

GENEXPRESSION UND ROLLE MATERNALER  
ENDOCYTEN WÄHREND DER ONTOGENESE DES  
SÜBWASSERPOLYPEN *HYDRA*

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Andreas Fröbius**

Kiel  
2002

Referent:.....Prof. Dr. T.C.G. Bosch.....

Koreferent:.....Prof. Dr. W. Wünnenberg.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....30.Mai 2002.....

Zum Druck genehmigt: .....Kiel, den 12.Juni 2002.....

gez. Prof. Dr. Th. Bauer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Meinen lieben Eltern gewidmet

GENEXPRESSION UND ROLLE MATERNALER  
ENDOCYTEN WÄHREND DER ONTOGENESE DES  
SÜßWASSERPOLYPEN *HYDRA*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1	<i>Grundzüge der Cnidaria-Entwicklung .....</i>	6
1.2	<i>Der Süßwasserpolytyp Hydra als entwicklungsbiologischer Modellorganismus .....</i>	8
1.2.1	Anatomie und Morphologie.....	8
1.2.2	Achsenformierung und Musterbildung bei adulten Polypen.....	12
1.2.3	Die Oogenese von <i>Hydra</i> .....	14
1.2.4	Die Embryogenese von <i>Hydra</i> .....	18
1.3	<i>Der programmierte Zelltod .....</i>	22
1.3.1	Biochemische Mechanismen der Apoptose bei <i>Hydra</i> .....	23
1.3.2	Morphologische und biochemische Merkmale apoptotischer Zellen.....	24
1.3.3	Apoptose während der Gametogenese und Embryogenese.....	25
<b>2</b>	<b>Ziele dieser Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Verwendete Materialien.....</b>	<b>28</b>
3.1	<i>Lebendmaterial.....</i>	28
3.1.1	Tiermaterial .....	28
3.1.2	Bakterien.....	29
3.2	<i>Verwendete Chemikalien und Lösungen .....</i>	29
3.2.1	Puffer, Hybridisierungslösungen und Lösungen für in-situ-Hybridisierung.....	29
3.2.2	Chemikalien.....	31
3.2.3	Oligonukleotide .....	33
3.2.4	Kits und Enzyme.....	34
3.2.5	Nähr- und Kulturmedien.....	35
3.2.6	Vektorplasmide.....	35
3.2.7	Antikörper.....	35
3.3	<i>Verwendete Geräte .....</i>	36
3.3.1	Elektrophorese .....	36
3.3.2	PCR-Cycler.....	36
3.3.3	Zentrifugen.....	36

3.3.4 Inkubatoren.....	36
3.3.5 Optische Geräte.....	37
3.3.6 Sonstige.....	37
<b>4 Methoden.....</b>	<b>39</b>
<i>4.1 Das Versuchstier</i> .....	39
4.1.1 Vorbemerkung .....	39
4.1.2 Haltung und Zucht.....	39
4.1.3 Induktion der Gametogenese .....	39
4.1.4 Embryonengewinnung und –aufbewahrung.....	40
<i>4.2 Molekularbiologische Methoden</i> .....	41
4.2.1 Isolation totaler RNA aus Embryonen.....	41
4.2.2 RT-PCR .....	42
4.2.2.1 Reverse Transkription mit Not(dT) <sub>18</sub> -Primern .....	42
4.2.2.2 Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern.....	42
4.2.2.3 $\beta$ -Aktin-Probenäquilibrierung .....	43
4.2.2.4 Analyse der Genexpression bekannter Hydra-Gene während der Embryogenese.....	44
4.2.2.5 Agarosegelelektrophorese .....	45
4.2.3 Klonierung .....	45
4.2.3.1 Ligation in pGEM-T-Vektor.....	45
4.2.3.2 Vermehrung kompetenter Zellen.....	46
4.2.3.3 Transfektion durch Elektroporation.....	46
4.2.3.4 Insert-Check.....	47
4.2.3.5 Plasmid-Präparation.....	47
4.2.4 Sequenzierung.....	48
4.2.5 Nuclear run-on.....	48
4.2.5.1 Extraktion der Nuclei.....	48
4.2.5.2 Vorbereitung der Probenmembran.....	49
4.2.5.3 Run-on-Reaktion.....	49
4.2.5.4 Hybridisierung .....	49
4.2.6 In-situ-Markierung naszenter RNA mit 5-Fluoro-Uridin.....	50
4.2.7 Whole-mount In-situ-Hybridisierung .....	50

4.2.7.1 Sondensynthese.....	51
4.2.7.2 Hybridisierung.....	53
4.3 <i>Histologische Methoden</i> .....	55
4.3.1 Einbettung in Kunststoff.....	55
4.3.2 Anfertigung von Semidünnschnitten.....	55
4.3.3 Anfertigung von Ultradünnschnitten.....	56
4.3.4 Kontrastierung für die Transelektronenmikroskopie.....	56
4.3.5 Rhodamin-123-Färbung.....	56
4.3.6 Silberfärbung.....	57
4.3.7 Hoechst-33342-Färbung.....	57
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
5.1 <i>Lichtmikroskopische Betrachtung der Embryogenese von Hydra</i> .....	58
5.2 <i>Expressionsanalyse bekannter Hydra-Gene</i> .....	59
5.2.1 Homeobox-Gene.....	61
5.2.2 Transkriptionsfaktoren anderer Art.....	62
5.2.3 Peptide, Polypeptide und andere sezernierte Signalmoleküle .....	63
5.2.4 Moleküle anderer Zugehörigkeit.....	64
5.2.5 Gene des Wnt-Reaktionsweges im Überblick.....	65
5.3 <i>Transkripte in frühen Embryonen und ihre Rolle in der Embryogenese</i> .....	66
5.3.1 Der Start zygotischer Transkription.....	66
5.3.2 De-novo Transkription vor dem Start der zygotischen Transkription.....	67
5.3.3 Endocyten als Orte der embryonalen Transkription maternaler Gene .....	68
5.4 <i>Lokalisierung der Expression ausgewählter Gene</i> .....	70
5.4.1 HyTcf.....	71
5.4.2 HyAlx.....	72
5.5 <i>Funktionelle und morphologische Charakteristika der embryonalen Endocyten</i> .....	73
5.5.1 Nucleolusstruktur der <i>Hydra</i> -Endocyten.....	73
5.5.2 Die respiratorische Aktivität der Endocyten.....	75
5.5.3 Feinstrukturelle Analyse der Endocyten-Morphologie .....	76
5.5.4 Endocytenzellkernmorphologie.....	78

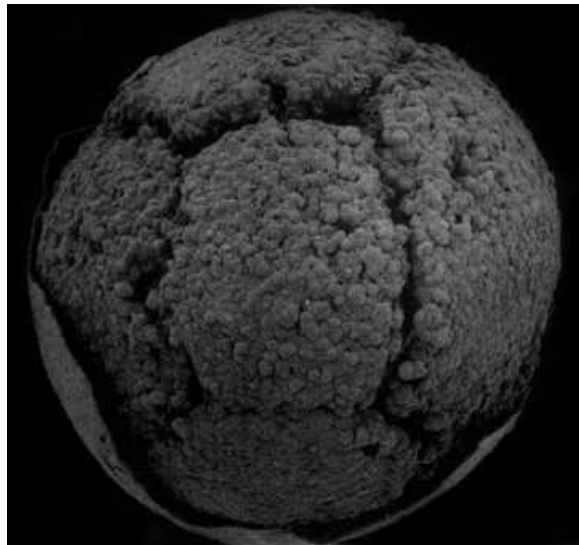
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
6.1	<i>Die Rolle der maternalen Endocyten während der frühen Embryogenese von Hydra..</i>	81
6.1.1	Endocyten als Orte aktiver Transkription entwicklungsrelevanter Gene .....	81
6.1.2	Die Mehrzahl der <i>Hydra</i> -Endocyten ist nicht apoptotisch .....	82
6.1.3.	Regulation der Nährstofffreigabe aus Endocyten durch Apoptose .....	85
6.2	<i>Expression regenerationsrelevanter Hydra-Gene während der Ontogenese .....</i>	87
6.2.1	Start der Genexpression vor der Aktivierung zygotischer Expression.....	87
6.2.1.1	CnOtx.....	88
6.2.1.2	HyAlx.....	89
6.2.1.3	HyBra.....	90
6.2.1.4	HyTcf, $\beta$ -Catenin und Frizzled.....	90
6.2.1.5	Cnno5 .....	92
6.2.2	Die potentielle Rolle erster zygotischer Transkripte .....	93
6.2.2.1	Heady.....	93
6.2.2.2	CnGsc .....	94
6.2.2.3	CnNK-2.....	96
6.2.3	Der Übergang zum Dauerstadium.....	97
6.2.3.1	HyWnt.....	97
6.2.3.2	Cnox-2 .....	99
6.2.3.3	Budhead .....	100
6.2.3.4	Hyp1 und Hym301.....	101
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsindex.....</b>	<b>119</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>122</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>123</b>



## 1 Einleitung

Bereits seit HAECKEL (1874) wurde allgemein angenommen, daß die ersten Metazoa mikroskopisch kleine in ihrer Entwicklung und Morphologie den Embryonen oder Larven rezenter Tiere ähnelnde Organismen gewesen sein müssen.

Aus Phosphoriten des späten Neoproterozoikums mit einem Alter von 570-590 Millionen Jahren konnten vor kurzem die ältesten Zeugen der embryonalen Entwicklung früher Cnidaria und erster Bilaterier gewonnen werden (XIAO ET AL., 1998, 2000). Diese fossilen und mikroskopisch kleinen versteinerten ontogenetischen Entwicklungsstadien werden damit noch vor die außerordentliche radiale Entwicklung der makroskopischen Ediacara-Fauna zurückdatiert. Embryonen in frühen Furchungsteilungen dokumentieren mit erstaunlichem Detailgehalt, daß die Aufspaltung der Linien, die zu den triploblastischen und



**Abb. 1-1: Früher Embryo aus der Doushantuo-Formation, Sguizhou Provinz, Süd-China, ca. 570 Millionen Jahre alt (XIAO, 1998).**

damit bilateralsymmetrischen Tieren führten, lang vor dem bisher aufgrund von ersten fossilen Körperabdrücken vermuteten Zeitpunkt erfolgen konnte. Im Kontrast zu den fossilen Funden geben molekulare Uhren die Divergenz zwischen Protostomiern und Deuterostomiern in einem Zeitraum von 1-1,3 Milliarden Jahren vor unserer Zeitrechnung an (WRAY ET AL., 1996).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die Annahme, daß die Aufspaltung der Linien und das Auftreten großer und adulten Baupläne Ereignisse sind, die durch eine längere Zeitspanne voneinander getrennt eingetreten sind, vereinbart werden. Dies dokumentiert das enorme Alter und ist ein Hinweis auf den langen Weg durch die Zeit, den die Cnidarier hinter sich haben.

Das jedoch Interessanteste an diesen Funden ist die faszinierende Ähnlichkeit dieser Zeugen frühen vielzelligen Lebens mit den embryonalen Entwicklungsstadien, die man heute während der Embryogenese des Süßwasserpolyphen *Hydra* beobachten kann. Noch weiß man wenig über diese Funde - stellen sie adulte Lebensformen da, repräsentieren sie tatsächlich Ontogenesestadien früher Cnidarier? Diese Fragen werden noch geklärt werden müssen. Mit diesen Fossilien vereint die Embryogenese von *Hydra* jedenfalls auch die Tatsache, daß bis jetzt nur wenig über die auf molekularer Ebene während der Individualentwicklung von *Hydra* ablaufenden Prozesse bekannt ist.

## 1.1 Grundzüge der Cnidaria-Entwicklung

Lange Zeit wurden innerhalb der Cnidaria die Hydrozoa als ursprünglichstes Taxon angesehen. Diese Annahme basierte im wesentlichen auf der einfachen Struktur ihrer Polypen. Ihre Cniden, die in dieser Gruppe auftretenden Sinnesorgane sowie insbesondere die im Tierreich eher seltenen ektodermalen Gonaden sprechen jedoch für eine Einordnung der Hydrozoa als abgeleitete Gruppe mit sekundär vereinfachten Polypen.

Diese revidierte Sicht der Cnidaria-Phylogenie führte zur Etablierung eines neuen Modells, bei dem die Anthozoa die basale Gruppe, gefolgt von den Cubozoa, Scyphozoa und schließlich den Hydrozoa als abgeleitete Gruppe darstellen. Dieser Einordnung liegen die zunehmende Komplikation der Entwicklungszyklen und immer höhere Komplexität des Cnidoms zugrunde (siehe auch Abb. 1-2). Molekularbiologische Untersuchungen haben ergeben, daß Anthozoa als einzige Gruppe der Cnidaria eine mit allen Bilateria übereinstimmende ringförmige Struktur der mitochondrialen DNA aufweisen, wohingegen die anderen drei Taxa eine lineare mtDNA besitzen. Auch besitzen die Cniden der Anthozoa im Gegensatz zu denen der andere Gruppen kein Cnidocil. Anthozoa entwickeln sich über

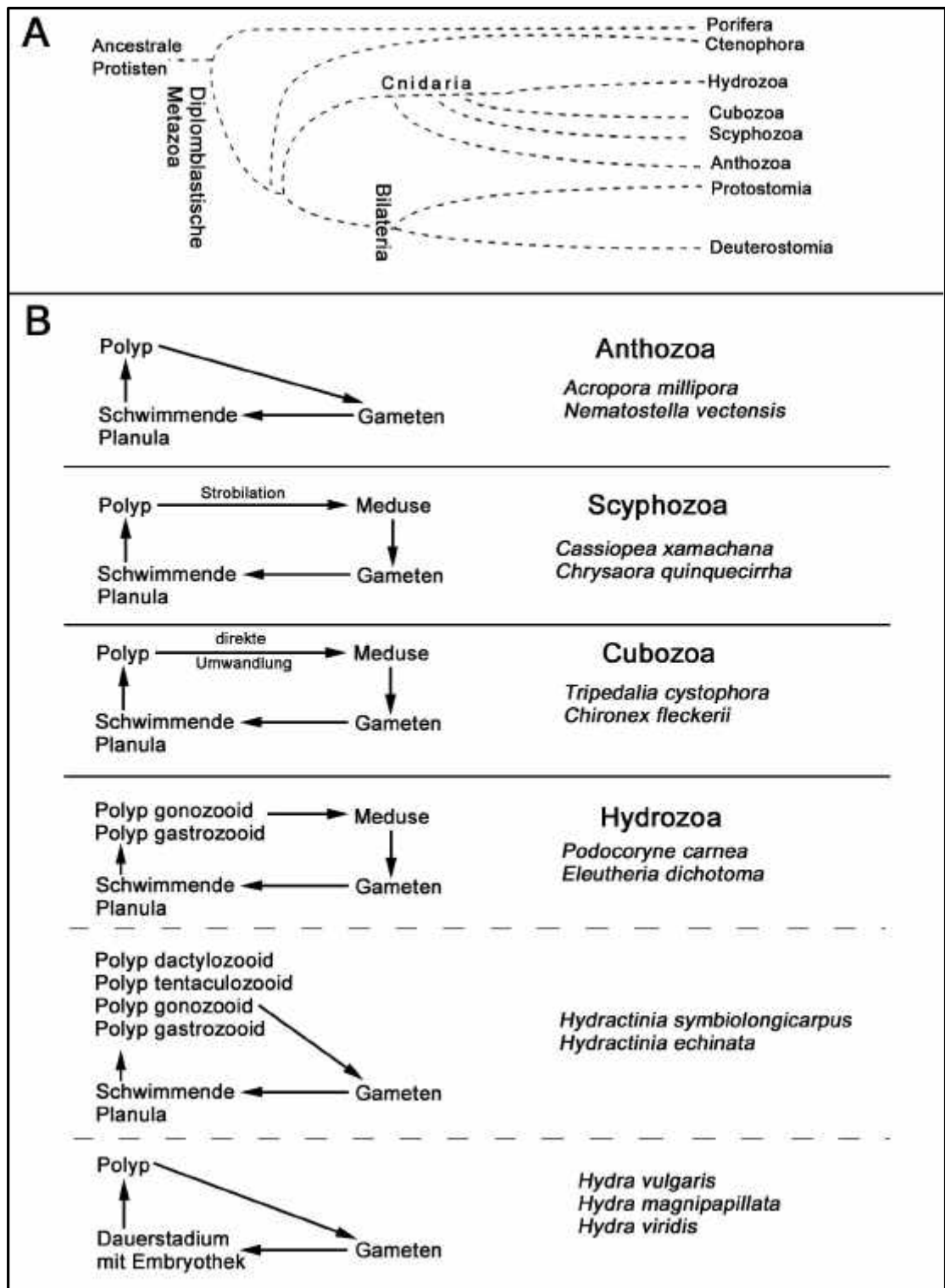


Abb. 1-2: A) Phylognese der Cnidaria. B) Schema der Haupttypen der Entwicklungszyklen in den vier Klassen der Cnidaria (modifiziert nach GALLIOT, 2000).

eine Planularlarve direkt zu einem neuen Polypen, ohne die bei den anderen Gruppen auftretende Medusengeneration auszubilden.

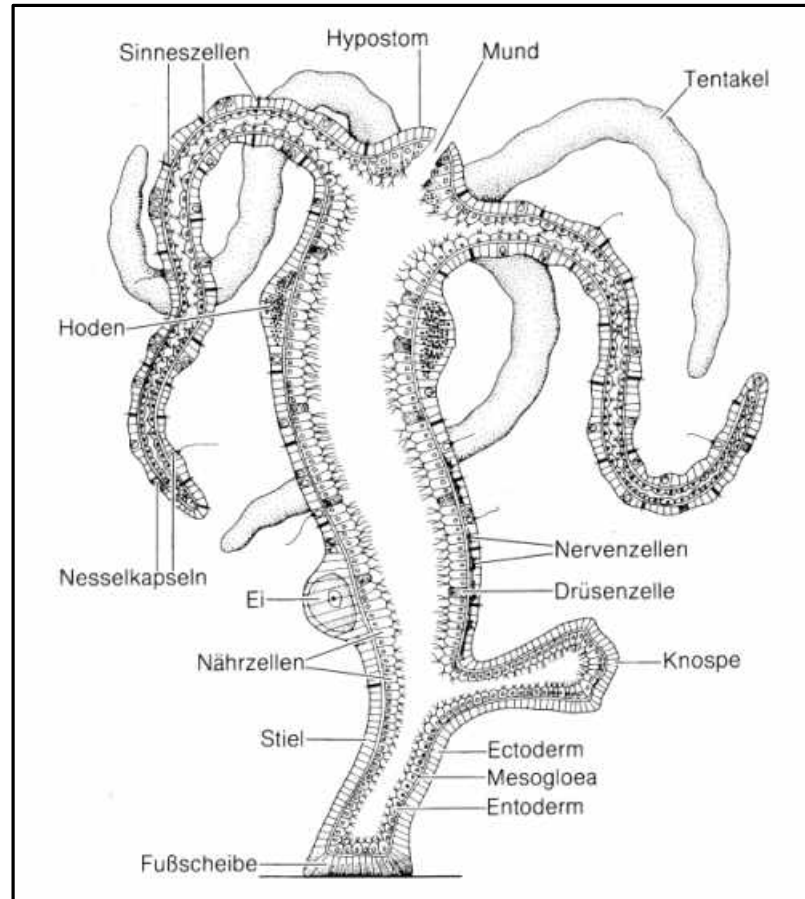
Betrachtet man deren Entwicklungszyklen (Abb. 1-2 B), so fällt auf, daß die Cubozoa als einzige der drei abgeleiteten Taxa einen einfachen Zyklus durchlaufen, im Laufe dessen sich der Polyp direkt in eine Meduse umwandelt. Die metagenetische Entwicklung der Scyphozoa zeigt die Bildung von Ephyren durch eine terminale Knospung des Polypen, wohingegen Hydrazoa eine Fülle verschiedener Entwicklungszyklen aufweisen. Innerhalb dieser Entwicklungszyklen tritt häufig ein Polymorphismus kolonialer Hydrazoa auf, bei dem die Medusengeneration in die Kolonie integriert und bis auf die Gonaden völlig rediziert sein kann. Schließlich können sowohl Polypengeneration (*Aglaura*) als auch Medusengeneration völlig fehlen. Letzteres ist auch beim Süßwasserpolypen *Hydra* der Fall. Eine Besonderheit stellt die sexuelle Vermehrung von *Hydra* auch dahingehend dar, daß keine Planularlarve ausgebildet wird. Vielmehr erfolgt die gesamte Entwicklung direkt in einem einzigartigen Dauerstadium.

## **1.2 Der Süßwasserpolyp *Hydra* als entwicklungsbiologischer Modellorganismus**

### **1.2.1 Anatomie und Morphologie**

Die Cnidaria gehören aufgrund ihres diploblastischen Bauplans zu den basalen Metazoa. Der Süßwasserpolyp *Hydra* gehört innerhalb der Nesseltiere der Klasse der Hydrozoa an.

Der Körper der je nach Art von wenigen Millimetern bis hin zu etwas mehr als einem Zentimeter großen Tiere hat die Form eines radiärsymmetrischen, an einem Ende geschlossenen Schlauches, der am oralen Pol eine Tentakelkrone und am unteren Ende einen Fuß mit einer Fußscheibe trägt (Abb. 1-3).



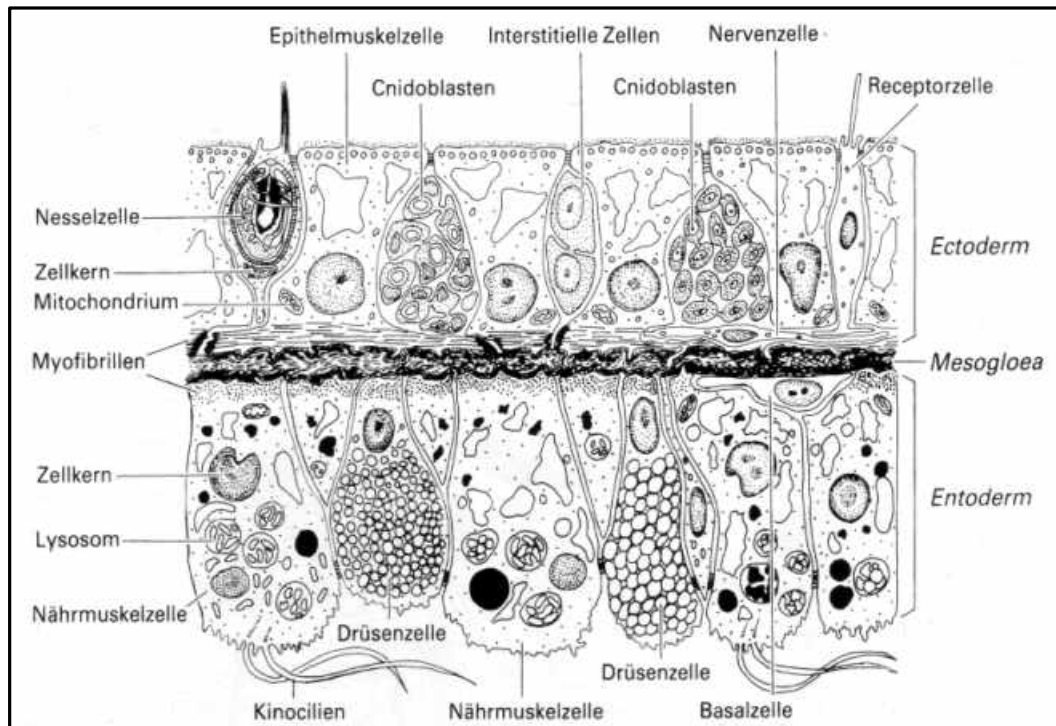
**Abb. 1-3: Schematischer Längsschnitt durch einen *Hydra*-Polyp** (aus: Storch & Welsch: Kükenthal Zoologisches Praktikum, 23.Auflage).

Aus morphologischen und entwicklungsgeschichtlichen Gründen wird der Körper von *Hydra* in fünf Regionen eingeteilt. In der *Kopfregion* bildet das Zentrum des von in der Regel 4-10 Tentakeln umstandenen Mundfeldes eine konische Struktur, das Hypostom. Einen Mund besitzt der *Hydra*-Polyp nicht; vielmehr reißt das Gewebe im Zentrum des Hypostoms bei der Nahrungsaufnahme ein jedes Mal auf und verheilt in der Folge wieder. Die so entstehende Öffnung ist äußerst dehnbar, so daß auch Nahrung, deren Durchmesser viel größer als der des Polypen ist, aufgenommen werden kann. Bei der Nahrungsaufnahme sind die hohlen Tentakel beteiligt, die mit Nematocyten ausgestattet sind. Die Nesselzellen repräsentieren die Autapomorphie der Cnidaria und somit auch von *Hydra*. Sie sind die komplexesten Produkte des Golgi-Apparates und für den Fang und die Lähmung von Beute verantwortlich. *Hydra* besitzt vier Typen von Nematocyten, die sich in ihrer sekretorischen Vakuole und der Nematocyste voneinander unterscheiden lassen (HOLSTEIN, 1981). Die höchste Ansammlung

von Nematocyten ist in den Tentakeln zu finden, wo bis zu 24 Nematocyten in speziell differenzierten Epithelzellen, den Batteriezellen, sitzen. In der folgenden *Gastralregion*, die den größten Teil der Körpersäule einnimmt und auch in die Tentakel reicht, findet die Verdauung statt. Das den Gastralraum auskleidende Entoderm ist reich an Drüsenzellen, die ihre Enzyme in den Gastralraum entleeren. Nach dem Aufschluß der Nahrung nehmen die Nährmuskelzellen die Nährstoffe auf. Daran anschließend befindet sich im unteren Drittel der Körpersäule die *Knospungszone* des Tieres, in der vegetative Vermehrung des Polypen durch die Bildung von Knospen stattfindet. Daran schließen sich ein in Abhängigkeit von der Spezies unterschiedlich geformter *Fußstiel* und die basale *Fußscheibe* an.

*Hydra* besitzt keine Organe. Das Nervensystem ist ein einfaches Nervennetz (SCHNEIDER, 1890), das von Ganglion-, Sensor- und Motoneuronen gebildet wird (DAVIS ET AL., 1968). Dieses Netz weist Konzentrationen im Hypostom und im Fuß auf, es gibt jedoch keine Nervenknoten. Das Muskelsystem wird durch Epithelmuskelzellen gebildet. Diese Zellen vereinen die Charakteristika von Epithel- und Muskelzellen, indem sie in ihrer Basis Myofibrillen ausbilden (MÜLLER, 1950). Dies sind innerhalb der Metazoen die einfachsten Muskelzellen. Es gibt weiterhin keine speziellen Atmungs-, Exkretions-, Gefäß- oder Reproduktionsorgane. Die Körperwand besteht aus einem äußeren Epithel, dem Ektoderm und einem inneren Epithel, dem Entoderm, die durch eine extrazelluläre Matrix, die Mesogloea, voneinander getrennt sind (Abbildung 1-4). Das Ektoderm setzt sich aus Epithelmuskelzellen, drüsenartigen Zellen, sensorischen Rezeptorneuronen, Ganglionzellen und Nesselzellen unterschiedlicher Typen, den Cnidocyten oder Nematocyten zusammen. Das Entoderm hingegen bildet Nährmuskelzellen, Drüsenzellen und Neuronen. In beiden Epithelien kommen kleine weitgehend undifferenzierte Zellen in den Interstitien vor, die pluripotenten i-Zellen. Beide Schichten werden während des letzten Stadiums der Embryogenese gebildet. Im Fall von *Hydra* entsprechen die Keimblätter daher direkt den Epithelien des adulten Tieres. Biochemische und immunohistochemische Daten zeigen, daß die Mesogloea sich aus Typ IV Kollagen, Fibronectin, Heparansulfat Proteoglykan und Laminin zusammensetzt (SARRAS ET AL., 1991, 1994; DAY & LENHOFF, 1981).

Ein ausreichend mit Nahrung versorgter *Hydra*-Polyp befindet sich in einem dynamischen Zustand von kontinuierlichem Wachstum und Musterbildung. Die unipotenten Epithelzellen der beidem Gewebeschichten proliferieren ständig. Die wachsenden Gewebe werden entlang



**Abb. 1-4:** Schematische Darstellung des zellulären Aufbaus der Körperwand von *Hydra* (nach TARDENT, aus Storch & Welsch: Kükenthal Zoologisches Praktikum, 23.Aufl.).

der Körpersäule zum Kopf oder Fuß der *Hydra* verschoben. Durch das Abstoßen überzähliger Zellen behält der Polyp seine Körpergröße bei, dies geschieht überwiegend durch das Ausformen einer Ausbuchtung der Körperwand in der Knospungszone und dem Ausbilden eines Tochterpolypen. Diese ständige Neubildung von Zellen in Verbindung mit Gewebebewegung und Zelldifferenzierung verleihen *Hydra* ihre überragenden Regenerationsfähigkeiten (OTTO & CAMPBELL, 1977). An der weiteren Funktionsfähigkeit der regenerierten Strukturen jedoch haben die pluripotenten i-Zellen, die in der Lage sind, sich in somatische Zellen (Drüsenzellen, Neuronen, Nematocyten) wie auch Keimzellvorläufer zu differenzieren (BOSCH & DAVID, 1987; SCHMIDT & DAVID, 1986; DAVID & MURPHY, 1977), einen großen Anteil. So kann eine experimentell ihrer i-Zell-Population beraubte *Hydra* zwar ihre Gestalt regenerieren, die Neubildung ihres Nervennetzes ist ihr jedoch nicht möglich. Ohne direkte Fütterung stirbt einer solcher Polyp daher, da er nicht in der Lage ist, sich zu ernähren. Diese i-Zellen können bis zu 75% des Polypen ausmachen (DAVID ET AL., 1987), dabei liefern 60% der proliferierenden i-Zellen wieder i-Zellen, die diese Zellpopulation aufrechterhalten.

Obwohl *Hydra* sich bei guter Ernährung primär vegetativ fortpflanzt, sind die Polypen in der Lage, sich sexuell über die Bildung von Gameten zu vermehren. In diesen Fällen bestehen die Gonaden aber im Wesentlichen aus Anhäufungen von spezifischen Sexzellen bei der Hodenbildung im oberen Bereich der Körpersäule, während der Oogenese im mittleren Bereich der Körpersäule bis in die Knospungszone (siehe auch Abbildung 1-3).

### **1.2.2 Achsenformierung und Musterbildung bei adulten Polypen**

Bereits vor über 250 Jahren untersuchte Trembley die bemerkenswerten regenerativen Fähigkeiten von *Hydra*-Polypen (TREMBLEY, 1744). Gewebestücke eines Hydrapolypen sind so in der Lage, Strukturen wie Kopf und Fuß neu zu bilden. Mehr noch, dissoziiert man *Hydra*-Polypen in Einzelzellen und erlaubt diesen, sich neu zusammenzufinden und zu reaggregieren, dann bilden sich aus diesen Aggregaten neue Polypen (GIERER ET AL., 1972). Diese Vorgänge basieren auf einem System der Musterbildung und Musterkontrolle, die, bedingt durch die auch im Polypen ständige Regeneration und Erneuerung von Zellen, bei diesem Organismus ständig aktiv sind und so sowohl die Reorganisation zu neuen Polypen wie auch den Austausch überalteter oder verbrauchter Zellen steuern können.

Die Morphologie von *Hydra* wird dabei durch das Zusammenspiel von Gradienten, die in ihrer Wechselwirkung Positionsinformationen vermitteln, aufrechterhalten, fehlende Strukturen an den korrekten Stellen ersetzt. Ausschlaggebend ist hierbei u.a. der Gradient des Positionswertes. Er bestimmt, daß das Potential zur Bildung eines Kopfes in der kopfnahen Körpersäule, das zur Bildung eines Fußes hingegen im fußnahen Bereich des Tieres am höchsten sind. Stimuliert man eine Proteinkinase C mit Diacylglycerol (DAG), so führt dies zur Entwicklung ektopischer, also am falschen Ort befindlicher Köpfe, die Hemmung des PI-Signaltransduktionssystemes (Phosphatidylinositol) mit Lithiumionen hingegen führt zur Entwicklung ektopischer Füße (MÜLLER, 1990). Bei der Einstellung des Positionswertes spielt diese Signalkaskade also eine besondere Rolle und es wird vermutet (MEINHARDT, GIERER 1974, 2000), daß die Zellen Faktoren mit morphogenetischer Wirkung durch bestimmte Rezeptoren binden und so ihre Lage im Organismus bestimmen können. Weitere wichtige Parameter im Mechanismus der Musterbildung sind entsprechende reziproke Hemmwirkungen (laterale Inhibition) (MEINHARDT & GIERER, 2000).



Ein Morphogen ist eine Substanz, deren Verteilung über die Körperachse einem Gradienten entspricht. Ein solches Morphogen ist der Kopfaktivator (HA, head activator), ein Neuropeptid mit einer molaren Masse von 1124 g/mol. Er ist am besten charakterisiert und seine Aminosäuresequenz ist bekannt, nur das dazugehörige Gen wurde noch nicht isoliert (SCHALLER & GIERER, 1973, SCHALLER, 1973, 1976 A+B). Vor kurzem konnte Heady, ein während der Kopfregeneration und Knospung transient-exprimiertes Gen, isoliert und charakterisiert werden (LOHMANN & BOSCH, 2000). Untersuchungen mit einem nach den Sequenzdaten synthetisierten Genprodukt, einem Peptid, weisen auf eine morphogenetische Wirkungsweise und Schlüsselfunktion Headys während der Achsenbildung hin. So ist transplantiertes Gewebe, das zuvor mit Heady behandelt wurde, in der Lage, stabile sekundäre Achsen zu bilden, bei denen Wirtsgewebe zur Bildung ektopischer Strukturen rekrutiert wird. Von anderen Morphogenen dieses hypothetischen Wirkungsgefüges, dem ebenfalls peptidären Fußaktivator (HOFFMEISTER, 1989; GRIMMELIKHUIJZEN & SCHALLER, 1977) sowie der Inhibitoren Kopfinhibitor (BERKING, 1977) und Fußinhibitor (SCHMIDT & SCHALLER, 1976), sind leider lediglich deren Aktivitäten nachgewiesen wurden. Eine Aufreinigung und genaue Charakterisierung dieser Moleküle war bisher nicht möglich. Man weiß jedoch, daß auch sie von Neuronen produziert werden und nimmt an, daß Aktivatoren und Inhibitoren von den Nervenzellen in das Interstitium freigesetzt werden, wo diese auf die Zielzellen wirken können. Da die höchsten Konzentrationen im Kopf und Fuß des Polypen zu finden sind, sind ihre höchsten Konzentrationen in diesen Regionen zu finden. Beide können jedoch von diesen Stellen aus über die Körperachse diffundieren und bilden so die Gradienten aus. Zielzellen an einer beliebigen Stelle der Körperachse können diese lokalen Parameter erfassen und so ihre Position im Organismus bestimmen (SCHALLER ET AL., 1996).

Eine entscheidende Rolle im Musterbildungsprozeß spielen offenbar auch die Epithelmuskelzellen, da epitheliale Hydren, also solche, die keine i-Zellen und deren Derivate besitzen, in der Lage sind, ihr Muster aufrechtzuerhalten und verlorene Strukturen zu regenerieren (SUGIJAMA & FUJISAWA, 1978).

Schließlich wurden in den letzten Jahren verschiedene Gene isoliert und analysiert, von denen eine Beteiligung an der Bildung verschiedener Strukturen und der Determination der Körperachse vermutet wird (TECHNAU & BODE, 1999; LOHMANN & BOSCH, 2000; HOBMAYER ET AL., 2000; GAUCHAT ET AL., 2000; siehe auch Tabelle 5-1).

### 1.2.3 Die Oogenese von *Hydra*

Im Rahmen sexueller Vermehrung werden genetische Informationen über Keimzellen von einer Generation an die andere weitergegeben. In höheren Metazoen werden die Vorläufer dieser Zellen, die Keimbahnzellen, schon früh von den Linien der somatischen Zellen getrennt. Dies geschieht in der Ontogenese umso eher, je weiter der Weg ist, den die Zellen von ihrer ersten Determination bis zu ihrem endgültigen Bestimmungsort in den Gonaden zurücklegen müssen.

Um die Fähigkeit der sexuellen Vermehrung weiterzugeben, ist bei Lebewesen, deren primäre Vermehrung vegetativ erfolgt, ein Mechanismus nötig, der die Weitergabe von Keimzellen oder deren Vorläufern sichert. Dies wird durch die Existenz morphologisch undifferenzierter totipotenter Zellen oder multipotenter Stammzellen, aus denen sowohl somatische als auch Keimzellen hervorgehen können, ermöglicht. Der Süßwasserpolyt *Hydra* besitzt pluripotente interstitielle Stammzellen, die i-Zellen, die sich zur Erhaltung ihrer Population selbst erneuern und Keimzellen wie auch verschiedene Arten von somatischen Zellen produzieren können. Desweiteren weist er ‚Keimbahnstammzellen‘ auf, die ursprünglich von i-Zellen gebildet werden (BOSCH & DAVID, 1987) (daher existiert bei *Hydra* keine Keimbahn im eigentlichen Sinn), wie diese aber ebenso in der Lage sind, ihre Population zu erhalten. Diese Zellen sind weiblich oder männlich determiniert und können so entweder Spermien oder Eizellen bilden. In *Hydra* erfolgt die Differenzierung seiner ‚Keimbahnzellen‘ oder Sexzellen direkt in Ansammlungen proliferierender Zellen.

