer kontinuierlichen Reduktion des RBD-GFP- Signals bei *Hydra* führt. In den ersten Stunden der Inhibition (Inhibitionsdauer 1-6h) reduzierte sich das Signal um circa 50 %. Nach einer 24 stündigen Inhibition betrug die Intensität des RBD-GFP- Signals nur noch ungefähr 33 % der Intensität der HM- und DMSO- Kontrolle.

V.3.7 RBD-GFP und α RhoA- Antikörper sind in Nematoblasten kolokalisiert

Um zu untersuchen, wo inaktives und aktives Rho in *Hydra* lokalisiert sind wurde eine immunhistochemische Vierfachfärbung des α RhoA- Antikörpers, des RBD-GFPs, des F-Aktins und der Zellkerne durchgeführt. Der α RhoA- Antikörper bindet sowohl inaktives, als auch aktives RhoA, wohingegen RBD-GFP aktives RhoA detektiert. Dabei bestätigte sich, dass RBD-GFP verstärkt in evaginierenden Knospen und an der Knospenbasis nachgewiesen werden kann (Abb. 36 A–F).

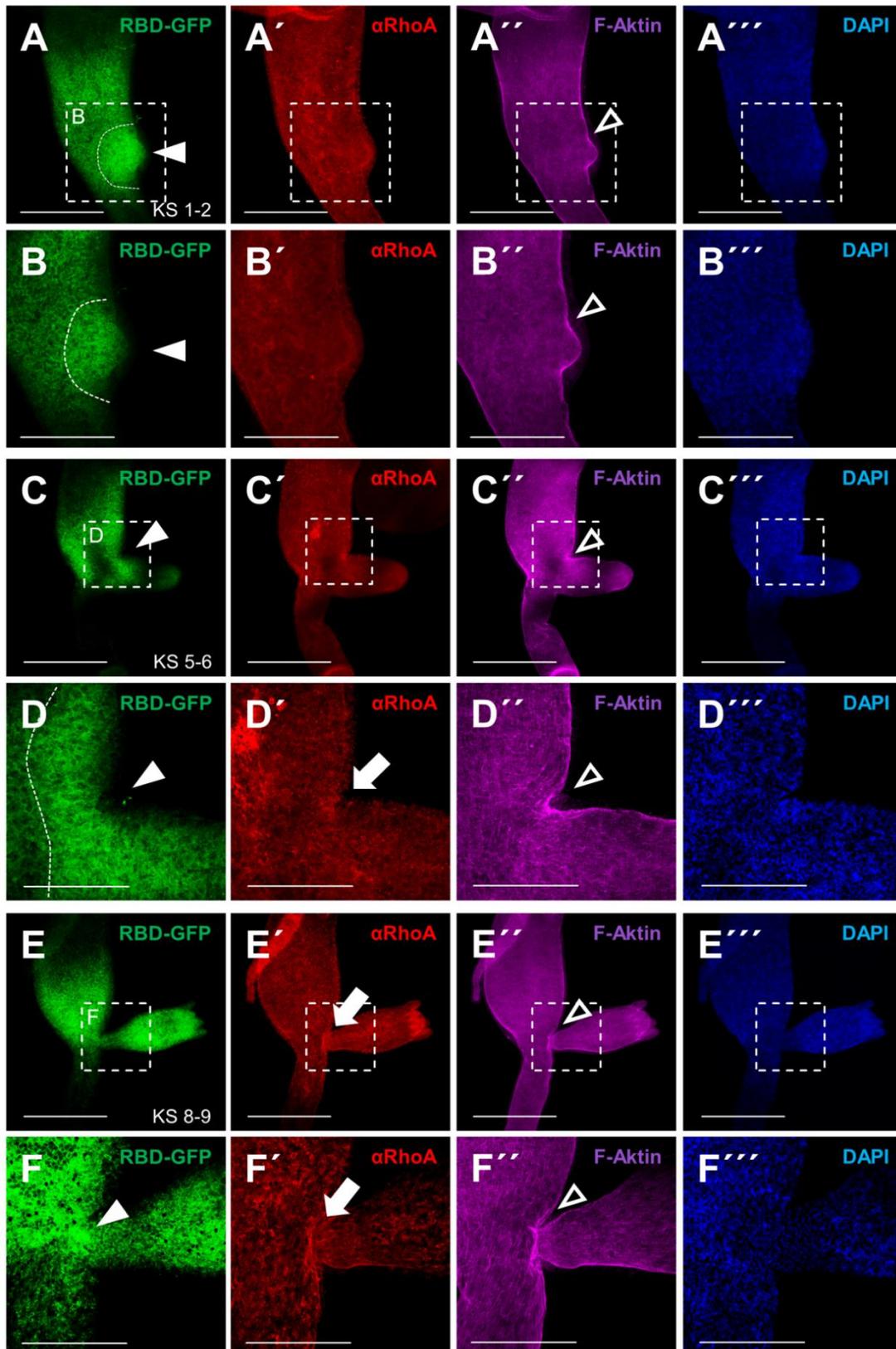


Abbildung 36: Immunhistochemische Vierfach-Färbung mit RBD-GFP, einem anti-RhoA-Antikörper, Phalloidin und DAPI. (A-F) Detektion des RBD-GFPs. Verstärktes RBD-GFP-Signal (weiße Pfeilköpfe). (A'-F') Detektion des anti-RhoA-Antikörpers. Verstärktes Signal des Antikörpers (weiße Pfeile). (A''-F'') Detektion des F-Aktins mittels Phalloidin 647. Akkumulation und eine Reorientierung der Aktinfasern (schwarze Pfeilköpfe). (A'''-F''') Detektion der Zellkerne mittels DAPI. Maßstabsbalken in A, C und E: 500 µm; Maßstabsbalken in den digitalen Vergrößerungen B, D und F: 200 µm. (Daten sind in Zusammenarbeit mit Lea Hüttlinger entstanden; von mir betreute MSc Studentin).

In diesen Regionen korreliert die (beginnende) Morphogenese mit einer Akkumulation der Aktinfasern des Zytoskeletts (Abb. 36 A'-F'). In den Übersichtsaufnahmen zeigte der α RhoA- Antikörper ein ubiquitäres Signal plus ein verstärktes Signal an der Basis auswachsenden Knospe oder der späten Knospe (Abb. 36 A'-F'). Dieses korreliert wiederum mit der Akkumulation, respektive Reorientierung von F-Aktin an der Basis der Knospen (Abb. 36 A''-F'').

Eine detaillierte Betrachtung der kLSM- *Stacks* der Detailaufnahmen zeigt, dass das RBD-GFP und der α RhoA- Antikörper im Zytoplasma von einigen Nematoblasten und großen I-Zellen kolokalisiert sind (Abb. 37 A-B'). Während in einigen Zellen, sowohl RBD-GFP, als auch α RhoA- Antikörper detektiert werden kann, ist in anderen Zellen lediglich RBD-GFP nachzuweisen (Abb. 37 A-B'). Anhand der orthogonalen Ansicht des kLSM- *Stacks* wurde die Lokalisation des α RhoA- Antikörpersignals genauer bestimmen (Abb. 37 A''-A'''). Dabei zeigte sich, dass der Antikörper hauptsächlich ektodermal lokalisiert ist (Abb. 37 A'''), während RBD-GFP auch endodermal nachgewiesen werden kann (Abb. 37 A''). Durch die Färbung der DNA, mittels DAPI, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den RBD-GFP- und bei den α RhoA- positiven Zellen um Nematoblasten und große I- Zellen handelt (Abb. 37 A', B', B'', B'''). Diese haben einen großen runden Zellkern, während ähnlich aussehende Nesselkapseln einen kleinen sichelförmigen Zellkern besitzen. Anhand des *Overlays* des α RhoA- Antikörpersignals und des F-Aktins konnte gezeigt werden, dass kein F-Aktin in den Nematoblasten oder den großen I-Zellen zu detektieren ist, während ein deutliches Signal des Antikörpers zu erkennen ist (Abb. 37 B'''). Gleichzeitig konnte aber eine Kolokalisation des Antikörpers und des F-Aktins nachgewiesen werden (Abb. 37 B'''). Auch bei mittleren und späten Knospenstadien ist mit dem α RhoA- Antikörper an der Basis der Knospen Signal nachzuweisen, welches mit der Färbung des F-Aktin mittels Phalloidin (Phalloidin 647) korreliert (Abb. 36 C'-F').

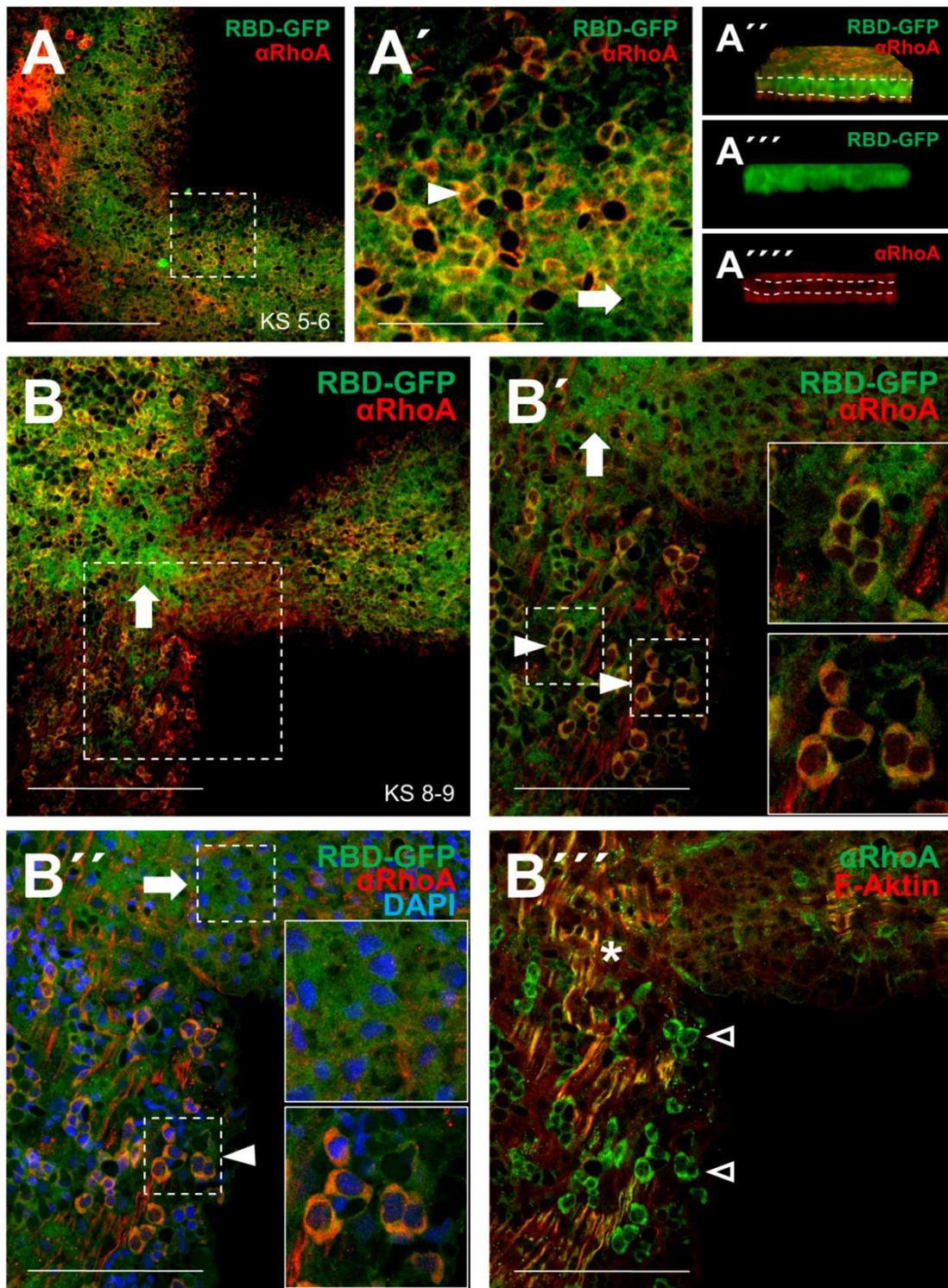


Abbildung 37: Immunhistochemische Vierfach-Färbung mit RBD-GFP, einem anti-RhoA-Antikörper, Phalloidin und DAPI an der Knospbasis von *Hydra*. (A, B) Detektion des RBD-GFP-Signals (grün), des anti-RhoA-Antikörpers (rot) und der Zellkerne (blau) an einer Knospe im Stadium 5-6 (A), beziehungsweise im Stadium 8-9 (B). (A', B', B'') Kolokalisation des RBD-GFPs und des anti-RhoA-Antikörpers (weißer Pfeilkopf) in Nematoblasten (A') und in großen I-Zellen (B', B''). Alleinige Detektion des RBD-GFPs (weißer Pfeil). (A''-A''') Orthogonale Ansicht der kLSM-Aufnahmen zeigt die ektodermale Bindung des anti-RhoA-Antikörpers, während RBD-GFP endo- und ektodermal bindet. Mesogloea (gestrichelte Linie). (B''). (B''') Detektion des anti-RhoA-Antikörpers in großen I-Zellen (schwarze Pfeilköpfe). Kolokalisation des anti-RhoA-Antikörpers mit den durch Phalloidin 647 angefärbten F-Aktinfasern (Stern). Maßstabsbalken: 200 µm; Maßstabsbalken in der digitalen Vergrößerung A': 50 µm. (Daten sind in Zusammenarbeit mit Lea Hüttinger entstanden; von mir betreute MSc Studentin).

Durch Färbungen des F-Aktins (Abb. 38 A') und des α RhoA- Antikörpers (Abb. 38 A''), an einer *Hydra* mit einer Knospe im Stadium 9, verdeutlicht das *Overlay* die klare Kolokalisation des F-Aktins und des RhoA Proteins an den Aktinfasern (Abb. 38 A, A''').

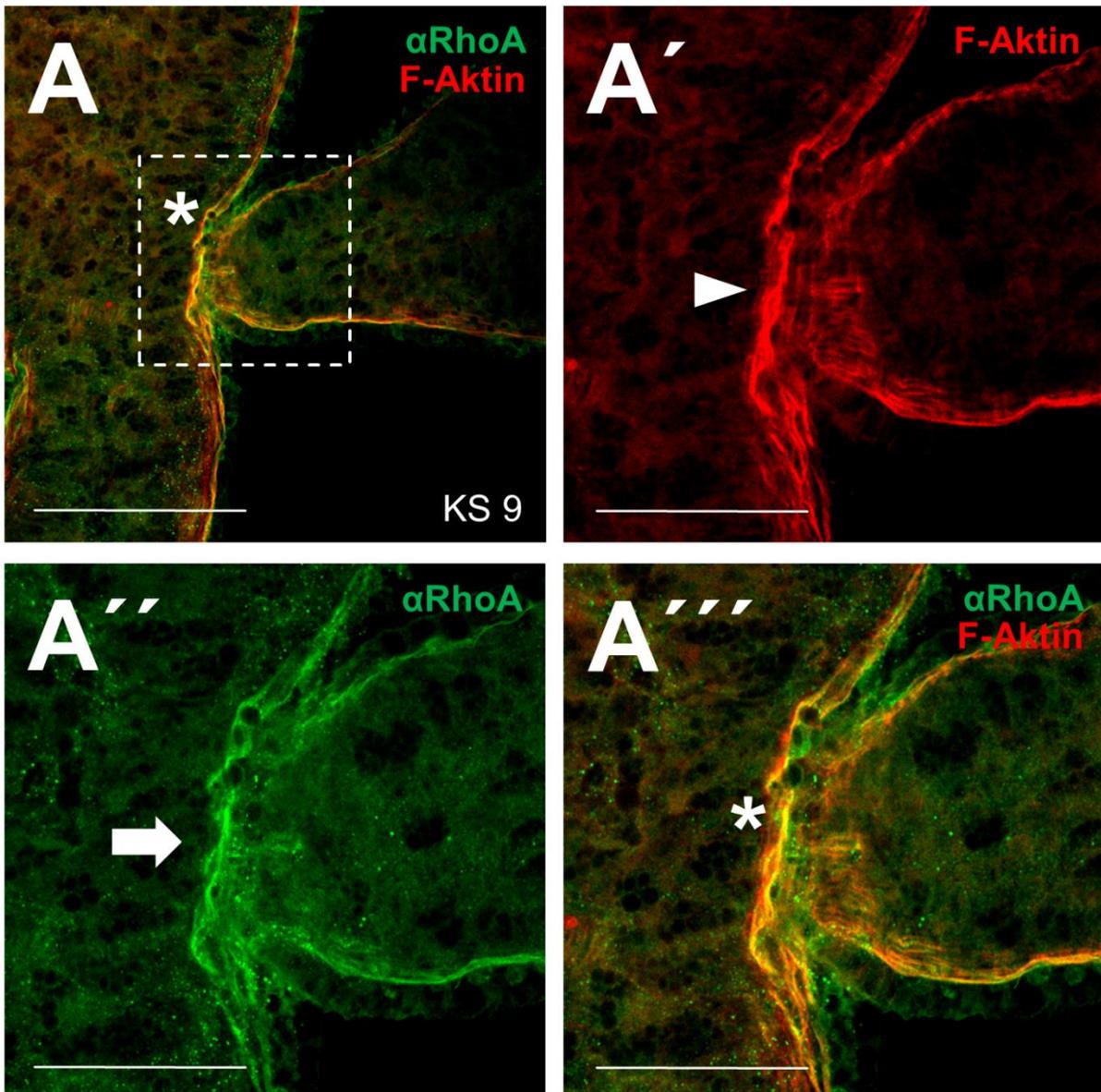


Abbildung 38: Nachweis der Kolokalisation des anti-RhoA- Antikörpers und der Aktinfasern an der Knospbasis einer Knospe im Stadium 8-9. (A) Overlay der Färbung des anti-RhoA- Antikörpers und des Phalloidins. Kolokalisation der Signale (Stern). (A'-A''') Vergrößerung aus A. (A') Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin 647. Akkumulation der Aktinfasern (weißer Pfeilkopf). (A'') Färbung des anti-RhoA- Antikörpers mittels eines TRITC markierten Sekundärantikörpers. Signal des anti-RhoA- Antikörpers an der Knospbasis (weißer Pfeil). (A''') Overlay der Kanäle zur Detektion der Kolokalisation (Stern). Maßstabsbalken: 200 μ m; Maßstabsbalken in den digitalen Vergrößerungen A'-A''': 50 μ m. (Daten sind in Zusammenarbeit mit Lea Hüttinger entstanden; von mir betreute MSc Studentin).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass RBD-GFP und der verwendete α RhoA- Antikörper im Zytoplasma von Nematoblasten und großen I-Zellen kolokalisiert sind (Abb. 37). Während RBD-GFP im Gewebe von auswachsenden Knospen und an der

Knospenbasis und umliegenden Gewebe verstärkt detektiert werden kann, fehlt dort spezifisches Signal des Antikörpers (Abb. 36). Dieser zeigt im Vergleich zum RBD-GFP jedoch eine direkte Kollokalisierung mit den F-Aktinfasern des Aktinzytoskeletts, hauptsächlich an der Basis von späten Knospen (Abb. 38). Neben der Kollokalisierung mit dem α RhoA-Antikörper im Zytoplasma von einigen ektodermalen Nematoblasten und großen I-Zellen nachzuweisen, ist RBD-GFP zusätzlich noch im Zytoplasma der Epithelmuskelzellen nachweisbar (Abb. 37 A-B´). RBD-GFP ist im Zytoplasma von ekto- und endodermalen Epithelmuskelzellen nachzuweisen, während sich das Signal des α RhoA- Antikörpers auf Zellen des Ektoderms beschränkt (Abb. 37 A´´-A´´´).

V.4 Untersuchung der Proteindomänenstruktur der GEFs Trio und Kalirin (Kratzer et al., 2019)

Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) vermitteln generell den Austausch von GDP zu GTP, wodurch sie die Rho- GTPasen aktivieren (Abb. 8). Über spezifische Domänen wird die Lokalisation der GEFs und somit indirekt auch der dazugehörigen Rho- GTPasen reguliert. Bereits 1985 wurde mit Dbl (*diffuse B-cell lymphoma*) das erste GEF in Säugetieren isoliert und beschrieben. Mittlerweile konnten eine Vielzahl an GEFs im gesamten Tierreich identifiziert werden. Diese weisen eine große Variabilität in ihrer Proteindomänenstruktur auf, wobei der Großteil aller GEFs durch eine *Dbl-homology-* (DH) und eine *Pleckstrin-homology-* (PH) charakterisiert ist (Schmidt und Hall, 2002). Zusätzlich zu diesen Domänen besitzen GEFs der Dbl- Familie katalytische- und Protein-Protein- Interaktionsdomänen, wodurch die Aktivität, die Lokalisation und die Beteiligung an unterschiedlichen Signalwegen gesteuert werden. Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Marie Kratzer aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Annette Borchers wurden die Proteindomänenstruktur und die phylogenetische Einordnung der beiden Rho- GEFs Trio und Kalirin (Kalrn), vor allem im Krallenfrosch (*Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*) und in *Hydra* untersucht (Kratzer et al., 2019). Bekannt ist, dass die beiden Mitglieder der Dbl- Familie Trio und dessen Paralog Kalirin jeweils zwei DH-PH- Domäneneinheiten besitzen, wobei die N-terminal gelegene DH-PH- Einheit die Rac1 GTPase aktiviert, während die C-terminal gelegene DH-PH- Domäneneinheit speziell die Aktivierung von RhoA reguliert (Bellanger et al., 1998; Blangy et al., 2000; Debant et al., 1996). Neben diesen charakterisierenden GEF- Proteindomänen besitzt Trio weitere GEF- typische Domänen, wie eine SEC14- (*domain in phosphatidylinositol transfer protein Sec14*) Domäne, sich wiederholende SPEC- (*spectrin repeats*) Domänen, ein SH3- (*src homology 3 domain*) Domäne, eine Ig- (*immunoglobuline-like*) Domäne und eine STK- (*serine/threonine kinase*) Domäne am C-Terminus. Kalirin weist eine fast identische Proteindomänenstruktur wie Trio auf, besitzt jedoch eine C-terminal

gelegene FN3- (*fibronectin type 3 domain*) Domäne zwischen der Ig- und der STK- Domäne, welche Trio fehlt (Schmidt und Hall, 2002) (Abb. 39).

V.4.1 Untersuchung der Proteindomänenstruktur der GEFs Trio und Kalirin

Zur Untersuchung der Proteindomänen wurden die annotierten humanen Sequenzen von Trio (Hs_TRIO) und Kalirin (Hs_KALRN) als *Query* genutzt, um entsprechende Sequenzen in unterschiedlichen Organismen der Neumünder (Deuterostomia), der Urmünder (Protostomia) und der Präbilateria, zu identifizieren (Anhang 3 und Anhang 4). Die Proteindomänen wurden grafisch an einem idealisierten Stammbaum (Telford et al., 2015) dargestellt (Abb. 39), der auf einem berechneten Stammbaum der Rho- GEFs Trio und Kalirin beruht (Abb. 40). Bei der Sequenzsuche wurden in dem diploiden *Xenopus tropicalis* ein Trio- Ortholog (Xt_Trio) sowie zwei Kalirin- Proteinfragmente (Xt_Kalrn1-2) identifiziert. Bei dem allotetraploiden *Xenopus laevis* hingegen wurden ein Trio- Ortholog (Xl_Trio) und zwei Kalirin- Paraloge, welche auf der S-Form (Xl_KalrnS), beziehungsweise der L-Form (Xl_KalrnL) des Chromosoms 9 lokalisiert sind, untersucht (*Xenopus*- Sequenzen wurden von Dr. Marie Kratzer identifiziert). Anhand des Alignments der Sequenzen ist zu erkennen, dass Trio und Kalirin in allen untersuchten Organismen weitestgehend konservierte Sequenzen in den jeweiligen Bereichen den Proteindomänen aufweisen (Anhang 21-24). Bei den anderen Wirbeltiersequenzen setzt sich die typische Proteindomänenstruktur von Trio N-terminal aus einer SEC14- Domäne, sechs sich wiederholenden SPEC- Domänen, den beiden GEF- Domänen und einer SH3- Domäne zusammen. Weiterhin besitzt Kalirin C-terminal eine zweite SH3- Domäne, eine Ig- Domäne, sowie eine Ser/Thr Kinase- Domäne. Im Vergleich zu Trio besitzt Kalirin eine zusätzliche SPEC- Domäne und eine C-terminal gelegene FN3- Domäne, welche die Kalirin- charakterisierenden Domäne darstellt und bei allen Trio- Sequenzen fehlt (Abb. 39 und Anhang 21-24). Ansonsten sind die Rho- GEFs Trio und Kalirin bezüglich ihrer Proteindomänenstruktur bei den Vertebraten weitestgehend identisch, während sie bei Invertebrata Varianzen in ihrer Domänenstruktur aufweisen können (Abb. 39). Bei Deuterostomia sind in der Regel jeweils sowohl Trio- als auch Kalirin- Sequenzen identifizierbar. Einigen Deuterostomia wie *Branchiostoma belcheri*, *Saccoglossus kowalevskii* und *Acanthaster planci* fehlen jedoch entsprechende Trio- Sequenzen, weshalb man von einem Trio-Verlust bei einigen Deuterostomia sprechen kann (Abb. 39 und Abb. 40). Aufgrund der Untersuchung der Proteindomänenstruktur ist zu erkennen, dass bei einigen Protostomia (*Drosophila melanogaster*, *Lottia gigantea* oder *Capitella teleta*) die C-terminal gelegenen Ig- Domäne, die STK- Domäne und die Kalirin- charakterisierende FN3- Domäne fehlen (Abb. 39 und Abb. 40), weswegen bei diesen Organismen von einem Kalirin-Verlust gesprochen werden kann (Abb. 39 und Abb. 40).

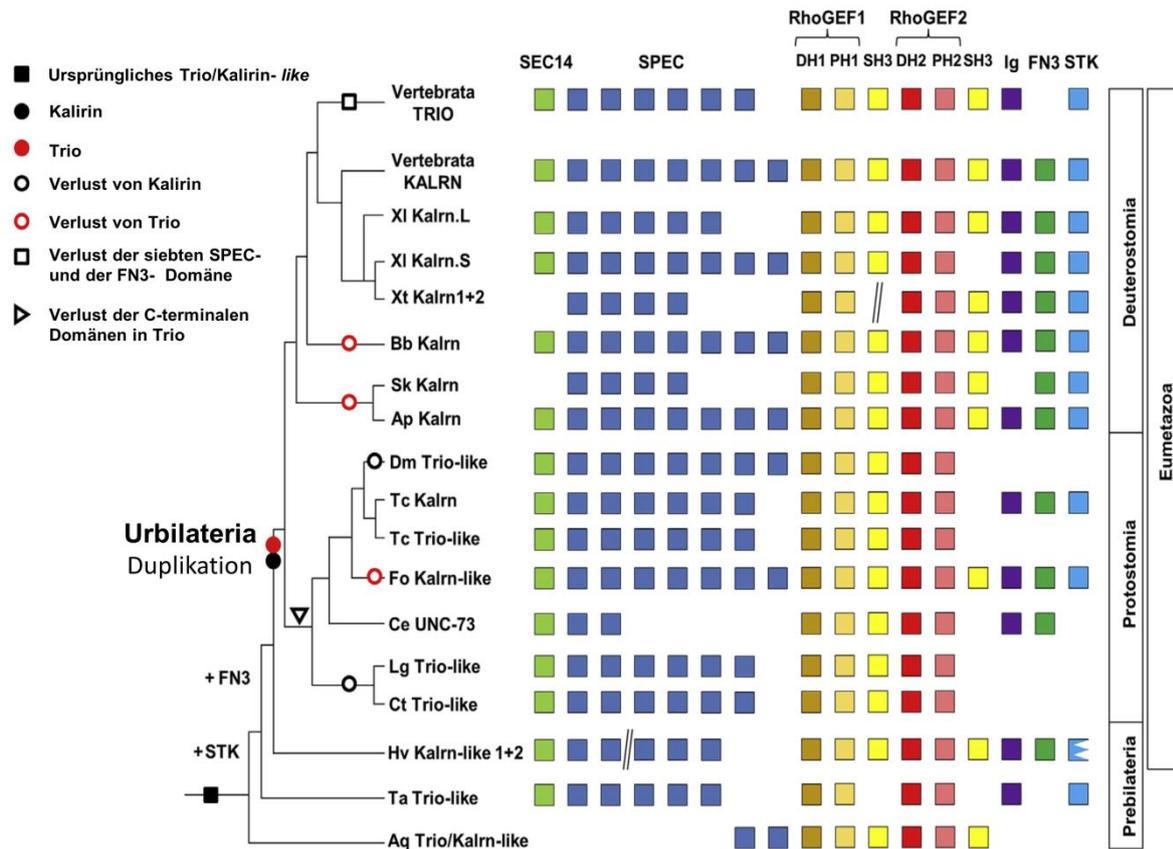


Abbildung 39: Grafische Zusammenfassung der Proteindomänenstruktur von Trio und Kalirin anhand eines idealisierten momentan akzeptierten Stammbaums (Kratzer et al., 2019). Der Stammbaum gibt die aktuell akzeptierte Phylogenie des Tierreiches wieder. Die unterschiedlichen Proteindomänen sind farblich markiert. Abkürzungen der Sepezies: Ap: *Acanthaster planci*; Aq: *Amphimedon queenslandica*; Bb: *Branchiostoma belcheri*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Ct: *Capitella teleta*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Fo: *Frankliniella occidentalis*; Hv: *Hydra vulgaris*; Lg: *Lottia gigantea*; Lg: Sk: *Saccoglossus kowalevskii*; Ta: *Trichoplax adhaerens*; Tc: *Tribolium castaneum*; Xl: *Xenopus laevis*; Xt: *Xenopus tropicalis*.// zeigt Lücken in den Sequenzen an.

Anhand des Schwammes *Amphimedon queenslandica* ist zu erkennen, dass bereits vor der Aufspaltung der Deuterostomia und der Protostomia ein ursprüngliches Trio/Kalirin existierte, welches sich wiederholende SPEC- Domänen und die beiden DH-PH- Domäneneinheiten (RhoGEF1 und RhoGEF2) beinhaltet. Im Vergleich dazu besitzt der Placozoe *Trichoplax adhaerens* die N-terminalen Domänen (Sec14 und fünf SPEC- Domänen) sowie die beiden DH-PH- Domäneneinheiten (RhoGEF1 und RhoGEF2), denen jedoch jeweils die anliegende SH3- Domäne fehlt. C-terminal findet sich in der Sequenz von *T. adhaerens* eine Ig- Domäne und eine STK- Domäne, die Kalirin- charakterisierende FN3- Domäne fehlt, weswegen von einer Trio-like Sequenz ausgegangen wird. Bei dem Cnidaria *Hydra* konnten zwei getrennte Sequenzen identifiziert werden, die zusammen den N-Terminus und den C-Terminus codieren. Wie bei *Trichoplax* ist in der Sequenz von *Hydra* die N-terminalen SEC14- und die fünf sich wiederholende SPEC- Domänen nachzuweisen. Weiterhin sind in der Sequenz des Süßwasserpolypten die beiden DH-PH- Domäneneinheiten (RhoGEF1 und RhoGEF2) samt den beiden anliegenden SH3- Domänen zu identifizieren, die bei *Trichoplax* fehlten. C-

terminal sind eine Ig-, eine unvollständige STK- und eine FN3- Domäne nachweisbar, welche die *Hydra*- Sequenz als Kalirin-like definiert (Abb. 39 und Abb. 40; Anhang 4 und Anhang 21-24).

Für eine detaillierte phylogenetische Analyse wurden ausschließlich die Sequenzen der Eumetazoa genutzt, da sowohl *Amphimedon*, als auch *Trichoplax* aufgrund ihrer großen Unterschiede zu den restlichen untersuchten Sequenzen eine sinnvolle Auftrennung des Baumes verhinderten (nicht gezeigte Daten). Allgemein kann man anhand des phylogenetischen Stammbaumes erkennen, dass die Auftrennung der Trio- und Kalirin-Sequenzen der Eumetazoa und die entsprechenden Trio-like- und Kalirin-like- Sequenzen der Protostomia eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit von 99 % und 100 % aufweisen. Lediglich die Kalirin-like- Sequenz von *Caenorhabditis elegans* (UNC-73) gruppiert sich basal zu den Bilateria außerhalb der restlichen Ecdysozoa, wie beispielweise *Drosophila* (Abb. 40).

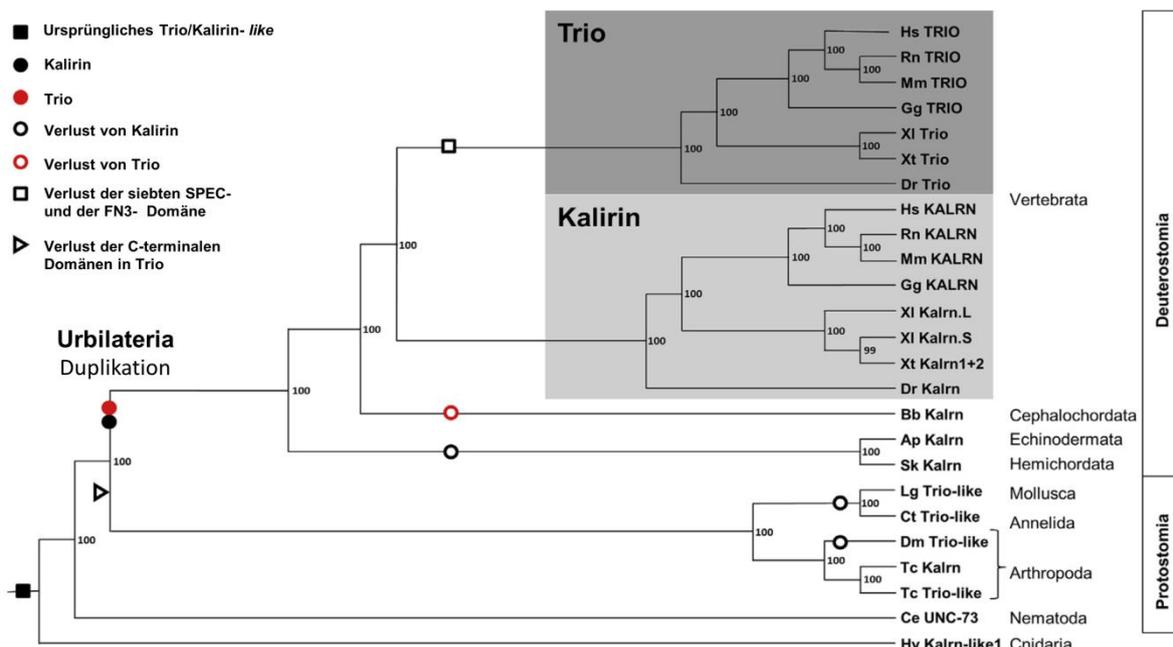


Abbildung 40: Phylogenetischer Stammbaum der Vertebraten und Invertebraten Trio- und Kalirin- Proteine. Abkürzungen entsprechen der Abbildung 39. Accession-Nummern in Anhang 3 Anhang 4.

Die Kalirin-like *Hydra*- Sequenz bildet als ursprünglichster Organismus des Stammbaums die Wurzel (*Root*) woran sich der restliche Baum auftrennt. Anhand des Stammbaumes ist eine klare Auftrennung der Protostomia und der Deuterostomia zu erkennen. Weiterhin wird deutlich, dass die untersuchten Wirbeltiersequenzen einen isolierten Ast bilden. Es ist eine eindeutige Trennung der Trio- (Abb. 40; dunkelgrau hinterlegt) und Kalirin- (Abb. 40; hellgrau hinterlegt) Sequenzen ersichtlich, trotz ihrer großen Ähnlichkeit zueinander. Im Gegensatz zu den Vertebraten existieren bei den Organismen der Invertebraten oft entweder eine Trio-

oder eine Kalirin- Sequenz, aber selten beide Sequenzen gleichzeitig in einem Organismus. Eine Ausnahme bildet der Arthropode *Tribolium castaneum*, der eine eindeutige Kalirin-Sequenz und eine als Trio-*like* identifizierte Sequenz besitzt.

Im Rahmen der Arbeit zu dieser Publikation konnte die *in-silico* Analyse eine komplexe und evolutionär interessante Entwicklung der Rho- GEFs Trio und Kalirin verdeutlichen. Bemerkenswerte Unterschiede in den Proteindomänen konnten zwischen den einzelnen Tierstämmen nachgewiesen werden, was auf dynamische Verluste und Gewinne der spezifischen Proteindomänen schließen lässt. Interessanterweise konnte bei *Hydra* lediglich eine Kalirin- homologe Sequenz identifiziert werden.

V.5 Relaxantien zur detaillierten *in vivo* Mikroskopie von *Hydra*

Um *Hydra in vivo* hochauflösend mikroskopieren zu können ist eine Immobilisierung des Polypen unabdingbar. Dazu wurde die immobilisierende Wirkung sowie die mögliche Beeinflussung von morphogenetischen Prozessen untersucht.

V.5.1 Linalool und Benzocain erzielen die effektivste Immobilisierung bei *Hydra*

Getestet wurden bekannte Relaxantien und lokale Anästhetika, wie MgCl₂, Lidocain, Linalool und Benzocain, deren immobilisierende, relaxierende und anästhetische Wirkung teilweise beschrieben ist (Bianchini et al., 2017; Rooper und Sweeny, 1983; Collymore et al., 2014, 2016; Daloe und Behbahani, 2019; Goel et al., 2019; Hanck et al., 2009; Letizia et al., 2003; Martins et al., 2016; Messenger et al., 1985; Neumcke et al., 1981; Park et al., 2011; Re et al., 2000; Romanelli et al., 2018; Sheets und Hanck, 2003; Smith et al., 2018). Zunächst wurde mit jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen die Fähigkeit der Immobilisierung, die Letalität der jeweiligen Konzentration (nach 24 Stunden bestimmt) und die Erholung, anhand der Fähigkeit Beute zu fangen und zu fressen, untersucht (Tab. 3). Die Hydren blieben für 24 Stunden in dem jeweiligen Relaxans, bevor dieses mehrmals ausgewaschen wurde. Anschließend (nach circa 30 Stunden) wurde untersucht, ob die Hydren in der Lage waren Artemien zu fangen und zu fressen. Die Wirkung des Relaxans wurde optisch nach 30 Minuten, nach zwei Stunden und nach vier Stunden kontrolliert und in keine ersichtliche Immobilisierung (-), minimale Immobilisierung (+), deutliche Immobilisierung (++) und starke Immobilisierung (+++) eingeteilt (Tab. 3). Dabei zeigte sich, dass die getesteten Konzentrationen von Magnesiumchlorid und Lidocain bei *Hydra* keine oder nur eine sehr geringe relaxierende Wirkung aufweisen und eine hohe Letalität (80-100 %) nach 24 Stunden aufwiesen. Die Polypen zerfielen meist innerhalb weniger Stunden unter dem Einfluss von Magnesiumchlorid oder Lidocain.

Tabelle 3: Untersuchung der Relaxantien Magnesiumchlorid, Lidocain, Benzocain und Linalool. Die Relaxantien wurden bezüglich ihrer immobilisierenden Wirkung nach 0,5 Stunden, 2 Stunden und 4 Stunden untersucht. Weiterhin ist die resultierende Letalität nach einer 24 stündigen Relaxierung sowie die Fähigkeit der Polypen nach der Relaxierung und einer anschließenden Erholungsphase von circa sechs Stunden, Beute fangen und fressen zu können aufgetragen. Die immobilisierende Wirkung wurde in unwirksam (-), leicht (+), mittel (++) und stark (+++) eingeteilt. Die effektivsten Konzentrationen wurden farblich hervorgehoben. N=5.

Relaxans	Konzentration	Immobilisierung (h)			Letalität (nach 24 h)	Beutefang (nach ca. 30 h)
		0,5	2	4		
MgCl ₂	• 0,25 % w/v	-	-	-	80 %	/
	• 0,5 % w/v (25 mM)	+	+	-	100 %	/
	• 1 % w/v	+	+	-	100 %	/
Lidocain	• 0,01 %	-	-	-	100 %	/
	• 0,02 % (9 mM)	++	+	-	100 %	/
	• 0,05 %	++	+	-	100 %	/
Benzocain	• 0,01 %	-	+	-	0 %	✓
	• 0,03 % (20 mM)	++	+++	++	0 %	✓
	• 0,05 %	+++	+++	++	10 %	✓
Linalool	• 0,01 %	+	-	-	0 %	✓
	• 0,02 % (1 mM)	+++	+++	++	0 %	✓ langsam
	• 0,04 %	+++	+++	++	30 %	✓ langsam

Auch bei Benzocain und Linalool ist zu erkennen, dass die geringsten Konzentrationen ebenfalls keine, beziehungsweise nur eine schwache Immobilisierung bei *Hydra* bewirkten. Die mittleren- und die hohen Konzentrationen hingegen hatten eine deutliche Immobilisierung des Polypen zur Folge. Diese waren lang gestreckt und zeigten nur selten die typische spontane Kontraktion. Allerdings zeigten Benzocain-relaxierte Tiere in den ersten Minuten oft ein einseitiges Eindrehen des Körpers (Abb. 41 M). Lediglich einzelne Tentakel bewegten sich (Abb. 41) und ein langsames Rotieren um die Körperachse konnte beobachtet werden. Weiterhin bewirkten nur die höchsten getesteten Konzentrationen eine Letalität von 10 % bei Benzocain, respektive 30 % bei Linalool. Alle Hydren, die mit Benzocain oder Linalool relaxiert wurden, waren am folgenden Tag nach einer kurzen Erholung in der Lage Artemien zu fangen und zu fressen, wobei auffiel, dass Linalool-relaxierte Hydren dabei langsam und lethargisch agierten. Die stärkste Immobilisierung der

Polypen ist innerhalb der ersten Stunden der Behandlung zu erkennen. Daher wurde für Benzocain und Linalool eine detaillierte Beobachtung der ersten 60 Minuten der Behandlung durchgeführt (Abb. 41), da dies ein realistischer kontinuierlicher Zeitraum für eine *in vivo* Mikroskopie des Süßwasserpolyphen ist.

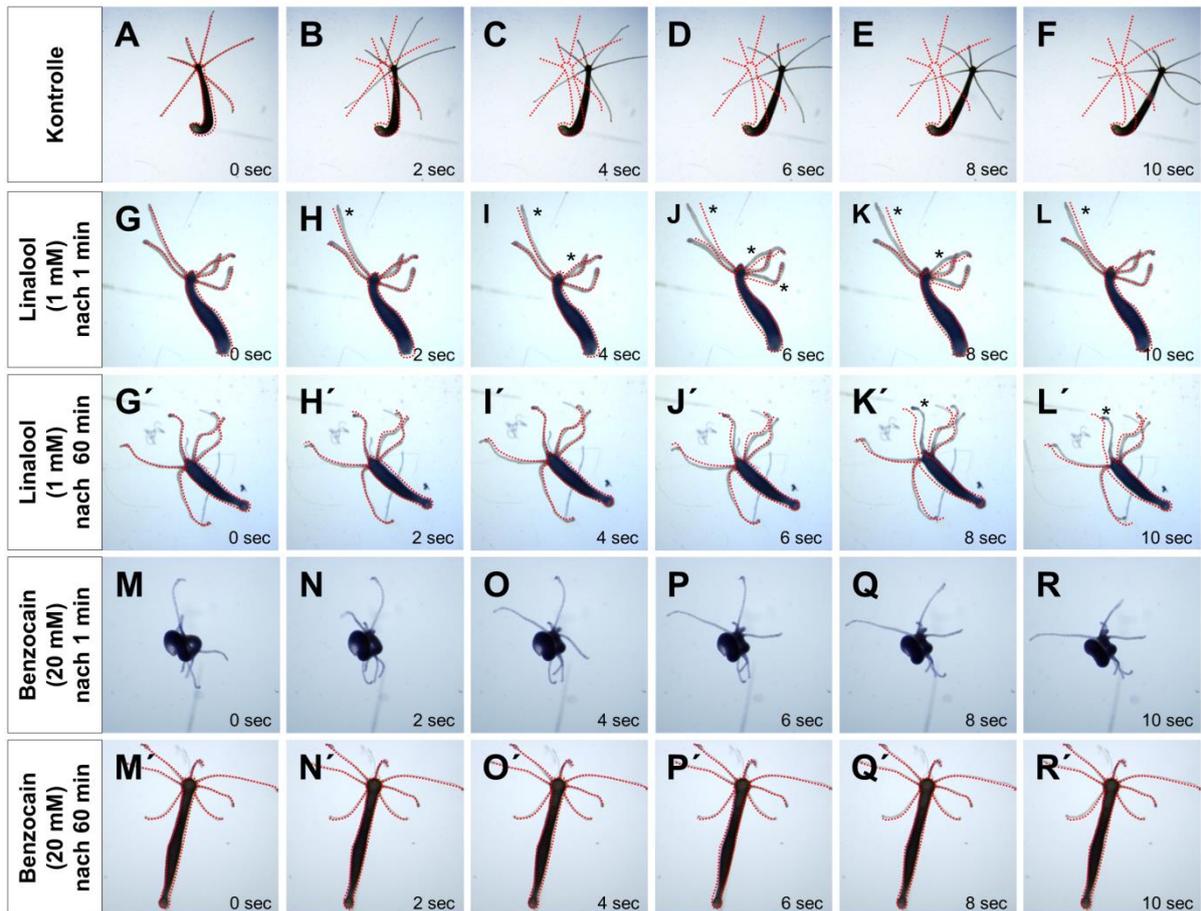


Abbildung 41: Bewegungsanalyse des Süßwasserpolyphen nach Immobilisierung durch Linalool und Benzocain mittels 10 Sekunden dauernden Videos. Alle zwei Sekunden wurden Einzelbilder der *Hydra* genommen. (A-F) Kontrolle in Hydramedium. (A) Einzelbild zum Zeitpunkt t_0 . (B-F) Kontinuierliche Bewegung kann durch die Abweichung zu der Ausgangsposition (rote Kontur) verfolgt werden. (G-L') Linalool- Behandlung (1 mM). (G-L) Langsame Bewegung nach einer einminütigen Behandlung mit Linalool. (G'-L') Kaum wahrnehmbare Bewegung nach einer 60-minütigen Behandlung mit Linalool. Bewegung einzelner Tentakel (Stern). (M-R') Benzocain-Behandlung (20 mM). (M-R) Eindrehen des Polypen nach einer einminütigen Behandlung mit Benzocain. (M'-L') Keine wahrnehmbare Bewegung nach einer 60-minütigen Behandlung mit Benzocain.

Anhand der Einzelbilder lässt sich das Bewegungsmuster des Polypen während der 10 Sekunden dauernden Videos nachvollziehen. Die Kontrolle zeigt, dass *Hydra* einer ständigen Bewegung des Körpers und der Tentakel unterliegt (Abb. 41 A-F). Im Gegensatz dazu zeigen Hydren, die durch Linalool immobilisiert wurden sowohl nach einer Minute, als auch nach 60 Minuten lediglich geringe Bewegungen der Tentakel. Die Körperachse driftet nur unmerklich von der Ausgangsposition weg (Abb. 41 H-L, K', L'). Dieser Grad der Immobilisierung hält für mindestens vier Stunden an, bevor leichte Bewegungen wieder erkennbar sind. Bei den Polypen, die mit Benzocain immobilisiert wurden ist zu erkennen,

dass sie sich nach einer 60-sekündigen Behandlung mit Benzocain in einigen Fällen spiralartig zusammendrehen (Abb. 41 M-R). Dies legt sich nach spätestens 20-30 Minuten und die Tiere sind für circa 3-4 Stunden relaxiert und immobilisiert. Nach 60 Minuten war keine Bewegung des Körpers oder der Tentakel mehr wahrnehmbar (Abb. 41 M'-R').

Allgemein kann man festhalten, dass sowohl Linalool als auch Benzocain eine effektive Immobilisierung der Hydren ermöglichen. Dabei immobilisiert Linalool unmittelbar nach Behandlungsbeginn, während sich Benzocain-behandelte Hydren oft kurzfristig spiralartig zusammendrehen, bevor sie weitestgehend vollständig immobilisiert sind. Dadurch ist bei Benzocain eine 20-30-minütige Vorinkubation der Hydren mit dem Relaxans notwendig.

V.5.2 Linalool führt zu massiven Veränderungen des Aktinzytoskeletts

Da Linalool die schnellste und effektivste Immobilisierung der Polypen bewirkte (Goel et al., 2019), wurde dessen möglicher Einfluss auf das Aktinzytoskelett mittels Phalloidin färbung untersucht. Dazu wurden Hydren für unterschiedliche Zeiträume kontinuierlich mit Linalool behandelt und anschließend Phalloidin- und DAPI-gefärbt (Abb. 42 A). Anhand der Kontrolle sind die geordneten Aktinfasern des Ektoderms (senkrecht verlaufend) und des Endoderms (horizontal verlaufend) deutlich zu erkennen (Abb. 42 B, I). Das Tier weist lang gestreckte Tentakel und eine typische kegelartige Hypostomform auf (Abb. 42 B).

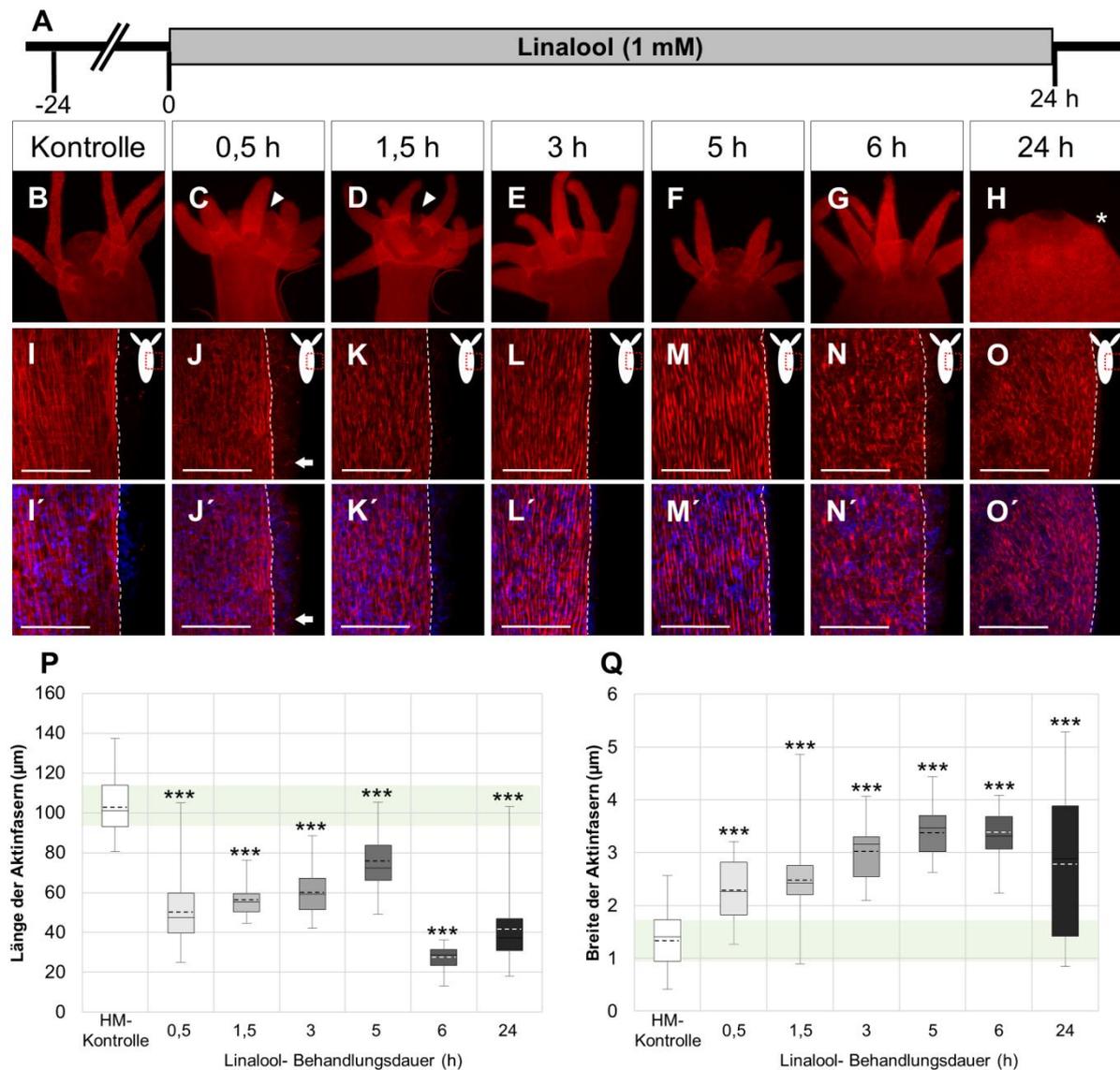


Abbildung 42: Veränderung der F-Aktin-Faser-Bildung durch eine kontinuierliche Behandlung mit Linalool (1 mM) für 24 Stunden. (A) Schema der kontinuierlichen Linalool-Behandlung (1 mM) für 24 Stunden. Zu markierten Zeitpunkten wurden Hydren zur statistischen Analyse fixiert und mit Phalloidin-TRITC- und DAPI gefärbt. (B-H) Phalloidin-TRITC Färbung der Aktinfasern der Kopfregion von *Hydra*. (I-O) Phalloidin-TRITC Färbung der Aktinfasern in der Körpersäule von *Hydra*. (C-H) Aufblähen der Kopfstruktur von *Hydra* während einer kontinuierlichen Linalool-Behandlung. (C, D) Nach 0,5 h und 1,5 h ist ein offenstehendes Hypostom erkennbar (weiße Pfeilköpfe). (H) Kontrahierte Tentakel (Stern) nach einer 24-stündigen Immobilisierung mit Linalool erzeugt den beschriebenen Lollipop-Phänotyp (Goel et al., 2019). (I-O') Maximale Projektion (kLSM Stack) der Aktinfasern in der Körpersäule zeigt verkürzte und verdickte Aktinfasern, während keine Veränderung der Zellkerne erkennbar ist. (J, J') Untypische longitudinale Aktinfasern im Ektoderm (weißer Pfeil). Mesogloea (gepunktete Linie). Maßstabsbalken: 100 µm. (P, Q) Box-Plot der Längen- und Breitenmessung der Aktinfasern. Die Werte der Quartile der Kontrolle sind grün hinterlegt.

Im Vergleich dazu ist an den Linalool-behandelten Hydren zu erkennen, dass das Hypostom 0,5 h und 1,5 h nach der Behandlung offen steht und dass die Tentakel deutlich zusammengezogen sind (Abb. 42 C, D). Im weiteren Behandlungsverlauf beult das Hypostom zunächst kegelförmig aus (Abb. 42 C-E), bevor später das gesamte Tier den

typischen Phänotyp verliert, und nach 24 Stunden den beschriebenen ballonartigen Lollipop-Phänotyp annimmt (Abb. 42 H und Anhang 27) (Goel et al., 2019). Die Tentakel verkürzen sich weiter bis sie nur noch als Tentakelknospen erkennbar sind (Abb. 42 H). Das Aktinzytoskelett zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine drastische Veränderung (Abb. 42 J-O). Nach einer 30-minütigen Behandlung weichen die F- Aktinfasern deutlich von dem longitudinalen und horizontalen Verlauf in Kontrolltieren ab und erscheinen zusätzlich verkürzt und verdickt (Abb. 42 J). Weiterhin sind untypische apiko-basale verlaufende Aktinfasern im Ektoderm nachzuweisen (Abb. 42 J). In dem Behandlungszeitraum von 1,5-5 Stunden verlaufen die Aktinfasern wieder etwas geordneter als nach 0,5 Stunden, sind jedoch unterbrochen und verdickt (Abb. 42 K-M). Nach einer sechsstündigen und nach einer 24-stündigen Behandlung mit Linalool erscheinen die Fasern wiederum deutlich ungeordneter (Abb. 42 N, M). Anhand der Phalloidin- und DAPI- Doppelfärbung ist zu erkennen, dass während einer 24-stündigen Linalool- Behandlung das F-Aktin und die Zellkerne der ektodermalen Epithelmuskelzellen zum Teil gut detektiert werden können (Abb. 42 J', N'). Jedoch gibt es während der 24-stündigen Behandlung auch Zeitpunkte an denen die ektodermalen Epithelmuskelzellen kaum zu erkennen sind und sehr dünn erscheinen, da die Zellkerne lediglich als dünne Reihe direkt auf der Mesogloea zu erkennen sind (Abb. 42 L', M', O').

Die Färbung der F- Aktinfasern mittels Phalloidin wurde genutzt, um die Länge und die Breite der Aktinfasern auszumessen und graphisch anhand eines Box-Plots darzustellen (Abb. 42 P, Q). Dabei zeigte sich, dass die Aktinfasern durch eine Behandlung mit Linalool im Vergleich zu der Kontrolle signifikant verkürzt sind (Abb. 42 P). In der Kontrolle beträgt die durchschnittliche Länge der Aktinfasern circa 100 μm , welche über basale Fortsätze (Myoneme) der Epithelmuskelzellen in Verbindung stehen und dadurch als Fasereinheit erscheinen. Nach 0,5 Stunden in Linalool verkürzen sich die Aktinfasern des Polypen auf durchschnittlich ungefähr 50 μm , bevor sie sich schrittweise bis zu einer fünfständigen Linalool- Behandlung wieder auf knapp 80 μm im Durchschnitt verlängern. Ab einer Behandlungsdauer von sechs Stunden ist jedoch wieder eine deutliche Verkürzung der Aktinfasern auf durchschnittlich circa 30 μm erkennbar. Nach einer kontinuierlichen Behandlung mit Linalool für 24 Stunden beträgt die Länge der Aktinfasern im Durchschnitt 30-40 μm . Anhand der *Whisker* des Box-Plots sind die Maxima und Minima der Messungen ersichtlich, die vor allem direkt nach Behandlungsbeginn (0,5 h) und nach der längsten Behandlung von 24 Stunden am weitesten voneinander abweichen (Abb. 42 P).

Bezüglich der Dicke der Aktinfasern konnte bei der Kontrolle ein Durchschnittswert von circa 1,5 μm ermittelt werden (Abb. 42 Q). Durch die Behandlung mit dem Relaxans Linalool nimmt die Dicke der Aktinfasern signifikant zu. So ist nach 0,5 h ein Durchschnittswert von

circa 2,2 μm , nach 1,5 h von circa 2,5 μm , nach 3 h von circa 3 μm , nach 5 h und 6 h jeweils von circa 3,2 μm und nach 24 Stunden von circa 2,8 μm nachzuweisen (Abb. 42 Q). Daran ist zu erkennen, dass die Verdickung der Aktinfasern kontinuierlich mit der Dauer der Linalool- Behandlung ansteigt, bevor die Fasern nach 24 Stunden wieder dünner werden, im Vergleich zu der 5 h und 6 h Behandlung.

Eine Behandlung mit dem Relaxans Linalool beeinflusst das Aktinzytoskelett in *Hydra* also stark. Die Fasern sind zum Teil ungeordnet, deutlich verkürzt und verdickt. Weiterhin ist während der kontinuierlichen Behandlung mit Linalool zu erkennen, dass sich der Phänotyp des Polypen verändert. Zunächst beult das Hypostom kegelförmig aus und die Mundöffnung steht offen. Nach einer 24 stündigen Behandlung verliert der gesamte Polyp seine langgestreckte Form und nimmt einen ballonartigen Lollipop- Phänotypen an, wobei die Tentakel nur noch als Tentakelknospen erkennbar sind.

V.5.3 Effekt der Relaxantien auf das Aktinzytoskelett

Um einen Vergleich zu den anderen Relaxantien ziehen zu können wurde für alle Relaxantien eine Behandlungsdauer von zwei Stunden gewählt, welches einer realistischen Zeitspanne für eine *in vivo* Mikroskopie des Süßwasserpolyten entspricht (Abb. 43).

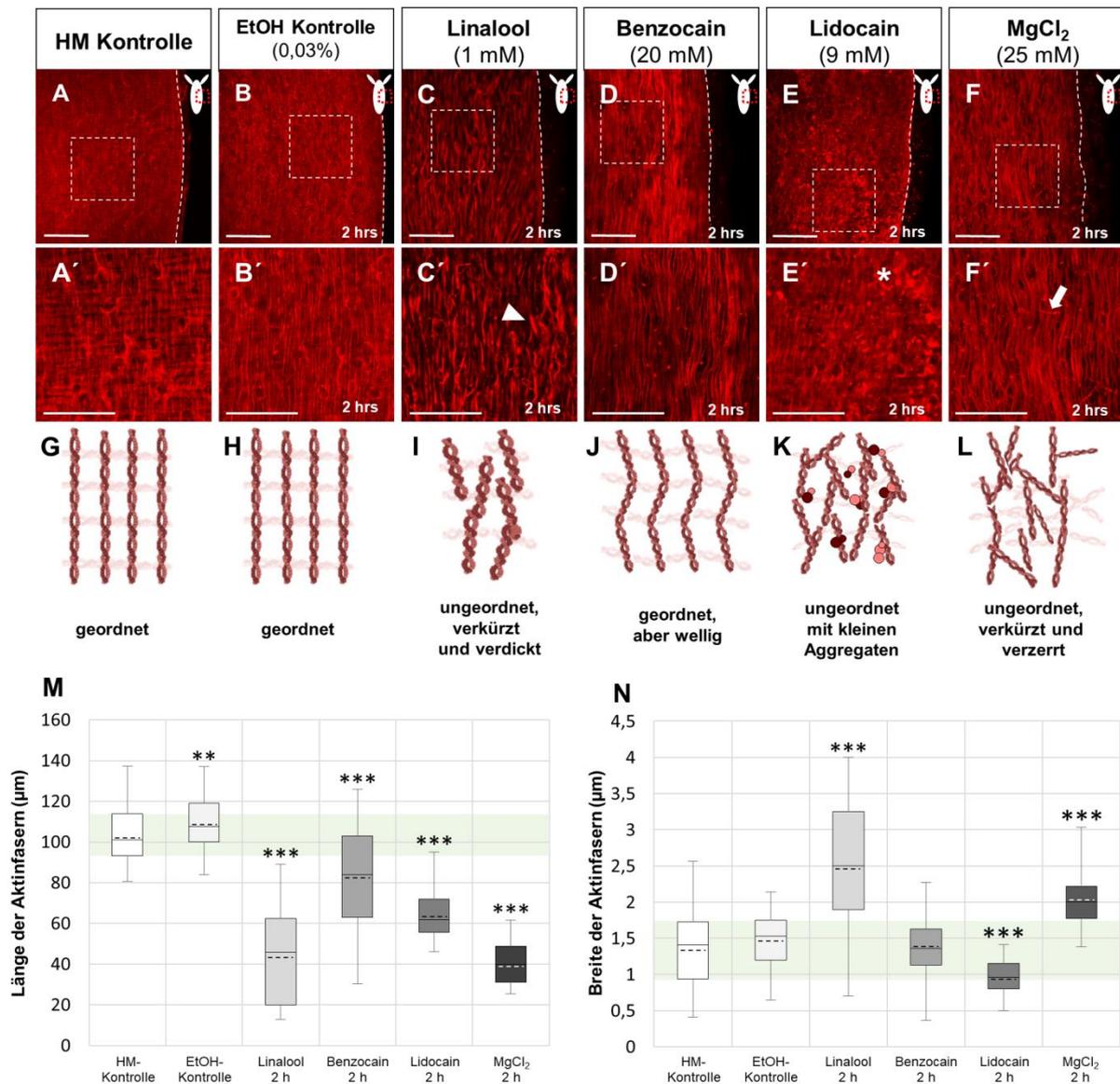


Abbildung 43: Einfluss einer zweistündigen Behandlung mit den unterschiedlichen Relaxantien auf die F-Aktinfasern bei *Hydra*. (A-F) Maximale Projektion (kLSM Stack) der Phalloidin-TRITC-Färbung der Aktinfasern in der Körpersäule von *Hydra*. (A', B') Typischer Verlauf der endo- und ektodermalen Aktinfasern. (C') Verdickte und verkürzte Aktinfasern nach einer zweistündigen Immobilisierung mit Linalool (1 mM) (weißer Pfeilkopf). (D') Typisch geordnete, aber leicht wellig verlaufende Aktinfasern nach einer zweistündigen Immobilisierung mit Benzocain (20 mM). (E') Ungeordnete und verkürzte Aktinfasern mit Aktinaggregaten (Stern) nach einer zweistündigen Immobilisierung mit Lidocain (9 mM). (F') Ungeordnete, verkürzte und verdrehte Aktinfasern (weißer Pfeil) nach einer zweistündigen Immobilisierung mit MgCl₂. (G-L) Schemata des Einflusses der Relaxantien auf die F-Aktin-faser-Bildung in *Hydra*. (M, N) Box-Plot der Längen- und Breitenmessung der Aktinfasern. Die Werte der Quartile der HM- Kontrolle sind grün hinterlegt.

Dabei zeigte sich, dass die Aktinfasern der endo- und ektodermalen Epithelmuskelzellen der Hydramedium (HM)- Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle, welche entsprechend dem zur Lösung der Relaxantien benötigten Anteil an EtOH beinhaltet, geordnet senkrecht respektive waagrecht verlaufen (Abb. 43 A-B', G, H). Im Vergleich dazu sind die Aktinfasern nach einer zweistündigen Behandlung mit Linalool, vergleichbar mit einer 90-minütigen und einer dreistündigen Behandlung (Abb. 42), ungeordnet und erscheinen unterbrochen (Abb. 43 C, C').

Die Behandlung mit dem Lokalanästhetikum Benzocain hingegen hat einen geringen Effekt auf den Verlauf der Aktinfasern in *Hydra*. Die Fasern zeigen den typischen longitudinalen Verlauf der ektodermalen- und den horizontalen Verlauf der endodermalen Myoneme. Lediglich ein wellenartiger Verlauf der F- Aktinfasern ist nach der Benzocain- Behandlung anhand der Phalloidininfärbung zu erkennen (Abb. 43 D, D', J). Der Ionenkanalblocker Lidocain hingegen beeinträchtigt die Aktinfasern des Zytoskeletts massiv. Die Fasern sind im Vergleich zur Kontrolle deutlich ungeordneter und Aktinaggregate werden sichtbar (Abb. 43 E, E', K). Auch eine zweistündige Behandlung mit Magnesiumchlorid bewirkt bei *Hydra*, dass die Aktinfasern ungeordnet verlaufen und verdreht (bis hin zu spiraligen Formen; Anhang 11) vorliegen (Abb. 43 F, F', L).

Messungen der Länge der Aktinfasern zeigten, dass bei den beiden Kontrollen vergleichbar eine durchschnittliche Faserlänge von circa 100-110 μm ermittelt werden konnte (Abb. 43). Die zweistündige Behandlung mit Linalool bewirkt eine Verkürzung der Aktinfasern auf durchschnittlich circa 40 μm , genau wie eine zweistündige Behandlung mit MgCl_2 . Bei den Lidocain- behandelten Hydren konnte eine durchschnittliche Länge der Aktinfasern von 60 μm bestimmt werden, während Benzocain- behandelte Hydren eine Faserlänge von 80-90 μm im Durchschnitt aufweisen. Anhand des Box-Plots (Abb. 43 M) ist zu erkennen, dass das obere Quartil der zweistündigen Benzocain- Behandlung die Werte der Kontroll- Quartile erreicht.

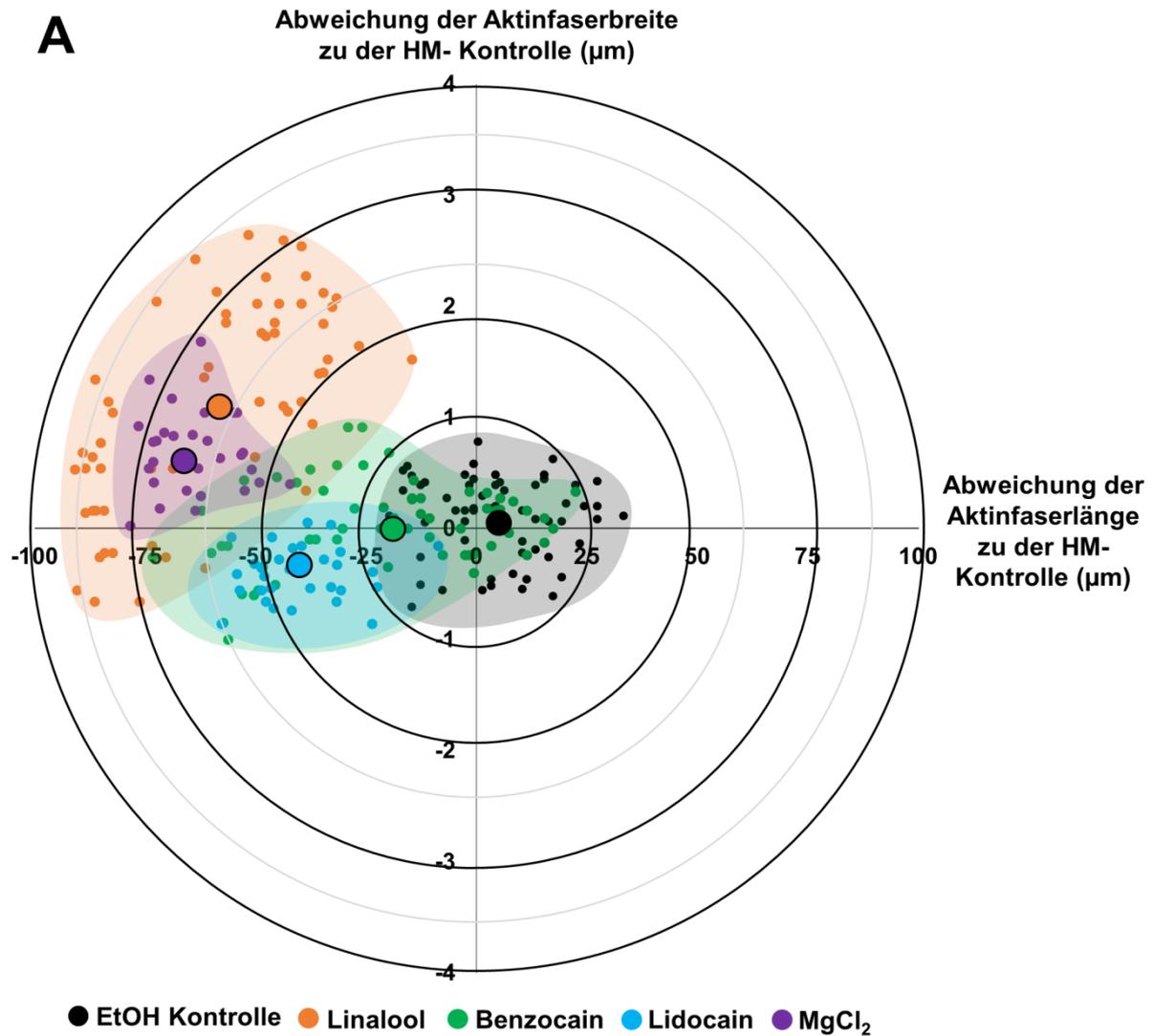
Die Analyse der Aktinfaserbreite zeigte sowohl bei der HM- Kontrolle, als auch bei der EtOH- Kontrolle eine durchschnittliche Faserbreite von jeweils circa 1,5 μm (Abb. 43 N). Nach einer zweistündigen Inkubation mit Linalool konnte eine Zunahme der Faserbreite auf circa 2,5 μm im Durchschnitt ermittelt werden. Die Behandlung mit Benzocain hatte keinen Einfluss auf die Breite der Aktinfasern, während Lidocain eine leichte Reduktion der Faserbreite auf durchschnittlich circa 1 μm bewirkte. Im Gegensatz dazu bewirkte die zweistündige MgCl_2 - Bewirkung wie Linalool eine Zunahme der Aktinfaser- Breite auf circa 2 μm im Durchschnitt (Abb. 43 N).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach einer zweistündigen Behandlung alle getestete Relaxantien die Länge der Aktinfasern verkürzten, wobei Benzocain die geringste Abweichung zu den Kontrollen aufwies (Abb. 43 M). Bei der Analyse der Aktinfaserbreite zeigte Benzocain keine Abweichung zu der Kontrolle, wohingegen die anderen getesteten Relaxantien eine Zunahme, beziehungsweise bei Lidocain eine Reduktion der Aktinfaserbreite zeigten (Abb. 43 N).

Um die Abweichung der Aktinfaser- Länge und -Breite in Relation zu der HM- Kontrolle zu setzen wurde jeweils die Differenz zu der HM- Kontrolle berechnet und in einem Wolkendiagramm aufgetragen. Anhand der Verteilung der Daten innerhalb der Wolken ist die Streuung der Daten ersichtlich, wobei die Mittelwerte der Daten hervorgehoben sind (Abb. 44 A). Weiterhin kann das Streuungsverhältnis ($\text{span}(90)$) berechnet werden. Dies erlaubt eine Aussage über die Streuung der Daten, indem die Extrema (oberen 5 % der Daten und unteren 5 % der Daten) nicht berücksichtigt werden. Die HM- Kontrolle wird dabei als Referenz angesehen und je näher die ermittelten $\text{span}(90)$ - Werte an null sind, umso geringer ist die Streuung der Daten (Abb. 44 B).

Durch das Wolkendiagramm ist deutlich zu erkennen, dass die Werte der EtOH- Kontrolle sich um das Diagrammzentrum verteilen, welches die Werte der HM- Kontrolle darstellt und somit wiederum als Referenzwert angesehen werden kann (Abb. 44 A). Die Datenwolke der EtOH- Kontrolle weist keine weiträumige Verteilung auf und auch die berechneten $\text{span}(90)$ - Werte weisen auf keine große Streuung hin und der ermittelte Mittelwert der Daten entspricht weitestgehend der HM- Kontrolle (Abb. 44).

Für die Daten der Aktinfaser- Länge und -Breite der Linalool- und Benzocain- Behandlung konnte eine recht große Streuung der Daten festgestellt werden. Für Lidocain und MgCl_2 hingegen konnte eine deutlich geringere Streuung der Daten nachgewiesen werden (Abb. 44).



