

**Molekulare Untersuchungen zur Musterbildung im  
einfachen Vielzeller *Hydra***

Dissertation

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

vorgelegt von

**René Augustin**

Kiel

2003

Referent/in: .....Prof. Dr. T. C. G. Bosch.....  
Korreferent/in: .....Prof. Dr. M. Leippe.....  
Tag der mündlichen Prüfung: .....10.02.2004.....  
Zum Druck genehmigt: Kiel, .....10.02.2004.....

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet:

Fedders, H. and **Augustin, R.**, Bosch, T.C.G. 2003. A Dickkopf-3 related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan *Hydra*. Dev. Genes Evol.: im Druck

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN:</b>	<b>9</b>
<b>MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN ZUR MUSTERBILDUNG IM EINFACHEN VIELZELLER <i>HYDRA</i></b>	<b>13</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Hydra als Modellorganismus der Entwicklungsbiologie</b>	<b>13</b>
1.1.1 Systematik, Morphologie und Biologie	13
1.1.2 Die interstitielle Zelllinie und die Differenzierung der Nesselzellen	17
<b>1.2 Muster- und Achsenbildung in <i>Hydra</i></b>	<b>18</b>
1.2.1 Musterbildung in <i>Hydra</i> nach Gierer & Meinhardt	19
1.2.2 Signalmoleküle in <i>Hydra</i>	21
1.2.3 Regulatorische Gene in <i>Hydra</i>	26
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>31</b>
<b>2. ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Identifizierung von HEADY Zielgenen</b>	<b>32</b>
2.1.1 Ein Dickkopf homologes Protein in <i>Hydra</i>	32
2.1.2 Suche nach HEADY – Zielgenen mittels SSH	42
<b>2.2 Charakterisierung der Vorgänge bei Regeneration und Knospung in <i>Hydra</i></b>	<b>59</b>
2.2.1 Hybridisierung /Vergleich von Filtern mit Klonen einer normalisierten cDNA Bank	59
2.2.2 Identifizierung von Unterschieden in der Genexpression bei Knospung und Regeneration in <i>Hydra</i> durch SSH und cDNA Macroarray Hybridisierung	67
<b>3. DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>3.1 <i>HyDkk-3</i>, ein Dickkopfprotein am Beginn der Evolution der Metazoa</b>	<b>81</b>
<b>3.2 HEADY Zielgene in <i>Hydra</i></b>	<b>83</b>
3.2.1 Cystatin und Cathepsin L, Regulation der Kopfregeneration durch HEADY	86
<b>3.3 Achsenpolarität in <i>Hydra</i></b>	<b>89</b>

<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>93</b>
<b>5. MATERIALIEN</b>	<b>95</b>
5.1 Organismen	95
5.2 Medien	95
5.3 Puffer und Lösungen	96
5.3.1 Allgemeine Lösungen	96
5.3.2 Lösungen für die mRNA – Extraktion (Dynabeads)	97
5.3.3 Lösungen für <i>in situ</i> Hybridisierung	98
5.4 Kits	99
5.5 Enzyme (neben den verwendeten Kit´s)	99
5.6 Chemikalien	100
5.7 Radioaktive Substanzen	102
5.8 Vektoren	102
5.9 Antikörper	102
5.10 Oligonukleotide (Primer)	102
5.11 Geräte	105
5.12 Andere Materialien	107
5.13 Computerprogramme	107
5.14 Sequenzanalyse im Internet	108
<b>6. METHODEN</b>	<b>110</b>
6.1 Hälterung der Versuchstiere	110
6.1.1 <i>Hydra magnipapillata</i>	110
6.1.2 <i>Artemia salina</i>	110
6.2 Peptidinkubation	110
6.3 Differential Display PCR (DD-PCR)	111
6.3.1 Reverse Transkription	111
6.3.2 DD-Polymerasekettenreaktion	112
6.3.3 Hochauflösende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	113

6.3.4	Silberfärbung	114
6.3.5	Klonierung differentiell exprimierter Gene/Genfragmente aus dem Silbergel	114
<b>6.4</b>	<b>Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)</b>	<b>115</b>
6.4.1	Überblick	115
6.4.2	Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese	115
6.4.3	Adapterligation und Hybridisierung	116
6.4.4	Erste und Zweite PCR Amplifikation	116
<b>6.5</b>	<b>Herstellung der Macroarray Filter</b>	<b>118</b>
6.5.1	Vorbereitung	118
6.5.2	Automatisches Aufnehmen der Klone der cDNA Banken mit Hilfe des QPix Robotersystems	119
6.5.3	Kopieren der cDNA Banken in den Mikrotiterplatten	119
6.5.4	Übertragung der cDNA Banken aus den Mikrotiterplatten auf Nylon - membranen zur Herstellung der Macroarray Filter mit dem QPix Roboter	120
6.5.5	Behandlung der Macroarray Filter in Vorbereitung auf die Hybridisierung	122
6.5.6	Aufbau von kleinen PCR – Filtern	122
<b>6.6</b>	<b>DNA-Sequenzierung</b>	<b>123</b>
<b>6.7</b>	<b>Northern-Blot Analyse</b>	<b>124</b>
6.7.1	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	125
6.7.2	Herstellung der Sephadex-G50-Säulen	126
6.7.3	Reinigung radioaktiv markierter Sonden	127
6.7.4	Membran-Hybridisierung	127
6.7.5	Entfernung der „alten“ Hybridisierungsprobe von der Membran	128
<b>6.8</b>	<b><i>In situ</i> Hybridisierung</b>	<b>128</b>
6.8.1	Herstellung der DIG-markierten RNA Sonden	128
6.8.2	<i>In situ</i> Hybridisierung mit ganzen Polypen	129
<b>6.9</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)</b>	<b>131</b>
6.9.1	Standard-PCR	132
6.9.2	„Nested“- PCR	132
6.9.3	„Hotstart“- PCR	132
6.9.4	„Touch-Down“- PCR	133

<b>6.10</b>	<b>3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) PCR</b>	<b>133</b>
<b>6.11</b>	<b>5' RACE PCR mit Splinkerettenmethode</b>	<b>134</b>
6.11.1	Synthese doppelsträngiger cDNA	134
6.11.2	Synthese der Splinkeretten	135
6.11.3	Splinkerettenligation	136
6.11.4	Splinkeretten-PCR	136
<b>6.12</b>	<b>RT-PCR, Quantitative PCR</b>	<b>137</b>
<b>6.13</b>	<b>Agarosegel-Elektrophorese</b>	<b>138</b>
<b>6.14</b>	<b>Aufreinigung von DNA Fragmenten</b>	<b>138</b>
<b>6.15</b>	<b>Ligation</b>	<b>139</b>
6.15.1	Ligation von Adenosinnukleotid-Überhängen	139
<b>6.16</b>	<b>Transformation von Bakterien</b>	<b>139</b>
6.16.1	Herstellung kompetenter Zellen	139
6.16.2	Transformation	140
6.16.3	Kolonie-PCR	140
6.16.4	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen	141
<b>6.17</b>	<b>DNA-Isolierung</b>	<b>141</b>
6.17.1	Isolierung von Plasmid-DNA	141
6.17.2	Isolierung genomischer DNA	141
<b>6.18</b>	<b>RNA-Isolierung</b>	<b>142</b>
6.18.1	Isolierung von Gesamt-RNA	142
6.18.2	Isolierung von mRNA	143
<b>6.19</b>	<b>Reverse Transkription</b>	<b>143</b>
<b>6.20</b>	<b>DNA- /RNA-Konzentrationsbestimmung</b>	<b>144</b>
<b>6.21</b>	<b>Regeneration</b>	<b>144</b>
<b>6.22</b>	<b>In silico Analyse von DNA- und Proteinsequenzen</b>	<b>144</b>
6.22.1	Homologie-Analyse	144
6.22.2	Generierung von phylogenetischen Stammbäumen	145
6.22.3	Struktur- und Sequenzanalyse	146

<b>7. LITERATURVERZEICHNIS:</b>	<b>147</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>158</b>
<b>9. ERKLÄRUNG</b>	<b>159</b>



## Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BAC	Baculovirus
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cpm	„counts per minute“
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosinnukleotidtriphosphat
DD-PCR	Differential Display-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix („extra cellular matrix“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST(s)	„Expressed Sequence Tag(s)“

et al.	und andere
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LB <sub>amp</sub>	LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin
l	Liter
M	molar
mA	Milliampere
MAB	Maleinsäurepuffer
MAB-B	Maleinsäurepuffer mit 1 % BSA
MetOH	Methanol
µCi	Mikrocurie
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
mg	Milligramm
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	millimolar
min.	Minute(n)
Mio	Million
mol	Mol
mRNA	„Messenger“ - RNA
ms	Millisekunde(n)
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“

OD <sub>550</sub>	Optische Dichte bei 550 nm
OPA	Operon Primer Kit A (Randomprimer für DD-PCR)
Ω	Ohm
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PBS	Phosphat - gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase - Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pg	Picogramm
pmol	Picomol
RACE	„Rapid Amplifikation of cDNA Ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptions - PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
siRNA	„small interfering RNA“
SSH	„Suppression Subtractive Hybridisation“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris/HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' - Tetraethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Gesamt-RNA
U	Unit(s)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-glucuronid

z. B.

zum Beispiel

# **Molekulare Untersuchungen zur Musterbildung im einfachen Vielzeller Hydra**

## **1. Einleitung**

Vielzellige Organismen haben im Verlauf ihrer Evolution vielfältige Formen und Muster ausgebildet. Man denke da an die Muster tropischer Schnecken auf deren Gehäuse, die Anordnung der Dornen bei Rosen, um nur wenige Beispiele zu benennen. Generell erfüllen Muster dabei die unterschiedlichsten Aufgaben. So haben die genannten Beispiele eher ökologische Bedeutung.

Aus entwicklungsbiologischer Sicht ist besonders die Ausbildung der Körperachsen als eine Form der Musterbildung von Interesse. Diese Achsenbildung war während der Evolution der vielzelligen Organismen wichtige Voraussetzung für die Entstehung eines dreidimensionalen Körpers, indem ein koordiniertes und hocheffektives Zusammenarbeiten von spezialisierten Zellen, die in verschiedenen Geweben in verschiedenen Körperbereichen überlebensnotwendige Funktionen erfüllen, realisiert werden konnte. Die Notwendigkeit der Achsendeterminierung lässt es nicht verwunderlich erscheinen, dass genau wie bei der evolutiven Entwicklung zu den Eumetazoa, auch bei der Ontogenese, d.h. der Entwicklung eines Organismus aus der befruchteten Eizelle, die Etablierung der Achsen an erster Stelle steht. Drei unterscheidbare Orientierungen werden dabei festgelegt, die anterior-posteriore, die dorsal-ventrale und die links-rechts Orientierung. Die Achsen bilden eine Art Koordinatensystem, entlang dessen sich die Zellen an dem jeweiligen Ort in die entsprechende spezialisierte Zelle differenzieren.

Um die ursprünglichen Mechanismen und Prozesse der Achsenbildung zu untersuchen, bietet der Süßwasserpolytyp *Hydra*, als Vertreter der basalen Metazoa gute Voraussetzungen.

### **1.1 Hydra als Modellorganismus der Entwicklungsbiologie**

#### **1.1.1 Systematik, Morphologie und Biologie**

Systematische Einordnung von *Hydra spec.*

Stamm: Cnidaria

Klasse: Hydrozoa

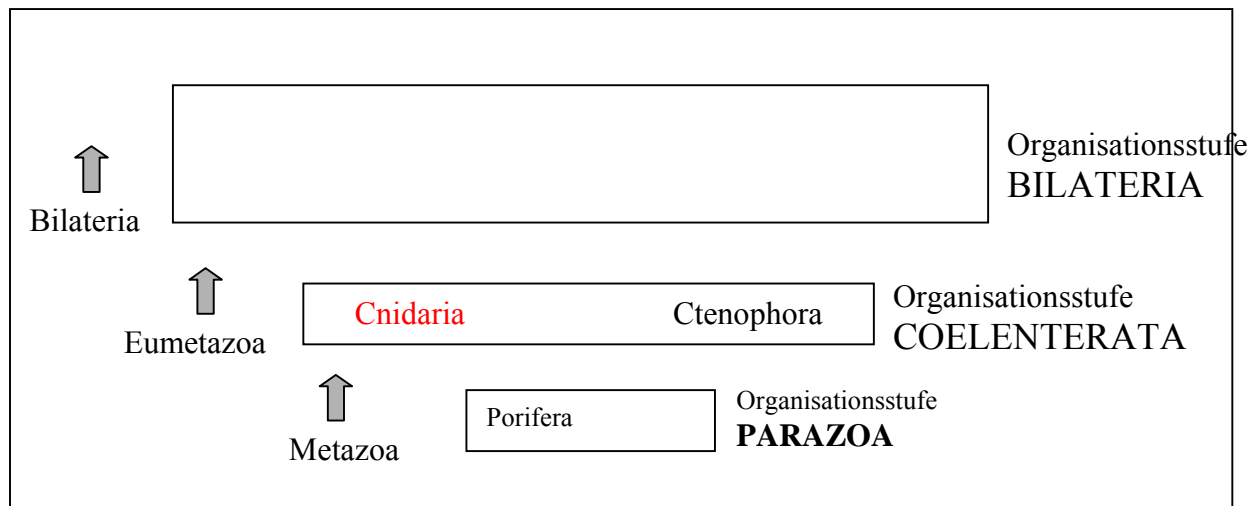
Ordnung: Hydroida

Unterordnung: Hydrina

Familie: Hydridae

Art: *Hydra spec.*

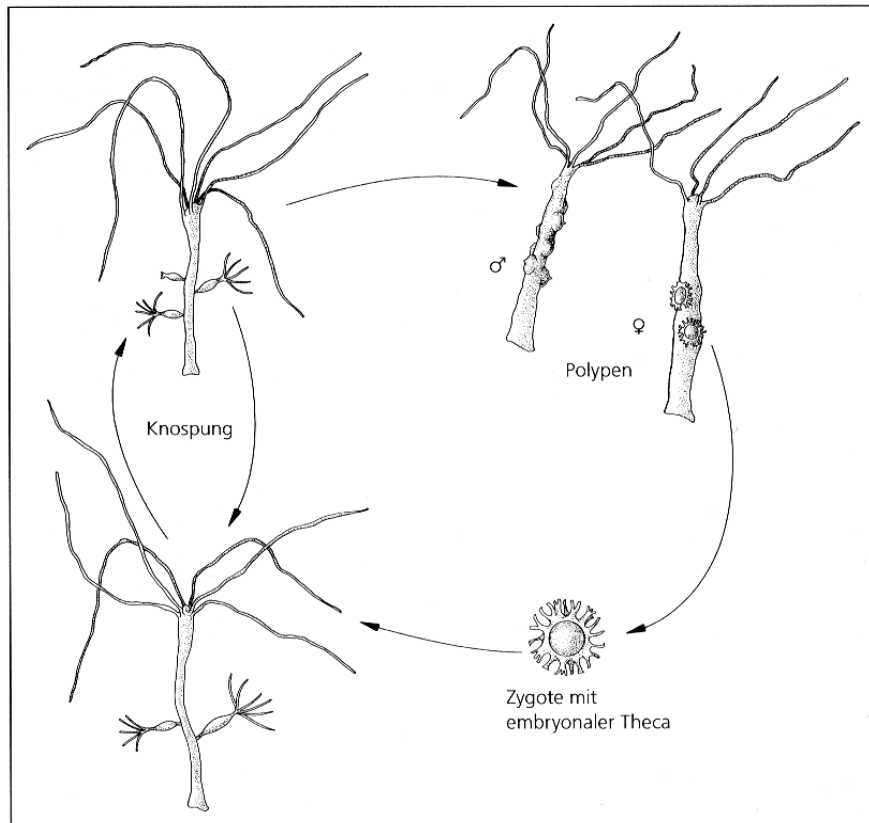
*Hydra* ist ein solitärer Süßwasserpolyt, der weit verbreitet in Seen, Tümpeln und Flüssen lebt. Systematisch gehört *Hydra* zum Stamm der Cnidaria (Nesseltiere). Die Cnidaria spalteten sich vor ca. 500 Millionen Jahren von der Hauptlinie der Eumetazoa ab und sind nach dem für sie charakteristischen Zelltyp, den Nesselkapseln (Cnidozyten) benannt, die sowohl dem Nahrungserwerb, als auch der Feindabwehr dienen (Westheide und Rieger, 1996). Zusammen mit den Ctenophora (Rippenquallen) werden diese zu den Coelenterata (Hohltieren) zusammengefasst. Im Gegensatz zu den noch einfacher organisierten Schwämmen (Porifera) nennt man die Coelenterata bereits diploblastische Eumetazoa, denn sie zeichnen sich durch den Besitz zweier echter Epithelgewebe aus, der Epidermis und der Gastrodermis, die sich wiederum von den beiden Keimblättern Ektoderm und Entoderm ableiten lassen (Abb.1.1).



**Abb. 1.1: Stufen histologischer, embryologischer und mikroanatomischer Organisation der Metazoa**  
(verändert nach Westheide und Rieger, 1996)

Alle Strukturen und Gewebe der Coelenterata basieren auf diesen beiden Keimblättern, ein Mesoderm kommt nicht vor. Zwischen den beiden Zellschichten befindet sich eine azelluläre Stützlamelle, die sogenannte Mesogloea.

Wie bei den meisten Hydrozoen ist die Medusengeneration bei *Hydra* allerdings sekundär zurückgebildet. Häufig bleiben jedoch keimzelltragende Strukturen erhalten, deren Gameten ektodermaler Herkunft dann kugelige Anhäufungen zwischen Epidermis und Mesogloea bilden (Abb.1.2). Die Tiere können zwittrig oder getrenntgeschlechtlich sein. Von größerer Bedeutung ist bei *Hydra* die asexuelle Vermehrung durch Knospung (Westheide und Rieger, 1996). Die bei vielen Hydrozoen häufige Koloniebildung tritt bei *Hydra* nicht auf.



**Abb. 1.2: Lebenszyklus von *Hydra spec.*** (aus Westheide und Rieger, 1996)

*Hydra* weist einen sehr einfachen, radiärsymmetrischen Bauplan mit nur einer Achse, der apikal – basalen, auf. An den Extremen befinden sich die Hauptdifferenzierungsleistungen des Tieres, der Kopf und der Fuß. Der Kopf der *Hydra* gliedert sich in den Mundkegel (Hypostom) und fünf bis sechs Tentakel, die zum Beutefangen dienen. Auch der Begriff Fuß fasst zwei diskriminierbare Strukturen zusammen, den Stiel und die Basalscheibe, die das Anhaften an das Substrat, wie Steine oder Algen, erlaubt. Zwischen Kopf und Fuß liegt der zylindrische Gastralbereich (Abb.1.3).

Die Tiere können eine maximale Größe von 3 cm erreichen, jedoch liegt die durchschnittliche Größe bei 0,5 – 1 cm. Ein adulter Polyp mit einer durchschnittlichen Größe besitzt ca.  $10^5$  Zellen, die aus 2 Zellpopulationen, den interstitiellen Zellen und den Epithelzellen, entstehen.

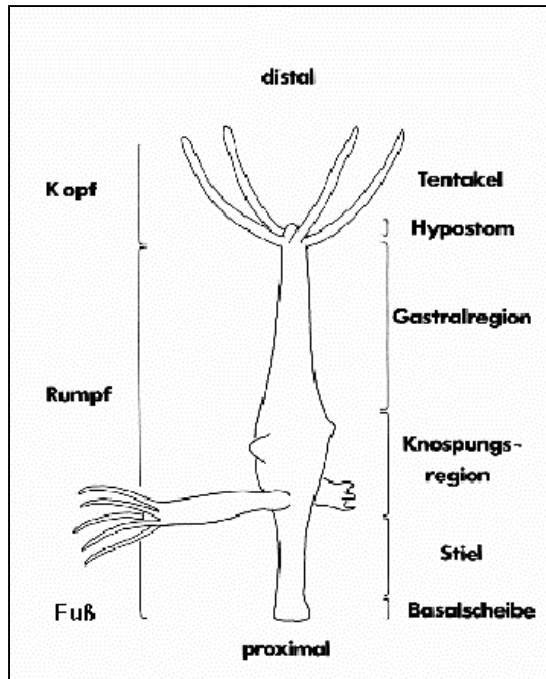


Abb. 1.3: Körperbau eines *Hydra*-Polypen, vegetativer Phänotyp. (verändert nach Holstein, 1995)

Die Zellen sind in zwei Gewebeschichten organisiert, Entoderm und Ektoderm, die von einer azellulären Stützschrift, der Mesoglöa, getrennt werden (Abb 1.4). Das Ektoderm besteht aus ektodermalen Epithelzellen, interstitiellen Zellen (I-Zellen), Nematocyten, Nervenzellen und Keimzellen, das Entoderm aus entodermalen Epithelzellen, interstitiellen Zellen, Nervenzellen und Drüsenzellen. Die Nerven-, Drüsen- und Keimzellen entwickeln sich aus der interstitiellen Zelllinie (Bosch and David, 1987). Die ektodermalen Epithelzellen können zudem zu Batteriezellen differenzieren, deren Funktion in der Aufnahme von 8-24 Nesselkapseln liegt.

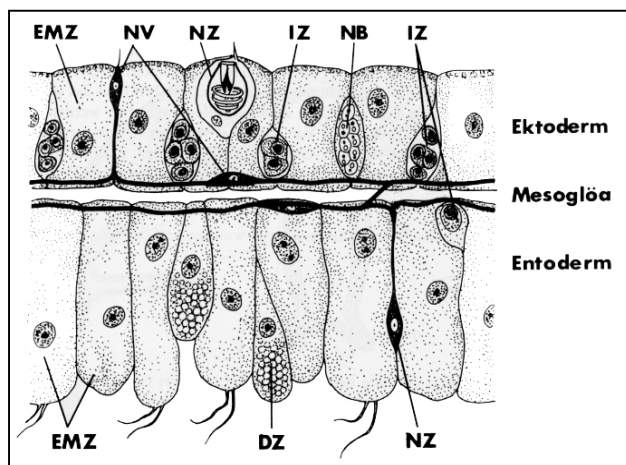
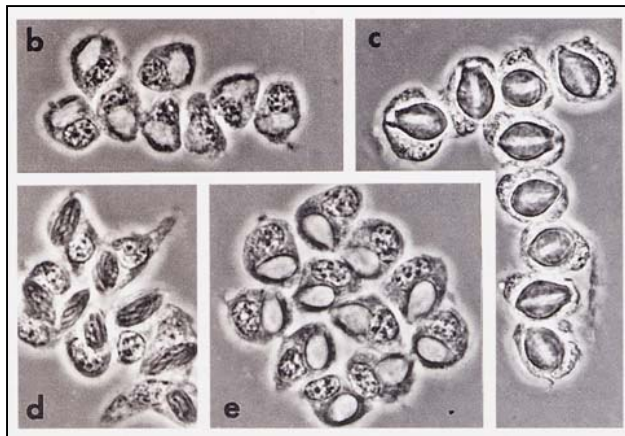


Abb.1.4: Schematische Darstellung der Histologie von *Hydra* (Längsschnitt durch die Gastralregion) DZ = Drüsenzelle des Entoderms, EMZ = Epithelmuskelzelle, IZ = Interstitielle Zelle, NV = Nervenzelle, NB = Nest von Nematoblasten, NZ = Nematocyte (nach Gierer 1974, modifiziert)



### 1.1.2 Die interstitielle Zelllinie und die Differenzierung der Nesselzellen

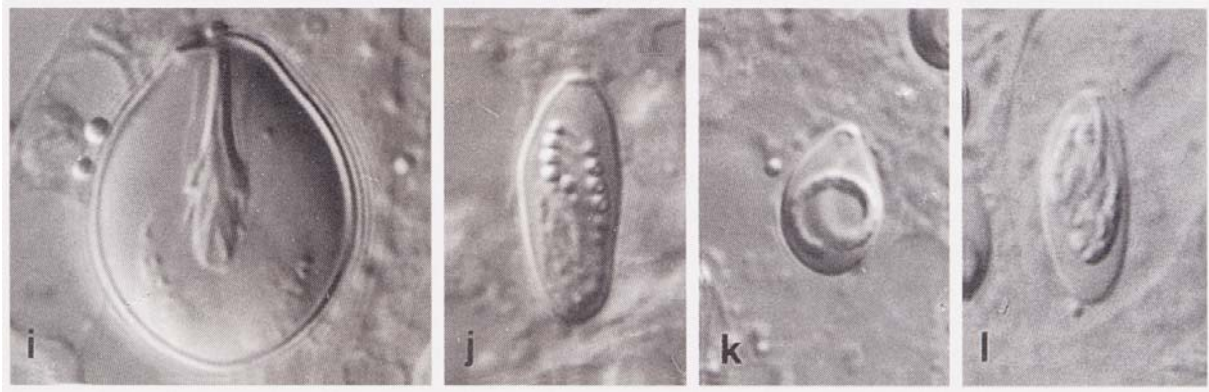
Die I-Zellen in *Hydra* sind eine Zellpopulation mit Eigenschaften multipotenter Zellen, die ständig proliferieren und zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren (David and Murphy, 1977, Bosch and David, 1987). Sie treten einzeln oder in Zweiergruppen auf. Der weitaus größte Teil der I-Zellen ist im Ektoderm lokalisiert, in geringer Zahl kommen sie jedoch auch im Entoderm vor. Etwa 60 Prozent sind sogenannte echte Stammzellen. Die meisten der übrigen I-Zellen sind Vorläuferzellen für Nematocyten. Während sich die Differenzierung der Nervenzellen im wesentlichen auf das Kopf- und Fußgewebe beschränkt, findet die Stammzellvermehrung und Nematocyten-differenzierung ausschließlich im Gastralbereich statt (David und Gierer, 1974; David und Plotnick, 1980).



**Abb. 1.5: Nematoblasten.** (b) Differenzierende Nematocyten, (c) Nest von Stenotelen, (d) von atrischen Isorhizen und (e) von Desmonemen (aus Holstein, 1995)

Ausgangspunkt für die Entstehung von Nematocyten sind determinierte I-Zellen. Diese proliferieren, bleiben jedoch über zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden. Die dabei entstehenden typischen Zellnester bestehen aus 2, 4, 8, 16 oder 32 Vorläuferzellen (Nematoblasten) (David and Challoner, 1974) (Abb.1.5).

Nach der terminalen Mitose treten alle Zellen eines Nestes den Differenzierungsweg an und bilden letztendlich denselben Kapseltyp (David and Challoner, 1974). Erst nach Fertigstellung der Kapsel brechen die Nester auseinander und migrieren zum jeweiligen Bestimmungsort, z.B. zu den Tentakeln, um dort in Batteriezellen eingebaut zu werden. Die Abb. 1.6. zeigt die 4 unterschiedlichen Kapseltypen in *Hydra vulgaris*; atriche und holotriche Isorhizen, Desmonemen und Stenotelen.



**Abb. 1.6: Nematozysten von *Hydra vulgaris*.** (i) Stenotele, (j) holotriche Isorhize, (k) Desmoneme, (l) atriche Isorhize (aus Holstein 1995)

## 1.2 Muster- und Achsenbildung in *Hydra*

Schon seit dem Jahr 1744 ist die wohl bemerkenswerteste Eigenschaft von *Hydra* beschrieben, die Regenerationsfähigkeit (Trembley, 1744). Werden Körperstrukturen entfernt, ist *Hydra* in der Lage diese innerhalb weniger Tage an der entsprechenden Stelle zu regenerieren. Selbst nach Dissoziation des Hydragewebes in Einzelzellen, entstehen nach anschließender Aggregation intakte Polypen (Gierer et al., 1972).

Wo liegen die Ursachen für diese Regenerationsfähigkeit? Zunächst einmal scheint sie das Resultat kontinuierlicher Zellproliferation und –differenzierung zu sein. Die kontinuierliche Zellproliferation, deren Ausgangspunkt der obere Gastralbereich ist, führt zu einem Gewebefluß zu den Enden der Achse, an denen die Zellen in gleichem Maße abgestoßen werden. Das Gewebe befindet sich in einem Fließgleichgewicht aus Zellproliferation und Zellverlust (Otto and Campbell, 1977). Für die Proliferation sind vor allem Stammzellen zuständig, aus denen positionsabhängig bestimmte Differenzierungsprodukte entstehen. Die Konsequenz aus kontinuierlicher Proliferation und positionsabhängiger Differenzierung ist, dass ständig Positionssignale und Proliferationssignale zwischen den Zellen ausgetauscht werden müssen, um die Integrität und Funktionalität des Gewebes zu gewährleisten (Wolpert et al., 1974; David and Murphy, 1977). Ein Beispiel für die kontrollierte Proliferation liefert die Homöostase der zwei unabhängigen Zelllinien, interstitielle und epitheliale Zellen.

Der ständige Zellverlust an den Polen der Achse bzw. Zellaustausch hat zur Folge, dass im adulten Tier aktiv und kontinuierlich die Aufrechterhaltung der Körperachse betrieben wird. Aus diesen Gründen kann man *Hydra* auch als einen „permanenten Embryo“ bezeichnen.

Die Mechanismen die bei der kontinuierlichen Achsenbildung involviert sind, sind auf zellularer Ebene gut untersucht. Transplantationversuche waren der Schlüssel zur Aufklärung

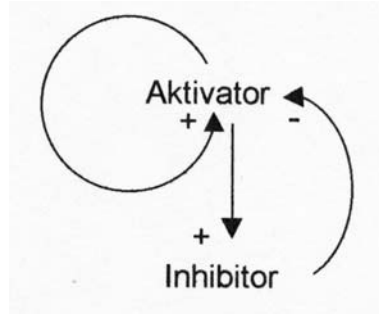
der Vorgänge und der damit verbundenen Mechanismen. Bereits angesprochen wurde, dass *Hydra* in der Lage ist, positionsabhängig die entsprechenden Strukturen zu regenerieren. Dies trifft auch dann noch zu, wenn sowohl Kopf als auch Fuß entfernt wurden (Goetsch, 1929). Trotz Gewebefluß bleibt eine innere Polarität über einen gewissen Zeitraum erhalten. Es besteht eine Art Polaritätsgedächtnis. Experimentell ist es jedoch möglich, die Polarität umzukehren. Werden Kopf und Fuß entfernt und an die entgegengesetzten Enden transplantiert, so erfährt das Gewebe innerhalb von 48 h eine vollständige Umkehr der Polarität. Wurde nur der Kopf transplantiert, so ist auch dieser in der Lage eine Reversion der Polarität hervorzurufen, jedoch benötigt dieser Vorgang wenigstens 96 h. Der Fuß hingegen, kann nur eine teilweise Polaritätsumkehr bewirken (Wilby and Webster, 1970). Die Ergebnisse dieser Experimente erlaubten die Schlussfolgerung, dass sich der axiale Gradient wie ein Gradient einer bestimmten Substanz verhält. D.h. die gradierte Verteilung einer Substanz ist für die Polarität des Hydragewebes verantwortlich und determiniert an welcher Stelle der Kopf oder Fuß gebildet werden muss.

Um diese Substanz oder Substanzen näher zu charakterisieren, wurde eine Reihe von lateralen Transplantationsexperimenten durchgeführt. Transplantiert man beispielsweise kopfnahes Gewebe eines Tieres in den Gastralbereich eines anderen Tieres, wird an dieser Stelle die Bildung einer Kopfstruktur induziert (Kopfaktivierung) (MacWilliams 1983b). Transplantiert man jedoch dieses Stück kopfnah in ein anderes Tier, so werden keine neuen Strukturen gebildet. Dies deutet auf die Existenz von Signalen hin, die eine Kopfbildung in der unmittelbaren Nähe eines bereits vorhandenen Kopfes inhibieren (Kopfinhibition) (MacWilliams 1983a). Die Charakterisierung mutanter Hydrastämme, die Störungen bei der Musterbildung aufweisen (Sugiyama and Fujisawa, 1977; Achermann and Sugiyama, 1985), sowie die gewonnenen Ergebnisse vielfältiger weiterer Transplantations- und Regenerationsversuche, dienten als Basis für die Entwicklung eines theoretischen Modells zur Achsen- und Musterbildung in *Hydra* durch A. Gierer und H. Meinhardt.

### **1.2.1 Musterbildung in *Hydra* nach Gierer & Meinhardt**

Alan Turing veröffentlichte 1952 seine Arbeiten über die chemischen Grundlagen der Morphogenese. Darin postuliert er, dass zwei interagierende Substanzen mit unterschiedlichen Diffusionsraten in der Lage sind Muster zu bilden. Gierer und Meinhardt fügten diesen Substanzen spezielle Eigenschaften hinzu. Dabei fanden sie zwei wichtige Charakteristika für die Musterbildung. A) ein Aktivator, welcher autokatalytisch auf die eigene Produktion wirkt,

jedoch nur über eine kurze Diffusionsreichweite verfügt und B) ein Inhibitor, dessen Produktion vom Aktivator stimuliert wird, der jedoch gleichzeitig hemmend auf die Synthese des Aktivators wirkt. Darüberhinaus verfügt der Inhibitor über eine längere Diffusionsreichweite als der Aktivator (Abb.1.7).



**Abb.:1.7 Basis-Interaktionen des Reaktions-Diffusions-Modells nach Gierer und Meinhardt** (Gierer und Meinhardt 1972) Der Aktivator stimuliert seine eigene Produktion sowie die Produktion eines Inhibitors. Der Inhibitor reprimiert den Aktivator und kann weiter diffundieren als dieser.

Ausgehend von einem im Gleichgewicht befindlichen Zustand, erzeugt durch eine basale Produktion beider Komponenten, führen zufällige Fluktuationen in der Produktion des Aktivators zu einem lokalen Aktivatormaximum, das durch den autokatalytischen Charakter des Aktivators schnell erreicht und durch die Langreichweiten – Inhibition des gleichzeitig verstärkt produzierten Inhibitors lokal begrenzt bleibt (Gierer und Meinhardt, 1972; Gierer, 1981).

Bezogen auf biologische Systeme sollte darauf hingewiesen werden, dass unter einem Aktivator auch ein ganzes Netzwerk von Substanzen verstanden werden kann, welches dennoch die Eigenschaft der starken Autokatalyse aufweist. Selbige Ergänzung ist auch auf das Inhibitorsystem zutreffend.

Nach den Vorstellungen des Reaktions – Diffusionsmodells zur Bildung biologischer Muster hat sich in adulten Hydren folgendes System etabliert. Das Gradientenpaar, bestehend aus Kopfaktivator und Kopfinhibitor, besitzt sein Maximum in der Kopffregion. Der Kopfaktivator bleibt lokal begrenzt, da der weiter diffundierende Kopfinhibitor die Produktion des Aktivators außerhalb des Aktivatormaximums inhibiert. Da auch der Kopfinhibitor nicht unendlich weit diffundiert, kann sich ein neues Aktivatormaximum erst dort bilden, wo es entsprechend wenig Kopfinhibitor gibt. So können neue Köpfe nur in einem, durch die Diffusionsreichweite des Kopfinhibitors definierten Mindestabstand vom existierenden Kopf, entstehen. Genau dies ist der Grund, warum Hydra immer an einer bestimmten Stelle mit der

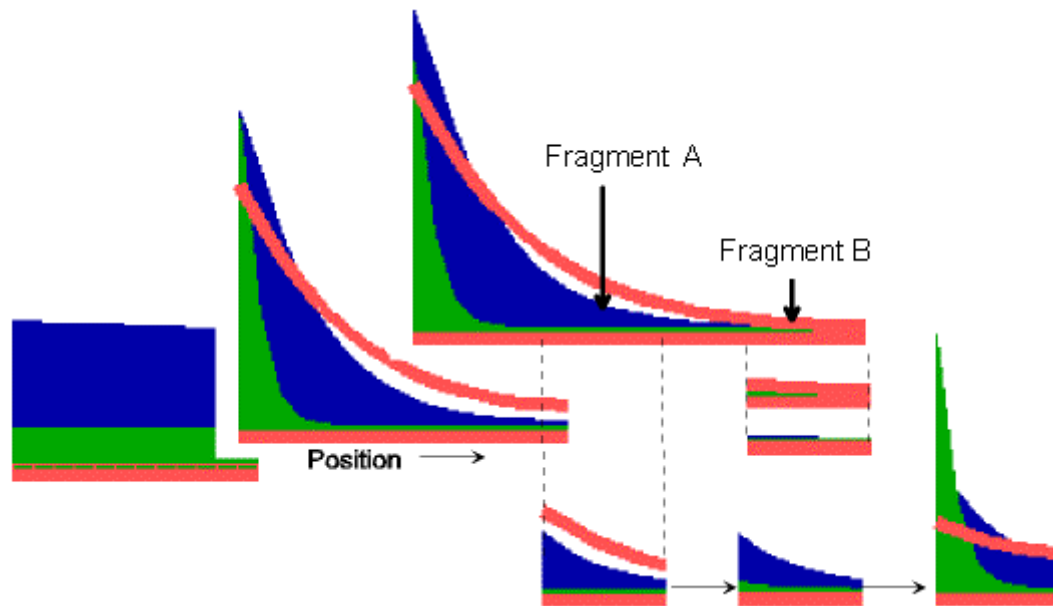
Knospung beginnt. Für die Determinierung des Fußes wird ein analoges Gradientenpaar, bestehend aus Fußaktivator und –inhibitor, angenommen. Bemerkenswerterweise entstehen jedoch nie Knospen, die mit der Bildung des Fußes beginnen und so ohne weiteres in der Nähe des existierenden Kopfes gebildet werden könnten, obwohl dies, gezeigt durch laterale Transplantationsexperimente (MacWilliams 1983a), möglich wäre.

Mit Hilfe dieses Modells ist es auch möglich, die Regeneration bei *Hydra* zu erklären. Entfernt man den Kopf, so entfernt man die Quelle der Aktivatorproduktion. Da die Produktion des Inhibitors direkt von der des Aktivators abhängig ist, wird damit auch das etablierte Zusammenspiel zwischen Inhibitor und Aktivator zerstört. Nach dem Zerfall des Kopfinhibitors sollte das Gewebe in der Lage sein, an jeder beliebigen Stelle einen neuen Kopf zu bilden. Wie bereits gezeigt, bleibt die Polarität jedoch über einen langen Zeitraum erhalten. Dies erfordert die Einführung einer dritten gradierten Größe, der Quelldichte (Meinhardt, 1993). Der Quelldichtegradient beschreibt, wie sensibel das Gewebe, das für die Produktion des Aktivators verantwortlich ist, auf die selbstverstärkende Wirkung des Aktivators reagiert, um selbst verstärkt Aktivator zu produzieren (Abb. 1.8) . Für den Kopfaktivator verläuft dieser Gradient entlang der Körperachse, hat sein Maximum im Kopf und nimmt zum Fuß hin ab. Biologisch veranschaulicht bedeutet das, dass sich im Kopfgewebe eine größere Dichte Kopfaktivator produzierende Zellen befindet, als im Fußgewebe. Dieser Quelldichtegradient ist mit dem bereits eingeführten Positionswert für die Zellen vergleichbar (Wolpert et al., 1974).

Obwohl diese Modelle durch entsprechende Transplantationsexperimente Unterstützung finden, bleibt die Frage nach den molekularen Grundlagen eines solchen Reaktions-Diffusionsmodells offen.

### 1.2.2 Signalmoleküle in Hydra

In den 70er Jahren und fast zeitgleich mit der Entwicklung des Gierer-Meinhardt-Modells wurden die ersten morphogenen Substanzen aus *Hydra* isoliert, die als Fußaktivator bzw. –inhibitor sowie als Kopfaktivator bzw. –inhibitor agieren könnten. An erster Stelle soll dabei das neurogene Peptid „Kopfaktivator“ (Schaller, 1973) Erwähnung finden, das die Tentakelbildung (Schaller, 1973; Schaller et al., 1989; Schaller et al., 1990; Hobmayer et al., 1990; Javois and Frazier-Edwards, 1991; Hobmayer et al., 1997) und Knospenbildung (Schaller, 1973; Hobmayer et al., 1997) stimulieren kann.



**Abb. 1.8: Die Quelldichte als Positionssignal und deren Einfluß auf die Regeneration.** Blau: Quelldichtegradient, Rot: Kopfinhibitor, Grün: Kopfaktivator; Das Fragment A ist in der Lage, nach dem Zerfall des Inhibitors, durch den Einfluß der Quelldichte, an der dem früheren Aktivatormaximum nächstgelegenen Stelle wieder ein Aktivatormaximum zu bilden. Fragment B ist nicht in der Lage zu regenerieren. (Verändert nach Meinhardt, [www.eb.tuebingen.mpg.de/dept4/meinhardt/competen.html](http://www.eb.tuebingen.mpg.de/dept4/meinhardt/competen.html))

Leider konnte, trotz über 25 jähriger Suche, das dem Peptid „Kopfaktivator“ entsprechende Gen nicht nachgewiesen werden. So steht der Beweis noch aus, ob es sich bei diesem Peptid tatsächlich um ein Signalpeptid handelt, oder um ein Abbauprodukt eines anderen Proteins.

Eine genaue Identifizierung und Charakterisierung solcher morphogenetisch aktiven Peptide gelang erstmals mit der Isolierung von Pedin und Pedibin (Hoffmeister, 1996). Beide stimulieren die Fußregeneration, wobei zunächst besonders für Pedin ein direkter Einfluss auf die Kontrolle der fußspezifischen Differenzierung gezeigt werden konnte (Hoffmeister, 1996). Im Zuge eines systematischen Ansatzes zur Identifizierung von Signalpeptiden in *Hydra magnipapillata* (Takahashi et al., 1997) konnten bis jetzt zwei weitere an der Musterbildung beteiligte Peptide beschrieben werden. Hym-346 ist bis auf eine fehlende Aminosäure am C-terminalen identisch mit Pedibin. Sowohl die Behandlung der Tiere mit Pedibin als auch mit Hym-346 führten zu einer apikalen Ausweitung der Expression von *CnNk-2* entlang der Körperachse. Eine solche Verlängerung der Expression dieses „Fußmarkergenes“ korreliert mit einer Abnahme des Positionswertes, oder anders ausgedrückt der Quelldichte. Laterale Transplantationsexperimente mit zuvor peptidbehandeltem Gewebe führten zu einer vermehrten Bildung von Fußstrukturen. Sowohl für Pedipin als auch Hym-346 konnte somit gezeigt werden, dass diese aktiv den Positionswert der Körpersäule herabsetzen und

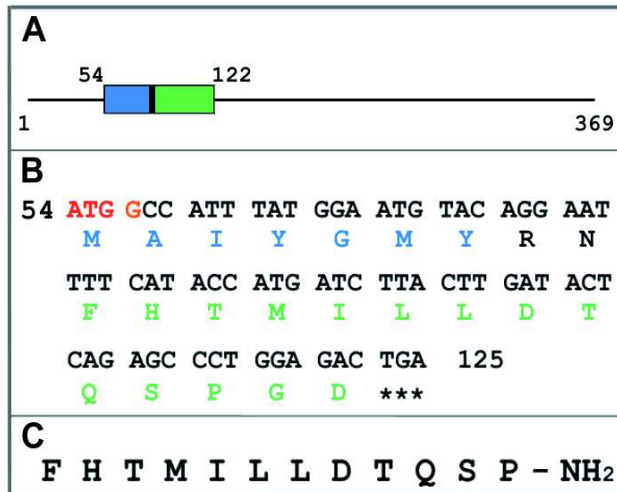
verstärken damit den Verdacht, dass Peptide einen signifikanten Platz bei den Musterbildungsprozessen einnehmen (Grens et al., 1999).

Das zweite neue Peptid Hym-323 ist ebenfalls am Prozess der Fußdifferenzierung beteiligt (Harafuji et al., 2001). Dabei zeigte es ähnlich wie Hym-346/Pedibin bei lateralen Transplantationsexperimenten eine Fußgewebe induzierende Wirkung (Harafuji et al., 2001). Bei *Hym-323* handelt es sich um ein ausschließlich im Gastralbereich von *Hydra* exprimiertes Gen, das für ein 62 Aminosäure langes Vorläuferpeptid (Propeptid) kodiert. Das aktive Peptid Hym-323 ist jedoch nur 16 Aminosäure lang und befindet sich am C-terminalen Ende des Propeptides. Ein weiteres Indiz für die Fußgewebe induzierende Wirkung ist der Effekt, den Hym-346/Pedibin und Hym-323 auf die Expression der Astacin-Matrixmetalloprotease *Farm1* haben, welche in unbehandelten Tieren im Gastralbereich des Ekto- wie des Endoderms transkribiert wird. Die Expression von *Farm1* erfährt eine drastische Herunterregulierung, wenn man Polypen in den Peptiden Hym-346/Pedibin und Hym-323 inkubiert (Kumpfmüller et al., 1999). Die Expression von *Farm1* ist abhängig vom Positionssignal, da es ausschließlich im Gastralbereich transkribiert wird und nicht im Kopf- oder Fußgewebe. Jede Veränderung dieses Positionssignals muss zu einer Reprimierung der Transkription von *Farm1* führen. Da, wie zu vor beschrieben, die Peptidinkubation genau diese Wirkung auf die Expression von *Farm1* hat, liegt es nahe zu vermuten, dass auch Hym-323, genau wie Hym346/Pedipin, den Positionswert des Gewebes verringert (Bosch, 2001).

#### **1.2.2.1 Das Signalpeptid HEADY in Hydra (Lohmann and Bosch, 2000)**

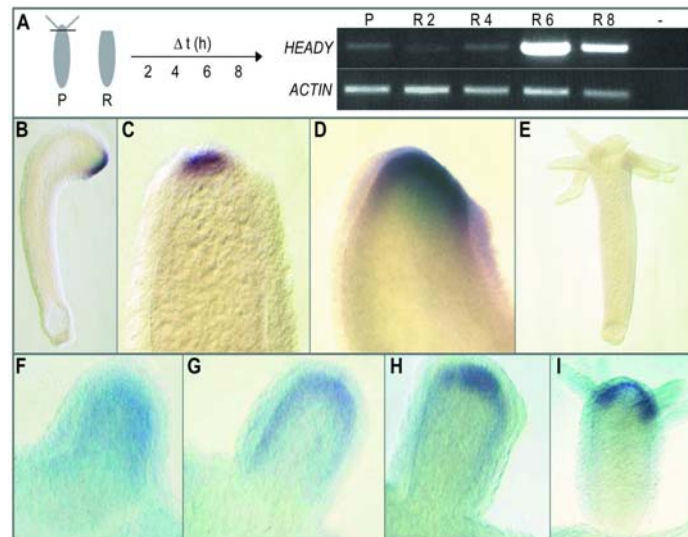
Die einzigen bekannten und genauer charakterisierten Peptide, die für die Induktion eines Apikalen- oder Kopfschicksales in *Hydra* von Bedeutung sind, sind das bereits erwähnte Neuropeptid „Kopffaktivator“ und das Signalpeptid HEADY.

Die für HEADY codierende Nukleotidsequenz wurde bei einem „DD-PCR-Screening“ nach Genen entdeckt, die in die *de novo* Achsenbildung aus Zellaggregaten involviert sind. Das *Heady* Transkript ist 369 Basen lang und weist einen offenen Leserahmen von 69 Basen auf. Nach dem Abspalten eines Signalpeptides wird für das aktive Peptid eine Länge von nur 12 Aminosäuren mit einer C-terminalen Amidierung vorhergesagt (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9: HEADY mRNA- und Proteinstruktur.** (A) Struktur des Transkripts. Die Nukleotide 54-122 codieren für das Vorläuferprotein. Blau: Signalpeptid, Schwarz: Prozessierungsstelle, Grün: Propeptid. (B) cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz des HEADY-Propeptids. (C) Aminosäuresequenz des aktiven Peptids (verändert nach Lohmann und Bosch, 2000)

Die Transkription von *Heady* wird 6 Stunden nach dem Dekapitieren während der Regeneration adulter Tiere induziert. Dabei kommt es nur zu einer transienten ca. 2 h dauernden Expression des Gens in einer kleinen Zahl apikal gelegener entodermaler Zellen (Abb. 1.10). Dies ist unabhängig von der genauen Lage der Schnittstelle und steht damit im Gegensatz zu vielen bekannten, kopfspezifisch exprimierten Genen. Deren Expression verzögert sich je, proximaler die Schnittstelle vom Kopf entfernt liegt. Außerdem wird *Heady* während des Knospungsprozesses zunächst im gesamten Entoderm der sich entwickelnden Knospe, später auch hier nur in den am weitesten apikal gelegenen Zellen, exprimiert (Abb. 1.10).



**Abb. 1.10: Die Expression von HEADY ist während der apikalen Spezifizierung vorübergehend induziert.** (A) Expression von *HEADY* während der Kopfregeneration. Die RT-PCR zeigt ein Maximum der Expression nach 6 Stunden (R6). Nach 8 Stunden (R8) ist die Expression deutlich reduziert. (B) „Whole-mount“ in situ Hybridisierung im regenerierenden Polypen 6 Stunden nach der Dekapitation. (C) und (D) Die *HEADY*-Expression ist auf das Entoderm beschränkt. (E) Intakter adulter Polyp. (F) bis (I) Expression von *HEADY* während der Knospung. Während des Knospenswachstums verlagert sich die Expression aus dem gesamten Entoderm der Knospe (F und G) zu den am weitesten apikal gelegenen Zellen (H und I). (verändert nach Lohmann und Bosch, 2000)

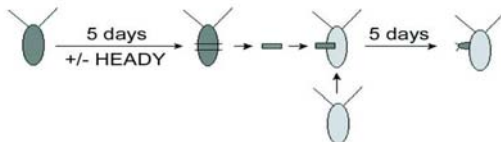


Eine erste immunozytochemische Untersuchung des HEADY - Peptides konnte zeigen, dass HEADY in Vesikeln gespeichert ist. Es wird angenommen, dass das Entleeren der Vesikel zu einer frühen Phase des Kopfregenerationsprozesses erfolgt und die transiente Expression mit der anschließenden Translation, dem Auffüllen der entleerten Vesikel dient.

Die vorübergehende Expression des Gens und die kurzfristige Ausschüttung des Peptids, ausschließlich während der frühen Achsenbildungsprozesse, deuten auf eine Rolle bei der Induktion des apikalen Poles der Achse und nicht bei deren Aufrechterhaltung hin.

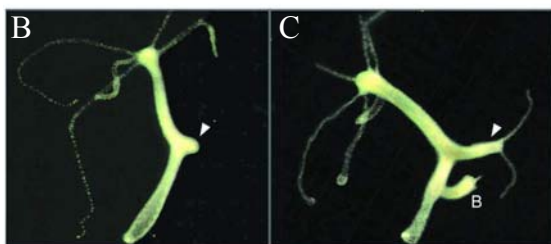
Weitere Versuche bekräftigen diese Vermutungen. So konnte bei dem mutanten Stamm *Hydra magnipapillata* reg-16, dessen Kopfregenerationsfähigkeit stark eingeschränkt ist, keine Induktion der *Heady* Expression nach Dekapitierung festgestellt werden. RNA - Interferenz Experimente, die zu einem zeitlich begrenzten Ausschalten (Knock-out) des Gens führen, hatten zur Folge, dass die damit behandelten Tiere im Vergleich 2 d länger als die Kontrolltiergruppe für die Regeneration von apikalen Strukturen benötigten. Die Inkubation von Polypen in einer  $10^{-6}$  M HEADY Lösung führte zu einem durchschnittlich 1,5 d früheren Einsetzen der Knospung. In lateralen Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass in HEADY-Peptid inkubiertes Spendergewebe signifikant häufiger zur Ausbildung einer sekundären Achse beim Empfänger führt als nicht inkubiertes Kontrollgewebe (Abb. 1.11).

A



**Abb 1.11: Einfluss des HEADY - Peptides auf die Induktion von apikalen Strukturen.**

(A) Experimentelle Vorgehensweise bei der lateralen Transplantation, schematisch dargestellt (Sugiyama, 1982). (B) Kontrollimplantat (Pfeilspitze) zeigt keine sich differenzierenden Strukturen. (C) HEADY-behandeltes Implantat (Pfeilspitze) entwickelt eine zweite Achse mit der typischen Kopfmorphologie. B eine sich entwickelnde Knospe der primären Körperachse



Die offensichtliche Veränderung die das Gewebe erfährt, wird zwar durch HEADY induziert, die Veränderung vollziehen werden jedoch eine ganze Reihe, derzeit noch unbekannter Gene. Eine Analyse dieser Zielgene, unter anderem Gegenstand dieser Arbeit, wird einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Achsendeterminierung erlauben.

