

Molekulare Analysen zur Fußentwicklung von *Hydra*

Dissertation

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



vorgelegt von

Stefan Thomsen

Kiel

Januar 2005

Referent:

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C.G. Bosch

Koreferent/in:

Prof. Dr. Rüdiger Schulz-Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Februar 2005

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 09. Februar 2005

Der Dekan

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits zur Publikation eingereicht:

Siebert, S., **Thomsen, S.**, Reimer, M. M., Bosch, T. C. G., 2004. Control of foot differentiation in *Hydra*: Phylogenetic footprinting indicates interaction of head, bud and foot patterning systems. Mech.Dev.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Süßwasserpolypt <i>Hydra</i> als entwicklungsbiologisches Modell.....	3
1.1.1 Systematik von <i>Hydra</i>	3
1.1.2 Morphologie, Lebenszyklus und Histologie von <i>Hydra</i>	5
1.1.3 Taxonomie und Phylogenie der Gattung <i>Hydra</i>	7
1.1.4 Entwicklungsbiologie von <i>Hydra</i>	10
1.1.4.1 Entwicklungsprozesse in <i>Hydra</i>	10
1.1.4.2 Ebenen der Musterbildung	13
1.1.4.3 Modelle zur Musterbildung von <i>Hydra</i>	14
1.2 Der Fuß von <i>Hydra</i>.....	16
1.2.1 Dynamik der Fußdifferenzierung	16
1.2.2 Ebenen der Fußmusterbildung am Beispiel der Regeneration.....	19
1.2.3 Die Fußperoxidase und PPOD1	21
1.2.4 CnNK-2, ein zentraler Transkriptionsfaktor?.....	22
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	26
2 Ergebnisse.....	27
2.1 PPOD-Gene in der Gattung <i>Hydra</i>.....	27
2.1.1 Die Fuß-Peroxidase und PPOD-Gene in <i>Hydra</i>	27
2.1.1.1 Systematische Einordnung verwendeter <i>Hydra</i> -Kulturen.....	27
2.1.1.2 Peroxidase-Aktivitäten in <i>Hydra</i>	29
2.1.1.3 Genomische Komplexität und Expression von PPOD-Genen in verschiedenen <i>Hydra</i> -Spezies.....	30
2.1.2 „Homologue Hunting“ nach PPOD-Genen in <i>Hydra</i> : Ergebnisse und Sequenzanalyse	31
2.1.2.1 Screening einer <i>H. viridis</i> -cDNA-Bibliothek nach PPOD-Homologen	34
2.1.2.2 Analyse von PPOD-Sequenzen aus verschiedenen <i>Hydra</i> -Spezies	36

2.1.3	Charakterisierung von PPOD-Genen in den systematischen Großgruppen	38
2.1.3.1	PPOD-Gene in der Vulgaris-Gruppe	38
2.1.3.1.1	Genomische Organisation	38
2.1.3.1.2	Hinweise auf genomische Cluster von PPOD-Genen	39
2.1.3.1.3	„Screening“ einer genomischen Bibliothek nach PPOD-Genen ...	41
2.1.3.1.4	Expression von PPOD-Genen in der Vulgaris-Gruppe	44
2.1.3.1.5	Veränderung der PPOD2-Expression durch LiCl-Behandlung	48
2.1.3.1.6	Abweichende Expression von PPOD1 in <i>H. vulgaris</i> (AEP)	50
2.1.3.1.7	Zusammenfassung - Vulgaris-Gruppe	51
2.1.3.2	PPOD-Gene in der Oligactis-Gruppe	52
2.1.3.2.1	Genomische Organisation	52
2.1.3.2.2	Expression von PPOD-Genen in der Oligactis-Gruppe	54
2.1.3.3	PPOD-Gene in den basalen Gruppen	56
2.1.3.3.1	Genomische Organisation und Expression	56
2.2	Regulation der <i>CnNK-2</i>-Transkription	59
2.2.1	„Phylogenetische Fußabdrücke“ in der <i>CnNK-2</i> 5'-flankierenden Sequenz	59
2.2.2	Budhead, das Protein eines <i>Hydra</i> Forkhead Homologs, bindet an ein interspezifisch konserviertes Motiv im <i>CnNK-2</i> -Promotor	63
2.2.2.1	EMSAs – Auswahl der Oligonukleotide	63
2.2.2.2	EMSAs - Überexpression von <i>budhead</i> in <i>E. coli</i>	65
2.2.2.3	EMSAs – „Screening“ verwendeter Oligonukleotide	66
2.2.2.4	EMSAs – Charakterisierung von BH_1	68
2.2.3	Budhead, ein negativer Regulator der <i>CnNK-2</i> -Expression?	70
2.2.3.1	Komplementäre Expression von <i>CnNK-2</i> und <i>budhead</i>	70
2.2.3.2	Effekte von LiCl auf die Expression von <i>CnNK-2</i> und <i>budhead</i>	72
3	Diskussion	74
3.1	PPOD-Gene in der Gattung <i>Hydra</i>: Charakterisierung einer Familie von Markergenen	75
3.1.1	Charakterisierung der PPOD-Genfamilie in verschiedenen <i>Hydra</i> -Spezies	77
3.1.2	Der Peroxidase-Assay in <i>Hydra</i>	79
3.1.3	PPOD-Gene und die Phylogenie der Gattung <i>Hydra</i>	80
3.1.4	Evolution der PPOD-Genfamilie und differentielle Genexpression bei Fußmusterbildungsprozessen in <i>Hydra</i>	82

3.2	Regulation der <i>CnNK-2</i>-Transkription: Eine Interaktion von Kopf-, Knospungs- und Fußmusterbildungsprozessen	83
3.2.1	„phylogenetic footprinting“ in <i>Hydra</i>	84
3.2.2	Interaktion zweier „mesodermaler“ Markergene	85
3.2.3	<i>CnNK-2</i> : ein Schlüsselgen bei Fußmusterbildungsprozessen in <i>Hydra</i>	87
3.3	Molekulare Analyse der Fußentwicklung von <i>Hydra</i> - Bestandsaufnahme und Perspektiven.....	89
4	Zusammenfassung	95
5	Material.....	98
5.1	Organismen.....	98
5.2	Medien.....	98
5.3	Puffer und Lösungen.....	98
5.3.1	Allgemeine Lösungen	98
5.3.2	EMSA.....	99
5.3.3	Western-Blot	100
5.3.4	<i>in situ</i> Hybridisierung	100
5.4	Kits	101
5.5	Enzyme	101
5.6	Radiochemikalien	101
5.7	Chemikalien.....	102
5.8	Vektoren.....	103
5.9	Antikörper/-seren	103
5.10	Geräte und sonstige Materialien	103
5.10.1	PCR-Maschinen (Thermocycler)	103
5.10.2	Gelelektrophoresekammern und Blottingsystem	103
5.10.3	Inkubatoren / Schüttler.....	104

5.10.4	UV-Geräte.....	104
5.10.5	Elektroporationsgeräte.....	104
5.10.6	Zentrifugen.....	104
5.10.7	Mikroskopie.....	104
5.10.8	Sonstiges	105
5.11	Primer (MWG Biotech).....	105
5.12	Adapter und Adapterprimer (MWG Biotech)	106
5.13	Oligonukleotide für EMSA (MWG Biotech).....	107
5.14	URLs und Software.....	107
6	Methoden	108
6.1	Hälterung der Versuchstiere.....	108
6.1.1	Standardbedingungen	108
6.1.2	Peptidinkubation	108
6.1.3	Lithiumchlorid-Inkubation.....	109
6.2	Molekularbiologische Methoden	109
6.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	109
6.2.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Hydra</i>	109
6.2.1.1.1	Genomische DNA (Standard).....	109
6.2.1.1.2	Genomische DNA (<i>H. viridis</i> , aposymbiotisch).....	110
6.2.1.1.3	Genomische DNA für Pulsfeldgelelektrophorese	110
6.2.1.2	Isolierung von Vektor-DNA aus <i>E.coli</i>	111
6.2.1.2.1	Plasmide	111
6.2.1.2.2	BACs.....	111
6.2.1.3	Aufreinigung von DNA/-fragmenten	112
6.2.1.4	Isolierung von RNA aus <i>Hydra</i>	112
6.2.1.4.1	Total-RNA.....	112
6.2.1.4.2	mRNA	112
6.2.1.5	Konzentrierung von Nukleinsäuren	113
6.2.1.6	Quantifizierung von Nukleinsäuren	113
6.2.2	Synthese und Amplifikation von DNA.....	113
6.2.2.1	Oligonukleotidsynthese	113
6.2.2.2	cDNA-Synthese.....	113
6.2.2.3	Adapterligation	114

6.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion	115
6.2.2.4.1	Standard-PCR	115
6.2.2.4.2	Colony-Check	116
6.2.2.4.3	Splinkeretten-PCR	116
6.2.2.4.4	Reverse Transcriptase (RT) – PCR.....	117
6.2.3	Markierung von Nukleinsäuren	118
6.2.3.1	Markierung von DNA-Fragmenten	118
6.2.3.1.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	118
6.2.3.1.2	Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	119
6.2.3.2	Synthese von markierter RNA.....	120
6.2.4	Separierung von Nukleinsäuren	120
6.2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	120
6.2.4.1.1	Standard-Gelelektrophorese.....	120
6.2.4.1.2	Denaturierende Alkalische Gelelektrophorese	121
6.2.4.1.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	121
6.2.4.1.4	Denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese	121
6.2.5	Klonierungstechniken	122
6.2.5.1	Klonierung von PCR-Produkten	122
6.2.5.1.1	Transformation von <i>E.coli</i>	122
6.2.5.1.2	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen.....	122
6.2.5.2	Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren.....	123
6.2.5.3	cDNA-Bibliothek (<i>H. viridis</i>).....	123
6.2.5.4	BAC-Bibliothek (<i>H. magnipapillata</i>).....	125
6.2.6	Analyse von Nukleinsäuren	125
6.2.6.1	Restriktionsverdau von genomischer DNA.....	125
6.2.6.1.1	Verdau von in Agarose eingebetteter DNA.....	125
6.2.6.2	Sequenzierung von klonierter DNA.....	126
6.2.6.2.1	Plasmide	126
6.2.6.2.2	BACs.....	126
6.2.6.3	Hybridisierungstechniken	126
6.2.6.3.1	Southern Blotting	127
6.2.6.3.2	Screening rekombinanter DNA-Bibliotheken	128
6.2.6.3.3	Northern Blotting.....	129
6.2.6.3.4	In situ- Hybridisierung	129
6.2.6.3.5	Analyse von DNA/Protein-Interaktionen: Gelretentions-analyse ("Bandshift Assay", EMSA).....	133
6.3	Proteinbiochemische Methoden.....	134
6.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>Hydra vulgaris</i> (Basel)	134
6.3.2	Isolierung von Kernprotein.....	135
6.3.3	Herstellung von rekombinantem Protein.....	135
6.3.4	Western Blot Analyse	137

6.3.5	Immunohistochemie.....	139
6.3.6	Peroxidase-Assay.....	140
6.4	Histologische Methoden	140
6.5	In silico-Analysen	141
6.5.1	“phylogenetic footprinting” mit der ConSite Plattform	141
7	Referenzen.....	X
8	Anhang.....	XIX
8.1	PPOD-cDNA-Sequenzen.....	XIX
8.1.1	PPOD1-cDNA-Sequenzen.....	XIX
8.1.2	PPOD2-cDNA-Sequenzen.....	XX
8.1.3	PPOD2-like-cDNA-Sequenz	XXIV
8.2	PPOD-Protein-Sequenzen	XXIV
8.2.1	PPOD1-Protein-Sequenzen.....	XXIV
8.2.2	PPOD2-Protein-Sequenzen.....	XXV
8.2.3	PPOD2-like-Protein-Sequenz	XXV
8.3	Genomische PPOD-Sequenzen	XXVII
8.4	Genomische CnNK-2-Sequenzen	XXIX
8.5	PPOD-Gene in der genomischen <i>H. magnipapillata</i>-BAC- Bibliothek.....	XXIX
9	Danksagung.....	XXX
10	Erklärung	XXXI

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AEP	<i>Hydra vulgaris</i> (AEP)
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
BAC	“bacterial artificial chromosome”
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cpm	„counts per minute“
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosinnukleotidtriphosphat
dCTP	Desoxycytosinnukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
dscDNA	doppelsträngige cDNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST(s)	Expressed Sequence Tag(s)“
EtOH	Ethanol
E-value	Expekt-Wert
G	Guanin
g	Gramm
H.circ.	<i>Hydra circumcincta</i>
H.mag.	<i>Hydra magnipapillata</i> (105)
H.rob.	<i>Hydra robusta</i>
H. viri.	<i>Hydra viridis</i> (A99)
H.vul.	<i>Hydra vulgaris</i> (Basel)
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
i-Zellen	interstitielle Zellen
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
LB-amp ⁺	LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin
LiCl	Lithium-Chlorid
M	molar
mA	Milliampère

MAB	Maleinsäurepuffer
MAB-B	Maleinsäurepuffer mit 1 % BSA
max.	maximal
MetOH	Methanol
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
mg	Milligramm
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
mRNA	Messenger-RNA
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
OD_{550}	Optische Dichte bei 550 nm
Ω	Ohm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RACE	„Rapid Amplifikation of cDNA Ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	double-stranded RNA-mediated interference
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum-Temperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	„single stranded“ (einzelsträngige)
T	Thymin, Temperatur
T_A	Primer-Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetraethylendiamin
T_m	Primer-Schmelztemperatur
(Schmelztemperatur)	
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Gesamt-RNA
U	Unit(s) oder Uracil
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

w/v
X-Gal

Gewicht (weight) pro Volumen
5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -glucuronid

1 Einleitung

Die **Entwicklungsbiologie** beschäftigt sich mit der Frage, wie komplexe, biologische Strukturen aus einfachen entstehen, wie sich ein vielzelliger Organismus aus einer einzelnen Zelle, der Zygote, entwickeln kann. Im Laufe ihrer Entwicklung hat die Entwicklungsbiologie sich zunächst mit verschiedenen vergleichend anatomischen bzw. histologischen, ab der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts auch molekulargenetischen und biochemischen Methoden der Frage zu nähern versucht, wie sich die räumliche und zeitliche Inhomogenität lebender Organismen erklären lässt.

Entwicklung umfasst eine Vielzahl von Prozessen wie Zellteilung, Musterbildung, Formänderung, Zelldifferenzierung und Wachstum (Wolpert, 1999), wobei der **Musterbildung** ("pattern formation") im sich entwickelnden Organismus eine zentrale Stellung zukommt. Im Zuge der primären Musterbildung wird der gesamte Körperbauplan festgelegt und mit den Körperachsen das entscheidende Koordinatensystem, innerhalb dessen sich die gesamte weitere Entwicklung vollzieht, etabliert.

Zwar lässt sich Entwicklung nicht vollständig auf genetische Steuerungsprozesse reduzieren, jedoch haben die Ergebnisse der letzten Jahrzehnte deutlich gemacht, dass Entwicklungsprozesse durch **differenzielle Genexpression** koordiniert werden.

Die Regulation von Genaktivitäten ist durch eine Fülle von Mechanismen auf DNA-, Transkriptions-, RNA-Prozessierungs- und RNA-Transport- sowie auf Translations- und posttranslationaler Ebene realisiert. Die **Transkriptionskontrolle** stellt dabei die effektivste und ökonomischste Art der Expressionskontrolle dar und überwiegt i.d.R. alle posttranskriptionalen Regulationsvorgänge an Bedeutung.

Das Verständnis der Transkription regulatorischer, an der Entwicklung von Organismen beteiligter Gene auf molekularer Ebene ermöglicht die Analyse von zunächst einfachen **Kausalketten** sich beeinflussender Gene und schließlich das Aufstellen **genomischer, regulatorischer Netzwerke**, die zu einem vertieften Verständnis von Entwicklungsprozessen führen.

Überraschend bei der Analyse von Entwicklungsprozessen in verschiedenen Systemen bzw. Modellorganismen war die Feststellung, dass offensichtlich derselbe limitierte Satz von **Entwicklungsgenen**, namentlich Transkriptionsfaktoren und Mitglieder von Signaltransduktionsketten, von allen Taxa der Metazoa benutzt und geteilt wird und sich die erstaunliche Vielfalt unter den lebenden Organismen u.a. durch den differentiellen Gebrauch dieser hochkonservierten, molekularen „tool box“ in den verschiedenen systematischen Gruppen entwickelt hat. Über die Entdeckung der **Konservierung von Entwicklungsmechanismen** bzw. der ihnen zu Grunde liegenden Aktivitäten von konservierten Genen haben die Disziplinen Genetik und Entwicklungsbiologie wieder zueinander gefunden und unter Einbeziehung weiterer Disziplinen wie vergleichender Embryologie und Paläontologie die neue Forschungsrichtung „evolutionary developmental biology“ („**evo-devo**“) begründet (Holland, 1999).

Konservierung findet sich v.a. im **Mittelbau** der großen Entwicklungswege und -kaskaden; stromaufwärts („upstream“) und -abwärts („downstream“) davon zeigt sich in regulatorischen Netzwerken bei der Wahl der für die Steuerung "rekrutierten" Gene mehr Vielfalt (Duboule und Wilkins, 1998). Es scheint so, dass die zunehmende Komplexität tierischer Entwicklung vor allem durch eine Zunahme der biologischen Funktionen pro Entwicklungsgen („**a gene's work load**“) ermöglicht wurde und nicht durch eine Modifizierung der basalen biochemischen Funktionen der Genprodukte. Die meisten regulatorischen Gene in Tieren sind multifunktional. Der Preis für diese Multifunktionalität war jedoch ein immer komplexeres regulatorisches Netzwerk auf Transkriptionsebene (Duboule und Wilkins, 1998).

Das Bestreben, die **Evolution von Entwicklungsprozessen** und die ihnen zu Grunde liegenden Netzwerken zu verstehen findet momentan Ausdruck in der Ausweitung von Genom- und Transkriptomprojekten auf nicht-klassische Modellorganismen innerhalb der Metazoa (<http://www.genome.gov/12511858>) und rückt Vertreter phylogenetisch basaler Gruppen in das Zentrum des Interesses.

1.1 Der Süßwasserpolytyp *Hydra* als entwicklungsbiologisches Modell

Der Süßwasserpolytyp *Hydra* ist ein klassisches Modell der Entwicklungsbiologie. Er wurde bereits 1744 aufgrund seiner später namensgebenden Regenerationsfähigkeit für die Wissenschaft entdeckt (Trembley, 1744). Durch eine Fülle unterschiedlicher und der experimentellen Analyse gut zugänglicher Entwicklungsprozesse ist er heute ein etablierter Modellorganismus der Entwicklungsbiologie.

1.1.1 Systematik von *Hydra*

Hydra gehört systematisch zu den Cnidariern (Nesseltiere), einer Tiergruppe, die sich fossil 500 Mio. Jahre zurückdatieren lässt (Xiao et al., 2000). Die systematische Stellung von *Hydra* und die Phylogenie der Gattung sind in Abb. 1.1 nach verschiedenen Autoren zusammengefasst.

Bei den **Cnidariern** handelt es sich um radiärsymmetrische, diploblastische, meist marine Organismen mit einer zentralen, **aboral-oralen Körperachse** (vgl. Abb. 1.2 A). Ihr charakteristisches Merkmal sind die phylotypischen **Nesselkapseln (Nematozyten)**, die im Dienste von Nahrungserwerb und Feindabwehr stehen. Als Schwestergruppe der Bilateria, mit denen sie phylogenetisch als Eumetazoa den Schwämmen gegenübergestellt werden, sind sie die erste Tiergruppe mit einem definierten Körperbauplan, einem einfachen Nervensystem und echten Geweben.

Eine umfangreiche, aktuelle, kladistische Studie schlägt unter Einbeziehung von 87 morphologischen bzw. Entwicklungsmerkmalen den in Abb. 1.1 A dargestellten phylogenetischen Stammbaum für die Cnidaria vor (Marques und Collins, 2004). Dieser stimmt gut mit jüngeren, molekularen Analysen von 18S- und 28S-rRNA-Sequenzen überein (Collins, 2000; Medina et al., 2001; Collins, 2002).

Die **Anthozoa** gelten u.a. durch ein zirkuläres mitochondriales Genom (Bridge et al., 1992; Bridge et al., 1995), das sie mit den Bilateria gemeinsam haben, als ursprünglich. Des Weiteren fehlt bei ihnen der für die übrigen Taxa, die **Medusozoa**, typische Wechsel von asexueller und sexueller Vermehrung

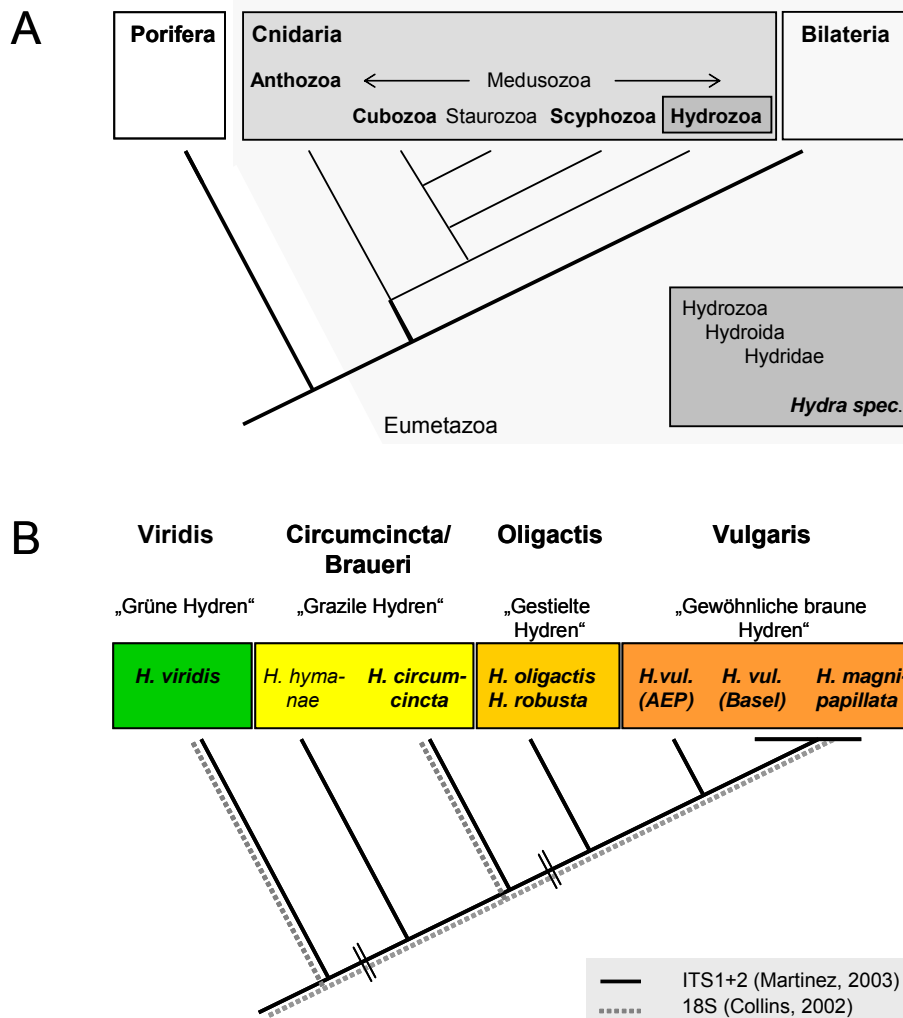


Abb. 1.1: Systematik und Phylogenie von *Hydra*. (A) Systematische Stellung von *Hydra* im System der Metazoa (nach Marques & Collins, 2004, ITIS database (www.itis.usda.gov)). (B) Phylogenie der Gattung *Hydra*. Klassische Einteilung in die 4 Großgruppen (nach Campbell, 1987, 1989; Holstein 1995) und phylogenetischer Stammbaum nach molekularen Analysen ribosomaler Sequenzen (Collins, 2002, vereinfacht nach Percell, 2003). Fett geschriebene Arten wurden auch in dieser Studie bearbeitet. *H.vul.*, *H.vulgaris*.

(Metagenese), d.h. ein pelago-benthischer Lebenszyklus mit den Stadien Planula-Larve, Polyp und Meduse.

Die **Hydrozoa** werden heute innerhalb der Cnidaria aufgrund ihrer Formenmannigfaltigkeit, ihrer Sinnesorgane und ihres komplexen Cnidoms als stark abgeleitet angesehen (Steele, 2002; Collins, 2002). Die Systematik der Subtaxa ist noch im Fluss (Westheide und Rieger, 1996), lässt sich aber durch die Kombination von morphologischen und molekularen Datensätzen zunehmend besser auflösen (Marques und Collins, 2004). Die Hydrozoen sind eine vielfältige Gruppe typischerweise mariner, kolonialer Tiere mit metagenetischem Lebenszyklus.

1.1.2 Morphologie, Lebenszyklus und Histologie von *Hydra*

Hydra weicht von diesem Typus ab. Ihr äußeres Erscheinungsbild, ihr Lebenszyklus und der Feinbau ihrer Körperwand sind in Abb. 1.2 zusammengefasst. Abb. 1.3 zeigt Lebendaufnahmen von Hydren der in dieser Arbeit verwendeten Spezies.

Hydren sind solitäre, 3 bis 20 mm große Süßwasser-Polypen ohne metagenetischen Lebenszyklus. Sie zeigen den einfachen, radiärsymmetrischen Bau eines **Polypen**, der sich entlang der einzigen Körperachse grob in **Kopf**, **Rumpf** und **Fuß** unterteilen lässt (Abb. 1.2 A). Als differenzierte Strukturen finden sich ober- und unterhalb des ungegliederten Gastralschlauches der Kopf mit dem von 4 bis 7 Tentakeln umstellten Hypostom (Mundkegel) und der Fuß mit einem in einigen Arten deutlich abgesetzten Stiel (vgl. Abb. 1.3 D, E; Pfeile) und der Basalscheibe, einer Haftstruktur, welche durch klebrige Sekrete den Kontakt und die Befestigung am Substrat vermittelt.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Hydrozoen ist im **Lebenszyklus** von *Hydra* die Medusengeneration reduziert. Die Fortpflanzung erfolgt v.a. asexuell durch **Knospung** in einer Zone unterhalb der Gastralregion (Abb. 1.2 A, B; vgl. Abb. 1.3). In Abhängigkeit von Umweltfaktoren (Populationsdichte, Nahrungsangebot, Temperatur) können Geschlechtszellen gebildet werden. Die Entwicklung der Zygote bzw. des Embryos erfolgt direkt, d.h. ohne Larvenstadium, in einer Embryothek und schließt ein cuticuläres Dauerstadium ein. Die Embryogenese endet mit dem Schlüpfen des Polypen (Martin et al., 1997). Es treten sowohl gonochoristische (diözische) als auch hermaphroditische (monözische) Arten auf. In Abb. 1.2 A (unten) ist ein hermaphroditischer Phänotyp gezeigt.

Die **Körperwand** von *Hydra* zeigt den phylotypischen, diploblastischen Aufbau aus **Ekto-** und **Endoderm** und der dazwischen liegenden **Mesogloea**, einer azellulären Stüttschicht. Sie ist ein Sekretionsprodukt beider Epithelien und ist bei den Hydropolypen nur als dünne Stützlamelle ausgebildet (Abb. 1.2 C). Die ca. 20 in *Hydra* präsenten Zelltypen gehen aus **drei Zelllinien** hervor.

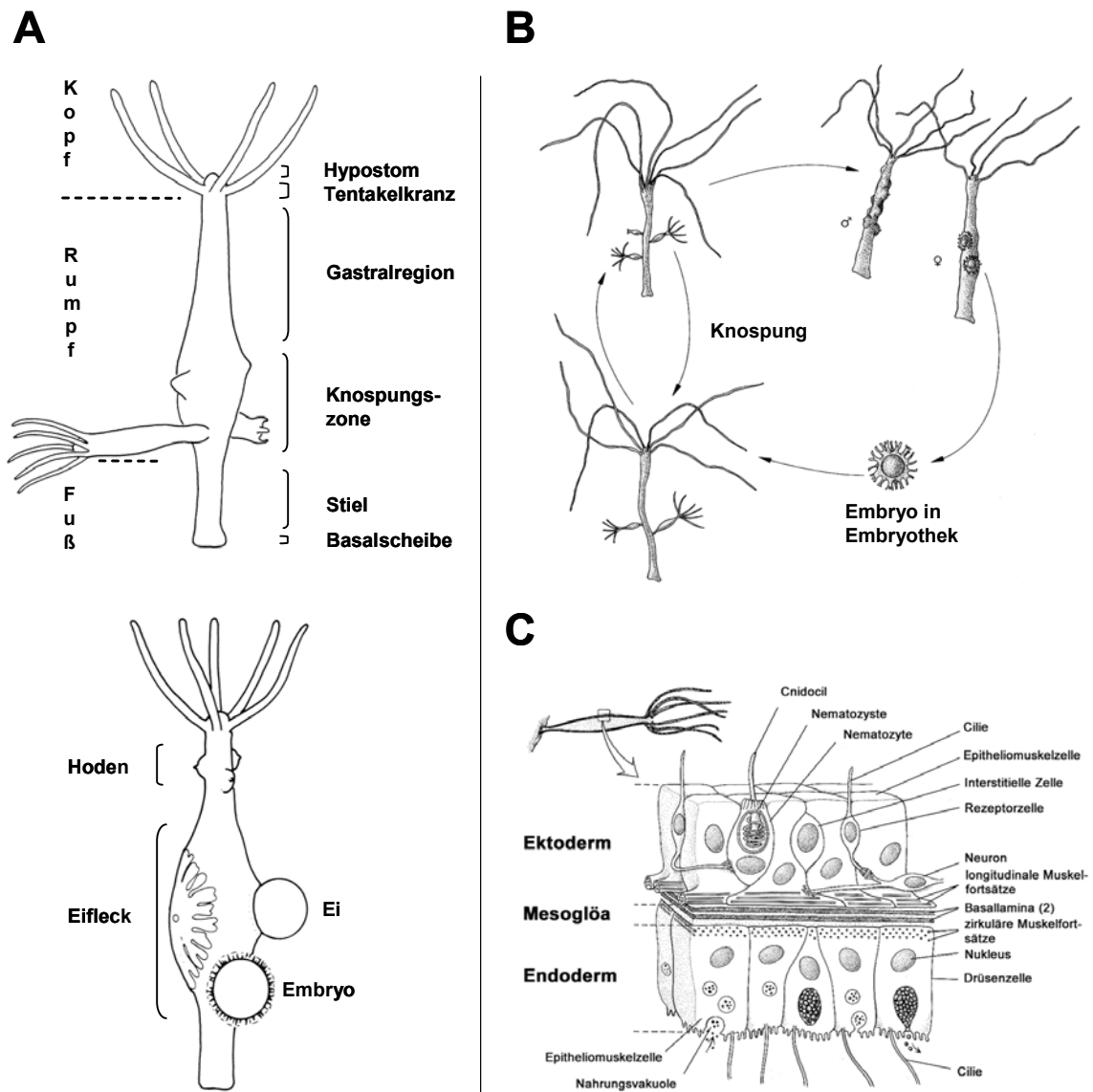


Abb. 1.2: Morphologie, Lebenszyklus und Histologie von *Hydra*. (A) Morphologie von *Hydra*. Vegetativer (oben) und sexueller, hermaphroditischer Phänotyp (verändert nach Campbell, 1983). (B) Lebenszyklus von *Hydra* (aus Westheide & Rieger, 1996). (C) Histologie von *Hydra*. Aufbau der Körperwand (verändert nach Rupert & Barnes, 1994).

Die beiden Epithelien werden durch separate Zelllinien gebildet. Diese **Epithelmuskelzellen** machen den Hauptteil der Zellmasse aus. Die endodermalen sind hochprismatisch, begeißelt und dienen der Nahrungsaufnahme; die ektodermalen können im Kopf zu nematocystentragenden **Batterie-** und im Fuß zu Mucus sezernierenden **Basalscheibenzellen** transdifferenzieren. Die Epithelzellen von *Hydra* besitzen weiterhin noch die Funktion von Makrophagen und phagozytieren fremde oder nekrotische Zellen (Marcum und Campbell, 1978). **Nessel-, Nerven-, Drüsen- und Geschlechtszellen** gehen aus den multipotenten **interstitiellen Zellen (I-Zellen)**, der dritten Zelllinie in *Hydra*, hervor; sie finden sich in den

Zellzwischenräumen beider Epithelien (zusammengefasst in Bosch, 2003). Im Vergleich zu den Vertebraten ist die extrazelluläre Matrix (ECM) oder **Mesoglea** von *Hydra* hochelastisch; einerseits gewährt sie durch ihre Rigidität die Erhaltung der Körperform und ermöglicht andererseits durch ihre Plastizität extensive, reversible Änderungen derselben durch Kontraktion der Epitheliomuskelzellen (zusammengefasst in Sarras, Jr. und Deutzmann, 2001).

1.1.3 Taxonomie und Phylogenie der Gattung *Hydra*

Verschiedene Ansätze zur **Taxonomie und Phylogenie der Gattung *Hydra*** sind in Abb. 1.1 B zusammengefasst. Alle Hydren zeigen grundsätzlich die beschriebene Morphologie (Abb. 1.2 A, Abb. 1.3).

Die grösste Einteilung unterscheidet die mit Grünalgen in Symbiose lebenden „**grünen**“ von den übrigen „**braunen**“ **Hydren**.

Verschiedene *Hydra*-Arten weisen deutliche Unterschiede in ihrer Verbreitung, Ökologie, Geschlechterverteilung, Körpergröße, -farbe und -proportionen, z.B. der relativen Tentakellänge, auf. Haben die insbesondere unter Kulturbedingungen stark variablen morphologischen Merkmale in historischen taxonomischen Arbeiten noch zu Verwirrungen geführt, so arbeitet die moderne Taxonomie mit invariablen Merkmalen. Die grösste taxonomische Bedeutung kommt dabei der **Anatomie der Nematocyten**, insbesondere den **holotrichen Isorhizen**, zu (Holstein, 1995). Weitere Bestimmungsmerkmale beziehen sich auf die Entwicklung, z.B. die Reihenfolge der Tentakelentwicklung an Knospen und die Ausgestaltung der Embryothek. Die Arten der Gattung *Hydra* lassen sich so eindeutig den in Abb. 1.1 B dargestellten vier **Arten-Gruppen** bzw. **-Clustern** zuordnen (Campbell, 1987; Campbell, 1989; Holstein, 1995). Dieses Konzept hat in alle gängigen Bestimmungsschlüssel Eingang gefunden. Die Arten innerhalb der Gruppen sind oft nur durch ihre geographische Verbreitung zu unterscheiden und werden z.T. als regionale Varianten derselben Art diskutiert (Holstein und Campbell, 1990). Dieses gilt z.B. für die europäische *H. vulgaris* und die japanische *H. magnipapillata* sowie für die in dieser Studie verwendeten Arten der Oligactis-Gruppe.

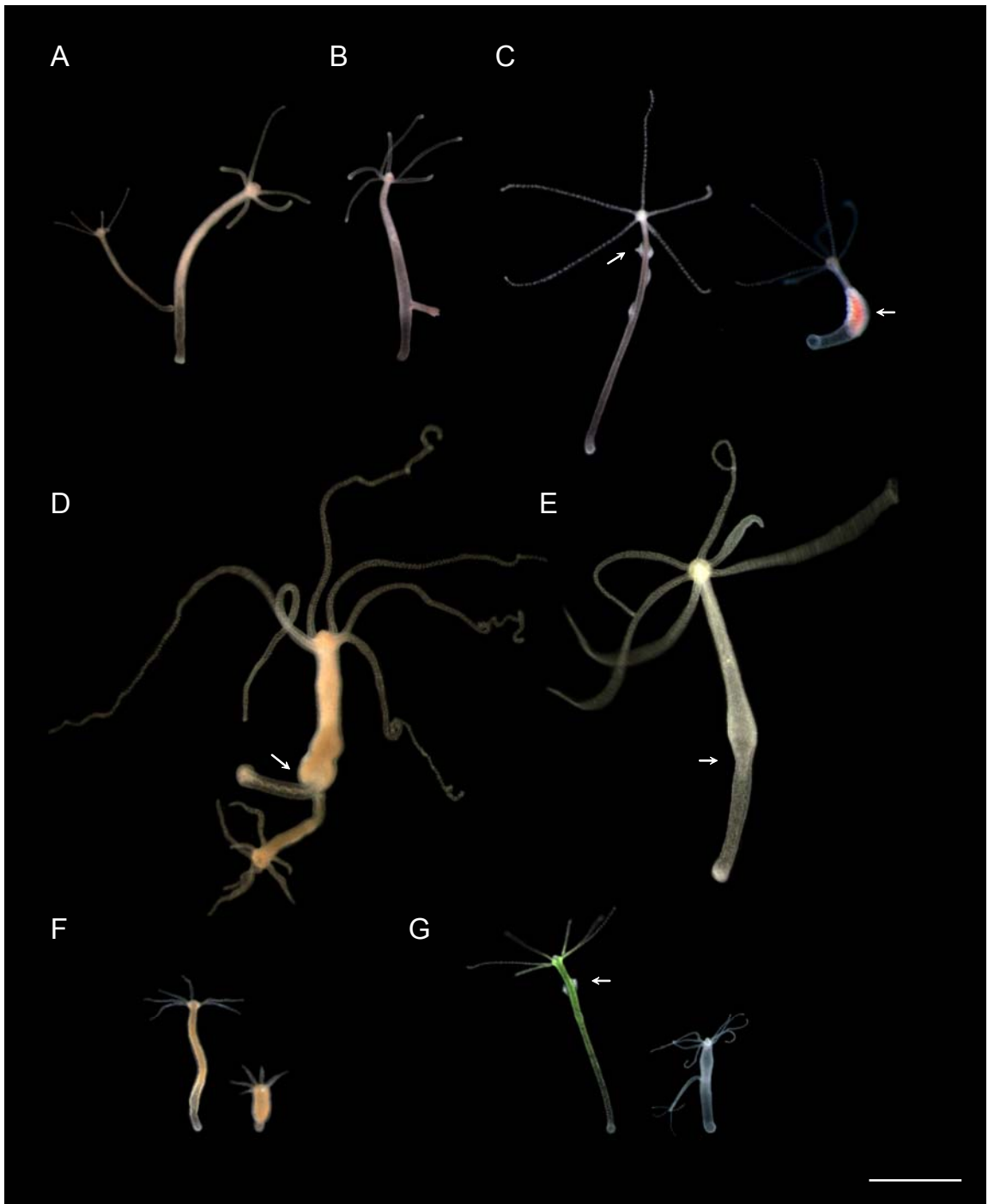


Abb. 1.3: Verschiedene *Hydra*-Arten (Lebendaufnahmen). Vegetative und sexuelle Phänotypen, verschiedene Bewegungs- und Kontraktionszustände. **(A)** *H. vulgaris* (Basel). **(B)** *H. magnipapillata*. **(C)** *H. vulgaris* (AEP), männlicher und weiblicher Phänotyp (Pfeil = Hoden bzw. Eifleck, vgl. Abb. 1.2 A). **(D)** *H. oligactis*. **(E)** *H. robusta* (Pfeil D, E: gestielte Füße, Konstriktion). **(F)** *H. circumcincta*, gestreckt und kontrahiert. **(G)** *H. viridis*, männlich-symbiontisch und aposymbiontisch (Pfeil: Hoden). Balken entspricht 5 mm.