B

		HM-Kontrolle	EtOH-Kontrolle	Linalool	Benzocain	Lidocain	MgCl ₂
Span(90)	Länge der Aktinfasern	1	1,1	1,4	1,8	0,8	0,6
	Breite der Aktinfasern	1	0,8	2	0,9	0,5	0,8

Abbildung 44: Wolkendiagramm und span(90)- Werte der Abweichung der Breite- und der Länge der Aktinfasern nach einer zweistündigen Immobilisierung mit unterschiedlichen Relaxantien. (A) Die Werte wurden in Relation zu den Daten der Hydramedium (HM)- Kontrolle aufgetragen. Der Mittelwert der jeweiligen Daten ist als verdickter Punkt hervorgehoben. Abweichung der der EtOH- Kontrolle zu der HM- Kontrolle (graue Wolke). Abweichung nach einer zweistündigen Immobilisierung mit Benzocain (grüne Wolke), mit Lidocain (blaue Wolke), mit Linalool (orange Wolke) und mit MgCl₂ (violette Wolke). (B) Der span(90)- Wert gibt das Streuungsverhältnis der Daten wieder. Je näher der span(90)- Wert an null ist, desto geringer ist die Streuung der Daten.

Anhand der ermittelten Werte für die Aktinfaserlänge und die Aktinfaserbreite nach einer Behandlung mit Benzocain wird deutlich, dass die Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Breite der Aktinfasern hat (Abb. 44). Eine Verkürzung der Aktinfasern ist wie bei den

anderen Relaxantien ersichtlich. Dabei konzentriert sich der Großteil der Benzocain- Daten im Zentrum des Diagramms, wodurch der hervorgehobene Mittelwert nicht stark von der Kontrolle abweicht (Abb. 44 A). Allerdings ist auch bei Benzocain eine große Streuung der Daten der Aktinfaserlänge anhand der weit verteilten Werte im Diagramm, sowie durch die berechneten $\text{span}(90)$ - Werte nachzuweisen (Abb. 44 B).

Festzuhalten ist, dass die beiden effektivsten Relaxantien Linalool und Benzocain die größte Streuung der Daten hinsichtlich der gemessenen Aktinfaserlänge und Aktinfaserbreite aufweisen. Der Mittelwert der Aktinfaser- Daten der Benzocain- Behandlung entsprechen jedoch von allen getesteten Relaxantien am ehesten den Werten der Kontrollen.

V.5.4 Benzocain führt zu den geringsten Veränderungen der Aktinfaserorientierung bei *Hydra*

Um ein Maß der veränderten Orientierung der Aktinfasern durch eine Behandlung mit den unterschiedlichen Relaxantien zu haben, wurde der Winkel der ektodermalen Aktinfasern, nach einer zweistündigen Inkubation mit den jeweiligen Relaxantien bestimmt. Die Winkel wurden in Relation zu einem linearen Verlauf gesetzt und graphisch dargestellt (Abb. 45). Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten Aktinfasern der HM- Kontrolle maximal zu 5° von einem senkrechten Verlauf abwichen. Die EtOH- Kontrolle wich bei 92,5 % der Aktinfasern zu maximal 5° -, und bei 7,5 % der Aktinfasern zu 5° - 10° von einem senkrechten Faserverlauf ab (Abb. 45 und Tab. 4).

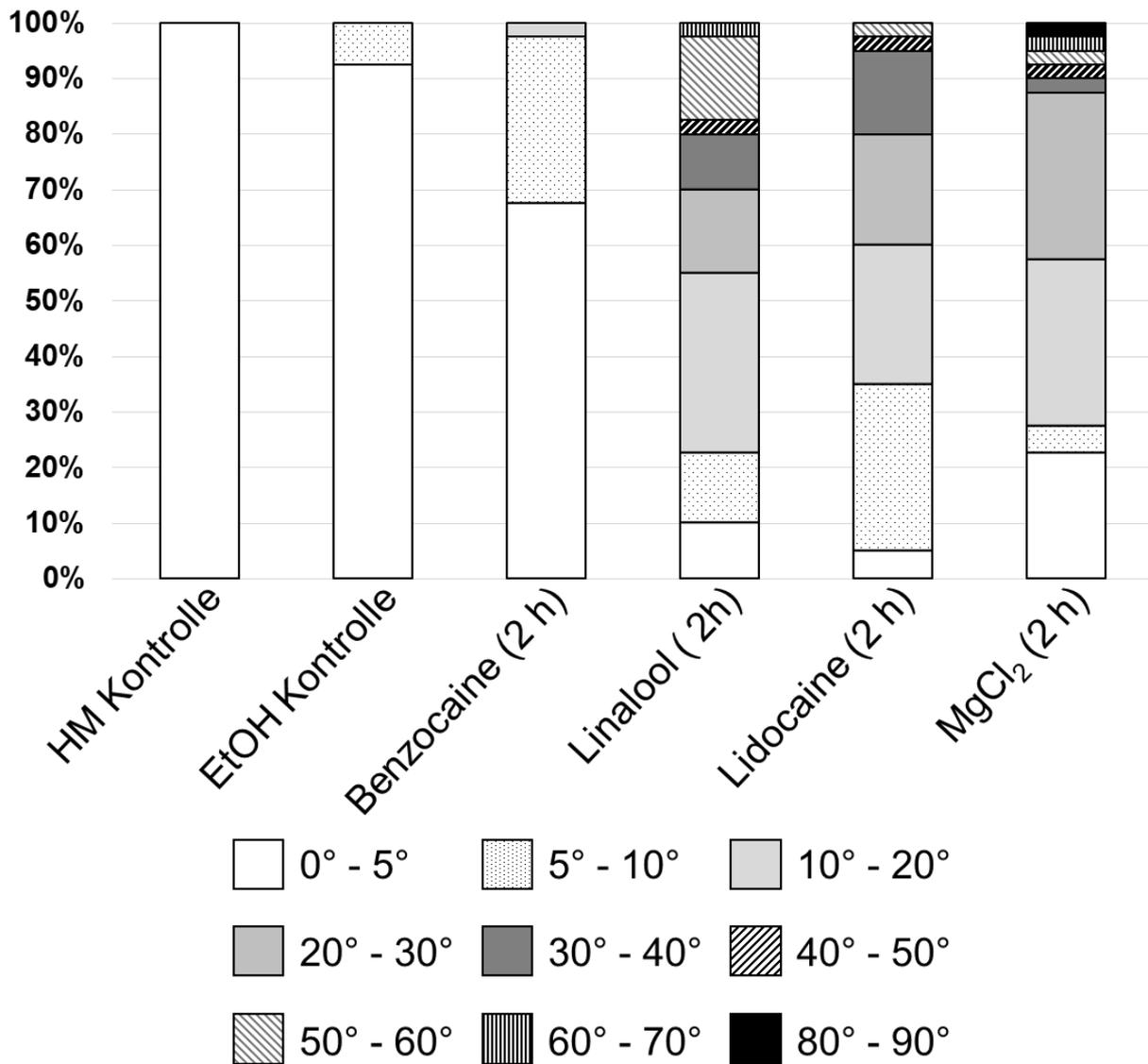


Abbildung 45: Abweichung der Aktinfaserorientierung nach einer Behandlung mit den unterschiedlichen Relaxantien in Relation zur longitudinalen Achse in *Hydra*. Die Orientierung der ektodermalen Aktinfasern wurde bestimmt und in Relation zu der vertikalen Achse aufgetragen (n=40). Eine Abweichung der Aktinfaserorientierung von 0°-5° (weißer Balken), von 5°-10° (schwarze Punkte), von 10°-20° (hellgrauer Balken), von 20°-30° (grauer Balken), von 30°-40° (dunkelgrauer Balken), von 40°-50° (schwarze diagonale Streifen), von 50°-60° (graue diagonale Streifen), von 60°-70° (schwarze vertikale Streifen) und von 80°-90° (schwarzer Balken). Eine Abweichung der Aktinfaserorientierung von 70°-80° konnte nicht gemessen werden. Die Prozentuale Abweichung der Faserorientierung ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Bei dem Relaxans Benzocain konnte mit einer Abweichung von 67,5 % zu maximal 5°, von 30 % zu 5° - 10° und von 2,5 % zu 10° - 20° der geringste Effekt auf die Aktinfaserorientierung aller getesteten Relaxantien ermittelt werden (Abb. 45 und Tab. 4). Alle anderen getesteten Relaxantien hatten einen massiven Effekt auf die Orientierung der Aktinfasern. Der Grad der Abweichungen ist folgend tabellarisch dargestellt:

Tabelle 4: Prozentuale Abweichung der Aktinfaserorientierung von der longitudinalen Achse durch *Hydra* nach einer zweistündigen Immobilisierung mit unterschiedlichen Relaxantien.

		Verteilung der Abweichung der Aktinfasern zu einem senkrechten Faserverlauf (%)					
		HM-Kontrolle	EtOH-Kontrolle	Benzocain	Linalool	Lidocain	MgCl ₂
Abweichung der Aktinfasern zu einem senkrechten Faserverlauf (°)	0°-5°	100	92,5	67,5	10	5	22,5
	5°-10°	/	7,5	30	12,5	30	5
	10°-20°	/	/	2,5	32,5	25	30
	20°-30°	/	/	/	15	20	30
	30°-40°	/	/	/	10	15	2,5
	40°-50°	/	/	/	2,5	2,5	2,5
	50°-60°	/	/	/	15	2,5	2,5
	60°-70°	/	/	/	2,5	/	2,5
	70°-80°	/	/	/	/	/	/
	80°-90°	/	/	/	/	/	2,5

Durch die Messungen der Faserorientierung lässt sich erkennen, dass alle getesteten Relaxantien einen Effekt auf die Orientierung der Aktinfasern ausüben, Benzocain jedoch am ehesten den Werten der Kontrolle entspricht. Im Vergleich dazu weichen die Aktinfasern nach einer Behandlung mit Linalool bis zu 70° von einem senkrechten Verlauf ab. Aktinfasern nach einer Behandlung weichen bis zu 60° von einem senkrechten Faserverlauf ab und durch eine MgCl₂-Behandlung beträgt die maximale Abweichung sogar bis zu 90° (Abb. 45 und Tab. 4).

V.5.5 Periodische Behandlungen mit Benzocain oder Linalool haben keinen signifikanten Einfluss auf den Knospungsprozess bei *Hydra*

Im Rahmen der Betreuung der BSc Studentin Marie Sieberns wurde überprüft, ob die beiden effektivsten Relaxantien Benzocain und Linalool einen Einfluss auf den Knospungsprozess bei *Hydra* haben. Dazu wurden Hydren mit Knospen in den Stadien 3, 5 oder 8 zweimal täglich für zwei Stunden mit Benzocain, beziehungsweise Linalool immobilisiert (Abb. 46 und Abb. 47, rote Kurven) oder zur Kontrolle in Hydramedium (Abb. 46 und Abb. 47, graue Kurven) gehalten. Der Fortschritt des Knospungsprozesses wurde täglich bis zur finalen Ablösung der Knospe dokumentiert (Daten sind dem Anhang 25 zu entnehmen).

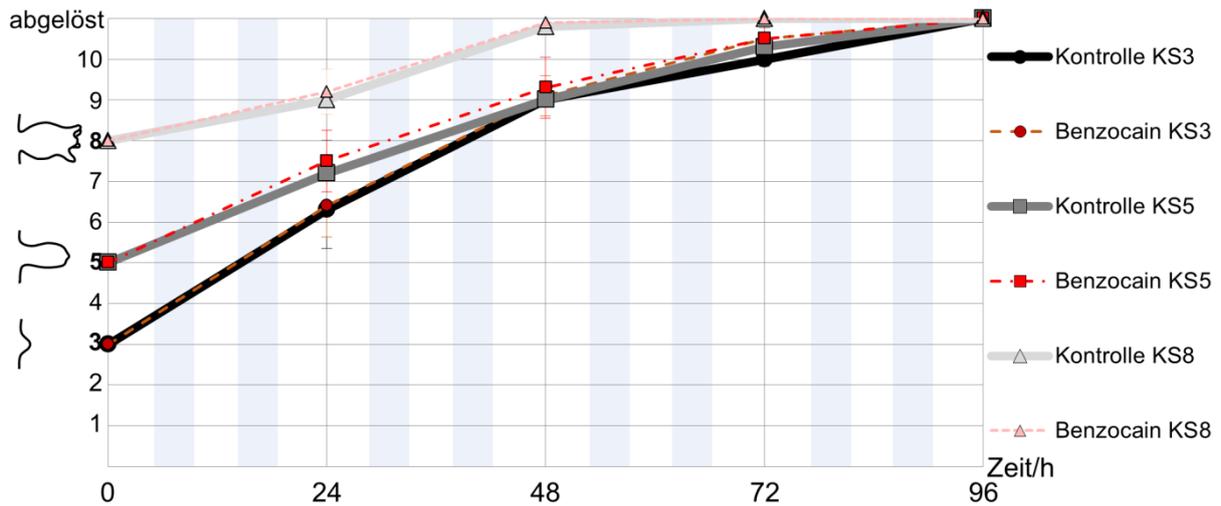


Abbildung 46: Graphische Darstellung des Knospungsverlaufes unter dem Einfluss des Relaxans Benzocain. Hydren mit den Knospenstadien 3, 5 oder 8 wurden zweimal täglich für 2 Stunden mit Benzocain (20 mM) immobilisiert (hellblaue Balken) bis sich die Knospen ablösten. Bei Kontrolltieren, die ab Knospenstadium 3 (schwarze Linie mit Punkten) oder 5 (graue Linie mit Vierecken) relaxiert wurden, lösten sich am fünften Tag die Knospen ab. In Kontrolltieren mit dem Knospenstadium 8 (hellgraue Linie mit Dreiecken) lösten die Knospen sich nach drei Tagen ab. Bei Benzocain-immobilisierten Hydren mit dem Knospenstadium 3 (dunkelrote, gestrichelte Linie mit Punkten) oder 5 (rote, gestrichelte Linie mit Vierecken) löste sich die Knospe am fünften Tag ab. Bei Benzocain-immobilisierten Hydren mit einem Knospenstadium 3 (rosa, gestrichelte Linie mit Dreiecken) löste sich die Knospe am dritten Tag ab. (Auswertung der Daten von Marie Sieberns; von mir betreute BSc Studentin).

Dabei zeigte sich, dass Benzocain auf keines der Knospenstadien, beziehungsweise auf den Verlauf der Knospung einen signifikanten Einfluss hatte. Lediglich bei Knospen im Knospenstadium fünf zu Versuchsbeginn schien das Relaxans einen minimal beschleunigenden Effekt auf den Knospungsverlauf zu haben. Der Zeitpunkt der finalen Knospenablösung war jedoch nicht beeinträchtigt (Abb. 46). Bei den anderen untersuchten Knospenstadien zeigte das Relaxans keinen beschleunigenden oder verlangsamen Einfluss auf den Knospungsprozess.

Bei dem Relaxans Linalool konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf den Knospungsprozess von jungen- oder späten Knospen beobachtet werden. Bei Tieren im Knospenstadium acht zu Versuchsbeginn schien Linalool zunächst einen beschleunigenden Effekt auf den Knospungsprozess zu haben, jedoch korrelierte die finale Ablösung auch hier mit den Kontrollwerten. Wie bei der Benzocainbehandlung verlief auch bei Linalool der Prozess der Knospung weitestgehend parallel zu der Knospung der Kontrolltiere.

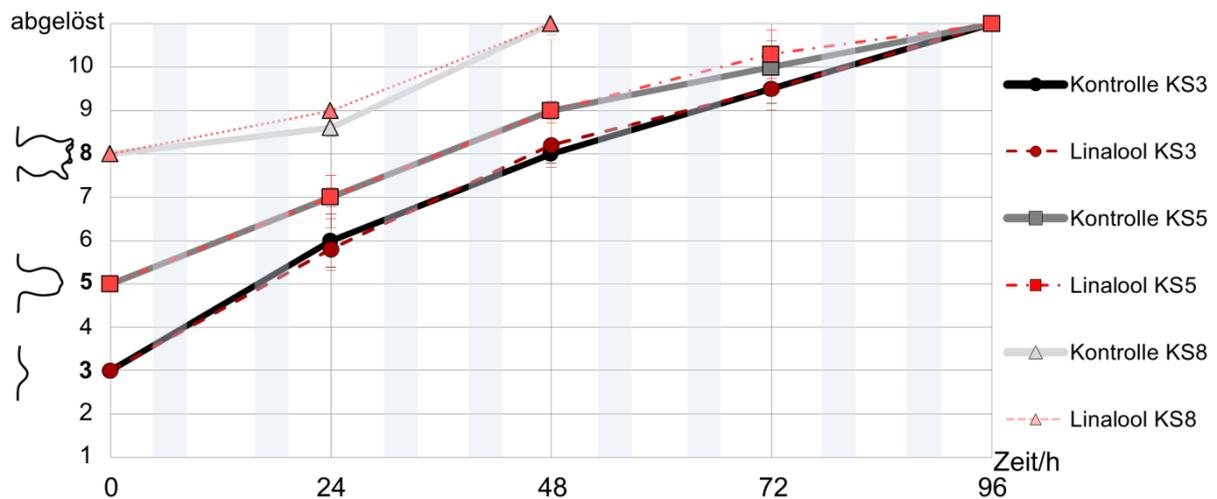


Abbildung 47: Graphische Darstellung des Knospungsverlaufes unter dem Einfluss des Relaxans Linalool. Hydren mit den Knospenstadien 3, 5 oder 8 wurden zweimal täglich für 2 Stunden mit Benzocain (20 mM) immobilisiert (hellblaue Balken) bis sich die Knospen ablösten. Bei Kontrolltieren mit dem Knospenstadium 3 (schwarze Linie mit Punkten) oder 5 (graue Linie mit Vierecken) löste sich die Knospe am fünften Tag ab. Bei Kontrolltieren mit dem Knospenstadium 8 (hellgraue Linie mit Dreiecken) war die Ablösung der Knospe am dritten Tag zu beobachten. Bei Linalool-immobilisierten Hydren mit dem Knospenstadium 3 (dunkelrote, gestrichelte Linie mit Punkten) oder 5 (rote, gestrichelte Linie mit Vierecken) löste sich die Knospe am fünften Tag ab. Bei Linalool-immobilisierten Hydren mit einem Knospenstadium 8 (rosa, gestrichelte Linie mit Dreiecken) löste sich die Knospe während des dritten und vierten Tages ab. (Auswertung der Daten von Marie Sieberns; von mir betreute BSc Studentin).

V.5.6 Behandlungen mit Benzocain beeinflussen den Wundverschluss bei *Hydra* geringfügig

Im Rahmen der Betreuung der BSc Studentin Marie Sieberns wurde der mögliche Einfluss von Benzocain und Linalool auf den Prozess des Wundverschlusses untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Versuchsprotokolle entwickelt (siehe Material und Methoden VIII.14.5). Statt eines Komplettschnittes (horizontales Halbieren des gesamten Polypen) der Hydren wurden diese zur Beobachtung des Wundverschlusses horizontal mittig in der Körpersäule eingeschnitten, wodurch sich dieser gut und vor allem zeitnah beobachten lässt. Dadurch werden mögliche Nebeneffekte der Relaxantien bei einer Dauerbehandlung, welche bei einem Komplettschnitt notwendig wäre, minimiert.

Dabei zeigte sich, dass bei jedem Versuchsschema die Hydren in der Lage waren ihre Wunde zu verschließen (Abb. 48 A-E''). Die Kontrolltiere benötigten dabei circa 7,5 Minuten für ein erkennbares Zusammenziehen des Gewebes an der Schnittstelle und ungefähr 31 Minuten bis die offenstehende Wunde wieder vollständig mit Gewebe verschlossen ist (Abb. 48 F, G; a-blau). Den stärksten Effekt auf den Regenerationsprozess erzielte eine Immobilisierung der Polypen für 60 Minuten direkt im Anschluss an den zugefügten Einschnitt (Abb. 48; Behandlungsschema b-grün). Bei so behandelten Hydren war ein aktives Verschließen der Wunde erst nach ungefähr 12,5 Minuten erkennbar (Abb. 48 F; b-grün), was bedeutet, dass sie circa fünf Minuten länger benötigen als die Kontrolltiere.

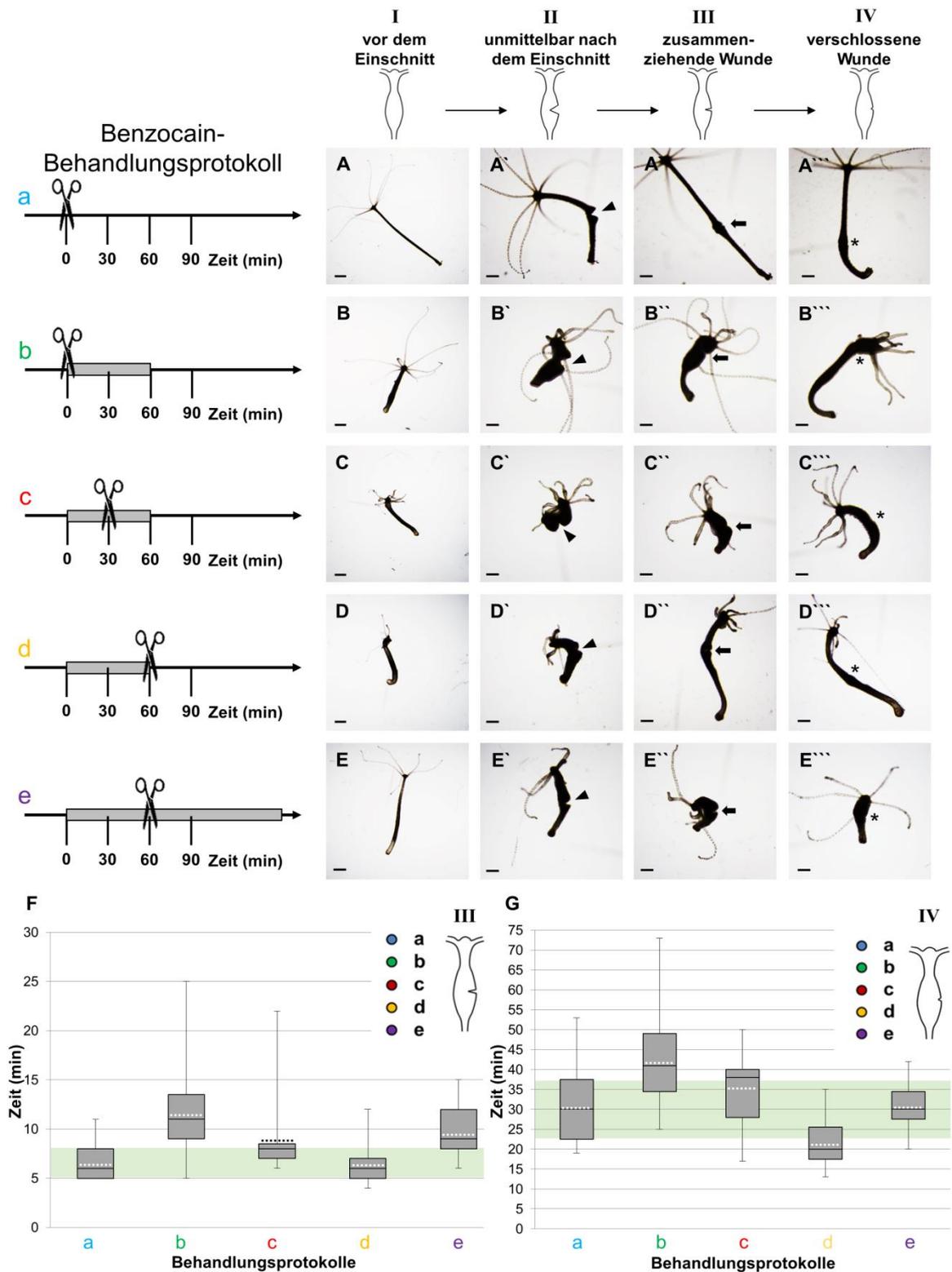


Abbildung 48: Wundverschluss von *Hydra* unter dem Einfluss unterschiedlicher Behandlungsprotokolle mit dem Relaxans Benzocain. Linke Seite: Unterschiedliche Behandlungs- und Schnittprotokolle unter dem Einfluss von Benzocain (20 mM) (siehe Material und Methoden VIII.14.5). (A-E) *Hydra* bevor dem Einschnitt (Regenerationsstadium I). (A'-E') *Hydra* direkt nach dem Einschnitt mit weit offenstehender Wunde (schwarzer Pfeilkopf) (Regenerationsstadium II). (A''-E'') *Hydra* während des aktiven Wundverschlusses (schwarzer Pfeil) (Regenerationsstadium III). (A'''-E''') *Hydra* mit einer kürzlich verschlossenen Wunde (Stern) (Regenerationsstadium IV). (F, G) Box-Plot der Dauer bis zum Erreichen des Regenerationsstadiums III (F) oder IV (G). Die Daten der Quartile der Kontrolle sind jeweils grün hinterlegt. Der Mittelwert der Daten ist als gestrichelte Linie dargestellt. (Auswertung der Daten von Marie Sieberns; von mir betreute BSc Studentin).

Der vollständige Verschluss der offenstehenden Wunde tritt ungefähr nach 42 Minuten, also circa 10 Minuten nach der Kontrolle, ein (Abb. 48 G; b-grün). Wenn der Einschnitt während einer Behandlung mit Benzocain hinzugefügt wurde und die Immobilisierung nach 60 Minuten behandelt wurde (Abb. 48; Behandlungsschema c-rot) hatte dies einen leichten verzögernden Einfluss auf die Regeneration.

Der Start des Zusammenziehens des Gewebes an der Schnittstelle (Abb. 48 F; c-rot) und der Zeitpunkt des vollständigen Wundverschlusses (Abb. 48 G; c-rot) waren jeweils um wenige Minuten im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Eine 60-minütige Immobilisierung mit Benzocain vor dem zugefügten Schnitt (Abb. 48; Behandlungsschema d-gelb) scheint im Vergleich dazu den Wundverschluss bei *Hydra* minimal beschleunigen zu können. Für ein erkennbares Zusammenziehen des Gewebes an der offenstehenden Wunde benötigten Hydren nach Behandlungsschema d zwar wie die Kontrolle circa 7,5 Minuten (Abb. 48 F; d-gelb), jedoch war die Wunde bereits nach ungefähr 22 Minuten verschlossen (Abb. 48 G; d-gelb). Für den vollständigen Verschluss der Wunde benötigten Hydren nach Behandlungsschema d also knapp 10 Minuten weniger Zeit als die Kontrolltiere. Eine durchgängige Immobilisierung mit Benzocain (Abb. 48; Behandlungsschema e-violett) bewirkte eine leichte Verzögerung des Zeitpunktes, an dem sich das Gewebe an der offenstehenden Wunde zusammenzog (Abb. 48 F; e-violett). Auf den Zeitpunkt, der als Wundverschluss definiert wurde, hatte die kontinuierliche Benzocain- Behandlung jedoch keinen Einfluss (Abbildung 48 G; e-violett).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Relaxans Benzocain scheinbar einen verzögernden Einfluss auf den Prozess des Wundverschlusses bei *Hydra* hat, wenn die Immobilisierung direkt nach dem zugeführten Schnitt stattfindet (Abb. 48; Behandlungsschemata b, c, e). Wenn die Immobilisierung vor dem zugeführten Schnitt stattfand, war vor allem die ersten Phasen des Wundverschlusses, also das Zusammenziehen der zugefügten Wunde, durch das Relaxans beeinflusst (Abb. 48 F; Behandlungsschemata b, c, e). Wenn die Immobilisierung hingegen vor dem Einschnitt stattfindet hat dies keinen Einfluss auf den Startzeitpunkt, an dem sich das Gewebe an der Wunde beginnt zusammen zu ziehen (Abb. 48 F; d-gelb). Durch dieses Behandlungsschema waren die Hydren sogar schneller in der Lage die Wunde vollständig zu verschließen als die Kontrolltiere (Abb. 48 G; d-gelb).

V.5.7 Die Behandlung mit Linalool zeigt einen ähnlichen Einfluss den Wundverschluss bei *Hydra* wie Benzocain

Um die beiden Relaxantien Benzocain und Linalool und deren Einfluss auf den Prozess des Wundverschlusses bei *Hydra* miteinander vergleichen zu können, wurden die gleichen Versuchsprotokolle wie für die Benzocain- Behandlung genutzt (Abb. 49).

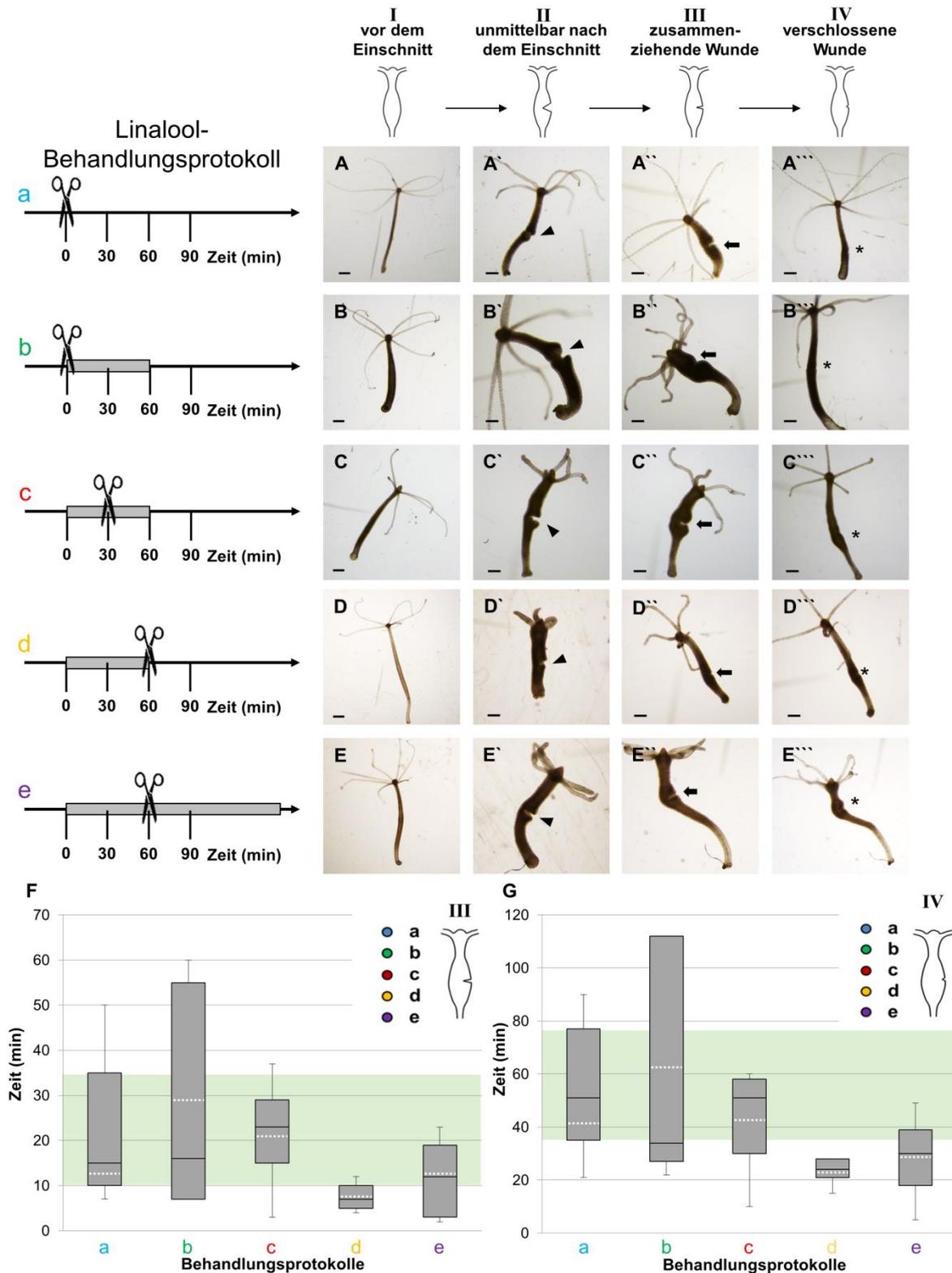


Abbildung 49: Wundverschluss von *Hydra* unter dem Einfluss unterschiedlicher Behandlungsprotokolle mit dem Relaxans Linalool. Linke Seite: Unterschiedliche Behandlungs- und Schnittprotokolle unter dem Einfluss von Linalool (1 mM) (siehe Material und Methoden VIII.14.5). (A-E) *Hydra* bevor dem Einschnitt (Regenerationsstadium I). (A'-E') *Hydra* direkt nach dem Einschnitt mit weit offenstehender Wunde (schwarzer Pfeilkopf) (Regenerationsstadium II). (A''-E'') *Hydra* während des aktiven Wundverschlusses (schwarzer Pfeil) (Regenerationsstadium III). (A'''-E''') *Hydra* mit einer kürzlich verschlossenen Wunde (Stern) (Regenerationsstadium IV). (F, G) Box-Plot der Dauer bis zum Erreichen des Regenerationsstadiums III (F) oder IV (G). Die Daten der Quartile der Kontrolle sind jeweils grün hinterlegt. Der Mittelwert der Daten ist als gestrichelte Linie dargestellt. (Auswertung der Daten von Marie Sieberns; von mir betreute BSc Studentin).

Wie bei der Benzocainbehandlung waren auch alle Hydren nach den Behandlungen mit Linalool in der Lage die zugefügte Wunde vollständig zu verschließen (Abb. 49 A-E``).

In diesem Versuchsaufbau benötigten die Kontrollen im Durchschnitt 12 Minuten, um das Gewebe an der Wunde merklich zusammen zu ziehen (Abb. 49 F; a-blau) und circa 40 Minuten um die Wunde vollständig zu verschließen (Abb. 49 G; a-blau).

Im Vergleich dazu benötigten Hydren, die direkt nach dem Einschneiden für 60 Minuten mit Linalool behandelt wurden (Abb. 49; Behandlungsschema b-grün) durchschnittlich circa 30 Minuten bis sie begannen das Gewebe an der Wunde zusammen zu ziehen (Abb. 49 F; b-grün) und circa 60 Minuten bis die Wunde vollständig verschlossen war (Abb. 49 G; b-grün). Damit benötigten die Tiere im Vergleich zur Kontrolle ungefähr 20 Minuten länger bis zum Beginnen des Wundverschlusses und ebenfalls 20 Minuten länger, um die Wunde vollständig zu verschließen. Dies zeigt, dass das Einsetzen des Wundverschlusses zwar verzögert wurde, der Prozess des Wundverschlusses anschließend jedoch nicht weiter beeinträchtigt oder verzögert wurde. Im Vergleich dazu hat eine 30-minütige Behandlung mit Linalool vor und nach dem zugeführten Schnitt (Abb. 49; Behandlungsschema c-rot) einen geringeren Einfluss auf den Regenerationsprozess. Die Hydren brauchten circa 20 Minuten, um mit dem Wundverschluss zu beginnen (Abb. 49 F; c-rot) und ungefähr 44 Minuten, um die Wunde vollständig zu verschließen (Abb. 49 G; c-rot). Somit tritt der Beginn des Wundverschlusses im Vergleich zur Kontrolle ungefähr 10 Minuten später ein, wobei der vollständige Wundverschluss nur geringfügig um circa vier Minuten verzögert ist. Wenn die Hydren vor dem Schnitt für 60 Minuten mit Linalool behandelt wurden (Abb. 49; Behandlungsschema d-gelb), scheint dies einen beschleunigenden Einfluss auf den Prozess des Wundverschlusses zu haben. So behandelte Hydren begannen bereits nach 7,5 Minuten mit dem Wundverschluss (Abb. 49 F; d-gelb), der nach circa 23 Minuten vollständig abgeschlossen war (Abb. 49 G; d-gelb). Somit setzte der Wundverschluss im Vergleich zur Kontrolle circa 3,5 Minuten schneller ein und die Wunde war ungefähr 20 Minuten schneller verschlossen. Auch eine kontinuierliche Linalool- Behandlung bis zum vollständigen Wundverschluss, die 60 Minuten vor dem Einschnitt begonnen wurde (Abbildung 49; Behandlungsschema e-violett), scheint einen leicht beschleunigenden Einfluss auf den Prozess des Wundverschlusses zu haben. Tiere nach diesem Behandlungsschema behandelt, begannen nach 12,5 Minuten mit dem Wundverschluss (Abb. 49 F; e-violett), welcher nach circa 30 Minuten vollständig abgeschlossen war (Abb. 49 G; e-violett). Somit begannen sie vergleichbar mit der Kontrolle nach circa 12 Minuten mit dem Wundverschluss, waren jedoch circa 10 schneller in der Lage, diesen vollständig zu beenden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Behandlung mit Linalool einen verzögernden Effekt auf den Wundverschluss hat, wenn die Behandlung ausschließlich nach

dem zugeführten Schnitt stattfindet (Abb. 49; Behandlungsschema b). Eine kurze 30-minütige Behandlung vor- und nach dem zugefügten Gewebeseinschnitt scheint hingegen keinen Einfluss auf den Prozess des Wundverschlusses zu haben (Abb. 49; Behandlungsschema c). Sobald eine Immobilisierung mit Linalool für 60 Minuten vor dem Einschnitt stattgefunden hat (Abb. 49; Behandlungsschema d, e) hatte dies sogar einen beschleunigenden Effekt auf den Wundverschluss. Wenn nach dem Einschnitt die Linalool-Behandlung jedoch fortgesetzt wurde (Abb. 49; Behandlungsschema e) verzögerte dies den Wundverschluss im Vergleich zu der alleinigen Linalool- Behandlung vor dem Einschnitt (Abb. 49; Behandlungsschema d) wiederum leicht.

V.6 Klonierung, Etablierung und Charakterisierung von PtdIns(4,5)P₂-GFP- und PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor transgenen *Hydra* Linien

Die *in vivo* Detektion der Phosphatidylinositolphosphate (PtdInsP), speziell von PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ mittels spezifischer Sensoren erlaubt den (sub)zellulären Nachweis der Phospholipide in Zellkultursystemen (Balla und Várnai, 2009; Várnai und Balla, 2008). Ziel der vorliegenden Arbeit war es mittels PtdInsP-GFP- Sensoren die Lokalisation der Phospholipide sowie deren Beteiligung an morphogenetischen Prozessen in *Hydra live* am lebenden Tier verfolgen und nachzuweisen zu können. Um die von Dr. Dominik Oliver (Pathophysiologie Marburg) zur Verfügung gestellten Vertebraten- spezifischen PtdInsP-GFP- Sensoren in den phylogenetisch basalen Cnidaria *Hydra* einbringen zu können, war eine Umklonierung in einen *Hydra*- spezifischen Expressionsvektor notwendig. Dazu wurden die Sensoren zunächst mit geeigneten Primern aus den Wirbeltiervektoren (siehe Anhang 14-16) mit der *proofreading* Polymerase Q5 heraus amplifiziert und in pJET1.2/blunt (siehe Anhang 12) subkloniert. Von dort wurden die PtdInsP-GFP- Sensor Sequenzen per Restriktionsverdau isoliert, in den identisch verdauten Aktinpromoter-getriebenen LigAF (siehe Anhang 13) ligiert und das Konstrukt in der *Transgenic Hydra Facility* in Kiel von Dr. Alexander Klimovich (AG Prof. Dr. Thomas Bosch) injiziert. Die Embryonen entwickelten sich in Marburg und wurden als transgene Linien etabliert.

V.6.1 Klonierung der PtdInsP-GFP- Sensoren in den *Hydra*- spezifischen Expressionsvektor LigAF

Für die Detektion von PtdIns(4,5)P₂ wurde das PLCδ1-PH-GFP- Sensorkonstrukt gewählt, welches über die *Pleckstrin Homology* (PH) Domäne der Phospholipase C (PLC) spezifisch an PtdIns(4,5)P₂ bindet. Die Detektion von PtdIns(3,4,5)P₃ soll durch das BTK-PH-GFP- Sensorkonstrukt erfolgen, welches die PH- Domäne der Brutons´s tyrosine kinase (Btk) zur Bindung an PtdIns(3,4,5)P₃ nutzt. Zur Kontrolle dienen jeweils die Sensorkonstrukte mit

Aminosäureaustausche, wodurch eine spezifische Bindung an PtdIns(4,5)P₂, beziehungsweise PtdIns(3,4,5)P₃ verhindert werden soll (persönliche Informationen von Prof. Dr. Dominik Oliver) (Tab. 9).

Nach erfolgter Umklonierung der Sensoren in den Expressionsvektor LigAF, wurden die Sensorkonstrukte sequenziert und verifiziert. Die Sequenzen des PtdIns(4,5)P₂ (#59)-GFP- und des PtdIns(3,4,5)P₃ (#63)-GFP- Sensors wurden jeweils mit den entsprechenden Negativkontrollen (#60 und #64) gegeneinander aligniert (Anhang 30 A und Anhang 31 A). Dabei zeigte sich, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor und der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor exakt der Ausgangskonstrukt entsprachen (Anhang 30 B und Anhang 31 B). Die Kontrolle #60 des Sensors PtdIns(4,5)P₂ (#59) weist die vorgegebenen Sequenzmutationen auf, die in der Aminosäuresequenz einen Austausch an Position 34 (Serin (S) zu Phenylalanin (F)) und an Position 40 (Arginin (R) zu Leucin (L)) bewirken (Anhang 30 C). Aminosäuren und ihre Seitenketten besitzen unterschiedliche physiochemische Eigenschaften, die spezifische Funktionen ermöglichen. Neben der Hydrophobie und der Polarität ist das unter anderem die Masse der Aminosäure oder auch das Volumen der Seitenkette (Z. Li et al., 2016; Taylor, 1986). Ein Austausch in der Aminosäuresequenz bewirkt folglich eine Veränderung der physiochemischen Eigenschaften sowie der Masse und der Struktur. Dadurch soll der Austausch des kleinen polaren Serins (105,1 g/mol) gegen das große hydrophobe und aromatische Phenylalanin (165,2 g/mol) sowie der Austausch des großen, stark basischen und positiv geladenen Arginins (174,2 g/mol) gegen das kleinere neutrale und hydrophobe Leucin (131,2 g/mol) (Forney-Stevens et al., 2016) ein Binden des Kontroll- Sensors an PtdIns(4,5)P₂ in Vertebraten- Zellkulturen sowie in *Hydra* verhindern (persönliche Informationen von Prof. Dr. Dominik Oliver).

Auch für die Negativkontrolle #64 des Sensors PtdIns(3,4,5)P₃ (#63) wurde die vorgegebene Sequenzmutation bestätigt, die an der Position 28 einen Aminosäureaustausch (Arginin (R) zu Cystein (C)) bewirkt (Anhang 31 C). Das neutrale und polare Cystein ist im Vergleich zu dem stark basischen Arginin, sehr klein (121,2 g/mol), was wiederum ein Binden des Kontroll- Sensors an PtdIns(3,4,5)P₃ verhindern soll (persönliche Informationen von Prof. Dr. Dominik Oliver).

V.6.2 Etablierung der ektodermalen PtdInsP-GFP- Sensor *Hydra*- Linien

Pro Sensorkonstrukt wurden durch die *Transgenic Hydra Facility* in Kiel circa 30 ein- oder zweizellige Embryonen von *Hydra vulgaris* AEP- injiziert. Dies ist bislang der einzige Hydrastamm, mit dem Transgene erzeugt werden können (Abb. 50 D).

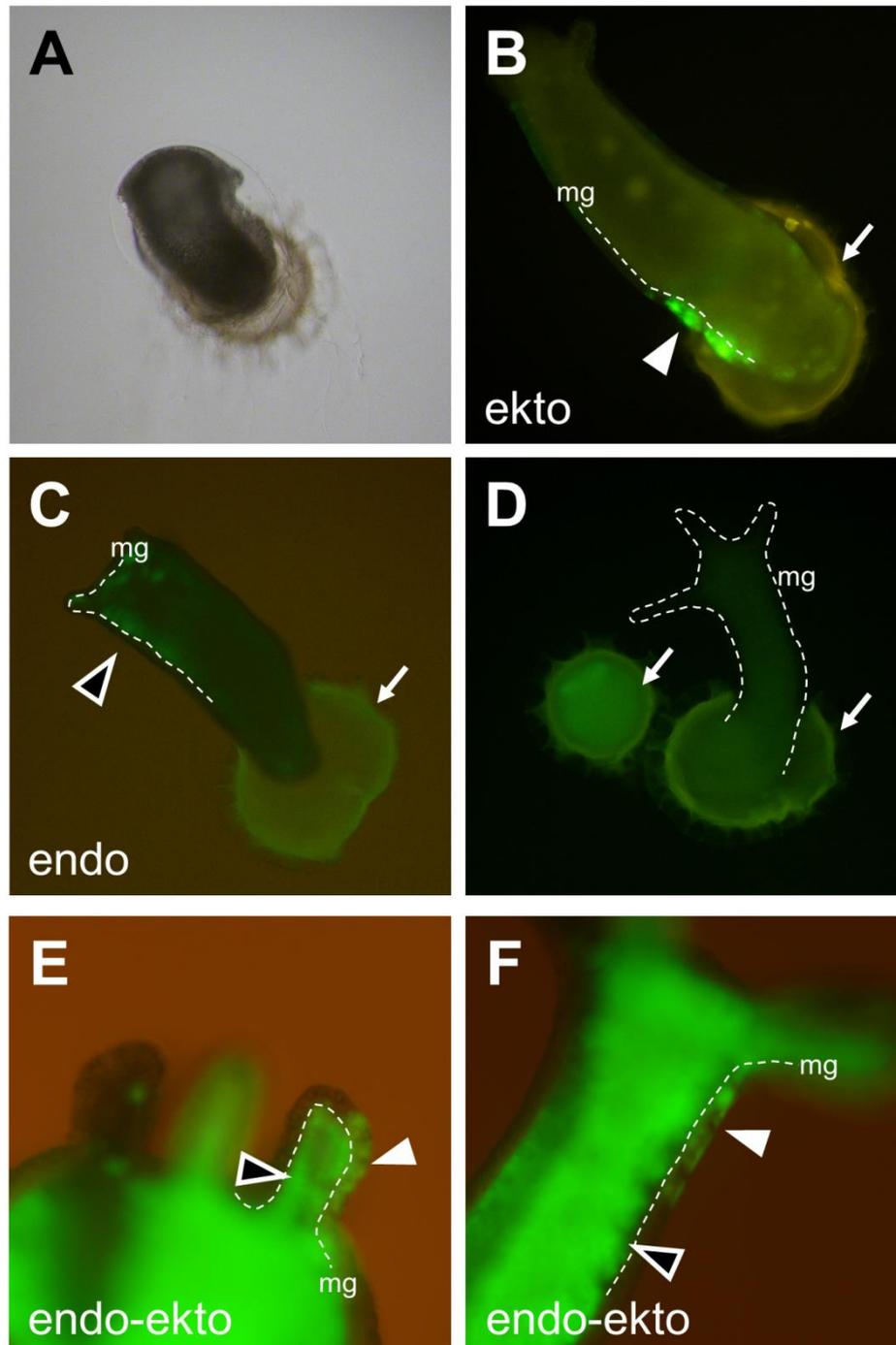


Abbildung 50: Schlupf von PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren. (A) Hellfeld-Mikroskopie eines schlüpfenden Polypen. (B-D) Die Eihülle zeigt Autofluoreszenz (Pfeile). (B) Schlupf einer *Hydra* mit ektodermalen, transgenen Epithelmuskelzellen (weißer Pfeilkopf). (C) Schlupf einer *Hydra* mit endodermalen, transgenen Epithelmuskelzellen (schwarzer Pfeilkopf). (D) Schlupf einer nicht-transgenen *Hydra*. (E, F) Schlupf von Hydren mit gleichzeitig endo- (schwarzer Pfeilkopf) und ektodermalen (weißer Pfeilkopf), transgenen Epithelmuskelzellen. Endo: Endodermal, Ekto: Ektodermal. Mesogloea (mg) als gestrichelte Linie.

Nach dem Schlupf (Abb. 50 A) wurden die jungen Hydren auf Transgenität untersucht, die in der Regel nur in einigen Zellen erreicht wird (Wittlieb et al., 2006). GFP- Sensor transgene Einzelpolypen wurden separiert von den nicht- transgenen Hydren gehalten (Abb. 50 D). Bei der Analyse der geschlüpften Hydren zeigte sich, dass sowohl ektodermal- (Abb. 50 B) und endodermal- (Abb. 50 C) transgene Hydren, als auch endo- ektodermal- transgene Polypen (Abb. 50 E, F) erzeugt wurden.

Neben der Transgenität in den endo- und/oder ektodermalen Epithelmuskelzellen, konnten keine Transgenen für die interstitiellen Stammzellen nachgewiesen werden, die lediglich mit circa 3 % auftreten (Klimovich et al., 2019). Somit konnten keine transgene I-Zelllinie für die PtdInsP-GFP- Sensoren erzeugt werden.

Die Etablierung der transgenen PtdInsP-GFP- Sensor Linien erwies sich allgemein als kompliziert und aufwendig, da vor allem die Negativkontrollen (#60 und #64) oft defekte im Phänotyp aufwiesen und von Pilz befallen wurden, wodurch sich eine hohe Letalität einstellte. So bildeten viele Hydren regelmäßig zahlreiche Testes aus (Abb. 51 A-B'), was bei *Hydra vulgaris* AEP in der Regel zur Reproduktion bei schlechten Bedingungen dient. Gleichzeitig waren die Tiere nicht in der Lage gebildete Knospen abzulösen, wodurch sich stark verzweigte Hydren bildeten (Abb. 51 A, A' und Abb. 52 A, A'). All diese Phänotypen sind in unserer Hand normale Begleiterscheinungen bei der Etablierung transgener *Hydra*-Linien (Hasse et al., 2014). Weiterhin waren einige Tiere der Kontrollen in einzelnen Fällen nicht in der Lage einen Fuß auszubilden oder dieser war oft nur rudimentär, wodurch sich die Hydren nicht am Substrat festhaften konnten (Abb. 51 B, B').

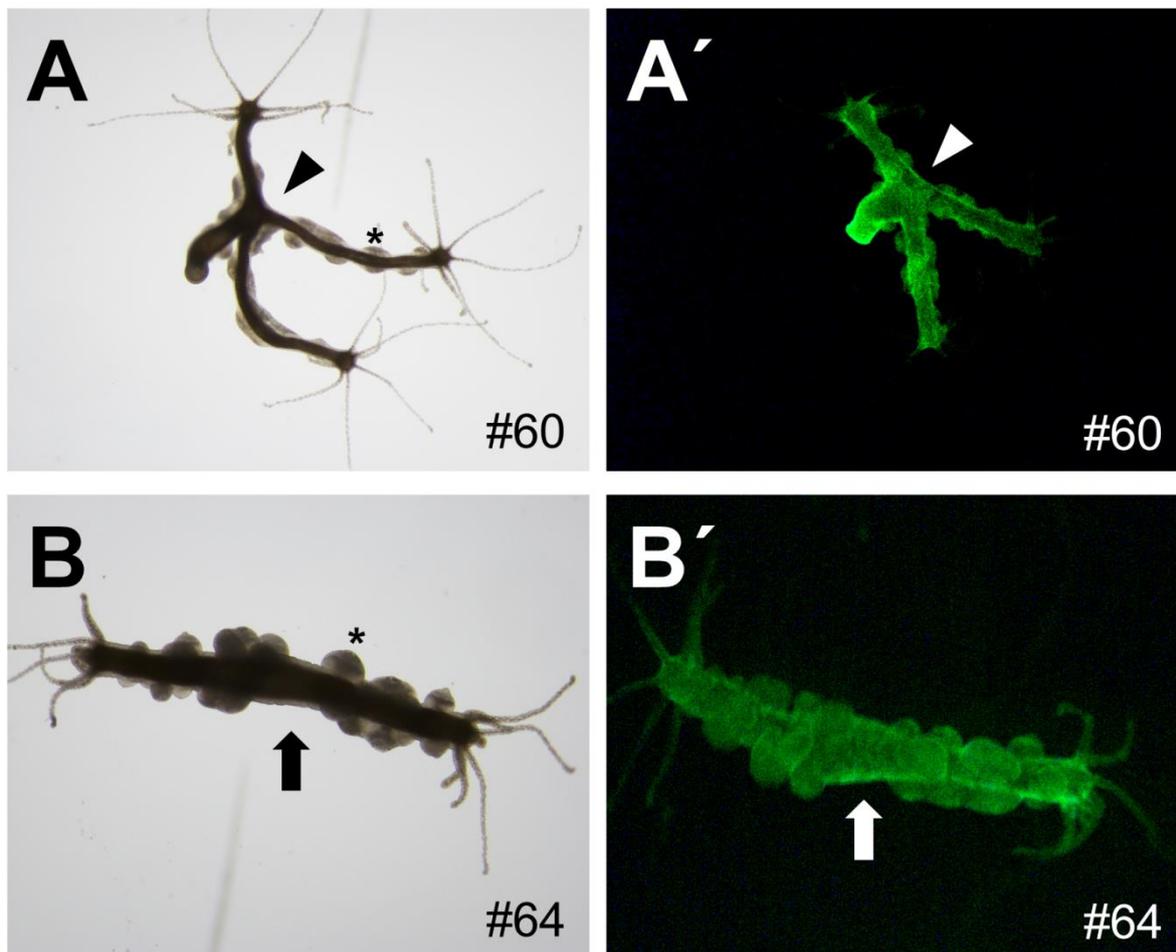


Abbildung 51: Phänotypdefekte bei den PtdInsP-GFP- Negativkontrollen #60 und #64. (A, B) Hellfeld-Mikroskopie der Hydren mit Phänotypdefekten und zahlreichen Testes (Stern). (A, A') Verzweigte und nicht-ablösende Knospen (Pfeilkopf). (B, B') Fehlende Fußstruktur (Pfeil), stattdessen ein bipolares Tier mit zwei Köpfen. (A', B') *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie der Hydren mit Phänotypdefekten.

Wenn die Tiere mit Pilz befallen wurden, bildete sich dieser meist an der Basalscheibe des Muttertieres und/oder von späten Knospen. Die Polypen zogen sich in der Folge zusammen und die Knospe konnte sich oft nicht von dem Muttertier ablösen (Abb. 52 A-B').

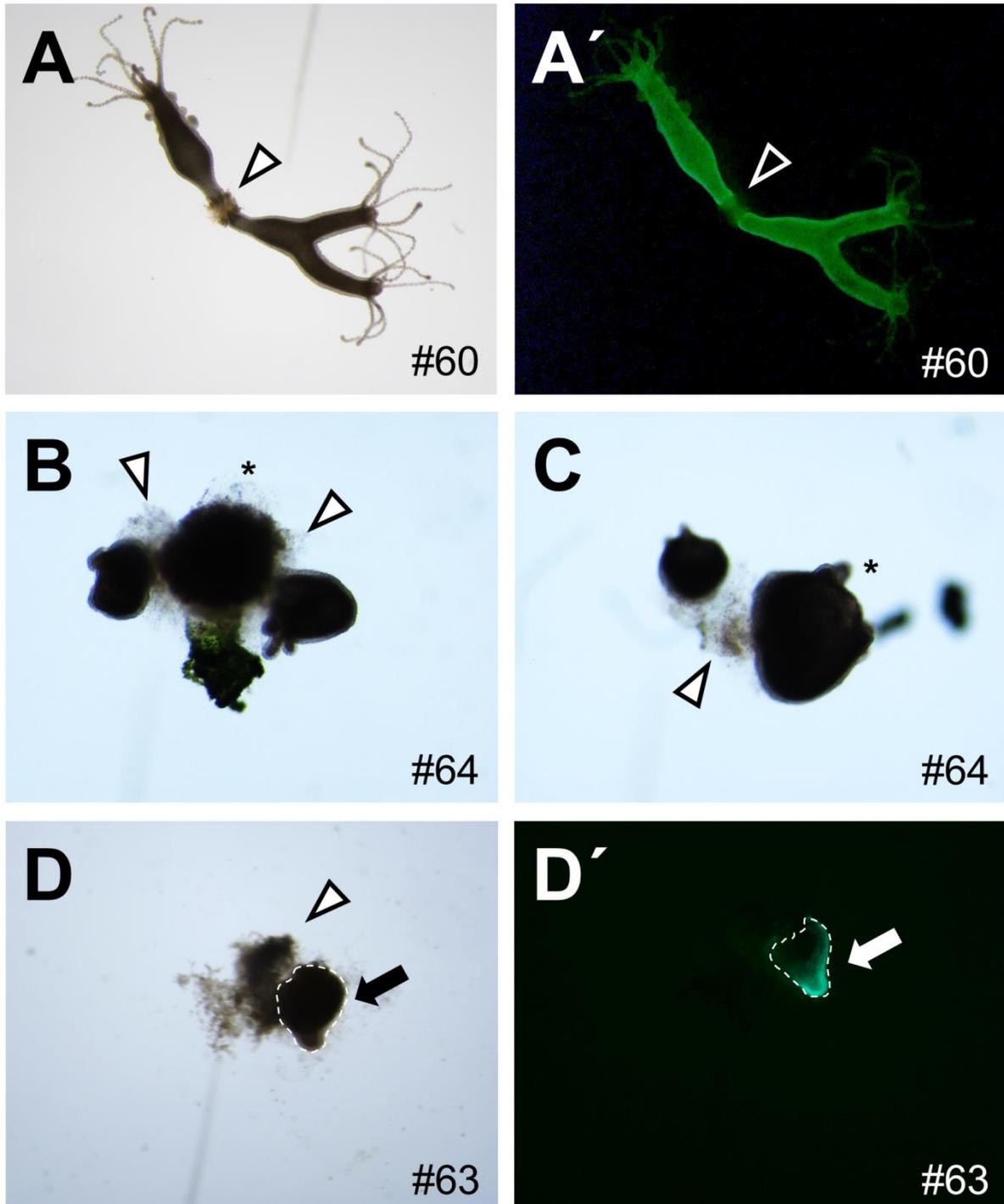


Abbildung 52: Pilzbefall der PtdInsP-GFP- Kontrollsensor transgenen Hydren. (A-C) Hellfeld-Mikroskopie des Pilzbefalls an der Knospenbasis, welcher die Ablösung der Knospe verhindert (Pfeilkopf). (B, D) Massiver Pilzbefall führt zu einem Zusammenziehen (Stern) und zu einem Zerfall (Pfeilkopf) der Polypen. (A', D') *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie der von Pilz befallenen Polypen. (D, D') Lediglich der nicht- zerfallene Teil der *Hydra* ist mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen (Pfeil).

Falls eine Ablösung der Knospe stattfand wurde diese nach der Ablösung von dem Pilz überwuchert, woraufhin sich die Polypen ebenfalls meist auflösten und zerfielen (Abb. 52 B, B', D, D').

Auch einige Polypen des PtdIns(4,5)P₂ (#59)-GFP- und des PtdIns(3,4,5)P₃ (#63)-GFP-Sensors zeigten die beschriebenen Phänotypen (Anhang 20) oder wurden von Pilz befallen (Abb. 52 D, D'), wodurch sich die Etablierung der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Linien als schwierig und langwierig gestaltete. Aufgrund dieser Erfahrungen wurden für die Etablierung der Sensor transgener Linien nur noch gesunde Tiere mit normalem Phänotyp separiert und weiter beobachtet (Abb. 53).

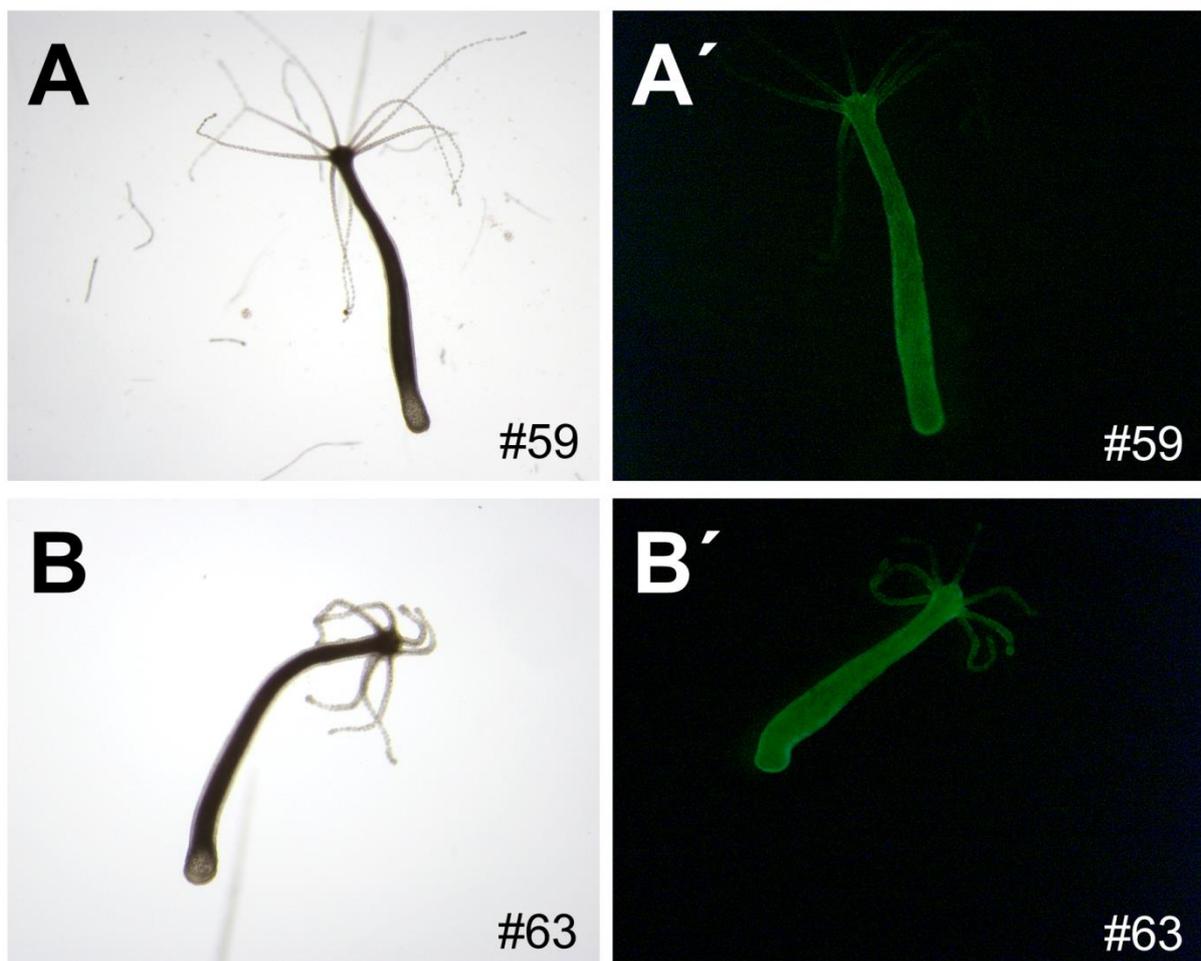


Abbildung 53: PtdIns(4,5)P₂ (#59)-GFP- und der PtdIns(3,4,5)P₃ (#63)-GFP- Sensor transgene Hydren mit normalem Phänotyp zur Etablierung von voll-transgenen *Hydra*-Linien. (A, B) Hellfeld-Mikroskopie der PtdInsP-GFP- Sensor Transgenen. (A', B') *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie der transgenen Hydren.

Langfristig konnten allerdings lediglich die ektodermalen Sensor- Linien etabliert werden, da die endodermalen Sensor- Linien häufiger von Pilz befallen wurden und dadurch nicht dauerhaft gehalten werden konnten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die Etablierung der PtdInsP-GFP-Sensor transgene Hydren aufgrund von verschiedenen Problemen und Defekten sowie dem häufigen Pilzbefall langwierig und schwierig gestaltete. Dies erschwerte die kontinuierliche und detaillierte Untersuchung der Lokalisierung der PtdInsP-GFP-Sensoren bei unterschiedlichen morphologischen Prozessen, wie vor allem der Knospung und der **Regeneration**.

V.6.3 PtdInsP-GFP- Sensor transgene Tiere zeigen eine verminderte Reproduktionsrate gemessen an der Knospenanzahl

Im Rahmen der Betreuung des Bachelorstudenten Gideon Speich wurde die Reproduktionsrate der PtdInsP-GFP-Sensor transgenen Hydren bestimmt (Abb. 56). Bei den PtdInsP-GFP-Sensor transgenen Tieren konnte bei allen Konstrukten ungewöhnlich viele Knospen an einem Muttertier nachgewiesen werden (Abb. 55 B, C und Abb. 54). Normalerweise bilden Hydren eine Knospe, und bei guter Fütterung zwei Knospen gleichzeitig in der definierten Knospungszone aus (Abb. 55 A und Abb. 54). Die zweite Knospe entsteht dabei stets zeitversetzt auf der entgegengesetzten Seite zu der ersten Knospe am Muttertier. Dadurch sind diese Knospen in der Regel nie im gleichen oder ähnlichen Knospenstadium gleichzeitig am Muttertier (Abb. 55 A).

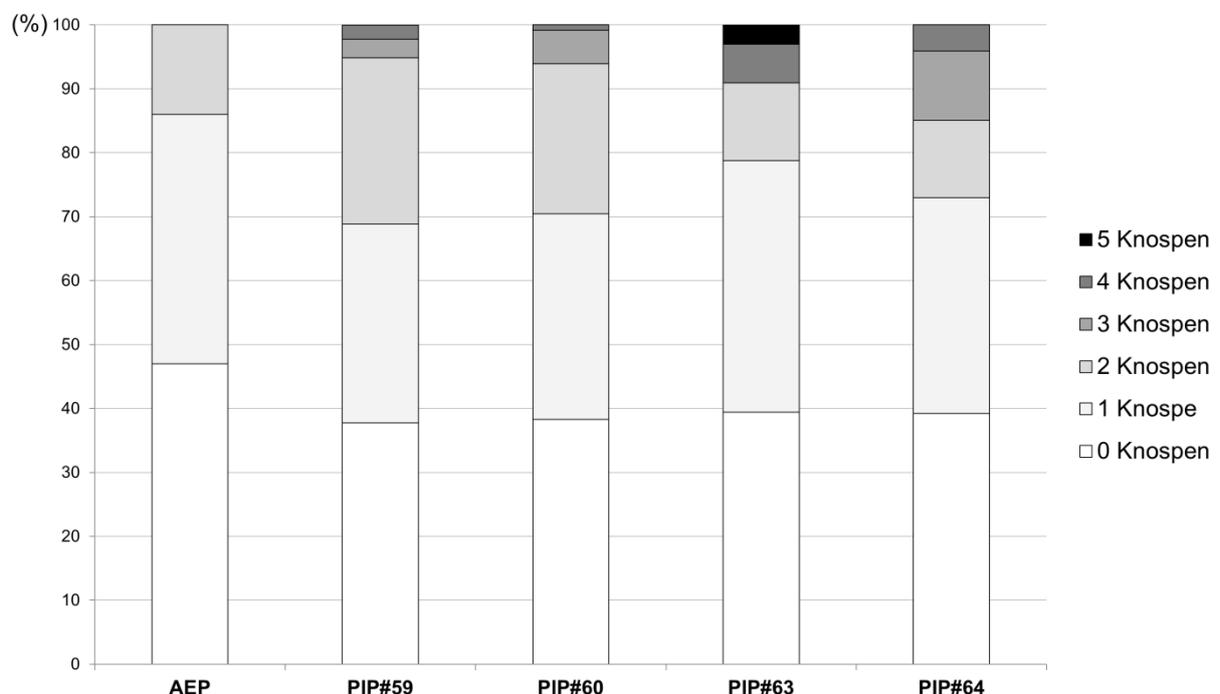


Abbildung 54: Statistik der überzähligen Knospenanzahl der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren. *Hydra vulgaris* AEP trägt maximal zwei Knospen gleichzeitig. Transgene Hydren der Sensoren #59, #60 und #64 trugen bis zu vier Polypen gleichzeitig. Hydren des Sensors #63 trugen bis zu fünf Knospen gleichzeitig. Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung der Knospenanzahl.

Bei gleicher Fütterung und Haltung konnten bei den PtdInsP-GFP- Sensor transgenen-, beziehungsweise bei deren Kontrollen, jedoch bis zu fünf Knospen (in Einzelfällen sogar bis zu sieben Knospen; Abb. 71) gleichzeitig in einer expandierten Knospungszone an einem Muttertier nachgewiesen werden (Abb. 54). Dabei wiesen bei dem PtdIns(4,5)P₂-GFP-Sensor (#59) und dessen Negativkontrolle (#60) circa 5 % der Tiere überzählige Knospen auf, wohingegen bei dem PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor (#63) und dessen Kontrolle (#64) bei 10-15 % der Tiere überzählige Knospen nachgewiesen werden konnten. Bei den Tieren waren Knospen im gleichen oder ähnlichen Stadium gleichzeitig am Muttertier und befanden sich teilweise auf der gleichen Seite des Muttertieres, wobei die ältere Knospe immer unterhalb der neuen Knospe platziert war (Abb. 55 B, C; weißer Pfeilkopf und Pfeil).

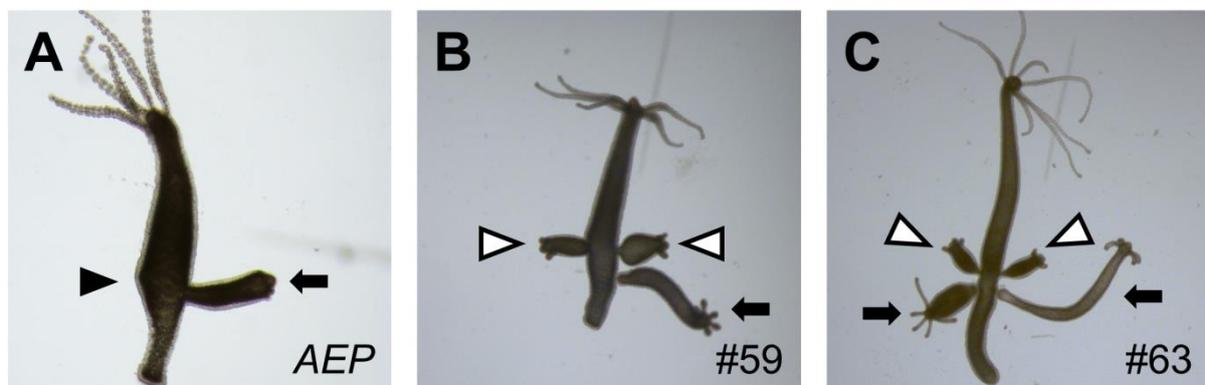


Abbildung 55: Hellfeld- Mikroskopie der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren mit fehlerhafter Knospenablösung. (A) *Hydra vulgaris* AEP trägt in der Regel zwei Knospen in Stadien 3 (schwarzer Pfeilkopf) und 8 (schwarzer Pfeil) gleichzeitig einander gegenüber stehend. Die junge Knospe wächst dabei oberhalb der alten Knospe aus. (B, C) Bei den PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren entwickeln sich Knospen auch synchron, wiederum gegenüber stehend (weißer Pfeilkopf). Zeitgleich befinden sich unterhalb dieser Knospen auch noch ungewöhnlich alte Knospen am Muttertier (schwarzer Pfeil).

Trotz der ungewöhnlichen Knospenanzahl bei einigen Hydren der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen, beziehungsweise deren Kontrollen, konnte beobachtet werden, dass sich diese dennoch nicht so effektiv reproduzieren wie *Hydra vulgaris* AEP, da sie oft nicht in der Lage waren die Knospen abzulösen. Daher wurde jeweils ein knospenloses Tier des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors (#59), dessen Kontrolle (#60), des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors (#63), dessen Kontrolle (#64) sowie einer *Hydra vulgaris* AEP über Wochen separat gehalten und die Knospungsrate bestimmt. Die Tiere wurden stets gleich behandelt und täglich die Anzahl der Polypen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass aus einer einzelnen *Hydra vulgaris* AEP Polypen innerhalb von 30 Tagen 17 Hydren entstanden (Abb. 56). Im Vergleich dazu verdoppelten die transgenen Hydren der PtdInsP-GFP- Sensoren #60, #63 und #64 in 30 Tagen lediglich (Abb. 56). Das PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor transgene Tier vermehrte sich innerhalb von 30 Tagen auf immerhin fünf Tiere (Abb. 56).

Während die nicht- transgenen *Hydra vulgaris AEP* regelmäßig Knospen bildeten, traten bei PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensortieren und den beiden Negativkontrollen (#60 und #64) Testes aus. Sie begannen erst nach circa zwei Wochen eine Knospe auszubilden, wodurch sie sich innerhalb von 30 Tagen lediglich einmal reproduzieren konnten. Der Polyp des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors bildete im Vergleich zu den anderen Transgenen keine Testes aus, benötigte allerdings circa zwei Wochen, um die erste Knospe auszubilden.