Während den letzten 50 Jahren hat es mehrere Versuche gegeben, die Bildung der Oocyte und die Zelltypen und Prozesse, die dabei auftreten, zu verstehen (ZIHNER, 1972; AIZENSHTADT, 1974, 1975, 1978; TARDENT, 1985; HONEGGER, 1989). Im Rahmen dieser Forschungen wurden verschiedene Modelle aufgestellt, die zum Teil widersprüchlich sind. Die bei weitem detailliertesten Untersuchungen stammen von Dr. Aizenshtadt und obwohl spätere Untersuchungen andere Meinungen vertreten, ermöglicht ihre Forschung die genaueste Beschreibung der cytologischen Charakteristika der Oogenese von *Hydra*. Eine drastische Reduktion der Nahrungszufuhr weiblicher *Hydra*-Polypen über einige Tage oder auch eine Reduktion der Umgebungstemperatur hat eine Erhöhung der Proliferationsrate ihrer Keimzellvorläufer zur Folge. Diese Zellen, die sich, wie auch die pluripotenten I-Zellen, im wesentlichen durch ein geringes Cytoplasmavolumen, wenige große Mitochondrien und

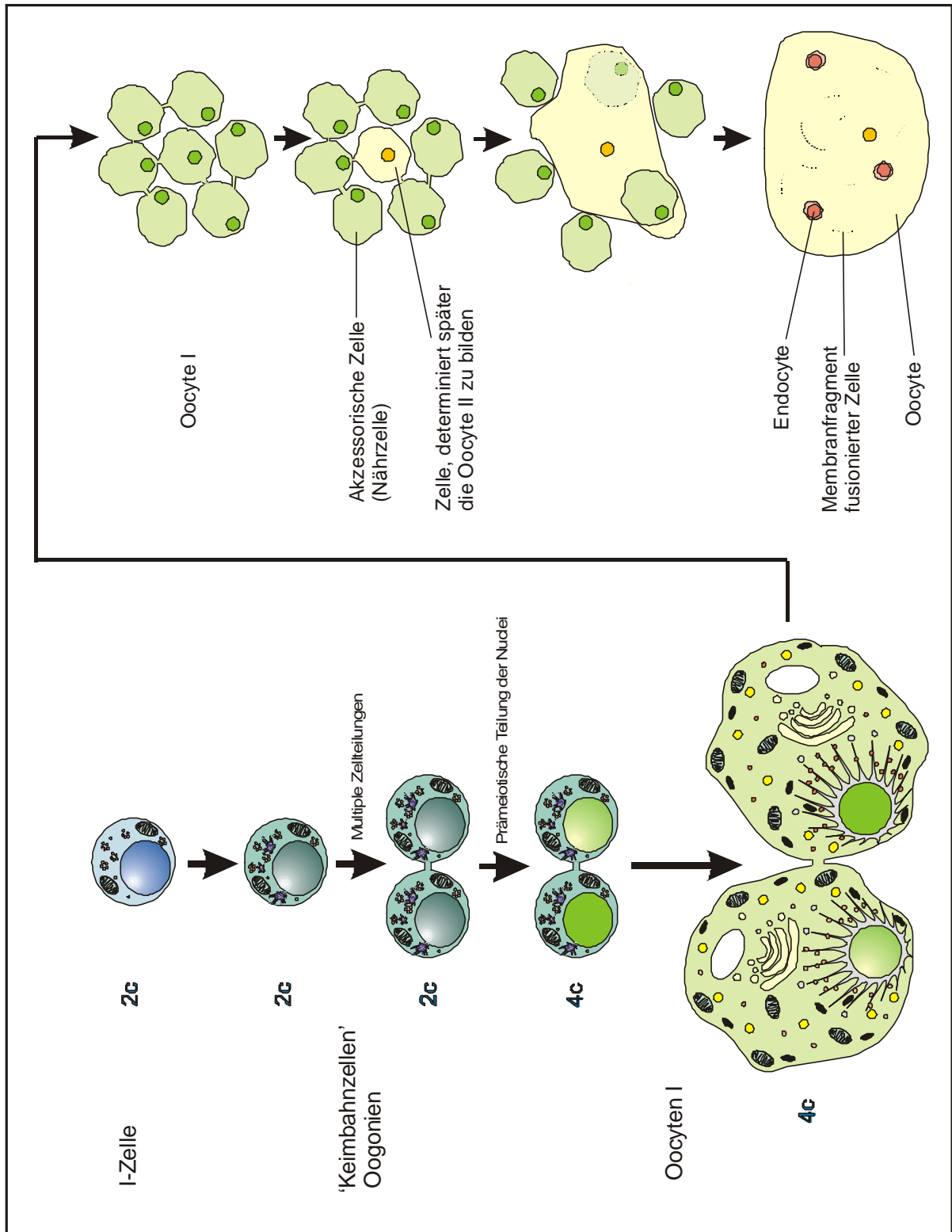
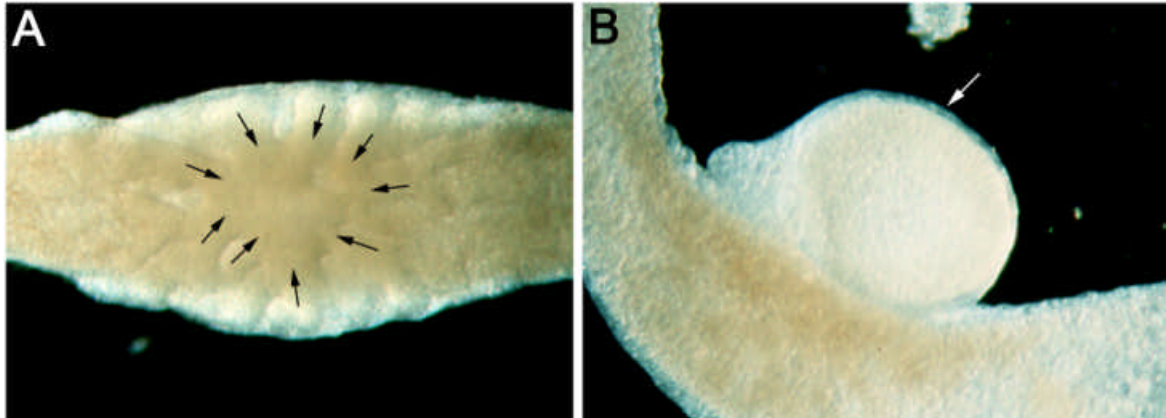


Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Oogenese von *Hydra*.

geringe Anteile an ER und Golgi-Apparat auszeichnen, können von ihnen durch die Existenz von Ribonucleoproteinen in Form von feinem filamentösen Materials unterschieden werden. Dieses Material, das in einer großen Anzahl von Oocyten im Tierreich nachgewiesen werden konnte (CHAPRON & RELEXANS, 1971; AL-MUKHTAR & WEBB, 1971; EDDY, 1975; MAHOWALD, 1975; MAHOWALD & HENNEN, 1971), ist, wie wir inzwischen wissen, bei *Hydra* auch in somatischen Zellen vorhanden (NODA & KANAI, 1980), kann aber in Cnidoblasten nicht nachgewiesen werden. Diese ‚Keimbahnstammzellen‘ werden als Oogonien bezeichnet. Die Proliferation der Zellen geht mit der Erhöhung ihres Zellvolumens und dem Auftauchen verschiedener membranöser Strukturen, rER, vieler Mitochondrien und Golgi-Komplexe mit typischen Dictyosomen, einher. Gleichzeitig werden erste Lipidtröpfchen und Glykogengranula im Inneren dieser Zellen sichtbar. Da die Zellen offenbar eine Phase cytoplasmatischen Wachstums und Vitellogenese erreicht haben, können wir in diesem Zusammenhang bereits von Oocyten 1.Ordnung sprechen. Sie bilden eine mit bloßem Auge sichtbare Verdickung der Epidermis. Zellen eines Typs sind durch Cytoplasmabrücken miteinander verbunden. Innerhalb von etwa 24 Stunden nehmen sie die typischen Charakteristiken von Phagozyten an: Sie bilden Pseudopodien und größere Vakuolen aus. Nur eine Zelle, die sich in einer Ansammlung in der Mitte dieser Verdickung befindet, beginnt nun zu wachsen und die umgebenden Zellen zu phagozytieren. Basierend auf ihrem feinstrukturellen Aufbau wird angenommen, daß alle Zellen die erste prämeiotische DNA-Synthese durchlaufen, bevor sie von der Oocyte aufgenommen werden und daher auch Oocyten repräsentieren. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß diese Zellen tetraploid sind und wie in der meiotischen Prophase befindliche Zellen vier Zentriolen annähernd gleicher Größe aufweisen. Die im Vergleich dazu ebenfalls einen höheren DNA-Gehalt besitzenden i-Zellen befinden sich in der S- oder G2-Phase, weisen aber nur ein einziges Zentriolenpaar auf (AIZENSHTADT, 1974).

Das Wachstum der Oocyte geht schnell vonstatten und basiert auf der Abgabe von Cytoplasma an die Oocyte durch die sie umgebenden Zellen sowie ihrer Phagozytose. Im Verlauf der Oogenese werden so etwa 5000 Zellen in die Oocyte inkorporiert. Durch den Cytoplasmaverlust besitzen diese Endocyten ein geringes Volumen und eine kugelförmige Gestalt. Aufgrund dessen und wegen ihres unregelmäßig strukturierten Nucleoplasmas werden diese Zellen allgemein als apoptotisch beschrieben. Genauere Kenntnisse der biochemischen oder molekularbiologischen Eigenschaften dieser Zellen stehen noch aus. Abbildung 1-6 A. zeigt eine wachsende, zu diesem Zeitpunkt noch schildförmige Oocyte, die

auch als Eifleck bezeichnet wird. Während der Aufnahme der akzessorischen Zellen nimmt die Oocyte in zunehmendem Maße eine kugelförmige Gestalt an. Bis zur vollständigen Reife bleibt sie vom Ektoderm des Muttertieres bedeckt (Abbildung 1-6 B).

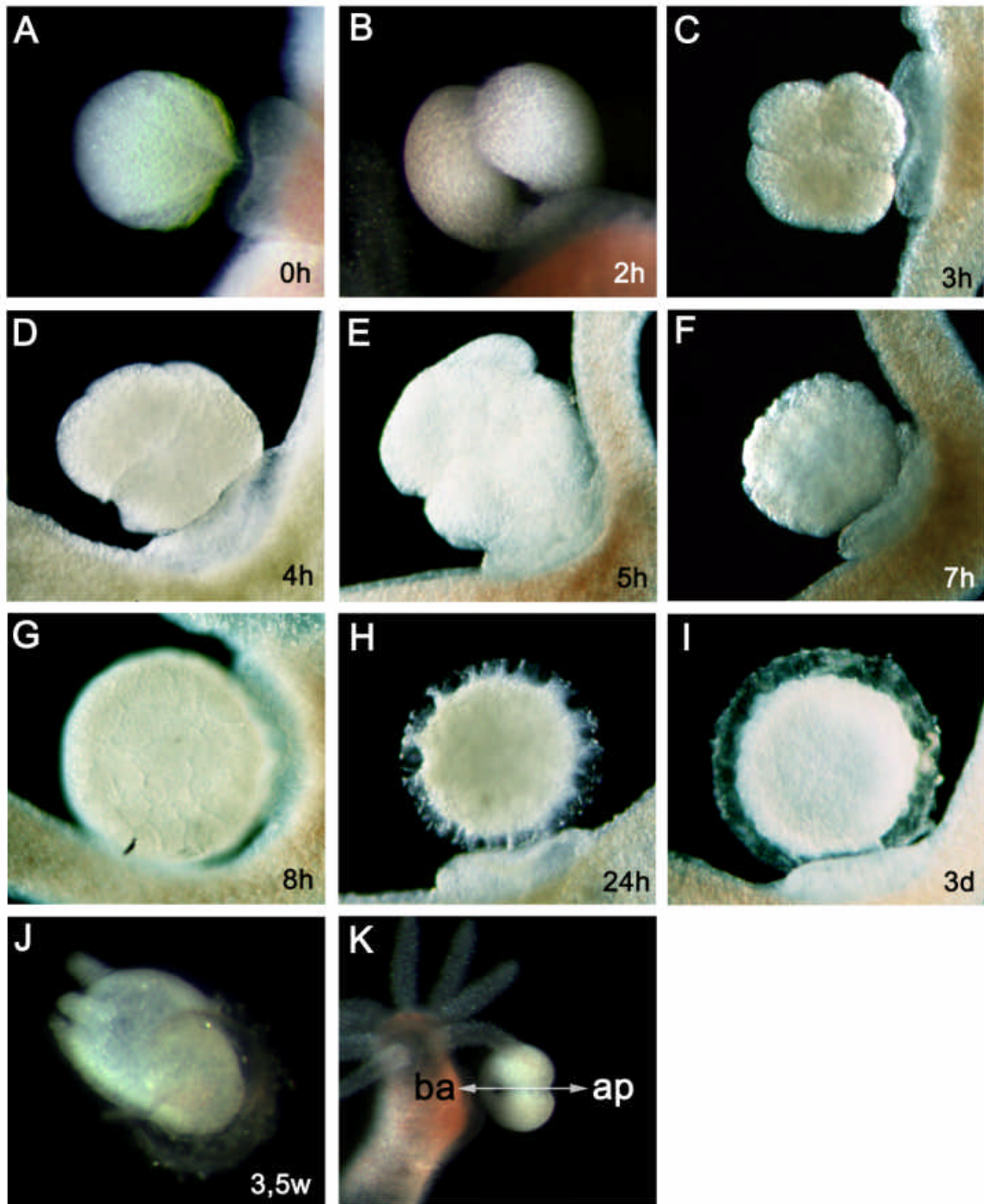


**Abb. 1-6: Oogenese von *Hydra* im lichtmikroskopischen Bild. A)** Wachsende Oocyte (Eifleck), die Pfeile geben die Richtung an, in der die akzessorischen Oocyten phagocytiert werden. **B)** Oocyte vor Abschluß der Reifung. Der Pfeil zeigt auf das die Oocyte einschließende Ektoderm des Muttertieres.

### 1.2.4 Die Embryogenese von Hydra

Ist die Oocytenreifung abgeschlossen, bricht die reife Eizelle durch die ektodermale Epidermis, die sich wie ein Eierbecher um die Basis der Oocyte zusammenzieht (Abb. 1-7 A). Die Befruchtung der Oocyte kann nur an einer bestimmten Stelle, der Befruchtungsmulde am apikalen Pol, an der zuvor die Polarkörper ausgestoßen worden waren, erfolgen. Direkt unterhalb dieser Stelle befindet sich der Pronucleus der Eizelle. Das Zeitfenster für die Befruchtung beträgt etwa zwei Stunden, kommt es in dieser Zeit nicht zu einer Befruchtung, so quillt die Eizelle auf und stirbt innerhalb von 24 Stunden ab. Enthält das umgebende Medium Spermien, beginnt die Furchung etwa 2 Stunden nach seiner Freisetzung. Bei der Furchung handelt es sich um eine Radiärfurchung, die stets unipolar erfolgt. Die erste Furchung ist äqual holoblastisch. Sie verläuft meridional vom animalen Pol aus und dauert etwa 2 Stunden, der Embryo nimmt in dieser Zeit eine Herzform an (Abb. 1-7 B). Diese erste Furchung ist noch nicht vollständig abgeschlossen, wenn die zweite, ebenfalls äquale meridionale Teilung beginnt. Auch sie verläuft vom animalen Pol aus und ihre Achse verläuft im rechten Winkel zur ersten Teilung (Abb. 1-7 C). Eine Stunde später beginnt die äquatoriale dritte Furchung, die an der Seite beginnt, die dem Kopf des Muttertieres zugewandt ist. Da diese Teilung viel näher am apikalen Pol des Embryos verläuft, gehen daraus Blastomeren unterschiedlicher Größe hervor (Abb. 1-7 D). Die unipolare Furchung führt so zu einer asynchronen Teilung der Blastomeren. Bei den nun folgenden Teilungen stehen die Teilungsachsen schräg, und die Teilungen der verschiedenen Blastomeren verlaufen weiterhin asynchron, so daß daraus Blastomeren verschiedener Größe hervorgehen, wobei die kleineren generell näher am animalen Pol des Embryos zu liegen kommen. Bis zum 32-Zell-Stadium teilen sich die Zellen etwa alle 60 Minuten, danach verlangsamt sich diese Rate etwas, und die entstehenden Blastomeren erhalten in zunehmendem Maße eine einheitliche Größe. Etwa 7 Stunden nach Befruchtung hat der Embryo eine morulaähnliche Form erreicht (Abb. 1-7F) und beginnt, eine Coeloblastula zu bilden. Dabei nimmt der Embryo an Größe beträchtlich zu. Die Wand dieser Coeloblastula besteht aus etwa 76 quadratischen Zellen, die in einer einzigen Schicht um einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum angeordnet sind (Abb. 1-7 G und Abb. 1-9 A).

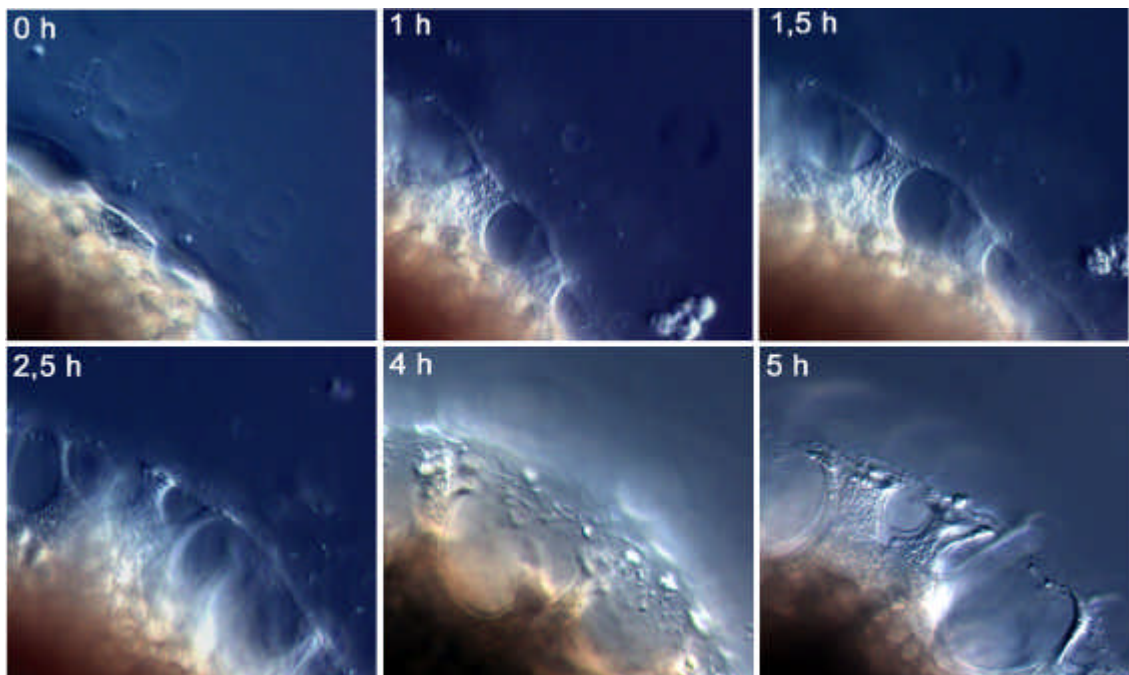
Kurz nach der Blastulabildung beginnt die Gastrulation durch multipolare Einwanderung. Dabei lösen sich, beginnend am apikalen Pol, vereinzelt Zellen aus ihrem Verband und



**Abb. 1-7: Die Embryogenese von *Hydra* im lichtmikroskopischen Bild.** A) Zygote, B) 2-Blastomer-Stadium, C) 4-Blast.-Stadium, D) 8-Blast.-Stadium, E) Stadium der mittleren Furchungen, F) Morulastadium, G) Coeloblastula, H) Postgastruläres ‚spike‘-Stadium, Embryothekbildung, I) Dauerstadium, J) Schlüpfender Polyp mit Tentakelknospen, K) Lage der apikal-basalen (oral-aboralen) Achse. *ap* apikal, *ba* basal.

migrieren in das Blastocoel (Abb. 1-9 B). Im Laufe der Gastrulation nehmen die äußeren Zellen eine säulenähnliche Form an, ihre Endocyten sind nun am basalen Ende lokalisiert. Die inneren Zellen hingegen runden sich ab. Vier Stunden später, etwa 12 Stunden nach Befruchtung, ist die Gastrulation abgeschlossen (Abb. 1-9 C). Der Embryo erscheint nun wieder kleiner, er hat sich zusammengezogen, und seine Zellzahl hat sich während dieser Zeit etwa vervierfacht. Während der nächsten 12 Stunden sind keine Veränderungen zu beobachten.

Etwa 24 Stunden nach Befruchtung beginnen die Zellen der äußeren Schicht damit, Filopodien zu formen, die sie in das umgebende Medium ausstrecken (Abb. 1-7 H und Abb. 1-9 D). Gleichzeitig beginnen die Zellen mit der Bildung einer Embryothek, indem sie an diesen Filopodien und ihrer apikalen Seite Substanzen sezernieren, die nachfolgend auspolymerisieren und eine harte mehrschichtige Theca bilden. Noch während dieser Formierung, die bis zu 24 Stunden dauern kann, werden die Filopodien wieder eingezogen. Zum Abschluß wird unter der Embryothek eine dünne zweite Schicht gebildet. Der Embryo hat nun das Dauerstadium erreicht (Abb. 1-7 I), dessen Länge äußerst variabel ist und 2 bis

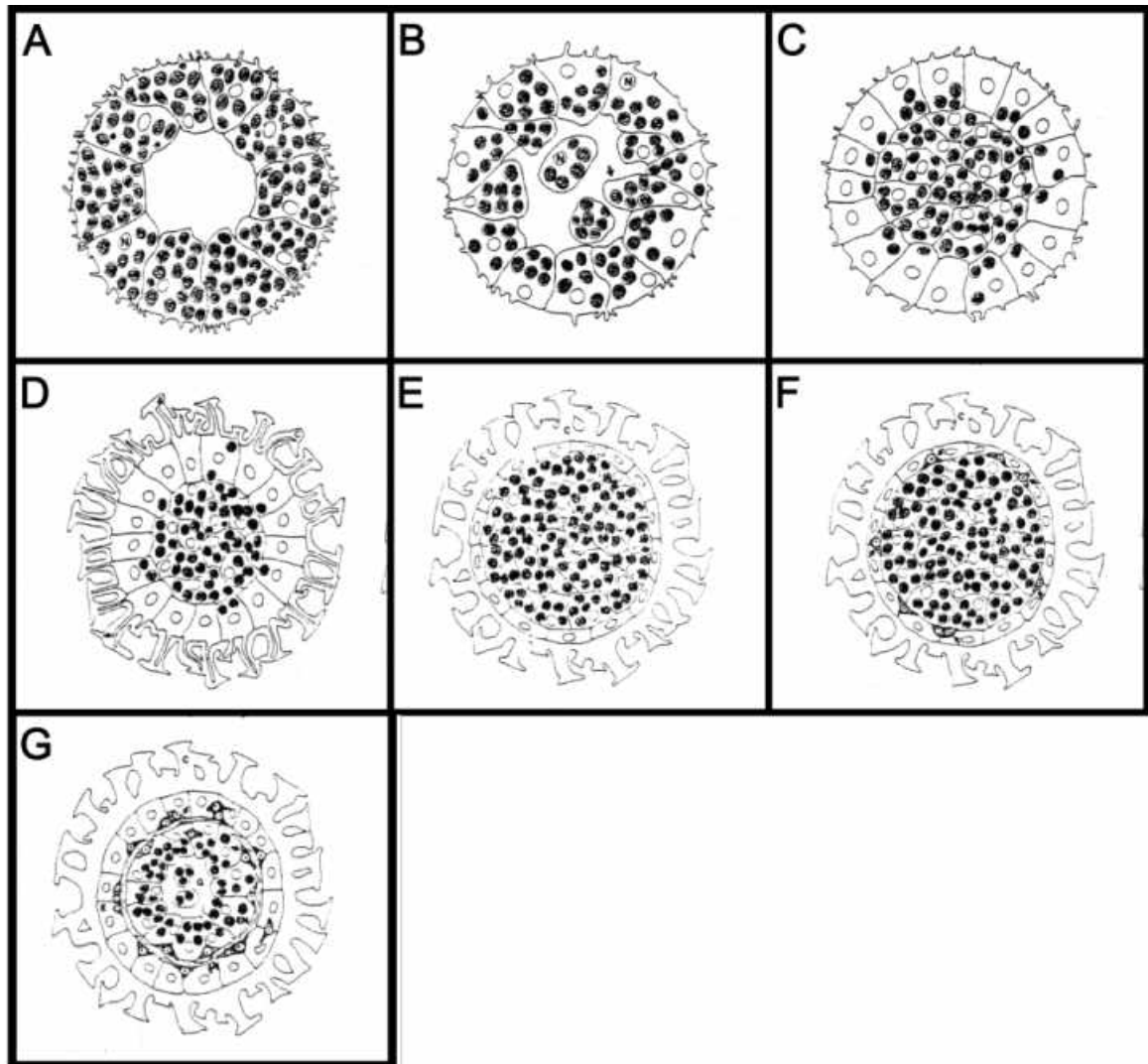


**Abb. 1-8: Zeitreihe der Filopodienbildung während der Formierung der Embryothek.** Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf den Beginn der Beobachtung. Das betrachtete Postgastrula-Stadium war zum Zeitpunkt ,0 h‘ etwa 24 Stunden alt.



über 20 Wochen andauern kann (Abb. 1-9 E). Während dieser ganzen frühen Embryogenese kann sich der Embryo jederzeit vom Muttertier lösen, es gibt keine Verbindung zwischen ihm und dem Polypen. Zumeist erfolgt dieses Lösen jedoch erst im Dauerstadium.

Bereits früh im Dauerstadium flachen sich die äußeren Zellen ab und verlieren ihre Endocyten vollständig. Desweiteren treten nach einiger Zeit die ersten einzelnen I-Zellen im Interstitium der äußeren Zellen auf (Abb. 1-9 F). Sie repräsentieren den ersten Zelltyp, der im adulten Tier zu finden ist.



**Abb. 1-9: Schematische Darstellung der Veränderungen die der *Hydra*-Embryo von der Coeloblastula bis kurz vor dem Schlüpfen durchläuft. A) Coeloblastula, B) Gastrula; Zellen wandern in das innere Lumen ein, C) Postgastrula D) postgastruläres ‚spike‘-Stadium, Embryothekbildung, E) frühes Dauerstadium, F) Mittleres Dauerstadium, erste I-Zellen sind im Interstitium der äußeren Zellschicht sichtbar, G) Embryo vor dem Schlüpfen, Ento- und Ektoderm mit dazwischenliegender Mesogloea sind ausgebildet (aus MARTIN ET AL., 1997).**

Während des Dauerstadiums teilen sich die Zellen nur selten und es sind keine Veränderungen zu erkennen.

Das letzte Embryonalstadium wird durch die Bildung zweier Zellschichten, dem späteren Ekto- und Entoderm des Polypen mit einer dazwischen liegenden extrazellulären Matrix gekennzeichnet. Die äußeren Zellen verändern dabei ihre Gestalt abermals: sie nehmen die Form der Epithelzellen des Polypen an. Diese letzten aber entscheidenden morphologischen Veränderungen beginnen nur wenige Tage vor dem Schlüpfen. Im späteren Ektoderm sind nun viele I-Zellen, einige wenige Nematoblasten und wenige Neuronen nachweisbar. Mit dem Abschluß der Ektodermbildung setzt nun die Bildung des Entoderms ein. Die Zellen, die zuvor die innere Zellmasse formten, reihen sich auf der inneren Seite der extrazellulären Matrix auf und nehmen die typisch säulenförmige Gestalt an. Erste i-Zellen werden in ihren Interstitien sichtbar, und eine Mesogloea wird gebildet (Abb. 1-9 G). Zu diesem Zeitpunkt hat sich die Zellteilungsrate stark erhöht und Zellen der i-Zelllinie machen etwa 40% der Gesamtzellzahl aus.

Nun beginnt der Embryo mit rhythmischen Kontraktionen, die dazu führen, daß die Embryothek Risse bekommt. Etwa 48 Stunden nach Formierung der beiden Epithelien schlüpft das zu diesem Zeitpunkt noch kugelförmige Tier mit seinem oralen Pol voran durch Öffnungen am apikalen Pol der Theka. Die Embryothek ist an dieser Stelle deutlich dünner als an den anderen Seiten. Innerhalb der nun folgenden 2,5 Stunden verändert das geschlüpfte Tier seine Gestalt und wird zunehmend schlauchförmig. Schließlich wird in etwa 15 Minuten das Hypostom ausgebildet und mehrere Tentakelknospen erscheinen (Abb. 1-7 J). Die Beobachtung, daß das geschlüpfte Tier sich sofort nach dem Schlüpfen am Boden einer Petrischale festhaften kann, spricht dafür, daß zu diesem Zeitpunkt schon ein Fuß vorhanden ist. Die junge *Hydra* besitzt die gleichen regenerativen Fähigkeiten wie der adulte Polyp und kann Nahrung fangen, aufnehmen und verdauen sowie die Tentakel ausgebildet sind (MARTIN ET AL., 1997).

### **1.3 Der programmierte Zelltod**

Während der Entwicklung eines mehrzelligen Organismus ist der Tod einiger Zellen ein normaler Bestandteil dieses Prozesses. Nicht benötigte Zellen werden während der Embryogenese, der Metamorphose und im Rahmen der Gewebeerneuerung eliminiert. Dieser

Prozeß, der programmierte Zelltod oder Apoptose, ermöglicht eine spezifische Kontrolle über die Gesamtzellzahl. In *C. elegans*, dessen somatische Zelllinien bekannt sind, durchlaufen 131 von den 1090 somatischen Zellen, die im Laufe der Ontogenese gebildet werden, den programmierten Zelltod. Zellen sterben vorhersehbar zu einer festgelegten Zeit und an einem bestimmten Ort in jedem einzelnen Tier dieser Art. Während der Vertebratenentwicklung werden diese Vorgänge zwar bei weitem nicht so präzise kontrolliert, jedoch werden auch hier Zellen beobachtet, die während der Ausbildung der Extremitäten (MONTERO ET AL., 2001), des Nervensystems und des Immunsystems gezielt eliminiert werden, um die gewünschten Strukturen zu bilden. Eine wichtige Rolle kommt der Apoptose auch bei der Vernichtung von mutierten Zellen zu, die außerhalb der Kontrolle des Organismus geraten sind (JACOBSON ET AL., 1997; MEIER ET AL., 2000).

### **1.3.1 Biochemische Mechanismen der Apoptose bei *Hydra***

Apoptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Dazu gehören die Abnahme essentieller Wachstumsfaktoren, Behandlung mit Glucocorticoiden, Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen und die Aktivierung bestimmter Rezeptoren. Eine andere Möglichkeit der Aktivierung der Apoptose bieten die Faktoren, die von cytotoxischen T-Lymphozyten des Immunsystems der Vertebraten ausgehen. Abschließend sei hier die besondere Fähigkeit des Tumor-Suppressors p53 erwähnt, Apoptose auszulösen. Dieser Weg stellt eine entscheidende Waffe gegen die Krebsentstehung dar.

Der Signaltransduktionsweg, der diese apoptotische Antwort aktiviert, ist in jedem der genannten Fälle unterschiedlich, aber die darauf folgende Antwort ist ähnlich. In den meisten, aber nicht in allen Fällen, werden ursprüngliche Stimuli über einen gemeinsamen Effektor-Reaktionsweg weitergeschaltet (LEWIN, 1997). Die komplexe biochemische Maschinerie, die sich hinter diesen Vorgängen verbirgt, soll hier aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten nicht im Detail erklärt werden. Am Ende der Kaskade steht jedoch die Aktivierung einer Familie von Cysteinproteasen, die ausschließlich Peptidbindungen nach Asparaginsäure spalten und daher als Caspasen bezeichnet werden. Diese Caspasen sind in den Zellen an der Spaltung von zelleigenen DNase-Inhibitoren beteiligt. Die daraus resultierende DNase-Aktivität zeigt sich im folgenden durch die internucleosomale Fragmentierung der DNA. Wie die meisten Metazoen besitzt auch *Hydra* diese Regulatoren der Apoptose (CIKALA ET AL.,

1999). Auch wurden alle weiteren im folgenden beschriebenen Charakteristika apoptotischer Zellen bei *Hydra*-Polypen beobachtet. Es ist daher davon auszugehen, daß auch der basale Vielzeller *Hydra* alle für diesen Vorgang notwendigen und bislang noch nicht identifizierten Faktoren besitzt.

### 1.3.2 Morphologische und biochemische Merkmale apoptotischer Zellen

Zellen, die Apoptose durchlaufen können durch eine Reihe morphologischer Veränderungen identifiziert werden, die sich von denen, die nekrotische Zellen durchlaufen, unterscheiden.

**Tab. 1-1: Übersicht über die morphologischen und eine biochemischen Unterschiede apoptotischer und nekrotischer Zellen im Vergleich.**

	<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
<b>Ziele</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einzelne Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gruppen benachbarter Zellen</li> </ul>
<b>Zellgröße</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schrumpfen</li> <li>• Fragmentierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anschwellen</li> </ul>
<b>Plasmamembran</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intakt</li> <li>• Formierung von Blebs</li> <li>• Phosphatidylserin an der Oberfläche</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frühe Lysis</li> </ul>
<b>Mitochondrien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte Permeabilität der Membran</li> <li>• Inhalte werden ins Cytoplasma Abgegeben</li> <li>• Struktur bleibt weitestgehend erhalten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anschwellen</li> <li>• Strukturverlust</li> </ul>
<b>Organellen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vesikulär / Komprimiert</li> <li>• Auftreten von apoptotischen Körpern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragmentierung und Lysis der Membranen</li> </ul>
<b>DNA-Abbau</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragmentiert                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Internucleosomale Spaltung</li> <li>- Freie 3'-Enden</li> <li>- Leiterbildung in der Elektrophorese</li> </ul> </li> <li>• DNA erscheint im Cytoplasma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diffus und zufällig</li> </ul>

Während der Apoptose kommt es so zur Bildung von apoptotischen Körpern, Zellfragmenten, die Überreste von Organellen und vesikuläre Kernfragmente mit den Abbauprodukten des Fragmentierungsprozesses enthalten. Diese apoptotischen Körper werden schließlich zum Abschluß des programmierten Zelltods durch andere Zellen phagozytiert und abgebaut.

### **1.3.3 Apoptose während der Gametogenese und Embryogenese**

Die entscheidende Rolle, die die Apoptose während der Embryonalentwicklung von Organismen spielt, ist bereits in großem Umfang erforscht worden (Review von GLUCKSMAN, 1951; WYLLIE ET AL., 1980). So sterben Zellen, die sich aus dem Zellverband gelöst haben und daher nicht mehr die lebenswichtigen Signale ihrer Nachbarn wie auch Überlebenssignale über ihre Bindung an die extrazelluläre Matrix erhalten, den programmierten Zelltod. Dieser Mechanismus dient auch der Bildung einfacher einschichtiger Epithelien aus ungeordneten Zellclustern, da nur solche Zellen überleben, die in Kontakt mit der extrazellulären Matrix stehen. Primordiale Strukturen wie z.B. der Müllersche oder Wolffsche Gang während der embryonalen Ausbildung des Exkretions- und Reproduktionssystems des Säugers, die der adulte Organismus nicht benötigt, werden auf diese Weise ebenfalls entfernt. Schließlich können Strukturen, die ausschließlich Larvenstadien vorbehalten sind, eliminiert (SACHS ET AL., 1997) und bei der Formung der Extremitäten auftretende überzählige interdigitale Zellen entfernt werden (MONTERO ET AL., 2001).

Trotz des weitgehenden Verständnisses dieser Vorgänge steht die Forschung die Apoptose während der Oogenese und der frühesten Ontogenese betreffend noch an ihrem Anfang. Nährzellen, denen eine wichtige Funktion in der Ernährung und Versorgung der Oocyte oder des wachsenden Embryos zukommt, sind im Tierreich weit verbreitet. Diese Zellen werden nach Vollendung ihrer Funktion abgebaut. So wird die Apoptose in den Ovariolen von *Drosophila* bei den Nährzellen während und bei den Follikelzellen nach abgeschlossener Oogenese eingeleitet (FOLEY & COOLEY, 1998). Aber auch während der Oocytenreifung verschiedener Organismen wurde Apoptose beobachtet. Bei Säugetieren ist Apoptose von Oocyten in verschiedenen Phasen des meiotischen Prozesses (atretische Oogonien, Oocyten im Pachytänstadium und neu formierte Primordialfollikel) im Fetus nachgewiesen worden (Review von DRIANCOURT ET AL., 1998). Dabei wird eine Beteiligung von apoptosekontrollierenden Faktoren zum einen bei der Überwachung aberranter DNA-Rekombination

und Beseitigung mutierter Zellen wie auch bei der Elimination überzähliger Oocyten durch die Regulation bestimmter Wachstumsfaktoren, wie z.B. den Stammzellenfaktor SCF, vermutet (FELICI ET AL., 1999). Auf diese Weise wird die Größe des entstehenden Reservoirs primordialer Follikel reguliert. Eine weitere interessante Rolle des programmierten Zelltods bei der Regulation der Oocytenreifung wurde kürzlich bei Zebrafischen entdeckt. Viele Teleostei durchlaufen im Laufe ihres Lebens beide Geschlechter, wobei sie entweder als Jungtiere männlich sind und später weiblich werden (proterandrische Zwitter), oder aber zunächst weiblich sind, um dann zu Männchen zu werden (protogyne Zwitter). Letzteres ist auch beim Zebrafish *Danio rerio* der Fall. Im Laufe ihrer Geschlechtsumwandlung zum Männchen wurde die gezielte Elimination von Oocyten durch Apoptose beobachtet (UCHIDA ET AL., 2002).

Auch während der Spermatogenese beim Säuger tritt häufig eine Regulation durch Apoptose auf (MARTINCIC, 2001; Review von PRINT & LOVELAND, 2000). Die Spermatogenese ist ein dynamischer Prozess der Keimzellproliferation und -differenzierung. Während der regulären Spermatogenese nimmt die Anzahl der testikulären Keimzellen im Rahmen eines apoptotischen Prozesses ab. Diese Regulation tritt besonders hervor, wenn die Spermienproduktion infolge Krankheit gestoppt ist.

Vor kurzem konnte Apoptose in den Hoden von *Hydra* nachgewiesen werden (KUZNETSOV ET AL., 2001). Es wird angenommen, daß der programmierte Zelltod während der Spermatogenese bei *Hydra* wie auch bei der Säugerspermatogenese der Elimination defekter Spermien wie auch der Aufrechterhaltung der Homeostase der verschiedenen Keimzellvorläufer dient. Desweiteren konnten in diesem Zusammenhang apoptotische Zellen in degenerierenden Hoden von *Hydra* nachgewiesen werden; dieses Suizidprogramm erfüllt hier offenbar die Funktion zur Entfernung nicht weiter benötigter Strukturen.

Nach erfolgtem Tod der Zellen, die im allgemeinen mit einer Zellschrumpfung einher geht, werden die Überreste in Form apoptotischer Körper phagozytiert. Die an der Bildung der Oocyte von *Hydra* beteiligten akzessorischen Zellen (Endocyten) werden als apoptotisch beschrieben (HONEGGER ET AL., 1989). Obwohl jedoch während der Oogenese eine starke phagozytotische Aktivität verbunden mit dem Schrumpfen der künftigen Endocyten zu beobachten ist, reichen die vorliegenden Daten nicht aus, um diese Annahme zu untermauern.

## 2 Ziele dieser Arbeit

Obwohl in den letzten 30 Jahren einige Versuche unternommen wurden, die bei der Embryogenese von *Hydra* ablaufenden Prozesse ins Licht zu rücken, wissen wir heute noch sehr wenig darüber. Dies ist zum einen dem zuzuschreiben, daß die Gametogenese bei *Hydra* bislang ein Vorgang war, der in *Hydra*-Kulturen nur wenig kontrollierbar ablief, wodurch der Zugriff auf die für funktionelle Untersuchungen unentbehrliche große Anzahl an Embryonen verschiedenster Stadien zunächst lange nicht gegeben war. Auch der Mangel an molekularbiologischem Hintergrund hatte zudem zur Folge, daß Kenntnisse vorerst allein auf licht- und elektronenmikroskopischem Wege gewonnen wurden. So wurden morphologische Charakteristika der an der Oogenese beteiligten Zellen schon früh untersucht. Erst der Umstand, daß ein durch eine Züchtung entstandener Stamm Embryonen in dem Maß verfügbar machte, in dem sie benötigt wurden, sowie jahrzehntelange *Hydra*-Forschung und das dabei gewonnene Wissen um zahlreiche Gene der verschiedensten Gruppen ermöglichten diese Arbeit. Das Ziel meiner Arbeit war die Analyse der frühen Embryogenese von *Hydra* mit molekularbiologischen Mitteln im Hinblick auf die Expression verschiedener Gene, denen eine Rolle während der Achsen- und Musterbildung zugeschrieben wird. Die dem zugrundeliegenden Erkenntnisse wurden durch das Studium der Genexpression während der Regeneration dekapitierter Polypen und der Knospung von Tochterpolypen gewonnen. In dieser Studie sollten diese Ergebnisse durch die Betrachtung der Vorgänge bei der *de novo* Achsenformierung und Musterbildung evaluiert werden. Konkrete Fragestellungen waren:

- Zu welchen Zeitpunkten und in welchem zeitlichen Ablauf werden die untersuchten Gene exprimiert?
- Transkripte welcher der untersuchten Gene sind bereits in der Zygote nachweisbar?
- Sind diese frühen Transkripte maternalen Ursprungs oder werden sie vom Embryo transkribiert?
- Sollten sie bereits zu diesem Zeitpunkt aktiv transkribiert werden, welche Zellen/Blastomere sind daran beteiligt?
- Welche Rolle spielen die als apoptotisch geltenden Endocyten der *Hydra*-Embryonen?