Die taxonomischen Arbeiten lassen die Frage der **Phylogenie** offen, jedoch deuteten Histokompatibilitätsexperimente mit Transplantaten, die eine Inkompatibilität von Geweben aus der Viridis- und Circumcincta-Gruppe mit allen anderen (zusammengefasst in Holstein, 1995) und eine begrenzte

Kompatibilität von solchen der Oligactis- und Vulgaris-Arten miteinander (Bosch und David, 1986; Kuznetsov et al., 2002) zeigten, eine nähere Verwandtschaft der beiden letzteren Gruppen an (vgl. Abb. 1.1 B).

Die **Proteinmuster der Nematozyten** stützen die taxonomischen Arten-Cluster (Holstein, 1995); jüngste Analysen ribosomaler DNA-Sequenzen legen den in Abb. 1.1 B skizzierten phylogenetischen Stammbaum nahe. Ein Vergleich der kompletten **18s-rRNA Gensequenzen** von 35 Hydrozoen bezog auch Vertreter aus drei der vier *Hydra*-Gruppen mit ein und zeigte die basale Stellung der Viridis-Gruppe im Vergleich zu den „braunen Hydren“ (Collins, 2000). Zum gleichen Ergebnis kam eine Studie, die hochvariable Regionen des Primärtranskriptes der ribosomalen RNAs (**internal transcribed spacer, ITS 1 + 2**) betrachtet, alle vier taxonomischen Gruppen mit jeweils mehreren Vertretern berücksichtigte und so eine höhere Auflösung bezüglich einzelner Arten erreichte (Percell et al., 2003). Dargestellt sind vereinfachend nur die im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Vertreter der Gruppen (Abb. 1.1 B). Beide Studien bestätigen die klassische Einteilung und weisen drei der Gruppen als monophyletisch aus.

Die **Viridis-Gruppe** wird jeweils an die Basis des *Hydra*-Stammbaumes gestellt; die Abspaltung der „braunen“ Hydren hat vermutlich sehr früh stattgefunden. Unterstützt wird die basale Stellung der Viridis-Gruppe auch durch Messungen der Genomgrößen in den vier Großgruppen (Zacharias et al., 2004). Bei einem identischen **Chromosomensatz von $2n = 30$** weist *H. viridis* ein im Vergleich zu den braunen Hydren ein um den Faktor 3 kleineres Genom, korrelierend mit einer geringeren Chromosomengröße, auf.

Die klassische **Circumcincta-Gruppe** stellt nach den neuen Ergebnissen eine paraphyletische Vereinigung der nordamerikanischen *H. hymanae* mit den übrigen Circumcincta-Arten, die ein Monophylum bilden, dar.

Die nahe Verwandtschaft von **Oligactis-** und **Vulgaris-Gruppe** (s.o.) wird bestätigt. Die Polypen der Oligactis-Arten sind ca. doppelt so groß wie die übrigen *Hydra*-Spezies und weisen einen deutlich gestielten Fuß auf (Abb. 1.3 D, E; Pfeil). Der *H. vulgaris* (AEP) – Stamm, der wegen seiner induzierbaren

Gametogenese gehalten wird (Martin et al., 1997), liegt im Stammbaum der Vulgaris-Gruppe mit anderen nordamerikanischen Vulgaris-Arten auf einem anderen Zweig als die in den meisten Laboren verwendeten *H. vulgaris* (Basel) und *H. magnipapillata* (105). Die ITS-Sequenzen der letzteren sind fast identisch.

1.1.4 Entwicklungsbiologie von *Hydra*

1.1.4.1 Entwicklungsprozesse in *Hydra*

Bei den meisten Modellorganismen beschränken sich Musterbildungsprozesse auf die Embryonalentwicklung wohingegen sich an *Hydra* zeitlebens verschiedene axiale Musterbildungsprozesse beobachten und studieren lassen (Abb. 1.4). Unterschieden werden müssen dabei Entwicklungsprozesse in einem bereits bestehenden Koordinatensystem, d.h. bei etablierter Körperachse (Abb. 1.4 A-C), und *de novo*-Musterbildungsprozesse (Abb. 1.4 D, E). Den beiden Körperpolen, dem **Kopf** und dem **Fuß**, wird bei den verschiedenen Prozessen jeweils eine **Organisator**-Funktion zugeschrieben (zusammengefasst in Broun und Bode, 2002; Bode, 2003).

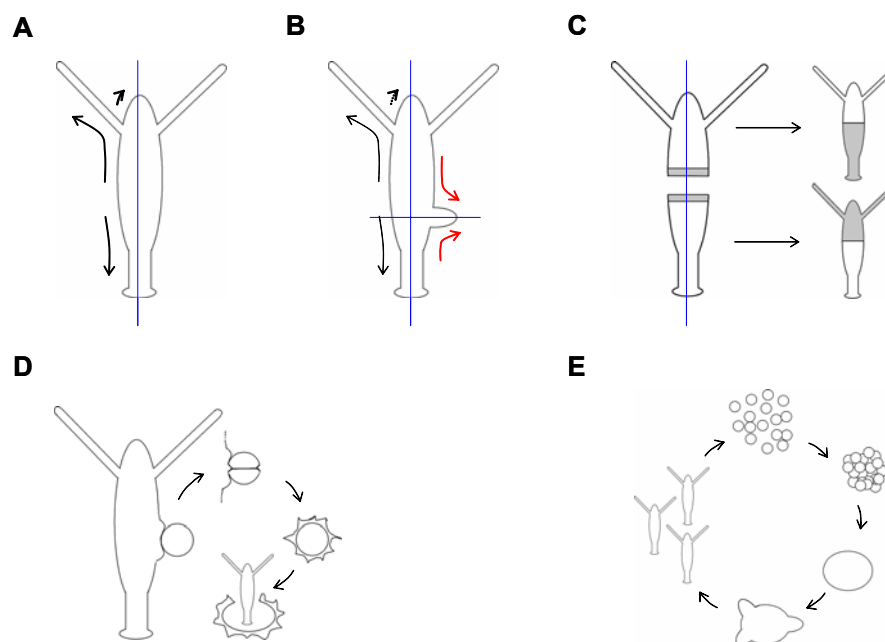


Abb. 1.4: Entwicklungsprozesse in *Hydra*. (A) bis (C) Entwicklung im bestehenden Koordinatensystem. (A) Konstante Musterbildung, der „ewige Embryo“. (B) Knospung. (C) Regeneration durch Morphallaxis. (D)+(E) *De novo*-Musterbildung. (D) Embryogenese. (E) Regeneration aus Aggregaten. Pfeile, Gewebefluss; blaue Gerade, Körperachse.

Hydra befindet sich in einem ständigen **Fließgleichgewicht von Zellverlust und Zellproliferation**. Die Epithel- und interstitiellen Zellen der Körpersäule proliferieren ständig, wodurch es zu einem kontinuierlichen Fluss von Gewebe in Richtung der Extremitäten kommt (zusammengefasst in Bosch, 2003) (Abb. 1.4 A). Die **ektodermalen Epithelzellen transdifferenzieren** im Bereich der Tentakeln zu nematocystentragenden Batterie- und am Übergang zur Basalscheibe zu Mukus sezernierenden, hochprismatischen Basalscheibenzellen. An den Tentakeln, am Hypostom und im Bereich der Basalscheibe werden die Zellen aus dem Gewebeverband abgeschilfert (**Ektoderm**) bzw. in den Gastralraum abgegeben (**Endoderm**). Der beschriebene, dynamische Gewebefluss bzw. Zellumsatz vollzieht sich in engem Kontakt **zur extrazellulären Matrix (ECM)**, der Mesogloea, die ebenfalls ständig erneuert und remodelliert wird. Über Zell-Zellkontakte durch sie hindurch kommunizieren die Epithelien miteinander; Zell-ECM-Kontakte spielen bei verschiedensten Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle (zusammengefasst in Sarras, Jr. und Deutzmann, 2001).

Im adulten Polypen ändern **Zellen** somit ständig **Kontakte, Position**, und in Abhängigkeit davon ihre **Funktion**; Zelldifferenzierungs- und axiale Musterbildungsprozesse finden zeitlebens statt, was zum Begriff des „**ewigen Embryos**“ geführt hat.

Der Großteil der „überschüssigen“ Zellen geht in die **Knospenbildung**, die asexuelle Form der Fortpflanzung bei *Hydra*, ein (Abb. 1.4 B). In definiertem Abstand vom vorhandenen Kopf und Fuß wird eine neue Körperachse senkrecht zur Bestehenden etabliert. In der Körperwand entsteht ein morphogenetisches Feld aus konzentrischen Ringen, die den zukünftigen axialen Geweben entsprechen mit dem zukünftigen Hypostom im Zentrum. Die Knospenbildung vollzieht sich in definierten Stadien und lässt sich in eine Phase der Geweberekrutierung und anschließende Morphogenese des neuen Polypen unterteilen (Otto und Campbell, 1977). Makroskopisch kommt es zunächst zu einer Ausstülpung der Körperwand, anschließend zur sukzessiven Differenzierung von Kopf- und Fußstrukturen und schließlich zur Abschnürung vom Muttertier.

Namensgebend für *Hydra* war ihre **Regenerationsfähigkeit**, die Wiederherstellung von durch Verletzung oder Amputation verlorenen Strukturen (Abb. 1.4 C). Im Anschluss an den schnellen **Wundverschluss** kommt es unter Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden zur Bildung eines **Organisationszentrums**, das die morphogenetischen Ereignisse zur Wiederherstellung der verloren gegangenen Struktur steuert (Galliot und Schmid, 2002; Holstein et al., 2003). Regenerationsereignisse finden in *Hydra* zunächst ohne Zellproliferation und Blastembildung, sondern durch direkte Differenzierung von epithelialen Stammzellen in der Körpersäule statt. Diese Art der Regeneration durch Umstrukturierung von vorhandenem Gewebe wird als **Morphallaxis** bezeichnet. *Hydra* ist das Lehrbuchbeispiel für diese Art der Regeneration (Wolpert, 1999). Regenerationsversuche führten zur Entdeckung der **Polarität von Hydra-Gewebe**, da ehemals benachbarte Zellen des Gastralbereiches nach der Amputation, abhängig von ihrem relativen **Positionswert** im jeweiligen Fragment des Ursprungspolypen (s.u.) Fuß- oder Kopfstrukturen bilden (Abb. 1.4 C, grau hinterlegt). Bei Entfernung von Kopf und Fuß regeneriert das Gastralfragment beide Strukturen unter Erhalt der ursprünglichen Polarität.

Die bisher beschriebenen **Entwicklungsprozesse** vollziehen sich in einem **bestehenden Koordinatensystem** mit vorhandener Körperachse und definierten Positionswerten. **De novo Musterbildungsprozesse** lassen sich in *Hydra* im Zuge der Embryonalentwicklung und an Zellaggregaten studieren.

Die **Embryonalentwicklung** von *Hydra* umfasst eine holoblastische, unipolare **Furchung** gefolgt von einer **Gastrulation** durch Ingression. Anschließend erfolgt die Absonderung einer cuticularen Embryothek. Während eines zeitlich variablen Dauerstadiums kommt es zur Ausdifferenzierung des Ektoderms und der Anlage der interstitiellen Zelllinie. Endoderm und I-Zell-Derivate (1.1.2) sowie der Gastralraum bilden sich erst kurz vor dem Schlüpfen des Polypen (Martin et al., 1997).

Die Regeneration von reaggregierten Einzelzellen ist ein weiteres System zur Analyse von *de novo* Musterbildungsprozessen auf zellulärer und molekularer Ebene in *Hydra*. Die Zellen in den **Aggregaten** nehmen aus einem Zustand

ohne jegliche Positionsinformation heraus zunächst Kontakt zu Nachbarzellen auf; es kommt sukzessive zu einer **Sortierung von ekto- und endodermalen Epithelzellen** durch differentielle Adhäsion, der **Reetablierung der Epithelien** unter Wiederherstellung der extrazellulären Matrix, der **Differenzierung von Kopf- und Fußstrukturen** und abschließend zur Separierung intakter Polypen (zusammengefasst in Holstein et al., 2003).

In all diesen geschilderten Entwicklungszusammenhängen vollziehen sich auch die in dieser Arbeit betrachteten **Fuß-Musterbildungsprozesse**.

1.1.4.2 Ebenen der Musterbildung

Die geschilderten Entwicklungsprozesse sind nicht unabhängig voneinander. So laufen beispielsweise die Gewebeflüsse im adulten Polypen und im Zuge der Knospung (Abb. 1.4 A, B) parallel ab; die Gametogenese findet im Bereich ständig proliferierender Gastralzellen statt.

Transplantations- und Regenerationsstudien belegen eine enge **Verschränkung verschiedener Musterbildungsprozesse** (Schiliro et al., 1999 und Zitate darin; Forman und Javois, 1999). So konnte z.B. gezeigt werden, dass sich Kopf- und Knospenbildung gegenseitig hemmen (Tardent, 1972; Shostak, 1974) und die Fußdifferenzierung durch Signale aus dem Kopf unterstützt wird (Javois und Frazier-Edwards, 1991; Müller, 1995). Diese Befunde unterstützend zeigte die Analyse **subtraktiver cDNA-Bibliotheken** kürzlich, dass sich verschiedene Entwicklungsprozesse auch in unterschiedlichen, genomischen Kontexten abspielen (Augustin, 2004; Genikhovich, 2004), d.h. dass neben einem gemeinsamen molekularen „tool kit“ auch eine **prozessspezifische Genexpression** auftritt.

Im Zuge der **Charakterisierung von Genen**, die an der Entwicklung von *Hydra* beteiligt sind, wurden zahlreiche **konservierte Entwicklungsgene** identifiziert. Neben zahlreichen Homöobox- und anderen Transkriptionsfaktoren (zusammengefasst in Galliot, 2000) fanden sich auch Mitglieder des *Wnt*- (Hobmayer et al., 2000) und *Hedgehog*-Signalweges (Kaloulis und Galliot, 2000) sowie weiterer Signaltransduktionskaskaden (zusammengefasst in Steele, 2002). Überraschend wurde auch eine große Anzahl von **Peptiden**

identifiziert, für die z.T. morphogenetische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Bosch und Fujisawa, 2001; Bosch, 2003). Beispiele sind die Peptide *heady*, für die eine Rolle bei der Determinierung von Kopfstrukturen gezeigt werden konnte (Lohmann und Bosch, 2000) und *Hym346/ pedibin*, das eine wichtige Rolle bei der Fußbildung spielt (s.u.). Durch ihr geringes Molekulargewicht sind diese sezernierten, diffusiblen Moleküle in der Lage, die langreichweitigen Effekte bei der Etablierung der beobachteten **morphogenetischer Gradienten** (s.u.) auszuüben.

Die sich andeutende Vielfalt von Neuro- und Epitheliopeptiden mit einer Rolle bei Musterbildungs- und Zelldifferenzierungsprozessen in *Hydra* war der Ausgangspunkt für das **Hydra-Peptid-Projekt**, im Zuge dessen systematisch Peptide aus *Hydra*-Gewebe isoliert und durch verschiedene Assays auf eine biologische Funktion hin untersucht werden (Takahashi et al., 1997).

Ein Charakteristikum der Entwicklung von *Hydra* und anderen Cnidariern ist also die **konzertierte Aktion** der **Metazoa-weit konservierten Maschinerie** von Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden mit dem **taxonspezifischen Peptid-System** der Cnidarier. Erste Studien auf Transkriptionsebene deuten eine innige Verknüpfung von und Rückkopplungen zwischen beiden Systemen an (s.u.).

Den Peptiden wird dabei auf einer ersten Ebene der Musterbildung die Vermittlung von Positionsinformation zugeschrieben. Diese wird im Anschluss dann von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren interpretiert und in die lokale Aktivierung von Effektorgenen übersetzt, die letztendlich die Morphogenese vermitteln (zusammengefasst in Bosch, 2003).

1.1.4.3 Modelle zur Musterbildung von *Hydra*

Der Erhalt der Gewebepolarität bei Regenerationsversuchen und zahlreiche Transplantationsstudien machten deutlich, dass es (i) entlang der Körperachse von *Hydra* eine gradiert verteilte Eigenschaft gibt, die ein Maximum im Kopf aufweist und verschiedentlich als **Positionswert**, Kopfaktivationspotential oder Quelldichte bezeichnet wurde (Bode, 2003; Berking, 2003). Eine weitere Erkenntnis war (ii), dass **Kopf-** und **Fuß** von *Hydra* **Organisationszentren**

darstellen, von denen eine induktive Wirkung auf umliegendes Gewebe ausgeht.

Auf das **Reaktions-Diffusions-Modell** von Turing (Turing, 1952) aufbauend haben Alfred Gierer und Hans Meinhardt bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts allgemeine Modelle zur Entstehung **selbstorganisierter, morphogenetischer Felder** entwickelt und unter Einbeziehung o.g. Beobachtungen auf Entwicklungsprozesse in *Hydra* angewendet. Das führte zur Formulierung und ständigen Weiterentwicklung eines **theoretischen Modells zur axialen Musterbildung** dieses Modellorganismus, das in verschiedenen Varianten die experimentellen Beobachtungen und Musterbildungsprozesse im Detail zu beschreiben vermag (zusammengefasst in Meinhardt, 1993; Berking, 2003).

Zentraler Bestandteil des Modells sind zwei **Aktivator-Inhibitor-Systeme** (Abb. 1.5), die für die beiden Organisatorregionen **Kopf** und **Fuß** postuliert werden. In diesen Organisatorregionen residiert jeweils ein **Aktivator**, der sich durch lokale **Selbstverstärkung (Autokatalyse)** selbst erhält, aber gleichzeitig die Produktion seines **Inhibitors** initiiert, der durch eine vergleichsweise schnellere Ausbreitung den Aktivator langreichweitig hemmt. Somit entstehen entlang der Körpersäule von *Hydra* **gegenläufige Gradienten von Kopf- und Fußaktivierungspotential**, die über eine dritte Größe, die sog. Queldichte bzw. Positionswert gekoppelt sind und auf diesen rückwirken.

Über die **Identität der Aktivatoren, Inhibitoren** sowie der die **Positionswerte** vermittelnden Moleküle ist bisher wenig bekannt. Die Autoren lassen explizit

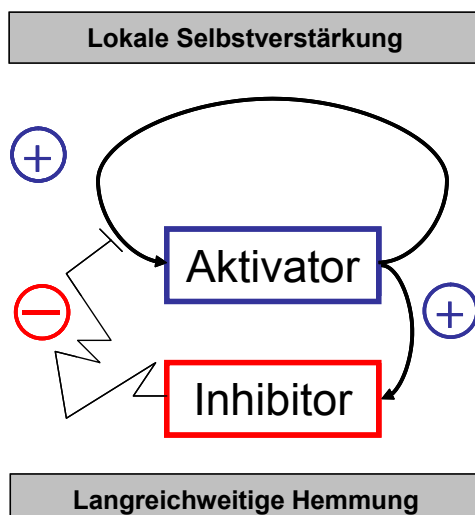


Abb. 1.5: Reaktions-Diffusions-Modelle zur Musterbildung in *Hydra*. Aktivator-Inhibitor-Systeme. Die Prinzipien der lokalen Selbstverstärkung und der langreichweitigen Hemmung.

offen, ob die Konstrukte Aktivator und Inhibitor bzw. die **Prinzipien der lokalen Selbstverstärkung** und der **langreichweitigen Hemmung** durch einzelne, interagierende Moleküle oder aber durch komplexe Signaltransduktionskaskaden realisiert sind (Meinhardt, 2001).

Die Musterbildungsprozesse im Zuge der allgemeinen Homöostase sowie asexueller, sexueller Vermehrung und Regeneration sind in *Hydra* auf **zellulärer und Gewebeebene** gut verstanden. Die Befunde flossen ein in die Formulierung fruchtbarer, **theoretischer Modelle**. Weiterhin konnte eine große Anzahl **konservierter sowie taxonspezifischer Gene** charakterisiert werden, denen, meist aufgrund ihrer räumlich-zeitlichen Expression, bei den beobachteten Prozessen eine wichtige Rolle zugesprochen wird.

Im Zentrum der aktuellen Bemühungen steht die **Integration der vorhandenen Daten zu einem Gesamtbild der Entwicklung von *Hydra***. Ein Ansatz ist der Versuch, aus dem Verständnis der den Entwicklungsprozessen von *Hydra* zu Grunde liegenden genomischen, regulativen Netzwerke heraus die morphologisch-histologischen Befunde zu erklären, die Modelle zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen.

Ausgangspunkt dafür ist die **Analyse der Regulation bekannter Schlüsselgene**, die die **Identifikation** sowohl **ihrer Zielgene** als auch ihnen übergeordneten **Regulatoren** ermöglicht.

1.2 Der Fuß von *Hydra*

Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit für verschiedene im **Fuß** von *Hydra* exprimierte **Entwicklungs-** und **Effektorgene** verfolgt (s.u.).

1.2.1 Dynamik der Fußdifferenzierung

Der Fuß von *Hydra* ist eine von zwei differenzierten Strukturen an den Polen der Körpersäule von *Hydra* (vgl. 1.1.2, Abb. 1.2 A). Verschiedene Aspekte seiner Bildung bzw. Erhaltung sind in Abb. 1.6 zusammengefasst.

Der Fuß umfasst den **Bereich unterhalb der Knospungsregion** und untergliedert sich in den **Stiel**, der v.a. in der Oligactis-Gruppe deutlich ausgeprägt und durch eine Konstriktion von der Gastralregion abgesetzt ist (Abb. 1.3 D, E; Pfeil), und die **Basalscheibe**, eine Haftstruktur, die durch viskose Sekrete den Kontakt zum Substrat vermittelt (Abb. 1.6 A).

Durch die ständige **Proliferation im Gastralbereich** werden **Epithelzellen** im Zuge des normalen Gewebeflusses (s.o.) in den Fußbereich von *Hydra* verschoben (Abb. 1.6 A). Bereits im **Stiel** ändern sie leicht ihre Form; sie werden flacher und weisen, insbesondere im Endoderm, vergleichsweise weniger Granula als im Gastralbereich auf (vgl. Abb. 1.6 B). Der Stiel erscheint in lebenden Hydren dadurch optisch weniger dicht (vgl. Abb. 1.3). Versuche an Explantaten aus verschiedenen Regionen des Stieles belegen, dass die Zellen während ihrer passiven Verschiebung in der Stielregion **graduell** für die Transdifferenzierung zu Basalscheibenzellen **determiniert** werden (Abb. 1.6 A).

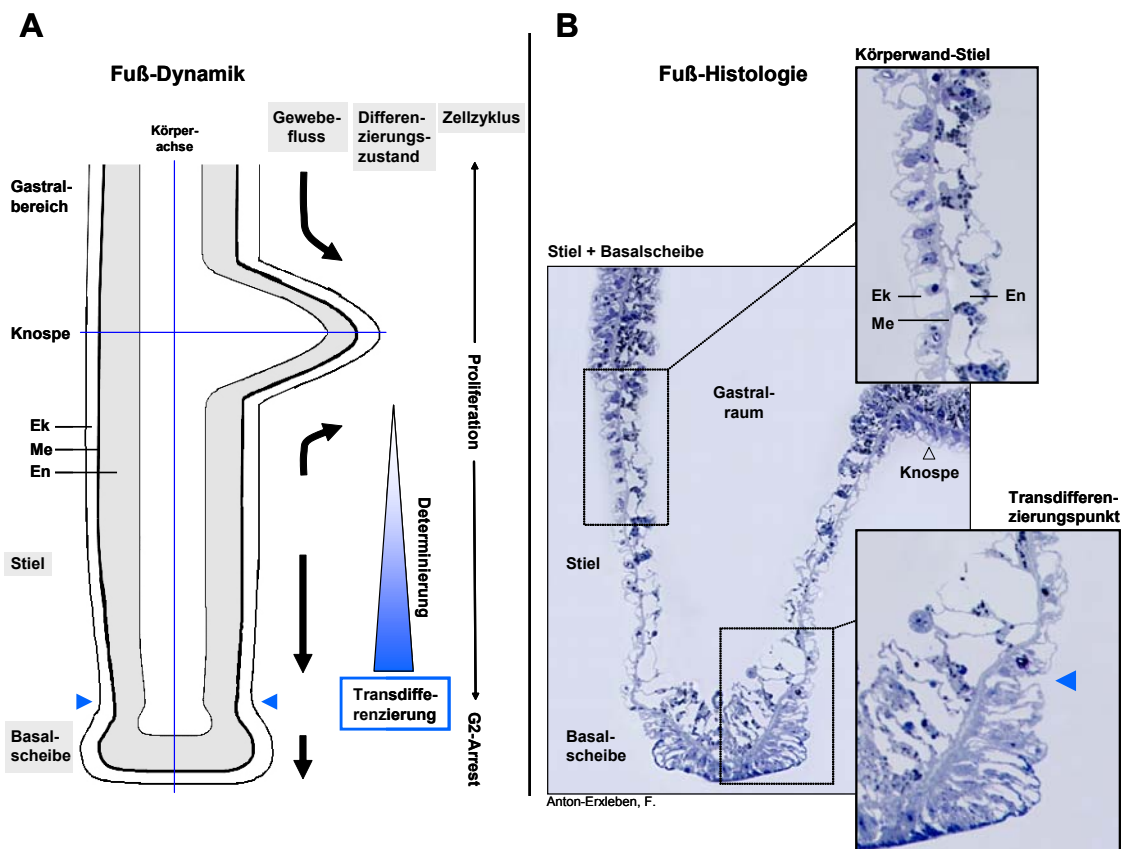


Abb. 1.6: Der Fuß von *Hydra*. (A) Schematische Darstellung. Gewebedynamik, Differenzierungszustände und Zellzyklus. (B) Histologischer, toluidinblaugefärbter Dünnschnitt. Vergrößerungen von Stiel-Körperwand und Transdifferenzierungspunkt. Ek, Ektoderm; Me, Mesoglea; En, Endoderm.

Eine Abkehr von diesem „Zellschicksal“ ist nur Zellen aus dem oberen Stielbereich noch möglich (Kobayakawa und Kodama, 2002). Am in Abb. 1.6 durch blaue Pfeilspitzen dargestellten **Transdifferenzierungspunkt** schließlich machen die Epithelzellen des Ektoderms innerhalb eines letzten Zellzyklus eine drastische Änderung ihrer **Form und Funktion** durch.

Die Epitheliomuskelzellen transdifferenzieren zu **sekretorischen, hochprismatischen Basalscheiben- oder Glandulo-Muskelzellen** (Davis, 1973), für die elektronenmikroskopisch bis zu 6 verschiedene sekretorische Vesikel, gefüllt u.a. mit sauren Mukopolysacchariden, nachgewiesen wurden (Philpott et al., 1966; Davis, 1973). Elektronenmikroskopisch stellt sich die Basalscheibe als metabolisch eine der aktivsten Regionen von *Hydra* dar. Die Sekretion von mukösen Substanzen dient der Befestigung des Polypen am Substrat. Gleichzeitig mit der Transdifferenzierung verlieren die Zellen ihr Teilungsvermögen und werden in der G2-Phase arretiert (Abb. 1.6 A).

Zellmarkierungsexperimente zeigten, dass in der oberen Stielregion markierte Zellen nach durchschnittlich drei Tagen den Transdifferenzierungspunkt erreichen und nach weiteren 5 Tagen im Zentrum der Basalscheibe, am sog. **aboralen Porus**, einer Region, in der sich die extrazelluläre Matrix auflöst (Davis, 1975), abgestoßen werden (Dübel et al., 1987).

Als **Marker** für die Präsenz **terminal differenzierter, ektodermaler Basalscheibenzellen**, haben sich in mehreren Studien **(i)** ein unbekanntes Antigen in mukösen Granula des Basalscheibenektoderms, das durch den monoklonalen **Antikörper AE03** erkannt wird (Amano et al., 1997; Kobayakawa und Kodama, 2002) sowie **(ii)** eine **basalscheibenspezifische Peroxidase** (Hoffmeister und Schaller, 1985), deren Aktivität durch externe „Tracer“ wie z.B. Diaminobenzidin (DAB) visualisiert werden kann, bewährt (s.u.).

In Form von **Nematozyten** und **Nervenzellen** sind auch differenzierte **Derivate der interstitiellen Zelllinie** in der Basalscheibe nachgewiesen worden (Davis und Bursztajn, 1973). Nervenzellen ändern am Transdifferenzierungspunkt ebenfalls ihr Genexpressionsmuster, was sich im Fehlen von Transkripten bzw. Antigenen einer Reihe von Neuropeptiden in der Basalscheibe äußert (Yum et al., 1998a; zusammengefasst in Koizumi et al., 2004).

Der **Fuß von Hydra** ist eine dynamische Struktur, in der ständig Zellbewegungen, -determinierungen und -transdifferenzierungen stattfinden (Abb. 1.6). Der kontinuierliche „Zell-Turnover“ sowie die Erhaltung der Körperproportionen, kurz, die Homöostase des Fußes von *Hydra* bedarf einer strikten Regulierung im Sinne eines regulativen Netzwerkes.

1.2.2 Ebenen der Fußmusterbildung am Beispiel der Regeneration

Einen Überblick über **Gene mit bekannter, fußspezifischer Expression** sowie ihre **Rolle bei Fußdifferenzierungsprozessen** gibt das in Abb. 1.7 dargestellte, schematische Genexpressionprofil bei Fuß-Regenerationsversuchen.

Entfernt man den Fuß eines Polypen durch einen Schnitt über der Stielregion, so lassen sich verschiedene Phasen der Genaktivierung unterscheiden.

Die aufeinander folgenden **Wellen „sofortiger“, „früher“, „früh/später“ und „später“ Genaktivierung**, die sich in ähnlicher Form auch bei der

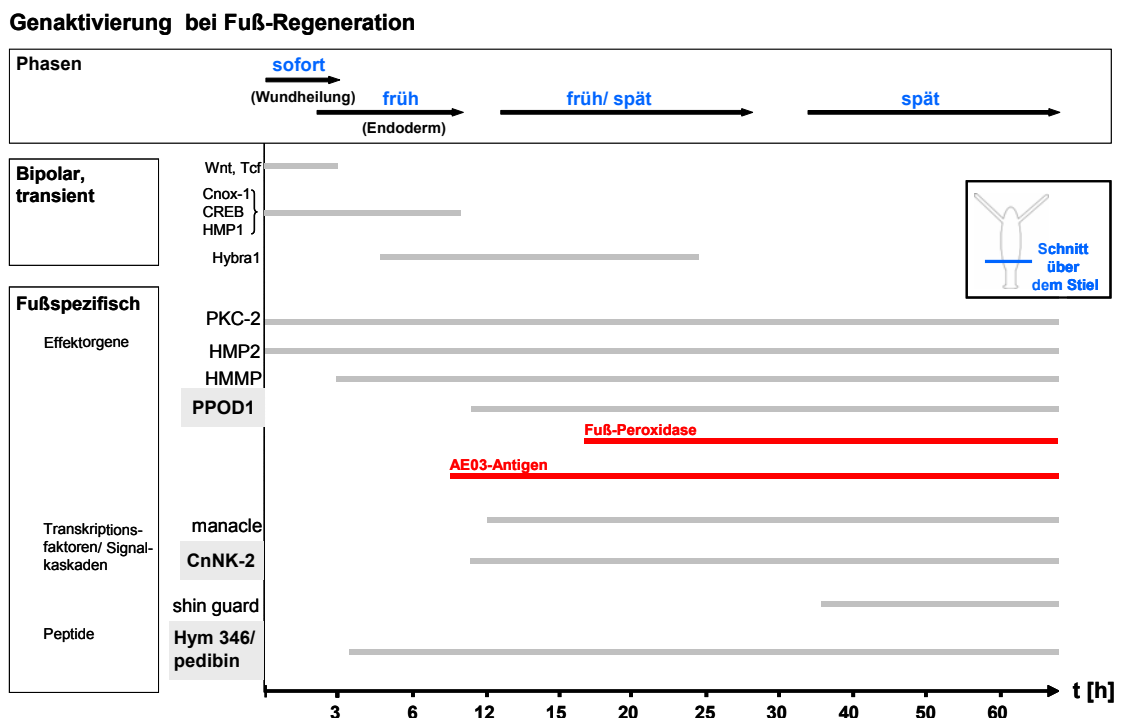


Abb. 1.7: Fuß-Regeneration (molekular). Wellenförmige Aktivierung von Genen im Zuge von Wundheilung, Musterbildung und Transdifferenzierung. Rote Balken, Basalscheiben-Marker. (verändert nach Galliot und Schmid, 2003).

Regeneration vom Kopf beobachten lassen, korrelieren mit Phasen der **Wundheilung**, der **Etablierung eines Organisators** sowie der Differenzierung bzw. der **Morphogenese** der verlorenen Strukturen (Galliot und Schmid, 2002).

Sofort nach der Amputation des Fußes zeigen die Metalloprotease *HMP2* (Yan et al., 2000a) und die Protein-Kinase *PKC-2* (Hassel et al., 1998) eine Modulation, die im Zusammenhang mit der im Zuge des **Wundverschlusses** stattfindenden Wiederherstellung der extrazellulären Matrix gesehen wird.

Unter den „sofort“ und „früh“ aktivierten Genen im regenerierenden Stumpf ist eine Reihe von Genen, die ausschließlich im Zuge der Regeneration eine transiente Expression im Fuß, im Zuge der konstanten Musterbildung im adulten Polypen hingegen eine kopfspezifische Expression zeigen. Unter diesen **bipolar-transient exprimierten Genen** ist eine weitere Metalloprotease (*HMP1*, Yan et al., 2000b), Gene der *Wnt*-Signalkaskade (*Wnt*, *Tcf*, Hobmayer et al., 2000) und die Transkriptionsfaktoren *Hybra1* (Technau und Bode, 1999), *Cnox-1* (Gauchat et al., 2000) und *CREB* (Kaloulis, persönliche Mitteilung). In den frühesten Stadien der Regeneration wird offenbar bei Kopf- und Fuß-Regenerationsprozessen auf ein gemeinsames „tool kit“ zurückgegriffen.

Eines der ersten fußspezifisch aktivierten Gene ist das **Peptid *Hym 346/pedibin***, für das eine Beschleunigung der Regeneration von Fußstrukturen sowie eine Steigerung des Fußbildungspotentials im Gewebe nachgewiesen werden konnte (Hoffmeister, 1996). Für zwei weitere Peptide, *Hym 194* (Epp, persönliche Mitteilung) und *Hym 323* (Harafuji et al., 2001), ist ebenfalls eine Beteiligung an der Fußdifferenzierung gezeigt worden. Ihr Expressionsmuster im Zuge der Fußregeneration ist bisher jedoch noch nicht bestimmt worden.

Auf der Ebene der bekannten fußspezifischen Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden zeigen die Homöobox-Transkriptionsfaktoren ***CnNK-2*** (Grens et al., 1996) und *manacle* (Bridge, 2000) die früheste Modulation (s.u.).

Parallel dazu bzw. wenig später setzt die Expression der beiden zuvor geschilderten **Marker** für ektodermale Basalscheibenzellen ein (s.o.), Ausdruck der einsetzenden Transdifferenzierungsereignisse zur Wiederherstellung der Basalscheibe. Nach ca. 48 h ist die Regeneration auch makroskopisch sichtbar abgeschlossen.

Auch für die **Fußdifferenzierung**, hier am Beispiel der Regeneration gezeigt, zeichnet sich das Bild einer **Hierarchie von musterbildenden Prozessen** ab (vgl. 1.1.4.2), in der **Peptide** Zellen früh Positionsinformation verleihen, die dann, vermittelt durch **Transkriptionsfaktoren**, in die Aktivität von **Effektorgenen** übersetzt wird.

1.2.3 Die Fußperoxidase und PPOD1

Ein verlässlicher, **biochemischer Marker für ausdifferenzierte Basalscheibenzellen** ist die fußspezifische Peroxidase, die durch die externe Applikation von Peroxidase-„Tracern“ wie Diaminobenzidin (DAB) visualisiert werden kann (Abb.1.8 B, Hoffmeister und Schaller, 1985).