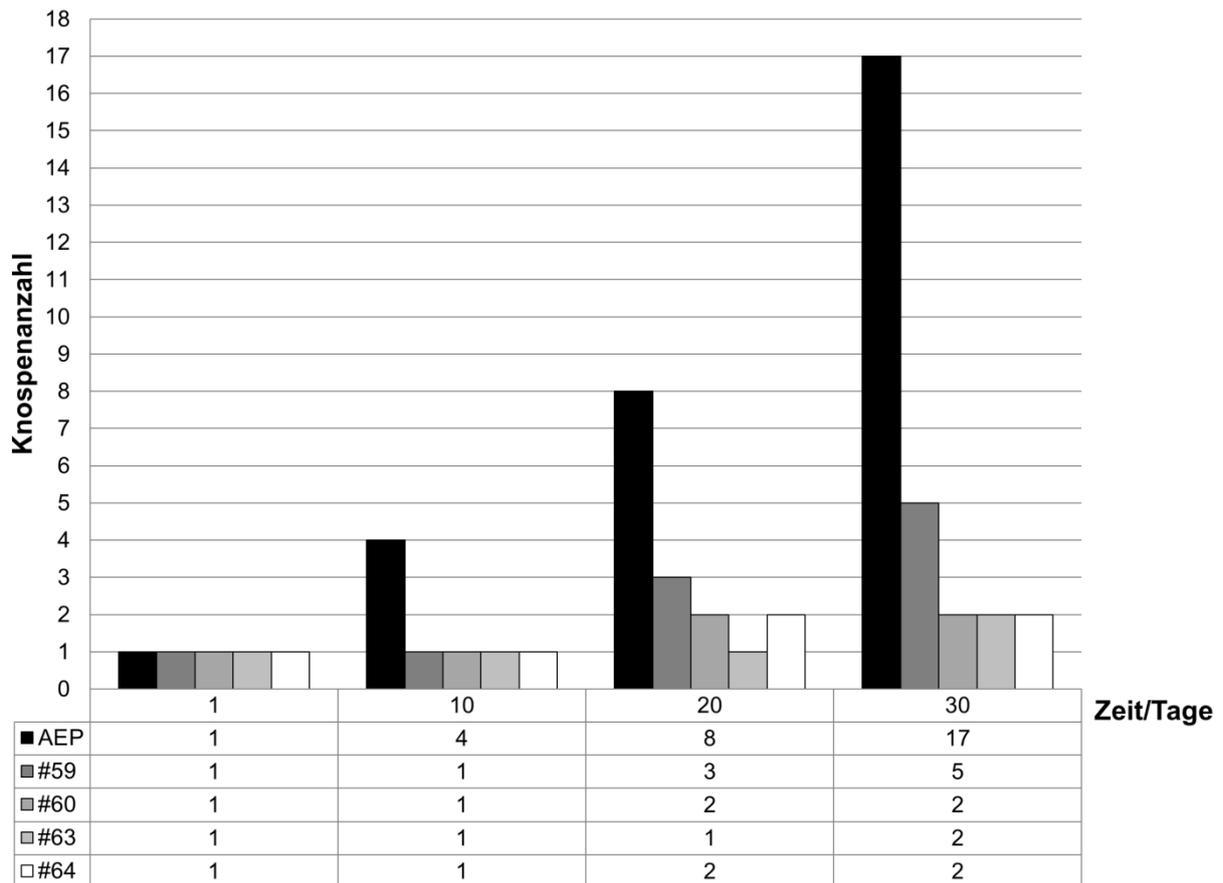


Abbildung 56: Reproduktionsrate der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren. Beginnend mit jeweils einem Polypen wurde die Anzahl der Polypen über 30 Tage dokumentiert. *Hydra vulgaris AEP* reproduzierte sich innerhalb von 30 Tagen von einem Polypen auf 17 Polypen. Eine PtdInsP-GFP-Sensor (#59) transgene *Hydra* reproduzierten sich innerhalb von 30 Tagen auf fünf Polypen, während sich die anderen Sensor- transgenen Hydren (#60, #63, #64) auf lediglich jeweils zwei Polypen. (Auswertung der Daten von Gideon Speich; von mir betreuter BSc Student).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren deutlich langsamer reproduzieren als nicht- transgene *Hydra vulgaris AEP*, obwohl sie zeitlich mehrere Knospen tragen können. Neben unterschiedlichen, vom Normalfall abweichenden Phänotypen erschwerte häufiger Pilzbefall, die Etablierung sowie die detaillierte Charakterisierung stabiler transgener Linien.

V.6.4 Der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor zeigt apikale Lokalisation in den ektodermalen Epithelmuskelzellen

Nach einer langwierigen Phase der Etablierung der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren konnten neben der anti-GFP- Antikörperfärbung an fixierten PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren auch ein *Spinning-Disc* Mikroskop am Fachbereich Medizin (Zeiss; AxioObserver.Z1) (Abb. 57 C) und ein *Light-Sheet* Mikroskop (Luxendo GmbH; InVi SPIM Lattice Pro) im Rahmen einer Vorführung (Abb. 58 A-D) für die *in vivo* Mikroskopie der lebenden Hydren getestet werden. Dabei sollte die subzelluläre Lokalisation der PtdInsPs in den ektodermalen Epithelmuskelzellen bestimmt werden. Weiterhin wird dadurch eine Aussage über mögliche Unterschiede der PtdInsPs, beziehungsweise deren PtdInsP-GFP-Sensoren, zwischen lebenden- und fixierten Polypen möglich. Für die *in vivo* Mikroskopie eigneten sich besonders teiltransgene Hydren, da ein starkes ubiquitäres Sensorsignal den Nachweis der spezifischen, zellulären Sensor- Lokalisation erschwert (Balla und Várnai, 2009).

Dabei zeigte sich, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor bei der *in vivo* Mikroskopie deutlich verstärkt in apikalen Membrankompartimenten der ektodermalen Epithelmuskelzellen nachgewiesen werden kann an (Abb. 57 C, D). Auch an fixierten und mittels anti-GFP- Antikörper angefärbten Polypen wird das Sensorsignal hauptsächlich apikal in Epithelmuskelzellen detektiert (Abb. 57 A, B, D).

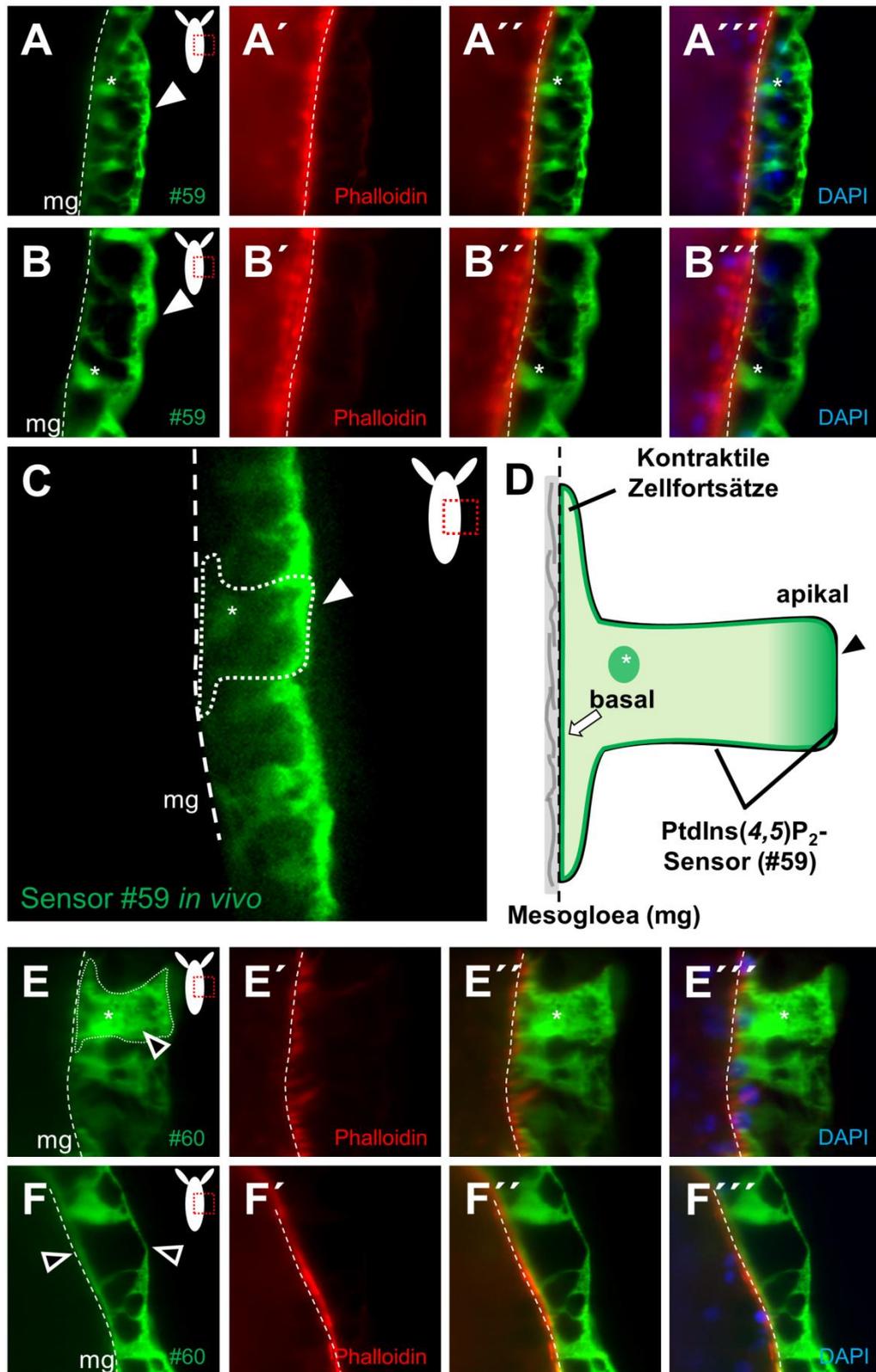


Abbildung 57: Apikale Lokalisation des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors. (A-B'') Die *Light-Sheet* Mikroskopie an fixierten und anti-GFP gefärbten Polypen des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors zeigt eine apikale Lokalisation (weißer Pfeilkopf). (E-F'') *Light-Sheet* Mikroskopie an fixierten und anti-GFP gefärbten Polypen der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Negativkontrolle (#60) zeigt eine ubiquitäre Verteilung sowie eine membranassoziierte Lokalisation (schwarzer Pfeilkopf). (C) *In vivo Spinning-Disc* Mikroskopie eines PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor transgenen Polypen zeigt deutliche apikale- (weißer Pfeilkopf) Lokalisation. (A-E) Fluoreszierende Aggregate im Zytoplasma und/oder am Zellkern sind nachzuweisen (Stern). (D) Schema der zellulären Verteilung des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors.

Neben dem membrangebundenen- und dem eindeutig apikal konzentrierten PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensorsignal, sind fluoreszierende subzelluläre Aggregate im Zytoplasma einiger Epithelmuskelzellen zu erkennen, die häufig direkt an/um den Zellkern nachgewiesen werden konnten (Abb. 57 A-C). Durch eine Doppelfärbung mit DAPI konnte jedoch kein eindeutige Kolokalisation des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors und der Zellkerne nachgewiesen werden (Abb. 57 A''', B''').

Anhand der Doppelfärbung mit Phalloidin ist zu erkennen, dass in den basalen Myonemen, in denen die Aktinfasern der Zelle verlaufen, keine Kolokalisation des F-Aktins und des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors nachgewiesen werden kann (Abb. 57 A'', B''). Dies verdeutlicht die primär apikale Lokalisation, und die fehlende, beziehungsweise sehr schwache basale Lokalisation des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors.

Im Vergleich zeigt der Kontroll- Sensor (#60) keine spezifische Lokalisation innerhalb der ektodermalen Epithelmuskelzelle, sondern liegt primär zytoplasmatisch vor (Abb. 57 E). Wenn die Zelle von einer großen Vakuole gefüllt ist, ist auch der Kontroll- Sensor hauptsächlich ubiquitär membrangebunden und ohne spezifische Lokalisation in der Zelle nachzuweisen (Abb. 57 F). Auch in der Negativkontrolle sind subzelluläre perinukleäre fluoreszierende Aggregate nachzuweisen, die jedoch nicht durch DAPI detektiert werden können (Abbildung 57 E, E'''). Weiterhin kann auch bei der Negativkontrolle (#60) keine basale Kolokalisation mit dem F-Aktin in den Myonemen nachgewiesen werden (Abb. 57 E'', F'').

Allgemein ist festhalten, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor bei teiltransgenen Hydren, die einen detaillierten Blick auf einzelne transgene Zellen oder Zellverbände ermöglichen, eine sehr deutliche und praktisch ausschließliche apikale Konzentration aufweist. Die entsprechende Kontrolle (#60) hingegen weist entweder ein zytoplasmatisches- oder ein membrangebundenes, jedoch nie in einem der Zellkompartimente spezifisch lokalisiertes Signal auf. Zwischen der *in vivo* Mikroskopie und der *Light-Sheet* Mikroskopie (auch am fixierten Polypen) ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor- Lokalisation nachzuweisen.

V.6.5 Der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor zeigt eine basale Lokalisation in den ektodermalen Epithelmuskelzellen

Im Vergleich zu dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor ist der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor bei der *in vivo* Mikroskopie hauptsächlich basal in den ektodermalen Epithelmuskelzellen nachzuweisen (Abb. 58 A-D). Zusätzlich ist sowohl im Cnidocil, als auch an der apikalen Kappe der Nesselkapseln in den Tentakel der *Hydra* ein starkes PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensorsignal durch die *in vivo* Mikroskopie erkennbar (Abb. 58 B, B' C, C').

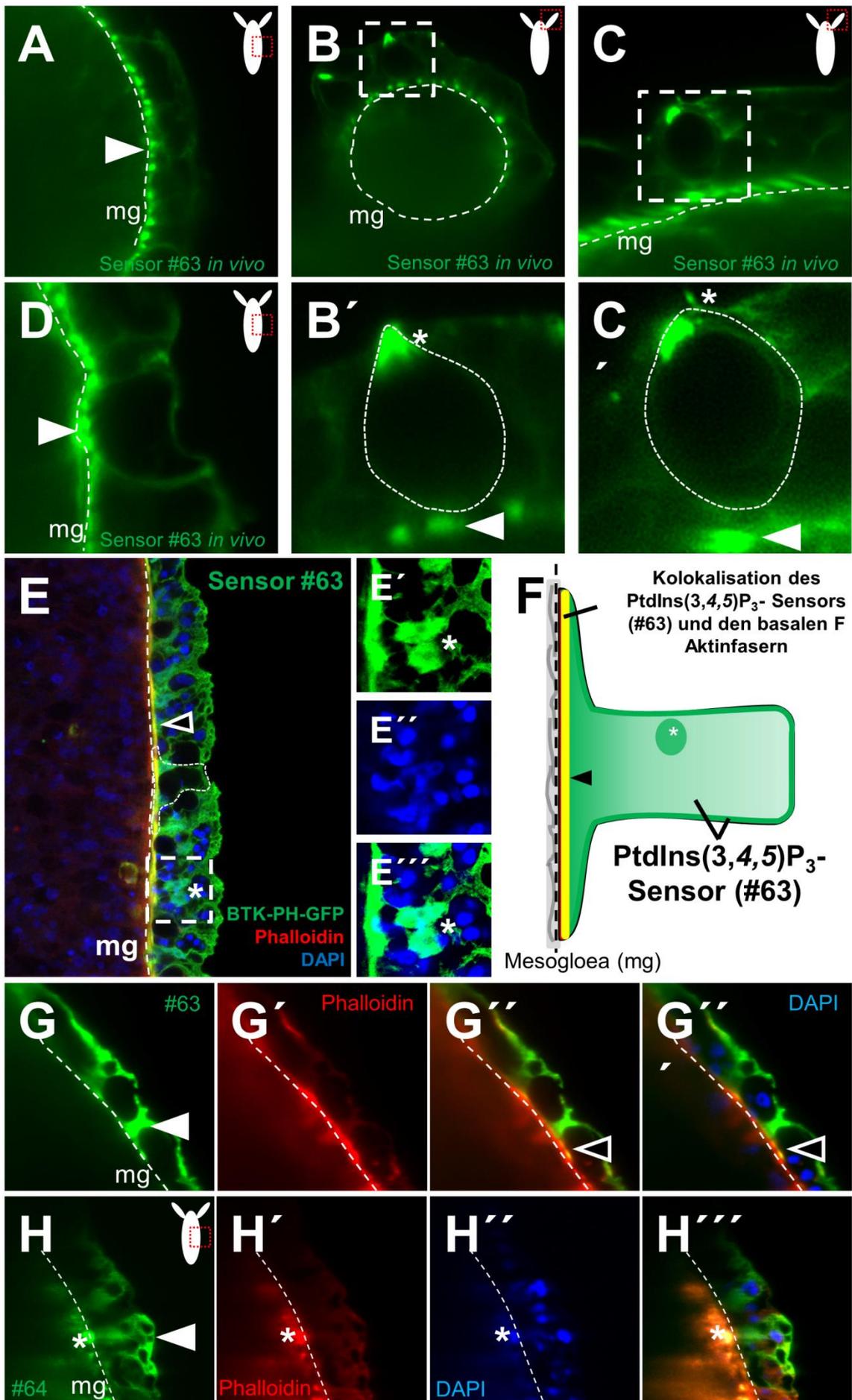


Abbildung 58: Basale und basolaterale Lokalisation des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP Sensors. (A-D) *In vivo Light-Sheet* Mikroskopie eines PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor transgenen Polypen mit deutlicher basaler Lokalisation des Sensors (weißer Pfeilkopf) ist in ektodermalen Epithelmuskelzellen. (B, C) Eine starke Akkumulation des Sensors in den Cnidocilien der Nesselzellen ist nachzuweisen (Stern). (E) Anti-GFP- Antikörper-, Phalloidin- und DAPI- Färbung eines PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor transgenen Polypen. KLSM- Aufnahmen zeigen eine ubiquitäre zytoplasmatische Verteilung sowie eine starke basale Lokalisation des Sensors, die mit den Fasern des F-Aktins in Myonemen korreliert (schwarzer Pfeilkopf). (E'-E'') Die Kolokalisation mit einigen wenigen Zellkernen ist zu erkennen (Stern). (F) Schema der zellulären Verteilung des PtdIns(3,4,5)P₃- Sensors. (G-H) Detektion des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors (G) und der Negativkontrolle (H) mittels anti-GFP- Antikörperfärbung am *Light-Sheet* Mikroskop. (G) Sensor ist membrangebunden und stark basolateral angereichert (weißer Pfeilkopf). (G') Durch die Färbung der Aktinfasern (G'') ist schwach eine basale Kolokalisation des Sensors und der basalen Aktinfasern detektierbar (schwarzer Pfeilkopf). (H) Die Negativkontrolle liegt vor allem zytoplasmatisch vor (weißer Pfeilkopf). (H') Durch die Färbung der Aktinfasern und der Zellkerne (H'') ist keine Kolokalisation mit der Negativkontrolle nachweisbar. (H-H'') In allen Kanälen waren stark fluoreszierende Aggregate nachweisbar (Stern).

Dieses deutlich lokalisierte Signal ist nach dem Fixieren und dem Anfärben der Polypen nicht mehr detektierbar gewesen. Weiterhin ist das basale Sensorsignal durch das Anfärben zwar noch nachzuweisen, allerdings ist im Vergleich zu der *in vivo* Mikroskopie zusätzlich auch eine zytoplasmatische, basolaterale und leicht apikale Lokalisation des Sensors nachweisbar (Abb. 58 E, G).

Durch die Doppelfärbung mit Phalloidin ist am kLSM eine deutliche Kolokalisation des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors und der basal gelegenen Aktinfasern in den Myonemen erkennbar (Abb. 58 E), während am *Light-Sheet* Mikroskop an fixierten Präparaten diese Kolokalisation nur punktuell nachgewiesen werden konnte (Abb. 58 G'). Weiterhin konnte durch die Doppelfärbung mit DAPI eine Kolokalisation des Sensorsignals mit große Zellkernen nachgewiesen werden, während keine Kolokalisation in kleinen Zellkernen erkennbar ist (Abb. 58 E-E''). Die Negativkontrolle (#64) des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors liegt wie die Negativkontrolle des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors (#60) hauptsächlich zytoplasmatisch vor (Abb. 58 H-H'') und zeigt keine spezifische Lokalisation in einem der Zellkompartimente.

Besonders in der Nähe des Hypostoms konnte die membrangebundene Lokalisation des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors deutlich durch eine apikale Aufsicht nachgewiesen werden (Abb. 59 A, A'). Im Vergleich dazu ist bei dem PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor wiederum deutlich zu erkennen, dass er häufig an oder in enger Nähe zu Zellkernen bindet, während der Nukleolus frei bleibt (Abb. 59 B, B'). Weiterhin zeigt sich in der Nähe des Hypostoms eine laterale Konzentration des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors in Richtung des Hypostoms in den ektodermalen Epithelmuskelzellen bei *Hydra* (Abb. 59 B'), welche bei dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor nicht detektiert werden konnte.

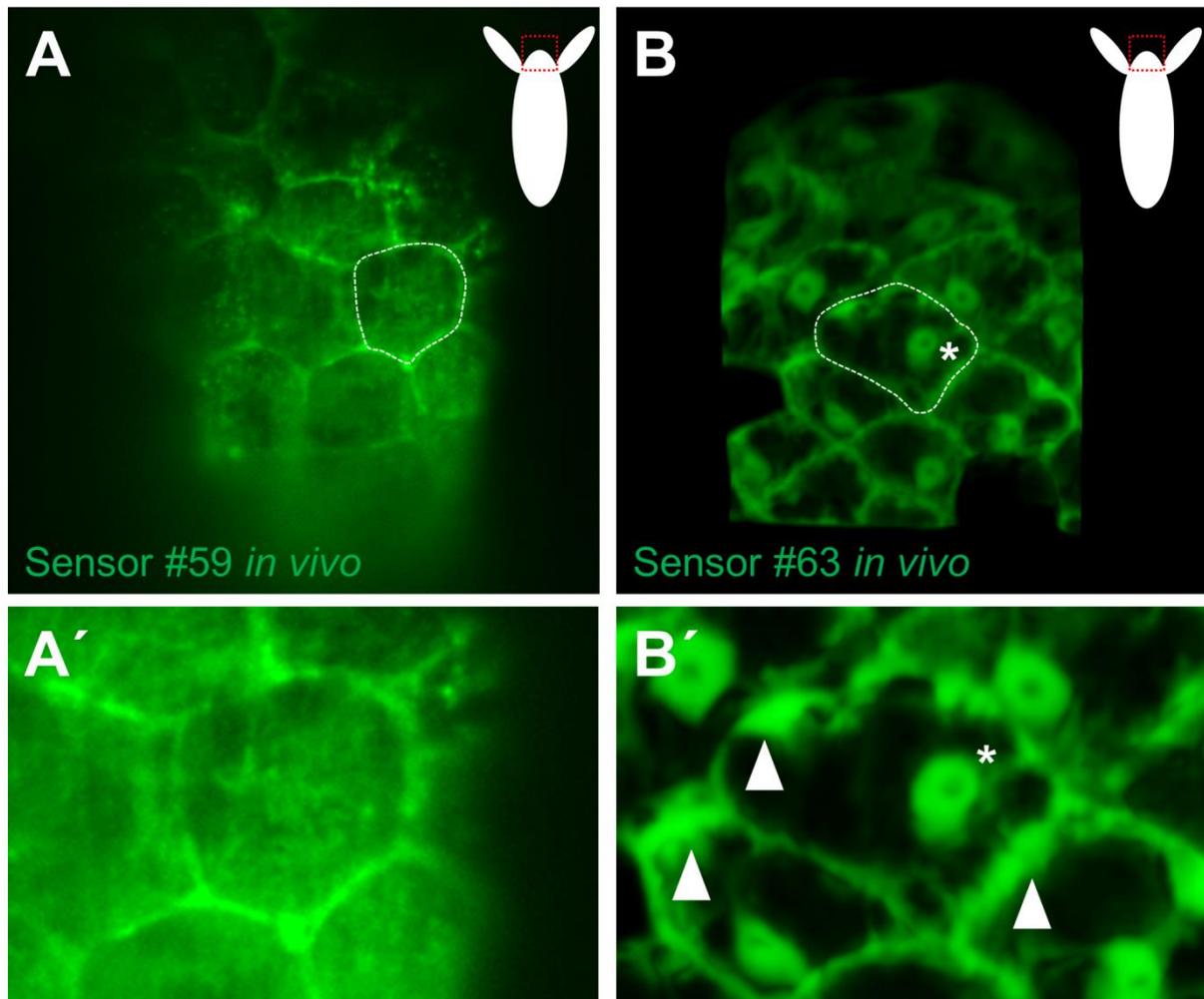


Abbildung 59: Apikale Aufsicht auf ektodermale Epithelmuskelzellen von PtdIns(4,5)P₂-GFP-Sensor- und PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensor transgenen Hydren nahe des Hypostoms. (A, A') Membrangebundenes PtdIns(4,5)P₂-GFP-Sensorsignal. (B, B') Membrangebundenes sowie Zellkern-assoziiertes (Stern) PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensorsignal. (B') Laterale Lokalisation des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensors in Richtung des Hypostoms ist erkennbar (weiße Pfeilköpfe).

Bezüglich der Lokalisation des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensors kann festgehalten werden, dass dieser im Gegensatz zum PtdIns(4,5)P₂-GFP-Sensor in basalen Zellkompartimenten der ektodermalen Epithelmuskelzellen konzentriert nachzuweisen ist. Während sowohl beim PtdIns(4,5)P₂-GFP-Sensor, als auch beim PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensor im Zytoplasma keine Signal detektiert werden kann, bindet der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensor deutlich an große Zellkerne des Ektoderms. Weiterhin kann in der Nähe des Hypostoms eine laterale Konzentration des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensors in Richtung des Hypostoms in den ektodermalen Epithelmuskelzellen beobachtet werden. Zwischen der *in vivo* Mikroskopie am *Light-Sheet* Mikroskop (Luxendo) oder dem *Spinning-Disc* Mikroskop (Zeiss) und der Mikroskopie an fixierten und gefärbten Hydren am kLSM-, beziehungsweise *Light-Sheet* Mikroskopie (Luxendo) besteht ein großer Unterschied. Bei den lebenden Polypen ist eine starke basal lokalisierte Konzentration des Sensorsignals und beinahe kein zytoplasmatisches Sensorsignal nachzuweisen. Im Vergleich dazu ist nach der Fixierung und

der Antikörperfärbung der Sensor auch im Zytoplasma und ubiquitär an der Zellmembran zu detektieren. Ein Nachweis der Kolokalisation des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors und der basal verlaufenden Myoneme in den ektodermalen Epithelmuskelzellen ist vor allem durch die detaillierte Mikroskopie am kLSM möglich gewesen. Für die korrekte Detektion der subzellulären Lokalisation der PtdInsP-GFP- Sensoren ist die *in vivo* Mikroskopie unbedingt notwendig.

V.6.6 Intensitätsanalyse der PtdInsP-GFP- Sensorsignale in ektodermalen Epithelmuskelzellen

Um eine Aussage über den Konzentrationsunterschied des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors und des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors im Vergleich zu den Kontrollen (#60 und #64) treffen zu können wurde die subzelluläre Verteilung und Intensität des GFPs untersucht (Abb. 60). Dabei wurde die Messgerade jeweils durch, für diesen Sensor typische Signallokalisationen gelegt. Dabei ist zu erkennen, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor etwa doppelt so stark am apikalen Pol der Zelle bindet wie in der basalen Domäne (Abb. 60 A-B'; grün hinterlegt). Durch die Intensitätsanalyse wird deutlich, dass im Zytoplasma der ektodermalen Epithelmuskelzellen in der Regel kein PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor detektiert wird (Abb. 60 A-B'; rot hinterlegt). Das Sensor bindet an zytoplasmatische Aggregaten, wobei das Signal in seinem Intensitätslevel zwischen der Intensität der basalen- und der apikalen Zellmembran liegt (Abb. 60 A, A'; blau hinterlegt). Im Gegensatz zum PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor ist der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor an der basalen Zellmembran etwa doppelt so stark konzentriert (Abb. 60 C, C'; grün hinterlegt). Im Zytoplasma ist wiederum kaum Signal des Sensors nachzuweisen (Abb. 60 C, C'; rot hinterlegt). Im Nukleolus fehlt das Sensorsignal (Abb. 60 C, C'; blau hinterlegt; Stern).

Bei den Negativkontrollen (#60 und #64) ist kaum Sensorsignal an der Zellmembran, beziehungsweise den basalen- und apikalen Zellkompartimenten nachzuweisen (Abb. 60 B, B', D, D'; grün hinterlegt), wohingegen im Zytoplasma eine hohe Konzentration detektiert werden konnte (Abb. 60 B, B', C, C'; rot hinterlegt). Im Vergleich zu dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor und dem PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor ist die Intensität in den basalen- und apikalen Regionen gleich. Die Negativkontrolle des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors (#60) bindet im Vergleich zu der Negativkontrolle des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors stark perinukleär (Abb.60 B, B', D, D').

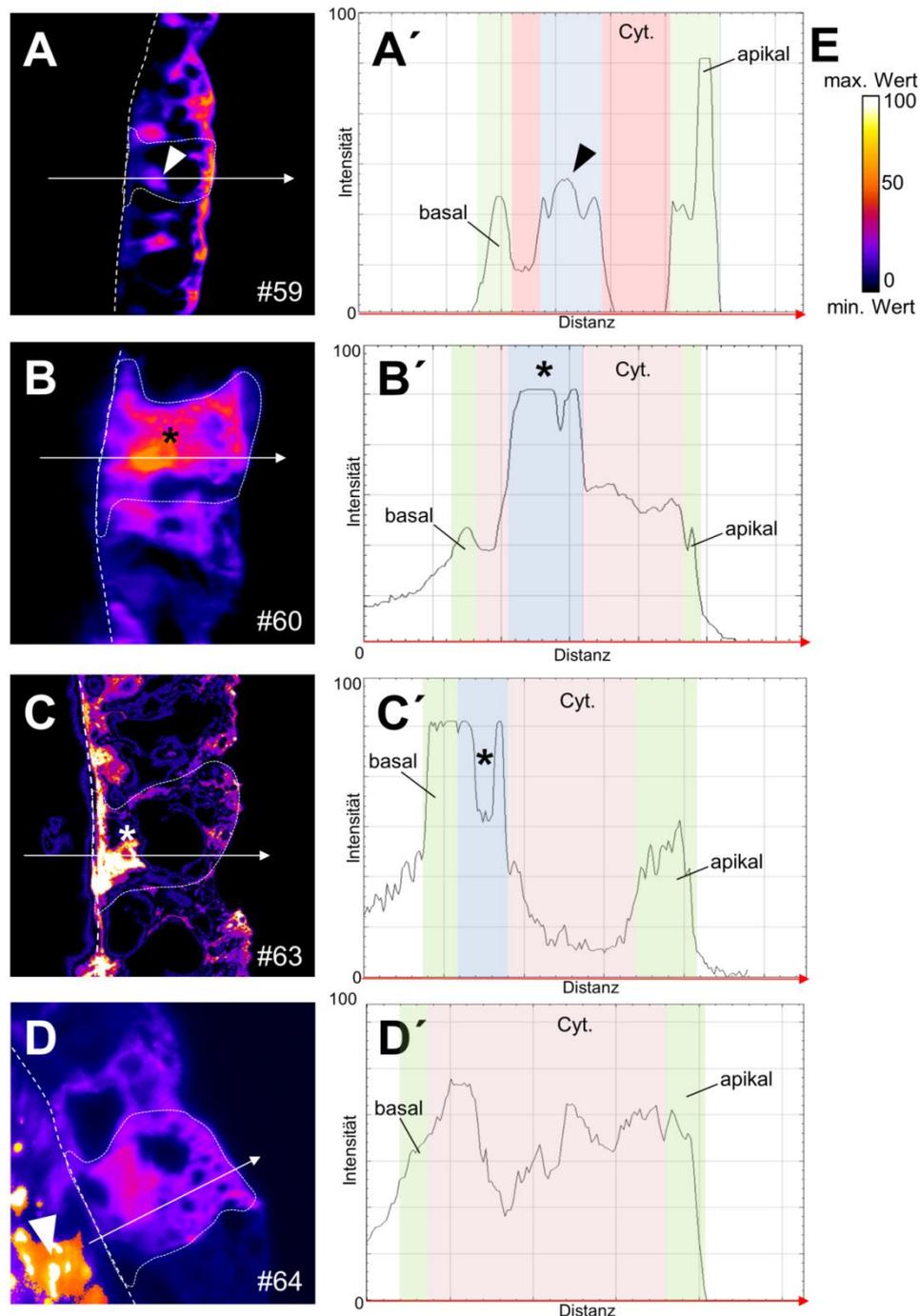


Abbildung 60: Bestimmung der regiospezifischen Signalintensität der PtdInsP-GFP-Sensoren (#59 und #63) und deren Kontrollen (#60 und #64) in ektodermalen Epithelmuskelzellen zur. (A-D) Signalintensitäten entlang einer Messgeraden (weißer Pfeil) durch die ektodermalen Epithelmuskelzellen und deren Zellkerne (Stern) sowie z.T. dem Nukleolus. (A'-D') Profil der Signalintensitäten entlang der Messgeraden (Pfeil). Sensorsignal im Zytoplasma ist rot hinterlegt, basal- oder apikal lokalisiertes Signal ist grün hinterlegt und Sensorsignal, welches mit dem Zellkern oder fluoreszierenden Aggregaten im Zytoplasma korreliert ist blau hinterlegt. (A, A') Der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor zeigt eine starke apikale Lokalisation. Basal und in fluoreszierenden Aggregaten (schwarzer Pfeilkopf) ist der Sensor praktisch nicht nachzuweisen. Im Zytoplasma (Cyt.) ist kaum Signal nachzuweisen. (C, C') Der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor zeigt eine starke basale Lokalisation. Apikal und im Zytoplasma (Cyt.) ist kaum Signal nachzuweisen. Ein starkes Signal ist Zellkern- assoziiert, während im Nukleolus kaum Signal detektiert werden kann. (B, B', D, D') Die Negativkontrollen des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors (#60) und des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors (#64) zeigen ein starkes zytoplasmatisches Signal ohne verstärktes Signal in basalen oder apikalen Zellkompartimenten. Die Negativkontrolle #60 zeigt weiterhin ein Zellkern- assoziiertes (Stern) Sensorsignal.

Durch die Intensitätsanalyse wurde bestätigt, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor stark am apikalen Pol, beziehungsweise der apikalen Zellmembran in ektodermalen Epithelmuskelzellen bindet. Zwar bindet der Sensor auch im lateralen und basalen Membrankompartiment, doch ist hier die Intensität des Sensors auf weniger als 50 % reduziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor neben der Zellmembran auch schwach an fluoreszierende Aggregate im Zytoplasma binden kann. Im Gegensatz zu dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors bindet der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor am basalen Pol, beziehungsweise der basalen Zellmembran von ektodermalen Epithelmuskelzellen. Weiterhin konnte ein starkes Sensorsignal an/in großen Zellkernen der ektodermalen Epithelzellen nachgewiesen werden, während das Signal am/im Nukleolus des Zellkerns deutlich reduziert ist. Die Signalintensität am/im Zellkern entspricht dabei der Intensität der basalen Zellmembran. Die beiden Negativkontrollen (#60 und #64) zeigen jeweils ein hauptsächlich zytoplasmatisches Sensorsignal.

V.6.7 Translokation des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensorsignals in das Zytoplasma während des späten Knospungsprozesses

Bei frühen Knospen während der Initiations- und der Elongationsphase ist der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor an der apikalen Zellmembran angereichert und es konnte keine Veränderung des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensorsignals beobachtet werden. Jedoch wird bei den späten Knospenstadien ersichtlich, dass das Sensorsignal massiv in das Zytoplasma transloziert (Abb. 61). Im Vergleich dazu konnte bei dem PtdIns(4,5)P₂- Kontrollsensor (#60) keine Veränderung des Sensorsignals an der Knospenbasis beobachtet werden (siehe Anhang 19). Neben der *in vivo* Beobachtung des Sensorsignals an der Knospenbasis (Abb. 61 A-C) wurden fixierte und gefärbte Polypen zur detaillierten zellulären Untersuchung des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors angefertigt (Abb. 61 D), da bei dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors das Sensorsignal durch das Fixieren und die Antikörperfärbung nicht signifikant verändert wird (Abb. 57).

Bei der *in vivo* Mikroskopie war zu beobachten, dass der Sensor ungefähr ab dem Knospenstadium 6 an einer Seite der Knospenbasis begann eine zytoplasmatische Lokalisation zu zeigen (Abb. 61 A). Im Laufe der Knospung bildet sich ein Kreis an der Knospenbasis, in dessen Zellen der Sensor sehr stark zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 61 B). Dies steht in starkem Gegensatz zum Gewebe der Körpersäule des Muttertieres, wo das Signal hauptsächlich membrangebunden ist (Abb. 61 B).

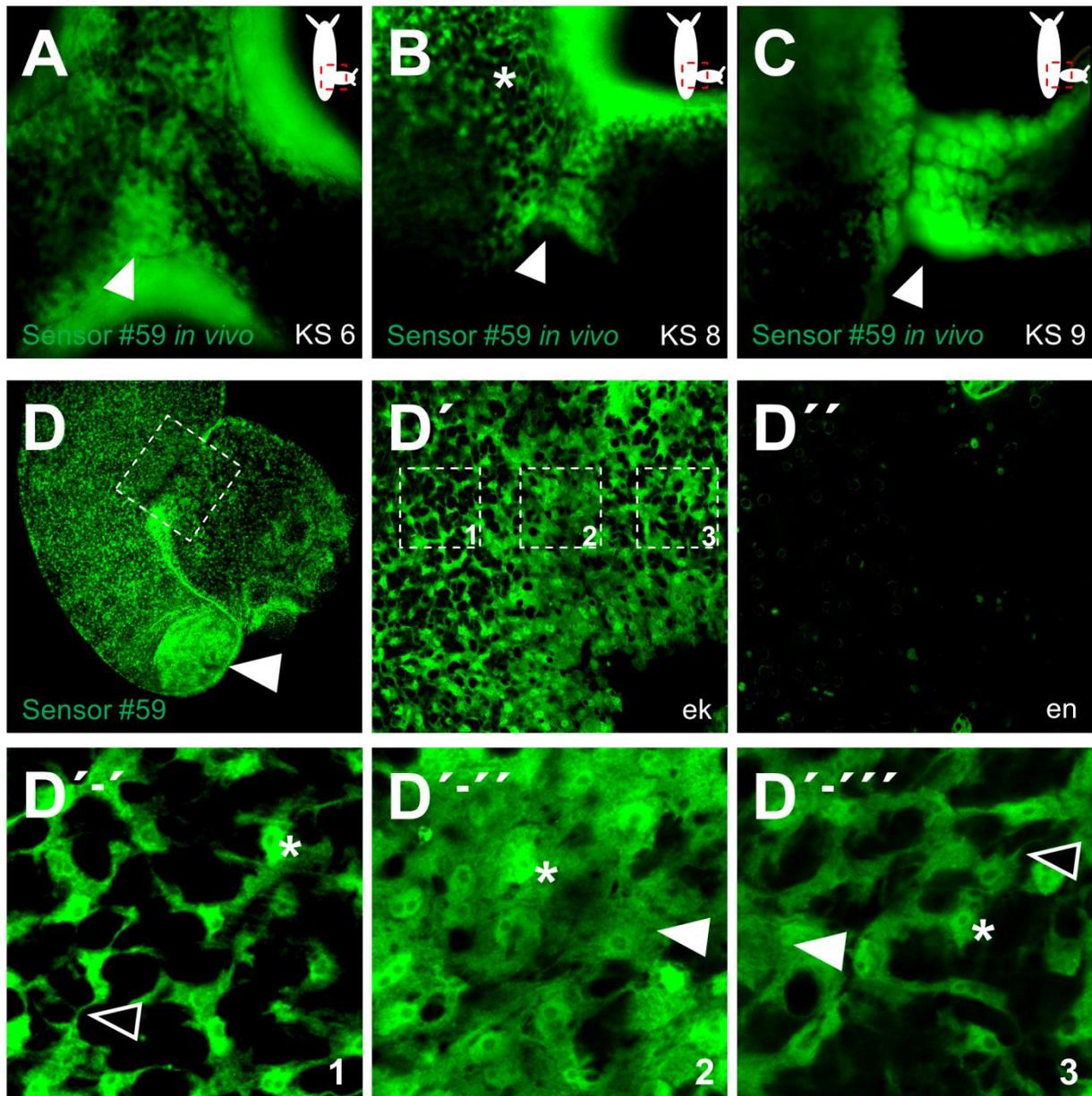


Abbildung 61: Translokalisierung des membranständigen PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors in das Zytoplasma der Zellen an der Knospenbasis von Hydra. (A-C) *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie (ohne *Spinning-Disc*- oder *Light-Sheet* Mikroskopie) der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor volltransgenen Hydren. Ein starkes zytoplasmatisches Sensorsignal an der Knospenbasis ist nachzuweisen (weißer Pfeilkopf), während in umliegendem Gewebe der Sensor hauptsächlich membrangebunden und zellkern- assoziiert vorliegt (Stern). (D-D''''') Detektion des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors an volltransgenen Hydren mittels anti-GFP- Antikörperfärbung am kLSM. (D', D'') Vergrößerungen aus D. Starkes Sensorsignal in ektodermalen Epithelmuskelzellen (D') und kein Sensorsignal in endodermalen Epithelmuskelzellen (D'') nachzuweisen. (D'''-D''''') Vergrößerung aus D'. Membranständiges (schwarzer Pfeilkopf) und zellkernassoziiertes (Stern) Sensorsignal im Gewebe des Muttertieres (D'''). Starkes zytoplasmatisches (weißer Pfeilkopf) und zellkernassoziiertes (Stern) Sensorsignal direkt an der Knospenbasis (D'''''). Membranständiges (schwarzer Pfeilkopf), zytoplasmatisches (weißer Pfeilkopf) und zellkernassoziiertes Sensorsignal (Stern) (D'''''). Knospenstadium (KS), Endoderm (en), Ektoderm (ek).

In der Ablösephase der Knospe, ist der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor im Zytoplasma der neugebildeten Fußzellen der Knospe nachzuweisen und wird dort stets zytoplasmatisch (Abb. 61 D und Anhang 19). Durch die detaillierte Mikroskopie am kLSM konnte eine klare

Translokation des PtdIns(4,5)P₂- Sensors an der Knospenbasis gezeigt werden (Abb. 61 D). Während der Sensor stark in den ektodermalen Epithelmuskelzellen der ektodermal transgenen Linie detektiert werden kann (Abb. 61 D') ist keinerlei Signal im Endoderm nachweisbar (Abb. 61 D'').

In der Körpersäule des Muttertieres ist das Sensorsignal im Bereich der Knospungszone hauptsächlich membrangebunden oder Kern- assoziiert nachzuweisen (Abb. 61 D'''). Direkt im Bereich der Knospenbasis liegt das Signal des Sensors nicht mehr membrangebunden, sondern zytoplasmatisch vor (Abb. 61 D'''). Im Gewebe der auswachsenden Knospe ist der Sensor, sowohl an der Membran als auch im Zytoplasma und am/im Zellkern (Abb. 61 D''''') zu detektieren.

Zur Analyse der Signalintensität an der Knospenbasis wurden Messgeraden jeweils diagonal durch die kLSM- Aufnahmen gelegt (Abb. 62 A-C), um eine Aussage über die durchschnittliche Signalintensität in dieser Region des Polypen zu erhalten.

Die Analyse der Signalintensität entlang Messgeraden zeigt deutlich, dass im Gewebe des Muttertieres der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor nur an der Membran (Abb. 62 A, A'; grün hinterlegt) und an/in den Zellkernen bindet (Abb. 62 A, A'; blau hinterlegt), während so gut wie kein Signal im Zytoplasma nachgewiesen werden kann (Abb. 62 A, A'; rot hinterlegt).

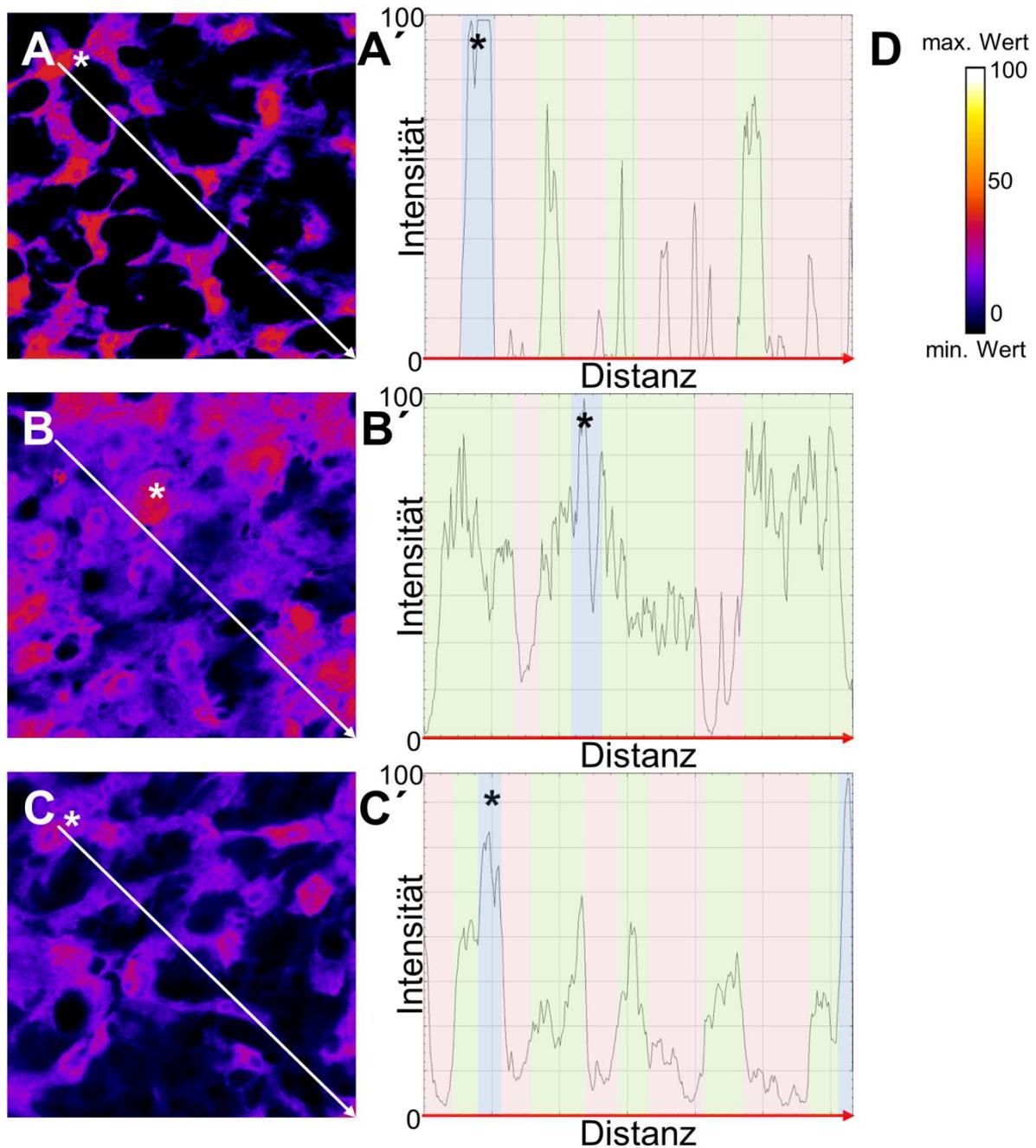


Abbildung 62: Signalintensität des PtdIns(4,5)P₂-GFP-Sensorsignals an der Knospbasis. (A, A') Signalintensität im Gewebe des Muttertieres an der Knospbasis entlang einer diagonalen Messgeraden (Pfeil). Starkes Sensorsignal an den Zellkernen (Stern; blau hinterlegt) und an den Zellmembranen (grün hinterlegt). Kaum nachweisbares Sensorsignal im Zytoplasma (rot hinterlegt). (B, B') Signalintensität direkt an der Knospbasis entlang einer diagonalen Messgeraden (Pfeil). Starkes zytoplasmatisches (grün hinterlegt) und Zellkern-assoziiertes (blau hinterlegt) Sensorsignal. Schwaches Sensorsignal vermutlich auf nicht-transgene Bereiche oder Vakuolen zurückzuführen (rot hinterlegt). (C, C') Signalintensität im Gewebe der auswachsenden Knospe an der Knospbasis entlang einer diagonalen Messgeraden (Pfeil). Starkes Signal an den Zellkernen (blau hinterlegt). Deutliches membrangebundenes Sensorsignal (grün hinterlegt) und schwaches Signal im Zytoplasma ist nachzuweisen (rot hinterlegt). (D) Skala der Signalintensität.

Direkt an der Knospbasis hingegen ist der Sensor hauptsächlich im Zytoplasma zu detektieren (Abb. 62 B, B'; grün hinterlegt) und eine Lokalisation an den Zellmembranen kann in diesem Bereich nicht mehr nachgewiesen werden. Lediglich wenige Bereiche

entlang der Messgeraden, an denen der Sensor keine hohe Signalintensität aufweist waren festzustellen (Abb. 62 B, B'; rot hinterlegt).

In dem Gewebe der auswachsenden Knospe ist durch die Intensitätsanalyse deutlich zu erkennen, dass in diesem Bereich Zellen vorliegen, in denen der Sensor membrangebunden und zytoplasmatisch vorliegt (Abb. 62 C, C'; grün hinterlegt). In diesen Zellen ist oft eine hohe Signalintensität an den Zellkernen (Abb. 62 C, C'; blau hinterlegt) nachweisbar. Gleichzeitig sind in dem Gewebe der auswachsenden Knospe, vergleichbar zum Gewebe des Muttertieres, jedoch auch Zellen, in denen das Signal lediglich an der Zellmembran aber nur sehr schwach im Zytoplasma zu detektieren ist (Abb. 62 C, C'; rot hinterlegt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor in der späten Phase des Knospungsprozesses in proximalen Knospenzellen eine Translokation vollzieht und das membrangebundene Signal in ein zytoplasmatisches übergeht. Im dem Gewebe der auswachsenden Knospe ist eine Mischung aus membrangebundenen- und zytoplasmatisch lokalisiertem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensorsignal nachzuweisen, während das Sensorsignal im Gewebe des Muttertieres hauptsächlich membrangebunden und Zellkern- assoziiert nachweisbar ist.

V.6.8 Translokation des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Signals in das Zytoplasma während des Wundverschlusses

Anders als der PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor scheint der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor bei der Knospung keine Rolle zu spielen (nicht gezeigte Daten). Allerdings spricht dieser Sensor auf die Regeneration, beziehungsweise den Wundverschluss an.

Unter normalen Bedingungen liegt der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor sowohl membrangebunden, als auch zytoplasmatisch lokalisiert vor (Abb. 63 A-A'), wodurch sich durch die Intensitätsanalyse vereinzelte zytoplasmatische Signalkonzentrationen in Zellen der transgenen Tiere nachweisen lassen (Abb. 63 A'''; beispielhaft blau hinterlegt).

Im Vergleich dazu ist der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor während des Prozesses des Wundverschlusses an der Schnittstelle stark zytoplasmatisch nachzuweisen, was weder bei dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor, noch bei der Kontrolle zu beobachten war (Anhang 19). Weiter von der zugefügten Schnittstelle entfernen liegt das PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensorsignal weiterhin membrangebunden vor (Abb. 63 B-D).

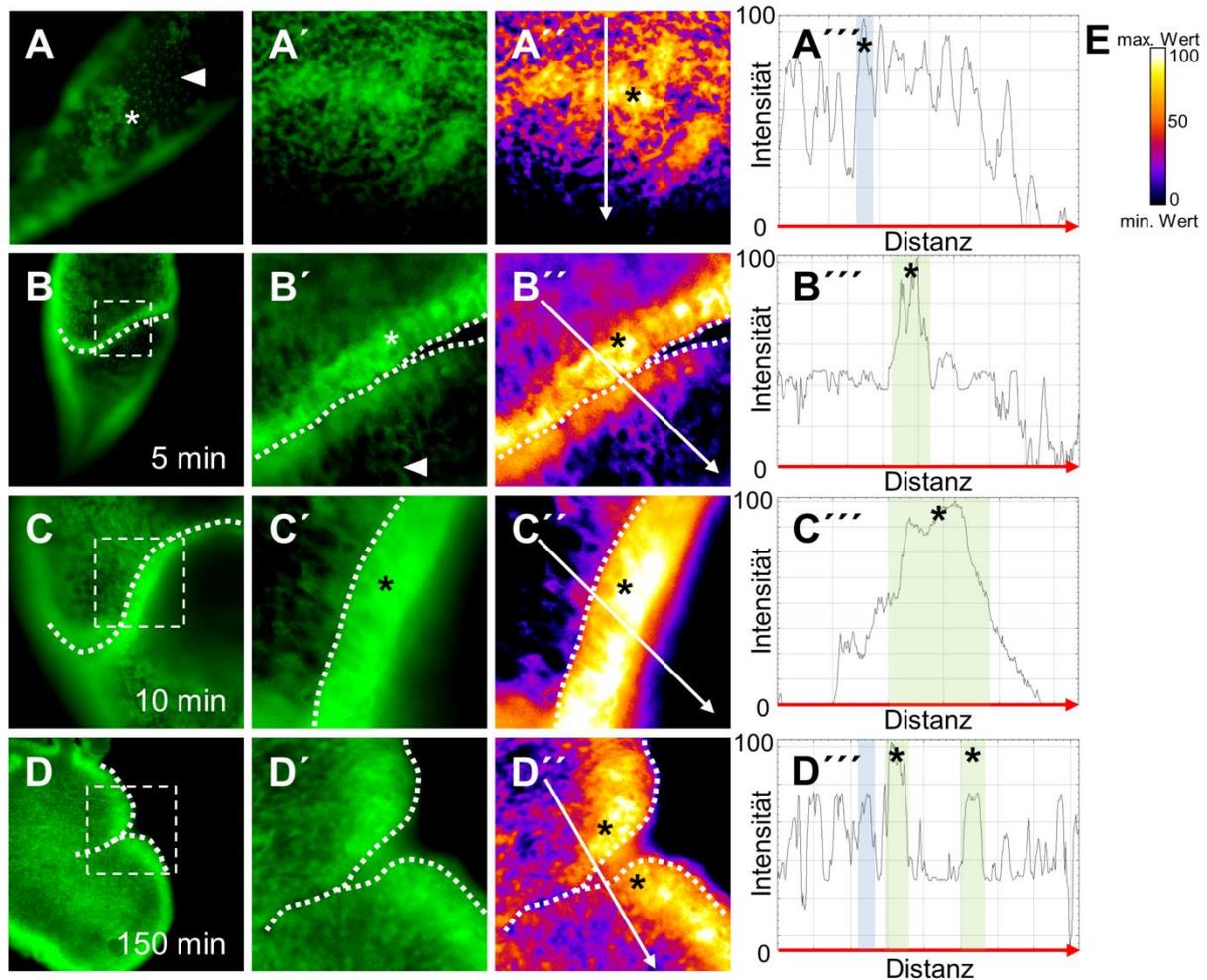


Abbildung 63: Translokalisierung des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensors in das Zytoplasma von Zellen an der Regeneration induzierenden Schnittstelle. (A-A''') Unter normalen Bedingungen zeigt der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensor entlang der Körpersäule entweder ein membrangebundenes (weißer Pfeilkopf) oder ein starkes zytoplasmatisches Signal (Stern). (A'', A''') Die Signalintensität entlang einer Messgeraden (Pfeil) ist in manchen Zellen stark zytoplasmatisch (Stern; blau hinterlegt). (B-B''') Fünf Minuten nach einem Schnitt ist an der Wunde ein starkes zytoplasmatisches Signal (Stern; grün hinterlegt) nachzuweisen, während der Sensor im umliegenden Gewebe membrangebunden vorliegt (weißer Pfeilkopf). (C-C''') 10 Minuten nach dem zugefügten Schnitt ist an der Schnittstelle weiterhin ein starkes zytoplasmatisches Signal (Stern; grün hinterlegt) nachzuweisen, während in umliegendem Gewebe der Sensor weiterhin membrangebunden vorliegt (weißer Pfeilkopf). (D-D''') 150 Minuten nach dem zugefügten Schnitt ist an der Schnittstelle ein zytoplasmatisches Signal (Stern; grün hinterlegt) nachzuweisen, welches ungefähr dem Intensitätslevel des Signals in dem umliegenden Gewebe entspricht (blau hinterlegt). (E) Skala der Signalintensität.

Kurz nach dem zugefügten Einschnitt mittig in der Körpersäule ist das Sensorsignal hauptsächlich im Zytoplasma in allen Zellen unmittelbar an der noch offenstehenden Wunde zu beobachten (Abb. 63 B-B'''). Die Analyse der Signalintensität zeigt ein deutlich stärkeres zytoplasmatisches Sensorsignal in den Zellen direkt an der Schnittstelle (Abb. 63 B'''; grün hinterlegt), im Vergleich zu dem membranständigen Sensorsignal des umliegenden Gewebes. Circa 10 Minuten nach dem zugefügten Schnitt ist die offenstehende Wunde bereits wieder weitestgehend verschlossen und der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensor weist in wenigen Zellreihen an dem Schnitt ein sehr starkes zytoplasmatisches Signal auf. Zellen, in

denen der Sensor im Zytoplasma vorliegt, weisen eine klare Grenze zu den Zellen auf, in denen der Sensor membrangebunden ist (Abb. 63 C-C''). Die Intensitätsanalyse des Sensorsignals zeigt, dass sehr lokal an der Schnittstelle weiterhin eine hohe Signalstärke nachgewiesen werden kann (Abb. 63C'''; grün hinterlegt), während weiter vom Schnitt entfernt kein Signal nachweisbar ist. Ungefähr zwei bis drei Stunden nach dem zugefügten Schnitt, ist die Wunde verschlossen und nur noch als Kerbe im Gewebe zu erkennen (Abb. 63 D-D''; Stern), an der aber weiterhin ein verstärktes Sensorsignal vorliegt (Abb. 63 D'''; grün hinterlegt). Allerdings ist vergleichbar zu der Signalintensität vor dem Einschnitt, nach 150 Minuten das Sensorsignal wieder sowohl zytoplasmatisch, als auch membrangebunden nachzuweisen (Abb. 63 D'''; blau hinterlegt). Im Vergleich dazu zeigt die Kontrolle des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors (#64) zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung des Sensorsignals an der Schnittstelle (Anhang 19).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor unter normalen Bedingungen sowohl eine zytoplasmatische, als auch eine membrangebundene Lokalisation aufweist. Nach einem zugefügten Schnitt ist der Sensor massiv im Zytoplasma in allen Zellen unmittelbar an der offenstehenden Schnittstelle zu beobachten, während bei vom Schnitt entfernten Zellen der Sensor weiterhin membrangebunden vorliegt. Nachdem die offenstehende Wunde im Laufe des Regenerationsprozesses verschlossen wurde (nach circa 150 Minuten), ist eine leichte Erhöhung der Signalintensität an der ehemaligen Schnittstelle nachzuweisen. Das „Salz-und-Pfeffer“ Muster, von Zellen die den Sensor zytoplasmatisch oder membrangebunden tragen, entspricht weitestgehend dem Zustand des Sensormusters vor dem Schnitt.

VI. Diskussion

VI.1 Rho Proteine in *Hydra*

VI.1.1 RhoA als ursprünglichste Rho- GTPase der RhoABC- Familie

Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass Rho, Cdc42 und RhoBTB durch Genduplikation aus Rac hervorgegangen sind, welches vermutlich die ursprünglichste Rho-GTPase darstellt. Durch diese frühe Duplikation konnten in allen Eukaryoten mindestens eine Rho- GTPase nachgewiesen werden (Boueux et al., 2007). Seit der Abspaltung der tierischen- von den pflanzlichen Rho- GTPasen fanden zahlreiche Duplikationen der Gene der Vertreter der Ras- Superfamilie statt (Hedges et al., 2004). Dadurch sind im Laufe der Evolution aus 5-6 Rho- GTPasen (Hefe) beispielsweise über 20 verschiedenen Rho- GTPasen (Mammalia) entstanden (Wheeler und Ridley, 2004), die jeweils spezifische Funktionen regulieren können. Die Rho- GTPase RhoA erfüllt dabei spezifisch die Aufgaben des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Aktinreorganisation (Wheeler und Ridley, 2004). Weiterhin ist während der Embryogenese ein Rho- GTPase vermittelter Signalweg bei Bilateria an der Regulation des Aktinzytoskeletts, zur Trennung von Geweben, beteiligt (Fagotto et al., 2013; Fagotto, 2014). Für die Untersuchung des Prozesses der Gewebetrennung bietet sich *Hydra* als Modell und speziell der Prozess der Knospung zur Untersuchung an. Daher wurden zunächst phylogenetische Analysen der Rho- GTPasen, speziell bei *Hydra* durchgeführt.

In allen untersuchten Invertebraten konnten jeweils eine Sequenz nachgewiesen werden, die als RhoA- Homolog angesehen werden kann, da sie sowohl in ihrer Sequenzstruktur, als auch in ihrer Proteinfaltung dem Vertebraten RhoA, beziehungsweise dem strukturell sehr ähnlichen RhoC entsprechen. Bei *Hydra* konnten hingegen überraschenderweise vier homologen RhoA- Proteine (Hv_Rho1-4) identifiziert und beschrieben werden. Hv_Rho1 und Hv_Rho2 beinhalten alle RhoA- charakterisierende Proteindomänen, wodurch sie aktiviert, deaktiviert und von ROCK gebunden werden könnten. Weiterhin weisen sie eine hoch konservierte strukturelle Sequenz zu den homologen Sequenzen der Vertebraten auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Hv_Rho1 und Hv_Rho2 die typischen Funktionen einer Rho- GTPase in *Hydra* erfüllen können. Im Gegensatz dazu fehlen Hv_Rho3 und Hv_Rho4 alle Rho- charakterisierende Proteindomänen, bis auf *Switch*-Regionen, die in ihrer Sequenz große Unterschiede aufweisen und in ihrer Position nicht mit den *Switch*-Regionen von Mensch und Hv_Rho1/2 übereinstimmen und. Für die konservierten Rho- GTPasen weisen Hv_Rho3/4 allgemein große Sequenzunterschiede auf. Dies, zusammen mit dem Fehlen der notwendigen Proteindomänen, lässt darauf schließen, dass es sich bei Hv_Rho3 und Hv_Rho4 um keine klassischen Vertreter der Rho- GTPasen, sondern um *Hydra*-

spezifische Sonderformen handelt. Dies wird durch die Stammbaumanalyse der Rho-GTPasen gestützt. Diese zeigt, dass sich Hv_Rho1/2 deutlich innerhalb der RhoABC-Familie gruppieren, während Hv_Rho3 basal am RhoABC- Ast lokalisiert ist. Im Vergleich zu Hv_Rho1-3 befindet sich Hv_Rho4 auf einem isolierten Ast basal zu dem Ast der RhoABC-Familie.

Trotz ihres gemeinsamen Ursprunges und einer großen Ähnlichkeit von circa 85 % in ihren Aminosäuresequenzen, erfüllen RhoABC in Vertebraten jeweils spezifische Funktionen. Während RhoA ein Regulator der Aktomyosin- Kontraktilität ist, ist RhoB für den Zytokintransport und das Zellüberleben verantwortlich. RhoC hingegen spielt hauptsächlich eine Rolle in der Zellmigration (Wheeler und Ridley, 2004). Die detaillierte Analyse der Aminosäuresequenz und der Proteinfaltung zeigen, dass alle beschriebenen Rho- GTPasen aus *Hydra* die höchste Ähnlichkeit zu den humanen RhoA und RhoC aufweisen, während sie zu dem humanen RhoB deutliche Unterschiede zeigen. Dies deutet darauf hin, dass in *Hydra* Hv_Rho1-4 und speziell Hv_Rho1/2 eine ähnliche Funktion wie RhoA in Vertebraten erfüllen könnten, indem sie als Regulator der Aktomyosin- Kontraktilität fungieren und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts steuern.

VI.1.2 Expressionsmuster von *hv_rho1-4* korrelieren mit morphogenetisch aktivem Gewebe

Die Sequenzeigenschaften sowie die unterschiedlichen Expressionsmuster legen vor allem Hv_Rho1 und Hv_Rho2 als passende Kandidaten des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges nahe. Korrelierend zu der Expression des FGF- Rezeptors (*kringelchen*) (Sudhop et al., 2004) in *Hydra* wird *hv_rho1* ebenfalls im Ektoderm an der Knospenbasis von späten Knospenstadien hochreguliert (Holz et al., 2017). Dies korreliert mit der Akkumulation des Aktomyosin- Komplexes, der die kontraktile Kräfte und die Konstriktion an der Knospenbasis zur Ablösung der Knospe generiert (Holz et al., 2017; Holz et al., 2020). Zusätzlich zu der Knospenbasis konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *hv_rho1* in weiteren, morphogenetisch aktiven Geweben (auswachsende Knospe, auswachsende Tentakel, Tentakelbasis und Testes) exprimiert wird. In diesen morphogenetisch aktiven Geweben könnten die Rho- GTPasen unterschiedliche Funktionen erfüllen. So ist beispielsweise vom RhoA-ROCK-Myosin II- Signalweg bekannt, dass er neben der Regulation des Aktinzytoskeletts auch an dem Prozess der Apoptose beteiligt ist (Shimokawa et al., 2016). Daher könnte Hv_Rho1 neben der über das Aktinzytoskelett regulierten Zellformveränderung, welche die Zellen während der Spermatogenese in *Hydra* durchlaufen müssen, auch an dem dort nachgewiesenen Zelltod beteiligt sein (Kuznetsov et al., 2006). Bei evaginierenden Gewebe hingegen, wie der auswachsenden Knospe oder der auswachsenden Tentakel könnte eine *hv_rho1* Expression der Umgestaltung des

Aktinzytoskeletts dienen. Im Gegensatz zu einer Aktinakkumulation, welche Gewebetrennung ermöglicht (Fagotto, 2014), könnten unregelmäßig angeordnete Aktinfasern, wie es bei der auswachsenden Knospe oder Tentakel nachzuweisen ist (Aufschnaiter et al., 2017; Holz et al., 2020; Abb. 32), einer Auflockerung des Gewebes dienen. Dies würde das Auswachsen des Gewebes in die neu entstehenden Knospen und Tentakel ermöglichen, indem die Steifheit des Gewebes reduziert wird. Die Expression von *hv_rho1* an der Tentakelbasis adulter Tentakel könnte einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Ermöglichung komplexer Bewegungen, beispielsweise während des Beutefangs, dienen.

Neben *hv_rho1* konnte erstmals auch eine schwache ektodermale Expression von *hv_rho2* an der Basis der späten Knospe nachgewiesen werden. Die Expression an der Basis der Tentakel, ektodermal in der gesamten Körpersäule sowie in dem auswachsenden Gewebe der Knospe zu erkennen. Dies korreliert mit morphogenetisch aktivem Gewebe und könnte beispielsweise die Veränderungen der Zellformen an der Tentakel- und Knospenbasis regulieren (Holz et al., 2017). Die ubiquitäre Expression von *hv_rho2* lässt auf die „housekeeping“ Funktion des Rhos schließen, welche über das Aktinzytoskeletts ständig den Zell-Kortex reguliert (Fehon et al., 2010).

Für *hv_rho3* konnte lediglich eine Expression in wenigen endo- und ektodermalen Zellen um die Mundöffnung gezeigt werden (Holz et al., 2017; Abb. 22). Diese Zellen müssen bei der Nahrungsaufnahme enorme Veränderungen der Zellform ermöglichen, um sich öffnen, dehnen und wieder schließen zu können. Weiterhin sezernieren Zellen des Hypostoms Schleim, wodurch zusammen mit Peptiden die Nahrungsaufnahme reguliert wird (Alzugaray et al., 2013; Rose und Burnett, 1968). Eine Beteiligung der *hv_rho3* exprimierenden Zellen an der Schleimsekretion am Hypostom des Süßwasserpolypen ist daher denkbar. Weiterhin ist eine über *Hv_Rho3* regulierte Erzeugung von kontraktilen Kräften der radialsymmetrisch angeordneten Myoneme am Hypostom möglich. Diese steuern vermutlich die Öffnung und die Ausdehnung der Mundöffnung zur Aufnahme von Nahrung (Carter et al., 2016).

In-situ-Hybridisierung von *hv_rho4* zeigt ein endodermales Expressionsmuster in Zellen im Bereich der Mundöffnung, vergleichbar zu *hv_rho3*. Diese Expression könnte unterstützend zu *Hv_Rho3* die Zellformveränderung der Zellen der Mundöffnung regulieren. Weiterhin ist eine verstärkte Expression von *hv_rho4* in endodermalen Zellen der auswachsenden Knospen zu erkennen. Diese bildet von der Knospenbasis zum oralen Ende der Knospe einen zunehmenden Gradienten aus. Die endodermale Expression ist dem Erscheinen nach vermutlich auf Drüsenzellen des Endoderms zurückzuführen. Dies würde eine spezifische Funktion des *Hv_Rho4* in Schleimdrüsenzellen (Siebert et al., 2008) der evaginierenden Knospen bedeuten und möglicherweise die Sekretion regulieren. Die spezifische

endodermale Expression von *hv_rho4* in den evaginierenden Knospen ist nicht endodermal im Muttertier nachzuweisen, was zukünftig weiterer Untersuchungen bedarf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vier Rho- GTPasen *hv_rho1-4* in Geweben exprimiert werden, die aufgrund morphogenetischer Prozesse eine Veränderung der Zellform oder eine Reorganisation, beziehungsweise eine Akkumulation der Aktinfasern, vollziehen müssen (Abb. 64).

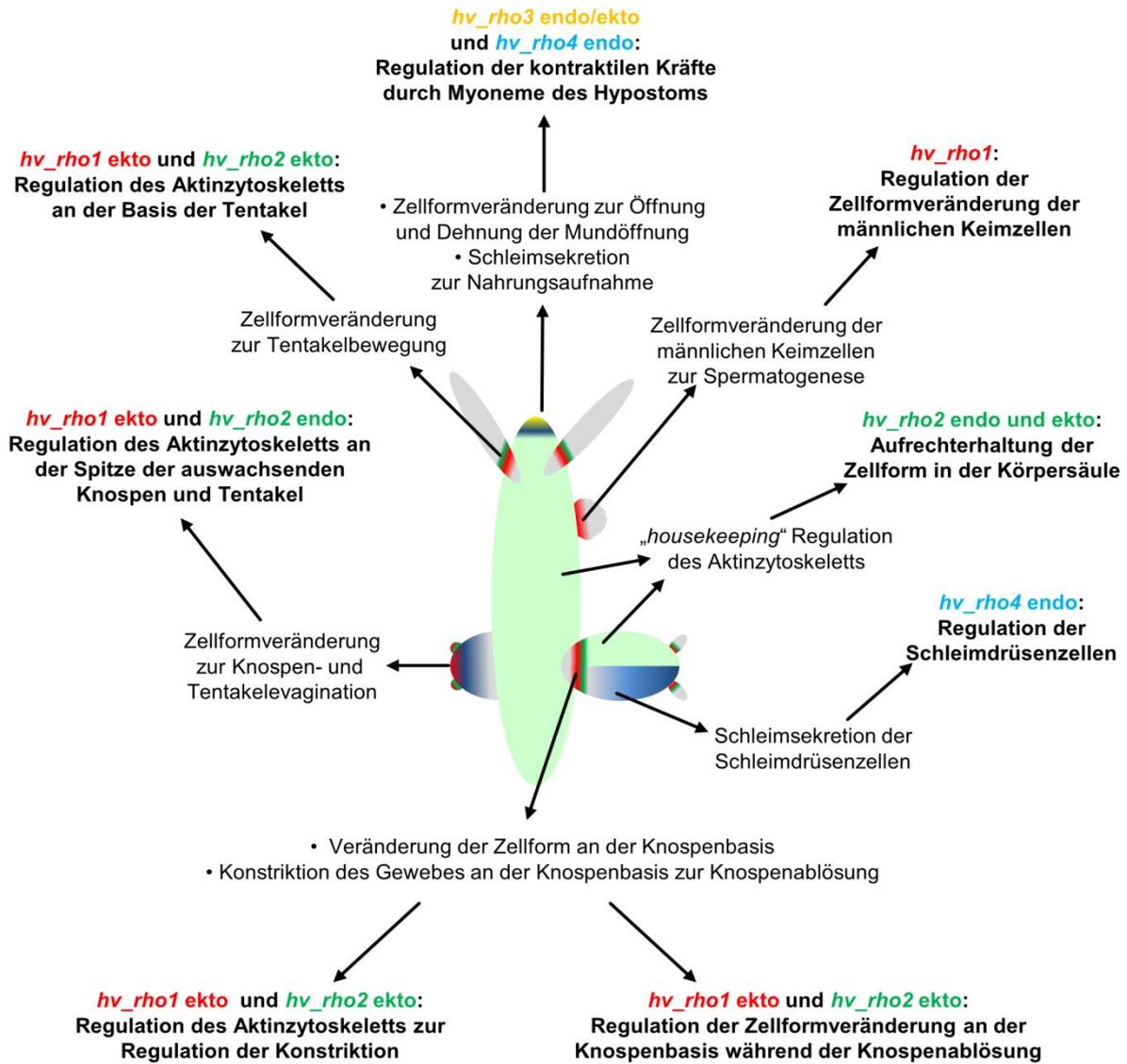


Abbildung 64: Schematische Übersicht der *hv_rho1-4* Expressionsmuster und möglicher Funktionen in *Hydra*. Expressionsmuster von *hv_rho1* (rot), *hv_rho2* (grün), *hv_rho3* (gelb) und *hv_rho4* (blau) in unterschiedlichen Geweberegionen von *Hydra*.

VI.1.3 Beteiligung des Rho-ROCK-Myosin II- vermittelten Signalweges bei der Knospenablösung in *Hydra* (Holz, Apel et al., 2017)

Kontraktile Kräfte, welche durch die Interaktion des Aktomyosin- Komplexes generiert werden, sind ein grundlegende Mechanismus für die Gewebetrennung während der

Embryonalentwicklung. Diese kontraktile Kräfte werden oftmals durch RhoA-ROCK-Myosin II- Signalwege gesteuert (Fagotto, 2014). Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts unterliegt dabei der Aktivität der Rho- GTPasen (Karnoub et al., 2004; Wheeler und Ridley, 2004). Die Inhibition von RhoA, beziehungsweise der RhoA- homologen Rho- GTPasen in *Hydra* (durch Rhosin) sowie die Inhibition von ROCK (durch Rockout) und Myosin (durch Blebbistatin) bewirken jeweils ein Nichtablösen der Knospe (Holz et al., 2017).