### 3 Verwendete Materialien

#### 3.1 Lebendmaterial

##### 3.1.1 Tiermaterial

Der einzige während dieser Arbeit verwendete *Hydra*-Stamm trägt die Bezeichnung AEP und ist das Resultat einer Züchtung aus dem Jahren 1994-1995. Da der Ursprung dieser Tiere nur noch wenigen bekannt ist, sei er hier erwähnt: 1980 wurden Tiere eines der ursprünglichen Stämme von Lynne Littlefield aus einem Gewässer in den Sierra Mountains nahe Lake Tahoe in Californien isoliert (CA). Der andere Stamm stammt aus einem Bach auf dem Bren Mawr College campus in Philadelphia, aus dem er im selben Jahr von Carolyn Teragawa entnommen wurde (im Folgenden PA1 genannt). 1994 wurden erneut Tiere in Pennsylvania gesammelt, die bei einer Rückkreuzung verwendet wurden (PA2). Die Kreuzung erfolgte folgendermaßen (nach Patricia Bode):

- a) P: PA1 Weibchen x CA7 Männchen  
F1: Tiere mit den Bezeichnungen A, E und G schlüpfen am 8.10.92
  
- b) A4 Weibchen x E2 Männchen  
F2 AE schlüpfte 4/94

PA 2 Männchen wurden 11/94 in Pennsylvania gesammelt und nach Californien gesandt.

- c) AE20 Weibchen x PA2 Männchen  
F3 AEP schlüpfte 3/95

Diese Tiere zeigen alle Charakteristika von *Hydra vulgaris*, dazu gehört ein im Vergleich zu Tieren der Art *Hydra oligactis* nicht ausgezogener Fuß und ein longitudinal aufgewickelter Nematocystenschlauch der holotrichen Isorhizen. Nach den Beobachtungen amerikanischer Kollegen scheint es jedoch gesichert, daß *Hydra littoralis* im Norden der Vereinigten Staaten dominiert und eine einheitliche Verbreitung aufweist. Die Beobachtungen, daß Tiere der Arten *Hydra carnea*, *Hydra littoralis* und *Hydra vulgaris* frei miteinander kreuzbar sind,



erschwert die Einordnung umso mehr. Ich gehe daher davon aus, daß die verwendeten Tiere zu einer Großgruppe, der *Hydra vulgaris*-Gruppe, gehören, die *Hydra littoralis* mit einschließt. Sie sind aber keineswegs mit der europäischen *Hydra vulgaris* völlig identisch, wie auch vergleichende RAPD-Untersuchungen (KUZNETSOV, 2002) und verschiedene Klonierungsversuche zeigen. Die Tiere zeichnen sich insbesondere dadurch aus, daß eine Gametenbildung durch eine kontrollierte Hungerphase induziert werden kann. Die für molekularbiologische Untersuchungen notwendigen großen Mengen an Embryonen verschiedener Stadien wird so in kurzer Zeit verfügbar.

### 3.1.2 Bakterien

Der für die Klonierung verwendete Bakterienstamm ist der elektrokompetente E. coli Stamm XL-1 Blue, der eine hohe Kopienzahl integrierter Plasmide ermöglicht.

## 3.2 Verwendete Chemikalien und Lösungen

### 3.2.1 Puffer, Hybridisierungslösungen und Lösungen für in-situ-Hybridisierung

- 2x Reaktionspuffer                      40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 280 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>
- Ampicillin-Stammlösung                50 mg/ml in Aqua bidest.
- Bleicitratlösung                         1,33 g Bleinitrat, 1,76 g Natriumcitrat-Dihydrat in Aqua bidest lösen, 8 ml 1 M NaOH dazugeben und auf 50 ml auffüllen.
- Blockierlösung                         80% MAB-B + 20% Schafserum (Sigma)
- CHAPS                                      10% CHAPS in DEPC-H<sub>2</sub>O
- Denhardt's Lösung (50x)                1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Ficoll, 1% BSA Fraktion V in DEPC-H<sub>2</sub>O. Filtersterilisieren und in 1ml Aliquots bei -21°C einfrieren.
- DEPC-H<sub>2</sub>O                                 0,1% DEPC in Aqua bidest; ÜN gerührt; 60 min autoklaviert
- Formaldehyd 3,7%                        37% Formaldehyd 1:10 in Hydra-Medium verdünnen
- Glycinlösung                              Stammlösung 1:10 in DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt (4 mg/ml)

- Glycinstammlösung                    40 mg/ml in DEPC-H<sub>2</sub>O
- Heparinlösung                        10 mg/ml in DEPC-H<sub>2</sub>O
- Hybridisierungslösung                50% Formamid, 5x SSC, 0,1% Tween-20, 0,1% CHAPS,  
1x Denhardt's Lösung, 100 µg/ml Heparin in DEPC-H<sub>2</sub>O
- IPTG                                        200 mg/ml in Aqua bidest.
- Levamisol                                1M Levamisol in Aqua bidest
- MAB                                        100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 in DEPC-  
H<sub>2</sub>O; pH-Wert mit NaOH einstellen
- MAB-B                                    MAB + 1% BSA Fraktion V
- MAB-T                                    MAB + 0,1% Tween-20
- NTMT                                      100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 50 mM  
MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20 in DEPC-H<sub>2</sub>O
- Paraformaldehyd 4%                 1,6 g Paraformaldehyd bei 55°C in 38 ml Hydra-Medium  
oder PBT (nach Anwendung) mit einem Tropfen 10 M  
NaOH lösen, dann pH-Wert auf pH 7,5 einstellen.
- PBS                                        0,15 M NaCl, 0,08 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,021 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH  
7,34 in DEPC-H<sub>2</sub>O
- PBT                                        0,1% Tween-20 in PBS
- Proteinase K                            1 mg/ml in DEPC-H<sub>2</sub>O
- SSC (20x)                                3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7.0
- STARKS 30%                            30% Formamid, 0,02 % BSA Fraktion V, 0,02 % Ficoll,  
0,02 % Polyvinylpyrrolidon, 5x SSC , 1 % SDS in DEPC-  
H<sub>2</sub>O
- TAE (50x)                                2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA, pH 8.0
- TBE (2,5x)                               225 mM Tris (27,5 g/l), 225 mM Borsäure (13,75 g/l), 5  
mM EDTA (10 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0)/l)
- Triethanolaminlösung                0,1 M, pH 7,8 in DEPC-H<sub>2</sub>O
- X-Gal                                       20 mg/ml in DMFA

### 3.2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten, soweit möglich, die Reinheitsstufe p.a. (zur Analyse).

▪ 1,2-Propylenoxid	Plana
▪ Acetic Anhydride	Sigma
▪ Agarose	Sigma
▪ Ampicillin	Merck
▪ APS	Roth
▪ Bactoagar	Roth
▪ Bakto-Trypton	Difco
▪ Bleiazetat	Merck
▪ Boratpuffer pH 9,22	Merck
▪ Borax	Merck
▪ Borsäure	Roth
▪ Bromphenolblau	Fluka
▪ BSA, Fraktion V	Merck
▪ CHAPS	Roth
▪ Chloroform	Roth
▪ DEPC	Roth
▪ Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
▪ DMFA	Roth
▪ DMSO	Roth
▪ DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter)	Fermentas
▪ DNA-Ladepuffer (6x)	Fermentas
▪ dNTP	Gibco/Amersham Pharmacia Biotech
▪ EDTA	Merck
▪ Essigsäure	Roth
▪ Ethanol 99,6% reinst	Roth
▪ Ethidiumbromid	Roth
▪ Ficoll	Sigma
▪ Formaldehyd, 37% (stabilisiert)	Roth

▪ Formamid	Roth
▪ Glukose	Roth
▪ Glutaraldehyd	Serva
▪ Glycin	Roth
▪ Glyzerin	Roth
▪ HCl	Merck
▪ Hefe-Extrakt	Gibco
▪ Heparin	Roth
▪ IPTG	Sigma
▪ Kaliumchlorid	Merck
▪ Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
▪ LB Broth Base	Life Technology
▪ Levamisol	Sigma
▪ Magnesiumchlorid	Sigma
▪ Magnesiumchlorid, 50 mM	Gibco
▪ Maleinsäure	Roth
▪ Methanol	Roth
▪ Natriumcacodylat	Fluka
▪ Natriumchlorid	Roth
▪ Natriumcitrat	Merck
▪ Natriumhydrogencarbonat	Merck
▪ Natriumpyruvat	Sigma
▪ Natriumthiosulfat	Merck
▪ NBT/BCIP-Stammlösung	Rôte
▪ Osmiumtetroxid	Plana W. Plannet GmbH
▪ Pioloform	Plana
▪ Polyvinylpyrrolidon	Sigma
▪ Rifampicin	Sigma
▪ Schafserum	Sigma
▪ Schiff's Reagenz	Sigma
▪ Sequagel complete Puffer Reagenz	National Diagnostics
▪ Sequagel XR	National Diagnostics
▪ Silbernitrat	Merck

▪ TEMED	Merck
▪ TES	Sigma
▪ Triethanolamin	Sigma
▪ Tris	Roth
▪ Triton X-100	Merck
▪ Tween-20	Roth
▪ Uranylazetat	Plana
▪ Urethan	Sigma
▪ X-Gal	Sigma
▪ Xylencyanol	Fluka
▪ Xylol	Merck

### 3.2.3 Oligonukleotide

▪ AF_25S_3'	5'-ATG TGA TTT CTG CCC AGT GC-3'
▪ AF_25S_5'	5'-CAG TGT CTT CGA CAG GAT CG-3'
▪ AF_Budhead_fw	5'-GCC AAA CCG CCT TAC AGY TAY ATH TC-3'
▪ AF_Budhead_rev	5'-TAA CAT CCG TTT TCR AAC ATR TTB CC-3'
▪ AF_CnGsc200_fw	5'-CCG AGG TTA GAG TTT CAA TGC-3'
▪ AF_CnGsc200_rev	5'-TGA CTA CTT TGA CGC CGT AGC-3'
▪ AF_CnNK2_fw	5'-AAC TGC GAA AAC CGA ATA CC-3'
▪ AF_CnNK2_rev	5'-TAC GGT GGA GGT CTT GTA CG-3'
▪ AF_Frizzled400_fw	5'-CAT CGA AAC CCT GAA GAA GC-3'
▪ AF_Frizzled400_rev	5'-ATG CAC AAC CAG GTT TAC CC-3'
▪ cb_alx_3'_oute	5'-GAA ATG GGG AGA GTT ATT CG-3'
▪ cb_alx_5'_1	5'-GCA TCG ATA TGA TAC TTG G-3'
▪ cb_bcat_s_3'_1	5'-ACA TTC CTG TTC TAG CAC GC-3'
▪ cb_bcat_s_5'_1	5'-GAA TGC TTG AAG ATC GTC GG-3'
▪ cb_bra_sonde_3'_1	5'-CCG AGC TAG TGG TAG CTG G-3'
▪ cb_bra_sonde_5'_1	5'-GAC ATT GAT GGA GTT GCG C-3'
▪ cb_cnox2_s_3'_1	5'-GAA GAG GTA CCT TCA CCT GGT TC-3'
▪ cb_cnox2_s_5'_1	5'-GTA TAA GAT ACG GCA GCA GCC TG-3'

- cb\_Hym301\_s\_3'\_1                    5'-GAA CAA TAA CCA TTC AAG TAG C-3'
- cb\_Hym301\_s\_5'\_1                    5'-TGA ATG ATC CTT CAT TTG GG-3'
- cb\_hyp1\_sonde\_3'\_1                5'-CAG TTA GCT CTT GCA TTG C-3'
- cb\_hyp1\_sonde\_5'\_1                5'-TTA AAG GAC ATC AAC AAC GC-3'
- cb\_otx\_sonde\_3'\_1                   5'-GGG TAA GAG TGT CCA GTG CCT C-3'
- cb\_otx\_sonde\_5'\_1                   5'-CCG ATA GCC CCT TGG ATA GTC C-3'
- cb\_wnt\_s\_3'\_1                        5'-CAG CGC CAA CCT TCG TCC G-3'
- cb\_wnt\_s\_5'\_1                        5'-TGG ATG GCG CTT GGG ACG C-3'
- Heady-fw                              5'-AGT CAG CCA CAG CAA CAT AGG-3'
- Heady-rev                             5'-AGT CAG CCA CTC GGG GAG C-3'
- HVNOS1\_F                            5'-GAT CCA GAT GAG ACG AGT G-3'
- HVNOS1\_R                            5'-CAT GTG ACT TGC AGA GTG G-3'
- HyTcf\_fwd                            5'-GGC GAA GCT ACA GAA GTT CC-3'
- HyTcf\_rev                            5'-CGT CGA GTG CCT TTC GTC-3'

Alle angegebenen Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech bestellt.

### 3.2.4 Kits und Enzyme

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| ▪ Agar 100 Einbettungmedium                   | Agar Scientific            |
| ▪ Digoxigenin-RNA-Labeling Kit                | Rôche                      |
| ▪ DNase I, RNase-frei                         | Amersham Pharmacia Biotech |
| ▪ First-strand-cDNA-Synthesis Kit             | Amersham Pharmacia Biotech |
| ▪ PeqGOLD RNAPure                             | Peqlab                     |
| ▪ pGEM-T Vektor-Kit                           | Promega                    |
| ▪ Proteinase K                                | Sigma                      |
| ▪ QIAquick Gel Extraction Kit                 | Qiagen                     |
| ▪ QIAquick Mini-Prep Plasmid Purification Kit | Qiagen                     |
| ▪ SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC   | Epicentre Technologies     |
| ▪ Superscript II Reverse Transcriptase        | Gibco BRL                  |
| ▪ T4 DNA-Ligase                               | Promega                    |
| ▪ Taq DNA-Polymerase                          | Amersham Pharmacia Biotech |

- |                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| ▪ Taq DNA-Polymerase                 | Gibco BRL |
| ▪ Polyacrylamid-Horizontalgel-System | ETC       |

### 3.2.5 Nähr- und Kulturmedien

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| ▪ Artemien-Kulturmedium | 31,8 g Meersalz / 1 Aqua bidest  |
| ▪ Dissoziations-Medium  | 3,6 mM KCl, 6 mM CaCl <sub>2</sub> , 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> , 6 mM Natriumcitrat, 6 mM Natriumpyruvat, 6 mM Glukose, 12,5 mM TES, 50 mg/l Rifampicin, pH 6,9 in Aqua bidest. |
| ▪ Hydra-Medium          | 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM NaCl, 0,1 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1 mM KCl, 1 mM Tris-Hcl, pH 7,8 in Aqua bidest  |
| ▪ LB-Amp-Medium         | 20 g LB Broth base in 1 l Aqua bidest lösen, 1 ml Ampicillinstammlösung (50 mg/ml) zugeben   |
| ▪ LB-Amp-Agar           | LB-Amp-Medium wie angegeben mischen und 15 g Bactoagar vor dem Autoklavieren dazugeben.  |
| ▪ SOB-Medium            | 20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefe-Extract, 0,58 g NaCl und 0,19 g KCl in 1 l Aqua bidest  |
| ▪ SOC-Medium            | 10 ml SOB-Medium, 100 µl 2 M Glukose (steril), 100 µl 1M MgCl <sub>2</sub> (steril)  |

### 3.2.6 Vektorplasmide

Für die Klonierung wurde ausschließlich pGEM-T-Vektor (Promega) verwendet.

### 3.2.7 Antikörper

- |  |       |
|--|-------|
| ▪ Anti-digoxigenin Fab-Fragmente AP-konjugiert | Rôche |
| ▪ Anti-Maus-mAB TRITC-konjugiert               | Sigma |

- Anti-BrdU-AB Klon BU-33 (Maus) Sigma

### 3.3 Verwendete Geräte

#### 3.3.1 Elektrophorese

- Agarose-Elektrophorese-Kammer Omni Separation Systems
- Netzteil für die Elektrophorese PS250 Hybaid
- Netzteil für die Elektrophorese LNG 350-06 Heinzinger

#### 3.3.2 PCR-Cycler

- Cyclone Gradient Peq-Lab
- Primus 96 plus MWG Biotech
- Primus 25 MWG Biotech

#### 3.3.3 Zentrifugen

- Biofuge 13 Heraeus
- Eppendorf 5415 D Eppendorf
- Eppendorf 5417 R (Kühlzentrifuge) Eppendorf

#### 3.3.4 Inkubatoren

- Thermoinkubator Heraeus
- Thermoschüttler Certomat H B. Braun
- Thermomixer compact Eppendorf



### 3.3.5 Optische Geräte

- |   |             |
|---|-------------|
| ▪ Binocular mit Phototubus                  | Leica       |
| ▪ Digitalkamera Axiocam                     | Zeiss       |
| ▪ Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2           | Zeiss       |
| ▪ IMAGO compact imaging system              | B&L Systems |
| ▪ Transmissionselektronenmikroskop CM 10    | Philips     |
| ▪ Transmissionselektronenmikroskop EM 208 S | Philips     |
| ▪ CLSM Leica TCS-SP                         | Leica       |

### 3.3.6 Sonstige

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| ▪ Analysewaage 1205 MP                       | Sartorius               |
| ▪ <i>Artemia salina</i> -Zysten              | Zoo Zajac               |
| ▪ Bio Photometer                             | Eppendorf               |
| ▪ Chelex-100                                 | Sigma                   |
| ▪ Diamantmesser                              | C. Schmied Labortechnik |
| ▪ Elektroporationsküvetten, Spaltbreite: 1mm | Bio-Rad                 |
| ▪ Eppendorf-Gefäße, 1,5ml, 0,2 ml            | Sarstedt                |
| ▪ Feinwaage Kern 770                         | Kern                    |
| ▪ GenePulser                                 | Bio-Rad                 |
| ▪ Glaspipetten 15 cm                         | Roth                    |
| ▪ Gummiformen für die Flacheinbettung        | Plana                   |
| ▪ HyBond Nylon <sup>+</sup> -Membran         | Amersham                |
| ▪ Kolbenhubpipettensatz Eppendorf Research   | Eppendorf               |
| ▪ Konische Röhrchen 15 ml, 50 ml             | Sarstedt                |
| ▪ LI-COR Gene ReadIR 4200                    | MWG Biotech             |
| ▪ Magnetrührer                               | Eydam Heidolf           |
| ▪ Netze für die Elektronenmikroskopie        | Plana                   |
| ▪ Objektträger                               | Menzel-Gläser           |
| ▪ Petrischalen                               | Greiner                 |

▪ pH-Meter pH 211	Hanna Instruments
▪ Pipettenspitzen mit Filter 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt
▪ Plastikschaalen für die Hydrakultur	Geida
▪ Plastiksiebe (Maschengröße 0,5 mm)	Tee- und Haushaltwarengeschäfte
▪ Pulselektroporator	Bio-Rad
▪ Siebeinsätze für 12er Zellkulturplatten	Corning Costar
▪ Skalpellklingen	Bayha
▪ Slot-Blot-Kammer	Schleicher & Schüll
▪ Spektrophotometer Mod. 100-40	Hitachi
▪ UV-Stratalinker	Stratagene
▪ UV-Transilluminator Chroma 43	Vetter GmbH
▪ Vortex Genie 2	Scientific Industries
▪ Whatman-Papier	Whatman
▪ Zellkulturplatten, 12er, 24er	Corning Costar

## 4 Methoden

### 4.1 Das Versuchstier

#### 4.1.1 Vorbemerkung

Der Süßwasserpolyp *Hydra* gehört innerhalb der Cnidaria zu den Hydrozoen, genauer zur Ordnung Hydrina und zur Familie Hydridae. Er ist weltweit verbreitet und besitzt eine große Bedeutung als Labortier für morphogenetische und funktionsmorphologische Untersuchungen.

#### 4.1.2 Haltung und Zucht

Die Haltung der Tiere erfolgte in *Hydra*-Medium in belüfteten Kunststoffbehältern bei 18°C und einem Tageszyklus mit einer Dauer von 12 Stunden (LENHOFF & BROWN, 1970). Die Nahrung der Polypen bestand aus frisch-geschlüpften Nauplius-Larven des Salzkrebsschens *Artemia salina*. Die Dauereier dieser Krebsart wurden 24 bis 48 Stunden bei 30°C in Saline ausgebrütet und in Leitungswasser gewaschen, um das Salz zu entfernen. Anschließend wurden die Krebse in Hydramedium aufgenommen und verfüttert. Die Fütterung erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche. Die Kulturen wurden 6-8 Stunden nach Fütterung gewaschen, um Nahrungsreste und Stoffwechselprodukte zu beseitigen. Alle zwei Wochen wurden die Schalen gereinigt, um den Schalenboden von anheftenden Bakterien und Pilzen zu befreien, die, wenn in großen Mengen vorhanden, das Mikroklima der Kultur beeinträchtigen können.

#### 4.1.3 Induktion der Gametogenese

Unter den geschilderten Standard-Kulturbedingungen wird man das Ausbilden von Testes oder Oocyten bei *Hydra*-Polypen nur selten beobachten können. Da es für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen dringend erforderlich war, große Mengen an Embryonen unterschiedlichster Entwicklungsstadien zu erhalten, wurde mit einem Stamm gearbeitet, bei dem sich die Gametogenese induzieren ließ.

Nachdem die Tiere einer Schale mindestens 3 Wochen in Folge kontinuierlich Nahrung erhalten hatten und sich in einem Zustand stetiger vegetativer Vermehrung befanden, wurden sie 4-5 Tage nicht und darauffolgend nur alle 2-3 Tage mäßig gefüttert. Etwa 10-14 Tage später wurden von den männlichen Tieren der Kultur Testes ausgebildet. Die Oocytenreifung bei den weiblichen Tieren erfolgte zeitversetzt wenige Tage später.

#### **4.1.4 Embryonengewinnung und –aufbewahrung**

Für die Durchführung der Versuche war es notwendig, die Embryonen von den Muttertieren zu trennen. Natürlicherweise geschieht dies nach Ausbildung der Oothek, zuvor ist der entwickelnde Embryo über Reste des mütterlichen Ektoderms, den ‚Eierbecher‘ mit dem Polypen verbunden. Zur Gewinnung der Embryonen wurden die Tiere mit Embryonen in Petrischalen überführt und diese mit einem Skalpell, z.T. zusammen mit dem erwähnten Ektodermrest, vorsichtig abgetrennt. Da insbesondere Eizellen und frühe Embryonen vor dem mid-cleavage-Stadium sehr fragil sind, mußte mit außerordentlicher Vorsicht vorgegangen werden. Für die Vorbereitung der nun folgenden Versuche wurden die gewonnenen Embryonen unterschiedlich behandelt:

- a) Für die Extraktion von totaler RNA wurden sie in peqGOLD RNAPure (Peqlab) unter Zuhilfenahme eines Einwegpistills homogenisiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert. Phenol und Guanidiniumisothiocyanat wirken dabei dem Abbau der RNA entgegen.
- b) Für in-situ-Hybridisierungen und Silberfärbung der Nucleoli wurden die Embryonen in 4% frischem Paraformaldehyd in *Hydra*-Medium über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  fixiert und anschließend in Methanol überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Längere Fixierung führt zu einem Verlust des Signals bei in-situ-Hybridisierungen.
- c) Im Fall des Nuclear run-ons wurden die Kerne der Embryonen isoliert und in 2x Reaktionspuffer bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.
- d) Alle Untersuchungen, die eine volle Funktionalität der Zellen voraussetzen, wurden sofort ohne Vorbehandlung der Embryonen und in *Hydra*-Medium ausgeführt.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolation totaler RNA aus Embryonen

Die Isolation totaler RNA aus jeweils 20-25 Embryonen/Probe erfolgte unter Verwendung des Extraktionsmediums peqGOLD RNAPure der Firma Peqlab nach den Angaben des Herstellers. Dieses Verfahren vereint die Vorteile einer Extraktion mit chaotropen Salzen und einer Phenol-Chloroform-Extraktion und ermöglicht die Isolation in wenigen Schritten. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Da die so erhaltenen Proben in der Regel noch Kontaminationen mit DNA enthalten, mußte ein DNase-Verdau durchgeführt werden, um diese vollständig zu entfernen. Die folgende Tabelle gibt den Reaktionsansatz an:

**Tab. 4-1: Pipettierschema für die DNase I-Behandlung extrahierter Gesamt-RNA**

Komponente	Volumen [µl]
RNA	19,0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	19,2
1 M Tris-HCl, pH 7,5	3,2
RNaseOut (40u/µl)	1,0
DNase I	2,0
DEPC-H <sub>2</sub> O	35,6
Gesamt	80

Der Verdau erfolgte für 40 min bei 37°C im Schüttelinkubator bei 1000 rpm. Die RNA wurde anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt: zur Aufreinigung wurde jeder Reaktionsansatz mit 100 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und 1 min kräftig gemischt (Vortex). Alle nun folgenden Zentrifugationen erfolgten bei 4°C und 14000 rpm. Nach Zentrifugation für 5 min wurden die in der wäßrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren mit 1/5 Volumen Ammoniumacetatlösung (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (99,6%) über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei wurde das Pellet zweimalig mit 1 ml Ethanol (80%, in DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen, gefolgt von Pelettierung für 10 min und

schließlich bei 37°C für 7 min angetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Verunreinigung mit Protein, Kohlenhydraten und Phenolen wurde über das Verhältnis  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  bestimmt und lag bei allen Proben >1,6. Der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  gibt Aufschluß über weitere Verunreinigungen. Er lag nach der DNase-Behandlung grundsätzlich über 2,1. Die Reinheit der Proben ist somit als sehr hoch einzuschätzen. Die Proben wurden anschließend auf eine Konzentration von 250 ng/µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt, in 10µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80° gelagert.

## 4.2.2 RT-PCR

### 4.2.2.1 Reverse Transkription mit Not(dT)<sub>18</sub>-Primern

Um die Expression verschiedener Hydra-Gene im Verlauf der Embryogenese untersuchen zu können, ist es notwendig, die in der extrahierten Gesamt-RNA enthaltene mRNA in cDNA umzuschreiben, um diese nachfolgend in einem PCR-Ansatz als Template einsetzen zu können. Man bedient sich hierbei eines Enzyms von retroviralem Ursprung, der reversen Transkriptase. Die reverse Transkription von jeweils 2 µg/Probe wurde mit dem First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit von Amersham-Pharmacia-Biotech nach deren Protokoll durchgeführt. Dabei wurde für die Gewinnung der cDNA, die für die anschließende RT-PCR verwendet werden sollte, ein Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer verwendet.

### 4.2.2.2 Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um durch Einsatz sequenzspezifischer Oligonucleotide Fragmente von sechzehn bekannten *Hydra*-Genen zu amplifizieren. Für jedes zu untersuchende Gen wurde basierend auf den in der Genbank veröffentlichten Sequenzen ein spezifisches Primerpaar entworfen (siehe Oligonucleotide). In der PCR wurde ein Standard-Ansatz mit einem Volumen von 20 µl verwandt.

**Tab. 4-2: Standard-PCR-Ansatz für die RT-PCR**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Konzentration
Wasser	12,8	-
10x PCR-Puffer (Gibco)	2,0	1x
DNTPs (1mM)	2,0	100 $\mu$ M
5'-Primer (10 $\mu$ M)	1,0	500nM
3'-Primer (10 $\mu$ M)	1,0	500nM
Template-cDNA	1,0	-
Taq-Polymerase (5u/ $\mu$ l) (Gibco)	0,2	0,05u/ $\mu$ l
Gesamt	20,0	

Zum Einsatz kam ein Primus 96plus-Thermocycler der Firma MWG Biotech unter folgenden Bedingungen:

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} n Zyklen
Annealing	T <sub>A</sub>	45 s	
Elongation	72°C	45 s	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

Die verwandten Annealingtemperaturen T<sub>A</sub> und Zyklenzahlen n sind in Tab.4 angegeben. Im Anschluß an die Reaktion wurden die Ansätze mit 4 $\mu$ l 6x DNA-Ladepuffers gemischt und durch Gelelektrophorese in einem 1,5% Agarose-Gel analysiert.

#### 4.2.2.3 b-Aktin-Probenäquilibration

Um die ursprünglichen Transkriptmengen in Proben unterschiedlicher Entwicklungsstadien miteinander semiquantitativ vergleichen zu können, mußten die Proben zunächst anhand eines abundanten Genes, von dem angenommen wird, daß sich seine Expressionsstufe während der Embryogenese nicht sichtbar ändert, äquilibriert werden. Zu diesem Zweck wurde das  $\beta$ -

Aktin-Gen gewählt, aus dessen Transkript ein etwa 230 bp-großes Fragment für den Vergleich unter Einsatz gleichen Template-Volumens bei 15, 18 und 21 Zyklen amplifiziert wurde. Anhand der Intensität der Banden konnten die einzusetzenden Volumina der einzelnen Proben ermittelt werden, die bei erneuter vergleichender Amplifikation zu gleichen Bandenintensitäten führen.

#### 4.2.2.4 Analyse der Genexpression bekannter Hydra-Gene während der Embryogenese

Um die optimale Zyklenzahl für die vergleichende Amplifikation eines zu untersuchenden *Hydra*-Genes zu erhalten, wurde das entsprechende Fragment mit 30, 33, 36 und 39 Zyklen unter Einsatz von cDNA aus Polypen amplifiziert. Die optimale Zykluszahl  $n$  sollte jene sein, die eine Bande maximaler Intensität ohne erkennbare Überamplifikation erzeugt. Die Annealingtemperatur  $T_A$  entspricht dabei der Schmelztemperaturangabe des Herstellers (MWG Biotech) minus einem Kelvin. Anschließend wurde eine vergleichende Amplifikation des entsprechenden Fragmentes aus allen embryonalen Proben unter Verwendung der ermittelten Parameter durchgeführt und im 1,5% Agarosegel analysiert.

**Tab. 4-3: In der RT-PCR verwandte Annealingtemperaturen und Zyklenzahl für die untersuchten Gene.**

Gen	Annealingtemperatur $T_A$	Zyklenzahl $n$	Gen	Annealingtemperatur $T_A$	Zyklenzahl $n$
Actin	56°C	21	Frizzled	56°C	31
$\beta$ -Catenin	57°C	36	Heady	58°C	40
Budhead	54°C	28	HyAlx	52°C	33
CnGsc	57°C	41	HyBra	56°C	32
CnNK-2	54°C	31	Hym301	54°C	28
Cnnos	56°C	29	Hyp1	52°C	39
CnOtx	64°C	29	HyTcf	58°C	29
Cnox-2	62°C	36	HyWnt	62°C	39



#### **4.2.2.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Überprüfung und Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern. Die Gelmatrix bestand in Abhängigkeit von der erwarteten Fragmentgröße aus 1-1,5% Agarose in TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer fungierte. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde der Matrix vor dem Gießen 0,03% Ethidiumbromid zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 5:1 mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und anschließend bei 50-90 V elektrophoretisch getrennt. Die Laufzeit betrug 1-1,5 Stunden. Das Ergebnis wurde unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen diente ein komigrierter 100bp-DNA-Marker.

#### **4.2.3 Klonierung**

##### **4.2.3.1 Ligation in pGEM-T-Vektor**

Die verwendete Methode zur Klonierung der amplifizierten PCR-Fragmente basiert auf der Fähigkeit der Taq-Polymerase, keine Fragmente mit glatten Enden, sondern solche mit einem Überhang einer Base am 3'-Ende, in der Mehrzahl der Fälle eines Adenosin, zu schaffen. Da die verwendeten pGEM-T-Vektoren (Promega) einen Überhang eines Thymins aufweisen, lassen sich PCR-Produkte mit dieser auch als TA-Klonierung bezeichneten Methode leicht klonieren. Einzige Voraussetzung ist hierbei der Wahl eines Primers mit einem Guanin oder Adenosin am 5'-Ende des Primers, da die endständige Base einen nicht unwesentlichen Einfluß auf die Art des Überhangs hat.

Die Ligation in pGEM-T-Vektor (Promega) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. In einem Reaktionsansatz für die T4-Ligase-Reaktion wurden 5µl Ligationspuffer, 1µl Vektor, 1µl T4-Ligase und 3µl PCR-Produkt (im Konzentrationsverhältnis 3:1 zum Vektor) gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### 4.2.3.2 Vermehrung kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden *Escherichia coli* - Bakterien des Stammes XL-1 Blue verwendet. Diese Zellen sind elektrokompent, d.h. durch einen kurzen elektrischen Impuls kann ihre Zellmembran permeabilisiert werden, so daß DNA aus der umgebenden Lösung in die Zelle diffundieren kann. Um die Zellen vorzubereiten, wurde eine einzelne Kolonie des Stammes in 3 ml SOB-Medium mit 12µg/ml Tetrazyklin über Nacht bei 37°C herangezogen. 50 ml frisches SOB-Medium wurden anschließend mit 2ml dieser Übernachtskultur beimpft und bei 37°C inkubiert, bis die Kultur die logarithmische Wachstumsphase erreichte ( $A_{600nm}=0,5-0,6$ ), was in der Regel nach 3-4 Stunden der Fall ist.

Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 3000g wurde das Pellet sequentiell in 50 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O, 25 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O und schließlich in 2 ml eiskaltem 10% Glycerin gewaschen. Nach einer abschließenden Sedimentation bei 3000g für 10 min wurden die Bakterien in 200µl eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen und in 40µl-Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.2.3.3 Transfektion durch Elektroporation

Die bereits erwähnte Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran erfolgte in Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 1mm (Bio-Rad), die durch Waschen mit 70°C Ethanol, reichlich ddH<sub>2</sub>O und darauf folgender Bestrahlung mit ultravioletter Strahlung (Stratagene Crosslinker) von Überresten früherer Transfektionen gereinigt worden waren. 1 µl Ligationsprodukt wurden auf Eis mit 20µl Bakteriensuspension gemischt und in die vorgekühlte Küvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte nun bei 1,7 kV, 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Unmittelbar nach dem Puls, der eine Dauer von etwa 4-5 ms aufwies, wurden die Zellen in 1ml vorgewärmten SOC-Mediums aufgenommen, in ein steriles Zuchtröhrchen überführt und anschließend für 1 Stunde bei -37°C schüttelnd inkubiert. 50, 100 und 200 µl der Kultur wurden dann auf LB-Agar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Isolation transfizierter Klone wurde durch die blau/weiß-Selektion erleichtert. Zu diesem Zweck waren die LB-Agar-Platten vor dem Ausplattieren mit 50 µl X-Gal (50 mg/ml) und 100 µl IPTG (100 mM) behandelt worden.

#### 4.2.3.4 Insert-Check

Wird für die Ligation das Produkt einer PCR-Reaktion verwendet, kann der transfizierte Vektor auch Primer und kürzere unvollendete Fragmente enthalten. Da mit solchen Vektoren transfizierte Klone in der blau/weiß-Selektion ebenfalls weiß erscheinen, müssen die vermeintlich positiven Klone zunächst auf ihr Insert untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Polymerasekettenreaktion mit den vektorspezifischen SP6- und T7-Primern durchgeführt. Positive Klone wurden mit gepickt und geordnet auf eine neue LB-Agar-Platte übertragen (Gridausstrich) sowie anschließend in 20 µl-PCR-Ansätze, entsprechend dem Standard-PCR-Ansatz in 3.2.2.2, gegeben. Die Amplifikation wurde in einem Primus96plus-Thermocycler (MWG-Biotech) unter Verwendung des folgenden Programmes durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} 40 Zyklen
Annealing	52°C	45 s	
Elongation	72°C	45 s	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

Nach Abschluß der Reaktion wurden der Ansätze mit 4 µl 6x DNA-Ladepuffer gemischt und auf dem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Fünf positive Klone pro Insert wurden anschließend sequenziert.

#### 4.2.3.5 Plasmid-Präparation

Zur Plasmidvermehrung wurden die entsprechenden Klone vom Gridausstrich gepickt und in 3-4 ml LB-Flüssigmedium bei 37°C über Nacht herangezogen. Die Präparation der Plasmide erfolgte nun unter Verwendung des QIAquick Mini-Prep Plasmid Purification Kits (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dabei werden die Zellen zunächst mittels Zentrifugation (14000 rpm, 1 min) pelletiert und anschließend in Gegenwart von RNase in alkalischer Lösung lysiert. Nach Neutralisierung der Lösung sowie Fällung und Sedimentation der

bakteriellen Proteine sorgt ein Bindepuffer, der chaotrope Salze enthält, dafür, daß die gelöste DNA an die Matrix von Zentrifugationssäulen binden kann. Nach Waschen mit ethanolhaltigen Puffern kann die gebundene DNA durch eine Erhöhung des pH-Werts und Senkung der Salzkonzentration von der Säule eluiert werden.

#### **4.2.4 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Inserts erfolgte nach SANGER ET AL. (1977) durch den Einsatz des SequiTherm EXCEL II DNA-Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies). Hierbei wurden die Fragmente in einem Thermocycler unter Verwendung IRD800-markierter SP6 oder T7-Primer (MWG Biotech) nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Die Markierung durch den Fluoreszenzfarbstoff ermöglichte die Detektion der Reaktionsprodukte nach erfolgter Separation in einem automatischen Sequenzierer vom Typ LI-COR Gene ReadIR 4200 mit Internet-Interface Netwinder (MWG Biotech). Die Sequenzdaten wurden mit der Software eSeq V2.0 des Geräteherstellers ausgelesen und analysiert.