Das **korrespondierende Enzym** wurde kürzlich über diese Aktivität isoliert und als 43 - 45 kDa großes Protein mit einem Aktivitätsoptimum von pH 4,5 charakterisiert (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Das saure Optimum sprach für eine **Kompartimentierung**, die durch subzelluläre Lokalisation der Aktivität in Vesikeln bestätigt werden konnte. Auf der Basis der Sequenz von durch Trypsinverdau erhaltener Proteinfragmente wurden voll degenerierte Primer entworfen. Durch RT-PCR mit *H.vulgaris* (Basel) cDNA und anschließende RACEs wurden cDNA-Sequenzen für **zwei homologe Gene** identifiziert, *PPOD1* und *PPOD2* (PPOD = „putative peroxidase“), die auf Ebene der

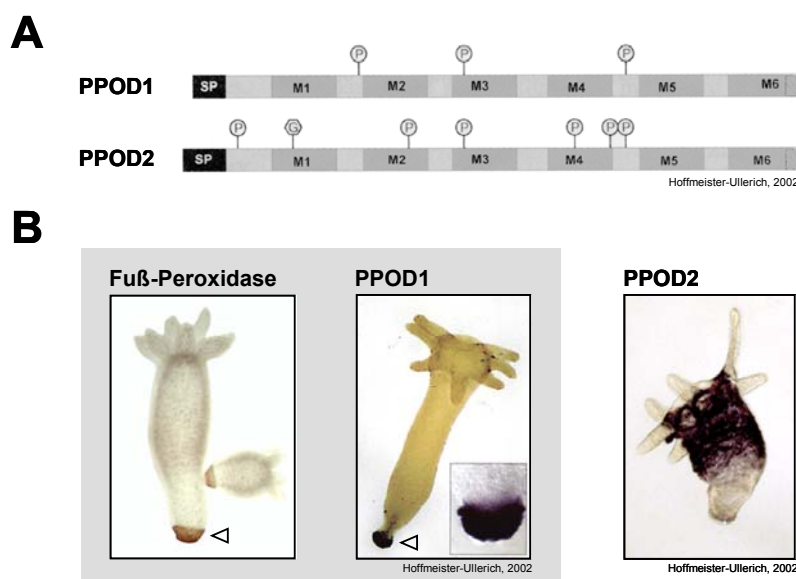


Abb. 1.8: Die Fußperoxidase und PPOD-Gene. (A) Schematische Darstellung der PPOD1- und PPOD2-Struktur. (B) Fuß-Peroxidase-Aktivität, visualisiert durch DAB, und *PPOD1*- und *PPOD2*-Expressionsmuster. *In situ* Hybridisierung.

Aminosäuren beide die zur Generierung der Primer verwendeten, tryptischen Fragmente aufwiesen.

Beide zeigten im **Northern Blot** eine Transkriptgröße von ca. 1,2 kbp. Im kodierenden Bereich der cDNA ergab sich eine 80 %-ige Identität. Die **Strukturen** der daraus abgeleiteten **Proteinsequenzen**, die zu 75 % übereinstimmen, sind in Abb. 1.8 A dargestellt. Für beide Proteine wird ein N-terminales Signalpeptid vorausgesagt; sie zeigen eine modulare Struktur mit sechs jeweils 34 Aminosäuren umfassenden Modulen.

Eine **Expressionsanalyse** durch *in situ* Hybridisierung zeigte, dass die räumlich-zeitliche Expression von *PPOD1* mit der bekannten Peroxidase-Aktivität in der Basalscheibe korrespondiert (Abb. 1.8 B), wohingegen *PPOD2* eine nahezu komplementäre Expression im Rumpf von *Hydra* zeigte.

Die Identifizierung von zwei **Isoformen** einer Familie von Effektorgenen mit stark divergenten Expressionsmustern im Fußbereich von *Hydra* war überraschend und wies auf eine **differentielle Regulation** ihrer Mitglieder **im Zuge der Fußdifferenzierung** hin. Eine Charakterisierung dieser Genfamilie und der Regulation ihrer Mitglieder in *Hydra*, d.h. (i) die Identifizierung weiterer Mitglieder in *H.vulgaris* (Basel) sowie (ii) das Nachzeichnen ihrer Evolution im Zuge der Phylogenie von *Hydra* durch die Einbeziehung weiterer Arten, versprach Einblicke in die **differentielle Genexpression bei Fußmusterbildungsprozessen**.

1.2.4 CnNK-2, ein zentraler Transkriptionsfaktor?

CnNK-2 ist ein **Homöobox-Transkriptionsfaktor** der **NK-2-Klasse**. Er zeigt innerhalb der DNA-bindenden Homöodomäne auf Aminosäureebene eine 70 %ige Übereinstimmung mit *Nkx2.5* (*Mus musculus*).

Seine Expression ist auf das Endoderm der Stielregion von *Hydra* beschränkt (Abb. 1.9 A, Grens et al., 1996), das Endoderm der Basalscheibe bleibt frei von *CnNK-2*-Transkripten. Die Expression ist in *H.vulgaris* (Basel) in der unteren Stielregion am stärksten und lässt eine gradierte Verteilung bis zur Knospungsregion erkennen.

Eine Reihe von Beobachtungen sprechen für eine wichtige Rolle von *CnNK-2* bei Fußdifferenzierungsereignissen in *Hydra*:

- (i) **Die Expression von *CnNK-2* geht der Differenzierung von Basalscheibenzellen stets voraus.** Das gilt zunächst für die konstante Musterbildung, bei der endodermale Epithelzellen im Bereich der Knospungsregion beginnen das Gen zu exprimieren bevor sie am Transdifferenzierungspunkt ihre Gestalt und Funktion ändern (vgl. Abb. 1.6 A). Frühe **Knospen** sind frei von Transkript (vgl. Abb. 1.9 A); offenbar wird das Gen im Zuge der asexuellen Vermehrung, bei der sich Kopfstrukturen in unmittelbarer Nähe zum parentalen Fuß entwickeln, negativ reguliert. Weiterhin wird es früh im Zuge der **Fuß-Regeneration** exprimiert (Abb. 1.7).

- (ii) **Die Anwesenheit von *CnNK-2* Transkripten korreliert mit der Fähigkeit zur Regeneration.** Die Geschwindigkeit der Fuß-Regeneration variiert in Abhängigkeit von der Schnitthöhe, d.h. das sie bei Amputation a) der Basalscheibe oder b) der gesamten Stielregion in ersterem Falle schneller abgeschlossen ist. Diese Beobachtung korreliert mit einem früheren Einsetzen der *CnNK-2*-Expression im regenerierenden Stumpf. Wird der Schnitt außerhalb der ursprünglichen *CnNK-2*-Expression (vgl. Abb. 1.9 A) im mittleren bis oberen Gastralbereich gesetzt, so findet keine Fußregeneration statt.

Eine interessante Beobachtung ist auch die Tatsache, dass das vergleichsweise schlechte Fuß-Regenerationsvermögen von *H. oligactis* (Hoffmeister, 1991) mit einer strikt auf den unteren Stielbereich beschränkten und im Zuge der Regeneration verzögert einsetzenden *CnNK-2*-Expression korreliert (Grens et al., 1996).

Die Expression von *CnNK-2* ist gekoppelt an den gradiert verteilten Positionswert entlang der Körperachse von *Hydra*. Die Positionswerte im Gewebe von *Hydra* lassen sich durch chemische Interferenz manipulieren. So belegen Transplantationsstudien, dass eine Inkubation von Polypen in **LiCl** diesen erniedrigt, was zu einer

„**Verfußung**“ des Gewebes führt (Hassel et al., 1993). Alternativ wird diese Behandlung auch als Störung des Wnt-Signalweges durch eine Hemmung der GSK-3-Kinase interpretiert (Klein und Melton, 1996). Die Inkubation mit LiCl führt zu einer Aufregulierung der *CnNK-2*-Expression und zu einer Verschiebung seiner Expression in den Gastralbereich (Abb. 1.9 B, rote Pfeilspitzen).

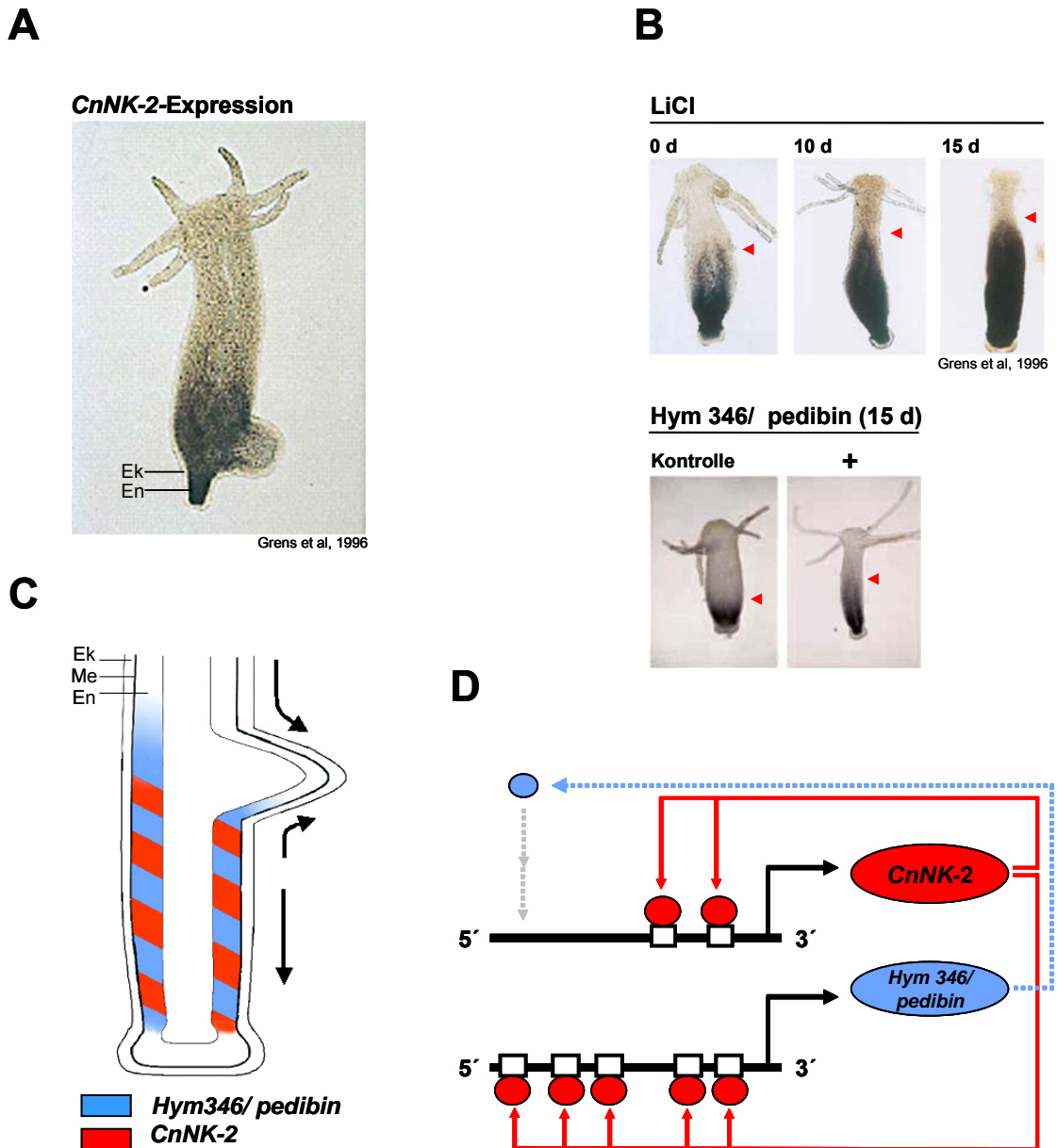


Abb. 1.9: *CnNK-2*, ein Transkriptionsfaktor im Fuß von *Hydra*. (A) Endodermale Expression. *In situ* Hybridisierung. (B) Kopplung der Expression an den Positionswert. Veränderung des Expressionsmusters durch *Hym 346/ pedibin* und LiCl. Pfeilspitze, Obergrenze der *CnNK-2*-Expression. (C) Synexpression von *CnNK-2* und *Hym 346/ pedibin*. Schematisch. (D) Regulierung der *CnNK-2*-Transkription: Autoregulation und Interaktion mit *Hym 346/ pedibin* (C, D, verändert aus Thomsen et al., 2004). Ek, Ektoderm; Me, Mesogloea; En, Endoderm.

Eine Erhöhung des Positionswertes („**Verkopfung**“) wird durch eine Inkubation mit **Diacylglycerol (DAG)** erreicht, was mit einer Wirkung entweder auf den Phosphatidyl-Inositol-Zyklus bzw. einer Aktivierung von Proteinase C in Verbindung gebracht wird (Muller, 1990; Hassel et al., 1998). Die Domäne der *CnNK-2*-Expression verkleinert sich durch DAG um ca. 50 % und beschränkt sich auf die untere Stielregion (Grens et al., 1996).

Die ***CnNK-2*-Expression** ist also zusammenfassend **negativ mit dem gradierten Positionswert**, der ein Maximum im Kopf aufweist, **korreliert**.

- (iii) ***CnNK-2* hat autoregulative Eigenschaften und interagiert mit einem morphogenetisch aktiven Peptid.** Eine Erniedrigung des Positionswertes wurde auch für das **Peptid *Hym 346/ pedibin*** nachgewiesen (Hoffmeister, 1996). Wie für die LiCl beobachtet (s.o.), so führt auch die Inkubation von Polypen in synthetischem Peptid zu einer Verschiebung der *CnNK-2*-Expression in den Gastralbereich (Abb. 1.8 B, Grens et al., 1999). Die molekulare Basis der vermutlich rezeptorvermittelten Änderung der *CnNK-2*-Expression durch das mit ihm im Stiel von *Hydra* synexprimierte Peptid (Abb. 1.9 C) ist bisher nicht bekannt (Abb. 1.9 D). Bei Regenerationsprozessen setzt die Expression des Peptides vor der von *CnNK-2* ein (Abb. 1.7).

Eine Studie zur Regulation von ***CnNK-2*** belegte kürzlich *in vitro* die Bindung des Transkriptionsfaktors an Motive in seiner 5'-flankierenden Sequenz (Abb. 1.9 D), was für einen **autoregulativen Mechanismus** spricht. Weiterhin konnte ***Hym 346/ pedibin* als Zielgen** von *CnNK-2* identifiziert werden (Thomsen et al., 2004).

Offenbar üben sowohl der Transkriptionsfaktor also auch das Peptid wichtige Funktionen bei Fußdifferenzierungsprozessen aus. Die Ergebnisse von Regenerationsexperimenten (Abb. 1.7), der Expression von *CnNK-2* (s.o.) sowie die Studie zu seiner Regulation auf Transkriptionsebene führten zur Aufstellung des in Abb. 1.9 D dargestellten Modells: Die Ausschüttung von ***Hym 346/ pedibin*** verleiht nach dem Modell Zellen, die im Zuge des Gewebeflusses in die Stielregion verschoben werden (Abb. 1.6 A), **Positionsinformation** und

induziert die Expression von **CnNK-2**. Dieses erhält fortan seine Expression durch eine **autoregulatorische Schleife** und wirkt auf Transkriptionsebene auf die Expression des Peptides zurück.

Eine weitere **Analyse der Regulation von CnNK-2** und die Identifizierung weiterer Zielgene verspricht ein vertieftes Verständnis der Fußentwicklung von *Hydra*.

1.3 Ziele dieser Arbeit

In zwei Projekten wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die molekularen Erkenntnisse zur Fußbildung von *Hydra* zu erweitern.

(1) Auf der Ebene der die Fußmorphogenese vermittelnden Effektorgene sollte die Familie der **PPOD-Gene**, für die in *H.vulgaris* (Basel) zwei Isoformen mit differentieller Regulation beschrieben waren (Abb. 1.8), in verschiedenen *Hydra*-Arten charakterisiert werden. Das Studium der sich andeutenden Genfamilie versprach Einblicke in die differentielle Genexpression bei Fuß-Musterbildungsprozessen.

(2) In einem zweiten Projekt sollte ein kürzlich vorgestelltes Modell zur Regulation von **CnNK-2** (Abb. 1.9 D), einem im Endoderm der Fußregion von *Hydra* exprimierten Transkriptionsfaktor, für den eine wichtige Rolle bei Fußdifferenzierungsereignissen belegt ist, um weitere Mitglieder bzw. Konnektivitäten erweitert werden.

2 Ergebnisse

2.1 PPOD-Gene in der Gattung *Hydra*

Das erste Projekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der fußspezifischen Peroxidase von *Hydra*, einem biochemischen Marker für terminal differenzierte Fuß-, bzw. Basalscheibenzellen (Hoffmeister und Schaller, 1985), der in vielen Studien zur Fußentwicklung von *Hydra* Verwendung gefunden hat. Über diese fußspezifische Aktivität wurde kürzlich ein Protein isoliert. Das dazu korrespondierende Gen, *PPOD1*, kodiert offenbar für die bekannte Peroxidase und weist ein Homolog mit komplementärer Expression im Rumpf von *Hydra* auf. Ziel des Projektes war eine Charakterisierung der sich andeutenden Familie von homologen, differentiell regulierten PPOD-Genen in verschiedenen *Hydra*-Spezies bzw. -Stämmen um (i) die Evolution dieser Markergenfamilie in der Gattung *Hydra* nachzuvollziehen und (ii) Einblicke in die differentielle Genexpression bei Fuß-Musterbildungsprozessen in *Hydra* zu erhalten.

2.1.1 Die Fuß-Peroxidase und PPOD-Gene in *Hydra*

2.1.1.1 Systematische Einordnung verwendeter *Hydra*-Kulturen

Zunächst sollten verschiedene *Hydra*-Spezies und -Stämme auf die Anwesenheit der fußspezifischen Peroxidase überprüft werden. Die verwendeten Kulturen zeigten den jeweils arttypischen Habitus und die charakteristische Art der Tentakelbildung während der Knospung. Ein sicheres differentialdiagnostisches Merkmal für die Einordnung von Hydren in die systematischen Großgruppen (Vulgaris-, Oligactis-, Circumcincta- und Viridis-Gruppe,) ist die Morphologie der holotrichen Isorhizen. Die Kulturen aller verwendeten Arten zeigten die jeweils gruppentypische Morphologie dieses Nematocyten Typs (Abb. 2.1). Die Überprüfung der systematischen Zugehörigkeit der verwendeten Kulturen war notwendig, um auf molekularer Ebene festgestellte Unterschiede sicher verschiedenen Arten bzw. Stämmen der Gattung *Hydra* zuordnen zu können.

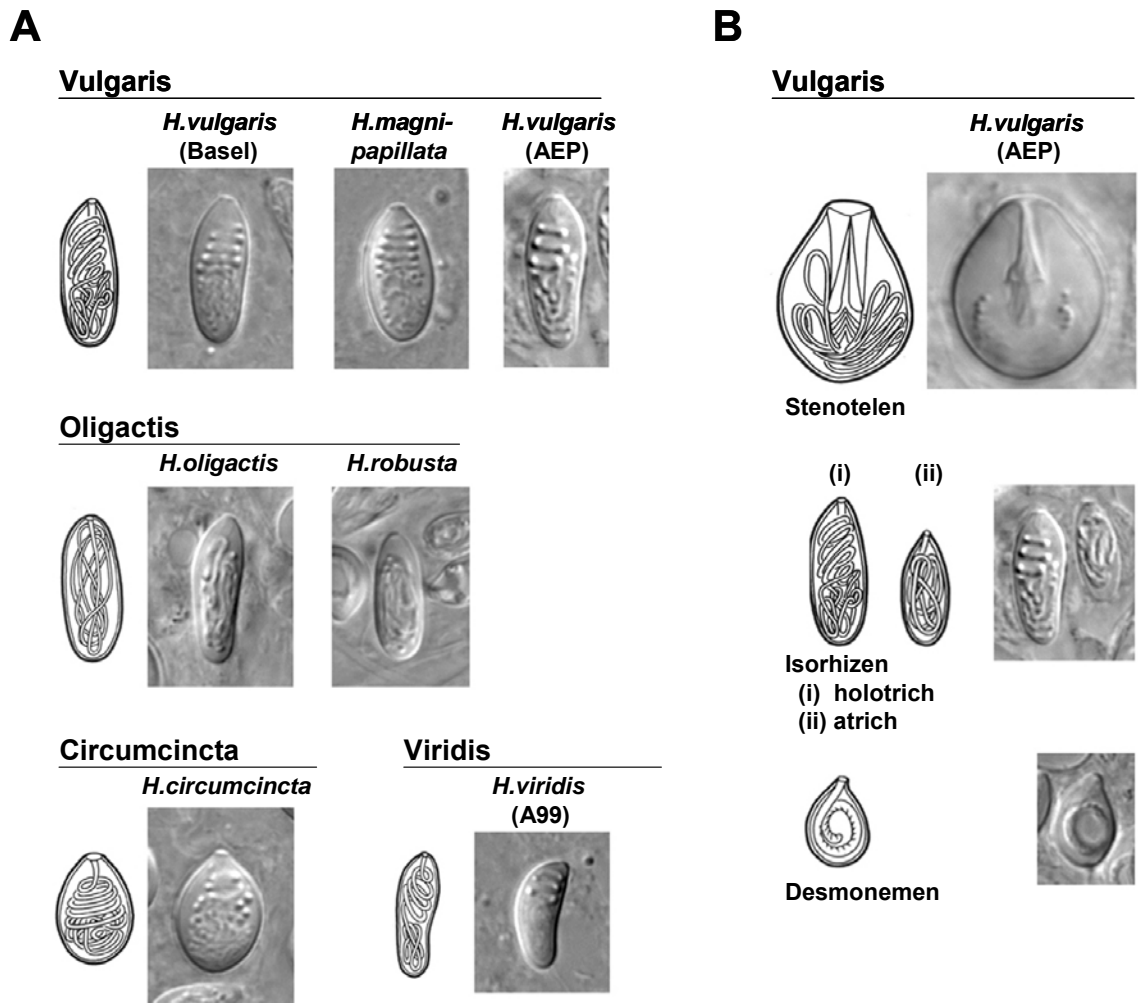


Abb. 2.1: Dokumentation der Artzugehörigkeit verwendeter *Hydra*-Kulturen. (A) Morphologie der holotrichen Isorhizen. **(B)** Das Cnidom (Nesselzellausstattung) von *H. vulgaris* (AEP). Interferenzkontrast an Lebendpräparaten; Vergrößerung x 1000. (schematische Nematocyten darstellungen aus Holstein, 1995).

Insbesondere entsprachen die Nesselzellen von *H. vulgaris* (AEP), einem Stamm, der durch Kreuzung von nordamerikanischen Arten der Vulgaris-Gruppe entstanden ist und wegen seiner induzierbaren Gametogenese gehalten wird (Martin et al., 1997), in allen Nematocyten-Subtypen dem Vulgaris-Typ (Abb. 2.1 B).

Dieser Stamm zeigte später auf molekularer Ebene deutliche Abweichungen im Vergleich zu anderen Arten der Vulgaris-Gruppe.

2.1.1.2 Peroxidase-Aktivitäten in *Hydra*

Mit allen Arten wurde der bekannte **Peroxidase-Assay** durchgeführt (Abb. 2.2).

Die **fußspezifische Peroxidaseaktivität in der Basalscheibe**, biochemischer Ausdruck der *PPOD1*-Expression, trat in allen betrachteten Spezies auf. Das sprach für die Präsenz von PPOD-Genen in allen Arten der Gattung und weiterhin für eine Expression dieser im Fuß. Am Beispiel von *H.circumcincta* ist gezeigt, dass die Peroxidaseaktivität und somit das Auftreten ausdifferenzierter Basalscheibenzellen erst in späten Stadien der Knospung, kurz vor der Ablösung vom Muttertier, einsetzt.

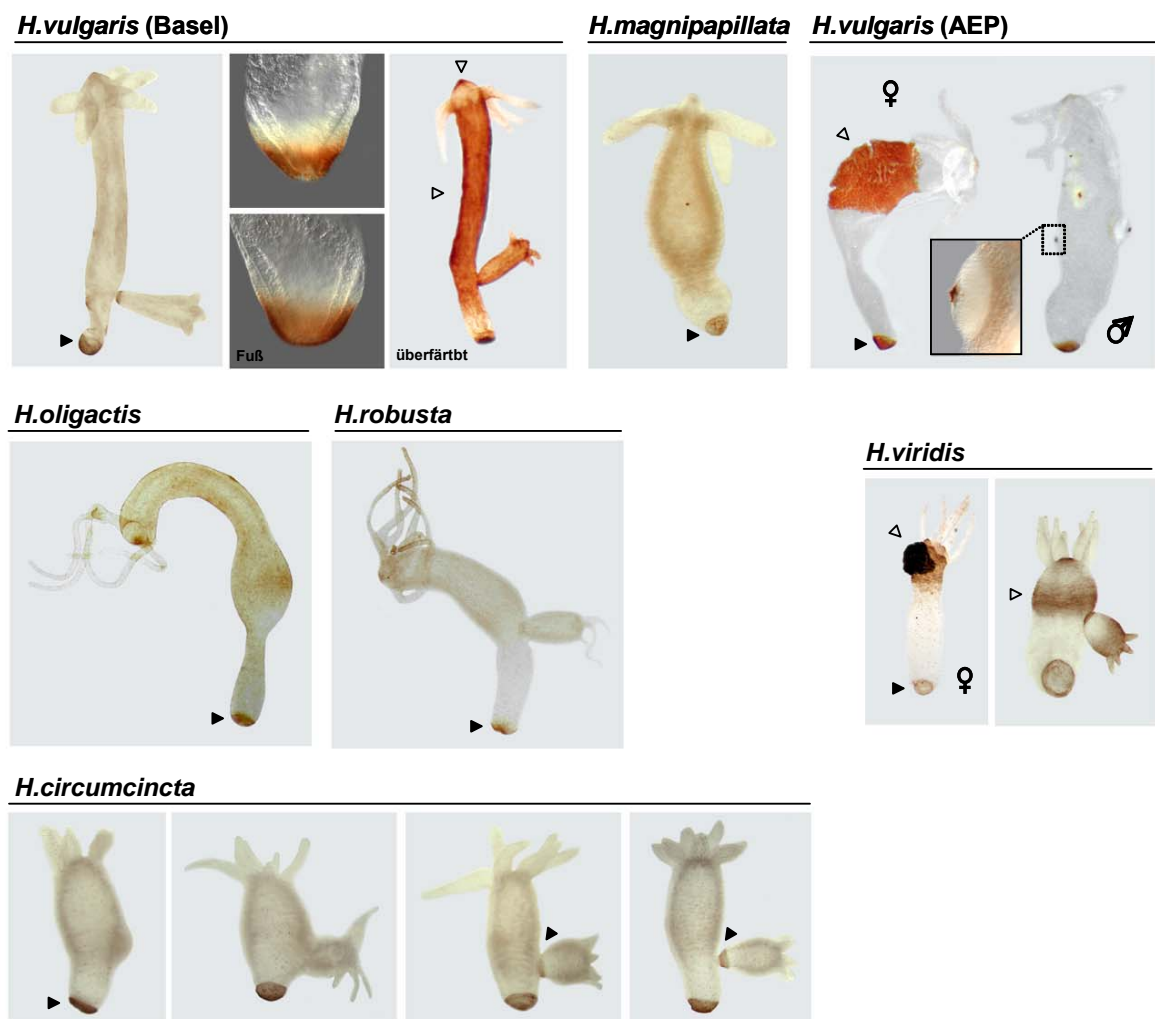


Abb. 2.2: Peroxidaseaktivitäten in knospenden und sexuellen Hydren. Die fußspezifische Peroxidaseaktivität tritt in allen betrachteten Spezies auf (gefüllte Pfeilspitzen). Offene Pfeilspitzen, andere Peroxidaseaktivitäten.

Unter anderem bei Überfärbung traten in asexuellen Tieren aller Spezies schwache Peroxidaseaktivitäten auch im **Gastralbereich** und im **Hypostom** auf (hier gezeigt für *H.vulgaris* (Basel), *H.viridis*).

Sexuelle Tiere zeigten zusätzlich zu der fußspezifischen eine starke Aktivität in sich entwickelnden **Oozyten** bzw. den Spitzen der **Hoden**. Erstere residiert in den von der sich entwickelnden Oocyte phagozytierten Endocyten. Für diese Peroxidaseaktivität wird eine Rolle bei der Verhinderung der Apoptose von Endocyten diskutiert (Technau et al., 2003).

2.1.1.3 Genomische Komplexität und Expression von PPOD-Genen in verschiedenen *Hydra*-Spezies

Um einen ersten Eindruck von der genomischen Komplexität der PPOD-Genfamilie und der Expression ihrer Mitglieder in den verschiedenen Arten zu erhalten, wurden unter wenig stringenten Bedingungen ein Southern Blot und ein Northern Blot mit Nukleinsäuren verschiedener Spezies unter Verwendung der bekannten *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1*- und *PPOD2*- Sequenzen als Probe durchgeführt (Abb. 2.3).

Der **Southern Blot** zeigte für zwei verschiedene Restriktionen ein bis zwei PPOD-Signale für *H.circumcincta*, zwei für *H.oligactis* und *H.vulgaris* (AEP) sowie mehr als 10 für *H.vulgaris* (Basel) (Abb. 2.3 A). Die **genomische Komplexität** der Genfamilie variiert also stark in verschiedenen Spezies.

Der **Northern Blot** zeigte für alle Spezies Signale im Größenbereich der bekannten *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1*- und *PPOD2*-Transkripte (Abb. 2.3 B, Pfeilspitze). In den Arten *H.vulgaris* (Basel), *H.magnipapillata* sowie in *H.viridis* wurden auch Transkripte abweichender Größe detektiert. Die Beobachtungen zeigten, dass die genomisch in den verschiedenen Arten nachgewiesenen PPOD-Gene auch exprimiert wurden. Das Fehlen bzw. die schwächere Ausprägung von PPOD-Signalen im Rumpf einiger Arten deutete unterschiedliche Expressionsmuster von PPOD-Genen an.

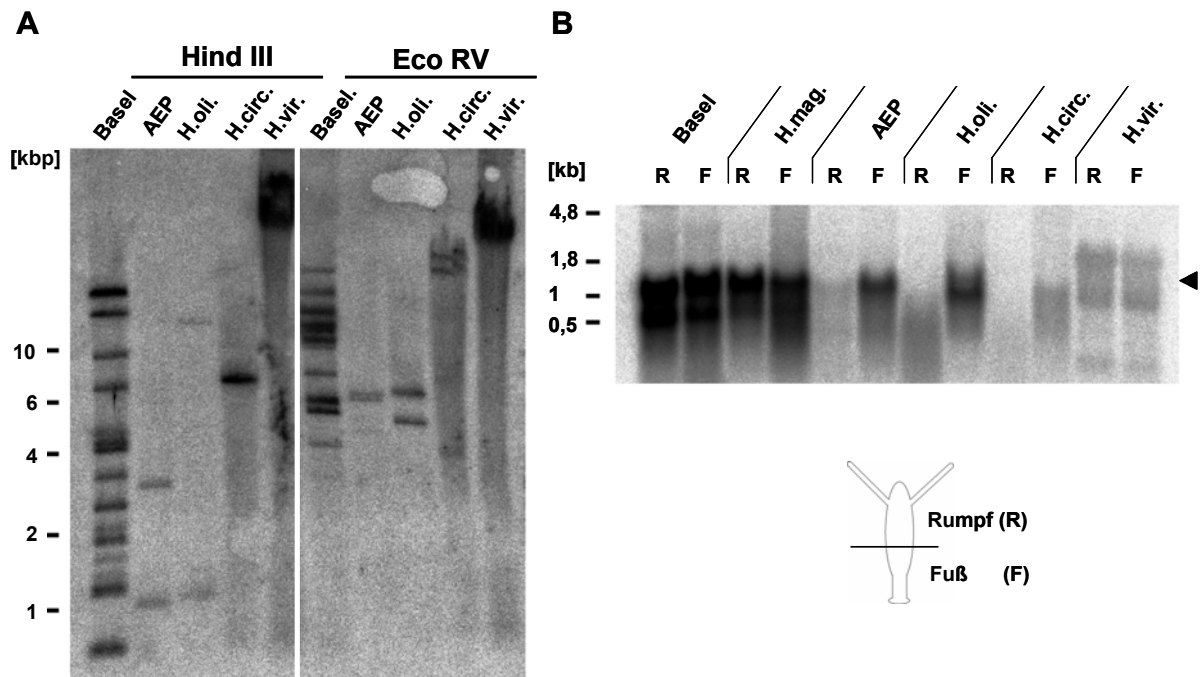


Abb. 2.3: Genomische Komplexität der PPOD-Genfamilie in *Hydra* und differentielle Expression von PPOD-Genen. (A) Southern Blot. Genomische DNA verschiedener *Hydra*-Spezies wurde verdaut, separiert, geblottet und mit einer genomischen, intronlosen Probe gegen die Exons 2 der *H. vulgaris* (Basel) *PPOD1*- und -2 Gene hybridisiert. **(B)** Northern Blot mit totaler RNA aus Rumpf-/ Fußgewebe und *H. vulgaris* (Basel) *PPOD1*- und -2 „full length“ cDNA als Probe. Die Äquilibration der Filter ist nicht gezeigt. Basel= *H. vulgaris* (Basel); AEP = *H. vulgaris* (AEP); Pfeilspitze: Größe der bekannten *H. vulgaris* (Basel) *PPOD1* und -2 Transkripte (ca. 1,2 kb).

Die ersten Experimente zeichneten somit für die **PPOD-Gene in *Hydra*** das Bild einer im Laufe der Evolution (vgl. Abb. 1.1 B) genomisch an Komplexität zunehmenden Genfamilie mit unterschiedlicher Expression in verschiedenen Arten.

In einem zweiten Schritt wurden genomische und cDNA-Sequenzen von bekannten und neuen PPOD-Genen aus verschiedenen Arten isoliert und analysiert.

2.1.2 „Homologue Hunting“ nach PPOD-Genen in *Hydra*: Ergebnisse und Sequenzanalyse

cDNA-Sequenzen für PPOD-Gene aus verschiedenen *Hydra*-Spezies wurden durch RT-PCR entweder mit homologen oder aber heterologen Primern gegen in *H. vulgaris* (Basel) *PPOD1* und *PPOD2* konservierte Regionen erhalten. Durch Klonierung und Sequenzierung von spezifischen Fragmenten sowie

anschließende 5'- und 3'-RACEs wurden vollständige cDNA-Sequenzen erhalten. Weiterhin wurde eine *H.magnipapillata* EST-Datenbank nach PPOD-Genen durchsucht. Die so gewonnenen bzw. identifizierten cDNA- sowie daraus abgeleiteten Proteinsequenzen für PPOD-Gene finden sich einschließlich diverser Sequenzvergleiche im Anhang.

Genomische Sequenzen wurden ebenfalls über einen PCR-basierten Ansatz isoliert. Dabei wurde genomische DNA zunächst mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend wurden Adapter ligiert und in einer PCR genspezifische mit adapterspezifischen Primern kombiniert. Auf diesem Wege konnten von bekannten, kodierenden Bereichen ausgehend unbekannte genomische Sequenzen isoliert, die Exon-Intron-Strukturen verschiedener PPOD-Gene in *H.vulgaris* (Basel) aufgeklärt sowie 5'-flankierende Sequenzen von PPOD-Genen in *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* isoliert werden. Die isolierten und für die Analysen verwendeten genomischen Sequenzen finden sich ebenfalls im Anhang.

PPOD-Gen	Anzahl der ESTs im Cluster	Identität zu <i>H.vulgaris</i> (Basel)-Homolog in kodierender Sequenz [%]	Bestätigung durch RT-PCR und Klonierung
PPOD1	36	90	+
PPOD2	60	> 99	+
PPOD2-short (splicing-Variante)	19	> 99	+
PPOD2-like	128	n.b.	+

Tab. 2.1: PPOD-EST-Cluster aus *H.magnipapillata*. Ca. 110.000 *H.magnipapillata*-ESTs wurden mit dem BLAST N Algorithmus mit der *H.vulgaris* (Basel) PPOD1 cDNA-Sequenz verglichen. Ca. 500 Treffer mit einem Expect-Wert von $< e^{-20}$ wurden mit dem Programm TGICL geclustert. Es ergaben sich 4 Cluster mit mehr als 3 ESTs. n.b., nicht bestimmt.

Die publizierten **PPOD-cDNA-Sequenzen** aus *H.vulgaris* (Basel) für *PPOD1* und *PPOD2* konnten durch RT-PCR und Reklonierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse von ca. 110.000 Sequenzen einer *H.magnipapillata*-EST-Datenbank („Expressed Sequence Tags“) zeigte vier Cluster von PPOD-Genen in dieser Spezies (Tab. 2.1).

Die ersten beiden Cluster sind den aus *H.vulgaris* (Basel) bekannten *PPOD1*- und *PPOD2*-Genen zuzuordnen. Die cDNA-Sequenz von *PPOD2* ist in beiden Spezies annähernd identisch. In den *PPOD1*-Sequenzen zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Homologie beider *PPOD1*-Gene konnte später durch *in situ* Hybridisierung belegt werden (s. Abb. 2.10).

Neben den bis dato bekannten traten auch zwei unbekannte Transkripte auf. Das *PPOD2*-short-Cluster ist mit den *PPOD2*-Genen aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* sowohl in der kodierenden Region als auch in den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen identisch (Abb. 8.2) und stellt offenbar eine kürzere Splicing-Variante desselben dar. Mit einer Länge von ca. 650 bp erklärt es für *H.magnipapillata* und *H.vulgaris* (Basel) die Detektion von PPOD-Transkripten in diesem Größenbereich im Northern Blot (s. Abb. 2.3 B, vgl. Abb. 2.10). In beiden Spezies konnte die Splicing-Variante auch durch RT-PCR und Klonierung nachgewiesen werden. Das *PPOD2*-like-Cluster zeigt eine nahe Verwandtschaft zu *PPOD2* (vgl. Abb. 2.5 A); das Transkript wurde durch Reklonierung in einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt. Das korrespondierende Protein steht als einziges der bisher bekannten PPOD-Proteine im Verdacht, von Proteinen der 14-3-3 Klasse (Aitken et al., 1995) gebunden und so in seiner Aktivität reguliert zu werden (Barbara Pauly, TU München, persönliche Mitteilung).

Aus *H.vulgaris* (AEP) und *H.oligactis* konnten durch RT-PCR mit heterologen *H.vulgaris* (Basel) Primern jeweils PPOD-cDNAs isoliert werden, die *PPOD1* aus *H.vulgaris* (Basel) ähnlich sind (vgl. Abb. 2.5 A). Alle klonierten Fragmente, auch im Zuge der RACEs, ließen sich in beiden Spezies jeweils einem einzigen Transkript zuordnen. Diese Beobachtung sprach für die Existenz von jeweils nur einem PPOD-Gen.