Abschließend soll die Tatsache Erwähnung finden, dass Peptide in *Hydra* nicht nur bei der Achsendeterminierung oder an der Aufrechterhaltung der Achsen beteiligt sind. Die schon erwähnte systematische Suche nach Signalpeptiden (Takahashi et al., 1997) führte unter anderem zur Isolation von Hym-355 und Hym-33H, die gegenläufige Effekte auf die Nervenzelldifferenzierung haben und damit zur Homöostase zwischen Nervenzellen und Epithelzellen beitragen (Bosch and Fujisawa, 2001). Peptide scheinen also eine zentrale Rolle als Signalmoleküle bei der Entwicklung von *Hydra* zu spielen.

### 1.2.3 Regulatorische Gene in Hydra

Bei der Mehrzahl der im Folgenden zu beschreibenden Genen, deren Genprodukte im Gegensatz zu den Signalpeptiden, direkten Einfluss auf die Transkription entsprechender Zielgene haben, handelt es sich um hochkonservierte Transkriptionsfaktoren. Schon länger ist bekannt, dass die unterschiedlichsten Organismen des Tierreichs dieselbe molekulare Maschinerie in Form konservierter Gene oder sogar Signaltransduktionswege für basale Entwicklungsvorgänge nutzen. So sind auch viele an Musterbildungs- und Zelldifferenzierungsprozessen beteiligte *Hydra*-Gene Orthologe von in Bilateriern beschriebenen Genen (Bosch und Khalturin, 2002).

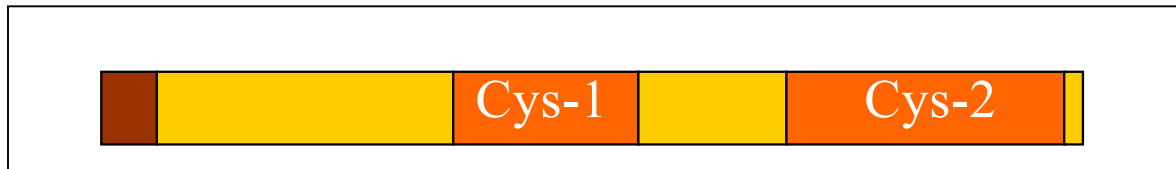
Ein populäres und faszinierendes Lehrbuchbeispiel dafür, wie nicht nur der Signaltransduktionsweg als Mechanismus, sondern auch die Funktion bei gleichzeitig völlig verschiedener Morphologie erhalten bleiben kann, ist das *Pax-6*-Gen, das sowohl in *Drosophila* (hier *eyeless* genannt), als auch in Vertebraten für die Augenentwicklung notwendig ist. Die Konservierung ist so stark, dass die Expression des Wirbeltiergens *Pax-6* in der Fruchtfliege Augenbildung induziert (Halder, 1995).

#### 1.2.3.1 Wnt Signaltransduktion

Die Komponenten des Wnt - Signaltransduktionsweges, der in *Drosophila* und Vertebraten für die Etablierung der dorsal-ventral Achse verantwortlich ist, konnten als stark konservierte Orthologe aus *Hydra* isoliert werden (Hobmayer et al., 1996 und 2000). Das Expressionsmuster der Gene *Wnt*, *Dishevelled*, *GSK3*,  $\beta$ -*Catenin* und *Tcf/Lef* im Zusammenhang mit funktionellen Tests legen auch für die aus *Hydra* beschriebenen Komponenten des Wnt - Signaltransduktionsweges eine Rolle bei der Achsenbildung nahe.

Die Gene *Hyβ-Catenin*, *HyTcf* und *HyWnt* werden extrem früh während der Knospenbildung, Regeneration und de novo Achsenbildung aus Aggregaten in der Organisatorregion des zukünftigen Hypostoms exprimiert (Hobmayer et al., 2000). Die Konservierung des Signaltransduktionsweges kann durch ein eindrucksvolles Experiment gezeigt werden. Die Injektion des *Hyβ-Catenin* Transkripts in die ventralen Blastomere eines Xenopusembryos induziert in 100 % der Fälle die Bildung einer sekundären Achse bei der sich entwickelnden Froschlarve (Hobmayer et al., 2000).

Der Gegenspieler zu Wnt in *Xenopus* ist *Dickkopf-1*, der Prototyp der bisher nur für Wirbeltiere beschriebenen Dickkopf - Genfamilie (Glinka et al., 1998). Die 4 Vertreter codieren für konservierte, sekretierte Proteine. Dkk-1 wird im Spemannorganisor exprimiert und nimmt eine Schlüsselrolle bei der Kopfbildung des Krallenfrosches (*Xenopus*) ein (Glinka et al., 1998). Während Dkk-1 und Dkk-4 als Inhibitoren des bereits erwähnten Wnt-Signaltransduktionsweges wirken, sind die Eigenschaften von Dkk-2 und Dkk-3 gänzlich unbekannt (Krupnik et al., 1999; Monaghan et al., 1999). Charakteristisch für alle Gene der Dickkopffamilie ist die Existenz zweier cysteinreicher Domänen, die durch ein Verbindungsstück voneinander getrennt sind (Aravind and Koonin, 1998; Monaghan et al., 1999; Krupnik et al., 1999). Jede der beiden Domänen besteht aus 10 konservierten Cysteinresten (Abb.1.12).



**Abb 1.12: Struktur des sekretierten Proteins Dickkopf-1.** Die beiden für die Dickkopffamilie charakteristischen cysteinreichen Domänen sind rot gekennzeichnet. Am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid (braun), das abgespalten wird.

Allgemein wird für die Proteine der Dickkopffamilie eine Rolle bei den verschiedensten induktiven Prozessen während der Embryogenese und im adulten Organismus angenommen (Monaghan et al., 1999).

### 1.2.3.2 Hox gene

Die Hoxgene gaben den ersten Hinweis auf die Konservierung von Entwicklungsgenen aufgrund der Ähnlichkeiten der Homöoboxmotive zwischen Genen aus *Drosophila* und aus

Vertebraten. Alle Homöoboxgene kodieren für Proteine mit einer charakteristischen DNA-bindenden Domäne, dem Homöoboxmotiv, und haben als Transkriptionsfaktoren grundlegende Bedeutung bei Musterbildungsprozessen entlang der anterior-posterioren Achse (Gehring, 1993). Auch aus *Hydra* wurden inzwischen sogenannte Hox- und paraHox-Gene isoliert (Schummer et al., 1992, Gauchat 2000). Eines dieser Gene in *Hydra* ist *Cnox-2* (*cnidarian homeobox gene 2*), dem ebenfalls eine Funktion bei der Achsenbildung zugeschrieben wird (Schummer et al. 1992, Shenk et al., 1993). Nach neueren Erkenntnissen ist *Cnox-2* mit dem paraHox-Gen *Gsx/Gsh* der Vertebraten am nächsten verwandt, das bei der Entwicklung des Gehirns eine Rolle spielt (Brooke, 1998). In *Hydra* wird es in der Körpersäule und im Fuß exprimiert und nur sehr schwach im Kopf (Shenk et al., 1993).

Das Auffinden von orthologen Genen der Hox- und paraHox-Genefamilie und des Wnt – Signaltransduktionsweges zeigt, dass sowohl die Vertreter der dorsal - ventral Achsenorientierung als auch die der anterior - posterioren Orientierung an der Bildung der apikal - basalen Achse in *Hydra* beteiligt sind. Die Frage des Ursprungs der Hydraachse bleibt aber ungeklärt.

### 1.2.3.3 Budhead

*Budhead* wird permanent in der apikalen Organisatorregion der adulten *Hydra* und während der Achsenbildung bei Regenerations- und Knospungsprozessen exprimiert, was eine entscheidende Funktion in der Kopf- und Achsenbildung nahe legt (Martinez, 1997). *Budhead* ist homolog zu den entwicklungsrelevanten Transkriptionsfaktoren der forkhead/HNF-3 Familie, die auch in Tunikaten und Wirbeltieren für die Achsenbildung im sich entwickelnden Embryo erforderlich sind (Kaufmann and Knochel, 1996; Olsen and Jeffery, 1997). So wird das Gen *XFKH1* (*Xenopus forkhead 1*) im Organisationszentrum des Embryos, der dorsalen Blastoporuslippe, beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) exprimiert und ist dort an der Initiation der Gastrulation beteiligt (Dirksen and Jamrich, 1992).

### 1.2.3.4 Brachyury

In Vertebraten ist *Brachyury* für die Bildung des Mesoderms erforderlich und wird zu Beginn der Gastrulation in mesodermalen Vorläuferzellen um den Blastoporus und später auch in der

Neuralleiste exprimiert (Smith, 1997). Die diploblastischen Cnidaria besitzen kein Mesoderm, aber trotzdem wurde ein dem *Brachyury* homologes Gen *HyBra-1* in *Hydra* gefunden (Technau und Bode, 1999). Hier ist es bei adulten Tieren in endodermalen Zellen des Hypostoms exprimiert, außerdem sehr früh im zukünftigen Hypostom während der Regeneration und der Bildung neuer Knospen, schon bevor das Entstehen der Knospe morphologisch erkennbar ist (Technau und Bode, 1999). Die stammesgeschichtlich ursprüngliche Funktion des Gens scheint in der Bestimmung einer Blastoporusregion zu liegen, die neue Achsen induzieren und ausbilden kann (Technau, 2001).

### 1.2.3.5 Goosecoid

In vielen Organismen wird die Achsenbildung durch sogenannte Organisatorregionen initiiert. *Goosecoid*, ein Transkriptionsfaktor, ist ein wichtiger Vertreter der Gene die an der Etablierung des Spemann-Mangold Organisationszentrums in *Xenopus* beteiligt sind. Dabei aktiviert es eine große Anzahl verschiedener Gene des Organisators, der sich aus Zellen des Nieuwkoop Zentrums rekrutiert. Die Aktivierung der Transkription von *Goosecoid* selbst ist durch Moleküle des Nieuwkoop Zentrums geregelt. Dabei steht die Transkription unter der Kontrolle von Siamois, das als kritisch für die Expression Organisator - spezifischer Gene erachtet wird (Fan and Sokol 1997; Kessler et al. 1997; Laurent et al. 1997). Die transkribierte mRNA von *Goosecoid* erstreckt sich über das gesamte Gebiet des Spemann-Mangold Organisators, nicht aber darüber hinaus. Da Siamois theoretisch in der gesamten dorsalen Hälfte aktiv sein kann, man aber *Goosecoid* nur im begrenzten Bereich des Organisators findet, kann das nur mit der Interaktion eines weiteren Proteins erklärt werden. Es wurde erkannt, dass die *Goosecoid* Expression in dem Bereich am stärksten ist, wo das Siamois Protein synergistisch mit Signalen der TGF- $\beta$  Familie, die im dorsal vegetativen Bereich exprimiert werden (Nieuwkoop Zentrum), interagieren (Brannon und Kimelman, 1996; Engleka and Kessler, 2001). Es wird demzufolge durch Signale des Nieuwkoop Zentrums in den Zellen des Spemann-Mangold Organisators die *Goosecoid* Transkription initiiert. Aktives *Goosecoid* Protein erledigt innerhalb des Organisators 3 wichtige Aufgaben (1.) Es aktiviert die Fähigkeit der Zellen der dorsalen Blastoporuslippe zu migrieren. (2.) Es determiniert das dorsal, mesodermale Schicksal der Zellen, die es exprimieren. (3.) Es ermöglicht den *goosecoid* exprimierenden Zellen, benachbarte Zellen in die dorsale Achse zu integrieren. Davon abgesehen hat *Goosecoid* die Fähigkeit die Gehirnbildung im anterioren Mesoderm und das Gehirnektoderm zu induzieren, indem es *Otx2* aktiviert (Blitz and Cho, 1995).

Ein *Goosecoid* homologes Gen konnte ebenfalls aus *Hydra* isoliert werden (Broun et al., 1999). Dabei fallen diesem Gen während der Kopfentwicklung wahrscheinlich 2 verschiedene Rollen zu. Da es an der Grenze zwischen dem Hypostom und der Tentakelbildungszone im Entoderm exprimiert wird, scheint es plausibel, dass das Gen zur Determinierung der Grenze dieser beiden Regionen beiträgt. Die Gewebedynamik im adulten Tier macht eine solche Festlegung immer wieder aufs Neue erforderlich. Dabei könnte eine in *Xenopus* bestehende Interaktion zwischen Xgsc und Xbra als Erläuterung der Vorgänge dienen. Nach der Gastrulation liegen die beiden Proteine in benachbarten Regionen vor und nicht wie vor der Gastrulation überlappend. In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass dies durch die Inhibition der Expression von Xbra durch Xgsc erreicht wird (Artinger et al., 1997). Da durch Broun et al. (1999) ebenfalls gezeigt werden konnte, dass Cngsc in *Xenopus* Induktionsexperimenten die Rolle von Xgsc übernehmen kann, ist es sinnvoll auch die Inhibition der Expression von *Hybra 1* durch Cngsc anzunehmen.

Desweiteren wird *Cngsc* in den am weitesten apikal gelegenen hypostomspezifischen Neuronen exprimiert. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Arbeiten an *Xenopus*, in denen die Rolle von *Goosecoid* bei der Induktion von neuronalen Strukturen im anterioren Teil des *Xenopus* Embryos erörtert wurde (Blitz and Cho, 1995). So ist anzunehmen, dass *Cngsc* an der Differenzierung von ganz bestimmten, im Hypostom liegenden Nervenzellen beteiligt ist.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe der Methoden zur Erstellung von Expressionsprofilen sollen Gene und genetische Kaskaden identifiziert und charakterisiert werden, die bei der Musterbildung, d.h. im speziellen bei der Kopfregeneration und Knospung, in *Hydra* eine Rolle spielen.

Das mit der Musterbildung bei Kopfregeneration und Knospung eng verknüpfte Peptid HEADY diene als Ausgangspunkt für einen weiteren Weg, sich der Frage nach den ablaufenden Prozessen, beider Mechanismen zu nähern. Besonders im Blickpunkt stehen dabei die Gene, deren Expression durch die Expression von *Heady* Veränderungen erfahren. Obwohl in *Hydra* einige homologe Gene und deren Funktion beschrieben sind, unterscheidet sich der Prozess der Musterbildung im Vergleich zu anderen Organismen doch erheblich. Es bestand die Hoffnung, so interessante, unbekannte Gene zu identifizieren, die an der Kopfregeneration und Knospung beteiligt sind.

Langfristig gesehen sollen so Schritt für Schritt die genetischen Kaskaden aufgeklärt werden, die zur Ausbildung der am stärksten differenzierten Struktur bei *Hydra*, dem Kopf, führen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Identifizierung von HEADY Zielgenen durch die Erstellung und den Vergleich von Expressionsprofilen nach HEADY – Behandlung

Wie in lateralen Transplantationsexperimenten durch Lohmann und Bosch (2000) gezeigt werden konnte, induziert synthetisch hergestelltes HEADY-Peptid die Bildung einer 2. Achse. Die Veränderungen, die das Gewebe durch die HEADY – Behandlung erfährt, wird wohl durch HEADY induziert, die Veränderung vollziehen jedoch eine ganze Reihe, derzeit noch unbekannter Gene. Es bestand die begründete Hoffnung, dass sich die im Vergleich von Expressionsprofilen HEADY – behandelte Tiere gegenüber unbehandelten Tieren ergebenden Unterschiede erste Einblicke in die Wirkmechanismen von HEADY ermöglichen. Für die Erstellung der Expressionsprofile kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz, i) D(ifferential) D(isplay) - PCR und ii) S(upression) S(ubtractive) H(ybridisation) mit anschließender differenzieller Hybridisierung von cDNA Macroarray's.

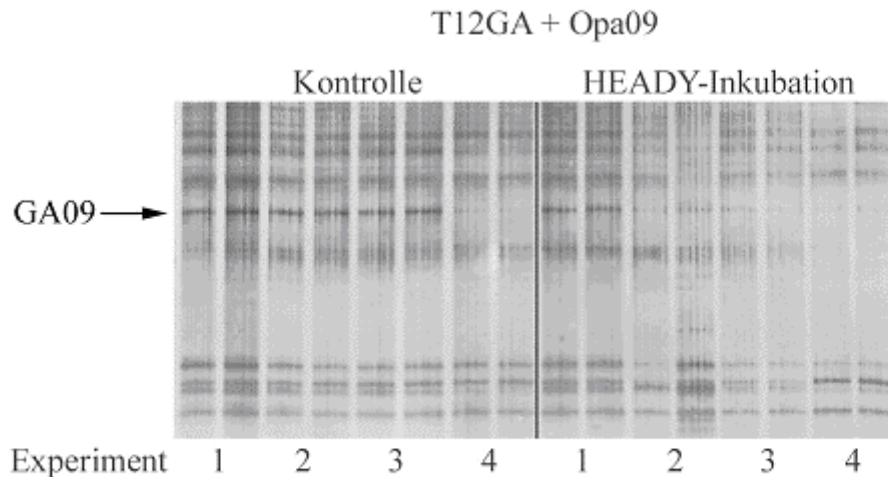
#### 2.1.1 Ein Dickkopf homologes Protein in *Hydra*

##### 2.1.1.1. Isolation und Sequenzanalyse von HyDkk-3 cDNA

Aufgrund der erfolgreichen Isolation von differentiell exprimierten Genen mittels DD-PCR (Lohmann and Bosch 2000, Khalturin et al., 2003) wurde zunächst diese Methode angewendet, um die Veränderungen der Genexpression nach HEADY – Behandlung sichtbar zu machen. Dafür wurden junge Hydren (Knospen die sich gerade vom Muttertier gelöst hatten) mit  $10^{-6}$ M synthetisch hergestelltem HEADY für 5 Tage inkubiert. Für den Vergleich der Expressionsprofile wurde die gleiche Anzahl junger Hydren in normalem Hydromedium über den gleichen Zeitraum gehalten. Aus diesen Tieren wurde entsprechend PolyA<sup>+</sup> - RNA isoliert und mit 2 verschiedenen Ankerprimern (T<sub>12</sub>GC und T<sub>12</sub>GA) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente dann als Matrize für die DD-PCR. In der PCR kamen die verschiedenen Kombinationen aus den beiden Ankerprimern und 17 verschiedenen OPA Random - Primern zum Einsatz. Um eine verlässliche Aussage über die Differenzialität machen zu können, wurden cDNA's aus vier unabhängigen Inkubationsexperimenten als Matrize eingesetzt. Abb. 2.1 zeigt einen Ausschnitt eines Polyacrylamidgels, auf dem die PCR-Produkte der



Primerkombination T<sub>12</sub>GA und OPA 9 aufgetragen wurden. Hier zeigt sich, dass das mit GA09 bezeichnete Fragment häufiger aus der Kontroll cDNA amplifiziert werden konnte, als aus der cDNA der mit HEADY behandelten Tiere. Die Spalte 4 der Kontrolle und die Spalte 1 aus der HEADY – Inkubation sind höchstwahrscheinlich vertauscht wurden.



**Abb. 2.1: Polyacrylamidgel mit DD-PCR-Produkten.** Hinter Bande GA09 (Pfeil) verbirgt sich voraussichtlich ein Genfragment, dessen Expression durch die HEADY-Inkubation reprimiert wird.

Die Sequenzanalyse der 615 bp großen Bande aus Abb. 2.1 ergab eine Homologie zu einem Teil der ersten und zur gesamten zweiten cysteinreichen Domäne, die typisch für das Dickkopf 3 Protein der Ratte (*Rattus norvegicus*) sind. Die vollständige cDNA wurde durch 5'RACE und 3'RACE PCR ermittelt. Wie aus der Abb.2.2 ersichtlich, ist die vollständige cDNA 882 bp lang. Der Offene Leserahmen (O(pen) R(eading) F(rame)) ist deutlich durch ein Startcodon (ATG) und mehrere Stopcodons determiniert. In der vorhergesagten 5' untranslatierten Region befinden sich 2 Stopcodons, die durch die Sequenzierung der entsprechenden genomischen Region verifiziert wurden. Das vorhergesagte Protein hat ein Molekulargewicht von 21,2 kDa. Durch eine computergestützte Analyse der N-terminalen Region des vorhergesagten Proteins konnte eine 17 Aminosäure lange Signalsequenz identifiziert werden. Zwischen der 17. und 18. Aminosäure befindet sich des weiteren eine Schnittstelle für die Endopeptidase des ER (Abb 2.2 A).

**A**

```

1 AGATTTTCATTAATTTTATGCTAGTCAAATATTTATAAAAAATATAAAGATATATAACGAAAATGTCGAAACTATTTATATCTATACG
                                     M S K L F I I Y T
91 TTTTGTATTTTGTTCGCTATGCAGAAGACAAAAAGGTTCCAAAACCAAGTCGCACCTTCGTTAGAAAAAGAGGCGATATACAGCCTCGC
   F C I F V A Y A E D K K V P K P V A P S L E K R G D I Q P R
181 ATGCTTGTCCAGGATATTACTCTCAAGAATGTAACGCCACAAAAGCTTGCCTGAGAAAAATATTGCCATTTGTTTCTATGTGTTTCAT
   M L A P G Y Y S Q E C N A H K A C P E K K Y C H L F L C V H
271 TGCTTAAAGAGAACGTAGCCTGCACACAGAATGGCCAATGCTGTGAAGGACAGTGTACTTATGGAAGATGTAAGCTGGTGTCTGAA
   C L K E N V A C T Q N G Q C C E G Q C T Y G R C K A G V S E
361 GGACAACCAGGAACATTTTGTGATAGACACGAGGATTGTGCTGGAGAAGGAAAAGCGGCTTGTGTGTAAGAGAACCAGCCATAAACCCCT
   G Q P G T F C D R H E D C A G E G K A A C C V R E P A I N P
451 CATATATCTATATGCAAGCCACCATTGGCTGAAAACATGGTTTGGCGACCAATAAACTTTTTCAGAAATGTTTACGTTGGAGCTCAAGTA
   H I S I C K P P L A E N M V C G P I N F F R N V Y V G A Q V
541 CAAAAAGCATGCGACCTTGCAAACAAGCGTTATATGCAAGCAAGTTGGTCTTTTTGGAATTCACGAAATATGTATGAAGGAAGATGAT
   Q K A C G P C K Q A L I C K Q V G L F G I H E I C M K E D D
631 AAAAAAGAAATAGACACAAAAGTAAAATCCAACATGTATCACTAGGTACTGATTACAAATCCACACCAAGCAAGCAAACACAAACAATAA
   K K K *
721 TGTAAATAAATGTACTGACAAATAATAGGAAGCAAATAAATGTTTTATACCCAGTTTATTCAACCAATATGTTCTATTAACGAAATGG
811 TTTTCTCAATAGAATAAGTATTTTTGGCGTTATGTTTTTAAATAAATTTATATATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

**B**

Cysteinreiche Domäne I

<b>HDkk-3</b>	144	SHE	CI	I	D	E	D	C	G	P	S	M	Y	C	Q	F	A	S	F	Q	Y	T	C	Q	P	C	R	G	Q	R	M	L	C	T	R	D	S	E	C	C	G	D	Q	L	C	V	W	G	H	C	T	K	M	A	T	R	G	S	N	G	T	I	207
<b>MDkk-3</b>	144	SHE	CI	I	D	E	D	C	G	P	T	R	Y	C	Q	F	S	S	F	K	Y	T	C	Q	P	C	R	D	Q	Q	M	L	C	T	R	D	S	E	C	C	G	D	Q	L	C	A	W	G	H	C	T	Q	K	A	T	K	G	G	N	G	T	I	207
<b>GDkk-3</b>	136	NHE	CI	I	D	E	D	C	E	T	G	K	Y	C	Q	F	S	T	F	E	Y	K	Q	P	C	K	T	Q	H	T	H	C	S	R	D	V	E	C	C	G	D	Q	L	C	V	W	G	E	C	R	K	A	T	S	R	G	E	N	G	T	I	199	
<b>HyDkk-3</b>	47	SQE	C	N	A	H	K	A	C	P	E	K	K	Y	C	H	L	--	F	--	L	C	V	H	C	L	K	E	N	V	A	C	T	Q	N	G	Q	C	C	E	G	Q	C	T	Y	G	R	C	K	A	G	V	S	E	G	P	G	T	F	105			

Cysteinreiche Domäne II

<b>HDkk-3</b>	208	CDN	Q	R	D	C	---	Q	P	G	L	C	C	A	F	Q	R	G	L	--	L	F	P	V	C	T	P	L	P	V	E	G	E	L	C	H	D	P	A	S	R	L	L	D	L	I	T	W	E	L	P	D	G	A	L	D	R	C	235
<b>MDkk-3</b>	208	CDN	Q	R	D	C	---	Q	P	G	L	C	C	A	F	Q	R	G	L	--	L	F	P	V	C	T	P	L	P	V	E	G	E	L	C	H	D	P	T	S	Q	L	L	D	L	I	T	W	E	L	P	E	G	A	L	D	R	C	235
<b>GDkk-3</b>	200	CEN	Q	H	D	C	---	N	P	G	T	C	C	A	F	Q	K	E	L	--	L	F	P	V	C	T	P	L	P	E	E	G	E	P	C	H	D	P	S	N	R	L	L	N	L	I	T	W	E	L	P	D	G	V	L	E	R	C	257
<b>HyDkk-3</b>	106	CDR	H	E	D	C	A	G	E	G	K	A	A	C	C	V	R	E	P	A	I	N	P	H	I	S	I	C	K	P	L	A	E	N	M	V	C	-	G	P	I	N	F	R	N	V	Y	V	G	A	---	Q	V	Q	A	C	G	164	

C    DC            CC            C P            C P            C

<b>HDkk-3</b>	236	PC	A	S	G	L	L	C	Q	P	H	-	S	H	S	L	V	Y	V	C	K	P	T	257
<b>MDkk-3</b>	236	PC	A	S	G	L	L	C	Q	P	H	-	S	H	S	L	V	Y	M	C	K	P	A	257
<b>GDkk-3</b>	258	PC	A	S	G	L	I	C	Q	P	S	S	H	S	T	S	V	C	E	L	S	280		
<b>HyDkk-3</b>	165	P	C	Q	A	L	I	C	K	Q	V	G	L	F	G	I	H	E	I	C	M	K	E	187

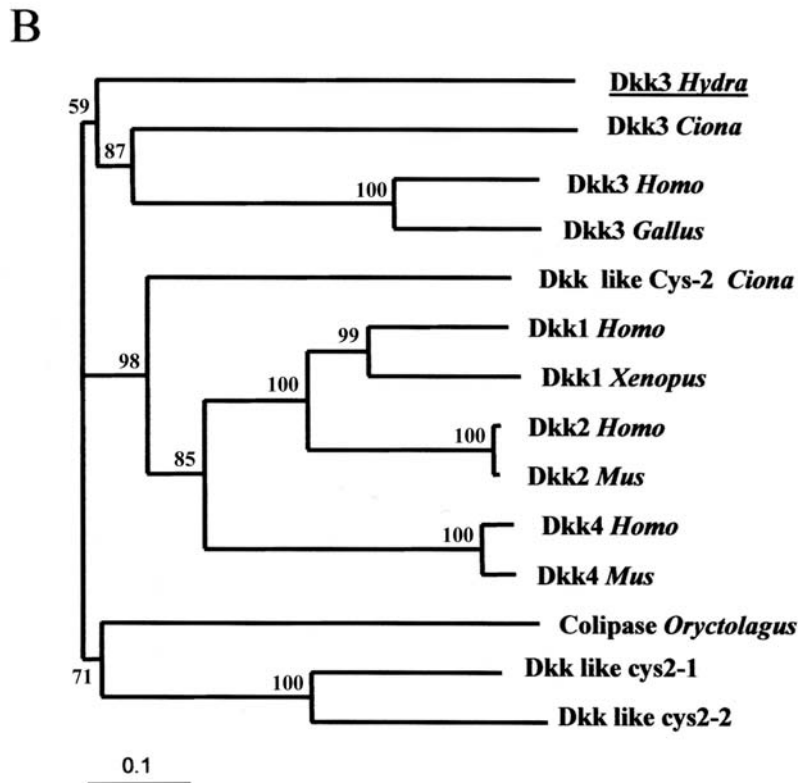
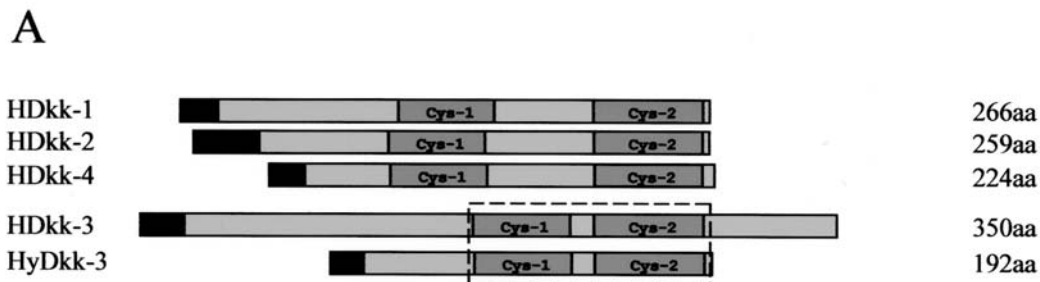
P C    L C                            C

**Abb. 2.2: Hydra Dkk-3 Nukleotidsequenz mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz; Gruppierung zu der Dickkopffamilie. (A)** Nukleotidsequenz und vorhergesagte Aminosäuresequenz von *HyDkk-3*. Das vorhergesagte Signalpeptid ist unterstrichen. Die mögliche Endopeptidaseschnittstelle wurde mit Hilfe des Pfeils sichtbar gemacht. Die cysteinreiche Domäne I ist dunkelgrau, die cysteinreiche Domäne II ist hellgrau unterlegt. Das Startcodon und die Stopcodons sind fett hervorgehoben. **(B)** Vergleich der Aminosäuresequenz der cysteinreichen Domäne I und der cysteinreichen Domäne II von *Hydra Dkk-3* mit der korrespondierenden Region des Dkk-3 Proteins aus dem Menschen (HDkk-3), der Maus Dkk-3(MDkk3) und dem Hühnchen (GDkk-3) (aus Fedders et al., im Druck).

Durch die Anwendung eines Suchalgorithmus BLASTX, der die vollständige Nukleotidsequenz des *Hydra* Gen in alle sechs möglichen ORF's translatiert und diese dann

mit der Proteindatenbank am N(ational) C(enter) for B(iotechnology) I(nformation) vergleicht, konnte eine Sequenzhomologie mit dem Dickkopf 3 Protein des Hühnchens (*Gallus gallus*) nachgewiesen werden. Besonders homolog sind dabei die Bereiche, die als cysteinreiche Domänen beschrieben worden sind. Jede der zwei Domänen hat 10 Cysteinreste, deren Verteilungsmuster hochkonserviert ist (Abb. 2.2.B). Die Cysteinreste stellen eine wesentliche Stütze der 3D-Struktur der Proteine dar, da sie in der Lage sind, sehr stabile Disulfidbrücken auszubilden. Aber nicht nur die Verteilung der Cysteine in den jeweiligen Domänen stimmen zwischen dem Hühnchen Dickkopfprotein und dem *Hydra* Gen überein, auch der Abstand zwischen der cysteinreichen Domäne I (cys I) und der cysteinreichen Domäne II (cysII) von genau 12 Aminosäuren, der als diagnostisches Charakteristika für Dickkopf 3 Proteine angesehen wird, stimmt mit dem Hydraprotein überein. Die 4 bisher nur in Vertebraten gefundenen Dickkopf Proteine (Dkk-1, Dkk-2, Dkk-3 und Dkk4) unterscheiden sich unter anderem genau in der Länge der Region zwischen den cysteinreichen Domänen (Abb. 2.3 A). Diese ist in den Protein Dkk-1,2 und 4 deutlich länger. Durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums ausschließlich mit der cys II Domäne konnte noch einmal bestätigt werden, dass das Hydraprotein mit den Dickkopf 3 Proteinen aus *Ciona*, dem Menschen und dem Hühnchen gruppiert, keinesfalls mit den anderen drei Dkk - Proteinen (Abb. 2.3 B). Aus diesen Gründen scheint es plausibel, dieses Hydragen *HyDkk3* (AY332609) zu nennen.

Neben Dickkopf 3 gibt es noch drei weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie. Als Antagonist des Wnt – Signaltransduktionsweges, dessen entscheidende Rolle bei der dorsal - ventralen Achsenbildung bereits unter Abschnitt 1.2.3.1 erwähnt wurde, ist vor allem Dickkopf 1 interessant. Die Suche nach Dkk-1 in *Hydra* gestaltete sich aus wenigstens zwei Gründen schwierig. Der Grad der Konservierung zwischen HyDkk-3 und den Vertebraten Dkk-3 war zu gering, um Methoden der RT PCR Klonierung mit degenerierten Oligonukleotiden (homology hunting) anzuwenden. Auch eine Southern Blot Analyse unter wenig stringenten Waschbedingungen, die wenigstens einen Hinweis auf die Existenz weiterer Dickkopfproteine geliefert hätte, könnte an der Tatsache scheitern, dass die Dickkopf Proteine Dkk-1,2 und 4 untereinander sehr viel höhere Homologien zeigen als zu Dkk3 (Krupnik et al., 1999).



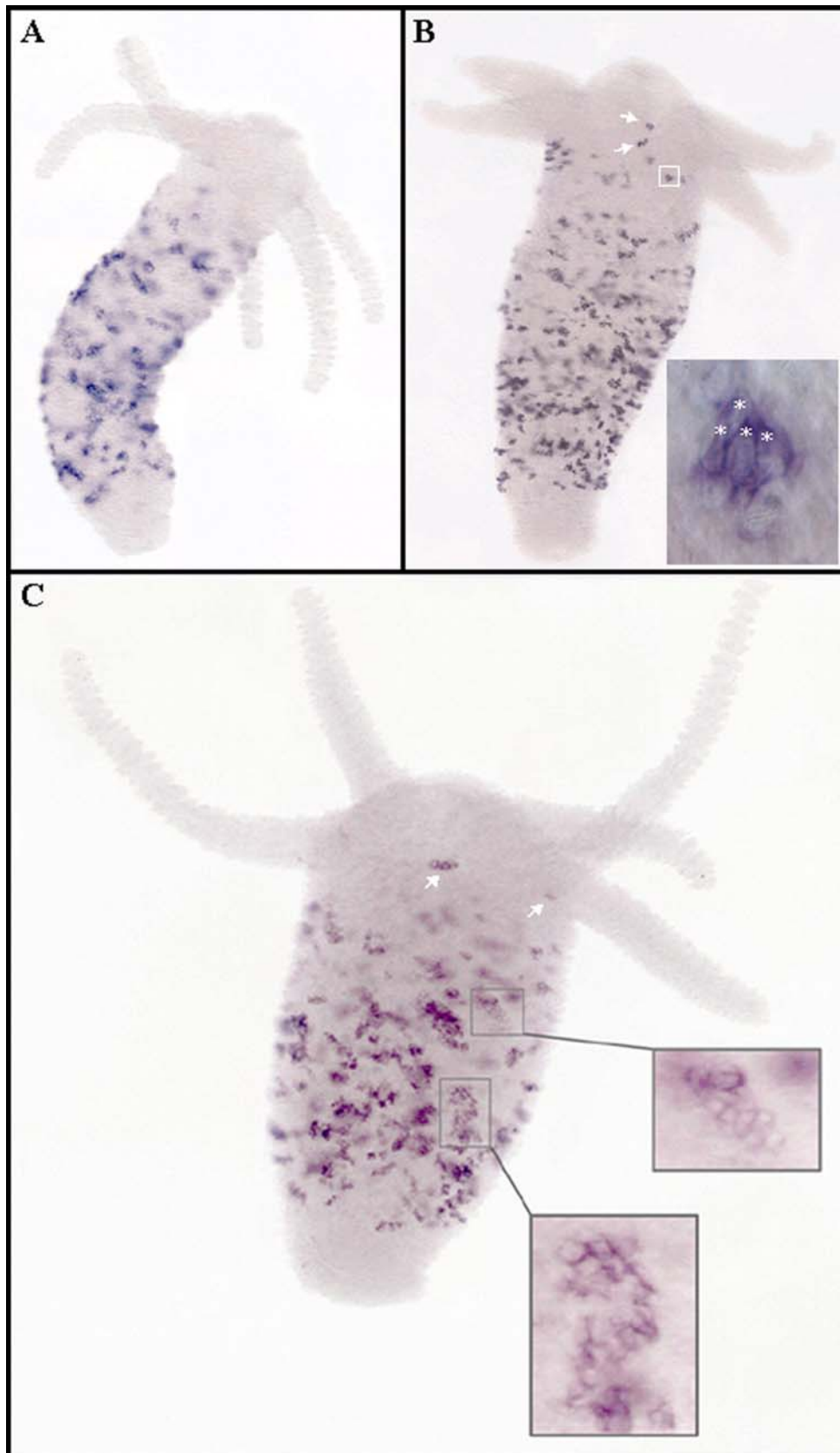
**Abb. 2.3: Evolutionäre Beziehungen zwischen HyDkk-3 und den anderen Dickkopfproteinen. (A)** Schematisches Diagramm, das die strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen *Hydra* Dkk-3 (HyDkk-3) und dem Dkk-3 Protein aus dem Menschen (HDkk-3), im Vergleich zu Dickkopf 1,2, und 4 aus dem Menschen (HDkk-1,2,4) verdeutlicht. **(B)** HyDkk-3 gruppiert zusammen mit den Dkk-3 Proteinen aus *Ciona*, *Gallus* und *Homo*. Es ist deutlich getrennt von der Gruppe der Vertebraten Dkk-1, 2 und 4 Proteine und von der Gruppe von Proteinen die nur eine cysteinreiche Domäne besitzen ( wie die *Oryctolagus Colipase* und *Dkk like cys2-1* und *Dkk like cys 2-2*, die aus der Konsensussequenz der EST Datenbank ermittelt wurden.) Die Länge des Balken gibt die evolutionäre Entfernung an, ausgedrückt durch 0,1 Aminosäuresubstitution pro Position in der Sequenz. Die Zahlen an den Verzweigungen, sind Werte die nach der Bootstrapanalyse ermittelt wurden, und geben einen Wert der Vertrauenswürdigkeit der Verzweigung in Prozent wieder (aus Fedders et al., im Druck).

Die Suche in zwei unabhängigen *Hydra* E(xpressed) S(equence) T(ag) Datenbanken (DDBJ: <http://srs.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>; EBI: <http://srs.ebi.ac.uk>) mit den Vertebraten Dkk-1 und Dkk-2 Proteinsequenzen führte zur Identifikation von einer EST Sequenz (tac25c08.y1 am

EBI), welche die bereits beschriebene Sequenz von HyDkk3 enthielt und von zwei EST Clustern ( d.h. Sequenzen mehrerer EST's zusammengefasst zu einer Konsensussequenz), welche für zwei 95 Aminosäure lange Proteine kodieren, die eine einzige cysteinreiche Domäne enthalten, welche homolog zur cys II Domäne aus den Dkk-1, Dkk-4 Proteinen und der Colipase ist. Diese Datenbanken liefern derzeit keine Hinweise auf das Vorhandensein weiterer dickkopffähnlicher Proteine, die zwei cysteinreiche Domänen enthalten. Jedoch repräsentieren die in den EST Projekten enthaltenen Daten zum jetzigen Zeitpunkt bei weitem nicht alle in Hydra exprimierten Gene.

#### **2.1.1.2 Expression von *HyDkk-3* in Nematoblasten**

Mittels *in-situ* Hybridisierung an ganzen Hydrapolypen konnte das Expressionsmuster von *HyDkk-3* aufgezeigt werden. Wie in Abb. 2.4 dargestellt, akkumulieren die *HyDkk-3* Transkripte in Clustern sich differenzierender Nematoblasten entlang des gesamten Körperbereichs. Zusätzlich konnten in der Tentakelbildungszone *HyDkk-3* positive Nematocyten detektiert werden. Diese Nematocyten, die nur in kleinen Gruppen auftreten, jedoch niemals in großen Clustern, sind möglicherweise migratorische Nematocyten auf dem Weg zu den Batteriezellen der Tentakeln, um dort inkorporiert zu werden. Die Schlussfolgerung, dass *HyDkk-3* nur in späten Differenzierungsstadien der Nematocyten detektiert werden kann, wird durch die Beobachtung gestützt, dass alle *HyDkk-3* positiven Zellen bereits über voll entwickelte Kapseln verfügen. Weder zu Beginn der Nematocyten-differenzierung noch im Kopf- oder Fußgewebe, in dem gewöhnlich keine Nematoblasten vorkommen, konnte eine Expression von *HyDkk-3* nachgewiesen werden. Desweiteren wurde in allen vier morphologisch unterscheidbaren Nematocytentypen *HyDkk-3* detektiert. Nichtzuletzt wurde das gleiche Expressionsmuster auch in anderen Hydraarten bzw. -stämmen, so z.B. *H. magnipapillata*, *H. vulgaris*, *H. vulgaris* (Stamm AEP) und *H. oligactis* beobachtet. Alle Resultate zusammengenommen zeigen, dass *HyDkk-3*, das für ein sekretiertes Protein kodiert, in einem späten Stadium der Nematocytenentwicklung exprimiert wird, zu einer Zeit, zu der die großen Cluster auseinanderbrechen, sich die zytoplasmatischen Brücken lösen und die Nematocyten zu den Tentakeln wandern. In allen getesteten Hydraarten scheint die Funktion dieses Genes konserviert.



**Abb. 2.4:** *HyDkk-3* wird in einem späten Stadium der Nematozytendifferenzierung exprimiert. Nematoblasten, die *HyDkk-3* exprimieren, besitzen bereits vollentwickelte Kapseln ( als ein Beispiele siehe vergrößerten Bereich in B, die Sterne markieren vier Nematoblasten mit voll entwickelten Kapseln) (aus Fedders et al, im Druck).

### 2.1.1.3. Die Suche nach Genen der Dickkopffamilie außerhalb der Vertebraten

Wie bereits im Abschnitt 1.2.3.1 angedeutet, wurden Dickkopf Proteine bisher nur in den Vertebraten nachgewiesen (Hino et al., 2003). Durch Isolation von *HyDkk3* aus *Hydra* war zu vermuten, dass andere Invertebraten Dickkopf verwandte Gene besitzen.

Um diese Vermutung zu unterstützen, wurden genomische und EST Datenbanken einiger Invertebraten auf die Anwesenheit von Dickkopf Proteinen untersucht. Zunächst fiel die Wahl dabei auf *D. melanogaster* und *C. elegans*, weil bei diesen Protostomia ein komplettes Genomprojekt und eine große Anzahl von veröffentlichten EST zur Verfügung stehen. Zusätzlich zu den beiden Protostomia wurde *Ciona intestinalis* ausgewählt, da auch hier eine große Anzahl an EST's (240.000) und ebenfalls genomische Daten verfügbar waren. *Ciona* wird aufgrund seiner phylogenetischen Stellung als ein Schlüsselorganismus betrachtet, um die Evolution der Entwicklungsmechanismen der Vertebraten zu verstehen (Corbo et al., 2001).

Um Dickkopfgene zu identifizieren, wurden die erwähnten EST Datenbanken auf Proteine hin untersucht, die über zwei cysteinreiche Domänen verfügten, welche als diagnostisches Kriterium die Zugehörigkeit zur Dickkopf Proteinfamilie belegt.

Obwohl die EST Sequenzen aus *Drosophila* für eine große Anzahl an cyteinreichen Proteinen kodieren, konnte kein Protein gefunden werden, das das typische Verteilungsmuster der Cysteinreste in den Dickkopfproteinen aufweist. Da das Gleiche auch für *C. elegans* gilt und die Genome beider Organismen durchsequenziert wurden, muss geschlussfolgert werden, dass ein Dickkopf vermittelter Signaltransduktionsweg in diesen Protostomia nicht existiert.

In den Datenbanken von *Ciona* konnten jedoch 8 cDNA Klone (ciad068o01, cign052d13, rcilv069e22, cilv004h08, cign028k21, citb042f20, ciad013j05, and cibd068a20) gefunden werden, die eine Homologie zu Dkk-1, Dkk-2 und Dkk-4 zeigten. 7 der 8 Klone konnten zu einer Konsensussequenz zusammengefasst werden. Die Translation dieser Konsensussequenz resultierte in einem ORF, der am C terminalen Ende eine Domäne enthielt, die das typische Verteilungsmuster der Cysteine in der cys II Domäne der Dickkopfproteine Dkk-1, 2 und 4 vom Menschen aufwies. Jedoch hatte dieses vorhergesagte Protein nur diese eine cysteinreiche Domäne, nicht die für die Identifikation als ein Dickkopf Protein erforderlichen 2 Domänen. Aus diesem Grund wird dieses Protein nicht als ein Dickkopf homologes Protein betrachtet. Klon 8 (cibd068a20) allerdings kodiert für ein Protein, das zwei cysteinreiche Domänen enthält und wies aufgrund dieser Tatsache eine hohe Homologie zu den

Dickkopfproteinen auf, besonders zu Dickkopf 3. Durch eine Ergänzung der Sequenz aus Klon 8 durch die Daten der genomischen Datenbank von *Ciona*, ergab sich ein ORF von 1182 bp, der für 394 Aminosäuren kodiert. Eine nochmalige Suche in den Datenbanken von NCBI mit dem Suchalgorithmus BLAST konnte die Ähnlichkeit der Sequenz zu Dkk-3 aus dem Hühnchen bestätigen. Ein Vergleich der cysteinreichen Domäne aus *Ciona* und dem Hühnchen ist in der Abb. 2.5 dargestellt. Interessanterweise ergibt ein solcher Vergleich nicht nur, dass das Muster der 10 Cysteinreste in den beiden Domänen übereinstimmt, sondern auch, dass der Abstand, der die beiden Domänen verbindet, bei beiden Proteinen aus 12 Aminosäuren besteht. Dieser Abstand wurde schon vorher als spezifisches Charakteristikum für die Dkk-3 Proteine definiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Ciona* über ein Protein verfügt, das am ehesten mit dem Dickkopf 3 Protein der Vertebraten verwandt ist. Es gibt jedoch keine Hinweise auf Proteine, die homolog zu Dickkopf 1, 2 und 4 wären.