#### **4.2.5 Nuclear run-on**

##### **4.2.5.1 Extraktion der Nuclei**

Der Nachweis der de-novo-Transkription von mRNA verschiedener Hydra-Gene, die früh während der Embryogenese zu detektieren sind, erfolgte durch nuclear run-on-Analyse (GELLNER, 1992). Zur Isolation ihrer Kerne wurden 120 Zygoten, 2- und 4-Blastomer-Stadien in 1 ml Dissoziationsmedium (3,6 mM KCL, 6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 6 mM Natriumcitrat, 6 mM Natriumpyruvat, 6 mM Glucose, 12,5 mM Tes und 50 mg/ml Rifampicin), das durch 5 % Nonidet-P40 ergänzt wurde, in einem 1,5 ml-Eppendorfgesäß mittels eines Einwegpistills homogenisiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 100 rpm und 4°C wurden zunächst größere Zellreste pelletiert. Aus dem Überstand wurden die Zellkerne durch eine 12 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C gewonnen. Das Nucleus-Pellet wurde nun in 50 µl 2x Reaktionspuffer (40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 280 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 4.2.5.2 Vorbereitung der Probenmembran

Als Proben dienten alle *Hydra*-Gene, deren Transkripte zuvor durch RT-PCR in Zygoten nachgewiesen werden konnten, sowie zwei weitere, erst später hochregulierte Gene als Kontrollen. Nachdem die Fragmente in pGEM-T-Vektoren kloniert worden waren, wurden sie in größeren Mengen durch PCR bei Standardbedingungen amplifiziert und mittels eines PCR-Purification-Kits (Quiagen) gereinigt. Die DNA wurde durch Inkubation in 0,1 M NaOH für 10 min bei 95°C denaturiert und jeweils 5µg/Probe in 20xSSC-Puffer wurden mittels einer Slot-Blot-Kammer (Schleicher&Schüll) auf positiv geladene Nylon-Membran gespottet. Die Fixierung der Nukleinsäuren auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung (120mJ, Stratalinker, Stratagene).

#### 4.2.5.3 Run-on-Reaktion

Isolierte Nuclei in 50 µl 2x Reaktionspuffer wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl 0,1 M DTT, je 1 µl 100 mM ATP, CTP und GTP und 100 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP gemischt und auf 100 µl mit DEPC-behandeltem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion lief nun für 90 min bei Raumtemperatur ab. Die <sup>32</sup>P-markierte RNA wurde unter Verwendung des Extraktionsmediums peqGOLD RNAPure der Firma Peqlab extrahiert und in 200 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O mit 100 u RNaseOut RNase-Inhibitor gelöst.

#### 4.2.5.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der gereinigten RNA gegen die auf der Nylon-Membran immobilisierte DNA erfolgte für 72 Stunden bei 42°C in 30 % STARKS (30% Formamid, 0,02 % BSA, 0,02 % Ficoll, 0,02 % Polyvinylpyrrolidon, 5x SSC und 1 % SDS). Nach der Hybridisierung wurde der Filter zweimalig für 20 min bei 37°C unter niedrig-stringenten Bedingungen mit 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen und schließlich 4 Tage bei -80°C auf Röntgenfilm unter Verwendung von Verstärkerfolien exponiert.

#### **4.2.6 In-situ-Markierung naszenter RNA mit 5-Fluoro-Uridin**

Zur in-situ-Markierung der Orte aktiver Transkription in frühen Hydra-Embryonen, wurden diese einem 15 minütigen Puls von 2 mM 5-Fluoro-Uridin in Hydra-Medium ausgesetzt. Während dieser Zeit diffundiert das FU in die Zellen und wird dort während der Transkription anstelle normalen UTPs in die RNA eingebaut. Nun wurden die Embryonen in 4% Paraformaldehyd in Hydra-Medium, pH 7.5 für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Eine anschließende Permeabilisierung der Membranen durch Behandlung mit 0,5% Triton-X-100 in PBS für 20 min auf Eis ermöglichte die nun folgende Immunodetektion des FU. Dazu wurden die Proben zunächst für 1 Stunde bei RT in 1:2000 mit MAB + 1% BSA verdünntem anti-BrdU-Antikörper (Sigma) inkubiert. Es ist bekannt, daß dieser Antikörper eine Crossreaktivität gegenüber FU aufweist. Nach dreimaligem Waschen mit MAB + 0,1% Tween20 erfolgte die Detektion mit anti-mouse-Antikörper (1:500 in MAB + 1% BSA) an den der Fluoreszenzfarbstoff TRITC konjugiert war. Auf die einstündige Inkubation bei RT folgten mehrere Waschschritte in MAB + 0,1 % Tween 20 zur Entfernung überschüssigen Antikörpers. Die Einbettung erfolgte in Moviol, dem Hoechst 33342 in einer Konzentration von 10 µg/ml zur Visualisierung der Zellkerne zugegeben worden war.

#### **4.2.7 Whole-mount In-situ-Hybridisierung**

Diese Methode beinhaltet die Detektion einer im Gewebe befindlichen mRNA durch eine Digoxigenin-markierte Ribonukleotid-Sonde und die anschließende Bindung eines anti-Digoxigenin-Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Dadurch kann bei Einsatz des geeigneten Substrates für dieses Enzym die Expression des zu untersuchenden Gens sichtbar gemacht werden.

#### 4.2.7.1 Sondensynthese

Als Matrix für die Sondensynthese wurden Fragmente der zuvor generierten Plasmide verwendet, die sich aus den Inserts der gewünschten Gene, flankiert von den SP6- und T7-Promotoren des Plasmids zusammensetzten. Um diese Fragmente zu erzeugen, wurde eine PCR-Reaktion mit Primern gegen die viralen Promotoren unter Verwendung von Plasmid als Matrix durchgeführt.

**Tab. 4-4: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes zur Erzeugung SP6/T7-Promotor-flankierter Inserts aus Plasmiden.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Konzentration
Wasser	13,3	-
10x PCR-Puffer (Gibco)	2,0	1x
dNTPs (1mM)	2,0	100 $\mu$ M
5'-Primer (10 $\mu$ M)	1,0	500nM
3'-Primer (10 $\mu$ M)	1,0	500nM
Plasmid (ca. 100ng/ $\mu$ l)	0,5	-
Taq-Polymerase (5u/ $\mu$ l) (Gibco)	0,2	0,05u/ $\mu$ l
Gesamt	20,0	

Zur Amplifikation wurde ein Primus96plus-Thermocycler (MWG-Biotech) unter Verwendung des folgenden Programmes verwendet:

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} 40 Zyklen
Annealing	56°C	45 s	
Elongation	72°C	45 s	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

Zur Synthese der Ribonukleotid-Sonden wurde das DIG-RNA-Labeling-Kit von R<sup>o</sup>che nach den Angaben des Herstellers verwendet. In einen Ansatz für die Transkriptionsreaktion gehen ein:

**Tab. 4-5: Pipettierschema eines Transkriptionsansatzes für die Dig-RNA-Sondensynthese**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
DEPC-H <sub>2</sub> O	auf 20,0
10x Transkriptionspuffer	2,0
Dig-Markierungs-Mix	2,0
RNase-Inhibitor	1,0
300 ng klonierte DNA (Insert flankiert von Promotoren)	Variabel
SP6- oder T7-Polymerase	2,0
Gesamt	20,0

Im pGEM-T-Vektor wird das in der Multiple-Cloning-Site sitzende Insert auch von zwei Promotoren für die SP6- und T7-RNA-Polymerasen flankiert. Werden somit pro Insert zwei Reaktionen angesetzt, die entweder die eine oder die andere Polymerase enthalten, so entsteht in der Reaktion nachfolgend in Abhängigkeit von der Orientierung des Inserts im Vektor im einen eine Sense-RNA, die als Kontrolle dient, im anderen Ansatz die Antisense-RNA, die als Sonde zum Einsatz kommt. Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden je 2  $\mu$ l RNase-freie DNase I hinzugegeben und für 15 min bei 37°C erneut inkubiert, um das Template zu verdauen. Die Reaktion wurde mit 2  $\mu$ l 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt und die synthetisierte RNA nach Zugabe von 2  $\mu$ l 4 M LiCl und 75  $\mu$ l gekühlten 99,6% Ethanol über Nacht bei -21°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 14000 rpm und 4°C wurde das Pellet einmalig mit 1 ml eisgekühltem 80% Ethanol gewaschen um überschüssiges Salz zu entfernen und nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm bei 37°C kurz (6-7 min) angetrocknet und in 20  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Sonden ist durch das eingebaute Dig-UTP schwer möglich. Die Bestimmung erfolgte daher durch einen Dot-Blot, bei dem 1  $\mu$ l von verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:5, 1:10, 1:50 1:100) der Sonden und einer markierten Standard-RNA auf Nylon-Membran (Hybond) aufgetragen wurden. Nach Fixierung durch UV-



Bestrahlung konnte die Dig-markierte RNA durch den Einsatz des anti-Dig-Antikörpers (Röche) in Verbindung mit NBT/BCIP als Substrat detektiert und angefärbt werden. Die Kenntnis der Konzentration der Sonden ist für den Einsatz von Sense- und Anti-Sense-Sonde in gleichen wie auch angemessenen Mengen unbedingt erforderlich.

#### 4.2.7.2 Hybridisierung

Alle Schritte, die keine Temperaturangabe enthalten, wurden bei Raumtemperatur in Costar-Platten auf einem Rotationsschüttler durchgeführt. Alle anderen erfolgten in Eppendorf-Gefäßen in einem Thermoschüttler.

##### 1.Tag

Die für die in-situ-Hybridisierung verwendeten Embryonen waren zuvor 24 h in 4% frischem Paraformaldehyd in Hydra-Medium bei 4°C fixiert und anschließend in Methanol bei -21°C gelagert worden. Am Anfang dieser Methode stand somit das sequentielle Überführen des Gewebes in PBT durch Waschen für jeweils 5 min und in einem Volumen von 2 ml 75% Methanol in PBT, 50% Methanol in PBT und 25% Methanol in PBT gefolgt von 3x 5 min in PBT um auch die letzten Methanolreste zu entfernen. Der folgende partielle Verdau des fixierten Gewebes mit Proteinase K (10 µg/ml in PBT) für 30 min bei 37°C hilft, die spätere Penetration durch die RNA-Sonde zu erhöhen. Die Enzymaktivität wird durch zweimaliges Waschen mit Glycin (4 mg/ml in PBT) gestoppt. Nach weiterem Waschen für 2x 5 min mit PBT wurde das Gewebe in Triethanolaminlösung pH 7.8 überführt (2x 5 min). Nun folgt eine Behandlung mit Acetic Anhydride (1x 5 min 2,5 µl/ml; 1 x 5 min 5 µl/ml) in Triethanolamin um die spätere unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Nach weiterem Waschen in PBT (2x 5 min) wird das nach dieser Behandlung angegriffene Gewebe 20 min in 4% Paraformaldehyd in PBT refixiert, um einem Zerfall entgegenzuwirken. Die folgende Hitzebehandlung für 30 min bei 80°C in einem Thermoschüttler soll die Aktivität endogener alkalischer Phosphatasen herabsetzen, die zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führen würden. Vor der Prähybridisierung der Proben wird das Gewebe nun für 10 min in 50% Hybridisierungslösung in PBT gegeben. Alle folgenden Schritte der Prä-, Post- und Hybridisierung werden bei 50°C ausgeführt. Die Prähybridisierung soll die unspezifische Bindung der Sonden minimieren, dazu wurden die Embryonen zunächst für 10 min, dann für

weitere 2 Stunden in Hybridisierungslösung inkubiert. Zur folgenden Hybridisierung wurden die Embryonen in zwei Eppendorfgefäße (für Sense- bzw. Antisense-Sonde) aufgeteilt. Die Hybridisierung selbst erfolgte dann in 250 µl Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von 30 ng/100 µl für 40 Stunden bei 50°C und leichtem Schütteln.

### 3.Tag

Um ungebundene Sonde zu entfernen wurden die Proben mehreren Waschschritten ausgesetzt: 5 min in 1 ml 100% Hybridisierungslösung, 5 min in 1 ml 75% Hyb.-Lösung in 2x SSC, 5 min in 1ml 50% Hyb.-Lösung in 2x SSC, 5 min in 25% Hyb.-Lösung in 2x SSC und schließlich zweimaliges Waschen für 30 min in 2x SSC + 0,1% CHAPS. Für die folgende Antikörper-Bindung wurde das Gewebe durch zweimaliges Waschen für 10 min mit MAB an das neue Puffersystem angepaßt. Das folgenden Waschen für 1 h in MAB-B bei RT und 2 h in Blockierungslösung bei 4°C dient dem Absättigen unspezifischer Bindestellen für den Antikörper. Schließlich wurde die Blockierungslösung durch 1:2000 verdünnten Antikörper in Blockierungslösung ersetzt. Die Inkubation erfolgte im Thermoschüttler bei 4°C über Nacht. Der eingesetzte Antikörper ist ein anti-Digoxigenin-Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase konjugiert wurde.

### 4.Tag

Nach der Inkubation wurde ungebundener Antikörper durch zahlreiche Waschschriffe vollständig entfernt. Die Embryonen wurden dazu 6 x 30 min in MAB-Puffer gewaschen. Nun wurde die Färbereaktion durchgeführt. Da die alkalische Phosphatase für ihre Katalyse einen hohen pH-Wert benötigt, wird das Gewebe zunächst durch dreimaliges Waschen für 5 min in 2 ml NTMT-Puffer mit Levamisol (1 µl/ml) an die neuen Bedingungen angepaßt. Das Levamisol ist ein Inhibitor endogener alkalischer Phosphatasen. Das verwendete chromogene Substrat ist NBT/BCIP-Konzentrat in einer 1:50 Verdünnung in NTMT + Levamisol. Die Farbreaktion erfolgte im Dunkeln zunächst für 20 min auf einem Rotationsschüttler, dann ohne Schütteln, bis die Embryonen, die mit der Sense-Sonde inkubiert worden waren, eine erste schwache unspezifische Färbung zeigten. Die Reaktion wurde durch die Behandlung mit 99,6% Ethanol für 10 min gestoppt, anschließend wurden die Proben für 30 min mit 4% Paraformaldehyd erneut fixiert. So behandelte Proben wurden nun in 50% Methanol in DEPC-H<sub>2</sub>O bei 4°C aufbewahrt, da eine Einbettung in Euparal ein Schrumpfen sowie den Verlust der Dreidimensionalität zur Folge gehabt hätte.

## **4.3 Histologische Methoden**

### **4.3.1 Einbettung in Kunststoff**

Das Einbetten in Kunststoff erfolgte nach Anleitung von Frau Dr. Anton-Erxleben. *Hydra*-Embryonen wurden für 18 Stunden über Nacht in 3,5% Glutaraldehyd in 50 mM Cacodylatpuffer pH 7.4 fixiert. Nach einmaligem Waschen in 75 mM Cacodylatpuffer für 30 min erfolgte eine zweistündige Postfixierung mit 1% OsO<sub>4</sub> in 75 mM Cacodylatpuffer bei 4°C. Nach einem weiteren 30-minütigen Waschschrift zur Entfernung des Fixativs wurden die Proben durch sequentielles Waschen für 15 min in 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100% Ethanol dehydriert. Nun folgten zwei Inkubationen für jeweils 30 min in 1,2-Propylenoxid bevor mit dem Einbetten begonnen werden konnte. Die verschiedenen Komponenten für das Einbettungsmedium Agar 100 (Agar Scientific Ltd., Essex) wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers für die ‚harte‘ Variante gemischt und anschließend wurde für die Infiltration des Gewebes wie folgt verfahren: zunächst wurden die Proben für 30 min in einer 1:1-Mischung aus 1,2-Propylenoxid und dem Kunststoffgemisch inkubiert, darauf folgte eine 30-minütige Inkubation dieser Komponenten im Verhältnis 1:3. Nach diesen Inkubationen, die bei RT durchgeführt wurden, erfolgte die Infiltration durch reines Agar 100 über Nacht bei 4°C. Abschließend wurden die infiltrierte Proben in frischem Agar 100-Medium in kleine Gummiformen gegeben und bei 60°C polymerisiert.

### **4.3.2 Anfertigung von Semidünnschnitten**

Für die lichtmikroskopische Betrachtung der in den *Hydra*-Embryonen befindlichen Endocyten war es notwendig, Semidünnschnitte anzufertigen, um diese anschließend mit verschiedenen Methoden zu färben. Zunächst wurden die Blöcke mit den eingebetteten Embryonen mit Rasierklingen zurechtgeschnitten, um den Zugang zum Gewebe zu ermöglichen. Die semidünnen Schnitte wurden anschließend durch ein Ultracut E Ultratom (Leica) unter Verwendung einer Glasklinge hergestellt und auf Objektträger gegeben.

### 4.3.3 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Für die Anfertigung von Ultradünnschnitten erfolgte der Gewebeschnitt mit dem gleichen Gerät wie bei den Semidünnschnitten, allerdings unter Verwendung eines Diamantmessers. Die Schnitte wurden danach auf feinen runden Gittern aufgenommen, die zuvor mit 1,2% Pioloform in Chloroform behandelt worden waren.

### 4.3.4 Kontrastierung für die Transelektronenmikroskopie

Zur Kontrastierung der im TEM sichtbar zu machenden Feinstrukturen müssen die Gewebeschnitte mit Schwermetall-Ionen angereichert werden. Dies wurde unter Anleitung von Frau Dr. Anton-Erxleben durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Ultradünnschnitte zunächst für 5 min in 2,5% Uranylacetat inkubiert und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gespült, um schließlich für 2 min mit Bleicitratlösung, die jeweils frisch aus Bleiazetat und Natriumcitrat gemischt wurde, behandelt zu werden (REYNOLDS, 1963).

### 4.3.5 Rhodamin-123-Färbung

Rhodamin123 ist ein Rhodamin-Derivat, das von respiratorisch aktiven Mitochondrien in deren Matrix aufgenommen wird. Da diese Färbung nur dann möglich ist, wenn das innere Membranpotential dieser Organellen intakt ist, dient sie auch dem Nachweis apoptotischer oder nekrotischer Zellen. Zellen, deren Mitochondrien mit Rhodamin123 gefärbt wurden, können aufgrund dieser Eigenschaften des Farbstoffs nicht fixiert werden; der Tod der Zellen hätte eine schnelle Diffusion des Rhodamins in das Cytoplasma zur Folge.

Vor seiner Verwendung wurde Rhodamin123 in einer Konzentration von 1 mM in DMSO gelöst. Diese Stammlösung wurde bei 4°C aufbewahrt. Färbelösung wurde immer unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch angesetzt. Die Färbung lebender Embryonen erfolgte in 200 nM Rhodamin123 in *Hydra*-Medium für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Embryonen 3-5 x für jeweils 10 min in *Hydra*-Medium gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Dokumentation der Färbung erfolgte in *Hydra*-Medium unter dem

Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Rhodamin-Filtersets nachdem Endocyten durch leichtes Quetschen aus den Embryonen freigesetzt worden waren.

#### **4.3.6 Silberfärbung**

Die Silberfärbung der Nukleoli fixierter oder unfixierter Zellen basiert auf argyrophilen (silberbindenden) Proteinen, die mit der NOR (nucleolar organizer region) assoziiert sind. Diese Färbung ist außerordentlich spezifisch, es werden keinerlei andere Strukturen gefärbt. Da die in *Hydra*-Embryonen befindlichen Endocyten sehr fragil sind und bei der Herstellung eines Quetschpräparates leicht platzen, wurden ausschließlich Embryonen verwendet, die zuvor in 4% Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert worden waren. Die Embryonen wurden anschließend in 24-Well-Zellkulturplatten (Costar) überführt und für 20 min in Boratpuffer pH 9,22 (Merck) inkubiert. Die Färbung erfolgte nun in Silbernitratlösung (1 g/ml) bei 37°C im Inkubator. Sie war abgeschlossen, wenn die Embryonen eine gold-braune Farbe angenommen hatten, was in der regel nach etwa 40 min der Fall war. Abschließend wurden die Embryonen nun 6 x 10 min in PBS gewaschen, um überschüssiges Silber aus dem Gewebe zu entfernen. Unzureichende Entfernung zieht die Schwärzung des Präparates unter der Lichtquelle des Mikroskops nach sich. Schließlich wurden die Embryonen in Moviol eingebettet.

#### **4.3.7 Hoechst-33342-Färbung**

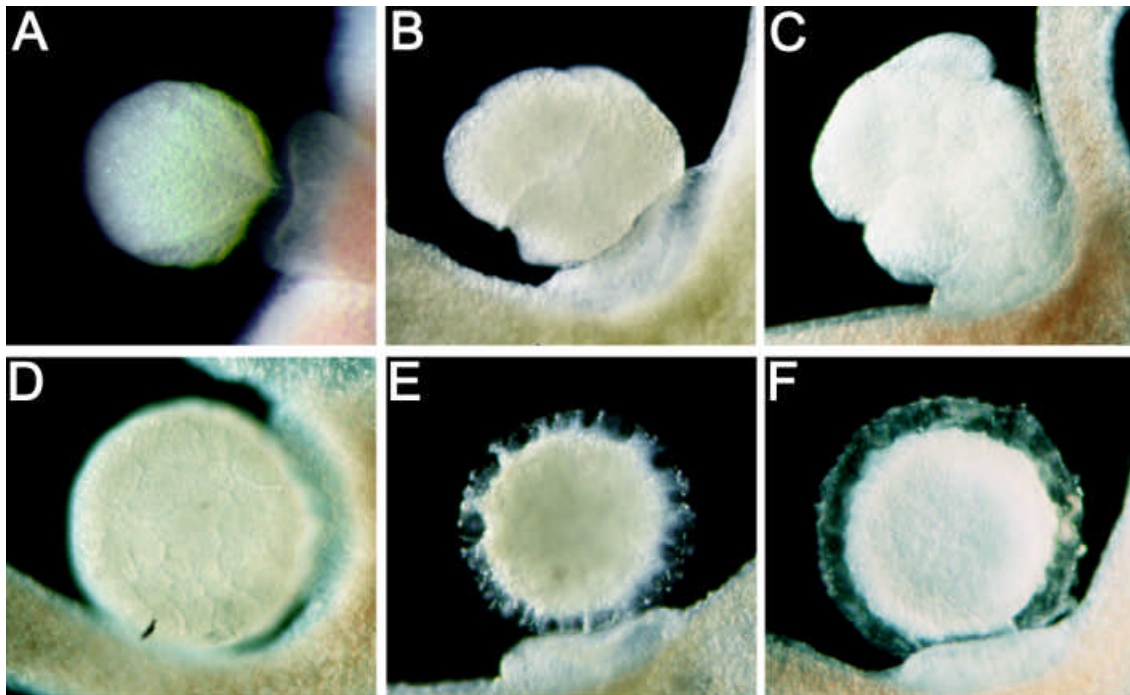
Hoechst-33342 ist in der verwendeten Konzentration ein Vitalfarbstoff, eine Färbung zieht also keine Beeinträchtigungen der Prozesse in den gefärbten Zellen nach sich. Für die Färbung der Zellkerne werden lebende oder auch fixierte Embryonen für 10 Minuten in 1:1000 verdünnter Hoechst-33342-Stammlösung in *Hydra*-Medium bzw. PBS (Endkonzentration 10µg/ml) gefärbt und anschließend zweimal für 5 min in dem verwendeten Medium gewaschen. Die Färbung wurde anschließend nach Einbettung in Moviol unter Verwendung eines DAPI-Filtersatzes unter Epifluoreszenz betrachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Lichtmikroskopische Betrachtung der Embryogenese von *Hydra*

Für die molekularbiologische Betrachtung der Expression verschiedener Gene war es zunächst erforderlich, verschiedene Embryogenesestadien festzulegen, die bei der Untersuchung berücksichtigt werden sollten. Da die bis dato veröffentlichten Daten der Embryogenese von *Hydra* (MARTIN ET AL., 1997) keine lichtmikroskopischen Aufnahmen und keine Definition diskreter Stadien enthielten, war es notwendig, insbesondere die frühe Embryogenese erneut unter diesen Gesichtspunkten zu betrachten. Abbildung 1-7 zeigt den Ablauf der Embryogenese von *Hydra* im lichtmikroskopischen Bild. Für die molekularbiologische Expressionsanalyse wurden die folgenden Entwicklungsstadien ausgewählt, die in Abbildung 5-1 dargestellt sind:

- a) *unbefruchtete Oozyten*.
- b) *8-Blastomer-Stadien*, 4 h nach Befruchtung.
- c) *Stadien in den mittleren Furchungsteilungen*. Diese Stadien werden nachfolgend mit Bezug auf die Literatur mit ‚*mid-cleavage*‘ bezeichnet. Sie umfassen Ontogenesestadien 5,5 - 6 Stunden nach Befruchtung.
- d) *Coeloblastulae*, 8 h nach Befruchtung. Diese Stadien sind im Lichtmikroskop gut durch die dunklere Färbung in ihrer Mitte zu erkennen. Es wurden ausschließlich Stadien verwendet, bei denen die Gastrulation noch nicht eingesetzt hatte.
- e) *Postgastrulae während der Embryothekformierung*. Diese Stadien werden nachfolgend mit Bezug auf die Literatur und der Kürze wegen mit ‚*spike*‘-*Stadium* bezeichnet. Es wurden Stadien 24-30 h nach Befruchtung verwendet.
- f) *Dauerstadien*, 3 Tage nach Befruchtung. Diese Stadien werden nachfolgend als *Embryothekstadium* oder ‚*cuticle*‘-*Stadium* bezeichnet.



**Abb. 5-1: Ausgewählte Embryonalstadien von *Hydra* für die Expressionsanalyse (A) Unbefruchtete Oocyte. (B) 8-Blastomer-Stadium. (C) Stadium der mittleren Furchungsteilungen. (D) Coeloblastula. (E) Postgastrulastadium während der Embryothekbildung mit pseudopodienartigen Fortsätzen („spike“-Stadium). (F) Dauerstadium („cuticle“-Stadium), 3 Tage.**

## 5.2 Expressionsanalyse bekannter *Hydra*-Gene

Die einzigen publizierten Erkenntnisse über die Genexpression während der Embryogenese von *Hydra* geben die Expression von HyBra, einem Brachyury-Homolog, während der späten Embryonalentwicklung bis zu Schlüpfen des Tieres wieder (TECHNAU & BODE, 1999). Daher wurden Gene aus verschiedenen Funktionsgruppen (Homeoboxgene, andere Transkriptionsfaktoren, Peptide, andere Signalmoleküle und ein Rezeptor) gewählt und RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt, um Einblicke in deren Expressionsprofile während der frühen Embryogenese zu erhalten. Optimale Amplifikationsbedingungen wurden im Vorfeld durch Temperaturgradienten-PCR und

verschiedene Zykluszahlen für jedes untersuchte Gen ermittelt. Als Referenz-Mengenstandard diente  $\beta$ -Aktin, ein ubiquitäres Gen, von dem angenommen wird, daß sich seine Expression während der frühen Embryogenese nicht signifikant ändert. Alle amplifizierte Fragmente wurden in *E.coli* kloniert und sequenziert, um sicherzustellen, daß es sich bei den erhaltenen Expressionsmustern um die analysierten Gene handelt.

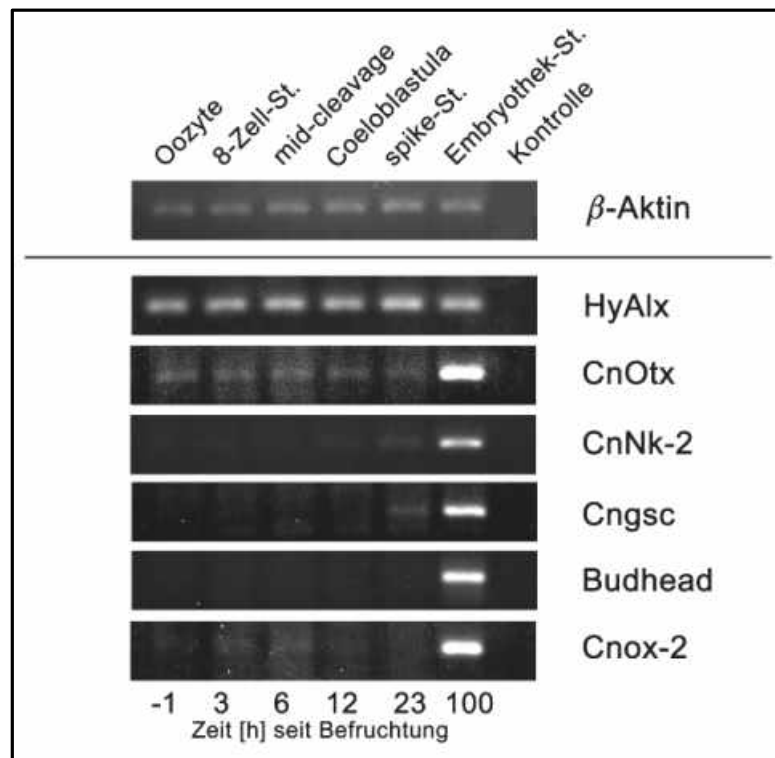
**Tab. 5-1: Übersicht über die untersuchten *Hydra*-Gene und ihre Gruppenzugehörigkeit.**

<b>Gen</b>	<b>Homolog</b>	<b>Gruppe</b>	<b>REFERENZ</b>
$\beta$ -Catenin	$\beta$ -Catenin	Transkriptionfaktor	HOBMAYER ET AL., 1996
Budhead	Fork head/HNF-3	Homeoboxgen	MARTINEZ ET AL., 1997
CnGsc	Goosecoid	Homeoboxgen	BROUN ET AL., 1999
CnNk-2	Nk-2	Homeoboxgen	GRENS ET AL., 1996
Cnnos	Nanos	Translationsinhibitor	MOCHIZUKI ET AL., 2000
CnOtx	Orthodenticle	Homeoboxgen	SMITH ET AL., 1999
Cnox-2	Hox-2	Homeoboxgen	SHENK ET AL., 1993
Frizzled	Frizzled	Rezeptor	MINOBE ET AL., 2000
Heady	-	Peptid	LOHMANN & BOSCH, 2000
HyAlx	Aristaless	Homeoboxgen	SMITH ET AL., 2000
HyBra	Brachyury	Transkriptionsfaktor	TECHNAU & BODE, 1999
Hym301	-	Peptid	HOFFMEISTER, 1996, 1999, 2001
Hyp1	-	Signalprotein	HERMANS-BORGMEYER ET AL., 1996
HyTcf	Tcf	Transkriptionsfaktor	HOBMEYER ET AL., 2000
HyWnt	Wnt	Signalmolekül	HOBMEYER ET AL., 2000



### 5.2.1 Homeobox-Gene

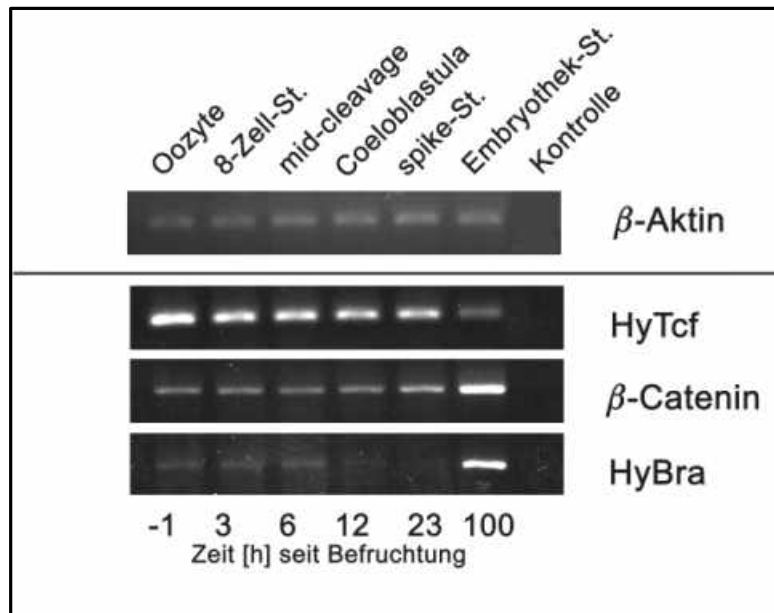
Der Expressionsstart der untersuchten Homeoboxgene ist, wie aus Abbildung 5-2 ersichtlich, von Gen zu Gen sehr unterschiedlich und erstreckt sich über den ganzen Untersuchungszeitraum. So weist das aristaless-Homolog HyAlx einen stetig unveränderten Expressionsgrad auf und wurde wie das orthodenticle-Homolog CnOtx bereits in Oocyten nachgewiesen. Letzteres zeigte allerdings eine starke positive Regulation nach Vollendung der Oothek. Transkripte der anderen Vertreter waren meist erst während (Cngsc und CnNk-2) oder nach erfolgter Formierung der Oothek (Cnox-2 und Budhead) nachweisbar.



**Abb. 5-2: Expressionsprofil verschiedener Homeobox-Homologe von *Hydra* während der frühen Embryogenese.** Aus verschiedenen Entwicklungsstadien wurde RNA isoliert, in komplementäre cDNA umgeschrieben und diese als Matrix für PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden eingesetzt.  $\beta$ -Aktin ist der Referenzstandard, als Kontrolle wurde einer PCR-Reaktion statt cDNA Aqua bidest hinzugefügt.

### 5.2.2 Transkriptionsfaktoren anderer Art

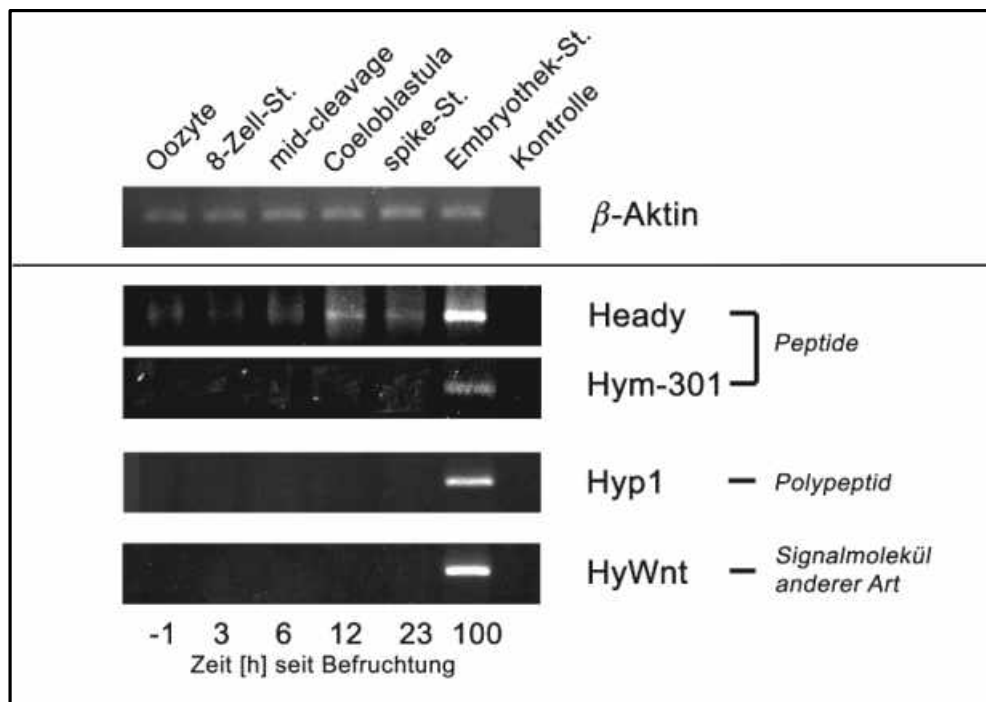
Wie in Abbildung 5-3 illustriert wird, sind Transkripte aller untersuchten Vertreter dieser Gruppe bereits in Eizellen nachweisbar. Während jedoch bei HyTcf und HyBra eine kontinuierliche Abnahme zu verzeichnen ist, bleibt der Expressionspegel von  $\beta$ -Catenin zunächst konstant, um schließlich die Aufregulation beim Übergang zum Dauerstadium zu erfahren. Letzteren Anstieg der Transkriptmenge zeigt auch HyBra, dessen Expression während der späten Embryogenese schon bekannt war und nun hier vervollständigt wird.



**Abb. 5-3: Expressionsprofile von anderen Transkriptionsfaktoren während der frühen Embryogenese von *Hydra* nach Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern.  $\beta$ -Aktin dient als Mengenstandard, die Kontrolle enthielt Wasser anstelle von Template.**

### 5.2.3 Peptide, Polypeptide und andere sezernierte Signalmoleküle

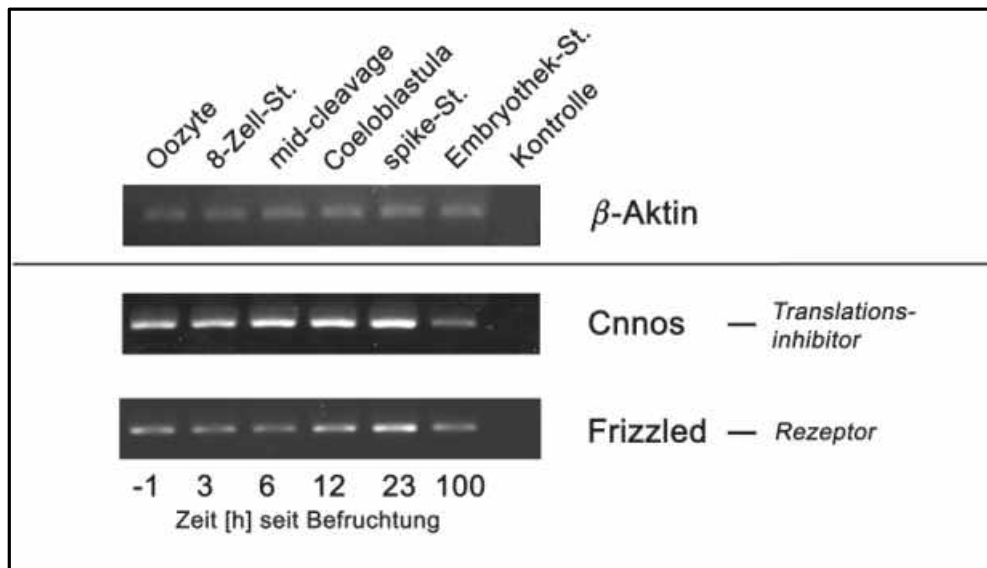
Die Expressionsprofile aller untersuchten sezernierten Moleküle (Abbildung 5-4), zu denen neben den Peptiden Heady und Hym-301 auch das hypostomspezifische Polypeptid Hyp1 und das Hauptsignalmolekül des Wnt-Signaltransduktionsweges, HyWnt, gehören, ähneln sich. Während die Expression von Heady schon im Blastula-Stadium beginnt, sind Transkripte der anderen Signalmoleküle erst viel später, nach der Bildung der Oothek im Dauerstadium zu finden. Die Expression des fußspezifischen Peptides Hym-301 ist auch hier nur äußerst gering. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen scheinen mit Ausnahme von Heady sezernierte Moleküle nur eine untergeordnete Rolle während der frühen Embryogenese zu spielen.



**Abb. 5-4: Expressionsprofile verschiedener sezernierter Signalmoleküle während der frühen Embryogenese.** Zur besseren Übersicht sind hier die Profile der Peptide, des einzigartigen Polypeptid Hyp1 und des Wnt-Homolog HyWnt im Vergleich dargestellt. Die Amplifikation erfolgt mit sequenzspezifischen Primern.  $\beta$ -Aktin dient als Mengenstandard, die Kontrolle enthielt Wasser anstelle von Template.