Rhosin ist ein spezifischer RhoA- Inhibitor, der weder Cdc42 oder Rac beeinträchtigt (Shang et al., 2012), indem er an die GEF- Bindestelle des RhoAs bindet und so dessen Aktivierung durch Rho- GEFs (z.B. Trio, Kalirin, DBL, LARG u.v.m.) verhindert. Da Hv_Rho1/2 im Vergleich zu Hv_Rho3/4 eine Rhosin- Interaktionsstelle und eine GEF- Bindestelle besitzen, ist davon auszugehen, dass Rhosin die Aktivierung von Hv_Rho1/2 verhindert. Das Nichtablösen der Knospe durch die Inhibition mit Rhosin ist schlussfolgernd vermutlich auf die Inaktivität von Hv_Rho1 oder Hv_Rho2 zurückzuführen. Downstream der Rho- GTPasen ist ROCK ebenfalls hauptsächlich an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Kontraktion des Aktomyosins beteiligt (Julian und Olson, 2014; Riento und Ridley, 2003). Weiterhin werden mit ROCK eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie beispielsweise die Zellkontraktion, die Zellmigration, die Apoptose, aber auch die Proliferation in Verbindung gebracht (Julian und Olson, 2014). Lediglich Hv_Rho1 und Hv_Rho2 besitzen eine ROCK- Bindestelle was ein weiteres Indiz für die Aktivität von Hv_Rho1 und Hv_Rho2 und deren über ROCK vermittelte Funktionen, wie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts in *Hydra* ist. Der Inhibitor Blebbistatin bindet weiter *downstream* im Signalweg spezifisch an die *myosin-light-chain* (MLC) des nichtmuskulären Myosin II, was die Neubildung von Aktomyosin-Komplexen verhindert (Kovács et al., 2004; Rauscher et al., 2018).

Die Inhibition an jungen Knospen (Knospenstadium 3-5) bewirkte die Etablierung der auswachsenden Knospe als sekundäre Achse des Tieres ohne dass eine Konstriktion der Knospenbasis zur Ablösung des Jungpolypen zu beobachten war (Holz et al., 2017; Fig. 8). Dieser Phänotyp entsteht ebenfalls nach einer Inhibition des FGF- Rezeptors durch den spezifischen Inhibitor SU5402 (Sudhop et al., 2004), was die Aktivierung des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges über den FGFR in *Hydra* nahelegt. Die Inhibition bedingt ein Ausbleiben der Aktinfaserakkumulation und der Phosphorylierung von Myosin an der Knospenbasis der späten Knospenstadien (Holz et al., 2017). Myosin und Aktin bilden zusammen den kontraktile Aktomyosin- Komplex, der an einer Vielzahl zellulärer Funktionen, wie der Bildung von Stressfasern oder der Regulation von Adhäsionskomplexen beteiligt ist (Ai et al., 2001; Arnold et al., 2017; Horwitz und Parsons, 1999). Sowohl die Bildung von Aktinstressfasern, als auch die Bildung von Adhäsionskomplexen werden durch

RhoA-, oder in *Hydra* vermutlich durch Hv_Rho1/2, vermittelt und können durch Rhosin verringert werden (Fagotto, 2014; Shang et al., 2012).

Eine Inhibition der späten Knospen (Knospenstadium 5-7) verhindert hingegen nicht die Konstriktion der Knospenbasis, sondern bedingt lediglich das Ausbleiben der finalen Ablösung, beziehungsweise verzögert diese deutlich, da die Knospe über eine feine Gewebebrücke mit dem Muttertier verbunden bleibt (Holz et al., 2017; Fig. 8). Ein solche feine Gewebebrücke war auch bei der gestörten Knospenablösung durch eine dominant-negative FGFR (*kringelchen*) transgene *Hydra*-Linie (*kringel* Δ 1308-GFP) zu beobachten gewesen (Hasse et al., 2014). Dies spricht wiederum für einen FGFR- vermittelten Rho-ROCK-Myosin II- Signalweg in *Hydra*. Die Tatsache, dass sich die Knospe trotz der Konstriktion der Knospenbasis oftmals nicht final ablösen konnte, lässt die Vermutung zu, dass die koordinierte Sphinkterkontraktion zur Ablösung der Knospe (Toshio Takahashi et al., 1997) und die notwendige Regulation der Adhäsionskomplexen an der Knospenbasis durch die Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalwegs gestört wird.

Es lässt sich also festhalten, dass der Zeitpunkt der Inhibition Rho-ROCK-Myosin II- Signalweg essentiell für den entstehenden Phänotyp bei *Hydra* ist. Ungefähr während des Knospenstadiums 5 befindet sich vermutlich ein *point-of-no-return*, der das zelluläre Programm der Knospenbasiskontraktion bereits früh während der Knospung irreversibel einleitet. Korrelierend mit diesem Zeitpunkt beginnt die Expression des FGF- Rezeptors bei Knospenstadium 4 an der Knospenbasis, welche dann bis zur Ablösung der Knospe als Ring an der Knospenbasis verbleibt und auch noch danach im Muttertier nachzuweisen ist (Sudhop et al., 2004) (Abb. 70 A). Sowohl ein inaktiver FGF- Rezeptor (Hasse et al., 2014; Sudhop et al., 2004), als auch die Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges (Holz et al., 2017) durch Rhosin, Rockout oder Blebbistatin führt zu einem Nichtablösen der Knospe. Dabei ist entscheidend, ob die Inhibition vor dem *point-of-no-return* beginnt, wodurch die Kontraktion der Knospenbasis verhindert wird (Abb. 65 B: grün hinterlegt), oder ob die Inhibition nach dem *point-of-no-return* beginnt, wodurch lediglich die finale Ablösung der Knospung, aber nicht die Konstriktion der Knospenbasis, verhindert wird (Abb. 65 B: rot hinterlegt).

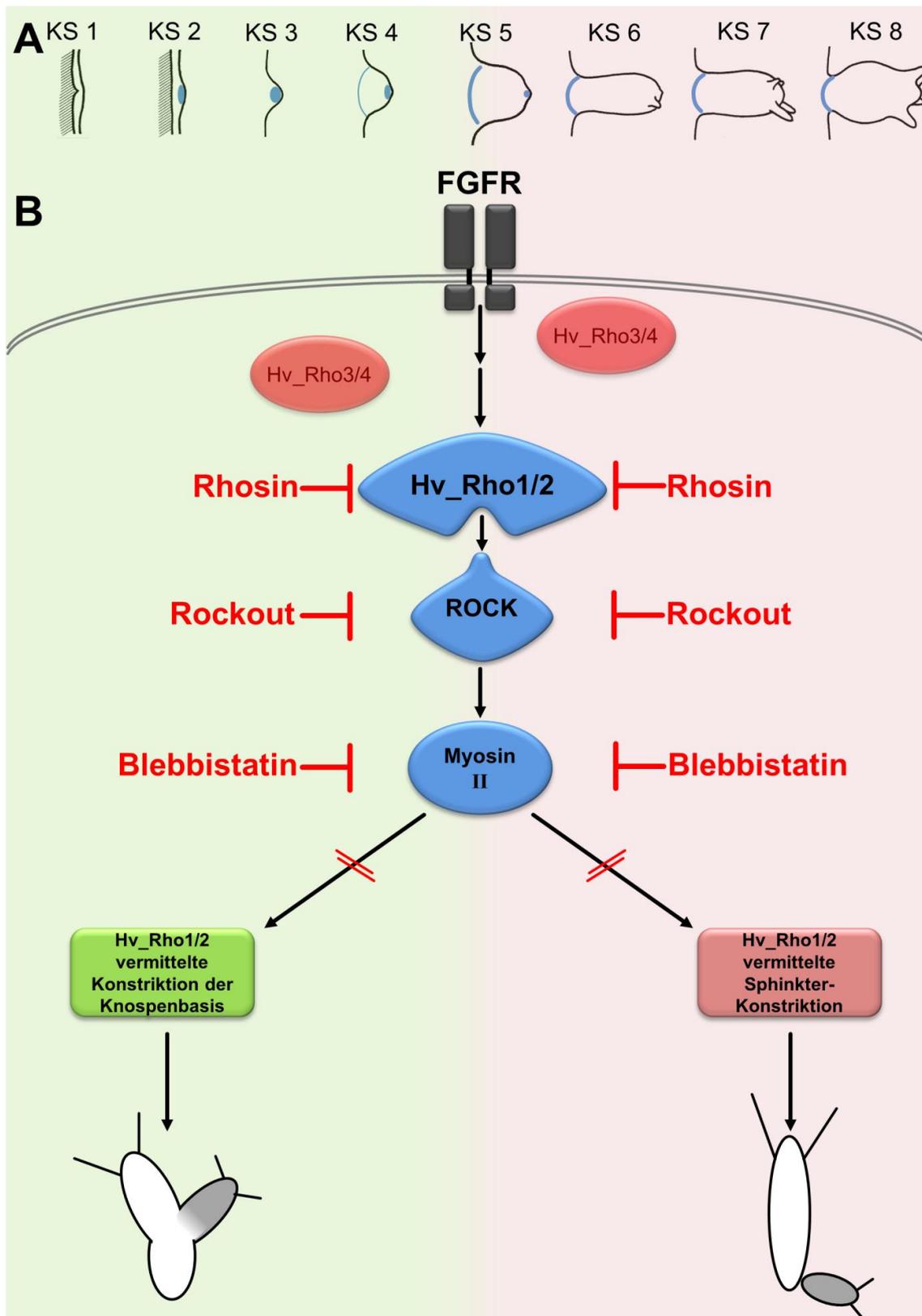


Abbildung 65: Schematische Übersicht der FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Inhibition in *Hydra*. (A) Schematische Knospenreihe (nach Otto und Campbell, 1977) und Expressionsmuster von FGFR (blau). (B) Die Inhibition des FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges an frühen Knospenstadien (grün hinterlegt) führt zu einem Ausbleiben der Konstriktion an der Knospenbasis, wodurch sich die Knospe als sekundäre Achse etabliert und ein Y-förmiger Phänotyp entsteht. Die Inhibition des FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges an späten Knospenstadien (rot hinterlegt) führt zu einem Ausbleiben der finalen Knospenablösung, obwohl die Konstriktion der Knospenbasis stattfinden kann. Die Signalvermittlung findet vermutlich über Hv_Rho1/2- und nicht über Hv_Rho3/4 statt.

Dies lässt darauf schließen, dass der FGF- Rezeptor den Rho-ROCK-Myosin II- Signalweg in *Hydra* aktiviert, der zum einen die Kontraktion der Knospenbasis und zum anderen die kontraktilen Kräfte zur finalen Ablösung der Knospe generiert. Dabei wird das Signal vermutlich über die RhoA- homologen Hv_Rho1/2 an ROCK vermittelt, da Hv_Rho3/4 aufgrund der fehlenden Proteindomänen wahrscheinlich weder durch Rho- GEFs aktiviert werden können, noch in der Lage sind von ROCK zur Signalvermittlung gebunden zu werden.

VI.1.4 *In-silico* Analyse der Rho- GEFs Kalirin und Trio

Da Rho- GTPasen durch Rho- GEFs aktiviert werden, wurden die beiden Rho- GEFs Trio und Kalirin in Kooperation mit Dr. Marie Kratzer (AG Prof. Dr. Annette Borchers) untersucht (Kratzer et al., 2019). Die Stammbaumanalyse gibt Hinweise für die Existenz eines Trio/Kalirin Vorfahren in den Präbilateria, welcher wie *Amphimedon* vermutlich bereits SPEC- Domänen, eine SH3- Domäne und eine DH-PH- Domäneneinheiten (Rho- GEF1 und Rho- GEF2)- Kernsequenz besessen hat. Während die SPEC- *repeats* die Faltung der Proteine vermitteln (Pascual et al., 1997), sind SH3- Domänen für die Bindung von Prolin- reichen Liganden verantwortlich (Saksela und Permi, 2012), wohingegen die Aktivierung der Rho- GTPasen durch die Rho- GEF- Domänen reguliert wird. Bereits bei dem Cnidaria *Hydra* ist zusätzlich eine SEC14- Domäne, eine STK- Domäne und die Kalirin- charakterisierende FN3- Domäne nachzuweisen. Die Kalirin- charakterisierende FN3- Domäne ist an der Proteinfaltung beteiligt (Chandler und Buckle, 2020), wohingegen die SEC14- Domäne (Homolog zu dem *phosphatidylinositol transfer protein* aus *Saccharomyces cerevisiae*) die Bindung an/von Lipiden ermöglicht (Aravind et al., 1999). Daher würde Kalirin mit der FN3- Domäne ab den Cnidaria eine mögliche Verbindung zwischen Lipiden, wie Phosphatidylinositolphosphaten, und der Regulation von Rho- GTPasen darstellen (Aravind et al., 1999; de Campos und Schaaf, 2017).

Weiterhin zeigen die Daten, dass es vermutlich zu einer frühen Duplikation der Sequenzen in den Urbilateria gekommen ist. Im Laufe der Evolution kam es zu abstammungsspezifischen Verlusten von Trio oder Kalirin vor allem bei den Invertebraten. Da erst mit *Trichoplax* die STK- Domäne auftritt, ist zu vermuten, dass der Ursprung der STK- Domäne vor dem letzten gemeinsamen Vorfahren der Eumetazoa liegt. In dem letzten gemeinsamen Vorfahren der Cnidaria und der Bilateria hat sich vermutlich die Sequenz etabliert, die die C-terminalen Proteindomänen zwischen der DH-PH- Domäneneinheiten RhoGEF2 und STK kodiert, welche charakteristisch für Kalirin sind. Dies ist als Entstehung eines ursprünglichen Kalirins zu verstehen, welches sich durch Duplikation in den Urbilateria zu Trio und Kalirin auftrennte. Anhand des Stammbaumes lässt sich auch erkennen, dass es während der Evolution der Invertebrata zu einem Verlust von Trio in den basalen Deuterostomia (Echinodermata, Hemi-

und Cephalochordata) gekommen ist. Weiterhin muss der letzte gemeinsame Vorfahre aller Vertebraten in Trio die siebte SPEC-Domäne und FN3- Domäne verloren haben, wodurch sich Kalirin und Trio jeweils in den Vertebraten etabliert haben. Dies ist anhand der eindeutigen Auftrennung des Stammbaumes bei den Vertebraten ersichtlich ist. Die Tatsache, dass sich die Kalirin- Sequenz von *C. elegans* basal zu den Bilateria außerhalb der Ecdysozoa eingruppiert ist vermutlich auf das schnell evolvierende Genom des Nematoden zurückzuführen (Memar et al., 2019).

Zusammengefasst ergeben die Daten, dass die Rho- GTPasen Trio und Kalirin vermutlich in einem gemeinsamen Vorfahren der Bilateria entstanden sind. Mit der FN3- Domäne ist Kalirin vermutlich in der Lage Lipide zu binden. Dadurch bildet Kalirin in *Hydra* möglicherweise eine direkte Verbindung zwischen membranständigen Lipiden, wie Phosphatidylinositolphosphaten (PtdInsP), und Rho- GTPasen, welche durch Kalirin aktiviert werden können (Aravind et al., 1999; KF de Campos und Schaaf, 2017). Ob Trio und Kalirin möglicherweise die RhoA- homologen Rho- GTPasen in *Hydra* aktivieren können und ob Kalirin an PtdInsP in *Hydra* binden kann bedarf zukünftiger Untersuchungen. Dies würde erstmals eine direkte Verbindung der PtdInsP und der Rho- GTPasen in dem Süßwasserpolypen nachweisen und Hinweise auf eine mögliche Verbindung des PLC γ -, des PI3K- und des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges (Abb. 6) liefern.

VI.1.5 Rho- GTPasen sind in *Hydra* vermutlich an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt

Die kleinen Rho- GTPasen sind wichtige Regulatoren des Zytoskeletts und damit einer Vielzahl von morphogenetischen Prozessen. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgt in der Regel durch aufwendig und unter hohem Tierverbrauch produzierten Antikörpern. Eine elegante Alternative zum Nachweis von aktivem RhoA in fixiertem Gewebe bietet das Fusionsprotein RBD-GFP.

Dabei wird die Rho-Binde-Domäne (RBD) des *Scaffold*- Proteins Rhotekin zusammen mit dem grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) zur Detektion der aktiven (GTP- gebundenen) RhoA- GTPasen in fixiertem *Xenopus*- Gewebe genutzt (Berger et al., 2009). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von RhoA und RhoC bindet Rhotekin in Vertebraten auch stark an RhoC (Wheeler und Ridley, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fusionsprotein in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Grosse in Bakterien produziert und biochemisch aufgereinigt. Anschließend wurde mit dem aufgereinigten Protein eine Färbemethode für *Hydra* entwickelt, um aktive RhoA- homologe- GTPasen nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass RBD-GFP ubiquitär im gesamten Gewebe von *Hydra* bindet, was für eine „housekeeping“ Funktionen, wie beispielsweise die Regulation von zytoplasmatischen Proteinen, der Zellmorphologie, der Zellmigration oder der Regulation der Proliferation

spricht (Jaffe und Hall, 2005; Kim et al., 2018). In morphogenetisch aktiven Geweberegionen konnte eine deutliche Verstärkung der Signalintensität des RBD-GFPs nachgewiesen werden. In diesen Regionen wird, korrelierend mit den Daten der *in-situ*-Hybridisierungen verstärkt Rho benötigt, um spezifische Funktionen, wie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts oder die Ansammlung von kontraktile Aktomyosin-Filamenten zu erfüllen (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005; Wheeler und Ridley, 2004). Aus den Daten kann die Hypothese abgeleitet werden, dass aktive Rho-GTPasen während der Knospen- und der Tentakel-Evagination zunächst das vorhandene Aktinzytoskelett chaotisch reorganisieren (Anton-Erxleben et al., 2009; Aufschnaiter et al., 2017), damit eine Reduktion der Steifheit von Zellen und damit des Gewebes stattfinden kann. An der Stelle des chaotisch verlaufenden Aktinzytoskeletts könnte sich das Gewebe zur Evagination der Knospe, beziehungsweise der Tentakel, ausstülpfen.

Passend zu dieser Hypothese konnte sowohl bei der Knospenevagination (Aufschnaiter et al., 2017), als auch bei der Tentakel-Evagination (Abb. 32 A) ein chaotisches Aktinzytoskelett nachgewiesen werden, welches jeweils mit einem verstärkten RBD-GFP-Signal korreliert (Abb. 29 A, B; Abb. 32 B). Auch die Reorganisation der Aktinfasern an der Knospenbasis im Verlauf des Knospungsprozess (Aufschnaiter et al., 2017; Abb. 39 A) korreliert mit einem verstärktem RBD-GFP-Signal. Innerhalb des Knospengewebes lässt sich über den gesamten Knospungsprozess hinweg ein starkes RBD-GFP-Signal in der auswachsenden Knospe nachweisen, was man durch eine Zellformveränderung im evaginierenden Gewebe erklären könnte. Das aktive Rho in der evaginierenden Knospe könnte möglicherweise die beschriebene Reorientierung der ektodermalen Epithelmuskelfortsätze während der Knospenevagination regulieren (Aufschnaiter et al., 2017).

Während der letzten Phasen des Knospungsprozesses korreliert das RBD-GFP-Signal mit einer starken Akkumulation des Aktinzytoskeletts, zur Knospenablösung durch kontraktile Kräfte (Holz et al., 2017; Holz et al., 2020) sowie der Expression des FGF-Rezeptors (Sudhop et al., 2004). Eine Beteiligung, der durch RBD-GFP detektierten Rho-GTPasen in *Hydra* an der Trennung der Zellen an der Knospenbasis ist denkbar. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen gestützt, die zeigen konnten, dass Rho-GTPasen sowohl an der Bildung-, als auch an der Trennung von Zell-Zell-Verbindungen in Epithelzellen von Mammalia und Insecta beteiligt sind, indem sie die Dynamik des Aktinzytoskeletts regulieren. So ist beispielsweise gezeigt, dass eine über RhoA-ROCK-Myosin II vermittelte Konstriktion des Aktinzytoskeletts zu einer Destabilisierung der Zelladhäsion führt, wodurch Zellmigration oder Zellinvasion ermöglicht wird (Rusu und Georgiou, 2020).

Neben der RBD-GFP-Detektion bei dem Knospungsprozess konnte auch bei regenerierenden Tieren an der Schnittstelle ein verstärktes RBD-GFP-Signal nachgewiesen

werden, welches wiederum mit der Akkumulation von F- Aktin korreliert. Bei der Regeneration in *Hydra* sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Genen und Signalwegen zu unterschiedlichen Zeiten des komplexen Regenerationsprozesses beteiligt. Dabei sind der apikal gelegene hypothetische Kopforganisator und der basal lokalisierte hypothetische Fußorganisator essentiell, um fehlende Körperstrukturen regenerieren zu können (Broun und Bode, 2002; Vogg et al., 2019). Bei der Regeneration des Kopfes spielt der Wnt- β -catenin-Signalweg die entscheidende Rolle und steuert zusammen mit dem BMP- Signalweg die Regeneration des Fußes steuert (Broun und Bode, 2002; Vogg et al., 2019; Wenger et al., 2019). Neben Wnt ist der Transkriptionsfaktor Sp5 maßgeblich an der Regeneration des Kopfes beteiligt, der bei einem *Knockdown* zu Hydren mit überzähligen Köpfen führt und daher als *Feedback-loop* Inhibitor des Wnt- β -catenin- Signalweg angesehen werden kann (Vogg et al., 2019). Korrelierend zu der Detektion des RBD-GFPs an der Schnittstelle konnte die Expression der Rho- GTPasen 0,5-3 Stunden nach horizontalem Schnitt während der frühen Kopfregeneration nachgewiesen werden (Petersen et al., 2015; Reddy et al., 2019). So ist es denkbar, dass die Rho- GTPasen vor allem an dem Wundverschluss durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die Aktomyosin- vermittelte Kontraktion zum Zusammenziehen der offen stehenden Wunde beteiligt sind. Weiterhin könnte die Rho- GTPasen auch an der Regulation der Apoptose beteiligt sein (Shimokawa et al., 2016), die nach einer Verletzung bei *Hydra* nachgewiesen werden kann (Galliot, 2013).

Dadurch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die detektierte/n Rho- GTPase/n in *Hydra* an mindestens drei zellulären Prozessen während morphogenetischer Prozesse beteiligt sind. Dies sind: (i) die Umorientierung des geordneten Aktinzytoskeletts in ungeordnet verlaufende Aktinfasern zur Reduktion der Steifheit des Gewebes. Dadurch wird die Geweeevagination während des Auswachsens der Knospen und der Tentakel ermöglicht. (ii) die Reorientierung des Aktinzytoskeletts und der Aufbau des Aktomyosin-Komplexes zur Regulation von kontraktile Kräften. Dies ermöglicht es dem Gewebe sich an der Knospenbasis und an der offenstehenden Wunde zusammenzuziehen, um zum einen die Knospenablösung einzuleiten und zum anderen die Wunde zu verschließen. Weiterhin könnte die Kontraktion des Sphinkters an der Knospenbasis zur finalen Ablösung der Knospe durch die Rho- GTPase reguliert werden. (iii) die Bildung und die Degeneration der Zell-Zell-Verbindungen an der Basis der Knospe während der letzten Phase der Knospenablösung. Die Bildung und Verstärkung von Zell-Zell-Verbindungen lateral an der Knospenbasis und zu der Mesogloea könnte dabei die Steifheit des Gewebes erhöhen, während die Zell-Zell-Verbindungen der Gewebebrücke zwischen der Knospe und dem Muttertier gelöst werden müssen (Abb. 66). (Burute und Thery, 2012; Case und Waterman, 2015; Holz et al., 2020).

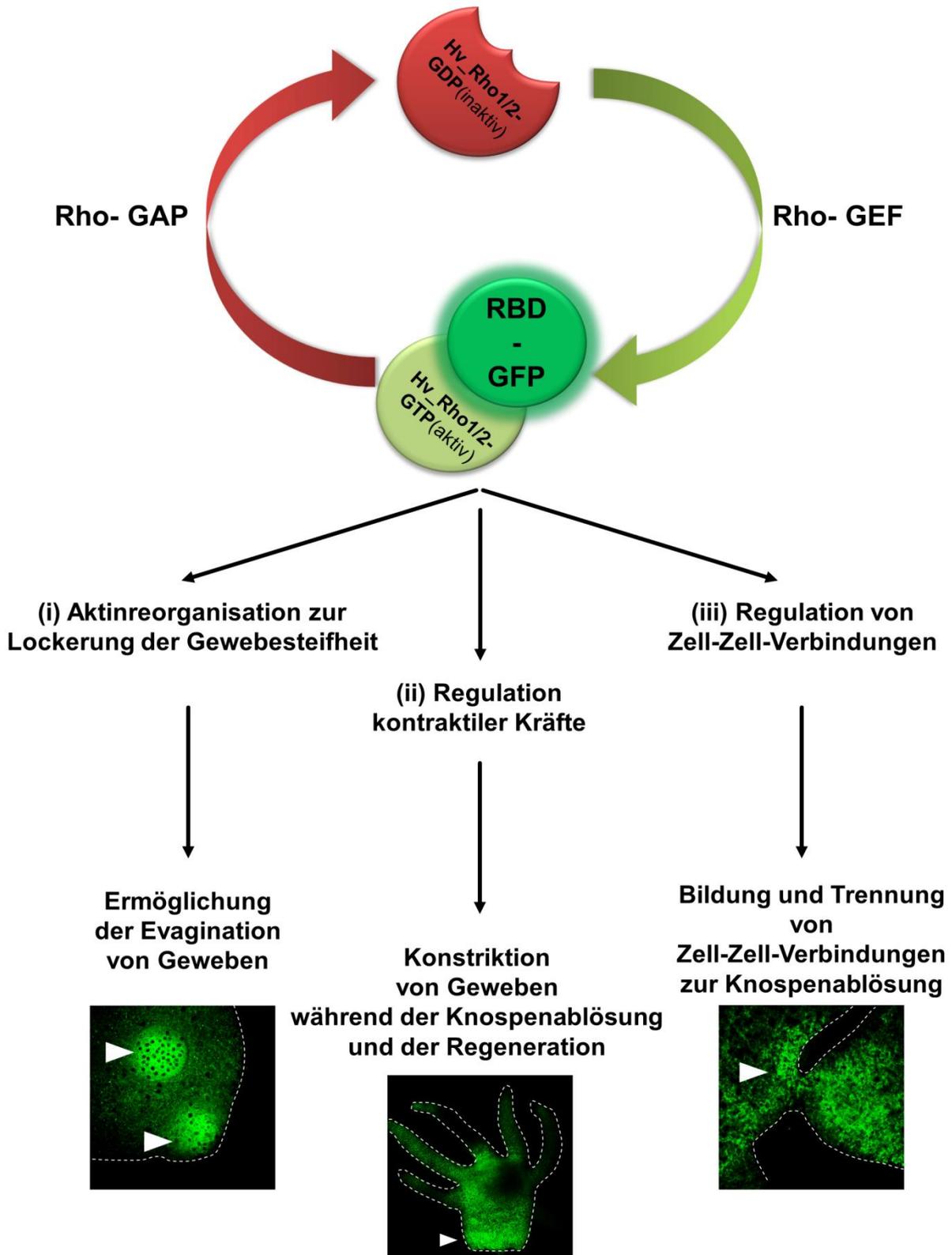


Abbildung 66: Schematische Übersicht der Rho- Aktivierung, der vermuteten Rho- vermittelten Signalgebung in *Hydra* und der Detektion des aktiven Rhos mittels RBD-GFP. Inaktives (GDP-gebundenes) Rho (rot) wird durch Rho- GEFs phosphoryliert und somit aktiviert. Aktiviertes (GTP-gebundenes) und durch RBD-GFP detektiertes Rho (hellgrün) könnte an mindestens drei morphogenetischen Prozessen in *Hydra* beteiligt sein. (i): Aktinreorganisation zur Reduktion der Steifheit von Zellen und damit des Gewebes, wodurch die Evagination von Geweben ermöglicht wird. (ii): Die Regulation der Aktomyosin- Kontraktion zur Konstriktion des Gewebes an der Knospenbasis und der Regenerationsstelle. (iii): Die Regulation der Zell-Zell-Verbindungen zur Verstärkung und zur Trennung von Zellverbänden an der Knospenbasis von *Hydra*.

Vergleichend wurden aktives und inaktives RhoA immunhistochemisch mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. Dabei wurde ein anti-RhoA-Antikörper verwendet, der spezifisch an RhoA bindet. Im Vergleich zu anderen anti-RhoA- Antikörpern detektiert der verwendete Antikörper weder RhoB und RhoC, noch andere Mitglieder der Ras- und Rac-Subfamilien (Cytoskeleton, Inc.). Das Epitop des Antikörpers weist jedoch mehrere Unterschiede zu den Rho- GTPasen aus *Hydra* auf, wobei bereits ein einzelner Aminosäureaustausch ausreicht, um die Bindung des Antikörpers an RhoC zu verhindern (Cytoskeleton, Inc.). Daher muss davon ausgegangen werden, dass der Antikörper nicht spezifisch an Rho- GTPasen in *Hydra* binden kann. Der Vermutung entsprechend konnte mittels Western-Blot bisher keine Bindung an RhoA- Orthologe in *Hydra* nachgewiesen werden.

Nichtsdestotrotz wurde zur detaillierten Untersuchung eine anti-RhoA + RBD-GFP + Phalloidin + DAPI- Vierfachfärbung durchgeführt, um mögliche Kollokationen des anti-RhoA- Antikörpersignals mit dem RBD-GFP- Signal oder mit dem F- Aktin oder den Zellkernen zu detektieren. Dabei wurde deutlich, dass der Antikörper im Vergleich zum RBD-GFP nicht an der Knospbasis oder dem Gewebe der auswachsenden Knospe bindet, dafür jedoch mit dem F- Aktin- Signal des verwendeten Phalloidin 647 kollokalisiert ist. Bei Phalloidin 647 handelt es sich um einen langwelligen Fluoreszenzfarbstoff mit einer Anregungswellenlänge von 656 nm und einer Emissionswellenlänge von 670 nm. Bei diesem Versuchsaufbau wurde ein TRITC- gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, dessen Emissions-Peak zwar bei 572 nm liegt aber insgesamt bis 650 nm reicht. Durch die Lasereinstellungen am kLSM ist es vermutlich zu einer zeitgleichen Anregungen der Fluorophore gekommen, was als *bleed-through*- Phänomen bezeichnet wird und die Kollokation des RhoA- Antikörpersignals und des F- Aktinsignals erklärt (Rénier et al., 2007).

Weiterhin konnte der RhoA- Antikörper vereinzelt im Zytoplasma von großen I- Zellen und von Nematoblasten detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte das RBD-GFP- Signal in deutlich mehr Nematoblasten und I- Zellen sowie in weiteren Zellen des Zytoplasmas nachgewiesen werden. Dies könnte durch ein spezifisches Binden des Antikörpers an eine oder mehrere Rho- GTPasen erklärt werden, welche ebenfalls durch RBD-GFP detektiert werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass der RhoA- Antikörper zytoplasmatisch in einigen Zelltypen kreuzreagiert und beispielsweise an RNA-Helikasen (XP_002161749.2) bindet, die im Protein- BLAST als mögliche Bindungspartner des Antikörpers identifiziert wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der verwendete anti-RhoA- Antikörper vermutlich nicht in der Lage ist Rho- GTPasen in *Hydra* effektiv zu detektieren. Im Vergleich dazu sollte die Bindung des Fusionsproteins RBD-GFP, aufgrund der zugänglichen *Switch*-

Regionen, an Hv_Rho1 und Hv_Rho2 spezifisch binden. Um dies explizit zu überprüfen werden aktuell Konstrukte für ein Hv_Rho-RBD- Interaktionsassay in Kooperation mit Prof. Dr. Klaudia Giehl (Justus-Liebig-Universität Gießen) erzeugt.

VI.2 Benzocain als wirkungsvolles und schonendes Relaxans für *Hydra*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren ein weiteres Werkzeug erzeugt und etabliert. Für detaillierte *live* Aufnahmen der transgenen Hydren ohne Interferenz mit dem, für morphogenetische Prozesse essentielle Aktinzytoskelett, ist eine Immobilisierung der Hydren unabdingbar. Daher wurden unterschiedliche Relaxantien auf ihre immobilisierende Wirkung sowie auf mögliche Nebeneffekte, in *Hydra* untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Relaxans Magnesiumchlorid, welches in der Vergangenheit vor allem bei Invertebraten und speziell bei Cephalopoden zum Einsatz kam (Messenger et al., 1985; Pantin, 1948), für die Immobilisierung von *Hydra* ungeeignet ist. $MgCl_2$ hatte nur kurzfristig einen geringfügigen immobilisierenden Effekt auf den Polypen und führte bei den getesteten Konzentrationen zu einer Letalität von mindestens 80 % nach 24 Stunden. Weiterhin wirkte sich das Relaxans massive auf das Aktinzytoskelett aus, indem die Faserorientierung, die Faserlänge und die Faserbreite der gut zu untersuchenden longitudinalen Aktinfasern des Ektoderms gestört wurden. Magnesium ist in gewissem Maße als $MgSO_4$ zusammen mit Calcium, Natrium und Kalium für den Salzhushalt des Hydramediums verantwortlich. Geringfügige Veränderungen der Konzentrationen können massive Effekte auf den Polypen haben, was zum Tod der Hydren führt.

Linalool wurde als schnelles und reversibles Anästhetikum für *Hydra* beschrieben, welches eine nicht-toxische Wirkung sowie einen einfachen Gebrauch zeigt. Durch Experimente konnte eine Beteiligung des Linalools an der epithelialen, Calcium- gesteuerten Signalgebung ausgeschlossen werden. Dadurch ermöglicht das Relaxans wiederholende, kurzfristige *in vivo* mikroskopische Aufnahmen des Süßwasserpolypen (Goel et al., 2019). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Linalool- Konzentrationen und deren immobilisierende Wirkung und mögliche Letalität bei *Hydra* untersucht. Die schnelle und effektive Immobilisierung konnte dabei bestätigt werden. Da Linalool jedoch einen zytostatischen Effekt auf Krebszellen in Zellkultur hat (Rodenak-Kladniew et al., 2018), wurde anhand von Knospungs- und Wundverschlussexperimenten untersucht, ob das Relaxans in *Hydra* ähnliche Auswirkungen hat. Dabei konnte weder ein signifikanter Einfluss auf den Prozess der Knospung, noch auf den Wundverschluss beobachtet werden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Linalool- Behandlung (1 mM) an horizontal halbierten Tieren dazu führte, dass diese nicht in der Lage waren die fehlende Körperregion zu regenerieren (Goel et al., 2019). Die Länge der Zellzyklen sowie

die Apoptoserate waren dabei nicht beeinträchtigt. Weiterhin konnte an Nervenzell- freien Hydren gezeigt werden, dass eine Linalool- Behandlung keine Auswirkung auf den Regenerationsprozess hat. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Nervenzellen durch Linalool immobilisiert werden und so die fehlende Regeneration bewirken. Bei einer geringen Linalool Konzentration (0,1 mM) waren die Polypen allerdings in der Lage zu regenerieren, wobei sie in den ersten 24 Stunden sogar schneller regenerierten als die Kontrolle (Goel et al., 2019). Dies korreliert mit den Daten dieser Arbeit, die zeigen konnten, dass kontinuierliche Behandlungen mit Linalool und Vorinkubationen mit Linalool den Wundverschluss nach einem Einschnitt beschleunigen können. Die vermutlich reduzierte Steifheit des Gewebes, ausgelöst durch die Immobilisierung der Nervenzellen, durch Linalool könnte somit dazu führen, dass Wunden, von dem umliegenden Gewebe ausgehend schneller zusammengezogen und verschlossen werden können als bei der Kontrolle. Allerdings scheint Linalool die Regeneration der fehlenden Körperstruktur bei horizontal halbierten Hydren nach dem Wundverschluss unterdrücken zu können.

Die Behandlung mit Linalool, zeigte dass das Relaxans bereits nach kurzer Zeit massive Auswirkungen auf die Aktinfasern hat. Die gut zu untersuchenden Fasern der ektodermalen Epithelmuskeln verkürzten sich nach der Linalool- Behandlung, vergleichbar zu den Ergebnissen nach der Immobilisierung mit Lidocain oder $MgCl_2$. Allerdings verlängerten sich die Aktinfasern während der Linalool- Behandlung kurzzeitig wieder nach der anfänglichen Reduktion der Faserlänge. Dies könnte damit erklärt werden, dass die ektodermalen Epithelmuskelzellen möglicherweise schneller relaxiert werden können als die endodermalen Epithelmuskelzellen. Diese Theorie wird durch die Tatsache gestützt, dass die ektodermalen Aktinfasern aus einigen dicken Myonemen bestehen, während das Endoderm zahlreiche dünne Myoneme besitzt (Aufschnaiter et al., 2017; Seybold et al., 2016). Während die schnell ablaufende longitudinale Kontraktion von dem Ektoderm gesteuert wird, reguliert das Endoderm die langsame Elongation durch zirkuläre Kontraktion (Holz et al., 2020; Murillo-Rincon et al., 2017). Dies könnte bedeuten, dass zunächst die Immobilisation der longitudinalen Kontraktion der ektodermalen Zellen einsetzt und zeitversetzt die langsame chronische zirkuläre Kontraktion der endodermalen Zellen immobilisiert wird.

Linalool führte weiterhin zu einer drastischen Zunahme der Aktinfaserbreite sowie zu einer fehlerhaften Aktinfaserorientierung und zu ungewöhnlich flachen ektodermalen Epithelmuskelzellen. All dies kann auf einen Verlust der Zellspannung der Epithelmuskelzellen sowie durch eine gestörte Verbindung des Aktinzytoskeletts an Zell-Zell-Verbindungen durch die Relaxierung des Aktinzytoskeletts durch Linalool zurück zu führen sein und sollte in Zukunft intensiver untersucht werden.

Da die genaue Wirkung des Linalools ungewiss ist, aber gezeigt werden konnte, dass es das Aktinzytoskelett drastisch beeinflusste wurden anschließend mit Lidocain und Benzocain Relaxantien getestet die bekanntermaßen die Reizweiterleitung der Aktionspotenziale der Nervenzellen verhindern (Frazier und Narahashi, 1975; Hanck et al., 2009).

Vergleichbar zu Magnesiumchlorid waren die getesteten Konzentrationen des Lokalanästhetikums Lidocain nur kurzfristig in der Lage *Hydra* zu relaxieren, waren jedoch nach 24 Stunden zu 100 % letal für den Polypen. Die Behandlungen mit Lidocain führten ebenfalls zu einer fehlerhaften Aktinfaserorientierung und zu kleinen Aktinaggregaten sowie zu einer deutlichen Reduktion der Aktinfaserlänge und einer fehlerhaften Faserorientierung. Das Lokalanästhetikum wurde in der Aquaristik als effektives Relaxans verwendet, wird mittlerweile jedoch aufgrund der geringen Sicherheitsspanne auch als Mittel zur Euthanasie bei adulten Zebrafischen verwendet (Collymore et al., 2014; Collymore et al., 2016; Ross und Ross, 2008). Die euthanasierende Wirkung des Lidocains führt vermutlich auch bei dem Süßwasserpolyphen *Hydra* zu der hohen Sterblichkeit, indem der Natrium-Kanal-Blocker die Reiz- und Signalweiterleitung blockiert und dauerhaft verhindert (Sheets und Hanck, 2003). Die verwendeten Konzentrationen von Lidocain könnten bei dem, aus lediglich zwei Medium-zugänglichen Zellschichten bestehenden, Süßwasserpolyphen zu hoch gewesen sein, wodurch die Natrium-Kanäle dauerhaft blockiert wurden. Weitere Nebeneffekte auf beispielweise andere Ionen- Kanäle oder unspezifische intra- und extrazelluläre Bindungen können nicht ausgeschlossen werden.

Wie Lidocain blockiert auch Benzocain offene (inaktivierte) und geschlossene (aktivierte) spannungsabhängige Natrium-Kanäle, wodurch die Reizweiterleitung der Aktionspotenziale der Nervenzellen verhindert wird (Frazier und Narahashi, 1975; Hanck et al., 2009). Dabei binden beide Relaxantien mit ihren aromatischen Ringen (Anhang 28 und 29) relativ schwach an den geschlossenen (aktiv) Natrium-Kanal und stark an den offenen (inaktiv) Natrium-Kanal (Hanck et al., 2009). Dies bedeutet, dass hauptsächlich die offenen (inaktiven) Natrium-Kanäle durch die Relaxantien blockiert werden, wodurch kein neues Aktionspotential erzeugt werden kann. Bereits aktivierte (geschlossene) Natrium-Kanäle können teilweise jedoch noch ein Aktionspotential aufbauen und weiterleiten. Der Vermutung entsprechend konnte bei einer Behandlung mit Benzocain beobachtet werden, dass die Immobilisierung oft nicht direkt, sondern nach spätestens 30 Minuten vollständig und dauerhaft effektiv einsetzt. In den ersten Minuten der Behandlung war manchmal ein einseitiges Eindrehen der Polypen zu beobachten. Die zufällige starke Bindung an offene (inaktive) Kanäle sowie die zufällige schwache Bindung an geschlossene (aktive) Kanäle in verschiedenen Körperregionen würde den Polypen möglicherweise unterschiedlich stark und zeitlich versetzt immobilisieren. Das versetzte Einsetzen der Immobilisierung könnte

zunächst das Eindrehen des Polypen bewirken und die verzögerte vollständige Immobilisierung erklären. Da sowohl Lidocain, als auch Benzocain Natrium-Kanälen blockieren (Hanck et al., 2009), könnte der drastische Unterschied der beiden Relaxantien bei *Hydra* auf den nicht-aromatischen Teil der Struktur (Anhang 28 und 29) oder auf eine unspezifische Bindung des Lidocains zurückzuführen sein.

Allerdings führte auch Benzocain, wenn auch weniger drastisch im Vergleich zu den anderen getesteten Relaxantien, zu einer Reduktion der Aktinfaserlänge. Im Gegensatz zu Linalool konnte kein Einfluss des Benzocains auf die Breite der Aktinfaser bestimmt werden. Von allen getesteten Relaxantien hatte Benzocain den geringsten Einfluss auf die Aktinfaserorientierung. Wie Linalool hat auch Benzocain keinen signifikanten Einfluss auf den Prozess der Knospung und auf den Regenerationsprozess nach einem seitlichen Einschneiden des Polypen.

Die Veränderung der Form und Orientierung der Aktinfasern in Epithelmuskelzellen durch die Behandlungen mit den Relaxantien könnte auf mindestens drei unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein.

Diese sind: (i) die Immobilisierungen könnten die Zell-Zell-Verbindungen in einer bisher unbekanntem Weise beeinflussen. Die Zell-Zell-Verbindungen bestehen hauptsächlich aus basalen Desmosomen- ähnlichen Zell-Zell-Verbindungen, worüber Myoneme der Nachbarzellen als mechanische Einheit aufgefasst werden können, aus *Gap Junctions* und weiter apikal aus *Septate Junctions* (Aufschnaiter et al., 2017; Hatzfeld et al., 2017; Seybold et al., 2016). Neben den Desmosomen in den Myonemen ist das Aktinzytoskelett der benachbarten Zellen hauptsächlich über *Septate Junctions* miteinander verbunden (Aufschnaiter et al., 2017). Die Relaxantien könnten diese Zell-Zell-Verbindungen beeinflussen, wodurch die intrazelluläre Spannung der Zellen gestört wird und möglicherweise die gesamte Zellform der Epithelzellen verändert wird. Dies würde die Verbindungen der Epithelmuskelzellen, und dadurch die Verbindung der Aktinfasern, untereinander stören oder unterbrechen. Dadurch würde es zu einer Veränderung der Faserlänge, der Faserbreite und der Faserorientierung kommen. Das Aktinzytoskelett würde unterbrochen erscheinen, wie es beispielsweise vor allem nach einer Linalool- Behandlung zu erkennen ist (Abb. 67). Korrelierend dazu konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Linalool die Expression von Adhäsionsgenen in dem Hefepilz *Candida albicans* herab reguliert (Hsu et al., 2013).

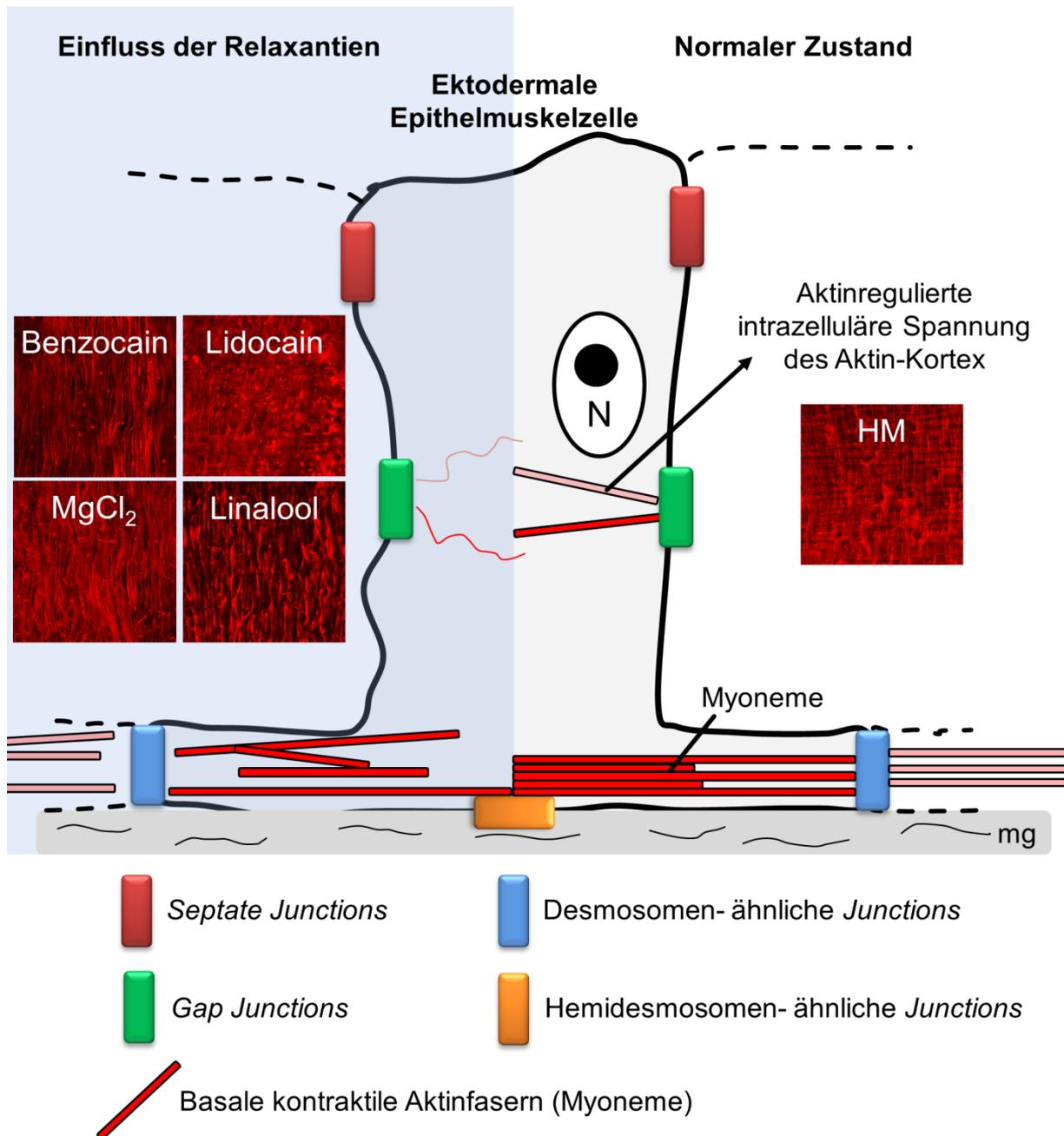


Abbildung 67: Möglicher Einfluss der Relaxation auf das Aktinzytoskelett und die Zell-Zell-Verbindungen in *Hydra*. Unter normalen Bedingungen vermitteln *Septate Junctions* (rot), *Gap Junctions* (grün) *Desmosomen-ähnliche Junctions* (blau) und *Hemidesmosomen-ähnliche Junctions* (orange) die Verbindungen der Epithelmuskelzellen zu ihren Nachbarzellen und zu der Mesogloea. Weiterhin regulieren die Zell-Zell-Verbindungen die Vernetzung des Aktinzytoskeletts der eigenen Zelle sowie die Verbindung mit den Aktinfasern der Nachbarzellen (verändert nach Seybold et al., 2016). Mesogloea (mg).

(ii) die Behandlungen mit den unterschiedlichen Relaxantien könnten zu einer gestörten Reorganisation und Neubildung des vorhandenen Aktinzytoskeletts führen, wodurch sich die Faser -länge, -breite und -orientierung verändert. Dies könnte zu Bildungen von fehlorientierten Fasern und Aktinaggregaten führen, wie man es nach einer Behandlung mit Lidocain bei *Hydra* nachweisen kann. In Zellkulturen von humanen MDA-MB-231

Brustkrebszellen führt eine Behandlung mit Lidocain dazu, dass sich das Aktinzytoskelett in den Krebszellen nicht reorientieren konnte, was zu einer Reduktion der Migration der Krebszellen führt. Das Relaxans beeinträchtigt auf unbekannte Weise Signalwege zur intrazellulären Ca^{2+} - Freisetzung, was die Polymerisation des Aktins stört und die Migration der Krebszellen reduziert (D'Agostino et al., 2018) (Abb. 67). (iii) die Relaxantien könnten durch die gestörte Reizweiterleitung im Falle von Lidocain und Benzocain dazu führen, dass die Polypen ihre intrazelluläre Spannung, vermittelt über das Aktinzytoskelett, nicht aufrechterhalten können. Durch die fehlende Kontraktionen der Epithelmuskelzellen (Neumcke et al., 1981) würde es zu einer Elongation und Immobilisierung kommen, wodurch die fest mit den Zell-Zell-Verbindungen verbundenen Aktinfasern nicht straff, sondern eher locker im Zytoplasma vorliegen könnten. Dies würde die wellig verlaufenden Aktinfasern beispielweise nach einer Benzocain- Behandlung erklären (Abb. 67).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Benzocain ein wirkungsvolles und Aktinzytoskelett- schonendes Relaxans für den Süßwasserpolyphen *Hydra* etabliert werden konnte. Dieses ermöglicht die hochauflösende *in vivo* Mikroskopie über mehrere Stunden, ohne morphogenetische Prozesse wie die Knospung oder den Wundverschluss zu beeinflussen.

VI.3 PtdInsPs-GFP- Sensor transgene Hydren als wertvolle Methode zur Detektion der Zellpolarität und zur Verfolgung der PLC- Aktivität und des PI3K- Signalweges in *Hydra*

Neben dem Rho- GTPase vermittelten Signalweg ist unter anderem der PI- Zyklus an dem Prozess der Knospung beteiligt (Hassel et al., 1998; Hassel und Bieller, 1996). Durch die wirkungsvolle Immobilisation mit Benzocain ist erstmals die *in vivo* Beobachtung sowie die Untersuchung der PtdInsP-GFP- Sensoren für PtdIns(4,5) P_2 und PtdIns(3,4,5) P_3 in *Hydra* möglich.

VI.3.1 Der PtdIns(4,5) P_2 -GFP- Sensor ermöglicht die Detektion der apikalen Zellpolarität sowie die *in vivo* Verfolgung der PLC- Aktivität in *Hydra*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit PtdIns(4,5) P_2 -GFP- und PtdIns(3,4,5) P_3 -GFP- Sensor-transgenen Hydren neue transgene Linien erzeugt werden. Dadurch konnte eine wertvolle Methode der *live in vivo* Beobachtung der membranständigen Phospholipide und deren Hydrolyseprodukte etabliert werden. Durch den PtdIns(4,5) P_2 -GFP- Sensor ist sowohl die Beobachtung des membranständigen PtdIns(4,5) P_2 , als auch dessen Hydrolyseprodukts

Ins(1,4,5)P₃ (IP₃) im Zytoplasma möglich, da das Sensorkonstrukt über spezifische Domänen an den zytoplasmatischen Teil der PtdInsPs bindet (Balla und Várnai, 2009) (Abb. 68).

Der *second messenger* IP₃ ist nach der Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ durch die Phospholipase C (PLC), welche von aktivierten FGF- Rezeptoren phosphoryliert wird (Perez-Garcia et al., 2018), zytoplasmatisch nachzuweisen. Gleichzeitig verbleibt der zweite *second messenger* Diacylglycerol (DAG) in der Zellmembran. IP₃ bewirkt im Zytoplasma die Freisetzung von Ca²⁺ am endoplasmatischen Retikulum, welches dann zusammen mit DAG die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirkt. Aktivierte PKC kann verschiedene Signalwege, wie beispielsweise den RAS/RAF/MEK/ERK- Signalweg, regulieren, der an dem Knospungsprozess bei *Hydra* beteiligt ist (Hasse et al., 2014; Kaleli et al., 2020).

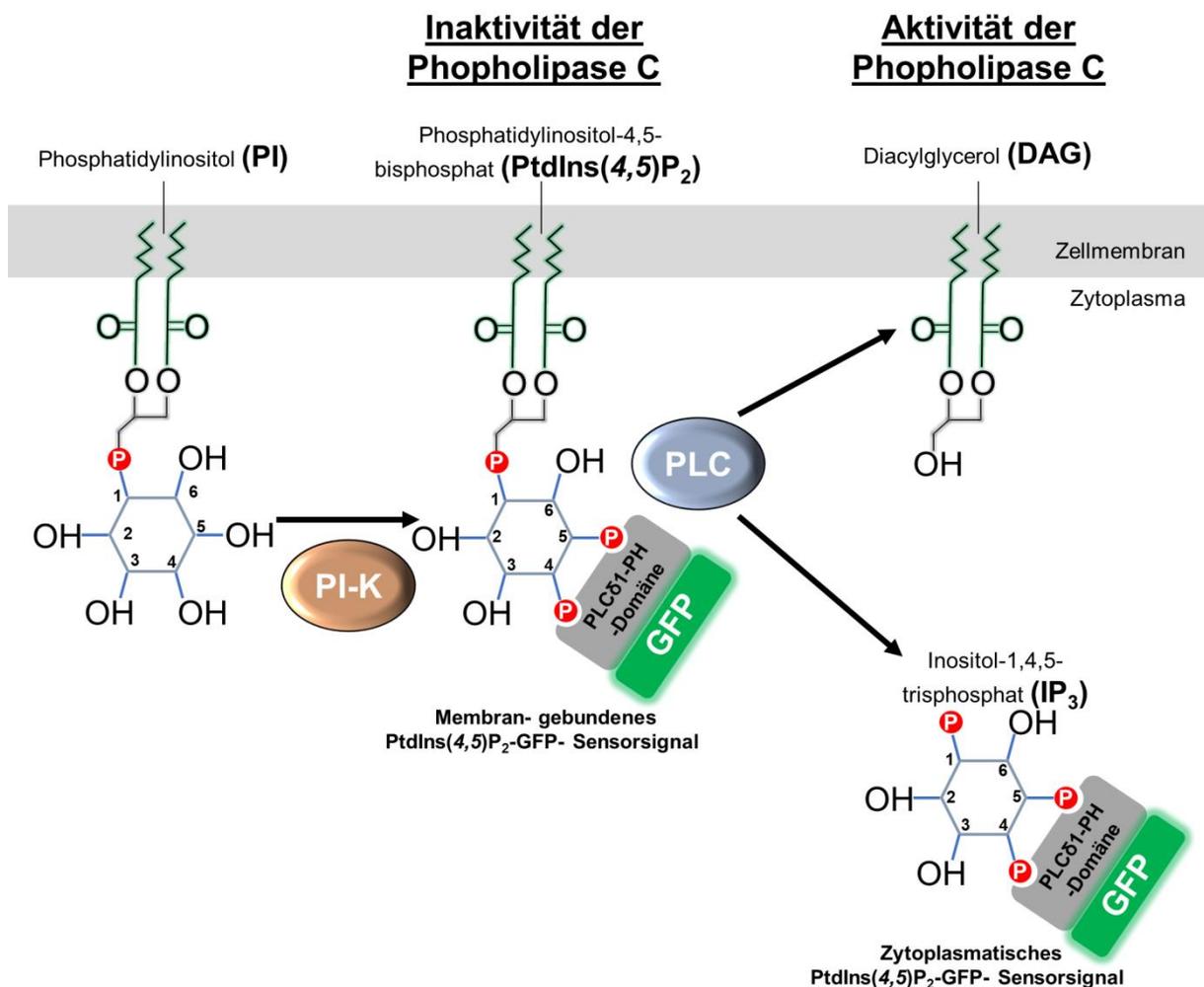


Abbildung 68: Schematische Darstellung der Bindung des Sensors (#59) an das membranständige PtdIns(4,5)P₂ sowie die Detektion des zytoplasmatischen IP₃. PI wird durch die PI- Kinase zu PtdIns(4,5)P₂ phosphoryliert, welches von dem Sensor (#59; PLC-PH-GFP-Fusionsprotein) in der Membran gebunden werden kann und so die Inaktivität der Phospholipase C (PLC) anzeigt. Aktive PLC führt zu einer Hydrolyse des PtdIns(4,5)P₂ zu den beiden second messenger Molekülen DAG und IP₃. Zytoplasmatische IP₃ kann durch den Sensor (#59) gebunden werden, was die Aktivität der PLC anzeigt.

Weiterhin ist IP_3 in der Lage zusammen mit der PKC die Aktomyosin- Kontraktilität zu regulieren, indem es die Phosphorylierung der regulierenden-leichte-Kette des Myosins steuert (Logan und Mandato, 2006).

Ein solches zytoplasmatisches Signal des $PtdIns(4,5)P_2$ -GFP- Sensors, welches die Detektion von IP_3 in dieser Region bedeutet, ist an der Knospbasis während des späten Knospungsprozesses nachzuweisen (Abb. 61). Das zytoplasmatische Sensorsignal an der Knospbasis korreliert somit mit der Expression des FGF- Rezeptors (Sudhop et al., 2004), mit einer Akkumulation des F- Aktins (Holz et al., 2017), mit phosphoryliertem MLC (Holz et al., 2017; Holz et al., 2020), mit phosphoryliertem ERK (Hasse et al., 2014) und mit dem RBD-GFP- Signal zur Detektion aktiver Rho- GTPasen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass $PtdIns(4,5)P_2$, beziehungsweise dessen Hydrolyseprodukte IP_3 und DAG, an der Regulation des Aktinzytoskeletts sowie der Bildung von kontraktile Kräften mittels Myosin, welche die finale Ablösung der Knospe reguliert, beteiligt sein könnte.

Aber auch membranständiges $PtdIns(4,5)P_2$ reguliert das Aktinzytoskelett über verschiedene Adapterproteine. Somit kann $PtdIns(4,5)P_2$ die Verknüpfung des Aktins an die Zellmembran vermitteln, aber auch die Zelladhäsion verstärken und allgemein den Aufbau von Aktinfilamenten regulieren (Abb. 11) (Saarikangas et al., 2010). Das membranständige $PtdIns(4,5)P_2$ -GFP- Sensorsignal kann daher also zum einen die Inaktivität der Phospholipase C anzeigen und zum anderen die Bindung von Adapterproteinen bedeuten, welche das Aktinzytoskelett regulieren können. Von membrangebundenen $PtdInsPs$ ($PtdIns(4,5)P_2$ und $PtdIns(3,4,5)P_3$) ist weiterhin bekannt, dass sie über die Bindung von Rho- GEFs direkt an der Regulation der Rho- GTPasen beteiligt sein können (Buchsbaum, 2007; Saarikangas et al., 2010). Dadurch ist es möglich, dass ein membranständiges $PtdIns(4,5)P_2$ -GFP- Sensorsignal, welches hauptsächlich in der Körpersäule des Polypen nachzuweisen ist, über die Bindung von Rho- GEFs die „housekeeping“ Aktivität der Rho- GTPasen in den Epithelmuskelzellen reguliert.

Neben der Beobachtung der Beteiligung des $PtdIns(4,5)P_2$ -GFP- Sensors an Aktin-regulierenden Signalwegen konnte gezeigt werden, dass der $PtdIns(4,5)P_2$ -GFP- Sensor *in vivo* eine wertvolle Methode zur Detektion der apikalen Zellpolarität der ektodermalen Epithelmuskelzellen in *Hydra* ist. Von $PtdIns(4,5)P_2$ ist bekannt, dass es in Epithelzellen zusammen mit PTEN am apikalen Zellkompartiment lokalisiert ist, während $PtdIns(3,4,5)P_3$ zusammen mit der PI3- Kinase am basalen und basolateralen Zellkompartiment nachzuweisen ist (Krahn und Wodarz, 2012; Shewan et al., 2011). Durch die $PtdIns(4,5)P_2$ -GFP- Sensor transgenen Hydren konnte eine primär apikale Konzentration des Sensors in den ektodermalen Epithelmuskelzellen nachgewiesen werden, was mit der nachgewiesenen apikalen Lokalisation von $PtdIns(4,5)P_2$ in Epithelzellen übereinstimmt.

Dies lässt vermuten, dass PTEN in *Hydra* auch am apikalen Pol zusammen mit PtdIns(4,5)P₂ lokalisiert sein könnte, wo es das Phosphat an der dritten Position von PtdIns(3,4,5)P₃ entfernen und so PtdIns(4,5)P₂ generieren (Shewan et al., 2011). Weiterhin ist bekannt, dass je nach Konzentration des PtdIns(4,5)P₂ in der Zellmembran unterschiedliche Aktin-Binde-Proteine (ABPs) an das Phospholipid binden können, wodurch das Aktinzytoskelett spezifisch reguliert werden kann. So sind geringe PtdIns(4,5)P₂ Konzentrationen in der Zellmembran bekannt für die Bindung von ABPs wie beispielsweise Ezrin und Moesin, worüber Myosin II binden kann, um das Aktinzytoskelett des Aktin-Kortex aufzubauen. Hohe Konzentrationen von PtdIns(4,5)P₂ hingegen können zu einer Bindung von ABPs wie Dia2 und WASP/N-WASP führen, wodurch es zu einer lokalen Ansammlung von Aktinfasern kommt (Abb. 69) (Krahn und Wodarz, 2012; Leslie et al., 2008; Shewan et al., 2011; Wu et al., 2014). Die unterschiedlichen PtdInsP- Konzentrationen stehen also direkt mit der Regulation und dem Aufbau des komplexen Aktinzytoskeletts in Verbindung.

Da die Knospe rechtwinklig aus dem Muttertier auswächst muss es an der Knospbasis zu einer Umorientierung der Zellen beim Einwandern in die Knospe kommen. Dadurch bedingt muss an der Knospbasis ebenfalls zu einer Veränderung der Zellpolarität kommen. Die Veränderung der Zellpolarität würde zu einer Veränderung der PtdInsP- Lokalisation in den Epithelmuskelzellen führen. Von einer Veränderung und speziell von dem Verlust der hohen PtdIns(4,5)P₂- Konzentration an der apikalen Zellmembran ist bekannt, dass dies in einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts sowie in der Auslösung von Zell-Zell-Verbindungen resultiert (Mason et al., 2007). Die Reorganisation, beziehungsweise die Akkumulation von Aktinfasern an der Knospbasis (Holz et al., 2017, 2020) sowie die notwendige Auflösung der Zellverbindungen sind grundlegende Mechanismen zur Ablösung der Knospe bei *Hydra*, was für eine mögliche Beteiligung des PtdIns(4,5)P₂ an der Knospablösung spricht.

VI.3.2 Der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor ermöglicht die Detektion der basalen Zellpolarität sowie die *in vivo* Verfolgung des PI3K- Signalweges in *Hydra*

Im Gegensatz zu dem PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor ist der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor *in vivo* in den ektodermalen Epithelmuskelzellen von *Hydra* basal lokalisiert (Abb. 58). An hohe Konzentrationen von PtdIns(3,4,5)P₃ in der Zellmembran können ABPs, wie beispielsweise Gelsolin und Cofilin binden, worüber der Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts reguliert wird. Die Bindung des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors an solche ABPs könnte die Kolo-kalisation, beziehungsweise die räumliche Nähe des Sensors mit den basalen Aktinfasern der ektodermalen Epithelmuskelzellen erklären (Abb. 58). Weiterhin können Rho- GEFs und somit Rho- GTPasen basal an PtdIns(3,4,5)P₃ in *Hydra* binden, wodurch die Polymerisation der basalen Aktinfasern gesteuert werden könnte (Saarikangas et al., 2010).

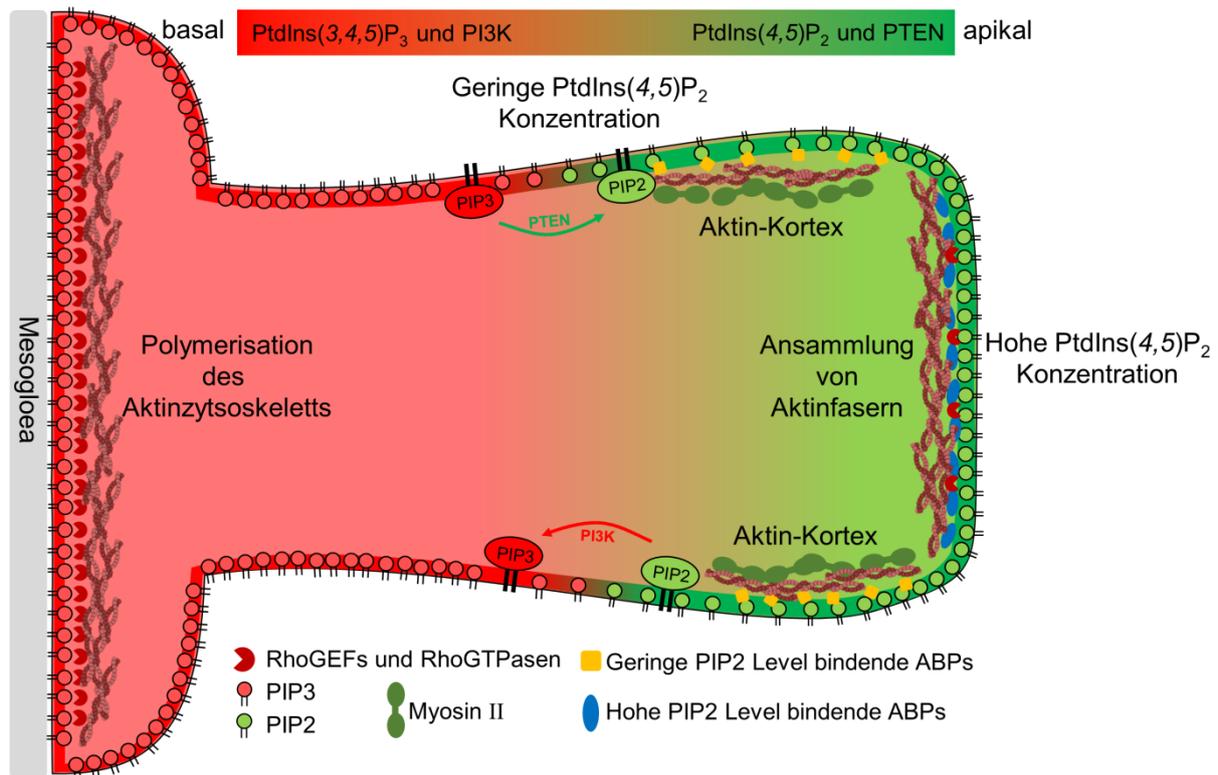


Abbildung 69: Schematische Übersicht der zellulären Verteilung der PtdInsP und deren Regulationsmöglichkeiten des Aktinzytoskeletts anhand einer ektodermalen Epithelmuskelzelle in *Hydra*. Basal und basolateral konzentriertes PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) ist in der Lage Rho- GEFs zu binden und so die Polymerisation des Aktinzytoskeletts zu regulieren. Basolateral und apikal wird PtdIns(3,4,5)P₃ durch PTEN zu PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂) hydrolysiert. Geringe PIP₂-Konzentrationen können zu einer Bindung von bestimmten Aktin-Binde-Proteinen (ABPs) führen, welche den Aktin-Kortex der Zelle regulieren können. An hohe Konzentrationen von PIP₂ können ABPs binden, welche die Akkumulation von Aktinfasern bewirken können (verändert nach Krahn und Wodarz, 2012; Leslie et al., 2008; Shewan et al., 2011; Wu et al., 2014).

Neben der basalen Lokalisation konnte bei dem PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor ebenfalls ein membrangebundenes sowie ein zytoplasmatisches Sensorsignal während des Wundverschlusses an der Wunde nachgewiesen werden (Abb. 63). Im Gegensatz zu PtdIns(4,5)P₂ zeigt ein membranständiges PtdIns(3,4,5)P₃- Sensorsignal die Fähigkeit des PtdIns(3,4,5)P₃ an unterschiedliche Signalwege zu aktivieren (Balla et al., 2000). Dazu gehört hauptsächlich der PI3K/AKT/mTOR- Signalweg (Abb. 12), der beispielsweise das Zell-Überleben, den Fortschritt des Zellzykluses, die DNA- Reparatur, die Proteinsynthese, die Zelldifferenzierung und die Zellproliferation regulieren kann (Robbins und Hague, 2016). Der PtdIns(3,4,5)P₃ vermittelte PI3K/AKT/mTOR- Signalweg ist somit beispielsweise maßgeblich an der Axon- Regeneration in Mammalia beteiligt (Park et al., 2010).

Während der PtdIns/P- Regulation kann der *second messenger* IP₃ durch die IP₃ 3-Kinase (IP₃ 3K) zu IP₄ phosphoryliert werden (Srivastava et al., 2013). IP₄ liegt im Zytoplasma vor und kann aufgrund seiner Struktur als zytoplasmatisches PtdIns(3,4,5)P₃- Analog aufgefasst

werden. Durch die PH- Domänen, die sowohl IP_4 , als auch $PtdIns(3,4,5)P_3$ besitzen, konkurriert das zytoplasmatische IP_4 mit dem membranständigen $PtdIns(3,4,5)P_3$. Dadurch kann IP_4 beispielweise den $PtdIns(3,4,5)P_3$ - regulierten PI3K/AKT/mTOR- Signalweg negativ regulieren, indem AKT an IP_4 statt an $PtdIns(3,4,5)P_3$ bindet. So kann AKT nicht an der Membran gebunden werden, wodurch keine Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR- Signalweges stattfinden kann (Wang et al., 2015).

Somit ist der $PtdIns(3,4,5)P_3$ -GFP- Sensor auch in der Lage mit seiner Btk-PH-Domäne das zytoplasmatisch vorliegende IP_4 nachzuweisen. Dadurch kann zum einen indirekt die Aktivität der IP_3 3-Kinase nachgewiesen werden, welche IP_3 zu IP_4 phosphoryliert. Zum anderen kann durch die zytoplasmatische Bindung des $PtdIns(3,4,5)P_3$ -GFP- Sensors auch auf die negative Regulation des PI3K/AKT/mTOR- Signalweges zurückgeschlossen werden, wodurch Prozesse wie beispielsweise die Zelldifferenzierung unterdrückt werden könnten (Abb. 70).

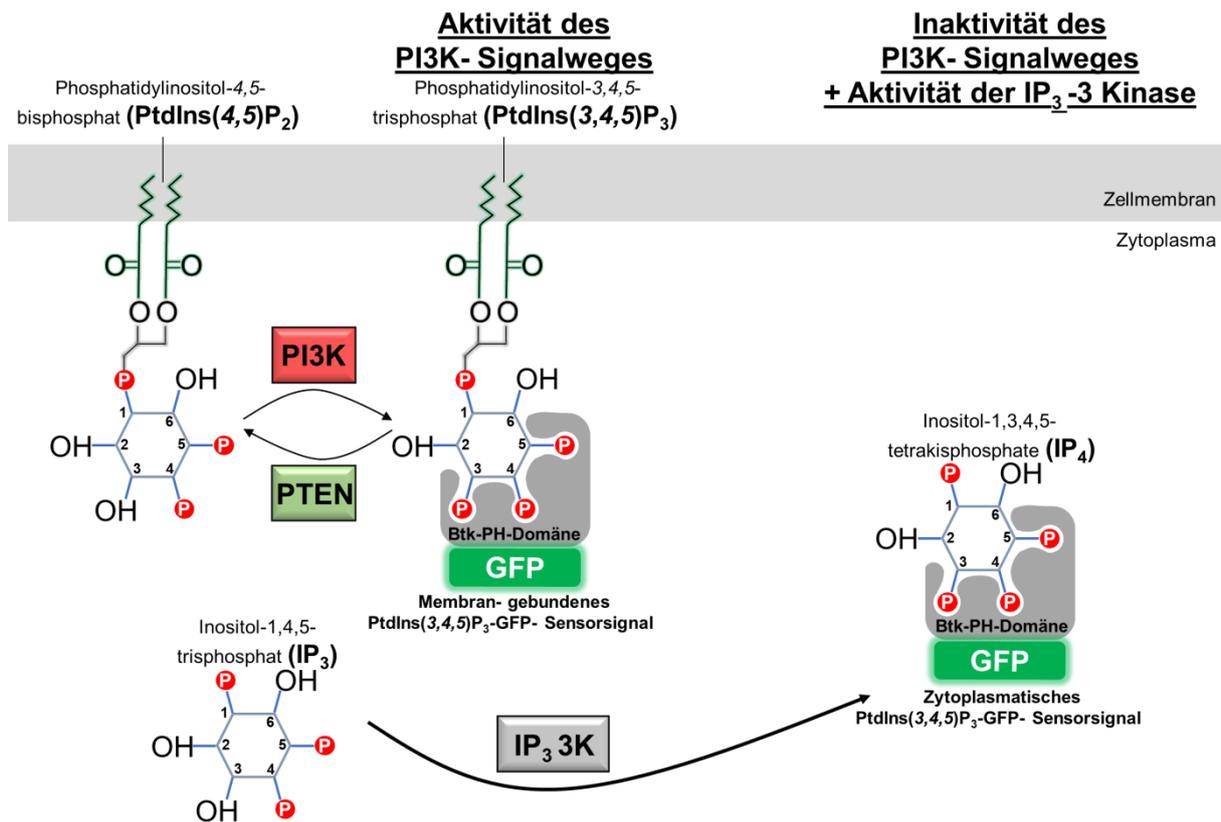


Abbildung 70: Schematische Darstellung der Bindung des Sensors (#63) an das membranständige $PtdIns(3,4,5)P_3$ sowie die Detektion des zytoplasmatischen IP_4 . $PtdIns(4,5)P_2$ wird durch die PI3- Kinase (PI3K) zu $PtdIns(3,4,5)P_3$ phosphoryliert, welches von dem Sensor (#63; Btk-PH-GFP- Fusionsprotein) in der Membran gebunden werden kann und so die Aktivität der PI3K anzeigt. Während des komplexen Recyclingprozesses der $PtdIns/P$ und der IPs wird IP_3 von der IP_3 3- Kinase (IP_3 3K) zu IP_4 hydrolysiert, welches von dem Sensor (#63) im Zytoplasma detektiert werden kann. Das zytoplasmatische Sensorsignal (#63) zeigt somit sowohl die Inaktivität der PI3K, als auch die Aktivität der IP_3 3K an.