2.1.2.1 Screening einer *H. viridis*-cDNA-Bibliothek nach PPOD-Homologen

Die Isolierung von PPOD-Genen durch RT-PCR gelang für *H. circumcincta* und *H. viridis* nicht. Da ein erster Northern-Blot (Abb. 2.3 B) jedoch PPOD-ähnliche Transkripte auch in diesen phylogenetisch basaleren *Hydra*-Spezies angezeigt hatte, wurde eine nicht normalisierte *H. viridis*-cDNA-Bibliothek konstruiert (Abb. 2.4), um diese durch Hybridisierungsexperimente nach PPOD-Genen zu durchsuchen.

Es wurde mRNA aus ganzen Polypen isoliert; die cDNA wurde bei der Erststrangsynthese radioaktiv markiert. Durch Gelautoradiographie bzw. Radioaktivitätsmessungen konnten die verschiedenen Arbeitsgänge so verfolgt werden.

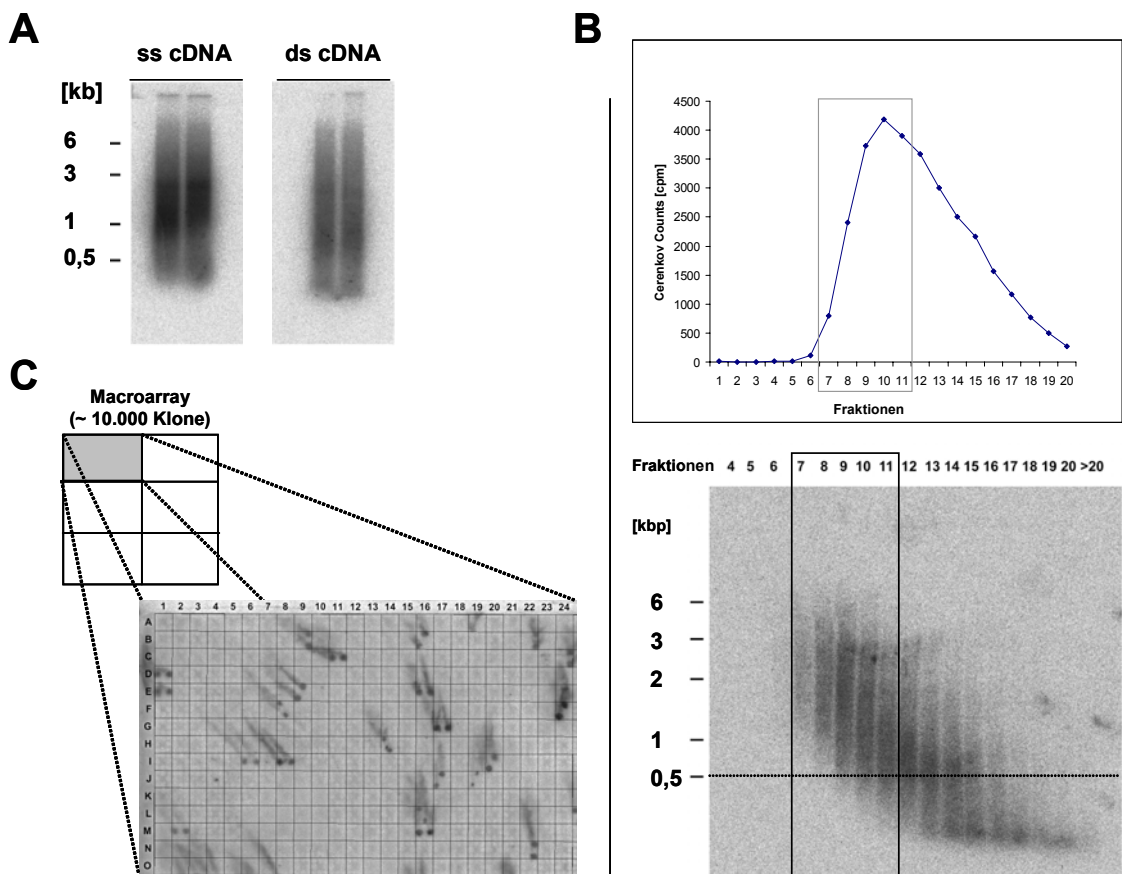


Abb. 2.4: Konstruktion und „Screening“ einer *H. viridis* cDNA-Bibliothek nach PPOD-Genen. (A) ^{32}P -Monitoring von cDNA-Erst- und Zweitstrangsynthese durch Gelautoradiographie. (B) Säulenchromatographische Größenfraktionierung. Elutionsprofil der ^{32}P -markierten ds cDNA und Dokumentation der Größenselektion durch Gelautoradiographie. Die Fraktionen 7 - 11 (Kästen) wurden ligiert und in *E. coli* transformiert. (C) Evaluierung der cDNA-Bibliothek durch Hybridisierung des Macroarrays mit *H. viridis*-Aktin-Probe.

Die Produkte von **Erst- und Zweitstrangsynthese** zeigten die gewünschte Größenverteilung und belegten die Verarbeitung von intakter mRNA (Abb. 2.4 A). Nach der Ligation von **Bst XI-Adapttern** erfolgte die Abtrennung von überschüssigen Adaptermolekülen sowie eine **Größenfraktionierung** der ds cDNA durch Säulenchromatographie (Abb. 2.4 B). Die Fraktionen 7 - 11 zeigten eine mittlere Größe > 0,5 kbp; die kleineren, nicht-ligierten Adapter eluierten später. Die gewünschten Fraktionen wurden vereinigt, in den Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert. Ca. 10.000 **Transformanten** wurden selektiert und zur Herstellung eines **Macroarrays** jeweils doppelt auf Nylonmembranen „gespottet“, herangezogen und fixiert.

Die Bibliothek wurde zunächst durch Hybridisierung der erstellten Macroarrays mit einer ***H.viridis*-Aktin-Probe** evaluiert. Über den gesamten Filter verteilt zeigten sich deutliche Doppel-Signale (Abb. 2.4 C). Es ergab sich unter den Klonen ein Aktin-Anteil von 1,4 %. Dieser Wert stimmte gut mit einem Richtwert für cDNA-Banken aus Säuger-Fibroblasten überein (1 - 4 %, Current Protocols). Wie Fibroblasten sind auch die gestaltgebenden Epitheliomuskelzellen von *Hydra* reich an Cytoskelettelementen. Zur weiteren Evaluierung wurden 50 Klone durch Kolonie-PCR auf das Vorhandensein und die Größe der in den Vektor inserierten ds cDNA überprüft. Es ergaben sich für alle Klone PCR-Produkte, die ds cDNA im selektierten Größenbereich entsprachen (Daten nicht gezeigt).

Es konnte also eine nicht-normalisierte *H.viridis* cDNA-Bibliothek mit ausschließlich „insert“-tragenden Vektoren im selektierten Größenbereich und normaler Repräsentation eines Haushaltsgens erstellt werden.

Die anschließende Hybridisierung der Macroarrays mit heterologen **PPOD1- und PPOD2-Proben** aus *H.vulgaris* (Basel) erzeugte jedoch keine spezifischen Signale. Auch ein Anschlussexperiment, bei dem 60.000 *H.viridis*-cDNA-Klone der Bibliothek auf Agarplatten angezogen und durch „Colony-Lifts“ auf Nylonmembranen transferiert, fixiert und mit der o.g. PPOD-Probe hybridisiert wurden, führte nicht zur Identifizierung eines *H.viridis*-PPOD-Homologs.

Für keine der basalen Spezies konnte somit ein PPOD-Homolog isoliert werden. Die negativen Ergebnisse der RT-PCR- und Hybridisierungsexperimente einer zuvor evaluierten *H. viridis*-cDNA-Bibliothek mit einer heterologen PPOD-Probe deuten für die genomisch nachgewiesenen PPOD-Gene in den basalen *Hydra*-Gruppen deutliche Sequenzunterschiede an.

2.1.2.2 Analyse von PPOD-Sequenzen aus verschiedenen *Hydra*-Spezies

Die Analysen der erhaltenen cDNA-, der daraus abgeleiteten Protein- und der genomischen Sequenzen sind in Abb. 2.5 zusammengefasst.

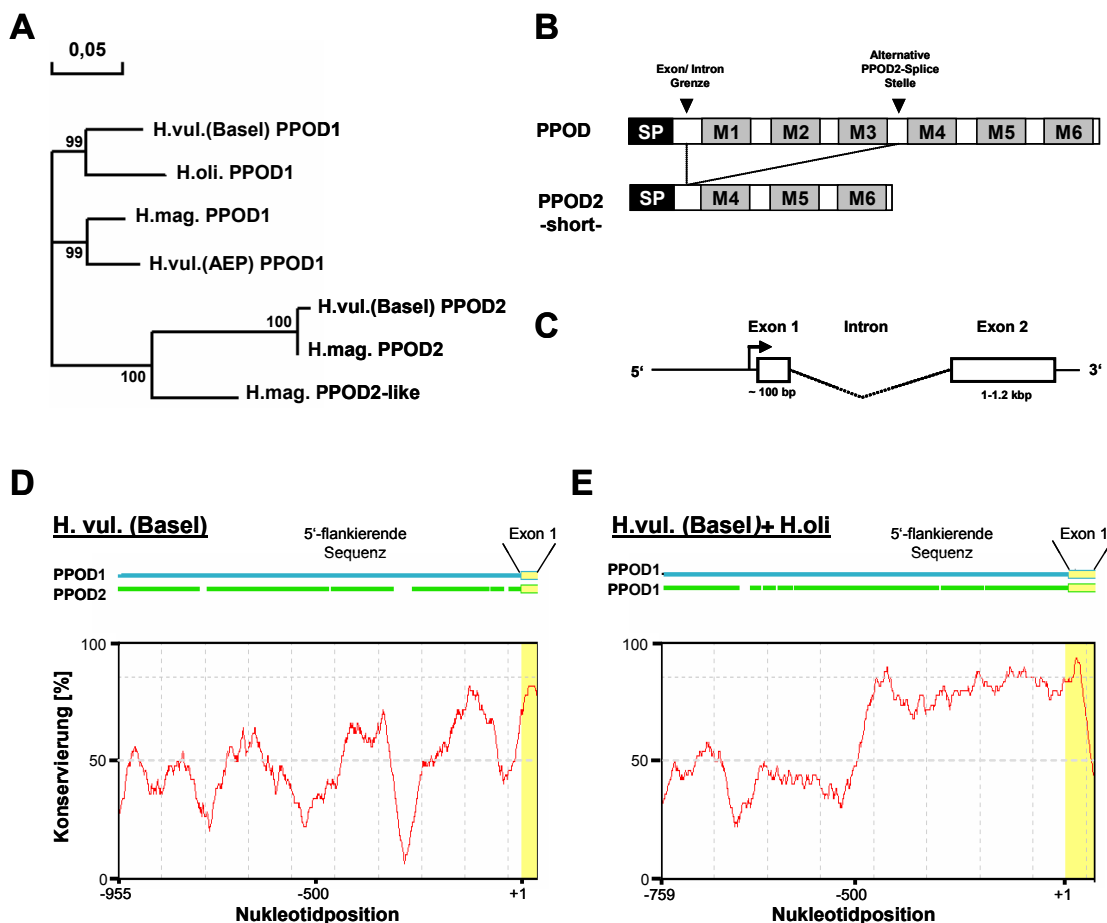


Abb. 2.5: „*In silico*“-Analyse klonierter PPOD-Sequenzen aus *Hydra*. (A) „Neighbour-Joining-Tree“ bekannter PPOD-Proteinsequenzen. „Bootstrap“-Werte sind angegeben. Der Balken entspricht einer positionsspezifischen Aminosäureaustauschwahrscheinlichkeit von 0,05. (B) Schematische Darstellung der Proteinstrukturen. (C) PPOD-Exon-Intronstruktur. (D) Konservierungsprofil von *H. vulgaris* (Basel) PPOD1- und PPOD2- 5'-flankierenden Sequenzen. (E) Konservierungsprofil von *H. vulgaris* (Basel) und *H. oligactis* PPOD1- 5'-flankierenden Sequenzen. ConSite-Analyse: „window-size“ 50 Nukleotide. (Grafik D, E verändert nach ConSite).

Die detaillierten Vergleiche aller PPOD-cDNA- und Proteinsequenzen finden sich im Anhang. Die cDNA-Sequenzen sind untereinander zu mehr als 90 % identisch, die Proteinsequenzen zu mehr als 87 % (Daten nicht gezeigt). Eine phylogenetische „Neighbour Joining“ Analyse unterteilt die PPOD-**Protein-Sequenzen** in drei Gruppen (Abb. 2.5 A). Die beiden näher verwandten Gruppen werden durch die *PPOD1*-Gene aus verschiedenen Spezies gebildet. Überraschenderweise ist die *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1*-Proteinsequenz der aus *H.oligactis* am ähnlichsten und gruppiert nicht mit denen der übrigen Arten aus der Vulgaris-Gruppe. Die fast identischen *PPOD2*-Proteine aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* bilden zusammen mit *H.magnipapillata* *PPOD2*-like die dritte Gruppe.

Für alle PPOD-Proteine wird ein **N-terminales Signalpeptid** vorhergesagt; sie alle weisen die für *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1* und *PPOD2* beschriebene Struktur mit 6 untereinander ähnlichen **Modulen** auf (Abb. 2.5 B, Abb. 8.3). Der kürzeren *PPOD2*-Splicing-Variante fehlen die Module 1-3.

Die erhaltenen, genomischen *PPOD1*- und *PPOD2* -Sequenzen aus *H.vulgaris* (Basel) belegen die in Abb. 2.5 C dargestellte **Exon-Intron-Struktur** von PPOD-Genen für diese Spezies. Zwei in einer genomischen *H.magnipapillata*-BAC-Bibliothek identifizierte PPOD-Gene wiesen dieselben Exon-Intron-Übergänge auf, was die dargestellte Struktur für eine weitere Art der Vulgaris-Gruppe bestätigte (Daten nicht gezeigt). Für *H.oligactis* wurde sie durch PCRs mit PPOD-spezifischen Primerpaaren und gDNA als Matritze unterstützt. Im Gegensatz zu Primerpaaren, die Bereiche innerhalb der gezeigten Exons einschlossen, konnte mit Primern, die die für *H.vulgaris* (Basel) belegte Exon-Intron-Grenze überspannten, niemals Fragmente amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Exon-Intron-Struktur der PPOD-Gene ist in Vulgaris- und Oligactis-Gruppe offenbar konserviert.

In Abb. 2.5 D und E sind **Konservierungsprofile** für verschiedene **5'-flankierende Sequenzen von Hydra-PPOD-Genen** gezeigt. Diese wurden nach einem globalen Vergleich der jeweiligen Sequenzen mit Hilfe der ConSite-Plattform erstellt. Die bekannten Unterschiede im Expressionsmuster von *PPOD1* und *PPOD2* in *H.vulgaris* (Basel) (vgl. Abb. 2.10, Abb. 2.11) finden

Ausdruck im geringen Konservierungsgrad ihrer 5'-flankierenden Regionen (Abb. 2.5 D). Das deutet auf **Unterschiede in der Promotoranatomie als molekulare Basis der differentiellen Expression** hin. Der Vergleich von orthologen *PPOD1*- 5'-flankierenden Sequenzen aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* hingegen lässt eine signifikante Konservierung im Bereich der ersten 500 bp erkennen (Abb. 2.5 E). *PPOD1*-Transkripte sind in beiden Spezies streng auf die Basalscheibe beschränkt (vgl. Abb. 2.10, Abb. 2.17), was die Lokalisation von für dieses Expressionsmuster kritischen Promotorelementen im interspezifisch konservierten Bereich wahrscheinlich macht.

Im Anschluss an die Klonierung und die „*in silico*“ Analyse von cDNA- sowie genomischen PPOD-Sequenzen aus verschiedenen *Hydra*-Spezies erfolgte durch diverse Hybridisierungsexperimente eine nähere Charakterisierung der Genfamilie in den systematischen Großgruppen.

2.1.3 Charakterisierung von PPOD-Genen in den systematischen Großgruppen

2.1.3.1 PPOD-Gene in der Vulgaris-Gruppe

2.1.3.1.1 Genomische Organisation

Nachdem ein erster Southern Blot mit HindIII- und EcoRV-verdauter gDNA aus verschiedenen Spezies viele PPOD-Signale in *H.vulgaris* (Basel) und nur 2 in *H.vulgaris* (AEP) angezeigt hatte (Abb. 2.3 A), wurden weitere **Southern Blots** mit gDNA aus *H.vulgaris* (Basel), *H.magnipapillata* (105) und *H.vulgaris* (AEP) unter Verwendung von Proben gegen die Exons 2 von *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1* und -2 durchgeführt. Diese Proben wurden in einer Vielzahl von Hybridisierungs-experimenten (Northern- und Southern Blots) mit Nukleinsäuren verschiedener Spezies erfolgreich als heterologe „**Genfamilien**“-Probe eingesetzt. Spätere Rehybridisierungen von Filtern mit gDNA verschiedener Spezies mit homologen Proben führten stets zu identischen Bandenmustern.

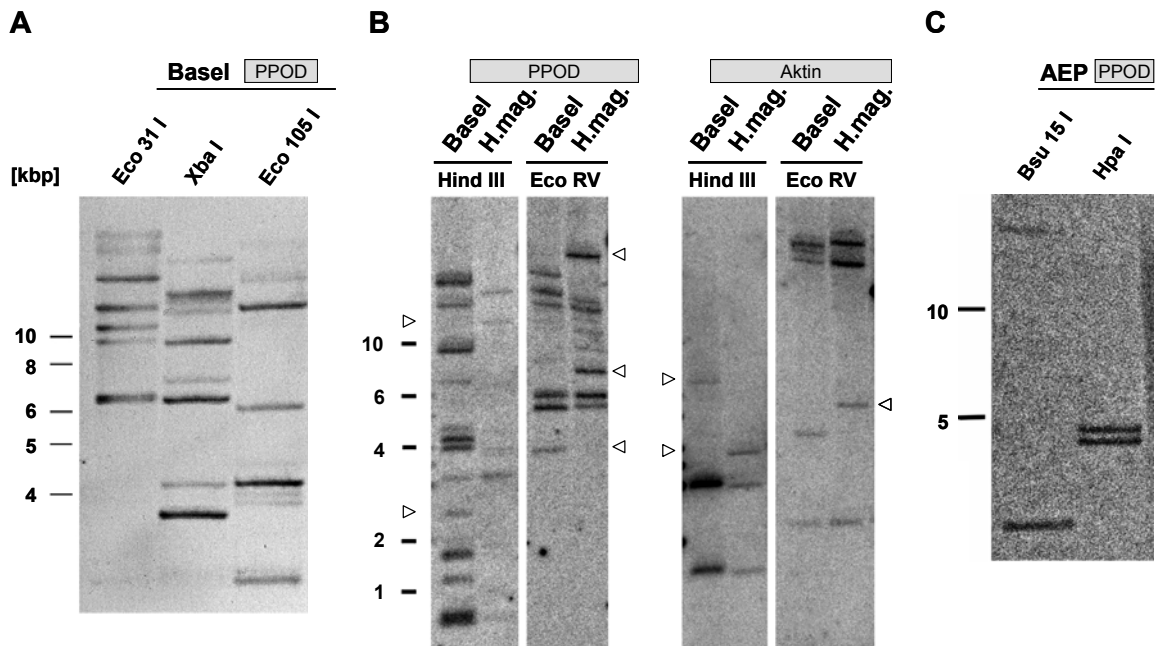


Abb. 2.6: Genomische Komplexität der PPOD-Genfamilie in der Vulgaris-Gruppe. Southern Blots mit genomischer DNA verschiedener Arten der Vulgaris-Gruppe und der PPOD-Genfamilienprobe **(A)** *H.vulgaris* (Basel). **(B)** *H.magnipapillata* und *H.vulgaris* (Basel). Sukzessive Hybridisierung mit PPOD- und Aktin-Probe. Unterschiede in den Bandenmustern sind durch Pfeilspitzen markiert. **(C)** *H.vulgaris* (AEP).

Sowohl für *H.vulgaris* (**Basel**) als auch für *H.magnipapillata* wurden je 7 - 11 PPOD-Signale erhalten (Abb. 2.6 A, B). In beiden Arten existiert mithin genomisch eine größere Anzahl von PPOD-Genen. Die verschiedentlich als regionale Stämme derselben Art angesprochenen Spezies zeigten neben identischen Banden bei Hybridisierungen sowohl mit PPOD- als auch mit einer Aktin-Probe deutliche Unterschiede im Banden- bzw. Restriktionsmuster.

Für *H.vulgaris* (**AEP**) konnte das Vorhandensein von nur zwei PPOD-Signalen durch weitere Restriktionen bestätigt werden (Abb. 2.6. C). In diesem Stamm existieren genomisch also nur zwei oder aber ein einzelnes PPOD-Gen in zwei Kopien.

2.1.3.1.2 Hinweise auf genomische Cluster von PPOD-Genen

Im Gegensatz zu den kodierenden zeigten die 5'-flankierenden Bereiche von *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1* und *PPOD2* deutliche Unterschiede (Abb. 2.5 D). Bei der Klonierung dieser wurde zusätzlich 5'-flankierende Sequenz für ein unbekanntes PPOD-Gen, im folgenden *PPOD3* genannt, erhalten (s. Anhang).

Diese unterschied sich deutlich sowohl von der *PPOD1*-, wie auch von der *PPOD2*- 5'-flankierenden Sequenz. Diese divergenten, den homologen, kodierenden Bereichen 5'-vorgelagerten Sequenzen ermöglichten die Generierung von spezifischen Proben für 3 verschiedene PPOD-Gene (Abb. 2.7 A). Die Identität und die Lage der Proben in den 5'-flankierenden Sequenzen sind im Anhang beschrieben.

Im Folgenden wurden verschiedene Southern Blots sukzessive mit der PPOD-**Genfamilien-** (s.o.) und den **genspezifischen Proben** hybridisiert. Die genspezifischen Proben ergaben im Vergleich zum Bandenmuster mit der Genfamilienprobe jeweils ein Banden-Subset (Abb. 2.7 B). Sowohl ***PPOD1*** als auch ***PPOD2*** liegen im *H.vulgaris* (Basel)-Genom offenbar **in mehreren Kopien** vor. Genspezifische Signale ohne korrespondierendes Genfamiliensignal ließen sich durch Schnittstellen in der z.T. unbekanntem Intronsequenz erklären.

Das kleinste detektierte *PPOD1*-Fragment mit korrespondierendem Genfamiliensignal wies eine Größe von ca. 7 kbp auf (BglI-Verdau). Auf diesem Fragment lag offenbar das komplette *PPOD1*-Gen vor. Unter Berücksichtigung der Lage von Genfamilien- und genspezifischer Probe in den bekannten *PPOD1*- Sequenzen (vgl. Abb. 2.7 A) ließ sich die **Größe des Introns** im *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1*-Gen so auf mind. 5 kbp beziffern.

Weiterhin wurde ein hochmolekulares Fragment detektiert, das Signale für alle drei PPOD-Gene erzeugte (Abb. 2.7 B, Pfeilspitze) und somit eine „Nachbarschaft“ der PPOD-Gene im Genom von *Hydra vulgaris* (Basel) andeutete.

Eine bessere Auflösung hochmolekularer Restriktionsfragmente wurde durch **Pulsfeldgelelektrophorese** erreicht (Abb. 2.7 C). Die sukzessive Hybridisierung des entsprechenden Southern Blots mit Genfamilien- und genspezifischen Proben zeigte im Größenbereich von ca. 50 -100 kbp drei Fragmente mit Signalen für alle betrachteten PPOD-Gene.

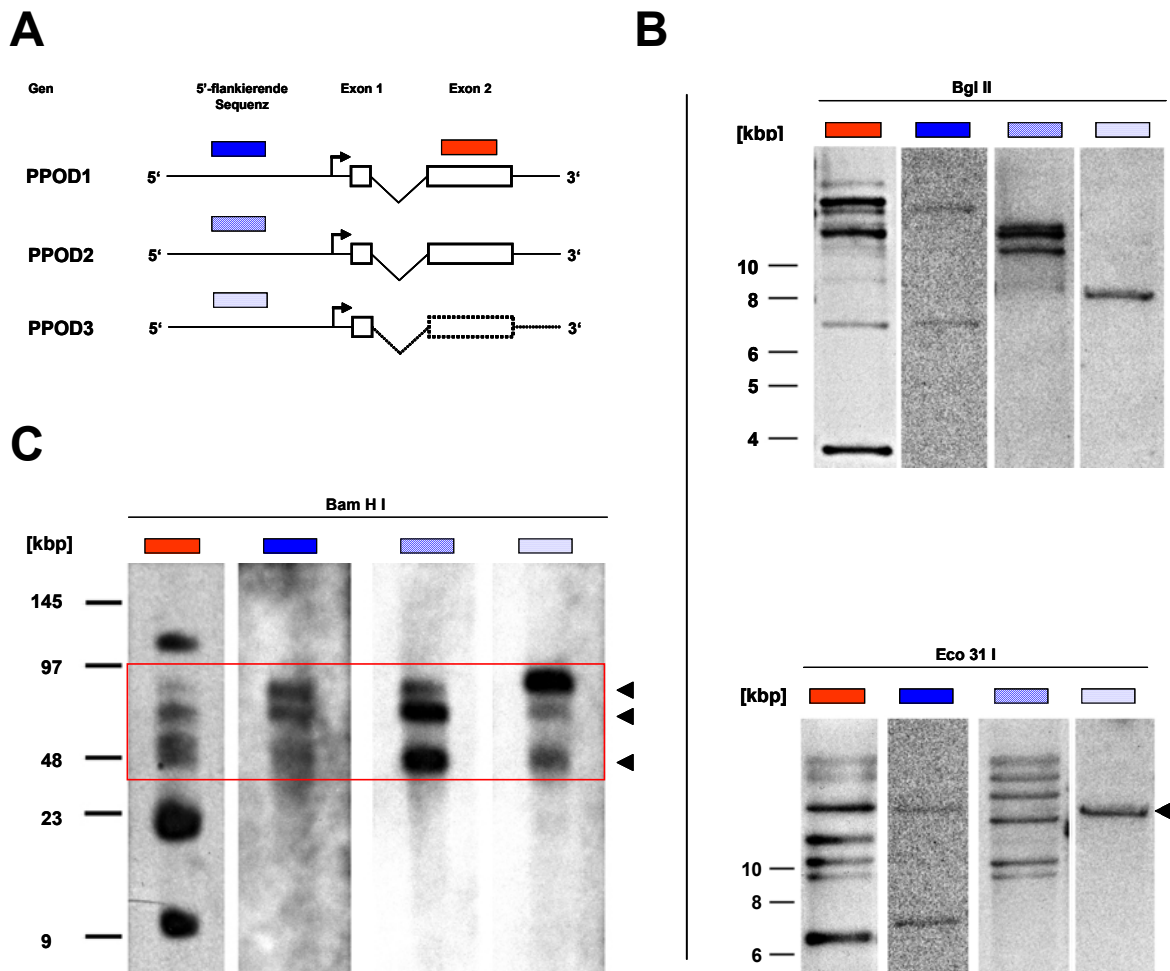


Abb. 2.7: Cluster von PPOD-Genen im *H.vulgaris* (Basel)-Genom. Southern Blots mit verschiedenen Restriktionen. Die Filter wurden sukzessive mit PPOD-Genfamilien- (roter Balken) sowie 3 genspezifischen (5'-flankierende Sequenz, blau/ blau gemusterte Balken) Proben hybridisiert (**A**) schematische Darstellung der gewählten Proben (**B**) Filter mit Bgl II- und Eco 31 I-verdauter gDNA. Die gefüllte Pfeilspitze (Eco 31 I) zeigt deutlich *PPOD1* + 3 sowie schwach auch *PPOD2*- Signale auf einem hochmolekularen Fragment. (**C**) Filter mit BamHI-verdauter, durch Pulsfeldgelelektrophorese separierter gDNA. Die gefüllten Pfeilspitzen deuten auf Fragmente mit *PPOD1*, -2 und -3-Signalen.

Diese Beobachtungen zeigten, dass im Genom von *Hydra vulgaris* (Basel) mehrere Cluster von PPOD-Genen existieren, die mind. 50 kbp umfassen. Weitere Banden, die nur mit der Genfamilien-Probe erhalten werden, deuteten zusätzlich auf PPOD-Gene außerhalb dieser Cluster hin.

2.1.3.1.3 „Screening“ einer genomischen Bibliothek nach PPOD-Genen

Um weitere Beweise für die Existenz von PPOD-Gen-Clustern zu erhalten, wurde eine genomische *H.magnipapillata*-BAC-Bibliothek (Pinnow et al., in

Vorbereitung) nach PPOD-Genen durchsucht. Dieses geschah durch Hybridisierung von Macroarrays, auf denen doppelt aufgetragene BAC-Klone angezogen und fixiert worden waren, mit der PPOD-Genfamilienprobe (Abb. 2.8 A). 6 BAC-Klone erzeugten ein PPOD-Signal. Ihre Koordinaten auf den Macroarrays und ihre genaue Bezeichnung finden sich im Anhang; sie wurden im Folgenden mit den Nummern 1 - 6 angesprochen. Aus Kulturen dieser Klone wurden die BAC-Vektoren im Midi-Maßstab isoliert und durch Restriktionsanalyse sowie Southern Blotting der Fragmente und Hybridisierung mit der PPOD-Genfamilienprobe charakterisiert. Alle BACs zeigten im Southern Blot nach Hpa I-Verdau ein deutliches PPOD-Signal (Abb. 2.8 B). Die Klone 1, 2, 3 und 6 wiesen identische Restriktionsmuster auf; das PPOD-Signal lag jeweils auf demselben Restriktionsfragment. Sie wurden daher als identisch angesehen.

Die unterschiedlichen Klone 2, 4 und 5 wurden durch Doppelverdau mit Not I und je einem weiteren Enzym, Separierung der Fragmente und Southern Blotting mit der PPOD-Genfamilienprobe näher charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.8 C zusammengefasst. Die in die Hind III-Schnittstelle des Vektors inserierte, genomische *H. magnipapillata*-Sequenz wird durch den NotI-Verdau aus dem Vektor „ausgeschnitten“; die in Abb. 2.8 D schematisch dargestellte Restriktionskarte des Vektors erlaubte bei Doppelverdauen die Identifizierung von Vektorfragmenten. Sie sind in Abb. 2.8 C durch graue Kästen markiert.

Durch Addition der Größen der übrigen Fragmente, die also Fragmente genomischer *Hydra*-Sequenzen darstellten, ergaben sich für die BACs 2, 4 und 5 „Insertgrößen“ von ca. 30, 8 und 10 kbp. In allen Restriktionsansätzen zeigten sich Fragmente gleicher Größe für die BACs 2 und 5 (blaue Kästen). In Kombination mit weiteren, nicht gezeigten Restriktionsanalysen konnte belegt werden, dass die *Hydra*-Sequenz in BAC 5 ein Subklon von der in BAC 2 inserierten ist.

Der Southern Blot zeigte wiederum nur auf jeweils einem genomischen Fragment ein PPOD-Signal (nicht gezeigt). Die korrespondierenden Restriktionsfragmente sind in Abb. 2.8 C durch rote Kästen markiert.

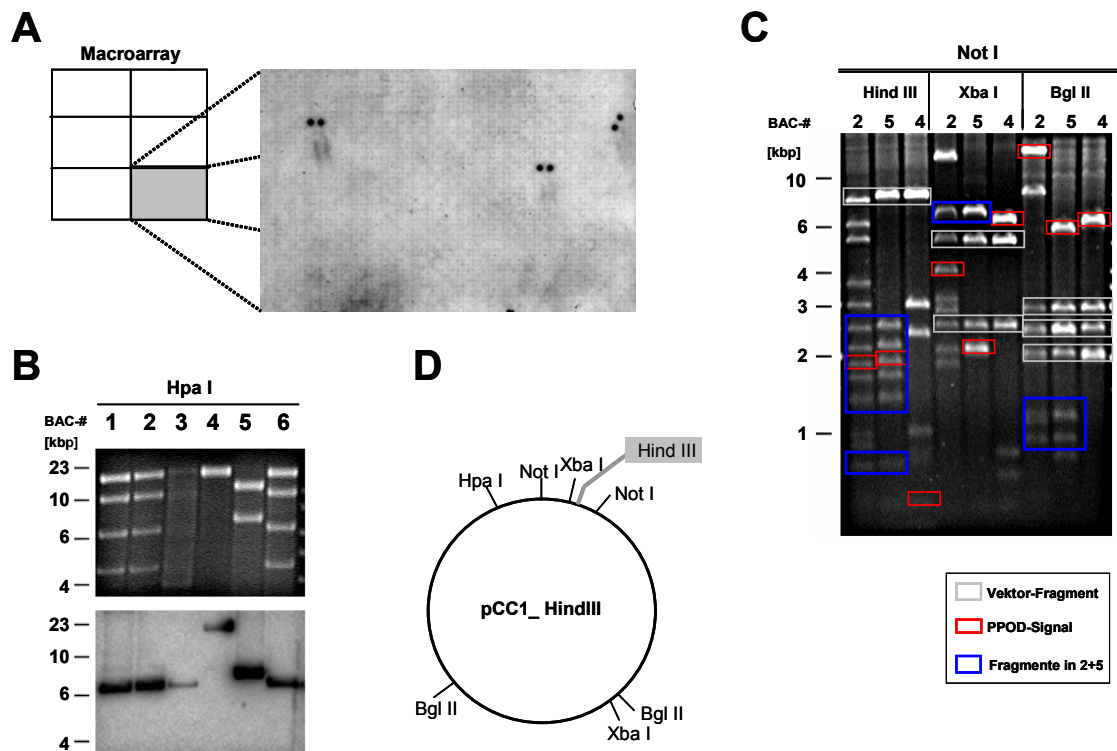


Abb. 2.8: Screening einer genomischen *H. magnipapillata*-Bibliothek nach PPOD-Gen-Clustern. (A) Ausschnitt eines mit einer PPOD-Genfamilien-Probe hybridisierten Macroarrays. (B) Hpa I-Restriktion der PPOD-positiven BAC-Klone und Southern Blot der Fragmente mit PPOD-Probe. (C) Charakterisierung der *Hydra*- gDNA-Sequenz der Klone/ BACs # 2, 5 und 4 durch Not I-Doppelverdau, Restriktionsanalyse und Southern Blot (Blot nicht gezeigt). (D) schematische Darstellung des BAC-Vektors mit Schnittstellen für verwendete Enzyme. Fragmente aus dem *H. magnipapillata*-Genom waren in die Hind III-Schnittstelle inseriert.

Es konnte somit kein BAC mit mehreren, benachbarten PPOD-Genen gefunden werden. Allerdings lag die Größe der Inserts der analysierten BACs mit max. 30 kbp auch deutlich unter der postulierten Cluster-Größe von mind. 50 kbp (Abb. 2.7 C). Des Weiteren befand sich die BAC-Bibliothek zum Zeitpunkt der Experimente noch im Aufbau, so dass nur eine teilweise Abdeckung des *H. magnipapillata*-Genoms gewährleistet werden konnte. Das negative Ergebnis steht somit nicht im Widerspruch zu den durch vorausgegangene Experimente erhaltenen Hinweisen auf Cluster von PPOD-Genen im Genom von *H. vulgaris* (Basel) (Abb. 2.7).

Sollte die **genomische Komplexität der PPOD-Genfamilie in der Vulgaris-Gruppe** (Abb. 2.3, Abb. 2.6) auf Genduplikationsereignisse im Zuge der Evolution von *Hydra* zurückgehen, so sind verschiedene PPOD-Gene offenbar in enger genomischer Nachbarschaft verblieben.

2.1.3.1.4 Expression von PPOD-Genen in der Vulgaris-Gruppe

Im Anschluss an die Charakterisierung auf genomischer Ebene sollte die Expression von PPOD-Genen in der Vulgaris-Gruppe analysiert werden. Dazu wurden Northern Blots mit totaler RNA aus oberer und unterer Körperhälfte der Polypen und *in situ* Hybridisierungen an ganzen Tieren durchgeführt.

Der **Northern Blot** wurde sukzessive mit den kompletten cDNAs von *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1* und *PPOD2* hybridisiert (Abb. 2.9). Er zeigte für alle betrachteten Arten bzw. Stämme eine **Expression von PPOD-Genen sowohl im Rumpf, als auch im Fuß**. In *H.vulgaris* (AEP) ist die Expression im Rumpf nur schwach. Durch die große Sequenzähnlichkeit beider Proben (vgl. Abb. 2.5 A, Sequenzvergleich im Anhang) kam es zu gegenseitigen Kreuzhybridisierungen, d.h. es wurden jeweils dieselben Transkripte im Größenbereich von ca. 1,2 kbp detektiert (vgl. Abb. 2.3 B). Die kürzeren *PPOD2*-Splicing-Varianten in *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* (2.1.2, Abb. 2.5 B) wurden hingegen nur durch die *PPOD2*-Probe detektiert und finden sich nicht in *H.vulgaris* (AEP). Das im Vergleich zum *PPOD1*-Signal und den *PPOD2*-Signalen der anderen Spezies schwache *PPOD2*-Signal in *H.vulgaris* (AEP) spiegelt die größere Sequenzähnlichkeit des einzigen aus diesem Stamm klonierten PPOD-Genes mit *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1*-Genes wider.

Da in *H.vulgaris* (AEP) genomisch nur 2 PPOD-Signale detektiert werden konnten (Abb. 2.6 C), sich in diesem Stamm alle klonierten Fragmente der RT-PCR-Experimente einem einzigen, *PPOD1*-ähnlichen Transkript zuordnen ließen (2.1.2) und das einzige im Northern Blot detektierbare Transkript mit der *PPOD1*-Probe ein stärkeres Signal ergibt, existiert in diesem Stamm der Vulgaris-Gruppe offenbar nur ein Gen der PPOD-Genfamilie, *PPOD1*. Dieses scheint jedoch auch im Rumpf exprimiert zu sein, was später durch *in situ* Hybridisierung bestätigt werden konnte (s.u.).