### 5.2.4 Moleküle anderer Zugehörigkeit

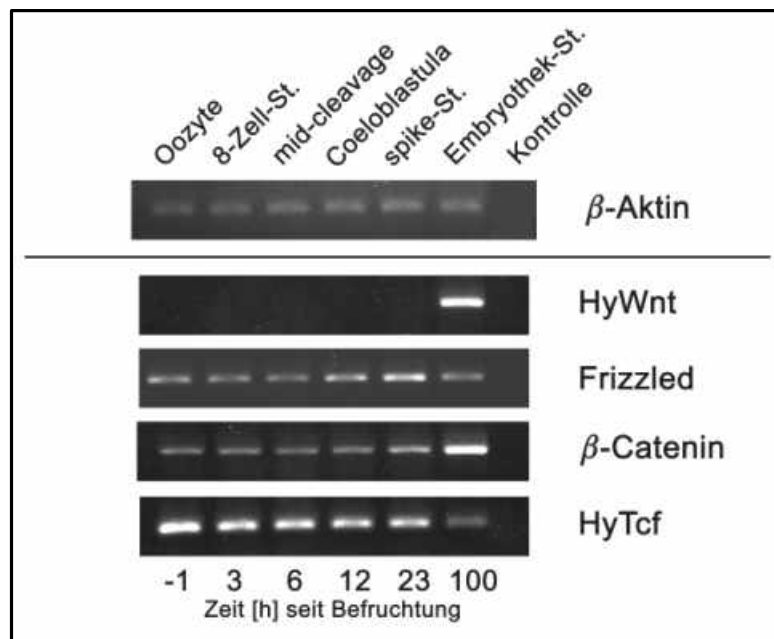
Dieser Abschnitt gibt die Ergebnisse der Expressionsanalyse einzelner Vertreter zweier Gruppen wieder. Sowohl von Cnnos, dem einzigen bearbeiteten cytoplasmatischen Translations-Inhibitor als auch vom Frizzled-Rezeptor-Homolog sind Transkripte bereits in den Oocyten und über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbar. Auffallend ist jedoch, daß der Expressionsgrad bei beiden zur Oothekenbildung im postgastrulären ‚spike‘-Stadium etwas ansteigt, dann jedoch signifikant abfällt.



**Abb. 5-5: Expressionsprofile des maternalen Translations-Repressors Cnnos und des Frizzled-Rezeptors während der frühen Embryogenese von *Hydra*.** Auch hier wurde zur Kontrolle Aqua bidest in einem PCR-Ansatz eingesetzt. Die Probenäquilibrierung erfolgte gegen das abundante Transkript von  $\beta$ -Aktin.

### 5.2.5 Gene des Wnt-Reaktionsweges im Überblick

Unter den Signalwegen ist der Wnt-Reaktionsweg bei Modellorganismen wie *Drosophila* oder *Xenopus* einer der am besten erforschten. Vier der untersuchten Genen sind Homologe von Vertretern dieses Weges: das Signalprotein Wnt, der dazugehörige Rezeptor Frizzled und die Transkriptionsfaktoren  $\beta$ -Catenin und HyTcf. In der Abb. 5-6 ist die Expression dieser Faktoren nocheinmal in der Übersicht dargestellt. Während Frizzled, HyTcf und  $\beta$ -Catenin in allen Stadien exprimiert werden, wird HyWnt ausschließlich nach erfolgter Formierung der Oothek transkribiert. Somit ist zwar der Rezeptor dieses Signaltransduktionsweges vorhanden, der Ligand jedoch wird nicht koexprimiert. Dieses überraschende Ergebnis weist auf die Beteiligung eines weiteren, noch unbekanntes Wnt-Liganden und die offenbar von der hypothetischen Funktion abweichenden Rolle des *Hydra*-Homologs hin.

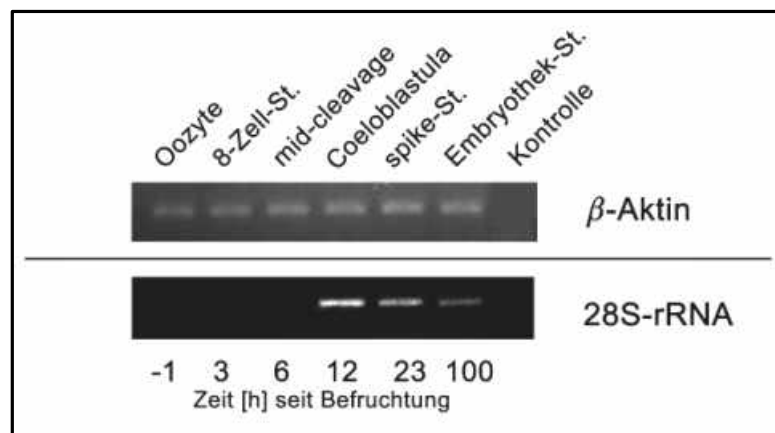


**Abb. 5-6: Expressionsprofile verschiedener Vertreter des Wnt-Signalweges während der frühen Embryogenese im Überblick** Die Amplifikation erfolgt mit sequenzspezifischen Primern.  $\beta$ -Aktin dient als Mengenstandard, die Kontrolle enthielt Wasser anstelle von Template.

## 5.3 Transkripte in frühen Embryonen und ihre Rolle in der Embryogenese

### 5.3.1 Der Start zygotischer Transkription

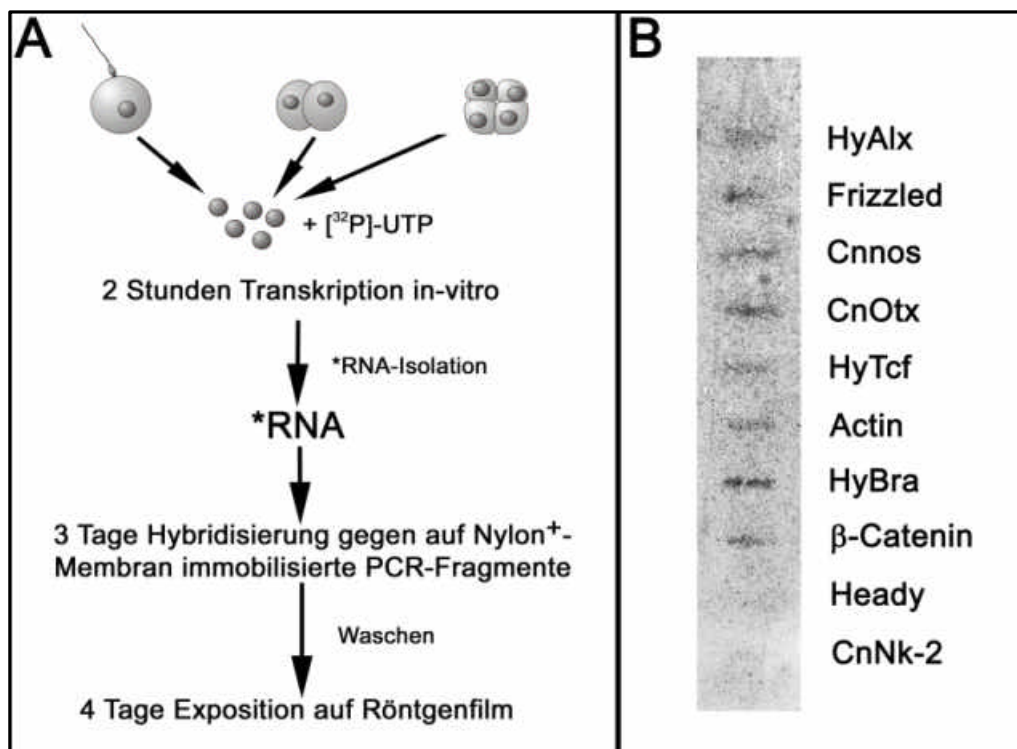
Der Beginn der Transkription zygotischer Gene und somit das Auftauchen erster embryonaler Transkripte wird unter anderem durch die vermehrte Synthese ribosomaler RNA charakterisiert. Zur Ermittlung dieses Zeitpunktes wurden die gleichen Proben, mit denen die Genexpressionsprofile zuvor erfaßt wurden, einer PCR mit Primern gegen 28S-rRNA unterworfen. Abbildung 5-7 zeigt, daß die Expression ribosomaler RNA nach Übergang zum Coeloblastulastadium stark ansteigt, um dann im weiteren Verlauf leicht anzusinken. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf den Start zygotischer Transkription während des Blastulastadiums. Um das Expressionsprofil zu erhalten, war eine PCR-Reaktion mit einer relativ hohen Zyklenzahl (40 Zyklen) und Überbelichtung der Gelaufnahme erforderlich.



**Abb. 5-7: Expression ribosomaler 28S-RNA im Verlauf der Embryogenese.**  $\beta$ -Aktin ist der Referenzstandard, als Kontrolle wurde einer PCR-Reaktion statt cDNA Aqua bidest hinzugefügt.

### 5.3.2 De-novo Transkription vor dem Start der zygotischen Transkription

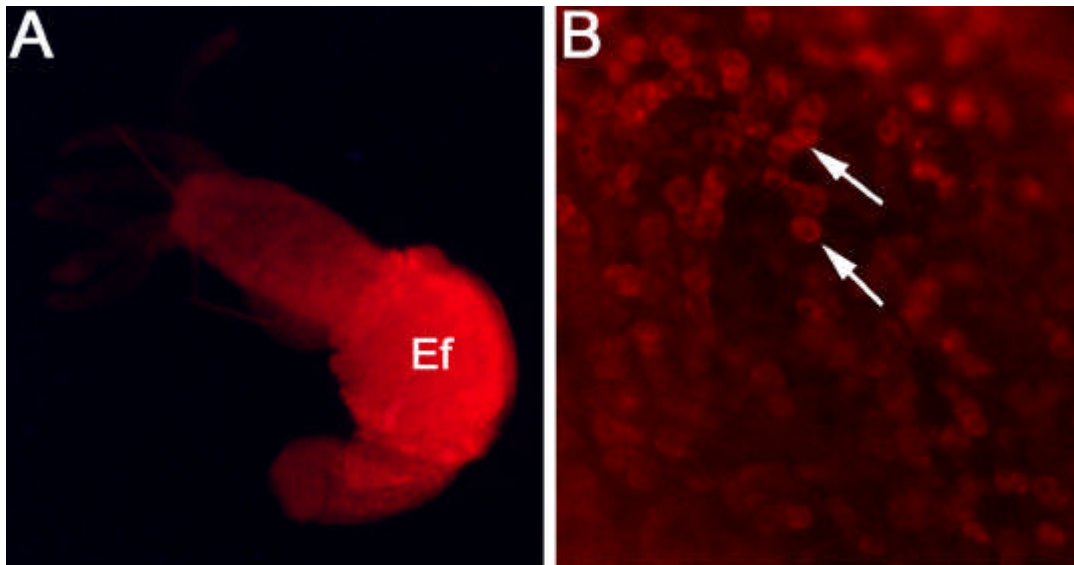
Von insgesamt sieben Genen konnten Transkripte bereits in unbefruchteten Oocyten und frühen Furchungsstadien nachgewiesen werden. Um bestimmen zu können, ob diese Gene tatsächlich aktiv transkribiert werden oder ob sie vielleicht Überreste der Oocytenbildung und damit maternalen Ursprungs sind, wurde ein Nuklear-run-on durchgeführt, bei dem in der Entstehung begriffene RNA radioaktiv markiert wurde. Wie Abbildung 5-8 A zeigt, werden alle bereits in Oocyten, 2- und 4-Blastomer-Stadien nachgewiesenen Transkripte aktiv synthetisiert. Die Grafik in Abbildung 5-8 B gibt den Versuch schematisiert wieder.



**Abb. 5-8: Nachweis naszierender RNA in frühesten Embryonen durch nuclear run-on-Transkription.** (A) Röntgenfilm nach 4-tägiger Exposition. Aktin diente als Positiv-, Heady und CnNK-2, als Negativkontrollen. (B) Versuchsschema: Die Transkription in isolierten Zellkernen aus Oocyten, 2- und 4-Blastomer-Stadien wurde in-vitro unter Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]-UTP beendet. Die Produkte wurden gegen PCR-Produkte der angegebenen Gene hybridisiert und die radioaktiven Banden durch Exposition auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### 5.3.3 Endocyten als Orte der embryonalen Transkription maternaler Gene

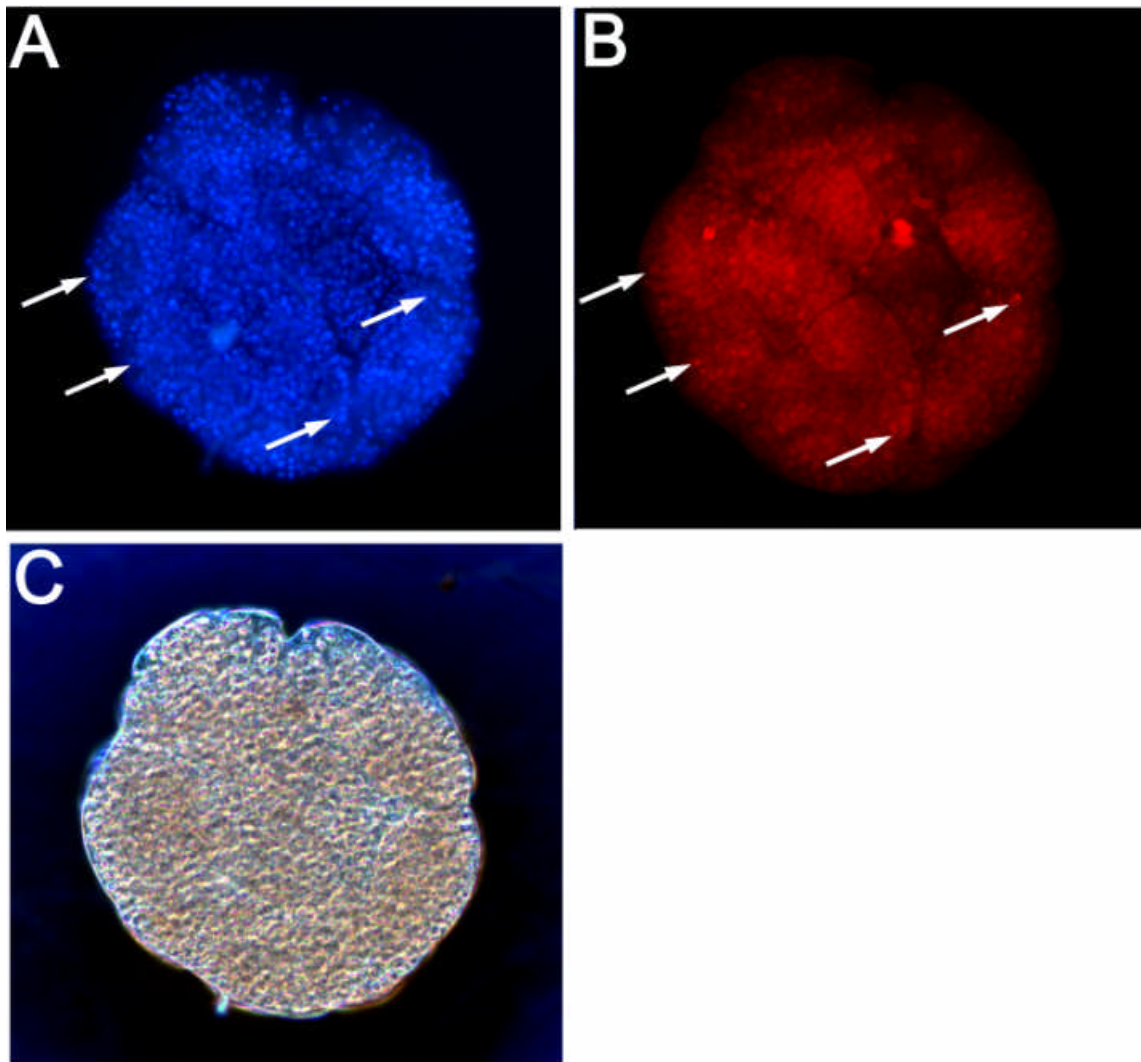
Aus den vorangegangenen Untersuchungen geht hervor, daß die ersten embryonalen Gene vermutlich während des Blastulastadiums transkribiert werden, im Gegenzug aber die aktive Transkription von sieben der untersuchten Gene in 2- und 4-Blastomer-Stadien einwandfrei nachgewiesen werden konnte. Dieser Gegensatz sollte durch die Markierung naszierender RNA in-vivo aufgeklärt werden. Bei der eingesetzten FU-Markierung wird die von den transkriptionell aktiven Zellen oder Blastomeren synthetisierte RNA durch den Einbau von 5'-Fluor-Uridin markiert. Der Einsatz eines kreuzreaktiven anti-BrdU-Antikörpers, der mit einem geeigneten Fluorochrom konjugiert ist, ermöglicht die Detektion der markierten Transkripte am Ort ihrer Entstehung. Bereits nach kurzer Markierungszeit (10 min) weisen lichtmikroskopisch nicht zu unterscheidende i-Zellen und Oogonien in der Körpersäule eines Kontroll-Polypen eine starke Markierung auf (Abb. 5-9 A & B). Dies ist ein Hinweis auf die hohe transkriptionelle Grundaktivität dieser Zellen.



**Abb. 5-9: I-Zellen und Oogonien weisen bereits im Polypen und während der Oogenese erhöhte transkriptionelle Aktivität auf. (A & B) Orte der aktiven Transkription wurden durch Inkorporation von 5-FU markiert und durch einen TRITC-konjugierten-anti-BrdU-Antikörper detektiert. (A) Oocyte-bildender *Hydra*-Polyp (AEP-Stamm) nach FU-Markierung. *Ef* Eifleck. (B) Vergrößerung der Körpersäule eines zu sexueller Vermehrung induzierten AEP-Polypen. Pfeile zeigen auf markierte Zellen in den Interstitien (pluripotente i-Zellen und Oogonien).**



Abbildung 5-10 A demonstriert, daß ein *Hydra*-Embryo im Bereich der mittleren Furchungen eine hohe Anzahl an Endocysten mit ihren Zellkernen enthält. Dem gegenüber stehen nur wenige embryonale Zellkerne. Durch die FU-Markierung konnte gezeigt werden, daß der vorwiegende Teil der Endocysten transkriptionell aktiv ist (Abb. 5-10 B).



**Abb. 5-10: Die embryonalen Endocysten maternalen Ursprungs sind Orte aktiver Transkription in frühen *Hydra*-Embryonen.** (A) *Hydra*-Embryo 6 Stunden nach Befruchtung. Orte der aktiven Transkription wurden durch Inkorporation von 5-FU markiert und durch einen TRITC-konjugierten-anti-BrdU-Antikörper detektiert. Alle sichtbaren Endocysten weisen eine Färbung von Cytoplasma und Nucleus durch markierte RNA auf. (B) Der gleiche Embryo wie in (A) nach Zellkernfärbung durch Hoechst 33342. (C) Dunkelfeld-Aufnahme des gleichen Embryos im Interferenzkontrast mit stark lichtbrechenden Endocysten. Die Pfeile weisen auf die gleichen Kerne in (A) und (B) hin.

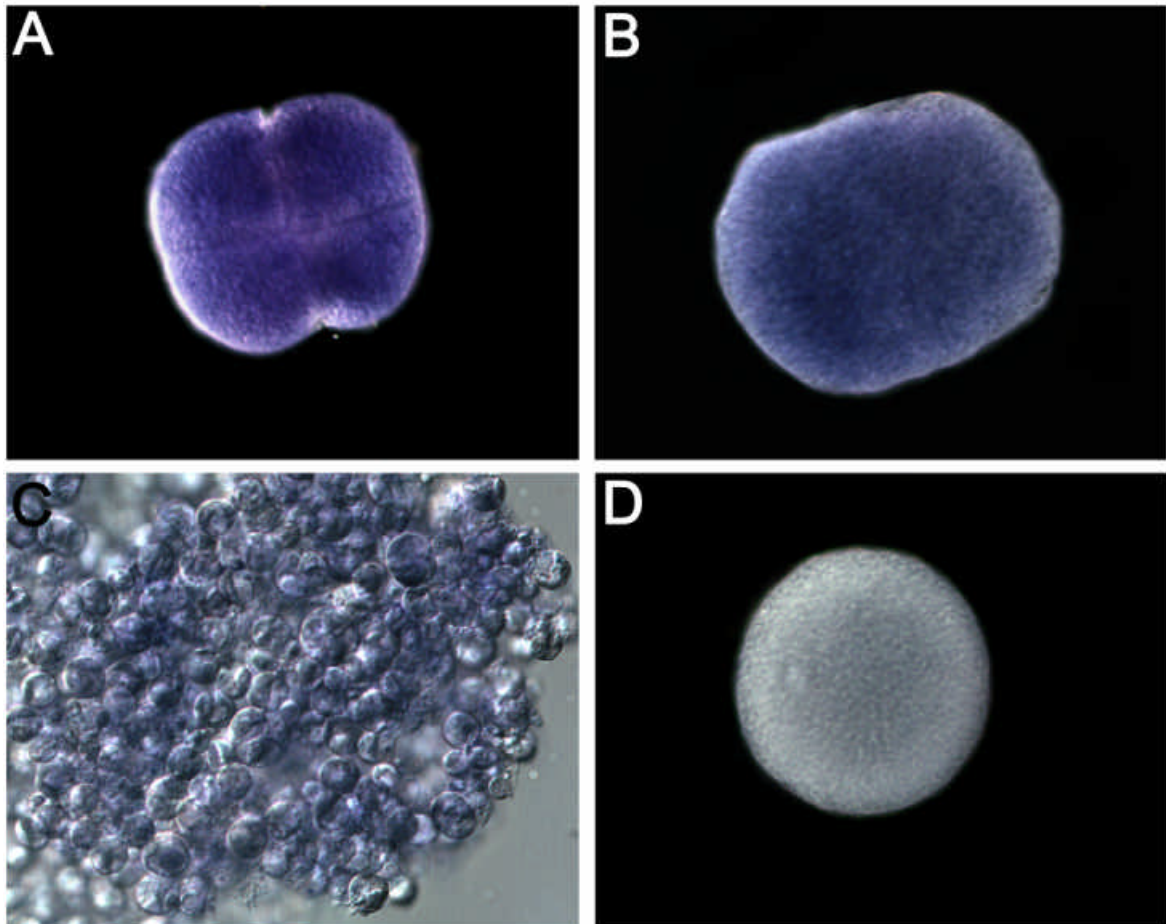
## 5.4 Lokalisierung der Expression ausgewählter Gene

Da keine der zuvor eingesetzten Methoden - weder der Nuclear-run-on noch die FU-Markierung - eine spezifische Trennung der transkriptionellen Aktivität der embryonalen und der endocytischen Nuclei erlaubt, wurden für den Nachweis, ob die Endocyten die in der RT-PCR und im nuclear-run-on nachgewiesenen Transkripte tatsächlich synthetisieren, in-situ-Hybridisierungen mit Sonden ausgewählter Gene durchgeführt.

Bei den in-situ-Hybridisierungen wurden Embryonen aller frühen Embryonalstadien bis zur Formation der Embryothek eingesetzt. Postgastrulae, die bereits mit der Sekretion der Theca begonnen hatten, wie auch Dauerstadien wurden bei der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt, da die sezernierten Substanzen ihrer Oberfläche eine derartige Klebrigkeit verleihen, daß es bei der Detektion zu einer starken unspezifischen Färbung der Embryothek kommt (Daten nicht gezeigt). Leider scheinen *Hydra*-Embryonen wegen der in den Blastomeren befindlichen Endocyten, die wiederum eine intakte Membran und die nachzuweisenden Transkripte in ihrem eigenen Inneren besitzen, für eine in-situ-Hybridisierung nur bedingt geeignet zu sein. Es kommt in den meisten Fällen nur zu einer guten Erreichbarkeit und somit Färbung der äußersten Endocytenlagen.

### 5.4.1 HyTcf

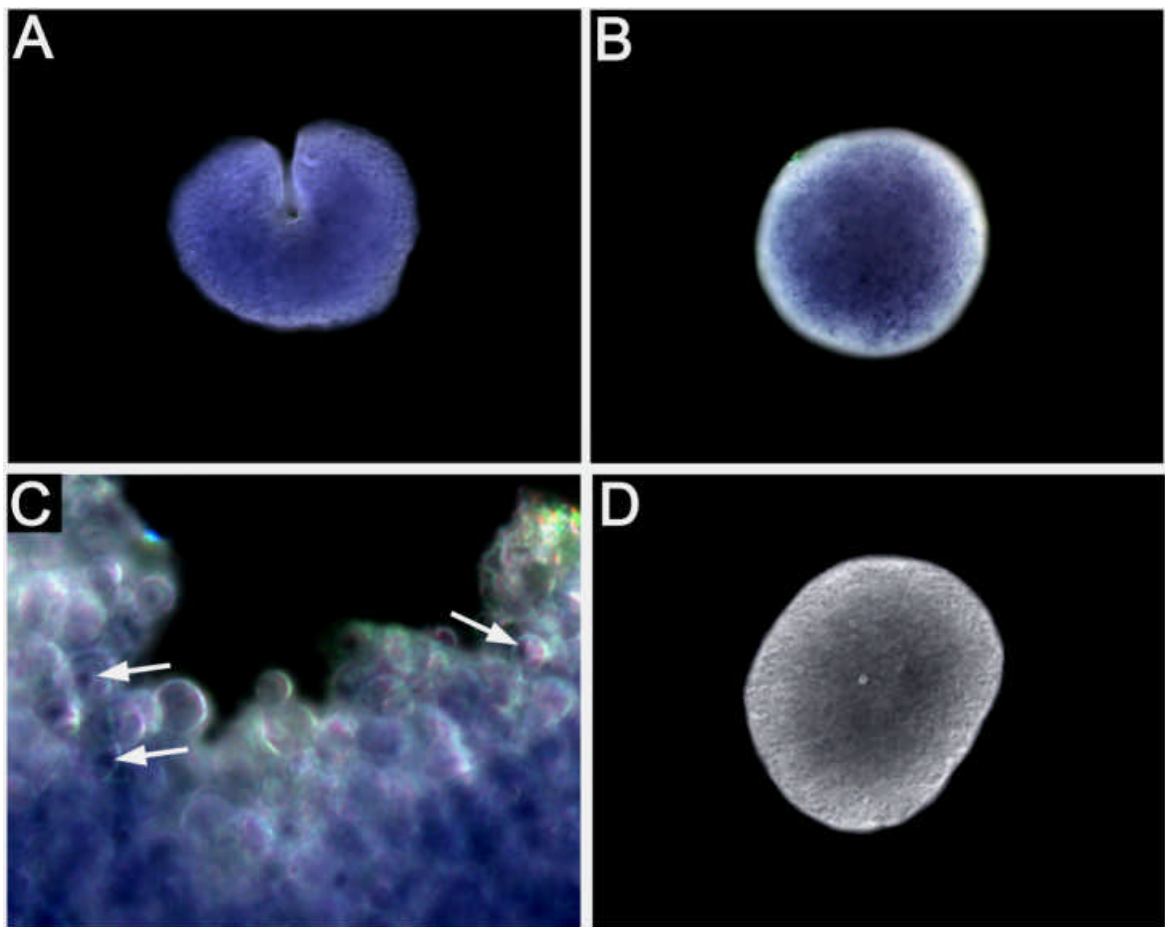
Nach whole-mount-in-situ-Hybridisierung mit Sonden gegen ein Fragment der kodierenden Region von HyTcf zeigen die verwendeten Embryonalstadien eine gleichmäßige blaue Färbung (Abbildung 5-11 A & B), die von Stadium zu Stadium in der Intensität variiert. Transkripte sind in Übereinstimmung mit RT-PCR-Daten schon in frühen Embryonen (4-Blastomer-Stadien) nachweisbar. Um Expression in Endocysten nachzuweisen, wurde ein Quetschpräparat angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-11 C dargestellt: Die im Cytoplasma der Blastomeren befindlichen Endocysten weisen eine blaue Färbung auf; die nachgewiesenen Transkripte wurden also von den Endocysten synthetisiert.



**Abb. 5-11: Whole-mount-in-situ-Hybridisierung mit Sonden gegen HyTcf.** (A) 4-Blastomer-Stadium, Antisense-Sonde, Dunkelfeld. (B) Leicht deformiertes Postgastrula-Stadium vor Beginn der Oothekbildung, Antisense-Sonde, Dunkelfeld. (C) Quetschpräparat eines Stadiums der mittleren Furchungsteilungen, Ausschnittsvergrößerung der Endocysten im Hellfeld-Interferenzkontrast. (D) Zygote, Sense-Kontrollsonde im Dunkelfeld.

### 5.4.2 HyAlx

Die whole-mount-in-situ-Hybridisierung zeigt eine gleichmäßige HyAlx-Expression ohne die bei HyBra beobachtete Zonierung im gesamten Embryo. Alle untersuchten Stadien der frühen Embryonalentwicklung weisen eine vergleichbare Färbung auf. Im Quetschpräparat wird eine Konzentration der blauen Färbung im Cytoplasma der Endocyten sichtbar. Dies zeigt abermals, daß die im Nuclear-run-on nachgewiesenen naszierenden Transkripte von den maternalen Endocyten synthetisiert werden.



**Abb. 5-12: Whole-mount-in-situ-Hybridisierung mit Sonden gegen HyAlx.** (A) Embryo während der ersten Furchungsteilung, Antisense-Sonde, Dunkelfeld. (B) Postgastrula-Stadium vor Beginn der Oothekbildung, Antisense-Sonde, Dunkelfeld. (C) Detailaufnahme der Oberfläche einer Zygote im Dunkelfeld. Der weißen Pfeile zeigen auf gefärbtes Cytoplasma und gefärbte Zellkerne von Endocyten. (D) Postgastrula vor Oothekenformation, Sense-Kontrollsonde im Dunkelfeld.

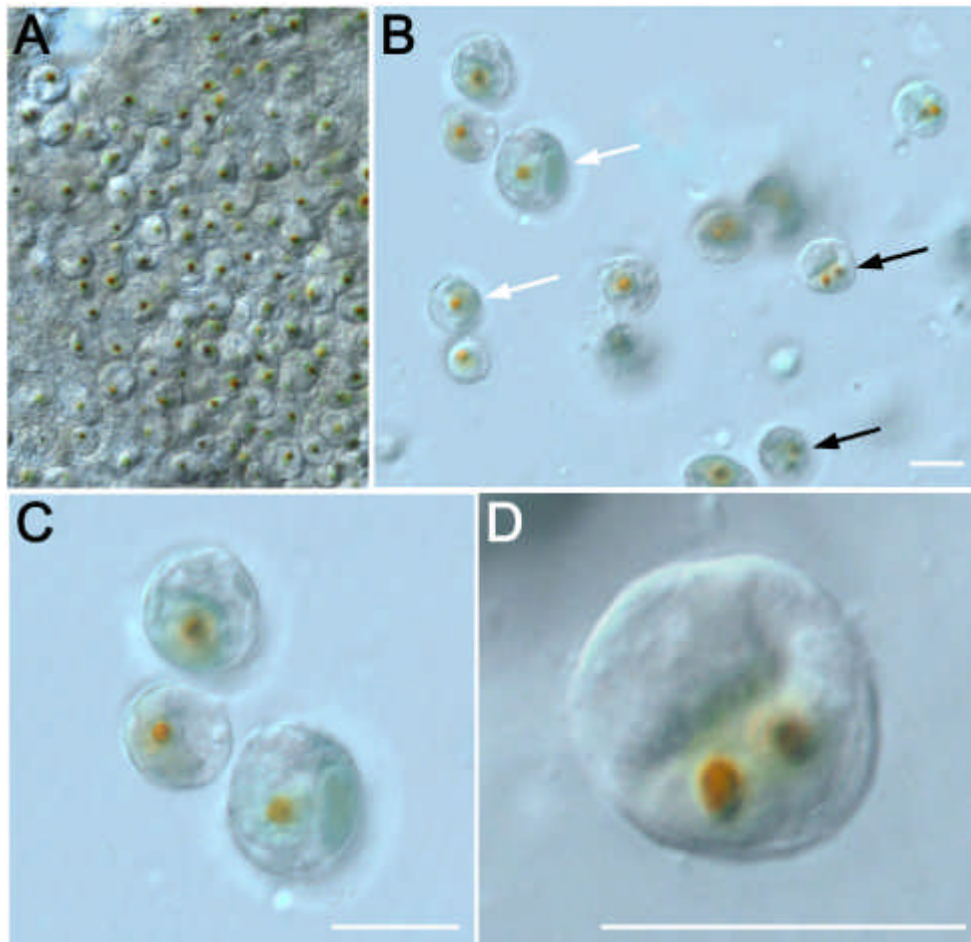
## 5.5 Funktionelle und morphologische Charakteristika der embryonalen Endocyten

Die bislang publizierten Ergebnisse über die Morphologie der *Hydra*-Endocyten basieren fast ausschließlich auf ultrastrukturellen Untersuchungen dieser Zellen während der Oogenese. Dabei werden diese Zellen fast ausnahmslos als apoptotisch beschrieben (HONEGGER ET AL., 1989; MILLER ET AL., 2000). Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse zeigen jedoch auf, daß Endocyten transkriptionell aktiv sind, und daß diesen Zellen möglicherweise eine weitaus größere Bedeutung zukommt als bisher angenommen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Merkmale der Endocyten gezielt analysiert, um festzustellen, ob sich die Endocyten tatsächlich im Zelltod befinden. Desweiteren wurde erneut ein besonderes Augenmerk auf die Feinstruktur dieser Zellen und die möglichen Veränderungen, die sie während der Embryogenese erfahren, gerichtet.

### 5.5.1 Nucleolusstruktur der *Hydra*-Endocyten

Untersuchungen jüngerer Datums haben gezeigt, daß Nucleoli solcher Zellen, bei denen der programmierte Zelltod initiiert wurde, schon sehr früh, noch bevor eine Fragmentierung des Chromatins zu beobachten ist, abgebaut und in Form von stark kondensiertem Material an die Peripherie der Nuclei transportiert werden (MORIMOTO, 2001). Um zu überprüfen, ob die Nuclei der Endocyten intakte Nucleoli aufweisen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. In intakten Kernen sind die Nucleoli mit NORs (nucleolar organizer regions) assoziiert. Diese weisen wiederum besondere argyrophile, also silberbindende Proteine auf, die durch eine Silberfärbung spezifisch angefärbt werden können. Abbildung 5-13 A zeigt einen Ausschnitt eines mit Silber gefärbten 2-Blastomer-Embryos. Im Überblick sind durch Silber-Einlagerung braun gefärbte Nucleoli in jeder kugelförmigen Endozyte zu erkennen. Um eine Betrachtung im Detail zu ermöglichen, wurden Endocyten durch leichtes Quetschen aus dem Embryo gelöst. Die Struktur der runden bis ovalen Nucleoli scheint intakt, es gibt kein Anzeichen einer Fragmentierung. Während die Nuclei der meisten Endocyten nur einen Nucleolus aufweisen, gibt es eine große Anzahl, die zwei Nucleoli enthalten (Abbildung 5-13 B,C und

D). Diese Ergebnisse zeigen, daß Endocyten metabolisch aktive Zellen sind. Die Existenz zweier Nucleoli läßt zudem auf eine vergleichsweise höhere metabolische Aktivität schließen.

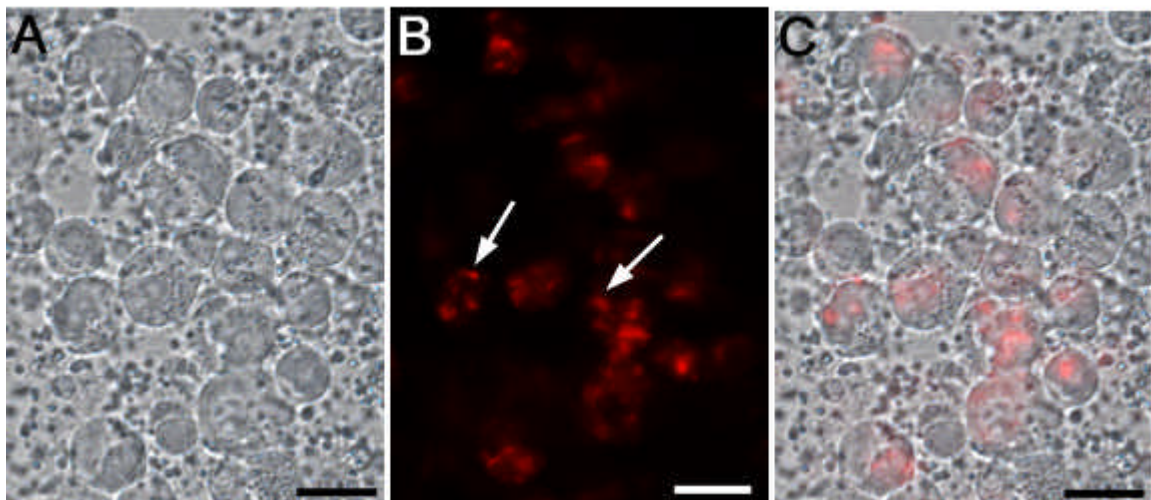


**Abb. 5-13: Silberfärbung intakter Nucleoli in Endozyten im Interferenzkontrast.**

(A) Ausschnitt eines 2-Blastomer-Stadiums bei geringerer Vergrößerung. (B) Durch leichtes Quetschen freigesetzte Endozyten im Überblick. Weiße Pfeile markieren Zellen mit nur einem Nucleolus, schwarze solche, die zwei Nucleoli aufweisen. (C und D) Stärkere Vergrößerungen einiger in (B) gezeigter Zellen. Die braune Färbung markiert in allen Abbildungen die Nucleoli, die gelbe Färbung stammt von geringfügiger Silbereinlagerung ins Nucleoplasma und macht so den Zellkern sichtbar. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

### 5.5.2 Die respiratorische Aktivität der Endozyten

Ein weiteres Merkmal apoptotischer Zellen ist der Verlust des inneren Mitochondrienmembranpotentials, der vom Abbau der Mitochondrien gefolgt wird. Die respiratorische Aktivität von Zellen läßt sich durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin123 untersuchen. Dieser Farbstoff wird in der Matrix aktiver Mitochondrien eingelagert, solange besagtes Potential besteht. Geht es durch den Tod der Zelle oder andere Vorgänge verloren, so verteilt sich das Rhodaminderivat im Cytoplasma. Wie in Abbildung 5-14 B zu sehen ist, lassen sich die Mitochondriencluster der Endocyten durch Färbung mit Rhodamin123 sichtbar machen. *Hydra*-Endozyten sind also respiratorisch aktiv, was den nicht-apoptischen Charakter dieser Zellen betont.