Die Daten des zytoplasmatischen PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensorsignals an der Schnittstelle, während des Wundverschlusses, deuten darauf hin, dass in diesen Zellen viel zytoplasmatisches IP₄ statt membrangebundenen PtdIns(3,4,5)P₃ vorliegt. Dies könnte auf eine erhöhte Aktivität der IP₃ 3-Kinase zurückzuführen sein, die IP₃ zu IP₄ phosphoryliert und so für die komplexen Synthese- und Recycling- Prozesse der Inositolphosphate zur Verfügung stellt. Weiterhin könnte das zytoplasmatische Sensorsignal auch die Inaktivität des PI3K- Signalweges detektieren, was für eine Reduktion zellulärer Prozesse wie der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation oder der Zellmigration spricht. Dafür spricht die Tatsache, dass die Regeneration bei *Hydra* durch eine Umbildung vorhandener Zellen und das Ausbleiben von Zellproliferation charakterisiert ist, was als Morphallaxis bezeichnet wird (Holstein et al., 1991; Li et al., 2015).

Im Bereich des Hypostoms ist eine nach aboral gerichtete laterale Konzentration des PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensors an der Zellmembran der ektodermalen Epithelmuskelzellen nachweisbar gewesen, die für den PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor nicht zu beobachten war. Diese veränderte Lokalisation könnte mit der spezifischen Funktion dieser dynamischen Zellen zusammenhängen, die sich bei der Aufnahme von Nahrungspartikeln stark dehnen und zusammenziehen müssen.

Der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor konnte überraschend durch die hoch auflösende *in vivo* Mikroskopie in den Cnidocilien der Nesselkapseln sowie an deren apikalem Operculum detektiert werden. Diese Kappe springt bei einem Reiz der Cnidocilie auf und der Nesselfaden wird mit einer Beschleunigung von 1,4 bis 5,4 Millionen g ausgestoßen (Nüchter et al., 2006; Tardent, 1995). Dies wird durch den enormen Innendruck der Kapsel (bis zu 150 bar) ermöglicht, der abhängig von der Anwesenheit von Kationen, wie beispielsweise Ca²⁺, in der Kapselmatrix ist. Weiterhin hängt auch die Latenzzeit der Reizung der Cnidocilie bis zur Entladung der Nesselkapsel von der Calcium- Konzentration des Mediums ab (Nüchter et al., 2006). Die Tatsache, dass der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor in den Cnidocilien der Nesselkapseln sowie an deren apikaler Kappe nachzuweisen ist könnte zum einen bedeuten, dass Nesselkapseln eine vergleichbare Polarität zu migrierenden Zellen aufweisen. Bei migrierenden Zellen sind unter anderem PtdIns(3,4,5)P₃ und Calcium daran beteiligt Signalproteine an die vordere Membran zu rekrutieren (Falke und Ziemba, 2014). Im Falle der Nesselkapsel könnte PtdIns(3,4,5)P₃ somit an der Öffnung der apikalen Kappe, beziehungsweise an der mechanischen Reizweiterleitung über die Cnidocilie beteiligt sein, welche weder sensorische- noch Nervenzellen benötigt (Tardent, 1995).

Der PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor stellt damit ein wertvolles Werkzeug dar, um zum einen die Aktivität, beziehungsweise die Inaktivität der PI3- Kinase und der IP₃ 3- Kinase in *Hydra* zu detektieren und zum anderen um die Polarität der Epithelmuskelzellen zu untersuchen.

VI.3.3 Phänotypdefekte stimmen mit den Phänotypen nach einer LiCl-Behandlung bei *Hydra* überein

Alle PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren zeigten teilweise sehr ungewöhnliche Phänotypen. Manche Polypen bildeten zahlreiche Knospen aus, die nicht in der Lage waren sich vom Muttertier zu trennen. Eine vergrößerte Knospungszone, mit bis zu sieben Knospen, in unterschiedlichen Stadien, waren gleichzeitig an dem Muttertier nachzuweisen (Abb. 71 A). Vergleichbar dazu konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass ein Eingriff mit Lithiumchlorid (LiCl) in den komplexen PI- Zyklus ebenfalls zu einer überzähligen Anzahl von Knospen führt (Abb. 71 B) (Hassel und Bieller, 1996). Weiterhin führen Behandlungen mit LiCl zu der Bildung von ektopischen Fußstrukturen, Kopfstrukturen und Tentakel bei *Hydra* (Abb. 71 D) (Hassel et al., 1993). Ektopische Tentakel waren vereinzelt auch bei den PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren zu beobachten (Abb. 71 C).

Sowohl durch die PtdInsP-GFP- Sensoren, als auch durch einen schrittweisen Transfer von einer hohen LiCl- Konzentration zu einer niedrigen LiCl- Konzentration, können bei *Hydra* also vergleichbare Phänotypen erzeugt werden. Lithiumchlorid inhibiert dabei die Inositolphosphatasen in *Hydra*, sodass kein Inositol für die komplexe Synthese der Phosphatidylinositole und der Phosphatidylinositolphosphate mehr zur Verfügung steht. Dieses wird ausschließlich im Zug des Recyclings oder in geringem Maße durch die aufwendige Neusynthese aus Glucose gewonnen (Fallahi et al., 2018; Hooper, 1997). Die Reduktion der LiCl- Konzentration nach einer kurzzeitigen Inhibition führt zu einer Aktivierung des PI- Zyklus, indem möglicherweise die Aktivierung des PI- Zyklus imitiert wird. Gleichzeitig werden durch die Reduktion der Lithiumchlorid- Konzentration Inositolphosphatasen nicht mehr inhibiert, was ebenfalls zu einem Anstieg der PtdInsP- Level in *Hydra* führen könnte, was zu den beschriebenen Phänotypen führt (Hassel und Bieller, 1996).

Für die PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren könnte dies bedeuten, dass die eingebrachten Sensoren PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ ähnlich wie das LiCl die Aktivität des PI- Zyklus beeinflussen. Es ist denkbar, dass die von den Sensoren gebundenen PtdInsPs möglicherweise nur noch eingeschränkt in der Lage sind von Effektorproteinen gebunden zu werden, da Sensor und Effektorprotein um die Bindung an die PtdInsPs konkurrieren (Balla und Várnai, 2009). Dadurch werden zelluläre Prozesse, die durch die PtdInsP vermittelt werden inhibiert oder reduziert, was ähnlich wie der Anstieg der PtdInsP- Level zu den Phänotypen bei *Hydra* führen könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von PtdIns(4,5)P₂- Sensorstrukturen, wie sie auch bei dem *Hydra*-spezifischen, Aktin-getriebenen Expressionsvektor LigAF stattfindet, in Zellkulturen die Reduktion der Bindung des Zytoskeletts an die Plasmamembran bewirkt. Dabei konnte

gezeigt werden, dass die Reduktion der Adhäsion des Zytoskeletts an die Plasmamembran auf die Reduktion des zur Verfügung stehenden $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ zurückzuführen ist (Raucher et al., 2000).

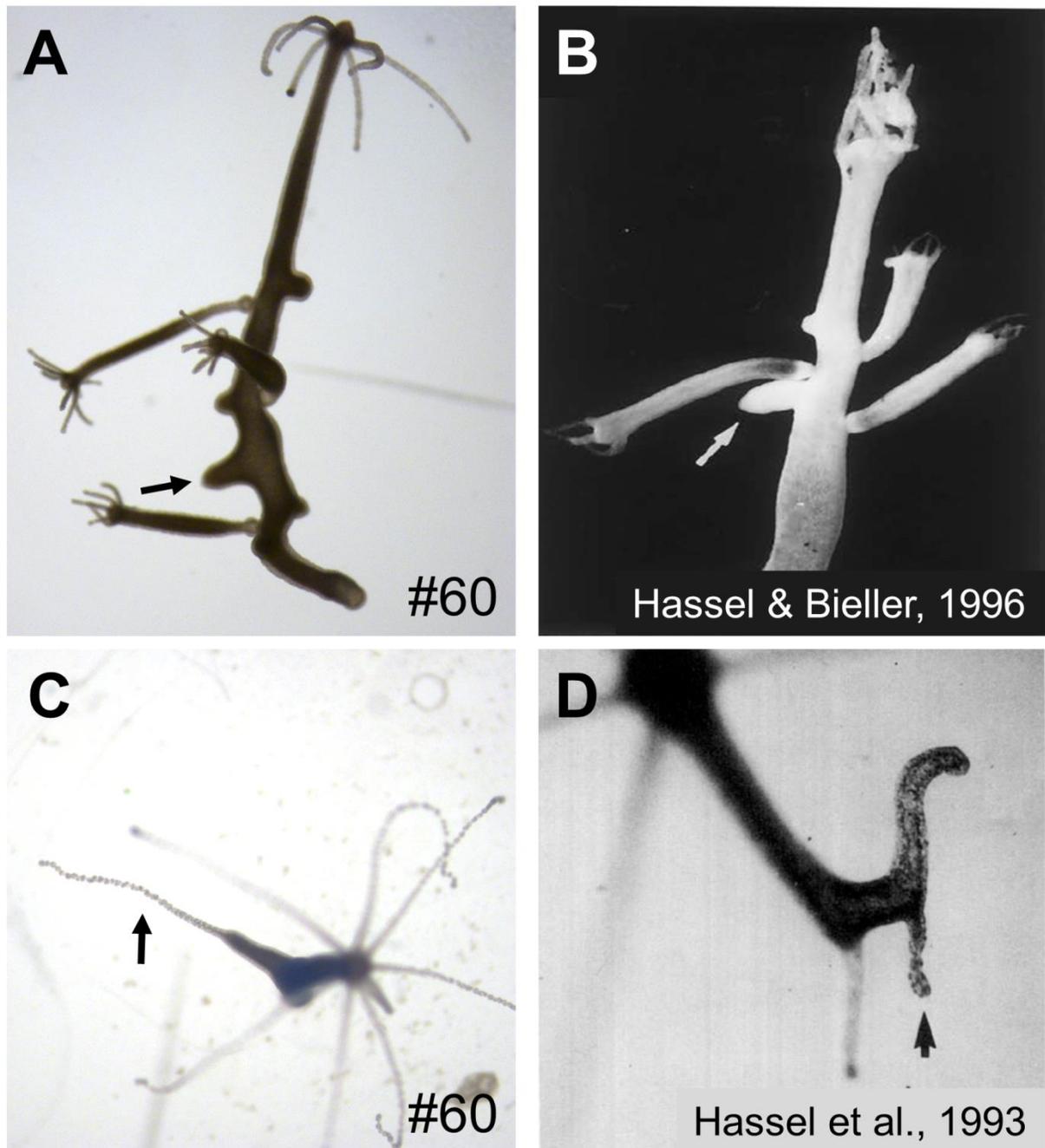


Abbildung 71: Vergleich der Phänotypen der PtdInsP -GFP- Sensor transgenen Tieren mit den Phänotypen hervorgerufen durch eine LiCl - Behandlung. (A) Die PtdInsP -GFP- Sensoren, beziehungsweise deren Kontrollen führen zu einer expandierten Knospungszone mit einer überzähligen Anzahl von Knospen unterschiedlicher Stadien. Dabei befinden sich Knospen auf der gleichen Seite des Muttertieres, wobei sich junge Knospen (Pfeil) über- und unter bereits existierenden Knospen bilden. (B) Der gleiche Phänotyp konnte durch einen schrittweisen Transfer von einer hohen LiCl - Konzentration zu einer niedrigen LiCl - Konzentration erzeugt werden, welches die Synthese und das Recycling der PtdInsP stören (Hassel und Bieller, 1996). (C) Bei einigen PtdInsP -GFP- Sensor transgenen Hydren konnten ektopische Tentakel nachgewiesen werden (Pfeil). (D) Damit übereinstimmend konnten ektopische Tentakel (Pfeil) ebenfalls durch Behandlungen mit Lithiumchlorid erzeugt werden.

Gleichzeitig ist es möglich, dass die Bindung der Sensoren, samt voluminösen GFP-Molekül dazu führt, dass das Verhalten der, an PtdInsPs bindenden, *downstream* Effektoren gestört werden kann (Balla et al., 2000), wodurch wiederum zahlreiche zelluläre Prozesse gestört werden könnten.

VI.3.4 Mögliche Fehlinterpretationen der PtdInsP-GFP- Sensoren in *Hydra*

Allgemein muss man bei der Interpretation der Daten der PtdInsP-GFP- Sensoren in *Hydra* berücksichtigen, dass die Sensoren durch den *Hydra*- spezifischen Expressionsvektor LigAF (Anhang 13) Aktin-getrieben, und somit kontinuierlich exprimiert werden. Dies führt dazu, dass die spezifische, membrangebundene Lipid- Fraktion möglicherweise nicht von dem hohen zytosolischen Hintergrundsignal des ungebundenen Sensors unterschieden werden kann. Daher sollten die PtdInsP-GFP- Sensoren an Zellen untersucht werden, die den Sensor in einer geringen Konzentration exprimieren (Balla und Várnai, 2009). Weiterhin ist die Menge der Phospholipide, die zur Bindung bereitstehen, relativ gering, wohingegen gleichzeitig viel Sensor zur Detektion produziert wird, was zu Fehlbindungen führen könnte. Das verwendete Sensorkonstrukt für PtdIns(4,5)P₂ (PLCδ-PH-GFP), aber besonders das Sensorkonstrukt für PtdIns(3,4,5)P₃ (Btk-PH-GFP) können Zellkernporen durchdringen und in den Zellkern gelangen, wo eine Vielzahl von PtdInsPs in geringen Maße lokalisiert sind (Balla und Várnai, 2009; Irvine, 2006). Fluoreszierende Aggregate im Zytoplasma (Abb. 57 und Abb. 58) sind oftmals auf hohe Konzentrationen der Sensoren, aber hauptsächlich auf Faltungsprobleme des Sensor-GFP-Konstrukts zurückzuführen. Dies resultiert dann in großen fluoreszierenden Aggregaten, welche in unterschiedlichen Zellkompartimenten, aber hauptsächlich perinukleär und mit dem Golgi-Apparat- assoziiert vorkommen (Balla und Várnai, 2009). Diese fluoreszierenden Aggregate konnten verstärkt bei PLCδ-PH- Sensoren nachgewiesen werden, was mit den perinukleären fluoreszierenden Aggregaten des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors (PLCδ-PH-GFP) in *Hydra* korreliert. Weiterhin ist ein eindeutiges membrangebundenes Signal oft nur bei runden, klar abgegrenzten Zellen in Zellkulturen, wie MDCK oder ähnlichen Zellen, möglich. Daher werden oftmals Signalintensitätsanalysen zur spezifischen Detektion der PtdInsP-GFP- Sensoren genutzt, die der Analyse der erhobenen Daten dieser Arbeit entsprechen. Der direkte Vergleich des Sensorsignals in dem dreidimensionalen Süßwasserpolyphen mit den planaren Vertebraten Zellkultur- Zellen zeigt jedoch, dass zumindest für den PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor eine vergleichbare membrangebundene Lokalisation nachgewiesen werden kann (Abb. 72). Die Sensorkonstrukte sind Vertebraten- spezifische Zellkultur- Konstrukte, die temperaturempfindlich sind. So konnte beispielsweise für das PLCδ-PH-GFP- Konstrukt des PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensors ein Verlust der Lokalisation nach 20 Minuten in Raumtemperatur gezeigt werden, nachdem die Zellen aus dem 37°C Zellkulturschrank genommen worden waren (Balla und Várnai, 2009). *Hydra vulgaris* wird bei 18°C gehalten,

was möglicherweise eine aberrante fehlerhafte Sensor- Lokalisationen verursachen könnte, die zukünftig weiter abgeklärt werden sollte.

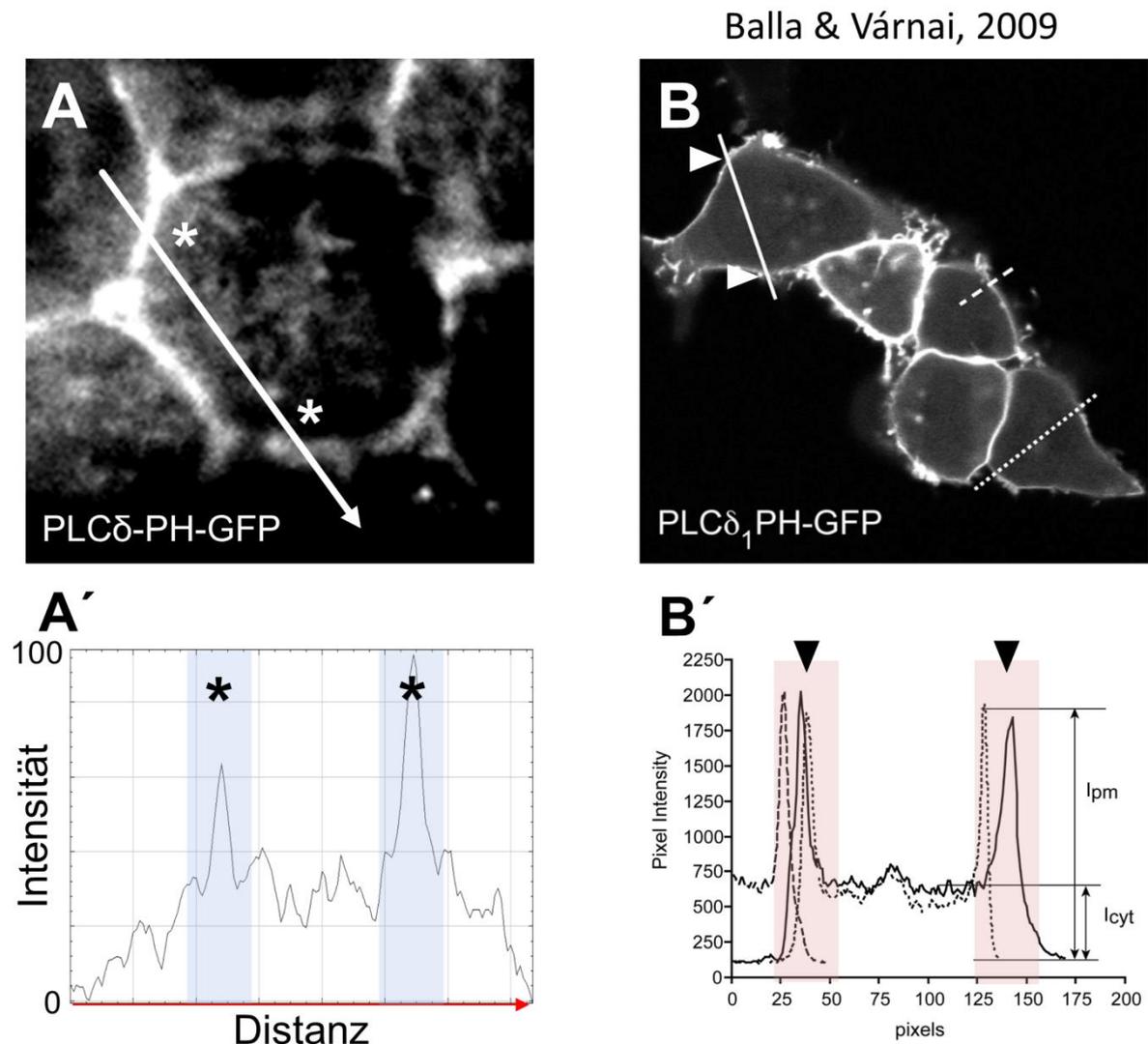


Abbildung 72: Vergleich des Vertebraten PLC δ -PH-GFP (#59)- Sensorkonstrukts in HEK293-Zellkultur- Zellen mit der Expression des Sensors in ektodermalen transgenen Epithelmuskelzellen in *Hydra*. (A, A') Die transgenen ektodermalen Epithelmuskelzellen zeigen eine deutliche membrangebundene Lokalisation (Stern; blau hinterlegt). (B, B') Die *Human-Embryonic-Kidney* (HEK293)- Zellkultur- Zellen zeigen dazu eine vergleichbare membrangebundene Lokalisation (schwarzer Pfeilkopf; rot hinterlegt) (Balla und Várnai, 2009).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass *in vitro* ein PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensorkonstrukt (ARNO-PH) nicht exklusiv an PtdIns(4,5)P₂ bindet, sondern auch in einem gewissem Maße PtdIns(3,4,5)P₃ bindet (Macia et al., 2000). Daher ist es theoretisch möglich, dass *in vivo* die verwendeten Sensoren in *Hydra* ebenfalls kreuzreagieren und jeweils beide PtdInsPs detektiert werden. Da die Sensoren jedoch eine spezifische Lokalisation bezüglich der Zellpolarität in ektodermalen Epithelmuskelzellen zeigen, und auch bei morphogenetischen

Prozessen unterschiedliche zelluläre Signale zeigen, ist davon auszugehen, dass Sensor-transgene Hydren eine effektive Methode zur *in vivo* Beobachtung der PtdInsP bieten.

Anhand der *in vivo* Beobachtung der PtdInsP-GFP- Sensoren sowie der Antikörperfärbung des GFPs der Sensorkonstrukte ist zu erkennen, dass es eine große Diskrepanz zwischen der *in vivo* und der immunhistochemische Detektion der Sensoren gibt (Abb. 58). An *Lifeact*-GFP-transgenen Hydren und einer entsprechenden Färbung des F- Aktins mittels Phalloidin konnte gezeigt werden, dass sich die Strukturen in *Hydra* durch die Fixierung und den Färbeprozess verändern (Aufschnaiter et al., 2017). Dies lässt vermuten, dass es durch die Fixierung ebenfalls zu einer Strukturveränderung der PtdInsP-GFP- Sensoren kommen könnte. Dies würde die Veränderung der Lokalisation PtdInsP-GFP- Sensoren in den Epithelmuskelzellen durch immunhistochemische Antikörperfärbung des GFPs der Sensorkonstrukte erklären.

VII. Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen auf eine klare Beteiligung der Rho-GTPasen Hv_Rho1-4 bei verschiedenen morphogenetischen Prozessen, wie der Knospung und der Regeneration in *Hydra* hin.

Durch Expressionsuntersuchungen der mRNA mittels *in-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass *hv_rho1-4* speziell in morphologisch aktivem Gewebe exprimiert werden. Die Expression der Rho- GTPasen sollte zukünftig detailliert an dem vollständigen Prozess der Knospung zu den einzelnen Knospstadien untersucht werden. Weiterhin könnten *in-situ*-Hybridisierungen an regenerierenden Hydren dazu dienen eine mögliche Hochregulation der vier Rho- GTPasen aus *Hydra* während des Regenerationsprozesses zu untersuchen.

Mittels des Fusionsproteins RBD-GFP konnte eine effektive Methode zur Detektion von aktiven RhoA- homologen Rho- GTPasen in *Hydra* etabliert werden. Die Analyse der Rho-GTPasen Proteindomänen sowie der Proteinfaltung, lieferte erste Indizien dafür, dass lediglich Hv_Rho1 und Hv_Rho2 durch RBD-GFP detektiert werden können, wohingegen eine Bindung an Hv_Rho3 und Hv_Rho4 eher unwahrscheinlich ist. Um die tatsächliche Bindungsfähigkeit zu untersuchen soll eine Interaktionsstudie der Rho- GTPasen und des RBDs in einem Zellkultursystem in Kooperation mit Prof. Dr. Klaudia Giehl (Universität Gießen) durchgeführt werden. Dafür sollen Hv_Rho1-4 jeweils in einen GFP- exprimierenden Vektor kloniert werden, wodurch eine mögliche Interaktion mit einem Vertebraten RBD, welches mit einem RFP gekoppelt ist, untersucht werden kann. Weiterhin wäre diese Studie phylogenetisch interessant und wertvoll, da somit eine Bindung zwischen einem Cnidaria- und einem Vertebraten- Protein untersucht werden könnte.

Zukünftig könnten auch RBD-GFP transgene *Hydra*- Linien etabliert werden, mit denen *in vivo* eine Untersuchung der Aktivität der Rho- GTPasen möglich wäre. Die pharmakologische Inhibition dieser transgenen Linie, beispielweise mit dem FGFR- Inhibitor SU5402 oder dem RhoA- Inhibitor Rhosin, könnte direkt Einsichten über die Beteiligung und die Lokalisation der Rho- GTPasen bei unterschiedlichen morphogenetischen Prozessen liefern. Weiterhin könnte man durch siRNA- Konstrukte gezielt die Expression verschiedener Komponenten des FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges verhindern und so deren speziellen Einfluss, beziehungsweise Aufgabe in *Hydra* untersuchen.

Neben der Untersuchung der Rho- GTPasen war die Klonierung, Etablierung und erste Charakterisierung von PtdInsP- Sensor transgenen Hydren, Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. Diese transgenen Linien sind ein nützliches Werkzeug, um die Zellpolarität, aber auch um die Involvierung von PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ während morphogenetischer Prozesse in *Hydra* zu analysieren. Zukünftig müssen weitere detaillierte Untersuchungen der transgenen Tiere folgen, um die regiospezifische Lokalisation der Sensoren, vor allem während des Knospungsprozesses und der Regeneration zu bestimmen. Da gezeigt werden konnte, dass die PtdInsP-GFP- Sensoren in *Hydra* als Marker der Zellpolarität genutzt werden können, würden sich zukünftig teiltransgene Hydren eignen, um eine notwendige Änderung der Zellpolarität bei der Zell- und Gewebewanderung, beispielweise in die auswachsende Knospe, verfolgen zu können. Dabei muss jedoch die physiologisch stattfindende Veränderung der PtdInsP-GFP- Sensoren berücksichtigt werden, da die Hydrolyse und die Synthese der PtdInsPs Bestandteil der normalen Zellphysiologie ist.

Das Gewebe in *Hydra* unterliegt einer kontinuierlichen passiven Verdriftung Richtung Termini und Knospe. Allerdings sind einige Zellen, wie Nematoblasten, Neuroblasten sowie die Vorläufer der Geschlechtszellen aktiv in der Lage zu migrieren. Um die aktive Zellwanderung und mögliche Polaritätsveränderung dieser Zellen zu untersuchen würden sich Transplantationsexperimente mit PtdInsP-GFP- Sensor- transgenen Hydren anbieten. Bei diesen Experimenten würde transgenes-, als auch nicht-transgenes Gewebe aufeinander transplantiert werden, wodurch die Migration der transgenen Zellen durch nicht-transgenes Gewebe untersucht werden kann.

Für die detaillierte mikroskopische Untersuchung von lebenden Hydren konnten speziell die Relaxantien Benzocain und Linalool während dieser Arbeit untersucht und beschrieben werden. Dabei zeigte sich, dass Benzocain im Gegensatz zu Linalool einen geringen Einfluss auf das Aktinzytoskelett bei *Hydra* hat. Perspektivisch bietet Benzocain ein effektives und schonendes Relaxans, um *live* über lange Zeiträume morphogenetische Prozesse in *Hydra* beobachten zu können. Weiterhin wird durch die Immobilisierung die

Detektion von zellulären Prozessen, beispielsweise anhand von PtdInsP-GFP- Sensor- transgenen Hydran ermöglicht.

VIII. Material und Methoden

VIII.1 Haltung von *Hydra vulgaris*

VIII.1.1 Materialien zur Haltung von *Hydra vulgaris*

Verwendete Lösungen:

- Lösung I (1000x): 42,18 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- Lösung II (100x): 14,45 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
4,238 g/l NaHCO_3
1,0985 g/l K_2CO_3
- Milli-Q Reinstwasser
- Volvic: natürliches Mineralwasser: Calcium 12,0 mg/L, Magnesium 8,0 mg/L, Natrium 12,0 mg/L, Kalium 6,0 mg/L, Chlorid 15,0 mg/L, Silizium 32,0 mg/L, Sulfat 9,0 mg/L, Hydrogencarbonat 74,0 mg/L mit einem pH- Wert von 7 (Quelle: www.Volvic.de/produkte/Volvic-naturelle.html) als alternatives Hydramedium
- Gerda- Plastischalen (Maße in mm: 200x100x65 oder 200x200x65)
- Eier der Süßwasserkrebse *Artemia salina* (Ocean Nutrition Artemia/brine Shrimp; Erdmann Art.-Nr.:ON-151041; Lagerung bei -20°C)
- Petrischalen (unterschiedliche Größen)

Die Lösungen I und II wurden in Milli-Q Reinstwasser gelöst. Für 30 Liter Hydramedium (HM) wurden 30 ml der Lösung I und 300 ml der Lösung II in 30 Liter Milli-Q Reinstwasser gegeben und unter ständiger Belüftung gelöst. Zur Belüftung wurden saubere Gummischläuche und Glas- Pipetten an Aquaristik- Pumpen angeschlossen.

VIII.1.2 Haltung und Fütterung von *Hydra vulgaris*

Die Haltung der Süßwasserpolyphen erfolgte in der Regel in Gerda- Plastischalen (Maße in mm: 200x100x65 oder 200x200x65) oder in Petrischalen bei 18°C und einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus mit einer 16-stündigen Lichtphase. Die Fütterung erfolgte montags bis freitags mit frischen Nauplien von *Artemia salina*. Überschüssige Artemien sowie unverdaute Futterreste wurden nach circa sechs Stunden durch den Austausch des Hydramediums (HM) ausgewaschen.

VIII.2 Phylogenie und Proteinstruktur- Analyse

VIII.2.1 Software und Websites zur Phylogenie- und Proteinstruktur-Analyse

- BLAST- Funktion der *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) Website ([www. blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))
- Clustal-X zur Erstellung eines Alignments (Version 2.0) (Thompson et al., 1997)
- GeneDoc zur Editierung des Alignments (Version 2.7.000) (Nicholas et al., 1997)
- *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* zur Stammbaumberechnung (MEGA-X; Version 10.0.5) (Kumar et al., 2018)
- MrBayes zur Stammbaumberechnung (Version 3.2.6; *Bayesian Analysis of Phylogeny*) (Huelsenbeck und Ronquist, 2001)
- FigTree zur Darstellung des Stammbaums (Version 1.4.4) ([www. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/))
- Zur Domänenanalyse der Proteine wurden die Online- Funktionen von NCBI (*Conserved Domain Search*; www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) und das SMART- Onlinetool des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) (www.smart.embl-heidelberg.de) genutzt
- *Illustrator for Biological Sequences* (IBS) zur Darstellung der Proteinsequenzen (Version 1.0.3) (Liu et al., 2015)
- Swiss-Model Tool zur Berechnung der Proteinstruktur (www.swissmodel.expasy.org; Biozentrum University of Basel) (Waterhouse et al., 2018)
- DeepView / Swiss-PdbViewer zur Darstellung der Proteinstruktur (Version 4.1.0; www.expasy.org/spdbv/) (Johansson et al., 2012)

VIII.2.2 Methoden zur Sequenzsuche, zur Erstellung eines Sequenzalignments und zur Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums

Die phylogenetische Analyse wurde für die Rho- GTPasen (publiziert in Holz, Apel et al., 2017) und für die Rho- GEFs Trio und Kalirin (publiziert in Kratzer et al., 2019) durchgeführt. Basierend auf den annotierten humanen Proteinsequenzen der Rho- GTPasen Rho, Rac, Cdc42 und RhoBTB, beziehungsweise auf den annotierten humanen Proteinsequenzen der Rho- GEFs Trio und Kalirin wurde die BLAST- Funktion der *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) Website genutzt, um entsprechende homologe Sequenzen in ausgewählten Organismen zu identifizieren (Anhang 1 und Anhang 2: Accession-Nummern der Rho- GTPasen (Holz et al., 2017); Anhang 3 und Anhang 4: Accession-Nummern der Trio- und Kalirin- Protein (Kratzer et al., 2019)). Die Sequenzen, die die größte Ähnlichkeit

(mehr als 60 % Übereinstimmung zur *Query*- Sequenz) zu der humanen Ausgangssequenz (*Query*) aufwiesen wurden für die Sequenzalignments und für die Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes genutzt. Die Sequenzen müssen dazu zunächst in dem FASTA- Format in einem Txt.- File abgespeichert werden, bevor mit dem Analyseprogramm Clustal-X ein vorläufiges Alignment erstellt wurde. Dieses kann anschließend manuell mit GenDoc editiert und dargestellt werden. Das editierte Alignment wurde danach mit der Software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA-X) in ein .nex- File umgeschrieben, welches kompatibel mit der Stammbaumberechnungs- Software MrBayes ist. Bei MrBayes wurden die folgenden Parameter zur Berechnung der Stammbäume bestimmt: NGEN=1000000 (1 Mio. Generationen); SAMPLEFREQ=100 (jeder 100. Baum wird gespeichert); SUMT BURNIN=100 (d.h. ab dem 100. Baum = von 10000 Generation fließen die Werte mit in die Auswertung). Während der Berechnung der Stammbäume durch MrBayes wurde jeweils ein .nex.con.tre- File erstellt. Damit wurden anschließend mit FigTree die errechneten Bäume editiert und grafisch dargestellt.

Für die Analyse der Proteindomänen wurden die Domänen zunächst mit den Online-Funktionen von NCBI (*Conserved Domain Search*) und mit *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL; SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*)) bestimmt. Anschließend wurden die ermittelten Proteindomänen zur Veranschaulichung mittels *Illustrator for Biological Sequences* (IBS) dargestellt. Alternativ wurde eine vereinfachte Übersichtsdarstellung der Proteindomänen von Trio und Kalirin mittels PowerPoint (Microsoft) angefertigt (publiziert in Kratzer et al., 2019).

Um Proteinstrukturen zu berechnen und darzustellen wurden die diese zunächst basierend auf existierenden Proteinsequenzen mit dem Swiss-Model Tool (www.swissmodel.expasy.org) berechnet. Dies geschieht, indem basierend aus einer Kristall- Proteinstruktur- *template library*, Vorlagen ausgewählt werden, die eine hohe Ähnlichkeit zu der zu analysierenden Proteinsequenz aufweisen. Aus diesen Vorlagen werden anschließend 3D- Proteinstrukturen für das zu analysierende Protein errechnet. Diese 3D- Proteinstrukturen können mit der Software DeepView / Swiss-PdbViewer editiert und dargestellt werden. Weiterhin können mittels des DeepView / Swiss-PdbViewers 3D-Strukturen von Proteinen verglichen werden, worüber eine Aussage über die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine getroffen werden kann.

VIII.3 Immunhistochemische Antikörperfärbung (IHC)

Die Immunhistochemie ist eine molekularbiologische Methode zur Markierung und Detektion von Proteinen mittels Antikörpern. Dazu wird zunächst ein Primärantikörper verwendet, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist. In einem zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper verwendet, der wiederum gegen die Spezies gerichtet ist, aus welcher der Primärantikörper stammt. An den Sekundärantikörper ist üblicherweise ein Fluorophor gekoppelt, worüber sich das zu untersuchende Protein mittels Fluoreszenzmikroskopie indirekt detektieren lässt (Müller und Hassel, 2018).

VIII.3.1 Lösungen und Materialien der IHC

- Allgemeine Laborausstattung
- Paraformaldehyd (PFA): 4 % PFA in 1 x PBS oder HM
- *Phosphate buffered saline* (PBS): 0,01 M Natrium-Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl (bei einem pH- Wert von 7,4)
- PBTx: 1 x PBS + 0,25 % Triton X-100
- Triton X-100 (Sigma)
- Urethan (2 %) in HM; sterilfiltriert
- Blocklösung:
 - 2 % Bovines Serumalbumin (BSA)
 - 3 % BSA + 1 % *Normal Goat Serum* (NGS) + 0,1 M Glycin
- Primärantikörper:
 - anti- RhoA (aus Maus; von Cytoskeleton; ARH05-S) für die RhoA- Einzelfärbung und für die RhoA + RBD-GFP- Doppelfärbung (siehe VIII.3.2)
 - anti- GFP (aus Maus; von Abcam; 9F9.F9) für die Detektion der PtdInsP-GFP-Sensoren (siehe VIII.3.2)
- Sekundärantikörper: anti- Maus (FITC (F9887) oder TRITC (T5393) gekoppelt; Sigma)
- Fluoreszenzfarbstoffe:
 - Phalloidin-TRITC (1:150 in PBTx) (Sigma)
 - Phalloidin 647 (Abcam)
 - DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1:5000 in 1x PBTx) (Sigma)
- Objektträger
- Deckgläschen
- Einbettmedium: Roti®Mount FluorCare (CarlRoth) oder Mowiol/DABCO

VIII.3.2 Methode der anti-RhoA Immunhistochemie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene immunhistochemische Antikörperfärbungen durchgeführt: (i) anti-RhoA – Einzelfärbung; (ii) anti-RhoA + RBD-GFP-

Doppelfärbung; (iii) anti-GFP zur Verstärkung des GFPs der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren.

Für die immunhistochemische Antikörperfärbung wurden circa fünf, für 24 Stunden ungefütterte Hydren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das HM wurde vollständig abgenommen und durch 1 ml Urethan (2 %; sterilfiltriert) ersetzt. Unter einer Lichtquelle wurden die Tiere im Urethan für maximal zwei Minuten geschwenkt, wodurch sie relaxierten. Das Urethan wurde daraufhin vollständig abgenommen und durch PFA (4 % in HM oder 1 x PBS) ersetzt, welches nach fünf Minuten noch einmal ausgetauscht wurde. Im PFA fixierten die Hydren über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler bei 50 rpm. Am folgenden Tag wurde das PFA vollständig abgenommen und durch 3 x 20-minütiges waschen mit PBTx (1 x PBS + 0,25 % Triton X-100) möglichst restlos entfernt. Anschließend an die Waschschriffe folgte ein Blockschritt, wobei die Tiere zwei Stunden auf dem Schüttler (50 rpm) in der Blocklösung (für (i) und (iii): 2 % BSA in PBTx; für (ii) 3 % BSA + 1 % NGS + 0,1 M Glycin) inkubierten. Dadurch werden unspezifische Bindestellen des Antikörpers blockiert, wodurch die Bindungsaffinität des verwendeten Antikörpers erhöht wird. Die Dauer der Inkubation mit der Blocklösung sowie dessen spezifische Zusammensetzung kann variieren und muss für jeden Antikörper getestet und angepasst werden. Nach der Inkubation wurde die Blocklösung abgenommen und durch 200 µl des primären Antikörpers (bei (i) und (ii): anti-RhoA (1:250); bei (iii) anti-GFP (1:500)) ersetzt. Darin inkubierten die Hydren über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler (50 rpm). Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper vollständig abgenommen und 6 x 15-20 Minuten mit PBTx ausgewaschen. Anschließend wurde zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper anti-Maus (FITC oder TRITC gekoppelt; 1:500 in PBT) inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und alle weiteren Arbeitsschritte müssen im Dunklen geschehen, da der Sekundärantikörper mit einem lichtsensitiven Fluorophor gekoppelt ist, welcher vor Verblässen geschützt werden sollte. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper abgenommen und durch 6 x 15-20-minütiges Waschen mit PBTx vollständig entfernt. Standardmäßig erfolgt nach dem ersten Waschschriffe mit PBTx die indirekte Färbung der Zellkerne durch DAPI (1:5000 in PBTx) für 10 Minuten (Chazotte, 2011). Optional kann nach dem dritten Waschschriffe mit PBTx eine Färbung des F-Aktins durch Phalloidin-TRITC (1:150 in PBTx) für 60 Minuten durchgeführt werden, bevor mit den PBTx- Waschschriffen fortgesetzt wird. Zum Abschluss der immunhistochemischen Färbung erfolgten sechs 20-minütige Waschschriffe mit 1 x PBS, wodurch das Triton X-100 möglichst vollständig entfernt wurde, bevor mit Roti®Mount FluorCare Einbettmedium oder Mowiol/DABCO eingebettet wurde (siehe VIII.5).

Bei der anti-RhoA + RBD-GFP- Doppelfärbung wurde zeitgleich mit dem anti-RhoA- Antikörper und dem RBD-GFP- Fusionsprotein inkubiert und kühl gearbeitet (siehe VIII.7).

VIII.4 Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin-TRITC

Zur Färbung des filamentösen Aktins (F- Aktin) wird Phalloidin, das Gift des *Amanita phalloides* (Grüner Knollenblätterpilz) verwendet (Melak et al., 2017; Vandekerckhove et al., 1985). Phalloidin bindet an das F- Aktin, wodurch sich dieses durch ein an das Phalloidin gekoppelten Fluorophor (TRITC) detektieren lässt.

VIII.4.1 Lösungen und Materialien der F- Aktin Färbung mittels Phalloidin-TRITC

- Paraformaldehyd (PFA): 4 % PFA in 1 x PBS oder HM
- Phosphate buffered saline (PBS): 0,01 M Natrium-Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl (bei einem pH- Wert von 7,4)
- PBTx: 1 x PBS + 0,25 % Triton X-100
- Triton X-100 (Sigma)
- Urethan (2 %) in HM; sterilfiltriert
- Fluoreszenzfarbstoffe:
 - Phalloidin-TRITC (1:150 in PBTx) (Sigma)
 - DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1:5000 in 1x PBTx) (Sigma)
- Objektträger
- Deckgläschen
- Einbettmedium: Roti®Mount FluorCare (CarlRoth) oder Mowiol/DABCO

VIII.4.2 Methode der F- Aktin Färbung mittels Phalloidin-TRITC

Dazu wurden circa 5 *Hydren* in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und wie beschrieben fixiert (VIII.3.2). Im Anschluss wurde das PFA vollständig abgenommen und die *Hydren* wurden 3 x 10-20 Minuten mit jeweils 1 ml PBTx (PBS + 0,25 % Triton X-100) auf dem Schüttler bei RT gewaschen und permeabilisiert. Danach wurde das PBTx durch 1 x PBS ersetzt, womit die *Hydren* 3 x 5-10 Minuten gewaschen wurden. Darauf folgte die Färbung des F- Aktins mittels Phalloidin. Dazu wurde das PBS abgenommen und durch Phalloidin-TRITC- Lösung (1:150 in PBS) ersetzt. Darin inkubierten die Tiere für 90 Minuten bei RT auf dem Schüttler. Anschließend wurde das Phalloidin vollständig abgenommen und es wurde 2 x 20 Minuten und folgend 3 x 5 Minuten mit PBTx gewaschen. In dem ersten 20-minütigen PBTx Waschschriff erfolgte parallel die Färbung der DNA durch DAPI (1:5000 in PBTx), wodurch die Zellkerne der *Hydren* detektiert werden können (Chazotte, 2011). Nach den PBTx- Waschschriffen, erfolgten mindesten 5 x 5 Minuten Waschschriffen mit PBS, um das PBTx aus dem Gewebe zu entfernen. Die Waschschriffen erfolgten bis abends oder über

Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Im Anschluss daran wurden die Proben mit Roti®Mount oder Mowiol/DABCO eingebettet (siehe VIII.5).

VIII.5 Einbetten der immunhistochemischen Präparate

Anschluss an die Färbungen werden die Präparate auf Objektträgern mittels Einbettmedium und Deckgläschen eingebettet, wodurch hochauflösende Mikroskopie ermöglicht wird.

VIII.5.1 Lösungen und Materialien zum Einbetten der Präparate

- Objektträger
- Deckgläschen
- Rundgeschmolzene Glas- Pasteurpipette
- Saugfähige Papiertücher
- Einbettmedium: Roti®Mount FluorCare (CarlRoth) oder Mowiol/DABCO

VIII.5.2 Methode des Einbettens der immunhistochemischen Präparate

Für das Einbetten der Präparate wurden die Tiere mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette samt 1 x PBS auf beschriftete Objektträger überführt. Das 1 x PBS wurde vorsichtig mit einem saugfähigen Papiertuch abgesaugt und direkt durch 2-3 Tropfen Roti®Mount FluorCare Einbettmedium oder Mowiol/DABCO ersetzt, um das Austrocknen der Tiere zu verhindern. Mittels Kanülen wurden die *Hydren* auf dem Objektträger angeordnet und ausgerichtet. Anschließend wurde ein Deckglas schräg auf dem Objektträger angesetzt und vorsichtig mit einer Kanüle, möglichst luftblasenfrei aufgelegt. Bevor die eingebetteten Präparate mikroskopiert werden können wurden diese nun abgedunkelt für mindestens 24 Stunden stehen gelassen, wodurch die Einbettmedien polymerisieren.

VIII.6 RBD-GFP Proteinextraktion (in Kooperation mit Prof. Dr. Robert Grosse)

Die Rho-Binde-Domäne (RBD) des Proteins Rhotekin, welches ausschließlich an die aktive Form der GTPase RhoA bindet, kann genutzt werden, um aktives RhoA nachzuweisen. Dazu wurde ein RBD-GFP- Konstrukt erzeugt. Dieses Fusionsprotein wird genutzt, um aktiviertes RhoA in fixiertem Gewebe detektieren zu können (Berger et al., 2009). In diesem Fall diente das Rhotekin aus Maus als Grundlage für das Fusionsprotein RBD-GFP. Für die Detektion des RBD-GFPs in fixiertem *Hydra*- Gewebe muss das Fusionsprotein zunächst prokaryontisch exprimiert und aufgereinigt werden, bevor es zur Detektion an fixierten Hydren verwendet werden kann.

VIII.6.1 Lösungen und Materialien zur RBD-GFP Proteinaufreinigung

- Allgemeine Laborausstattung
- LB- (engl. *lysogeny broth*) Nährmedium: 10g NaCl (Roth)
+5g Hefeextrakt (Roth)
+10g Pepton (Roth)
ad 1000 ml H₂O
- Ni-His-beads: Nickel-Agarose (Qiagen)
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG; 1M)
- Zentrifuge Sorvall Biofuge Stratos
- Amicon Ultra 15 *Centrifugat Filter Devices* zur Proteinaufkonzentration
- Dialyse-Schlauch (*Membra-Cel dialysis tubing*; SERVA)
- *Disposable Columns* (5 ml; Qiagen)
- Ultraschallstab von LKB BROMMA
- Entfärbelösung: Ethanol/Essigsäure/Wasser (Roth)
- Chemikalien und Lösungen für die Puffer sind alle von Roth
- Lyse-Puffer (Stammlösung): 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
+300 mM NaCl
+10 mM Imidazol (pH 8,0)
ad 100 ml H₂O

Zur Verwendung werden 19 ml Lyse-Puffer mit 1 ml Protease-Inhibitor (Roche) versetzt.

- Wasch-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
+300 mM NaCl
+20 mM Imidazol (pH 8,0)
ad 200 ml H₂O
- Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)
+300 mM NaCl
+250 mM Imidazol (pH 8,0)
ad 15 ml H₂O

- Dialyse-Puffer:
 - 25 mM Tris-HCl
 - +10 mM MgCl₂
 - +50 mM NaCl
 - +5 % Glycerol
 - +1 mM Dithiothreitol (DTT)
 - ad 3000 ml H₂O

VIII.6.2 Methode der RBD-GFP Proteinaufreinigung

Für die Detektion von aktivem RhoA mittels RBD-GFP Färbung wurde zunächst das His₁₀-tagged RBD-GFP Fusionsprotein exprimiert und anschließend nach dem Qiagen Protokoll zur Proteinaufreinigung aufbereitet. Dazu wurden 1 µg des RBD-GFP Fusionsprotein-Vektors (pET 2x His₁₀ GFP-RBD), beziehungsweise 1 µg des GFP-Vektors (pET 2x His₁₀ GFP) als Kontrolle in 100 µl *Escherichia coli* (BL21 kompetente *E. coli*) Bakterien transformiert (Vektorkarte Anhang 18). Dazu wurden die Proben zunächst 15 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie einen 30-sekündigen Hitzeschock bei 42°C erhielten. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten auf Eis inkubiert, wonach 200 µl SOC- (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) Medium hinzugegeben wurde und die Bakterien darin für 20 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler wuchsen. Nach der 20-minütigen Inkubation wurden jeweils 100 µl der Bakterien auf vorgewärmten LB (*Lysogeny broth*) Agar Ampicillin Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus den einzelnen Bakterienkolonien wurden am folgenden Tag Vorkulturen über Nacht in 50 ml LB Medium angesetzt. Diese Vorkultur wurde am folgenden Morgen 1:20 mit LB Medium auf ein totales Volumen von 1 Liter verdünnt und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD600 von 0,6 inkubiert, welches in der Regel 1 – 2 Stunden benötigt. Bei der entsprechenden OD600 erfolgte die Induktion mit 300 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 1 M), wobei die Temperatur für die Proteinexpression neu adjustiert werden muss (je nach Protein wird eine Temperatur zwischen 18°C und 37°C gewählt). Für das RBD-GFP beziehungsweise für die GFP-Kontrolle wurde eine Expressionsdauer von vier Stunden bei 30°C auf dem Schüttler gewählt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert und bei -80°C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Bakterienpellets (aus einem Liter Bakterienkultur) in 20 ml Lyse-Puffer resuspendiert und die Zellen wurden mittels Ultraschall (Sonikation) 3 x 20 Sekunden aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden anschließend bei 10.000 g für 30 Minuten abzentrifugiert, währenddessen man die Ni-His-beads (Nickel-Agarose) zweimal mit Lyse-Puffer wäscht. Nach dem Zentrifugieren wird das geklärte Lysat auf 1 ml der Ni-His-beads (Nickel-Agarose) überführt und für zwei Stunden abgedunkelt bei 4°C sanft unter ständiger Bewegung auf dem Schüttler inkubiert. Während der Inkubation werden *Disposable Columns* (5 ml; Qiagen) mit 5 ml Lyse-Puffer gewaschen, indem man diesen durch das Säulchen laufen lässt. Das an den Ni-His-beads gebundene Protein wird daraufhin

auf die Säulchen gegeben. Nachdem das Lysat durchgelaufen ist, ist das Protein an den Säulchen gebunden, die schrittweise mit 50 ml Wasch-Puffer gewaschen werden. Im Anschluss daran wird das *Disposable Columns* mit einem Stopfen verschlossen und 500 µl des Elutionspuffers werden für fünf Minuten auf das Säulchen gegeben. Daraufhin wird der Stopfen entfernt und der Durchfluss wird aufgefangen. Das *Disposable Columns* wird erneut mit einem Stopfen verschlossen und es werden wieder 500 µl Elutionspuffer für fünf Minuten auf das Säulchen gegeben und der Durchfluss wird wiederum aufgefangen. Dies wird solange wiederholt, bis die aufgrund des GFPs grün gefärbten Ni-His-beads vollständig entfärbt sind. Die Proben werden anschließend in einen Dialyse-Schlauch (Membra-Cel dialysis tubing; SERVA) gefüllt, wobei der Schlauch auf einer Seite fest verschlossen und zuvor mit Dialyse-Puffer befeuchtet werden muss. Die Schlauchöffnung wird mit einer Klemme verschlossen und mit Schwimmern in 3 Liter Dialyse-Puffer über Nacht bei 4°C leicht rührend gehängt. Am folgenden Tag kann das aufgereinigte Protein optional aufkonzentriert werden. Dazu wurden Amicon Ultra 15 *Centrifugat Filter Devices* mit H₂O gewaschen indem, H₂O auf die enthaltenen Säulchen gegeben wird und bei 5000 g durch die Säulchen zentrifugiert wird. Anschließend wird das aufgereinigte Protein aus dem Dialyse-Schlauch auf die Säulchen überführt und mit 5000 g abzentrifugiert, bis man 1,5 ml Durchfluss hat. Das aufgereinigte und aufkonzentrierte Protein wird auf 50-100 µl aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und stets dunkel bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

VIII.7 Detektion von aktiver RhoA-GTPase mittels RBD-GFP Fusionsproteins

VIII.7.1 Lösungen und Materialien der RBD-GFP Detektion

- Allgemeine Laborausstattung
- Paraformaldehyd (PFA): 4 % PFA in 1 x PBS oder HM
- Phosphate buffered saline (PBS): 0,01 M Natrium-Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl (bei einem pH- Wert von 7,4)
- PBTx: 1 x PBS + 0,25 % Triton X-100
- Triton X-100 (Sigma)
- Urethan (2 %) in HM; sterilfiltriert
- Blocklösung: 3 % BSA + 1 % *Normal Goat Serum* (NGS) + 0,1 M Glycin
- RBD-GFP (1:200 bis 1:500 in Blocklösung)

- Fluoreszenzfarbstoffe:
 - Phalloidin-TRITC (1:150 in PBTx) (Sigma)
 - DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1:5000 in 1x PBTx) (Sigma)
- Objektträger
- Deckgläschen
- Einbettmedium: Roti®Mount FluorCare (CarlRoth) oder Mowiol/DABCO

VIII.7.2 Methode der RBD-GFP Detektion

Wie für die immunhistochemische Antikörperfärbung beschrieben wurden zunächst Hydren fixiert (siehe VIII.3.2). Nach der Fixierung wurde das PFA am folgenden Tag abgenommen und 3 x 20 Minuten mit PBTx (1 x PBS + 0,25 % Triton X-100) ausgewaschen. Anschließend folgte ein Blockschritt, um unspezifische Bindestellen des RBD-GFPs abzublocken und so die Spezifität der Bindung zu erhöhen. Dazu wurden die Tiere für zwei Stunden in der Blocklösung (3 % + 1 % NGS + 0,1 M Glycin) auf dem Schüttler (50 rpm) inkubiert. Danach wurde die Blocklösung abgenommen und durch die RBD-GFP Färbelösung (1:250 bis 1:500 in Blocklösung) ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden darauf geachtet, dass alle Arbeitsschritte kühl und abgedunkelt durchgeführt wurden, wodurch sowohl ein Denaturieren, als auch ein Verblässen des RBD-GFPs verhindert werden soll. Die Tiere inkubierten über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler (50 rpm) in der RBD-GFP Färbelösung, welche am folgenden Tag abgenommen und durch 6 x 15 bis 20-minütiges Waschen mit PBTx weitestgehend vollständig entfernt wurde. Nach dem ersten PBTx- Waschschriffen wurden die Zellkerne indirekt mit DAPI (1:5000 in PBTx) für 10 Minuten gefärbt. Optional kann nach dem dritten Waschschriffen das F-Aktin durch Phalloidin-TRITC (1:150 in PBTx) für 60 Minuten angefärbt werden, bevor mit den PBTx- Waschschriffen fortgesetzt wurde. Im Anschluss an die PBTx- Waschschriffen wurde 6 x 15-20 Minuten mit 1 x PBS gewaschen (der letzte Waschschriffen kann über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler (50 rpm) stattfinden), bevor die *Hydren* mit Roti®Mount FluorCare Einbettmedium oder Mowiol/DABCO eingebettet wurden (siehe VIII.5).

VIII.7.3 RBD-GFP Detektion nach einer Inhibition mit Rhosin

Um eine Aussage über die Bindungsfähigkeit des RBD-GFPs an die Rho- GTPasen in *Hydra* (Hv_Rho1 – Hv_Rho4) treffen zu können wurden knospentragende Hydren mit dem Inhibitor Rhosin behandelt. Rhosin ist ein spezifischer Inhibitor der kleinen GTPase RhoA, indem deren Aktivität verhindert wird (Informationen zu den Inhibitoren im Anhang 24).

VIII.7.3.1 Lösungen und Materialien der RBD-GFP Detektion nach einer Inhibition mit Rhosin

- Für die generellen Materialien der RBD-GFP Detektion siehe VIII.7.2
- 24-well Gewebekulturplattenplatten
- Dimethylsulfat (DMSO): je Ansatz in einer Konzentration von 0,1%
- Inhibitor Rhosin: Calbiochem; Lot Nummer: D00173196
- Volvic - natürliches Mineralwasser

VIII.7.3.2 Methode der RBD-GFP Detektion nach einer Inhibition mit Rhosin

Zunächst wurden Hydren, die eine junge Knospe trugen (Knospenstadium 3-5) in 24-well Platten überführt und in Volvic gehalten. Das Volvic wurde vollständig abgenommen und durch jeweils 2 ml des Rhosin- Inhibitionsansatzes (100 μ M + 0,1 % ATP) ersetzt. Darin inkubierten die Tiere für 1 h, 6 h und 24 h abgedunkelt bei 18°C, bevor sie wie beschrieben fixiert und mittels RBD-GFP gefärbt wurden (VIII.3.2 und VIII.7.2). Als Kontrolle diente das Lösungsmittels DMSO, indem der Inhibitor Rhosin gelöst wurde. DMSO wurde dabei mit einer Konzentration von 0,1 % verwendet, was den Anteil des Lösungsmittels im Rhosin-Inhibitionsansatzes entspricht.

VIII.7.4 RBD-GFP Detektion an regenerierenden Hydren

Um eine Aussage über die mögliche Beteiligung der Rho- GTPasen in *Hydra* (Hv_Rho1 – Hv_Rho4) treffen zu können wurden RBD-GFP- Färbungen an regenerierenden Hydren durchgeführt, die horizontal halbiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und gefärbt wurden.

VIII.7.4.1 Materialien der RBD-GFP Detektion an regenerierenden Hydren

- Für die generellen Materialien der RBD-GFP Detektion siehe VIII.7.2
- 24-well Gewebekulturplattenplatten
- Kanülen zum Einschneiden der Hydren

VIII.7.4.2 Methode der RBD-GFP Detektion an regenerierenden Hydren

Um einen möglichen Einfluss der aktiven Rho- GTPasen an dem Prozess der Regeneration zu untersuchen wurden Hydren zunächst horizontal bei einer Körperhöhe von 50 % mit einer Kanüle halbiert. Unmittelbar nach dem Einschnitt sowie 1h, 2h, 3h, 6h, 8h, 14h, 20h, 24h, 30h, 40h und 48h nach dem Einschnitt wurden alle Hydren zeitlich fixiert und mittels RBD-GFP, Phalloidin-TRITC und DAPI gefärbt (VIII.7.2).

VIII.8 Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges (publiziert in Holz, Apel et al., 2017)

Inhibitoren dienen in der Biologie als Hemmstoffe, indem meist die biochemische Enzymreaktion inhibiert oder verzögert wird. Die Inhibition des Rho-ROCK- Myosin II- Signalweges, *downstream* des FGF- Rezeptors, soll Einsichten über einen möglichen Zusammenhang des Signalweges bezüglich des Knospungsprozesses in *Hydra* liefern (Holz et al., 2017). Basierend auf Daten meiner Masterarbeit wurden für die Publikation Holz et al., 2017 im Rahmen dieser Arbeit ergänzende Inhibitionen und Phalloidin-TRITC- Färbungen an *Hydren* mit jungen Knospen (Knospenstadium 3-5) durchgeführt.

VIII.8.1 Lösungen und Materialien der Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges

- Volvic - natürliches Mineralwasser
 - 6-*well* Gewebekulturplattenplatten
 - Adenosintriphosphat (ATP; Stammlösung 1 M): je Ansatz wurden 1 mM eingesetzt
 - Dimethylsulfat (DMSO): je Ansatz in einer Konzentration von 0,1 %
 - Inhibitor Rhosin: Calbiochem; Lot Nummer: D00173196
 - Inhibitor Rockout: SIGMA; Lot Nummer: SLBM5499V
 - Inhibitor Blebbistatin: Calbiochem; Lot Nummer: B00145119
- ➔ Detaillierte Informationen der verwendeten Inhibitoren sind dem Anhang (Anhang 24) zu entnehmen.

VIII.8.2 Methode der Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges

Zur Inhibition des Rho-ROCK-Myosin II- Signalweges während des Knospungsprozesses wurden jeweils 10 *Hydren* mit jungen Knospen (Knospenstadium 3-5) in 6-*well* Platten überführt. Das HM wurde vollständig abgenommen und durch die jeweilige Inhibitor- Lösung ersetzt. In allen Ansätzen der Inhibitionen betrug der Anteil des ATPs 0,1 % und des Lösungsmittels DMSO ebenfalls 0,1 %.

- **Rhosin:** 100 μ M Rhosin + 0,1 % ATP; für eine Inkubationsdauer von 48 Stunden.
- **Rockout:** 50 μ M und 100 μ M Rockout + 0,1 % ATP; für eine Inkubationsdauer von 48 Stunden.
- **Blebbistatin:** 2,5 μ M Blebbistatin + 0,1 % ATP; für eine Inkubationsdauer von 48 Stunden.

- ➔ Nach der 48 stündigen Inkubation wurden die Inhibitoren vollständig entfernt und mehrmals mit Volvic ausgewaschen. Die Hydren erholten sich für 3 Tage von der Inkubation, bevor sie Phalloidin- und DAPI- gefärbt wurden.

Neben den Inhibitoren wurden vier Kontrollansätze parallel angesetzt. Kontrollansatz 1: Volvic pur; Kontrollansatz 2: Volvic + DMOS (0,1 %); Kontrollansatz 3: Volvic + ATP (0,1 %); Kontrollansatz 4: Volvic + ATP (0,1 %) + DMSO (0,1 %).

VIII.9 *In-situ*-Hybridisierung (ISH)

Die *in-situ*-Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode, mit der Ribonukleinsäure (RNS; RNA) oder Desoxyribonukleinsäure (DNS; DNA) im Gewebe, *in-situ* (lat. *in-situ* „am Ort“), mittels einer Sonde nachgewiesen wird. Dies geschieht indem die markierte Sonde mit der nachzuweisenden Nukleinsäure hybridisiert und anschließend detektiert wird.

Für die *in-situ*-Hybridisierung von *hv_rho4* musste zunächst eine spezifische Sonde hergestellt werden (siehe VIII.9.2.1). Die Sonden für *hv_rho1*, *hv_rho2* und *hv_rho3* sind im Rahmen meiner Masterarbeit im Rahmen der Publikation Holz, Apel et al., 2017 entstanden. Für die *Insert*-PCR wurden folgende Primer verwendet:

- *Hv_Rho1* forward: ATTGTTGGTGATGGTGCTTGTGG
- *Hv_Rho1* reverse: GCAGCTCTAGTTGCAGTTTCAAATACC
- *Hv_Rho2* forward: GCAATTCGCAAGAAATTAGTC
- *Hv_Rho2* reverse: GCCATCTCACGACCTTGTTCAATC
- *Hv_Rho3* forward: GAAATCATCAGAGAGAAGCCC
- *Hv_Rho3* reverse: TGATATCTTCGAGGTCACGCT
- *Hv_Rho4* forward: CTCGAGGTGATAGAAACAGAATCAAAGAGCAACCC
- *Hv_Rho4* reverse GAATTCCGATTATATATAAGCACAATGACTTATTTTTTTTCTC

Die amplifizierte cDNA- Fragmente wurden mittels AT- Klonierung in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) (Anhang 17) eingebracht. Die Promotoren für die *anti-sense* Transkription waren T7 oder SP6, abhängig von der Orientierung der *blunt-end* klonierten cDNA.

VIII.9.1 Lösungen und Materialien der *in-situ*-Hybridisierung

- Anti-Digoxigenin-Antikörper (anti-Dig-AK-AP): Zur Präabsorption werden circa 20 fixierte *Hydren* mit 0,5 ml des 1:400 verdünnten anti-Dig-AK-AP in Blocklösung über Nacht bei 4°C bei 50 rpm geschüttelt. Der anti-Dig-Antikörper wird auf die Endkonzentration (1:2000) verdünnt und zur stabilen Lagerung mit 0,01 % Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert.

- Blocklösung: 80 % MAB-B + 20 % Schafserum (Sigma). Das Schafserum wurde vor der Benutzung in MAB-B für 30 Minuten bei 55°C hitze-inaktiviert, aliquotiert und anschließend bei -20°C gelagert. Die angesetzte Blocklösung wird bei -20°C gelagert.
- CHAPS (Sigma): 10 % CHAPS in DEPC-H₂O. Lagerung bei -20°C.
- Denhardt's (50 x): 1 % Polyvinylpyrrolidon + 1 % Ficoll (Sigma) + 1 % BSA Fraktion V (Serva) in DEPC-H₂O. Die angesetzte Lösung wird steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.
- Essigsäureanhydrid (Sigma): Lagerung bei Raumtemperatur (RT). Vorsicht giftig!
- Färbelösung: Zur NBT/BCIP (Roche) Stammlösung: 20 µl/ml Färbepuffer. Lagerung bei 4°C.
- Formamid (Roth): Zur Deionisierung wurde ein Liter mit einem Teelöffel (circa 7,5 g) Amberlite über Nacht inkubiert und darauf folgend in 50 ml Falcons aliquotiert. Langfristige Lagerung bei -20°C; kurzfristige Lagerung bei 4°C möglich.
- Glycin (Roth oder Merck): Zur Glycin-Stammlösung: 40 mg/ml Glycin in DEPC-H₂O lösen und anschließend steril filtrieren. Lagerung bei 4°C.
- Heparin (Sigma oder Serva): 10 mg/ml in DEPC-H₂O lösen und anschließend steril filtrieren. Lagerung bei -20°C.
- Hybridisierungslösung (beispielhaft für einen 10 ml Ansatz):

Tabelle 5: Ansatz der Hybridisierungslösung für die *in-situ*-Hybridisierung (beispielhaft für einen 10 ml Ansatz).

Endkonzentration der Lösung	Konzentration der Stammlösung	Benötigtes Volumen (ml)
50 % Formamid	100 %	5
5 x SSC	20 x	2,5
200 µg/ml Torula RNA	10 mg/ml	0,125
0,1 % Tween 20	10 %	0,1
0,1 % CHAPS	10 %	0,1
1 x Denhardt's	50 x	0,2
100 µg/ml Heparin	10 mg/ml	0,1
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC/ H ₂ O	1,875

- Reduzierte Hybridisierungslösung: Hybridisierungslösung ohne Torula RNA, Heparin und Denhardt's
- Maleic Acid Buffer - MAB (Sigma): 100 mM Maleinsäure + 150 mM NaCl. Der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Anschließend autoklavieren und bei RT lagern.
- MAB-B: MAB + 1 % BSA Fraktion V (Sigma). Lagerung maximal 1 Woche bei 4°C.
- NTMT (Färbepuffer): 100 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 9,5), 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20. Die einzelnen Lösungen werden autoklaviert und bei RT gelagert. NTM wird frisch angesetzt und Tween 20 wird vor dem Gebrauch frisch hinzugegeben.

- Paraformaldehyd (PFA): Für die 4 % Fixierungslösung werden zunächst 20 ml Hydramedium in einem Falcon erhitzt, bevor 1 g Paraformaldehyd (PFA) dazugegeben und gemischt wird. Zum vollständigen Lösen im Wasserbad (nicht in der Mikrowelle, da korrosiv!) erhitzen. Nachdem sich das PFA vollständig gelöst hat, wird mit Hydramedium auf 25 ml aufgefüllt. Lagerung maximal eine Woche bei 4°C.
- Proteinase K (Sigma oder Roche): Zur Stammlösung: 10 mg/ml Proteinase K werden in DEPC-H₂O gelöst. Frisch ansetzen.
- PBS (10 x): 1,5 M NaCl + 0,8 M Na₂HPO₄ + 0,02 M NaH₂PO₄-H₂O mit MilliQ-H₂O auf 1 Liter auffüllen und auf einen pH-Wert von 7,4 einstellen. Zu der Lösung wird über Nacht 400 µl DEPC (100 %) hinzugegeben und anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.
- PBTx: PBS + 0,1 % Tween 20.
- SSC (20 x): 3 M NaCl + 0,3 M NaCitrat mit einem pH-Wert von 7,0. Zu der Lösung wird über Nacht 0,1 % DEPC hinzugegeben und anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.
- Tetramisol (Sigma): 1 M Tetramisol entspricht 6 mg/25 µl. Lagerung bei -20°C.
- Triethanolamin (Sigma oder Roche): 0,1 M Triethanolamin mit einem pH-Wert von 7,8. Vor Gebrauch steril filtrieren. Frisch ansetzen.
- Torula RNA (Sigma): 10 mg/ml Torula RNA in DEPC-H₂O lösen und danach aliquotieren. Lagerung bei -20°C.
- Tween 20 (Sigma): 10 % Tween 20 in DEPC-H₂O lösen. Lagerung bei 4°C.
- Urethan (2 %) in HM; sterilfiltriert; Lagerung bei RT
- 24-well Gewebekulturplattenplatten
- Euparal (CarlRoth)
- Objektträger
- Deckgläschen
- 20-50 g Bleigewichte

VIII.9.2 Methode der *in-situ*-Hybridisierung

Die Methode der *in-situ*-Hybridisierung dient dem Nachweis von mRNA, welche an unterschiedlichen Orten und/oder Zeiten im Tier exprimiert wird, mittels markierter antisense-RNA. Bei der *In-situ*-Hybridisierung an intakten Tieren oder Embryonen spricht man auch von der *whole-mount-in-situ*-Hybridisierung (Müller und Hassel, 2018).

VIII.9.2.1 Synthese der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Zur Sondensynthese von *hv_rho4* wurde zunächst eine *Insert*-PCR durchgeführt, wodurch die linearisierte *hv_rho4* DNA isoliert wurde. Als Template dienten Plasmidpräparationen der

zuvor in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) (Anhang 17) klonierten *hv_rho*- Sequenzen. Auf RNase freies Arbeiten ist während der Sondensynthese zu achten.

Tabelle 6: Komponenten der *Insert-PCR* zur Sondensynthese.

Reagenzien	Volumen (μ l)
Steriles Wasser	12,3
10x PCR Puffer	2
MgCl ₂ (25 mM)	2
T7; Forward Primer (10 pmol)	1
SP6; Reverse Primer (10 pmol)	1
dNTPs (2 mM)	0,5
Template - Plasmid-DNA (1:100)	1
Taq- Polymerase	0,2

Die *Insert-PCR* wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Tabelle 7: PCR-Programm der *Insert-PCR* zur Sondensynthese.

Schritt	Dauer (min)	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zyklen
Denaturierung	1	96	30
Anlagerung	1	50	
Elongation	1	72	
Finale Elongation	10	72	1
Lagerung	∞	4	

Anschließend an die *Insert-PCR* folgte die Transkriptionsreaktion, bei der die DNA in mRNA transkribiert wird. Dazu wurden folgende Komponenten, falls nicht speziell angegeben, bei Raumtemperatur pipettiert:

Tabelle 8: Ansatz der Sondensynthese.

Reagenzien	Volumen (μ l)
DEPC Wasser	6
10 x Transkriptionspuffer (37 $^{\circ}$ C)	1
10 x <i>Dig Labelling Mix</i>	1
Linearisierte DNA	1
T7/SP6 Polymerase (20 U/ μ l)	1

Der 10 x Transkriptionspuffer wurde auf 37 $^{\circ}$ C erwärmt, damit sich die Bestandteile des Puffers lösen. Anschließend wurden die Komponenten auf Eis zusammen pipettiert. Der *Dig Labelling Mix* enthält Digoxigenen-markiertes UTP, wodurch die spätere Detektion der Sonden durch einen an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper ermöglicht wird. Zur Erzeugung einer *sense*- und einer *antisense*- Sonde wurden die Transkriptionsreaktionen jeweils mit der T7- oder der SP6- Polymerase durchgeführt.

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für drei Stunden bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde die Sonde mit 1,25 µl 4 M LiCl und 38 µl 100 % Ethanol (-20°C) bei -20°C für zwei Stunden gefällt. Daraufhin wurde 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde folgend mit 75 % Ethanol (in DEPC Wasser; -20°C) gewaschen und nochmals bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl DEPC Wasser (55°C) resuspendiert. Die Sonde wurde zur Verwendung in 3 x 5 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

VIII.9.2.2 Fixierung der Lagerung von *Hydra vulgaris*

Bevor *Hydra vulgaris* für die *in-situ*-Hybridisierung fixiert werden kann, müssen diese für mindestens 24 Stunden ungefüttert bleiben. Dadurch kann eine unspezifische Hintergrundfärbung des Gewebes reduziert werden, da die dafür verantwortlichen alkalischen Phosphatasen in den endodermalen Epithelzellen verringert werden. Um Verletzungen zu vermeiden wurde *Hydra* mit einer abgeschmolzenen Pasteurpipette abgesammelt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Hydren wie bereits beschrieben fixiert (VIII.3.2). Am folgenden Tag wurde das PFA vollständig abgesaugt und durch -20°C kaltes Methanol (100 %) ersetzt. Folgend wurde das Methanol mehrmals alle fünf Minuten durch frisches kaltes Methanol ausgetauscht. Die fixierten *Hydren* wurden bei -20°C für mindestens 24 Stunden in Methanol gelagert (die Tiere können in Methanol bei -20°C mehrere Jahre gelagert werden).

VIII.9.2.3 Die Rehydrierung des Gewebes

Für die *in-situ*-Hybridisierung müssen die in Methanol gelagerten *Hydren* rehydriert werden. Die Waschschriffe zur Rehydrierung des Gewebes wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (50 rpm) durchgeführt. Das Methanol wurde zunächst vollständig abgenommen und durch Ethanol (100 %) für bis zu 30 Minuten ersetzt, bis sich die Tiere entfärbten und klar wurden. Anschließend folgten 3 x 5-minütige Waschschriffe in einer abfallenden Ethanol-PBTx Waschsreihe (75 % Ethanol + 25 % 1x PBTx; 50 % Ethanol + 50 % 1x PBTx; 25 % Ethanol + 75 % 1x PBTx). Darauf folgend wurden die *Hydren* 3 x 5 Minuten in 1x PBTx gewaschen.

VIII.9.2.4 Behandlung mit Proteinase K zur Penetration des Gewebes

Damit die RNA- Sonde in das Gewebe gelangen kann muss die Penetration durch einen partiellen Verdau des fixierten Gewebes mit einer Behandlung mit Proteinase K erleichtert werden. Eine Proteinase K- Stammlösung (10 mg/ml) wurde dazu frisch in DEPC- H₂O angesetzt. *Hydra vulgaris* AEP wurde exakt für 15 Minuten in 1 ml einer Proteinase K- Gebrauchslösung (10 µg/ml / 1x PBTx) inkubiert. Um den partiellen Verdau des Gewebes

durch die Enzymaktivität der Proteinase K zu stoppen, wurden 100 µl einer Glycin-Stammlösung (40 mg/ml) zu den Proben hinzugegeben und die Tiere wurden darin für 10 Minuten inkubiert. Darauf folgend wurden die *Hydren* zweimal für 5 Minuten mit 1x PBTx gewaschen.