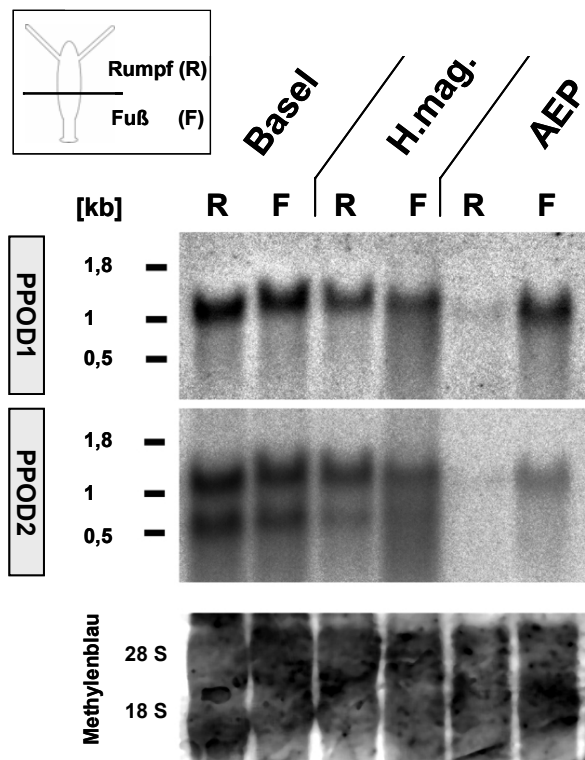


Abb. 2.9: Expression von PPOD-Genen in Rumpf- und Fußgewebe von Hydren der Vulgaris-Gruppe. Northern Blot mit totaler RNA aus verschiedenen Gewebefractionen und *H.vulgaris* (Basel) PPOD1 oder -2- Proben. Die Methylenblaufärbung des Filters zeigt den Auftrag vergleichbarer RNA-Mengen. Basel = *H.vulgaris* (Basel); AEP = *H.vulgaris* (AEP).

Die *in situ* Hybridisierungen wurden mit Ausnahme der Doppel *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Riboproben und einem anti-Dig-Antikörper mit konjugierter Alkalischer Phosphatase durchgeführt. Für die *PPOD1 in situ* Hybridisierung in *H.vulgaris* (Basel) wurden die ersten 400 bp inklusive der 5'-untranslatierten Region, für die *PPOD2 in situ* Hybridisierung 350 bp am Ende der kodierenden Sequenz als Probe gewählt. Die *PPOD2*-Probe erfasste beide Splicing-Varianten (vgl. Abb. 2.9). Die genaue Identität der ist im Anhang beschrieben. Durch die Wahl der Proben in Bereichen mit relativ vielen Sequenzunterschieden und stringente Hybridisierungsbedingungen konnte eine gegenseitige Kreuzhybridisierung ausgeschlossen werden.

Die Expression von *PPOD1* war in *H.vulgaris* (Basel) auf die ektodermalen Epithelzellen der Basalscheibe beschränkt (Abb. 2.10); sie war im Zuge der Knospung erst kurz vor der Ablösung vom Muttertier detektierbar (vgl. Peroxidase-Assay, Abb. 2.2). Es zeigte sich eine Verstärkung der Expression zur Mitte der Basalscheibe hin, was gut mit der Verteilung der Peroxidaseaktivität übereinstimmte (vgl. Abb. 2.2, Fußvergrößerung). In einigen Tieren war zusätzlich eine ringförmige Expression direkt am Übergang vom Stiel zur

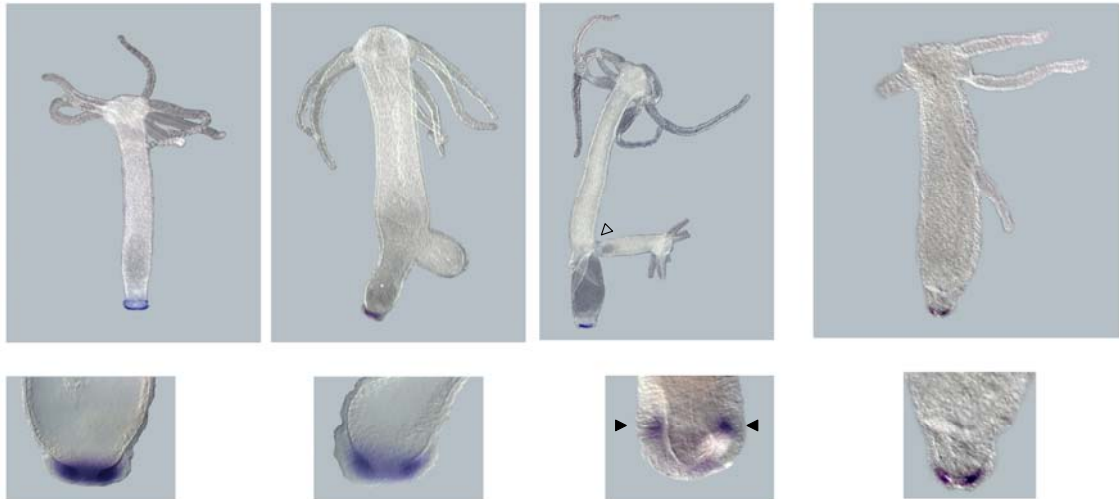
H.vulgaris* (Basel)**H.magnipapillata***

Abb. 2.10: Expression von *PPOD1* in *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata*. *In situ* Hybridisierung mit jeweils artspezifischer *PPOD1*-Riboprobe. Ganze Tiere und vergrößerte Fußpartien. Offene Pfeilspitze, *PPOD1*-Expression in spätem Knospenstadium; gefüllte Pfeilspitzen, ringförmige *PPOD1*-Expression am Übergang vom Stiel zur Basalscheibe.

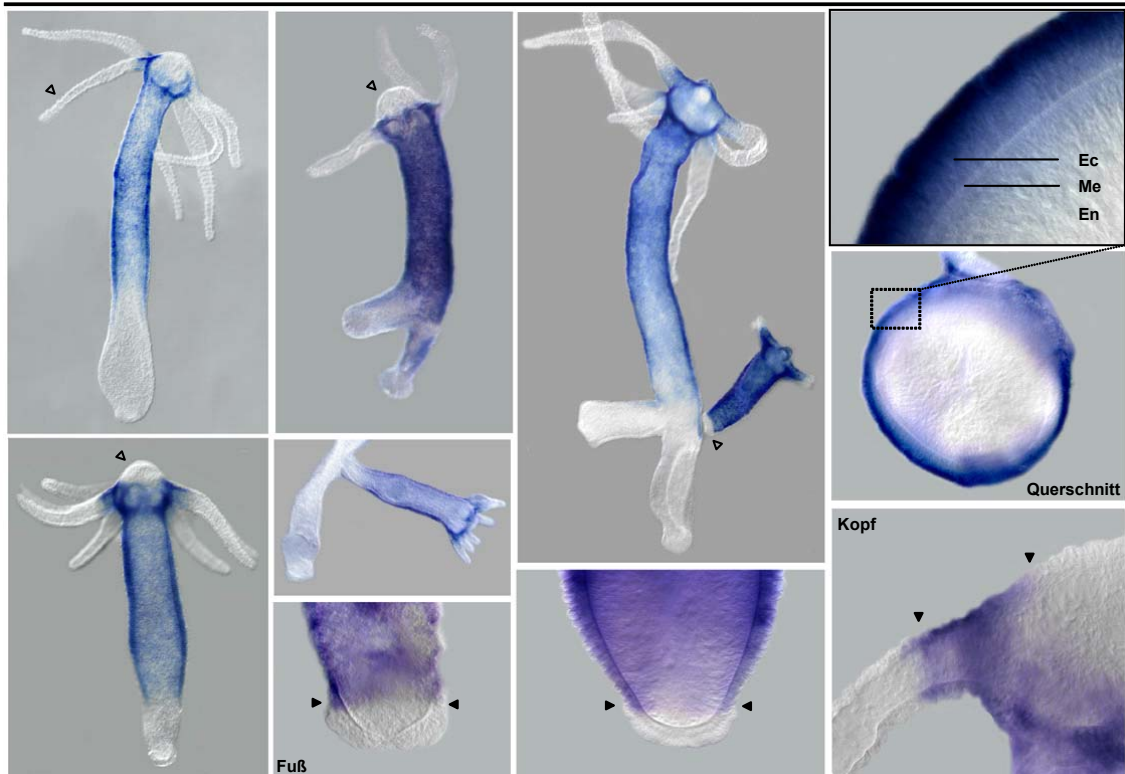
***H.vulgaris* (Basel)**

Abb. 2.11: Expression von *PPOD2* in *H.vulgaris* (Basel). *In situ* Hybridisierung mit *PPOD2*-Riboprobe. *PPOD2* zeigt eine ektodermale, epitheliale Expression. Kein Transkript findet sich im Hypostom, in den Tentakeln und der Basalscheibe (offene Pfeilspitzen). Geschlossene Pfeilspitzen, Expressionsgrenzen; Ek, Ektoderm; Me, Mesogloea; En, Endoderm.

Basalscheibe zu beobachten.

In ***H.magnipapillata*** zeigte eine artspezifische *PPOD1*-Probe ebenfalls eine Expression in der Basalscheibe an.

Das unterstrich die im Zuge der EST- und Sequenzanalyse postulierte Homologie der im Bereich der *in situ* Proben divergenten *PPOD1*-cDNA-Sequenzen (s. Anhang) aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* (vgl. 2.1.2, Tab. 2.1).

PPOD2 zeigte in ***H.vulgaris* (Basel)** ebenfalls eine ektodermal-epitheliale, im Vergleich zu *PPOD1* jedoch annähernd komplementäre Expression (Abb. 2.11). Neben der Basalscheibe waren auch die Tentakeln und der Mundkegel, das Hypostom, frei von *PPOD2*-Transkripten. Die Expression war stets stark in der Tentakelzone und im Gastralbereich. In vielen Präparaten war ab der Knospungszone eine gradierte Abnahme des Transkriptionsgrades zum Fuß hin zu beobachten. Vor allem in Knospen, die oft eine im Vergleich zum Muttertier stärkere Expression zeigten, war sie aber bis zum Übergang vom Stiel zur Basalscheibe nachweisbar. Im Gegensatz zu den Tentakelbasen und dem Hypostom ist die Grenze der *PPOD2*-Expression hier sehr definiert und fällt mit dem Transdifferenzierungspunkt, an der gastrale, ektodermale Epitheliomuskelzellen zu Basalscheibenzellen transdifferenzieren (Abb. 1.6) zusammen.

Das Expressionsmuster des nahezu sequenzgleichen ***PPOD2***-Gens in ***H.magnipapillata*** entspricht dem in *H.vulgaris* (Basel) (Daten nicht gezeigt).

Die **komplementäre Verteilung der *PPOD1* und -2-Transkripte im Fuß** wurde weiterhin durch Doppel- *in situ* Hybridisierung demonstriert (Abb. 2.12). Dazu wurde eine Biotin-markierte *PPOD2*-Riboprobe hergestellt, die dann mit einem Peroxidase-konjugierten anti-Biotin-Antikörper kombiniert wurde. Unter parallelem Einsatz der o.g. *PPOD1*-Riboprobe waren somit zwei verschiedene Substratreaktionen zum Nachweis beider Transkripte möglich. Die Biotin-*PPOD2*-Probe zeigte das bekannte Expressionsmuster (Abb. 2.12). Die Hemmung endogener Peroxidasen im Zuge der Antikörperfärbung war



Abb. 2.12: Komplementäre Expression von *PPOD1* und *PPOD2* im Fuß von *H.vulgaris* (Basel). Doppel- *in situ* Hybridisierung. Braunrote Präzipitate zeigen *PPOD2*-, blauviolette *PPOD1*-Transkripte an. Gefüllte Pfeilspitzen, Grenze zwischen *PPOD1*- und *PPOD2*-Expressionsdomäne = Transdifferenzierungspunkt.

erfolgreich, da sich im Kontrollansatz ohne Riboprobe bei der Substratreaktion keine Färbung in den Tieren zeigte.

Die Expressionsdomänen von *PPOD1* und *PPOD2* waren, auch im Zuge der Knospung, deutlich voneinander getrennt (gefüllte Pfeilspitzen).

Im Zuge des ständigen Gewebeflusses Richtung Fuß stellt der anatomisch-histologisch definierte **Transdifferenzierungspunkt** (Abb. 1.6) also zusätzlich auch die untere bzw. obere **Grenze der Expressionsdomänen zweier Effektorgene**, namentlich *PPOD1* und *PPOD2*, dar (Abb. 2.10, Abb. 2.11).

2.1.3.1.5 Veränderung der *PPOD2*-Expression durch LiCl-Behandlung

Um weitergehende Einblicke in die Regulation der verschiedenen *PPOD*-Gene in *Hyda* zu erhalten, wurden Tiere 14 Tage mit LiCl behandelt und dann durch *in situ* Hybridisierung auf eine Änderung der *PPOD1*- und *PPOD2*-Expressionsmuster hin untersucht (Abb. 2.13).

LiCl hemmt die GSK-3-Kinase (Klein und Melton, 1996); daher werden LiCl-Effekte mit einer Störung des *Wnt*-Signalweges in Zusammenhang gebracht. In

Hydra verursacht LiCl die Bildung ektopischer Fußstrukturen (Hassel und Berking, 1990) sowie eine Änderung der Expression verschiedener, u.a. auch an der Musterbildung im Fuß von *Hydra* beteiligter Gene (Grens et al., 1996; Bridge et al., 2000). Dieses wurde, gestützt durch Transplantationsversuche, verschiedentlich als eine Erhöhung des Fußbildungspotentials bzw. als eine Absenkung des Positionswertes im Gewebe interpretiert (Hassel et al., 1993). Eine Kopplung der Expression von PPOD-Genen an die den bekannten Effekten zu Grunde liegenden Mechanismen sollte sich in Änderungen ihrer Expression nach LiCl-Behandlung äußern.

Der Erfolg der LiCl-Behandlung zeigte sich in der **Ausprägung ektopischer Basalscheiben** sowie z.T. ektopischer Stiele (Abb. 2.13). Weiterhin konnte die bekannte Fehlregulation von *CnNK-2*, eines bei der Fußbildung zentralen Transkriptionsfaktors, durch RT-PCR nachgewiesen werden (s. Abb. 2.25).

PPOD1 zeigt in den ektopischen Fußstrukturen das normale ektodermale epitheliale Expressionsmuster (vgl. Abb. 2.10). **PPOD2** hingegen zeigt eine stark veränderte Expression. Die Grenzen der Expression bleiben erhalten, es finden sich keine Signale in Basalscheibe, Tentakeln und Hypostom (Abb. 2.11). Jedoch tritt die nach wie vor nachweisbare, epitheliale Expression vor einer starken **Expression in Derivaten der I-Zelllinie** in den Hintergrund. Eine **PPOD2**-Expression in dieser Zelllinie konnte in nichtbehandelten Tieren nicht nachgewiesen werden; eine Überdeckung entsprechender Signale durch die starke epitheliale Färbung ist jedoch möglich (Abb. 2.11).

Offenbar ist die **Expression von PPOD2**, im Gegensatz zu der von **PPOD1**, in *H. vulgaris* (Basel) an **LiCl-sensitive Signalkaskaden** gekoppelt.

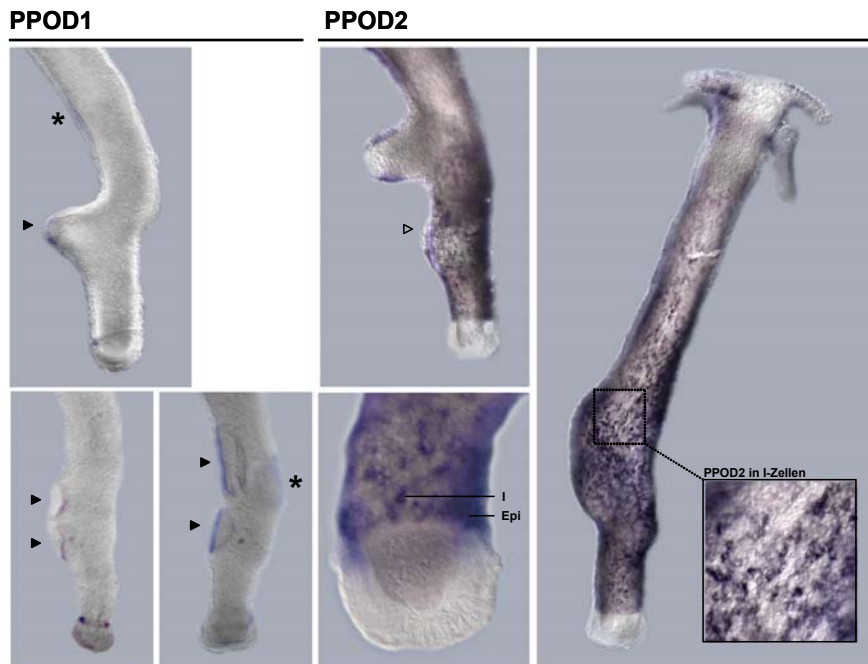


Abb. 2.13: Änderung der PPOD2-Expression in *H.vulgaris* durch LiCl-Behandlung. *In situ* Hybridisierung mit PPOD1 und PPOD2 Riboproben nach 14-tägiger LiCl-Behandlung. Geschlossene Pfeilspitzen, ektopische Fußstrukturen; offene Pfeilspitzen, Abwesenheit von PPOD2-Transkript in ektopischer Basalscheibe; Sterne, ektopische PPOD1-Expression vor morphologisch erkennbarer Transdifferenzierung; Epi, epitheliale Expression; I, I-Zell-Expression.

2.1.3.1.6 Abweichende Expression von PPOD1 in *H.vulgaris* (AEP)

Die *in situ* Hybridisierung mit *H.vulgaris* (AEP) wurde mit einer homologen PPOD1-Probe durchgeführt, die ca. 500 bp der *H.vulgaris* (AEP) PPOD1-cDNA-Sequenz entsprach (s. Anhang). Das vermutlich einzige PPOD-Gen in diesem Stamm der Vulgaris-Gruppe (s.o.) zeigte eine sehr starke ektodermale-epitheliale Expression in der Basalscheibe sowie eine schwächere im Rumpfbereich (Abb. 2.14 A); Hypostom und Tentakeln waren transkriptfrei. Dieses Ergebnis stimmte mit dem des Northern Blots überein (Abb. 2.9), der ebenfalls eine schwächere Expression im Rumpf angezeigt hatte. *In situ* Hybridisierungen mit sexuellen Tieren zeigten, dass das PPOD-Gen weder in Hoden früher und später Stadien, noch in sich entwickelnden Oocyten exprimiert wird (Abb. 2.14 A). Dieser Befund zeigte eine **Regulierung der Hydra-PPOD-Gene im Zuge der Gametogenese.**

Eine **RT-PCR** mit PPOD-spezifischen Primern und cDNA aus (i) asexuellen Tieren, (ii) weiblichen, sich in der Oogenese befindlichen Tieren sowie (iii) Embryos verschiedener Stadien zeigte einen vergleichbaren PPOD-Transkriptionsgrad in asexuellen und weiblichen Tieren sowie eine Abwesenheit

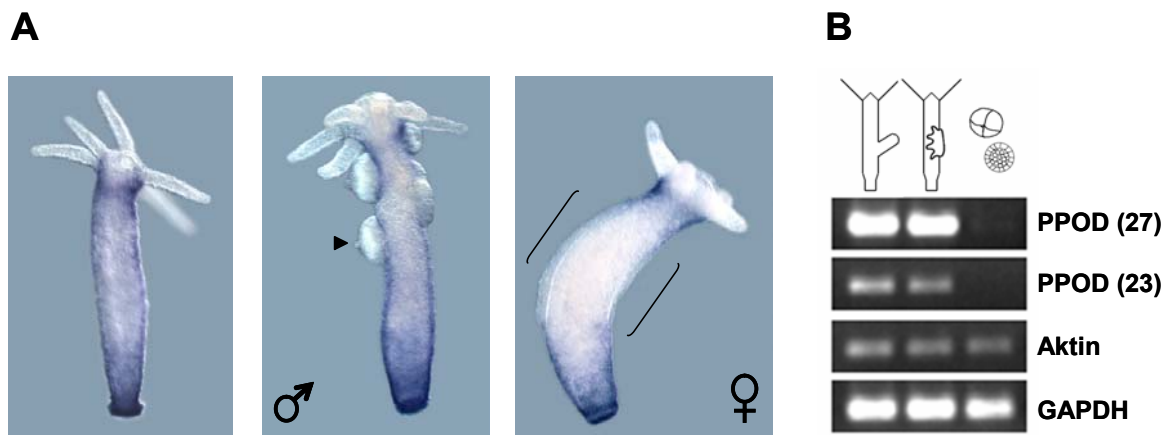


Abb. 2.14: Expression von *PPOD1* in *H.vulgaris* (AEP). (A) *In situ* Hybridisierung mit homologer Riboprobe. Expressionsmuster in asexuellen, männlichen und weiblichen Tieren. Pfeilspitzen/ Klammern, transkriptfreie Hoden bzw. Oocyten. (B) RT-PCR mit (i) asexuellen, knospenden, (ii) weiblichen Tieren in der Oogenese und (iii) Embryos verschiedener Stadien. In Klammern: PCR-Zyklen.

von PPOD-Transkripten in Embryos (Abb. 2.14 B).

Diese Beobachtungen zeigten, dass die starken Peroxidaseaktivitäten in Endocysten der sich entwickelnden Oocyte (Abb. 2.2) und des Embryos (Technau et al., 2003) sowie die Aktivität in den Hodenspitzen (Abb. 2.2) der Expression eines oder mehrerer anderer, nicht identifizierter Peroxidase-Gene zugeschrieben werden müssen.

Für *H.vulgaris* (AEP) konnte genomisch und auf Transkriptebene **nur ein PPOD-Gen** nachgewiesen werden (Abb. 2.6, Abb. 2.9), das *PPOD1* aus *H.magnipapillata* stark ähnelt (Abb. 2.5 A). Neben diesen Unterschieden auf genomischer und Transkriptebene zeigt sich zusätzlich auch noch eine im Vergleich zu den anderen Arten der Vulgaris-Gruppe **abweichende Expression** des *PPOD1*-Homologs (vgl. Abb. 2.10).

2.1.3.1.7 Zusammenfassung - Vulgaris-Gruppe

Zusammenfassend zeichnete sich für die **PPOD-Genfamilie in der Vulgaris-Gruppe** das folgende Bild ab:

H.vulgaris (Basel) und *H.magnipapillata* wiesen genomisch eine größere Anzahl von PPOD-Genen auf (Abb. 2.3, Abb. 2.6). Die Southern Blot Analyse

belegte neben der nahen Verwandtschaft beider Arten anhand von RFLPs („Restriction fragment length polymorphisms“) auch Unterschiede auf genomischer Ebene, z.B. im PPOD-Bandenmuster. Für *H.vulgaris* (Basel) konnte das Vorliegen verschiedener PPOD-Gene in mehreren Kopien gezeigt werden. Weiterhin ergaben sich hier Hinweise auf genomische Cluster von PPOD-Genen (Abb. 2.7). Durch Analyse einer *H.magnipapillata*-EST-Bibliothek und Klonierungsversuche konnten jeweils drei PPOD-Gene auch auf Transkriptebene nachgewiesen werden (Tab. 2.1, 2.1.2). In beiden Spezies traten Splicing-Varianten von *PPOD2* auf, die auch durch Northern Blotting belegt werden konnten (Abb. 2.9). *PPOD1* und *PPOD2* zeigen in beiden Spezies bei Transdifferenzierungsereignissen im Zuge von Fuß-Musterbildungsprozessen komplementäre Expressionsmuster. Die *PPOD2*-Expression ist weiterhin gekoppelt an LiCl-sensitive Signaltransduktionskaskaden.

In *H.vulgaris* (AEP), einem der Spezies *H.vulgaris* zugeordneten Stamm, zeigte sich ein gänzlich anderes Bild. Die Ergebnisse von Southern und Northern Blotting- sowie Klonierungsexperimenten legen die Existenz von nur einem einzigen PPOD-Gen in diesem Stamm nahe. Es ähnelte stark dem *H.magnipapillata*-*PPOD1*-Gen (Abb. 2.5 A). Die Expressionsdomäne von *H.vulgaris* (AEP)-*PPOD1* entsprach einer Überlagerung der *PPOD1* und -2- Expressionsdomänen in den anderen Arten der Vulgaris-Gruppe (Abb. 2.10-Abb. 2.12). Im Zuge von Gametogenese und Embryogenese war eine negative Regulierung des *H.vulgaris* (AEP)-*PPOD1*-Genes zu beobachten.

2.1.3.2 PPOD-Gene in der Oligactis-Gruppe

2.1.3.2.1 Genomische Organisation

Der ursprüngliche Southern Blot hatte für *H.oligactis*, eine Spezies der Oligactis-Gruppe, mit nur zwei Banden eine geringe Anzahl von PPOD-Genen angezeigt (Abb. 2.3 A), was durch die Klonierung von RT-PCR-Fragmenten, die sich allesamt einem einzigen Transkript mit großer Ähnlichkeit zu *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1* (Abb. 2.5 A) zuordnen ließen, unterstützt wurde.

Ein **Southern Blot** mit weiteren Restriktionen bestätigte diese Befunde (Abb. 2.15 A). Auch für *H.robusta*, eine weitere Art der Oligactis-Gruppe, wurden im Southern Blot 2 PPOD-Signale erhalten (Daten nicht gezeigt).

Hybridisierte man Southern Blots mit *H.oligactis* gDNA sukzessive mit einer Probe gegen Exon 2 des *H.oligactis PPOD1*-Genes und mit einer Probe aus der 5'-flankierenden Sequenz desselben (Abb. 2.15 C), so wurde in einigen Restriktionen ein identisches Bandenmuster erhalten (Abb. 2.15 B). Da in *H.vulgaris* (Basel) unterschiedliche PPOD-Gene stark divergierende 5'-flankierende Sequenzen aufwiesen (Abb. 2.5 D), deutete dieses darauf hin, dass die beiden PPOD-Signale in *H.oligactis* Southern Blots auf zwei Kopien bzw. Allele desselben Genes zurückzuführen sind. Die Tatsache, dass mit vier verschiedenen Restriktionen (Abb. 2.3 A, Abb. 2.15 A) je zwei Banden erhalten wurden, unterstützt die Annahme, dass es sich um zwei Kopien handelt.

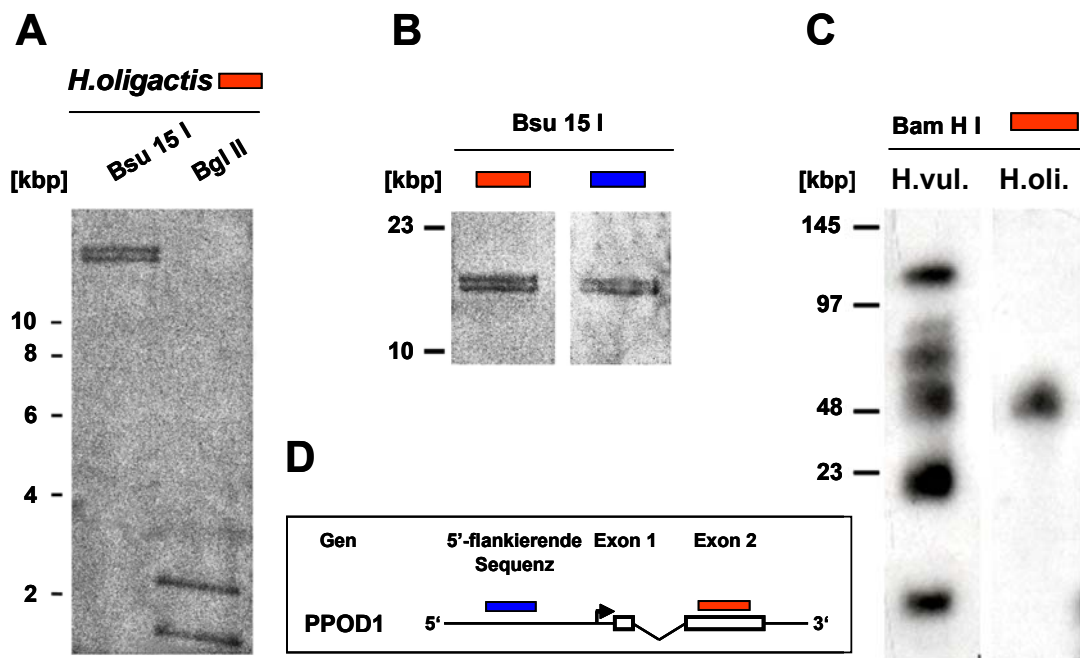


Abb. 2.15: Genomische Organisation von PPOD-Genen in *H.oligactis*. Southern Blots mit verschiedenen Restriktionen. **(A)** Das Vorhandensein von nur 2 PPOD-Signalen wird durch weitere Restriktionen bestätigt. **(B)** Bsu 15 I-Verdau. Die Filter wurden sukzessive mit einer PPOD-Genfamilien- sowie einer genspezifischen (5'-flankierende Sequenz) Probe hybridisiert. **(C)** BamHI-Verdau. Pulsfeldgelelektrophorese und Southern Blot. **(D)** Schematische Darstellung der gewählten Proben aus kodierendem sowie 5'-flankierendem Bereich des *H.oligactis PPOD1*-Genes.

Das Auftreten von allelischen, genomischen Bereichen mit derartig vielen differentiellen Restriktionsschnittstellen ist unwahrscheinlich.

Ein **Southern Blot** mit BamHI-verdauter, durch **Pulsfeldgelelektrophorese** separierter *H. oligactis* gDNA zeigt bei Hybridisierung mit einer PPOD-Genfamilienprobe nur ein Signal im Größenbereich von 50 kbp, was eine enge genomische Nachbarschaft der beiden *H. oligactis* PPOD1- Kopien andeutet (Abb. 2.15 C). Cluster von PPOD-Genen treten somit sowohl in der Oligactis-, wie auch in der Vulgaris-Gruppe auf (vgl. Abb. 2.7 B, C). In der Oligactis-Gruppe besteht dieses „Cluster“ jedoch nur **aus zwei Kopien eines PPOD1-Genes**.

2.1.3.2.2 Expression von PPOD-Genen in der Oligactis-Gruppe

Die Expression des einzigen *H. oligactis* PPOD-Genes wurde durch Northern Blotting und *in situ* Hybridisierung untersucht.

Sowohl in *H. oligactis*, als auch in *H. robusta* zeigt der **Northern Blot** mit heterologen *H. vulgaris* (Basel) PPOD1 und -2-Proben eine Expression von PPOD-Genen ausschließlich im Fuß an (Abb. 2.16).

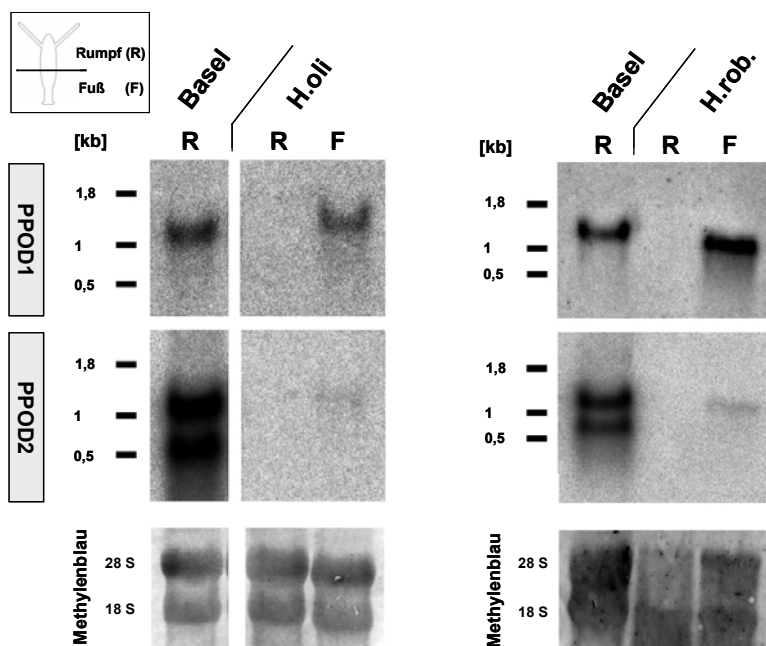


Abb. 2.16: Expression von PPOD-Genen in Rumpf- und Fußgewebe von Hydren der Oligactis-Gruppe. Northern Blot mit totaler RNA aus verschiedenen Gewebefractionen von *H. vulgaris* (Basel), *H. oligactis* und *H. robusta*. Es wurden heterologe *H. vulgaris* (Basel) PPOD1 und -2-Proben benutzt. Die Methylenblaufärbung zeigt den Auftrag vergleichbarer RNA-Mengen.

Als Positivkontrolle war auf dieselben Filter jeweils auch *H. vulgaris* (Basel) RNA geblottet worden. Die heterologen *PPOD1* und -2-Proben detektierten durch ihre Sequenzähnlichkeit wiederum dieselben Transkripte (vgl. Abb. 2.9). Die im Vergleich zum jeweiligen *PPOD1*-Signal und dem *PPOD2*-Signal von *H. vulgaris* (Basel) schwachen *PPOD2*-Signale in beiden Spezies der Oligactis-Gruppe spiegeln die größere Sequenzähnlichkeit des *H. oligactis* PPOD-Genes mit *H. vulgaris* (Basel) *PPOD1* wider. Eine homologe PPOD-Probe, die der cDNA-Sequenz des *H. oligactis*-*PPOD1*-Genes entsprach, detektierte dieselben Transkripte (Daten nicht gezeigt). Mit keiner verwendeten Probe wurden Splicing-Varianten detektiert.

In situ Hybridisierungen wurden sowohl mit den beschriebenen *PPOD1*- und *PPOD2*-Proben aus *H. vulgaris* (Basel), als auch mit einer homologen *H. oligactis* *PPOD1*-Probe durchgeführt (Abb. 2.17). Mit allen Proben wurde in beiden Spezies der Oligactis-Gruppe eine starke Expression in der Basalscheibe detektiert. Wie schon für *H. vulgaris* (Basel) beobachtet (Abb. 2.10), nahm die Expression zur Basalscheibenmitte oftmals zu und es zeigte sich vereinzelt eine ringförmige Expression am Übergang zum Stiel.

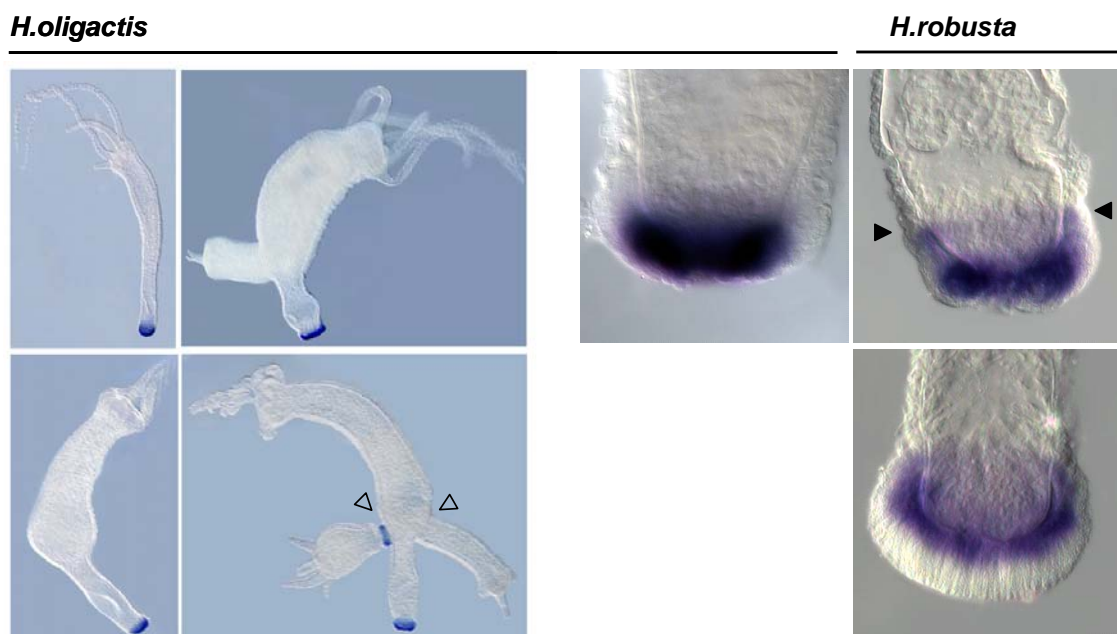


Abb. 2.17: Expression von *PPOD1* in der Oligactis-Gruppe. *In situ* Hybridisierung mit homologen *H. oligactis*- und heterologen Riboproben aus *H. vulgaris* (Basel). Leere Pfeilspitzen, Expression in Knospen; gefüllte Pfeilspitzen, ringförmige Expression am Übergang vom Stiel zur Basalscheibe.

Zusammenfassend fand sich in der **Oligactis-Gruppe** genomisch, ähnlich der Situation in *H.vulgaris* (AEP), nur ein PPOD-Gen, *H.oligactis PPOD1*. Dieses existierte in 2 Kopien, die genomisch eng beieinander lagen (Abb. 2.15). Es wurde ausschließlich in der Basalscheibe exprimiert (Abb. 2.16, Abb. 2.17) und zeigte hier dasselbe Expressionsmuster wie sein *H.vulgaris* (Basel)-Homolog (Abb. 2.10).

2.1.3.3 PPOD-Gene in den basalen Gruppen

2.1.3.3.1 Genomische Organisation und Expression

Durch eine Analyse der PPOD-Genfamilie in Spezies der basalen Circumcincta- und Viridis-Gruppen (Abb. 1.1 B) sollte die **ursprüngliche genomische Organisation von PPOD-Genen** in der Gattung *Hydra* und ihr **Expressionsmuster** geklärt werden. Die zu Beginn der Studie durchgeführten Southern und Northern Blots hatten die Anwesenheit von PPOD-Genen auch in den basalen *Hydra*-Gruppen angedeutet (Abb. 2.3). Im Zuge der darauf folgenden Klonierungsexperimente gelang es jedoch weder durch RT-PCR mit heterologen PPOD-Primern aus *H.vulgaris* (Basel) (2.1.2), noch durch Hybridisierung von *H.viridis*-cDNA- Macroarrays mit PPOD-Genfamilien-Proben (2.1.2, Abb. 2.4), ein PPOD-Homolog aus den basalen Gruppen zu identifizieren bzw zu isolieren. Diese Befunde sprachen für im Vergleich zur Oligactis- und Vulgaris-Gruppe **deutlich abweichende PPOD-Sequenzen** in diesen Gruppen. Daher war nur eine grobe Charakterisierung durch weitere Southern und Northern Blots unter Verwendung von heterologen PPOD-Proben aus anderen Spezies möglich (Abb. 2.18).