```

CDkk-3: 149 GQSEWLSEEITSKSDVKRDRGPWKCSIAFPCSSEDEYCFETQTSSECKECKLEGDQCVDNAECCQEPHANYDHQAMCVFGRC
GDkk-3: 115 TGSTIFSETIITSIKGGENKRNHECIIDEDCETGKYCQFSTFEYKCPCKTQHTHCSRDRVECCGD-----QLCVWGEC
          S   SE I +      ++  +C I  C  +YC +  +C+ CK +  C  + ECC +      +CV+G C

CDkk-3: 229 KLSTRPGAIGTICEVPDDCDAGMCCADTPGYARSLCKPNARVGERCSVEPDYNPSEYIVFE---DGQY-FCPCESDLTCVS
GDkk-3: 188 RKATSRGENGTICENQHDCNPGTCCAFQKELLPVCTPLPEEGEPCH-DPSNRLNLIITWELEPDGVLERCPCASGLIQCP
          + +T  G  GTICE  DC+ G  CCA      +C P  GE C  +P      I +E  DG  CPC S L C

CDkk-3: 307 RGTNKEDNLQDYNTPRFCEMPRLNLDRASTKDKVQ
GDkk-3: 268 QSS-----HSTTSVCELSSNETRKNEKEDPLN
          + +      ++T  CE+      +  +D +
    
```

Abb. 2.5. Vergleich der Aminosäuresequenzen der cysteinreichen Domänen I und II von *Ciona intestinalis* Dkk-3 (CDkk-3) mit der korrespondierenden Region im Dkk-3 des Hühnchens (GDkk-3) (aus Fedders et al., im Druck).

Die offensichtliche Konservierung von *Dkk-3* in *Hydra*, *Ciona* und dem Menschen und die Abwesenheit von *Dkk-1*, 2 und 4 außerhalb der Vertebraten macht es wahrscheinlich, dass sich die vier Vertebraten Dickkopf Gene aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben, das mit dem *Dkk-3* Gen verwandt war.

#### 2.1.1.4 Der Einfluss des Peptides HEADY auf die Expression von *HyDkk-3*

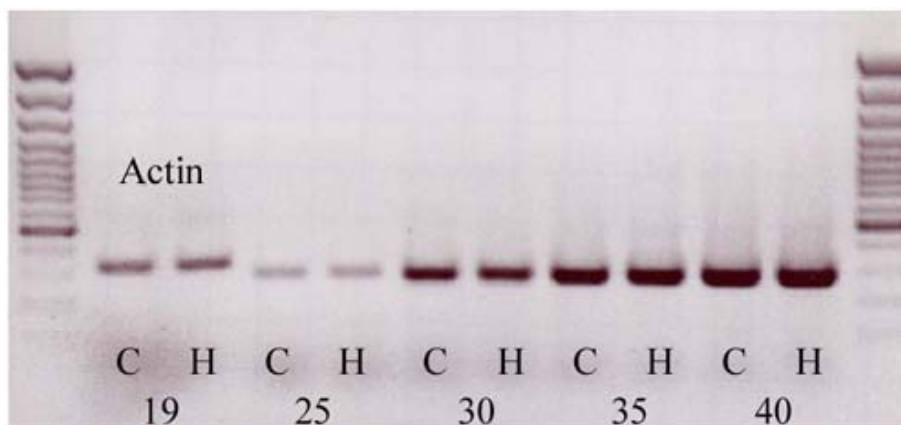
Die Behandlung des Hydragewebes mit HEADY-Peptid führt laut DD-PCR zu einer Repression der Transkription von *HyDkk-3*. *HyDkk-3* scheint allerdings einen Einfluss auf die Nematocyten Entwicklung zu nehmen, wenigstens jedoch an deren Differenzierung beteiligt



zu sein. Offensichtlich bewirkt HEADY die Induktion des apikalen Schicksals nicht über *HyDkk-3*. Verdeutlicht man sich jedoch die Bedeutung des Begriffes „apikales Schicksal“, stellt man fest, dass im Hyperstom keine Differenzierung von Nematocyten stattfindet. Wird durch HEADY das Gastralgewebe zu einem apikaleren Schicksal determiniert, dann könnte dies zur Folge haben, dass die Differenzierung der Nematocyten unterbunden oder nicht mehr unterstützt wird. Damit wird auch die Expression von *HyDkk-3* inhibiert.

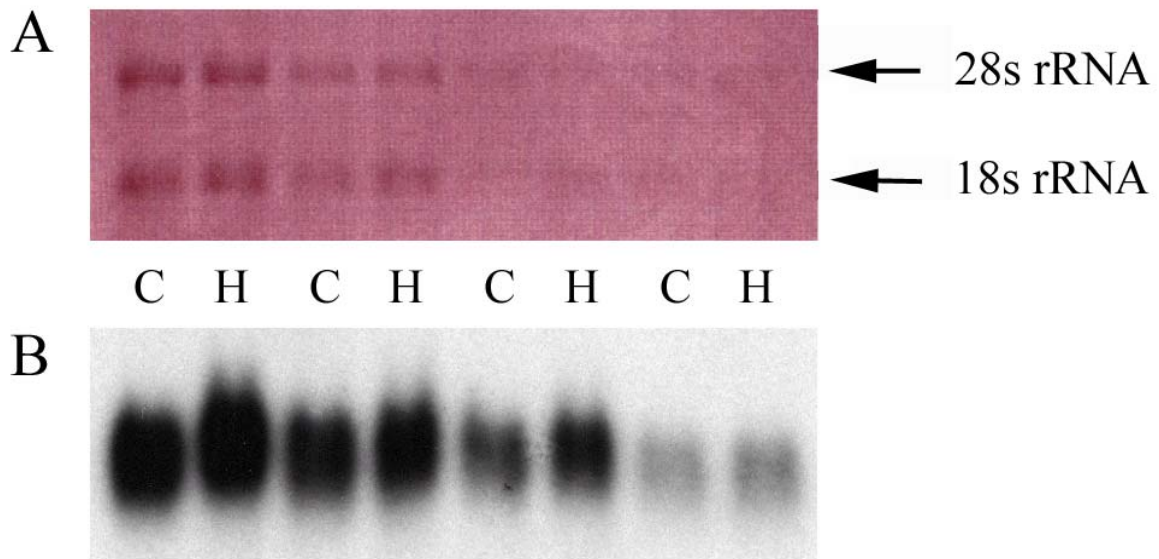
Dennoch aufkommende Zweifel an der Richtigkeit der Wechselbeziehung zwischen HEADY und *HyDkk-3* führten zu weiteren Experimenten.

In einem neuen Experiment wurden die Polypen für 5 Tage in HEADY inkubiert, mRNA isoliert und cDNA synthetisiert. Unter Verwendung genspezifischer Primer wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Das in Abb. 2.6 gezeigte Resultat der PCR, lässt keinen Expressionsunterschied zwischen HEADY behandelten Tieren und den Kontrolltieren erkennen.



**Abb. 2.6: Gel der RT-PCR mit *HyDkk-3*.** Aufgetragen sind jeweils die PCR mit Kontrolltieren (C) im Vergleich mit HEADY-inkubierten Tieren (H) für unterschiedliche Zyklenzahlen (19, 25, 30, 35, 40). Die ersten beiden Banden stellen die Equilibrierung mit Aktin dar. Alle anderen PCRs wurden mit einem für *HyDkk-3* spezifischen Primerpaar durchgeführt.

Der abschließend durchgeführte Northern - Blot (Abb.2.7) bestätigte die Ergebnisse aus der RT-PCR. Die Ergebnisse der drei Experimente zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass HEADY keinen Einfluss auf die Expression von *HyDkk-3* hat.



**Abb. 2.7: Northern-Blot zur Untersuchung der differentiellen Expression von *HyDkk-3*.**

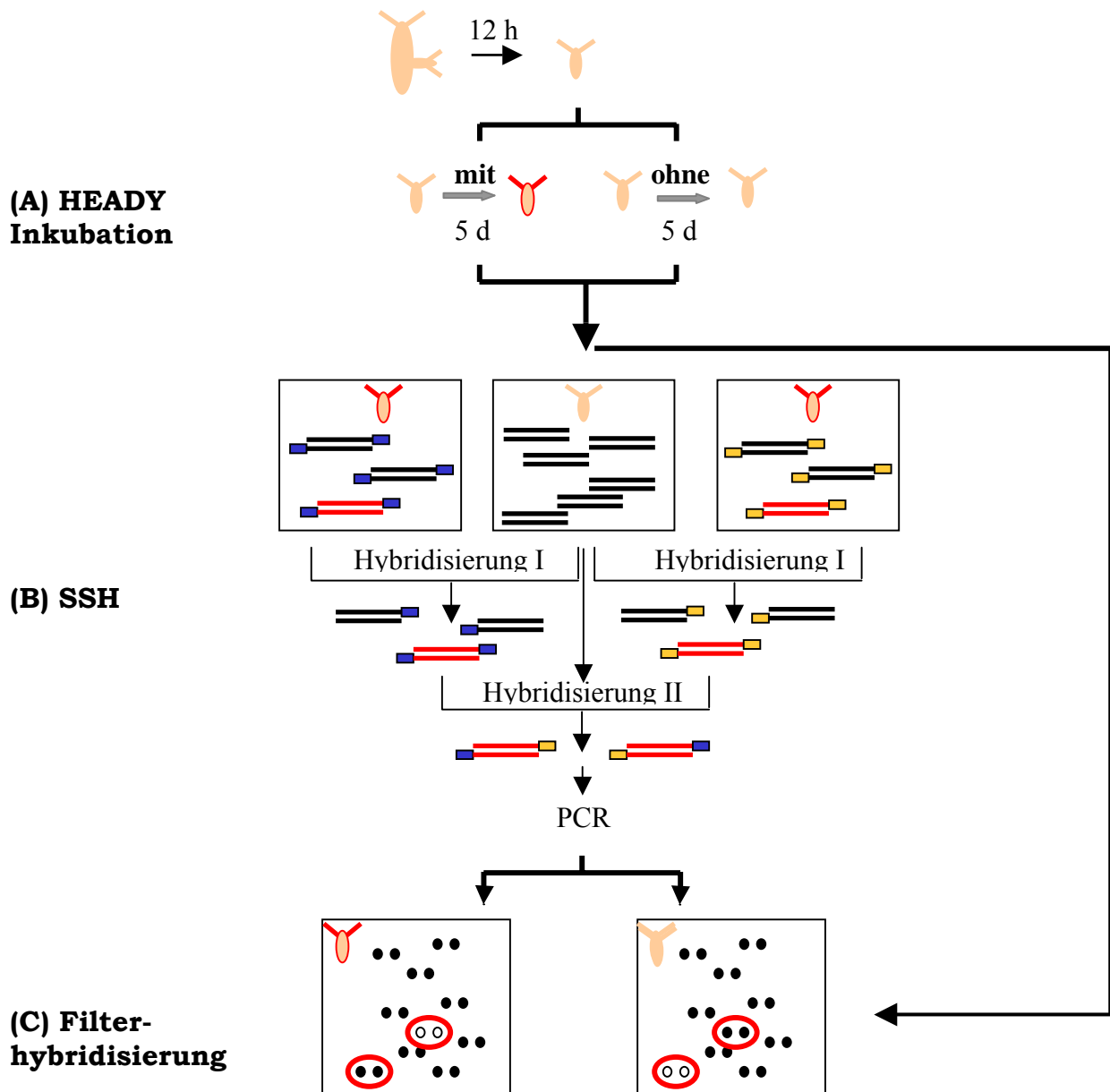
(A) Equilibrierung der eingesetzten totalen RNA mittels der Banden der ribosomalen 28s und 18s rRNA jeweils für HEADY-inkubierte (H) und Kontrolltiere (C) und für unterschiedliche Mengen Gesamt-RNA (von links nach rechts: 6 µg, 3 µg, 1,5 µg und 0,75 µg). (B) Northern-Blot mit *HyDkk-3* ebenfalls für HEADY-inkubierte (H) und Kontrolltiere (C) und für unterschiedliche Mengen Gesamt - RNA (von links nach rechts: 6 µg, 3 µg, 1,5 µg und 0,75 µg).

### 2.1.2 Suche nach HEADY – Zielgenen mittels S(upp(ression) S(ubtractive) H(ybridisation)

Die Resultate aus dem DD-PCR Experiment, nach denen von 460 klar identifizierbaren Banden lediglich vier differentiell amplifizierbar (0,9%) waren, deuteten darauf hin, dass sich durch den Einfluss des Peptides nur wenige Gene in ihrer Expression ändern.

Die Expression, des in Abschnitte 2.1.1 näher untersuchten Gen *HyDkk-3*, zeigte, in welchem Körperbereich mögliche Veränderungen der Genexpression, hervorgerufen durch die HEADY – Behandlung, hauptsächlich erwartet werden sollten, auch wenn die Expression von *HyDkk-3* selbst keine Abhängigkeit zu HEADY zeigt. Der Gastralbereich ist, im Vergleich zu Kopf und Fuß, der am wenigsten differenzierte Bereich des Hydrakörpers. Dies ist vor allem der Tatsache zuzuschreiben, dass sich hier die Hauptproliferationszone des Tieres befindet, in der ein Pool von undifferenzierten Zellen darauf wartet, die entsprechenden Differenzierungssignale zu erhalten. So ist plausibel, dass vor allem die Expression der Gene des Gastralabschnittes durch eine Behandlung mit HEADY-Peptid verändert wird.

Da deutlich wurde, dass die DD-PCR nicht die Methode der Wahl war, um die von HEADY beeinflussbaren Gene zu identifizieren, musste die methodische Vorgehensweise geändert werden. Aus diesem Grunde wurde eine Methode adaptiert, die unter dem Namen S(uppression) S(ubtractive) H(ybridisation) bekannt ist (Diatchenko et al. 1996).



**Abb. 2.8 Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur Identifizierung von HEADY Zielgenen.** (A) Frisch abgefallene Knospen werden in HEADY ( $10^{-6}$ M) oder in Hydramedium inkubiert. (B) Die aus (A) isolierte RNA beider Stadien werden der SSH zugeführt. (C) Die aus (B) entstandenen PCR –Produkte werden kloniert und in geordneter Form auf Filter aufgebracht, um im Anschluß mit der RNA aus (A) hybridisiert zu werden.

Mit deren Hilfe war es möglich, eine cDNA Bank zu generieren, die fast ausschließlich die Gene enthält, die durch die HEADY – Behandlung eine Änderung ihrer normalen Expression

erfahren und kaum noch Gene, die „nur“ an der Aufrechterhaltung der Lebensfunktion der Zellen beteiligt sind, den sogenannten „house keeping“ Genen (Abb. 2.8).

Ausgangsmaterial für die Erstellung der cDNA Bank war wie bei den vorangegangenen Experimenten die RNA von Tieren, die für 5 Tage in  $10^{-6}$  M HEADY inkubiert wurden bzw. von Kontrolltieren ohne HEADY im Medium. Um sowohl aktivierte wie auch reprimierte Gene zu identifizieren, wurde die SSH in zwei Richtungen durchgeführt (Abb. 2.9). Das bedeutet, dass einmal der cDNA Pool der HEADY inkubierten Tiere (Driver) von dem der Kontrolltiere (Tester) subtrahiert wurde, um all die durch HEADY reprimierten Gene zu erhalten und zum anderen, dass der cDNA Pool der Kontrolltiere (Driver) von dem der HEADY behandelten Tiere (Tester) abgezogen wurde. Dabei verfügt die als Tester bezeichnete cDNA über cDNA - Spezies, die im Vergleich zur Driver cDNA nicht oder weniger häufig vorhanden sind. Durch das experimentelle Prozedere wird erreicht, dass nur diese cDNA Unterschiede durch PCR amplifizierbar werden. Die PCR-Produkte stellen die generierte cDNA Bank dar (Abb. 2.9).

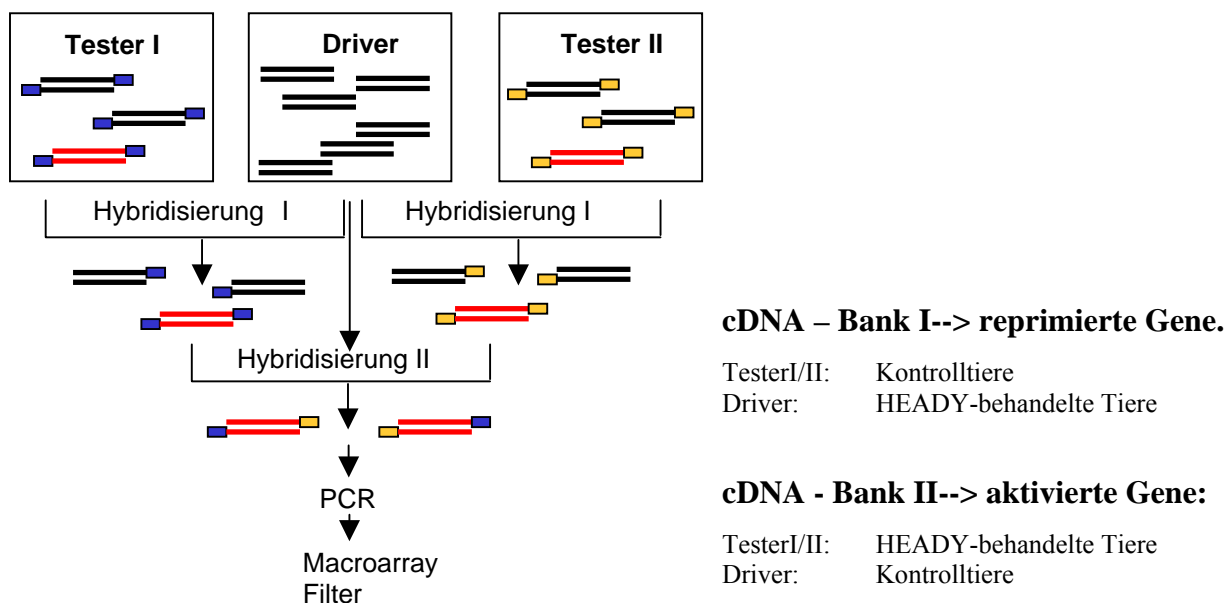
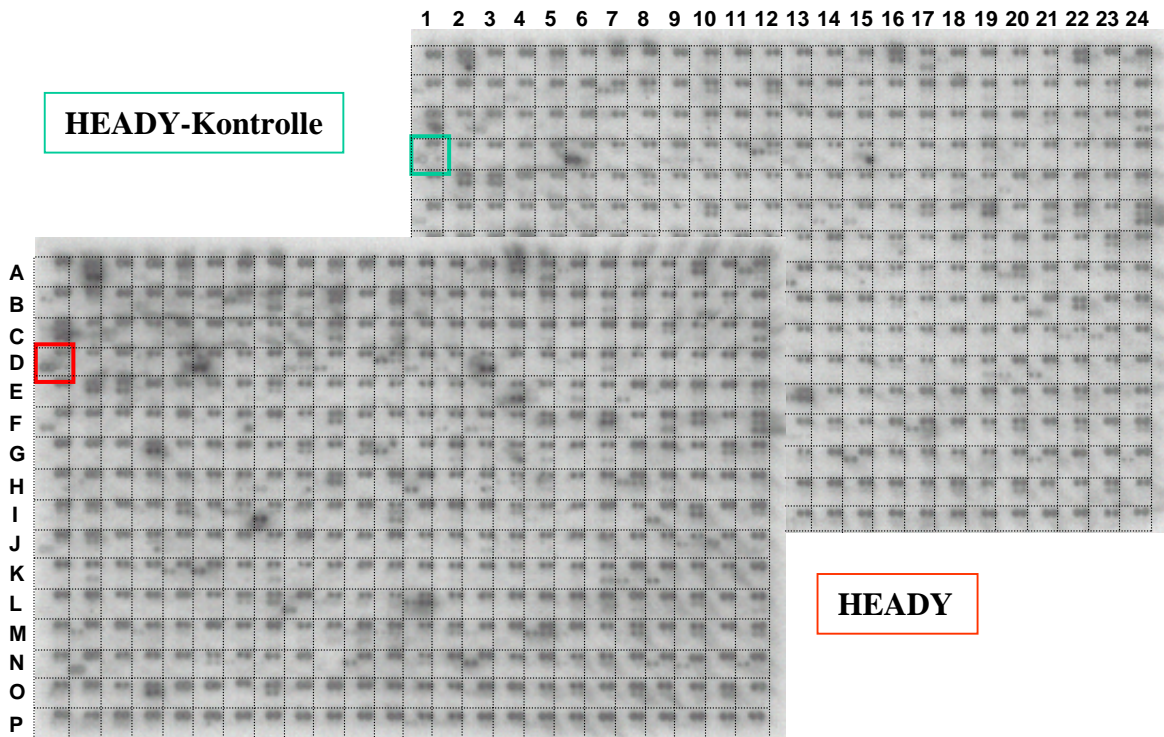


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Generierung der cDNA Banken.

Die so entstandenen cDNA Banken für HEADY reprimierte und aktivierte Gene wurden transformiert und die Bakterienklone (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) in einer geordneten Form auf einer Nylonmembran mit Hilfe eines Roboters plaziert. Diese Filter, im folgenden als Macroarray bezeichnet, wurden mit cDNA, gewonnen aus einem unabhängigen, in der Abfolge aber identischen HEADY - Inkubationsexperiment, hybridisiert. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass die Klone, welche als differentielle Genfragmente durch die SSH amplifiziert wurden, durch ein zweites, unabhängiges Experiment verifiziert werden konnten. (Abb. 2.10)



D1\_4.2

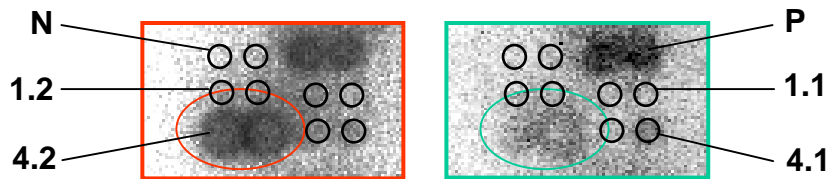


Abb. 2.10 Vergleich der Macroarrayfilter, hybridisiert mit cDNA aus HEADY behandelten Tieren (rot) und mit cDNA aus Kontrolltieren (grün). Auf jeden der abgebildeten Filter sind 1418 Klone aufgebracht worden. Die Ausschnitte in der unteren Hälfte des Bildes (D1\_4.2) zeigen die grundsätzliche Anordnung der, in Duplikaten aufgetragenen Klone auf dem Filter. N-Negativ Kontrolle; das Gen CD94 aus *Botryllus schlosserii*, diente als artfremdes Gen als negative Hybridisierungskontrolle und stellte somit den zu subtrahierenden Hintergrund dar. P- Positiv Kontrolle; das ubiquitäre Gen Somaferitin aus *Hydra*, diente sowohl der Orientierung auf dem Filter und zusätzlich als Equibrilierungsmarker. 1.1 u. 1.2 – die erste bzw. zweite Hälfte der Klone der I. cDNA Bank (reprimierte Gene, 768 Klone). 4.1 und 4.2 – die erste bzw. zweite Hälfte der Klone der II. cDNA Bank (aktivierte Klone, 650 Klone). D1\_4.2 – Beispiel eines durch die HEADY – Behandlung aktivierten Genes (Vergleich rote Elypse gegenüber grüner Elypse).

Im ersten Durchlauf dieser Experimente wurden 1418 Klone auf jeden der beiden Filter in Abb. 2.10 aufgetragen. Von diesen 1418 Klonen kommen 768 Klone aus der cDNA-Bank I, die durch HEADY Behandlung reprimierte Genfragmente enthält. Die restlichen 650 Klone entstammen aus der cDNA Bank II. Bei der Evaluierung der Filter nach der Hybridisierung wurde festgestellt, dass von den 768 Klonen der cDNA Bank I 111 und von den 650 Klonen

der cDNA Bank II 192 hybridisiert hatten. Wie bereits erwähnt, diente die Hybridisierung der Verifizierung der Ergebnisse der SSH durch ein zweites unabhängiges HEADY - Inkubationsexperiment. So konnten aus cDNA Bank I 2 Klone und aus cDNA Bank II 37 Klone bestätigt werden. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse von 13 (1 Klone aus cDNA Bank I. und 12 Klone aus cDNA Bank II) dieser 39 differenziellen Klone sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Nr.	Identifikation	reguliert <sup>1</sup>	beste Homologie zu	E-Wert	NCBI Datenbanknr.	Länge des ORF in AS
1	B19 4.1	+	hypothetical protein	0,017	AAO51302	91
2	C10 4.1	++	ribosomal protein S16	4e <sup>-30</sup>	NP_001011	42
3	D1 4.2	++	hypothetical protein	4,8	NP_704983	43
4	D10 4.2	++	ribosomal protein S21	1e <sup>-21</sup>	NP_001015	40
5	E15 4.1	++	Actin non muscle 6.2	6e <sup>-38</sup>	P17126	71
6	F1_4.2 (identisch mit D10 4.2)	++	ribosomal protein S21	1e <sup>-21</sup>	NP_001015	40
7	F7_4.1	++	Dynactin/Dynamitin	9e <sup>-05</sup>	AAC50423 NP_006391	56
8	F15 4.1	+	solute carrier family	2e <sup>-26</sup>	NP_061126	83
9	H8 4.2	+	keine Homologie	-	-	-
10	K2 4.1	+	keine Homologie	-	-	kein ORF
11	M2 4.2	+	hnRNA bindig protein	6e <sup>-11</sup>	NP_006796	50
12	N2 4.2	++	keine Homologie	-	-	27
13	N11 1.2	--	ribosomal protein S27	8e <sup>-06</sup>	XP_208206	kein ORF

<sup>1</sup>Die Expression wird durch HEADY Inkubation verstärkt (+) oder reprimiert (-)

**Tab. 2.1 Resultate der Sequenzanalyse von 13 differenziell hybridisierenden Klonen**

Interessanterweise zeigen die meisten Klone Homologien zu Genen, die man als „house keeping“ Gene bezeichnen würde. Jedoch wäre eine Verstärkung ihrer Expression erforderlich, sollte HEADY die Zellteilungsrate steigern. Ist diese These zutreffend, dann wären verstärkt ribosomale Proteine erforderlich, daneben aber auch Aktin für den Aufbau des Zytoskelletes der Tochterzellen oder Dynactin/Dynamitin, um den Vesikeltransport zu beschleunigen. Sicherlich müsste man diese Gene dann auch als HEADY-Zielgene verstehen. Wenn es jedoch um die Beantwortung der Frage geht, wie das HEADY-Peptid in der Lage ist, eine neue Achse zu induzieren, dann sind diese Gene weniger aufschlussreich. Auch die Klone zu denen keine Homologie besteht, lassen vermuten, da sie im Zusammenhang mit hoch abundanten Genen gefunden wurden, dass auch sie eher an strukturellen Prozessen in den Zellen (Umbau des Zytoskelletes zur Vorbereitung der Zellteilung etc.) beteiligt sind. Letztlich kann aber nur eine detailliertere Analyse dieser Gene Aufschluss über ihre Funktion geben.

Von größerem Interesse sind demnach Gene, deren Produkte in der Lage sind, selbst regulativ auf die Transkription von Genen Einfluss zu nehmen, die Transkriptionsfaktoren. Die meisten

dieser Gene werden jedoch in einer relativ geringen Anzahl von Kopien transkribiert. Dies hat zur Folge, dass bei einer Hybridisierung der Macroarrays, Klone die differentiell exprimiert werden und zu dieser Gruppe von Genen gehören, kein Hybridisierungssignal ergeben und damit nicht als differentiell exprimiertes Gen erkannt werden können. Tatsächlich ist es zutreffend (siehe Abb. 2.10) dass nur etwa ein Achtel bzw. zwei Siebtel der aufgebrauchten Klone je cDNA Bank hybridisierten. Für die Mehrzahl der Klone stellte die Hybridisierung somit eine zu insensitive Methode dar, um die Differentialität dieser Klone nachzuweisen. Jedoch sollte nicht unerwähnt bleiben, dass natürlich auch die Menge der applizierten cDNA Einfluss auf die Sensitivität der Hybridisierung hat. In Untersuchungen, bei denen das Ausgangsmaterial limitiert ist, wie in diesem Fall, stellt die Erhöhung der Probenkonzentration jedoch keine alternative Lösung dar.

Im folgenden wurden nun Klone untersucht, die kein Hybridisierungssignal zeigten, die aber dennoch auf die ein oder andere Weise differentiell exprimiert werden sollten, da sie ein Produkt der SSH darstellen. Dazu wurden zunächst einmal 30 Klone ausgewählt und sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 2.2 zusammengefasst.

Nr.	Identifikation	reguliert	beste Homologie zu	E-Wert	NCBI – Datenbanknr.	Länge des ORF in AS
1	A14_4.1	+	Tubulin beta chain	3e-11	P33631	47
2	A14_4.2	+	Zinkfingerprotein 345	6e-04	XP217728	158
3	B16_4.1 entspricht Klon E23_4.1	+	Oligosaccharyl transferase	3e-43	P46975/	120
4	B20_4.1	+	translation elongation factor eEF-2	2e-43	S05988	108
5	C15_4.1	+	DNA replication licensing factor	6e-66	Q14566	181
6	D6_4.2	+	Ribosomal protein P1	5e-26	NP_000994	125
7	D9_4.1	+	Calcium binding protein	6e-05	Q27052	75
8	D22_1.1	-	chitinase like precursor family	5e-09	NP_498171	126
9	E23_4.1 Entspricht Klon B16_4.1	+	C. elegans essential membrane protein 1 OLIGOSACCHARYL TRANSFERASE STT3	3e-43	NP498362	117
10	F9_1.1	-	Proliferation-associated protein 1	7e <sup>-45</sup>	AAH56591	47
11	G8_1.1	-	NADH dehydrogenase subunit 2	0,22	AF447294.1	32
12	G13_4.1	+	SYAP1 protein	1e <sup>-30</sup>	BC045947.1	141
13	G18_4.1	+	vascular endothelial growth factor / silk protein	1e <sup>-08</sup> / 2e <sup>-09</sup>	NP_033532/ AAA_99803	179

Nr.	Identifikation	reguliert	beste Homologie zu	E-Wert	NCBI – Datenbanknr.	Länge des ORF in AS
14	J12_1.1	-	keine Homologie	-	-	99
15	J12_4.2	+	60S ribosomal protein L23a	3e <sup>-38</sup>	AAN52376	94
16	J19_1.1	-	bromodomain and PHD finger	2e <sup>-28</sup>	NP_084454	99
17	J19_4.1	+	Arginase	8e <sup>-34</sup>	P49900	58
18	K5_1.2	-	Collagen related protein precursor – Hydra magnipapillata	3e <sup>-06</sup>	A41132	31
19	K10_1.1	-	ribo: S11	4e <sup>-26</sup>	NP_001006	77
20	K10_4.1	+	hypothetical protein KIAA1259	5e <sup>-29</sup>	NP_115572	49
21	K10_4.2	+	similar to RIKEN cDNA 1110035L05	2e <sup>-18</sup>	XP_233720	110
22	K18_1.1	-	Potential RNA-binding protein	0.006	NP442740	80
23	K18_4.1	+	hypothetical protein KIAA1259	5e <sup>-29</sup>	NP115572	136
24	L1_1.2	-	zinc finger protein 207	5e <sup>-33</sup>	XP293072	61
25	L21_1.1	-	astacin family metalloendopeptidase FARM-1	7e <sup>-26</sup>	AAF24991	110
26	L21_4.1	+	nucleolar protein 5; SIK similar protein	2e <sup>-23</sup>	NP_061356	161
27	N16_1.1	-	peptidylprolyl isomerase D	2e <sup>-32</sup>	NP005029	196
28	N23_1.1	-	Cytoplasmic protein NCK2	3e <sup>-04</sup>	AF043260.1	162
29	P7_1.1	-	HN-1-like protein	3,1	XP_340767	32
30	P7_1.2	-	drug resistance-related protein LRP	2e <sup>-54</sup>	2113368A	158
31	B1_H4*	-	Cystatin	3e <sup>-1</sup>	P22085	138

\*1 Dieser Klon wurde direkt aus der cDNA Bank I sequenziert und besitzt deshalb keine Koordinaten als Namen

**Tab. 2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalyse von 30 nicht hybridisierenden Klonen.** Rot hinterlegt sind die Klone, die als vorrangig für die weitere Bearbeitung ausgewählt wurden.

### 2.1.2.1 J12\_1.1 ein Peptid, dessen Expression durch HEADY reprimiert wird

Wie bereits Eingangs geäußert, ist es nicht verwunderlich, dass HEADY Einfluss auf Differenzierungsvorgänge hat, die vor allem im Gastralbereich stattfinden. Die Entwicklung der Nematocyten ist ein solcher Differenzierungsvorgang, der sich ausschließlich auf den Gastralbereich beschränkt. Der Klon J12\_1.1 enthält ein Genfragment, dass durch HEADY – Behandlung weniger stark exprimiert wird als in den Kontrolltieren. Das Gen besitzt, wie aus der Tabelle 2.2 ersichtlich, keinerlei Homologien zu anderen bekannten Proteinen. Dabei kodiert ein 297 Nukleotid großer ORF für 99 Aminosäuren. Der ORF wird von einem Startcodon und mehreren Stopcodons am 3'Ende begrenzt. Die in 5' Richtung zur Verfügung



stehende Sequenz zeigt ebenfalls ein Stopcodon und verifiziert somit den Beginn des ORF's bei dem vorhergesagten Startcodon (Abb.2.11).

```

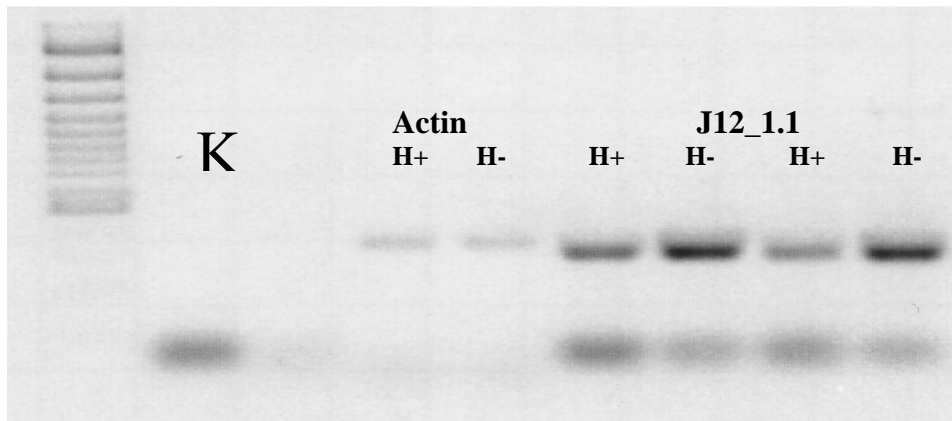
1   GTTTAACTTAGCAACATTTAGAACGCCTGTAACGATGGAAAAGATTGAAATCTTATTAGTAAATGTTTTTTTCATT
1   M E K I E I L L V I V F F I
79  CAACTTTGCTTCAGTGAAAACCTATATGAACACTAAAAATGAGTCCGAGGAAACAGATGAATCTGGAAATGGAAGCGGA
15  Q L C F S E N Y M N T K N E S E E T D E S G N G S G
157 GATCTTAGTATTTAAACTGTTAAAAGAAGTGTAAGTAAAGAAGTCACATACGTAGATATTTTAAATAAGTCTGCAAAA
41  D L S I K T V K R S V S K E V T Y V D I L N K S A K
235 GCTATTCTTGCTTTTGACATAAATATTAACCGCTGAAGCAAATTTTGGGAAGATCATTACTTTACAAGTGAAGAAAAT
67  A I L A F D I N I N Q L K Q I L E D H Y F T S E E N
313 CAATCAATTTGGCCGAAGGTTAAAAGAAACAGAAGGRACACTCAATTTGTATTTAATGAACGCGAACTTTTGTACA
93  Q S I W P K V *
391 TGCAAAGCGATTAAAAATGATTTACCGTCGAATGTTGGRATGCGACTTGCTCCCTAAAGT

```

**Abb. 2.11 Die Nukleotidsequenz mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz des Klonen J12\_1.1.** Die ersten 20 unterstrichenen N – terminalen Aminosäuren markieren das vorhergesagte Signalpeptid. Der ORF ist klar durch die markierten (**fett**) Start- und Stopcodons festgelegt.

Eine mit Hilfe des SignalP Servers der Universität Kopenhagen durchgeführte *in silico* Computeranalyse konnte eine Signalpeptidsequenz lokalisieren. Diese umfasst die ersten 20 Aminosäuren. Zwischen der Aminosäure E20 und N21 konnte dabei gleichzeitig eine Schnittstelle für die Endopeptidase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) identifiziert werden. Weitere Modifikationen sind nicht ausgeschlossen, jedoch gibt es darauf derzeit keinerlei Hinweise. Andere computergestützte Methoden, die der Erkennung spezifischer Motive dienen, was eine Zuordnung zu einer bereits ausführlicher charakterisierten Protein- bzw. Genfamilie ermöglichen würde, brachten keine weiteren Erkenntnisse. Offenbar handelt es sich hier um ein sekretiertes, *Hydra* spezifisches Peptid. Da aber auch die SSH falschpositive Klone generieren kann (die in der Literatur gemachten Angaben schwanken von 10-90%) und der Klon J12\_1.1 auf dem Macroarray Filter nicht hybridisierte, war es notwendig, die Veränderung der Expression mit Hilfe eines zweiten, unabhängigen Experimentes zu bestätigen. Die RT-PCR (Abb.2.12) belegt sehr eindrucksvoll, dass eine Behandlung der Polypen mit HEADY - Peptid zu einer Reprimierung der Expression von J12\_1.1 führt.

Die *in situ* Expressionsanalyse sollte zeigen, welche Zellen, wo im Körper für die Expression des Gens J12\_1.1 verantwortlich sind.



**Abb. 2.12** Ergebnisse der RT-PCR zur Verifizierung der Abhängigkeit der Expression von J12\_1.1 von der Behandlung mit HEADY – Peptid. (H+)- PCR-Produkte, entstanden aus cDNA von HEADY-behandelten Tieren, (H-) PCR-Produkte, entstanden aus cDNA von Kontrolltieren. Die Actin PCR diente der Equilibrierung der eingesetzten cDNA Mengen. K – Wasserkontrolle (negativ Kontrolle)

In Abb.2.13 wird deutlich, dass J12\_1.1 nur im Ektoderm des Gastralbereiches exprimiert wird, jedoch weder im Kopf noch im Fuß. Diese scharfe Begrenzung der Expression zeigen vor allem die Differenzierungsprodukte der i-Zelllinie. Ähnlich wie bei *HyDkk-3*, handelt es sich bei J12\_1.1 um Nematoblastennester. Allerdings ist die Anzahl der Nester, die eine Expression von J12\_1.1 zeigen, im Vergleich zu *HyDkk-3* geringer. Das lässt darauf schließen, dass nur einer der vier Subtypen der Nematocyten dieses Gen exprimiert. Eine genauere Lokalisierung war bisher noch nicht möglich.

Interessanterweise handelt es sich bei J12\_1.1 wieder um ein Gen, das eine noch nicht näher charakterisierte Funktion bei der Differenzierung der Nematocyten spielt. Da die HEADY Behandlung zu einer Verringerung des Expressionslevels von J12\_1.1 führt, lässt sich die These untermauern, dass die durch HEADY induzierten Veränderungen die im Gastralbereich normalerweise vorgenommenen Differenzierungsschritte nicht mehr unterstützen oder sogar aktiv unterdrücken.



**Abb. 2.13** Das räumliche Expressionsmuster von J12\_1.1 in *Hydra*. **A** Die Expression des Gens J12\_1.1 beschränkt sich auf Nematoblastennester des Ektoderms, innerhalb des Gastralbereiches. **B** Vergrößerte Darstellung der Nester. Eine Identifizierung des Nematocytenstypes ist jedoch nicht möglich.

### 2.1.2.2 Unterdrückung der Expression einer Astacin Metalloendopeptidase (Klon L21\_1.1) durch HEADY-Behandlung

Der Klon L21\_1.1 wurde hauptsächlich auf Grund seiner starken Homologie zu der Proteinfamilie der Astacin Metalloendopeptidasen einem näherem Studium unterworfen, da für eines der Mitglieder dieser Familie, FARM-1, gezeigt werden konnte, dass dieses auf Peptid vermittelte Veränderungen der Positionsinformation im Gewebe mit einer Veränderung der eigenen Expression reagiert (Kumpfmüller et al., 1999). Die Peptide Hym-

346/Pedibin und Hym-323 stimulieren die Fußinduktion. Dabei sind sie in der Lage Gastralbereichsgewebe zu Fußgewebe umzuformen. Die Expression der ausschließlich im Gastralbereich exprimierten Metalloendopeptidase *FARM-1* wird dabei verringert (Kumpfmüller et al., 1999).

Der analysierte Klon von L21\_1.1 umfasste zunächst 331 Nukleotide. Diese kodieren für 110 Aminosäuren, die die höchste Homologie zu FARM-1 aufwiesen, speziell zur diagnostischen Astacin-Metallopeptidase Domäne. Es konnte jedoch kein klarer ORF abgegrenzt werden. Mit Hilfe der *Hydra* EST-Projekte aus St. Luis and Mishima (Konsensussequenz zusammengesetzt aus den EST's: CF657658.1; BP505802; CF777297.1) konnte diese Sequenz auf 580 Nukleotide erweitert werden (siehe Abb. 2.14). Aber auch dieser Sequenz konnte noch kein begrenzter ORF zugeordnet werden.

```

1      AATAAGTTACAAAATGTACAGAATTTTTGTTTATTGCAGTCTAATTCCTTAGTGCTAGCGC
1      I S Y K M Y R I F V Y C S L I L S A S A
61     ATGGGTCAGAGATATGGAAAATCCGAATTTGTATCAAGGAGATATGATATTATCGCCATC
21     W V R D M E N P N L Y Q G D M I L S P S
121    TGAAATAGAAGAAGTTCGAAATGGAACTTTTACATTTTCAGCACTTGGAGATTTAAGCAA
41     E I E E V R N G T F T F S A L G D L S K
181    GATGTGGCCTAATGCTGTTGTACCTTACGTCATAGATTTCATCCTTAGCTAATGAAAGAAA
61     M W P N A V V P Y V I D S S L A N E R K
241    AGCAAAAAGTGGGATCGAAAAGTGAATGCTGATTATCATAAATACACCTGCTTGAGATT
81     A K S G I E S A I A D Y H K Y T C L R F
301    TAAATTAAGAACAAATGAGGCGGAATATATCAGATTTTGGCGGGTAGCGGTTGTTTCATC
101    K L R T N E A E Y I R F W R G S G C S S
361    GTATGTTGGGTATACTAAGGGAAGGAGAAAATGATGTATCGCTTTTCTGAAGGATGTTGGAG
121    Y V G Y T K G R R N D V S L S E G C W S
421    TAAATCAACTGTTTTGCATGAAGTTGGGCACAGCTTAGGTTTCCATCATGAACAAACCCG
141    K S T V L H E V G H S L G F H H E Q T R
481    ACCTGACAGAGATAGTTTGTACTATTGTTAAAAGTAACATAAGTCCTGGTACCTATTT
161    P D R D S F V T I V K S N I S P G T Y F
541    CAATTTTGAAAAGAAAACGCAAGAGACATTAATTCATAC
181    N F E K E N A R D I N S Y

```

**Abb. 2.14 Nukleotidsequenz mit korrespondierender Aminosäuresequenz des Klones L21\_1.1.** Der unterstrichene Teil der Sequenz ist die Astacin-Metalloendopeptidase Domäne. Diese besteht unter anderem aus einem Zink bindendes Motiv, das rot unterlegt worden ist. Desweiteren ist diese Domäne charakterisiert durch vier konservierte Cysteinreste, von denen drei rot markiert wurden. Der vierte befindet sich wahrscheinlich im noch unbekanntem 3' Bereich bzw. im unbekanntem C-terminalen Teil.

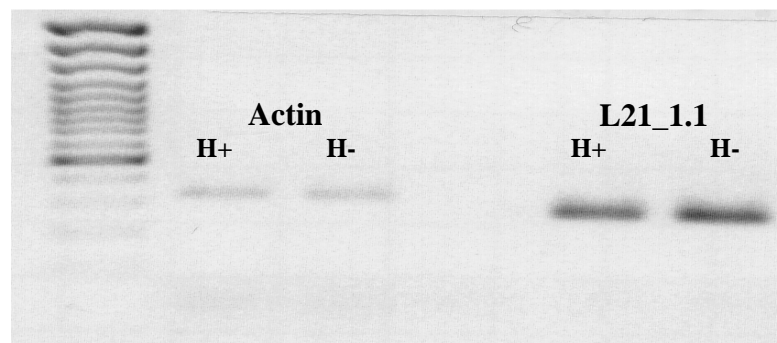
Weitere 3' bzw. 5' RACE Experimente sind erforderlich, um den gesamten Bereich des ORF's zu bestimmen. Allerdings veränderte sich durch die Verlängerung der Sequenz von Klon L21\_1.1 die Homologie zugunsten von PMP1, ebenfalls einer Astacin-Metalloendopeptidase. Diese Peptidase, isoliert aus *Podocoryne carnea*, spielt sowohl eine

Rolle bei der Entwicklung der Qualle als auch bei der Verdauung der Nahrung (Pan et al., 1998). Es ist davon auszugehen, dass noch etwa 80 bis 90 Aminosäuren, vor allem am C – Terminus dazukommen werden, sollte sich die Homologie zu PMP1 bestätigen (Abb. 2.15).

PMP1	21	WVDLMENAGMFEQDMELDPDEKEGVLKTGN	NAFASIK–GGRWPGAKIAYQIERSIGSG–	76	
		WV MEN +++GDM L P E E V	F+++ WP A + Y I+ S+ +		
L21_1.1	21	WVRDMENPNLYQGDMLSPSEIEEVRNGT	FTFSALGDL SKMWPNAVVPYVIDSSLANERK	80	
PMP1	77	GRTAIAANAIAQYHKHT	CLRFHKRTNERSHISFYKGGG	CSSPVGYSRGRQNRISLAGGCWR	136
		++ I +AIA YHK+T	CLRF RTNE +I F++G	GCSS VGY GR+N +SL+ GCW	
L21_1.1	81	AKSGIESAIADYHKYT	CLRFKLRITNEAEYIRFWRGSG	CSSYVGYTKGRRNDVSLSEGCWS	140
PMP1	137	TGIVMHEIGHSIGIYHEQSRPDRDSYVEIV		166	
		V+HE+GHS+G +HEQ+RPDRDS+V	IV		
L21_1.1	141	KSTVLHEVGHSLGPFHHEQTRPDRDSFVTIV		170	

**Abb. 2.15 Vergleich der Homologie in der Aminosäuresequenz zwischen PMP1 und L21\_1.1.** Neben einer starken Homologie innerhalb der Astacin-Metallopeptidase Domäne, gibt es durchaus auch im N-terminalen Bereich Homologie, welche eine Unterscheidung zwischen FARM-1 und PMP1 ermöglichen. **grau** – Astacin-Metallopeptidase Domäne, **rot** – konservierte Cysteinreste

Die Expression des Gens L21\_1.1 wird durch die Behandlung der Tiere mit HEADY reprimiert. Diese Schlussfolgerung ergibt sich, da der Klon aus der cDNA Bank I isoliert wurde. Durch RT-PCR konnte diese Abhängigkeit (siehe Abb. 2.16) bestätigt werden.



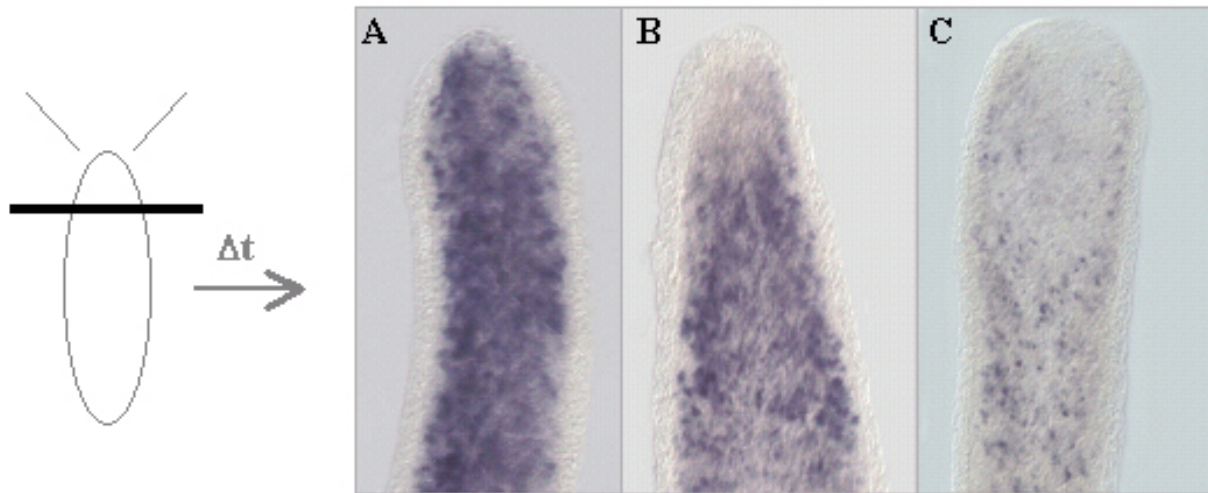
**Abb. 2.16 Ergebnisse der RT-PCR zur Verifizierung der Abhängigkeit der Expression von L21\_1.1 von der Behandlung mit HEADY – Peptid.** (H+)- PCR-Produkte, entstanden aus cDNA von HEADY-behandelten Tieren, (H-) PCR-Produkte, entstanden aus cDNA von Kontrolltieren. Die Actin PCR diente der Equilibrierung der eingesetzten cDNA Mengen.

Aufgrund der gezeigten Homologie, vor allem zu *FARM-1*, konnte bereits vermutet werden, dass das Gen im Gastralbereich exprimiert wird. Die *in situ* Analyse bestätigte dies. Darüber hinaus ist die Expression spezifisch für Drüsenzellen des Entoderms (siehe Abb.2.17).



**Abb. 2.17** Das räumliche Expressionsmuster von L21\_1.1 einer Astacin-Metallopeptidase in *Hydra*. **A** Die Expression des Gens beschränkt sich auf die Drüsenzellen des Entoderms im Gastralbereich der *Hydra*. Im Kopf und Fuß wird L21\_1.1 nicht exprimiert. **B** Die Vergrößerung eines Ausschnittes zeigt die zelluläre Lokalisierung der Expression, in den Drüsenzellen.

Die Verteilung der Expression ist jedoch keineswegs gleichmäßig über das Entoderm des Gastralbereiches verteilt. Diese folgt eher einem Gradienten, beginnend kurz unterhalb des Kopfes mit einer starken Expression, die in Richtung der Knospungszone langsam schwächer wird und nach der Knospungszone nicht mehr zu erkennen ist. Um feststellen zu können, in welcher Weise die Expression dieses Gen durch Musterbildungsprozesse beeinflusst wird, wurde dieselbe *in situ* Analyse mit Hydren durchgeführt, die für unterschiedliche Zeiträume (6h, 12h, 24h) die Möglichkeit hatten, den Kopf zu regenerieren (Abb. 2.18).



**Abb. 2.18** Kopfregenerationsexperiment, um den Einfluß von Musterbildungsprozesse auf die Expression von L21\_1.1 zu testen. Expression von L21\_1.1 nach **A** 6h, **B** 12h und **C** 24h Kopfregeneration.

Anhand der Ergebnisse (Abb.2.18) des Regenerationsexperimentes lässt sich konstatieren, dass sich an der gradierten Verteilung des Gens nichts ändert. Allerdings ist nach 12h Regeneration zu erkennen, dass die der apikalen Spitze am nächsten liegenden Gewebeschichten die Expression des Gens reprimieren. Der Effekt ist nicht ganz so stark, wie die Bilder (B-C) es vermuten lassen, aber die Spitze des regenerierenden Gastralbereiches, die später zum Hypostom des Kopfes wird, unterdrückt die Expression des Genes in seiner unmittelbaren Umgebung. Dies stimmt mit den Beobachtungen an nicht regenerierenden Tieren überein, die im Kopf, d.h. Hypostom- und Tentakelbildungszone, über keine Expression von L21\_1.1 verfügen. Wenn also apikale Strukturen die Expression dieses Genes verhindern, scheint es logisch, dass auch das durch die HEADY – Behandlung veränderte Gewebe die Expression des Genes unterdrückt. Die hier beschriebene Astacin-Metalloprotease ist also in ähnlicher Weise sensitiv auf Positionssignale, wie das im Falle von FARM-1 gezeigt werden konnte, jedoch ist sie im Gegensatz sensitiv auf kopfinduzierende Signale (Kumpfmüller et al., 1999).

### 2.1.2.3. HEADY's inhibitorische Wirkung auf Klon B1\_H4, ein *Cystatin* homologes Gen

Die Sequenzanalyse für B1\_H4 ergab eine in Abb. 2.19 gezeigte 560 Nukleotide große Sequenz, die einen klar abgegrenzten ORF von 413 Nukleotiden enthält. Diese kodieren für ein 138 Aminosäure langes Protein, das eine Cystatin Domäne zwischen den Aminosäuren L45 und L125 beherbergt. N - terminal konnte wieder ein 18 Aminosäure langes Signalpeptid

identifiziert werden, das durch die Anwesenheit einer Schnittstelle für die Endopeptidase des ER zusätzliche Bestätigung erfuhr. (Abb. 2.19)