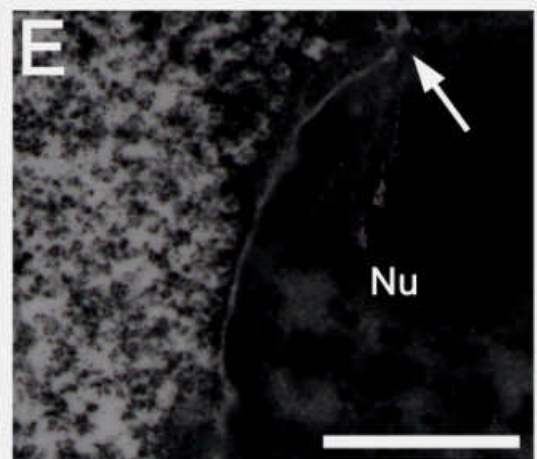
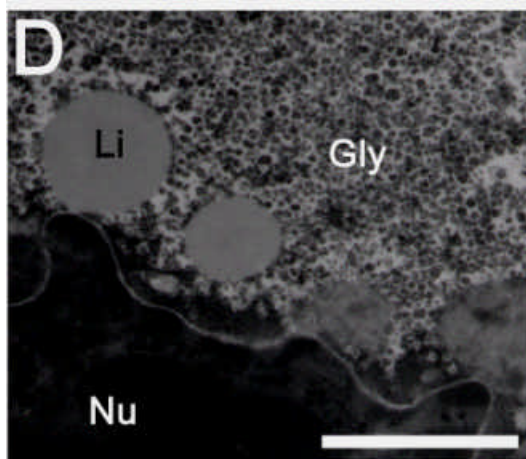
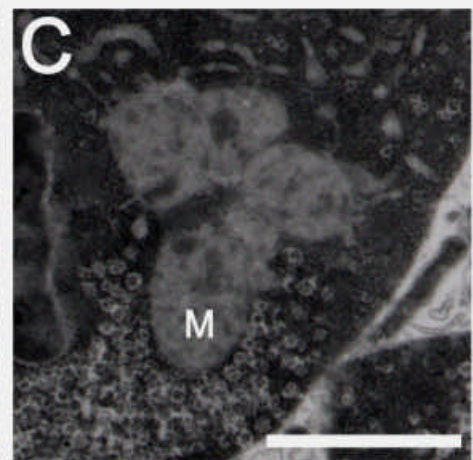
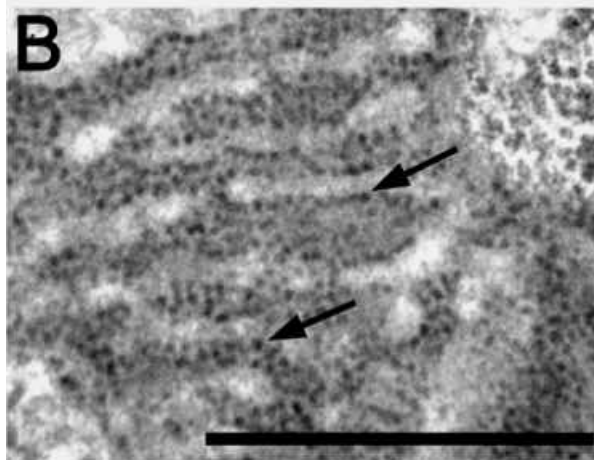
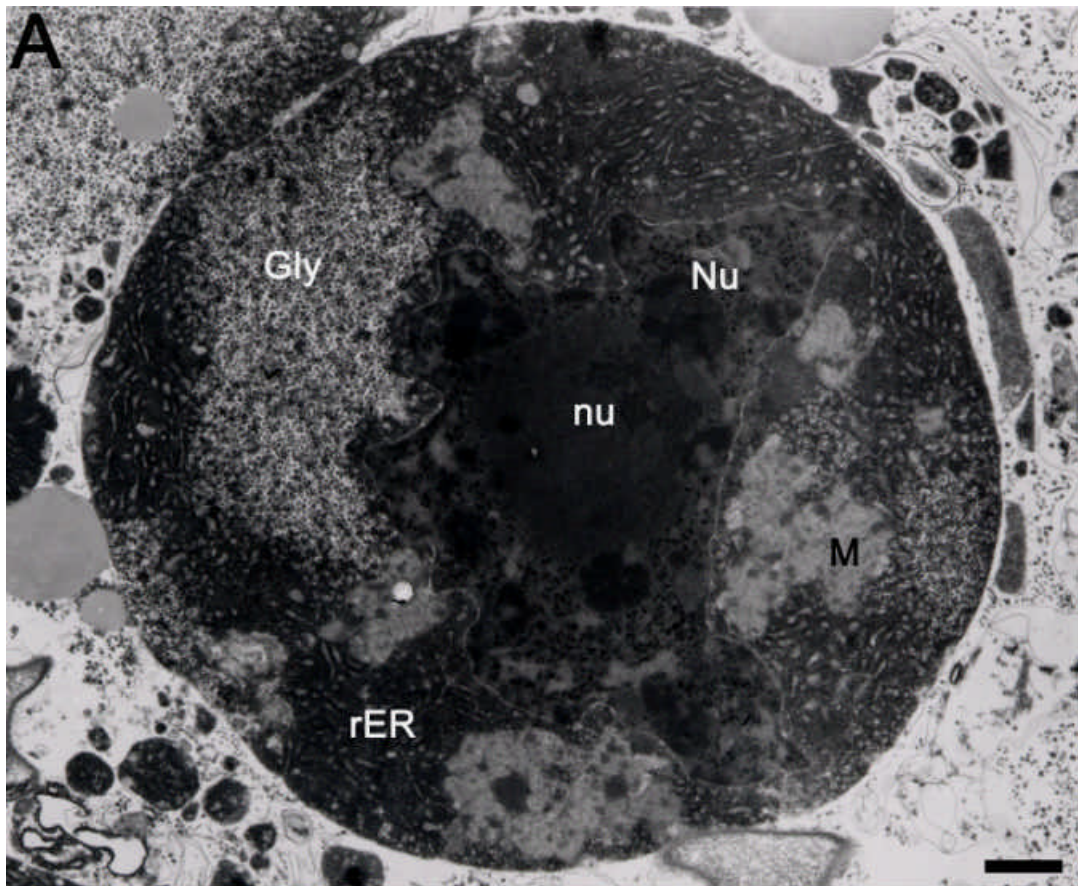
**Abb. 5-14: Rhodamin123 färbt mitochondriale Cluster in Endozyten. (A)** Phasenkontrastbild von Endozyten, die durch leichtes Quetschen aus einem 8 h alten Embryo freigesetzt wurden. Zwischen den Zellen liegen die zytoplasmatischen Bestandteile der geplatzen Blastomere. **(B)** Fluoreszenzaufnahme nach Färbung mit Rhodamin123 unter Verwendung eines Rhodamin-Filtersatzes. Mitochondrien (weiße Pfeile) sind als rote Punkte sichtbar. **(C)** Addition von (A) und (B); Die Markierung ist auf den zytoplasmatischen Bereich der Endozyten beschränkt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

### 5.5.3 Feinstrukturelle Analyse der Endocyten-Morphologie

Alle bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß sich die maternalen Endocyten in *Hydra*-Embryonen nicht im programmierten Zelltod befinden. Da jedoch bei der lichtmikroskopischen Untersuchung eine Abnahme der Endocytenzahl während der Embryogenese beobachtet wurde, ist es möglich, daß ein gewisser Anteil dieser Zellen tatsächlich apoptotisch ist und abgebaut wird. Zur Untersuchung der Feinstruktur der Endocyten und Beobachtung etwaiger Veränderungen, die sie im Inneren der embryonalen Blastomeren während der Embryogenese von *Hydra* durchlaufen, wurden Ultradünnschnitte früher (Zygote, mittlere Furchungsteilungen) als auch späterer Stadien (Postgastrula nach Oothekformation) angefertigt, mit Blei und Osmium kontrastiert und im Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

Die Endocyten sind hochlichtbrechende kugelförmige Zellen mit einem mittleren Durchmesser von 10µm. Sie weisen eine intakte eigene Zellmembran auf; eine Phagozytosevakuole ist nicht vorhanden, die Zellen liegen dicht gepackt im Cytoplasma der Blastomeren. Der rein cytoplasmatische Anteil der Zellen ist sehr stark reduziert, in der Regel macht sein Volumen weniger als die Hälfte der Zelle aus. Der übrige Anteil enthält Glykogen in Form von α-Glykogen-Partikeln und vereinzelte Lipidtropfen (Abbildung 5-15 D). Der im Cytoplasma liegende Zellkern weist eine stark unregelmäßige Gestalt mit Einbuchtungen und Wölbungen auf, die ihm oft eine sternförmige Form verleihen (Abbildung 5-15 A). Die Kernmembran ist jedoch strukturell intakt. Das Chromatin besitzt eine inhomogene Struktur, darin befindliche Nucleoli sind von regelmäßiger Gestalt, NORs sind sichtbar. Große Anteile des Cytoplasmas werden von rauhem Endoplasmatischem Retikulum eingenommen, dessen Ribosomen bei höherer Vergrößerung gut sichtbar sind (Abbildung 5-15 B). Desweiteren weisen die Endocyten größere Anzahlen von Mitochondrien auf, die in Gruppen und Rosetten angeordnet sind (Abbildung 5-15 C). Die Struktur des Zellkerns und Kernkörperchens wie auch intaktes rER und Mitochondrien sind weitere Hinweise auf eine hohe Syntheseaktivität dieser Zellen.





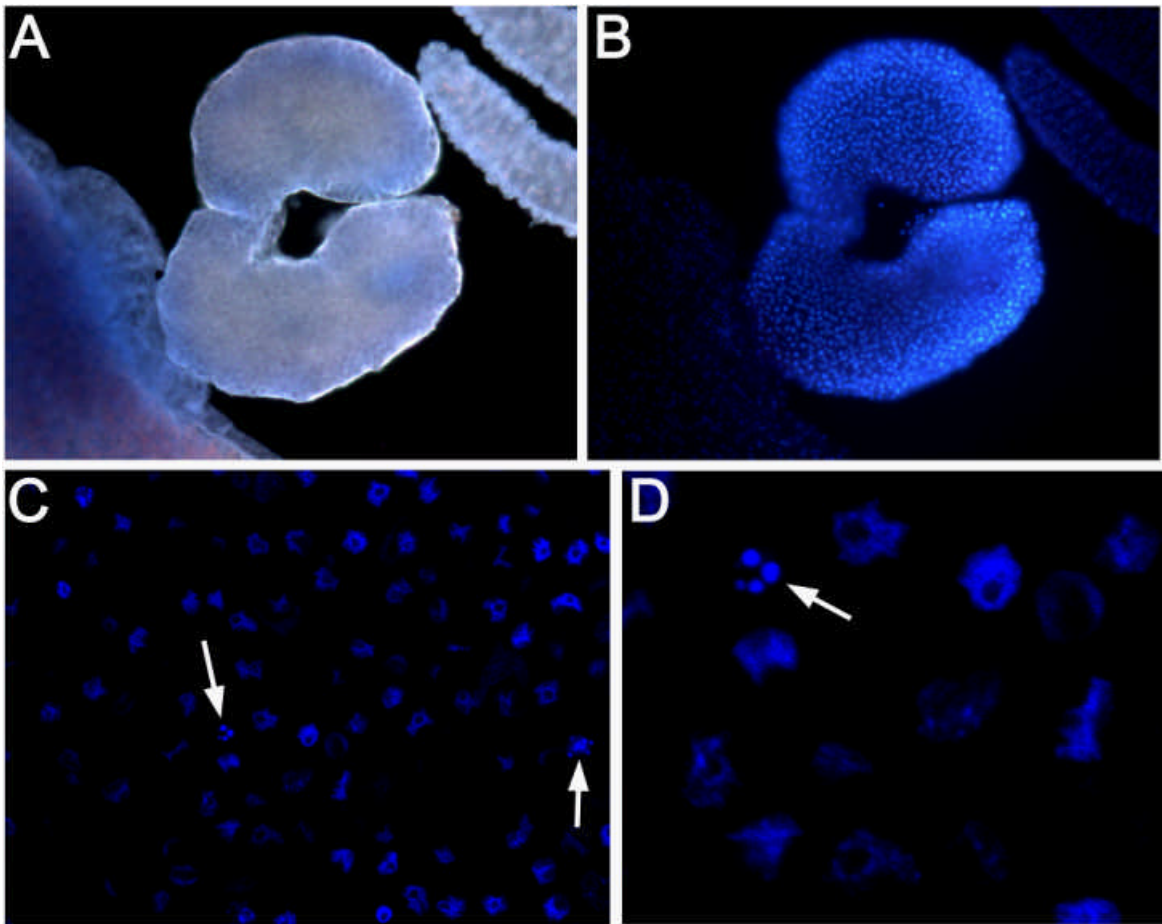
**Abb. 5-15: Morphologie der embryonalen Endocyten im TEM.** (A) Endocyte in einem Embryo im Stadium der mittleren Furchungsteilungen. (5 h nach Befruchtung) (B) Detailaufnahme des rauhen Endoplasmatischen Retikulums. Pfeile weisen auf einzelne Ribosomen. (C) Nahaufnahme eines mitochondrialen Clusters umgeben von rER und Glykogenpartikeln. (D, E) Abschnitt der Kernmembran mit Chromatin auf der einen und Speicherstoffen auf der anderen Seite. Der Pfeil zeigt auf eine Kernpore. *Gly*  $\alpha$ -Glykogenpartikel, *Li* Lipidtropfen, *M* Mitochondrien, *Nu* Nucleus, *nu* Nucleolus, *rER* rauhes endoplasmatisches Retikulum. Der Maßstabsbalken entspricht 1000 nm = 1  $\mu$ m.

Die bei dieser Abbildung verwendeten Bilder wurden freundlicherweise von FRAU DR. FREDERIKE ANTON-ERXLEBEN zur Verfügung gestellt.

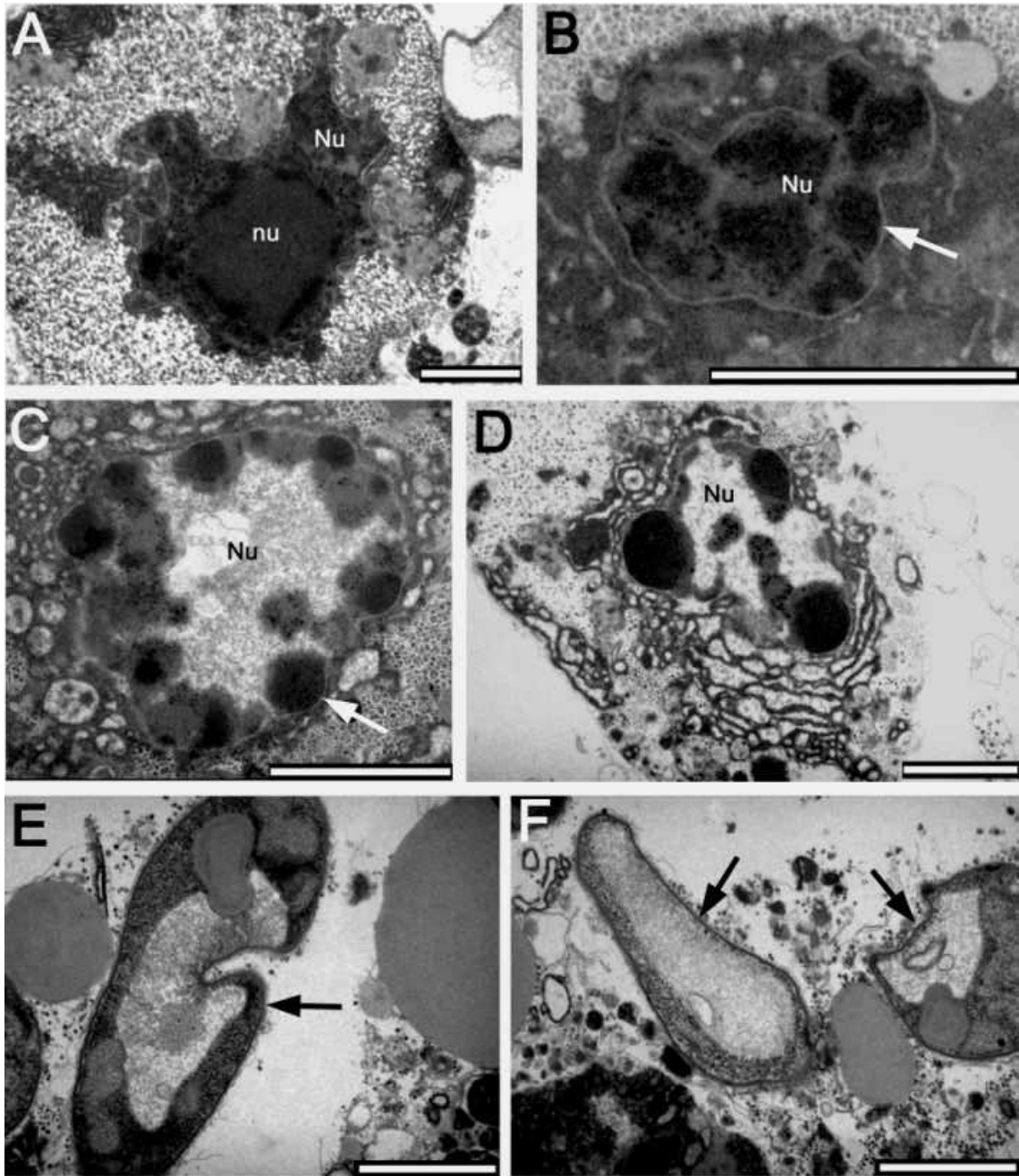
#### 5.5.4 Endocytenzellkernmorphologie

Um den Anteil der apoptotischen Endocyten abschätzen zu können, wurden die Nuclei junger Hydra-Embryonen mit dem fluoreszenten DNA-Interkalator Hoechst-33342, einem bis-Benzimid, angefärbt und unter Verwendung eines konfokalen Lasermikroskops analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Anteil apoptotischer Endocyten nur äußerst gering ist, während die meisten Zellen die in Abbildung 5-15 A gezeigte intakte Kernmorphologie aufweisen. Abbildung 5-16 illustriert dieses Ergebnis.

Während in jungen Stadien der weitaus größte Teil der Endocyten diese Feinstruktur aufweist, sind in späteren Stadien hingegen in erhöhtem Maße Zellen sichtbar, die klar apoptotische Charakteristika aufweisen. Abbildung 5-17 zeigt die Veränderungen, die diese Zellen durchlaufen. Erstes Anzeichen für den beginnenden Zelltod ist der Abbau des Nucleolus und die Kondensation des nukleären Chromatins (Abb. 5-17 B). Zu diesem Zeitpunkt sind keine Veränderungen im Cytoplasma sichtbar. Als nächstes kommt es zu einer fortschreitenden Chromatinkondensation und dem Transport an die Kernperipherie, bis das Innere der Zellkerne kein elektronendichtes Material mehr aufweist. Währenddessen verliert auch das rER seine strukturelle Integrität und wird vesikulär (Abb. 5-17 C & D). Den Abschluß bildet die Abgabe ihrer Inhalte an die Blastomeren, wobei sie weiter schrumpfen, bis schließlich unförmige apoptotische Restkörper übrigbleiben (Abb. 5-17 E & F), die zu einem späteren Zeitpunkt vom Embryo absorbiert werden.



**Abb. 5-16:** Der Anteil tatsächlich apoptotischer Zellen ist in jungen *Hydra*-Embryonen gering. (A) 2-Blastomer-Stadium im Dunkelfeld. (B) Der gleiche Embryo wie in (A) in der Epifluoreszenz nach Färbung der Nuclei mit Hoechst-33342. (C&D) Optischer Schnitt durch einen jungen *Hydra*-Embryo nach erfolgter Kernfärbung mit Hoechst-33342 unter Verwendung eines konfokalen Lasermikroskops. (D) Ausschnittsvergrößerung aus (C). Die Pfeile zeigen auf eindeutig apoptotische Zellen ohne Nucleoli und mit verklumptem Chromatin.



**Abb. 5-17: Apoptotische Endocyten in Embryonen des Dauerstadiums (3 Tage nach Befruchtung).** (A,B,C,D) Endocytenzellkerne, (E,F) Apoptotische Restkörper. (A) Nucleus einer nicht-apoptotischen Endocyte mit intaktem Nucleolus. (B) Beginnende Apoptose: Endocytenkern ohne Nucleolus, mit verklumpendem Chromatin. (C, D) Spätere Apoptose: Kernmaterial an der Kernperipherie, das rER wird vesikularisiert. (E, F) Apoptotische Restkörper der Endocyten (Pfeile) nach dem Tod der Zellen. *Nu* Nucleus, *nu* Nucleolus. Der Maßstabsbalken entspricht 2000 nm = 2 µm. Die bei dieser Abbildung verwendeten Bilder wurden freundlicherweise von FRAU DR. FREDERIKE ANTON-ERXLEBEN zur Verfügung gestellt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Rolle der maternalen Endocyten während der frühen Embryogenese von *Hydra*

Die Inkorporation großer Mengen maternaler DNA, wie sie durch die Aufnahme der Endocyten in das Ooplasma geschieht, ist einzigartig im Tierreich. Mögliche Funktionen dieses Materials waren bis zum jetzigen Zeitpunkt rein spekulativ. Die vorliegenden Daten geben einen neuen Einblick in die Funktion dieser Zellen.

#### 6.1.1 Endocyten als Orte aktiver Transkription entwicklungsrelevanter Gene

Der Einsatz von RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern ermöglichte den Nachweis von Transkripten verschiedener Gene bereits in Oocyten und frühen Embryonen des Süßwasserpolypen *Hydra*. Es existieren verschiedene Möglichkeiten für den Ursprung dieser Transkripte: a) sie könnten Überbleibsel der Oogenese und somit maternalen Ursprungs sein oder b) sie könnten die ersten zygotischen bzw. embryonalen Transkripte darstellen. Durch Einsatz eines nuclear-run-ons, bei dem in der Entstehung befindliche (naszierende) Transkripte in Gegenwart radioaktiv markierter Nucleotide beendet und so markiert werden, konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, daß diese Transkripte in frühen Embryonen de-novo synthetisiert werden und keineswegs ausschließlich während der Oogenese in die Oocyte gelangten. Dieses Ergebnis war umso interessanter, als um im Rahmen dieser Methode ein Signal ausreichender Stärke zu erlangen, und es auf einem Röntgenfilm sichtbar zu machen, in der Regel Transkripte tausender aktiver Zellkerne notwendig sind. Bereits in Zygoten sind weit über tausend im Laufe der Oogenese aufgenommener akzessorischer Zellen vorhanden, ihnen gegenüber stehen zunächst nur wenige embryonale Zellkerne. Diese Beobachtung gab bereits einen Hinweis auf die Aktivität der Endocyten. Autoradiographie ist aufgrund langer Belichtungszeiten eine zeitaufwendige Methode. Die auf dem Einbau nicht-radioaktiver Uridin-Derivate (5-Fluoro-Uridin) mit anschließender Detektion durch einen

fluoreszent markierten Antikörper basierende FU-Markierung ermöglicht die zuverlässige und schnelle Visualisierung aktiver Kerne und Zellen in-situ (KOBBERNA ET AL., 2000; STANÌK ETAL., 2000; BOISVERT ET AL., 2000). Die hohe transkriptionelle Aktivität der Endozytenkerne konnte durch FU-Markierung nachgewiesen werden. Obwohl diese Daten die Aktivität der Endocytenuclei aufzeigen und einen Hinweis auf die geregelte Transkription regenerationsrelevanter Gene geben, konnte dieser Zusammenhang erst durch die whole-mount-in-situ-Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden hergestellt werden. Dabei wurden Transkripte zweier früherer Gene, des Transcriptionfactor-Homologs HyTcf und des Aristaless-Homologs HyAlx im Cytoplasma der Endocyten sichtbar gemacht. Die Expression von HyTcf und HyAlx erfolgt bereits während der frühen Ontogenese im gesamten Embryo gleichmäßig. Dieses Ergebnis ist einzigartig, im Tierreich ist bislang keine geregelte Transkription maternalen Gene während der Ontogenese eines Organismus im Inneren von Zellen, die in seinen embryonalen Blastomeren sitzen, nachgewiesen worden.

### **6.1.2 Die Mehrzahl der *Hydra*-Endocyten ist nicht apoptotisch**

Aufgrund früherer licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen, in deren Mittelpunkt die Oogenese von *Hydra* und Aufklärung der Morphologie und Struktur der maternalen Endocyten stand, ist in der Literatur die Meinung, daß diese Zellen apoptotisch seien, weit verbreitet (MILLER ET AL., 2000; MARTIN ET AL., 1997, HONEGGER ET AL., 1989; TARDENT, 1985). Diese Hypothese wurde hauptsächlich durch die, während des programmierten Zelltodes ebenfalls auftretende Verringerung des Zellvolumens, die den Zellen die Bezeichnung ‚shrinking cells‘ einbrachte, gestützt (HONEGGER ET AL., 1989).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Endocyten aus frühen und mittleren Ontogenesestadien feinstrukturell unter Einsatz der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Der weitaus größte Teil dieser Zellen weist bis auf ein vergleichsweise geringes Zellvolumen und eine Reduktion des cytoplasmischen Anteils infolge Einlagerung von Glykogen und Lipiden keine typischen apoptotischen Merkmale auf. Einzige Auffälligkeiten sind der ungewöhnliche geformte Kern, der jedoch eine intakte Membran mit Kernporen und eine von den interstitiellen Vorläuferzellen deutlich unterschiedliche Struktur des Chromatins aufweist (HONEGGER ET AL., 1989). Kerne mit vergleichbarer Form können jedoch zuweilen auch in

den ektodermalen Epithelzellen von Polypen auftreten. Andere Untersuchungen zeigen zudem, daß die Endocytenkerne tetraploid sind (AIZENSTADT, 1975). In einigen Fällen wurden zudem Kerne mit solchen Einbuchtungen bei metabolisch besonders aktiven Zellen beobachtet.

Weitere Untersuchungen jüngerer Datums (MILLER ET AL., 2000) versuchten den apoptotischen Charakter aufgrund der Anfärbbarkeit der Endocyten mit Acridin-Orange zu belegen. Acridin-Orange ist ein kationischer Farbstoff, der vor allem in den letzten Jahren häufig für den Nachweis apoptotischer Zellen eingesetzt wurde. Jedoch ist dieser Farbstoff weniger ein Marker für Apoptose als vielmehr ein Reagenz, das sowohl Vesikel mit niedrigen pH-Werten als auch basophile Bestandteile und Nukleinsäuren zu färben vermag. Als Marker für Apoptose ist er daher nur dann einsetzbar, wenn die nicht-apoptotischen Zellen des gleichen Typs nicht bereits angefärbt werden können. Der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte hohe Anteil basophiler Strukturen (rER) im Cytoplasma der Endocyten in Verbindung mit der Beobachtung, daß Toluidinblau, ein Farbstoff mit dem gleichen Färbevermögen, schon im adulten Polypen spezifisch interstitielle Zellen und Keimzellvorläufer färbt, führt zu dem Schluß, daß eine Acridin-Orange-Färbung zum Nachweis der Apoptose hier nicht eingesetzt werden kann und zwangsläufig zu einem falsch-positiven Ergebnis führt.

Während der frühen Apoptose kommt es in der Regel zu einer Aktivierung zelleigener DNasen durch Caspasen, die zu einer charakteristischen Fragmentierung der genomischen DNA zwischen den Nucleosomen und so der Generierung von einem Mehrfachen 180 –200 bp-großer Fragmente führt (WYLLIE, 1980; NAGATA, 2000). Dieser Vorgang ist zum einen durch TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) wie auch durch die elektrophoretische Auftrennung der degradierten DNA, die sich in Form einer DNA-Leiter darstellt („laddering“), nachzuweisen. Während die TUNEL-Färbung keine positiven Zellen zu zeigen vermochte, konnte auch ein typisches DNA-laddering nicht beobachtet werden (TECHNAU, unveröff. Ergebnis).

Im Kontrast zu diesen Hypothesen zeichnen die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten ein anderes Bild der maternalen Endocyten.

**Tab. 6-1: Vergleich des Zustandes von apoptotischen Zellen und den untersuchten Endocysten aufgrund morphologischer und funktioneller Kriterien**

	<b>Apoptose</b>	<b>Endocysten</b>
Fragmentierung des Kerns	✓	-
Verlust des Nucleolus	✓	-
Chromatin-Kondensation	✓	-
Verlust der respirativen Aktivität	✓/-	-
Vesikularisierung von Organellen	✓	-
Gezielte Transkription entwicklungsrelevanter Gene	-	✓

Bereits früh in der Apoptose, noch bevor TUNEL-positive Zellen nachweisbar sind, kommt es zu einem Abbau des Nucleolus und der Nucleolus-organisierenden-Regionen mit ihren argyrophilen Proteinen (MORIMOTO ET AL., 2001, HORKY ET AL., 2000). Sowohl die Untersuchung der nucleären Feinstruktur durch TEM wie auch die spezifische Färbung der assoziierten argyrophilen Proteine sprechen für die Existenz intakter und funktionstüchtiger Nucleoli. Viele der untersuchten Zellen weisen zudem einen zweiten Kernkörper auf, was ein Indiz für eine (mit dem höheren Anteil rauhen ERs übereinstimmende) erhöhte Syntheseleistung darstellt.

Ein weiteres Merkmal des programmierten Zelltodes ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) der betroffenen Zellen (KRYSKO ET AL., 2001). Selten konnten in apoptotischen Zellen auch vereinzelte polarisierte Mitochondrien nachgewiesen werden. Die eingesetzte Rhodamin-123-Färbung färbt ausschließlich Mitochondrien lebender Zellen mit intaktem inneren Membranpotential; kann dieses infolge Apoptose oder Tod nicht aufrechterhalten werden, diffundiert der Farbstoff ins Cytoplasma, eine Färbung der Mitochondrien bleibt aus. Daß nicht nur vereinzelte Mitochondrien der Endocysten angefärbt werden konnten, ist somit abermals ein Hinweis auf die Intaktheit der Zellen.

Schließlich zeugen auch die molekularbiologischen Ergebnisse vom nicht-apoptotischen Zustand der Endocysten. Wie meine Daten zeigen, sind die Kerne der Zellen nicht nur transkriptionell hochaktiv, sie exprimieren auch gezielt alle untersuchten, verschiedenen Gruppen zugehörigen Gene.



### 6.1.3. Regulation der Nährstofffreigabe aus Endocyten durch Apoptose

In der Zoologie ist nur ein weiterer Fall bekannt, bei dem Zellen eines Organismus in anderen Zellen des gleichen Organismus existieren: beim Menschen werden seit einigen Jahren Untersuchungen an sogenannten TNCs (Thymic nurse cells) durchgeführt. Anders als die Endocyten von Hydra, haben diese TNCs offenbar die Fähigkeit, Vorläuferzellen des Thymus bei Kontakt in sich aufzunehmen und am Leben zu erhalten. Sie besitzen zudem die Möglichkeit, bei solchen aufgenommenen Zellen, die bestimmte Kriterien erfüllen, gezielt Apoptose einzuleiten. Da allerdings diese beiden Fälle zu unterschiedlich sind, um zwischen ihnen Vergleiche anstellen zu können, können Funktionen der Endocyten nur postuliert werden.

Während der Oogenese und zuweilen der Embryogenese auftretende Zellen, deren Aufgabe die Bereitstellung von Nährstoffen sowie regulatorischen maternalen Transkripten und Faktoren für die Oocyte darstellt, sind im Tierreich weit verbreitet. Bei Hydrozoen wurden Nährzellen als wichtige nutritive Elemente bei den marinen Vertretern Myriothela (BENOIT, 1925; BEIGEL, 1976), Pennaria (COWDEN, 1964), Tubularia (BENOIT, 1925; NAGAO, 1965; BOELSTERLI, 1975) und schließlich beim Süßwasserpolyphen Hydra (BRAUER, 1891; ZHLER, 1972; AIZENSHTADT, 1973; DEPPE, 1974; TARDENT, 1974) identifiziert.

Die Endocyten von Hydra wurden aufgrund ihres hohen Gehaltes an Speicherstoffen schon früh als Nährzellen bezeichnet, obwohl ein direkter Transport von Substanzen von diesen Zellen zur Oocyte bisher nicht direkt nachgewiesen wurde. Es wurde aber beobachtet, daß diese Zellen im Rahmen ihrer Aufnahme in das Ooplasma während der Oogenese Anteile ihres Cytoplasmas an die wachsende Oocyte abgeben, und daß es zum Teil zu einer Fusion der Endocyten mit der Oocyte kommt. Das Vorhandensein von Fusomen während der Oogenese wird in der Literatur kontrovers diskutiert (AIZENSHTADT, 1974, 1975, 1978; HONEGGER ET AL., 1989). Zwar scheint es im Embryo keine direkte Verbindung zwischen den Blastomeren und den Endocyten, die sie beherbergen, zu geben, das völlige Fehlen einer Phagozytosevakuole könnte jedoch den Austausch niedermolekularer Substanzen ermöglichen. Auch ist es nicht ausgeschlossen, daß ein Transport von Transkripten in die Blastomeren stattfindet. Während der Oogenese ist die wachsende Oocyte zwar in der Lage, Nährstoffe selbst zu synthetisieren (Autosynthese), jedoch ist das tatsächliche Volumen des Ooplasmas vergleichsweise gering, die Endocyten füllen es fast ganz aus. Auch die beobachtete Transformation von Oocyten-Mitochondrien im Rahmen der Dotterbildung (HONEGGER ET AL., 1989; RATIGORSKY, 1975; PFANNENSTIEL ET AL., 1982) könnte kein

ausreichendes Material für die Individualentwicklung von *Hydra* liefern. Ein postulierter Transport von Glycogen durch die Mesogloea (BURNETT, 1959; HAUSMAN, 1973) in die Oocyte im Rahmen der Oogenese wurde bisher nicht experimentell bestätigt. Wird dazu in Betracht gezogen, daß das nach Formierung der Oothek erreichte Dauerstadium 2 bis über 20 Wochen anhalten kann, bis durch Faktoren, die wir noch nicht kennen, die entscheidende Schritte der Zelldifferenzierung und Morphogenese zum *Hydra*-Polypen eingeleitet werden (MARTIN ET AL., 1997), so stellt sich die Frage, wie die Blastomeren diesen langen Zeitraum ohne Nährstoffe in Form von Dotter überstehen können. Dieser Zeitraum ist dabei unabhängig von der Umgebungstemperatur, so habe ich Längen von über 12 Wochen auch bei Raumtemperatur beobachtet. Diese Überlegungen können nur zu dem Schluß führen, daß als eine wichtige Funktion der maternalen Endocyten die Funktion als Nährzelle (als solche war sie ja schon früh bezeichnet worden) angesehen werden kann. Die Zellen synthetisieren während ihrer Differenzierung zu Nährzellen in hohem Maß Speicherstoffe wie Glykogen und Lipide, was mit einer starken Reduktion ihres Cytoplasmas einhergeht. Erhöhter DNA-Gehalt, Struktur ihres Nukleus und der hohe Anteil rauhen Endoplasmatischen Retikulums weisen auf eine erhöhte metabolische Aktivität hin.

Während der Embryogenese persistieren die Endocyten in den Blastomeren, wobei es zu einer sehr langsamen Reduktion ihrer Zahl kommt. So konnte anhand konfokaler Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß nur ein sehr geringer Anteil der Endocyten Veränderungen aufweist, die den Schluß zulassen, daß sie den programmierten Zelltod durchlaufen. Nur diese Zellen weisen kondensiertes Chromatin, fehlende Nucleoli und vesikuläre Überreste des rauhen ERs auf. Zudem können in älteren Embryogenesestadien in zunehmendem Maß apoptotische Restkörper solcher Zellen gefunden werden. Diese Abnahme erfolgt also durch das vereinzelte Einleiten des apoptotischen Programmes, an dessen Ende die Abgabe des Zellinhaltes in die Blastomere steht. Die gespeicherten Nährstoffe wie auch Transkripte und Abbauprodukte des Zellkerns und membranöser Strukturen werden dabei in die Blastomere entlassen und stehen dieser ab sofort zur Verfügung. Somit sind zwar apoptotische Endocyten in Embryonen zu finden, ihr Anteil ist jedoch äußerst gering und die Annahme, alle Endocyten seien bereits seit der Bildung der Oocyte apoptotisch, wurde wiederlegt.

## 6.2 Expression regenerationsrelevanter *Hydra*-Gene während der Ontogenese

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß fünfzehn *Hydra*-Gene, denen eine wichtige Funktion bei Musterbildungs- oder Achsendeterminationsprozessen beim *Hydra*-Polypen zugeschrieben werden, während der Individualentwicklung von *Hydra* exprimiert werden. In anderen Organismen erfüllen viele der untersuchten Gene ihre Funktion in Form ihres Genproduktes, eines Proteins. Zum jetzigen Zeitpunkt wissen wir noch nichts über das Vorhandensein und die Verteilung dieser Faktoren. Auch erleichtert der Befund, daß die einzigartigen Endocyten von *Hydra* zumindest die frühen Gene exprimieren, die Auswertung der molekularbiologischen Daten in Bezug auf mögliche Funktionen dieser Gene während der Embryogenese nicht. Die Betrachtung der Expressionsprofile zeigt jedoch auf, daß man die frühe Embryonalentwicklung nach dem Zeitpunkt, zu dem die Expression bestimmter Gene beginnt oder eine Aufregulation erfährt, im wesentlichen in drei Abschnitte gliedern kann.

### 6.2.1 Start der Genexpression vor der Aktivierung zygotischer Expression

Während der Ontogenese eines jeden Lebewesens gibt es einen Zeitpunkt, an dem die Expression zygotischer Gene initiiert wird. Dieser Zeitpunkt in der Individualentwicklung ist von Taxon zu Taxon unterschiedlich, sehr häufig wurde allerdings dieser Beginn während des Blastulastadiums festgestellt (mid-blastula-transition). Vor diesem Zeitpunkt werden nur maternale Transkripte verwendet. Der Start zygotischer Expression geht in der Regel mit der erhöhten Transkription von rRNA zur Ribosomensynthese einher. In dieser Studie konnte durch RT-PCR mit Primern gegen 28S-rRNA belegt werden, daß es auch im Blastula-Stadium von *Hydra* zu einer starken Steigerung der Expression ribosomaler RNA kommt. Daher kann angenommen werden, daß auch beim Süßwasserpolyphen erste embryonale Gene während des Coeloblastulastadiums exprimiert werden.

Ich konnte Transkripte von insgesamt sieben der untersuchten Gene bereits in Oocyten sowie jungen Stadien vor dem Blastula-Stadium nachweisen. Zu ihnen gehören viele Transkriptionsfaktoren (HyTcf,  $\beta$ -Cat, HyBra) darunter auch Homeoboxgene (HyAlx und CnOtx) sowie der Translationsinhibitor Cnno und der Rezeptor Frizzled. Die Entdeckung,

daß unter anderem die Endocyten diese Gene transkribieren ist sehr überraschend, ist ein Transport von Nukleinsäuren oder Genprodukten doch bisher noch nicht nachgewiesen worden. Setzt man voraus, daß die Produkte der frühen Gene ins Ooplasma transportiert werden, so könnten diese Gene verschiedene Aufgaben während dieses Bereichs der Embryogenese erfüllen.

### 6.2.1.1 CnOtx

Orthodenticle-Genen (*otd*, *otx*) werden Schlüsselrollen in verschiedenen wichtigen Entwicklungsprozessen zugeordnet. Bemerkenswert sind ihre Rollen in der Spezifizierung anterioren Gewebes während der frühen Embryogenese und der späteren Musterbildung des anterioren Endes des Nervensystems (FINKELSTEIN ET AL., 1990; ROYET ET AL., 1995). Die Expression von CnOtx während der frühen Embryogenese ist nur sehr gering, dies ist vergleichbar mit der ebenso geringen Expression im Ektoderm der Gastralregion und in den Tentakelbasen beim adulten Polypen. Das gesamte Gewebe in dieser Region ist dazu fähig unter bestimmten Umständen einen ektopischen Kopf zu bilden. Daraus ergibt sich die Vermutung, daß CnOtx eine Rolle dabei spielt, Gewebe die Kompetenz zu verleihen, Köpfe und damit sekundäre Achsen zu bilden (SMITH ET AL., 1999). Oocyten und *Hydra*-Embryonen sind offenbar schon früh polarisiert, da sich am apikalen Pol des Embryos auch immer der Kopf des Tieres entwickelt. Es wird daher vermutet, daß CnOtx daher schon früh eine Rolle in der Achsendetermination spielt (SMITH ET AL., 1999).