Für *H.circumcincta* waren im ersten **Southern Blot** in zwei verschiedenen Restriktionen jeweils ein bis zwei PPOD-Banden aufgetreten (Abb. 2.3 A). Da die 2 Banden im Southern Blot für *H.oligactis* und *H.vulgaris* (AEP) jeweils einem einzigen PPOD-Gen zugeordnet werden konnten (s.o.), ist auch für *H.circumcincta* die Existenz nur eines PPOD-Genes, evtl. in 2 Kopien, wahrscheinlich.

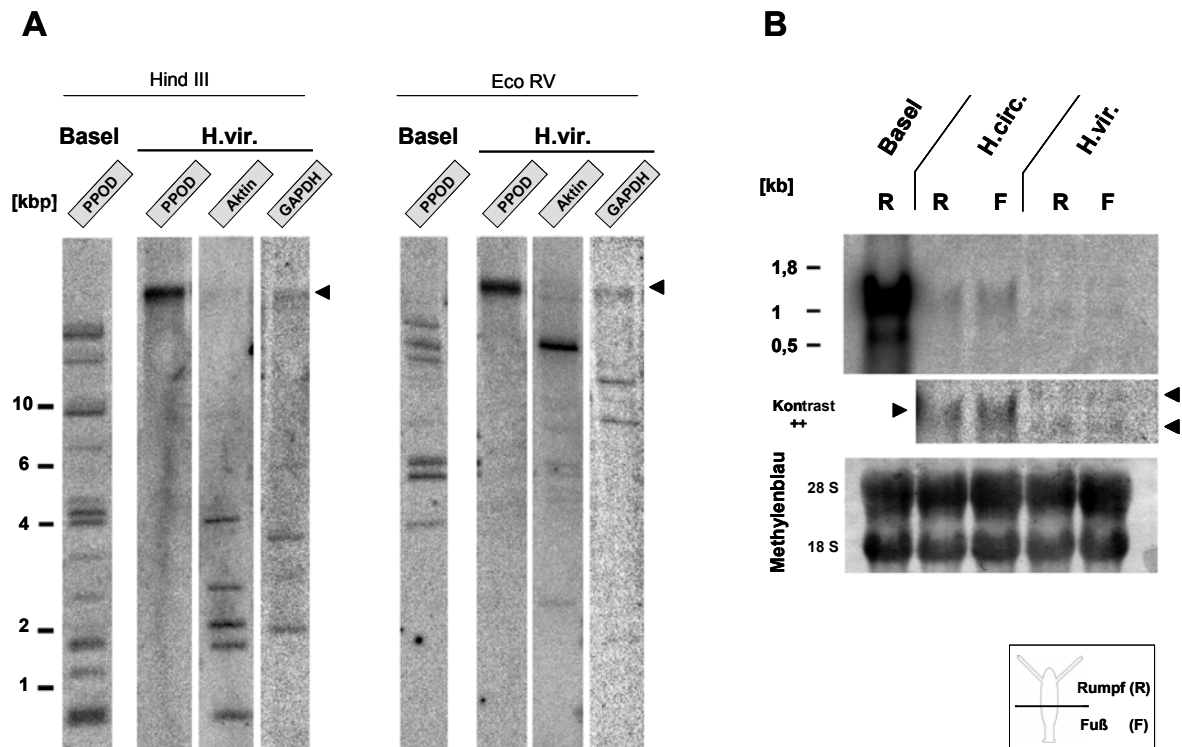


Abb. 2.18: PPOD-Gene in *H. viridis* und Expression von PPOD-Genen in Rumpf- und Fußgewebe von *H. circumcincta* und *H. viridis*. (A) Southern Blot mit *H. viridis*-gDNA. Sukzessive Hybridisierung mit PPOD-Genfamilien-, Aktin- und GAPDH-Probe. (B) Northern Blot mit Rumpf- und Fußgewebe aus *H. viridis* und *H. circumcincta* und heterologen *H. vulgaris* PPOD1 und -2 Proben. Die Methylenblaufärbung zeigt den Auftrag vergleichbarer RNA-Mengen.

Für *H. viridis* wurde im ursprünglichen Southern Blot jeweils nur ein **hochmolekulares Signal** in einem Größenbereich erhalten, der bei der Separierung der Restriktionen im Agarosegel geringe Mengen unverdauter gDNA erkennen ließ (Daten nicht gezeigt). Die Signale wurden daher zunächst als unspezifische Hybridisierung der PPOD-Probe an nicht-verdaute gDNA interpretiert (vgl. Abb. 2.3 A).

In weiteren **Southern Blot** Experimenten wurden sie jedoch auch für zwei weitere Restriktionen, wiederum auf gleicher Höhe, erhalten (Abb. 2.18 A). Eine anschließende Hybridisierung dieser Filter mit Aktin- und GAPDH-Proben zeigte spezifische Signale auch im niedermolekularen Bereich (die schwachen Signale im Größenbereich der PPOD-Bande bei der GAPDH-Hybridisierung (Abb. 2.18 A, Pfeilspitzen) sind auf eine unvollständige Entfernung der radioaktiven PPOD-Probe zurückzuführen). Die **PPOD-Signale** mussten daher als **spezifisch** angesehen werden. Offenbar liegen in *H. viridis* ein oder mehrere PPOD-Gene

in einem genomischen Bereich, der gängigen Restriktionsenzymen, angewendet auf mit Standardprotokollen isolierte *H.viridis*-gDNA, nicht zugänglich ist.

Die **Anwesenheit von PPOD-Genen in *H.viridis*** kann mithin bejaht, eine Aussage über ihre Anzahl jedoch nicht getroffen werden.

Der **Northern Blot**, der mit einer heterologen *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1*/*PPOD2*-Probe hybridisiert wurde, zeigte sowohl für *H.circumcincta* als auch für *H.viridis* schwache Signale im Größenbereich der bekannten *H.vulgaris* (Basel) PPOD-Transkripte (Abb. 2.18 B). Die Schwäche der Signale im Vergleich zum Kontrollansatz mit *H.vulgaris* (Basel)-RNA unterstreicht die durch weitere Beobachtungen (s.o) unterstützte Vermutung großer **Sequenzunterschiede**. PPOD-Signale finden sich in beiden Gruppen in gleicher Intensität sowohl im Rumpf als auch im Fuß, so dass eine **Expression von PPOD-Genen in beiden Körperhälften** als **ursprünglich** angenommen werden muss.

In den **basalen Gruppen** existiert offenbar **ein einziges PPOD-Gen**, welches im **Rumpf** und im **Fuß** exprimiert wird.

Die geschilderten Beobachtungen zusammenfassend, zeichnet sich die **PPOD-Genfamilie** innerhalb der **Gattung *Hydra*** durch **(i)** eine unterschiedliche genomische Komplexität, insbesondere auch bei Stämmen der gleichen systematischen Gruppe (Vulgaris-Gruppe) und **(ii)** durch eine differentielle Regulierung homologer PPOD-Gene in verschiedenen Spezies (*PPOD1*) sowie verschiedener PPOD-Gene innerhalb einer Spezies (*PPOD1* und *PPOD2*) aus. Weiterhin sind verschiedene PPOD-Gene offenbar an verschiedene Signalkaskaden gekoppelt. Es entsteht das Bild einer sich im Laufe der Phylogenie von *Hydra* vergleichsweise schnell weiterentwickelnden Effektorgenfamilie.

2.2 Regulation der *CnNK-2*-Transkription

In einem zweiten Projekt sollte ein kürzlich vorgestelltes Modell zum genomischen, regulativen Netzwerk rund um den im Endoderm der Stielregion von *Hydra* exprimierten Transkriptionsfaktor *CnNK-2* (Thomsen et al., 2004; s. 1.2.4) erweitert werden. Auf der Suche nach weiteren Mitgliedern und Konnektivitäten innerhalb dieses Netzwerkes wurden die *CnNK-2* 5'-flankierenden Sequenzen aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* isoliert und verglichen. Innerhalb interspezifisch konservierter Bereiche fanden sich mehrere potentielle Bindestellen für Vertebraten-Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Klasse, die im Anschluss durch EMSAs („electrophoretic mobility shift assays“) mit nukleärem Proteinextrakt sowie rekombinantem Protein auf die Bindung von einem *Hydra*-Forkhead-Homolog hin untersucht wurden.

2.2.1 „Phylogenetische Fußabdrücke“ in der *CnNK-2* 5'-flankierenden Sequenz

Im Zuge der zunehmenden Verfügbarkeit kompletter Genomsequenzen für eine immer größer werdende Anzahl von Spezies verschiedener systematischer Gruppen hat das sog. „phylogenetic footprinting“ eine stetig zunehmende Bedeutung bei der Identifizierung von *cis* regulativen Elementen erhalten. Diesem Ansatz zu Grunde liegt die Tatsache, dass das Mutationspotential *cis* regulativer Sequenzen durch ihre biologische Funktion als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren streng limitiert ist. Zumeist außerhalb kodierender Gensequenzen liegend und eingebettet in ein genomisches Umfeld höherer Variabilität, auf dessen Sequenzerhalt kein evolutionärer Druck lastet, lassen sie sich durch den Vergleich potentiell regulativer Sequenzen von orthologen Genen aus verschiedenen Arten identifizieren (Gumucio et al., 1992; Wasserman et al., 2000; Pennacchio und Rubin, 2001; Iwama und Gojobori, 2004).

Dieser Ansatz wurde auch zum Auffinden von an der transkriptionellen Kontrolle von *CnNK-2* beteiligten Faktoren gewählt. Über einen PCR-basierten Ansatz (vgl. 2.1.2) wurde jeweils ca. 1 kbp **5'-flankierende Sequenz des *CnNK-2*-Genes aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis*** isoliert. Die Sequenzen finden sich im Anhang. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen, die mit der **ConSite-**

Plattform durchgeführt wurden sind in Abb. 2.19 dargestellt. Zusammenfassend wurde aus einem **globalen Vergleich der CnNK-2 5'-flankierenden Sequenzen aus beiden Spezies** ein Konservierungsprofil erstellt und Bereiche mit einem vom Anwender definierten Konservierungsgrad, sog. phylogenetische Fußabdrücke, unter Verwendung von in der JASPAR-Datenbank (Sandelin et al., 2004a) niedergelegten Profilen nach Konsensusbindemotiven für verschiedene Transkriptionsfaktoren durchsucht.

Für die Analyse wurden **orthologe, genomische Sequenzen** (-989 bis +100, relativ zum Startkodon) aus beiden Spezies sowie die *H.vulgaris* (Basel) *CnNK-2* cDNA-Sequenz (Grens et al., 1996) eingesetzt. Für die Erstellung des **Konservierungsprofils** (Abb. 2.19 A) wurde die Standard-Fenstergröße („window size“) von 50 Nukleotiden gewählt. Zur Definierung der konservierten Regionen, die im Anschluss für die Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen herangezogen werden sollten, wurde ein hoher „conservation cutoff“ von 90 % gewählt, da molekulare Daten (Abb. 1.1 B) und Histokompatibilitätsstudien (Kuznetsov et al., 2002) eine nahe Verwandtschaft von *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* nahe legten, die sich auch in einer relativ hohen Identität der 5'-flankierenden Bereiche von 69 % (innerhalb der bekannten 989 bp) im Vergleich zu ca. 90 % im kodierenden Bereich (innerhalb 582 bp bekannter Sequenz aus beiden Arten) widerspiegelte.

Mit den gewählten Parametern wurden **zwei interspezifisch hochkonservierte Regionen**, im Folgenden Region I bzw. II genannt, identifiziert, die einen Konservierungsgrad von mehr als 90 % aufwiesen (Abb. 2.19 A). Bei der **Detektierung potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen** setzen die ConSite zu Grunde liegenden Algorithmen eine uniforme Basenverteilung innerhalb der analysierten, genomischen Sequenzen voraus. Die Basenkomposition des *Hydra*-Genoms ist mit 71 % sehr AT-reich (Joseph Gall, pers. Mitteilung). Unter diesen Bedingungen ist mit falsch-positiven Signalen in beliebigen, betrachteten Sequenzen zu rechnen (Stormo, 2000). Die Analyse erfolgte deshalb unter **stringenten Bedingungen** bei Verwendung eines hohen „transcription factor score threshold“ (TFST), der von 80 % auf 90 % gesteigert wurde.

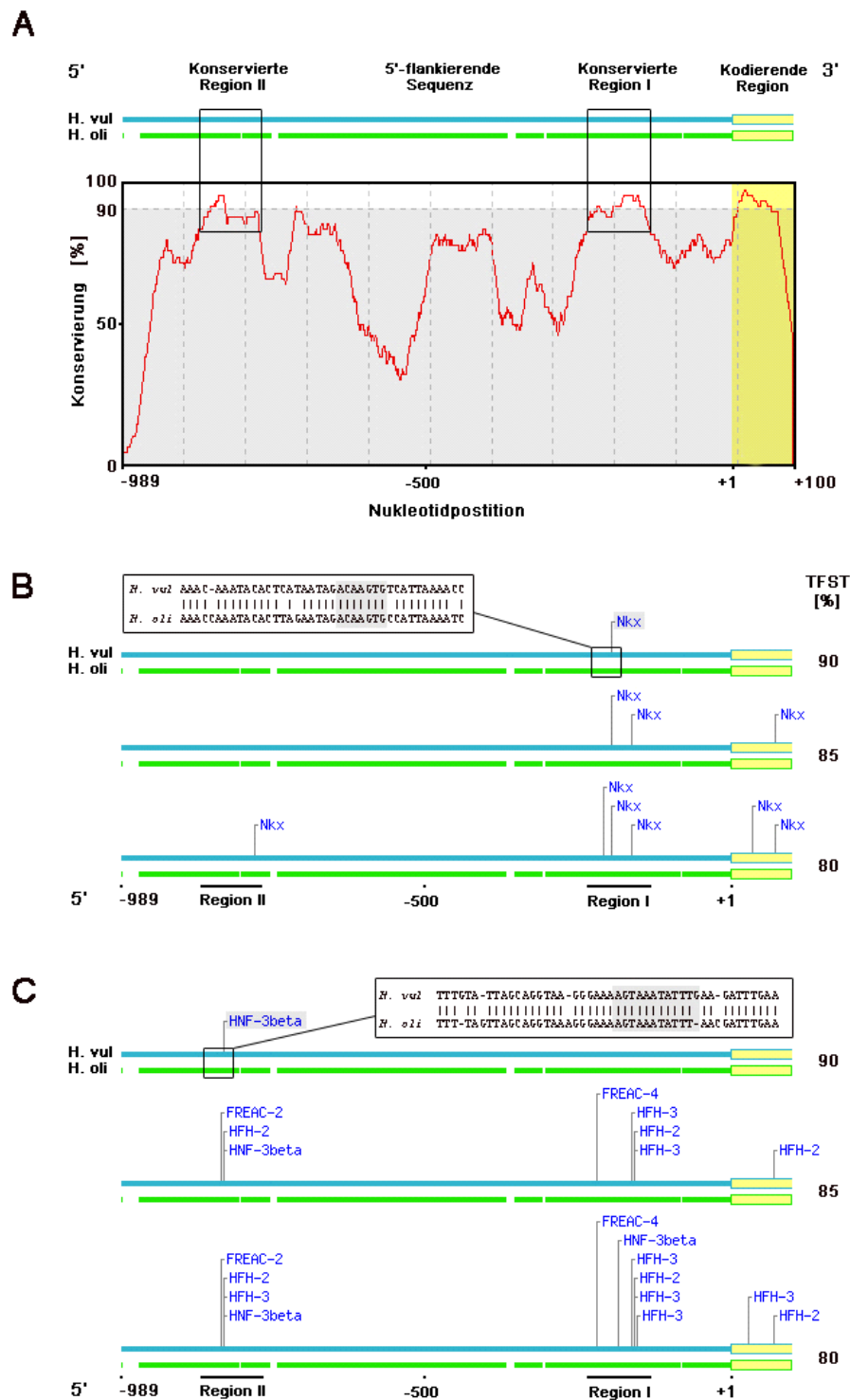


Abb. 2.19: „Phylogenetic footprints“ und interspezifisch konservierte Transkriptionsfaktor-bindestellen in der 5'-flankierenden Region von *CnNK-2*. ConSite-Analyse (Conservation Cutoff: 90 %, Window Size: 50 Nukleotide, Transcription factor score threshold (TFST): 80-90 %). **(A)** „Phylogenetic footprints“. Das Konservierungsprofil der orthologen *CnNK-2* 5'-flankierenden Sequenzen aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* zeigt zwei den Conservation Cutoff (90 %, grau schattiert) übertreffende Regionen an (Kästen). **(B)** Redetektion eines als autoregulatorische *CnNK-2*-Bindestelle charakterisierten Nkx-Motifs (Thomsen et al., 2004). Die *H.vulgaris* (Basel) -Sequenz im Kasten entspricht dem in der früheren Studie benutzen Oligonukleotid NK-2 (1/2); das interspezifisch konservierte Nkx-Motif ist schattiert. **(C)** Detektion einer interspezifisch konservierten HNF-3 β / Forkhead-Bindestelle. Die *H.vulgaris* (Basel)-Sequenz im Kasten entspricht dem in EMSA-Experimenten verwendeten Oligonukleotid BH_1 (Abb. 2.23); das interspezifisch konservierte HNF-3 β -Motif ist schattiert. *H.vul.* = *H.vulgaris* (Basel). (nach Siebert et al., 2004).

Zur **Evaluierung** der bei der Sequenzanalyse gewählten Parameter wurde zunächst versucht, eine in *H. vulgaris* (Basel) bereits *in vitro* funktionell getestete, autoregulative *CnNK-2* Bindestelle durch ConSite wiederaufzufinden. Für die Analyse wurde das in der JASPAR-Datenbank implementierte Nkx-Profil verwendet, mit dem auch die ursprüngliche Detektion dieser Bindestelle erfolgt war (Thomsen et al., 2004). Es basiert auf den Bindeeigenschaften des murinen Homöodomänfaktors Nkx-2.5 (*Mus musculus*, Chen und Schwartz, 1995). *CnNK-2* weist im Bereich der DNA-bindenden Homöodomäne eine Identität von 70% mit Nkx-2.5 auf (Grens et al., 1996).

Bei einem TFST von 80 % wurden in beiden konservierten Regionen der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region potentielle Nkx-Bindestellen detektiert (Abb. 2.19 B). Wurde die Stringenz durch die Erhöhung des TFST gesteigert, so nahm die Anzahl der detektierten Nkx-Bindestellen ab. Die Bindestelle, die bei einem TFST von 90 % noch erkannt wurde, konnte als die bereits beschriebene identifiziert werden.

Ein zuvor *in vitro* als ***CnNK-2* Bindestelle** charakterisiertes Nkx-Bindemotiv (Thomsen et al., 2004; vgl. Abb. 19 B, Kasten) in der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region konnte also mit den gewählten Parametern durch ConSite wieder aufgefunden werden. Die Lage in einem interspezifisch konservierten Bereich (Abb. 2.19 A, Region I) und die 100 %-ige Konservierung des Bindemotivs (Abb. 2.19 B, Kasten, grau schattiert) unterstützen die postulierte *in vivo* Funktionalität bei der Autoregulation der *CnNK-2*-Transkription.

Im Zuge der Analyse mit Profilen anderer Familien von Transkriptionsfaktoren wurde eine Reihe von **interspezifisch konservierten Bindemotiven für Proteine der Forkhead-Klasse** identifiziert (Abb. 2.19 C). Selbst unter stringentesten Bedingungen, d.h. bei einem TFST von 90 % oder sogar 99 % (nicht gezeigt), blieb eine potentielle **Bindestelle für HNF-3 β** detektierbar. Das aus zwölf Nukleotiden bestehende Motiv ist somit nahezu identisch mit der Kernzielsequenz des Vertebraten-Transkriptionsfaktors HNF-3 β (*Rattus norvegicus*) (Overdier et al., 1994), dessen Bindesepezifitäten zur Modellierung des Bindeprofils verwendet worden waren. Eine stringente Analyse mit sämtlichen in der JASPAR-Datenbank implementierten Profilen ergab, dass dieses Forkhead-Motiv das stärkste Signal in der betrachteten genomischen

Sequenz liefert (Daten nicht gezeigt). Der in Abb. 2.19 C im Kasten gezeigte Ausschnitt umfasst dieses Motiv; die gezeigte *H.vulgaris* (Basel)-Sequenz entspricht dem in anschließenden funktionellen Studien verwendeten **Oligonukleotid BH_1** (s.u.).

Die *in silico* Analyse der 5'-flankierenden Sequenzen des **CnNK-2** Genes aus *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* deutete somit neben der *in vivo* Funktionalität eines bereits charakterisierten *cis* regulatorischen Elements aufgrund interspezifischer Konservierung auch eine transkriptionell regulative Interaktion von *Hydra*- Forkhead-Homologen mit dem *CnNK-2*-Promotor an.

2.2.2 Budhead, das Protein eines *Hydra* Forkhead Homologs, bindet an ein interspezifisch konserviertes Motiv im *CnNK-2*-Promotor

In *Hydra* konnten bisher drei verschiedene Gene für Forkhead-Transkriptionsfaktoren gefunden werden (Martinez et al., 1997). Die größte Ähnlichkeit zum murinen **HNF-3 β** (*Rattus norvegicus*), für das eine Bindestelle in der *CnNK-2* 5'-flankierenden Sequenz postuliert wurde (Abb. 2.19 C), weist von diesen das gleichzeitig auch am besten charakterisierte ***budhead*** auf. Es zeigt mit HNF-3 β innerhalb der DNA-bindenden Forkhead-Domäne auf Aminosäureebene eine 78 %-ige Übereinstimmung. Der Grad der Übereinstimmung erhöht sich weiter, wenn man den Vergleich auf die für die DNA-Bindung relevanten Bereiche beschränkt (Martinez et al., 1997).

Durch **Gelretentionsanalyse**, "electrophoretic mobility shift assays" (**EMSAs**), sollte die sequenzspezifische Bindung von *budhead* an interspezifisch konservierte Forkhead-Bindemotive in der *H.vulgaris* (Basel) *CnNk-2* 5'-flankierenden Region im Folgenden überprüft werden.

2.2.2.1 EMSAs – Auswahl der Oligonukleotide

Dazu wurden ca. 40 bp lange **Oligonukleotide** konstruiert, die Abschnitten des *CnNK-2*-Promotors dieser Spezies entsprachen und zu testende Motive sowie diese flankierende Sequenzen umfassten. Die Lage der den verwendeten Oligonukleotiden entsprechenden Sequenzen ist in Abb. 2.20 A dargestellt. Die

im Zuge des „phylogenetic footprinting“ bzw. bei der Bindestellenvorhersage benutzen Profile beruhen auf Bindesepezifitäten von Vertebraten-Transkriptionsfaktoren (vgl. Abb. 2.19). Aufgrund der großen **evolutionären Distanz von *Hydra* und Vertebraten** sollten daher zusätzlich zu der hochkonservierten HNF-3 β -Bindestelle auf dem Oligonukleotid BH_1 (Abb. 2.20 A, vgl. Abb. 2.19 C) auch **weniger konservierte Motive** in die Analyse mit einbezogen werden. In einem weniger stringenten Ansatz des „phylogenetic footprinting“ mit einem „conservation cutoff“ von 60 % und einem TFST von 80 % wurden insgesamt 47 Forkhead-Bindemotive angezeigt (Daten nicht gezeigt). Unter anderem wurden für die in Abb. 2.20 B und C gezeigten Regionen der *CnNK-2* 5'-flankierenden Sequenz mehrere potentielle Forkhead-Bindemotive angezeigt. Die korrespondierenden *H.vulgaris* (Basel)-Sequenzen wurden als Oligonukleotide BH_2 und BH_3 in die EMSA-Studien mit einbezogen. Als Kontroll-Oligonukleotid diente das in einer früheren Studie benutzte NK-2 (1/2), welches eine autoregulative *CnNK-2* Bindestelle umfasst (vgl. Abb. 2.19 B).

Die **Oligonukleotide** sollten auf eine spezifische Bindung durch (i) Proteine aus *Hydra*-Kernextrakt sowie (ii) **rekombinantes *budhead*-Protein** überprüft werden.

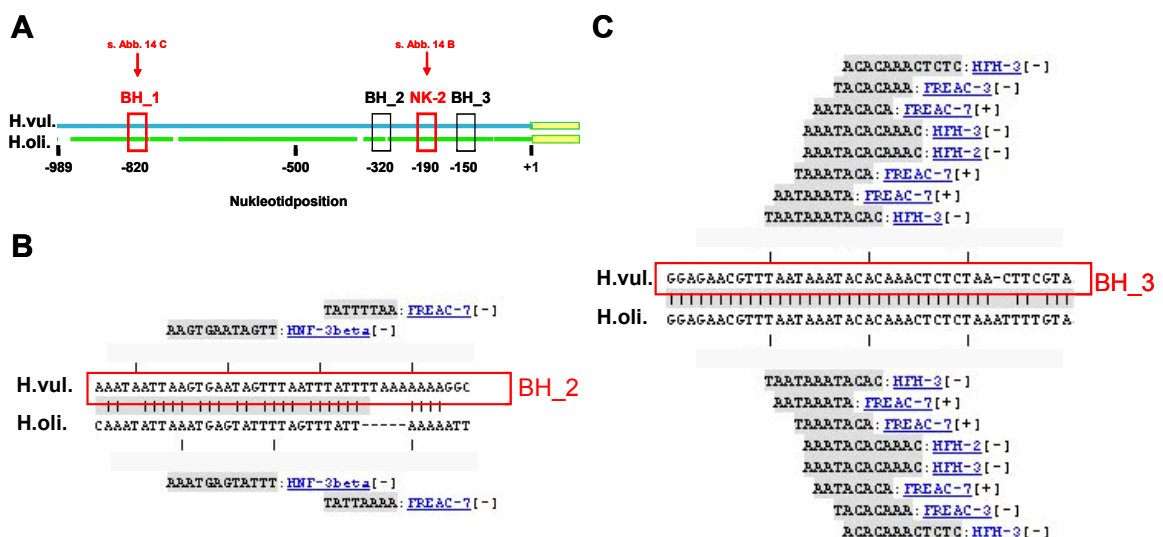


Abb. 2.20: Oligonukleotide mit konservierten Forkhead-Bindemotiven aus der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region. (A) Lage der verwendeten Oligonukleotide sowie des Kontroll-Oligonukleotids NK-2 (1/2). (B, C) BH_2 und BH_3 entsprechende Ausschnitte aus der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region. Angezeigt sind interspezifisch konservierte Bindemotive für Forkhead-Proteine. *H.vul.* = *H.vulgaris* (Basel). (Grafiken verändert nach ConSite).

2.2.2.2 EMSAs - Überexpression von *budhead* in *E.coli*

Die Ergebnisse der Überexpression von *budhead* in *E.coli* sind in Abb. 2.21 zusammengefasst. Durch RT-PCR mit *H.vulgaris* (Basel) cDNA wurde eine vollständige *budhead*-cDNA amplifiziert, in einen **Expressionsvektor** kloniert, der die Markierung des rekombinanten Proteins mit einem N-terminalen His-Tag gewährleistete und das Konstrukt in *E.coli* transformiert. Die Überprüfung des Leserahmens erfolgte durch Sequenzierung. Die Expression von *budhead* wurde durch **SDS-PAGE von Bakterienlysaten und Western Blot** Analyse mit einem monoklonalen anti-His Antikörper verfolgt. Verglichen wurden Kulturlysate von induzierten und nicht induzierten Bakterien mit oder ohne Vektor. Das theoretische, von der cDNA abgeleitete Molekulargewicht des Proteins lag bei ca. 36 kDa. Durch die Expression mit N-terminalem His-Tag war eine Größenzunahme von 3 - 5 kDa zu erwarten (Invitrogen). Das rekombinante Protein sollte somit ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa aufweisen.

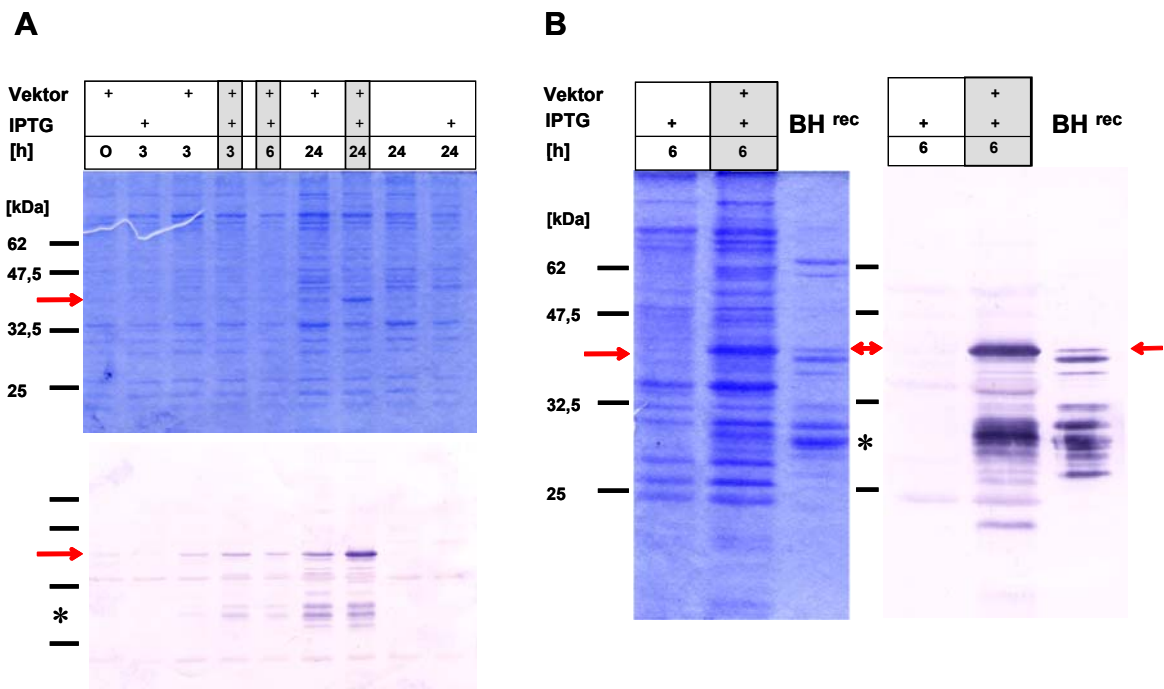


Abb. 2.21: Überexpression von *budhead* in *E.coli*. Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele und Western Blots mit anti-His Antikörper. **(A)** Pilotexpression. Bakterienlysate der Zeitpunkte 0, 3, 6 und 24h nach IPTG-Induktion sowie Kontrollysate aus Bakterien ohne Konstrukt bzw. IPTG. **(B)** Überexpression und Aufreinigung. Bakterienlysate mit und ohne Konstrukt nach 6 h Induktion sowie über den His-Tag aufgereinigte Budhead-Proteinfraktion. Grau hinterlegt, Ansätze mit induzierten, konstrukttragenden Bakterien; rote Pfeile, intakte Budhead-Fractionen; Sterne: Degradationsprodukte.

Bei der **Pilotexpression** wurde in Lysaten konstrukttragender Bakterien eine Bande im erwarteten Größenbereich mit im Zuge der Induktion zunehmender Stärke erhalten (Abb. 2.21 A, Pfeil). Diese entsprach gleichzeitig dem größten, IPTG-induzierbaren und vom anti-His Antikörper erkannten Protein. In denselben Lysaten traten parallel zu dieser Bande, die offenbar vollständig synthetisiertem *budhead*-Protein entsprach, auch kleinere durch den Antikörper detektierte Banden auf. Da diese in Lysaten konstruktloser Bakterien nicht auftraten und der Antikörper den N-terminalen His-Tag des rekombinanten Proteins erkennt, wurden diese auf carboxyterminale Veränderungen (Degradation, unvollständige Synthese) zurückgeführt.

Nach der **Überexpression** erfolgte die **Aufreinigung** des rekombinanten Proteins über Ni-NTA-Agarose (Abb. 2.21 B). Wiederum traten im Western Blot neben der größten, als rekombinantes Budhead angesprochenen Bande Degradationsprodukte auf.

Die in Lysaten von konstruktlosen Bakterien durch den Antikörper erkannten Banden traten in der aufgereinigten Proteinfraction nicht auf (Abb. 2.21 B, vgl. Spuren 1 und 3). Dieser Befund zeigte, dass alle in der aufgereinigten Fraction vom Antikörper erkannten Banden Produkte des *budhead*-Expressionsvektors waren. Der spätere Supershift-Versuch mit dem anti-His-Antikörper (Abb. 2.22 C) belegte zudem, dass die im Zuge der EMSAs erhaltenen DNA-/Proteinkomplexe unter Verwendung der aufgereinigten Proteinfraction durch ein Protein mit N-terminalem His-Tag verursacht wurden.

Zusammenfassend konnte also durch bakterielle Überexpression natives, **funktionelles *budhead*-Protein** erhalten werden.

2.2.2.3 EMSAs – „Screening“ verwendeter Oligonukleotide

In einem Vorversuch wurden die ausgewählten, radioaktiv markierten Oligonukleotide (s. Abb. 2.20) auf eine Interaktion sowohl mit *Hydra*-Kernproteinen aus oberer und unterer Körperhälfte als auch rekombinantem Budhead untersucht (Abb. 2.22).

Mit **Kernextrakt** deutete die Bildung eines DNA-/Proteinkomplexes mit BH_1 die Bindung desselben durch ein *Hydra*-Kernprotein an (Abb. 2.22 A, Pfeil). Der starke, fußspezifische DNA-/Proteinkomplex im Kontrollansatz mit NK-2 (1/2) geht auf das Binden von nukleärem *CnNK-2* zurück (Thomsen et al., 2004) und indizierte das Vorliegen nativer, funktioneller Kernproteine.

Rekombinantes Budhead bildete mit allen untersuchten Oligonukleotiden Komplexe aus (Abb. 2.22 B). Durch Competition mit einem sequenzfremden Oligonukleotid konnten diese jedoch für BH_2, BH_3 und das Kontroll-Oligonukleotid als unspezifisch ausgewiesen werden. Der Komplex mit BH_1 ließ sich nur durch spezifische Competition, d.h. durch Zugabe von nicht-markiertem BH_1 verdrängen.

Wird einem Bindeansatz mit BH_1 und rekombinantem Protein zusätzlich der **anti-His Antikörper** zugesetzt, so tritt durch die Bindung desselben an den Budhead-/BH_1-Komplex ein weiterer, stärker retardierter Komplex, der sog.

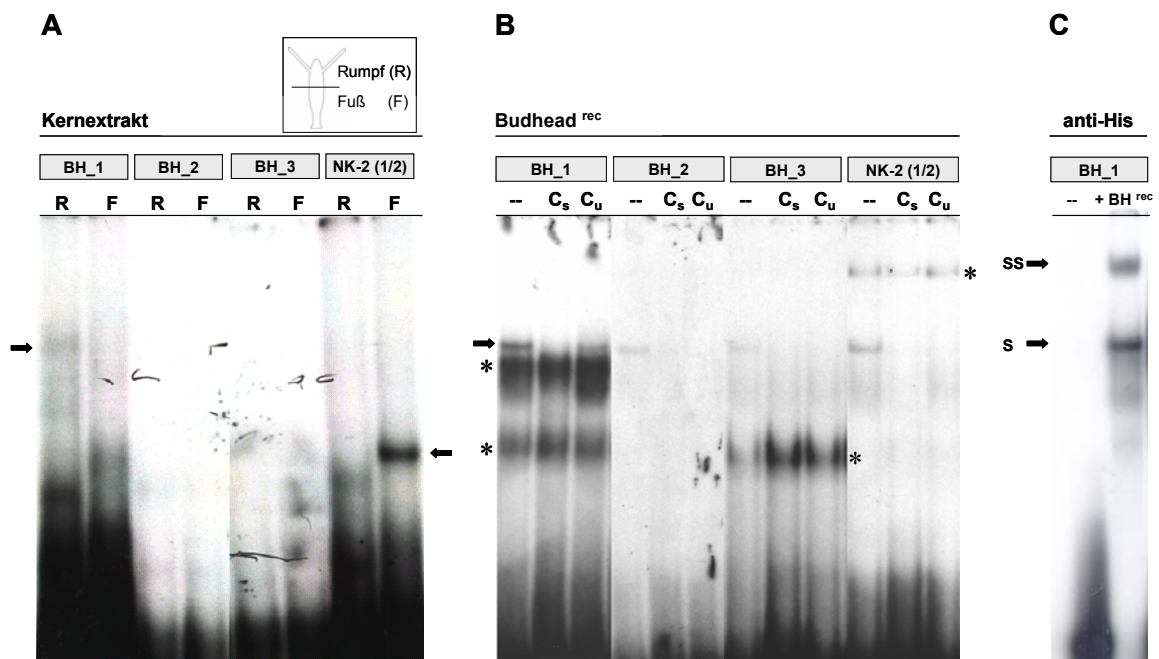


Abb. 2.22: Protein-/DNA-Interaktionen an interspezifisch konservierten Forkhead-Bindemotiven im *CnNK-2* 5'-flankierenden Bereich. (A) Nukleärer Proteinextrakt aus Rumpf- und Kopfgewebe bildet Protein-/DNA-Komplexe mit BH_1 und NK-2 (1/2) (Pfeile). **(B)** Rekombinantes Budhead bindet schwach an alle verwendeten Oligonukleotide (Pfeil). Nur der Komplex mit BH_1 ist spezifisch. **(C)** Supershift-Experiment mit BH_1 und anti-His. C_s, Zugabe von spezifischem Kompetitor; C_u, Zugabe von unspezifischem Kompetitor. Pfeile zeigen Protein-/DNA-Komplexe. Sterne zeigen unspezifische Komplexe, die in allen Kontrollen auftreten.