```

1      GTAAAGTCATACCTACTAGTATAGACTTTGTCAATACCTAACAGTAAAGACAGTCAGAAT
1      M
61     GAGTTTAGCTCTAGCCTTTGTTGCTCTACTTGGATTATCTTTAGCAAACGCACAATTAGG
2      S L A L A F V A L L G L S L A N A Q L G
121    AGGCATCGTCAATCTATCACAACTAAAGTTACGGAACCTTTATCGGAAAATGGCGACTT
22     G I V N L S Q T K V T E L L S E N G D F
181    TGCTAAAGGTTTTAAAAATGGCTGTTACAAAGCTAAACAACGGCAACGAAAAACATAAGCA
42     A K G L K M A V T K L N N G N E K H K Q
241    AGTAATAGAAAAGATTATCGACGCAACTTCGCAAGTTGTCACCGGTATCCGCTACGTAGT
62     V I E K I I D A T S Q V V T G I R Y V V
301    TAATGTTAAAATTGTCGAATCGGTGTGTAAAAGCATGAATAACAACATATTAATGACAAC
82     N V K I V E S V C K S M N N N I L M T T
361    AAACTTTGCCCTGCACTCAAGTATTCTAAATCAAAAATTTGTAAGGTGGTTATTTGGAG
102    K L C P A L K Y S K S K I C K V V I W S
421    CCGTCGTTGGCTCAGTTTAGCAACGGAATCACTAGTTGTAGATATTACATGTTAATACTT
122    R R W L S L A T E S L V V D I T C
481    GTTTACTTGTATTACTACACGTTTTTGCACGTTTCTAAAAAAGATGTATTTATTAGAT
541    AAATTTTATTTATTTAATG
  
```

**Abb. 2.19 Nukleotidsequenz mit korrespondierender Aminosäuresequenz.** Die grau hinterlegte Sequenz umfasst die gesamte Cystatindomäne. Diese Domäne zeichnet sich durch einen hohen Anteil an sehr stark konservierten Aminosäuren aus, die hier rot eingefärbt wurden. Das charakteristische Muster dient der eindeutigen Zuordnung. Die 18 Aminosäuren des Signalpeptides sind unterstrichen. Zwischen A18 und Q19 befindet sich die Endopeptidaseschnittstelle des ER. Das Start und die Stopcodons sind mit fetten Buchstaben dargestellt.

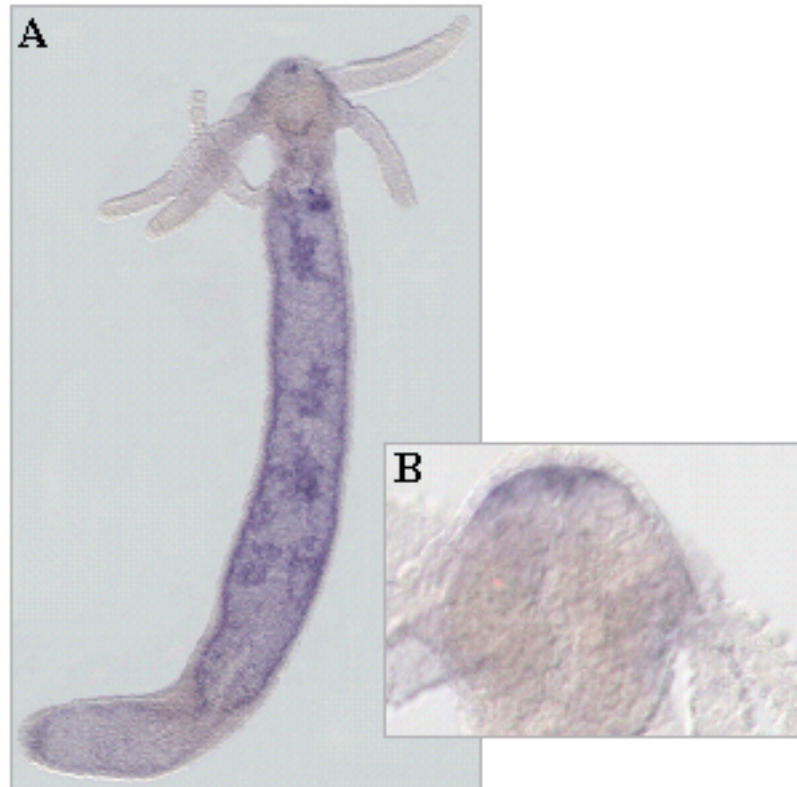
Proteine die eine Cystatindomäne besitzen, stellen in der Regel Inhibitoren für Papain-ähnliche Cysteinproteasen dar. Diese als Cathepsine bezeichneten Enzyme, verfügen über eine ausgesprochen große katalytische Aktivität, die dementsprechend reguliert werden muss. Die Hauptaufgabe der Cystatine liegt in der Kontrolle der Aktivität der Cathepsine (Turk et al., 1993).

Der Einfluss von HEADY auf die Expression dieses Genes ist ein negativer, da dieser Klon das Resultat der SSH war, die zu cDNA Bank I führte. HEADY hat also eine reprimierende Wirkung auf die Expression eines Cathepsininhibitors, dass zu einer gesteigerten Aktivität dieser Cysteinproteasen führen sollte.

Um über mögliche Auswirkungen der Inhibition der Expression von B1\_H4 spekulieren zu können, ist es notwendig, das natürliche Expressionsmuster zu ermitteln. Die *in situ* Expressionsanalyse ergab ein positives Signal im Entoderm, verteilt über den gesamten Bereich des Körpers (Abb. 2.20). Etwas genauer betrachtet, wird das Gen im Kopf allgemein schwach exprimiert. Im Hypostombereich des Kopfes jedoch kann man wieder eine verstärkte



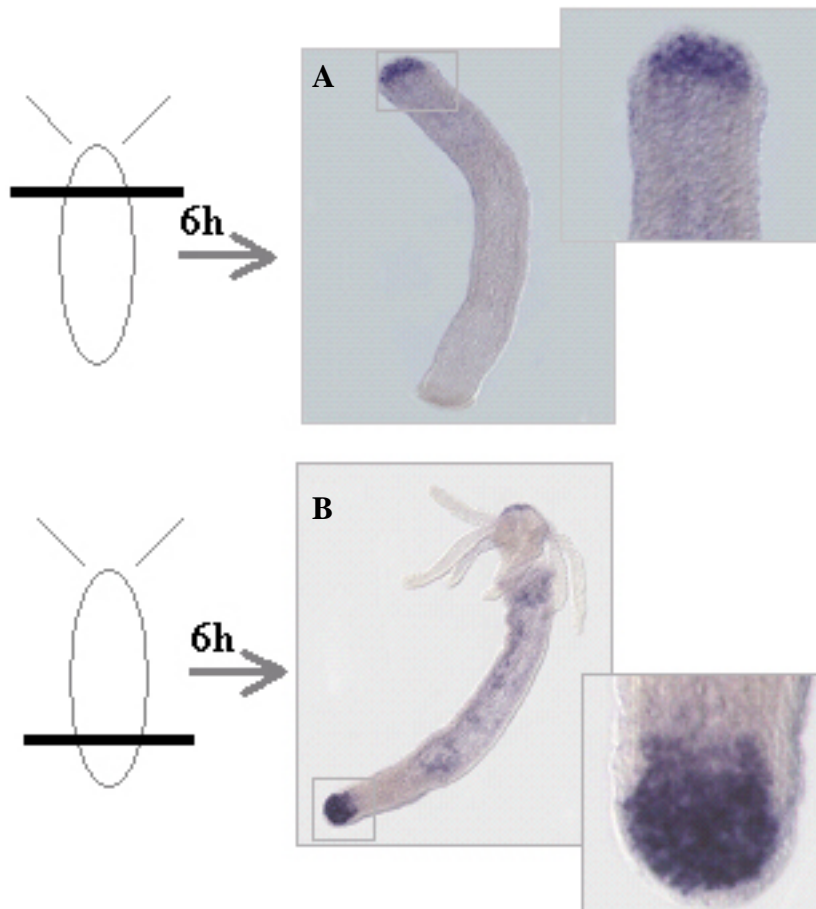
Expression beobachten. Die vereinzelt auftretenden dunkleren Stellen lassen sich derzeit noch keinen Strukturen zuordnen.



**Abb. 2.20 *In situ* Expressionsanalyse des Klonen B1\_H4 in *Hydra*.** **A** Expression beschränkt sich auf das Entoderm. Im Kopf und Fuß wird die Expression etwas schwächer, nimmt jedoch am Hypostom, dem apikalsten Bereich, wieder zu. Die im Körperbereich auftretenden dunkleren Flecken lassen sich bisher keinen Strukturen zuordnen. **B** Vergrößerte Darstellung des Kopfes, bei der die Verstärkung des Signals im Hypostom besonders gut zu erkennen ist.

Dieses Expressionsmuster lässt schwerlich Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion bei Musterbildungsprozessen zu. Interessant aber ist, dass B1\_H4 in Fuß- und Kopfregenerationsexperimenten immer an der sich regenerierenden Stelle exprimiert wird. (Siehe Abb. 2.21). Bei der Regeneration findet ein enormer Umbau von Strukturen statt. So wird z.B. die extrazelluläre Matrix ( extracelluläre matrix (ECM)) an bestimmten Stellen umgebaut, um eine Migration von differenzierten oder sich differenzierenden Zellen zu ermöglichen. An diesem Prozess sind eine ganze Reihe von Proteasen beteiligt. Vor allem Metalloproteasen und Matrixmetalloproteasen wurde eine entscheidende Rolle beim Umbau der ECM in *Hydra* eingeräumt (Yan et al., 2000). Aber auch von den Cathepsinen, den Cysteineproteasen, ist schon seit längerem bekannt, dass sie am Abbau der ECM beteiligt sind (Mort, 1998). Diese Argumente zusammengenommen lassen den Schluss zu, dass die

Cathepsine zusammen mit ihren Inhibitoren, den Cystatinen, einen entscheidenden Anteil an der Kopf- und Fußregeneration haben. Im Abschnitt 2.2.1.1 dieser Arbeit wird beschrieben, dass die Cysteinprotease *Cathepsin L* ebenfalls verstärkt bei der Kopf- und Fußregeneration exprimiert ist. Die Überlagerung der Expression dieser beiden Moleküle und die in anderen Organismen beschriebene Interaktion lässt es plausibel erscheinen, dass bei den Regenerationsprozessen in *Hydra* diese beiden Moleküle in Wechselwirkung stehen, und das Cystatin (B1\_H4) dabei die proteolytische Aktivität der Cathepsine reguliert.



**Abb. 2.21 Expression von B1\_H4 nach Kopf- bzw. Fußregeneration. A** Nach 6 h Kopfregeneration ist ein deutliches Signal an der regenerierenden Spitze erkennbar. **B** Auch bei der Fußregeneration kann eine starke Expression des Genes an der regenerierenden Spitze beobachtet werden.

## **2.2 Charakterisierung der Vorgänge bei Regeneration und Knospung in *Hydra* durch Erstellung und Vergleich von Expressionsprofilen**

Die Experimente die unter diesem Punkt zusammengefasst sind, sollen die Analyse der Musterbildung über das Limit der bis heute bekannten Gene in *Hydra* erweitern. Dies schien notwendig, um nicht zuletzt die Position von HEADY in dem genetischen Netzwerk, welches das apikale Schicksal determiniert, zu bestimmen. Der Vorteil der hier eingesetzten Methodik liegt darin begründet, dass sie nicht unmittelbar auf das Auffinden bereits in anderen Systemen (Organismen) als relevant identifizierte Musterbildungsgene abzielt, sondern die Identifizierung bisher unbekannter, möglicherweise sogar Spezies - spezifischer Gene erlaubt. Diese könnten der Schlüssel zum besseren Verständnis der Rolle von *Heady* sein.

Apikale Strukturen werden vor allem bei der Regeneration des Kopfes und bei der Knospung gebildet. Deshalb stand die Untersuchung dieser Prozesse im Blickpunkt der im folgenden zu beschreibenden Analyse.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden mit unterschiedlichen Methoden Expressionsprofile verschiedener Kopfregenerations- und Knospungsstadien erstellt. Zwei Methoden standen dabei im Blickpunkt: 1) Hybridisierung und Vergleich von Filtern mit Klonen einer normalisierten cDNA Bank 2) S(upression) S(ubtractive) H(ybridisation) (SSH) mit anschließender Hybridisierung von cDNA Macroarrays.

### **2.2.1 Hybridisierung und Vergleich von Filtern mit Klonen einer normalisierten cDNA Bank**

Eine bereits vorher generierte und dankenswerter Weise durch Herrn Dr. Konstantin Khalturin zur Verfügung gestellte normalisierte cDNA Bank war Ausgangspunkt für den ersten Teil der Analyse. Diese cDNA Bank enthielt einen Querschnitt von Genen, die in adulten Polypen exprimiert sind, aber auch Gene, die nach 24 h Kopfregeneration und bei der Knospung (Knospungsstadien 1-6) exprimiert werden. Bei vielen konventionell erstellten cDNA Banken wird die Tatsache nicht berücksichtigt, dass die Transkripte der einzelnen Gene in unterschiedlicher Anzahl im Transkriptom vorhanden sind. Bei der Herstellung der hier verwendeten cDNA Bank wurden die Unterschiede in der Anzahl der Transkripte pro Gen nahezu beseitigt, so dass man hier von einer normalisierten cDNA Bank spricht. Nach Transformation dieser cDNA Bank in *E. coli* (Stamm DH5 $\alpha$ ) wurden 4608 Klone in einer

geordneten Art und Weise auf eine Nylonmembran mit Hilfe eines Roboters plaziert. Diese mehrfach hergestellten, identischen Filter wurden getrennt mit radioaktiver cDNA, hergestellt aus 0h, 12h und 24h kopfregenerierenden Tieren sowie cDNA bestehend aus einer Mischung von Tieren mit unterschiedlichen Knospungsstadien (Phasen 1-6), hybridisiert. Der Vergleich der vier so hergestellten Filter untereinander ergab 86 Klone, die erkennbare Unterschiede in ihren Hybridisierungssignalen lieferten. Diese 86 Klone verteilen sich folgendermaßen auf die 3 möglichen Vergleichspaarungen:

<b>0h Kopfregeneration verglichen mit</b>	<b>Reguliert<sup>*1</sup></b>	<b>Gesamt</b>
12 h Kopfregeneration (reg.)	8+/13-	21
24 h Kopfregeneration (reg.)	14+/21-	35
knospende Hydren (Stadien 1-6)(k.)	2+/43-	36

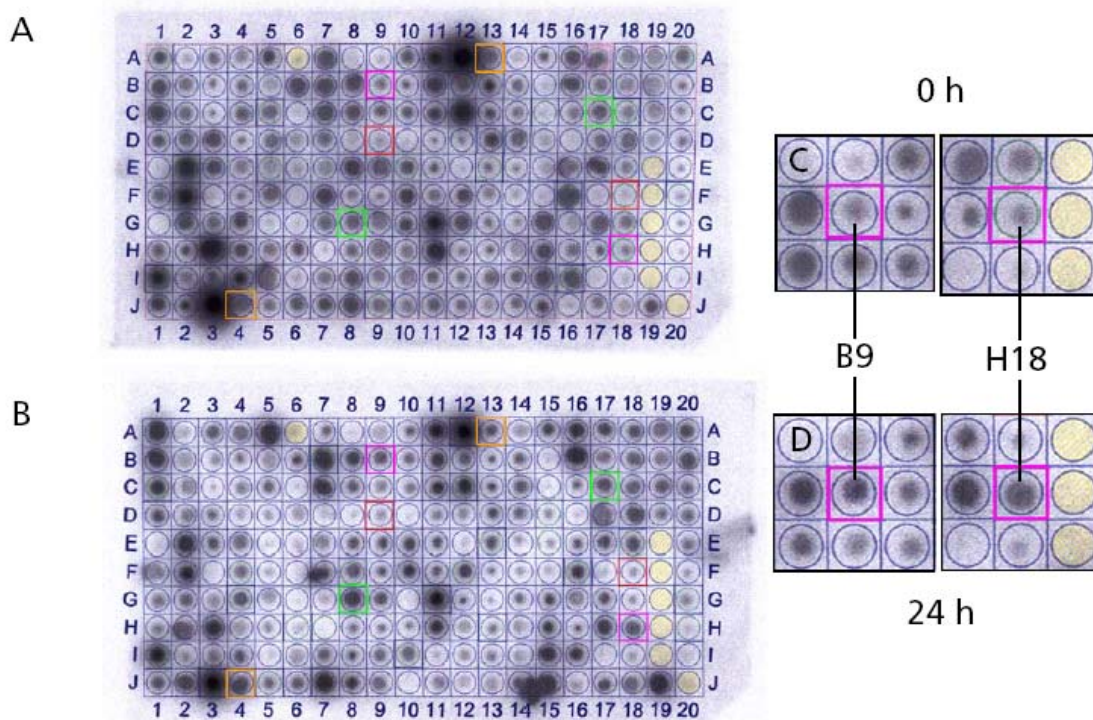
<sup>\*1</sup> Mit dem - versehene Klone besitzen ein stärkeres Hybridisierungssignal auf dem 0h reg Filter im Vergleich zu dem jeweiligen Partnerfilter, respektive die mit + gekennzeichneten Klone ein schwächeres Hybridisierungssignal.

**Tab. 2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Hybridisierung der cDNA Macroarray's mit verschiedenen Regenerations- und Knospungsstadien.**

Um 0 h Kopfregeneration überhaupt mit den knospenden Hydren vergleichen zu können, musste den knospenden Hydren ebenfalls der Kopf entfernt werden, bevor aus ihnen die cDNA zur Hybridisierung generiert werden konnte.

Um durch ein unabhängiges Experiment zu verifizieren, inwieweit diese 86 Klone (Tab.2.3) tatsächlich differentiell sind, wurden kleinere, mit PCR-Produkten der 86 Klone beladene Filter hergestellt. Das Aufbringen von PCR – Produkten hat dabei den Vorteil im Vergleich zum Aufbringen von Bakterienklonen, dass eine kontrollierbare Menge an DNA auf die Filter gelangt und dass zusätzlich nur die interessierenden DNA Fragmente aufgebracht werden, was die Spezifität erhöht. Diese kleineren Filter haben weiterhin den Vorteil, dass ein sehr viel geringeres Hybridisierungsvolumen ausreicht und damit eine höhere Probenkonzentration zum Einsatz kommen kann, was die Sensitivität gegenüber weniger stark exprimierten Genen erhöht. Um Hybridisierungsartefakte weitgehend ausschließen zu können, wurden die Filter so konstruiert, dass die in Duplikaten aufgetragenen Klone möglichst weit voneinander entfernt liegen.

Die so hergestellten Filter wurden mit der cDNA aus regenerierenden (24 h) und nicht regenerierende Hydren ( 0h) hybridisiert (Abb. 2.22).



**Abb. 2.22 Ergebnis der Hybridisierung der „PCR“-Filter.** **A** Filter hybridisiert mit 0 h reg. cDNA **B** Filter hybridisiert mit 24 h reg. cDNA. Farblich markierte Boxen: orange: Klon 72\_B16\_5, pink: Klon 1\_C18\_1, rot: Klon 7\_N12\_1, grün: Klon 53\_P8\_2. Am eindruckvollsten ist der Unterschied in der Expression an Klon 1\_C18\_1 zu dokumentieren. Eine Gegenüberstellung der Stellen der Filter, an denen 1\_C18\_1 aufgetragen wurde, zeigt eine deutliche Aktivierung des Gens nach 24 stündiger Regeneration.

Aus der Analyse dieser PCR – Filter gingen 10 in ihrer Transkription aktivierte und 11 reprimierte Genfragmente hervor. Bei einer Reihe von Klonen konnte keine genaue Aussage über das Verhalten bei der Kopfregeneration gemacht werden, da diese keine einheitliche Tendenz zeigten. Dennoch wurden fünf dieser Klonen ausgewählt und zusammen mit den 21 differentiellen Klonen sequenziert. Zwei dieser Klone sollen im folgenden näher charakterisiert werden.

### 2.2.1.1 1\_C18\_1 / Cathepsin L eine Cysteinprotease wird bei der Kopfregeneration aktiviert

Der Klon 1\_C18\_1 ist ein aus verschiedenen Gründen bemerkenswerter Klon. Ausgewählt wurde er, da das Genfragment eine sehr starke Aktivierung der Genexpression während der Kopfregeneration zeigte. Die 411 Nukleotide des Klons 1\_C18\_1 wurden mit Hilfe der Konsensussequenz aus den EST -Sequenzen CF656322, CF657569, CF657698, CF778918, CF657867 verlängert, um so einen vollständigen offenen Leserahmen zu generieren (Abb. 2.23). Die Suche nach bereits in den Datenbanken veröffentlichten homologen Genen erwies

sich in diesem Fall als fruchtbar. Klon 1\_C18\_1 ist identisch zu dem aus *Hydra vulgaris* isolierten *Cathepsin L* (AAO65603). In zwei C - terminalen Aminosäuren N173D und T182A unterscheiden sich die beiden. Die Veränderungen sind durch den Austausch der jeweils ersten Base im Basentriplett zurückzuführen (Abb. 2.23)

```

1      TTAACGATTAAAGCCTCTGAAAACCTTGGCACTTGGTAACTTTGGTTTCGCCATAATGAA
1      M K
61     GGTTCCTGTGCATTATTGTTGTTGGGTGTGACTCCTTGCTTATAACCATGAAAGGCCTGT
3      V F C A L L L L G V T L A Y T I E R P V
121    TAAAGATGAATCTTGGATTCAATGGAAAATGTATCACAAAGTATATAGCCATGATGG
23     K D E S W I Q W K M Y H N K V Y S H D G
181    TGAAGAAACCGTTAGATACACGATCTGGAAAGATAACGAAAGACGTATTAGGGAACACAA
43     E E T V R Y T I W K D N E R R I R E H N
241    TTTAAAAGGTGGAGATTTTCTTTTAAAGATGAATCAGTTTGGTGACATGACAAATAGCGA
63     L K G G D F L L K M N Q F G D M T N S E
301    GTTCAAAGCATTTAATGGTTATCTCTCTCACAAACACGTTAATGGTTCAACATTTTTAAC
83     F K A F N G Y L S H K H V N G S T F L T
361    TCCAAATAATTTTGTGCTCCTGATACAGTTGATTGGAGAAACGAAGGATATGTTACCCC
103    P N N F V A P D T V D W R N E G Y V T P
421    AGTTAAAGACCAAGGTCAATGCGGTTTCATGCTGGGCTTYYAGTACCACTGGATCACTTGA
123    V K D Q G Q C G S C W A F S T T G S L E
481    AGGACAACACTTYAAAAAGACTGGTAAACTTGTAGYCTYAGTGAACAAAATCTAGTWGA
143    G Q H F K K T G K L V S L S E Q N L V D
541    CTGCTCTACTGCCTACGGTAACAATGGGTGCRAVGGTGGTTTGATGGATAATGCCTTTRC
163    C S T A Y G N N G C N/D G G L M D N A F T/A
601    CTATATTAAGGAAAACAAAGGCATAGACTCTGAAGCTTCTTATCCATACTGCAGAGGA
183    Y I K E N K G I D S E A S Y P Y T A E D
661    TGGAAAATGCGTTTTCAAAAATCATCTGTTGCTGCAACTGATACAGGATTTGTAGATAT
203    G K C V F K K S S V A A T D T G F V D I
721    ACCTGAAGGAAATGAAAATAAATTAAGGAAGCAGTTGCCTCAATTGGACCTATCTCTGT
223    P E G N E N K L K E A V A S I G P I S V
781    TGCAATTGATGCTAGCCACGAGTCATCCAATTTTACAGTTCTGGAGTCTATAATGAACC
243    A I D A S H E S F Q F Y S S G V Y N E P
841    AAGTTGCAGTTCAACAGAATTAGACCACGGTGTGTTAGTTGTGCGATATGGTACTGAATC
263    S C S S T E L D H G V L V V G Y G T E S
901    TGGCAAAGATTATTGGCTTGTA AAAACAGTTGGAATACATCATGGGGAGATAAGGGTTA
283    G K D Y W L V K N S W N T S W G D K G Y
961    TATCAAAATGCGTCGAAACGCAAAAATCAATGTGGAATTGCAACCAAGGCTAGTTATCC
303    I K M R R N A K N Q C G I A T K A S Y P
1021  ATTAGTTTGAWGAGAAAAAAAACCTCTTTCATTTKGWAAAATAG
323    L V *

```

**Abb.: 2.23 Nukleotidsequenz mit der translatierten Aminosäuresequenz von Klon 1\_C18\_1.** Konsensussequenz aus Klon 1\_C18\_1, des *Cathepsin L* aus *Hydra vulgaris* und den folgenden EST - Sequenzen CF656322, CF657569, CF657698, CF778918, CF657867 Die 15 Aminosäuren des vorhergesagten Signalpeptides sind unterstrichen. **rot:** 92 Aminosäuren des Propetids. **grün:** 2 Aminosäuren für die keine Nukleotidkonsensussequenz ermittelbar war. **rot unterlegt** sind die Aminosäure **Cys<sup>25</sup>** und **His<sup>164</sup>** der katalytischen Diade. Der Rest der Sequenz besteht aus einer Endopeptidasedomäne Peptidase\_C1, Papainfamilie.

Außer der Sequenz von *Cathepsin L* sind allerdings noch keine weiteren computergestützten Analysen des Gens in *Hydra vulgaris* veröffentlicht worden. Durch eine Signalsequenzanalyse konnte für den N - terminalen Abschnitt ein 15 Aminosäure langes Signalpeptid vorhergesagt werden.

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2.3 dargestellt, sind die Mitglieder dieser Proteinfamilie sehr aktive Proteasen, deren Aktivität strikt kontrolliert werden muss. Aus diesem Grund besitzen diese Proteasen ein N - terminales Propeptid, das abgespalten wird, um die Protease zu aktivieren. Bei den Säugetieren kann die Aktivierung von Cathepsin L durch eine Anzahl von Wachstumsfaktoren bewerkstelligt werden (Ishidoh et al. 1998). Das Propeptid der in *Hydra* isolierten Cysteinprotease Cathepsin hat eine Länge von 92 AS. Die darauf folgende Domäne hat eine sehr hohe Homologie zur Peptidase C1 der Papain ähnlichen Proteasen.

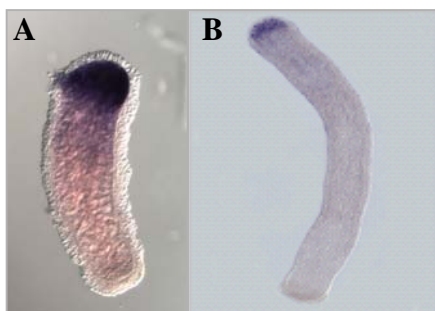
Nach der ersten Stufe der Kontrolle der Aktivität durch das Propeptid, kommt in einer zweiten Stufe die Inhibition durch eine Vielzahl von Proteinen hinzu. Darunter fallen auch die Proteine der Cystatin - Familie, die die Aktivität der Proteasen vor allem außerhalb der Zellen kontrollieren (Turk und Bode, 1991). Der Klon B1\_H4, isoliert als ein durch HEADY in seiner Expression beeinflussbares Gen, besitzt eine solche Cystatindomäne (siehe Abschnitt 2.1.2.3). So könnte dieses Gen auch einen Beitrag zur Kontrolle der Aktivität für das hier beschriebene Cathepsin L leisten.

Durch *in situ* Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass 1\_C18\_1, das *Cathepsin L* homologe Gen, von den Epithelzellen des Entoderms exprimiert wird (Abb. 2.24).



**Abb. 2.24 Expressionsanalyse des Klons 1\_C18\_1.** **A** Nach 24-30 h Regeneration konzentriert sich das Signal an der apikalen, regenerierenden Spitze. **B** Nach 35-48h konzentriert sich die Expression auf die hervortretenden Tentakeln. **C** Bei späten Knospungsstadien konzentriert sich die Expression auf die Tentakeln. **D** Bei Knospen, die kurz vor dem Trennen vom Muttertier stehen, wurde eine Färbung in der ganzen Knospe beobachtet.

Nach 24 h Kopfregeneration konzentriert sich das Signal zunächst auf die regenerierende Spitze. Im späteren Verlauf der Regeneration ist es mit den hervortretenden Tentakeln assoziiert (35h-48h) (Abb.2.24B). Es gibt Hinweise darauf, dass Cathepsin L außer bei der Kopfregeneration auch bei der Fußregeneration eine Rolle spielt und dass sich die Expression dort ebenfalls auf die regenerierende Spitze konzentriert (pers. Kommunikation M. Hassel). Abschließend soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass der Klon B1\_H4 (*Cystatin*) über das gleiche Expressionsmuster verfügt wie 1\_C18\_1 (*Cathepsin L*). So scheint eine Interaktion dieser beiden Gene aufgrund der jeweiligen Homologien und des überlappenden Expressionsmusters sehr wahrscheinlich (Abb. 2.25).



**Abb. 2.25 Vergleich der Expression von (A) 1\_C18\_1, *Cathepsin* und (B) B1\_H4, *Cystatin***

#### **2.2.1.2 7\_N12\_1, ein Gen ohne signifikante Homologie, ist an Kopf- und Fußregeneration beteiligt**

Das Auffinden unbekannter Gene, möglicherweise Spezies – spezifischer Gene, war eines der Vorteile des experimentellen Vorgehens. 7\_N12\_1 steht für ein solch bisher noch nicht beschriebenes Gen. Der isolierte und sequenzierte Klon konnte mit Hilfe der *Hydra* EST Projekte (Konsensussequenz aus CF658229, CF600707, BP505939, BP511894, CF654772) zu einem 995 Nukleotide langen Stück ergänzt werden. Dieses Fragment enthält einen ORF von 939 Nukleotiden, das für 312 Aminosäuren kodiert. Eine Signalpeptidanalyse (SignalP) sagte mit hoher Wahrscheinlichkeit für die ersten 19 N – terminalen Aminosäuren ein Signalpeptid voraus. Zwischen A19 und K20 befindet sich eine Schnittstelle für die Endopeptidase des ER, die gleichzeitig zur Bestätigung der Signalpeptidsequenz angesehen wurde (Abb. 2.26).



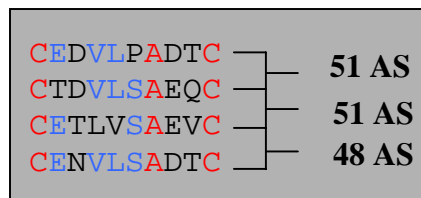
```