Beim Übergang zum Dauerstadium ist eine starke Aufregulation von CnOtx zu beobachten. Die ebenfalls starke Otx-Expression in großen Bereichen knospenbildenden Gewebes beim adulten Polypen sowie während der Entwicklung von Aggregaten läßt eine entscheidende Rolle von CnOtx in dieser Beweglichkeit der Zellen vermuten (SMITH ET AL., 1999). Bei *Hydra*-Polypen wurde nachgewiesen, daß die Knospung keineswegs nur auf Zellvermehrung beruht, sondern daß auch angrenzendes Zellmaterial des Erzeugerpolypen mit einbezogen wird und in die Knospungszone einwandert. Dies deckt sich mit der Entdeckung, daß bei Vertebraten Otx-exprimierende Zellen des prächordalen Mesoderms während ihrer Wanderung nach Anterior eine kriechende Bewegung ausführen (BONCINELLI & MALLAMACI, 1995; BALLY-GUIF & BONCINELLI, 1997). Vielleicht verleiht die stärkere CnOtx-Expression auch den Blastomeren eine erhöhte Beweglichkeit, ist doch bekannt, daß es während des

Dauerstadiums zur Differenzierung erster beweglicher I-Zellen kommt. Auch werden zum Ende des Dauerstadiums komplexe Vorgänge initiiert, die zur Neuarrangierung und Bildung von Ektoderm und Entoderm führt.

### 6.2.1.2 HyAlx

Aristaless (al, alx) ist bei *Drosophila* sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in die Musterbildung der Körperanhänge involviert. So spielt embryonal exprimiertes aristaless eine Rolle in der Ontogenie spezifischer Kopfsegmente und die Initiierung der Entwicklung von Extremitäten. Außerdem wird vermutet, daß aristaless neben wingless und decapentaplegic als Organisatoren für die proximodistale Achse der Extremitäten dient (CAMPBELL, 1993, 1998).

In adulten *Hydra*-Polypen ist die Funktion von HyAlx eng mit der Musterbildung der Tentakel verknüpft. Während die Zellen der Tentakelzone kontinuierlich proliferieren und typische ektodermale Epithelzellen darstellen, werden sie nach dem Übergang durch die Tentakelbildungszone permanent in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert und durchlaufen eine terminale Differenzierung zu tentakelspezifischen Batteriezellen (DÜBEL ET AL., 1987, CAMPBELL, 1967 A & B). Im sich entwickelnden Kopf scheint das Gen bei der Spezifizierung von Gewebestellen zur Formierung der Tentakel beteiligt zu sein. Außerdem wird ihm eine entscheidende Rolle in der Determinierung des Gewebes der Tentakelbildungszone zugeteilt. So soll HyAlx im Zusammenhang mit der kontinuierlichen Zellbewegung im Polypen entscheidend bei der Umwandlung von Gewebe der Tentakelbildungszone in Tentakelgewebe beteiligt sein (SMITH ET AL., 2000).

Das Expressionsmuster von HyAlx während der Embryogenese von *Hydra* weist eine kontinuierliche und zumindest im Untersuchungszeitraum bis im frühen Dauerstadium nicht variante HyAlx-Expression auf. Aus der whole-mount-in-situ-Hybridisierung geht zudem eine homogene HyAlx-Expression im ganzen Embryo hervor. In Anlehnung an die Erkenntnisse aus anderen Organismen und der Expression beim *Hydra*-Polypen ist eine entscheidende Funktion während der frühen Embryogenese daher fraglich. Die fehlende Aufregulation während des Übergangs zum Dauerstadium ist jedoch plausibel. Sollte HyAlx die primäre Funktion der Spezifizierung und Umwandlung von Gewebe in Tentakelgewebe

besitzen, so ist mit einer erhöhten Expression im Rahmen der Ontogenese erst kurz vor dem Schlüpfen der Polypen zu rechnen.

### **6.2.1.3 HyBra**

Brachyury-Homologe wurden in den letzten Jahren aus einer großen Vielzahl von Tieren verschiedener Taxa kloniert und sequenziert, und diesen Genen wird im Zusammenspiel mit Wnts, caudal und notch eine wichtige Rolle in einem Organisator für den posterioren Pol zugeschrieben (HOLLAND, 2002). Bisherige Daten (TECHNAU, 1999) zeigen eine erhöhte HyBra-Expression am animalen Pol des zweischichtigen ‚Bilayer-Stadiums‘ unmittelbar vor dem Schlüpfen des Embryos und später eine dem Expressionsmuster im adulten Tier entsprechende Expression in der Hypostomregion. Dies mag aufzeigen, daß HyBra zu verschiedenen Zeiten während der Individualentwicklung verschiedene Funktionen erfüllt. Während der frühen Embryogenese mag es im Rahmen eines konservierten allgemeinen molekularen Signalweges bei der Etablierung der anterior-posterioren Achse beteiligt sein, im Rahmen der Differenzierungs- und Musterbildungsprozesse im späten Embryo kann ihm jedoch ein Platz bei der Kopfbildung zukommen.

### **6.2.1.4 HyTcf, b-Catenin und Frizzled**

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist bei anderen Modellorganismen bisher sehr gut erforscht; eine Fülle von verschiedenen beteiligten Faktoren ist in den letzten Jahren auch im Hinblick auf die Verknüpfung ihrer Funktionen untereinander analysiert worden. Da mittlerweile auch Homologe verschiedener Mitglieder dieses regulatorischen Systems aus dem Süßwasserpolyphen *Hydra* kloniert wurden (HyTcf,  $\beta$ -Catenin, Frizzled und HyWnt), sollten im Rahmen dieser Studie auch deren Expression während der frühen Embryogenese untersucht und verglichen werden. Sezernierte Wnt-Proteine binden an Rezeptoren der Frizzled-Familie an der Zelloberfläche. Über einige cytoplasmatische Relaiskomponenten wird das Signal an  $\beta$ -Catenin weitergegeben, welches in den Kern transportiert wird, wo es einen Komplex mit Tcf bildet und so die Transkription der Wnt-Zielgene aktiviert. Zu diesen

Zielgenen gehören unter anderem Brachyury (YAMAGUCHI, 1999; ARNOLD, 2000), BMP4 (BAKER, 1999) wie auch verschiedene entwicklungsrelevante Gene von *Drosophila*, so zum Beispiel *wingless* (YU, 1998), *Dpp* (YANG, 2000) und *Engrailed* (HOOPER, 1994).

Betrachtet man die Expressionsprofile dieser Faktoren während der Embryogenese, so fällt die Koexpression aller von der Oocyte bis hin zum Dauerstadium auf. Die Expression ist dabei nur sehr geringen Veränderungen unterworfen. Dies könnte ein Hinweis auf die gemeinsame Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg sein. Diese Faktoren können also einen entscheidenden Beitrag in der Regulation von Entwicklungsprozessen während der Ontogenese von *Hydra* spielen. Aufgrund seiner davon abweichenden späten Expression im Dauerstadium wird die Funktion von Wnt erst in einem späteren Kapitel diskutiert.

Während der Kopfregeneration im adulten Polypen, bei der Knospung und während der Formierung neuer Köpfe bei der Entwicklung von *Hydra*-Aggregaten wird HyTcf stets nur in wenigen Zellen der apikalen Spitze, dort wo der Kopf entsteht, gebildet (HOBMAYER ET AL., 2000). Die homogene Expression von HyTcf in Embryonen während der frühen Embryogenese macht eine Funktion bei der Achsenbildung zu diesem Zeitpunkt eher unwahrscheinlich. Das leichte Abfallen des Expressionsgrades dieses Gens im Dauerstadium ist im Vergleich mit den anderen untersuchten Genen eher ungewöhnlich, vielleicht aber durch den Ruhezustand bedingt. Aufgrund der bisherigen Daten den Polypen betreffend, ist aber im Rahmen der Kopfbildung mit einer starken gezielten Expression zum Ende der Individualentwicklung zu rechnen.

Die Rolle  $\beta$ -Catenins ist durch in-situ-Hybridisierung nur schwer zu entschlüsseln, da dieser Faktor auch eine allgemeine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion in Geweben spielt. Während des frühen Dauerstadiums nehmen die Zellen, die die äußerste Zellschicht des Embryos bilden, die Morphologie von ektodermalen Epithelzellen des adulten Tieres an. In Bezug auf die Funktion  $\beta$ -Catenins bei der Zelladhäsion in Geweben kann das Ansteigen der Expression im Dauerstadium vermutlich durch die notwendige Bildung eines äußeren Epithels und der Formierung von Zell-Zell-Verbindungen bedingt sein.

Der Frizzled-Rezeptor schließlich wird im Polyp im gesamten Endoderm, das der Tentakel ausgenommen, exprimiert. Es wird vermutet, daß er eine Rolle in zellulären Signalwegen zwischen Ektoderm und Entoderm spielt. Sollte er Teil eines Differenzierungspfades sein, so könnte eine mögliche Funktion auch in der Aufrechterhaltung des Entoderms liegen (MINOBE ET AL., 2000). Die Expression des Frizzled-Rezeptors während der Embryogenese schließlich ist überaus interessant, wird Frizzled im adulten Polypen doch nur entodermal exprimiert.

Alle Zellen des Embryos gehen aber ausschließlich aus der interstitiellen Zelllinie hervor. Eine allgemeine Funktion im Wnt-Regulationssystem wird vermutet.

#### 6.2.1.5 Cnnos

Nanos wird bei *Drosophila* maternal für zwei Prozesse während der Oogenese benötigt: zum einen wird es im frühen Germarium exprimiert, wo es für die kontinuierliche Produktion der Eikammern benötigt wird. Zum anderen ist es in reifen Oocyten und sich entwickelnden Zygoten für die Festlegung des posterioren Pols erforderlich. Nanos mRNA befindet sich dabei im Polplasma, einem speziellen Cytoplasmabereich, der später in die Polzellen, die Vorläufer des Reproduktionssystems der Fliege, inkorporiert wird (WANG, 1991, 1994). Das Nanos-Protein fungiert als Translationsinhibitor, es bindet an die 3'UTR der mRNAs von *hunchback* und *bicoid*. Dadurch kann ein anteroposteriorer Gradient derer Genprodukte etabliert werden, der eine weitere differentielle Expression anderer Gene nach sich zieht (MURATA, 1995).

*Hydra*-Polypen besitzen multipotente, interstitielle Stammzellen, die sich zur Erhaltung ihrer Population selbst erneuern, und aus denen die Keimzelllinien wie auch drei Typen somatischer Zellen (Nematocyten, Neurone und Drüsenzellen) hervorgehen können (DAVID & GIERER, 1974; DAVID & MURPHY, 1977; BODE ET AL., 1987; BOSCH & DAVID, 1987). Zusätzlich zu diesen multipotenten Stammzellen besitzt *Hydra* allerdings auch Oocyten- oder Spermienbeschränkte Stammzellen, die Keimbahnstammzellen (LITTLEFIELD 1985, 1991; NISHIMIYA-FUJISAWA & SUGIYAMA 1993, 1995). Obwohl angenommen wird, daß diese Zellen ihren Ursprung in multipotenten Stammzellen haben, gibt es nach MOCHIZUKI (2000) dafür keinen direkten Beweis. In *Hydra*-Polypen wird Cnnos1, das in dieser Arbeit als Cnnos bezeichnet wird, in den multipotenten Stammzellen nur schwach, in sowohl männlichen als auch weiblichen Keimbahnstammzellen jedoch stark exprimiert. Somatische Zellen und auch die während der Nematocytendifferenzierung auftretenden Zellen hingegen weisen keine Cnnos-Expression auf (MOCHIZUKI ET AL., 2000). Vor dem Beginn dieser Studie war so schon bekannt, daß Oocyten eine hohe Konzentration an Nanos-Transkripten aufweisen, deren Verteilung über die ganze Eizelle homogen ist. Die neuen Daten zeigen nun, daß die Cnnos-Expression im Laufe der frühen Embryogenese bis zum spike-Stadium noch leicht ansteigt, um beim Übergang zum Dauerstadium abzunehmen. Die Funktion von Cnnos in *Hydra* ist



noch unbekannt. Die Expression von Cnnos in multipotenten Stammzellen und Keimbahnzellen und die Anhäufung dieser Transkripte in Eizellen und über die frühe Embryogenese deckt sich jedoch damit, daß nanos-Gene bei verschiedenen Aspekten der Keimbahnentwicklung erforderlich sind. Da bekannt war, daß die Cnnos-Expression bei der Differenzierung zu somatischen Zellen stoppt und in der Embryogenese beim Übergang ins Dauerstadium herabgeregelt wird, kann vermutet werden, daß Cnnos an der Repression der Translation von somatischen Genen beteiligt ist und somit die Charakteristika weitgehend undifferenzierter Zellen aufrechterhält.

### **6.2.2 Die potentielle Rolle erster zygotischer Transkripte**

Im Coeloblastulastadium kommt es zur ersten Expression zygotischer Gene. Diese Transkripte werden nun in den embryonalen Blastomeren synthetisiert und könnten wichtige Rollen bei Musterbildung im Embryo spielen. Die Expression von dreien der untersuchten Gene, Heady, CnGsc und CnNK-2, beginnt zu diesem Zeitpunkt. Interessant ist, daß allen drei zu diesem Zeitpunkt erstmals exprimierten Genen eine besondere Rolle in der Definition der Oral-Aboralen-Achse zugeschrieben wird.

#### **6.2.2.1 Heady**

Das Gen Heady wurde im Rahmen eines Differential-Display-Screenings entdeckt. Heady ist in adulten Polypen nur in einem geringen Maß exprimiert und tritt zunächst bei in-situ-Hybridisierungen nicht in Erscheinung. Dekapitierte Polypen jedoch weisen im Laufe der Regeneration des Kopfes eine Heady-Expression in wenigen Zellen der apikalen Spitze in einem charakteristischen Zeitfenster auf. Die transiente Expression beginnt etwa 4 Stunden nach Dekapitierung und erreicht ihr Maximum 2-4 Stunden später um anschließend wieder abzunehmen. Auch während der Reaggregation von Hydra-Zellen zeigt sich eine solche transiente Expression. Eine Heady-Expression über einen etwas längeren Zeitraum ist am distalen Ende einer Knospe nachzuweisen. Die Analyse der Regenerationsfähigkeit von Polypen, bei denen die Heady-Expression durch RNAi stark herabgesetzt worden war, zeigte

eine zentrale Rolle in der Kopfregeneration auf. Zwar ist das natürliche Genprodukt noch unbekannt, ein aus den Sequenzdaten ermitteltes Leseraster führte aber zu einem amidierten Peptid als Genprodukt. Synthetisch hergestelltes Peptid ermöglichte nun verschiedene Untersuchungen. Die so gewonnenen Daten führten zu dem Schluß, daß das Peptid eine entscheidende Rolle bei der Achsendetermination besitzt. So vermag mit Peptid behandeltes Gewebe eines Polypen, das in einen anderen transplantiert wurde, eine stabile sekundäre Achse unter Einbezug des Zielgewebes zu etablieren und *Hydra*-Mutanten, die einen Defekt in der Kopfregeneration aufweisen, zu retten. Immunohistochemische Untersuchungen mit polyklonalem Antikörper gegen das Peptid machten seine Verteilung in entodermalen Zellen der Kopfregion und in der Spitze von Knospen sichtbar. Bisher ist bei anderen Organismen kein Gen mit einer ähnlichen Sequenz vorhanden (LOHMANN & BOSCH, 2000).

Während der Embryogenese von *Hydra* wird *Heady* als erstes Gen nach dem Übergang in der *Coeloblastula* exprimiert. Die Expression bleibt in der *Postgastrula* konstant, bis *Heady* beim Übergang zum Dauerstadium eine Aufregulation erfährt. Da der Polyp geringste *Heady*-Expression aufweist, wissen wir jedoch, daß die starke Expression zu Beginn des Dauerstadiums später wieder herabreguliert wird. Während der Embryogenese zeigt sich somit die gleiche transiente Expression des Genes. Wie zuvor erwähnt und gezeigt wurde, scheint bereits die Oocyte eine Polarisierung entlang der animal-vegetativen Achse aufzuweisen. Inwieweit zu diesem Zeitpunkt jedoch die Achse fest determiniert ist, ist unsicher. Wie auch während der Regeneration des Kopfes bei dekapitierten Polypen wird *Heady* noch vor anderen kopfspezifischen Genen exprimiert. Eine organisatorische Funktion im Rahmen der axialen Musterbildung ist daher wahrscheinlich.

#### **6.2.2.2 CnGsc**

Das *Drosophila*-Goosecoid (*gsc*) wird während der Embryogenese in zwei Domänen exprimiert. Die während der frühen Zellformierung auftretende Expressionsdomäne anterior der Kopffalte bringt Zellen hervor, die später in den Hirnhemisphären zu finden sind. Die zweite Domäne invaginiert zusammen mit dem Stomodäum und ist bei der Bildung des stomatogastrischen Nervensystems, der Ringdrüsen und des Vorderdarm beteiligt (GORIELY ET AL., 1996; HAHN & JACKLE, 1996).

Die Funktion Goosecoids in Wirbeltieren ist eine etwas andere: Goosecoid wird hier im Organisator exprimiert, einem Bereich der mit dem dorsalen Bereich des Blastoporus assoziiert ist (BLUMBERG ET AL., 1992; CHO ET AL., 1991; BLUM ET AL., 1992; IZPISUA-BELMONTE ET AL., 1993; STACHEL ET AL., 1993). Dieser Organisator rekrutiert Zellen zur Einwanderung durch den Blastoporus und ist für die Determinierung dieser Zellen als dorsales Mesoderm verantwortlich. Goosecoid-exprimierende Zellen induzieren die Wanderung ihrer Nachbarzellen nach anterior. Diese migrierenden Zellen tragen zur Bildung des größten Teils der anterioren inneren Gewebe, im wesentlichen anteriores Entoderm und anteriores Mesoderm, bei. Goosecoid scheint dabei die Funktionen des Organisators ‚nachzuahmen‘ (NIEHRS, 1993).

Im adulten Hydra-Polypen wird CnGsc an drei verschiedenen Orten exprimiert: zum einen von Neuronen im Ektoderm der äußersten Spitze des Hypostoms, zum anderen in einem Ring von entodermalen Epithelzellen an der Grenze zwischen Hypostom und Tentakelzone und schließlich in epithelialen Zellen des Entoderms der Gastralregion in der Mitte der Tieres mit schwächeren Expressionsgraden in der Nähe von Kopf und Fuß (BROUN ET AL., 1999). Die gleichen Expressionsdomänen können auch während des Knospens beobachtet werden. Hier formiert sich zunächst die zweite, im Kopf liegende Domäne, schließlich geht mit der Formierung des Nervennetzes auch die Expression in distalen Spitze einher, und schließlich wird die Expression in der Körpersäule sichtbar. Verschiedene Untersuchungen zur möglichen Funktion von Goosecoid ergaben, daß die distalen Bereiche der Goosecoid-Expression Regionen mit einer hohen Kapazität für die Induktion sekundärer Achsen markieren. Das Hypostom und der apikale Bereich einer Knospe erfüllen bei Hydra die Funktion eines Organisators. Die Goosecoid-Expression zweier Domänen liegt bei Hydra im Bereich dieses Organisators. Eine direkte Beteiligung dieses Genes an der Organisatorfunktion und somit eine zentrale Rolle bei der Kopfbildung wird vermutet. Im Kontext mit der Funktion in Vertebraten könnte die Expression in der Körpersäule ein Hinweis auf eine zweite Funktion bei der geregelten Bewegung der Zellen in einer Gewebeschicht sein (NIEHRS ET AL., 1993).

Während der Embryogenese von Hydra wird eine erste Expression von HyGsc während des postgastrulären Spike-Stadiums sichtbar. Es ist zu vermuten, daß die Expression jedoch schon vor der Bildung der Embryothek beginnt und damit nicht direkt in Verbindung steht. Die vermutete Funktion in einem Kopforganisator deckt sich mit der frühen Expression nach Beginn der Hedy-Expression und könnte einen Hinweis auf die erste Aktivität von kopfregulatorischen Elementen im Rahmen einer Achsendetermination sein.

### 6.2.2.3 CnNK-2

Vnd (ventral nervous system defective)/Nkx2 ist sowohl bei Insekten als auch Vertebraten das erste neurale Gen, das exprimiert wird. Während der frühen neuronalen Entwicklung bildet es ein erstes Muster, noch bevor die Proneuralen Gene aktiviert werden. Bei *Drosophila* wird es für die Formierung einer Untergruppe von segmentalen Neuroblasten benötigt. Die Expression von vnd liegt upstream des proneuralen achaete-scute complexes. Es ist für die Induktion von achaete und scute in einigen proneuralen Neuroblastenclustern verantwortlich. Desweiteren reguliert es Gene des Enhancer of split-Komplexes (KRAMATSCHEK, 1994). In Vertebraten reguliert Nkx-2 die Expression des Vertebraten-achaete-scute-Homologs (ash) im sich entwickelnden Nervensystem. Vnd ist offensichtlich für die Festlegung der Identität des ventralen Neuroektoderms und der Neuroblastenidentität erforderlich. Es führt zur Bildung spezifischer Neuroblasten im ventralen Ast des sich entwickelnden Nervensystems (MCDONALD, 1998).

Im *Hydra*-Polypen wird CnNK-2 in entodermalen Epithelzellen im Fußstiel, dem unteren Teil der Körpersäule, konstitutiv exprimiert. Dieses Muster kann jedoch in Abhängigkeit von der *Hydra*-Spezies auch in Form eines Gradienten mit einem Expressionmaximum im Fuß vorkommen. Die Expression von CnNK-2 läuft sowohl während der asexuellen Vermehrung durch Knospung, während der Fußregeneration sowie bei der Bildung ektopischer Füße der eigentlichen Fußbildung im Rahmen der Gewebedynamik stets voraus. Experimente, bei denen der Positionswertgradient der Körpersäule künstlich verändert wurde, weisen auf eine Verbindung zwischen diesem Gradienten und CnNK-2 hin. Diese Daten geben Hinweise darauf, daß das Genprodukt von CnNK-2 ein integraler Faktor bei der Fußbildung ist (GRENS ET AL., 1996). Neuere Untersuchungen der Promotorstrukturen von fußspezifischen Genen konnten zeigen, daß sich CnNK-2 selbst zu regulieren vermag und entsprechende NK-2-Bindestellen auch im Promotor von Pedibin, einem fußspezifischen Peptid, zu finden sind (THOMSEN & BOSCH, bislang unveröffentlicht). CnNK-2 ist daher nicht nur Teil des Prozesses, der Gewebe zur Bildung eines Fußes veranlasst, die autoregulatorische Schleife führt auch zu einer Aufrechterhaltung dieses Musters (GRENS ET AL., 1996).

Die Expression von CnNK-2 während der Embryogenese von *Hydra* beginnt, vergleichbar mit dem Expressionsprofil von CnGsc, in der Postgastrula. Auch hier wird eine Beteiligung des Gens an der Embryothekbildung nicht vermutet, zumal eine starke Expression erst nach Vollendung der Theca nachzuweisen ist. Nachdem nach Aktivierung der zygotischen Gene früh auch *Heady* und *Goosecoid* Gene exprimiert werden, bei denen eine Beteiligung bei der

Achsendetermination angenommen wird, komplettiert die Expression von CnNK-2 dieses Bild. Eine Achse wird immer durch zwei einander gegenüberliegende Pole definiert. Die entscheidende Rolle, die dem Nkx-2-Homolog zugewiesen wird, die Organisation und Aufrechterhaltung des Fußes, deckt sich mit der Beobachtung, daß seine Expression auch während der Embryogenese der eigentlichen Fußbildung weit vorausgeht. Zwar liegen zu diesem Zeitpunkt die Bildung von Kopf und Fuß noch in weiter Ferne, es läßt aber vermuten, daß CnNK-2 zusammen mit den zuvor diskutierten Genen im Rahmen der Embryogenese eine besondere Rolle bei der Determination der oral-aboralen-Achse zukommt.

### **6.2.3 Der Übergang zum Dauerstadium**

Bei Betrachtung der ermittelten Expressionsprofile fällt auf, daß die meisten der untersuchten Gene eine starke Aufregulation nach erfolgter Formierung der Embryothek und vollendetem Übergang in das Dauerstadium erfahren.

#### **6.2.3.1 HyWnt**

Wnt-Proteine (Wg/Wnt) bilden eine Familie hoch konservierter sezernierter Signalmoleküle, die Zell-Zell-Interaktionen während der Embryogenese regulieren. Wie Wnt dabei mit anderen Faktoren seiner Signalkaskade zusammenspielt, wurde zuvor in Kapitel 6.2.1.4 beschrieben. Wnt-Gene und Wnt-Signaltransduktion sind außerdem an der Entstehung von Krebs beteiligt. Das heutige Wissen um die Mechanismen dieses komplexen regulatorischen Systems entspringt der Forschung an verschiedenen Modellorganismen unterschiedlicher Taxa: die Genetik aus *Drosophila* und *C. elegans*, Biochemie in Zellkultur und bei ektopischer Genexpression in *Xenopus*-Embryonen. Gezielte Mutationen verschiedener Wnt-Gene der Maus führen zu sehr spezifischen Defekten in der Entwicklung. Allein bei Vertebraten sind bislang 23 verschiedene Wnt-Moleküle bekannt, die unterschiedliche Funktionen während der Individualentwicklung besitzen. Diese Funktionen umspannen die verschiedensten Bereiche der Entwicklung von Achsenbildung und Funktion während der

Gastrulation, über Steuerung während der Hirnbildung, bis hin zu Funktionen während der Ausbildung der Exkretionssysteme. Funktionen die ein bestimmtes Wnt in einem Modellorganismus hat, können dabei in einem anderen Organismus völlig unterschiedlich sein (The Wnt gene homepage, WWW).

Kürzlich wurden einige Faktoren des Wnt-Signaltransduktionsweges auch aus *Hydra* kloniert und sequenziert. Das *Hydra*-Homolog HyWnt weist während der Kopfregeneration, der Knospung von Tochterpolypen wie auch der Bildung neuer Polypen aus Aggregaten eine frühe Expression in der apikalen Spitze der sich entwickelnden Köpfe auf. Die Expression liegt in dem Bereich, in dem der Kopfororganisator vermutet wird. Diese Entdeckung wie auch die Beobachtung, daß HyWnt-Protein, in *Xenopus*-Embryonen gespritzt, die Bildung einer sekundären Achse zu induzieren vermag, führte zu der Annahme, das isolierte Wnt-Homolog spiele zusammen mit dem ebenfalls isolierten HyTcf und  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle bei der Achsenbildung (HOBMAYER ET AL., 2000). Auffallend ist jedoch, daß, obwohl bei den meisten Modellorganismen die verschiedenen Wnts völlig unterschiedliche Funktionen erfüllen, fast alle aus *Xenopus* isolierten Wnts während der Embryogenese von *Xenopus* ektopische Köpfe induzieren können (MCMAHON, 1989; SOKOL S, 1991; LANDESMAN, 1997; WOLDA, 1993; CHRISTIAN, 1991, 1992, 1993; SMITH, 1991; CUI, 1995; KU, 1993). Der Schluß, der aus dem Ergebnis des entsprechenden Experimentes mit HyWnt-Protein gezogen wurde, ist daher eher fragwürdig.

Während der Achsenbildung de-novo während der Embryogenese wird HyWnt während der gesamten frühen Embryogenese im Gegensatz zu HyTcf,  $\beta$ -Catenin und seinem Rezeptor Frizzled nicht exprimiert. Auch nach der Aktivierung zygotischer Gene findet keine HyWnt-Expression statt. Erst 48 Stunden später ist eine Aufregulation der HyWnt-Expression im Dauerstadium nachweisbar. Daraus folgt, daß HyWnt keine Rolle während der frühen Embryogenese spielt. Folgt man der zuvor angestellten Vermutung, daß die Achse direkt nach der Aktivierung zygotischer Gene determiniert wird, ist HyWnt an diesem Vorgang nicht beteiligt. Da sowohl der Wnt-Rezeptor, wie HyTcf und  $\beta$ -Catenin schon früh exprimiert werden, ist HyWnt mit großer Wahrscheinlichkeit eines von mehreren *Hydra*-Wnts, aber eben nicht jenes, welches eine Rolle während der frühen Embryogenese spielt. Aufgrund der vielfältigen Funktionen, die die Mitglieder dieser Familie bei anderen Organismen erfüllen, ergeben seine Funktion während der Embryogenese von *Hydra* somit vielfältige Möglichkeiten.

### 6.2.3.2 Cnox-2

Homeobox-Gene der HOM/HOX-Klasse sind offenbar in die anterior-posteriore Musterbildung aller Organismen, in denen sie erforscht wurden, involviert. Sie teilen eine hoch konservierte Region, die Homeodomäne, welche in der Lage ist, DNA in einer sequenzspezifischen Weise zu binden, um die Transkription anderer Gene zu regulieren (SCOTT ET AL., 1989; MCGINNIS & KRUMLAUF, 1992). HOM/HOX-Genkomplexe sind über mehrere hundert Millionen Jahre konserviert worden (AKAM, 1989; KESSEL & GRUSS, 1990; BURGLIN ET AL., 1991; KENYON & WANG, 1991), und die Entstehung dieses Genkomplexes reicht vermutlich weit in die Ursprungsgeschichte der Metazoa zurück.

Cnox-2 ist eines von drei aus *Hydra* isolierten HOM/HOX Homeoboxgenen. Es ist den anterioren Vertretern des Antennapedia-Gen-Komplexes von *Drosophila* am ähnlichsten. Im *Hydra*-Polypen wird Cnox-2 in den Epithelzellen exprimiert. Die Expression ist dabei im Kopf gering, in der Körpersäule und dem Fuß hingegen hoch. Diese Expression deckt sich mit einer möglichen Funktion in der axialen Musterbildung. Die differentielle Expression von Cnox-2 über die Körpersäule des Polypen hat potentiell eine differentielle Expression anderer, durch Cnox-2 gesteuerter Gene zur Folge. Im Kontext mit den Expressionsmustern von HOM/HOX-Genen in Nematoden und Chordaten zeigen die bekannten Daten auf, daß die ursprüngliche Funktion dieser Gene vielleicht in der Spezifizierung größerer Bereiche während der Embryogenese lag (SHENK ET AL., 1993).

Cnox-2-Expression ist im Untersuchungszeitraum während der frühen Embryogenese nur im frühen Dauerstadium, etwa 48 Stunden nach Formierung der Embryothek, nachzuweisen. Die mögliche Funktion liegt in der Determination größerer Bereiche während der Embryogenese. Ein publiziertes Modell der Regulation der Cnox-2-Expression durch zwei Gradienten, ein positives regulatorisches Signal dessen Ursprung im Fuß liegt und ein negativ regulatorisches Signal aus dem Kopf, paßt zu der vermuteten ersten Achsendetermination ab dem Gastrulastadium (SHENK ET AL., 1993). Signale des künftigen oralen und aboralen Pols, bei deren Erzeugung vielleicht die mittleren Gene beteiligt sind, könnten die kurze Zeit später einsetzende Cnox-2-Expression regulieren. Auf diese Weise könnte eine erste Musterbildung bereits früh im Dauerstadium einsetzen.

### 6.2.3.3 Budhead

Gene der fork head/HNF-3-Klasse spielen wichtige Rollen während der Embryogenese. Fork head, der Drosophila-Vertreter dieser Gruppe, ist ein homeotisches Gen, das für die Entwicklung der beiden terminalen Regionen, insbesondere für die Entwicklung von Vorder- und Hinterdarm erforderlich ist (WEIGEL ET AL., 1989). HNF-3b (*Mus*), XFKH1/pintallavis (*Xenopus*) und axial (*Danio*), andere Vertreter dieser Klasse, werden in Organisatorregionen direkt vor und während der Gastrulation exprimiert. Daher werden ihnen entscheidende Funktionen bei der Achsenbildung zugeschrieben (DIRKSEN & JAMRICH, 1992; RUIZ I ALTABA & JESSELL, 1992; MONAGHAN ET AL., 1993; STRÄHLE ET AL., 1993). Jedes dieser Gene spielt außerdem eine Rolle bei der Entwicklung des dorsalen Mesoderms und ist an der Musterbildung des Neuralrohres beteiligt (KNÖCHEL ET AL., 1992; RUIZ I ALTABA & JESSEL, 1992; RUIZ I ALTABA ET AL., 1993; ANG & ROSSANT, 1994; STRÄHLE ET AL., 1993; SASAKI & HOGAN, 1994; WEINSTEIN ET AL., 1994).

Im adulten Polypen wird budhead ringförmig in entodermalen Epithelzellen im unteren Bereich des Hypostoms direkt oberhalb der Tentakelzone sowie in geringem Maß im oberen Teil der Körpersäule exprimiert. Der Vergleich der Expressionsmuster von Budhead mit denen der Vertebratengene fördert einige Übereinstimmung zu Tage. Zu Beginn der Knospung und während der Induktion ektopischer Köpfe wird budhead im unteren Hypostom, einer Region mit Organisator-Kapazitäten, exprimiert. In Maus, Huhn, Zebrafisch und *Xenopus* werden die entsprechenden HNF-3b-Orthologen kurz vor Beginn der Gastrulation in der Organisatorregion exprimiert. Weiter gibt es Hinweise darauf, daß diese Gene eine Rolle bei der Achsenbildung besitzen. Entwickelt sich nun während späterer Knospungsstadien und bei der Regeneration der Kopf, wird budhead ausschließlich im entwickelnden Hypostom exprimiert, dem anterioren oder rostralen Teil des Kopfes. Ist die Gastrulation bei Vertebratenembryonen erst einmal im Gange, beschränkt sich die HNF-3b-Expression auf das axiale Mesoderm, das im weiteren Verlauf die Chorda wie auch Gewebe, die bei der Bildung des rostralen Kopfendes beteiligt sind, bildet (BALLY-CUIF & BONCINELLI, 1997). Trotz der großen Unterschiede zwischen Vertebratenentwicklung und Kopfbildung bei *Hydra* ist ein gemeinsamer Ursprung der molekularen Maschinerie für den Kopforganisator und damit der Kopfbildung nicht unwahrscheinlich (MARTINEZ ET AL., 1997).

Die Expression von Budhead während der Embryogenese von *Hydra* ist, wie bei allen Genen, die in diesem Kapitel diskutiert werden, auf eine Aufregulation im frühen Dauerstadium beschränkt. Eine integrale Funktion im Kopforganisator ist zu diesem Zeitpunkt eher



unwahrscheinlich, da die Bildung des Kopfes und die vorliegenden Daten zeigen, daß die Expression von *budhead* im Polypen auf Kopfgewebe beschränkt ist (MARTINEZ ET AL., 1997). Es fällt allerdings auf, daß *budhead* vergleichbar mit der Abfolge während der Kopfregeration auch im Embryo erst nach *Heady* exprimiert wird. Vielleicht ist dies ein Indiz für eine gemeinsame Funktion mit anderen kopfspezifischen Genen in der frühen Musterbildung. So wie aber auch die Funktion der schwachen Expression in der Körpersäule noch keine Erklärung gefunden hat, ist es immer auch möglich, daß ein Gen, dessen Funktion im Polypen bekannt ist, eine zusätzliche oder völlig andere Funktion während der Individualentwicklung erfüllt.

#### **6.2.3.4 Hyp1 und Hym301**

Wie auch das *Heady*-Peptide sind für die beiden letzten der untersuchten Gene keine homologen Gene bekannt.

Das Polypeptid *Hyp1* ging aus dem Screening einer *Hydra vulgaris*-library mit einer Sonde gegen Neurotransmitterrezeptor von Säugern hervor. Es ist im adulten *Hydra*-Polypen ausschließlich in entodermalen Epithelzellen der Hypostomregion exprimiert. Über die Expression während der Knospung liegen keine Erkenntnisse vor, während der Kopfregeration jedoch beginnt die *Hyp1*-Expression im Entoderm der apikalen Spitze etwa 6 Stunden nach Dekapitation. *Hyp1* gilt als exzellenter Hypostommarker für die Erforschung kopfregenerativer Prozesse.

Das Epitheliopeptid *Hym-301* wurde im Rahmen des *Hydra* Peptid Projektes, einem Projekt, das es sich zum Ziel gesetzt hat, Peptide aus *Hydra*-Gewebe zu isolieren, zu sequenzieren und zu charakterisieren, aus *Hydra magnipapillata* isoliert. Das Peptid mit der Aminosäuresequenz KPPRRCYLNGYCSP-NH<sub>2</sub> wird in ektodermalen Epithelzellen im Kopf der Polypen exprimiert und spielt offenbar eine Rolle in der Kopf- und Tentakelbildung. Genaue Funktionen der beiden Peptide sind aufgrund noch ausstehender funktioneller Analysen nicht bekannt. Eine Rolle aus Morphogene bedingt einen Einfluß der Peptide auf den Positionswertgradienten des Gewebes. Auch diese Analyse steht noch aus.

Während der frühen Embryogenese werden auch diese beiden Peptide noch nicht exprimiert. Sie spielen daher keine Rolle in den frühen Achsen- oder Musterbildungsprozessen. Auch die Expression im frühen Dauerstadium ist noch außerordentlich schwach, sie konnte im

Experiment nur durch starke Amplifikation in Verbindung mit langer Exposition bei der Aufnahme sichtbar gemacht werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß die Signalpeptide epithelialen Ursprungs sind und nur von bestimmten Epithelzellen exprimiert werden. Erst während des Dauerstadiums erhalten die ersten Blastomeren erste Eigenschaften von Epithelzellen, zuvor sind im Embryo ausschließlich undifferenzierte Blastomere vorhanden. Ein Kopf mit Hypostom und Tentakelzone wird allerdings erst viel später nach erfolgter Formierung von Ento- und Ektoderm gebildet. Die schwache Expression kann daher eine konstitutive Hintergrundexpression darstellen. Eine abweichende Regulation und Funktion während der Embryogenese ist durchaus zu vermuten.

Abschließend faßt Abbildung 6-1 auf der folgenden Seite das zeitliche Auftreten der untersuchten Gene während der frühen Embryogenese noch einmal zusammen. Die Transkription zygotischer Gene beginnt im Blastula-Stadium. Alle zuvor nachgewiesenen Transkripte sind somit maternal. Die mittleren Gene *Heady*, *CnGsc* und *CnNK-2* erfüllen beim adulten Hydra-Polypen Schlüsselrollen der Achsendetermination, sie sind auch die ersten der zygotisch exprimierten Gene. Dies legt die Vermutung nahe, daß während dieses Zeitraums zwischen Blastula- und Dauerstadium die spätere Körperachse des Tieres festgelegt wird. Zuvor exprimierte Gene gehören zu einem Signaltransduktionsweg, der vielfältige Funktionen während der Ontogenese verschiedener Modellorganismen erfüllt (*Frizzled*, *HyTcf*,  $\beta$ -Catenin), erhalten vermutlich die Charakterzüge undifferenzierter Zellen aufrecht (*CnNos*) oder sind an der frühen Achsenbildung beteiligt (*HyBra*). Es ist denkbar, daß einige der untersuchten Gene hier allgemeine Rollen bei der Zellproliferation und ersten Polarisierung des Embryos erfüllen. Viele Gene werden erst spät, nach Übergang zum Dauerstadium, exprimiert. Ihnen werden Funktionen während Musterbildungsprozessen (*Cnox-2*, *Budhead*, *Hyp1*) und Zelldifferenzierung (*Hym301*) zugeschrieben. Auch während des Dauerstadiums von *Hydra* könnten sie ähnliche Funktionen erfüllen.