„Supershift“, auf (Abb. 2.22 C). Das belegt die Bildung der in Abb. 2.22 B gezeigten Komplexe durch Bindung eines rekombinanten Proteines mit His-Tag und mithin das Vorliegen funktionellen Budhead-Proteins in der aufgereinigten Fraktion der Überexpressionsversuche (s.o.).

Von mehreren untersuchten **Oligonukleotiden** mit konservierten Forkhead-Bindemotiven (Abb. 2.20) wurde mithin nur **BH_1** sowohl von *Hydra*-Kernprotein wie auch spezifisch von rekombinantem Budhead gebunden.

2.2.2.4 EMSAs – Charakterisierung von BH_1

Auf diesem Oligonukleotid befand sich mit dem im Zuge des „phylogenetic footprinting“ identifizierten **HNF-3 β - Bindemotiv** (Abb. 2.19) die interspezifisch am stärksten konservierte Forkhead-Bindestelle (vgl. 2.2.1).

Um den genauen **Ort der DNA-/Protein-Interaktion** zu bestimmen, wurden weitere EMSAs durchgeführt (Abb. 2.23).

Dabei wurde neben **BH_1** auch eine im Bereich des HNF-3 β –Bindemotivs **mutierte Version** dieses Oligonukleotids verwendet (Abb. 2.23 A). Die beobachtete Bindung von BH_1 durch Kernextrakt (Abb. 2.22 A) konnte reproduziert werden. Kompetitionsversuche zeigten zusätzlich die Spezifität dieser Bindung (Abb. 2.23 B). Die spezifischen DNA-/ Proteinkomplexe mit *Hydra*-Kernprotein und rekombinantem Budhead komigrierten, was auf identische, DNA-bindende Proteine in beiden Ansätzen und mithin auf eine *in vivo* Bindung der durch BH_1 repräsentierten Region des *CnNK-2*-Promotors durch *budhead*-Protein hindeutete.

Das **Oligonukleotid BH_1mu** mit mutiertem HNF-3 β - Bindemotiv konnte im Ansatz mit radioaktiv markiertem BH_1 und rekombinantem Protein nicht als spezifischer Kompetitor agieren; der DNA-/ Proteinkomplex blieb bestehen. Wurde BH_1mu selbst markiert und mit rekombinantem Budhead inkubiert, so bildete sich nur ein unspezifischer Komplex, der durch Zugabe von unspezifischem Kompetitor eliminiert wurde. Damit konnte das **HNF-3 β -Motiv als Ort der spezifischen DNA-/Protein-Interaktionen** ausgewiesen werden.

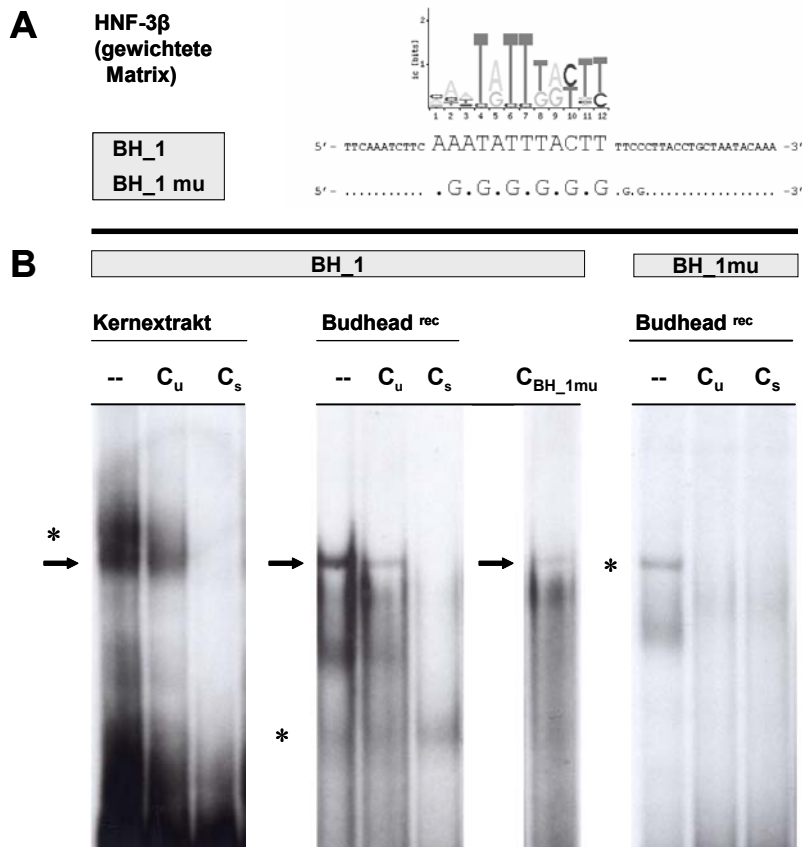


Abb. 2.23: Spezifische Protein-/DNA-Interaktionen an einem Forkhead-Bindemotiv in der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region. (A) Grafische Darstellung der gewichteten Matrix des HNF-3 β -Motivs (vgl. Abb. 2.19 C) und der Oligonukleotide BH_1 und BH_1 mu (Einzelstrangdarstellung). **(B)** Nukleärer Proteinextrakt und rekombinantes Budhead bilden jeweils einen spezifischen Protein-/DNA-Komplex (Pfeil). Beide Komplexe komigrieren. Der mutierte Oligo BH_1 mu wirkt im Ansatz mit markiertem BH_1 wie ein unspezifischer Kompetitor (C_{BH_1mu}); wird er radioaktiv markiert, zeigt sich lediglich eine unspezifische Bindung von rekombinantem Protein. C_s, Zugabe von spezifischem Kompetitor; C_u, Zugabe von unspezifischem Kompetitor; C_{BH_1mu}, Zugabe von unmarkiertem BH_1 mu; Pfeile, spezifische Protein-/DNA-Komplexe; Sterne, unspezifische Komplexe. (nach Siebert et al., 2004)

Zusammenfassend zeigten die **EMSA-Experimente**, dass ein Oligonukleotid mit einem interspezifisch konservierten **Bindemotiv für HNF-3 β in der 5'-flankierenden Sequenz** des *H. vulgaris* (Basel) *CnNK-2*-Gens spezifisch durch *Hydra*-Kernextrakt und Budhead, ein *Hydra*-HNF-3 β - Homolog, gebunden wird. Eine Mutation des Motivs führte zum Verlust der spezifischen DNA-/Proteinkomplexbildung. Damit deutet sich eine **Regulation der *CnNK-2*-Expression durch die Bindung von *budhead*-Protein** in der *CnNK-2-cis* regulatorischen Region an.

2.2.3 Budhead, ein negativer Regulator der *CnNK-2*-Expression?

Ein direkter Nachweis der Signifikanz des identifizierten Budhead-Bindemotivs für die *CnNK-2*-Transkription wäre durch Experimente mit Reportergenkonstrukten möglich gewesen. Da sich diese für *Hydra* noch in der Entwicklung befinden (Miljkovic et al., 2002), wurde nach indirekten Hinweisen auf die Art der Interaktion von *budhead* und *CnNK-2* gesucht. Dazu wurden die Expressionsmuster beider Transkriptionsfaktoren im Zuge (i) der Mustererhaltung im adulten Tier, (ii) des Knospungsprozesses und (iii) bei Manipulationen des Positionswertes durch chemische Interferenz mit LiCl untersucht.

2.2.3.1 Komplementäre Expression von *CnNK-2* und *budhead*

Für *budhead* ist eine kopfspezifische, endodermal-epitheliale Expression (i) im Bereich des unteren Hypostoms und der Tentakelzone sowie (ii) früh in sich entwickelnden Knospen beschrieben worden (Martinez et al., 1997). *CnNK-2* hingegen wird fußspezifisch im Endoderm der Stielregion exprimiert (s. 1.2.4). In früheren Studien hatte sich ein Fehlen der *CnNK-2*-Expression in sich entwickelnden Knospen angedeutet (Grens et al., 1996).

Um einen Eindruck von der Natur der potentiellen Interaktion des kopfspezifischen Budhead-Proteins mit dem fußspezifischen *CnNK-2*-Gen zu erhalten, wurden die Expressionsmuster beider Gene mit Schwerpunkt auf der Knospenbildung, in deren Verlauf offenbar beide Gene in enger Nachbarschaft exprimiert werden, durch ***in situ* Hybridisierung** in *H.vulgaris* (Basel) untersucht (Abb. 2.24). Es wurden jeweils die gesamten, kodierenden cDNA-Bereiche als Riboprobe eingesetzt.

Für ***CnNK-2*** wurde in ganzen Tieren das beschriebene Expressionsmuster erhalten (Abb. 2.24 E), während für ***budhead***, zusätzlich zu der beschriebenen Transkriptverteilung im unteren Hypostom und der Tentakelzone (s.o.), eine Expression bis hinunter zur Knospungszone nachweisbar war (Abb. 2.24 A).

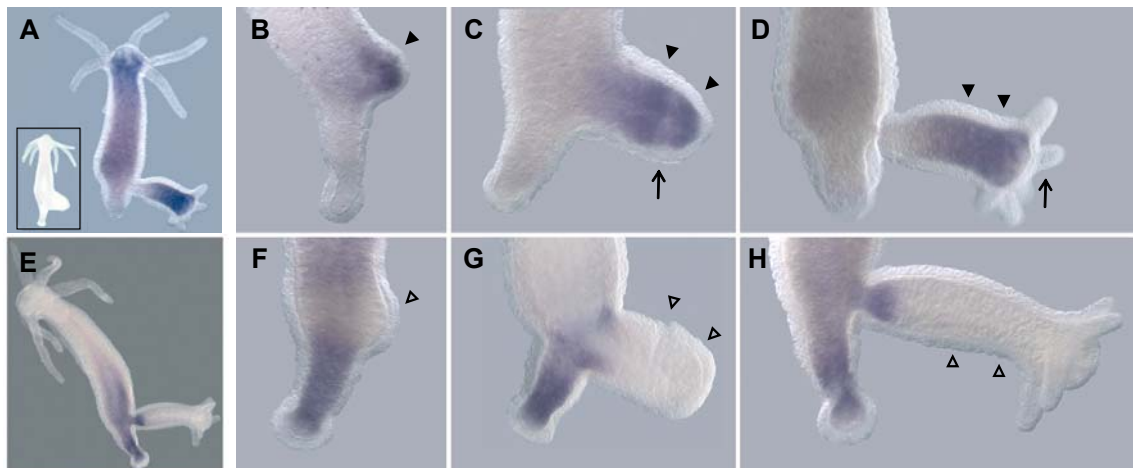


Abb. 2.24: Komplementäre Expression von *CnNK-2* und *budhead*, einem *Hydra* Forkhead Homolog. *In situ* Hybridisierung mit *budhead* (A-D) und *CnNK-2* (E-H)-Riboproben. Gezeigt sind ganze Tiere (A, E) und verschiedene Knospungsstadien (B-D, F-H). Dies sind die Stadien 3 (B, F), 5 (C, G) und 8-9 (D, H) nach Otto und Campbell, 1977. Gefüllte Pfeilspitzen, Anwesenheit von *budhead*-Transkript; leere Pfeilspitzen, Abwesenheit von *CnNK-2*-Transkript; Kasten in (A), „sense“ - Negativkontrolle; Pfeile, *budhead*-transkriptfreie Tentakelansätze (C) bzw. Tentakeln (D).

Im Gastralbereich der adulten Tiere wurden beide Gene in Form von **gegenläufigen Gradienten** exprimiert. Schon in frühen Knospungsstadien war eine starke, den Transkriptionsgrad im Kopf des Muttertieres übertreffende Expression von *budhead* in der gesamten Knospenanlage zu beobachten (Abb. 2.24 B). Im Laufe der weiteren Entwicklung kam es zu einer Konzentrierung des Transkripts im sich entwickelnden Kopf, wobei Tentakelansätze (Abb. 2.24 C) und Tentakeln (Abb. 2.24 D) frei von *budhead*-Transkript blieben (Pfeile).

Die Aufregulierung von *budhead* in frühen Knospen korreliert mit einem Verschwinden von *CnNK-2*-Transkripten aus diesem Bereich (Abb. 2.24 F). In intermediären Knospungsstadien kommt es zu einer ringförmig verstärkten Expression von *CnNK-2* im parentalen Gewebe an der Basis der auswachsenden Knospe (Abb. 2.24 G). Erst in späten Stadien, kurz vor der Ablösung vom Muttertier, ist es auch in der Knospe nachweisbar (Abb. 2.24 H).

Zusammengefasst zeigen beide in *Hydra* endodermal-epithelial exprimierte Transkriptionsfaktoren **komplementäre Transkriptverteilungen** (i) im adulten Tier sowie (ii) in enger räumlicher Beziehung während des Knospungsprozesses.

Die *in situ* Hybridisierungen deuten somit für das ***budhead*-Protein**, vor dem Hintergrund einer durch das „phylogenetic footprinting“ indizierten und *in vitro* nachgewiesenen Interaktion mit der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region, den Charakter eines **negativen *CnNK-2*-Regulators** an.

2.2.3.2 Effekte von LiCl auf die Expression von *CnNK-2* und *budhead*

Das Expressionsmuster von *CnNK-2* in *Hydra* ändert sich drastisch durch Inkubation mit dem Peptid *Hym 346/pedibin* oder LiCl. Beiden Behandlungen wird eine Absenkung des Positionswertes entlang der Körperachse von *Hydra* bzw. eine Zunahme des Fußbildungspotentials zugesprochen (vgl. 2.1.3.1.5). Um zu testen, ob die Effekte dieser Signale auf die *CnNK-2*-Expression mit einer Änderung der Expression von *budhead*, einem potentiellen Inhibitor, korrelieren bzw. durch diese vermittelt werden, wurden **RT-PCR**-Experimente mit cDNA aus LiCl-inkubierten sowie Kontrolltieren durchgeführt (Abb. 2.25).

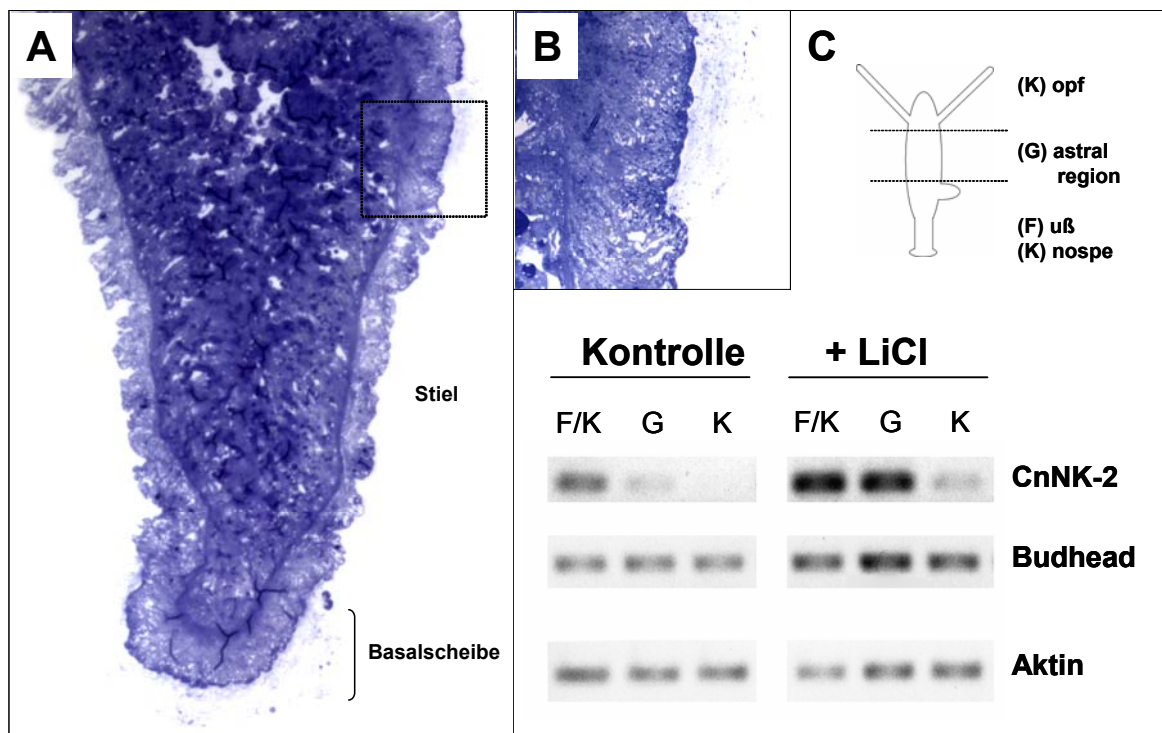


Abb. 2.25: LiCl hat keinen Einfluss auf die Expression von *budhead*. (A) Toluidinblaugefärbter Semidünnschnitt eines Hydrafußes. Die LiCl-Behandlung führt zur Bildung ektopischer Fußstrukturen. (B) Vergrößerung der ektopischen Basalscheibe. (C) RT-PCR mit cDNA aus verschiedenen Körperregionen von LiCl-inkubierten sowie Kontrolltieren mit *CnNK-2*, *budhead*- und *Aktin*-spezifischen Primern. (nach Siebert et al., 2004).

Wie beschrieben führte die **LiCl-Behandlung** der Polypen zur Bildung von zahlreichen ektopischen Fußstrukturen (Abb. 2.25, vgl. Abb. 2.13). Der Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitt des Fußes eines LiCl-inkubierten Polypen in Abb. 2.25 A zeigte eine **ektopische Basalscheibe** mit den typischen, hochprismatischen, mukusezernierenden Zellen im Ektoderm (Abb. 2.25 B).

Die **RT-PCR mit *CnNK-2*-Primern** belegte die bekannte Fehlregulation des Transkriptionsfaktors durch LiCl. Es zeigte sich ein generell höherer Transkriptionsgrad sowie eine Verschiebung der *CnNK-2*-Expression in den Gastralbereich (Abb. 2.25 C).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung zeigte die RT-PCR in Kontroll- wie auch in LiCl-inkubierten Tieren ***budhead*-Transkripte entlang der gesamten Körpersäule von *Hydra***. Die Expressionsdomäne von *budhead* änderte sich durch LiCl nicht, der Transkriptionsgrad allenfalls im Sinne einer minimalen Aufregulierung in allen Gewebefractionen.

Im Gegensatz zu *CnNK-2* ist die **Expression von *budhead*** offenbar nicht an die durch chemische Interferenz mit LiCl gestörten Signalkaskaden in *Hydra* gekoppelt. Weiterhin zeigen die Beobachtungen, dass die sich durch *in situ* Hybridisierungen andeutende Repression von *CnNK-2* in Kopfstrukturen adulter Polypen sowie in sich entwickelnden Knospen offenbar kombinatorisch durch mehrere Faktoren vermittelt wird.

Die *in vitro* durch EMSAs nachgewiesene **Interaktion von *budhead*-Protein** mit einem durch „phylogentic footprinting“ identifizierten Motiv im **Promotor von *CnNK-2*** und die **Effekte von LiCl** auf seine Expression lassen sich als **unabhängige Signaleingänge** deuten. Diese werden, zusammen mit weiteren, im Bereich der *CnNK-2*-cis-regulatorischen Region integriert. Letztere scheint eine Schnittstelle verschiedenster Signalkaskaden zu sein und weist *CnNK-2* als einen zentralen Bestandteil fußmusterbildender Prozesse aus.

3 Diskussion

Im einfachen, diploblastischen Vielzeller *Hydra* ist der **Fuß** neben dem Kopf eine von zwei differenzierten Strukturen an den Enden einer uniform gestalteten, hohlzylindrischen Körpersäule. Er unterteilt sich in eine Stielregion und eine Basalscheibe. Histologisch-anatomisch stellt der Fuß eine sehr **dynamische Struktur** dar. Zeitlebens finden hier im Zusammenhang mit Knospung, normalem Zell-„Turnover“ sowie Regegenerationsprozessen nach Verletzung entlang der Körperachse Gewebeflüsse, Zelldeterminierungs-, -proliferations- und –transdifferenzierungsereignisse statt. Diese sind in der Vergangenheit im Detail beschrieben worden und haben Eingang in die theoretischen Modelle zur Musterbildung in *Hydra* gefunden.

Als wertvolles Werkzeug bei vielen dieser Studien hatte sich als biochemischer Marker eine fuß-, genauer **basalscheibenspezifische Peroxidase** (Hoffmeister und Schaller, 1985) erwiesen. Die kürzliche Klonierung des korrespondierenden Genes deutete die Existenz einer Familie von entlang der Körperachse differentiell exprimierten Peroxidasen an (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002).

Molekulare Analysen in *Hydra* führten zur Identifizierung von an axialen Musterbildungsprozessen beteiligten Genen. Neben **konservierten Entwicklungsgenen**, d.h. Transkriptionsfaktoren und Mitgliedern verschiedener Signaltransduktionskaskaden, wurde eine wichtige Rolle auch für eine erstaunliche Anzahl von sezernierten, diffusiblen **Peptiden** nachgewiesen (zusammengefasst in Bosch und Fujisawa, 2001; Steele, 2002; Bosch, 2003). Eine Reihe von Entwicklungsgenen mit Homologen in den Bilateria zeigten Expressionsmuster, die eine Funktion bei Fußmusterbildungsprozessen in *Hydra* andeuteten; gleiches gilt auch für mehrere Peptide, für die zusätzlich auch direkte morphogenetische Effekte durch Inkubationsversuche nachgewiesen werden konnten. Für **CnNK-2**, einen im Endoderm des Stiels exprimierten Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, deutete seine Expressionkinetik in verschiedenen Entwicklungszusammenhängen sowie seine durch chemische Interferenz und Peptidinkubationen demonstrierte

Kopplung an eine Vielzahl von Signalkaskaden eine zentrale Rolle in dem Fußmusterbildungsprozessen zu Grunde liegenden, genomischen, regulativen Netzwerk an (Grens et al., 1996; Grens et al., 1999). Eine erste Studie zur Regulation von *CnNK-2* auf Transkriptionsebene (Thomsen et al., 2004) unterstützte diese Befunde (s.u.).

In **zwei Projekten** wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die molekularen Erkenntnisse zur Fußbildung von *Hydra* zu erweitern. Dieses waren **(i)** die Charakterisierung der Genfamilie der fußspezifischen Peroxidase in verschiedenen Arten der Gattung *Hydra* und **(ii)** die Identifizierung von weiteren an der Regulation des zentralen Transkriptionsfaktors *CnNK-2* beteiligten Faktoren in *H.vulgaris* (Basel).

3.1 PPOD-Gene in der Gattung *Hydra*: Charakterisierung einer Familie von Markergenen

Peroxidasen spielen in Pflanzen wie auch Tieren in vielen metabolischen Zusammenhängen eine Rolle. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies; sie helfen der Zelle bei der Bewältigung oxidativen Stresses. Weiterhin konnte für Peroxidasen eine Beteiligung an Wachstums-, und Differenzierungsprozessen sowie bei Phagocytose und Apoptose nachgewiesen werden (Smith et al., 1983; Mäder, 1985; Hockenbery et al., 1993; Behl et al., 1994; Nelson et al., 1994).

Die **basalscheibenspezifische Peroxidaseaktivität** in *Hydra* wurde in der Vergangenheit als biochemischer Marker in diversen Entwicklungszusammenhängen genutzt und zeigte durch Substratreaktion mit exogen applizierten Peroxidase-„Tracern“ wie z.B. Diaminobenzidin (DAB) die Anwesenheit von terminal differenzierten Basalscheibenzellen an. Über seine biochemische Funktion konnte kürzlich das zu der Peroxidaseaktivität korrespondierende Protein identifiziert und charakterisiert werden (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Gleichzeitig konnte eine entsprechende cDNA kloniert werden; die räumlich-zeitliche Expression des *PPOD1* genannten Gens stimmt mit dem Auftreten der Peroxidaseaktivität überein (Abb. 1.8). Parallel dazu

wurde ein zu *PPOD1* homologes Gen mit stark abweichendem Expressionsmuster isoliert. Beide **PPOD-Gene** zeigten bei Sequenzanalysen wenig Übereinstimmung mit anderen Peroxidasen (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002).

Die **Klassifizierung von Enzymen** erfolgt klassisch auf der Basis der von ihnen katalysierten Reaktionen. Neuere Studien unter Einbeziehung biochemischer, Struktur- sowie Sequenzdaten haben gezeigt, dass in diesem System oftmals **analoge Enzyme**, d.h. Enzyme ähnlicher Funktion aber nicht-verwandter Sequenz oder Struktur, unter derselben EC-(„enzyme classification“) Nummer zusammengefasst werden (Galperin et al., 1998). Peroxidasen gehören zu einer funktionellen Gruppe von Enzymen, die die zweitgrößte Anzahl von analogen Enzymen aufweist. In Gruppen gleicher EC-Nummern finden sich des Weiteren auch Proteine mit im Zuge der Evolution bis zur Unkenntlichkeit divergierten Aminosäuresequenzen. Diese konnten mitunter nur durch den Erhalt ihrer 3D-Struktur homologisiert werden, üben aber nach wie vor dieselbe Funktion aus. Eine genauere Analyse der 3D-Struktur von PPODs mag daher in Zukunft eine **Verwandtschaft zu anderen Peroxidasen** aufzeigen. Alternativ könnten sie eine zu anderen Peroxidase-Familien analoge Entwicklung der Cnidarier darstellen.

Eine **funktionelle Bedeutung der PPOD-Gene in *Hydra*** wurde kürzlich durch „Secretion Cloning“-Experimente deutlich. Diese zeigten, dass *PPOD1* und *PPOD2* in *H. vulgaris* (Basel) zu den 10 am häufigsten sezernierten Proteinen in *Hydra* gehören (Charles David, TU München, persönliche Mitteilung). Dieser Befund unterstreicht zusätzlich auch die durch den Peroxidaseassay belegte Lokalisation von PPOD-Proteinen in Vesikeln (Hand, 1976; Hoffmeister und Schaller, 1985; Hoffmeister-Ullerich et al., 2002) und unterstützt eine *in vivo* Funktionalität der im Zuge von Sequenzanalysen „*in silico*“ vorhergesagten Signalpeptide für PPOD-Proteine aus verschiedenen *Hydra*-Spezies (vgl. Abb. 2.5 B).

3.1.1 Charakterisierung der PPOD-Genfamilie in verschiedenen *Hydra*-Spezies

Im Kontext des Studiums der **differentiellen Genexpression bei Fußmusterbildungsprozessen in *Hydra*** waren vorrangig die unterschiedlichen Expressionmuster der beiden homologen *PPOD1*- und *PPOD2*-Gene in *H.vulgaris* (Basel) interessant. Daher wurde versucht, die **Evolution** der sich andeutenden **Familie von PPOD-Genen** durch eine Charakterisierung ihrer Vertreter in verschiedenen *Hydra*-Spezies und bzw. -Stämmen nachzuzeichnen.

Durch Southern Blot Experimente wurde zunächst die **genomische Komplexität** und Organisation der Genfamilie in den verschiedenen Gruppen untersucht. Z. T. gelang, für *H.magnipapillata* unterstützt durch die Analyse einer EST-Datenbank, die Klonierung von **PPOD-Homologen**. Alle klonierten PPOD-Gene zeigten dieselbe, **modulare Proteinstruktur** (Abb. 2.5 B).

Die **Expression von PPOD-Genen** wurde durch Northern Blot-Analyse, RT-PCR sowie *in situ* Hybridisierung analysiert. Im Detail konnten die bekannten Angaben zum Expressionsmuster von *PPOD1* und *PPOD2* (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002) in *H.vulgaris* (Basel) bestätigt, differenziert und um Änderungen durch chemische Interferenz mit LiCl ergänzt werden. Weiterhin wurden die Expressionmuster von *PPOD1* in *H.oligactis* und *H.vulgaris* (AEP) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 zusammengefasst. Der in diesem Zusammenhang dargestellte phylogenetische Stammbaum gründet sich auf Analysen ribosomaler Gensequenzen (Abb. 1.1 B).

PPOD-Gene konnten sowohl genomisch als auch biochemisch durch fußspezifische Peroxidaseaktivitäten **in allen Spezies** nachgewiesen werden. Innerhalb der Vulgaris-Gruppe zeigte sich für die Genfamilie eine starke **Zunahme der genomischen Komplexität**. Für *H.vulgaris* (Basel) sowie *H.magnipapillata* gelang der Nachweis von 7-11 PPOD-Genen. Ergänzt durch die anschließenden Klonierungsexperimente ließen sich diese mind. drei verschiedenen PPOD-Genen in jeweils mehreren Kopien zuordnen. Weiterhin ergaben sich für *H.vulgaris* (Basel) Hinweise auf mehrere **genomische Cluster**

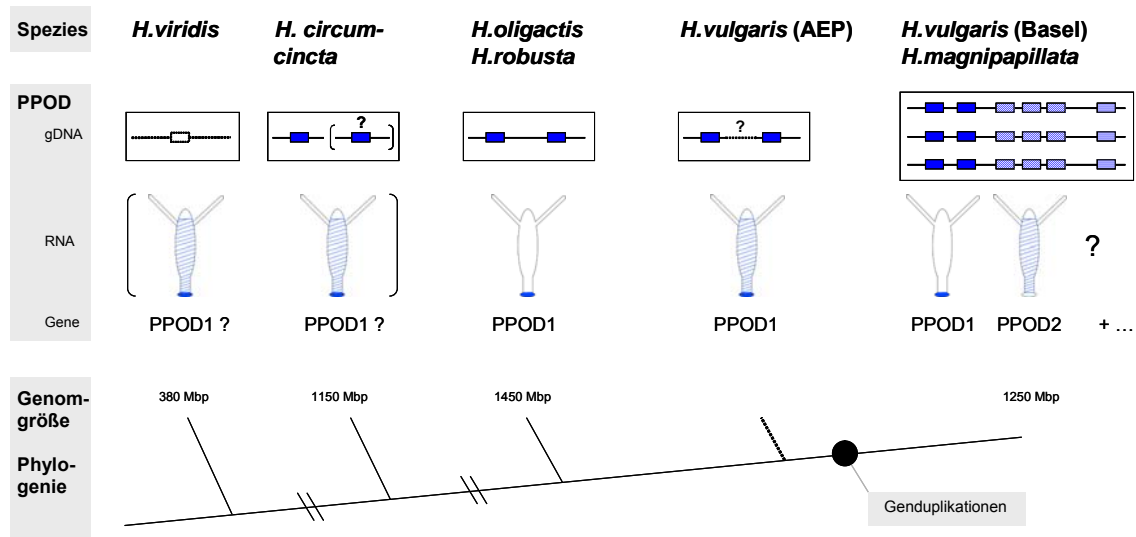


Abb. 3.1: Evolution der PPOD-Genfamilie in der Gattung *Hydra*. Genomische Organisation, der PPOD-Genfamilie, Expression und Identität von PPOD-Genen in verschiedenen *Hydra*-Spezies. Genomgrößen aus Zacharias et al., 2004; Phylogenie nach Collins, 2002 und Martinez, 2003.

von PPOD-Genen. Ausschließlich in diesen beiden Spezies konnten zudem PPOD-Splicing-Varianten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Klonierungsexperimente sowie von Southern und Northern Blotting legten für *H. vulgaris* (AEP) und *H. oligactis* die Existenz von jeweils einem einzigen, *PPOD1*-ähnlichen Gen in zwei Kopien nahe. Für *H. oligactis* wurde zusätzlich eine enge genomische Nachbarschaft beider Kopien gezeigt. Neben beiden Gruppen gemeinsamen Clustern deutete sich für Vulgaris- und Oligactis-Gruppe auch eine **konservierte Exon-Intron-Struktur** der PPOD-Gene an. Da (i) die basalscheibenspezifische Peroxidase, in *H. vulgaris* (Basel) biochemischer Ausdruck der *PPOD1*-Expression, in allen Spezies nachgewiesen und (ii) die geringe Anzahl genomischer PPOD-Signale in *H. oligactis* und *H. vulgaris* (AEP) einem einzelnen PPOD-Gen zugeordnet werden konnten, wurden die genomischen Signale in *H. circumcincta* und *H. viridis* ebenfalls der Expression eines einzelnen, *PPOD1*-ähnlichen Gens zugesprochen.

Die für Vulgaris- und Oligactis-Gruppe nachgewiesenen sowie sich in den basalen Gruppen andeutenden *PPOD1*-Gene zeigten entlang der Körperachse von *Hydra* eine **differentielle Expression**. Für *H. viridis*, *H. circumcincta* und *H. vulgaris* (AEP) konnten neben einer (auch durch den Peroxidaseassay gezeigten) Expression in der Basalscheibe auch Transkripte in der oberen

Körperhälfte belegt werden. Für *H.vulgaris* (AEP) zeigten die *in situ* Hybridisierungen im Detail einen vergleichsweise geringen *PPOD1*-Transkriptionsgrad im Rumpf. Ob dieses Expressionsmuster auch für die basalen Gruppen zutrifft, konnte hier mangels geeigneter, homologer Proben nicht festgestellt werden.

Im Zuge von **Gametogenese** und **Embryogenese** konnte in *H.vulgaris* (AEP) zusätzlich eine negative Regulation festgestellt werden, da sich in Hoden, Oocyten und Embryos keine PPOD-Transkripte nachweisen ließen. Ob **PPOD2**, das in *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* im Bereich sich entwickelnder Hoden bzw. Oocyten exprimiert wird, in diesen analog herunterreguliert wird, ließ sich nicht feststellen, da keine sexuellen Tiere zur Verfügung standen.

In *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* wird **PPOD1** ausschließlich in der **Basalscheibe** exprimiert; die identischen Expressionmuster von *PPOD1* in beiden Arten spiegeln sich im hohen Konservierungsgrad ihrer *cis* regulatorischen Regionen wider. Von den weiteren in *H.vulgaris* (Basel) identifizierten PPOD-Genen zeigte **PPOD2** im Fuß eine im Vergleich zu *PPOD1* **komplementäre Transkriptverteilung**. Die Expressionsdomänen beider Gene sind strikt getrennt, die Grenze fällt histologisch mit dem Transdifferenzierungspunkt zwischen Stiel und Basalscheibe zusammen.

Die Expression von *PPOD2* ist im Gegensatz zu der von *PPOD1* in *H.vulgaris* (Basel) an **LiCl-sensitive Signalkaskaden** gekoppelt. Für ein weiteres Gen der Familie, *PPOD2*-like, wird eine Regulation durch 14-3-3-Proteine diskutiert.

3.1.2 Der Peroxidase-Assay in *Hydra*

Der Peroxidase-Assay zeigte eine **dominierende Aktivität in der Basalscheibe** aller Spezies. In *H.vulgaris* (Basel) wird sie der Expression von *PPOD1*, zugeschrieben (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen auch für die anderen Arten die fußspezifische Expression eines *PPOD1*-Genes nahe (Abb. 3.1).

Die sich in allen Spezies v. a. bei Überfärbung zeigende Aktivität im **Rumpf** korreliert mit einer gastralen Expression von PPOD-Genen in Hydren der

basalen und der Vulgaris-Gruppe (Abb. 3.1). Sie kann jedoch nur teilweise Ausdruck einer Expression von PPOD-Genen sein, da sie auch in der Oligactis-Gruppe auftritt, für die im Gastralbereich keine PPOD-Transkripte nachgewiesen werden konnten. Hier muss die Aktivität weiterer, bisher nicht identifizierter Peroxidasen mit vergleichbarer Substratspezifität vermutet werden.

Vermutlich gilt letzteres auch für die beobachteten Aktivitäten in den Spitzen von **Hoden** sowie in den Endocyten entwickelnder **Oocyten** und **Embryos** (Abb. 2.2; Technau et al., 2003), da PPOD-Gene in diesen Strukturen, zumindest in *H.vulgaris* (AEP), negativ reguliert sind.

3.1.3 PPOD-Gene und die Phylogenie der Gattung *Hydra*

Die **schwachen PPOD-Signale** in Northern Blots mit *H.circumcincta* und *H.viridis* –RNA mit heterologen *H.vulgaris* (Basel)-Proben und die negativen Ergebnisse des PPOD-„Homologue Huntings“ in diesen Gruppen machen divergente PPOD-Sequenzen in diesen Gruppen sehr wahrscheinlich und stehen einer engen Sequenzverwandtschaft der aus Oligactis- und Vulgarisgruppe klonierten PPOD-Gene gegenüber.

Diese Ergebnisse gehen mit aktuellen Vorstellungen der **phylogenetischen Beziehungen zwischen den systematischen *Hydra*-Gruppen** konform (Abb. 3.1). Messungen der Genomgröße in verschiedenen *Hydra*-Spezies ergaben für *H.viridis* (bei identischen Chromosomensätzen von $2n = 30$) ein im Vergleich zu den anderen Spezies um den Faktor drei kleineres Genom (Abb.3.1; Zacharias et al., 2004). Die vergleichsweise Komplexität der **PPOD-Genfamilie** in der Vulgaris-Gruppe, offenbar ein Ergebnis zahlreicher Genduplikationsereignisse, zeigt, dass sich die vergleichbar großen Genome in den Circumcincta-, Oligactis- und Vulgaris-Gruppen im Zuge der Phylogenie offenbar durch **unabhängige Duplikationen verschiedener Genom-Bereiche** entwickelten. Die für Viridis- und Vulgaris-Gruppe nachgewiesene, **kopfspezifische KS1-Genfamilie**, für die in *H.magnipapillata* eine der PPOD-Familie vergleichbare Komplexität sowie ebenfalls eine genomische Organisation in Clustern gezeigt wurde, fehlt komplett in *H.oligactis* (Hemmrich, 2004). Dieser Befund deutet an, dass bei der **Genomevolution der Gattung *Hydra*** neben differentiellen

Duplikationsereignissen (s. o.) auch **differentielle Deletionen** stattgefunden haben müssen.

Der Vergleich der PPOD-Sequenzen sowie die in verschiedenen Southern Blots erhaltenen Banden- bzw. Restriktionsmuster für *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* bestätigen eine enge Verwandtschaft beider Arten.