1      AAATTTCAAGATGAAATCAATAGCTGTTTATTTGTGTCCGTTTTGGTTTTCAATGCCT
1      M K S I A V L F V S V L V F Q C V
61     GTCTGCTAAAAGTTTATCAGTAAAACGCCTACTAAATGCGAAGATGTTCTTCCAGCTGA
18     S A K S L S V K L P T K C E D V L P A D
121    TACCTGTGCTTCACTAAAAACTGCAGCAGCCAAATTTAAAAGTAAATACTCAGCTTGAAA
38     T C A S L K T A A A K L K V N T Q L V N
181    CGATGCTGTTATTAACGCTGTTAAAAAAAATATACAAAAACCCAGGAAATCATTCTTTT
58     D A V I N A V K K N I Q N T Q E I I L F
241    TGTCAAAGATACTTTGGTAGAAAAGGCTACTAATTTTCAATGCACTGACGTTCTTTCTGC
78     V K D T L V E K A T N F Q C T D V L S A
301    AGAGCAATGCGATAAAAATTGGTTCATTGGAAAAAATCTTAAATTTAAAACCTTCAGACGT
98     E Q C D K I G S I G K N L K L K T S D V
361    TTCAAAAGCCATCAAAGAGGCCGTTGTGAACGGAGTTGATCAAGCAAAGTTATTTATGC
118    S K A I K E A V V N G V D Q A K V I Y A
421    TCGAGCTGTGCGTTTTCTTTTAAACGATGTCAAAAATGTTAATTGTGAAACCTTGGTCTC
138    R A V R F L L N D V K N V N C E T L V S
481    TGCAGAAGTTTGCAAAAAAGTTGCTGATTATGCTAAAAGTCTTAAACTGAGCACAACTGA
158    A E V C K K V A D Y A K S L K L S T T D
541    CGCCACAAACGCCGTTAAAGAAGCCATCGTCCAGGGTGTAAACAATGTCGAGATTATTT
178    A T N A V K E A I V Q G A N N A A D Y F
601    TAATAACGAGCTGAATACCTGAGAGCACAAATATCTTGCGAAAATGTTCTTTCAGCTGA
198    N N A A E Y L R A Q I S C E N V L S A D
661    CACATGTGAAAAAGTCCGAAAAATGCGGATAAATTCAGTGTATCATTAACCGAAGTCAA
218    T C E K V R K I A D K F S V S L T E V N
721    CTCAGTTATACGATCTGCTGTAGCCAGTGGTGTACTAAAGTTACAGATCTTTACAAACA
238    S V I R S A V A S G V T K V T D L Y K H
781    TGCTGTTAATTTTATTATTGAGAAATGGACACAAAGTTTGGAGACGAGCCCATGATGTA
258    A V N F I I E K W T Q S F G D E P M M Y
841    CAAGAGAAGCATAGATCAAGAAGAGATCAAAGAAACAGTTGTTTCGCGCCGTTTGGAGAAT
278    K R S I D Q E E I K E T V V R A V W R I
901    CATGGATGTAATAACCCCCCTTTGAAAAATGCTAACATAAATGGATAAAATATGTTCA
298    M D V I T P P L K N A N I N G.

```

**Abb. 2.26 Nukleotidsequenz mit korrespondierender Aminosäuresequenz des Klonen 7\_N12\_1.** Die unterstrichenen 19 N - terminalen Aminosäuren stellen das vorhergesagte Signalpeptid dar. **Grau unterlegt** sind die Cysteinboxen, eine auffällige Charakteristik dieses Proteins. **Rot** hervorgehoben sind die in ihrer Position innerhalb der Cysteinboxen hochkonservierten Aminosäuren Cystein 1. u. 10. sowie Alanin an 7. Position.

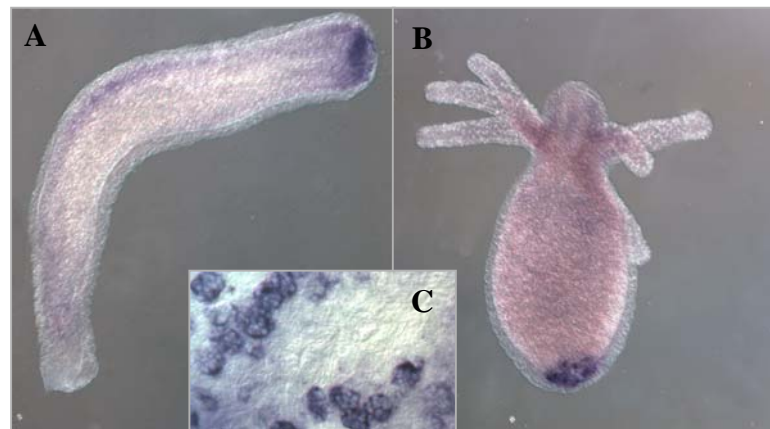
Bei einer genaueren Analyse der Aminosäuresequenz konnten vier cysteinreiche Abschnitte (Boxen) bestehend aus 10 Aminosäuren identifiziert werden. Diese Boxen werden von jeweils einem Cysteinrest flankiert. Vergleicht man die Boxen untereinander, so ist auffällig, dass sie in ihrer Aminosäurezusammensetzung relativ stark konserviert sind und an Position 7 mit dem Alaninrest sogar identisch sind. Interessant war zusätzlich die Tatsache, dass die Abstände zwischen den Boxen konstant sind. Sieht man von 3 fehlenden Aminosäuren zwischen Box 3 und 4 einmal ab, beträgt der Abstand zwischen den Boxen 51 Aminosäuren (Abb.2.27).



**Abb.2.27 Vergleich der Cysteinboxen.** rot identische Aminosäuren, blau in mindestens 3 der 4 Cysboxen identisch, Ziffern geben den Abstand zwischen den Cys-Boxen an.

Leider lassen sich daraus keine weiteren Schlüsse ziehen, da diese Charakteristika bei keiner anderen Proteinfamilie bisher beschrieben wurden. Es ist allerdings zu vermuten, da Cysteine häufig an der Stabilisierung der 3 – dimensionalen Struktur der Proteine durch die Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind, dass der definierte Abstand der Cysteine auf eine besondere 3D-Struktur hindeutet.

Mittels *in situ* Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass das Gen 7\_N12\_1 bei der Kopfregeneration exprimiert wird. Kopfregenerationsstadien zwischen 6 und 24 Stunden zeigen ein deutliches Signal in der regenerierenden, apikalen Spitze.(Abb. 2.28)



**Abb. 2.28 Expressionsanalyse von 7\_N12\_1 bei der Fuß- und Kopfregeneration.** A 6-24h Kopfregeneration, B 6-24h Fußregeneration, C das Gen wird in Drüsenzellen exprimiert.

Dabei ist das Gen ausschließlich in den Drüsenzellen des Entoderms exprimiert. 7\_N12\_1 ist jedoch kein Gen, das spezifisch bei der Kopfregeneration exprimiert ist, da auch bei den Fußregeneraten (Stadien zwischen 6 und 24 Stunden) ein deutliches Signal in der regenerierenden Spitze zu erkennen ist (Abb. 2.28 B). Die verfügbaren Informationen zusammengefasst lassen keine definitive Aussage über die Funktion des Proteins bei den Regenerationsprozessen zu. Es könnte aber als Strukturprotein eine Rolle bei der Reetablierung der ECM spielen.

Das vorhergesagte Signalpeptid deutet auf ein sekretiertes Protein hin. In den extrazellulären Raum abgegeben, könnte es mit Hilfe seiner Cysteinboxen in der Lage sein, Verbindungen zu

anderen cysteinreichen Proteinen herzustellen und damit Einfluss auf die Stabilität der ECM zunehmen. Wie bereits unter 2.2.1.1 angedeutet, findet genau an diesen Stellen und auch zum Zeitpunkt der Expression von 7\_N12\_1 ein massiver Umbau der ECM statt.

### **2.2.2 Identifizierung von Unterschieden in der Genexpression bei Knospung und Regeneration in *Hydra* durch SSH und cDNA Macroarray Hybridisierung**

Oberflächlich betrachtet könnte man annehmen, dass sich Kopfregeneration und Knospung in der Auswahl der Gene, die an diesen Prozessen beteiligt sind, nicht unterscheiden. Für eine Mehrzahl der benötigten Gene ist das sicher auch zutreffend. Trotz der unbestreitbaren Gemeinsamkeiten ist die Ansicht allgemein akzeptiert, dass sich diese Prozesse auch signifikant unterscheiden. Diesen Überlegungen liegt die Tatsache zugrunde, dass die Regeneration eines Kopfes stets entlang einer stabilen, determinierten Achse erfolgt, wohingegen die Induktion einer Knospe die Induktion einer neuen Achse voraussetzt. Ein Vergleich dieser beiden Vorgänge könnte daher zur Identifikation von Genen führen, die bei der Achseninduktion eine entscheidende Rolle spielen. Diese Gene wären dann natürlich auch potentielle Zielgene für das HEADY Peptid. Darüberhinaus würden aber Gene zu identifizieren sein, die, in Abhängigkeit davon in welcher Weise die entsprechenden Stadien miteinander verglichen werden, bei der Aufrechterhaltung der Achse in *Hydra* von Bedeutung sind. Besonders interessant dabei wäre die Frage, wie die Positionsinformation, die der Achse zugrunde liegt, gespeichert wird.

Um diese beiden Vorgänge zu vergleichen, mussten neue cDNA Banken generiert werden, die möglichst nur die Gene enthalten, deren Expression bei diesen Vorgängen verändert wird. Die für die Erstellung der cDNA Banken angewandte Methode wurde bereits in Abschnitt 2.1.2 zur Identifikation von HEADY – Zielgenen beschrieben. Auch in diesem Fall wurden 2 cDNA Banken mittels SSH generiert. Die erste cDNA Bank besteht aus den bei der Kopfregeneration bzw. Knospung in ihrer Expression aktivierten Genen. Dazu wurde der cDNA Pool aus kopf- und knospenlosen Hydren (Driver) von einem cDNA Pool bestehend aus verschiedenen Kopfregenerations- (4/8/16/32 h) und Knospstadien (1-6) (Tester) abgezogen. Zur Generierung der zweiten cDNA Bank wurden unter Umkehr von Driver und Tester die reprimierten Gene zusammengetragen (Abb.2.29).

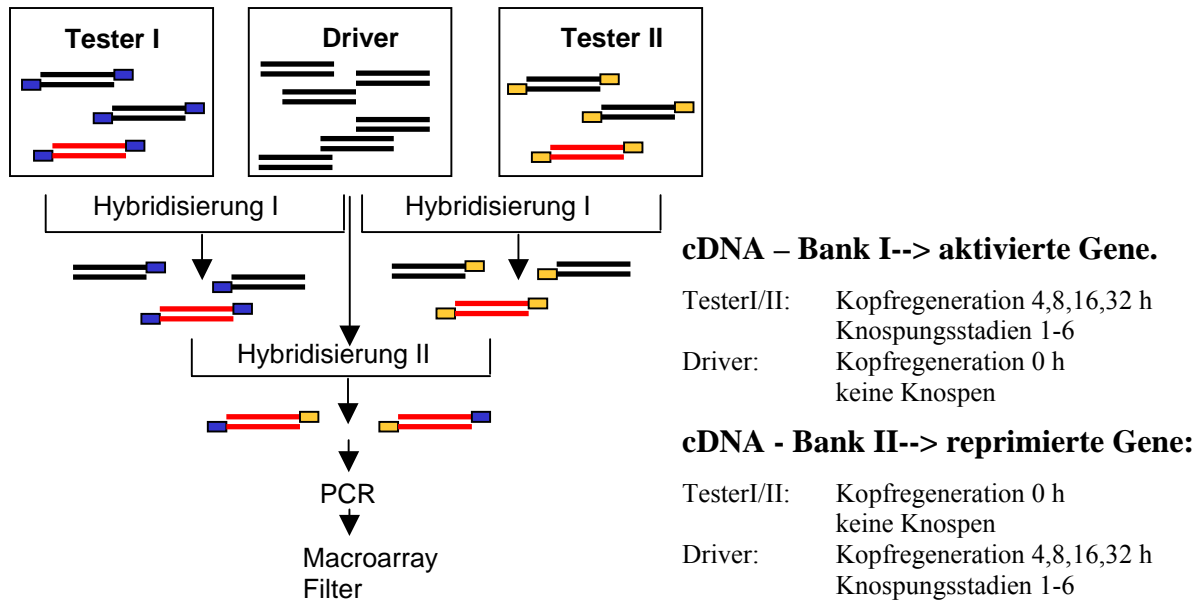
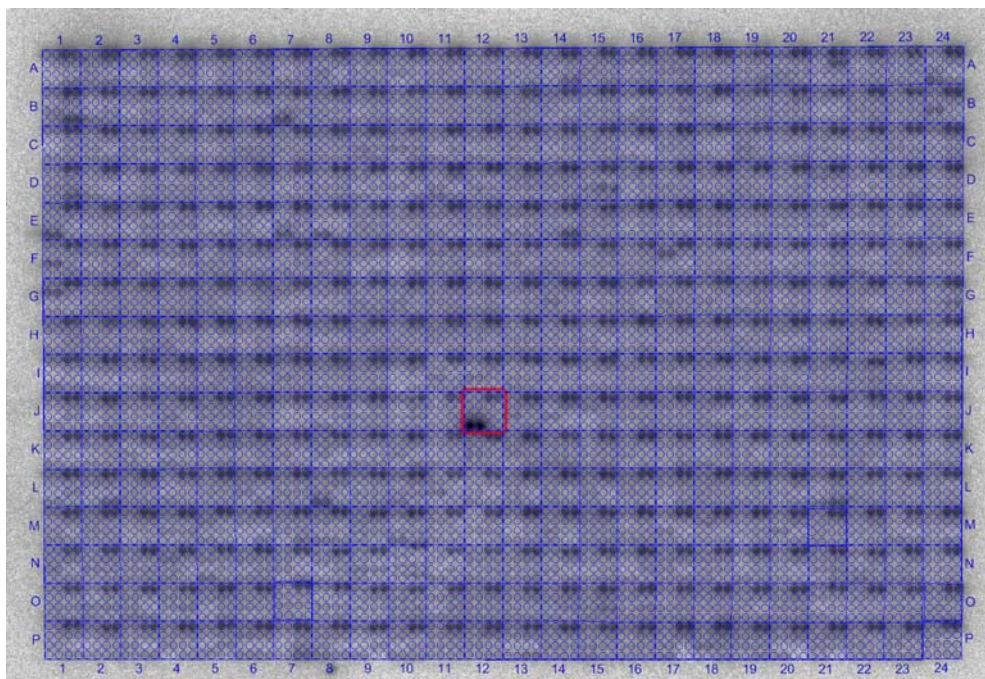
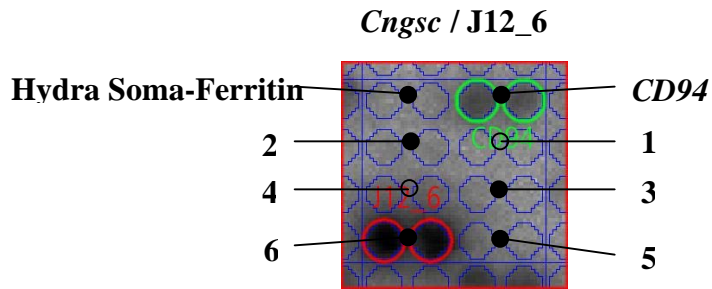


Abb. 2.29 Schematische Darstellung der Generierung der cDNA Banken.

Nach der Transformation der cDNA Banken in die Bakterien (DH5 $\alpha$ ) wurden 1152 Klone jeder cDNA Bank auf eine Nylonmembran unter Verwendung eines Roboters in einer geordneten Form aufgetragen.

Ein Gefühl für die Qualität der hergestellten cDNA Banken vermittelte die Hybridisierung der so erstellten Filter mit bekannten Musterbildungsgenen. Neben den bereits vorgestellten Klonen 1\_C18\_1 (*CathepsinL*) und 7\_N12\_1, konnte auch das durch eine andere Arbeitsgruppe beschriebene Gen *Cngsc* (Goosoid) (Broun et al., 1999) auf diesen Filtern nachgewiesen werden (Abb. 2.30). Anhand des Filters wurde *Cngsc* dem Klon J12\_6 zugeordnet.

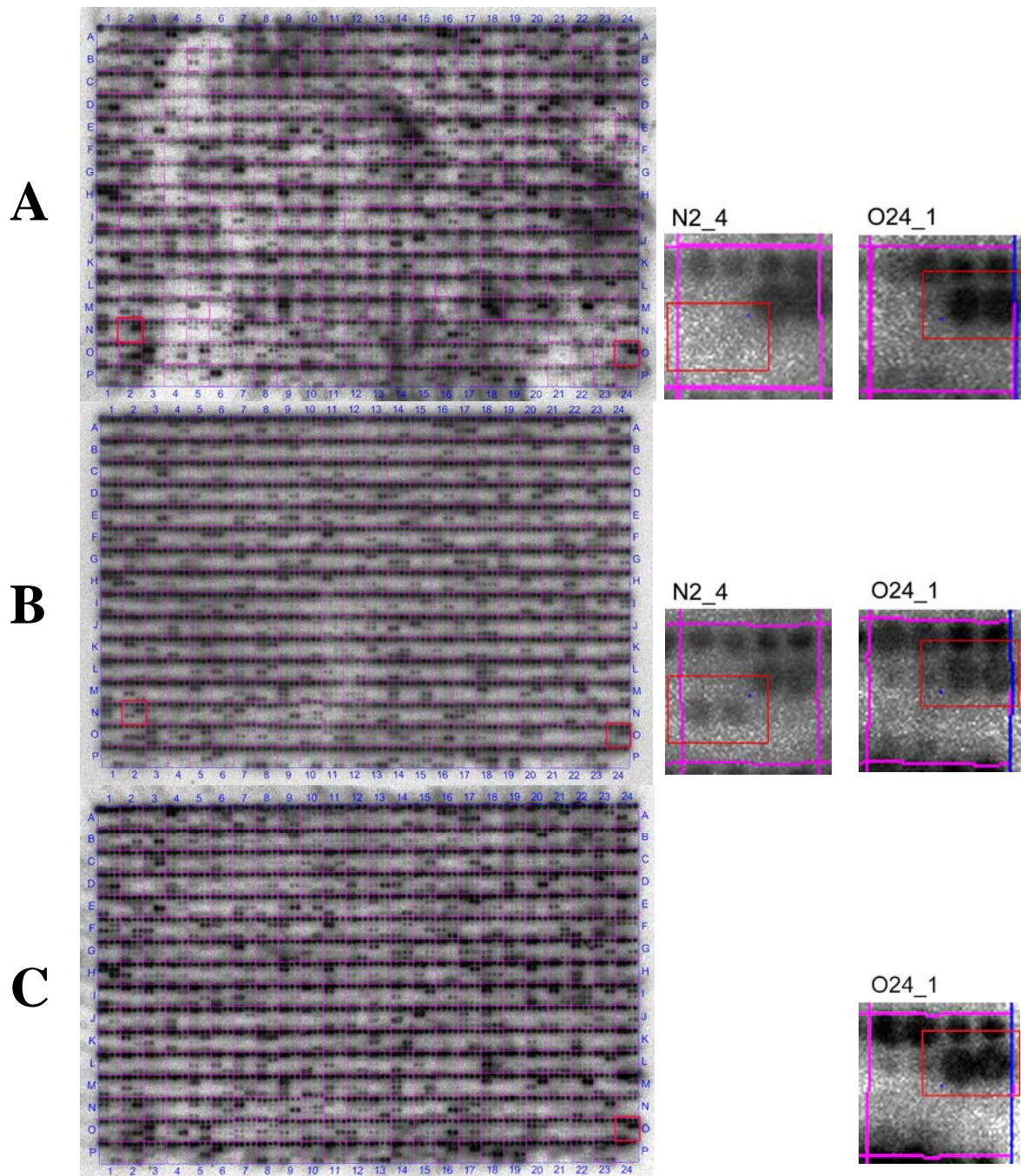




**Abb. 2.30 Hybridisierung des Macroarrayfilters mit einer *Cngsc* spezifischen Sonde.** Der rot markierte Teil des Filter ist im unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. **1-3** Die in Duplikaten aufgetragenen Klone der cDNA Bank I, Gene die bei der Regeneration und/oder Knospung aktiviert werden. **4-6** Die in Duplikaten aufgetragenen Klone der cDNA Bank II, Gene die bei der Regeneration und/oder Knospung reprimiert werden. **CD 94** Die Klone des *Botryllus schlosseri* Gens *CD94* dienten als Orientierungspunkte bzw. interne Markierungs- und Hybridisierungskontrolle. *Hydra Soma-Ferritin* Positiv Kontrolle; das ubiquitäre Gen *Soma-Ferritin* aus *Hydra*, diente der Orientierung auf dem Filter und zusätzlich als Equilibrierungsmarker.

### 2.2.2.1 Evaluierung der Filter im Hinblick auf einen Vergleich von Kopfregeneration und Knospung

Drei, der wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben hergestellten Filter, wurden mit drei verschiedenen, radioaktivmarkierten cDNA - Pools , generiert aus dem Gastralbereich der Tiere (Tiere ohne Kopf, keine Knospen), aus knospenden Tieren (Stadien 1-6) und aus kopfregenerierenden Tieren (4/8/16h), hybridisiert. Abbildung 2.31 zeigt diese drei Filter mit zwei exemplarisch hervorgehobenen differentiellen Klonen. N2\_4 enthält demnach eine bei der Kopfregeneration reprimierte Gensequenz. O24\_1 steht für eine bei der Kopfregeneration und der Knospung aktivierte Gensequenz.



**Abb. 2.31** Drei Macroarrayfilter hybridisiert mit **A)** cDNA generiert aus einer Mischung von Tieren mit verschiedenen Kopfregerationsstadien (4/8/16h) **B)** cDNA generiert aus Kontrolltieren (ohne Kopf, ohne Knospe) und **C)** cDNA generiert aus Tieren mit verschiedenen Knospungsstadien (1-6). Die jeweils vergrößert dargestellten Klone sind Beispiele für die Interpretierbarkeit dieser Filter.

Ein Vergleich der Filter untereinander ergab folgendes Gesamtergebnis: 256 Klone konnten als differentiell hybridisierende Klone identifiziert werden. 138 der 256 Klone waren dabei spezifisch für die Kopfregeneration, 47 spezifisch für die Knospung. Die übrigen 73 Klone

konnten als differentiell hybridisierende Klone in beiden Fällen ausgemacht werden (Abb. 2.32)

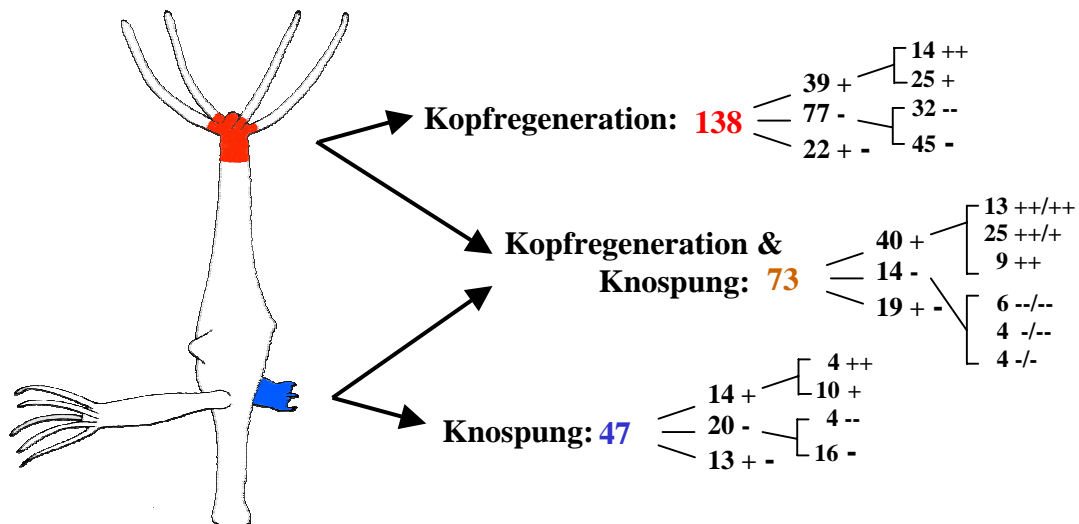


Abb. 2.32 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Vergleich der differentiell hybridisierten cDNA Macroarrays.

Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass sich hinter den 258 Klonen nicht automatisch 258 verschiedene Genfragmente verbergen. So werden sich diese Zahlen noch mit zunehmender Anzahl an sequenzierten und analysierten Klonen verändern.

An der allgemeinen Tendenz, die besagt, dass Knospung und Regeneration neben gemeinsam Genen in der Tat auch unterschiedliche, prozessspezifische Gene benutzen, wird sich aber nichts ändern. Die Untersuchung dieser prozessspezifischen Gene wird zeigen, worin sich Knospung und Kopfregeneration tatsächlich unterscheiden.

Um diese Klone genauer charakterisieren zu können, wurden zunächst 56 Klone ausgewählt (14 knospungsspezifische, 22 kopfregenerationsspezifische und 20 Klone die in beiden Prozessen involviert scheinen) und sequenziert. Die Ergebnisse dieser Sequenzierung sind in Tab. 2.4 zusammengefasst.

Abschließend wurde an Hand der Homologien, die die sequenzierten Klone zu anderen Genen bzw. deren Genprodukten aufweisen, ein Verteilungsmuster erstellt (Diagramm 2.1). Die im Diagramm 2.1 dargestellte Zusammenfassung enthält zusätzliche Klone, die bei der Hybridisierung der Filter nicht erfasst und direkt aus den cDNA Banken sequenziert wurden. Interessant ist die Tatsache, dass über 43 % der enthaltenen Gene zu den „house keeping“ Genen gehören, d.h. dass diese Gene in einem starken Maße an den Prozessen der Kopfregeneration und Knospung beteiligt sind.

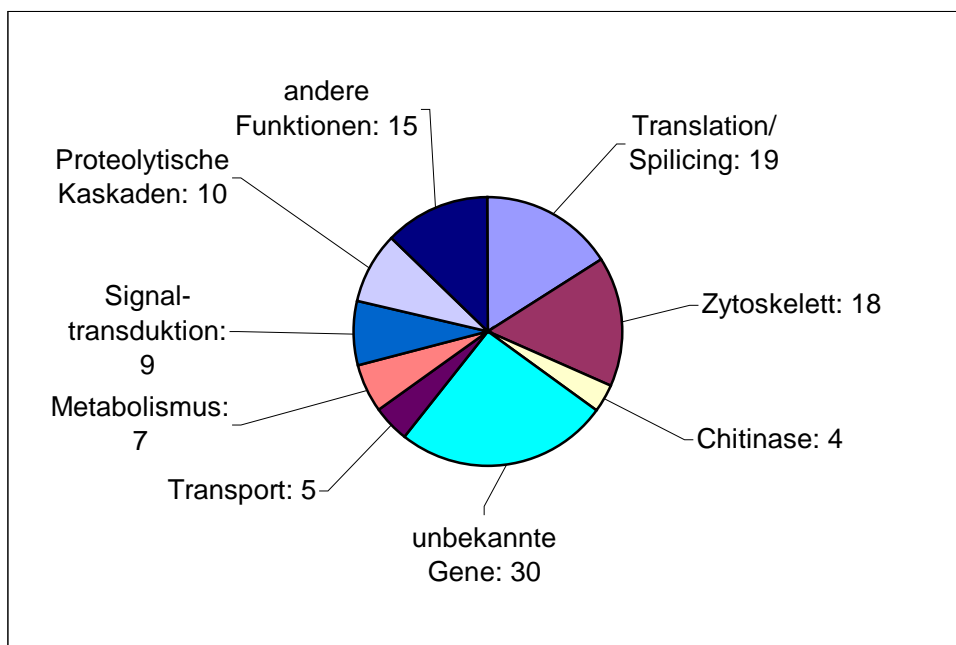
Nr.	ID	b / hr	Homologiesuche mit BlastX, BlastN* or Blast P**	E-Wert	Genbank Eintrag:	EST's
1	C23_2	++/++	Actin, non-muscle6.2	2E-82	P17126	ja
2	G14_3	++/++	Actin, non-muscle 6.2	3E-82	P17126	ja
3	B22_1	+ /++	Actin, non-muscle 6.2	8E-44	P17126	ja
4	N16_3	+ /++	particulate mehtane monooxygenase	3.7	BAC10314	nein
5	P6_2	+ /++	Actin, non-muscle 6.2	3E-22	P17126	ja
6	B6_2	++/+	GTP-binding protein alpha subunit1	3.5	AAN39541	nein
7	N2_1	++/+	Actin, non-muscle 6.2	2E-36	P17126	ja
8	I11_2	++/?	Actin	5E-06	AAF81133	ja
9	O4_3	+/?	calreticulin precursor	6E-09	AAN03709	ja
10	C19_4	--/--	Human DNA sequence from clone RP11-514O12*	0.064	AL159163	no
11	D4_4	--/--	ganglioside GM2 activator	8E-09	BAC20592	ja
12	D5_4	--/--	Pathogen related protein 1	1E-17	NP_012456	nein
13	F10_5	--/--	40S ribosomal protein S24 isoform a	3E-25	NP_148982	ja
14	H16_4	--/--	putative phophate permease	0.73	NP_069625	ja
15	P16_5	--/--	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 3	8E-05	NP_788840	ja
16	A7_6	-/--	Cathepsin L precursor	5E-12	AAO65603	ja
17	F11_5	-/--	diacylglycerol kinase, beta 90kDa, transcript variant 2*	0.011	NM_145695	ja
18	A13_5	--/-	ribosomal Protein L35	0.004	AAN52380	ja
19	B23_4	?/--	ferritin-like protein	0.44	AAQ12076	ja
20	G9_4	?/--	Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-254G11*	0.19	AC022795	ja
21	A23_1	++ k	U2 small nuclear RNA*	4E-07	X05084	ja
22	B14_3	++ k	Serine protease inhibitor (McaPI)	4E-19	P82968	ja
23	O16_3	++ k	Elongation factor 1-alpha	2E-14	P51554	ja
24	B20_1	+ k	Elongation factor 1-alpha	7E-64	P51554	ja
25	D19_1	+ k	chitotriosidase precursor	9E-13	AAG10644	ja
26	J1_3	+ k	Pathogen related protein1	5E-07	NP_012938	ja
27	M15_3	+ k	Methyl-accepting chemotaxis protein	0.021	NP_622340	ja
28	O11_3	+ k	conserved protein	2.0	NP_632799	ja
29	A14_5	-- k	similar to chitinase	2E-14	AAH46004	ja
30	B14_4	-- k	CCR4-NOT transcription complex subunit 7 POP2 homolog	7E-44	NP_035265	ja
31	D12_5	-- k	four wheel drive CG7004-PC	2E-11	NP_728519	ja
32	K8_4	-- k	Neurotoxic peptide caeron precursor**	0.00059	Q8MTX1	ja
33	B7_6	- k	hypothetical protein	0.76	NC_004317	ja
34	G10_4	- k	60S ribosomal protein L10	9E-65	BC045950	ja
35	A16_2	++ reg	Actin, non-muscle 6.2	1E-77	P17126	ja
36	D6_2	++ reg	small subunit ribosomal RNA gene*	0.0	AF358082	ja
37	E10_3	++ reg	Y-box binding protein1	1E-11	AAA61308	ja
38	F9_2	++ reg	U2 small nuclear RNA*	2E-07	X05084	ja
39	F15_3	++ reg	Actin, cytoskeletal IIIA	9E-37	P53474	ja
40	H5_1	++ reg	alpha-tubulin	8E-07	AAK27410	ja
41	I8_1	++ reg	small subunit ribosomal RNA gene*	0.0	AF358082	ja
42	I9_3	++ reg	cytosolic malate dehydrogenase A	6E-40	AAO26197	ja
43	O8_1	++ reg	Actin, non-muscle 6.2	4E-74	P17126	ja
44	P2_1	++ reg	Heat shock 70 KD Protein	5E-14	Q05944	ja
45	P19_3	++ reg	Actin non-muscle 6.2	3E-73	P17126	ja



Nr.	ID	b / hr	Homologiesuche mit BlastX, BlastN* or Blast P**	E-Wert	Genbank Eintrag:	EST's
46	B10_5	-- reg	ribosomal Protein L29/cell surface heparin binding pr. HIP	1E-18	BAA76401	ja
47	B24_4	-- reg	ribosomal protein L27a	4E-45	AAM27202	ja
48	C4_6	-- reg	60S ribosomal Protein L35a	2E-16	Q90YT3	ja
49	C10_4	-- reg	RNA Polymerase III subunit	2E-46	CAB41919	ja
50	C11_6	-- reg	Protease inhibitor (McaPI)	6E-19	P82968	ja
51	C12_6	-- reg	membrane-bound folate binding protein	2E-09	AAD33741	nein
52	D11_6	-- reg	putative ATP-dependent RNA helicase	1.4	NP_595925	nein
53	N2_4	-- reg	hypothetical Protein XP_287781	0.97	XP_287781	ja
54	P18_5	-- reg	Skeletal muscle LIM-protein 1	8E-10	P97447	ja
55	P19_5	-- reg	Translationally controlled tumor protein homolog	8E-93	Q94587	ja
56	J12_6	- reg	goosecoid	3E-44	AAF14575	ja

**Tab.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzierung von 56 differentiell hybridisierten Klonen**  
**reg:** Kopfregeneration (4/8/16 h); k: Knospungstadien (1-6); ++: stark aktiviertes Genfragment bei Kopfregeneration oder Knospung; + aktiviertes Genfragment bei Kopfregeneration oder Knospung, -- stark reprimiertes Genfragment bei Kopfregeneration oder Knospung, - reprimiertes Genfragment bei Kopfregeneration oder Knospung

Die größte einzeln vertretene Gruppe sind die unbekanntene Gene. Sie stellt die interessanteste Gruppe von Genen dar, deren spezifische Funktion in späteren Analysen aufgeklärt wird.



**Diagramm 2.1 Zusammenfassung aller sequenzierten Klone kategorisiert nach ihren besten Homologien.**

**2.2.2.2 K8\_4, ein Gen dessen Expression während der frühen Stadien der Knospung inaktiviert ist**

Zum Abschluss dieser Studien soll das Hauptaugenmerk auf den Klon K8\_4 gelenkt werden. Experimenteller Ausgangspunkt sind die Filter aus Abschnitt 2.2.2. Dort wurde er als Klon (Tab. 2.3. rote Markierung) isoliert, der ein Genfragment enthält, das während der frühen Phase der Knospung im Vergleich zu den normalen adulten Tieren nicht exprimiert wird. So handelt es sich um einen der Klone deren genauere Untersuchung die Unterschiede zwischen Knospung und Regeneration aufzeigen könnte.

Klon K8\_4 hat eine Länge von 399 Nukleotiden. Durch eine Konsensussequenz, gebildet aus 8 einzelnen EST (CF599935, CF600453, CF780430, CF601938, CF658411, CF658135, CF601017, CF779314) der *Hydra* EST-Projekte, konnte die Sequenz auf 528 Nukleotide erweitert werden. Der ORF umfasst 285 Nukleotide und kodiert dabei für 95 Aminosäuren. Am N - terminalen Ende konnte unter Benutzung des SignalP Servers ein 19 Aminosäure langes Signalpeptid vorhergesagt werden, das eine mögliche Sekretion des Proteins in den extrazelullären Raum wahrscheinlich macht (Abb.2.33).

1	GCTCAGTGGGCAACCTGAATACCATTATAAAGATATAAAAAACGGGGTTTT <b>TA</b> TTAAGCAC
61	TGCAGAGTCAAACCATTTT <b>MCTTG</b> ATTCAAATTTTGTCCAAA <b>ATG</b> AAATCAACGGTTAT
1	<u>M K S T V I</u>
121	TTTGTTCATTATTGCTTTGTGCATTGTTTGCAGCGAAGGAATATTCTGGAAATTTTGCTC
7	<u>L F I I A L C I V C S E G I F W K F C S</u>
181	ATCAAACAAAGATTGCCATGGAGGCTGTTGTGTAAATTCGGGTTTTTTGGAAAATGCAA
27	S N K D <b>C</b> H G G <b>C C</b> V K F G F F G K <b>C</b> K
241	ATCTTACGTAAAAGAAGGTGGACTCTGCGGTCTTAGCCAAGCACTTGCGTGTGGTTGCGA
47	S Y V K E G G L <b>C</b> G L S Q A L A <b>C</b> G <b>C</b> E
301	ACCAGGACTTGACTGCGAGAAAGTAAGAGGAACTATTACAGGATTGATTAGGAAATGTGT
67	P G L D <b>C</b> E K V R G T I T G L I R K <b>C</b> V
361	TGACAACTCCGGAAGTGGTTCTTTGTAT <b>TA</b> ATTAAATGTACCTTTTTCAAAAAATATATA
87	D N S G S G S L Y *
421	CATAATTATTTATTCAAATTTGTTGTATATTATTGTATTGTACTTTTTACTTTGCATT
481	TATTTTGATGTGTAATATGGTAGATTATTTGCCTCCAAAAA

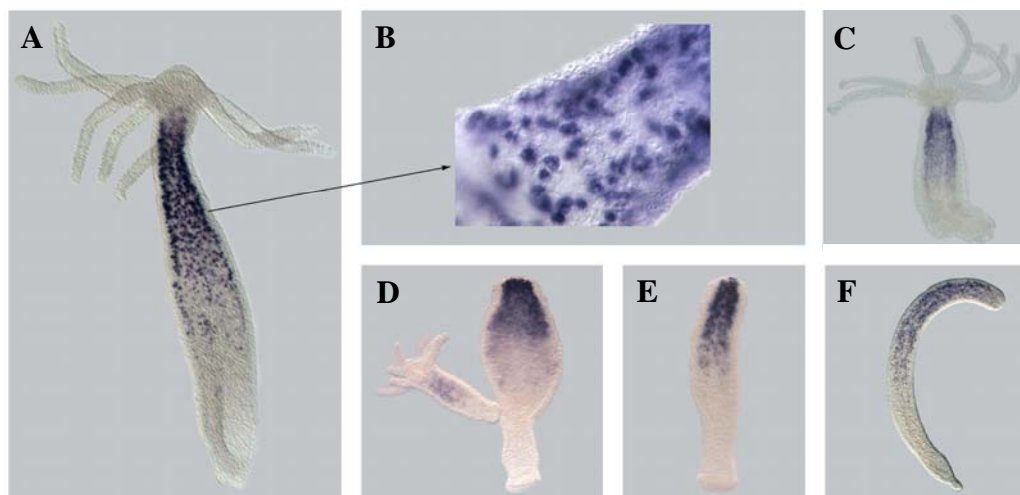
**Abb. 2.33 Nukleotidsequenz mit korrespondierender Aminosäuresequenz des Klons K8\_4.** Der ORF ist klar durch ein Startcodon und mehrere Stopcodons abgegrenzt (**fett**). Für das Protein wurde eine 19 Aminosäure lange Signalpeptidsequenz vorhergesagt (unterstrichen). Die 10 **rot** hervorgehobenen Cysteinreste ergeben das charakteristische Muster, das typisch für die cysteinreiche Domäne II der Dickkopfproteinfamilie ist.

Auffällig bei der Analyse der Aminosäuresequenz des Klones K8\_4 war das durch 10 Cysteinreste gebildete Muster, das mit dem der cysteinreichen Domäne II der Dickkopfproteinfamilie übereinstimmt. An dieser Stelle sollte daraufhingewiesen werden, dass dieses Protein schon einmal identifiziert werden konnte. Bei dem Versuch neben *HyDkk-3* weitere dickkopfähnliche Gene in *Hydra* zu finden, wurde dieses Protein in den EST-

Datenbanken entdeckt. Im Abschnitt 2.1.1.1 wurde das Protein als Dkk like cys2\_1 bezeichnet. Da es aber nur über eine cysteinreiche Domäne verfügt, wurde es als nicht zur Dickkopffamilie gehörig eingeordnet.

Ist die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren alleiniges Kriterium für die Homologie, dann zeigt K8\_4 die beste zu Caeron, einem neurotoxischen Peptid, isoliert aus den Giftdrüsenzellen von *Caerostris extrusa*. Der Parameter, der über die Verlässlichkeit des Vergleiches und der daraus abgeleiteten Homologie informiert, war in beiden Fällen vergleichsweise niedrig.

K8\_4 wird in den Drüsenzellen des Entoderms exprimiert. Dabei zeigt es eine gradierte Verteilung, beginnend mit einer starken Expression unterhalb der Tentakelbildungszone, um dann zur Knospungszone hin abzunehmen (Abb. 2.34 A-B). In jungen Knospen konnte kein K8\_4 Signal nachgewiesen werden (Abb. 2.34 C). Dies war nach den Ergebnissen aus 2.2.2.1 erwartet worden. Weder durch Kopf- noch Fußregenerationsexperimente konnte eine Veränderung des Expressionsmusters erreicht werden (Abb. 2.34 C-F). Die Kopf- und Fußregenerationsexperimente ausgeführt mit der *Hydra magnipapillata* Mutante reg-16, die keinen Kopf regenerieren kann, hatten ebenso wie beim Wildtyp keinen Einfluss auf die Expression von K8\_4 (Daten nicht gezeigt).



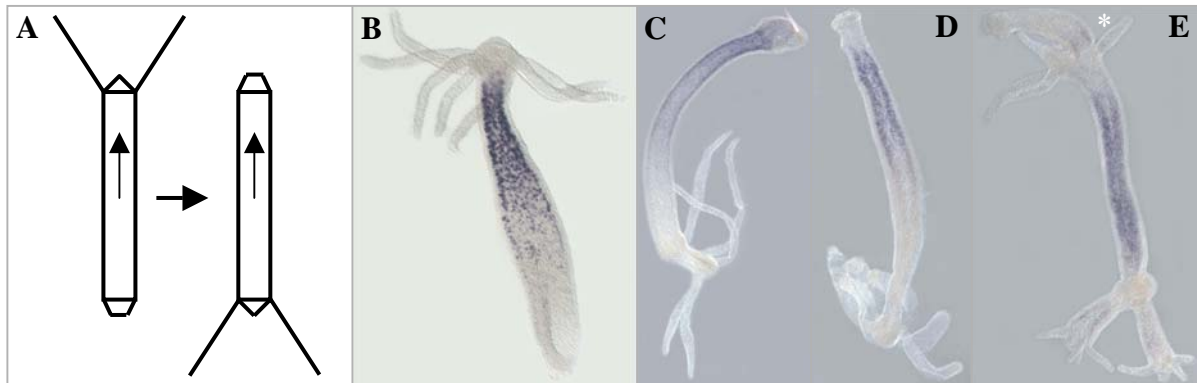
**Abb. 2.34 Expressionsanalyse des Klons K8\_4** A Das Genfragment von Klon K8\_4 ist gradiert über das Entoderm verteilt exprimiert. B Der vergrößerte Ausschnitt lokalisiert die Expression des Genes in Drüsenzellen C Fußregeneration (3h) hat keinen Einfluss auf die gradierte Expression des Genes K8\_4. Frühe Knospungsstadien zeigen keine Expression von K8\_4. D Expression nach Kopfregeneration (30 min.). Die späten Knospungsstadien zeigen die gleiche gradierte Expression wie die Muttertiere. E Expression nach Kopfregeneration (2 h). F Expression nach Kopfregeneration (6h).

Gradiert verteilte Substanzen sind in den meisten theoretischen Modellen mit deren Hilfe die Musterbildung bzw. Achsenbildung in Hydra zu erklären versucht wird, die entscheidenden Komponenten. Obwohl als solche in unzähligen Transplantationsexperimenten ( Wolper, 1969, 1971, Wilby and Webster 1970, MacWilliams 1983a,b) immer nur indirekt nachgewiesen, waren sie immer Bedingung für eine Speicherung der Positionsinformation im Gewebe. Auch im Gierer Meinhardt Modell (siehe Abschnitt 1.2.1) wurde eine Größe eingeführt, die besonders die Regenerationsexperimente, bei denen Kopf und Fuß entfernt wurden, besser in das theoretische Modell einpasste. Dabei machten sie eine stabile Positionsinformation, gespeichert in einer entlang der Körperachse gradiert verteilten Substanz, zur grundlegenden Bedingung für die Regenerationsexperimente und führten diese als Quelldichte ein (Meinhardt, 1993).

Die hervorstechendste Eigenschaft des Gens K8\_4 ist seine gradierte Verteilung und seine Stabilität gegenüber Regenerationsexperimenten. So kann man die Polarität des Gewebes anhand der Expression dieses Gens verfolgen. Es war nun interessant zu untersuchen, welchen Einfluss eine Polaritätsumkehr im Gewebe, erzeugt durch Transplantationsexperimente, auf die Expression des Gens K8\_4 hat. Dazu wurden folgende Transplantationsexperimente durchgeführt.

#### **2.2.2.2.1 Transplantationsexperiment I: der Austausch von Kopf und Fuß, hat keinen Einfluß auf die Expression von K8\_4**

Im Experiment I wurden dem Spendertier Kopf und Fuß abgetrennt und an die entgegengesetzten Stellen (Kopf auf Fußseite und umgekehrt) transplantiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Kopf unmittelbar unterhalb der Tentakeln abgetrennt wurde, sodass das Kopfstück möglichst keine K8\_4 exprimierenden Zellen enthielt. Nach 0, 2, 4 und 6 Tagen wurden Tiere abgenommen und für die *in situ* Expressionsanalyse fixiert (Abb. 2.35).



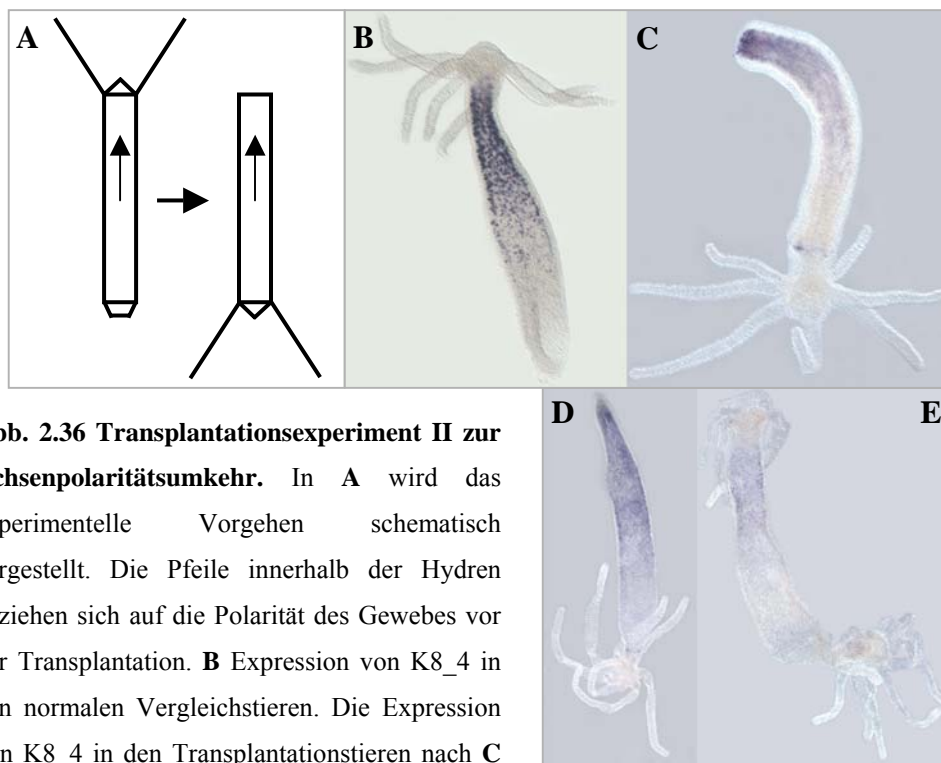
**Abb. 2.35 Transplantationsexperiment I zur Achsenpolaritätsumkehr.** In **A** wird das experimentelle Vorgehen schematisch dargestellt. Die Pfeile innerhalb der Hydren beziehen sich auf die Polarität des Gewebes vor der Transplantation. **B** Expression von K8\_4 in den normalen Vergleichstieren. Die Expression von K8\_4 in den Transplantationstieren nach **C** 0d, **D** 2d und **E** 6d.

2 Tage nach der Transplantation konnten keine Veränderungen in der Expression von K8\_4 festgestellt werden (Abb.2.35 D). Auch nach 6 Tagen kam es zu keiner Veränderung, obwohl dies durch die vielen zusätzlichen Köpfe schwierig zu beurteilen war (Abb. 2.35 E). Im oberen Teil der Abbildung 2.35 E sind zwei Strukturen zu erkennen, ein Fuß, welcher an diese Stelle transplantiert wurde und ein Kopf, der nach 6 Tagen selbst regenerierte. Am Fußteil, also im unteren Teil der Abbildung 2.35 E haben sich 2 Köpfe gebildet, von denen einer transplantiert wurde und der andere selbst regenerierte. Jeder der beiden Köpfe besitzt einen eigenen Gastralbereich und hat sogar schon Fußstrukturen entwickelt. In diesen beiden Körperbereichen ist K8\_4 dabei, dass für das adulte Tier typische Expressionsmuster aufzubauen. Es handelt sich bei diesen Köpfen wohl eher um 2 Knospen, die mit ihren beiden Füßen am Spendertier hängen und sich wahrscheinlich ohne Fixierung bald vom Rest gelöst hätten. Im Spendertier (großer Körper) haben sich folgende Änderungen vollzogen. Zunächst hat sich ein zweiter Fuß an der Stelle gebildet, wo er vor der Transplantation gewesen war. Es sind also eigentlich 3 Füße die im unteren Teil noch zusammenhängen. Im oberen Teil ist neben dem transplantierten Fuß ein Kopf entstanden. Die Tatsache, dass sich an den entsprechenden Stellen die vor der Transplantation befindlichen Strukturen regeneriert haben, zeigt, dass es zu keiner Polaritätsumkehr gekommen war. Der Gradient der Expression von K8\_4 ist jedoch nicht mehr deutlich als solcher zu erkennen. Dennoch exprimieren die neu entstandenen Köpfe und Füße das Gen nicht. Der transplantierte Fuß, im oberen Teil von Abb. 2.35 E, weist aber noch eine zusätzliche Besonderheit auf. An ihm kann man möglicherweise die Entstehung eines K8\_4 Gradienten beobachten. Kurz nach der Transplantationsstelle bildet sich vermutlich ein neuer Gradient von K8\_4 aus (weißer Stern).

Interessant ist dies deshalb, weil 2 überlagerte inhibitorische Mechanismen zu erkennen sind. An der Transplantationstelle hat sich ein Kopf gebildet. Dieser scheint die Expression von K8\_4 in seiner unmittelbaren Umgebung zu inhibieren, deshalb findet man auch keine Expression in unmittelbarer Nähe zur Transplantationstelle. Der Abstand der basalen Fußplatte des transplantierten Fußes zur Expressionstelle von K8\_4 (weißer Stern) ist jedoch um einiges größer. Der Fuß hat also genau wie der Kopf eine inhibitorische Wirkung, allerdings reicht die Wirkung des Fußinhibitors wesentlich weiter.

#### 2.2.2.2.2 Transplantationsexperiment II: das Transplantieren des Kopfes an die Position des Fußes führt zu keiner Veränderung der gradierten Expression von K8\_4

Im Transplantationsexperiment II wurden Kopf und Fuß so vom Gastralbereich abgetrennt, dass sie keine K8\_4 exprimierenden Zellen enthielten. Der Kopf wurde sofort an die Stelle, an der sich der Fuß vorher befunden hatte, transplantiert. Die apikale Schnittstelle blieb unbesetzt (Abb. 2.36).



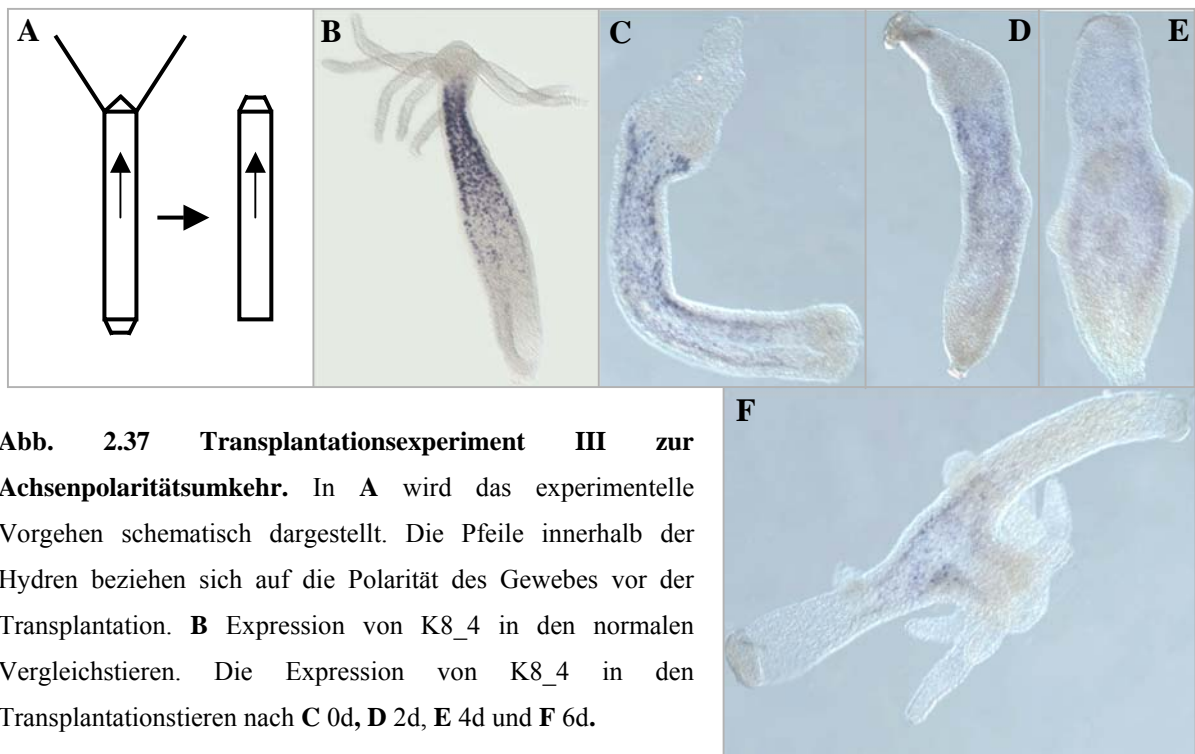
**Abb. 2.36** Transplantationsexperiment II zur Achsenpolaritätsumkehr. In **A** wird das experimentelle Vorgehen schematisch dargestellt. Die Pfeile innerhalb der Hydren beziehen sich auf die Polarität des Gewebes vor der Transplantation. **B** Expression von K8\_4 in den normalen Vergleichstieren. Die Expression von K8\_4 in den Transplantationstieren nach **C** 0d, **D** 4d und **E** 6d.

Nach der Analyse der Expressionsmuster konnte festgestellt werden, dass der Kopf nicht in der Lage war die Expression von K8\_4 zu induzieren. Stattdessen hatte der transplantierte Kopf einen inhibitorischen Effekt auf die Regeneration der apikalen Spitze. Normalerweise

braucht ein Kopf für die Regeneration zwischen 35 und 48 h. Aber nach 96 Stunden (4d) konnte noch immer keine Kopfregeneration beobachtet werden (Abb. 2.36 D). Erst nach 6 d wurden Transplantate beobachtet, die sowohl über den transplantierten, als auch über einen regenerierten Kopf verfügten. Die Regeneration des 2. Kopfes zeigt auch wieder deutlich, dass der transplantierte Kopf nicht zu einer Polaritätsumkehr führte, so dass der Gradient von K8\_4 immer noch die Polarität vor der Transplantation widerspiegelt (Abb. 2.35 E).

### 2.2.2.2.3 Transplantationsexperiment III: das Transplantieren des Fußes an die Position des Kopfes führt zur einer Inhibition der Expression von K8\_4

In Transplantationsexperiment III wurden wiederum zuerst der Kopf und der Fuß abgetrennt, wobei in diesem Versuch der abgetrennte Fuß auf die apikale Spitze transplantiert wurde. Die basale Spitze blieb hingegen unberührt (Abb. 2.37).

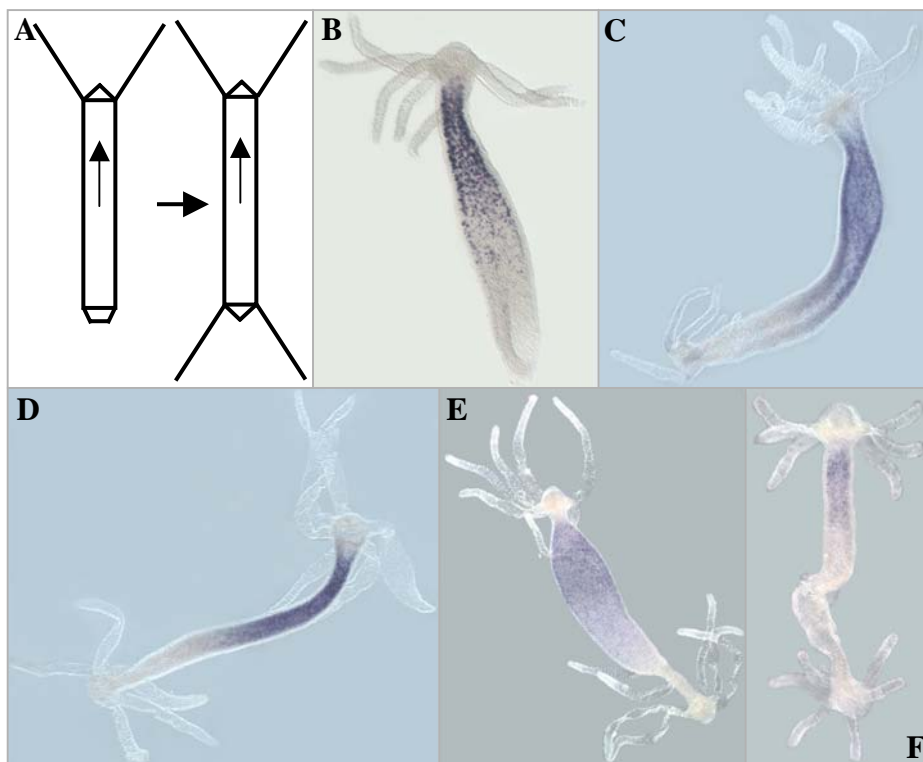


Im Gegensatz zu Exp. II konnte für die Fußtransplantation ein starker inhibitorischer Effekt auf die Expression von K8\_4 ausgemacht werden. Im Gegensatz zum Kopf scheint der Fuß jedoch keine inhibitorische Wirkung auf die Regeneration eines neuen Fußes an der basalen regenerierenden Spitze zu haben (Abb. 2.37 D). Der transplantierte und der regenerierte Fuß drängen den Gradienten in die Mitte des Tieres (Abb. 2.37 D-F). Interessanterweise bildet sich genau da ein neuer Kopf (Abb. 2.37 F). Diese Transplantation führte zu einer teilweisen

Achsenpolaritätsumkehr, welche sich auch in einer veränderten Expression von K8\_4 widerspiegelt.

### 2.2.2.2.3 Transplantationsexperiment IV: die Erstellung von Transplantaten mit 2 Köpfen und keinem Fuß hat keinen Effekt auf Expression von K8\_4

In diesem Transplantationsexperiment wurde dem Empfängertier der Fuß entfernt und durch einen Kopf eines Spendentieres ersetzt. Wie schon im Transplantationsexperiment II angedeutet, hat der Kopf kein Potential den Expressionsgradienten von K8\_4 zu beeinflussen (Abb. 2.38). Selbst 6 Tage nach der Transplantation kann der Kopf im basalen Bereich des Körpers keine Expression von K8\_4 induzieren (Abb. 2.38 F).



**Abb. 2.38 Transplantationsexperiment IV zur Achsenpolaritätsumkehr.** In A wird das experimentelle Vorgehen schematisch dargestellt. Die Pfeile innerhalb der Hydren beziehen sich auf die Polarität des Gewebes vor der Transplantation. B Expression von K8\_4 in den normalen Vergleichstieren. Die Expression von K8\_4 in den Transplantationstieren nach C 0d, D 2d, E 4d und F 6d.



### 3. Diskussion

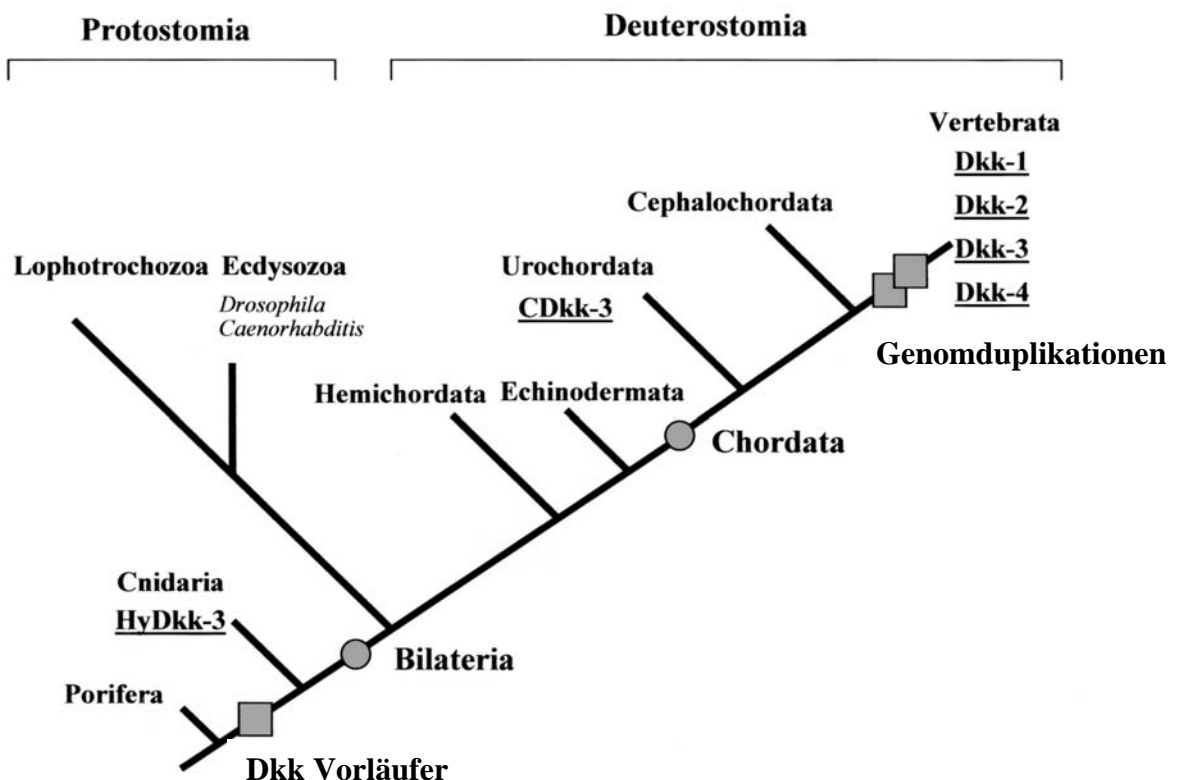
#### 3.1 *HyDkk-3*, ein Dickkopffprotein am Beginn der Evolution der Metazoa

Alle Mitglieder der Dkk Familie zeichnen sich durch zwei miteinander verbundene cysteinreiche Domänen aus. Obgleich die Funktion der zweiten cysteinreichen Domäne bei den Säugerproteinen Dkk-1 und Dkk-2 in der Inhibition des Wnt - Signaltransduktionsweges besteht, konnte für die erste cysteinreiche Domäne noch keine Funktion zugeordnet werden (Li et al., 2002). Beide Domänen enthalten 10 Cysteinreste, die ein hochkonserviertes und damit für Dickkopffproteine charakteristische Muster bilden. Neben den Mitgliedern der Dickkopffproteinfamilie, die beide cysteinreichen Domänen enthalten, wächst die Zahl der isolierten Proteine, die nur eine cysteinreiche Dkk ähnliche Domäne besitzen. Einige dieser Proteine sind beispielsweise die Colipase und einige andere sekretierte Proteine mit noch unbekannter Funktion (Aravind and Koonin, 1998, Krupnik et al., 1999). Die Länge der verbindenden Sequenz diskriminiert die einzelnen Mitglieder der Dickkopffproteinfamilie. Während der Abstand zwischen cys I und cys II bei Dkk-1 ,2 , 4 zwischen 50 und 55 Aminosäuren liegt, hat diese Region in Dkk-3 Proteinen immer eine Länge von 12 Aminosäuren (Krupnik et al., 1999, Monaghan et al., 1999). Das hier beschriebene *HyDkk-3* Protein hat genau diese 12 Aminosäuren und ist am nächsten mit dem Hühnchen Dkk-3 Protein verwandt.

Über die Funktion von *Dkk-3* in den Vertebraten ist bisher noch nichts bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es im Gegensatz zu Dkk-1 und Dkk-4 nicht an der Modulation des Wnt Signaltransduktionsweges beteiligt ist (Krupnik et al., 1999). In den Wirbeltieren ist *Dkk-3* hauptsächlich im Gehirn und im Herzmuskel exprimiert, was darauf hindeuten könnte, dass es eine Rolle bei der Nervenzelldifferenzierung spielt oder an einer nervenzelltypischen Funktion beteiligt ist. In *Hydra* wird *HyDkk-3* in einem späten Differenzierungsstadium bei allen vier Nematocytenotypen exprimiert (Abb. 2.4). Dieses Differenzierungsstadium ist durch Veränderungen in der Zellmorphologie und im Zellverhalten gekennzeichnet. Darunter wird die in diesem Stadium besonders ausgeprägte Fähigkeit der Cnidozyten verstanden, vom Gastralbereich zu den Tentakeln zu migrieren. Obwohl über die Funktion von *HyDkk-3* nur spekuliert werden kann, könnte es Parallelen in der Funktion zwischen *Hydra* und den Vertebraten geben. Diese Parallelen beziehen sich auf den Zusammenhang, dass *Hydra*'s Nematocyten als sensorische Neuronen angesehen werden können (Grens et al., 1995,

Holstein, pers. Kommunikation) und dass *Dkk-3* bei den Wirbeltieren im Nervengewebe exprimiert ist.

Die Isolation und Identifikation von *Dkk-3* in einem basalen Eumetazoa war Ausgangspunkt für eine Suche nach *Dkk* verwandten Genen in Organismen, bei denen große Mengen an genetischen Informationen in Form von EST und Genom Datenbanken zur Verfügung standen. Während in *D. melanogaster* und *C. elegans* keine Hinweise auf ein Dickkopf verwandtes Gen zu finden waren, konnte im Genom von *C. intestinalis* ein *Dkk-3* verwandtes Gen nachgewiesen werden. Neben diesem *Dkk-3* Gen gibt es keine Hinweise auf weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie in *Ciona* (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1 Die Evolution der Dickkopfgene.** *Dkk-3* wurde in *Hydra* und *Ciona* identifiziert; ist jedoch in den Genomen von *D. melanogaster* und *C. elegans* nicht vorhanden. Bei den wirbellosen Tieren konnte kein homologes Gen zu *Dkk-1*, *Dkk-2*, und *Dkk-4* der Wirbeltiere gefunden werden (aus Fedders et al., im Druck).

In jüngerer Vergangenheit haben Satoh und Mitarbeiter unter Benutzung der genomischen Daten von *Ciona* Gene des Wnt - Signaltransduktionsweges identifizieren können. Dabei

stießen sie auch auf ein Gen, das eine gewisse Verwandtschaft zum Dkk-2 Protein aus dem Menschen zeigte und von ihnen als *Ci-dickkopf* bezeichnet wird (Hino et al., 2003). Die hier durchgeführte Analyse der Beziehung dieses Genes zu Dkk-2 kommt zu dem Ergebnis, dass dieses Protein (Ci-dickkopf) aufgrund nur einer vorhandenen cysteinreichen Domäne nicht zu der Dickkopfproteinfamilie gehört.

Aufgrund der vorliegenden Daten, nach denen es vier Mitglieder der Dickkopf - proteinfamilie in den Wirbeltieren gibt und nur eines in den Urochordaten, die Schwestergruppe der Wirbeltiere, ist es möglich, dass sich die vier Dkk Gene durch Genduplikation eines gemeinsamen Vorläufer Genes entwickelt haben (McLysaght et al., 2002) (siehe Abb. 3.1).

Überraschend war allerdings die Tatsache, keine Dickkopf - ähnlichen Proteine bei den Protostomia gefunden zu haben, nachdem das bei *Hydra* und *Ciona* gelungen war. Es muss wohl angenommen werden, dass diese während der Protostomia Evolution „verloren gegangen“ sind. Dass dies durchaus ein realistisches Szenario darstellen kann, beweist das *Hydra Syk* Gen (Steele, 1999). So konnten keine Gene dieser Protein – Tyrosinkinase - Familie im Genom von *C. elegans* gefunden werden, obwohl wenigstens ein Vertreter in *Hydra* und alle anderen Mitglieder dieser Proteinfamilie in den Deuterostomia identifiziert wurden.

### **3.2 HEADY Zielgene in *Hydra***

Ein Ziel dieser Arbeit lag in der Identifizierung von Genen, deren Expression in Abhängigkeit zur Aktivität des HEADY – Peptides steht. Synthetisch hergestelltes HEADY – Peptid kann die Positionsinformation des Hydragewebes so verändern, dass in lateralen Transplantationsexperimenten häufiger apikale Strukturen gebildet werden als im Vergleich zu nicht behandeltem Kontrollgewebe (Lohmann und Bosch, 2000). Das bedeutete, dass HEADY in der Lage ist, ein apikales Schicksal zu induzieren. Ohne Transplantation zeigen die Polypen morphologisch nach der Peptidinkubation keine Veränderungen, d.h. die Bildung von ektopischen Köpfen oder Tentakeln unterbleibt. Die Ergebnisse aus Abschnitt 2.1.2 zeigen, dass das inkubierte Hydragewebe Veränderungen in der Genexpression aufweist, die aber dann offensichtlich nicht ausreichend sind, um eine zweite Achse anzulegen. An zwei Beispielen sollen die Genexpressionsveränderungen und deren mögliche musterbildende Bedeutung verdeutlicht werden.

In Abschnitt 2.1.2.2 wurde gezeigt, dass das Genfragment des Klonen L21\_1.1 durch das HEADY – Inkubations Experiment in seiner Expression reprimiert wird. Das Genfragment kodiert dabei für ein Protein, das eine starke Homologie zu den Astacin – Metalloproteasen aufweist. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie, wie z.B. Tolloid oder Xolloid (das Vertebraten homologe Gen aus *Xenopus*), haben einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der dorso - ventralen Achse sowohl bei den Insekten als auch bei den Wirbeltieren. In *Drosophila* trennt Tolloid einen Proteinkomplex bestehend aus Decapentaplegic (Dpp), ein Mitglied der TGF- $\beta$  Familie, und Short gastrulation (Sog), in dem es Sog proteolytisch abbaut. Durch diese Trennung ist der Wachstumsfaktor Dpp in der Lage an seinen Rezeptor zu binden. Die Interaktion zwischen Sog und Tolloid unterstützt die Ausbildung eines Dpp Aktivationsgradienten innerhalb des sich entwickelnden *Drosophila* Embryos. In den Bereichen, wo aktiviertes Dpp vorliegt, entwickelt der Embryo dorsales Ektoderm (Shimell et al., 1991, Ferguson et al., 1992).

Die Expression von *tolloid* selbst wird durch das Protein Dorsal, das bereits gradiert verteilt vorliegt, inhibiert. Die Expression dieser Protease ist also abhängig von der Position der jeweiligen Blastomere im *Drosophila* Embryo (Kirov et al., 1994).

In *Hydra* sind außer der hier beschriebenen Protease (L21\_1.1) noch mindestens drei weitere Mitglieder dieser Protein- bzw. Proteasefamilie identifiziert und untersucht worden. Für diese drei Astacin ähnlichen Metalloproteasen, Hydra metalloproteinase 1 (HMP1), Hydra metalloproteinase 2 (HMP2) (Yan et al., 1995, 2000a und 2000b) und „Foot activator responsive metalloproteinase“ 1 (FARM-1) (Kumpfmüller et al., 1999) gilt, dass auch deren Expression durch Positionssignale veränderbar ist.

Zu den drei in *Hydra* beschriebenen Astacin ähnlichen Proteasen hatte L21\_1.1 die größte Homologie zu FARM-1. Interessanterweise zeigten beide ein vergleichbares Expressionsmuster insofern, dass beide Gene im Entoderm des Gastralbereiches der *Hydra* exprimiert sind. *Farm-1* im Unterschied zu L21\_1.1 wird jedoch auch im Ektoderm des Gastralbereiches exprimiert. Hinzu kommt, dass sich diese beiden Gene auch im exprimierenden Zelltyp unterscheiden. L21\_1.1 wird ausschließlich in den Drüsenzellen exprimiert; *Farm-1* hingegen nur in den Epithelzellen. Auch in der Reaktion auf die Behandlung mit HEADY unterscheiden sich beide Proteasen. Es konnte gezeigt werden, dass eine HEADY – Behandlung keine Auswirkung auf die Expression von *farm-1* hat (Lohmann and Bosch, 2000). L21\_1.1 jedoch wird in seiner Expression reprimiert. In Kopfregenerationsexperimenten wurde deutlich, dass das regenerierende Gewebe mit fortschreitender Dauer der Regeneration und beginnender Determinierung zu Kopfgewebe,

die Expression von L21\_1.1. reprimiert (Abb. 2.18). Reprimiert apikales Gewebe die Expression des Genes L21\_1.1 und induziert HEADY die Bildung apikalen Gewebes, so scheint es verständlich, dass HEADY die Expression von L21\_1.1 unterdrückt. Interessant jedoch dabei ist, warum HEADY nicht auch die gleiche Wirkung auf die ebenfalls im Gastralbereich exprimierte Protease *farm-1* hat. Eine pauschalere Vergrößerung des Apikalenbereiches stellt offensichtlich keine Möglichkeit der Erklärung dar, da diese auch Auswirkungen auf die Expression von *farm-1* haben sollte. Ein hervorgehobener Unterschied beider Proteasen war die zelluläre Lokalisation. Eine spezifische Wirkung des HEADY Peptides auf die Drüsenzellen des Gastralgewebes könnte eine Möglichkeit darstellen, diese Frage zu beantworten.

Andererseits konnte im Abschnitt 2.1.2.1 gezeigt werden, dass die Expression des Gens J12\_1.1 durch eine HEADY – Behandlung ebenfalls negativ beeinflusst wird. J12\_1.1 wird von differenzierenden Nematocytennestern exprimiert, deren Differenzierungszone sich ausschließlich auf den Gastralbereich beschränkt, nicht jedoch von den Drüsenzellen. Ein direkter Einfluss des Peptides wäre damit nicht möglich, ist aber auch unter Vernachlässigung der Annahme, dass HEADY spezifisch auf Drüsenzellen wirkt, höchst unwahrscheinlich. Ein spekulativer indirekter Weg ergibt sich, wenn die möglichen Funktionen einer Astacin Metalloprotease Berücksichtigung finden. So wurde an anderer Stelle dargestellt, dass diese Proteasen in der Lage sind, Inhibitoren von Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  Familie zu neutralisieren. Wird im apikalen Teil der *Hydra* durch HEADY Inkubation weniger von L21\_1.1 hergestellt, dann könnte dies die Konzentration eines aktiven Wachstumsfaktors, der notwendig für einen bestimmten Schritt in der Nematocytenentwicklung ist, erniedrigen. Dies würde in dem entsprechenden Gewebereich zu einer Blockierung der Nematocytenentwicklung führen, die die Induktion der Expression von J12\_1.1 unterbindet. Aber auch proteolytische Veränderung der ECM, für HMP-1 (Yan et al. 1995) postuliert, spielt eine wichtige Rolle bei der Nematocytenentwicklung, besonders bei der Migration der Nematocyten durch das Gewebe. Das Unterbinden einer notwendigen Veränderung der ECM durch das Fehlen einer in den Drüsenzellen hergestellten Protease, z.B. L21\_1.1, würde ebenso zu einer Blockade in der Differenzierung der Nematocyten führen, wie das Fehlen eines Wachstumsfaktors und hätte damit die gleichen Auswirkungen auf die Expression von J12\_1.1.

### 3.2.1 Cystatin und Cathepsin L, Regulation der Kopfregeneration durch Regulation der proteolytischen Aktivität durch HEADY

Auf der Suche nach Genen, die während der Kopfregeneration eine wichtige Rolle spielen, wurde der Klon *1\_C18\_1* identifiziert (Abschnitt 2.2.1.1). Das Genprodukt wies eine starke Homologie zu Cathepsin L auf. Cathepsin L gehört zu einer Cysteinproteasefamilie mit 12 bekannten Mitgliedern, die an einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse beteiligt sind (Schwarz, 1995, Chapman et al., 1997). Unter anderem ist Cathepsin L an einem alternativen, Caspase unabhängigen Weg der Apoptose beteiligt. Es kann allerdings auch als Vorläuferprotein aus der Zelle in die extrazelluläre Matrix abgegeben werden und ist dort für den Umbau selbiger verantwortlich. Von besonderem Interesse ist diese Eigenschaft bei der Invasion von Tumorgewebe beim Menschen (Park et al., 1996).

Aber auch in *Hydra* ist der Umbau der ECM von entscheidender Bedeutung, besonders bei den Regenerationsprozessen. Durch eine Inhibition der Genexpression von *Hydra* Laminin ( $\beta$ 1chain), einer wichtigen Komponente der ECM in *Hydra* durch Antisense – Thiooligonukleotide kann die Kopfregeneration reversibel blockiert werden (Shimizu et al., 2002). Aber noch interessanter ist die Tatsache, dass gleiches auch für die *Hydra* Matrixmetalloprotease HMMP (Shimizu et al., 2002) zutreffend ist, die am Um- und Abbau der ECM in *Hydra* beteiligt scheint (Leontovich et al., 2000). Die *in situ* Expressionsanalyse des Gens *1\_C18\_1* zeigt große Übereinstimmungen bei der Expression mit HMMP. Genau wie HMMP ist *1\_C18\_1* (Cathepsin L) nach 24 h im Entoderm der regenerierenden Spitze exprimiert. Auch nach 48 h stimmen die Expressionsmuster dieser beiden Proteasen überein, da bei beiden die Expression mit den hervortretenden Tentakeln assoziiert ist.

Die Kolokalisierung beider Proteasen bei der Regeneration und die Tatsache, dass Cathepsin L in Säugern am Umbau der ECM beteiligt ist (Park et al., 1996), lassen es höchst wahrscheinlich erscheinen, dass *1\_C18\_1* (Cathepsin L) in *Hydra* ebenso eine Rolle beim Umbau der ECM übernimmt. Dennoch müssen beide Enzyme beim Umbau der ECM unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die Blockade der Genexpression von HMMP mit Antisense – Thiooligonukleotiden hätte niemals den Verlauf der Kopfregeneration inhibieren können (Shimizu et al., 2002), wenn beide für die gleiche Funktion in Frage kommen würden, da Cathepsin L diese Funktion dann übernommen hätte. Interessant ist die Frage vor allem deswegen, da beide Enzyme eigentlich nicht besonders selektiv für bestimmte Substrate sind.

Bei den Cathepsinen handelt es sich um besonders aktive Cysteinproteasen, deren Aktivität strikt kontrolliert werden muss. Dies geschieht auf zwei Ebenen. Jedes der Cathepsinproteine

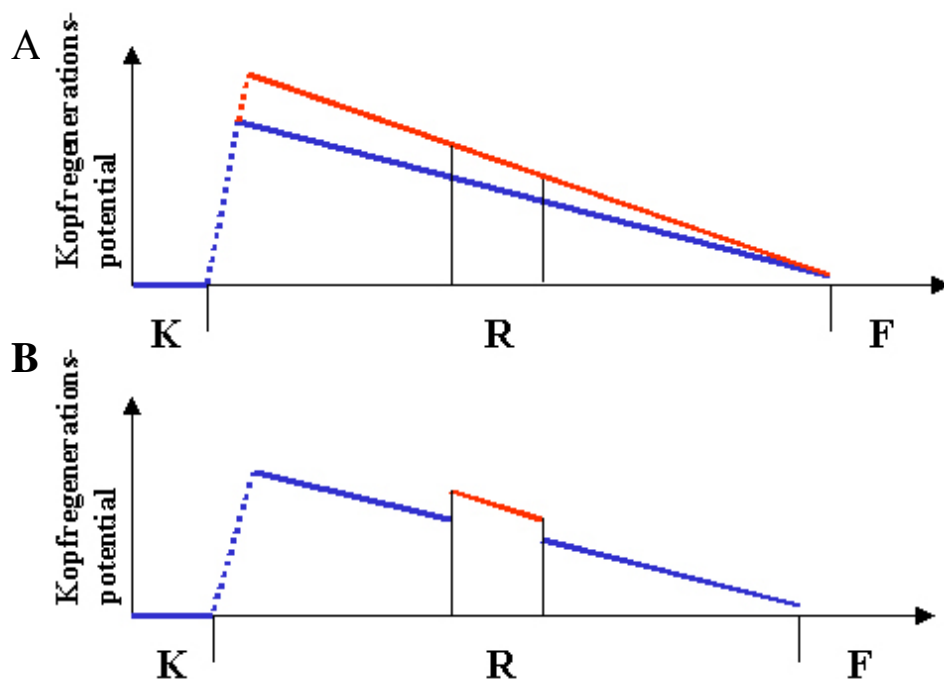