VIII.9.2.5 Behandlung mit Essigsäure-Anhydrid

Um die Hintergrundfärbung des Gewebes zu reduzieren und um das Signal der Sonde zu verstärken wurde eine Behandlung mit Essigsäure-Anhydrid durchgeführt. Dafür wurden die *Hydren* für fünf Minuten mit 1 ml 0,1 M Triethanolamin (pH 7,8) inkubiert. Währenddessen wurden 10 ml Triethanolamin mit 25 µl Essigsäureanhydrid (2,5 µl/ml) gemischt, womit die Tiere anschließend zweimal für fünf Minuten auf dem Schüttler bei 50 rpm gewaschen wurden. Im Anschluss daran wurde die Triethanolamin-Essigsäureanhydrid-Lösung weitestgehend vollständig abgenommen und die Tiere wurden 2 x 5 Minuten in 1x PBTx gewaschen.

VIII.9.2.6 Nachfixierung des Gewebes mit Paraformaldehyd

Das Gewebe der *Hydra* muss während der *in-situ*-Hybridisierung nachfixiert werden. Dazu wurde das 1x PBTx vollständig abgenommen und durch 1 ml Paraformaldehyd (4 %) ersetzt, worin die *Hydren* 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler bei 50 rpm inkubierten. Dadurch wird das zuvor anverdaute Gewebe wieder fixiert. Nach der 20-minütigen Inkubation mit Paraformaldehyd musste dieses wieder vollständig entfernt werden, bevor 5 x 5 Minuten mit PBTx gewaschen wurde.

VIII.9.2.7 Hitzebehandlung der *Hydren*

Um eine Hintergrundfärbung zu reduzieren wurde die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatasen gestoppt. Dazu wurden die Tiere in 1x PBTx/EDTA (5 mM) für 10 Minuten bei 85°C inkubiert. Das EDTA dient dabei als Komplexbildner, welches zweiwertige Ionen bindet, welche den alkalischen Phosphatasen als Kofaktor dienen und so für die deren Aktivität notwendig sind. Anschließend an die 10-minütige Inkubation ließ man die Tiere auf RT abkühlen.

VIII.9.2.8 Prä- Hybridisierung und Hybridisierung der *Hydren*

Anschließend an die Hitzebehandlung wurden die *Hydren* in frisch angesetzter Prähybridisierungslösung für mindestens 2 Stunden im Wasserbad bei 55°C inkubiert. Darauf folgend wurde die RNA- Sonde mit Prähybridisierungslösung auf die entsprechende Sondenkonzentration verdünnt (Verdünnung der RNA- Sonden mit Prähybridisierungslösung: *hv_rho1* 1:500; *hv_rho2* 1:250; *hv_rho3* 1:100; *hv_rho4* 1:100) und exakt für eine Minute aufgekocht, was dem Auflösen von Sekundärstrukturen dient. Nach dem Aufkochen der Sonde wurde diese direkt auf Eis gestellt. Die

Prähybridisierungslösung wurde danach von den *Hydren* vollständig abgenommen und durch die Hybridisierungslösung ersetzt, worin die Tiere mindestens über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubierten. Die Dauer der Inkubation ist abhängig von der Qualität der RNA-Sonde wodurch sie über das Wochenende ausgedehnt werden kann.

VIII.9.2.9 Stringentes Auswaschen der überschüssigen Sonde

Um die Spezifität des Signals zu erhöhen, ist es notwendig die überschüssige Sonde aus dem Gewebe auszuwaschen. Dazu wurde die Hybridisierungslösung zunächst weitestgehend vollständig abgenommen (kann bei -20°C gelagert und mehrmals verwendet werden). Die folgenden Waschschrte werden mit vorgewärmten Waschlösungen (55°C) durchgeführt, weswegen rasch gearbeitet werden musste, um ein Auskühlen der Waschlösungen zu vermeiden. Als erstes wurde mit vorgewärmter, reduzierter Hybridisierungslösung (50 % in 2x SSC; 55°C) für 15 Minuten gewaschen, bevor die Tiere zweimal je 30 Minuten mit vorgewärmter (55°C) 2x SSC + 0,1 % CHAPS- Waschlösung gewaschen wurden.

VIII.9.2.10 Inkubation mit dem α - Digoxigenin Antikörpers

Die hergestellten RNA- Sonden sind mit Digoxigenin markiert, welches durch einen anti-Digoxigenin Antikörper erkannt und gebunden werden kann. An diesen Antikörper sind alkalische Phosphatasen gekoppelt, wodurch eine Farbreaktion katalysiert wird, welche es ermöglicht die RNA zu detektieren, gegen die die Sonde gerichtet ist. Um unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen, ist es notwendig, dass der anti-Digoxigenin Antikörper vor der Verwendung mit einigen Tieren (circa 15 *Hydren*) präabsorbiert wird. Nach dem Waschen mit 2x SSC + 0,1 % CHAPS, wurde dieses durch MAB (Maleinsäurepuffer) ersetzt, womit zweimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen wurde. Anschließend wurde MAB zunächst vollständig abgenommen, bevor mit MAB-B (MAB + 1 % BSA) für 60 Minuten äquilibriert wurde. Um die Spezifität der Bindung des anti-Digoxigenin Antikörpers an die markierte RNA-Sonde zu verbessern ist es nötig unspezifische Bindestellen zu blockieren. Dazu wurden die Proben mit der Blocklösung für mindestens 2 Stunden (auch über Nacht bei 4°C möglich) bei RT inkubiert. Darauf folgend wurde die Blocklösung vollständig abgenommen und durch 1 ml präabsorbierten Antikörper (1:2000) ersetzt. Darin inkubierten die *Hydren* über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler.

VIII.9.2.11 Auswaschen des überschüssigen Antikörpers und anschließender Färbereaktion

Am folgenden Tag wurden die Tiere 5 Minuten, 10 Minuten, 30 Minuten und 5 x 60 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 1 ml MAB gewaschen. Nach den Waschschrten wurden die Tiere in frischen MAB über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die

Hydren 2 x 5 Minuten mit frisch angesetztem NTMT gewaschen. Anschließend wurden die Tiere für 10 Minuten mit NTMT + 1 µl Tetramisol (Endkonzentration 1 mM) gewaschen. Daraufhin wurde die NTMT + 1 µl Tetramisol- Waschlösung vollständig abgenommen und durch 500 µl Färbelösung ersetzt. Darin inkubierten die Tiere im Dunkeln bei Raumtemperatur und der Status der Farbreaktion wurde alle fünf Minuten mittels Binokular überprüft. Wenn nach ungefähr 30 Minuten keine Farbreaktion erkennbar ist, kann die Inkubation bei 37°C fortgesetzt werden. Wenn die Intensität der Farbreaktion den gewünschten Grad erreicht hat und sich das Signal der *antisense*- Sonde von der *sense*-Sonde (Kontrolle) deutlich unterscheidet, wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 70 % Ethanol gestoppt. Darin inkubierten die Tiere fünf Minuten, bevor das 70 % Ethanol durch 100 % Ethanol ersetzt wurde, worin die *Hydren* 20 Minuten gewaschen wurden, wodurch schwache Hintergrundfärbungen des Gewebes ausgewaschen werden können.

VIII.9.2.12 Einbetten der ISH Präparate

Mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette wurden die *Hydren*, samt 100 % Ethanol aus den 24-well Platten auf beschriftete Objektträger vorsichtig überführt. Mittels einer Kanüle können die Tiere auf dem Objektträger verteilt und angeordnet werden, um ein Überlagern der Präparate zu verhindern. Das Ethanol auf dem Objektträger wurde anschließend mit einer Pipette möglichst vollständig abgesaugt, bevor 1-2 Tropfen Euparal auf die Präparate gegeben wurde. Anschließend wurde vorsichtig ein Deckglas vorsichtig auf die *Hydren* aufgelegt, um eine Blasenbildung möglichst zu verhindern. Das Euparal ließ man nun circa 30 Minuten auspolymerisieren, bevor ein Gewicht (20-50 g) mittig auf dem Deckglas positioniert wurde. Dadurch werden die Präparate flach gedrückt, was die Bildgebung der Mikroskopie verbessert.

VIII.10 Klonierung der PtdInsP-GFP- Sensoren

Zur Erzeugung von PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor- und PtdIns(3,4,5)P₃-GFP-Sensor transgener *Hydra vulgaris* AEP wurden freundlicherweise PtdInsP-GFP- Sensoren von Herrn Prof. Dr. Dominik Oliver (Neurophysiologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

VIII.10.1 Methoden der PtdIns-GFP- Sensor Klonierung

Die Vertebraten- spezifischen Sensoren (Tab. 9) müssen für die Erzeugung von transgenen *Hydra*-Linien zunächst in einen *Hydra*- spezifische Expressionsvektor (LigAF; Wittlieb et al., 2006; Anhang 13) umkloniert werden.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten PtdInsP-GFP- Sensorkonstrukte.

Sensor-Nummer	Bezeichnung des Sensors	Vertebraten-Sensor	Mutation	Bindung an PtdIns
#59	PLC δ_1 -PH-GFP	pEGFP; Kan ^R	/	PtdIns(4,5)P ₂
#60	PLC δ_1 -PH-GFP	pEGFP; Kan ^R	Aminosäureaustausch: <ul style="list-style-type: none"> • an Position 34 (Serin (S) zu Phenylalanin (F)) • an Position 40 (Arginin (R) zu Leucin (L)) 	Kontrolle zu PtdIns(4,5)P ₂
#63	BTK-PH-GFP	pEGFP; Kan ^R	/	PtdIns(3,4,5)P ₃
#64	BTK-PH-GFP	pEGFP; Kan ^R	Aminosäureaustausch: <ul style="list-style-type: none"> • an Position 28 (Arginin (R) zu Cystein (C)) 	Kontrolle zu PtdIns(3,4,5)P ₃

VIII.10.2 PtdInsP-GFP- Sensor Primer und DNA- Konstrukte

Alle verwendeten Primer (von der Firma Sigma synthetisiert) wurden als Stammlösung (100 μ Mol/l) bei -20°C gelagert. Für die Klonierung wurden 10 μ Mol/l Gebrauchslösungen der Primer angesetzt, welche ebenfalls bei -20°C gelagert und jeweils frisch für den Gebrauch aufgetaut wurden.

Tabelle 10: Verwendeten Primer der PtdInsP-GFP- Sensorkonstrukte. T_m (*melting temperature*): Schmelztemperatur der Primer. Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind farblich hervorgehoben.

Primername	Sequenz (5´-3´)	Restriktions-enzyme	T _m
#59_#60_for	TT CCTGCAGG ATGGACTCGGGGCCGG	SdaI	82,4°C
#59_#60_rev	ACCGGT GGATCCTTCAGGAAGTTCTTGCAG	BshTI	77,5°C
#63_#64_for	TT CCTGCAGG ATGGCCGCAGTGATTCTGGAG	SdaI	83,3°C
#63_#64_rev	ACCGGT AACGGTTTTAAGCTTCCATTCCTGTTCTCC	BshTI	70,7°C

Um zu verhindern, dass man eine doppelte Proteincodierende Sequenz des GFPs erhält, wurden die Primer so gewählt, dass man im finalen Konstrukt nur die GFP codierende Sequenz des LigAF- Expressionsvektors hat. Das bedeutet, dass die *reverse* Primer für die Sensoren vor der GFP codierenden Sequenz des Vertebraten- spezifischen pEGFP- Vektors (Anhang 14-16) von Herrn Prof. Dr. Dominik Oliver platziert wurden (Abb. 73). Mit den durch die Primer hinzugefügten Restriktionsschnittstellen erhält man eine Konstruktgröße von 531 Basenpaaren (bp) für die Sensoren #59 und #60 und eine Konstruktgröße von 549 bp für die Sensoren #63 und #64.

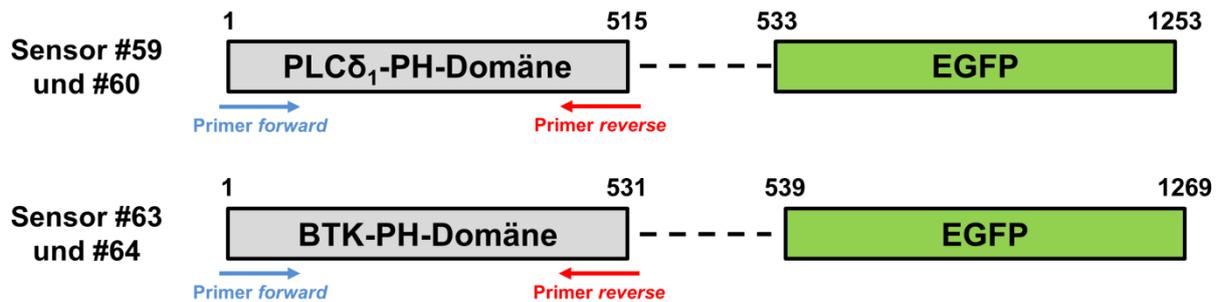


Abbildung 73: Grafische Darstellung der PtdInsP-GFP- Sensorkonstrukte und der Primerpositionen für die Sensoren #59, #60, #63 und #64. Durch die Primer werden die PH-Domänen der Sensoren ohne das GFP des pEGFP- Vektors synthetisiert. Die Größe der Konstrukte ist in bp angegeben.

VIII.10.3 Klonierungsstrategie

Um die PtdInsP-GFP- Sensoren in den *Hydra*- spezifischen LigAF- Expressionsvektor klonieren zu können, wurde eine Zwischenklonierung in den pJET1.2/blunt- Vektor gewählt (Anhang 12) (Abb. 74). Dazu wurden auf die Sensoren von Herrn Prof. Dr. Dominik Oliver zunächst mit der *proof-reading Polymerase* Q5 und den spezifisch designten Primern, welche die Restriktionsschnittstellen des LigAF- Expressionsvektors enthalten, eine *Insert-PCR* durchgeführt (Abb. 74; ①) (siehe VIII.10.5.2). Anschließend erfolgte die Ligation (siehe VIII.10.7.2) der Sensoren in den pJET1.2/blunt- Vektor von ThermoScientific in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dominik Oliver (Abb. 74; ②). Nach der Ligation des Konstrukts in den pJET1.2/blunt- Vektor erfolgte die Transformation (siehe VIII.10.8.2) in chemokompetenter *Escherichia coli* DH5 α Bakterien (siehe VIII.10.4.2) und das anschließende Ausplattieren auf LB-Amp-Agarplatten. Von diesen Platten wurden einzelne Kolonien gepickt, über Nacht wachsen lassen und nach der Plasmidpräparation mit den gewählten Restriktionsenzymen (SdaI und BshTI) enzymatisch verdaut (Abb. 74; ④) (siehe VIII.10.9.2 und VIII.10.10.2). Um sicher gehen zu können, dass das Konstrukt keine Sequenzfehler aufweist wurde der Restriktionsverdau per Sequenzierung analysiert (Abb. 74; ③) (siehe VIII.10.11.2). Parallel dazu wurde der LigAF- Expressionsvektor ebenfalls mit den Restriktionsenzymen SdaI und BshTI verdaut, um ihn für die PtdInsP- Sensoren zu öffnen (Abb. 74; ④). Bei fehlerfreien Sequenzen erfolgte anschließend die Ligation in den LigAF- Expressionsvektor (Abb. 74; ⑤). und die Transformation in *E. coli* DH5 α Bakterien. Die korrekte Ligation und Transformation wurde erneut durch Sequenzierung der Restriktionsverdau überprüft (Abb. 74; ⑥). Final erfolgte die Sicherung der Klone durch Glycerin-Bakterien-Stammkulturen und der Konstrukte durch Maxi-Präparation der Plasmide, welche dann zur Erzeugung von PtdInsP-GFP- Sensor transgenen *Hydra*-Linien nach Kiel zur *Transgenic Hydra Facility* versendet wurden (Abb. 74; ⑦).

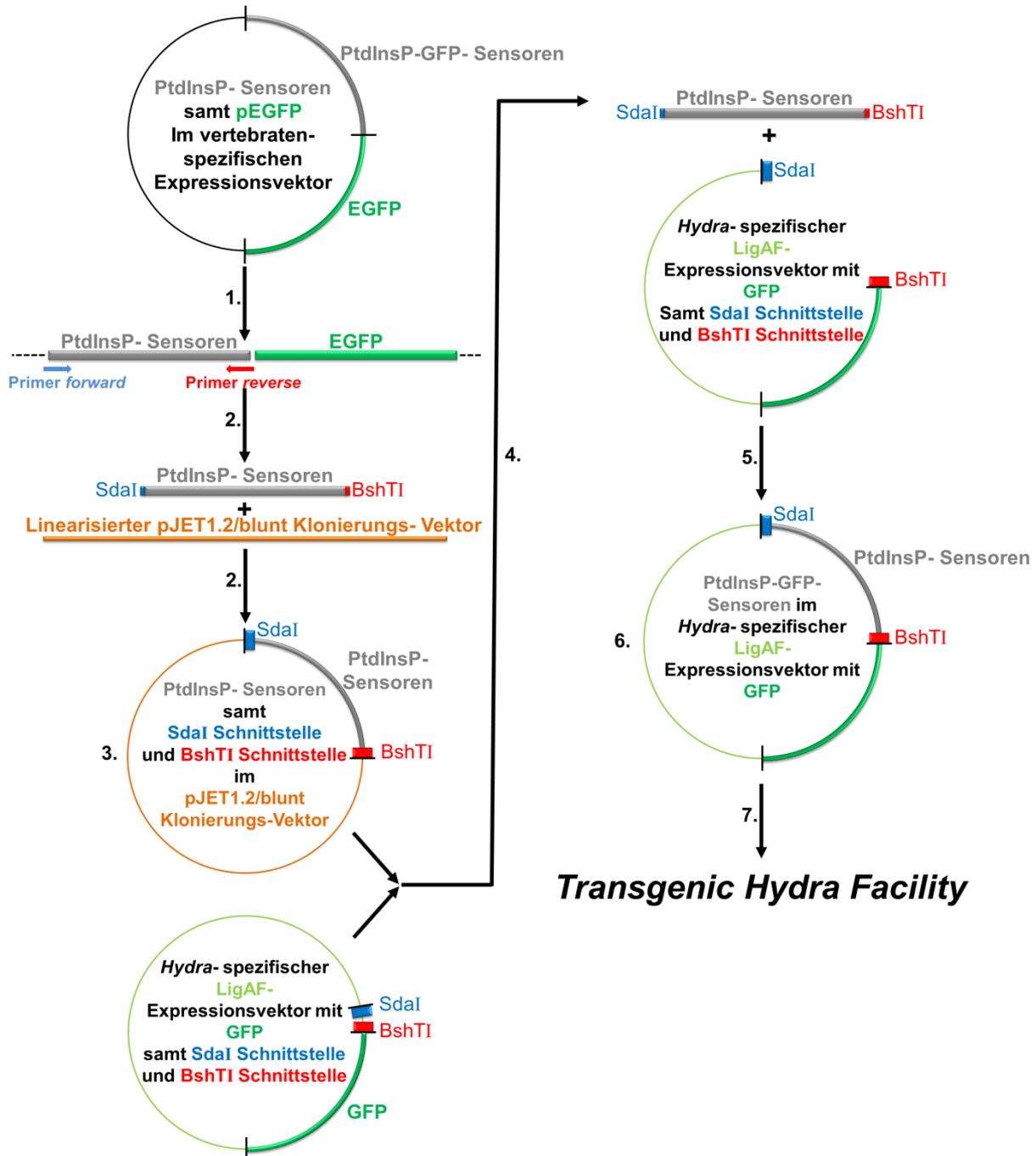


Abbildung 74: Klonierungsstrategie der Sensoren #59, #60, #63 und #64. ① Insert PCR mit der proof-reading Polymerase Q5. ② Ligation in den pJET1.2/blunt Vektor. ③ Sequenzierung der Konstrukte im pJET1.2/blunt Vektor. ④ Restriktionsverdau des LigAF-Expressionsvektors und der Plasmide mit den korrekten Sequenzen. ⑤ Ligation der fehlerfreien Sequenzen in den LigAF-Expressionsvektor. ⑥ Sequenzierung der Konstrukte im LigAF-Expressionsvektor. ⑦ Erzeugung transgener *Hydra*-Linien durch die *Transgenic Hydra Facility*.

VIII.10.4.1 Lösungen und Materialien zur Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* DH5 α Bakterien

- *Escherichia coli* DH5 α Bakterien aus Glycerinkulturen (-80°C)
- LB- (engl. *lysogeny broth*) Agar: 10 g Pepton
+5 g Hefeextrakt
+10 g NaCl
+15 g Agar (Biozym)
ad 1000 ml H₂O (autoklavieren)
- sterile Zahnstocher oder Pipettenspitzen
- LB (*Lysogeny broth*) Medium: 10 g Pepton
+5 g Hefeextrakt
+10 g NaCl
ad 1000 ml H₂O
(pH- Wert von 7; autoklavieren)
- Calciumchlorid (CaCl₂) (CarlRoth): 100 mM in H₂O (steril) Gebrauchslösung
- Glycerin (CarlRoth): 30 % Glycerin in H₂O (sterile) Gebrauchslösung

VIII.10.4.2 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* DH5 α Bakterien

Für die Arbeit wurden zunächst *Escherichia coli* DH5 α Bakterien aus Glycerinkulturen (-80°C) auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher oder Pipettenspitze gepickt und in 100 ml LB- Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden im Anschluss daran zur Plasmidaufnahme chemokompetent gemacht. Dazu wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 4000 rpm (bei 4°C) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 20 ml eiskaltem CaCl₂ (100 mM) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien wiederum für 5 Minuten bei 4000 rpm (bei 4°C) zentrifugiert, bevor das entstandene Bakterienpellet in 2 ml LB- Medium sachte resuspendiert wurde. Die erzeugten chemokompetenten Bakterien wurden entweder direkt für die Transformation verwendet oder als Aliquots 1:2 mit Glycerin (30 % Glycerin/sterilem H₂O) verdünnt und sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren bevor sie bei -80°C als Glycerin- Stammkultur gelagert wurden. Diese chemokompetenten DH5 α Bakterien wurden für die folgenden Transformationen in verschiedene Vektorsysteme genutzt.

VIII.10.5.1 Lösungen und Materialien für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

- PtdIns(4,5)P₂-GFP- und PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensoren von Herrn Prof. Dr. Dominik Oliver (Neurophysiologie, Philipps-Universität Marburg)
- PtdIns(4,5)P₂-GFP- und PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensoren spezifische Primerpaare
- *proof-reading* Q5 High-Fidelity DNA Polymerase
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase- Puffer
- dNTP Mix (2 mM)
- PtdIns(4,5)P₂- und PtdIns(3,4,5)P₃- Primer (10 µMol/l)
- H₂O (steril)

VIII.10.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um die verschiedenen PtdInsP-GFP- Sensoren in den *Hydra*-spezifischen LigAF- Expressionsvektor zu klonieren, womit schließlich PtdInsP-GFP- Sensor transgene Hydren erzeugt werden sollen, wurde zunächst zur Amplifizierung der Konstrukte eine *Insert*- PCR durchgeführt. Dazu wurden für die jeweiligen Sensoren spezifische Primerpaare designt, welche die Schnittstellen der Restriktionsenzyme SdaI und BshTI beinhalten, womit die Konstrukte in den LigAF- Vektor, der die gleichen Schnittstellen enthält, ligiert werden können. Um Sequenzfehler während der Amplifikation zu vermeiden wurde die *proof-reading* Polymerase Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) genutzt. Der optimierte Ansatz der PCR ist der folgenden Tabelle (Tab. 11) zu entnehmen.

Tabelle 11: Ansatz der *Insert*- PCR mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (50 µl).

Ansatz der <i>Insert</i> - PCR mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	Volumina eines 50 µl PCR Ansatzes (µl)
Q5 Puffer	10
Primer (10 µMol/l)	je 2,5
dNTP Mix (2 mM)	5
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
Template (Plasmid- DNA)	5
H ₂ O	24,5

Für die *Insert*- PCR wurde folgendes gewählt (Tab. 13):

Tabelle 12: PCR Programm der *Insert*- PCR.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Initiierung	98	60	1
Denaturierung	98	10	30 x
Annealing	63	30	
Elongation	72	30	
Finale Extension	72	120	1
Store	4	∞	

Alle PCR Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese (siehe VIII.10.6.2) aufgetrennt und auf die passende Konstruktgröße überprüft.

VIII.10.6.1 Lösungen und Materialien der Gelelektrophorese

- TAE- Puffer (50x Stammlösung): 40 mM Tris + 35 mM Essigsäure + 1 mM EDTA (pH-Wert von 8); 1 x TAE dient als Puffer der Gelelektrophorese
- 1 %iges Agarosegel (Biozym); 1 % Agarose in 1 x TAE- Puffer
- 6X MassRuler™ DNA Loading Dye (Thermo Scientific)
- GeneRuler DNA Ladder Mix O´Gene Ruler (Thermofisher)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium)

VIII.10.6.2 Methode der Gelelektrophorese

Sowohl die PCR- Produkte, als auch die Produkte der Restriktionsverdauung (siehe VIII.10.10.2) wurden mit einem 1 %igen Agarosegel (Biozym) in 1x TAE Puffer mittels Gelelektrophorese bei 120 Volt für circa 35 Minuten aufgetrennt. Dazu wurden 5 µl der Proben mit 1 µl des 6x Loading Dyes (Fermentas) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Marker diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermofisher). Anschließend wurde das Gel für 30 Minuten mit der nicht-toxischen Färbelösung GelRed Nucleic Acid Stain (1:10000 in H₂O) gefärbt. Zuletzt wurde das Gel mit einem UV-Dokumentationsgerät aufgenommen und dokumentiert. Die Gelbanden wurden nach ihrer Größe analysiert und ausschließlich Proben, deren Bandengröße der erwarteten Größe entsprach wurden für die weitere Klonierung verwendet.

VIII.10.7.1 Materialien der Ligation der Konstrukte in den pJET1.2/blunt Klonierungsvektor

- pJET1.2/blunt Klonierungsvektor CloneJET PCR Cloning KIT (ThermoScientific)
- PCR- Produkte der PtdInsP-GFP- Sensoren

VIII.10.7.2 Ligation der Konstrukte in den pJET1.2/blunt Klonierungsvektor

Um eine ausreichende Konzentration der Konstrukte für die finale Ligation in den LigAF- Expressionsvektor zu haben, wurde zunächst in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt Vektor zwischenkloniert. Dieser liegt linearisiert vor und die PCR- Produkte, welche durch *proof-reading* Polymerasen generiert wurden, können direkt in den Vektor ligiert werden. Für die Ligation wurden die PCR- Produkte (siehe VIII.10.5.2) der PtdInsP-GFP- Sensoren verwendet und es wurde nach dem *Blunt-End Cloning Protocol* von ThermoScientific des CloneJET PCR Cloning KITs für den pJET1.2/blunt Vektor vorgegangen. Statt 20 µl wurden 10 µl des Ligationsansatzes angesetzt, kurz gevortext und für 5 Sekunden abzentrifugiert.

Anschließend inkubierte der Ligationsansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation verwendet, kann aber auch kurzfristig bei -20°C gelagert werden.

VIII.10.8.1 Lösungen und Materialien zur Transformation der PtdInsP-GFP- Sensoren im pJET1.2/blunt- Vektor in chemokompetente *E. coli* DH5α Bakterien

- chemokompetente *Escherichia coli* DH5α Bakterien
- Ligationsansatz
- SOB- (*Super Optimal Broth*) Medium: 20 g Pepton
+5 g Hefeextrakt
+0,58 g NaCl
+0,19 KCl
ad 1000 ml H₂O (autoklavieren)
- SOC- (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) (sterilfiltriert)
10 ml SOB- Medium
+10 mM MgCl₂
+10 mM MgSO₄
+20 mM Glucose
- Ampicillin Stammlösung: 50 mg/ml, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert
- LB- (engl. *lysogeny broth*) Agarplatten mit Ampicillin (zu dem handwarmen frisch autoklavierten LB- Agar wird Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugeben)
- LB- (engl. *lysogeny broth*) Medium: 10 g Pepton
+5 g Hefeextrakt
+10 g NaCl
ad 1000 ml H₂O
(pH- Wert von 7; autoklavieren)

VIII.10.8.2 Transformation der PtdInsP-GFP- Sensoren im pJET1.2/blunt- Vektor in chemokompetente *E. coli* DH5α Bakterien

Die Transformation der Konstrukte in *Escherichia coli* DH5α Bakterien wurden zum einem zur Replikation der Konstrukte, und zum anderen zur Selektion der korrekten Plasmide genutzt. Zur Selektion wurden entsprechend der Vektorkarte (Anhang 12) Antibiotikaresistenzen des Vektors genutzt. Für die Transformation wurden 100 µl der chemokompetenten Bakterien (siehe VIII.10.4.2) zusammen mit 10 µl des Ligationsansatzes in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 30 Minuten auf Eis inkubiert, worauf

folgend die Probe 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erhitzt wurde (Alternativ 1 Minute bei RT). Im Anschluss daran wurden die Bakterien für 2 Minuten auf Eis inkubiert, bevor 900 µl SOC- (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) Medium hinzugegeben wurde, worin die Bakterien 60 Minuten bei 37°C auf dem Bakterenschüttler wuchsen. Anschließend wurden die Bakterien 4 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und 700 µl des Überstandes wurden entfernt, sodass man das Bakterienpellet in den restlichen 200 µl des Überstandes resuspendieren konnte. Diese Bakteriensuspension wurde daraufhin auf Resistenz-LB-Agar-Platten mit einer Ampicillin- Konzentration von 100 µg/ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien von den Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze gepickt und in 5 ml LB-Ampicillin-Medium überführt, worin die Bakterien über Nacht bei 37°C auf dem Bakterenschüttler wuchsen.

VIII.10.9.1 Lösungen und Materialien zur CTAB- Plasmidpräparation

- STET- Puffer: 8 % Saccharose + 0,1% Triton-X100 + 50 mM EDTA + 50 mM Tris (pH von 8,0)
- CTAB (5 % w/v)
- Lysozym (50 mg/ml in STET- Puffer)
- Natriumchlorid; NaCl (1,2 M)
- Ethanol (70 % und 100 %)
- Natriumacetat; NaAc (3 M; pH von 5,2)
- TE- Puffer: 10 mM Tris +1 mM EDTA
- Sterile Zahnstocher

VIII.10.9.2 Methode der Plasmidpräparation nach CTAB

Für weitere Analysen der Konstrukte muss das Plasmid aus den Bakterien isoliert werden. Dazu wurde die DNA Isolation mittels CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) durchgeführt. Aus den über-Nacht-Bakterienkulturen wurden hintereinander 2 x 2 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und jeweils 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet aus den 4 ml Bakteriensuspension wurde in 200 µl STET- Puffer + 4 µl Lysozym resuspendiert und bei RT für 5 Minuten inkubiert. Das Lysozym wurde kurz vor Beginn der Plasmidpräparation in STET- Puffer gelöst und kann so kurzfristig auf Eis gelagert werden. Daraufhin wurden die Proben für exakt 45 Sekunden in ein kochendes Wasserbad gegeben und anschließend 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die genomische DNA und Proteine setzen sich als weiches Pellet ab, welches mit einem sterilen Zahnstocher aus dem Eppendorfreaktionsgefäß entfernt wurde. Zu dem Überstand wurden darauf 8 µl CTAB (5 %) gegeben und durch mehrmaliges invertieren

gemischt. Der entstandene Niederschlag wurde anschließend 6 Minuten bei maximaler Zentrifugengeschwindigkeit gefällt. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen, bevor 300 µl NaCl (1,2 M) zu dem Pellet gegeben und kräftig gevortext wurde. Die Proben inkubierten darauf 10 Minuten bei RT. Zu den 300 µl NaCl wurden 750 µl raumtemperiertes EtOH (100 %) gegeben und gut gemischt. Die Proben wurden sofort im Anschluss daran für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend verworfen. Auf das Pellet wurden mit 200 µl raumtemperiertes EtOH (70 %) gewaschen, bevor 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde wieder vollständig abgenommen und die Proben wurden ungefähr 15 Minuten (bis kein EtOH- Geruch mehr wahrnehmbar ist) bei offenem Deckel des Eppendorfreaktionsgefäßes an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde abschließend in 20 µl TE- Puffer oder H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

VIII.10.10.1 Lösungen und Materialien zum Restriktionsverdau der Plasmide

- Produkt der Plasmidpräparation
- Restriktionsenzyme SdaI und BshTI
- SdaI Enzym- Puffer
- H₂O (steril)

VIII.10.10.2 Methode des Restriktionsverdaus der Plasmide

Anschließend an die Plasmidpräparation erfolgte der Restriktionsverdau (RV) der Plasmide mit den Enzymen SdaI und BshTI, deren Schnittstellen in den designten Primern integriert sind. Für einen Mastermix für 10 Proben (à 10 µl) des Restriktionsverdaus wurde folgender Ansatz gewählt (Tab. 13):

Tabelle 13: Ansatz des Restriktionsverdaus der Plasmide.

Komponenten des Restriktionsverdaus	Volumina für einen Proben Mastermix (µl)
H ₂ O	77
SdaI Puffer	10
SdaI Restriktionsenzym	2
BshTI Restriktionsenzym	1

Jeweils 9 µl des Mastermixes wurde auf 10 Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und zu jedem wurde 1 µl der entsprechenden Plasmid- DNA der Plasmidpräparation hinzugefügt, sodass man in jedem Eppendorfreaktionsgefäß ein Endvolumen von 10 µl hatte. Der Restriktionsverdau erfolgte für zwei bis drei Stunden bei 37°C im Wasserbad oder alternativ über Nacht bei 4°C. Dabei wurde das Insert (PtdInsP-GFP- Sensorkonstrukt) aus dem

pJET1.2/blunt Vektor herausgeschnitten und anschließend per Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet (siehe VIII.10.6.2). Bei korrekter Bandengröße wurden einzelne Plasmide sequenziert (siehe VIII.10.11.2), um die Korrektheit der Sequenz zu überprüfen.

VIII.10.11.1 Lösungen und Materialien für die Sequenzierung durch Microsynth

- 700-1200 ng Plasmid in 12 µl H₂O
- 3 µl des PtdIns(4,5)P₂- bzw. des PtdIns(3,4,5)P₃- Sensor spezifischen *forward* bzw. *reverse* Primers (20 µM)

VIII.10.11.2 Sequenzierung durch *Microsynth*

Für die Sequenzierung bei *SeqLab Microsynth* wurden die Proben entsprechend der Firmenvorgaben vorbereitet und eingeschickt (<https://srvweb.microsynth.ch/>). Die Sequenzen wurden anschließend mit den Freeware Phylogenie- Programmen Clustal-X (Version 2.0) (Thompson et al., 1997) und GeneDoc (Version 2.7.000) (Nicholas et al., 1997) analysiert (siehe VIII.2). Bei fehlerfreien Sequenzen wurden Glycerin-Bakterien-Stammkulturen angefertigt und bei -80°C gelagert.

VIII.11 Klonierung der PtdInsP-GFP- Sensoren in den LigAF- Expressionsvektor

Die Sensoren #59, #60, #63 und #64 konnten alle korrekt in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt eingebracht werden. Somit konnten die Sensoren in den nächsten Schritten in den *Hydra*-spezifischen Expressionsvektor LigAF umkloniert werden.

VIII.11.1.1 Lösungen und Materialien zur Aufkonzentration der Plasmidpräparationen

- Produkte der Plasmidpräparationen
- Natriumacetat (NaAc): 3 M
- Ethanol (EtOH): 100 % und 70 %

VIII.11.1.2 Methode der Aufkonzentration der Plasmidpräparationen

Da man mittels Midi- und Maxi- Plasmidpräparation des verwendeten Kits zu geringe Plasmidkonzentrationen für die weitere Klonierung erzielen werden konnte, wurde mehrere Plasmidpräparationen mittels CTAB durchgeführt und aufkonzentriert. Dazu wurden zunächst die Glycerin-Bakterien-Stammkulturen (PtdInsP-GFP- Sensoren in pJET1.2/blunt) erneut auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterien- Brutschrank

inkubiert. Am folgenden Tag wurden für die einzelnen Sensoren jeweils eine einzige Bakterienkolonie gepickt und in 25 ml über-Nacht-Bakterienkulturen bei 37°C in LB-Amp-Medium herangezogen. Damit wurde am nächsten Tag jeweils fünf Mini-Plasmidpräparationen (Volumen á 5 ml) mittels CTAB durchgeführt, am Ende zusammengeführt und aufkonzentriert. Die Plasmide wurden nach der CTAB-Plasmidpräparation jeweils in 20 µl H₂O gelöst, sodass man nach dem Zusammenführen 100 µl gelöstes Plasmid hatte. Zu den 100 µl wurden 50 µl Natriumacetat (NaAc; 3 M) hinzugegeben und gevortext. Anschließend wurde 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, ehe der Überstand abgenommen wurde. Auf das gefällte Pellet wurde 300 µl eiskaltes EtOH (100 %) gegeben und anschließend 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach entfernt und das Pellet wurde mit 300 µl eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen, bevor wiederum 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurde. Daraufhin wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet wurde bei geöffnetem Eppendorfreaktionsgefäß an der Luft getrocknet, bis kein EtOH- Geruch mehr wahrnehmbar war. Das aufkonzentrierte Plasmidpellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

VIII.11.2.1 Lösungen und Materialien zum Restriktionsverdau der PtdInsP-GFP- Sensoren und des LigAF- Vektors

- Für generelle Materialien des Restriktionsverdau siehe VIII.10.10.2
- PCR *clean up Kit* (Macherey und Nagel)
- LigAF- Expressionsvektor bzw. Produkte der PtdInsP-GFP- Sensor PCR (Template)

VIII.11.2.2 Methode des Restriktionsverdaus der PtdInsP-GFP- Sensoren und des LigAF- Vektors

Anschließend wurde enzymatische Restriktionsverdaue der Sensoren im pJET1.2/blunt Vektor, des LigAF- Expressionsvektors (Tab. 14) und zusätzlich der PtdInsP-GFP- Sensoren PCR (Tab. 12) (siehe VIII.10.5.2) durchgeführt. Das PCR- Produkt wurde dazu zuvor durch das PCR *clean up Kit* von Macherey und Nagel aufgereinigt. Auf die Aufreinigung und den Restriktionsverdau des PCR- Produktes wurde zurückgegriffen, da die Restriktionsverdaue der Sensoren im pJET1.2/blunt Vektor auch nach einer Gelextraktion zu geringe Konzentrationen für weitere Klonierungsexperimente aufwiesen. Von dem LigAF- Expressionsvektor wurde ein 10 µl Verdau (Tab. 14) angesetzt und von den PtdInsP-GFP- Sensoren wurden jeweils 20 µl Verdaue angesetzt (Tab. 15). Die Restriktionsverdau-Ansätze wurden mit dem *DoubleDigest Calculator* Online-Tool von ThermoScientific optimiert.

Tabelle 14: 10 µl Ansatz eines Restriktionsverdau des LigAF- Expressionsvektors.

Komponenten des Restriktionsverdau	Volumina (µl)
H ₂ O	5,5
LigAF- Expressionsvektor	2
SdaI Restriktionsenzym	1
SdaI Puffer	1
BshTI Restriktionsenzym	0,5

Tabelle 15: 20 µl Ansatz eines Restriktionsverdau der PtdInsP-GFP- Sensoren.

Komponenten des Restriktionsverdau	Volumina (µl)
PCR- Produkt der PtdInsP- Sensoren	15
SdaI Puffer	2
H ₂ O	1,5
SdaI Restriktionsenzym	1
BshTI Restriktionsenzym	0,5

VIII.11.3.1 Lösungen und Materialien der Ligation der PtdInsP-GFP- Sensoren in den LigAF- Expressionsvektor

- Restriktionsverdau der PtdInsP-GFP- Sensoren
- Ligase Puffer (10x)
- Restriktionsverdau des LigAF- Vektors
- T4 Ligase (ThermoScientific)

VIII.11.3.2 Methode der Ligation der PtdInsP-GFP- Sensoren in den LigAF- Expressionsvektor

Im Anschluss an die enzymatischen Restriktionsverdau der Sensoren und des LigAF- Expressionsvektors wurde die Ligation durchgeführt (Tab. 16). Dazu wurden alle Komponenten des 20 µl Ligationsansatzes (Tab. 15) zusammen in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und anschließend zwei Stunden bei 22°C inkubiert, bevor die Ligaseaktivität bei 65°C für 15 Minuten abgestoppt wurde.

Tabelle 16: Ligationsansatz der PtdInsP-GFP- Sensoren und des LigAF- Expressionsvektors.

Komponenten der Ligation	Volumina (µl)
Restriktionsverdau der PtdInsP-GFP- Sensoren	15
Ligase Puffer (10x)	2
Restriktionsverdau des LigAF- Vektors	2
T4 Ligase	1

VIII.12 Transformation der PtdInsP-GFP- Sensoren im LigAF- Vektor in chemokompetente *E. coli* DH5 α Bakterien

Als Ansatz wurden 50 μ l der chemokompetenten DH5 α Bakterien zusammen mit 5 μ l des Ligation- Ansatzes (siehe VIII.11.3.2) genutzt. Die Transformation des Konstruktes in chemokompetente *E. coli* DH5 α Bakterien wurde wie in VIII.10.8.2 beschrieben durchgeführt.

VIII.12.1.1 Materialien zur Plasmidpräparation, Restriktionsverdau und Sequenzierung der PtdInsP-GFP- Sensoren im LigAF- Expressionsvektor

- Für generelle Materialien siehe VIII.10.9.1; VIII.10.10.1; VIII.10.11.1
- Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI

VIII.12.1.2 Plasmidpräparation, Restriktionsverdau und Sequenzierung der Sensoren im LigAF- Expressionsvektor

Wie bei VIII.10.9.2 und bei VIII.10.6.2 beschrieben wurden aus den über- Nacht-Bakterienkulturen mit der CTAB- Methode die Plasmide isoliert und danach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Dazu wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI verwendet (Tab. 17), die bei dem Verdau ein ca. 1900 bp großes Fragment aus dem LigAF- Vektor schneiden, statt einem ca. 600 bp großen Fragment, wie es die Enzyme SdaI und BshTI machen würden. Dies würde ungefähr der Größe der Sensoren entsprechen, wodurch man bei der Bandengröße im Gel nach dem Restriktionsverdau nur schwer unterscheiden könnte, ob man das eingebrachte Konstrukt ausgeschnitten hat, oder man ein Fragment der gleichen Größe aus dem Leervektor geschnitten hätte.

Tabelle 17: Ansatz des Restriktionsverdaus der PtdInsP-GFP- Sensoren im LigAF- Expressionsvektor mit EcoRI und XhoI.

Komponenten des Restriktionsverdaus	Volumina eines 10 μ l Ansatzes (μ l)
H ₂ O	7
Tango Puffer	2
EcoRI Restriktionsenzym	0,5
XhoI Restriktionsenzym	0,5

Proben mit der entsprechenden Bandengröße wurden zur Sequenzanalyse wiederum an *SeqLab Microsynth* übergeben (siehe VIII.10.11.2). Klone mit fehlerfreien Sensoren im LigAF- Expressionsvektor (Anhang 30 und Anhang 31) wurden als Glycerin-Bakterien-Stammkulturen bei -80°C gelagert.

VIII.13 Erzeugung transgener Hydren durch die *Transgenic Hydra Facility*

VIII.13.1.1 Lösungen und Materialien für die Erzeugung transgener Hydren in Kooperation mit der *Transgenic Hydra Facility*

- Qiagen *Plasmid Maxi Purification Kit*

VIII.13.1.2 Erzeugung transgener Hydren in Kooperation mit der *Transgenic Hydra Facility*

Die Erzeugung PtdInsP-GFP- Sensor transgener Tiere fand in Kooperation mit der *Transgenic Hydra Facility* in Kiel, speziell mit Dr. Alexander Klimovich (AG Prof. Dr. Thomas Bosch; Zoologisches Institut; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) statt. Dazu wurden mit dem Qiagen *Plasmid Maxi Purification Kit* (nach dem Qiagen *Plasmid Maxi Purification Kit* Protokoll) große Mengen der Sensoren #59, #60, #63 und #64 isoliert und zur Injektion in fertilisierte *Hydra*- Eier nach Kiel versendet. Nach erfolgter Injektion wurden die *Hydra*-Embryonen persönlich abgeholt.

VIII.14 Immobilisierung von *Hydra vulgaris*

Um morphogenetische Prozesse und die (sub)zelluläre Lokalisation der PtdInsP-GFP-Sensoren hochauflösend *in vivo* mikroskopieren zu können, ist eine Immobilisierung der Hydren notwendig. Dazu wurden unterschiedliche Relaxantien, wie MgCl₂, Lidocain, Linalool und Benzocain getestet.

VIII.14.1 Lösungen und Materialien der Immobilisierung von *Hydra vulgaris*

- Volvic - natürliches Mineralwasser
- Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl₂ x 6 H₂O; 203,3 g/mol) (CarlRoth): 25 mM Gebrauchslösung (0,5 % w/v)
- Lidocain; 234,34 g/mol (Sigma-Aldrich): 10 %ige Stammlösung: 1 g in 10 ml Ethanol (entspricht 0,42 M); Gebrauchslösung in VOLVIC: 9 mM
- Linalool (97 %, Sigma-Aldrich): 1 mM Gebrauchslösung (1:5000 in VOLVIC)
- Benzocain; 165,19 g/mol (Sigma-Aldrich): 10 %ige Stammlösung: 1 g in 10 ml Ethanol (entspricht 0,6 M); Gebrauchslösung in Volvic: 20 mM
- 6-well Gewebekulturplattenplatten
- Kanülen zum Einschneiden der Hydren für die Regenerationsversuche

VIII.14.2 Methode der Immobilisierung von *Hydra vulgaris*

Die Immobilisierungslösungen wurden jeweils frisch aus den Stammlösungen in Volvic angesetzt und bei RT bis zur Verwendung gelagert. Die zu immobilisierende *Hydren* wurden in 6-well Platten überführt und das HM wurde vollständig entfernt, bevor es durch die Immobilisierungs- Lösung ersetzt wurde. Die relaxierten *Hydren* wurden mittels Binokular beobachtet und dokumentiert. Nach der Immobilisierung wurden die Relaxantien vollständig entfernt und mindestens 3 x 5 Minuten mit Volvic ausgewaschen.

VIII.14.3 Bestimmung der Gebrauchslösungen der Relaxantien

Um eine nutzbare Gebrauchslösung der Relaxantien zu bestimmen, die die *Hydren* ohne sichtbare Nebeneffekte effektiv relaxieren, wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen für MgCl₂, Lidocain, Linalool und Benzocain getestet. Dazu wurden jeweils 10 Tiere in die jeweilige Immobilisierungs- Lösung (Tab. 3) überführt und für 24 Stunden darin inkubiert. Die Immobilisierung wurde mittels Binokular nach 0,5 Stunden, nach 2 Stunden und nach 4 Stunden beobachtet und nach der 24 stündigen Inkubation wurde die Letalität der jeweiligen Lösung bestimmt. Weiterhin wurde 24 Stunden nach Beendigung der Inkubation überprüft, ob die *Hydren* in der Lage waren *Artemia salina* zu fangen und zu fressen.

VIII.14.4 Einfluss der Relaxantien Linalool und Benzocain auf den Prozess der Knospung

Ob die vielversprechenden Relaxantien Linalool und Benzocain einen Einfluss auf den Prozess der Knospung bei *Hydra* haben, soll durch wiederholende Immobilisierung während des Knospungsprozesses untersucht werden. Dazu wurden zunächst jeweils fünf *Hydren* mit den Knospenstadien 3, 5 und 8 abgesammelt und in 6-well Platten überführt. Dort wurden sie für den Versuch in Volvic gehalten, welches zweimal täglich vollständig abgenommen und durch Linalool (1 mM) oder Benzocain (20 mM) für jeweils zwei Stunden ersetzt wurde. Nach den zwei stündigen Behandlungen mit den jeweiligen Relaxantien wurden diese 3 x 5 Minuten mit Volvic ausgewaschen und in Volvic, bis zur nächsten Immobilisierungs-Behandlung, gehalten. Dies wurde täglich bis zur vollständigen Ablösung der Knospe wiederholt und das Knospenstadium der Tiere wurde täglich bestimmt (nach Otto und Campbell, 1977). Als Kontrolle dienten knospentragende *Hydren*, die die komplette Versuchsdauer in Volvic gehalten wurden.

VIII.14.5 Einfluss der Relaxantien Linalool und Benzocain auf den Prozess des Wundverschlusses

Um zu überprüfen, ob die beiden Relaxantien Linalool und Benzocain einen Einfluss auf den morphologischen Prozess des Wundverschlusses haben, wurde dieser Prozess unter

unterschiedlichen Behandlungsprotokollen der Relaxantien beobachtet. Dazu wurden knospense Hydren bei 50 % der Körpergröße, dem Radius des Körperumfanges entsprechend tief, mit einer Kanüle eingeschnitten. Der Prozess der Knospung wurde für die Dokumentation des Regenerationsgrades zunächst in vier unterschiedliche Regenerationsstufen eingeteilt. Regenerationsstufe 1 (RS I): vor dem zugeführten Schnitt ist keine Wunde zu erkennen; Regenerationsstufe 2 (RS II): eine weit offenstehende Wunde ist unmittelbar nach dem zugeführten Schnitt zu erkennen; Regenerationsstufe 3 (RS III): erkennbares zusammenziehen der offenstehenden Wunde ist zu erkennen; Regenerationsstufe 4 (RS IV): die Wunde ist durch eine Zellschicht verschlossen (Abb. 75).

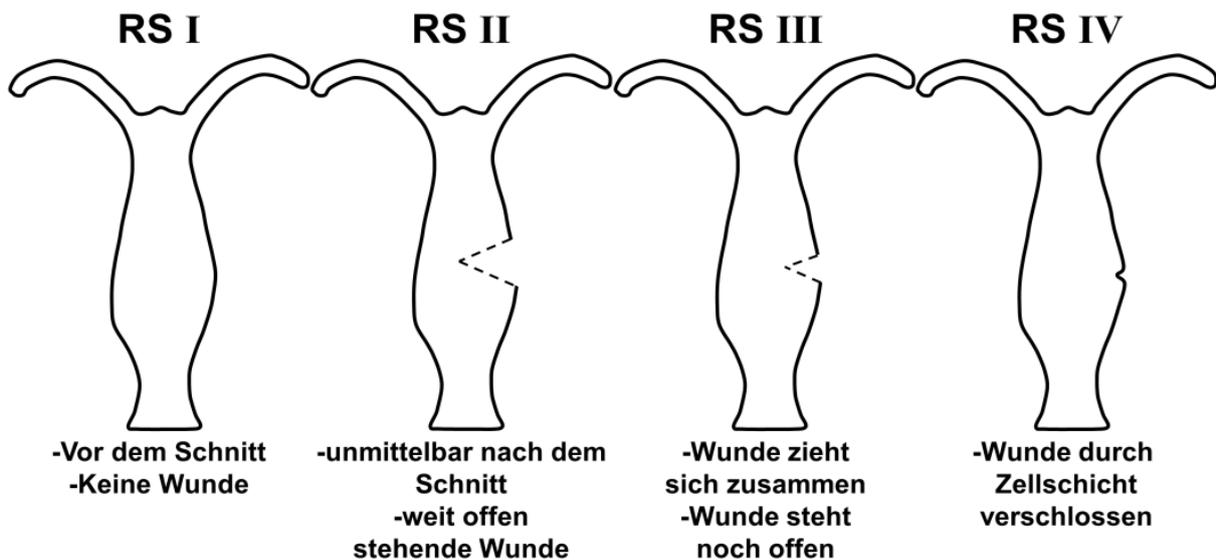


Abbildung 75: Schematische Darstellung der definierten Regenerationsstadien (RS) I bis IV. RS I: Vor dem Schnitt, ohne ersichtliche Wunde. RS II: Unmittelbar nach dem Schnitt mit einer weit offenstehenden Wunde. RS III: Die Wunde beginnt sich zusammen zu ziehen, steht aber weiterhin leicht offen. RS IV: Die Wunde ist wieder verschlossen.

Anhand vier unterschiedlicher Versuchsschemata die entwickelt wurden (Abb. 76), wurde der Prozess des Wundverschlusses mittels Binokular beobachtet, dokumentiert und eingestuft. Als Kontrolle dienten Hydren, die die gesamte Versuchs- / Regenerationsdauer, also sowohl vor, als auch nach dem zugeführten Schnitt in Volvic gehalten wurden. Die fünf unterschiedlichen Versuchsschemata (VS a-e) kombinieren unterschiedliche Schnittzeitpunkte, als auch unterschiedliche Dauer der Behandlungen mit den jeweiligen Relaxantien. Versuchsschema a: unmittelbar nach dem zugeführten Schnitt wurden die Hydren in Linalool respektive Benzocain überführt und darin für 60 Minuten immobilisiert, bevor die Relaxantien ausgewaschen wurden und die Tiere anschließend bis zum Erreichen der RS IV in Volvic gehalten wurden. Versuchsschema b: die Hydren wurden zunächst für 30 Minuten in Linalool respektive Benzocain immobilisiert, dann wurde ihnen in den jeweiligen Relaxantien der Schnitt zugeführt, woraufhin sie für weitere 30 Minuten darin immobilisiert, bevor die Relaxantien mit Volvic ausgewaschen wurden und die Tiere bis zum

Erreichen der RS IV in Volvic gehalten wurden. Versuchsschema c: die Tiere wurden für 60 Minuten in Linalool respektive Benzocain immobilisiert, bevor sie darin geschnitten wurden. Anschließend wurde das jeweilige Relaxans mit Volvic ausgewaschen, bevor die Hydren darin bis zum Erreichen der RS IV gehalten wurden. Versuchsschema d: die Hydren wurden zunächst 60 Minuten in Linalool respektive Benzocain immobilisiert, bevor sie darin geschnitten und dann bis zum Erreichen der RS IV in den jeweiligen Relaxantien gehalten wurden.

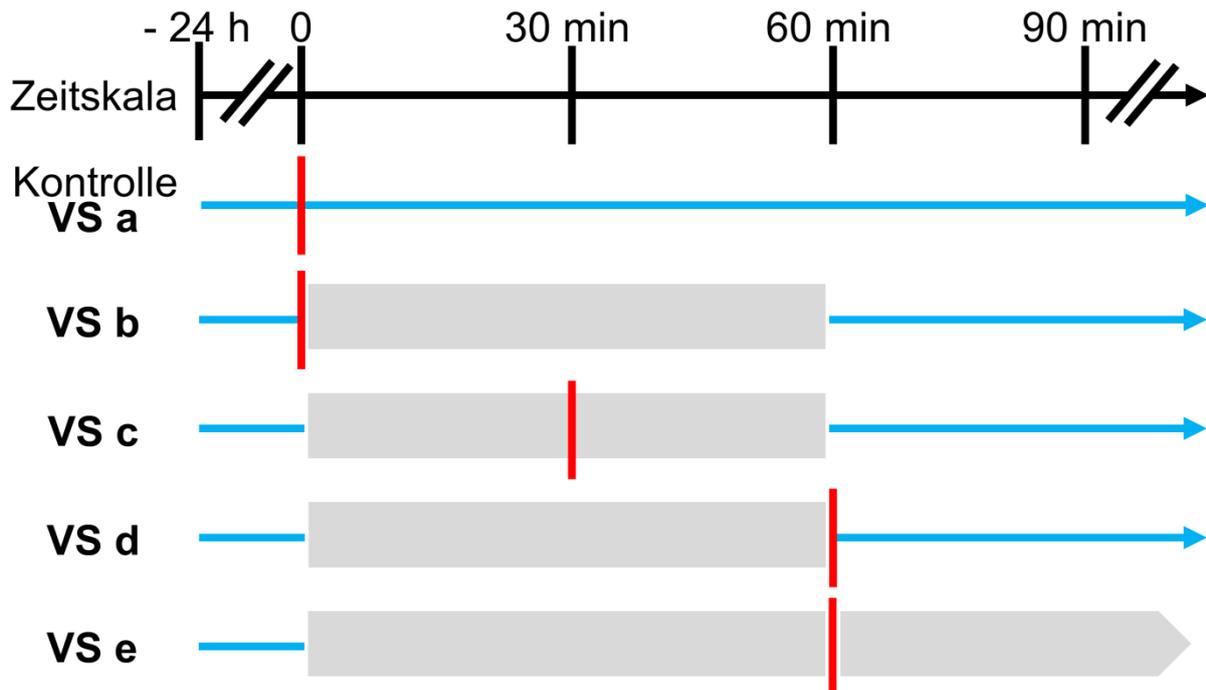


Abbildung 76: Versuchsschemata (VS) der Regeneration unter Einfluss der Relaxantien Benzocain oder Linalool. Die Tiere wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn zuletzt gefüttert. (VS a) Die Tiere wurden vor, während und nach dem Einschnitt (rote Linie) in Hydramedium (blauer Pfeil) gehalten. (VS b) Nach dem zugeführten Schnitt werden die Hydren für 60 Minuten mit dem jeweiligen Relaxans immobilisiert (grauer Balken), bevor sie wieder in Hydramedium überführt werden. (VS c) Die Hydren wurden 30 Minuten nach einer 60 minütigen Immobilisierung mit dem jeweiligen Relaxans geschnitten. Anschließend wurden sie wieder in Hydramedium überführt. (VS d) Die Hydren wurden nach einer 60 minütigen Immobilisierung mit den jeweiligen Relaxantien eingeschnitten und danach direkt in Hydramedium überführt. (VS e) Die Hydren wurden während einer kontinuierlichen Immobilisierung mit den jeweiligen Relaxantien eingeschnitten und danach weiter mit den Relaxantien immobilisiert.

IX. Literaturverzeichnis

- AE Karnoub, M Symons, SL Campbell, C. Der. (o. J.). Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Mar;84(1):61-71.
- Aelst, L. Van, Souza-schorey, C. D., Aelst, L. Van, und Souza-schorey, C. D. (1997). *Rho GTPases and signaling networks Rho GTPases and signaling networks.* 2295–2322. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2295>
- Agarwal, P., und Zaidel-Bar, R. (2019). Principles of Actomyosin Regulation In Vivo. *Trends in Cell Biology*, 29(2), 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.006>
- Ai, S., Kuzuya, M., Koike, T., Asai, T., Kanda, S., Maeda, K., Shibata, T., und Iguchi, A. (2001). Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis*, 155(2), 321–327. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00585-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00585-2)
- Akbulut, B., Cakmak, E., Özel, O., und Dülger, N. (2012). Effect of Anaesthesia with Clove Oil and Benzocaine on Feed Intake in Siberian Sturgeon. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12: 667-67.
- Alzugaray, M. E., Adami, M. L., Diambra, L. A., Hernandez-Martinez, S., Damborenea, C., Noriega, F. G., und Ronderos, J. R. (2013). Allatotropin: An Ancestral Myotropic Neuropeptide Involved in Feeding. *PLoS ONE*, 8(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077520>
- Antal, C. E., und Newton, A. C. (2013). Spatiotemporal dynamics of phosphorylation in lipid second messenger signaling. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12), 3498–3508. <https://doi.org/10.1074/mcp.R113.029819>
- Anton-Erxleben, F., Thomas, A., Wittlieb, J., Fraune, S., und Bosch, T. C. G. (2009). Plasticity of epithelial cell shape in response to upstream signals: A whole-organism study using transgenic Hydra. *Zoology*, 112(3), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2008.09.002>
- Aprotosoai, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., und Miron, A. (2014). Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(4), 193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>
- Aravind, L., Neuwald, A. F., und Ponting, C. P. (1999). Sec14p-like domains in NF1 and Dbp-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Current Biology*, 9(6), 195–197. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80127-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80127-4)
- Arnold, T. R., Stephenson, R. E., und Miller, A. L. (2017). Rho GTPases and actomyosin: Partners in regulating epithelial cell-cell junction structure and function. *Experimental Cell Research*, 358(1), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.053>
- Aspenström, P., Fransson, Å., und Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochemical Journal*, 377(2), 327–337. <https://doi.org/10.1042/BJ20031041>
- Aufschnaiter, R., Wedlich-Söldner, R., Zhang, X. und Hobmayer B. (2017). *Apical and basal epitheliomuscular F-actin dynamics during Hydra bud evagination.* 1137–1148. <https://doi.org/10.1242/bio.022723>
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny lipids with giant impact on cell regulation.

- Physiological Reviews*, 93(3), 1019–1137. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2012>
- Balla, T., Bondeva, T., Várnai, P., und Balla, T. (2000). 1-s2.0-S0165614700015005-main. 21(July), 238–241.
- Balla, T., und Várnai, P. (2009). Visualization of cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-domains. In *Current Protocols in Cell Biology* (Nummer SUPPL. 42). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2404s42>
- Behjati, S., Tarpey, P. S., Sheldon, H., Martincorena, I., Van Loo, P., Gundem, G., Wedge, D. C., Ramakrishna, M., Cooke, S. L., Pillay, N., Volland, H. K. M., Papaemmanuil, E., Koss, H., Bunney, T. D., Hardy, C., Joseph, O. R., Martin, S., Mudie, L., Butler, A., ... Campbell, P. J. (2014). Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in angiosarcoma. *Nature Genetics*, 46(4), 376–379. <https://doi.org/10.1038/ng.2921>
- Bellanger, J. M., Lazaro, J. B., Diriong, S., Fernandez, A., Lamb, N., und Debant, A. (1998). The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link the Rac1 and the RhoA pathways in vivo. *Oncogene*, 16(2), 147–152. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201532>
- Berger, C. D., März, M., Kitzing, T. M., Grosse, R., und Steinbeisser, H. (2009). Detection of activated Rho in fixed *Xenopus* tissue. *Developmental Dynamics*, 238(6), 1407–1411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21884>
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1603(2), 47–82. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(02\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(02)00082-3)
- Bertrand, S., Somorjai, I., Garcia-Fernandez, J., Lamonerie, T., und Escriva, H. (2009). FGFRL1 is a neglected putative actor of the FGF signalling pathway present in all major metazoan phyla. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-226>
- Bianchini, A. E., Garlet, Q. I., Da Cunha, J. A., Bandeira Junior, G., Brusque, I. C. M., Salbego, J., Heinzmann, B. M., und Baldisserotto, B. (2017). Monoterpenoids (Thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): Evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(12), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176346>
- Blangy, A., Vignal, E., Schmidt, S., Debant, A., Gauthier-Rouvière, C., und Fort, P. (2000). TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of RhoG. *Journal of Cell Science*, 113(4), 729–739.
- Bode, H. R. (1996). The interstitial cell lineage of hydra: A stem cell system that arose early in evolution. *Journal of Cell Science*, 109(6), 1155–1164.
- Boehm, A. M., und Bosch, T. C. G. (2012). Migration of multipotent interstitial stem cells in Hydra. *Zoology*, 115(5), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2012.03.004>
- Boothe, T., Hilbert, L., Heide, M., Berninger, L., Huttner, W. B., Zaburdaev, V., Vastenhouw, N. L., Myers, E. W., Drechsel, D. N., und Rink, J. C. (2017). A tunable refractive index matching medium for live imaging cells, tissues and model organisms. *eLife*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.27240>
- Böttcher, R. T., und Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews*, 26(1), 63–77. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0040>
- Böttger, A., und Hassel, M. (2012). Hydra, a model system to trace the emergence of

- boundaries in developing eumetazoans. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 583–591. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113454ab>
- Boureaux, A., Vignal, E., Faure, S., und Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1), 203–216. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl145>
- Broun, M., und Bode, H. R. (2002). Characterization of the head organizer in hydra. *Development*, 129(4), 875–884.
- Buchsbaum, R. J. (2007). Rho activation at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(7), 1149–1152. <https://doi.org/10.1242/jcs.03428>
- Burke, J. E. (2018). Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease. *Molecular Cell*, 71(5), 653–673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.005>
- Burute, M., und Thery, M. (2012). Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.07.003>
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., und Berenjano, I. M. (o. J.). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*.
- Campbell, R. D. (1974). Cell movements in Hydra. *Integrative and Comparative Biology*, 14(2), 523–535. <https://doi.org/10.1093/icb/14.2.523>
- Carlton, J. G., und Cullen, P. J. (2005). Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends in Cell Biology*, 15(10), 540–547. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.08.005>
- Carrasco, S., Sumano, H., und Navarro-Fierro, R. (1984). The use of lidocaine-sodium bicarbonate as anaesthetic in fish. *Aquaculture*, 41(4), 395–398. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90207-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90207-2)
- Carter, J. A., Hyland, C., Steele, R. E., und Collins, E. M. S. (2016). Dynamics of Mouth Opening in Hydra. *Biophysical Journal*, 110(5), 1191–1201. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.01.008>
- Case, L. B., und Waterman, C. M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology*, 17(8), 955–963. <https://doi.org/10.1038/ncb3191>
- Cephalopod preservationiz_Roper-1983.pdf.* (o. J.).
- Chandler, P. G., und Buckle, A. M. (2020). Development and Differentiation in Monobodies Based on the Fibronectin Type 3 Domain. *Cells*, 9(3), 610. <https://doi.org/10.3390/cells9030610>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(1), 80–83. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>
- Chen, Z., Medina, F., Liu, M. Y., Thomas, C., Sprang, S. R., und Sternweis, P. C. (2010). Activated RhoA binds to the Pleckstrin Homology (PH) domain of PDZ-RhoGEF, a potential site for autoregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 21070–21081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122549>
- Collymore, C., Banks, E. K., und Turner, P. V. (2016). *Lidocaine and MS222 for zebrafish euthanasia*. 55(6).

- Collymore, C., Tolwani, A., Lieggi, C., und Rasmussen, S. (2014). Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(2), 198–203.
- Czech, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: Complex roles at the cell surface. *Cell*, 100(6), 603–606. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80696-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80696-0)
- Czech, M. P. (2003). Dynamics of Phosphoinositides in Membrane Retrieval and Insertion. *Annual Review of Physiology*, 65(1), 791–815. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142522>
- D'Agostino, G., Saporito, A., Cecchinato, V., Silvestri, Y., Borgeat, A., Anselmi, L., und Ugucioni, M. (2018). Lidocaine inhibits cytoskeletal remodelling and human breast cancer cell migration. *British Journal of Anaesthesia*, 121(4), 962–968. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.07.015>
- Daloe, T. S., und Behbahani, F. K. (2019). MgCl₂ and its applications in organic chemistry and biochemistry: a review. *Molecular Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s11030-019-09947-2>
- De Lanerolle, P., und Serebrynnyy, L. (2011). *Nuclear actin and myosins: life without filaments*.
- Debant, A., Serra-Pagès, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S. H., und Streuli, M. (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5466–5471. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5466>
- Di Paolo, G., und De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651–657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Ersahin, T., Tuncbag, N., und Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems*, 11(7), 1946–1954. <https://doi.org/10.1039/c5mb00101c>
- Etienne-Manneville, S., und Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature volume 420, pages629–635*.
- Fagotto, F. (2014). The cellular basis of tissue separation. *Development (Cambridge)*, 141(17), 3303–3318. <https://doi.org/10.1242/dev.090332>
- Fagotto, F., Rohani, N., Touret, A. S., und Li, R. (2013). A Molecular Base for Cell Sorting at Embryonic Boundaries: Contact Inhibition of Cadherin Adhesion by Ephrin/Eph-Dependent Contractility. *Developmental Cell*, 27(1), 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.004>
- Falke, J. J., und Ziemba, B. P. (2014). Interplay between phosphoinositide lipids and calcium signals at the leading edge of chemotaxing amoeboid cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 182, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.01.002>
- Fallahi, P., Ferrari, S. M., Elia, G., Ragusa, F., Paparo, S. R., Caruso, C., Guglielmi, G., und Antonelli, A. (2018). Myo-inositol in autoimmune thyroiditis, and hypothyroidism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 19(4), 349–354. <https://doi.org/10.1007/s11154-018-9477-9>
- Fehon, R. G., McClatchey, A. I., und Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 276–287.

<https://doi.org/10.1038/nrm2866>

- Feld, L., Kellerman, L., Mukherjee, A., Livne, A., Bouchbinder, E., und Wolfenson, H. (2019). Cellular contractile forces emerge from time and F-actin dependent non-mechanosensitive displacements. *bioRxiv*, 733303. <https://doi.org/10.1101/733303>
- Fiume, R., Faenza, I., Sheth, B., Poli, A., Vidalle, M. C., Mazzetti, C., Abdul, S. H., Campagnoli, F., Fabbrini, M., Kimber, S. T., Mariani, G. A., Xian, J., Marvi, M. V., Mongiorgi, S., Shah, Z., und Divecha, N. (2019). Nuclear phosphoinositides: Their regulation and roles in nuclear functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20122991>
- Forney-Stevens, K. M., Bogner, R. H., und Pikal, M. J. (2016). Addition of Amino Acids to Further Stabilize Lyophilized Sucrose-Based Protein Formulations: I. Screening of 15 Amino Acids in Two Model Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(2), 697–704. <https://doi.org/10.1002/jps.24655>
- Frazier, D. T., und Narahashi, T. (1975). Tricaine (MS-222): Effects on ionic conductances of squid axon membranes. *European Journal of Pharmacology*, 33(2), 313–317. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(75\)90175-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(75)90175-2)
- Galliot, B. (2012). Hydra, a fruitful model system for 270 years. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 411–423. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120086bg>
- Galliot, B. (2013). Injury-induced asymmetric cell death as a driving force for head regeneration in Hydra. *Development Genes and Evolution*, 223(1–2), 39–52. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0411-y>
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Salvatore, G., und Mazzanti, G. (1999). Local Anaesthetic Activity of the Essential Oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica* 65 (1999) 700±703 – Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York ISSN: 0032-0943.
- Goel, T., Wang, R., Martin, S., Lanphear, E., und Collins, E.-M. S. (2019a). Linalool acts as a fast and reversible anesthetic in Hydra. *bioRxiv*, 584946. <https://doi.org/10.1101/584946>
- Goel, T., Wang, R., Martin, S., Lanphear, E., und Collins, E. M. S. (2019b). Linalool acts as a fast and reversible anesthetic in Hydra. In *PLoS ONE* (Bd. 14, Nummer 10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224221>
- Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Lopes, N. P., Roubach, R., und Araujo-Lima, C. A. R. M. (2001). Efficacy of Benzocaine as an Anesthetic in Juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(4), 426–431. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x>
- Goncalves, M. D., Hopkins, B. D., und Cantley, L. C. (2018). Phosphatidylinositol 3-kinase, growth disorders, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(21), 2052–2062. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704560>
- Hallinan, N., Finn, S., Cuffe, S., Rafee, S., O’Byrne, K., und Gately, K. (2016). Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 46, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.03.015>
- Hammond, G. R. V., und Burke, J. E. (2020). Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.007>
- Hammond, G. R. V., Sim, Y., Lagnado, L., und Irvine, R. F. (2009). Reversible binding and rapid diffusion of proteins in complex with inositol lipids serves to coordinate free

- movement with spatial information. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 297–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809073>
- Hanck, D. A., Nikitina, E., McNulty, M. M., Fozzard, H. A., Lipkind, G. M., und Sheets, M. F. (2009). Using lidocaine and benzocaine to link sodium channel molecular conformations to state-dependent antiarrhythmic drug affinity. *Circulation Research*, 105(5), 492–499. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198572>
- Hanna, S., und El-Sibai, M. (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling*, 25(10), 1955–1961. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.009>
- Hasse, C., Holz, O., Lange, E., Pisowodzki, L., Rebscher, N., Christin Eder, M., Hobmayer, B., und Hassel, M. (2014). FGFR-ERK signaling is an essential component of tissue separation. *Developmental Biology*, 395(1), 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.010>
- Hassel, M., Albert, K., und Hofheinz, S. (1993). Pattern formation in *Hydra vulgaris* is controlled by lithium-sensitive processes. In *Developmental Biology* (Bd. 156, Nummer 2, S. 362–371). <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1083>
- Hassel, M., und Berking, S. (1990). Lithium ions interfere with pattern control in *Hydra vulgaris*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 198(7), 382–388. <https://doi.org/10.1007/BF00376156>
- Hassel, M., und Bieller, A. (1996). Stepwise transfer from high to low lithium concentrations increases the head-forming potential in *Hydra vulgaris* and possibly activates the PI cycle. *Developmental Biology*, 177(2), 439–448. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0176>
- Hassel, M., Bridge, D. M., Stover, N. A., Kleinholz, H., und 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*. *Development Genes and Evolution*, 207(8), 502–514. <https://doi.org/10.1007/s004270050141>
- Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L., und Shoe, J. L. (2004). *A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life*. 9, 1–9.
- Hegedus, F., und Herb, K. (2005). Benzocaine-induced methemoglobinemia. *Anesthesia progress*, 52(4), 136–139. [https://doi.org/10.2344/0003-3006\(2005\)52\[136:BM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2344/0003-3006(2005)52[136:BM]2.0.CO;2)
- Heldwein, C. G., Silva, L. de L., Gai, E. Z., Roman, C., Parodi, T. V. parfau., Bürger, M. E., Baldisserotto, B., Flores, É. M. d. M., und Heinzmann, B. M. (2014). S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 41(6), 621–629. <https://doi.org/10.1111/vaa.12146>
- Hobmayer, Bert; Rentzsch, Fabian; Kuhn, Kerstin; Happel, Christoph; Cramer von Laue, Christoph; Snyder, Petra; Rothbacher, Ute; Holstein, T. (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407:186R9!doi:10.1038/35025063!
- Hobmayer, B., Jenewein, M., Eder, D., Eder, M. K., Glasauer, S., Gufler, S., Hartl, M., und Salvenmoser, A. W. (2012). Stemness in *Hydra* - A current perspective. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 509–517. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113426bh>
- Hohmann, und Dehghani. (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4), 362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>
- Holstein, T. W., Hobmayer, E., und Technau, U. (2003). Cnidarians: An evolutionarily conserved model system for regeneration? *Developmental Dynamics*, 226(2), 257–267.