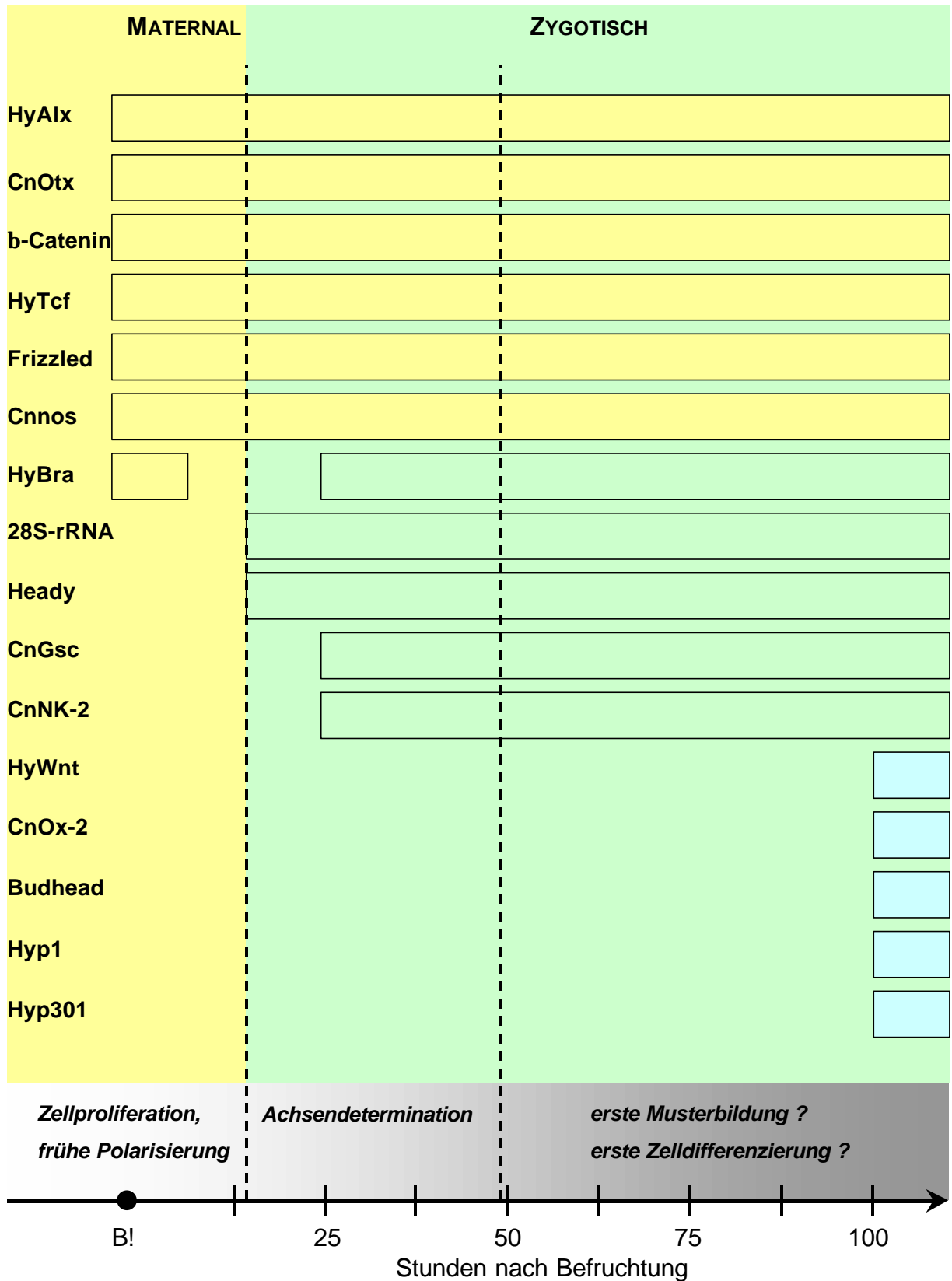


Abb. 6-1: Schematische Zusammenfassung der zeitlichen Expression der untersuchten

Gene.

## 7 Zusammenfassung

Der Süßwasserpolytyp *Hydra* weist innerhalb der Hydrozoa den am stärksten abgeleiteten Entwicklungszyklus auf. Dabei ist das Planulastadium völlig reduziert und ein großer Teil der ontogenetischen Entwicklung findet in einem von einer derben Hülle umgebenen Dauerstadium statt. Ein weiteres spezielles Charakteristikum ist die Bildung der Oocyte durch Phagocytose von etwa 5000 Zellen, die im Embryo persistieren und in geringerer Anzahl auch noch im schlüpfenden Tier nachzuweisen sind. Trotz verschiedener Ansätze in den letzten Dekaden ist jedoch bislang nur wenig über die Natur dieser Endocyten bekannt. Auch waren molekularbiologische Kenntnisse bislang auf die Expression des Brachyury-Homologs HyBra während des Dauerstadiums beschränkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von fünfzehn Genen unterschiedlicher Funktionsgruppen im Laufe der frühen Embryogenese mittels RT-PCR analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß Transkripte von sieben dieser Gene bereits in der Oocyte und während der frühen Embryogenese nachzuweisen sind. Nuclear-run-on-Experimente mit isolierten Nuclei frühester Stadien zeigten eine de-novo Transkription dieser Gene auf. Der Ursprung dieser frühen Expression wurde durch in-vivo-Markierung mit Fluoro-Uridin bestimmt. Überraschenderweise beweisen die vorliegenden Daten, daß die Endocyten von *Hydra* nicht, wie zuvor angenommen, grundsätzlich apoptotisch sind. Diese Zellen weisen nicht nur eine generell hohe transkriptionelle Aktivität auf, es konnte auch gezeigt werden, daß die Endocyten während der frühen Embryogenese von *Hydra* an der Transkription von verschiedenen Genen beteiligt sind, denen wichtige Funktionen bei der Achsenbildung und Aufrechterhaltung von Mustern während der Regeneration und Knospung bei adulten Polypen zukommen. Die möglichen Funktionen, die diese Gene während der Embryogenese von *Hydra* besitzen könnten, werden im Kontext ihrer bei anderen Organismen untersuchten Homologe diskutiert. Aufgrund der zu bisherigen Arbeiten differierenden Ergebnisse wurde die Morphologie der Endocyten und deren strukturelle Integrität untersucht. Funktionstüchtige Nucleoli und homogen respiratorisch aktive Mitochondrien sowie große Anteile rauhen ER's weisen auf eine erhöhte metabolische Aktivität der Endocyten hin. Konfokale und feinstrukturelle Untersuchungen zeigen auf, daß nur ein geringer Anteil der Endocyten jeweils den programmierten Zelltod mit allen bekannten morphologischen Veränderungen durchläuft, während der Großteil dieser Zellen synthetisch aktiv bleibt.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aizenshtadt, T.B. & Marshak, T.L. (1974) [Oogenesis in hydra. II. Cytophotometric determination of DNA concentration in the nuclei of somatic and sex cells]. *Ontogenez*, **5**, 446-53.
- Aizenshtadt, T.B. (1975) Investigation of oogenesis in hydra. Communication I. Ultrastructure of interstitial cells at early stages of their transformation into oocytes. *Sov J Dev Biol*, **5**, 9-18.
- Aizenshtadt, T.B. (1978) [Oogenesis in Hydra. III. The growth and fusion of the oocytes]. *Ontogenez*, **9**, 115-23.
- Akam, M. (1989) Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell*, **57**, 347-9.
- al-Mukhtar, K.A. & Webb, A.C. (1971) An ultrastructural study of primordial germ cells, oogonia and early oocytes in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, **26**, 195-217.
- Ang, S.L. & Rossant, J. (1994) HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell*, **78**, 561-74.
- Arnold, S.J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B.G., & Kemler, R. (2000) Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mech Dev*, **91**, 249-58.
- Baker, J.C., Beddington, R.S., & Harland, R.M. (1999) Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev*, **13**, 3149-59.
- Bally-Cuif, L. & Boncinelli, E. (1997) Transcription factors and head formation in vertebrates. *Bioessays*, **19**, 127-35.
- Beigel, U. (1976) Gonophorenentwicklung der Hydriodae Myriothela. *Cah. Biol. mar.*, **17**, 119-129.
- Benoit, P. (1925) L'ovogénèse et les premiers stades du développement chez la Myriothele et chez la Tubulaire. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **64**, 85-326.

- Berking,S. (1977) Bud formation in hydra: Inhibition by an endogenous morphogen. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, **186**, 189-210.
- Blum,M., Gaunt,S.J., Cho,K.W., Steinbeisser,H., Blumberg,B., Bittner,D., & De Robertis,E.M. (1992) Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecooid. *Cell*, **69**, 1097-106.
- Blumberg,B., Wright,C.V., De Robertis,E.M., & Cho,K.W. (1991) Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos. *Science*, **253**, 194-6.
- Bode,H.R., Heimfeld,S., Chow,M.A., & Huang,L.W. (1987) Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in *Hydra attenuata*. *Dev Biol*, **122**, 577-85.
- Bodenmuller,H. & Roberge,M. (1985) The head activator: discovery, characterisation, immunoassays and biological properties in mammals. *Biochim Biophys Acta*, **825**, 261-7.
- Boelsterli,U. (1975) Notes on oogenesis in *Tubularia crocea* Agassiz (Atheicata, Hydrozoa), *Pubbl. Staz. Zool. Napoli.*, **39**, 53-66.
- Boisvert,F.M., Hendzel,M.J., & Bazett-Jones,D.P. (2000) Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol*, **148**, 283-92.
- Boncinelli,E. & Mallamaci,A. (1995) Homeobox genes in vertebrate gastrulation. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 619-27.
- Bosch,T.C.G. and David,C.N. (1987) Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Dev. Biol.*, **121**, 182-191.
- Brauer,A. (1891) Über die Entwicklung von *Hydra*. *Zeitschr. Wiss. Zool.*, **52**, 169-215.
- Broun,M., Sokol,S., & Bode,H.R. (1999) Cngsc, a homologue of goosecooid, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra*. *Development*, **126**, 5245-54.
- Burglin,T.R., Ruvkun,G., Coulson,A., Hawkins,N.C., McGhee,J.D., Schaller,D., Wittmann,C., Muller,F., & Waterston,R.H. (1991) Nematode homeobox cluster. *Nature*, **351**, 703.
- Burnett,A.L. (1959) Histophysiology of growth in hydra. *J. Exp. Zool.*, **140**, 281-341.

- Campbell,G. & Tomlinson,A. (1998) The roles of the homeobox genes *aristaless* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development*, **125**, 4483-93.
- Campbell,G., Weaver,T., & Tomlinson,A. (1993) Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of *wingless*, *decapentaplegic*, and the homeobox gene *aristaless*. *Cell*, **74**, 1113-23.
- Campbell,R.D. (1967) Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. I. Patterns of cell division. *Dev. Biol.*, **15**, 487-502.
- Campbell,R.D. (1967) Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J. Morphol.*, **121**, 19-28.
- Chapron,C. and Relexans,J.C. (1971) Ultrastructure des gonocytes primordiaux et des gonies chez l'hermaphrodite *Eisenia foetida* (Oligochete lombricide). *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **272 D**, No. 23, 2916-2919 .
- Cho,K.W., Blumberg,B., Steinbeisser,H., & De Robertis,E.M. (1991) Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *goosecoid*. *Cell*, **67**, 1111-20.
- Christian,J.L. & Moon,R.T. (1993) Interactions between *Xwnt-8* and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev*, **7**, 13-28.
- Christian,J.L., McMahan,J.A., McMahan,A.P., & Moon,R.T. (1991) *Xwnt-8*, a *Xenopus* *Wnt-1/int-1*-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development*, **111**, 1045-55.
- Christian,J.L., Olson,D.J., & Moon,R.T. (1992) *Xwnt-8* modifies the character of mesoderm induced by bFGF in isolated *Xenopus* ectoderm. *Embo J*, **11**, 33-41.
- Cikala,M., Wilm,B., Hobmayer,E., Bottger,A., & David,C.N. (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr Biol*, **9**, 959-62.
- Cowden,R.R. (1964). A cytochemical study of gonophore and oocyte development in *Pennaria tiarella*. *Acta. Embryol. Morphol. Exper.*, **7**, 167-169.
- Cui,Y., Brown,J.D., Moon,R.T., & Christian,J.L. (1995) *Xwnt-8b*: a maternally expressed *Xenopus* *Wnt* gene with a potential role in establishing the dorsoventral axis. *Development*, **121**, 2177-86.

- David,C.N. & Gierer,A. (1974) Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *J Cell Sci*, **16**, 359-75.
- David,C.N. & Murphy,S. (1977) Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev Biol*, **58**, 372-83.
- David,C.N. & Murphy,S. (1977) Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev Biol*, **58**, 372-83.
- David,C.N., Bosch,T.C.G., Hobmeyer,B., Holstein,T. and Schmidt,T. (1987) The interstitial stem cells in hydra. In *Genetic regulation of development* (Loomis, W.F., ed.), Alan R. Liss Inc., New York, pp. 389-408.
- Davis,L.E., Burnett,A.L., & Haynes,J.F. (1968) Histological and ultrastructural study of the muscular and nervous systems in *Hydra*. II. Nervous system. *J Exp Zool*, **167**, 295-331.
- Day,R.M. & Lenhoff,H.M. (1981) *Hydra* mesoglea: a model for investigating epithelial cell-basement membrane interactions. *Science*, **211**, 291-4.
- Deppe,U. (1974). *Hydra* (Hydrozoa) als entwicklungsbiologisches Modellsystem. *Dissertation. Göttingen. Max-Planck-Institut exp. Medizin.*
- Dirksen,M.L. & Jamrich,M. (1992) A novel, activin-inducible, blastopore lip-specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA-binding domain. *Genes Dev*, **6**, 599-608.
- Driancourt,M.A., Fair,T., & Reynaud,K. (1998) [Oocyte apoptosis: when, how, why?]. *Contracept Fertil Sex*, **26**, 522-7.
- Dubel,S., Hoffmeister,S.A., & Chica Schaller,H. (1987) Differentiation pathways of ectodermal epithelial cells in *hydra*. *Differentiation*, **35**, 181-9.
- Eddy,E.M. (1975) Germ plasm and the differentiation of the germ line. In *Intern Review of cytology* (eds. G.H. Bourne and J.F. Danielli), Academic Press, New York. Pp. 229-280.
- Felici,M.D., Carlo,A.D., Pesce,M., Iona,S., Farrace,M.G., & Piacentini,M. (1999) Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death Differ*, **6**, 908-15.



- Finkelstein,R., Smouse,D., Capaci,T.M., Spradling,A.C., & Perrimon,N. (1990) The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev*, **4**, 1516-27.
- Foley,K. & Cooley,L. (1998) Apoptosis in late stage Drosophila nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. *Development*, **125**, 1075-82.
- Freeman,G. & Miller,R.L. (1982) Hydrozoan eggs can only be fertilized at the site of polar body formation. *Dev Biol*, **94**, 142-52.
- Galliot,B. (2000) Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 629-37.
- Gauchat,D., Mazet,F., Berney,C., Schummer,M., Kreger,S., Pawlowski,J., & Galliot,B. (2000) Evolution of Antp-class genes and differential expression of Hydra Hox/paraHox genes in anterior patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4493-8.
- Gierer,A., Berking,S., Bode,H., David,C.N., Flick,K., Hansmann,G., Schaller,H., & Trenkner,E. (1972) Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nat New Biol*, **239**, 98-101.
- Goriely,A., Stella,M., Coffinier,C., Kessler,D., Mailhos,C., Dessain,S., & Desplan,C. (1996) A functional homologue of goosecoid in Drosophila. *Development*, **122**, 1641-50.
- Grens,A., Gee,L., Fisher,D.A., & Bode,H.R. (1996) CnNK-2, an NK-2 homeobox gene, has a role in patterning the basal end of the axis in hydra. *Dev Biol*, **180**, 473-88.
- Grens,A., Shimizu,H., Hoffmeister,S.A., Bode,H.R., & Fujisawa,T. (1999) The novel signal peptides, pedibin and Hym-346, lower positional value thereby enhancing foot formation in hydra. *Development*, **126**, 517-24.
- Grimmelikhuijzen,C.J. & Schaller,H.C. (1977) Isolation of a substance activating foot formation in hydra. *Cell Differ*, **6**, 297-305.
- Haeckel,E. (1874) The gastrea theory, the philogenetic classification of the animal kingdom and the homology of the germ-lamellae. *Q. J. Microsc. Soc.*, **14**, 142-165
- Hahn,M. & Jackle,H. (1996) Drosophila goosecoid participates in neural development but not in body axis formation. *Embo J*, **15**, 3077-84.

- Hausman,R.E. (1973) The mesoglea. In *Biology of Hydra* (ed. A.L. Burnett), Academic Press, New York, pp.394-453.
- Hermans-Borgmeyer,I., Schinke,B., Schaller,H.C., & Hoffmeister-Ullerich,S.A. (1996) Isolation of a marker for head-specific cell differentiation in hydra. *Differentiation*, **61**, 95-101.
- Hobmayer,B., Rentzsch,F., Kuhn,K., Happel,C.M., von Laue,C.C., Snyder,P., Rothbacher,U., & Holstein,T.W. (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature*, **407**, 186-9.
- Hobmayer,E., Hatta,M., Fischer,R., Fujisawa,T., Holstein,T.W., & Sugiyama,T. (1996) Identification of a Hydra homologue of the beta-catenin/plakoglobin/armadillo gene family. *Gene*, **172**, 155-9.
- Hoffmeister,S.A. (1989) Action of foot activator on growth and differentiation of cells in hydra. *Dev Biol*, **133**, 254-61.
- Hoffmeister,S.A. (1996) Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from Hydra vulgaris. *Development*, **122**, 1941-8.
- Holland,L.Z. (2002) Heads or tails? Amphioxus and the evolution of anterior-posterior patterning in deuterostomes. *Dev Biol*, **241**, 209-28.
- Honegger,T.G., Zurrer,D. and Tardent,P. (1989) Oogenesis In Hydra carnea - a New Model Based On Light and Electron Microscopic Analyses Of Oocyte and Nurse Cell Differentiation. *Tissue & Cell*, **21**, 381-393.
- Hooper,J.E. (1994) Distinct pathways for autocrine and paracrine Wingless signalling in Drosophila embryos. *Nature*, **372**, 461-4.
- Horky,M., Wurzer,G., Kotala,V., Anton,M., Vojtesek,B., Vacha,J., & Wesierska-Gadek,J. (2001) Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci*, **114**, 663-70.
- Izpisua-Belmonte,J.C., De Robertis,E.M., Storey,K.G., & Stern,C.D. (1993) The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell*, **74**, 645-59.
- Jacobson,M.D., Weil,M., & Raff,M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**, 347-54.

- Kenyon,C. & Wang,B. (1991) A cluster of Antennapedia-class homeobox genes in a nonsegmented animal. *Science*, **253**, 516-7.
- Kessel,M. & Gruss,P. (1990) Murine developmental control genes. *Science*, **249**, 374-9.
- Knochel,S., Lef,J., Clement,J., Klocke,B., Hille,S., Koster,M., & Knochel,W. (1992) Activin A induced expression of a fork head related gene in posterior chordamesoderm (notochord) of *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev*, **38**, 157-65.
- Koberna,K., Stanek,D., Malinsky,J., Ctrnacta,V., Cermanova,S., Novotna,J., Kopsky,V., & Raska,I. (2000) In situ fluorescence visualization of bromouridine incorporated into newly transcribed nucleolar RNA. *Acta Histochem*, **102**, 15-20.
- Kramatschek,B. & Campos-Ortega,J.A. (1994) Neuroectodermal transcription of the *Drosophila* neurogenic genes *E(spl)* and *HLH-m5* is regulated by proneural genes. *Development*, **120**, 815-26.
- Krysko,D.V., Roels,F., Leybaert,L., & D'Herde,K. (2001) Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *J Histochem Cytochem*, **49**, 1277-84.
- Ku,M. & Melton,D.A. (1993) *Xwnt-11*: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development*, **119**, 1161-73.
- Kuznetsov,S. (2002) Role of apoptosis and epithelial cells in *Hydra* spermatogenesis and histocompatibility reactions. *Dissertation, Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*.
- Kuznetsov,S., Lyanguzowa,M. and Bosch,T.C.G. (2001) Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. *Zoology*, **104**, 25-31.
- Landesman,Y. & Sokol,S.Y. (1997) *Xwnt-2b* is a novel axis-inducing *Xenopus* Wnt, which is expressed in embryonic brain. *Mech Dev*, **63**, 199-209.
- Lenhoff,H.M. & Brown,R.D. (1970) Mass culture of hydra: an improved method and its application to other aquatic invertebrates. *Lab Anim*, **4**, 139-54.
- Lewin,B. (1997) *Genes VI*, Oxford University Press and Cell Press, New York.

- Littlefield,C.L. (1985) Germ cells in *Hydra oligactis* males. I. Isolation of a subpopulation of interstitial cells that is developmentally restricted to sperm production. *Dev Biol*, **112**, 185-93.
- Littlefield,C.L., Finkemeier,C., & Bode,H.R. (1991) Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. II. How temperature controls the reciprocity of sexual and asexual reproduction. *Dev Biol*, **146**, 292-300.
- Lohmann,J.U. & Bosch,T.C. (2000) The novel peptide HEADY specifies apical fate in a simple radially symmetric metazoan. *Genes Dev*, **14**, 2771-7.
- Mahowald,A.P. & Hennen,S. (1971) Ultrastructure of the "germ plasm" in eggs and embryos of *Rana pipiens*. *Dev Biol*, **24**, 37-53.
- Mahowald,A.P. (1975) Ultrastructural changes in the germ plasm during the life cycle of *Miastor* (Cecidomyiidae, Diptera). *Wilhelm Roux's Arch.*, **176**, 223-240.
- Martin,V.J., Littlefield,C.L., Archer,W.E., & Bode,H.R. (1997) Embryogenesis in hydra. *Biol Bull*, **192**, 345-63.
- Martincic,D.S., Klun,I.V., Zorn,B., & Vrtovec,H.M. (2001) Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflugers Arch*, **442**, 159-60.
- Martinez,D.E., Dirksen,M.L., Bode,P.M., Jamrich,M., Steele,R.E., & Bode,H.R. (1997) Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Dev Biol*, **192**, 523-36.
- McDonald,J.A., Holbrook,S., Isshiki,T., Weiss,J., Doe,C.Q., & Mellerick,D.M. (1998) Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev*, **12**, 3603-12.
- McGinnis,N., Kuziora,M.A., & McGinnis,W. (1990) Human Hox-4.2 and *Drosophila* deformed encode similar regulatory specificities in *Drosophila* embryos and larvae. *Cell*, **63**, 969-76.
- McGinnis,W. & Krumlauf,R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, **68**, 283-302.
- McMahon,A.P. & Bradley,A. (1990) The Wnt-1 (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, **62**, 1073-85.

- McMahon,A.P. & Moon,R.T. (1989) Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*, **58**, 1075-84.
- Meier,P., Finch,A., & Evan,G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-801.
- Miller,M.A., Technau,U., Smith,K.M., & Steele,R.E. (2000) Oocyte development in *Hydra* involves selection from competent precursor cells. *Dev Biol*, **224**, 326-38.
- Minobe,S., Fei,K., Yan,L., Sarras Jr,M., & Werle,M. (2000) Identification and characterization of the epithelial polarity receptor "Frizzled" in *Hydra vulgaris*. *Dev Genes Evol*, **210**, 258-62.
- Mochizuki,K., Sano,H., Kobayashi,S., Nishimiya-Fujisawa,C., & Fujisawa,T. (2000) Expression and evolutionary conservation of nanos-related genes in *Hydra*. *Dev Genes Evol*, **210**, 591-602.
- Monaghan,A.P., Kaestner,K.H., Grau,E., & Schutz,G. (1993) Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*, **119**, 567-78.
- Montero,J.A., Ganan,Y., Macias,D., Rodriguez-Leon,J., Sanz-Ezquerro,J.J., Merino,R., Chimal-Monroy,J., Nieto,M.A., & Hurle,J.M. (2001) Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development*, **128**, 2075-84.
- Morimoto,Y., Kito,S., Ohba,T., Morimoto,H., Okamura,H., & Haneji,T. (2001) Alteration of argyrophilic nucleolar organizer region associated (Ag-NOR) proteins in apoptosis-induced human salivary gland cells and human oral squamous carcinoma cells. *J Oral Pathol Med*, **30**, 193-9.
- Mueller,J.F. (1950) Some observations on the structure of hydra, with particular reference to the muscular system. *Trans. Amer. Microscop. Soc.*, **69**, 133-147.
- Murata,Y. & Wharton,R.P. (1995) Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell*, **80**, 747-56.
- Nagao,Z. (1965) Studies of the development of *Tubularia radiata* and *Tubularia venusta* (Hydrozoa), *Pubbl. Akkeshi. Mar. Biol. Stat.*, **15**, 9-35.
- Nagata,S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, **256**, 12-8.

- Niehrs,C., Keller,R., Cho,K.W., & De Robertis,E.M. (1993) The homeobox gene gooseoid controls cell migration in *Xenopus* embryos. *Cell*, **72**, 491-503.
- Nishimiya-Fujisawa,C. & Sugiyama,T. (1993) Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Dev Biol*, **157**, 1-9.
- Nishimiya-Fujisawa,C. & Sugiyama,T. (1995) Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra*. XXII. Two types of female germ stem cells are present in a male strain of *Hydra magnipapillata*. *Dev Biol*, **172**, 324-36.
- Noda,K. and Kanai,C. (1980) An ultrastructural observation on the embryogenesis of *Pelmatohydra robusta*, with special reference to ‚germinal dense bodies‘. In *Developmental and Cellular Biology of Coelenterates* (eds. P.Tardent and R. Tardent), Elsevier / North-Holland, Amsterdam, New York, pp. 133-138.
- Pfannenstiel,H.D. & Grunig,C. (1982) Yolk formation in an annelid (*Ophryotrocha puerilis*, polychaeta). *Tissue Cell*, **14**, 669-80.
- Piatigorsky,J. (1975) Gametogenesis. In *The Sea Urchin Embryo* (ed. G. Czihak), Springer Verlag, Berlin, pp. 42-98.
- Print,C.G. & Loveland,K.L. (2000) Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*, **22**, 423-30.
- Reynolds,A.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**, 208-212.
- Royet,J. & Finkelstein,R. (1995) Pattern formation in *Drosophila* head development: the role of the orthodenticle homeobox gene. *Development*, **121**, 3561-72.
- Ruiz i Altaba,A. & Jessell,T.M. (1992) *Pintallavis*, a gene expressed in the organizer and midline cells of frog embryos: involvement in the development of the neural axis. *Development*, **116**, 81-93.
- Ruiz i Altaba,A., Cox,C., Jessell,T.M., & Klar,A. (1993) Ectopic neural expression of a floor plate marker in frog embryos injected with the midline transcription factor *Pintallavis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8268-72.

- Sachs,L.M., Lebrun,J.J., de Luze,A., Kelly,P.A., & Demeneix,B.A. (1997) Tail regression, apoptosis and thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoforms in *Xenopus* tadpoles. *Mol Cell Endocrinol*, **131**, 211-9.
- Sanger,F., Nicklen,S., & Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sarras,M.P., Jr., Madden,M.E., Zhang,X.M., Gunwar,S., Huff,J.K., & Hudson,B.G. (1991) Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. I. Isolation and characterization. *Dev Biol*, **148**, 481-94.
- Sarras,M.P., Jr., Yan,L., Grens,A., Zhang,X., Agbas,A., Huff,J.K., St John,P.L., & Abrahamson,D.R. (1994) Cloning and biological function of laminin in *Hydra vulgaris*. *Dev Biol*, **164**, 312-24.
- Sasaki,H. & Hogan,B.L. (1994) HNF-3 beta as a regulator of floor plate development. *Cell*, **76**, 103-15.
- Schaller,H. & Gierer,A. (1973) Distribution of the head-activating substance in hydra and its localization in membranous particles in nerve cells. *J Embryol Exp Morphol*, **29**, 39-52.
- Schaller,H.C. (1973) Isolation and characterization of a low-molecular-weight substance activating head and bud formation in hydra. *J Embryol Exp Morphol*, **29**, 27-38.
- Schaller,H.C. (1976) Action of the head activator as a growth hormone in hydra. *Cell Differ*, **5**, 1-11.
- Schaller,H.C. (1976) Action of the head activator on the determination of interstitial cells in hydra. *Cell Differ*, **5**, 13-25.
- Schaller,H.C., Hermans-Borgmeyer,I., & Hoffmeister,S.A. (1996) Neuronal control of development in hydra. *Int J Dev Biol*, **40**, 339-44.
- Schmidt,T. & David,C.N. (1986) Gland cells in *Hydra*: cell cycle kinetics and development. *J Cell Sci*, **85**, 197-215.
- Schmidt,T. & Schaller,H.C. (1976) Evidence for a foot-inhibiting substance in hydra. *Cell Differ*, **5**, 151-9.

- Schneider,K.C. (1890) Histologie von Hydra fusca mit besonderer Berücksichtigung des Nervensystem der Hydroidpolypen. *Arch. Mikrosk. Anat.*, **35**, 321-379.
- Scott,M.P., Tamkun,J.W., & Hartzell,G.W.3. (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta*, **989**, 25-48.
- Shenk,M.A., Bode,H.R., & Steele,R.E. (1993) Expression of Cnox-2, a HOM/HOX homeobox gene in hydra, is correlated with axial pattern formation. *Development*, **117**, 657-67.
- Smith,K.M., Gee,L., & Bode,H.R. (2000) HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in hydra. *Development*, **127**, 4743-52.
- Smith,K.M., Gee,L., Blitz,I.L., & Bode,H.R. (1999) CnOtx, a member of the Otx gene family, has a role in cell movement in hydra. *Dev Biol*, **212**, 392-404.
- Smith,W.C. & Harland,R.M. (1991) Injected Xwnt-8 RNA acts early in Xenopus embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell*, **67**, 753-65.
- Sokol,S., Christian,J.L., Moon,R.T., & Melton,D.A. (1991) Injected Wnt RNA induces a complete body axis in Xenopus embryos. *Cell*, **67**, 741-52.
- Stachel,S.E., Grunwald,D.J., & Myers,P.Z. (1993) Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development*, **117**, 1261-74.
- Stanek,D., Kiss,T., & Raska,I. (2000) Pre-ribosomal RNA is processed in permeabilised cells at the site of transcription. *Eur J Cell Biol*, **79**, 202-7.
- Strahle,U., Blader,P., Henrique,D., & Ingham,P.W. (1993) Axial, a zebrafish gene expressed along the developing body axis, shows altered expression in cyclops mutant embryos. *Genes Dev*, **7**, 1436-46.
- Sugiyama,T. & Fujisawa,T. (1978) Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. V. Cell lineage and development of chimera hydra. *J Cell Sci*, **32**, 215-32.
- Tardent,P. (1974) Gametogenesis, fertilization and embryogenesis: introductory remarks. *Am. Zool.* **14**, pp.443-445.



- Tardent,P. (1985) The differentiation of germ cells in Cnidaria. In *The Origin and evolution of sex* (ed. A. Monroy), Alan R. Riss, New York, pp.163-197.
- Technau,U. & Bode,H.R. (1999) HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development*, **126**, 999-1010.
- Trembley,A. (1744) Mémoire pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce à bras en forme de cornes. Verbeck Leyden, pp-1-324.
- Uchida,D., Yamashita,M., Kitano,T., & Iguchi,T. (2002) Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol*, **205**, 711-8.
- Wang,C. & Lehmann,R. (1991) Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila. *Cell*, **66**, 637-47.
- Wang,C., Dickinson,L.K., & Lehmann,R. (1994) Genetics of nanos localization in Drosophila. *Dev Dyn*, **199**, 103-15.
- Weigel,D., Jurgens,G., Kuttner,F., Seifert,E., & Jackle,H. (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell*, **57**, 645-58.
- Weinstein,D.C., Ruiz i Altaba,A., Chen,W.S., Hoodless,P., Prezioso,V.R., Jessell,T.M., & Darnell,J.E., Jr. (1994) The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell*, **78**, 575-88.
- Wolda,S.L., Moody,C.J., & Moon,R.T. (1993) Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of Xenopus laevis embryos. *Dev Biol*, **155**, 46-57.
- Wray,G.A., Levinton,J.S. and Shapiro,L.H. (1996) Molecular evidence for deep Precambrian divergences among metazoan phyla. *Science*, **274**, 568-573.
- Wyllie,A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-6.
- Xiao,S., Yuan,X., & Knoll,A.H. (2000) Eumetazoan fossils in terminal proterozoic phosphorites? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13684-9.

- Xiao,S., Zhang,Y. and Knoll,A.H. (1998) Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a Neoproterozoic phosphorite. *Nature*, **391**, 553-558.
- Yamaguchi,T.P., Takada,S., Yoshikawa,Y., Wu,N., & McMahon,A.P. (1999) T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev*, **13**, 3185-90.
- Yang,X., van Beest,M., Clevers,H., Jones,T., Hursh,D.A., & Mortin,M.A. (2000) decapentaplegic is a direct target of dTcf repression in the Drosophila visceral mesoderm. *Development*, **127**, 3695-702.
- Yu,X., Riese,J., Eresh,S., & Bienz,M. (1998) Transcriptional repression due to high levels of Wingless signalling. *Embo J*, **17**, 7021-32.
- Zihler,J. (1972) Zur Gametogenese und Befruchtungsbiologie von Hydra. *Wilhelm Roux's Arch.*, **169**, 239-267.

## 9 Abkürzungsindex

μCi	Mikrocurie
μM, mM, M	mikromolar ( $10^{-6}$ mol/l), millimolar ( $10^{-3}$ mol/l), molar (1 mol/l)
A	Adenin
A <sub>230</sub> , A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub>	Absorption (Optische Dichte) bei 230, 260 oder 280 nm
AB	Antikörper
Aliquot	etwas von der Probe oder Substanz
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CTP	Cytosintriphosphat
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser, mit Diethylpyrocarbonat behandelt
Dig	Digoxygenin
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol

FU	5-Fluoro-Uridin
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid
kb	Kilobase; = 1000 basenpaare
kV	Kilovolt = 1000 Volt
LB	Luria Broth
mAB	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
ms	Millisekunde
NBT	Nitroblautetrazolium
nm	Nanometer
NOR	nuclear organizer region
NP-40	Nonidet P-40
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAPD	Rapid Amplification of Polymorphic DNA
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'- tetraethylmethyldiamin
U	Uridin
ÜN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat

UTR	nicht translatierte Region von RNAs
UV	Ultraviolett (Ultraviolettes Licht)
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 10 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Bosch möchte ich mich herzlich für die Finanzierung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine Ratschläge und die kritische Begleitung und Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Bei Frau Dr. Frederike Anton-Erxleben und Frau Antje Thomas bedanke ich mich für die hervorragende Hilfe bei der TEM-Analyse und der Anfertigung konfokaler Aufnahmen.

Für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und die anregenden Diskussionen danke ich insbesondere Vassili Rybakine (Jena), Manfred Gödel (Jena), Henrik Stotz, Sergey Kuznetsov, René Augustin, Jörg Wittlieb und Barbara Nixdorf-Bergweiler.

An dieser Stelle möchte ich unseren Sekretärinnen einen Christa Kuzel und Tine Griephan einen besonderen Dank für die Bewältigung bürokratischer Vorgänge und die Versorgung mit für die Arbeit ‚lebenswichtigem‘ Material aussprechen.

Weiterhin gilt mein Dank allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Institutes für Zoologie, die mich, ebenso wie die bereits genannten, motiviert, unterstützt und zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Hierzu gehören u.a. Kostya Khalturin, Matthias Becker, Gregory Genihovich, Matthias Habetha, Sandra Pankow, Stefan Thomsen, Reka Gyulay, Andreas Till, Eva Herbst, Birgit Belusa, Maria Franck und Margit Kruse.

Abschließend gilt mein größter Dank Katrin Thamm, meinen Eltern und meinem guten Freund PD Dr. Andreas Vilcinskas, die mich aufgefangen, mich wieder aufgebaut und mir wieder Mut gemacht haben, wenn ich nicht mehr weiter wußte. Ohne Eure Unterstützung hätte ich es nicht geschafft.

## 11 Lebenslauf

**NAME:** Andreas Christian Fröbius  
**GEBURTSDATUM UND –ORT:** 07.11.1970 in Berlin  
**STAATSANGEHÖRIGKEIT:** deutsch  
**ADRESSE:** Institut für Allgemeine Zoologie  
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,  
 Am Botanischen Garten 5-9,  
 24118 Kiel.

### AUSBILDUNG:

ZEITRAUM	INSTITUTION	ABSCHLUß
1977 - 1982	Reinhold-Otto-Grundschule	-
1982 - 1990	Herder-Gymnasium Berlin	Abitur
08.1990 – 06.1993	Lise-Meitner-Schule Berlin	Biologisch-Technischer Assistent Abschlußnote 1,6
09.1993 – 01.1999 (11 Semester)	Freie Universität Berlin, Zoologie, AG 10 Insektenparasitologie	Studium der Biologie, abgeschlossen mit dem Diplom. Abschlußnote 1,0 Prüfungsfächer: Anatomie und Morphologie der Tiere, Zellbiologie & Parasitologie
06.1999 – 03.2000 (2 Semester)	Spezielle Zoologie, FSU Jena	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Bosch
04.2000 – jetzt (5 Semester)	Allgemeine Zoologie, CAU Kiel	Promotion (Abschluß voraussichtlich 06.2002) Prüfungsfach: Zoologie

### PUBLIKATIONEN:

[1] WEDDE M., GRIESCH J., FRÖBIUS A., PODSIADLOWSKI L. AND VILCINSKAS A. (1998):

A Microtiterplate Azocoll Assay for Measurement of Proteases and Protease Inhibitors Involved in Insect-Pathogen-Interactions. In: *Techniques in Insect Immunology*, A. WIESNER, G. B. DUNPHY, V. J. MARMARAS, I. MORISHIMA, M. SUGUMARAN & M. YAMAKAWA (eds.), Ch. 22, pp. 171-177. Fairhaven, New York: SOS Publications.

[2] FRÖBIUS, A.C., KANOST, M.R., GÖTZ, P. AND VILCINSKAS, A. (2000): Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Eur. J. Biochem. 267, 2046-2053, FEBS 2000.

[3] LOHMANN, J.U., FRÖBIUS, A. AND THOMAS C.G. BOSCH (2000): The new peptide HEADY specifies apical fate in the radial-symmetric metazoan *Hydra*. Proceedings of the 93. Annual Meeting of the German Zoological Society (DZG), Bonn, 12.6.-16.6.2000. Zoology 103(2000), Suppl. III (Abstracts 93.1), p.10.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Andreas Fröbuis

Kiel, April 2002