wird als Proenzym translatiert, das durch die Abspaltung des in der aktiven Furche liegenden Propeptides aktiviert wird. Eine zweite Möglichkeit der Kontrolle der Aktivität besteht durch spezifische Inhibitoren. Im Falle der Cathepsine wird dies durch die Familie der Cystatine erreicht. Auch diese Proteinfamilie untergliedert sich in drei Gruppen, den Stefinen, den Cystatinen und den Kininogenen (Turk et al., 2001). Die Cystatine und Kininogene sind dabei extrazellulär aktiv im Gegensatz zu den Stefinen, die intrazellulär aktiv sind (Turk and Bode, 1991). Wie unter Abschnitt 2.1.2.3 beschrieben, konnte ein Gen isoliert werden, dessen Genprodukt eine Cystatin – Domäne enthielt. Die ebenfalls durchgeführte *in situ* Expressionsanalyse für das Gen aus Klon B1\_H4 zeigte deutlich, dass dieses Gen genau wie 1\_C18\_1 (Cathepsin L) bei der Kopfregeneration in der regenerierenden Spitze exprimiert wird (Abb. 2.25). Die Expression ist allerdings nicht auf die Kopfregeneration beschränkt. Auch bei der Fußregeneration ist die Expression sowohl von Cathepsin L (pers. Kommunikation M. Hassel) als auch B1\_H4 (Cystatin) (Abb. 2.21) in der regenerierenden Spitze lokalisiert. Eine Interaktion beider Genprodukte ist aufgrund ihrer Kolokalisierung als auch durch die aus der Homologie abgeleiteten Funktion wahrscheinlich.

Die starke Expression beider Proteine sowohl bei der Regeneration des Kopfes als auch des Fußes, zeigt die Bedeutung der beiden Proteine für den Prozess der Regeneration. Es wird jedoch auch deutlich, dass keiner der beiden über die Polarität der Achse entscheidet. So bleibt offen, welche Gene bei bipolaren Regenerationsexperimenten die Entscheidung über die Achsenausrichtung fällen. *Heady* ist ein solches Gen, das Achsenpolarität festlegen kann. Die HEADY – Inkubationsexperimente zeigen, dass HEADY negativ auf die Expression von B1\_H4 wirkt. Dies könnte zu einer Steigerung der katalytischen Aktivität von Cathepsin L führen. Mögliche Substrate für diese Enzyme sind Bestandteile der ECM. Eine Veränderung dieser würde zu einer Induktion von Differenzierungsvorgängen führen, die je nachdem in welcher Umgebung sich das behandelte Gewebe befindet, zur Induktion einer neuen Achse führen kann.

Das Peptid HEADY nimmt also Einfluss auf die proteolytische Aktivität von mindestens zwei Proteasen. Dabei reprimiert es auf der einen Seite L21\_1.1 eine Protease, die ausschließlich im Gastralbereich exprimiert wird und erhöht auf der anderen Seite aber die Aktivität der Protease 1\_C18\_1 (Cathepsin L), die besonders bei der Regeneration exprimiert wird und die sich dabei auch für die Kopfbildung mitverantwortlich zeigt, durch die Inhibition der Expression des Cathepsin spezifischen Inhibitors B1\_H4 (Cystatin).

Die Fähigkeit einen Kopf zu bilden ist in *Hydra* gradiert verteilt. Am stärksten ist diese Regenerationsfähigkeit in der Nähe des Kopfes, verliert sich dann allmählich in Richtung

Fuß. Man könnte sich nun vorstellen, dass die Inkubation mit HEADY Peptid die Kopfregenerationsfähigkeit durch die verstärkte proteolytische Aktivität von Cathepsin L erhöht. An der gradierten Verteilung der Regenerationsfähigkeit wird dabei nichts verändert. Es verändern sich lediglich die absoluten Werte. Das Tier verhält sich wie vor der Inkubation. Es werden keine zusätzlichen apikalen Strukturen gebildet. Bringt man jedoch einen Teil des behandelten Gewebes in ein unbehandeltes Tier (laterale Transplantation), dann führt die höhere Regenerationsfähigkeit im Vergleich mit seiner neuen Umgebung zur Ausbildung einer neuen, zusätzlichen apikalen Struktur (Abb.3.2).



**Abb.3.2 Veränderung des Kopfregenerationspotentials durch die Inkubation mit HEADY und die sich daraus ergebenden Folgen bei der lateralen Transplantation in unbehandeltes Gewebe. A** Erhöhung des Kopfregenerationspotentials durch HEADY – Inkubation. **blau:** Ursprüngliches Kopfregenerationspotential vor HEADY – Inkubation; **rot:** Verändertes Kopfregenerationspotential nach HEADY – Inkubation **B** Durch die Transplantation von HEADY behandeltem Gewebe in unbehandeltes Wirtsgewebe ergibt sich ein Unterschied im Kopfregenerationspotential im Vergleich zu dem neuen umgebenden Gewebe. Dieser Unterschied führt zur Regeneration einer zusätzlichen apikalen Struktur. **K-R-F:** Kopf-Rumpf-Fuß

Um zeigen zu können, dass HEADY tatsächlich über die Beeinflussung der proteolytischen Aktivität die Regenerationsfähigkeit reguliert, sind weitere Experimente erforderlich. Eine Repression der Transkription von *Heady* mit Hilfe der Methode der genetischen Interferenz (RNA<sub>i</sub>) führte zu einer drastischen Verlangsamung der Kopfregeneration (Lohmann and Bosch, 2000). Dabei wäre es nun interessant zu sehen, in welcher Weise sich diese Repression



auf die Expression von B1\_H4 (Cystatin), 1\_C18\_1 (Cathepsin L) oder anderer Proteasen, wie z.B. HMMP auswirkt.

### **3.3 Achsenpolarität in *Hydra***

Bipolare Regenerationsexperimente wiesen zum erstenmal daraufhin, dass das Gastralgewebe über eine stabile Achsenpolaritätsinformation verfügt (Goetsch, 1929), da Kopf und Fuß jeweils an den entsprechenden Stellen regenerierten, von denen sie vorher gleichzeitig entfernt worden waren. Diese Polarität ist bei *Hydra* von besonderer Bedeutung, um die Integrität des Gewebes aufrechtzuerhalten, da ständig Zellen entlang der Körperachse verschoben werden. Auch die Zelldifferenzierung ist abhängig von der Position der Zelle im Körper, die nur aufgrund einer stabilen Achsenpolarität genau ermittelt werden kann. Bekanntestes Beispiel ist die Entwicklung der Nematocyten aus den i-Zellen.

Stabilität ist also ein wichtiges Merkmal der Achsenpolarität und damit verbunden, der Positionsinformation. Durch gezielte Experimente ist es aber dennoch möglich, diese Achsenpolarität umzukehren. Vor allem Transplantationsexperimente von Wilby und Webster (1970) verdeutlichten die Bedingungen für die Achsenpolaritätsumkehr. Für diese Transplantationsexperimente wurden der Kopf und der Fuß zunächst vom Gastralraum entfernt und in umgekehrter Orientierung der Achse an die entsprechenden Enden transplantiert (Kopf an basales Ende, Fuß an apikales Ende). Für einen Zeitraum von 4 – 48 h blieben diese Köpfe und Füße an den Gastralbereichen. Nach Entfernung der transplantierten Köpfe und Füße konnte das Regenerationsverhalten der übriggebliebenen Gastralbereiche studiert werden. Die Mehrzahl der Gastralbereiche, die über 48 h mit den umgekehrt angesetzten Köpfen und Füßen in Kontakt standen, zeigte eine Umkehr der Achsenpolarität (Wilby and Webster, 1970). Die gleiche Umkehr der Achsenpolarität konnte erreicht werden, indem nur der Kopf an den Gastralbereich transplantiert wurde. Allerdings musste dieser Kopf mindestens 96 h mit dem Gastralgewebe in Kontakt bleiben, um eine Umkehr zu induzieren. Das gleiche Experiment nur mit dem Fuß als transplantiertes Gewebe führte zu keiner vollständigen Umkehr in der Achsenpolarität (Wilby and Webster, 1970).

Aus diesen und vielen weiteren Experimenten (MacWilliams 1983a, b) wurden gradiert verteilte Substanzen entlang der Körperachse postuliert. Auch Meinhardt machte eine stabile Positionsinformation, gespeichert in einer gradiert verteilten Substanz zur grundlegenden Bedingung für Achsenpolarität und Regeneration und führte diese in sein theoretisches Modell zur Achsen- und Musterbildung als „Quelldichte“ ein (Meinhardt, 1993). Jedoch

konnte solch eine gradiert verteilte Substanz oder ein gradiert exprimiertes Gen in *Hydra* bislang nicht nachgewiesen werden.

Bei einer umfangreich durchgeführten Suche nach Unterschieden bei der Genexpression zwischen Knospung und Kopfregeneration (Abschnitt 2.2.2), wurde ein Klon (K8\_4) identifiziert, dessen Expressionsmuster eine gradierte Verteilung aufwies, beginnend mit einer starken Expression direkt unterhalb der Tentakelbildungszone zur Knospungszone hin abnehmend (Abb. 2.34). Das Genfragment des Klons K8\_4 wies als eines von 47 knospungsspezifischen Genen Expressionsveränderungen auf (Abschnitt 2.2.2.1). Es konnte gezeigt werden, dass die frühen Knospstadien (1-5), das heißt Knospen die noch keine Tentakelansätze besitzen, dieses Gen noch nicht exprimieren (Abb. 2.34 C). Erst die späteren Knospstadien zeigen eine mit dem Muttertier vergleichbare gradierte Verteilung dieses Gens. Experimente die zwar zur Beantwortung einer anderen Fragestellung dienten, können so interpretiert werden, dass der Gastralbereich der frühen Knospen noch keine stabile Achsenpolarität besitzt (Broun et al., 1999). Die Korrelation zwischen der Expression des Gens und dem Vorhandensein der Achsenpolarität wurde als Hinweis gewertet, dass die gradierte Verteilung von K8\_4 zur Speicherung der Positionsinformation dienen könnte. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass sich die hier gemachten Anmerkungen stets auf den Gastralbereich der Knospe beziehen. Die Knospe selbst besitzt natürlich eine Polarität. Der vordere, später zum Hypostom differenzierende Teil, hat bereits in einer sehr frühen Phase der Entwicklung die Fähigkeit eines Kopforganisations (Broun et al., 1999). Vergleicht man diese Entwicklung mit dem theoretischen Modell von Meinhardt, dann kommt man zu folgender Schlussfolgerung: die Knospe entsteht *de novo* durch die verstärkte Produktion des Kopffaktivators in der Knospungszone, bedingt durch eine schwächer werdende Inhibition des Kopfinhibitors in diesem Bereich. Dies führt, wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, zur Festlegung einer zweiten apikal – basalen Achse. Die durch die Interaktion aus Kopffaktivator und –inhibitor entstandene Achse wird durch den Aufbau eines dritten Gradienten, der Queldichte, stabilisiert. Dieser kann also erst zu einem Zeitpunkt etabliert werden, nachdem die Achse determiniert ist. Diese spätere Etablierung kann man offenbar bei der Knospungsbildung recht gut verfolgen. Nachdem die Achse festgelegt worden ist, um die Knospung zu ermöglichen, wird eine gewisse Zeit benötigt, um den stabilen Gradienten aufzubauen, ersichtlich an der später einsetzenden Expression von K8\_4.

Durch Kopfregenerationsexperimente konnte eine weitere Bedingung nachgewiesen werden, die für Positionsdeterminatoren wichtig ist, die Stabilität. Keines der gemachten

Kopfregenerationsexperimente konnte an der Expression des Gradienten etwas verändern (Abb. 2.34 D-F).

Wie zuvor beschrieben, lassen sich jedoch auch Veränderungen an der Achsenpolarität vornehmen. In vier unterschiedlichen Transplantationsexperimenten (Abschnitt 2.2.2.2.1 – 2.2.2.2.4) wurde festgestellt, welche Auswirkungen die Veränderung der Position von Kopf und Fuß auf die Achsenpolarität und gleichzeitig auf die Expression von K8\_4 haben. Im Gegensatz zu Wilby und Webster wurden bei diesen Experimenten die transplantierten Köpfe bzw. Füße nicht wieder entfernt. Es zeigte sich, dass die Achsenpolarität über eine große Stabilität verfügt. Selbst durch einen Austausch von Kopf und Fuß (Abschnitt 2.2.2.2.1) konnte keine Veränderung der Achsenpolarität und auch keine Veränderung der Expression von K8\_4 erreicht werden. Jedoch im Transplantationsexperiment III (Abschnitt 2.2.2.2.3) wurde für den Fuß ein inhibitorischer Effekt auf die Expression von K8\_4 sichtbar gemacht. Dabei hat die Transplantation des Fußes auf den apikalen Pol zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation keinen Effekt auf die Achsenpolarität. Das wird durch die Regeneration (nach 2d, Abb. 2.37 D) eines weiteren Fußes am basalen Ende des Gastralbereiches demonstriert. Beide zusammen inhibieren aber im späteren Verlauf die Expression von K8\_4 in ihrer Umgebung und drängen diese in die Mitte des Tieres. Sechs Tage nach der Transplantation bilden die Tiere in der Mitte ihrer Körperachse einen Kopf, genau an der Stelle an der auch K8\_4 exprimiert wird. Die Fußtransplantation verändert also erst im späteren Verlauf, nach mind. 4 Tagen, die Achsenpolarität partiell. Gleichzeitig wird dabei die Expression von K8\_4 inhibiert.

Anhand der Expression von K8\_4 kann die Polarität der Achse zu jedem Zeitpunkt nachvollzogen werden. Apikale Körperbereiche sind stets durch eine starke Expression gekennzeichnet, wohingegen basale Bereiche keine Expression von K8\_4 zeigen oder erlauben. Der Kopf, so konnten die Transplantationsexperimente I,II,IV zeigen, hat keinen Effekt auf die Ausbildung des Gradienten im Gastralbereich. Im Kopf selbst, d.h. Hypostom und Tentakelbildungszone, wird die Expression von K8\_4 jedoch stark inhibiert. Obwohl es durch den Kopf nicht zu einer Umkehr der Achsenpolarität kommt, so inhibiert er doch, im Gegensatz zum Fuß, die Regeneration eines Kopfes am apikalen Pol des Gastralraumes über einen langen Zeitraum (Vergleiche Abschnitt 2.2.2.2.2 mit Abschnitt 2.2.2.2.3). Dieser inhibitorische Effekt des Kopfes (MacWilliams, 1983a) auf die Ausbildung eines neuen Kopfes ist gut untersucht. Sogar die Entfernung bis zu welcher der Inhibitor wirkt, konnte bestimmt werden (Technau, 1997). In der Tat wurde beobachtet, dass nur die Transplantate einen Kopf am apikalen Pol des Gastralbereiches regenerierten, die ein deutliches

Längenwachstum zeigten (Abb. 2.36 E). Dies zeigt, dass es Substanzen gibt, die trotz stabiler Achsenpolarität positionsunabhängig wirken und in diesem Fall die Kopfbildung an der „falschen“ Stelle inhibieren.

Mit Hilfe der Expression von K8\_4 kann die apikal – basale Achsenpolarität dargestellt werden. Es ist aber wichtig im folgenden zu ergründen, wodurch die gradierte Expression von K8\_4 im Körper der *Hydra* erreicht wird. Dabei könnte eine Promoteranalyse von K8\_4 wichtige Informationen liefern. Durch diese Analyse würde auch gezeigt, auf welchen molekularen Grundlagen der inhibitorische Einfluss des Fußes auf die Expression von K8\_4 beruht.

Andererseits konnte bei der Expressionsanalyse von L21\_1.1 (Astacin-ähnliche Protease) eine ähnlich gradiert verteilte Expression nachgewiesen werden. Gemeinsames Merkmal beider Gene ist die Expression in den Drüsenzellen. Es gibt Hinweise, nach denen die Drüsenzellen der Achsenpolarität folgen und verstärkt im apikalen Teil des Gastralgewebes vorkommen (Bode, 2003). So könnte die gradierte Expression von K8\_4 auf der gradierten Verteilung der Drüsenzellen beruhen. Vielleicht spielen aber genau diese Drüsenzellen eine wichtige Rolle bei der Achsenbildung, speziell in der Bewahrung der Achsenpolarität in *Hydra*. Eine gradierte Verteilung einer bestimmten Zelllinie würde eine sehr viel stabilere Positionsinformation darstellen, als das bei einer wie auch immer gearteten Substanz der Fall sein könnte.

## 4. Zusammenfassung

*Hydra*, ein basaler Metazoa, ist durch seinen einfachen Körperbau mit nur einer Achse ein idealer Modellorganismus, um Vorgänge der Musterbildung, im Speziellen die der Achsenbildung, zu studieren. Eine Vielzahl von Regenerations- und Transplantationsexperimenten lieferten detaillierte Kenntnisse, wie diese Achsenbildung auf zellulärer Ebene abläuft. Im folgenden sind viele Anstrengungen unternommen worden, die entsprechenden molekularen Hintergründe zu beleuchten. In dieser Arbeit wird gezeigt, wie weitere Gene und genetische Informationen analysiert und gewonnen werden können, um die molekularen Ursachen und Zusammenhänge der Achsenbildung besser zu verstehen.

Die Suche nach den Zielgenen von HEADY, einem 12 Aminosäure kurzen Peptid, das für die Festlegung des apikalen Pols der Hydraachse von entscheidender Bedeutung ist (Lohmann und Bosch, 2000), mittels zweier Methoden zum Vergleich von Genexpressionsprofilen, war Ausgangspunkt der Arbeit und sollte Einblicke in das Netzwerk der Achsendeterminierung liefern. Dabei konnte unbeabsichtigt das Gen *HyDkk-3* identifiziert werden, das zu einer Genfamilie gehört, die derzeit über vier Mitglieder verfügt. Aus dieser Familie spielt vor allem *Dkk-1* als Inhibitor des Wnt - Signaltransduktionsweges eine zentrale Rolle bei der Achsendeterminierung der Wirbeltiere (Glinka et al. 1998). Die Mitglieder dieser Genfamilie waren bis zu diesem Zeitpunkt nur aus den Wirbeltieren bekannt und es war angenommen worden, dass die Familie der Dickkopfgene erst mit der evolutiven Entwicklung der Wirbeltiere entstand. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Expression von *HyDkk-3* nicht durch HEADY beeinflussbar war und dass es sich bei diesem Gen, um ein Nematocyten spezifisches Gen handelt, das damit auch keine Bedeutung bei der Achsenbildung in *Hydra* hat. Das zusätzliche Auffinden eines *Dkk-3* homologen Genes in *Ciona intestinales* erlaubte die Erstellung eines Szenarios für die evolutive Entwicklung dieser Genfamilie, nachdem ein *Dkk-3* ähnliches Gen der Vorläufer aller bekannten Mitglieder der Dickkopffamilie sein könnte.

Durch die Adaptierung der Methode der „Supression Subtractive Hybridisation“ (SSH) zur Gewinnung von cDNA Banken, die nur die Gene enthalten, deren Expression durch HEADY beeinflussbar ist, und der differenziellen Hybridisierung von cDNA Macroarrays generiert aus diesen cDNA Banken, konnte eine ganz Reihe von Klonen identifiziert werden, die als mögliche HEADY Zielgene in Frage kommen. Besonders interessant war dabei die Erkenntnis, gewonnen aus der Untersuchung ausgewählter Beispiele, dass HEADY die proteolytische Aktivität innerhalb der *Hydra* reguliert. Es wurde demonstriert, dass HEADY

einen negativen Einfluss auf die Expression einer Gastralbereich – spezifischen Astacin ähnlichen Protease hat (L21\_1.1). Im Gegensatz dazu könnte HEADY einen positiven Einfluss auf die Aktivität von Proteasen der Cysteinproteasefamilie haben, da es die Expression eines Cysteinprotease – spezifischen Inhibitors B1\_H4 (Cystatin) reprimiert.

Um die in diesem ersten Teil gewonnenen Informationen besser verstehen und einordnen zu können, wurde im zweiten Teil nach Genen gesucht, die bei Kopfregeneration und Knospung eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus konnte durch das experimentelle Vorgehen ein Vergleich zwischen Knospung und Kopfregeneration vorgenommen werden, dessen Ergebnis die Hypothese stützte, dass Knospung und Kopfregeneration nicht nur über eine gemeinsame molekulare Maschinerie verfügen, sondern sich auch in der Benutzung von bestimmten Genen unterscheiden. Die auch in diesem Teil verwendete SSH, mit anschließender Hybridisierung von cDNA Macroarrays, erbrachte im wesentlichen zwei wichtige Gene.

Zum einen konnte der Klon 1\_C18\_1 identifiziert werden, der ein Cathepsin L homologes Genfragment enthielt. Durch die Überlagerung der Expressionsmuster von 1\_C18\_1 und B1\_H4 (Cystatin) sowie einer bereits beschriebenen Interaktion dieser beiden Genprodukte in anderen Organismen, wurde für *Hydra* ebenfalls eine Interaktion postuliert. Die Verknüpfung der Erkenntnisse aus dem ersten und zweiten Teil führten zur Aufstellung der Hypothese, dass HEADY über die spezifische Regulation der proteolytischen Aktivität die Erhöhung des Regenerationspotentials erreicht und darüber die Induktion von apikalen Strukturen ermöglicht.

Zum anderen wurde der Klon K8\_4 ermittelt, der ein Genfragment enthält, das nicht bei der frühen Knospenentwicklung exprimiert wird. Die Expressionsanalyse dieses Gens ergab eine gradierte Verteilung von Apikal nach Basal, charakteristisch für eine wichtige Komponente des Gierer - Meinhardt Modells, die „Quelldichte“. Über diese gradierte Verteilung könnte eine stabile Positionsinformation vermittelt werden, die in der Achsenpolarität manifestiert ist. Durch verschiedene Transplantationsexperimente konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieser Expression jederzeit die Polarität der Körperachse in *Hydra* bestimmt werden kann.

## 5. Materialien

### 5.1 Organismen

Untersuchte Organismen:

Sämtliche Versuche wurden mit der Art *Hydra magnipapillata* (Stamm 105) durchgeführt. In ergänzenden Experimenten fanden auch die Arten *Hydra vulgaris* (Stamm AEP), *Hydra oligactis* und *Pelmatohydra robusta* sowie die Mutante reg16 der Art *Hydra magnipapillata* (Stamm 105) Verwendung.

Futterorganismus:

*Artemia salina* (Salinenkrebsschen)

Empfängerorganismus:

*Escherichia coli*, Stamm XL-1 Blue und DH5- $\alpha$

### 5.2 Medien

*Artemia* - Medium

31,8 g Meersalz in 1 l Millipore gereinigtem Wasser

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, 50 mg/l Rifampicin, pH 6,9

*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)

Freezing - Medium

36 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,7 mM NaCitrat, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 6,8 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,4 % (v/v) Glycerol, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l NaCl, autoklavieren mindes. 20 min.

LB-amp – Medium

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, auf 1 l mit Millipore Wasser auffüllen, autoklavieren für  
- 95 -

	20 min., 0,1 % Ampicillin (50mg/ml) frisch zu gegeben; alternativ: 20 g LB – Broth in 1 l Millipore Wasser aufnehmen.
LB – Agar + Ampicillin	20 g LB Broth Base, 15 g Bactoagar, auf 1 l Millipore H <sub>2</sub> O auffüllen, autoklavieren mind. 20 min., 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) [10–15 ml / Platte]
SOB - Medium	20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl in 1 l
SOC-Medium	10 ml SOB-Medium, 100 µl 2 M Glucose (steril), 100 µl MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>

## 5.3 Puffer und Lösungen

### 5.3.1 Allgemeine Lösungen

Ampicillin – Stammlösung	50 mg/ml, gelagert bei –20°C in 100 µl Einheiten
APS	10 % (m/v) ad Millipore Wasser
DD-PCR-Ladepuffer	25 ml „Rehydration Buffer“ (ETC-Kit), 80 µl Orange G-Lösung (1 %), 60 µl Bromphenolblau-Lösung (1 %), 40 µl Xylencyanol-Lösung (1 %), 250 µl 0,2 M EDTA
Denhardt's (50 x)	1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % Ficoll, 1 % BSA Fraktion V, sterilfiltrieren, bei –20°C lagern
DNA-Ladepuffer	50 % Glycerin, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 % SDS, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol
Glykogen – Lösung	35 mg/ml in Millipore Wasser
Heparin	10 mg/ml in Millipore H <sub>2</sub> O, bei –20°C lagern
Hybridisierungslösung (für Blots)	50 % Formamid (v/v), 5 x SSC, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% SDS, 1 x Denhardt's, 10 % Dextransulfat
IPTG – Stammlösung	200 mg/ml ad Millipore Wasser, gelagert bei –20°C in 50 µl Einheiten
Lysis-Puffer (für gDNA Isolation)	0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA, 0,2 M Tris pH 8,5, 0,2 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K



MOPS (10 x)	92,52 g MOPS, 8,2 g Natriumacetat, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 l
Neutralisierungslösung (Macroarray)	1,5 M NaCl, 1 M Tris-base pH 7,5
NTM	100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
PCR Puffer (10 x)	Amersham
RNA-Ladepuffer	25 ml Glycerin, 0,5 M EDTA pH 8,0, 0,2 g Bromphenolblau, 0,2 g Xylencyanol, autoklavieren
RNA-Laufpuffer	116 ml 38 % Formaldehyd, 65 ml 10 x MOPS, 469 ml Millipore H <sub>2</sub> O
RNaseOut	Invitrogen
SDS – Stammlösung	10 % (m/v) ad Millipore Wasser
Sephadex G - 50	5 g Sephadex G-50 in 100 ml 1xTE für 30 min. autoklavieren
SSC (20 x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Strippinglösung (Macroarrays)	1 x SSC, 0,5 % (m/v) SDS
Stripping - Neutralisierungslösung	3 M NaCl, 0,5 M Tris-Cl pH 7,0
TAE (50 x)	2 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0
TBE (5 x)	54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 auf 1 l
TBE Sequenzierpuffer (10 x Long Run Buffer)	1,34 M Tris-Base, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA, 1 x TBE sollte einen pH Wert von 8,3 bis 8,7 bei 50 °C haben.
TE	10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0
Waschlösung 1 (für Macroarrays)	2 x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 2 (für Macroarrays)	0,2 x SSC, 0,1 % SDS
X – Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid, gelagert bei -20°C in 500 µl Einheiten

### 5.3.2 Lösungen für die mRNA – Extraktion (Dynabeads)

Bindepuffer	20 mM Tris – Cl pH 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA
Kaliumacetat	2,5 M Kaliumacetat pH 5,0
Regenerationslösung (Reconditioning Solution)	0,1 M NaOH

Lagerpuffer	250 mM Tris – Cl pH 7,5, 20 mM EDTA, 0,1 % Tween-20, 0,02 % Natriumazid
Waschpuffer B	10 mM Tris – Cl, 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA

### 5.3.3 Lösungen für *in situ* Hybridisierung

Blockierlösung	80 % MAB-B, 20 % Schafserum (hitzeinaktiviert)
CHAPS – Stammlösung	1 % (m/v) CHAPS ad Millipore H <sub>2</sub> O
Glycin – Stammlösung	40 mg/ml in Millipore H <sub>2</sub> O
Hybridisierungslösung	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween20, 0,1 % CHAPS, 1 x Denhardt's, 100 µg/ml Heparin, immer frisch zubereiten
Levamisol – Stammlösung	1 M Levamisol
Maleinsäurepuffer (MAB)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH eingestellt
MAB-B	Maleinsäurepuffer + 1 % BSA Fraktion V, bei 4°C lagern
Mowiol	6 g Glycerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 6 ml Millipore H <sub>2</sub> O für 2 Stunden bei Raumtemperatur, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 zugeben, Inkubation bei 53°C bis sich Mowiol löst. Klärung der Lösung durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min, bei –20°C lagern. Vor Gebrauch auf ca. 37 °C erhitzen.
NTMT	100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween20
Paraformaldehyd	8 % (m/v) Paraformaldehyd in 25 ml Millipore H <sub>2</sub> O auf 55 °C erhitzen, einen Tropfen 10 N NaOH zur Klärung der Lösung hinzugeben, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, pH-Wert auf 7,5 mit HCL einstellen; vor Gebrauch auf 4 % mit <i>Hydra</i> - Medium verdünnen
Proteinase K-Stammlösung (100 x)	5 mg Proteinase K in 5 ml Millipore H <sub>2</sub> O lösen, in 50 µl-Aliquots bei –70°C lagern
PBS	0,15 M NaCL, 0,08 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,021 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3

PBT	PBS + 0,1 % Tween20
Schafserum	Hitzeinaktivierung für 30 min bei 55°C
Triethanolamin	0,1 M Triethanolamin, pH 0,1
Urethan-Stammlösung	20 % (m/v) Urethan in <i>Hydra</i> - Medium

## 5.4 Kits

BD Advatange™ 2 PCR Enzyme System	BD Biosciences
Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	BD Biosciences
DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7)	Roche
DNA-Disc Buffer Kit	ETC
DYEnamic ET Dye Termination Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences
Dynabeads Oligo (dT) <sub>25</sub>	Dynal Biotech
First – Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences
GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
<i>Hotscribe</i> First-Strand cDNA Labelling Kit	Amersham Biosciences
Megaprime™ DNA labelling Kit	Amersham Biosciences
NucleoSpin® Plasmid	Macherey - Nagel
OP-Kit A	Operon
pGEM®-T Easy Vector System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuickPrep <i>micro</i> mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences
Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)	Amersham Biosciences
RNeasy Mini	Qiagen
SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit	Epicentre
Superscript™ Double – Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
Superscript™ Plasmid System for cDNA	
Synthesis and Cloning Reagent Assembly	Invitrogen
TRIzol® Reagent	Invitrogen

## 5.5 Enzyme (neben den verwendeten Kit's)

SP6 RNA Polymerase	Roche
T7 RNA Polymerase	Roche

T3 RNA Polymerase	Roche
Taq DNA-Polymerase	Fermentas
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen
DNase 1	Amersham Pharmacia
RNase A	Sigma
Proteinase K	Sigma

## 5.6 Chemikalien

Agarose	Sigma
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumsulfat	Sigma
Ampicillin	Merck
APS	Roth
Bactoagar	Roth
BM-Purple	Boehringer Mannheim
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Fluka
BSA Fraktion V (Rinderalbumin)	Merck
CHAPS	Sigma
Chelating Resin	Sigma
Chloroform	Roth
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
Dextransulfat	Roth/Fluka
Dimethylformamid	Merck
DNA-Größenstandard (50 bp/100 bp/1kb Leiter)	Fermentas
dNTPs (100mM)	Fermentas
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid (Acetic anhydride)	Sigma
Ethanol (unvergällt)	Roth
Ethanol (vergällt)	Roth
Ethidiumbromid (50 mg/ml)	Merck
Euparal	Roth
Formaldehyd	Merck

Formamid	Roth
Glucose	Merck
Glycerol	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Sigma
Herings sperma 10 mg/ml (Ultraschall behandelt)	Stratagene
IPTG	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kalziumchlorid	Merck
LB Broth Base	Life Technology
Levamisol	Roth
Lithiumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Maleinsäure	Sigma
Meersalz (Ocean Zac plus)	Zoo Zajac, Duisburg
Methanol	Roth
Mineralöl	Sigma
Mowiol 4-88	Calbiochem
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natrium- <i>di</i> - hydrogenphosphat	Roth
Natronlauge	Roth
Orange G	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Phenol	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
RapidGel <sup>TM</sup> -XL-40 % Concentrate	USB

Salzsäure	Roth
Schafserum	Sigma
SDS ( Natriumdodecylsulfat)	Roth
Silbernitrat	Merck
SEPHADEX G50	Pharmacia
Substratlösung (NBT/BCIP)	Roche
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Merck
Triethanolamin	Sigma
Tris-base (Trihydroxymethylaminomethan)	Roth
t-RNA (10mg/ml)	Sigma
Tryptic Soy Broth	Sigma
Trypton	Roth
Tween20	Merck
Urethan	Sigma
X-Gal	Sigma
Xylencyanol	Fluka

## 5.7 Radioaktive Substanzen

$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham
-----------------------------------	----------

## 5.8 Vektoren

pBluescript <sup>®</sup> SK +	Stratagene
pGEM <sup>®</sup> -T	Promega

## 5.9 Antikörper

Anti-DIG-AP Fab Fragment	Roche
--------------------------	-------

## 5.10 Oligonukleotide (Primer)

Alle unter diesem Punkt aufgeführten Primer wurden bei MWG-Biotech bestellt.

### Standard Primer:

AK Actin34	5' AAG CTC TTC CCT CGA GAA ATC 3'
AK Actin35	5' CCA AAA TAG ATC CTC CGA TCC 3'

SP6 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC 3'  
 T7 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'  
 T3 5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'  
 M13F 5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'  
 M13R 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'

**Sequenzier - Primer:**

SP6(IRD800) 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC 3'  
 T7(IRD800) 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'  
 M13R(IRD800) 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG 3'

**DD-PCR:**

OPA-01 5' CAG GCC CTT G 3'  
 OPA-02 5' TGC CGA GCT G 3'  
 OPA-03 5' AGT CAG CCA C 3'  
 OPA-04 5' AAT CGG GCT G 3'  
 OPA-05 5' AGG GGT CTT G 3'  
 OPA-06 5' GGT CCC TGA C 3'  
 OPA-07 5' GAA ACG GGT G 3'  
 OPA-08 5' GTG ACG TAG G 3'  
 OPA-09 5' GGG TAA CGC C 3'  
 OPA-10 5' GTG ATC GCA G 3'  
 OPA-11 5' CAA TCG CCG T 3'  
 OPA-12 5' TCG GCG ATA G 3'  
 OPA-14 5' TCT GTG CTG G 3'  
 OPA-15 5' TTC CGA ACC C 3'  
 OPA-16 5' AGC CAG CGA A 3'  
 OPA-17 5' GAC CGC TTG T 3'  
 OPA-20 5' GTT GCG ATC C 3'

T12GC 5' TTT TTT TTT TTT GC 3'  
 T12GA 5' TTT TTT TTT TTT GA 3'

**SSH - Primer:**

SSH_PCR primer 1	5' CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'
SSH_Nested PCR p.1	5' TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T 3'
SSH_Nested PCR p.2	5' AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT
SSH_cDNA synthesis p.	5' TTT TGT ACA AGC TT <sub>30</sub> N <sub>1</sub> N 3'

**3'und 5'RACE PCR:**

Splinkerette (Blunt)	siehe Methoden (6.11)
st_SplOutPri_3	5' GAA TCG TAA CCG TTC GTA CG 3'
st_SplInnPri_3	5' TAC GAG AAT CGC TGT CCT C 3'
3'RACE	5' GAC TCG AGT CGA CAT CGA T <sub>17</sub> 3'
Adapter	5' GAC TCG AGT CGA CAT CGA 3'

**1\_C18\_1 / Cathepsin L:**

RA_Cathepsin_F	5' ATG AAG GTT TTC TGT GCA TT 3'
RA_Cathepsin_R1	5' CAT TGA CCT TGG TCT TTA AC 3'
RA_Cathepsin_R2	5' CAA ACT AAT GGA TAA CTA GC 3'

**7\_N12\_1**

RA_Klon7_F	5' GCC TAC TAA ATG CGA AGA TG 3'
RA_Klon7_R	5' GAT CTC TTC TTG ATC TAT GC 3'

**Goosoid(CnGsn)**

AF_CnGsc200_fw	5' CCG GGT TAG AGT TTC AAT GC 3'
AF_CnGsc200_rev	5' TGA CTA CTT TGA CGC CGT AGC 3'

**HyDkk-3:**

RA_DKK1_F(2)	5' ATG TCG AAA CTA TTT ATT ATC TAT ACG 3'
RA_DKK1_F	5' CAG AAT GGC CAA TGC TGT GAA 3'
RA_DKK1_R	5' CAA CTT GCT TGC ATA TAA GCG 3'
RA_DKK1_R(2)	5' GAA CAT ATT GGT TGA ATA AAC TGG 3'
RA_DKK1_R(3)	5' CTA ACG AAG GTG CGA CTG G 3'

**J12\_1.1**



RA\_J12\_1.1\_F 5' CCG AGG AAA CAG ATG AAT CTG G 3'

RA\_J12\_1.1\_R 5' GGA GCA AGT CGC ATC CCA AC 3'

**K8\_4**

RA\_K8\_4\_F 5' CCA CCT CCG GAG TTG TCA AC 3'

RA\_K8\_4\_R 5' CAG TGG GCA ACC TGA ATA CC 3'

**L21\_1.1**

RA\_L21\_1.1\_F 5' ACT ATC TCT GTC AGG TCG G 3'

RA\_L21\_1.1\_R 5' CCT TAC GCC ATA GAT TCA TCC 3'

***Soma ferritin***

ferritin f-1 5' AGC GCT TGA ATT GGA AAA GA 3'

ferritin r-1 5' CGC ATC TCT TTG CGT TTG TA 3'

**5.11 Geräte**

**PCR-Maschinen (Thermocycler)**

Cyclone gradient	peqLab
i-Cycler 96	Biorad
Primus 96 plus	MWG-Biotech
Primus 25	MWG-Biotech
PTC-255 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
Robocycler Gradient 96	Stratagene

**Netzgeräte**

EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech
LNG 350-06	Heinzinger
PS 250	HYBAID

**Gelelektrophoresekammern**

EasyCast minigel system B1A	Owl Separation Systems
EasyCast minigel system B2	Owl Separation Systems
Multiphor 2	Amersham Pharmacia Biotech

**Inkubatoren/Schüttler**

Thermoshaker Certomat H	B.BraunBiotech
HIS25	Grant BOEKEL
Thermoinkubator	Heraeus Instruments
KS10 (Rotationsschüttler)	Edmund Bühler
Mini 10	Thermo Hybaid
Thermomixer Compact	Eppendorf

**UV-Geräte**

ImaGo	B+L Systems
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Kontaktlampe Chroma 43	Vetter GmbH

**Elektroporationsgeräte**

Gene Pulser II	Biorad
Pulse Controller II	Biorad

**Zentrifugen**

Biofuge 13	Heraeus
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Minifuge RF	Heraeus
Labofuge 1	Heraeus
Multifuge 3 S-R	Heraeus

**Mikroskopie**

AxioCam	Zeiss
Axioskop 2	Zeiss

**Sonstige Geräte**

BioPhotometer	Eppendorf
Eraser (Löschen der PI's)	Raytest
Gene Quant Photometer	Pharmacia Biotech

LaminAir HB2448 (Modell: Firefly)	Heraeus Instruments
MegaBACE 500	Amersham Biosciences
Milli-Q Academic System	Millipore
NEN Global IR <sup>2</sup> DNA Analyzer	LI-COR
Phosphoimager FLA-5000	FUJI
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments
QFill 2	Genetix
QPix	Genetix
VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 400 E	H+P Labortechnik GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wallac WinSpectral	PerkinElmer

## 5.12 Andere Materialien

96 well Microtiter – Platten	Genetix
384 well Microtiter – Platten	Genetix
Chromatografie Papier	Whatman
Hybond N Nylon Membran	Amersham Biosciences
Hybond N <sup>+</sup> Nylon Membran	Amersham Biosciences
Phosphoimaging Platten	Fuji
QTrays 20 cm x 20 cm	Genetix
Röntgenfilm (BioMax MS)	KODAK

## 5.13 Computerprogramme

### **cDNA Macroarray Analyse Software:**

AIDA Image Analyzer v3.2 (<http://www.raytest.de>)

AIDA Array Compare v3.2 (<http://www.raytest.de>)

### **DTP Software für das Erstellen der Arbeit:**

MS Word 2000

### **Software zur Bildbearbeitung und statistischen Analyse:**

Adobe Photoshop 7.0

MS Excel 2000

**Software für den Scintillationszähler:**

Wallac 1414 WinSpectral v1.30 (PerkinElmer) – Protokoll 10 (Cerenkov)

**Software zur Sequenzanalyse:**

DNASIS v2.5

eSeq LICOR v2.0

MegaBACE Score Card v3.0 (Molecular Dynamics)

Sequenze Analyzer v3.0 (Molecular Dynamics)

SEQtools v8.0xxx (<http://www.seqtools.dk>)

## 5.14 Sequenzanalyse im Internet

### EST und Genom – Projekte:

*Hydra magnipapillata*:

Database of Japan: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL: <http://www1.embl-heidelberg.de/>

Genome Sequencing Center St. Louis: <http://www.genome.wustl.edu/EST/index.php>

Sputnik (MIPS): <http://mips.gsf.de/proj/sputnik/hydra/>

*Caenorhabditis elegans*:

Sanger Center: [http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/blast\\_server.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/blast_server.shtml)

Worm base: <http://www.wormbase.org/db/searches/blat>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/NematodeBlast.html>

*Drosophila melanogaster*:

Fly Base: <http://www.fruitfly.org/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/FlyBlast.html>

*Strongylocentrotus purpuratus*:

<http://sugp.caltech.edu/sequence/blast.psp>

*Ciona intestinalis*:

<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>

<http://genome.jgi-psf.org/ciona4/ciona4.home.html>

*Fugu rubripes:*

<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/fugu.html>

*Danio rerio:*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/DrBlast.html>

*Gallus gallus:*

<http://www.chick.umist.ac.uk/>

*Mus musculus:*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html>

### **Proteinstruktur bzw. -funktions Vorhersage:**

*Serviceplattformen:*

Expert Protein Analysis System: <http://ca.expasy.org/>

Service am EBI: <http://www.ebi.ac.uk/>

*BLAST Datenbanken*

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

EBI: <http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>

*Proteindomänen Vergleich und Vorhersage:*

Interpro bei EBI: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/index.html>

PROSCAN: [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)

SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

*Kernlokalisierungssequenz Vorhersage:*

PredictNLS: <http://maple.bioc.columbia.edu/predictNLS/>

*Signalpeptid Vorhersage:*

SignalP V2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>

## 6. Methoden

### 6.1 Hälterung der Versuchstiere

#### 6.1.1 *Hydra magnipapillata*

*Hydra magnipapillata* (Stamm 105) wurde als Versuchstier für die Experimente verwendet. Mehrere hundert Tiere konnten in je einer Plastikschaale (20cm x 20cm x 6cm) gehältert werden. Die Temperatur des klimatisierten Kulturraums betrug konstant 18°C bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Die Tiere wurden dreimal pro Woche mit in Süßwasser gewaschenen Krebslarven (*Artemia salina*) mittels Pipette gefüttert. Nach frühestens sechs Stunden wurden die Kulturschalen mit Wasser gewaschen, um Futterreste und Krebschalen zu entfernen. Hierzu wurden die Tiere mechanisch von der Oberfläche gelöst und über ein Sieb abgossen, anschließend mit Hydramedium in das Kulturgefäß zurückgespült und übriggebliebene Futterreste oder tote Tiere mit einer Pipette per Hand entfernt (Methode nach Loomis und Lenhoff, 1956). Die ebenfalls verwendeten *Hydra vulgaris* (Stamm AEP), *Hydra oligactis* und *Pelmatohydra robusta* sowie die Mutante reg16 der Art *Hydra magnipapillata* (Stamm 105) wurden nach der gleichen Methode gehalten.

Es wurde stets darauf geachtet, dass Hydren, aus denen RNA oder DNA isoliert werden sollte, für mindestens 48 h keine Nahrung aufgenommen hatten, um Kontaminationen zu vermeiden.

#### 6.1.2 *Artemia salina*

Als Futtertiere wurden Larven des Salzwasserkrebsses *Artemia salina* verwendet. Diese Tiere konnten in 1-Liter-Flaschen bei 18°C unter ständiger Durchlüftung in 500 ml Salinenmedium gehältert werden. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurden zwei Teelöffel Dauereier unter den oben genannten Bedingungen inkubiert und angezogen. Durch Dekantieren konnten nach drei Tagen die geschlüpften Krebslarven abgesammelt, mehrfach mit Wasser gewaschen und in Hydramedium resuspendiert an die Versuchstiere verfüttert werden.

### 6.2 Peptidinkubation

Alle Peptidbehandlungen wurden mit einer Peptidkonzentration von  $10^{-6}$  M durchgeführt. Das Peptid HEADY wurde von der Firma Jerini mit Chlorid als Gegenion synthetisiert und geliefert. Das zu über 95% reine, lyophilisierte Peptid wurde zunächst in einer 10%igen DMSO Lösung auf  $2 \times 10^{-3}$  M verdünnt. Die so hergestellten Stammlösungen wurden in 10  $\mu$ l

Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und vor Gebrauch 1:2000 in Hydramedium verdünnt. Im HEADY Peptid wurden ausschließlich frisch abgefallene (max. 12 h) Knospentiere inkubiert.

### **6.3 Differential Display PCR (DD-PCR)**

Die DD-PCR ist eine besondere Form der RT-PCR (6.9), die es erlaubt, ohne jede Vorinformation die Genexpressionsmuster einer Vielzahl verschiedener Proben miteinander zu vergleichen. So können differentiell exprimierte Gene entdeckt werden, deren Expression sowohl induziert, als auch reprimiert sein kann.

#### **6.3.1 Reverse Transkription**

Die Darstellung der differentiellen Genexpression geschah durch Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel. Ein hochauflösendes Polyacrylamidgel kann allerdings nur eine begrenzte Anzahl von ca. 50 bis 100 unterscheidbaren DNA-Banden sichtbar machen. Die Anzahl an unterschiedlichen mRNA-Transkripten, die sich gleichzeitig in einer Zelle befinden, ist jedoch wesentlich höher und beträgt ca.  $10^5$  bis  $2 \times 10^5$ . Es ist daher notwendig die mRNA in Subpopulationen aufzuteilen. Dies geschieht durch eine spezielle Art der reversen Transkription (6.19) unter Verwendung von sogenannten Ankerprimern. Diese bestehen aus 12 Desoxythymidinnukleotiden und zwei weiteren Desoxynukleotiden M und N,  $(d)T_{12}MN$  (z. B. 5' TTTTTTTTTTTTGC 3'). Für N können alle vier Desoxynukleotide eingesetzt werden, für M hingegen nur die Desoxynukleotide mit den Basen A, C und G. Berücksichtigt man alle Kombinationsmöglichkeiten zwischen M und N, so ergeben sich hieraus 12 unterschiedliche Ankerprimer. Mittels dieser Primer kann die Gesamtpopulation der mRNA in 12 Teilpopulationen aufgeteilt werden, da ein einzelner Ankerprimer jeweils nur das Umschreiben eines Zwölftels der gesamten mRNA initiiert. Würde für M ein Desoxythymidinnukleotid eingesetzt werden, dann wäre die Selektivität dieses Primers herabgesetzt, er wäre nicht für  $1/12$  sondern für  $1/4$  der gesamten mRNA-Population spezifisch.

Die reverse Transkription wurde nach einem speziell für die DD-PCR von Dr. Sergey Kuznetsov (pers. Mitteilung) entwickelten Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden folgende Komponenten in einem „Master-Mix“ zusammengegeben (Tab. 6.1):

	Volumen
first strand buffer (5 x)	5 µl
DTT (0,1 M)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1,25 µl
BSA (0,1 %)	0,375 µl
RNase Out (40 U/µl)	1,25 µl
Trehalose (ca.80 %)	7,125 µl
Endvolumen	17,5 µl

**Tab. 6.1: Pipettierschema für die Reverse Transkription einer DD-PCR.**

Trehalose und BSA dienen der Stabilisierung des SuperScript II H<sup>-</sup> Enzyms, so dass die reverse Transkription bei höherer Temperatur durchgeführt werden konnte. Dadurch wurde eine erhöhte Spezifität bei der Bindung des Ankerprimers an die mRNA erreicht.

In dem nächsten Schritt wurden 100 ng mRNA in 4 µl Millipore H<sub>2</sub>O gelöst, mit 2,5 µl des gewünschten Ankerprimers (25 µM) kombiniert und zwecks Zerstörung von Sekundärstrukturen für 10 min. im Thermocycler auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch auf 50°C heruntergekühlt. Parallel wurde 1 µl des Enzyms SuperScript II H<sup>-</sup> mit den 17,5 µl „Mastermix“ vermischt und auf 50°C erhitzt. Daraufhin wurden alle Komponenten zusammengegeben und für 1 h bei 50°C inkubiert.

Durch diese Vorgehensweise wurde verhindert, dass es durch unspezifisches Hybridisieren des Ankerprimers und frühzeitige Aktivität des Enzyms zur Amplifikation unerwünschter Fragmente kommt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die DNA/RNA-Hybridstränge bei 95°C für 3 min. denaturiert und bei -20°C gelagert.

### 6.3.2 DD-Polymerasekettenreaktion

Nach der reversen Transkription erhält man ungefähr 10000 – 15000 unterschiedliche cDNAs pro eingesetztem Ankerprimer. Dies ist immer noch deutlich zu viel, um die Banden klar auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel zu trennen. Zudem würden Transkripte, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen, wesentlich schlechter auf dem Gel zu finden sein, als die häufigen Transkripte der sogenannten Haushaltsgene. In Anbetracht einer derart großen Menge unterschiedlicher cDNAs würde es zwangsläufig zur Überlagerung von Banden kommen, wodurch möglicherweise differentielle, schwache Banden übersehen werden könnten. Die Lösung dieser Probleme liegt in der Durchführung einer speziellen PCR-Reaktion mit jeweils einer der 12 cDNA-Subpopulationen als Matrize. Im Gegensatz zur