<https://doi.org/10.1002/dvdy.10227>

- Holstein, Thomas W., Hobmayer, E., und David, C. N. (1991). Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Developmental Biology*, 148(2), 602–611. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90277-A](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90277-A)
- Holz, O., Apel, D., und Hassel, M. (2020). Alternative pathways control actomyosin contractility in epitheliomuscle cells during morphogenesis and body contraction. *Developmental Biology, March*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.04.001>
- Holz, O., Apel, D., Steinmetz, P., Lange, E., Hopfenmüller, S., Ohler, K., Sudhop, S., und Hassel, M. (2017). Bud detachment in hydra requires activation of fibroblast growth factor receptor and a Rho–ROCK–myosin II signaling pathway to ensure formation of a basal constriction. *Developmental Dynamics*, 246(7), 502–516. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24508>
- Hooper, N. M. (1997). Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clinica Chimica Acta*, 266(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(97\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(97)00161-7)
- Hordijk, P., ten Klooster, J., van der Kammen, R., Michiels, F., Oomen, L., und Collard, J. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science*, 278(5342):1464-6., 3–5.
- Horwitz, A. R., und Parsons, J. T. (1999). Cell migration - Movin' on. *Science*, 286(5442), 1102–1103. <https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1102>
- Hsu, C. C., Lai, W. L., Chuang, K. C., Lee, M. H., und Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 51(5), 473–482. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.743051>
- Huelsenbeck, J. P., und Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, Vol. 17 no.
- Irvine, R. (1998). Inositol phospholipids: Translocation, translocation, translocation... *Current Biology*, 8(16), 557–559. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00360-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00360-0)
- Irvine, R. F. (2006). Nuclear inositide signalling-expansion, structures and clarification. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(5–6), 505–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.02.008>
- Ito, H., Morishita, R., und Nagata, K. I. (2018). Functions of rhotekin, an effector of rho gtpase, and its binding partners in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072121>
- Izdebska, M., Zielińska, W., Grzanka, D., und Gagat, M. (2018). The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4578373>
- Jaffe, A. B., und Hall, A. (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Janetopoulos, C., und Devreotes, P. (2006). Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 174(4), 485–490. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603156>
- Ji, W., und Rivero, F. (2016). *Atypical Rho GTPases of the RhoBTB Subfamily: Roles in*

- Vesicle Trafficking and Tumorigenesis*. 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells5020028>
- JJ Otto, R. C. (1977). Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. *J Exp Zool*. 1977 Jun;200(3):417-28.
- Johansson, M. U., Zoete, V., Michielin, O., und Guex, N. (2012). Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinformatics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-173>
- Julian, L., und Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK), structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, 5(2), 37–41. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29846>
- Kadam, S., McMahon, A., Tzou, P., und Stathopoulos, A. (2009). FGF ligands in *Drosophila* have distinct activities required to support cell migration and differentiation. *Development*, 136(5), 739–747. <https://doi.org/10.1242/dev.027904>
- Kaleli, H. N., Ozer, E., und Kaya, V. O. (2020). *Protein Kinase C Isozymes and Autophagy during Neurodegenerative Disease Progression*. 1–28.
- Kawano, Y., Kaneko-Kawano, T., und Shimamoto, K. (2014). Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals. *Frontiers in Plant Science*, 5(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00522>
- KF de Campos, M., und Schaaf, G. (2017). The regulation of cell polarity by lipid transfer proteins of the SEC14 family. *Current Opinion in Plant Biology*, 40, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.09.007>
- Khair-ul-Bariyah, S., Arshad, M., Ali, M., Din, M. I., Sharif, A., und Ahmed, E. (2019). Benzocaine: Review on a Drug with Unfold Potential. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(1), 3–11. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190913145423>
- Kim, J. G., Islam, R., Cho, J. Y., Jeong, H., Cap, K. C., Park, Y., Hossain, A. J., und Park, J. B. (2018). Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6381–6392. <https://doi.org/10.1002/jcp.26487>
- Klimovich, A., Wittlieb, J., und Bosch, T. C. G. (2019). Transgenesis in *Hydra* to characterize gene function and visualize cell behavior. *Nature Protocols*, 14(7), 2069–2090. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0173-3>
- Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., und Seller, J. R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35557–35563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405319200>
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: An update. *Journal of Cell Biology*, 108(2), 229–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.2.229>
- Krahn, M. P., und Wodarz, A. (2012). Phosphoinositide lipids and cell polarity: linking the plasma membrane to the cytocortex. *Essays In Biochemistry*, 53, 15–27. <https://doi.org/10.1042/bse0530015>
- Kratzer, M. C., England, L., Apel, D., Hassel, M., und Borchers, A. (2019). Evolution of the Rho guanine nucleotide exchange factors Kalirin and Trio and their gene expression in *Xenopus* development. *Gene Expression Patterns*, 32(March), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2019.02.004>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., und Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and*

- Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuznetsov, S., Lyanguzowa, M., Bosch, T. C. G., Institut, Z., und Kiel, C. U. (2006). *Role of epithelial cells and programmed cell death in Hydra spermatogenesis*. *104*(2001), 25–31.
- LEMMON, M. A., und FERGUSON, K. M. (2015). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochemical Journal*, 350(1), 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj3500001>
- Leslie, N. R., Batty, I. H., Maccario, H., Davidson, L., und Downes, C. P. (2008). Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene*, 27(41), 5464–5476. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.243>
- Letizia, C. S., Cocchiara, J., Lalko, J., und Api, A. M. (2003). Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*, 41(7), 943–964. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00015-2)
- Li, Q., Yang, H., und Zhong, T. P. (2015). Regeneration across metazoan phylogeny: Lessons from model organisms. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(2), 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.12.002>
- Li, Z., Tang, J., und Guo, F. (2016). Identification of 14-3-3 Proteins Phosphopeptide-Binding Specificity Using an Affinity-Based Computational Approach. *PLoS ONE*, 11(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147467>
- Linck, V. de M., da Silva, A. L., Figueiró, M., Luis Piato, Â., Paula Herrmann, A., Dupont Birck, F., Bastos Caramão, E., Sávio Nunes, D., Moreno, P. R. H., und Elisabethsky, E. (2009). Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, 16(4), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.08.001>
- Lis-Balchin, M., und Hart, S. (1999). Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytotherapy Research*, 13(6), 540–542. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199909\)13:6<540::AID-PTR523>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199909)13:6<540::AID-PTR523>3.0.CO;2-I)
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y., und Ren, J. (2015). IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31(20), 3359–3361. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv362>
- Logan, M. R., und Mandato, C. A. (2006). Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. *Biology of the Cell*, 98(6), 377–388. <https://doi.org/10.1042/BC20050081>
- Macia, E., Paris, S., und Chabre, M. (2000). Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids. *Biochemistry*, 39(19), 5893–5901. <https://doi.org/10.1021/bi992795w>
- Magie, C., Pinto-Santini, D., und Parkhurst, S. (2002). Rho1 interacts with p120ctn and alphacatenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* 129:3771–82.
- Manuel, G. C., Reynoso, R., Gee, L., Salgado, L. M., und Bode, H. R. (2006). PI3K and ERK 1-2 regulate early stages during head regeneration in hydra. *Development Growth and Differentiation*, 48(2), 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00847.x>
- Martin, A. C. (2010). Pulsation and stabilization: Contractile forces that underlie morphogenesis. *Developmental Biology*, 341(1), 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.031>

- Martínez, D. E., und Bridge, D. (2012). Hydra, the everlasting embryo, confronts aging. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 479–487. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113461dm>
- Martins, T., Valentim, A. M., Pereira, N., und Antunes, L. M. (2016). Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: A question of refinement. *Laboratory Animals*, 50(6), 476–488. <https://doi.org/10.1177/0023677216670686>
- Mason, D., Mallo, G. V., Terebiznik, M. R., Payrastra, B., Finlay, B. B., Brumell, J. H., Rameh, L., und Grinstein, S. (2007). Alteration of epithelial structure and function associated with PtdIns(4,5)P₂ degradation by a bacterial phosphatase. *Journal of General Physiology*, 129(4), 267–283. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609656>
- Medeiros Júnior, E. F. de, Uehara, S. A., Freitas, T. M. de, De Melo, N. F. A. C., Palheta, G. D. A., und Takata, R. (2019). Effectiveness of benzocaine as anesthetic at different water temperatures for early juvenile curimba (*Prochilodus lineatus valenciennes*, 1836), a neotropical fish species. *Boletim do Instituto de Pesca*, 45(3), 1–7. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.3.474>
- Melak, M., Plessner, M., und Grosse, R. (2017). Correction: Actin visualization at a glance [J. Cell Sci., 130, 3, (2017), 525–530]doi: 10.1242/jcs.189068. *Journal of Cell Science*, 130(9), 1688–1688. <https://doi.org/10.1242/jcs.204487>
- Memar, N., Schiemann, S., Hennig, C., Findeis, D., Conradt, B., und Schnabel, R. (2019). Twenty million years of evolution: The embryogenesis of four *Caenorhabditis* species are indistinguishable despite extensive genome divergence. *Developmental Biology*, 447(2), 182–199. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.12.022>
- Menke, A., und Giehl, K. (2012). Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 524(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.019>
- Messenger, J. B., Nixon, M., und Ryan, K. P. (1985). Magnesium Chloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 82(1), 203–205. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90230-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90230-0)
- Mohammadi, M., Dikic, I., Sorokin, A., Burgess, W. H., Jaye, M., und 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. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 977–989. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.3.977>
- Müller, W. A., und Hassel, M. (2018). *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen* (6. Auflage). ISBN 978-3-662-55533-0 ISBN 978-3-662-55534-7 (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-3-662-55534-7>.
- Münder, S., Käsbauer, T., Prexl, A., Aufschnaiter, R., Zhang, X., Towb, P., und Böttger, A. (2010). Notch signalling defines critical boundary during budding in Hydra. *Developmental Biology*, 344(1), 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.05.517>
- Murillo-Rincon, A. P., Klimovich, A., Pemöller, E., Taubenheim, J., Mortzfeld, B., Augustin, R., und Bosch, T. C. G. (2017). Spontaneous body contractions are modulated by the microbiome of Hydra. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16191-x>
- Neumcke, B., Schwarz, W., und Stämpfli, R. (1981). Block of Na channels in the membrane of myelinated nerve by benzocaine. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 390(3), 230–236. <https://doi.org/10.1007/BF00658267>

- Nicholas, K., Nicholas, H. G., Nicholas, K., Nicholas, H., Deerfield, D., und Gauch, H. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Embnet.news*.
- Niggli, V. (2005). Regulation of Protein Activities By Phosphoinositide Phosphates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 57–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.021704.102317>
- Nishimiya-Fujisawa, C., und Kobayashi, S. (2012). Germline stem cells and sex determination in Hydra. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 499–508. <https://doi.org/10.1387/ijdb.123509cf>
- Nüchter, T., Benoit, M., Engel, U., Özbek, S., und Holstein. (2006). Nematocyst Discharge. *Current Biology*, 16(9), R316–R318. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.089>
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. *Cellular Signalling*, 11(8), 545–554. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00063-1)
- P. Hilpelä, M. K. Vartiainen, P. L. (2004). *Regulation of the Actin Cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3*.
- Pantin, C. F. . (1948). Notes on microscopical techniques for zoologists. *Cambridge University Press*.
- Park, E., Hwang, D. S., Lee, J. S., Song, J. I., Seo, T. K., und Won, Y. J. (2012). Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 329–345. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.10.008>
- Park, I. S., Park, S. J., Gil, H. W., Nam, Y. K., und Kim, D. S. (2011). Anesthetic effects of clove oil and lidocaine-HCl on marine medaka (*Oryzias dancena*). *Lab Animal*, 40(2), 45–51. <https://doi.org/10.1038/labon0211-45>
- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Kanter, J. L., und He, Z. (2010). PTEN/mTOR and axon regeneration. *Experimental Neurology*, 223(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.12.032>
- Pascual, J., Castresana, J., und Saraste, M. (o. J.). Evolution of the spectrin repeat - Pascual - 2005 - BioEssays - Wiley Online Library. *Onlinelibrary.Wiley.Com*, 23. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.950190911/abstract%5Cnpapers3://publication/uuid/54E47FF3-55CF-46B6-BE81-84780D4C8FD9>
- Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., und Henkemeyer, M. (1993). Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 340(1293), 279–285. <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0069>
- Pearl, E. J., Li, J., und Green, J. B. A. (2017). Cellular systems for epithelial invagination. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1720). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0526>
- Perez-Garcia, J., Muñoz-Couselo, E., Soberino, J., Racca, F., und Cortes, J. (2018). Targeting FGFR pathway in breast cancer. *Breast*, 37, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.10.014>
- Petersen, H. O., Höger, S. K., Looso, M., Lengfeld, T., Kuhn, A., Warnken, U., Nishimiya-Fujisawa, C., Schnölzer, M., Krüger, M., Özbek, S., Simakov, O., und Holstein, T. W. (2015). A comprehensive transcriptomic and proteomic analysis of hydra head

- regeneration. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 1928–1947. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv079>
- Philipp, I., Aufschnaiter, R., Özbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., Watanabe, H., Rentzsch, F., Holstein, T. W., und Hobmayer, B. (2009). Wnt/ β -Catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4290–4295. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812847106>
- Pollard, T. D. (2016). *Actin and Actin-Binding Proteins*. 1–18.
- Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P., Meyer, T., und Carolina, N. (2000). *Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate Functions as a Second Messenger that Regulates Cytoskeleton – Plasma Membrane Adhesion*. 100, 221–228.
- Rauscher, A., Gyimesi, M., Kovács, M., und Málnási-Csizmadia, A. (2018). Targeting Myosin by Blebbistatin Derivatives: Optimization and Pharmacological Potential. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(9), 700–713. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.006>
- Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., Scarpantonio, A., Rinaldi, L., und Mosca, E. (2000). Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacological Research*, 42(2), 177–181. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0671>
- RE Steele, CN David, U. T. (2011). A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends Genet.* 2011 January ; 27(1): 7–13. doi:10.1016/j.tig.2010.10.002.
- Rebecchi, M. J., und Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains: A common fold with diverse functions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27, 503–528. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.503>
- Rebscher, N., Deichmann, C., Sudhop, S., Fritzenwanker, J. H., Green, S., und Hassel, M. (2009). Conserved intron positions in FGFR genes reflect the modular structure of FGFR and reveal stepwise addition of domains to an already complex ancestral FGFR. *Development Genes and Evolution*, 219(9–10), 455–468. <https://doi.org/10.1007/s00427-009-0309-5>
- Reddy, P. C., Gungi, A., und Unni, M. (2019). *Evo-Devo: Non-model species in cell and developmental biology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-23459-1>
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., und Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotophilin in the Rho-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13556–13560. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13556>
- Ren, X.-D., Kiosses, W. B., und Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho.pdf. *The EMBO Journal*, 18(3), 578–585. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171150/pdf/000578.pdf>
- Rénier, W., Joubert, A., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Massart, C., und Foray, N. (2007). Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *International Journal of Radiation Biology*, 83(8), 543–549. <https://doi.org/10.1080/09553000701436810>
- Rhee, S. G. (2001). REGULATION OF PHOSPHOINOSITIDE-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C. *Annu. Rev. Biochem.* 70:281–312.

- Riento, K., und Ridley, A. J. (2003). Rocks: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), 446–456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Robbins, H. L., und Hague, A. (2016). The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. *Frontiers in Endocrinology*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00188>
- Roberts, D. M., Anderson, A. L., Hidaka, M., Swetenburg, R. L., Patterson, C., Stanford, W. L., und Bautch, V. L. (2004). A Vascular Gene Trap Screen Defines RasGRP3 as an Angiogenesis-Regulated Gene Required for the Endothelial Response to Phorbol Esters. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10515–10528. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.24.10515-10528.2004>
- Rodenak-Kladniew, B., Castro, A., Stärkel, P., De Saeger, C., García de Bravo, M., und Crespo, R. (2018). Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. *Life Sciences*, 199, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.006>
- Romaneli, R. de S., Boaratti, A. Z., Rodrigues, A. T., Queiroz, D. M. de A., Khan, K. U., Nascimento, T. M. T., Fernandes, J. B. K., und Mansano, C. F. M. (2018). Efficacy of Benzocaine, Eugenol, and Menthol as Anesthetics for Freshwater Angelfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 30(3), 210–216. <https://doi.org/10.1002/aah.10030>
- Rose, P. G., und Burnett, A. L. (1968). An electron microscopic and radioautographic study of hypostomal regeneration in *Hydra viridis*. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 161(4), 298–318. <https://doi.org/10.1007/BF00576682>
- Ross, L., und Ross, B. (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (3rd ed. Am).
- Röttinger, E., Saudemont, A., Duboc, V., Besnardeau, L., Mcclay, D., Lepage, T., Röttinger, E., Saudemont, A., Duboc, V., Besnardeau, L., Mcclay, D., und Lepage, T. (2007). *FGF signals guide migration of mesenchymal cells, controlskeletal morphogenesis of the skeleton and regulategastrulation during sea urchin development*. 785, 1–14. <https://doi.org/10.1242/dev.020016>
- Rusu, A. D., und Georgiou, M. (2020). The multifarious regulation of the apical junctional complex. *Open biology*, 10(2), 190278. <https://doi.org/10.1098/rsob.190278>
- Saarikangas, J., Zhao, H., und Lappalainen, P. (2010a). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiological reviews*, 90(1), 259–289. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2009>
- Saarikangas, J., Zhao, H., und Lappalainen, P. (2010b). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiological Reviews*, 90(1), 259–289. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2009>
- Saksela, K., und Permi, P. (2012). SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Letters*, 586(17), 2609–2614. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.042>
- Santarpia, L., Lippman, S. M., und El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the MAPK/RAS/RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 103–119. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>
- Sarras, M. P. (2012). Components, structure, biogenesis and function of the Hydra extracellular matrix in regeneration, pattern formation and cell differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6–8), 567–576.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.113445ms>

- Sartorel, E., Unlu, C., Jose, M., Aurélie, M. L., Meca, J., Sibarita, J. B., und McCusker, D. (2018). Phosphatidylserine and GTPase activation control Cdc42 nanoclustering to counter dissipative diffusion. *Molecular Biology of the Cell*, 29(11), 1299–1310. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-01-0051>
- Schmidt, A., und Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: Turning on the switch. *Genes and Development*, 16(13), 1587–1609. <https://doi.org/10.1101/gad.1003302>
- Servant, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W., und Bourne, H. R. (2010). *Sci00-Akt-PH-GFP.pdf*. 287(5455), 1037–1040.
- Seybold, A., Salvenmoser, W., und Hobmayer, B. (2016). Sequential development of apical-basal and planar polarities in aggregating epitheliomuscular cells of Hydra. *Developmental Biology*, 412(1), 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.022>
- Shang, X., Marchioni, F., Sipes, N., Evelyn, C. R., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Seibel, W., Wortman, M., und Zheng, Y. (2012). Rational design of small molecule inhibitors targeting rhoa subfamily rho GTPases. *Chemistry and Biology*, 19(6), 699–710. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.05.009>
- Sheets, M. F., und Hanck, D. A. (2003). Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. *Journal of General Physiology*, 121(2), 163–175. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028651>
- Shewan, A., Eastburn, D. J., und Mostov, K. (2011a). Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004796>
- Shewan, A., Eastburn, D. J., und Mostov, K. (2011b). Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004796>
- Shimokawa, H., Sunamura, S., und Satoh, K. (2016). RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 118(2), 352–366. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306532>
- Shu, S., Liu, X., und Korn, E. D. (2005). *Blebbistatin and blebbistatin-inactivated myosin II inhibit myosin II-independent processes in Dictyostelium*.
- Sidhu, S. K., und Shawl, S. (o. J.). *on Benzocaine A P lergy in the United Kingdom*.
- Siebert, S., Anton-Erxleben, F., und Bosch, T. C. G. (2008). Cell type complexity in the basal metazoan Hydra is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. *Developmental Biology*, 313(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.007>
- Skår, M. W., Haugland, G. T., Powell, M. D., Wergeland, H. I., und Samuelsen, O. B. (2017). Development of anaesthetic protocols for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): Effect of anaesthetic concentrations, sea water temperature and body weight. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179344>
- Skruber, K., Read, T. A., und Vitriol, E. A. (2018). Reconsidering an active role for G-actin in cytoskeletal regulation. *Journal of cell science*, 131(1). <https://doi.org/10.1242/jcs.203760>
- Smith, B. D., Vail, K. J., Carroll, G. L., Taylor, M. C., Jeffery, N. D., Vemulapalli, T. H., und

- Elliott, J. J. (2018). Comparison of etomidate, benzocaine, and MS222 anesthesia with and without subsequent flunixin meglumine analgesia in african clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(2), 202–209.
- Srivastava, N., Sudan, R., und Kerr, W. G. (2013). Role of inositol poly-phosphatases and their targets in T cell biology. *Frontiers in Immunology*, 4(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00288>
- Storch, V., und Welsch, U. (2004). *Kükenthal Zoologisches Praktikum*. Springer Verlag.
- Straight, A. F. (2012). *Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a* 1743(2003). <https://doi.org/10.1126/science.1081412>
- Street, C. A., und Bryan, B. A. (2011). Rho kinase proteins-pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. *Anticancer Research*, 31(11), 3645–3657.
- Sudhop, S., Coulier, F., Bieller, A., Vogt, A., Hotz, T., und Hassel, M. (2004). Signalling by the FGFR-like tyrosine kinase, Kringelchen, is essential for bud detachment in *Hydra vulgaris*. *Development*, 131(16), 4001–4011. <https://doi.org/10.1242/dev.01267>
- Sun, H. Q., Yamamoto, M., Yin, H. L., Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., und Yin, H. L. (1999). *Regulatory Protein* *. 32, 33179–33183. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33179>
- Suryawanshi, A., Schaefer, K., Holz, O., Apel, D., Lange, E., Hayward, D. C., Miller, D. J., und Hassel, M. (2020). What lies beneath: *Hydra* provides cnidarian perspectives into the evolution of FGFR docking proteins. *Development Genes and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00427-020-00659-4>
- Suwalsky, M., Schneider, C., Villena, F., Norris, B., Cárdenas, H., Cuevas, F., und Sotomayor, C. P. (2004). Effects of the local anesthetic benzocaine on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Biophysical Chemistry*, 109(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2003.11.002>
- Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., und Hoseini, S. M. (2016). Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - Comparison with eugenol. *Aquaculture*, 464, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.028>
- Takahashi, T., Hayakawa, E., Koizumi, O., und Fujisawa, T. (2008). Neuropeptides and their functions in *Hydra*. *Acta Biologica Hungarica*, 59(SUPPL.), 227–235. <https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.Suppl.32>
- Takahashi, Toshio, Muneoka, Y., Lohmann, J., Lopez De Haro, M. S., Solleder, G., Bosch, T. C. G., David, C. N., Bode, H. R., Koizumi, O., Shimizu, H., Hatta, M., Fujisawa, T., und Sugiyama, T. (1997). Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in *hydra*: LWamide and PW families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1241–1246. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1241>
- Tan, X., Thapa, N., Choi, S., und Anderson, R. A. (2015). Emerging roles of PtdIns(4,5)P₂ - beyond the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 128(22), 4047–4056. <https://doi.org/10.1242/jcs.175208>
- Tardent. (1995). *Pierre Tardent all equipped with stinging cells (cnidocytes , nematocytes), which serve mainly in prey capture and defense . The secretory product of these cells is a most complicated extrusome consisting of a cyst containing a tubule and a liquid*

matri.

- Taylor, W. R. (1986). The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology*, 119(2), 205–218. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80075-3](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80075-3)
- Telford, M. J., Budd, G. E., und Philippe, H. (2015). Phylogenomic insights into animal evolution. *Current Biology*, 25(19), R876–R887. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.060>
- Thisse, B., und Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology*, 287(2), 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.011>
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., und Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Turwankar, A., und Ghaskadbi, S. (2019). VEGF and FGF signaling during head regeneration in hydra. *bioRxiv*, 596734. <https://doi.org/10.1101/596734>
- Vaidžiulytė, K., Coppey, M., und Schauer, K. (2019). Intracellular organization in cell polarity - placing organelles into the polarity loop. *Journal of cell science*, 132(24), 1–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.230995>
- Van Meer, G., Voelker, D. R., und Feigenson, G. W. (2009). Membrane lipids: where they are. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>. Membrane
- Vandekerckhove, J., Deboben, A., Nassal, M., und Wieland, T. (1985). The phalloidin binding site of F-actin. *The EMBO Journal*, 4(11), 2815–2818. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb04008.x>
- Várnai, P., und Balla, T. (2008). Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods*, 46(3), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.019>
- Vogg, M. C., Galliot, B., und Tsiairis, C. D. (2019). Model systems for regeneration: Hydra. *Development (Cambridge)*, 146(21). <https://doi.org/10.1242/dev.177212>
- Wang, H., Lo, W. T., und Haucke, V. (2019). Phosphoinositide switches in endocytosis and in the endolysosomal system. *Current Opinion in Cell Biology*, 59, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.011>
- Wang, X., Hills, L. B., und Huang, Y. H. (2015). Lipid and protein co-regulation of PI3K effectors Akt and I κ B in lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 6(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00117>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., und Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Webster, G., und Hamilton, S. (1972). Budding in hydra: the role of cell multiplication and cell movement in bud initiation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 27(2), 301–316.
- Wei, L., Surma, M., Shi, S., Lambert-Cheatham, N., und Shi, J. (2016). Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae*

Experimentalis, 64(4), 259–278. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0382-6>

Wenger, Y., Buzgariu, W., Perruchoud, C., Loichot, G., und Galliot, B. (2019). Generic and context-dependent gene modulations during Hydra whole body regeneration. *bioRxiv*, 587147. <https://doi.org/10.1101/587147>

Wheeler, A. P., und Ridley, A. J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental Cell Research*, 301(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.012>

Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J., Anton-Erxleben, F., und Bosch, T. C. G. (2006). Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *PNAS*, 6208–6211.

Wu, C. Y., Lin, M. W., Wu, D. C., Huang, Y. B., Huang, H. T., und Chen, C. L. (2014). The role of phosphoinositide-regulated actin reorganization in chemotaxis and cell migration. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5541–5554. <https://doi.org/10.1111/bph.12777>

Yarrow, J. C., Totsukawa, G., Charras, G. T., und Mitchison, T. J. (2005). *Screening for Cell Migration Inhibitors via Automated Microscopy Reveals a Rho-Kinase Inhibitor*. 12, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.01.015>

Yoshida, S., Bartolini, S., und Pellman, D. (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes and Development*, 23(7), 810–823. <https://doi.org/10.1101/gad.1785209>

X. Abkürzungsverzeichnis

- °C: Grad Celsius
- AA: *Amino acids*; Aminosäuren
- ABPs: Aktin-Binde-Proteine
- BTK: *Brutons' s tyrosine kinase*
- Cdc42: *cell division control protein 42*
- DAG: Diacylglycerin
- DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- DNA: *deoxyribonucleic acid*; Desoxyribonukleinsäure
- Ekto oder ek: Ektoderm / ektodermal
- Endo oder en: Endoderm (Entoderm) / endodermal (entodermal)
- F- Aktin: Filamentöses Aktin
- FGFR: *Fibroblast growth factor receptor*; Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor
- FGFs: *Fibroblast growth factor*; Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
- FITC: Fluoresceinisothiocyanat
- GFP: Grün fluoreszierendes Protein
- h: Stunden

- HM: Hydramedium
- IHC: Immunhistochemie
- IP₃: Inositoltrisphosphat
- I-Zellen: Interstitielle Stammzellen
- KB: Knospenbasis
- KS: Knospenstadium
- M: Molar
- MCMC: Markov-Chain-Monte-Carlo-Verfahren
- Mg: Mesogloea (Extrazelluläre Matrix der Cnidaria)
- min: Minuten
- mM: Millimolar
- PBS: *Phosphate buffered saline*; Phosphatgepufferte Salzlösung
- PBTw: PBS mit Tween20
- PBTx: PBS mit Triton X-100
- PI oder PtdIns: Phosphatidylinositol
- PIPs oder PtdInsPs: Phosphatidylinositolphosphate
- PtdIns(3,4,5)P₃ oder PIP₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
- PtdIns(4,5)P₂ oder PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
- RBD: Rho-Binde-Domäne
- Rho: Rac Homolog
- RNA: *ribonucleic acid*; Ribonukleinsäure
- ROCK: *Rho-associated protein kinase*
- sec: Sekunden
- TRITC: Tetramethylrhodamin

XI. Abbildungsverzeichnis

- **Abbildung 1:** Schematische Übersicht der Zelltypen anhand eines Längsschnittes der Körperwand von *Hydra*. (Seite 5)
- **Abbildung 2:** Schematische Übersicht des Modellorganismus *Hydra*. (Seite 6)
- **Abbildung 3:** Asexueller und sexueller Phänotyp bei *Hydra*. (Seite 7)
- **Abbildung 4:** Übersicht der Knospenstadien und einiger relevanter Signalwege der Knospungsphasen. (Seite 9)
- **Abbildung 5:** Schematische Darstellung eines typischen Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptors (FGFR). (Seite 12)
- **Abbildung 6:** Schematische Darstellung von FGF- Rezeptor abhängigen Signalwegen PLC γ , PI3K, Rho-ROCK-Myosin und MEK-ERK. (Seite 13)

- **Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Aktinpolymerisation und der Aktindepolymerisation. (Seite 14)
- **Abbildung 8:** Schematische Darstellung der zyklisch verlaufenden Aktivierung und Inaktivierung der Rho- GTPasen. (Seite 17)
- **Abbildung 9:** Schematische Darstellung der über PtdIns(3,4,5)P3 gesteuerte Aktinakkumulation an der Zellmembran. (Seite 18)
- **Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Synthese der sieben unterschiedlichen Phosphatidylinositolphosphate. (Seite 20)
- **Abbildung 11:** Schematische Darstellung der PtdIns(4,5)P2 abhängigen Regulierung der Aktinfilamente. (Seite 21)
- **Abbildung 12:** Schematische Darstellung PtdIns(4,5)P2 und PtdIns(3,4,5)P3 abhängiger Signalwege. (Seite 22)
- **Abbildung 13:** Zelluläre Lokalisation der GFP- markierten PtdInsP-GFP- Sensoren. (Seite 23)
- **Abbildung 14:** Darstellung der Proteindomänen der humanen Rho- GTPasen RhoA, RhoB und RhoC. (Seite 28)
- **Abbildung 15:** Darstellung der Proteindomänen der Rho- GTPasen Hv_Rho1 und Hv_Rho2 aus *Hydra*. (Seite 29)
- **Abbildung 16:** Darstellung der Proteindomänen der Rho- GTPase Hv_Rho3 aus *Hydra*. (Seite 30)
- **Abbildung 17:** Darstellung der Proteindomänen der Rho- GTPase Hv_Rho4 aus *Hydra*. (Seite 30)
- **Abbildung 18:** Darstellung des Alignments der untersuchten Rho- GTPasen aus Vertebraten- und Invertebraten Organismen. (Seite 31)
- **Abbildung 19:** Phylogenetischer Stammbaum (MrBayes, MCMC) der Rho- GTPase Proteinfamilien Rho, Rac, Cdc42 und RhoBTB. (Seite 34)
- **Abbildung 20:** Genexpressionsmuster von *hv_rho1*. (Seite 37)
- **Abbildung 21:** Genexpressionsmuster von *hv_rho2*. (Seite 39)
- **Abbildung 22:** Genexpressionsmuster von *hv_rho3*. (Seite 40)
- **Abbildung 23:** Genexpressionsmuster von *hv_rho4*. (Seite 41)
- **Abbildung 24:** Alignment der humanen RhoA- GTPase und der Rho- Proteine aus *Hydra*, zum Vergleich des Epitops des getesteten anti-RhoA- Antikörpers. (Seite 43)
- **Abbildung 25:** Darstellung des anti-RhoA- Antikörperepitops anhand der Proteinstruktur von Hs_RhoA und den vier Rho- GTPasen aus *Hydra*. (Seite 44)
- **Abbildung 26:** Antikörperfärbung des anti-RhoA- Antikörpers sowie Nachweis von F-Aktin mittels Phalloidin an unterschiedlichen Knospentadien. (Seite 45)
- **Abbildung 27:** Vergleich der berechneten Tertiärstruktur der humanen RhoABC- GTPasen mit Hv_Rho1-4 aus *Hydra*. (Seite 47)
- **Abbildung 28:** Analyse einer möglichen Bindungsfähigkeit der Rho-Binde-Domäne (RBD) aus Maus an die Rho- GTPasen *Hydra*. (Seite 50)

- **Abbildung 29:** Immunhistochemische Detektion des RBD-GFPs an Hydren mit unterschiedlichen Knospenstadien. (Seite 51)
- **Abbildung 30:** Detektion der Signalintensität der immunhistochemischen Färbung mittels RBD-GFP während des Knospungsprozesses bei *Hydra*. (Seite 52)
- **Abbildung 31:** Detektion des RBD-GFP- Signals und von F-Aktin mittels konfokaler-Laser-Scan- Mikroskopie anhand Hydren mit mittleren und späten Knospen. (Seite 54)
- **Abbildung 32:** Detektion des RBD-GFP- Signals und von F-Aktin mittels konfokaler-Laser-Scan- Mikroskopie an evaginierenden Tentakel von Jungpolypen. (Seite 55)
- **Abbildung 33:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktin und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. (Seite 57)
- **Abbildung 34:** Abnahme des RBD-GFP- Signals durch ein kontinuierliche 24-stündige Inhibition mit dem RhoA- Inhibitor Rhosin an Knospen mittleren Stadiums. (Seite 59)
- **Abbildung 35:** Analyse der Signalintensität des RBD-GFP- Signals entlang einer Messgeraden longitudinal durch auswachsende Knospen gelegt, nach Behandlung mit dem RhoA- Inhibitor Rhosin. (Seite 61)
- **Abbildung 36:** Immunhistochemische Vierfach- Färbung mit RBD-GFP, einem anti-RhoA- Antikörper, Phalloidin und DAPI. (Seite 62)
- **Abbildung 37:** Immunhistochemische Vierfach- Färbung mit RBD-GFP, einem anti-RhoA- Antikörper, Phalloidin und DAPI an der Knospenbasis von *Hydra*. (Seite 64)
- **Abbildung 38:** Nachweis der Kolo-kalisation des anti-RhoA- Antikörpers und der Aktinfasern an der Knospenbasis einer Knospe im Stadium 8-9. (Seite 65)
- **Abbildung 39:** Grafische Zusammenfassung der Proteindomänenstruktur von Trio und Kalirin anhand eines idealisierten momentan akzeptierten Stammbaums (Kratzer et al., 2019). (Seite 68)
- **Abbildung 40:** Phylogenetischer Stammbaum der Vertebraten und Invertebraten Trio- und Kalirin- Proteine. (Seite 69)
- **Abbildung 41:** Bewegungsanalyse des Süßwasserpolyphen nach Immobilisierung durch Linalool und Benzocain mittels 10 Sekunden dauernden Videos. (Seite 72)
- **Abbildung 42:** Veränderung der F-Aktinfaser- Bildung durch eine kontinuierliche Behandlung mit Linalool (1 mM) für 24 Stunden. (Seite 74)
- **Abbildung 43:** Einfluss einer zweistündigen Behandlung mit den unterschiedlichen Relaxantien auf die F-Aktinfasern bei *Hydra*. (Seite 77)
- **Abbildung 44:** Wolkendiagramm der Abweichung der Breite- und der Länge der Aktinfasern nach einer zweistündigen Immobilisierung mit unterschiedlichen Relaxantien. (Seite 80)
- **Abbildung 45:** Abweichung der Aktinfaserorientierung nach einer Behandlung mit den unterschiedlichen Relaxantien in Relation zur longitudinalen Achse in *Hydra*. (Seite 82)
- **Abbildung 46:** Graphische Darstellung des Knospungsverlaufes unter dem Einfluss des Relaxans Benzocain. (Seite 84)
- **Abbildung 47:** Graphische Darstellung des Knospungsverlaufes unter dem Einfluss des Relaxans Linalool. (Seite 85)

- **Abbildung 48:** Wundverschluss von *Hydra* unter dem Einfluss unterschiedlicher Behandlungs- Protokolle mit dem Relaxans Benzocain. (Seite 86)
- **Abbildung 49:** Wundverschluss von *Hydra* unter dem Einfluss unterschiedlicher Behandlungs- Protokolle mit dem Relaxans Linalool. (Seite 88)
- **Abbildung 50:** Schlupf von PtdInsP- Sensor transgenen Hydren. (Seite 92)
- **Abbildung 51:** Phänotypdefekte bei den PtdInsP-GFP- Negativkontrollen #60 und #64. (Seite 94)
- **Abbildung 52:** Pilzbefall der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren. (Seite 95)
- **Abbildung 53:** PtdIns(4,5)P2 (#59)- und der PtdIns(3,4,5)P3 (#63)- Sensor transgene Hydren mit normalem Phänotyp zur Etablierung von voll-transgenen *Hydra*-Linien. (Seite 96)
- **Abbildung 54:** Statistik der überzähligen Knospenanzahl der PtdInsP- Sensor transgenen Hydren. (Seite 97)
- **Abbildung 55:** Hellfeld- Mikroskopie der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren mit fehlerhafter Knospenablösung. (Seite 98)
- **Abbildung 56:** Reproduktionsrate der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Hydren. (Seite 99)
- **Abbildung 57:** Apikale Lokalisation des PtdIns(4,5)P2-GFP- Sensors. (Seite 101)
- **Abbildung 58:** Basale und basolaterale Lokalisation des PtdIns(3,4,5)P3-GFP Sensors. (Seite 103-104)
- **Abbildung 59:** Apikale Aufsicht auf ektodermale Epithelmuskelzellen von PtdIns(4,5)P2-GFP- Sensor- und PtdIns(3,4,5)P3-GFP- Sensor transgenen Hydren nahe des Hypostoms. (Seite 105)
- **Abbildung 60:** Signalintensität der PtdInsP-GFP- Sensoren (#59 und #63) und deren Kontrollen (#60 und #64) in ektodermalen Epithelmuskelzellen. (Seite 107)
- **Abbildung 61:** Translokalisierung des membranständigen PtdIns(4,5)P2-GFP- Sensors in das Zytoplasma der Zellen an der Knospenbasis von *Hydra*. (Seite 109)
- **Abbildung 62:** Signalintensität des PtdIns(4,5)P2-GFP- Sensorsignals an der Knospenbasis. (Seite 111)
- **Abbildung 63:** Translokalisierung des PtdIns(3,4,5)P3-GFP- Sensors in das Zytoplasma von Zellen an der Regeneration induzierenden Schnittstelle. (Seite 113)
- **Abbildung 64:** Schematische Übersicht der *hv_rho1-4* Expressionsmuster und möglicher Funktionen in *Hydra*. (Seite 118)
- **Abbildung 65:** Schematische Übersicht der FGFR-Rho-ROCK-Myosin II- Inhibition in *Hydra*. (Seite 121)
- **Abbildung 66:** Schematische Übersicht der Rho- Aktivierung, der vermuteten Rho-vermittelten Signalgebung in *Hydra* und der Detektion des aktiven Rhos mittels RBD-GFP. (Seite 126)
- **Abbildung 67:** Möglicher Einfluss der Relaxation auf das Aktinzytoskelett und die Zell-Zell-Verbindungen in *Hydra*. (Seite 132)
- **Abbildung 68:** Schematische Darstellung der Bindung des Sensors (#59) an das membranständige PtdIns(4,5)P2 sowie die Detektion des zytoplasmatischen IP3. (Seite 134)

- **Abbildung 69:** Schematische Übersicht der zellulären Verteilung der PtdInsP und deren Regulationsmöglichkeiten des Aktinzytoskeletts anhand einer ektodermalen Epithelmuskelzelle in *Hydra*. (Seite 137)
- **Abbildung 70:** Schematische Darstellung der Bindung des Sensors (#63) an das membranständige PtdIns(3,4,5)P₃, sowie die Detektion des zytoplasmatischen IP₄. (Seite 148)
- **Abbildung 71:** Vergleich der Phänotypen der PtdInsP-GFP- Sensor transgenen Tieren mit den Phänotypen hervorgerufen durch eine LiCl- Behandlung. (Seite 141)
- **Abbildung 72:** Vergleich des Vertebraten PLC δ -PH-GFP (#59)- Sensorkonstrukts in HEK293-Zellkultur- Zellen mit der Expression des Sensors in ektodermalen transgenen Epithelmuskelzellen in *Hydra*. (Seite 143)
- **Abbildung 73:** Grafische Darstellung der PtdInsP-GFP- Sensorstrukture und der Primerposition für die Sensoren #59, #60, #63 und #64. (Seite 168)
- **Abbildung 74:** Klonierungsstrategie der Sensoren #59, #60, #63 und #64. (Seite 169)
- **Abbildung 75:** Schematische Darstellung der definierten Regenerationsstadien (RS) I bis IV. (Seite 182)
- **Abbildung 76:** Versuchsschemata (VS) der Regeneration unter Einfluss der Relaxantien Benzocain oder Linalool. (Seite 183)

XII. Tabellenverzeichnis

- **Tabelle 1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen RhoABC und der Rho-GTPasen Hv_Rho1-4 aus *Hydra*. (Seite 33)
- **Tabelle 2:** Vergleich der berechneten Unterschiede in der Proteinstruktur der Vertebraten- und Invertebraten- Rho- GTPasen. (Seite 49)
- **Tabelle 3:** Untersuchung der Relaxantien Magnesiumchlorid, Lidocain, Benzocain und Linalool. (Seite 71)
- **Tabelle 4:** Prozentuale Abweichung der Aktinfaserorientierung von der longitudinalen Achse durch Hydra nach einer zweistündigen Immobilisierung mit unterschiedlichen Relaxantien. (Seite 83)
- **Tabelle 5:** Ansatz der Hybridisierungslösung für die *in-situ*-Hybridisierung (beispielhaft für einen 10 ml Ansatz). (Seite 160)
- **Tabelle 6:** Komponenten der *Insert*-PCR zur Sondensynthese. (Seite 162)
- **Tabelle 7:** PCR-Programm der *Insert*-PCR zur Sondensynthese. (Seite 162)
- **Tabelle 8:** Ansatz der Sondensynthese. (Seite 162)
- **Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten PtdInsP-GFP- Sensorstrukture. (Seite 167)
- **Tabelle 10:** Verwendeten Primer der PtdInsP-GFP- Sensorstrukture. (Seite 167)
- **Tabelle 11:** Ansatz der *Insert*- PCR mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (50 μ l). (Seite 171)
- **Tabelle 12:** PCR Programm der *Insert*- PCR. (Seite 171)
- **Tabelle 13:** Ansatz des Restriktionsverdau der Plasmide. (Seite 175)

- **Tabelle 14:** 10 µl Ansatz eines Restriktionsverdau des LigAF- Expressionsvektors. (Seite 178)
- **Tabelle 15:** 20 µl Ansatz eines Restriktionsverdau der PtdInsP-GFP- Sensoren. (Seite 178)
- **Tabelle 16:** Ligationsansatz der PtdInsP-GFP- Sensoren und des LigAF- Expressionsvektors. (Seite 178)
- **Tabelle 17:** Ansatz des Restriktionsverdau der PtdInsP-GFP- Sensoren im LigAF- Expressionsvektor mit EcoRI und XhoI. (Seite 179)

XIII. Anhangsverzeichnis

- **Anhang 1:** Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Invertebraten Rho-GTPasen (Holz et al., 2017). (Seite 208)
- **Anhang 2:** Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Vertebraten Rho-GTPasen (Holz et al., 2017). (Seite 209)
- **Anhang 3:** Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Trio und Kalirin Proteine – Teil 1 (Kratzer et al., 2019). (Seite 210)
- **Anhang 4:** Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Trio Kalirin Proteine –Teil 2 (Kratzer et al., 2019). (Seite 211)
- **Anhang 5:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Nach zwei und drei Stunden. (Seite 212)
- **Anhang 6:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Nach sechs und acht Stunden. (Seite 213)
- **Anhang 7:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Nach 14 und 20 Stunden. (Seite 214)
- **Anhang 8:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Nach 24 und 30 Stunden. (Seite 215)
- **Anhang 9:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. (Seite 216)
- **Anhang 10:** Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Nach 40 und 48 Stunden. (Seite 217)
- **Anhang 11:** Aktinfasern in der Körpersäule von *Hydra* während einer kontinuierlichen sechsständigen Behandlung mit MgCl₂ (0,4 M). (Seite 218)
- **Anhang 12:** Vektorkarte des Klonierungsvektors pJET1.2/blunt (Thermo scientific). (Seite 219)
- **Anhang 13:** Vektorkarte des Hydra-spezifischen Expressionsvektors LigAF (AG Prof. Dr. Thomas Bosch; Zoologisches Institut; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). (Seite 219)
- **Anhang 14:** Vektorkarte des Sensors PLCδ-PH-eGFP (#59) (von Prof. Dr. Dominik Oliver). (Seite 220)

- **Anhang 15:** Vektorkarte des Sensors PLC δ -PH-eGFP (#60) (von Prof. Dr. Dominik Oliver). (Seite 221)
- **Anhang 16:** Vektorkarte des Sensors Btk-PH-eGFP (#63 und #64) (von Prof. Dr. Dominik Oliver). (Seite 221)
- **Anhang 17:** Vektorkarte des Vektors pGEM-T Easy (Promega). (Seite 222)
- **Anhang 18:** Vektorkarte des Vektors H10 RBD-GFP (von Prof. Dr. Robert Grosse). (Seite 222)
- **Anhang 19:** Anhang zu den PtdInsP-GFP- Sensoren. (Seite 223)
- **Anhang 20:** Phänotypen der PtdInsP- Sensor transgenen Hydren. (Seite 224)
- **Anhang 21:** Alignment der Trio- und Kalirin- Sequenzen (Teil 1). (Seite 225)
- **Anhang 22:** Alignment der Trio- und Kalirin- Sequenzen (Teil 2). (Seite 226)
- **Anhang 23:** Alignment der Trio- und Kalirin- Sequenzen (Teil 3). (Seite 237)
- **Anhang 24:** Informationen zu den verwendeten Inhibitoren. (Seite 228)
- **Anhang 25:** Tabellarische Darstellung der Daten des Knospungsprozesses unter Einfluss der Relaxantien Benzocain oder Linalool. (Seite 229)
- **Anhang 26:** Kontinuierliche Behandlung mit Rhosin führt zu der Reduktion der Tentakel bei *Hydra* und der Knospe. (Seite 230)
- **Anhang 27:** Kontinuierliche Immobilisierung mit Linalool führt zu einem Lollipop- artigen Phänotyp bei *Hydra*. (Seite 230)
- **Anhang 28:** Strukturformel des Relaxans Benzocain (Quelle: sigmaaldrich.com). (Seite 231)
- **Anhang 29:** Strukturformel des Relaxans Lidocain (Quelle: sigmaaldrich.com). (Seite 231)
- **Anhang 30:** Korrekte Klonierung des PtdIns(4,5)P₂- Sensors (#59) und der Negativkontrolle (#60). (Seite 232)
- **Anhang 31:** Korrekte Klonierung des PtdIns(3,4,5)P₃- Sensors (#63) und der Negativkontrolle (#64). (Seite 233)

XIV. Anhang

Anhang 1: Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Invertebraten Rho- GTPasen (Holz et al., 2017).

A Phylum	Spezies	Protein-Sequenzen und Accession-Nummern							
		Rho	Acc. Nr.	Cdc42	Acc. Nr.	Rac	Acc. Nr.	Rnd	Acc. Nr.
Cnidaria	<i>Hydra vulgaris</i>	Hv_Rho1	XP_002156827.1	Hv_Cdc42	XP_004209147.2	Hv_Rac	XP_002158815.1	/	/
		Hv_Rho2	XP_012555672.1						
		Hv_Rho3	XP_012565650.1						
		Hv_Rho4	XP_002158739.1						
		Hv_RhoBTB	XP_002164975.1						
	<i>Nematostella vectensis</i>	Nv_Rho	XP_001631528.1	Nv_Cdc42	XP_001629535.1	Nv_Rac	XP_001630599.1	/	/
Nv_RhoBTB		XP_001629193.1							
Platyhelminthes	<i>Echinococcus granulosus</i>	Egr_Rho	EUB61455.1	Egr_Cdc42	EUB64783.1	Egr_Rac	EUB57999.1	/	/
	<i>Schistosoma haematobium</i>	Sh_Rho	XP_012797376.1	/	/	Sh_Rac	XP_012802366.1	/	/
	<i>Clonorchis sinensis</i>	Cs_Rho	GAA48944.1	Cs_Cdc42	GAA50705.1	Cs_Rac	GAA50315.1	/	/
	<i>Dugesia japonica</i>	Dj_Rho	ADZ73519.1	/	/	/	/	/	/
Chordata	<i>Oikopleura dioica</i>	Od_Rho	CBY40590.1	Od_Cdc42	CBY19799.1	/	/	/	/
	<i>Branchiostoma floridae</i>	Bf_Rho	XP_002613109.1	Bf_Cdc42	XP_002591633.1	Bf_Rac	XP_002602229.1	Bf_Rnd	XP_002599495.1
Echinodermata	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Sp_Rho	NP_001229608.1	Sp_Cdc42	NP_001229607.1	Sp_Rac	P_001229596.1	/	/
Mollusca	<i>Lottia gigantea</i>	Lg_Rho	XP_009058822.1	Lg_Cdc42	XP_009045752.1	Lg_Rac	XP_009045529.1	/	/
Annelida	<i>Capitella teleta</i>	Ct_Rho	ELT89915.1	Ct_Cdc42	ELT99896.1	Ct_Rac	ELU15297.1	/	/
	<i>Helobdella robusta</i>	Hr_Rho	XP_009025166.1	Hr_Cdc42	XP_009013497.1	Hr_Rac	XP_009027241.1	/	/
Insecta	<i>Tribolium castaneum</i>	Tc_Rho	NP_001158356.1	Tc_Cdc42	XP_966688.1	Tc_Rac	XP_968397.1	/	/
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dm_Rho	NP_477098.1	Dm_Cdc42	NP_523414.1	Dm_Rac	NP_476950.1	/	/
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ce_Rho	NP_502959.1	Ce_Cdc42	NP_495598.1	Ce_Rac	NP_500363.1	/	/

Anhang 2: Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Vertebraten Rho- GTPasen (Holz et al., 2017).

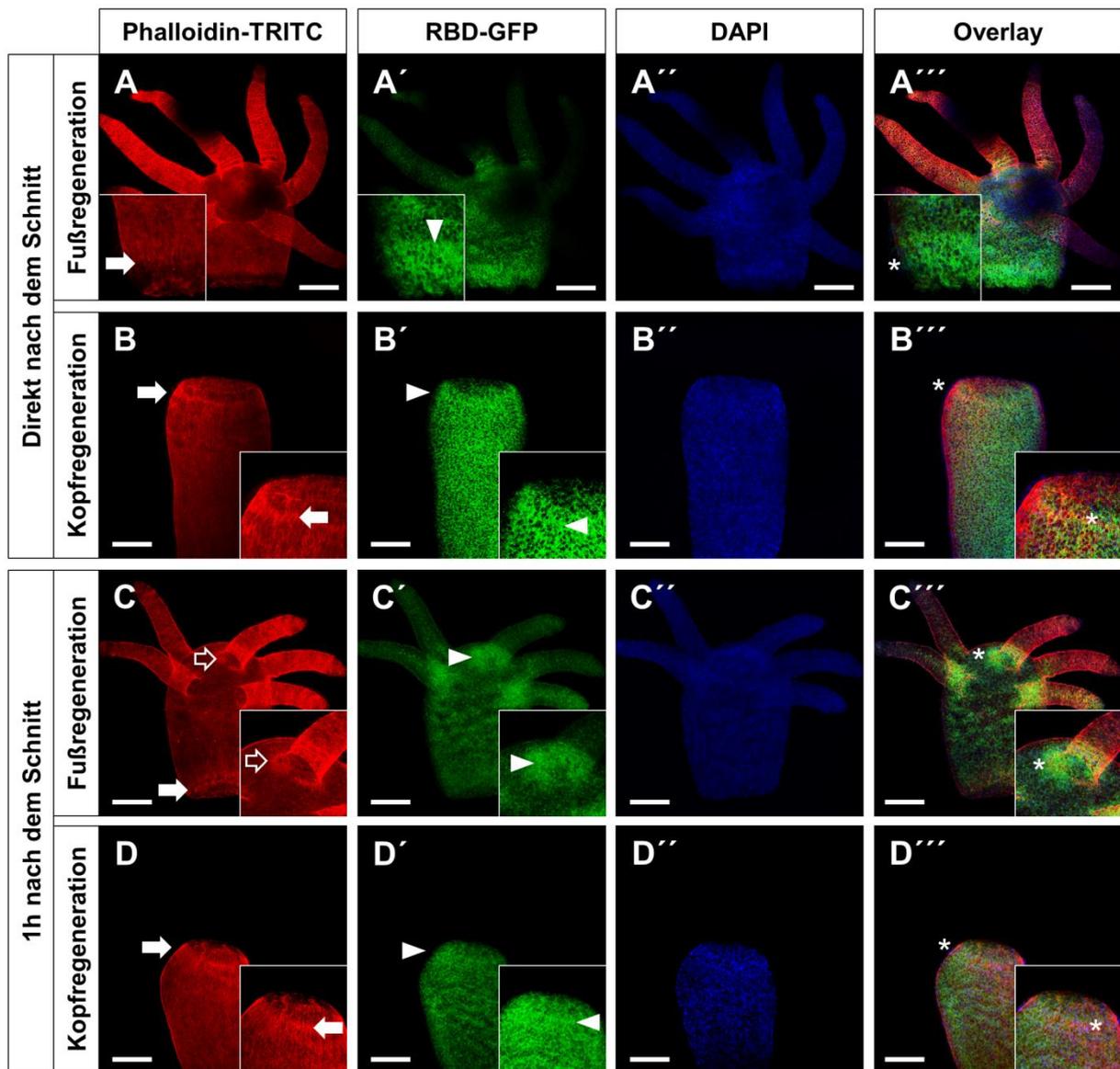
B Phylum	Spezies	Protein-Sequenzen und Accession-Nummern												
		Rho	Acc. Nr.	Cdc42	Acc. Nr.	Rac	Acc. Nr.	Rnd	Acc. Nr.					
Vertebrata	<i>Homo sapiens</i>	Hs_RhoA	AAM21117.1	Hs_Cdc42	AAM21109.1	Hs_Rac	NP_008839.2	Hs_Rnd1	BAB1785 1.1					
		Hs_RhoB	CAA29968.1											
		Hs_RhoC	AAM21119.1											
		Hs_RhoD	AAM21120.1					Hs_Rnd2	sp P5219 8.2					
		Hs_RhoF	NP_061907.2											
		Hs_RhoG	AAM21121.1											
		Hs_RhoH	NP_001265296.1											
		Hs_RhoJ	NP_065714.1											
		Hs_RhoQ	NP_036381.2											
		Hs_RhoU	NP_067028.1											
		Hs-RhoBTB	NP_055651.1					Hs_Rnd3	sp P6158 7.1					
	Xl_RhoA	AAD40671.1												
	Xl_RhoB	NP_001089930.1												
	Xl_RhoC	NP_001079639.1	Xl_Cdc42	XP_018079744.1	Xl_Rac	NP_001089332.1	Xl_Rnd1	NP_001080385.1						
	Xl_RhoF	NP_001088626.1												
	Xl_RhoG	XP_018105970.1												
	Xl_RhoH	XP_018098163.1												
	Xl_RhoJ	NP_001086125.1												
	Xl_RhoQ	XP_018120527.1												
	Xl_RhoB TB	NP_001085679.1												
	Dr_RhoA	AAI65903.1							Dr_Cdc42	NP_001018130.1	Dr_Rac	NP_956065.1	Dr_Rnd1	AAH76094.1
	Dr_RhoB	NP_998515.1												
	Dr_RhoC	NP_001002445.1												
	Dr_RhoF	CAK10780.1												
	Dr_RhoG	NP_956334.1												
	Dr_RhoH	NP_001314902.1												
	Dr_RhoJ	NP_001038266.1												
	Dr_RhoQ	NP_956112.1												
	Dr_RhoU	NP_001007444.1												
	Dr_RhoBTB	XP_003199615.1												

Anhang 3: Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Trio und Kalirin Proteine – Teil 1 (Kratzer et al., 2019).

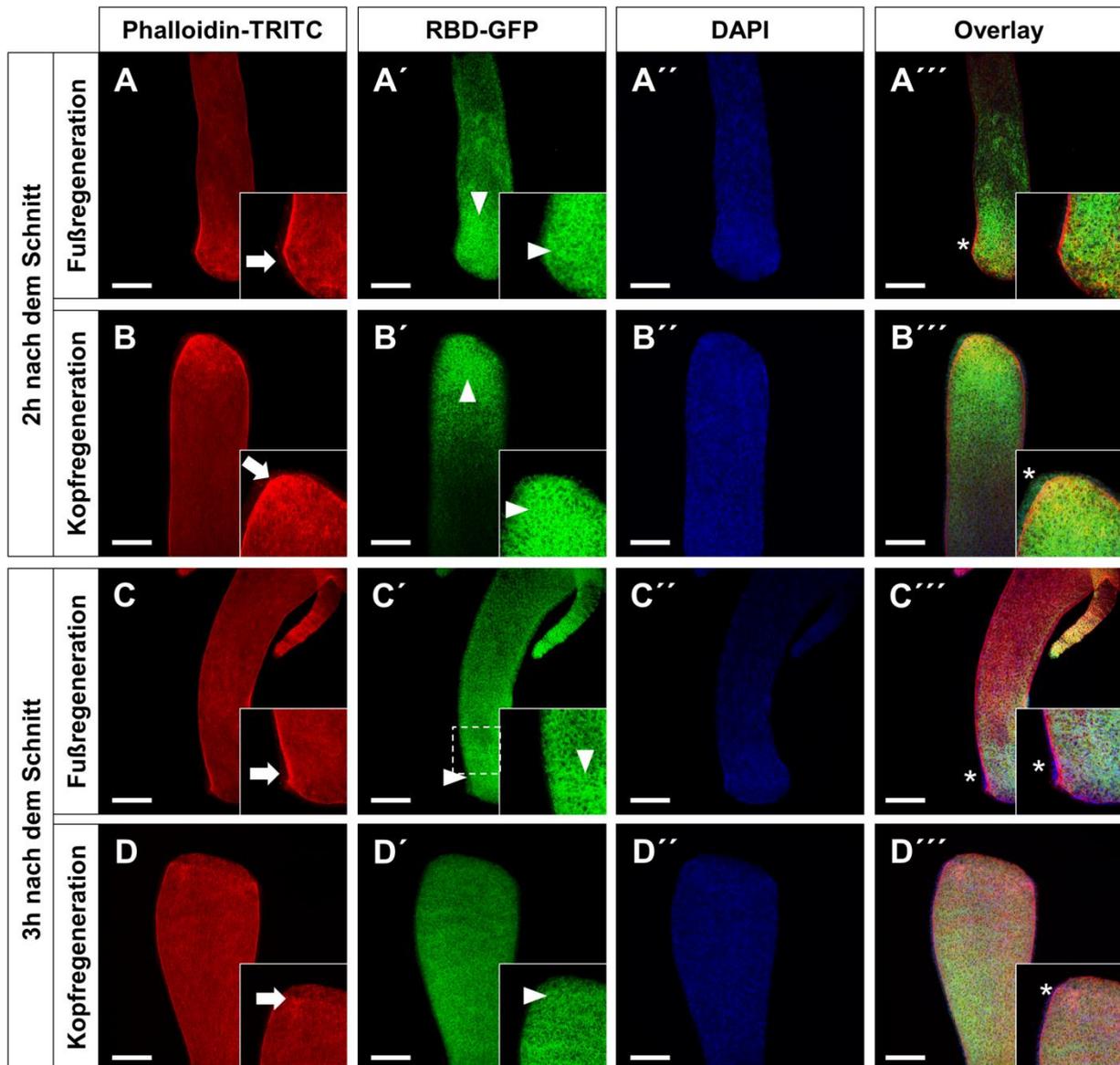
Spezies	Name	Accession-Nummer und Datenbank	Abkürzung
<i>Homo sapiens</i>	triple functional domain protein, PTPRF-interacting protein	NP_009049.2 (NCBI)	Hs TRIO
	kalirin isoform 1	NP_001019831.2 (NCBI)	Hs KALRN
<i>Xenopus laevis</i>	PREDICTED: triple functional domain protein	XP_018122338.1 (NCBI)	XI TRIO
	kalirin RhoGEF kinase (L-Form)	XB-GENE-1014011 (Xenbase)	XI KALRN.L
	kalirin RhoGEF kinase (S-Form)	XB-GENE-17339175 (Xenbase)	XI KALRN.S
<i>Xenopus tropicalis</i>	triple functional domain protein	NP_001123393.1 (NCBI)	Xt TRIO
	PREDICTED: kalirin-like	XP_017945506.1 (NCBI)	Xt KALRN1
	PREDICTED: kalirin, RhoGEF kinase isoform X1	XP_012825853.1 (NCBI)	Xt KALRN2
<i>Rattus norvegicus</i>	PREDICTED: triple functional domain protein isoform X1	XP_003753588.1 (NCBI)	Rn TRIO
	kalirin	NP_114451.2 (NCBI)	Rn KALRN
<i>Mus musculus</i>	triple functional domain protein	NP_001074771.1 (NCBI)	Mm TRIO
	kalirin isoform 1	NP_796331.2 (NCBI)	Mm KALRN
<i>Gallus gallus</i>	triple functional domain protein isoform X1	XP_015137712.1 (NCBI)	Gg TRIO
	kalirin isoform X1	XP_015145460.1 (NCBI)	Gg KALRN
<i>Danio rerio</i>	triple functional domain protein	NP_001097996.1 (NCBI)	Dr TRIO
	kalirin isoform X1	XP_017213230.1 (NCBI)	Dr KALRN
<i>Hydra vulgaris</i>	PREDICTED: triple functional domain protein-like	XP_002153877.3 (NCBI)	Hv KALRN_like1
<i>Capitella teleta</i>	hypothetical protein CAPTEDRAFT_170935	ELU10048.1 (NCBI)	Ct TRIO_like
<i>Drosophila melanogaster</i>	trio, isoform A	NP_651960.2 (NCBI)	Dm TRIO_like
<i>Caenorhabditis elegans</i>	uncharacterized protein CELE_F55C7.7	NP_001021496.1 (NCBI)	UNC-73
<i>Lottia gigantea</i>	hypothetical protein LOTGIDRAFT_220800	XP_009063066.1 (NCBI)	Lg TRIO_like
<i>Branchiostoma belcheri</i>	PREDICTED: kalirin-like	XP_019618116.1 (NCBI)	Bb KALIRIN
<i>Tribolium castaneum</i>	Triple functional domain protein-like Protein	KYB28883.1 (NCBI)	Tc TRIO_like
	PREDICTED: kalirin isoform X4	XP_015833084.1 (NCBI)	Tc KALRN
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	PREDICTED: kalirin-like	XP_006819276.1 (NCBI)	Sk KALRN
<i>Acanthaster planci</i>	kalirin-like	XP_022094000.1 (NCBI)	Ap KALRN

Anhang 4: Tabellarische Darstellung der Accession-Nummern der Trio Kalirin Proteine – Teil 2 (Kratzer et al., 2019).

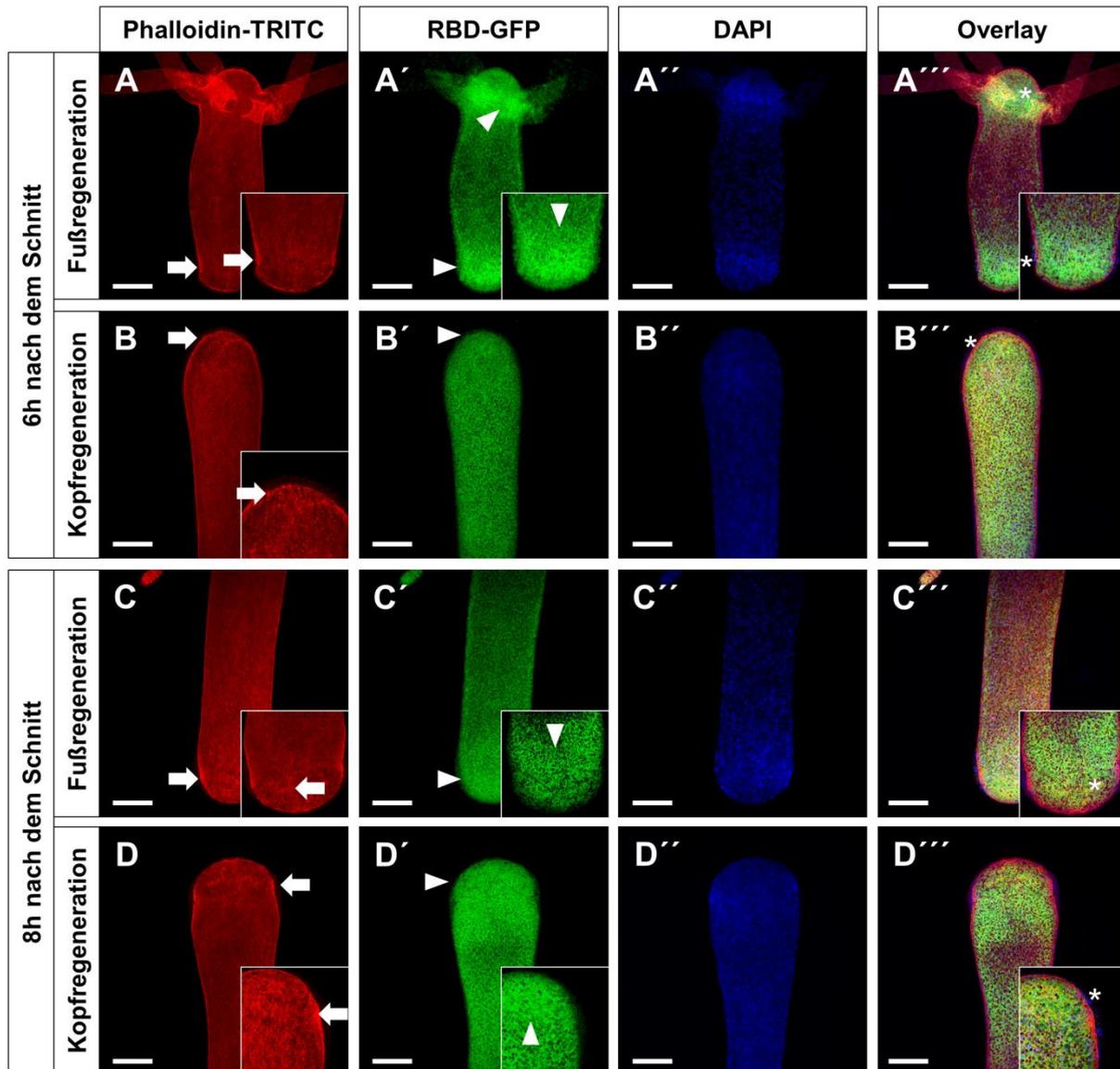
<u>Spezies</u>	<u>Name</u>	<u>Accession-Nummer und Datenbank</u>	<u>Abkürzung</u>
<i>Frankliniella occidentalis</i>	kalirin isoform X2	XP_026272418.1 (NCBI)	Fo KALRN_like
<i>Athalia rosae</i>	kalirin isoform X2	XP_012266030.1 (NCBI)	Ar KALRN_like
<i>Athalia rosae</i>	triple functional domain protein isoform X5	XP_012266033.1 (NCBI)	Ar TRIO_like
<i>Cephus cinctus</i>	triple functional domain protein isoform X6	XP_015585808.1 (NCBI)	Cc KALRN_like
<i>Cephus cinctus</i>	triple functional domain protein isoform X11	XP_015585812.1 (NCBI)	Cc TRIO_like
<i>Wasmannia auropunctata</i>	PREDICTED: kalirin isoform X3	XP_011691928.1 (NCBI)	Wa TRIO_like
<i>Fopius arisanus</i>	PREDICTED: triple functional domain protein isoform X2	XP_011315279.1 (NCBI)	Fa KALRN
<i>Diachasma alloeum</i>	PREDICTED: triple functional domain protein isoform X1	XP_015125607.1 (NCBI)	Da TRIO_like
<i>Ciona intestinalis</i>	hypothetical protein CAPTEDRAFT_170935	XP_002125003.3 (NCBI)	Ci TRIO_like
<i>Hydra vulgaris</i>	PREDICTED: kalirin-like	XP_012559711.1 (NCBI)	Hv KALRN_like2
<i>Trichoplax adhaerens</i>	hypothetical protein TRIADDRAFT_54394	XP_002110939.1 (NCBI)	Ta TRIO_like
<i>Amphimedon queenslandica</i>	PREDICTED: kalirin-like	XP_019858474.1 (NCBI)	Aq TRIO_like



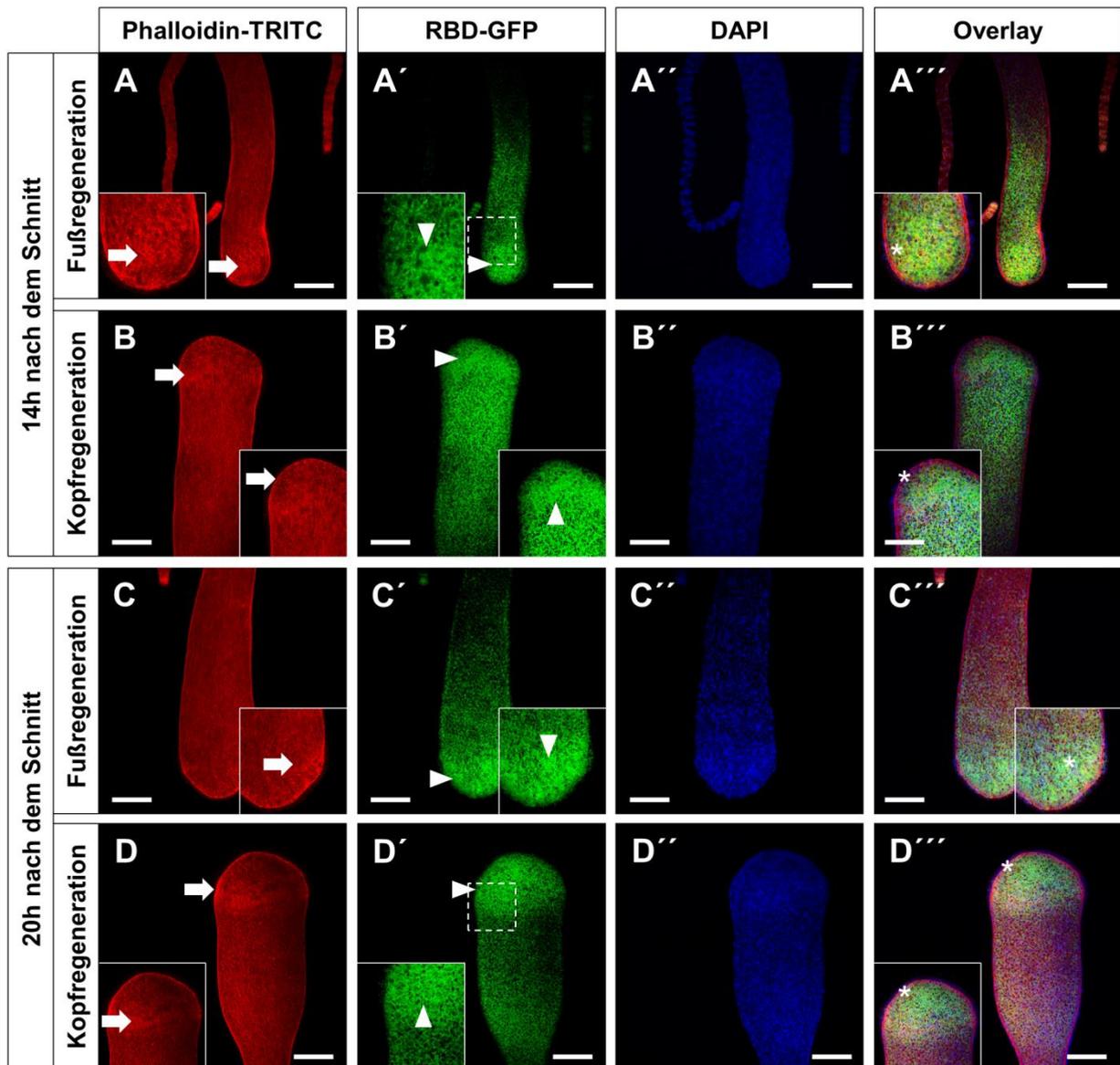
Anhang 5: Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Die Proben wurden unmittelbar und eine Stunde nach dem zugeführten Schnitt fixiert. (A-D) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A'-D') Detektion des RBD-GFP- Signals. Gradueller Verlauf des RBD-GFP- Signals (lotrechte weiße Pfeilköpfe). Verstärktes RBD-GFP- Signal (horizontale weiße Pfeilköpfe). (A''-D'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-D''') Overlay der Kanäle zur Detektion von Kolo-kalisation (Sterne). Maßstabsbalken: 250 μ m.