Standard PCR (6.9.1) werden dekamere 5' Randomprimer und der für die jeweilige Subpopulation spezifische 3' Ankerprimer verwendet. Bei den 5' Randomprimern handelt es sich um Primer, die aus 10 zufällig aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehen. In der Standard – PCR werden normalerweise Primer mit einer Länge von 20 Nukleotiden verwendet, diese sind hochspezifisch und haben den Zweck, genau ein bestimmtes Fragment zu amplifizieren. Die 5' Randomprimer hingegen binden auf vielen verschiedenen cDNA - Fragmenten und häufig sogar mehrfach auf ein und demselben Fragment. Auf diese Weise können unterschiedlich lange Fragmente eines Moleküls erzeugt werden.

Die verwendeten 5' Randomprimer entstammten dem „OP-Kit A“ der Firma Operon. Wie die reverse Transkription (6.3.1) wurde auch die folgende PCR-Reaktion (Tab. 6.2) unter besonderen, die Spezifität der Primerhybridisierung fördernden Bedingungen durchgeführt. Der Ankerprimer wurde im Vergleich zum Randomprimer in einem Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit verringern, dass PCR-Produkte ausschließlich durch die Bindung des Randomprimers generiert werden konnten.

	Volumen
PCR Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> (10 x)	1 µl
DTT (0,1 M)	0,1 µl
BSA (0,1 %)	1 µl
Ankerprimer (25 µM)	1 µl
Randomprimer (10 µM)	0,5 µl
DNTP (10 mM)	0,2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,6 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
CDNA Matrize	0,5 µl
Millipore H <sub>2</sub> O	5 µl
Endvolumen	10 µl

**Tabelle 6.2: Pipettierschema für die DD-PCR**

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen ausgeführt: initiale Denaturierung bei 90°C, 3 min; Denaturierung 90°C, 40 s; Primerhybridisierung bei 40°C, 60 s; Elongation 72°C, 90 s, 42 Zyklen, Termination 72°C, 5 min.

### 6.3.3 Hochauflösende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Für die Elektrophorese der PCR-Produkte wurden das „DNA - Disc Buffer Kit“ der Firma ETC Elektrophorese – Technik und die „Multiphor 2 Elektrophoresekammer“ von Amersham

Pharmacia Biotech verwendet. Die Vorbereitung der Proben und die anschließende horizontale Elektrophorese wurden genau nach Anleitung des ETC Protokolls für native Laufbedingungen durchgeführt. Hierzu wurde ein CleanGel (15 % 52 S) zunächst in „DNA Disc Gel Buffer“ für 1 h auf dem Rotationsschüttler rehydriert. Nach Abtupfen überschüssigen Puffers von beiden Seiten des Gels wurde dieses auf einem Tropfen Kerosin auf der Thermoplatte der „Pharmacia Multiphor 2 Elektrophoresekammer“ ausgerichtet. Als Pufferreservoir dienten mit „DNA Disc Buffer“ getränkte Filterpapierstreifen, die den Kontakt zwischen Elektroden und Gel herstellten. Nach der Zugabe von je 10 µl Ladepuffer zu den PCR-Ansätzen wurden je 6 µl auf das Gel aufgetragen. Nach kurzem Einlauf (ca. 30 min.) bei 5 mA und 40 V wurde für 30 weitere Minuten auf 10 mA und 200 V gestellt. Danach lief die Elektrophorese bei 15 mA und 400 V bis die Banden des Bromphenol-Blau und Xylencyanol aus dem Ladepuffer die Anode erreicht hatten.

#### **6.3.4 Silberfärbung**

Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel nach einer optimierten Vorschrift der Firma ETC silbergefärbt (Barros et al., 1991; Seymour and Lazarus, 1989; Bassam et al., 1991). Hierzu wurde das Gel erst eine halbe Stunde fixiert, 3 x 2 min. gewässert und anschließend 20-30 min. in Silberlösung inkubiert. Nach kurzem Spülen in Wasser konnte nun der Entwicklungsprozess für ca. 20 min. ablaufen (Sichtkontrolle). Jetzt wurde nur noch je 15 min. gestoppt und imprägniert, bevor das Gel bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurde. Folgende Lösungen wurden verwendet: Fixieren: 250 ml 10 % Essigsäure, Silberlösung: 200 ml 0,1 % AgNO<sub>3</sub>, 200 µl Formaldehyd, 100-250 µl 2 % Na-Thiosulfat bei 4 °C, Stoppen: 250 ml 2 % Glycin, 0,5 % EDTA Dinatriumsalz, Imprägnieren: 250 ml 5 % Glycerin.

#### **6.3.5 Klonierung differentiell exprimierter Gene/Genfragmente aus dem Silbergel**

Differentiell exprimierte Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in ein 200 µl Eppendorftube überführt. Unter Zugabe von etwas „chelating resin“ in 50 µl Millipore H<sub>2</sub>O wurde das Gelfragment mit einem Pistill zermahlen und resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl 10 x PCR-Puffer hinzupipettiert und das Gemisch für 5 min. auf 95°C erhitzt. Nach 5 min. Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand mit der gelösten DNA abgenommen und als Matrize für eine Reamplifikations-

PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit einer 1:25 Verdünnung des Eluats und dem entsprechenden Anker- und Randomprimer unter Standardbedingungen (6.9.1) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die richtige Bande aus dem Gel extrahiert (6.14). Anschließend wurden Adenosinnukleotid-Überhänge an das DNA-Fragment angefügt (6.15.1), dieses in den pGEM-T Vektor der Firma Promega ligiert (6.15) und schließlich sequenziert (6.6).

## **6.4 Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)**

Die SSH ist eine Methode, bei der Genexpressionsprofile miteinander verglichen werden, und die Unterschiede in Form von cDNA Banken gespeichert werden können. Für die Erstellung solcher cDNA Banken werden die zu vergleichenden cDNA Populationen voneinander subtrahiert (Diatchenko et al., 1996). Da durch eine nachgeschaltete PCR selektiv nur die differentiell exprimierten cDNA Fragmente amplifiziert werden, kommt es gleichzeitig auch zu einer Suppression von nicht differentiell exprimierten cDNA Fragmenten.

### **6.4.1 Überblick**

Die SSH wurde unter Benutzung des „PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ der Firma Clontech strikt nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die folgende Liste fasst den Ablauf der Prozedur zusammen:

1. Vorbehandlung des Hydragewebes (HEADY Zielgene (Abschnitt 2.1.2);  
Vergleich Knospung und Kopfregeneration (Abschnitt 2.2.2)
2. mRNA Isolation (Abschnitt 6.18.2)
3. Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese (Abschnitt 6.4.2)
4. Adaptorligation (Abschnitt 6.4.3)
5. Erste und Zweite Hybridisierung (Abschnitt 6.4.3)
6. Erste und Zweite PCR Amplifikation (Abschnitt 6.4.4)
7. Ligation und Klonierung der PCR – Produkte (Abschnitt 6.15)

### **6.4.2 Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese**

Für die Bestimmung von HEADY Zielgenen (Abschnitt 2.1.2) wurden jeweils 2,5 µg Poly A<sup>+</sup> RNA isoliert aus HEADY inkubierten Tieren und aus Kontrolltieren bei der cDNA Synthese

eingesetzt. Für die Generierung der cDNA Banken zum Vergleich von Knospung und Kopfregeneration (Abschnitt 2.2.2) wurden 5 verschiedene Poly A<sup>+</sup> RNA Populationen (RNA isoliert aus 4 h, 8 h, 16 h und 32 h kopfregerierenden Tieren und aus Tieren verschiedener Knospungsstadien (1-6)) gemischt. Um 2,2 µg Poly A<sup>+</sup> RNA bei der cDNA Synthese einsetzen zu können, wurden jeweils 366,7 ng aus jeder der RNA Populationen entnommen. 2,2 µg Poly A<sup>+</sup> RNA von 0 h regenerierenden Tieren ohne Knospen kam ebenfalls zum Einsatz für die Synthese der cDNA.

Für die cDNA Synthese wurde das „SuperScript™ Double – Stranded cDNA Synthesis Kit“ der Firma Invitrogen benutzt. Es wurde jedoch nicht der vorgesehene *Not I* Primer als Ankerprimer für die Erststrang Synthese eingesetzt, sondern der 3'RACE Primer. Nach den gemachten Herstellerangaben konnte so mit einer Ausbeute von 0,6-0,7 µg an doppelsträngiger cDNA gerechnet werden. Diese so hergestellten cDNA Pools wurden entsprechend der in den Abschnitten 2.1.2 und 2.2.2 gemachten Erläuterungen in Driver bzw. Tester unterteilt.

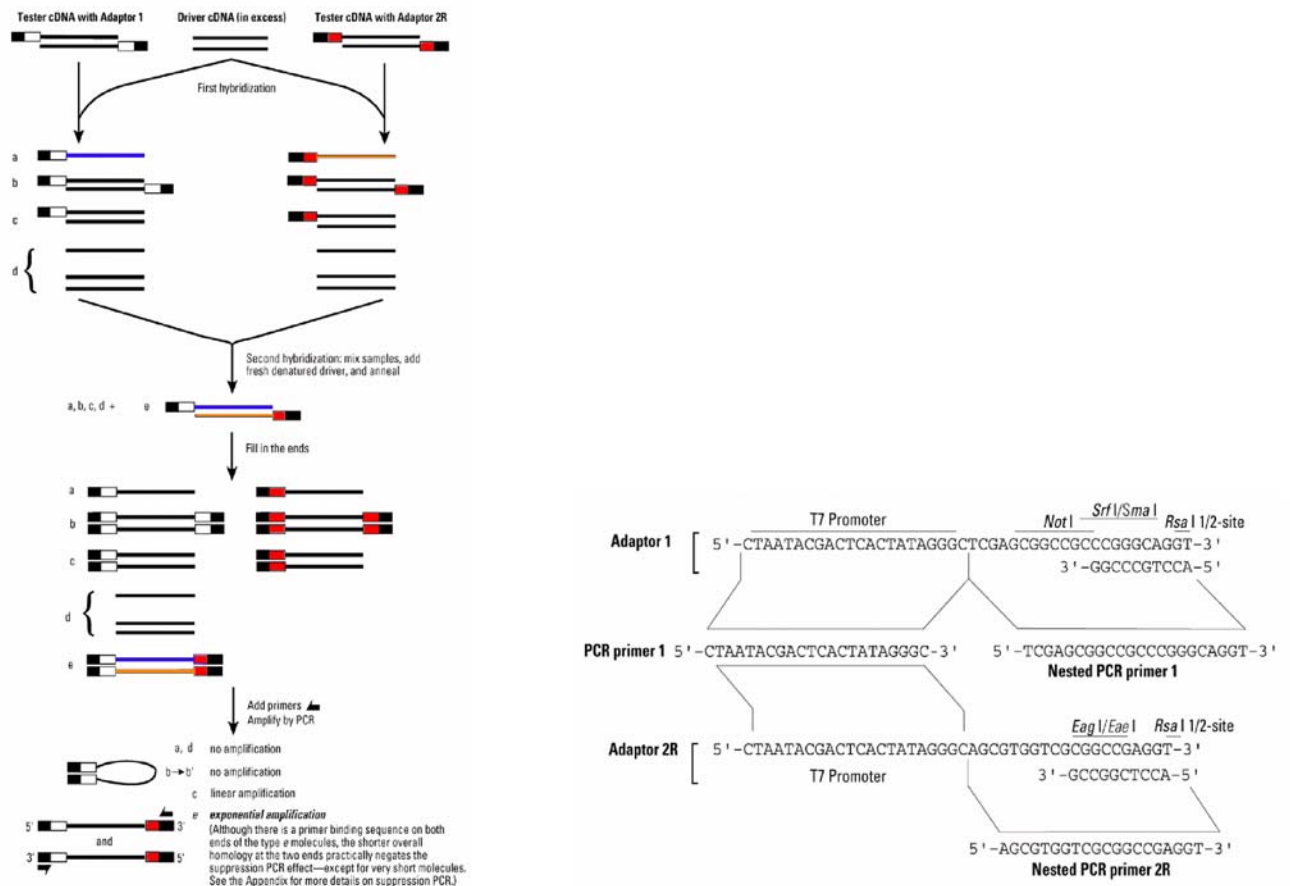
### **6.4.3 Adapterligation und Hybridisierung**

Nachdem die Tester und Driver cDNA Populationen mit der Restriktionsendonuklease *Rsa I* verdaut wurden, konnte an die in zwei Hälften unterteilte Testerpopulation, zwei unterschiedliche Adaptoren ligiert werden. Im Anschluss an die Ligation der Adaptoren an die Tester wurden zwei aufeinanderfolgende Hybridisierungen bei 68°C vorgenommen, die durch frisch denaturierten Driver in einen etwa 30fachen Überschuss ergänzt wurden. Das Ergebnis dieser Hybridisierungen ist eine Mischung von Hybridpopulationen, dargestellt in Abbildung 6.1. Nur die mit „e“ gekennzeichnete Population wird sich während der folgenden PCR - Schritte exponentiell amplifizieren lassen.

### **6.4.4 Erste und Zweite PCR Amplifikation**

Wie aus Abb. 6.1 ersichtlich, können verschiedene Hybride entstehen. Besonders ungünstig ist die Kombination von zwei Tester cDNA 's, die den gleichen Adaptor besitzen, da bei der folgenden ersten PCR nur ein Primer zum Einsatz kommt, um eine Primer – Dimerisierung zu vermeiden. Die oben genannten Hybride würden dadurch jedoch ebenfalls exponentiell amplifiziert werden. Allerdings sind die Adaptoren so konstruiert worden, dass die einzelsträngigen cDNA Moleküle, die auf beiden Seiten den gleichen Adaptor tragen, nach der ersten Denaturierung „Haarnadelschlaufen“ ausbilden und somit für die folgenden

Schritte in der PCR nicht mehr als Matrize zur Verfügung stehen (Abb. 6.2). Da nur die Adaptoren für die Bildung der „Haarnadelschlaufen“ durch ihre Komplementarität verantwortlich sind, nimmt die Bildung dieser besonderen Struktur mit zunehmender Fragmentlänge ab. Deshalb ist auch bei dem eingangs erwähnten Restriktionsverdau ein häufig schneidendes Enzym ausgewählt wurden, um möglichst kleine Fragmente zu generieren.



**Abb. 6.1 Schematisches Diagramm des Verlaufs der SSH.** Das Hybrid e (blau und orange) kann nur dann gebildet werden, wenn diese cDNA häufiger in der Testerpopulation vorhanden ist als in der Driver cDNA Population. Die schwarzen Kästchen repräsentieren die äußeren Bereiche der Adaptoren und korrespondieren mit dem PCR Primer I in der 1. PCR. Die transparenten Kästchen repräsentieren den inneren Teil des Adaptors 1 und korrespondieren mit dem „Nested“ PCR Primer 1 der 2. PCR. Die roten Kästchen repräsentieren den inneren Teil des Adaptors 2R und korrespondieren mit dem „Nested“ PCR Oligonukleotid 2R der 2. PCR (nach Herstellerprotokoll verändert).

Die beiden PCR Reaktionen wurden unter der Benutzung des „BD Advantage™ 2 PCR Enzyme System“ Kits der Firma BD Biosciences ausgeführt. Dieses Kit enthält eine Enzymmischung, bestehend aus einer modifizierten Taq – Polymerase, einer „proofreading“ Polymerase und einem Antikörper für das aktive Zentrum beider Polymerasen, um einen

automatischen „hot-start“ zu ermöglichen. Die Anzahl der Zyklen für die erste bzw. zweite PCR variierten und mussten bei jeder SSH neu empirisch ermittelt werden. Für die erste Reaktion wurden zwischen 20-25 Zyklen benötigt, wohingegen die Zyklenzahlen der zweiten PCR zwischen 12-17 Zyklen variierte.

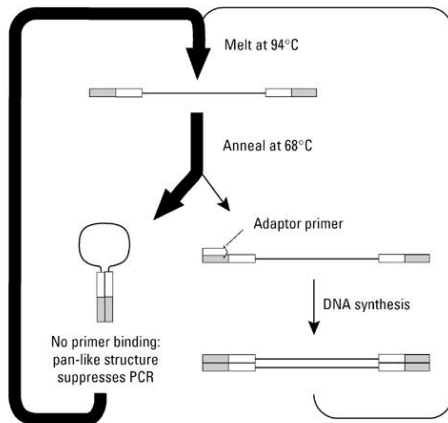


Abb. 6.2 Suppression PCR (nach Siebert et al., 1995).

Die PCR Produkte wurden 1:10 verdünnt und in den pGEM-T Vektor der Firma Promega ligiert und anschließend in *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) transformiert. Um einen Eindruck von der Effizienz der Klonierung zu erhalten, wurde die Anzahl der CFU's (colony forming units) zunächst auf kleinen LB-amp Platten bestimmt. Diese Daten wurden benötigt, um das entsprechende Volumen für eine gleichmäßige Verteilung der Klone auf der Oberfläche der LB-amp Platten bei der Produktion der Macroarray Filter zu bestimmen.

## 6.5 Herstellung der Macroarray Filter

### 6.5.1 Vorbereitung

Der erste Punkt bei der Vorbereitung für die Herstellung der Macroarray Filter war die Fertigung der QTrays LB-amp Agarplatten. Auf diesen wurden die unter Abschnitt 6.4.4 hergestellten und transformierten cDNA Banken aufgebracht. Pro QTray Platte wurden dazu 250 ml LB-amp Agar eingesetzt. Dabei musste sichergestellt sein, dass die Platte auf einer absolut ebenen Unterlage stand, um eine gleichmäßige Befüllung der QTrays Behältnisse zu gewährleisten. Trotz der Antibiotikabehandlung wurde auf eine sterile Arbeitsweise bei der Erstellung der Platten geachtet.

Mit Hilfe der unter Abschnitt 6.4.4 bestimmten Transformationsrate wurde das Volumen bestimmt, um etwa 2000 Klone pro Platte auftragen zu können. Diese Zahl erwies sich als zweckmäßig, da so eine gleichmäßige Verteilung erreicht und eine Überlappung von

Bakterienkolonien vermieden werden konnte. Die Mehrzahl der hier klonierten Fragmente wies eine durchschnittliche Größe von 500 bp auf. Auf eine Blau/Weiß – Selektion konnte verzichtet werden, da diese erst bei Fragmentlängen >1 kb zuverlässig funktioniert.

Zum Abschluss der Vorbereitung wurde die entsprechende Anzahl an „384 well“ Mikrotiterplatten mit Hilfe des QFill2 befüllt: 70 µl „freezing“ Medium pro Vertiefung.

### **6.5.2 Automatisches Aufnehmen der Klone der cDNA Banken mit Hilfe des QPix Robotersystems**

Um die unter Abschnitt 6.5.1 aufgetragenen Kolonien aufnehmen und in einer geordneten Form in die Mikrotiterplatten ablegen zu können, wurde der QPix Roboter der Firma Genetix benutzt. Vor Beginn jedes Arbeitsschrittes mit dem Roboter wurde der Innenraum 20 min. mit UV – Licht bestrahlt und somit sterilisiert. Im Durchschnitt wurden 1200 cDNA Klone mit Hilfe des „96-pin Picking“ Kopfes aufgenommen und in die „384 well“ Mikrotiterplatten übertragen. Nachdem alle 96 Pin's des Kopfes beladen und in die Mikrotiterplatten eingeführt wurden, erfolgte ein Sterilisierungsschritt mit Hilfe eines 70 %igen Ethanolbades. Die inokulierten Mikrotiterplatten wurden in einer feuchten Kammer bei 37°C für max. 20 h inkubiert. Auf dem Boden dieser Platten war dann eine Drübung zu erkennen, die von abgesetzten Bakterien herrührt. Die Platten wurden schnellstmöglich bei –80°C eingelagert.

### **6.5.3 Kopieren der cDNA Banken in den Mikrotiterplatten**

Das Kopieren der eingefrorenen cDNA Banken war aus mehreren Gründen notwendig. An erster Stelle ist natürlich die Sicherung vor dem Verlust der Originalplatten zu nennen. Darüberhinaus wurden für die Herstellung der Macroarray Filter immer nur frisch angewachsene cDNA Banken benutzt, was die Erstellung einer Kopie ebenfalls erforderlich machte.

Diese Kopien wurden unter Benutzung eines, durch die Werkstatt des Biozentrums der CAU Kiel hergestellten und von dem Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie durch Herrn Dr. Plieth in Auftrag gegebenen „384 Pin“ Stempel, hergestellt. Zu Beginn der Duplizierung wurde zunächst die entsprechende Anzahl an Mikrotiterplatten mit 50 µl LB-amp befüllt, da dieses Medium ein schnelleres und besseres Wachstum der Bakterien ermöglicht. Mit Hilfe des Stempels erfolgte die Übertragung der Bakterien von den Originalplatten. Auf striktes steriles Arbeiten wurde geachtet. Die Kopien wurden ebenfalls bei 37°C für 16 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationsphase wurden diese Platten

sofort für die Herstellung der Macroarray Filter eingesetzt. Durch Zugabe von 20 µl einer 80%igen Glycerollösung (v/v) konnten auch diese Platten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden und dienten so gleichzeitig als Sicherungskopie.

#### **6.5.4 Übertragung der cDNA Banken aus den Mikrotiterplatten auf Nylonmembranen zur Herstellung der Macroarray Filter mit dem QPix Roboter**

Für die Herstellung der Macroarray Filter wurden nur frisch angewachsene Bakterien benutzt. Zusätzlich zu den cDNA Banken benötigt man noch zwei weitere Platten. Diese beiden Platten enthielten *Soma ferritin* aus *Hydra* und *CD94* aus *Botryllus*. Diese Gene dienten sowohl als Orientierungspunkte auf den zu hybridisierenden Filtern, als auch als interne bzw. externe Kontrolle bei der radioaktiven Markierung.

Zu Beginn mussten wichtige Justierungen am Roboter vorgenommen werden. So müssen die Koordinaten für die Platten und den Filterblock bei jedem Experiment neu bestimmt werden. Bei der Verwendung der „384 well“ Platten der Firma Genetix musste zusätzlich darauf geachtet werden, dass die Spitzen des verwendeten „384 gravity gridding“ Kopfes leicht den Boden des „wells“ berührten. Die gemachten Einstellungen sind auf der Abbildung 6.3 dargestellt.



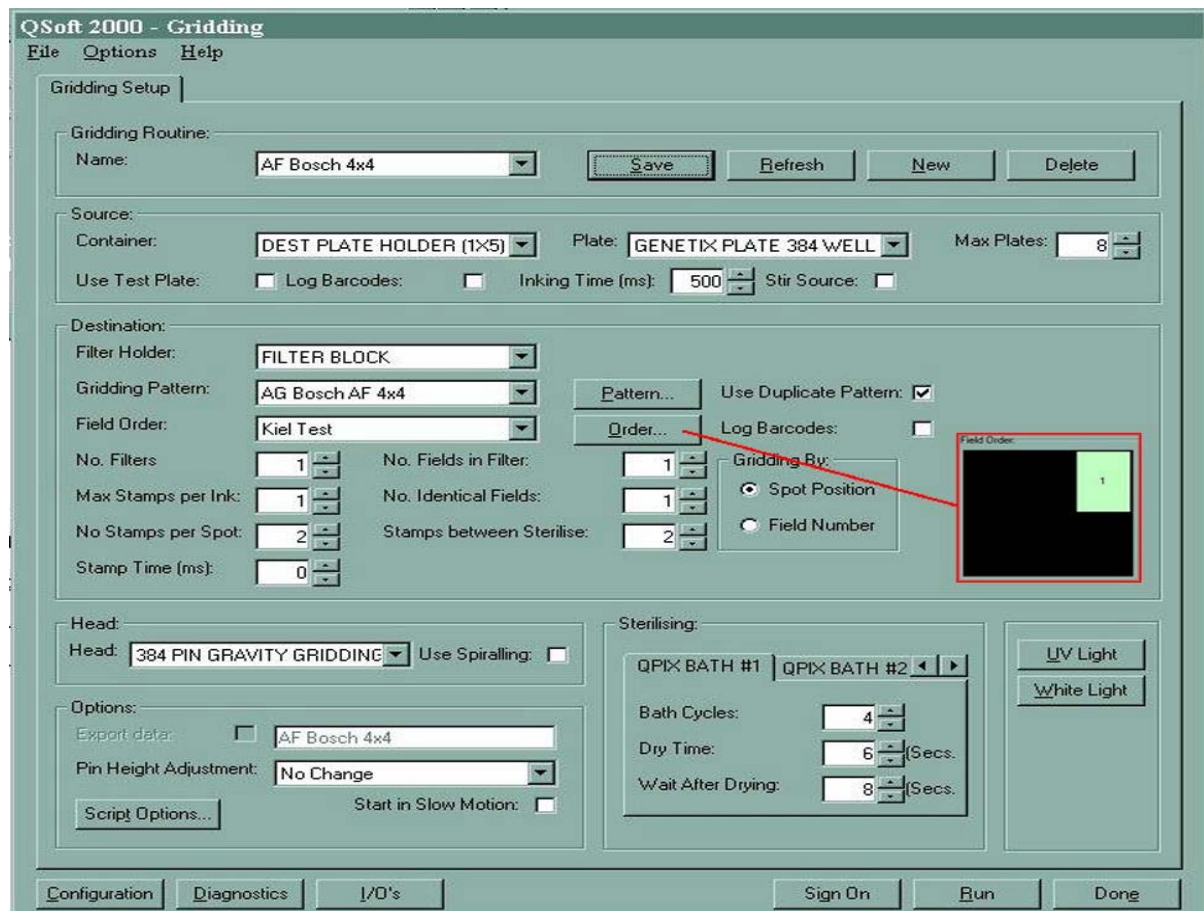


Abb. 6.3 Bildschirmausdruck mit den Voreinstellungen für die Herstellung der Macroarray Filter

Für den geordneten Auftrag der Klone auf die Membranen, musste ein Auftragsmuster definiert werden. Ein 4x4 Auftragsmuster mit zwei Positionen pro Klon hat sich als das am Besten zu benutzende Muster herausgestellt. Die oben erwähnten Klone, *Soma ferritin* und *CD94*, wurden dabei immer zuerst aufgebracht.

Worden diese Einstellungen vorgenommen, dann folgte die Vorbereitung der Nylonmembran. Die 11 cm x 14 cm große Nylonmembran wurde für 1 min. mit 6x SSC befeuchtet. Nach der Lufttrocknung der Membran konnte diese mit Klebestreifen auf dem Filterblock innerhalb des Roboters befestigt werden. Nachdem das entsprechende Programm des Roboters aufgerufen und ausgeführt wurde, konnte die Membran entnommen werden. Diese wurde durch das Abschneiden einer Ecke markiert und so auf eine QTrays LB-amp Agarplatte gelegt, dass die Seite der Membran mit den aufgebrauchten Klonen vom Agar weg zeigte. Vor dem Auflegen der Membran musste sichergestellt sein, dass der Agar kaum noch feucht war. Um dies zu erreichen, wurden die Platten zuvor bei 37°C für mindestens 30 min. inkubiert. Die mit den Membranen bestückten QTrays Platten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 6.5.5 Behandlung der Macroarray Filter in Vorbereitung auf die Hybridisierung

Die unter Abschnitt 6.5.4 aufgebrachten Klone mussten nun in Vorbereitung auf die Hybridisierung lysiert und die DNA auf der Membran immobilisiert werden. Dafür wurden zunächst fünf Behältnisse mit je drei Lagen Whatman Filterpapier (14 cm x 20 cm) bestückt. Diese Filterpapiere wurden jetzt im ersten Behältnis in Denaturierungslösung, im zweiten und dritten in Neutralisierungslösung, im vierten und fünften in 2x SSC – Lösung getaucht. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Filterpapierstapel nur angefeuchtet waren. Zuviel Flüssigkeit würde zu einem Verschwimmen der Klone auf der Membran führen. Die so präparierten Behältnisse waren jetzt bereit, die Membranen aufzunehmen. Dabei wurden die Membranen so auf das Filterpapier gelegt, dass die Bakterienkolonien das Filterpapier nicht berührten. Beginnend mit der Denaturierung im ersten Behältnis für 5 min., wurden die Membranen im Abstand von 5 min. von einem zum anderen Behältnis gebracht. Die Bildung von Luftblasen zwischen der Membran und dem Filterpapier musste unbedingt verhindert werden. Nach der Denaturierung (Behältnis 1) wurde die Membran für 2 min. auf trockenes Whatman Filterpapier gelegt.

Nach der letzten Inkubation wurden die Membranen für 30 min. an der Luft getrocknet, um darauf bei 80°C „gebacken“ zu werden. Durch diesen Schritt konnte eine Immobilisierung der denaturierten DNA auf der Membran erreicht werden. Die so hergestellten Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

### 6.5.6 Aufbau von kleinen PCR – Filtern

Eine andere, sensitivere Methode der Hybridisierung von Macroarrays ist das Aufbringen von PCR – Produkten (siehe Abschnitt 2.2.1). Um die relativ geringen Volumina an PCR-Produkt in einer auswertbaren Form auf die Nylonmembranen zu bringen, wurde eine Maske entworfen (André Franke) und von der Werkstatt des Biozentrums der CAU Kiel angefertigt, die in Abbildung 6.4 dargestellt ist.

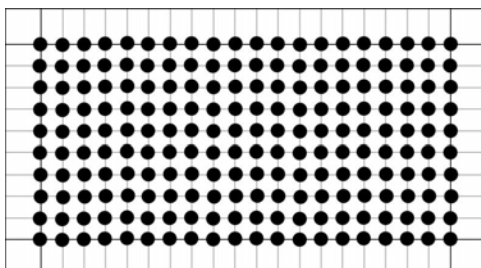


Abb. 6.4 Maske für das Aufbringen der PCR-Produkte auf die Membran

Diese Maske wurde auf der Membran fixiert und erlaubte so das schnelle Auftragen von jeweils 0,25 µl PCR – Produkt pro Loch. Vor dem Auftrag wurden die PCR – Produkte bei 94°C für 5 min. denaturiert. Mit dieser Methode konnten bis zu 100 verschiedene PCR – Produkte aufgebracht werden. Durch Bestrahlung der Membran mit 120 mJ UV Licht bei 254 nm wurden die PCR-Produkte auf der Membran fixiert.

Bei diesen kleinen Filtern wurde das Hybridisierungsprotokoll dahingehend verändert, dass nur 1,25 ml der Hybridisierungslösung zum Einsatz kamen. 6 Mio. CPM/ml radioaktiv markierter Probe wurden pro Filter appliziert.

## **6.6 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von Plasmid – DNA (6.17.1) erfolgte mittels der Methode der Kettenabbruchreaktion nach Sanger et al. 1977. Hierzu wurde das „SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kits-LC (for 25-41-cm gels)“ verwendet. Die Sequenzierungs – PCR wurde genau nach Herstellerangaben mit dem „Cycle Sequencing Protocol“ unter Verwendung von fluoreszierenden IRD-800-5' endmarkierten T7- bzw. SP6-Primern durchgeführt.

Das „Cycle Sequencing Protocol“ kombiniert die konventionelle Didesoxy-Sequenzier-Methode mit thermalen, zyklischen Reaktionsbedingungen. Die Verwendung einer thermostabilen Polymerase erlaubt eine zyklische Hitzedenaturierung, Hybridisierung und Polymerisierung der DNA-Matrize bei erhöhten Temperaturen. Dadurch wird die Stringenz der Oligonukleotid-Hybridisierung erhöht und die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der DNA-Matrize verringert. Pro eingesetztem Plasmid werden vier Reaktionen mit den entsprechenden Didesoxynukleotiden angesetzt.

Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des Gerätes „NEN Global IR<sup>2</sup> DNA Analyzer“ von LI-COR, welches sowohl die elektrophoretische Auftrennung, als auch die Auswertung der Daten übernahm. Das Polyacrylamid-Sequenziergel wurde mit der „SequaGel XR Monomer Solution“ und dem „SequaGel XR Complete Buffer Reagent“ von National Diagnostics sowie frisch angesetzter 10 %iger Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) nach Herstellerangaben angefertigt, in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und beide Pufferkammern des Sequenziergerätes mit 1 x TBE-Puffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte stets ein Vorlauf bei 1500 V für 30 min., um die bei der Herstellung des Gels verwendeten Substanzen APS und das im „SequaGel XR Complete Buffer Reagent“ enthaltene TEMED aus der Gelmatrix zu entfernen und das Gel auf 50°C vorzuwärmen. Erst nach diesem Vorlauf

wurden jeweils 1,2 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Die eigentliche Auftrennung der Proben erfolgte bei 1500 V und 50°C.

Dabei wird der an die Primer gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff mit einer Wellenlänge von 800 nm angeregt, ein Fluoreszenzlicht abzugeben, welches detektiert und auf dem Computerbildschirm sichtbar gemacht wird.

Die Sequenzierung, d. h. die Übersetzung des Bandenmusters in eine Nukleotidsequenz wurde automatisch mit dem Programm LI-COR eSeq durchgeführt.

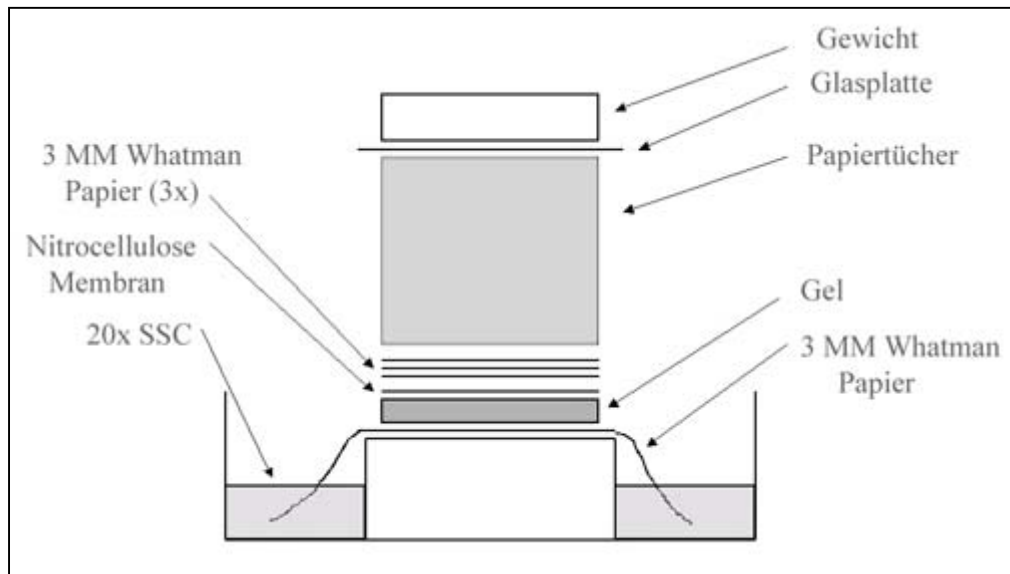
Zur Sequenzierung von Fragmenten aus DD-PCR-Gelen kam eine Ein-Buchstaben-Sequenzierung zum Einsatz. Um herauszufinden, ob sich hinter einer eluierten Bande mehrere unterschiedliche Sequenzen gleicher Länge verbargen, wurde für eine größere Anzahl Plasmide verschiedener positiver Bakterienklone zunächst nur ein Reaktionsansatz mit einem Didesoxynukleotid (ddATP) angesetzt. Durch einen Vergleich der Bandenmuster der Klone, konnte man feststellen, wie viele unterschiedliche Sequenzen sich hinter einer klonierten Bande verbargen.

## **6.7 Northern-Blot Analyse**

Die Northern-Blot Analyse kann dem Nachweis eines bestimmten Transkriptes in der untersuchten RNA sowie der Bestimmung seiner Größe und relativen Häufigkeit dienen. Zunächst wird die RNA (6.18) in einem denaturierenden 1 %igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Zur Vorbereitung des Gels wurden 0,4 g Agarose in 24,85 ml Millipore H<sub>2</sub>O aufgeköcht. Nach Abkühlung der gelösten Agarose auf ca. 50°C wurden 7,1 ml Formaldehyd (37 %) und 7,81 ml 5 x MOPS hinzugegeben. Für die Polymerisierung des Gels wurde ein RNase-freier Gelschlitten verwendet. RNasefreie Bedingungen wurden durch 30 minütige Inkubation der Gelkammer samt Schlitten und Kamm in 0,5 % SDS und anschließendem Ausspülen mit 1 M NaOH und Millipore H<sub>2</sub>O erreicht. Je 4,5 µl der zu analysierenden RNA und der RNA-Größenmarker wurden mit 2,0 µl 5 x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd (37%) und 10 µl Formamid vermischt, für 15 min. bei 65°C denaturiert und 5 min. auf Eis gekühlt. Als Größenmarker wurden 1 kb Marker RNA (aus DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7) von Roche) und Gesamt-RNA aus Hydra, deren 18s und 28s rRNA 1800 bzw. 3500 Nukleotide lang ist, verwendet. Nach Zugabe von 2 µl RNA-Ladepuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese in 1 x MOPS wurde bei 12 V für 16 Stunden oder bei höherer Spannung für entsprechend weniger Zeit durchgeführt. Vor dem „Blotten“ der RNA wurden die Spuren mit den Größenmarkern vom Gel abgeschnitten, in Ethidiumbromidlösung

(0,5 µg/ml in 0,1 M Ammoniumacetat) für 1 bis 2 Stunden gefärbt und mit angelegtem Lineal unter UV-Licht fotografiert.

Die aufgetrennten RNA-Proben wurden über Nacht aus dem Rest des Gels durch Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (Abb. 6.5).



**Abb. 6.5: Northern-Blot Kapillartransfer.**

Diese wurde anschließend für 5 min. in 6 x SSC gewaschen und auf 3MM Whatman Papier an der Luft getrocknet. Durch Bestrahlung der Membran mit 120 mJ UV Licht bei 254 nm wurde die RNA auf der Membran fixiert. Dies geschieht durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen der negativ geladenen Nukleinsäure und den positiv geladenen Aminogruppen auf der Oberfläche der Nylonmembran. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt.

### 6.7.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung von Northern - Blots wurde mit den „Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)“ der Firma Amersham Bioscience durchgeführt. Das für die Synthese der Sonde als Matrize dienende doppelsträngige DNA Fragment (Abschnitt 2.1.1.4 Sonde für *HyDkk-3* zwischen den Primern RA\_Dkk1\_F und RA\_Dkk1\_R2) wird dabei zunächst denaturiert und dann mit Oligodesoxyribonukleotiden zufälliger Sequenz vermischt. Diese Oligomere hybridisieren zufällig mit der DNA-Matrize und dienen als Primer für die DNA-Synthese durch eine Klenow-Polymerase. Diese baut das zum Reaktionsansatz zugesetzte [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP in das neu synthetisierte DNA-Fragment ein. Für die Reaktion wurden 25-50 ng der DNA-Matrize (gelöst in 45 µl TE-Puffer), 5 µl (50 µCi) [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP und ein Kügelchen mit dem

Reaktionsgemisch (Klenow-Polymerase, Oligomere, dNTPs ohne dCTP) eingesetzt. Die Elongation mittels Klenow-Polymerase erfolgte für 15-30 min. bei 37°C. Im Anschluss an die Markierungsreaktion wurde die radioaktive Sonde mittels Sephadex-G50-Säulen von den nicht eingebauten Nukleotiden und dem Enzym abgetrennt.

Für die Herstellung radioaktiv markierter cDNA wurde diese zunächst, wie in Abschnitt 6.19 beschrieben, aus RNA hergestellt. Etwa 100 ng dieser cDNA wurden danach 3 min. denaturiert und mit 4 µl sterilisierter 2,5 M NaOH versehen. Die nachfolgende Inkubation bei 37°C für 15 min. führte zur Degradierung der an der cDNA befindlichen RNA. Mit 10 µl 2 M HEPES freier Säure wurde die Reaktion neutralisiert. Um die Ribonukleotide der RNA und die bei der cDNA Synthese eingesetzten Desoxyribonukleotide abzutrennen, wurde die gesamte Reaktion auf eine Sephadex-G50-Säule geladen und für 2 min. bei 735 g zentrifugiert. Durch das Angleichen des Volumens auf 45 µl konnte gleich mit der oben beschriebenen Markierungsreaktion begonnen werden. Vor dem Start der Markierungsreaktion wurde zu jeder cDNA Mischung 1 ng des *CD94* Fragmentes (150 bp) gegeben, als eine von außen in das System eingetragene Markierungskontrolle (Khalturin et al., 2003).

### **6.7.2 Herstellung der Sephadex-G50-Säulen**

Sephadex ist eine polymere Substanz, die in Form von Säulen zur Abtrennung von bestimmten Stoffen mit definierter Größe, wie z. B. Proteine oder DNA, aus komplexen Gemischen benutzt wird. Die Trennung erfolgt durch Auftragen eines Gemisches auf die Säule und anschließende Zentrifugation. Dabei bleiben Moleküle bis zu einer bestimmten Größe in den Hohlräumen der Sephadex-Polymer-Partikel hängen und wandern nur langsam über die Säule. Moleküle mit größerer räumlicher Ausdehnung finden in diesen Hohlräumen keinen Platz und passieren die Polymermatrix sehr viel schneller. Sephadex G50 eignet sich, um DNA-Fragmente von überschüssigen Oligonukleotiden und nicht eingebauten Nukleotiden zu trennen. Da die Obergrenze des Auflösungsvermögens durch die dreidimensionale Matrixstruktur bestimmt wird, können auch die unerwünschten Enzyme abgetrennt werden.

Zur Herstellung der Säulen wurden 1-ml-Einwegspritzen mit einem kompakten Stopfen steriler Glaswolle versehen, in 10 ml Plastikröhrchen gestellt und mit 900 µl Sephadex-G50-Matrix, gelagert in 1 x TE, befüllt. In zwei Zentrifugationsschritten für 1 Minute bei 1000 rpm und Nachfüllen der Matrix wurden die Röhrchen auf diese Weise bis zur 900 µl Marke mit dem Polymer beschickt.

### 6.7.3 Reinigung radioaktiv markierter Sonden

Nach der radioaktiven Markierung der DNA wurde das Reaktionsgemisch mit TE-Puffer auf ein Volumen von 150  $\mu\text{l}$  gebracht und über die Sephadex-G50-Säule geschickt (Zentrifugation für 2 min. bei 1000 rpm). Das Eluat enthielt die aufgereinigte, radioaktiv markierte DNA-Sonde. Vor und nach der Aufreinigung wurde je 1  $\mu\text{l}$  entnommen, um die Einbaurrate radioaktiver Nukleotide mit dem Szintillationszähler zu bestimmen. Diese sollte bei mindestens 50 % liegen.

### 6.7.4 Membran-Hybridisierung

Für die Hybridisierung von Northern – Blots mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Nylonmembran zunächst für mindestens 2 Stunden bei 42°C prähybridisiert. Hierfür wurden 0,2 ml Hybridisierungslösung pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche und 100  $\mu\text{g}$  frisch denaturierte Heringssperma-DNA (5 min. bei 95°C, dann auf Eiswasser) pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die eigentliche Hybridisierung wurde über Nacht ebenfalls bei 42°C aber mit 0,05 ml Hybridisierungslösung pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche durchgeführt. Die Lösung enthielt wieder 100  $\mu\text{g}$  Heringssperma-DNA pro ml Hybridisierungslösung und zusätzlich die Menge markierter DNA-Sonde entsprechend 1 Mio cpm pro ml Hybridisierungslösung. Beides wurde vorher zusammengegeben und denaturiert. Alle Hybridisierungsschritte fanden in dicht schließenden Glasröhrchen mit Schraubverschluss und unter Rotation in einem Hybridisierungsofen statt. Die Heringssperma-DNA diente dazu, mögliche unspezifische Bindungsstellen für die eingesetzte Sonde zu blockieren.

Anschließend wurde die Membran mit Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) zweimal für je 10 min. bei Raumtemperatur und mit Waschlösung 2 (0,2 x SSC, 0,1 % SDS) zweimal für je 20 min. bei 65°C gewaschen. Daraufhin wurde die Membran feucht in Plastikfolie eingeschweißt. Der Filter wurde entweder auf einem Röntgenfilm oder einem „Phosphorimager-Screen“ exponiert und entwickelt.

Analog zu dieser Beschreibung wurde bei der Hybridisierung der Macroarray Filter (Größe 12 cm x 14 cm) verfahren. Die Menge an eingesetzter Hybridisierungslösung wurde jedoch reduziert. Für die Prähybridisierung kamen 8 ml Hybridisierungslösung zum Einsatz, respektive 4 ml bei der Hybridisierung mit der cDNA Probe. Im Gegensatz zu der Benutzung einer einheitlichen DNA Probe, wurde bei der cDNA als Probe mindestens 8 Millionen CPM pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Dies war erforderlich, da in der cDNA nicht alle Transkripte in der gleichen Anzahl vorliegen. Um auch bei weniger häufigen Transkripten ein

Hybridisierungssignal zu erhalten, wurden mindestens 8 Millionen CPM pro ml Hybridisierungslösung als Menge festgesetzt. Nach dem oben beschriebenen Waschschritten wurden die Macroarray Filter für mindestens 4 h auf die „Phosphoimager – Screens“ gelegt. Um ein möglichst deutliches Bild zu erhalten, wurde die Kammer, in der sich der „Phosphoimager – Screen“ und die Macroarray Filter befanden, mit 5 kg Gewichten beschwert.

### **6.7.5 Entfernung der „alten“ Hybridisierungsprobe von der Membran**

In einigen Fällen musste eine einmal benutzte Membran noch ein weiteres Mal mit einer anderen Probe hybridisiert werden. Dazu musste selbstverständlich die vorherige Probe entfernt werden. Die Membran wurde für 5 min. in einer Lösung aus 0,2 M NaOH und 0,1% SDS gewaschen. Danach wurde diese Membran für 10 min. unter fließendem, deionisiertem Wasser gewaschen. Darauf folgte eine Behandlung mit der Neutralisierungslösung für weitere 20 min. Nach 5 min. in 2 x SSC wurde die Membran für 20 min. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

War diese Prozedur nicht erfolgreich, dann musste die Membran verworfen werden, oder es wurde so lange mit der erneuten Hybridisierung gewartet bis die „alte“ Hybridisierungsprobe abgeklungen war.

## **6.8 *In situ* Hybridisierung**

Mittels *in situ* Hybridisierung ist es möglich, das räumliche Expressionsmuster eines Gens im fixierten Organismus darzustellen, indem das jeweilige Transkript mit einer markierten komplementären RNA-Sonde hybridisiert und diese anschließend mit einem Antikörper detektiert wird.

### **6.8.1 Herstellung der DIG-markierten RNA Sonden**

Als Matrize für die Herstellung DIG-markierten RNA Sonden diente ein PCR Produkt, das mittels Standard PCR amplifiziert und anschließend gereinigt wurde. Da alle hier verwendeten Proben von Genen stammten, die bereits in den pGEM - T Vektor kloniert wurden, konnten mit den vektorspezifischen Primern T7/Sp6 und den genspezifischen Primern zwei Fragmente hergestellt werden. Diese wurden dann in der T7 RNA – Polymerasereaktion bzw. Sp6 RNA – Polymerasereaktion eingesetzt. Für die Synthese wurden die Komponenten des „Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ von Roche benutzt. Dabei wurde genau nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Da die Synthese mit SP6 und T7



RNA Polymerase durchgeführt wurde, erhielt man eine „antisense“-Sonde, komplementär zu dem Transkript, das detektiert werden sollte und eine „sense-Sonde“ mit gleicher Sequenz wie das Transkript. Letztere wurde in der *in situ* Hybridisierung als Negativkontrolle eingesetzt. Gegebenenfalls wurde die Sonde vor Gebrauch gefällt und in Millipore® H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die erfolgreiche Synthese der Sonde wurde durch Auftragen von 1 µl der Reaktionsprodukte auf ein 1,5 %iges RNase-freies Agarosegel überprüft.

**Eingesetzte *in situ* Sonden:**

<i>HyDkk-3</i>	Fragment zwischen RA_Dkk1_F und RA_Dkk1_R2 (498bp)
J12_1.1	Fragment zwischen RA_J12_1.1_F und RA_J12_1.1_R (323bp)
L21_1.1	Fragment zwischen RA_L21_1.1_F und RA_L21_1.1_R (294bp)
B1_H4	der gesamte Klon (560bp)
1_C18_1	Fragment zwischen RA_Cathepsin_F und RA_Cathepsin_R1 (386bp)
7_N12_1	Fragment zwischen RA_Klon7_F und RA_Klon7_F (781bp)
<i>K8_4</i>	Fragment zwischen RA_K8_4_F und RA_K8_4_F (375bp)

**6.8.2 *In situ* Hybridisierung mit ganzen Polypen**

Für die *in situ* Hybridisierung wurde ein leicht abgeändertes Protokoll nach Martinez et al. (1997) verwendet. Die einzelnen Schritte wurden unter RNase-freien Bedingungen und mit RNase-freien Lösungen in COSTAR Zellkultur Platten oder in 1,5 ml Eppendorftubes durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, fanden alle Wasch- und Inkubationsschritte bei ca. 50 bis 100 rpm auf einem Rotationsschüttler statt.

**1. Tag:**

Vor dem Fixieren wurden die Tiere für ca. 4-5 min. in 2 % Urethan relaxiert. Die Fixierung erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd über Nacht für 12 Stunden.

**2. Tag:**

Das Fixativ wurde durch 10 minütige Inkubation in 1 ml 100 % Methanol ersetzt. Daraufhin folgte eine sukzessive Rehydrierung des Gewebes durch folgende Behandlungsschritte: jeweils für 5 min.: 75 % MetOH/25 % PBT, 50 % MetOH/50 % PBT, 25 % MetOH/75 % PBT und dreimaliges Waschen für jeweils 10 min. mit PBT. Anschließend wurden durch einen partiellen Verdau mit Proteinase K das Gewebe für die Penetration von RNA-Proben durchlässig gemacht, sowie mit der RNA assoziierte Proteine in den Zellen entfernt. Dazu

wurden die Polypen 20 min. in 1 ml PBT mit Proteinase K (10 µg/ml) inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml Glycin-Lösung wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Glycin-Lösung wurde einmal ersetzt und für weitere 10 min. inkubiert. Daraufhin wurde das Glycin durch zweimaliges Waschen mit 1 x PBT (je 10 min.) entfernt. Eine anschließende Behandlung mit Essigsäureanhydrid und Triethanolamin bewirkte eine Neutralisierung von  $\text{NH}_3^+$ - und  $\text{COO}^-$ -Gruppen, die durch die Behandlung mit Proteinase K entstanden waren. Dadurch sollten eine unspezifische Bindung der RNA-Sonde und des Antikörpers und somit ein verstärktes Hintergrundsignal vermieden werden. Hierfür wurden die Polypen 2 x 5 min. in 0,1 M Triethanolamin pH 7,8 und einmal in Triethanolamin mit 2,5 µl/ml Essigsäureanhydrid inkubiert. Für weitere 5 min. wurde noch einmal 2,5 µl/ml Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Anschließend wurde 2 x 5 min. in PBT gewaschen. Eine Refixierung erfolgte für 30-60 min in 4 % Paraformaldehyd, gefolgt von 3 Waschschritten für je 5 min. mit PBT. Um endogene Alkalische Phosphatasen zu inhibieren, wurde eine 30 minütige Hitzeinaktivierung bei 80°C in PBT durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung mit der RNA-Sonde wurde zunächst 10 min. mit PBT/Hybridisierungslösung (1:1) und dann 10 min. mit reiner Hybridisierungslösung gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden bei 55-60°C durchgeführt und die Lösungen, diesen Temperaturen entsprechend, vorgewärmt. Vor der Hybridisierung fand ein Prähybridisierungsschritt mit 0,02 % tRNA in Hybridisierungslösung für 2 Stunden statt. Die tRNA blockierte potentielle unspezifische Bindungsstellen der RNA-Sonde. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht in 400-500 µl Hybridisierungslösung mit 0,75 bis 4 µl einer 1:30 Verdünnung der Sonde (Konz. unverdünnt ca. 50 ng/µl).

### **3. Tag:**

Das Entfernen der Sonde erfolgte durch folgende Waschschritte bei 55-60°C für jeweils 5 min.: 100 % Hybridisierungslösung, Hybridisierungslösung/2 x SSC (3:1), Hybridisierungslösung/2 x SSC (1:1), Hybridisierungslösung/2 x SSC (1:3). Daraufhin folgten zwei stringenteren Waschschritte mit 2 x SSC (0,1 % CHAPS) für jeweils 30 min. Anschließend wurde die Antikörperbindung vorbereitet. Zweimaliges Waschen in MAB für 10 min. und einmal in MAB-B für 1 Stunde wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Unspezifisches Binden des Antikörpers wurde durch eine zweistündige Inkubation in Blockierlösung bei 4°C minimiert. Die Blockierlösung wurde durch verdünnte Antikörperlösung (1:2000) ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei handelte es sich um einen Anti-DIG Antikörper, der mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert war.

**4.Tag:**

Zur Entfernung des Antikörpers wurde 8 x für jeweils 30-60 min. in MAB gewaschen. Anschließend wurde die Farbreaktion durchgeführt. Dazu wurde durch dreimalige Inkubation der Polypen für jeweils 5 min. in NTMT-Lösung (pH 9,5) mit 1 µl/ml Levamisol ein geeigneter pH-Wert für die Alkalische-Phosphatase-Reaktion geschaffen. Levamisol inhibiert endogene Alkalische Phosphatasen. Anschließend wurde die NTMT/Levamisol-Lösung gegen 0,5-1 ml BM-Purple ausgetauscht. BM-Purple ist ein Substrat, das nach Umsatz durch Alkalische Phosphatase eine permanente, dunkelviolette Färbung ergibt. Die Farbreaktion lief so lange im Dunkeln bei 37°C ab, bis eine deutliche spezifische Färbung in den mit der „antisense“-Sonde inkubierten Tieren zu sehen war und die mit der „sense“-Sonde inkubierten Tiere noch farblos waren. Bei zu langer Inkubation tauchte unspezifische Färbung auf. Die Farbreaktion wurde durch Entfernen der BM-Purple-Lösung und Zugabe von Millipore H<sub>2</sub>O gestoppt. Vor dem Einbetten der Polypen wurde eine Refixierung in 4 % Paraformaldehyd in PBT durchgeführt. Erfolgte eine Einbettung der Tiere in Mowiol, dann wurde noch einmal in PBS gewaschen. Wurde in Euparal eingebettet, dann musste vorher eine Alkoholreihe zur Dehydratisierung der Tiere vorgenommen werden (70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 99 % Ethanol). Alternativ konnte die Farbreaktion auch mit 20 µl NBT/BCIP pro 1 ml NTMT als Substrat durchgeführt werden.

## **6.9 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)**

Das Prinzip der PCR beruht auf der wiederholten Denaturierung einer DNA-Matrize, spezifischer Bindung zweier in entgegengesetzte Richtung zeigender Oligonukleotide an ihre komplementäre Sequenz und der Elongation dieser sogenannten Primer durch eine thermostabile Polymerase und dNTPs (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987). In einer Kettenreaktion wird das DNA-Fragment zwischen den Primern exponentiell vermehrt. Die Reaktion wird in Thermocyclern durchgeführt.

### 6.9.1 Standard-PCR

	Volumen
PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (10 x)	1 µl
dNTP (1 mM)	1 µl
Primer (vorwärts) (10 µM)	1 µl
Primer (rückwärts) (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Millipore H <sub>2</sub> O	*
DNA Matrize	*
Gesamt	10 µl

**Tab. 6.3: Pipettierschema für eine Standard-PCR.**

\* die Menge des eingesetzten Millipore H<sub>2</sub>O richtet sich nach der Menge der verwendeten DNA Matrize.

Für die Standard-PCR wurde der in Tab 6.3 dargestellte Ansatz verwendet. Für die Amplifikation galten folgende Reaktionsbedingungen: Initiale Denaturierung der Matrizen-DNA für 3 min. bei 95°C, 1 Zyklus. Denaturierung für 40 sek bei 95°C, Primer-Hybridisierung für 40 sek 1°C unter der theoretischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer, Primerelongation bei 72°C, je nach Häufigkeit der Matrize bis zu 40 Zyklen. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Länge des amplifizierten Fragmentes und wurde nach der Faustregel „1 min, für 1 kb“ gewählt. Abschließend wurden die Proben für 5 min. bei 72°C inkubiert, um die Synthese aller DNA-Stränge fertig zu stellen.

### 6.9.2 „Nested“- PCR

Bei der verschachtelten („nested“) PCR werden zwei aufeinanderfolgende Amplifikationen durchgeführt. In der ersten PCR werden zwei jeweils weiter 5' gelegene Primer verwendet. Dieses erste größere Produkt wird dann in einer zweiten PCR als Matrize eingesetzt, in der ein internes Primerpaar zur Anwendung kommt. Dadurch wird das Auftreten unspezifischer Nebenprodukte minimiert.

### 6.9.3 „Hotstart“- PCR

Bei der „Hotstart“-PCR wird eine modifizierte Taq Polymerase (Platinum Taq Polymerase) verwendet, die erst nach dem initialen Denaturierungsschritt aktiv wird. Dies wird durch die Bindung eines Antikörpers an die DNA-erkennende Domäne des Enzyms erreicht, der sich erst nach Erhitzen auf 95°C von der Polymerase löst. Herkömmliche thermostabile DNA-Polymerasen sind auch bei nicht optimalen Bedingungen aktiv, so dass es schon vor dem

eigentlichen Start der PCR durch unspezifische Bindung der Primer zur Amplifikation unspezifischer Fragmente kommen kann.

#### **6.9.4 „Touch-Down“- PCR**

Auch die „Touch-Down“-PCR dient der Vermeidung unspezifischer Primerbindung und damit der Amplifikation unerwünschter Fragmente. Bei dieser Methode wird die Hybridisierungstemperatur der Primer in den ersten Zyklen der Reaktion jeweils um 1°C pro Zyklus gesenkt bis die optimale Hybridisierungstemperatur erreicht ist. Dieser Vorgang wird bis zu 3 mal hintereinander wiederholt. Auf diese Weise hybridisieren die Primer nur zu 100 % komplementären Bindungsstellen der denaturierten Matrize. Die erste Hybridisierungstemperatur lag 7°C über der optimalen Temperatur der Primer. Dementsprechend fanden erst nach 3 x 7 Zyklen 20 weitere Zyklen bei optimaler Hybridisierungstemperatur statt.

#### **6.10 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) PCR**

Das 3' RACE ist eine Variante der RT-PCR und dient dazu, unbekannte 3' Enden einer cDNA zu isolieren. Die reverse Transkription geschieht dabei mit einem speziellen oligo-dT-Primer, an dessen 5' Ende sich eine Adaptersequenz befindet. Mit einem Adapterprimer gegen diese Sequenz und einem spezifischen Primer gegen die bekannte Sequenz des Gens muss dann nur noch eine PCR-Reaktion durchgeführt werden. Als Ergebnis sollte ein Fragment amplifiziert werden, das von der genspezifischen Sequenz bis zu dessen 3' Ende, also dem Ende des poly-A-Schwanzes bzw. der Adaptersequenz, reicht. Um bei diesem Schritt hohe Spezifität zu gewährleisten, wird diese PCR-Reaktion unter „Hotstart“-Bedingungen, also mit Platinum Taq Polymerase, durchgeführt. Trotzdem erhält man nach dem Auftragen des Reaktionsproduktes meistens mehrere Banden. Deshalb ist es sinnvoll, Kontrollreaktionen mit alternativen Primerkombinationen durchzuführen. Dies erleichtert die Interpretation des Bandenmusters und das Auffinden der gesuchten Fragmente.