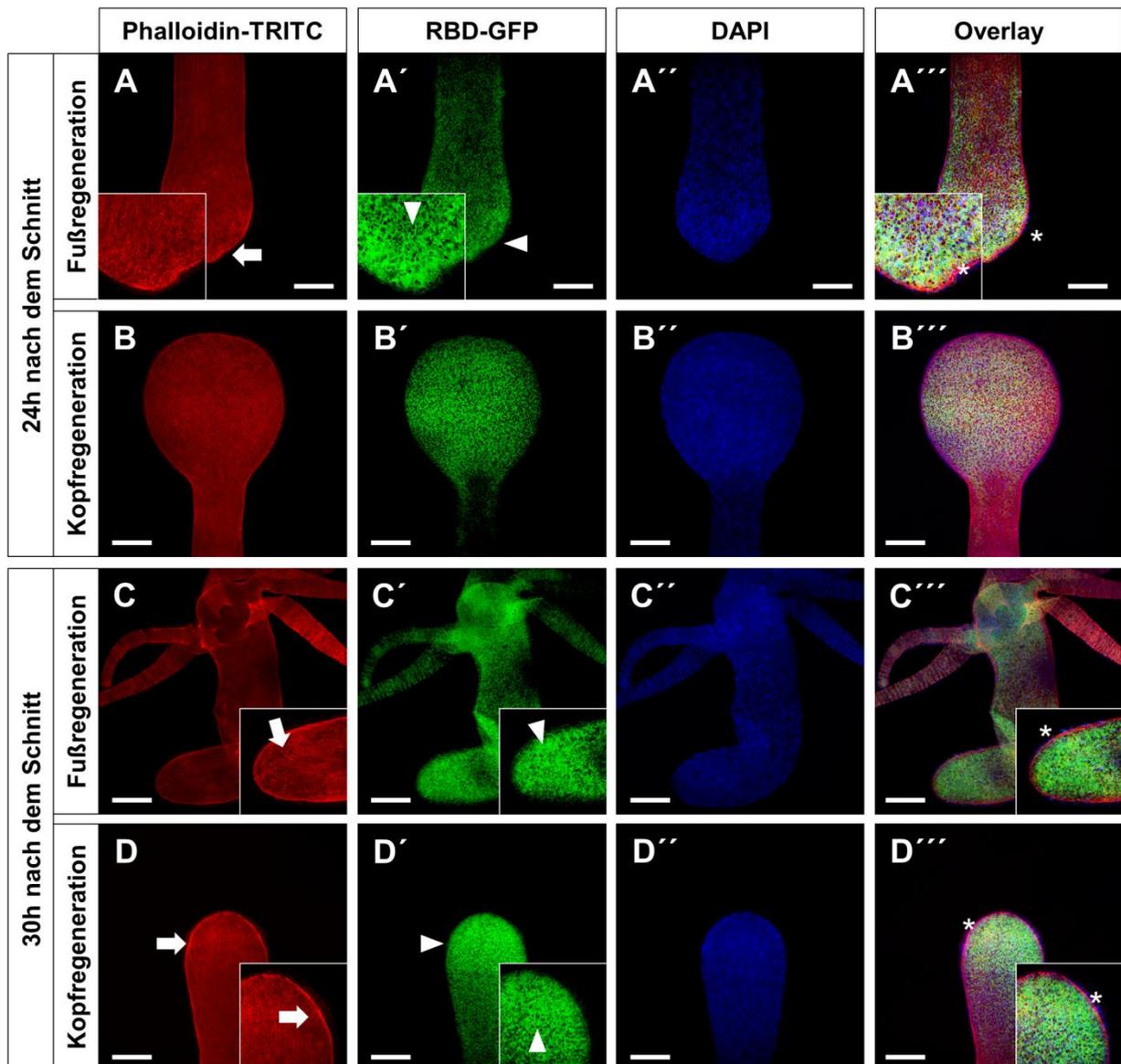
Anhang 6: Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Die Proben wurden zwei und drei Stunde nach dem zugeführten Schnitt fixiert. (A-D) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A'-D') Detektion des RBD-GFP- Signals. Gradueßer Verlauf des RBD-GFP- Signals (lotrechte weiße Pfeilköpfe). Verstärktes RBD-GFP- Signal (horizontale weiße Pfeilköpfe). (A''-D'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-D''') Overlay der Kanäle zur Detektion von Kolokalisation (Sterne). Maßstabsbalken: 250 μ m.



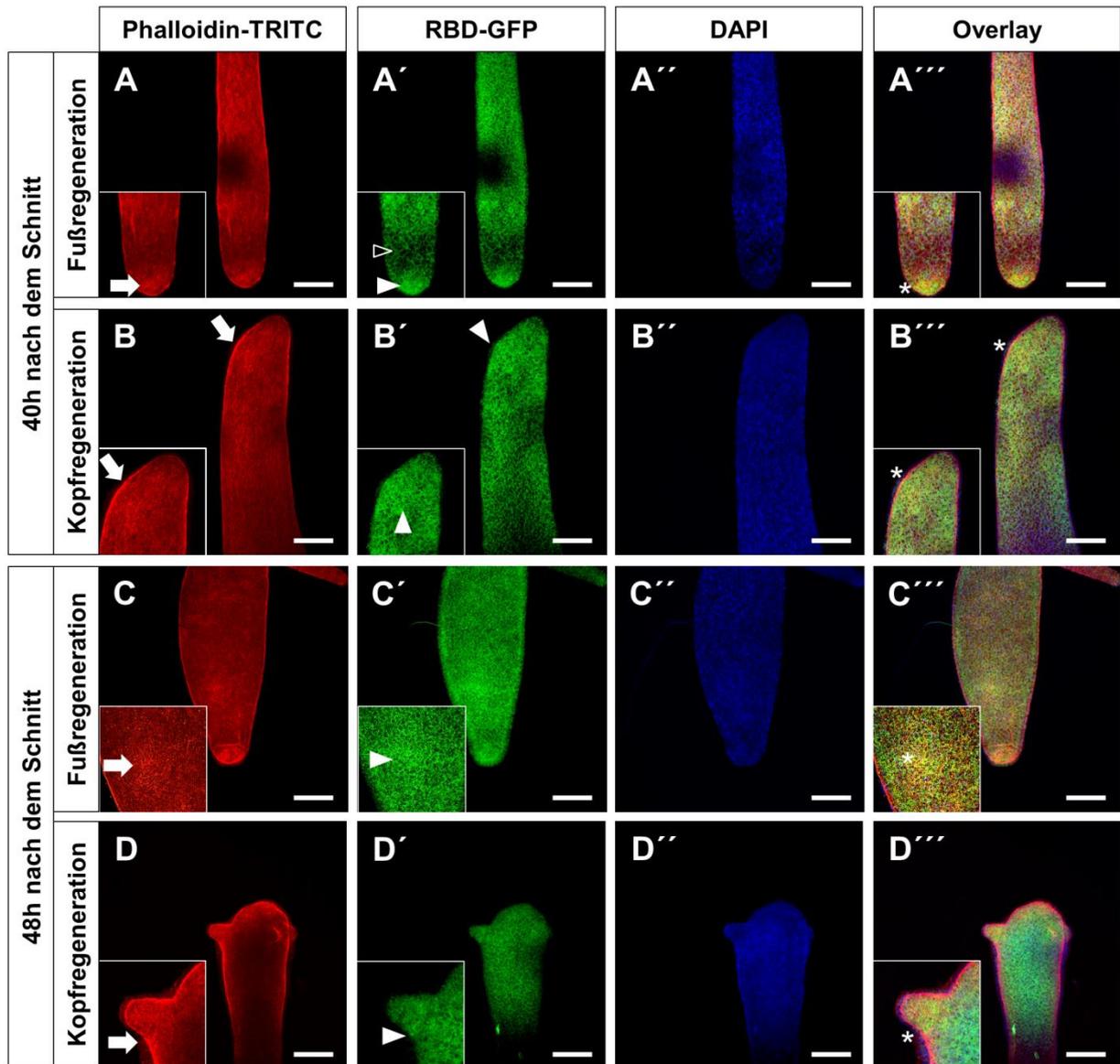
Anhang 7: Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Die Proben wurden sechs und acht Stunde nach dem zugeführten Schnitt fixiert. (A-D) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A'-D') Detektion des RBD-GFP- Signals. Gradueßer Verlauf des RBD-GFP- Signals (lotrechte weiße Pfeilköpfe). Verstärktes RBD-GFP- Signal (horizontale weiße Pfeilköpfe). (A''-D'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-D''') Overlay der Kanäle zur Detektion von Kolokalisation (Sterne). Maßstabsbalken: 250 μ m.



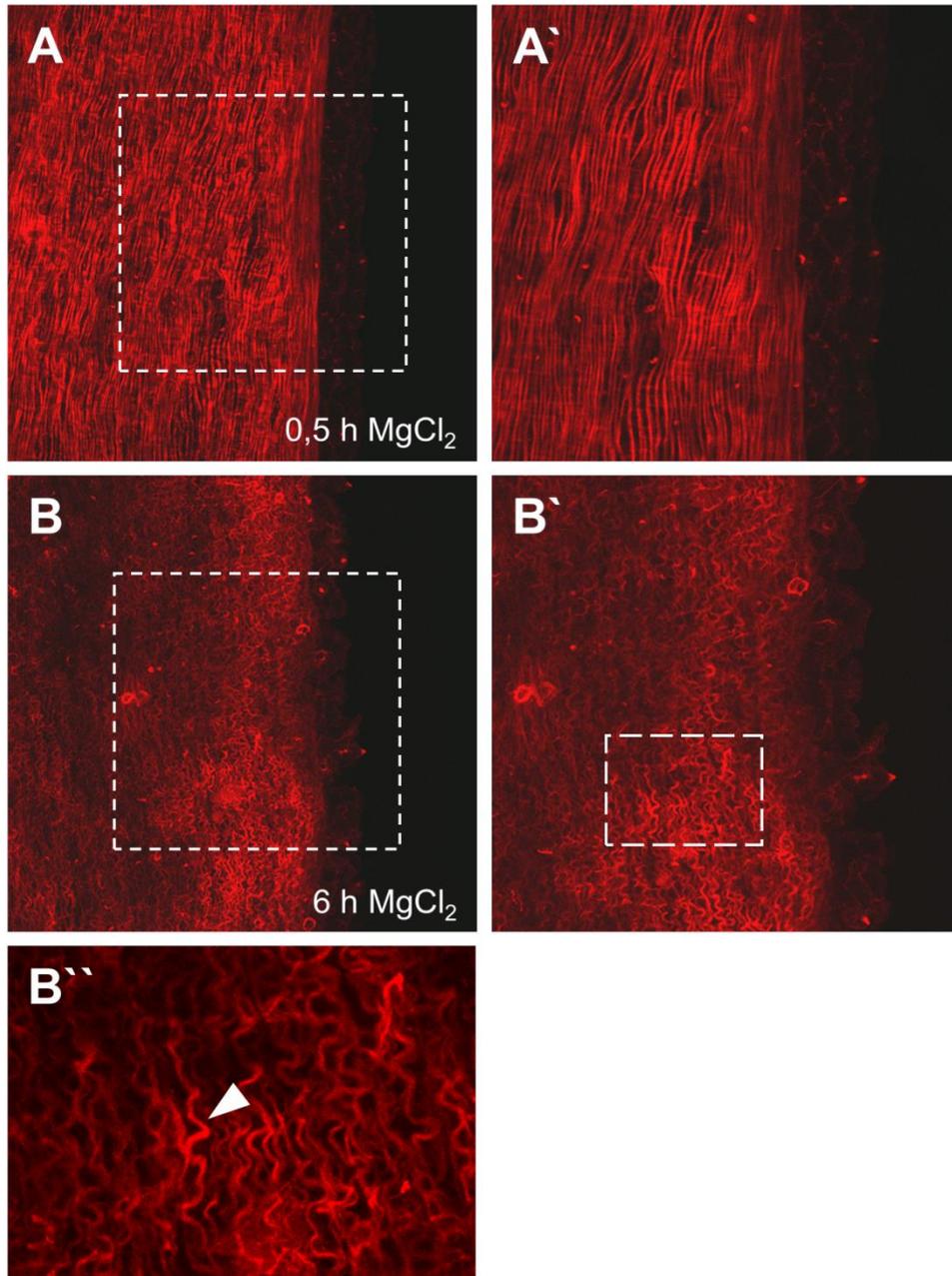
Anhang 8: Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Die Proben wurden 14 und 20 Stunde nach dem zugeführten Schnitt fixiert. (A-D) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A'-D') Detektion des RBD-GFP- Signals. Gradueßer Verlauf des RBD-GFP- Signals (lotrechte weiße Pfeilköpfe). Verstärktes RBD-GFP- Signal (horizontale weiße Pfeilköpfe). (A''-D'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-D''') Overlay der Kanäle zur Detektion von Kolokalisation (Sterne). Maßstabsbalken: 250 μ m.



Anhang 9: Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Die Proben wurden 24 und 30 Stunde nach dem zugeführten Schnitt fixiert. (A-D) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A'-D') Detektion des RBD-GFP- Signals. Gradueßer Verlauf des RBD-GFP- Signals (lotrechte weiße Pfeilköpfe). Verstärktes RBD-GFP- Signal (horizontale weiße Pfeilköpfe). (A''-D'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-D''') Overlay der Kanäle zur Detektion von Kolokalisation (Sterne). Maßstabsbalken: 250 µm.

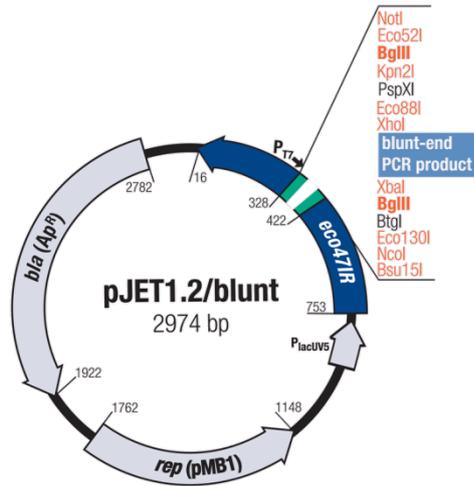


Anhang 10: Immunhistochemische Detektion von RBD-GFP, F-Aktins und der Zellkerne an Kopf- und Fußregeneraten. Die Proben wurden 40 und 48 Stunde nach dem zugeführten Schnitt fixiert. (A-D) Färbung des F-Aktins mittels Phalloidin. Akkumulation oder Reorientierung des F-Aktins (weiße Pfeile). (A'-D') Detektion des RBD-GFP- Signals. Gradueller Verlauf des RBD-GFP- Signals (lotrechte weiße Pfeilköpfe). Verstärktes RBD-GFP- Signal (horizontale weiße Pfeilköpfe). (A''-D'') Färbung der Zellkerne mittels DAPI. (A'''-D''') Overlay der Kanäle zur Detektion von Kolo-kalisation (Sterne). Maßstabsbalken: 250 µm.

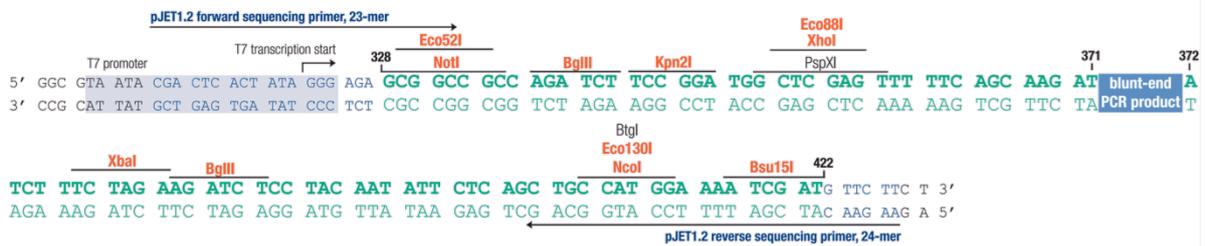


Anhang 11: Aktinfasern in der Körpersäule von *Hydra* während einer kontinuierlichen sechsständigen Behandlung mit MgCl₂ (0,4 M). F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC gefärbt. (A, A') Verdrehte und wellige Aktinfasern nach einer 30 minütigen MgCl₂- Behandlung. (B, B') Nach einer sechsständigen Behandlung mit MgCl₂ sind die Aktinfasern massiv verkürzt nehmen eine (B'') spiral-artige Struktur an (weißer Pfeilkopf).

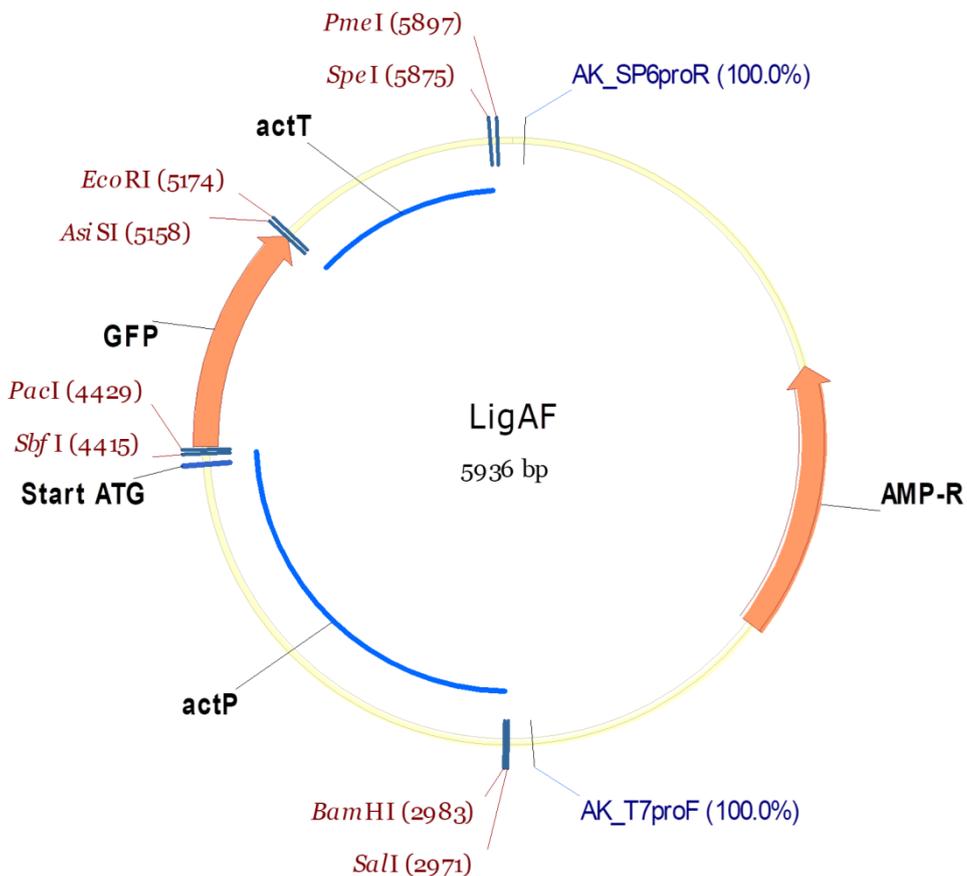
pJET1.2/blunt vector map



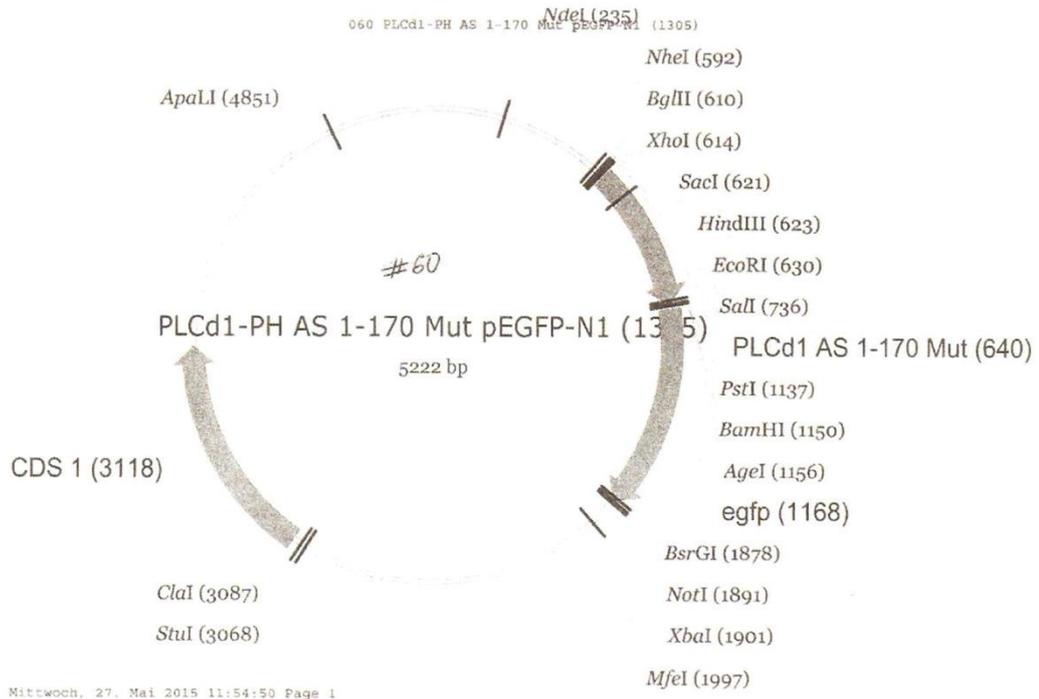
DNA sequence of MCS region



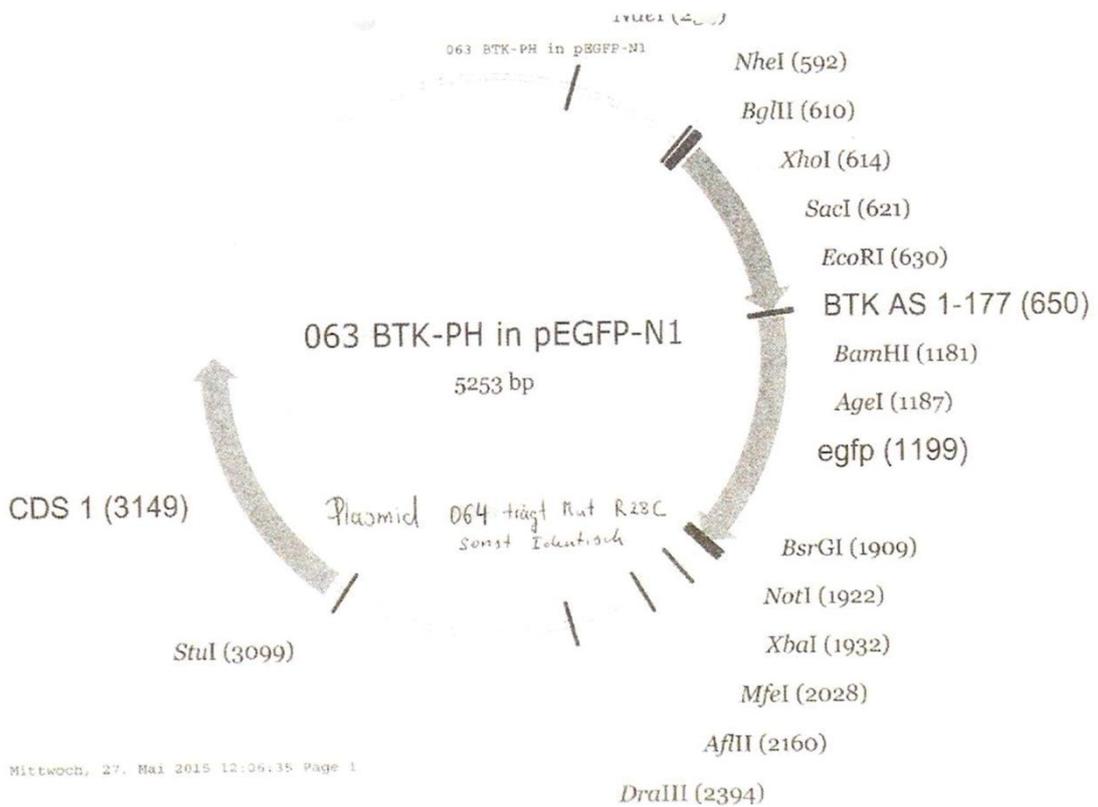
Anhang 12: Vektorkarte des Klonierungsvektors pJET1.2/blunt (Thermo scientific).



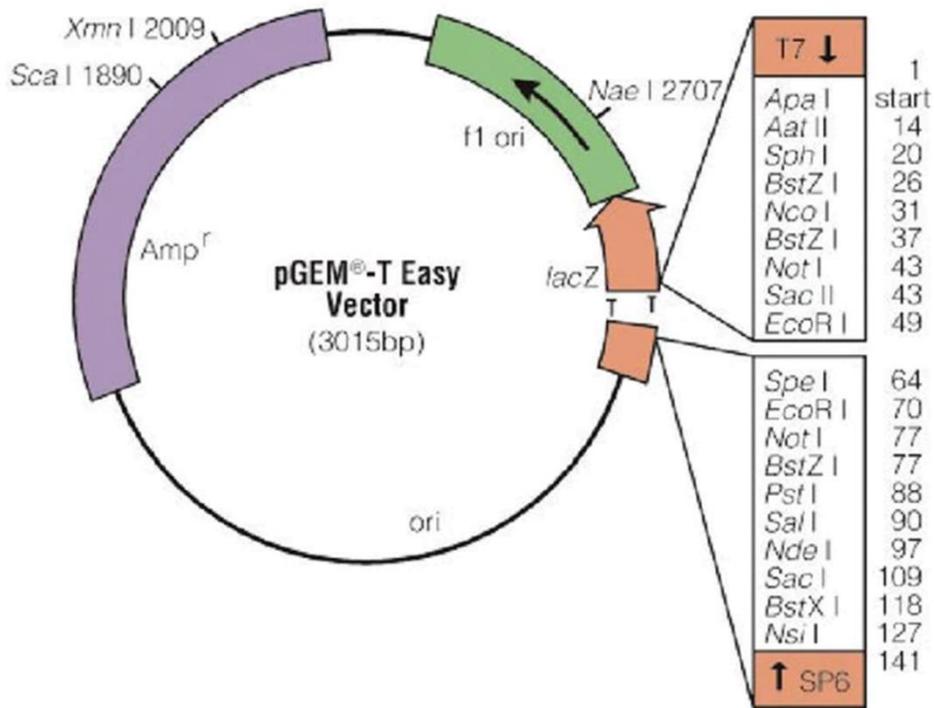
Anhang 13: Vektorkarte des Hydra-spezifischen Expressionsvektors LigAF (AG Prof. Dr. Thomas Bosch; Zoologisches Institut; Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).



Anhang 15: Vektorkarte des Sensors PLCδ-PH-eGFP (#60) (von Prof. Dr. Dominik Oliver).

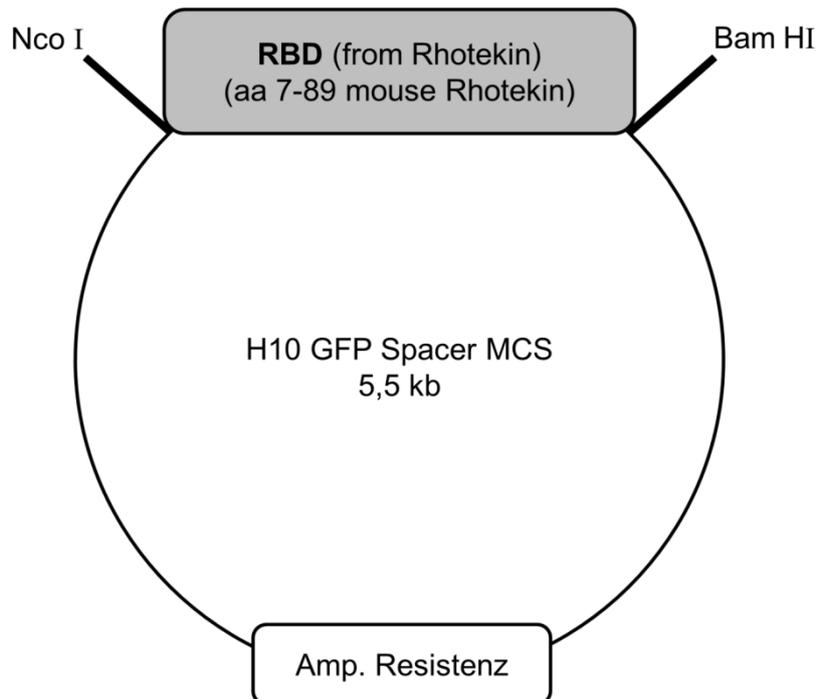


Anhang 16: Vektorkarte des Sensors Btk-PH-eGFP (#63 und #64) (von Prof. Dr. Dominik Oliver).

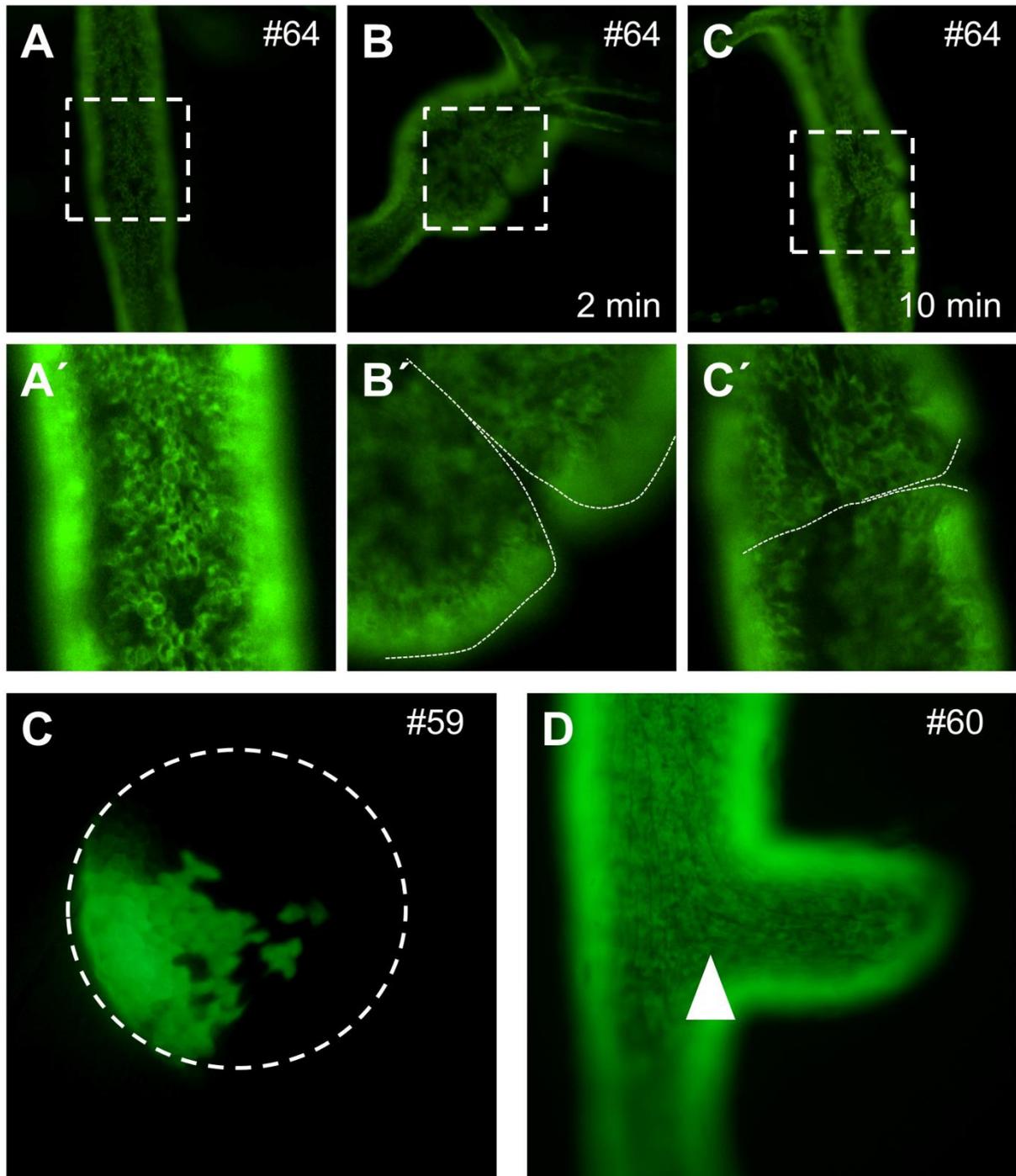


Anhang 17: Vektorkarte des Vektors pGEM-T Easy (Promega).

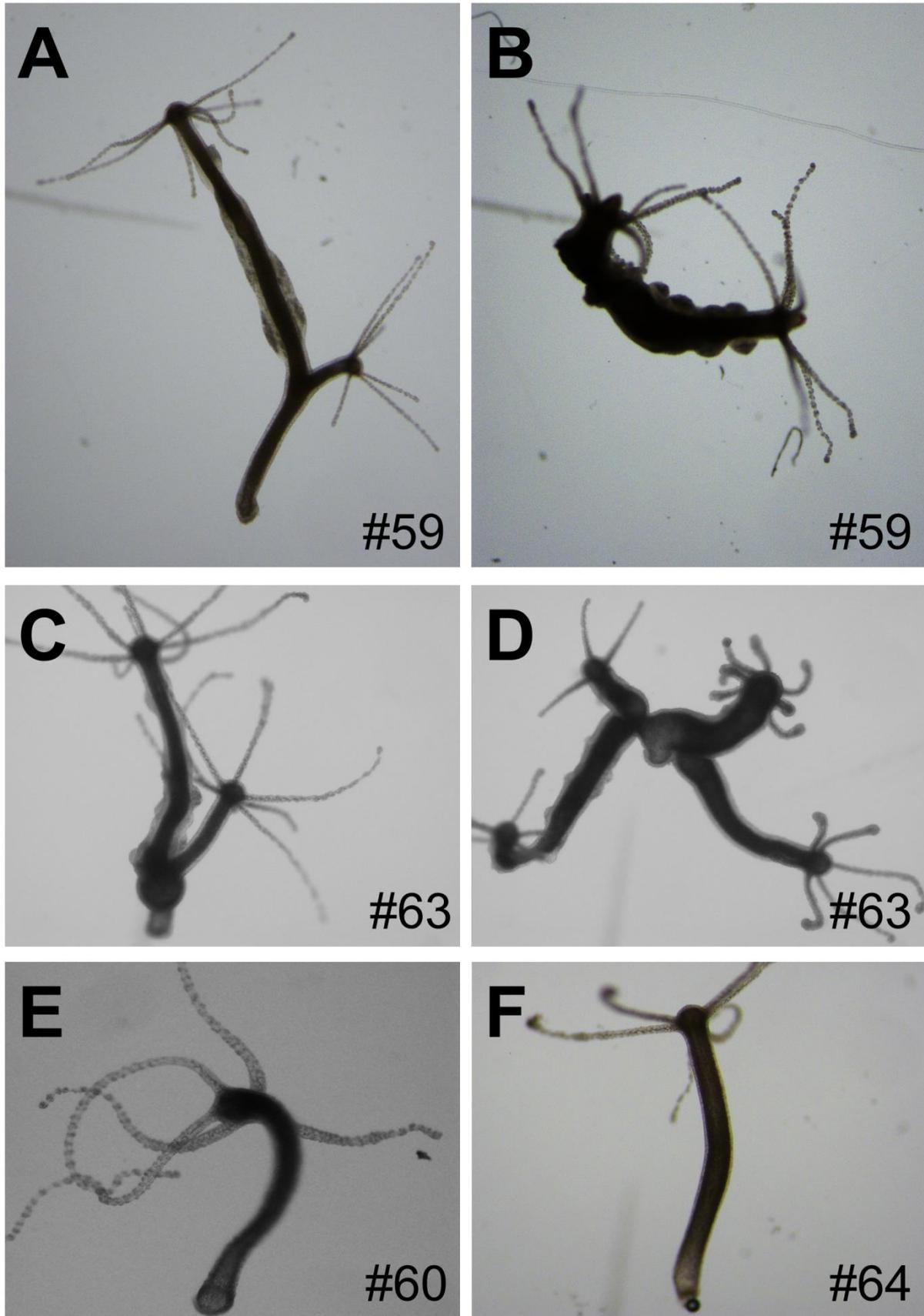
Plasmid name: H10 RBD-GFP
 Vector backbone: H10 GFP Spacer MCS
 Insert size: 248 bp
 Vector size: 5,5 kb



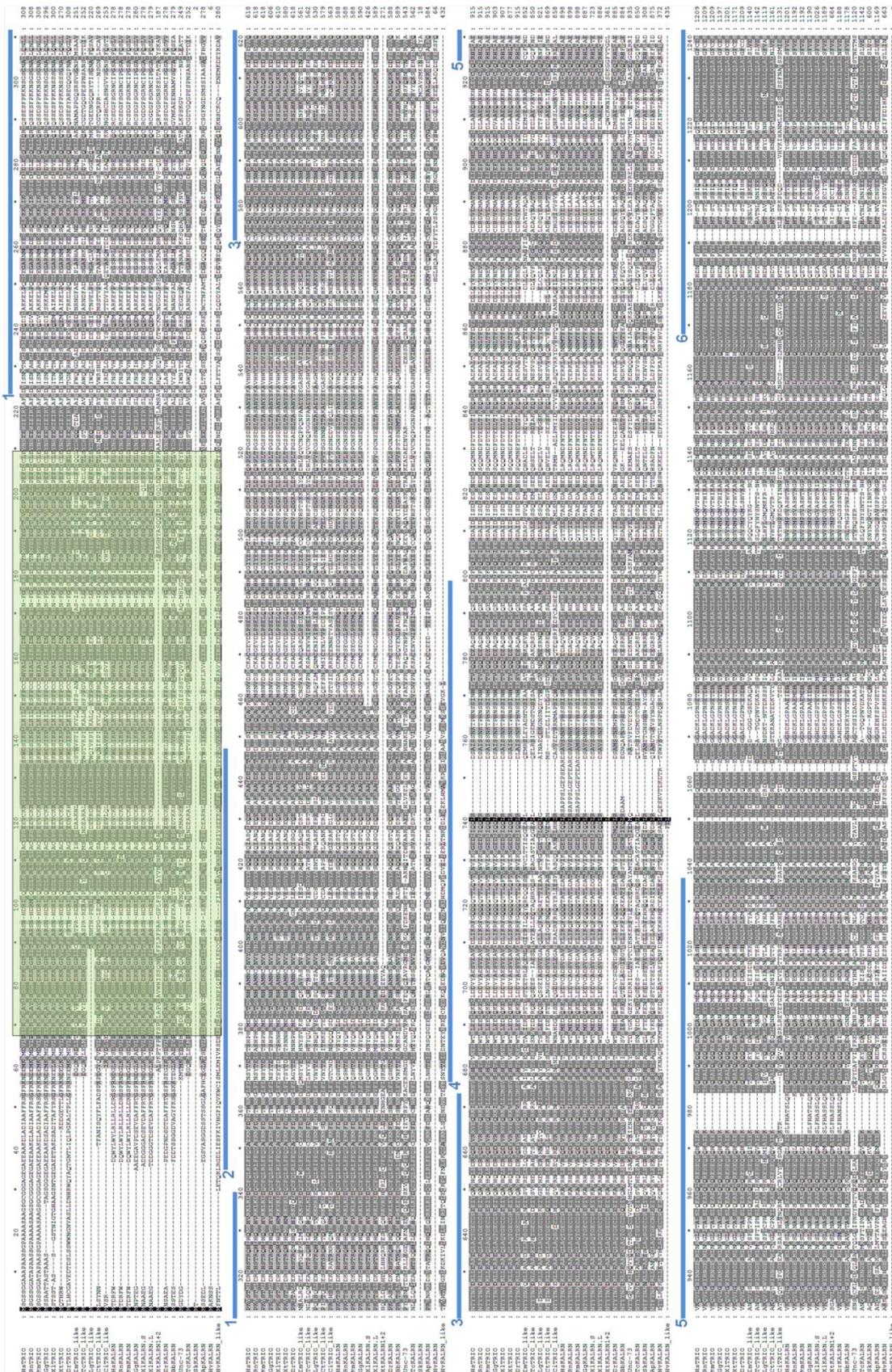
Anhang 18: Vektorkarte des Vektors H10 RBD-GFP (von Prof. Dr. Robert Grosse).



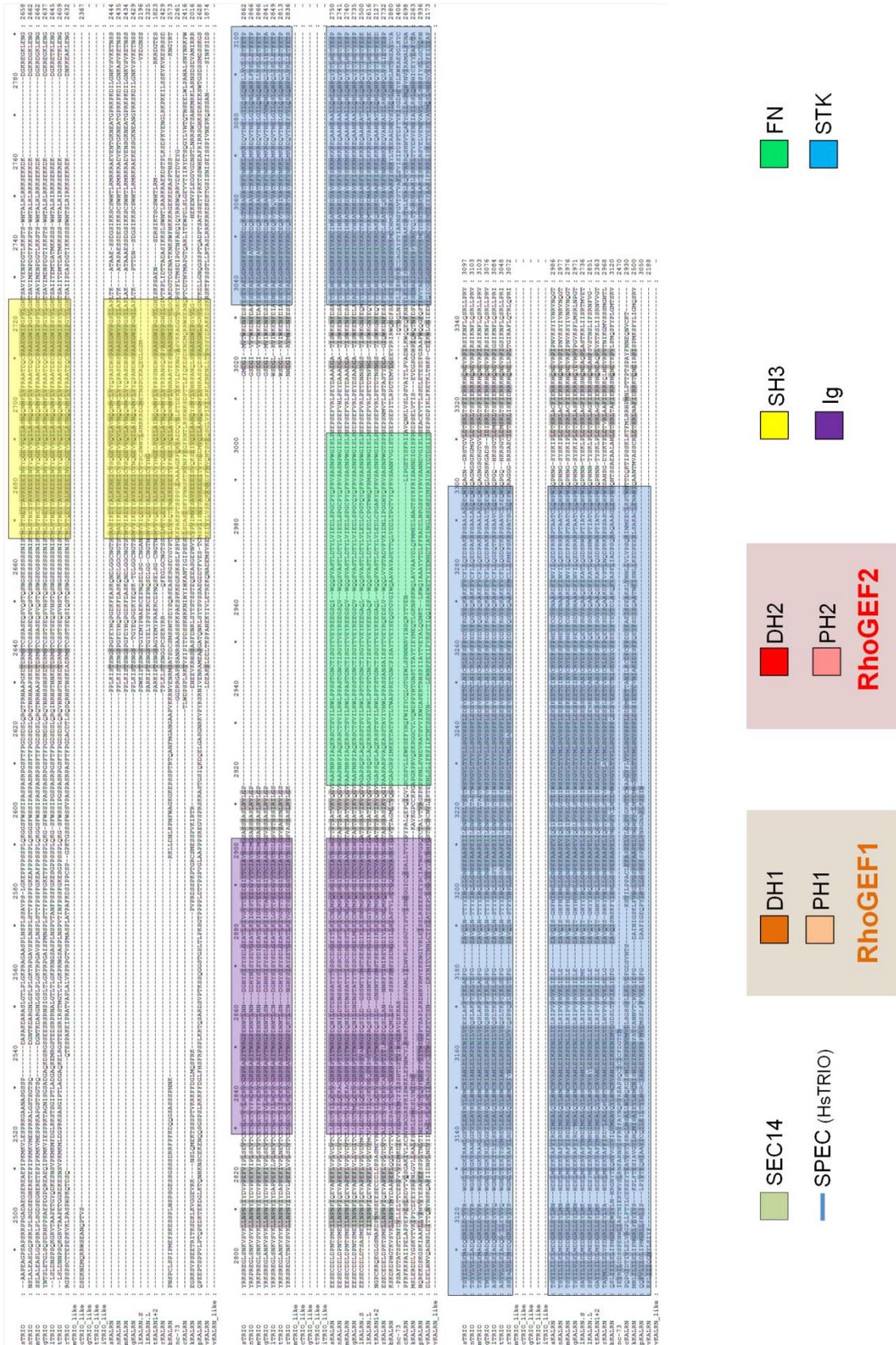
Anhang 19: Anhang zu den PtdInsP-GFP- Sensoren. (A-C') Der Kontrollsensor zu PtdIns(3,4,5)P₃ (#64) zeigt keine Veränderung des Sensorsignals an einer Wunde während der Regeneration. (C) Der PtdIns(4,5)P₂- Sensor (#59) zeigt ein zytoplasmatisches Sensorsignal in den Zellen der Fußscheibe. (D) Der PtdIns(4,5)P₂- Kontrollsensor (#60) zeigt keine Veränderung des Sensorsignals an der Knospenbasis.



Anhang 20: Phänotypen der PtdInsP- Sensor transgenen Hydren. (A-D) Auch die PtdIns(4,5)P₂-GFP- Sensor (#59)- und die PtdIns(3,4,5)P₃-GFP- Sensor (#63) transgenen Hydren weisen vereinzelt die beschriebenen Phänotypdefekte auf. (E, F) Die Tiere der Kontrollsensoren (#60 und #64), die keine Phänotypdefekte aufwiesen wurden separiert gehalten zur Etablierung volltransgener, gesunder *Hydra*- Linien.



Anhang 21: Alignment der Trio- und Kalirin- Sequenzen (Teil 1).



Anhang 23: Alignment der Trio- und Kalirin- Sequenzen (Teil 3). Die Trio und/oder Kalirin charakterisierenden Proteindomänen sind farblich hinterlegt. Sec14 (grün), SPEC (blau markiert), RhoGEF1 (orange), RHoGEF2 (rot), SH3 (gelb), FN3 (grün) und STK (blau).

Anhang 24: Informationen zu den verwendeten Inhibitoren.

• **Rhosin** (Molare Masse: 358,4; chemische Formel: $C_{20}H_{18}N_6O$) ist ein pharmakologischer Inhibitor der RhoA- GTPase. Die Rho- GTPase RhoA ist für die Formation von Stressfasern und Adhäsionsmolekülen verantwortlich. Weiterhin reguliert die GTPase die Zellgestalt, die Zellbewegung und die Zellanheftung. Der Inhibitor Rhosin bindet spezifisch an die Rho- GTPase RhoA und verhindert so die Interaktion mit dessen GEFs (z.B. LARG, DBL, LBC, p115 RhoGEF und PDZ RhoGEF). Dies geschieht indem der Inhibitor hochspezifisch bei einer K_i von 354 nM ausschließlich auf die GEFs des RhoA wirkt. Kreuzreaktionen mit Rho- GDIs oder den Rho- Effektoren, wie ROCK, mDia, PKN und Rhotekin sind nicht bekannt. Die Aktivität der verwandten Rho- GTPase Rac und Cdc42 werden durch die Inhibition mit Rhosin nicht gestört oder beeinträchtigt (Shang et al., 2012).

(www.merckmillipore.com/DE/de/product/Rho-Inhibitor%2C-Rhosin---Calbiochem,EMD_BIO-555460).

• **Rockout** (Molare Masse: 194,2; chemische Formel: $C_{13}H_{10}N_2$) ist ein Zell- permeabler, reversibler und ATP- kompetitiver Inhibitor der Aktivität der Rho- Kinase (ROCK). ROCK ist ein haupt-downstream- Effektor von Rho- GTPasen und erfüllt eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Regulation von Adhäsionsmolekülen oder der Regulation der Kontraktion, ist weiterhin aber auch an der Proliferation und der Apoptose beteiligt. Eine zentrale Rolle übernimmt die Rho- Kinase bei der Organisation des Aktinzytoskeletts ((Wei et al., 2016). Der Inhibitor Rockout hat einen Einfluss auf die Zellmigration und vermindert die Bildung von Stressfasern des Aktins (Yarrow et al., 2005).

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/555553?lang=deundregion=DE>).

• **Blebbistatin** (Molare Masse: 292,3; chemische Formel: $C_{18}H_{16}N_2O_2$) ist ein Zell- permeabler, reversibler und spezifischer Inhibitor des nichtmuskulären Myosin II. Myosin ist zusammen mit Aktin an einer Vielzahl von Prozessen, wie beispielsweise der Bildung von Stressfasern und der Zellmigration beteiligt. Der pharmakologische Inhibitor bindet an die myosin-light-chain (MLC) des Myosin, wodurch Aktin und Myosin keinen Komplex mehr eingehen können. So führt der Inhibitor beispielsweise auch zu einer Unterbrechung der Zytokinese und inhibiert die Zellmigration, wobei die Mitose nicht beeinträchtigt wird (Kovács et al., 2004; Rauscher et al., 2018; Shu et al., 2005; Straight, 2012).

(https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/-Blebbistatin-CAS-674289-55-5-Calbiochem,EMD_BIO-203390).

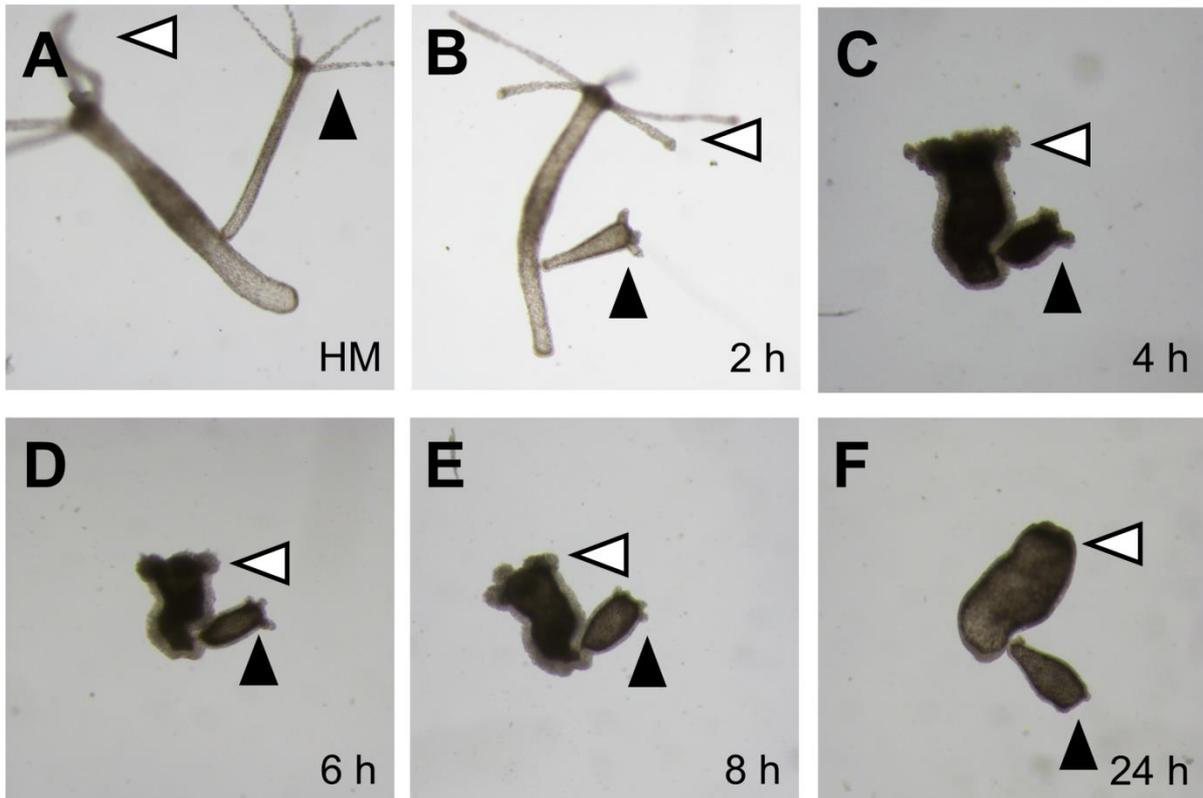
Anhang 25: Tabellarische Darstellung der Daten des Knospungsprozesses unter Einfluss der Relaxantien Benzocain oder Linalool. Die Daten geben die jeweiligen Knospenstadien wieder während der zweimal täglichen Behandlung mit Benzocain oder Linalool.

Benzocain

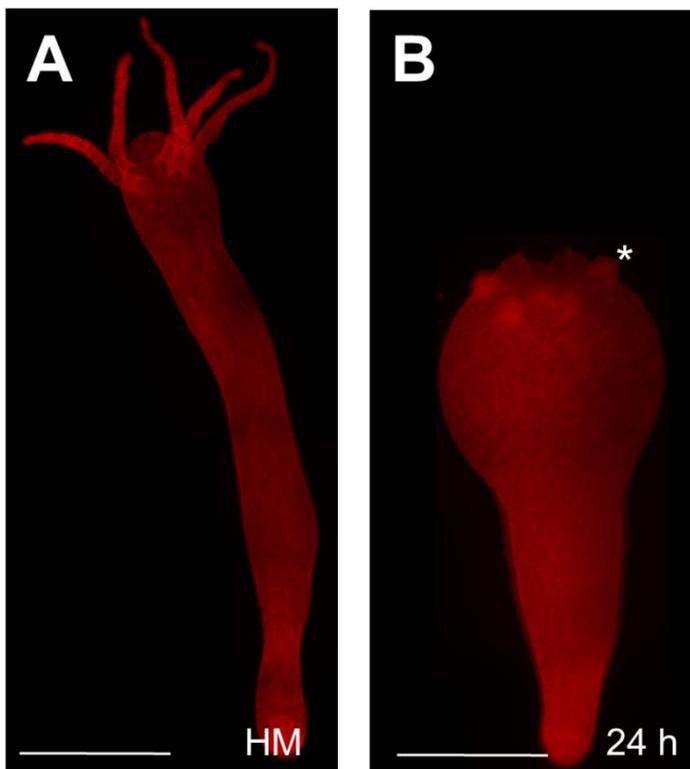
Versuchst- tage	Kontrolle KS3	Benzocain KS3	Kontrolle KS5	Benzocain KS5	Kontrolle KS8	Benzocain KS8
1	3	3	5	5	8	8
2	6,3	6,4	7,2	7,5	9	9,2
3	9	9,1	9	9,3	10,8	10,9
4	10	10,5	10,3	10,5	abgelöst	abgelöst
5	abgelöst	abgelöst	abgelöst	abgelöst	abgelöst	abgelöst

Linalool

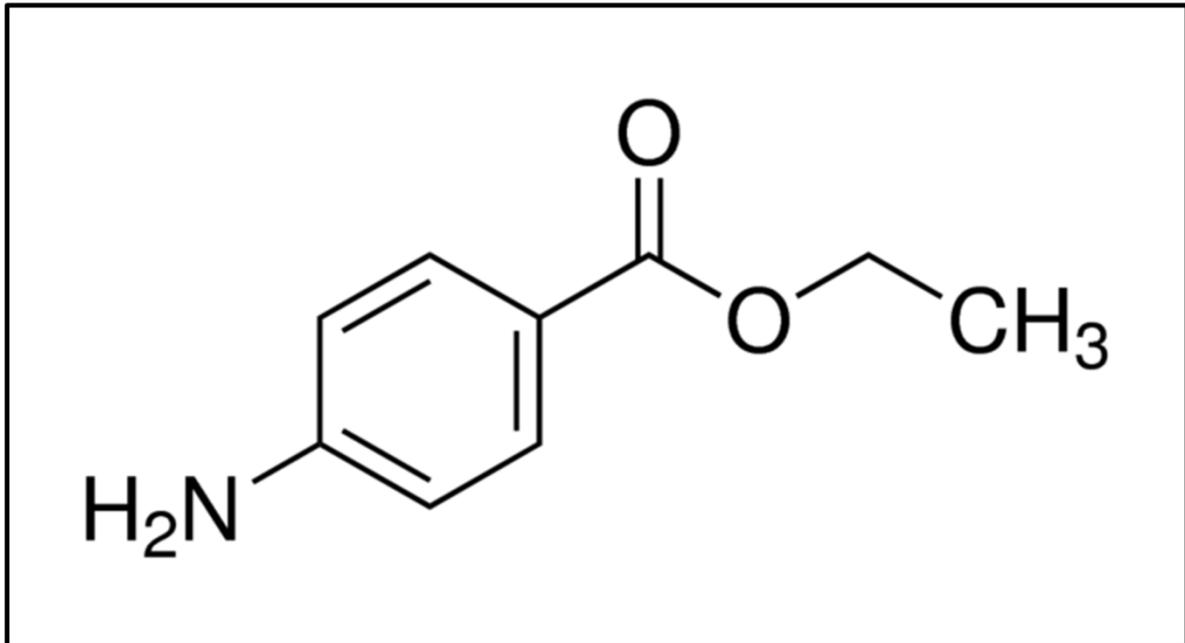
Versuchst- tage	Kontrolle KS3	Linalool KS3	Kontrolle KS5	Linalool KS5	Kontrolle KS8	Linalool KS8
1	3	3	5	5	8	8
2	6	5,6	7,1	7	8,3	9,1
3	8,1	8,3	9,1	8,9	9,8	10,8
4	9,5	9,6	10	10,2	abgelöst	10,8
5	abgelöst	abgelöst	abgelöst	abgelöst	abgelöst	abgelöst



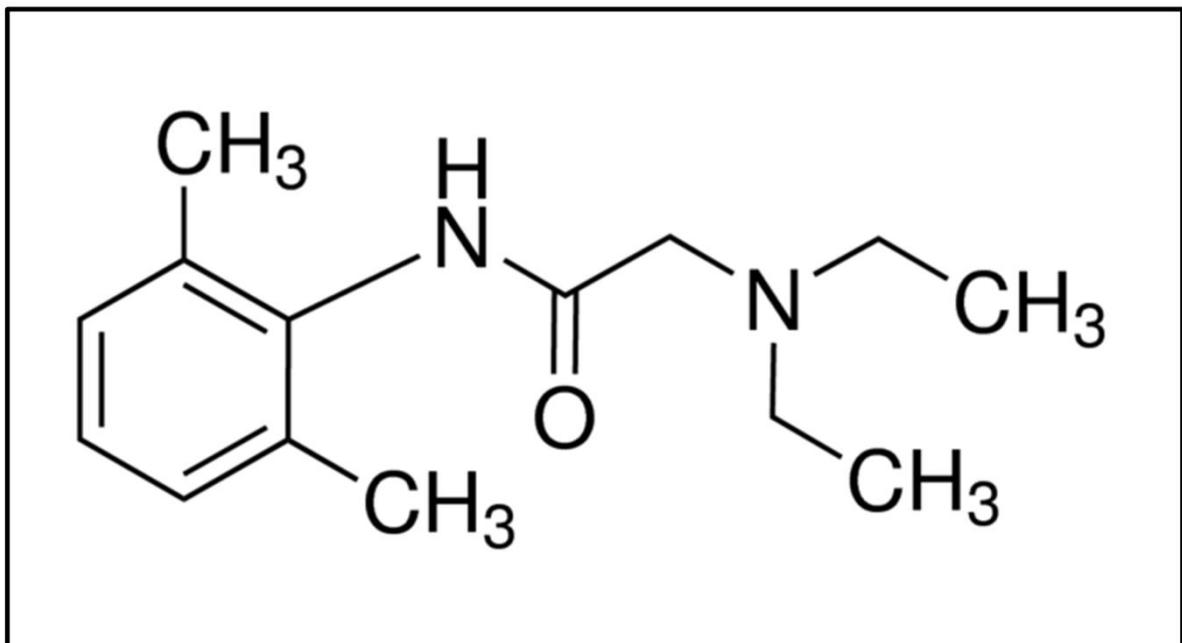
Anhang 26: Kontinuierliche Behandlung mit Rhosin führt zu der Reduktion der Tentakel bei *Hydra* und der Knospe. (A) In Hydramedium (HM) hat das Muttertier und die Knospe (Knospenstadium 9) langgestreckte Tentakel. (B-F) Durch die kontinuierliche Behandlung mit Rhosin (100 μ M) reduzieren sich die Tentakel des Muttertieres (weißer Pfeilkopf) und der Knospe (schwarzer Pfeilkopf) bis sie nach einer 24- stündigen Inhibition kaum noch zu erkennen sind.



Anhang 27: Kontinuierliche Immobilisierung mit Linalool führt zu einem Lollipop- artigen Phänotyp bei *Hydra*. (A) In Hydramedium (HM) besitzt Hydra den typischen gestreckten Phänotyp mit elongierten Tentakel (weißer Pfeilkopf). (B-F) Durch die kontinuierliche Immobilisierung mit Linalool (1 mM) zieht sich Hydra samt Tentakel zusammen (Stern) und nimmt einen Lollipop- artigen Phänotyp an.



Anhang 28: Strukturformel des Relaxans Benzocain (Quelle: sigmaaldrich.com).



Anhang 29: Strukturformel des Relaxans Lidocain (Quelle: sigmaaldrich.com).

A

	* 20 * 40 * 60 *	
PIP2 (#59)_Original :	ATGGACTCGGGCCGGGACTTCTGACCTGCACGGCCTACAGGATGATGAGGATCTACAGGCGCTGCTGAAGGGC	: 75
PIP2 (#59)_Hydra :	ATGGACTCGGGCCGGGACTTCTGACCTGCACGGCCTACAGGATGATGAGGATCTACAGGCGCTGCTGAAGGGC	: 75
PIP2- (#60)_Hydra :	ATGGACTCGGGCCGGGACTTCTGACCTGCACGGCCTACAGGATGATGAGGATCTACAGGCGCTGCTGAAGGGC	: 75
	80 * 100 * 120 * 140 *	
PIP2 (#59)_Original :	AGCCAGCTCCTGAAGGTGAAGTCCAGCTCATGGAGGAGAGAGCCCTTCTACAAGTTGCAGGAGGACTGCAAGACC	: 150
PIP2 (#59)_Hydra :	AGCCAGCTCCTGAAGGTGAAGTCCAGCTCATGGAGGAGAGAGCCCTTCTACAAGTTGCAGGAGGACTGCAAGACC	: 150
PIP2- (#60)_Hydra :	AGCCAGCTCCTGAAGGTGAAGTCCAGCTCATGGAGGAGAGAGCCCTTCTACAAGTTGCAGGAGGACTGCAAGACC	: 150
	160 * 180 * 200 * 220	
PIP2 (#59)_Original :	ATCTGGCAGGAGTCCCAGAGGTGATGCGGACCCCGAGTCCCAGCTGTTCTCCATCGAGGACATTCAGGAGGTG	: 225
PIP2 (#59)_Hydra :	ATCTGGCAGGAGTCCCAGAGGTGATGCGGACCCCGAGTCCCAGCTGTTCTCCATCGAGGACATTCAGGAGGTG	: 225
PIP2- (#60)_Hydra :	ATCTGGCAGGAGTCCCAGAGGTGATGCGGACCCCGAGTCCCAGCTGTTCTCCATCGAGGACATTCAGGAGGTG	: 225
	* 240 * 260 * 280 * 300	
PIP2 (#59)_Original :	CGAATGGGGCACCCGACGGAGGGTCTGGAGAAGTTCGCCCGTGATGTGCCGAGGACCCTGCTTCTCCATTGTC	: 300
PIP2 (#59)_Hydra :	CGAATGGGGCACCCGACGGAGGGTCTGGAGAAGTTCGCCCGTGATGTGCCGAGGACCCTGCTTCTCCATTGTC	: 300
PIP2- (#60)_Hydra :	CGAATGGGGCACCCGACGGAGGGTCTGGAGAAGTTCGCCCGTGATGTGCCGAGGACCCTGCTTCTCCATTGTC	: 300
	* 320 * 340 * 360 *	
PIP2 (#59)_Original :	TTCAAGGACCAGCGCAATACACTAGACCTCATCGCCCATCGCCAGCTGATGCCAGCACTGGGTGCTGGGGCTG	: 375
PIP2 (#59)_Hydra :	TTCAAGGACCAGCGCAATACACTAGACCTCATCGCCCATCGCCAGCTGATGCCAGCACTGGGTGCTGGGGCTG	: 375
PIP2- (#60)_Hydra :	TTCAAGGACCAGCGCAATACACTAGACCTCATCGCCCATCGCCAGCTGATGCCAGCACTGGGTGCTGGGGCTG	: 375
	380 * 400 * 420 * 440 *	
PIP2 (#59)_Original :	CACAAGATCATCCACCCTCAGGCTCCATGGACCAGCGTCAGAAGCTACAGCACTGGATTCACTCCTGCTTGCGA	: 450
PIP2 (#59)_Hydra :	CACAAGATCATCCACCCTCAGGCTCCATGGACCAGCGTCAGAAGCTACAGCACTGGATTCACTCCTGCTTGCGA	: 450
PIP2- (#60)_Hydra :	CACAAGATCATCCACCCTCAGGCTCCATGGACCAGCGTCAGAAGCTACAGCACTGGATTCACTCCTGCTTGCGA	: 450
	460 * 480 * 500 *	
PIP2 (#59)_Original :	AAAGCTGACAAAAACAAGGACAAACAAGATGAGCTTCAAGGAGCTGCAGAACTTCCTGAAGGATCCACCC	: 519
PIP2 (#59)_Hydra :	AAAGCTGACAAAAACAAGGACAAACAAGATGAGCTTCAAGGAGCTGCAGAACTTCCTGAAGGATCCACCC	: 519
PIP2- (#60)_Hydra :	AAAGCTGACAAAAACAAGGACAAACAAGATGAGCTTCAAGGAGCTGCAGAACTTCCTGAAGGATCCACCC	: 519

B Aminosäuresequenz des PtdIns(4,5)P₂ (#59)- Sensors:
MDSGRDFLTLHGLQDDEDLQÄLLKGSQLLKVKS **S**SW
RRE **R** FYKLQEDCKTIWQESRKVMRTPESQLFSIEDI
QEVRMGHRTEGLEKFARDVPEDRCFSIVFKDQRNTL
DLIAPSPADAQHWVLGLHKIIHHS G SMDQRQKLQHW
IHSCLRKADKNKDNKMSFKELQNFLK DPP

C Aminosäuresequenz der PtdIns(4,5)P₂- Negativkontrolle (#60):
MDSGRDFLTLHGLQDDEDLQÄLLKGSQLLKVKS **F**SW
RRE **L** FYKLQEDCKTIWQESRKVMRTPESQLFSIEDI
QEVRMGHRTEGLEKFARDVPEDRCFSIVFKDQRNTL
DLIAPSPADAQHWVLGLHKIIHHS G SMDQRQKLQHW
IHSCLRKADKNKDNKMSFKELQNFLK DPP

Anhang 30: Korrekte Klonierung des PtdIns(4,5)P₂- Sensors (#59) und der Negativkontrolle (#60). (A) Alignment der #59- und #60- Sequenzen mit der Originalsequenz der Wirbeltier- Sensoren. (B) Aminosäuresequenz des PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂)- Sensors (#59). Ser34 (S) und Arg40 (R) sind grün hervorgehoben. (C) Aminosäuresequenz des PtdIns(4,5)P₂- Negativsensors (#60), mit den vorgegebenen Sequenzmutationen von Ser34 (S) zu Phe34 (F) und Arg40 (R) zu Leu40 (L) (rot).

A

```

PIP3(#63)_Original : ATGGCCGCAGTGATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAGAAAACATCACCTCTAA : 70
PIP3(#63)_Hydra : ATGGCCGCAGTGATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAGAAAACATCACCTCTAA : 70
PIP3-(#64)_Hydra : ATGGCCGCAGTGATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAGAAAACATCACCTCTAA : 70

PIP3(#63)_Original : ACTTCAAGAAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGTGCACAAACTCTCTACTATGAGTATGACTTTGAACGTGG : 140
PIP3(#63)_Hydra : ACTTCAAGAAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGTGCACAAACTCTCTACTATGAGTATGACTTTGAACGTGG : 140
PIP3-(#64)_Hydra : ACTTCAAGAAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGTGCACAAACTCTCTACTATGAGTATGACTTTGAACGTGG : 140

PIP3(#63)_Original : GAGAAGAGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTGTGTGTTGAAACAGTGGTTCCTGAA : 210
PIP3(#63)_Hydra : GAGAAGAGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTGTGTGTTGAAACAGTGGTTCCTGAA : 210
PIP3-(#64)_Hydra : GAGAAGAGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTGTGTGTTGAAACAGTGGTTCCTGAA : 210

PIP3(#63)_Original : AAAAATCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAATGGAGCAAATTTCAA : 280
PIP3(#63)_Hydra : AAAAATCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAATGGAGCAAATTTCAA : 280
PIP3-(#64)_Hydra : AAAAATCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAATGGAGCAAATTTCAA : 280

PIP3(#63)_Original : TCATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTTGTATATGATGAAGGCCCTCTCTACGTCTTCTCCCAAC : 350
PIP3(#63)_Hydra : TCATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTTGTATATGATGAAGGCCCTCTCTACGTCTTCTCCCAAC : 350
PIP3-(#64)_Hydra : TCATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTTGTATATGATGAAGGCCCTCTCTACGTCTTCTCCCAAC : 350

PIP3(#63)_Original : TGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTCCACAGCTCAAAAACGTAATCCGGTACAACAGTGTCTGGTTCCAG : 420
PIP3(#63)_Hydra : TGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTCCACAGCTCAAAAACGTAATCCGGTACAACAGTGTCTGGTTCCAG : 420
PIP3-(#64)_Hydra : TGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTCCACAGCTCAAAAACGTAATCCGGTACAACAGTGTCTGGTTCCAG : 420

PIP3(#63)_Original : AAATATCACCCCTTGCTTCTGGATCGATGGGCAGTATCTCTGTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATGG : 490
PIP3(#63)_Hydra : AAATATCACCCCTTGCTTCTGGATCGATGGGCAGTATCTCTGTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATGG : 490
PIP3-(#64)_Hydra : AAATATCACCCCTTGCTTCTGGATCGATGGGCAGTATCTCTGTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATGG : 490

PIP3(#63)_Original : GCTGCCAAATTTTGGAGAACAGGAATGGAAGCTTAAACCG : 531
PIP3(#63)_Hydra : GCTGCCAAATTTTGGAGAACAGGAATGGAAGCTTAAACCG : 531
PIP3-(#64)_Hydra : GCTGCCAAATTTTGGAGAACAGGAATGGAAGCTTAAACCG : 531

```

B Aminosäuresequenz PtdIns(3,4,5)P₃ (#63)- Sensors :
 MAAVILESIFLKRSQQKKKTSPLNFKK **R**LFLLLTVHKLS
 YYEYDFERGRRGSKKGSIDVEKITCVETVVPEKNPPP
 ERQIPRRGEESSEMEQISIIERFPYPFQVVYDEGPLY
 VFSPTTEELRKRWIHQLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWID
 GQYLCCSQTAKNAMGCQILENRNGSLKPFTG

C Aminosäuresequenz der PtdIns(3,4,5)P₃- Negativkontrolle (#64): :
 MAAVILESIFLKRSQQKKKTSPLNFKK **C**LFLLLTVHKLS
 YYEYDFERGRRGSKKGSIDVEKITCVETVVPEKNPPP
 ERQIPRRGEESSEMEQISIIERFPYPFQVVYDEGPLY
 VFSPTTEELRKRWIHQLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWID
 GQYLCCSQTAKNAMGCQILENRNGSLKPFTG

Anhang 31: Korrekte Klonierung des PtdIns(3,4,5)P₃- Sensors (#63) und der Negativkontrolle (#64). (A) Alignment der #63- und #64- Sequenzen mit der Originalsequenz der Wirbeltier- Sensoren. (B) Aminosäuresequenz des PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃)- Sensors (#63). Arg28 (R) ist grün hervorgehoben. (C) Aminosäuresequenz des PtdIns(3,4,5)P₃- Negativsensors (#64), mit den vorgegebenen Sequenzmutationen von Arg28 (R) zu Cys28 (C) (rot).

XV. *Curriculum Vitae* und wissenschaftlicher Werdegang

Die Seite 234 (*Curriculum Vitae* und wissenschaftlicher Werdegang) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

• **Veröffentlichungen:**

- Holz O, **Apel DM**, Hassel M. (2020). Alternative pathways control actomyosin contractility in epitheliomuscle cells during morphogenesis and body contraction.
- Suryawanshi A, Schaefer K, Holz O, **Apel DM**, Lange E, Hayward DC, Miller Dj, Hassel M. (2020). What lies beneath: Hydra provides cnidarian perspectives into the evolution of FGFR docking proteins.
- Kratzer MC, England L, **Apel DM**, Hassel M, Borchers A. (2019). Evolution of the Rho guanine nucleotide exchange factors Kalirin and Trio and their gene expression in Xenopus development.
- Holz O, **Apel DM**, Steinmetz P, Lange E, Hopfenmüller S, Ohler K, Sudhop S, Hassel M. (2017). Bud detachment in Hydra requires activation of FGFR and a Rho - ROCK - myosin II signaling pathway to ensure formation of a basal constriction.
- Lidke AK, Bannister S, Löwer AM, **Apel DM**, Podleschny M, Kollmann M, Ackermann CF, García-Alonso J, Raible F, Rebscher N. (2014). 17 β - Estradiol induces supernumerary primordial germ cells in embryos of the polychaete *Platynereis dumerilii*.

XVI. Danksagung

Hiermit möchte ich bei all denen bedanken, die mich während der letzten Jahre in meiner Doktorandenzeit unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich daher natürlich bei Frau Prof. Dr. Monika Hassel für die Möglichkeit der Promotion in ihrer Arbeitsgruppe sowie für ihre Hilfe, ihre Unterstützung und auch für ihre konstruktive Kritik danken.

Für die spontane und freundliche Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Christian Helker bedanken. Genauso bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Annette Borchers und Herrn Prof. Dr. Uwe Homberg für ihre Bereitschaft meine Prüfungskommission zu bilden. Weiterhin möchte ich mich besonders für die Möglichkeit Mitglied des GRKs 2213 sein zu dürfen bei Frau Prof. Dr. Annette Borchers bedanken. Das GRK 2213 und der dadurch mögliche Austausch und die Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen waren für mich und meine Arbeit überaus hilfreich.

Ganz besonders möchte ich bei meinen Kollegen/innen der AG Hassel für die letzten Jahre Danke sagen. Danke an Heide Brandtner für die Unterstützung bei den Kulturen und Kursen, aber vor allem für die netten Gespräche in der Mittagspause. Danke an Lisa Reichart, Annegret Rittershaus, Kerstin Ohler und Oliver Holz für die spaßigen letzten Jahre, die hilfreichen Diskussionen und vor allem für eure lieben und nützlichen Korrekturen. Auch bei den von mir betreuten Studenten/innen Laura Annemüller, Alexandra Seiffermann, Ezgi Sari, Marie Sieberns, Maite Becker, Lea Hüttinger und Gideon Speich möchte ich mich dafür bedanken, dass ihr Teil meines Projektes wart und wir uns zusammen Ergebnisse erarbeiten konnten.

Da das Beste zum Schluss kommt bedanke ich mich zu guter Letzt bei meiner Familie. Vielen Dank für eure Unterstützung und für eure Geduld. Ohne euch hätte ich das alles sicherlich nicht geschafft.

Danke

XVII. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Neue Werkzeuge für *Hydra*
zur Untersuchung von Rho- und PtdInsP-
vermittelten Signalwegen

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, den 10.07.2020

David Matthäus Apel