## 6.11 5' RACE PCR mit Splinkerettenmethode

Mit der Splinkerettenmethode ist es möglich, die unbekanntes 3' und 5' Enden von Fragmenten bekannter genomischer DNA- oder cDNA-Sequenz zu ermitteln. Im Falle der unbekanntes cDNA-Sequenz ist diese Methode insbesondere für die Amplifikation von 5' Enden von Interesse, da die 3' Enden einfacher mit einem 3' RACE zu erhalten sind (6.10).

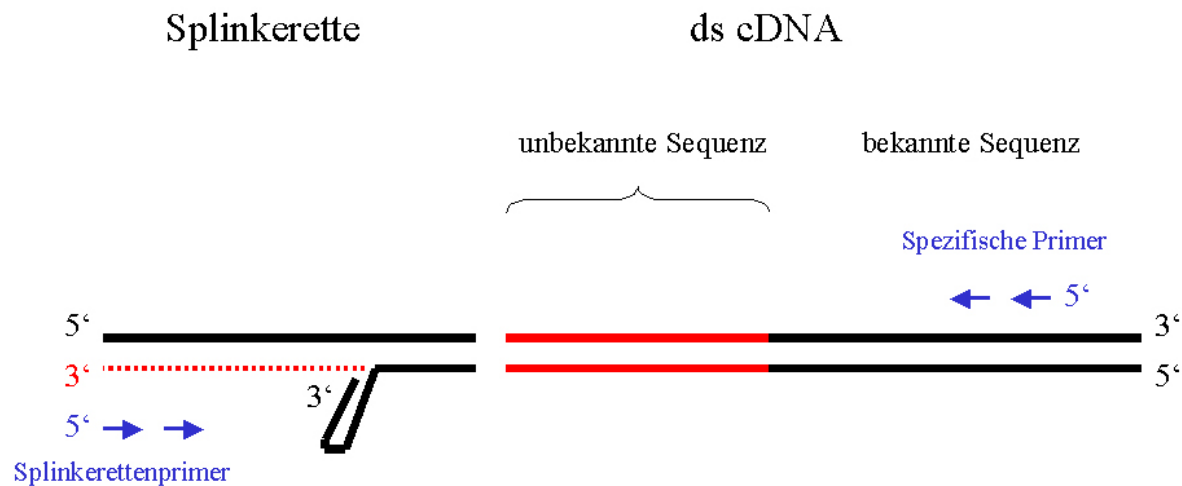


Abb. 6.6 Prinzip der Splinkeretten-PCR

Das Prinzip der hier angewendeten Splinkeretten-Methode basiert auf der Ligation spezieller Adaptermoleküle, sogenannter Splinkeretten, an doppelsträngige cDNA und einer „Nested“-PCR. Die Splinkeretten bestehen aus einem oberen und einem unteren Strang, die aber nur an dem 3' Ende des oberen Stranges komplementär sind (Abb. 6.6). Das nicht komplementäre 3' Ende des unteren Stranges weist eine Haarnadelstruktur auf. Mit einem für das bekannte cDNA-Fragment spezifischen Primer kann nun im ersten Zyklus ein Strang synthetisiert werden, der von der bekannten Sequenz über die unbekanntes Sequenz der cDNA bis zum Ende des oberen Stranges der Splinkerette reicht und zu diesem komplementär ist (Abb. 6.6, rote gestrichelte Linie). Ein splinkerettenspezifischer Primer, der mit dem oberen Strang der Splinkerette identisch ist, kann nun mit dem neu synthetisierten Strang hybridisieren. So wird nachfolgend ein Fragment amplifiziert, das das gesuchte 5' Ende enthält.

### 6.11.1 Synthese doppelsträngiger cDNA

Für die Herstellung doppelsträngiger cDNA musste zunächst einzelsträngige cDNA hergestellt werden (6.19). Die Synthese der doppelsträngigen cDNA erfolgte dann nach dem Protokoll des Kits „Superscript<sup>TM</sup> Plasmid System for cDNA Synthesis and Cloning Reagent

Assembly“ von GIBCO BRL. Demnach wurden auf Eis folgende Komponenten zusammengegeben, gut gemischt und für 2 Stunden bei 16°C inkubiert (Tab. 6.4):

	Volumen
einzelsträngige cDNA	15 µl
Millipore H <sub>2</sub> O	96 µl
Second Strand Reaction Buffer (5 x)	30 µl
dNTP mix (10 mM)	3 µl
<i>E. coli</i> DNA Ligase (10 U/µl)	1 µl
<i>E. coli</i> DNA Polymerase 1 (1 U/µl)	4 µl
<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)	1 µl
Endvolumen	150 µl

**Tab. 6.4: Pipettierschema für die Synthese doppelsträngiger cDNA**

Die RNase H zerlegt dabei die im Reaktionsgemisch vorhandene RNA aus der Erststrangsynthese in kleine Fragmente, die wiederum an der cDNA binden und der DNA Polymerase 1 als Primer für die Zweitstrangsynthese dienen. Die DNA Polymerase 1 besitzt eine 3' Exonukleaseaktivität, so dass nur am 5' Ende Überhänge entstehen. Die DNA Ligase verbindet die neu synthetisierten DNA-Fragmente.

Durch anschließende Zugabe von 2 µl (10 Units) der T4 DNA Polymerase, die eine 5' Exonukleaseaktivität besitzt, und Inkubation für 5 weitere Minuten bei 16°C werden die 5' Überhänge entfernt. Die Reaktion wird mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Die Trennung der doppelsträngigen cDNA von den Proteinen im Reaktionsansatz erfolgte mit 160 µl eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1). Das Gemisch wurde gevortext und durch Zentrifugation für 5 min. bei 14000 rpm in die einzelnen Phasen aufgetrennt. Die oberste wässrige Phase enthielt die DNA. Um die DNA zu fällen, wurden 140 µl der wässrigen Phase abgenommen und mit 70 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc und 0,5 ml eiskaltem 100 % Ethanol, gemischt. Nach Zentrifugation für 20 min. bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann für 10 min. bei 37°C getrocknet und in 6 µl Millipore H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 6.11.2 Synthese der Splinkeretten

Bei der Firma MWG wurde die Synthese zweier DNA-Oligomere mit komplementären Überhängen in Auftrag gegeben. Die beiden DNA-Oligomere wurden zusammenpipettiert, bei 95°C denaturiert und durch langsames Abkühlen im Wasserbad hybridisiert. Die

Splinkerette wurde so konstruiert, dass sie später für eine „Blunt-End“-Ligation, d. h. ohne überstehende Nukleotide, geeignet ist. Die Adenosin- und Thymidin-Nukleotide am Ende des unteren Stranges bilden eine Haarnadelstruktur aus. Die fertigen Splinkeretten wurden in einer Konzentration von 40 pmol/µl bei –20°C aufbewahrt.

5' CGAATCGTAACCGTTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGTCTCTCC**AACGAGCCAAGG**  
 3' **AAAAACGTTTTTTT****TTGCTCGGTTCC**

Die Sequenzen des äußeren (st\_SplOutPri\_3) und inneren (st\_SplInnPri\_3) Splinkerettenprimers sind unterstrichen .

### 6.11.3 Splinkerettenligation

	Volumen
doppelsträngige cDNA	1 µl
Splinkeretten („blunt end“) (40 pmol)	1,5 µl
Ligase Puffer (mit PEG) (2 x)	2,5 µl
T4 DNA Ligase (10 U/µl)	5 µl
Millipore H <sub>2</sub> O	17,5 µl
Endvolumen	50 µl

**Tab. 6.5: Pipettierschema für die Splinkerettenligation**

Die Splinkeretten wurden mit T4 Ligase (Promega Kit) in 50 µl Ansätzen für 24 Stunden bei 16°C an die doppelsträngige cDNA ligiert (Tab. 6.5). Nach der Ligation wurde die T4 DNA Ligase durch 20 minütige Hitzebehandlung bei 70°C inaktiviert.

### 6.11.4 Splinkeretten-PCR

Zur Erhöhung der Produktspezifität wurden die verschiedenen Techniken der „Nested“-PCR (6.9.2), „Hotstart“-PCR (6.9.3) und „Touchdown“-PCR (6.9.4) in einer Reaktion kombiniert. So wurde eine erste PCR mit einem äußeren Primerpaar (Abb. 6.6) wie folgt durchgeführt (Tab. 6.6):



	Volumen
Puffer Plat.-Taq (10x)	2 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6 µl
Millipore H <sub>2</sub> O	15 µl
Platinum Taq (5 U/µl)	0,2 µl
Splinkerettenprimer außen (50 µM)	0,4 µl
Spezifischer Primer außen (50 µM)	0,4 µl
Matrize (Ligationsansatz *)	1 µl
Endvolumen	20 µl

**Tab. 6.6: Pipettierschema für Splinkeretten-PCR**

\* jeweils für 1:25, 1:50, 1:75 und 1:100 Verdünnung des Ligationsansatzes

Die Produkte dieser ersten PCR wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10; 1:50) als Matrize für eine zweite PCR nach der „Hotstart“-Methode eingesetzt. Für diese zweite PCR fand ein inneres Primerpaar aus einem inneren spezifischen und einem inneren Splinkerettenprimer Verwendung (Abb. 6.6). Je nach Lage dieser Primer sollte das Produkt der ersten Reaktion um eine bestimmte Anzahl Basen länger sein als das Produkt der zweiten. Verdächtige Banden konnten aus dem Gel extrahiert (6.14), in einen Vektor ligiert (6.15) und schließlich sequenziert (6.6) werden. War die Konzentration des Produktes nach der Elution aus dem Gel zu gering für eine Ligation, dann wurde mit einer 1:10 oder 1:100 Verdünnung des Produktes eine Reamplifikations-PCR mit den beiden inneren Primern durchgeführt. Von diesem PCR-Produkt wurden 3 µl direkt für die Ligation eingesetzt.

## 6.12 RT-PCR, Quantitative PCR

Die Methode der RT-PCR bietet die Möglichkeit, exprimierte Gene zu amplifizieren. Hierzu wird mRNA isoliert und durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (6.19). Diese cDNA dient dann als Matrize für die folgende PCR.

Die RT-PCR wurde zur quantitativen Expressionsanalyse verschiedener Proben herangezogen. Zu diesem Zweck wurden zunächst gleiche Mengen mRNA in cDNA umgesetzt. Um sicher zu gehen, dass bei der vergleichenden Analyse gleiche Mengen cDNA eingesetzt wurden, musste zur Equilibrierung zunächst eine PCR mit einem Haushaltsgen (Aktin) erfolgen, das in beiden Proben in gleicher Stärke exprimiert sein sollte. Die eingesetzte Menge der Matrizen-DNA wurde gegebenenfalls so lange variiert, bis die Bandenstärke des Aktins nach der Gelelektrophorese (6.13) in den zu vergleichenden Proben gleich war. Mit den so ermittelten Mengen einzusetzender cDNA wurde die PCR mit dem zu

untersuchenden Gen durchgeführt. Unterschiede in der Bandenstärke bei beiden Proben wiesen auf Unterschiede in der Expression des Transkriptes hin. Dies galt jedoch nur, solange die PCR in ihrer exponentiellen Phase war. Um diesen Bereich abzudecken wurden Parallelreaktionen mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. Alle RT-PCR Reaktionen wurden unter Standard-PCR Bedingungen ausgeführt.

### **6.13 Agarosegel-Elektrophorese**

PCR-Produkte und *in vitro* transkribierte RNA wurden in Agarosegelen mit Konzentrationen zwischen 0,7 % und 2 % aufgetrennt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE Puffer aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 1 µl Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt und zur Polymerisation unter den Abzug gestellt. Als Elektrophorese-Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Nach Zusatz von DNA- bzw. RNA-Ladepuffer zur Probe wurden die einzelnen Fragmente bei 50-100 V elektrophoretisch im Gel aufgetrennt. Die DNA- bzw. RNA-Banden konnten aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht identifiziert und fotografiert werden. Die Größe der Fragmente wurde anhand eines mitaufgetrennten DNA- bzw. RNA-Längenstandards identifiziert. Im Falle der Auftrennung von RNA fand die Elektrophorese unter RNase-freien Bedingungen statt.

### **6.14 Aufreinigung von DNA Fragmenten**

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus PCR-Reaktionsgemischen erfolgte entweder direkt nach der PCR oder nach vorheriger Aufreinigung im Agarosegel. Die Isolierung von Banden aus dem Gel erfolgte unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell. Zur Aufreinigung der DNA wurden das „QIAquick PCR Purification Kit“ und das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Beide Kits beruhen auf der selektiven Bindung von DNA an eine Silikagel-Membran unter Hochsalzbedingungen. Kontaminanten fließen unter diesen Bedingungen durch die Membran hindurch, verbleibende Verunreinigungen werden durch einen Waschschrift entfernt. DNA von ca. 100 bp bis 10 kb wird auf diese Weise von Primern, Nukleotiden, Polymerase und Salzen gereinigt. Die Elution der DNA geschieht unter Verwendung eines Nidrigsalzpuffers. Bei der Handhabung wurde genau nach Herstellerangaben vorgegangen.

## 6.15 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurde mit dem „pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System“ der Firma Promega durchgeführt. Bei dem im Kit enthaltenen Vektor handelt es sich um einen mit EcoR5 geschnittenen Vektor an dessen beiden 3' Enden Thymidinüberhänge angefügt sind. Dadurch wird die Effektivität der Ligation von PCR-Produkten erhöht, die mit thermostabiler Taq DNA Polymerase amplifiziert wurden, die einzelne Desoxyadenosinnukleotide an die 3' Enden der von ihr synthetisierten Fragmente addiert. Die Insertionsstelle wird von einer SP6 und einer T7 Promotersequenz flankiert. Die Ligation des DNA-Fragmentes in den Vektor geschieht durch eine T4 DNA Ligase.

Das molare Verhältnis von eingesetztem Insert zum Vektor betrug ca. 8:1, wobei 50 ng des Vektors verwendet wurden. Die Ligationsreaktion fand über Nacht bei 16°C im Wasserbad statt. Anschließend wurde die T4 DNA Ligase durch Inkubation für 10 min. bei 70°C inhibiert.

### 6.15.1 Ligation von Adenosinnukleotid-Überhängen

In dem Fall, dass das zur Ligation eingesetzte DNA-Fragment zuvor aus einem Gel extrahiert wurde (6.14), musste es vor der Ligation mit Adenosinnukleotidüberhängen versehen werden, da diese während des Aufreinigungsprozesses aus dem Gel verloren gehen. Hierzu wurden 1-7 µl gereinigtes PCR-Fragment mit 1 µl 10 x Buffer für Taq DNA Polymerase (mit MgCl<sub>2</sub>), 5 Units Taq Polymerase, dATP für eine Endkonzentration von 0,2 mM und gegebenenfalls Millipore H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht und 15-30 min. bei 70°C inkubiert.

## 6.16 Transformation von Bakterien

### 6.16.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Transformation mussten zunächst elektrokompente Bakterienzellen der *E. coli* Stämme XL-1 Blue und DH5α hergestellt werden. Hierzu wurde eine Kolonie des Bakterienstammes in 3 ml SOB-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden in 50 ml SOB-Medium aufgenommen und für weitere 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Hatte die Kultur ihre logarithmische Phase erreicht (OD<sub>550</sub> = 0,4-0,6), wurden die Bakterien bei 3000 rpm und 4°C für 10 min. herunter zentrifugiert und das Pellet 3 x mit 50 ml 4°C kaltem Millipore H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde

das Pellet in 200  $\mu$ l 10 %igem Glycerol aufgenommen und auf 40  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt. Diese wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 6.16.2 Transformation

Für die Transformation wurden 40  $\mu$ l der elektrokompetenten *E. coli* XL-1 Blue oder DH5 $\alpha$  Zellen langsam auf Eis stehend aufgetaut. Die Geräte „Gene Pulser II“ und „Pulse Controller II“ der Firma Biorad kamen bei der Elektroporation zum Einsatz. An diesen mussten folgende Einstellungen vorgenommen werden:

Spannung:	1,7 kV
Kapazität:	25 $\mu$ F
Parallelwiderstand:	200 $\Omega$

Auf die vollständig aufgetauten *E. coli* Zellen wurde 1  $\mu$ l des Ligationsansatzes gegeben und gut gemischt. Diese 41  $\mu$ l wurden zügig in eine mit UV-Licht und 70 % Ethanol behandelte, vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm)(Fisher Scientific) überführt und elektroporiert. Anschließend wurden 960  $\mu$ l SOC-Medium auf diese Zellen gegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen mit dem Medium gut vermischt und in ein Glasröhrchen übertragen. Diese elektroporierten Zellen wurden für 30-60 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 100-300  $\mu$ l dieser Zellen wurden dann auf vorgewärmte LB<sub>amp</sub>-Platten verteilt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zur Erkennung der transformierten Bakterien wurden auf den Platten vorher 40  $\mu$ l X-Gal (20 mg/ml) und 4  $\mu$ l IPTG (2,5 M) ausplattiert. Die Induktion von LacZ ( $\beta$ -Galaktosidase) durch IPTG ruft eine blaue Farbreaktion hervor, sobald das für die Bakterien unphysiologische Substrat X-Gal hydrolysiert wird. Wird der codierende Bereich der  $\beta$ -Galaktosidase im transformierten Plasmid durch Insertion der Fremd-DNA unterbrochen, kann keine Farbreaktion mehr erfolgen.

Somit erschienen Bakterien, die ein Plasmid mit Insert trugen weiß, Bakterien mit einem Plasmid ohne Insert dagegen blau. Da das LB-Medium mit Ampicillin versetzt war und den Bakterien erst mit dem Plasmid eine Ampicillinresistenz verliehen wurde, konnten nur solche Bakterien wachsen, die erfolgreich transformiert wurden.

### 6.16.3 Kolonie-PCR

Um herauszufinden, ob die positiven Kolonien auch das gewünschte Insert enthielten, wurde zur Bestimmung der Insertgröße eine sogenannte Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine nach Standardbedingungen ausgeführte PCR mit den insertflankierenden Primern SP6 und T7 die mit den SP6 und T7 Promotersequenzen des Plasmids hybridisieren.

Als Matrize dient dabei das Plasmid einer positiven Kolonie, indem der PCR-Ansatz mit den positiven Bakterien beimpft wird, die mit einer Pipettenspitze direkt von der LB<sub>amp</sub>-Platte gepickt wurden.

#### **6.16.4 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen**

Zur Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 500 µl sterilem 50 % Glycerin vermischt, gevortext und bei -80°C tiefgefroren.

### **6.17 DNA-Isolierung**

#### **6.17.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Das Prinzip der Präparation von Plasmid-DNA ist eine Lyse der plasmidhaltigen Bakterienzellen unter NaOH/SDS-Bedingungen, unter denen die lineare chromosomale DNA irreversibel denaturiert und zusammen mit Proteinen präzipitiert wird. Plasmid-DNA kann unter neutralen pH-Bedingungen wieder vollständig renaturieren.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das „High Pure Plasmid Isolation Kit“ von Roche benutzt. Dazu wurden 3 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum, i. d. R. 100 µl/ml Ampicillin, versetzt, mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach der alkalischen Lyse der Zellen und dem enzymatischen Abbau der RNA erfolgte eine Adsorption der Plasmid-DNA an einer speziellen Glasfaser-Säule unter Hochsalzbedingungen. Nach mehreren Waschschritten wurde die Plasmid-DNA mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Ausbeute betrug 5-15 µg Plasmid-DNA pro 3 ml Bakterienkultur.

#### **6.17.2 Isolierung genomischer DNA**

Für die Isolierung genomischer DNA wurden ca. 100 für mindestens 24 Stunden nicht gefütterte Polypen in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und das Hydramedium vollständig abgesaugt. Unter Zugabe von 0,5 ml Lysis-Puffer wurden die Polypen mit Hilfe eines Pistills homogenisiert und das Gewebe durch Inkubation für 2 Stunden bei 60°C vollständig lysiert. Um die im Lysis-Puffer enthaltene Proteinase K zu inaktivieren, wurden 2 µl DEPC hinzupipettiert, gut vermischt und weitere 30 min. bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde eine Salzfällung der Proteine und Lipide vorgenommen. Hierzu wurde das Tube auf Eis gestellt, 50 µl 5 M K-Acetat hinzugegeben, gevortext und für 30 min. auf Eis stehen gelassen. Nach 5 min. Zentrifugation bei 14000 rpm in der Kühlzentrifuge wurde der Überstand

abgenommen und dieser erneut für 15 min. zentrifugiert. Dieser Überstand wurde in ein neues Eppendorftube überführt und die DNA durch Zugabe von 0,75 ml 95 % Ethanol bei Raumtemperatur für 5 min. unter leichtem Schütteln gefällt. Das DNA-Pellet wurde durch 20 min Zentrifugation bei 14000 rpm erhalten und anschließend 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Pellet in 100 µl TE resuspendiert. Um mitgefällte RNA zu entfernen enthielt der TE-Puffer 10 µl/ml RNase A.

## **6.18 RNA-Isolierung**

### **6.18.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Protokoll der optimierten Guanidinisocyanat/Phenol Methode der pegLAB Biotechnologie GmbH.

Die Tiere, aus denen RNA aufgereinigt werden sollte, wurden in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt. Das überstehende Medium wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette entfernt. Anschließend wurden 300 µl der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Lösung (peqGOLD RNAPure™) zu den Hydren gegeben. Mit Hilfe eines Teflonhomogenisators wurde das Gewebe so lange homogenisiert, bis eine rosafarbene Lösung entstand. Nach Zugabe von weiteren 700 µl der Guanidinisothiocyanat/Phenol-Lösung und gründlichem Vermischen, wurden die Proben für 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Die Zugabe von 0,2 ml Chloroform, anschließendes kräftiges Schütteln für 15 sek, eine 3-5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 5 min. bei 12000 rpm führten zu einer Trennung der Lösung in drei Phasen. Die obere farblose, wässrige Phase enthielt die RNA und nahm ca. 60 % des Probenvolumens ein. In der unteren organischen, gelben Phenol-Chloroform-Phase befanden sich die hydrophoben Bestandteile der Zelle, wie Lipide und Membranproteine. Die Interphase bestand im wesentlichen aus genomischer DNA und denaturierten Proteinen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Tube überführt. Durch die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol wurde die RNA für 15 min. bei Raumtemperatur gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge lag die RNA als Pellet am Boden des Tubes vor. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten ebenfalls bei 4°C auf Eis. Nach Abnahme des Isopropanolüberstandes wurde die RNA jeweils zweimal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, d. h. zuerst gevortext und dann bei 12000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bis sich das Erscheinungsbild des Pellets von einer kristallinen,

weißen zu einer gelartigen, durchsichtigen Masse verändert hatte. Das Pellet wurde dann in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **6.18.2 Isolierung von mRNA**

Die Gewinnung von mRNA aus Hydragewebe gelang mit Hilfe des „QuickPrep *micro* mRNA Purification Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech. Hierzu wurden die Hydren in ein 1,5 ml Tube übertragen und das überstehende Medium möglichst vollständig abgenommen. Die Zerstörung des Gewebes und die Extraktion der RNA aus den Zellen wurde durch die Denaturierung der Proteine mit Guanidiniumthiocyanat und N-lauroylsarcosin unter gleichzeitiger Benutzung eines Pistills erreicht. Daraufhin wurde die polyadenylierte RNA an oligo-dT-Cellulose gebunden. Verunreinigungen wurden durch je 5 Waschschrte mit einem Hochsalz- und einem Niedrigsalzpuffer entfernt. Anschließend wurde die polyadenylierte RNA eluiert.

Die Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit den „Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>“ der Firma Dynal Biotech ASA. Das Prinzip der mRNA-Isolierung mit „Dynabeads“ beruht auf winzigen Partikeln mit einem superparamagnetischen Kern, die auf ihrer Oberfläche einen oligo dT-Schwanz gebunden haben. Unter superparamagnetisch versteht man die Fähigkeit, in einem starken Magnetfeld magnetische Eigenschaften zu erwerben, die nach Entfernen des Magnetfeldes wieder verschwinden. Nach der Bindung der mRNA-Moleküle am oligo-dT-Schwanz der „Dynabeads“ folgen wiederum mehrere Waschschrte und schließlich die Elution der mRNA. Dabei werden die magnetischen „Dynabeads“ mit der gebundenen mRNA während der Waschschrte jeweils mit einem Magneten aus dem Waschpuffer entfernt.

Nach der Elution wurde die Konzentration der mRNA gemessen und diese anschließend gefällt, um sie dann im gewünschten Volumen RNase-freien Wassers wieder aufzunehmen. Bei beiden angewendeten Methoden wurde genau nach Herstellerangaben vorgegangen.

### **6.19 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription ist der erste Schritt bei der Durchführung einer RT-PCR oder quantitativen PCR (6.12). In ihr wird mRNA (6.18.2) durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für eine PCR dient. Die Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges durch die Reverse Transkriptase geschieht durch Elongation eines oligo-dT-Primers, der mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisiert. Die Zugabe

des Reduktionsmittels DTT dient der Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit der Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „First-Strand cDNA Synthesis Kit“ von Amersham Bioscience genau nach Herstellerangaben. Für die Synthese wurden 50 bis 200 ng mRNA eingesetzt.

## **6.20 DNA- /RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA erfolgte in der Regel photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem Eppendorf BioPhotometer V 1.26.

## **6.21 Regeneration**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Kopfgenerationsexperimente wurden ausschließlich knospenlose Polypen verwendet. Das Entfernen der Kopfstruktur erfolgt mit einem Skalpell direkt unterhalb der Tentakel von vollständig entspannten Polypen.

## **6.22 In silico Analyse von DNA- und Proteinsequenzen**

### **6.22.1 Homologie-Analyse**

Die erste Charakterisierung unbekannter DNA-Sequenzen und die allgemeine Suche nach homologen Genen wurde mit den verschiedenen BLAST-Funktionen (Basic Local Alignment Search Tool) der Internetseite des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Hierbei werden 3 BLAST-Funktionen wie folgt unterschieden.

#### **„Nucleotide BLAST“:**

Dieser BLAST erlaubt Nukleotidsequenzen einzugeben und diese mit anderen Nukleotidsequenzen zu vergleichen (**blastn**).

#### **„Protein BLAST“:**

Der Protein BLAST bietet die Möglichkeit Proteinsequenzen einzugeben und diese mit anderen Proteinsequenzen zu vergleichen (**blastp**).



**„Translated BLAST“:**

Diese Form der Suche ermöglicht entweder eine Übersetzung der Sequenz, mit der gesucht wird oder der Datenbank in der gesucht wird von der Nukleotidsequenz in die Proteinsequenz. Dabei gibt es wiederum 3 verschiedene Möglichkeiten:

Das Programm **blastx** übersetzt die für die Suche eingesetzte Nukleotidsequenz in alle je nach Leseraster 6 möglichen Proteinsequenzen und sucht damit in der NCBI-Proteindatenbank.

Das Programm **tblastn** nimmt eine Proteinsequenz und vergleicht diese mit einer NCBI-Nukleotiddatenbank deren Sequenzen jeweils in alle 6 möglichen Proteinsequenzen übersetzt wurden.

Das Programm **tblastx** übersetzt die für die Suche eingesetzte Nukleotidsequenz in alle je nach Leseraster 6 möglichen Proteinsequenzen und vergleicht diese mit einer NCBI-Nukleotiddatenbank deren Sequenzen jeweils in alle 6 möglichen Proteinsequenzen übersetzt wurden.

Je nach erwarteter Homologie und gewünschtem Umfang der Suche wurden unterschiedliche Programme für die jeweils durchgeführte Sequenzanalyse ausgewählt. Für die erste Analyse einer unbekanntes Nukleotidsequenz ist zum Beispiel die Anwendung des Programms blastx sinnvoll.

Für die Suche nach homologen Genen in speziellen Organismen wurden diverse weitere öffentlich zugängliche EST- und Genomdatenbanken verschiedenster Projekte benutzt. Mit Hilfe dieser Datenbanken ist es je nach vorhandener Datenlage möglich, verschiedene BLAST-Funktionen gegen bekannte und zum Teil auch noch nicht charakterisierte artspezifische Sequenzen auszuführen. Dies können zum Beispiel Daten aus EST-Projekten, vollständige cDNA-Klone, Sequenzen aus BAC-Klonen oder genomische Sequenzen sein. Viele dieser Datenbanken sind über die bereits erwähnte NCBI-Internetseite zu erreichen. Die Internetseiten aller in dieser Arbeit benutzten Datenbanken sind unter dem Abschnitt 5.14 aufgelistet.

### **6.22.2 Generierung von phylogenetischen Stammbäumen**

Um mehrere Proteine der Dickkopffamilie zu vergleichen, wurde die in jedem der Proteine vorkommende cys II Domäne mit Hilfe des Programms Clustal W auf der Internetseite des „European Bioinformatics Institute“ (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) analysiert. Aussagen über die evolutive Verwandtschaft der Dickkopffproteine konnte im Anschluss an die Clustal W Analyse mit Hilfe der „Neighbor-joining“ Methode (Saitou, N. and Nei, M.,

1987) gemacht und als phylogenetischer Stammbaum dargestellt werden. Dazu wurden folgende Sequenzen aus der Datenbank (NCBI) benutzt: Dkk-1 *Homo* (O94907), Dkk-2 *Homo* (Q9UBU2), Dkk-3 *Homo* (Q9UBP4), Dkk-4 *Homo* (Q9UBT3), Dkk-3 *Gallus* (Q90839), Dkk-1 *Xenopus* (AAC02427), Dkk-2 *Mus* (Q9QYZ8), Dkk-4 *Mus* (NP\_663567), Colipase *Oryctolagus* (AAA02911), Dkk like cys2-1 *Hydra* (Konsensussequenz aus tac30c03.y1 und tab34a10.x1 vom EBI), Dkk like cys2-2 *Hydra* (Konsensussequenz aus taa23c11.x2, taa23c11.y1 vom EBI und BP510080 von DDBJ). Desweiteren wurde für diese Analyse das aus der *Ciona* EST „Ghost Database“ isolierte *Ciona Dkk-3* Gen (cibd068a20) benutzt.

### 6.22.3 Struktur- und Sequenzanalyse

Die unterschiedlichsten Sequenzanalysen wie zum Beispiel der Vergleich von Nukleotid- oder Proteinsequenzen, Umwandeln von Nukleotidsequenzen in die komplementäre und reverse Sequenz, das Auffinden offener Leserahmen, die Suche nach Schnittstellen für Restriktionsenzyme und die Bestimmung des A/T Gehaltes wurden mit dem Programm **DNASIS v2.5** durchgeführt.

Die Strukturanalyse von Proteinen bezüglich Signalsequenzen und Transmembrandomänen erfolgte insbesondere mit den Programmen **SignalP V2.0** des „Center for Biological Sequence Analysis“ der „University of Denmark“ und **TMpred** – „Prediction of Transmembrane Regions and Orientation“ der Organisation EMBnet – „European Molecular Biomedical Network“.

Beide Programme stehen jedem Nutzer frei im Internet unter folgenden Adressen zur Verfügung:

SignalP V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>)

TMpred (<http://www.ch.embnet.org/>)

## 7. Literaturverzeichnis:

Aravind, L. and Koonin, E.V. 1998. A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists - the Dickkopfs. *Current Biology* 8: 477-478

Achermann, J. and Sugiyama, T. 1985. Genetic analysis of developmental mechanisms in *hydra*. X. Morphogenetic potentials of a regeneration-deficient strain (reg-16). *Dev. Biol.* 107: 13-27

Artinger, M. Blitz, I. Inoue, K. Tran, U. and Cho, K.W. 1997. Interaction of *gooseoid* and *brachyuri* in *Xenopus* mesoderm patterning. *Mech. Dev.* 65: 187-196

Barros, F., Carracedo, A., Lareu, M.V. and Rodriguez – Calvo, M.S. 1991. Electrophoretic human leukocyte antigen HLA-DQA1 DNA typing after polymerase chain reaction amplification. *Electrophoresis* 12: 1041-1045

Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Anal. Biochem.* 196, 80-83

Blitz, I. L. and Cho, K. W. Y. 1995. Anterior neuroectoderm is progressively induced during gastrulation: The role of the *Xenopus* homeobox gene *orthodenticle*. *Development* 121:993-1004

Bode, H.R. 2003. Head regeneration in *Hydra*. *Dev. Dyn.* 226(2):225-236

Bosch, T.C.G. and David, C.N. 1987. Stem cells of *Hydra magnipapillata* differentiate into somatic and germ line cells. *Dev. Biol.* 121: 182-191

Bosch, T.C.G. and Fujisawa, T. 2001. Polyps, peptides and patterning. *BioEssays* 23: 420-427

Bosch, T.C.G. and Khalturin, K. 2002. Patterning and cell differentiation in *Hydra*: novel genes and the limits of conservation. *Can. J. Zool.* 80: 1670-1677

Brannon, M. and Kimelman, D. 1996. Activation *siamois* by the Wnt pathway. Dev. Biol. 180: 344-347

Brooke, N.M., Garcia-Fernandez, J. and Holland, P.W. 1998. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. Nature 392: 920-922

Broun, M. Sokol, S. and Bode, H.R. 1999. *Cngsc*, a homologue of *gooseoid*, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra*. Development 126: 5245-5254

Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, G.P. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Ann. Rev. Physiol. 59: 63-88

Corbo, J.C., Gregorio, A.D. and Levine, M. 2001. The Ascidian as a Model Organism in Developmental and Evolutionary Biology. Cell 106: 535-538.

David, C.N. and Challoner, D. 1974. Distribution of interstitial cells and differentiating nematocytes in nests in *Hydra*. Am. Zool. 14:537-542

David, C.N: and Gierer, A. 1974. Cell cycle kinetics and development of *hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. J. Cell. Sci. 16: 359-375

David, C.N. and Murphy, S. 1977. Characterisation of interstitial stem cells in *Hydra* by cloning. Dev. Biol. 58: 372-383

David, C.N. and Plotnik, I. 1980. Distribution of interstitial cells in *hydra*. Dev. Biol. 76: 175-184

Diatchenko, L., Lau, Y.F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moquadarn, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue – specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 6025-6030.

Dirksen, M.L. and Jamrich, M. 1992. A novel, activin-inducible, blastopore lip-specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA-binding domain. *Genes and Development* 6: 599-608

Engleka, M.J. and Kessler, D.S. 2001. Siamois cooperates with TGF $\beta$  signals to induce the complete function of the Spemann-Mangold Organizer. *Int. J. Dev. Biol.*, 45:241-250

Fedders, H., Augustin, R., Bosch, T.C.G. 2003. A Dickkopf-3 related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan *Hydra*. *Dev. Genes Evol.*: im Druck

Fan, C.-M. and Sokol, S. Y. 1997. A role for Siamois in Spemann organizer formation. *Development* 124: 2581-2589

Ferguson, E.L. and Anderson, K.V. 1992. Localized enhancement and repression of the activity of the TGF-beta family member, decapentaplegic, is necessary for dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo. *Development* 114(3): 583-597

Gauchat, D., Mazet, F., Berney, C., Schummer, M., Kreger, S., Pawlowski, J. and Galloit, B. 2000. Evolution of Antp-class genes and differential expression of Hydra Hox/paraHox genes in anterior patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 4493-4498

Gehring, W.J. 1993. Exploring the homeobox. *Gene* 135: 215-221

Gierer, A. 1981. Generation of biological patterns and form: Some physical, mathematical, and logical aspects. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 37: 1-47

Gierer, A., Berking S., Bode, H., David, C.N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller H. and Trenker E. 1972. Regeneration of *Hydra* from Reaggregated Cells. *Nat. New Biol.* 238: 98-101

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

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C. and Niehrs, C. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391: 357-362

Goetsch, W. 1929. Das Regenerationsmaterial und seine experimentelle Beeinflussung. *Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org.* 117: 211-311

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

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(3): 517-524

Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W.J. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788-1792

Harafuji., Takahashi, T., Hatta, M., Tezuka, H., Morishita, F., Matsushima, O. and Fujisawa, T. 2001. Enhancement of foot formation in *Hydra* by a novel epitheliopeptide, Hym-323. *Development* 128: 437-446

Hino, K., Satou, Y., Yagi, K. and Satoh, N. 2003. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VI. Genes for Wnt, TGF $\beta$ , hedgehog and Jak/STAT signalling pathways. *Dev. Genes Evol.* 213(5-6): 264-72

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

Hobmayer, B., Holstein, T.W. and David, C.N. 1997. Stimulation of tentacle and bud formation by the neuropeptide head activator in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.* 183: 1-8

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

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

Holstein, T. und Emschermann, P. 1995. Cnidaria. Hydrozoa von Thomas Holstein, Kamptozoa von Peter Emschermann. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag

Ishidoh, K. and Kominami, E. 1998. Gene regulation and extracellular function of procathepsin L. *Biol. Chem.* 379(2): 131-135

Javois, L.C. and Frazier-Edwards, A.M. 1991. Simultaneous effects of head activator on the dynamics of apical and basal regeneration in *Hydra vulgaris* (formerly *Hydra attenuata*). *Dev. Biol.* 144, 78-85

Kaufmann E. and Knochel W. 1996. Five years on the wings of fork head. *Mech. Dev.* 57: 3-20

Kessler, D.S. 1997. Siamese is required for formation of Spemann's organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13017-13022

Khalturin, K., Becker, M., Rinkevich, B., Bosch, T.C.G. 2003. Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13017-13022

Krupnik, V.E., Sharp, J.D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T.W., Amaravadi, L., Brown, D.E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., Chang, B., Duong, T., Goodearl, A.D.J., Gearing, P.D., Sokol, S.Y. and McCarthy, S.A. 1999. Functional and structural diversity of the human *Dickkopf* gene family. *Gene* 238: 301-313

- Kirov, N., Childs, S., O'Connor, M. and Rushlow, C. 1994. The *Drosophila* dorsal morphogen represses the *tollid* gene by interacting with a silencer element. *Mol. Cell. Biol.* 14(1): 713-722
- Kumpfmüller, G., Rybakine, V., Takahashi, T., Fujisawa, T. and Bosch, T.C.G. 1999. Identification of an astacin matrix metalloprotease as a target for *Hydra* foot activator peptides. *Dev. Genes Evol.* 209: 601-607
- Laurent, M.N., Blitz, I.L., Hashimoto, C. Rothbacher, U. and Cho, K.W-Y. 1997. The *Xenopus* homeobox gene *twin* mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann's organizer. *Development* 124: 4905-4916
- Leontovich, A.A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagasse, H., Sarras Jr., M.P. 2000. A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development* 127(4): 907-920
- Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W. and Wu, D. 2002. Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol. Chem.* 277: 5977-5981
- Liang, P. and Pardee, A.B. 1992. Differential display of eukaryotic RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971
- Lohmann, J. Schickle, H. P. Bosch T. C. G: 1995. REN, a rapid and efficient method for non-radioactive differential display and isolation of mRNA. *BioTechniques* 18(2): 200-202
- Lohmann, J. U. and Bosch, T. C. G. 2000. The novel peptide HEADY specifies apical fate in a simple radially symmetric metazoan. *Genes and Development* 14: 2771-2777
- Loomis, W.F. and Lenhoff, H.M. 1956. Growth and sexual differentiation of hydra in mass culture. *J. Exp. Zool.* 132: 555-574



- MacWilliams, H.K. 1983a. Hydra transplantation phenomena and the mechanism of *hydra* head regeneration. I. Properties of head inhibition. *Dev. Biol.* 96: 217-238
- MacWilliams, H.K. 1983b. Hydra transplantation phenomena and the mechanism of *hydra* head regeneration. II. Properties of head activation. *Dev. Biol.* 96: 239-257
- Martinez, D.E., Dirksen, M.L., Bode, P.M., Jamrich, M., Steele, R.E. and Bode, H.R. 1997. Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Dev. Biol.* 192: 523-36
- McLysaght, A., Hokamp, K., Wolfe, K.H. 2002. Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat. Genet.* 31(2):200-204
- Meinhardt, H. 1993. A model for pattern-formation of hypostome, tentacles, and foot in *hydra*: how to form structures close to each other, how to form them at distance. *Dev. Biol.* 157: 321-333
- Monaghan, A.P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., Bock, D., Poustka, A., Delius, H. and Niehrs, C. 1999. *Dickkopf* genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mechanisms of Development* 87: 45-56
- Mort, J.S. 1998 in *Handbook of Proteolytic Enzymes*, eds. Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F. San Diego, Academic, pp. 609-617
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Olsen, C.L., and Jeffery, W.R. 1997. A forkhead gene related to HNF-3 $\beta$  is required for gastrulation and axis formation in the ascidian embryo. *Development* 124: 3609-3619
- Otto, J.J. and Campbell, R.D., 1977. Tissue economics of *hydra*: Regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *J. Cell. Sci.* 28, 117-132

Pan, T.-L., Gröger, H., Schmid, V., Spring, J. 1998. A toxin homology domain in an astacin-like metalloproteinase of the jellyfish *Podocoryne carnea* with a dual role in digestion and development. *Dev. Genes. Evol.* 208: 259-266

Park, I., Lee, S., Jeon, D., Lee, J., Hwang, C., Hwang, B., Lee, S., Hong, W., Hong, S. 1996. Enhanced Expression of Cathepsin L in Metastatic Bone Tumors. *J. of Korean Med. Science* 11(2): 144-148

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Schaller, H. 1973. Isolation and characterization of a low-molecular-weight substance activating head and bud formation in *hydra*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 26: 27-38

Schaller, H.C. Hoffmeister, S.A. and Dubel, S. 1989. Role of neuropeptide head activator for growth and development in *hydra* and mammals. *Development* 107(Suppl.): 99-107

Schaller, H.C., Hofmann, M. and Javois, L.C. 1990. Effect of head activator on proliferation, head specific determination and differentiation of epithelial cells in *hydra*. *Differentiation* 43: 157-164

Schummer, M., Scheurlen, I., Schaller, C. and Galliot, B. 1992. HOM/HOX homeobox genes are present in hydra (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration. *EMBO J.* 11:1815-1823.

Schwarz, M.K. 1995. Tissue Cathepsins as tumor markers. *Clin. Chem. Acta.* 237: 67-78

Seymour, J.L. and Lazarus, R.A. 1989. Nativ gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal. Biochem.* 178: 243-247

Shenk, M.A., Bode, H.R. and Steele, R.E. 1993. Expression of Cnox-2, a HOM/HOX homeobox gene in hydra, is correlated with axial pattern formation. *Development* 117: 657-667.

Shenk, M. A., Gee, L., Steele, R. E. and Bode, H. R. (1993). Expression of Cnox-2, a HOM/HOX gene, is suppressed during head formation in hydra. *Dev. Biol.* 160, 108-118

Shimell, M.J., Ferguson, E.L., Childs, S.R. and O'Conner, M.B. 1991. The Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell* 67(3): 469-481

Shimizu, H., Zhang, X., Zhang, J., Leontovich, A., Fei, K., Yan, Li and Sarras Jr., M.P. 2002. Epithelial morphogenesis in *hydra* requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development* 129: 1521-1532

Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. und Lukyanov, S.A. 1995. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 1087-1088

Steele, R.E., Stover, N.A. and Sakaguchi, M. 1999. Appearance and disappearance of Syk family protein-tyrosine kinase genes during metazoan evolution. *Gene* 239: 91-97

Sugiyama, T. 1982. Roles of head activation and head inhibition potentials in pattern formation of *hydra*: Analysis of a multiheaded mutant strain. *Am. Zool.* 22: 27-34

Sugiyama, T. and Fujisawa, T. 1977. Genetic analysis of developmental mechanisms in *hydra*. III. Characterization of a regeneration deficient strain. *J. Embryol. Exp. Morph.* 42: 65-77.

Takahashi, T. Muneoka, Y., Lohmann, J., de Haro, L.M: Solleder, G., Bosch, T.C.G., David, C.N., Bode, H.R., Koizumi, O., Shimizu, H., Hatta, M., Fujisawa, T. and Sugiyama, T. 1997. Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in *hydra*: LWamide and PW families. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 1241-1246

Technau, U. 2001. Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm. Bioessays 23: 788-794

Technau, U. and Bode, H.R. 1999. HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. Development 126: 999-1010

Technau, U., von Laue, C.C., Rentzsch, F., Luft, S., Hobmayer, B., Bode, H.R. and Holstein, T.W. 2000. Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates. Proc. Natl. Acad. Sci. 97(22): 12127-12131

Trembley, A. 1744. Mémoire pour servir à l'histoire d'un genre de polyp d'eau douce à bras en forme de cornes. Verbeck Leyden, pp. 1-324.

Turk, V. and Bode, W. 1991. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS Lett. 285: 213-219

Turk, B., Dolenc, I., Turk, V. and Bieth, J.G. 1993. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. Biochemistry 32: 375-380

Turk, V., Turk, B. and Turk, D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. EMBO Journal 20(17): 4629- 4633

Turing, A. 1952. The chemical basis of morphogenesis. Phil. Trans. B. 237: 37-72.

Westheide, W. und Rieger, R. 1996. Spezielle Zoologie, Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag

Wilby, K.O. and Webster, G. 1970. Experimental studies on axial polarity in hydra. J. Embryol. Exp. Morphol. 24(3): 595-613

Wolpert, L., Hornbruch, A. and Clarke, M.R.B. 1974. Positional information and positional signaling in *Hydra*. *Am. Zool.* 14, 647-663

Yan, L., Pollock, G.H., Nagasse, H., Sarras Jr., M.P. 1995. A  $25.7 \times 10^3$  M(r) hydra metalloproteinase (HMP1), a member of the astacin family, localizes to the extracellular matrix of *Hydra vulgaris* in a head-specific manner and has a developmental function. *Development* 121(6): 1591-1602

## 8. Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Bosch nicht nur für die Bereitstellung der Aufgabenstellung, die sehr guten Arbeitsbedingungen, die finanzielle Unterstützung, die Bereitschaft jederzeit wissenschaftliche, aber auch darüberhinausführende Probleme zu erörtern, sondern auch für die Hilfe bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation.

Bei all meinen Kollegen, die eine besonders stimulierende und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre schufen, möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken. Besondere Erwähnung sollen Henning Fedders, André Franke und Mareike Stanisak finden, die über ihre Diplomarbeiten maßgeblichen Anteil am Erfolg meiner Arbeit hatten. Ebenso soll neben der Bereitstellung der cDNA Bank auch das überaus großzügige, freundschaftliche Mitwirken durch Herrn Dr. Konstantin Khalturin dankende Berücksichtigung finden. Bei Frau Dr. Friederike Anton-Erxleben, Frau Tine Schimkus und Frau Christa Kuzel möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erledigung verschiedenster, notwendiger, aber unliebsamer bürokratischer Angelegenheiten bedanken.

Der zuverlässigen Unterstützung meiner Eltern Zeit meines Lebens gilt mein besonders herzlicher Dank.

Kiel, im Dezember 2003

## **9. Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den 19.12.2003

---

René Augustin