Im Gegensatz dazu stellt die molekulare Analyse der PPOD-Genfamilie die **systematische Stellung von *H.vulgaris* (AEP)** in Frage. Morphologisch-anatomisch entspricht dieser Stamm in vielen Bestimmungsmerkmalen (Tentakelbildung, Knospungsmuster und -anzahl, Ausgestaltung der Oothek; Boris Anokhin, persönlich Mitteilung) einschließlich des Cnidoms dem Vulgaris-Typus (Abb. 2.1 B). Auf molekularer Ebene zeigen sich am Beispiel der PPOD-Genfamilie jedoch deutliche Unterschiede (Abb. 3.1).

Die in dieser Studie demonstrierten, **molekularen Unterschiede** in der genomischen Komplexität und der Expression von **PPOD-Genen** werden ergänzt durch Befunde anderer mit diesem Stamm arbeitenden Wissenschaftlern, die auf zahlreiche, genomische Unterschiede zwischen *H.vulgaris* (AEP) und den anderen Arten der Vulgaris-Gruppe hindeuten (persönliche Mitteilungen).

Eine Klärung der Frage, ob die in *H.vulgaris* (AEP) vorgefundene Situation bezüglich der PPOD-Genfamilie repräsentativ für die **nordamerikanischen Spezies der Vulgaris-Gruppe** ist, auf die der in einem Labor gezüchtete Stamm zurückgehen soll (Martin et al., 1997) und mit denen er auch im phylogenetischen Stammbaum der Gattung *Hydra* gruppiert wird (s. Abb. 1.1 B, Daniel Martinez, persönliche Mitteilung) oder ob es sich vielmehr um die Ausnahmesituation in einer Vulgaris-Hybriden handelte, war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

3.1.4 Evolution der PPOD-Genfamilie und differentielle Genexpression bei Fußmusterbildungsprozessen in *Hydra*

Die in Abb. 3.1 zusammengefassten Ergebnisse zeichnen für die PPOD-Genfamilie in der Gattung *Hydra* das folgende Bild. Tendenziell nehmen im Zuge der Phylogenie sowohl **genomische Organisation** als auch die die Expression der PPOD-Gene steuernden **Regulationsmechanismen** an **Komplexität** zu.

Als **ursprünglich** ist die Existenz eines einzelnen, **PPOD1-ähnlichen Gens** mit starker **Expression in der Basalscheibe** und einer schwächeren im **Gastralbereich** anzusehen (vgl. 3.1.1). Ob die in *H.vulgaris* (AEP) vorgefundene, ähnliche Situation diesen Zustand wiedergibt, was eine unabhängige Restriktion der *PPOD1*-Expression auf die Basalscheibe in der Vulgaris- und der Oligactis-Gruppe implizieren würde, oder ob es sich hier um eine sekundäre Entwicklung handelt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht feststellen. Der hohe Konservierungsgrad der *PPOD1* 5'-flankierenden Sequenzen in *H.vulgaris* (Basel) und *H.oligactis* spricht jedoch für den einmaligen **Verlust der gastralen PPOD1-Expression**.

In *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata*, die genomisch eine große Anzahl verschiedener PPOD-Gene in jeweils mehreren Kopien aufweisen, zeigen die offenbar durch **Genduplikation** zusätzlich entstandenen PPOD-Gene trotz enger genomischer Nachbarschaft zu *PPOD1* in mehreren **Clustern** eine **differentielle Expression**.

Die in dieser Studie demonstrierte, komplementäre Expression von PPOD-Genen in der Vulgaris-Gruppe ist Ausdruck der **divergenten regulatorischen Einflüsse**, unter denen sich die **PPOD2-ähnlichen** Gene in *H.vulgaris* (Basel) im Vergleich zu **PPOD1** befinden. Diese spiegeln sich (i) im geringen Konservierungsgrad der *PPOD1*- und *PPOD2* 5'-flankierenden, vermutlich *cis* regulatorischen Regionen, (ii) der auf *PPOD2* beschränkten Kopplung der Expression an LiCl-sensitive Signalkaskaden und (iii) der sich andeutenden Regulation von *PPOD2*-like, einem *PPOD2*-ähnlichen Gen, durch Proteine der 14-3-3-Klasse (Barbara Pauly, persönliche Mitteilung).

Die Expression von annähernd sequenzidentischen, verschiedentlich als **Isoformen** bezeichneten Genen in sich ausschließenden Domänen wurde für *H. magnipapillata* inzwischen auch für ein weiteres Gen berichtet. Für das **Hym 176/ 337-Gen**, das für zwei im Zuge des *Hydra*-Peptid-Projektes isolierte Neuropeptide kodiert und in Neuronen des Fuß-Stieles exprimiert wird ((Yum et al., 1998a; Yum et al., 1998b), wurden in den den *H. magnipapillata*-ESTs mehrere Transkripte mit großer Sequenzähnlichkeit gefunden, von denen eines eine komplementäre Transkriptverteilung in der Körpersäule zeigte (Fujisawa, persönliche Mitteilung).

Die vielfältigen, **an verschiedene Signalkaskaden gekoppelten Expressionmuster von PPOD-Genen** in *H. vulgaris* (Basel) und anderen Spezies und ihre angesichts allgemein hoher Transkriptraten leichte Nachweisbarkeit durch *in situ* Hybridisierung (sowie im Fall von *PPOD1* zusätzlich durch den Peroxidaseassay) machen diese Familie von Effektorgenen als **Werkzeug bei Studien der differentiellen Genexpression in Hydra** interessant. Ein Studium ihrer Regulation auf Transkriptionsebene stellt für *Hydra* ein vertieftes Verständnis sowohl **fußspezifischer** (*PPOD1*) wie auch **gastraler** (*PPOD2*) **Genexpression** in Aussicht. *PPOD1* stellt in verschiedenen Spezies auf biochemischer und Transkriptionsebene einen exzellenten **Marker für terminal differenzierte Basalscheibenzellen** dar, während *PPOD2* im Kontext der Fußentwicklung als **Marker für ektodermale Stielzellen** nützlich erscheint. Die Expressionsdomänen beider Gene sind durch den im Zuge der Fußmorphogenese zentralen **Transdifferenzierungspunkt** getrennt. Durch *PPOD1/PPOD2* Doppel- *in situ* Hybridisierungen wäre beispielsweise eine hochauflösende Verfolgung von dessen (Re-) Etablierung in verschiedenen Entwicklungszusammenhängen möglich.

3.2 Regulation der CnNK-2-Transkription: Eine Interaktion von Kopf-, Knospungs- und Fußmusterbildungsprozessen

Im zweiten Projekt dieser Arbeit konnte *budhead*, ein Transkriptionsfaktor der Forkhead-Genfamilie in *Hydra* als transkriptioneller Regulator von *CnNK-2*

identifiziert und ein kürzlich vorgestelltes Modell zu dem der Fußmusterbildung zu Grunde liegenden genomischen, regulatorischen Netzwerk (Thomsen et al., 2004) erweitert werden (Abb. 3.2 B). Dazu wurden die *CnNK-2* 5'-flankierenden Sequenzen aus *H. vulgaris* (Basel) und *H. oligactis* isoliert und auf interspezifisch konservierte Bereiche untersucht. Innerhalb solcher „phylogenetischer Fußabdrücke“ wurden computergestützt mit auf Bindesepezifitäten verschiedener Vertebraten-Transkriptionsfaktoren beruhenden Profilen der JASPAR-Datenbank potentielle Bindemotive für entsprechende *Hydra*-Homologe gefunden. Dabei konnte (i) eine bereits funktionell charakterisierte, autoregulative Bindestelle für *CnNK-2* (Thomsen et al., 2004) wieder aufgefunden und (ii) eine Reihe von interspezifisch konservierten Bindestellen für Forkhead-Proteine identifiziert werden. Eine HNF-3 β –Bindestelle wies von diesen den höchsten Konservierungs-grad auf und wurde *in vitro* von rekombinantem Budhead, seinem *Hydra*-Homolog, spezifisch gebunden. Die zusätzlich gezeigte spezifische Bindung des Oligonukleotids mit der Budhead-Bindestelle durch ein *Hydra*-Kernprotein gleicher Größe sprach für die *in vivo* Funktionalität dieses Motivs. Insbesondere implizieren die erhaltenen Ergebnisse eine **Interaktion axialer Musterbildungsprozesse der Kopf-, Knospungs- und Fußregion von *Hydra*.**

3.2.1 „phylogenetic footprinting“ in *Hydra*

Das „phylogenetic footprinting“ stellt angesichts ständig anwachsender Datenbanken für genomische Sequenzen bei der Suche nach *cis* regulatorischen Elementen eine zunehmend genutzte Methode dar (vgl. 2.2.1) und führte auch in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von funktionellen Bindemotiven für *Hydra* Transkriptionsfaktoren. Die hier genutzte ConSite-Plattform greift wie auch vergleichbare Programme bei der Detektierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindemotive auf verschiedene Kollektionen von Bindeprofilen zurück. Diese gewichteten Matrizen leiten sich meist aus Bindesepezifitäten von DNA-bindenden Vertebraten-Proteinen ab. Angesichts der großen evolutiven Distanz von *Hydra* und Vertebraten war das Auffinden mehrerer funktioneller Bindemotive in der *cis* regulatorischen Region eines *Hydra*-Genes mit diesen Profilen überraschend.

Die DNA-bindenden Domänen der in dieser und einer vorangegangenen Studie (Thomsen et al., 2004) betrachteten *Hydra*-Transkriptionsfaktoren *CnNK-2* und *budhead* weisen mit denen ihrer Vertebraten-Homologen (auf Grund deren Bindespezifitäten die funktionellen Motive in *Hydra* erkannt wurden) eine hohe Übereinstimmung auf Aminosäureebene von ca. 80 % auf.

Diese durch unsere Ergebnisse implizierte, zunächst frappierende funktionelle Konservierung im Zuge der Evolution, d.h. die **Retention der Bindespezifitäten von Transkriptionsfaktoren vom Diploblasten *Hydra* bis zu den Vertebraten**, wird durch weitere Befunde gestützt. So binden z.B. die *Hydra*-Homologe von *achaete scute* und *CREB in vitro* an entsprechende Konsensus-Sequenzen der Bilateria (Grens et al., 1995; Galliot et al., 1995). Weiterhin konnten *in vivo* bei heterologer Expression von *Hydra gooseoid* und *brachyury*-Homologen in *Xenopus* spezifische, induktive Effekte beobachtet werden, die ebenfalls die Bindung konservierter Motive andeuteten (Broun et al., 1999; Marcellini et al., 2003).

Vor dem Hintergrund eines für *H.magnipapillata* beschlossenen **Genomprojektes** und der **Verfügbarkeit orthologer, genomischer Sequenzen** aus anderen *Hydra*-Spezies über den in dieser Arbeit verwendeten, PCR-basierten Ansatz bietet sich das „phylogenetic footprinting“ in *Hydra* auch für zukünftige Studien von Entwicklungsprozessen auf Transkriptionsebene als nützliches Werkzeug an.

Im Zusammenhang mit den in verschiedenen *Hydra*-Spezies morphologisch unterschiedlich ausgestalteten Fußpartien sind dabei auch interspezifische Unterschiede in *cis* regulatorischen Bereichen von Entwicklungsgenen, potentielle Bindemotive in nicht-konservierten Bereichen, mithin „**reverse phylogenetic footprints**“, von großem Interesse.

3.2.2 Interaktion zweier „mesodermaler“ Markergene

Die im Zuge dieser Arbeit nachgewiesene Interaktion von *budhead* und *CnNK-2*, zwei *Hydra*-Homologen der Forkhead- bzw. NK-2-Familie ist unter evolutiven Gesichtspunkten bemerkenswert. Das **Mesoderm der triploblastischen Tiere**,

der Bilateria, leitet sich vermutlich von einer ursprünglichen Keimschicht ab, die in den heutigen Cnidariern durch das Endoderm repräsentiert ist (zusammengefasst in Technau und Scholz, 2003; Ball et al., 2004).

Diese Hypothese fand kürzlich Unterstützung durch eine Studie, die die Expression von sieben Genen, deren Homologe in den Bilateria in Mesodermbildung und -differenzierung involviert sind, in *Nematostella vectensis*, einem solitären Polypen aus der Gruppe der Anthozoa (Einleitung), beschrieb. Es zeigte sich, dass 6 dieser 7 „mesodermalen“ Gene ausschließlich im Endoderm des Cnidariers exprimiert wurden (Martindale et al., 2004). Das **Endoderm der Nesseltiere** ist somit offenbar homolog zum sog. **Mesendoderm**, einer bipotenten Zellschicht, aus der sich im Zuge der Ontogenese von sowohl Deutero- als auch Protostomiern Mesoderm und Endoderm entwickeln (Rodaway und Patient, 2001). Eine Spezifizierung dieser transient nachweisbaren Zellschicht findet sowohl in *C.elegans* als auch im Zebrafisch durch **GATA-Transkriptionsfaktoren** statt, an deren Konsensus-Bindemotive *Hydra*-Kernproteine spezifisch binden (Endl et al., 1999) und die für *Nematostella* bereits charakterisiert ist (Martindale et al., 2004). In beiden Linien der Bilateria existiert ein konservierter Satz von **GATA-Zielgenen**, der an der Separierung des Mesendoderms in Meso- und Endoderm und deren weiteren Differenzierung beteiligt ist: ***nkx2.5*** (*ceh-22* in *C.elegans*) und ***HNF 3-like*** (*axial*, *pha-4* in *C.elegans*).

Die in dieser Arbeit betrachteten, korrespondierenden *Hydra*-Homologe ***CnNK-2*** und ***budhead*** werden während der Embryogenese schon 24 h nach der Befruchtung (Frobus et al., 2003) und in adulten Hydren an entgegengesetzten Enden der Körperachse exprimiert (Abb. 2.24). Weiterhin konnte für beide im Rahmen dieser Arbeit eine **Interaktion auf Transkriptionsebene** nachgewiesen werden. Die Frage, ob (i) beide auch in *Hydra* durch *GATA* reguliert werden und (ii) die belegte Interaktion zweier in höher abgeleiteten Tieren (Bilateria) in verschiedenen Keimschichten exprimierter Transkriptionsfaktoren eine evolutiv alte Konnektivität vor der Separierung des Mesendoderms in zwei Keimblätter im Zuge der Evolution darstellt, ist von großem Interesse.

3.2.3 CnNK-2: ein Schlüsselgen bei Fußmusterbildungsprozessen in *Hydra*

Zahlreiche Studien belegen für *Hydra* die Involvierung von gradiert verteilten Molekülen bzw. Gewebeeigenschaften in axiale Musterbildungsprozesse. Dieses Konzept hat auch Eingang in die gängigen **theoretischen Modelle** gefunden, die die Ereignisse bei Regenerations- und Transplantationsexperimenten sowie Gewebemanipulationen durch chemische Interferenz auf zellulärer Ebene im Detail zu beschreiben vermögen. Zentraler Bestandteil aller gängigen Modelle ist das **Prinzip der lokalen Selbstverstärkung und der langreichweitigen Hemmung** (Meinhardt und Gierer, 2000; Berking, 2003), das in der aktuellen Version des Gierer-Meinhardt-Reaktions-Diffusions-Modells (vgl. Abb. 1.5) für zwei Organisator-Regionen an entgegengesetzten Polen der Körperachse von *Hydra*, den Kopf und den Fuß, postuliert wird (Meinhardt, 1993). Beide sind an der Etablierung des gradiert verteilten Positionswertes beteiligt. Reziproke Interaktionen zwischen Kopf- und Fuß-Organisator sowie Musterbildungsprozessen im Zuge der Knospung sind seit langem belegt (Schiliro et al., 1999 und Zitate darin; Forman und Javois, 1999).

Die **molekulare Basis der Modelle** ist bisher weitestgehend unbekannt, jedoch konnten im Kopf mehrere Transkriptionsfaktoren mit der Etablierung des Kopf-Organisators im adulten Tier und beim Knospungsprozess in Verbindung gebracht werden (Broun und Bode, 2002; Bode, 2003).

Der im Stiel des Fußes exprimierte **Transkriptionsfaktor CnNK-2** zeigt eine enge Kopplung an den geschilderten Positionswert, der ein Maximum im Kopf von *Hydra* aufweist. Er kann durch Behandlungen mit **LiCl** und **Diacylglycerol** (DAG) abgesenkt bzw. erhöht werden; die Expression von *CnNK-2* verschiebt sich dabei in apikale (LiCl) bzw. basale (DAG) Richtung (Grens et al., 1996). Auch eine Inkubation von Polypen in synthetischem **Hym 346/pedibin**, einem Peptid mit im Zuge von Fußdifferenzierungs- und Knospungsprozessen morphogenetischen Eigenschaften (Hoffmeister, 1996; Hoffmeister-Ullerich, 2001), führt zu einer apikalen Verschiebung der Expression in den Gastralbereich.

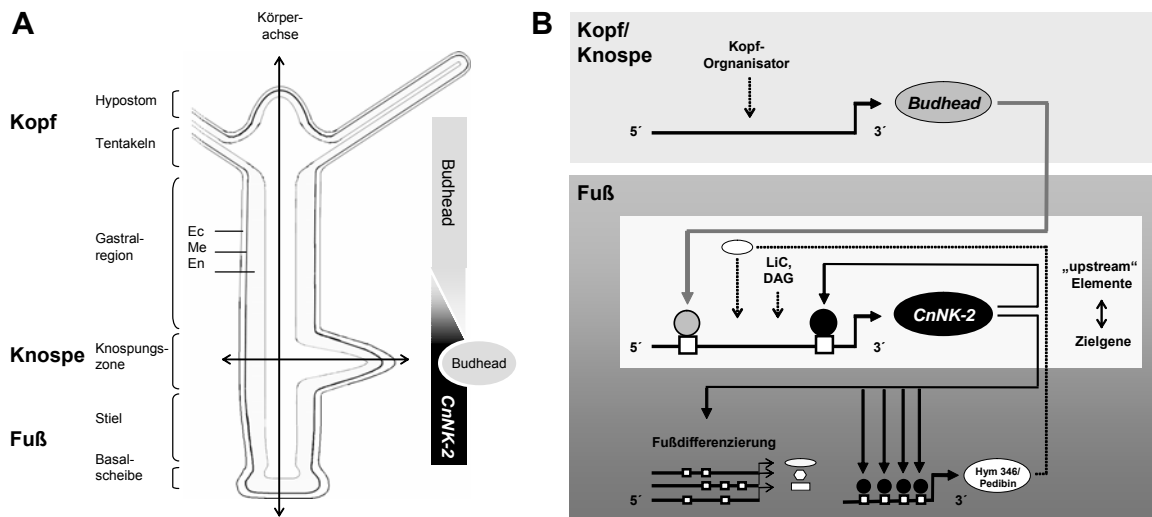


Abb. 3.2: Modell zur Regulation der *CnNK-2*-Transkription. Eine Interaktion von Kopf-, Knospungs- und Fußmusterbildungsprozessen über *budhead*. (A) Morphologie von *Hydra* sowie schematische Expression von *CnNK-2* und *budhead* entlang der Körperachse adulter Polypen und sich entwickelnder Knospen. (B) Das genomische, regulative Netzwerk um *CnNK-2*. Ec, Ektoderm; En, Endoderm; Me, Mesogloea.

Aufgrund der offensichtlichen **Kopplung der Expression von *CnNK-2* an mehrere Signalkaskaden** (LiCl, DAG, *Hym 346/pedibin*, s. Abb. 3.2 B) und seines Expressionsmusters im Kontext der Fußentwicklung und –differenzierung wurde *CnNK-2* eine wichtige Rolle in dem der Fußentwicklung zu Grunde liegenden, regulatorischen, genomischen Netzwerk zugesprochen (vgl. 1.2.4).

Diese Hypothese fand durch diese und eine vorangegangene Studie zur **Transkriptionskontrolle von *CnNK-2*** Unterstützung. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *CnNK-2* *in vitro* an *Nkx*-Motive sowohl in seiner eigenen 5'-flankierenden Sequenz, als auch in der von *Hym 346/pedibin* bindet. Diese Befunde deuteten (i) einen **autoregulativen Mechanismus für *CnNK-2*** und (ii) eine **Kopplung von *CnNK-2* und *Hym 346/pedibin*-Expression im Sinne eines Regelkreises** (Thomsen et al., 2004; Abb. 3.2 B) an.

Die in dieser Studie belegte **Interaktion von *budhead***, einem in Kopfmusterbildungsprozesse involvierten (Martinez et al., 1997) und mit dem Kopf-Organisator assoziierten (Broun und Bode, 2002) Transkriptionsfaktors mit der *cis* regulatorischen Region von *CnNK-2* erweitert das im Zuge der ersten Studie formulierte Modell eines Netzwerkes um ein „upstream“ von *CnNK-2*

liegendes Mitglied (Abb. 3.2 B). Gleichzeitig offenbart sich eine **molekulare Interaktion von Kopf-, Knospungs- und Fußmusterbildung in *Hydra***.

Das Fehlen von *CnNK-2* -Transkripten im Kopf adulter Polypen sowie in sich entwickelnden Knospen sprechen für eine **negative Regulation** des Gens durch Signale aus dem Kopf. Die komplementären Expressionsmuster von *budhead* und *CnNK-2* im Endoderm, insbesondere im Zuge des Knospungsprozesses (Abb. 3.2 A), sprechen für eine Beteiligung dieser Interaktion an dieser negativen Regulation.

Die **Vielzahl** der in seiner *cis* regulatorischen Region **integrierten Signaleingänge** (LiCl, DAG, *Hym 346/ pedibin*, *budhead*, Abb. 3.2 B) sprechen für die postulierte, **zentrale Rolle von *CnNK-2* bei Fußmusterbildungsprozessen** in *Hydra*. Durch die autoregulatorischen Eigenschaften und die offenbar langreichweitige Hemmung seiner Expression durch Faktoren aus dem Kopf weist *CnNK-2* Eigenschaften auf, die von den theoretischen Modellen die **Fußaktivierung** vermittelnden Molekülen zugesprochen werden (Meinhardt, 2004).

„Die Selbstverstärkung und die antagonistische Reaktion kann selbstverständlich auch durch eine komplexere Kette von Substanzen realisiert sein, bei denen Liganden, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren usw. eine Rolle spielen.“ (Hans Meinhardt, 2001). Die Ergebnisse zur Regulation von *CnNK-2*, seine Interaktionen mit *pedibin* und *budhead* und dem eigenen Promotor deuten in der Tat die partielle Realisierung der beiden u.a. für den Fußorganisator postulierten Prinzipien durch eine Interaktion von Transkriptionsfaktoren sowie eine Kopplung von konservierten Transkriptionsfaktoren mit *Hydra*-spezifischen, morphogenetischen Peptiden an (vgl. Abb. 3.3).

3.3 Molekulare Analyse der Fußentwicklung von *Hydra* - Bestandsaufnahme und Perspektiven

Fragen zu Musterbildungsprozessen in *Hydra* können im Zuge der fortschreitenden „Molekularisierung“ (EST-, BAC-Bibliotheken, Genomprojekt)

dieses klassischen Modells der Entwicklungsbiologie heute umfassend auch auf molekulargenetischer Ebene beantwortet werden. Jüngste Ergebnisse zeigen, dass bei den zahlreichen an *Hydra* studierten, z.T. interferierenden Musterbildungsprozessen wie Knospung, Regeneration und Embryogenese (Abb. 1.4) einerseits auf ein gemeinsames, molekulares „toolkit“ zurückgegriffen wird, es aber andererseits auch Unterschiede gibt und sich die verschiedenen Prozesse in unterschiedlichen, genetischen Kontexten vollziehen (Augustin, 2004; Genikhovich, 2004).

Für viele Musterbildungsprozesse in *Hydra* wurde neben der Beteiligung von konservierten Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden, die entlang der Körperachse die lokale Expression unterschiedlicher Genbatterien von Effektorgenen steuern, auch eine Beteiligung von meist taxonspezifischen Peptiden nachgewiesen.

Diesen verschiedenen **Ebenen der Musterbildung** im Kontext von Fußentwicklungsprozessen zugeordnete **Moleküle** sowie bekannte und im Zuge dieser Arbeit identifizierte **Konnektivitäten** zwischen einzelnen Molekülen, Signalkaskaden und Ebenen sind in Abb. 3.3 zusammenfassend aufgelistet (vgl. Abb. 1.7).

Dieses sind auf der Ebene der **Peptide**, die im Zuge der Regeneration zu den ersten nachweisbaren Transkripten gehören und denen eine Rolle bei der Vermittlung von Positionsinformation zugeordnet wird, die drei Epithelio-Peptide Hym 194 (Epp, persönliche Mitteilung), Hym 323 (Harafuji et al., 2001) und Hym 346/Pedibin (Hoffmeister, 1996; Grens et al., 1999). Für alle ist eine Beschleunigung der Fußregeneration, für die beiden letzteren weiterhin eine Absenkung des Positionswertes bzw. eine Erhöhung des Fußbildungspotential nachgewiesen worden.

Im Fall der Inkubation von Polypen mit Hym 346/Pedibin ist eine Aufregulierung und eine apikale Verschiebung der Expression des zentralen Transkriptionsfaktors *CnNK-2* nachgewiesen (s.o.). Dieser wiederum ist an der Regulation der Expression dieses Peptides beteiligt (vgl. Abb. 3.2), was eine **Interaktion von Metazoa-weit konservierter „Maschinerie“** und dem

offenbar **Cnidaria-spezifischen „Peptid-System“** belegt. Ein weiterer spezifischer Effekt von Hym 346/Pedibin und Hym 323 besteht in der negativen Regulierung des Effektorgenes *Farm1* (Abb. 3.3), einer im Gastralbereich exprimierten Metalloprotease, als Antwort auf eine Inkubation mit den Peptiden (Kumpfmüller et al., 1999). Derselbe Effekt tritt auch durch eine Inkubation mit LiCl auf. Die diese Regulation von *Farm1* vermittelnde Signalkaskade ist nicht bekannt; die Korrelation mit dazu komplementären Expressionänderungen von *CnNK-2* (Grens et al., 1996; Grens et al., 1999) machen *Farm1* zu einem potentiellen Zielgen desselben.

Auf der **Ebene konservierter Entwicklungsgene** gibt für eine Reihe von **Signaltransduktionskaskaden** die fußspezifische Expression einzelner oder mehrerer in *Hydra* bekannter Mitglieder Hinweise auf ihre Involvierung in Fußmusterbildungs- und -differenzierungsprozesse (zusammengefasst in Steele, 2002). Dieses sind z.B. verschiedene **Rezeptorthyrosinkinasen** (RTKs), ein *Hydra* „Vascular endodermal **growth factor**“ (VEGF) Homolog (Bridge, persönliche Mitteilung) sowie ein Ligand des **TGF- β** -Signalweges (Reinhardt et al., 2004). Die geschilderten Effekte von LiCl und DAG auf die Expression von *CnNK-2* (s.o.) wurden auch für die im Ektoderm des Stiels von *Hydra* exprimierte RTK *shin guard* sowie für den am Transdifferenzierungspunkt im Ektoderm exprimierten Homöobox-**Transkriptionsfaktor** *manacle* beschrieben (Bridge et al., 2000). Für LiCl wird eine Interferenz mit dem **Wnt**-Signalweg (Klein und Melton, 1996) angenommen, während die durch DAG vermittelten Effekte entweder auf eine Störung des **Phosphatidyl-Inositol-Zyklus** (PI) zurückgehen oder durch die Aktivierung von **Protein-Kinase C**, für die ein Homolog mit fußspezifischer Expression in *Hydra* bekannt ist ((Hassel et al., 1998), vermittelt werden. Die Involvierung auch dieser Signalwege in die Fußmusterbildung und insbesondere auf die Expression des Schlüsselgenes *CnNK-2* (s. Abb. 3.3) ist somit wahrscheinlich.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der Interaktion von Budhead mit der *CnNK-2* 5'-flankierenden Region, was für einen „**crosstalk**“ **verschiedener Musterbildungsprozesse in *Hydra* auf Transkriptionsebene** sprach (s.o.).

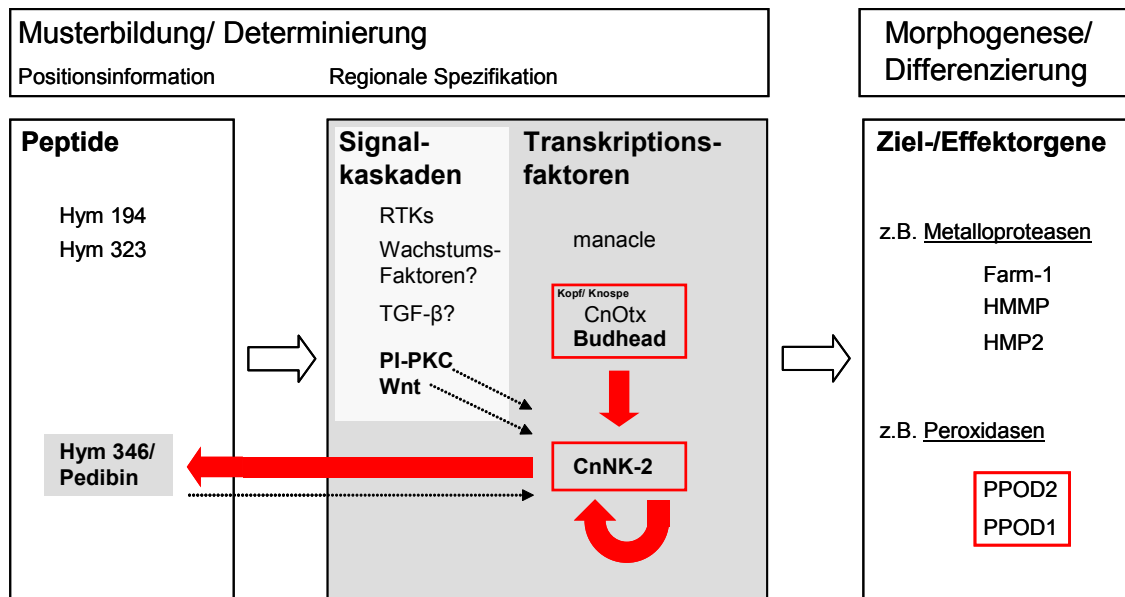


Abb. 3.3: Molekulare Analyse der Fußentwicklung in *Hydra*. Ebenen der Fußentwicklung. Die Rolle taxonspezifischer Peptide sowie konservierter Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren. Zentrale Stellung von *CnNK-2*. Pfeile, bekannte Konnektivitäten; rote Blockpfeile, im Rahmen dieser und einer vorausgegangenen Arbeit (Thomsen et al., 2004) belegte Konnektivitäten; rote Kästen, im Rahmen dieser Arbeit betrachtete Gene auf verschiedenen Ebenen der Fußentwicklung. Weitere Erläuterungen im Text. (verändert nach Bosch, 2003).

Für das mit *CnNK-2* interagierende *Hym 346/ pedibin* (Abb. 3.2, Abb. 3.3) wurde eine Wirkung auch auf den Knospungsprozess sowie eine Expression im Kopf nachgewiesen (Hoffmeister-Ullerich, 2001). Es deuten sich somit weitere Verknüpfungen der verschiedenen musterbildenden System an, was sich auch in der Aktivierung derselben Signalkaskaden in frühesten Stadien der Regeneration widerspiegelt (Abb. 1.7).

Mit *budhead*, *CnNK-2*, *pedibin* und etlichen Mitgliedern der geschilderten Signalkaskaden zeigt die überwiegende Anzahl der mit **Fußmusterbildungsprozessen** in Verbindung gebrachten Genen eine endodermale Expression. Dieser Befund wird ergänzt durch eine Studie mit der *H.magnipapillata*-Mutante mh-1, deren geringe Fähigkeit zur Fußregeneration ebenfalls dem Endoderm zugeordnet werden konnte (Zeretzke und Berking, 2002). Dem **Endoderm** ist offenbar im Zuge axialer Musterbildungsprozesse am Fußende von *Hydra* von beiden Epithelien die **wichtigere Funktion** bzw. Rolle zuzuschreiben.

Im **Ektoderm** bietet die starke Aufregulierung des Homöoboxgens **CnOtx** in frühen Knospenstadien (Smith et al., 1999) einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Studien zur **Verschränkung von Fuß- und Kopfdifferenzierungsereignissen**. Im Hinblick auf seine strikt auf den Transdifferenzierungspunkt beschränkte, ektodermale Expression ist der o.g. Transkriptionsfaktor *manacle* insbesondere auch im Hinblick auf die Regulation der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen PPOD-Genfamilie interessant, da die ektodermalen Expressionsdomänen von *PPOD1* und *PPOD2* exakt an dieser Stelle enden bzw. beginnen.

Auch die **Expressiondomänen anderer Effektorgene**, z.B. verschiedener Metalloproteasen, korrelieren mit den Expressionsmustern verschiedener **Entwicklungsgene** (Leontovich et al., 2000; Yan et al., 2000a) und reflektieren insbesondere auch die auf zellulär-histologischer Ebene bekannten Veränderungen im Zuge der Fußbildung (Abb. 1.6). Die beschriebene Trennung der Expressionsdomänen von *PPOD1* und *PPOD2* durch einen am bereits makroskopisch wahrnehmbaren Transdifferenzierungspunkt zwischen Stiel und Basalscheibe ist hier als ein Paradebeispiel anzuführen. Für die beschriebenen **Metalloproteasen** wird eine **duale Funktion** (i) bei der Fuß-Morphogenese, z.B. durch die Remodellierung der Extrazellulären Matrix (ECM) sowie weiterhin (ii) bei Signaltransduktionsereignissen durch die Abspaltung von ECM-gebundenen Liganden bzw. die Freisetzung aktiver Peptide durch die Prozessierung von Propeptiden diskutiert (Leontovich et al., 2000). Somit ist bei Fußdifferenzierungsereignissen auch eine **Rückkopplung** von der Ebene der Effektorgene auf die musterbildenden denkbar (Abb. 3.3).

Von großem Interesse ist weiterhin, welche der verschiedenen Musterbildungsebenen den größeren Anteil an den **morphologisch unterschiedlich ausgestalteten Fußregionen in verschiedenen Hydra-Spezies** hat. Allgemeiner formuliert stellt sich für die Zukunft die spannende Frage, ob die molekulare Basis morphologischer Unterschiede zwischen nahe verwandten Arten eher in der differentiellen Regulierung von Entwicklungsgenen im Mittelbau der nach und nach entschlüsselten genomischen, regulativen Netzwerke zu suchen ist (Abb. 3.2 B, Abb. 3.3) oder

aber vorrangig der Ausdruck von in verschiedenen Spezies unterschiedlich komplex ausgestalteten und regulierten Effektorgenbatterien ist (vgl. Abb. 3.3).

Die **Bildung des Fußes von *Hydra***, einer hochdynamischen Struktur (Abb. 1.6), stellt sich zusammenfassend als ein komplexes Geschehen dar, das neben mannigfachen **Interaktionen** der verschiedenen **Musterbildungsebenen** auch die **Verschränkung** mit anderen, sich entlang der Körperachse vollziehenden, **Musterbildungsprozessen** einschließt. Das weitere Studium zentraler **Schlüsselgene** sowie der die **Morphogenese vermittelnden Effektorgene** mit dem zur Verfügung stehenden, methodischen Repertoire verspricht ein umfassendes Verständnis des der Fußbildung zu Grunde liegenden Entwicklungsprogrammes.

4 Zusammenfassung

Der Fuß von *Hydra* ist eine dynamische Struktur, in der Zellen im Zuge verschiedener Musterbildungsprozesse ständig Position, Form, Funktion sowie ihren Differenzierungszustand ändern.

Für die diesen Ereignissen zu Grunde liegenden Entwicklungsprogramme war eine konzertierte Aktion von **taxonspezifischen Peptiden** sowie **konservierten Transkriptionsfaktoren** bekannt. *In vitro* Studien zeigten kürzlich die Interaktion eines Transkriptionsfaktors, *CnNK-2*, mit einem Peptid, *Hym 346/ pedibin*, auf Transkriptionsebene und zeigten eine **Kopplung beider Systeme** im Sinne eines Regelkreises.

In zwei Projekten wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die molekularen Erkenntnisse zur Fußbildung von *Hydra* zu erweitern.

(1) Ziel des ersten Projektes war die **Charakterisierung der Gen-Familie einer fußspezifischen Peroxidase**, eines klassischen, biochemischen Markers für ausdifferenzierte Fußzellen, in verschiedenen *Hydra*-Spezies.

Die genomische Organisation und die Regulation der Mitglieder dieser Genfamilie in verschiedenen Entwicklungszusammenhängen zeigte im Zuge der Phylogenie der Gattung *Hydra* eine starke Zunahme an Komplexität, was interessante Aspekte der Genomevolution offenbarte. Die (i) vielfältigen, an verschiedene Signalkaskaden gekoppelten Expressionsmuster ihrer Mitglieder in verschiedenen *Hydra*-Spezies und (ii) ihre leichte Nachweisbarkeit durch *in situ* Hybridisierung angesichts ihrer hohen Transkriptionsraten machen diese Familie von Effektorgenen als Werkzeug bei Studien der differentiellen Genexpression im Fuß von *Hydra* interessant. Ein Studium ihrer Regulation auf Transkriptionsebene stellt ein vertieftes Verständnis der Fußdifferenzierung von *Hydra* in Aussicht.

(2) In einem zweiten Projekt konnte ein kürzlich vorgestelltes **Modell zur Regulation von *CnNK-2***, eines bei der Fußbildung zentralen Transkriptionsfaktors, erweitert werden.

Durch Gelretentionsanalyse (EMSA) konnte gezeigt werden, dass ein durch den Vergleich der *cis* regulatorischen Bereiche der *CnNK-2*-Gene von *H.vulgaris* und *H.oligactis* identifiziertes HNF-3 β -Bindemotiv *in vitro* spezifisch durch das Protein von ***budhead***, einem *Hydra*-HNF-3 β -Homolog, gebunden wird. Für *budhead* ist eine Funktion bei Kopfdifferenzierungsprozessen und asexueller Fortpflanzung durch Knospung beschrieben worden. Beide Gene zeigten im Zuge verschiedener Entwicklungsprozesse komplementäre Expressionsmuster, was auf eine Beteiligung der beobachteten Interaktion an der bekannten, negativen Regulierung von *CnNK-2* im Zuge von Kopfdifferenzierungsprozessen hindeutete.

Die Ergebnisse stellen den ersten Hinweis auf die **molekulare Basis der Interaktion von Kopf-, Knospungs- und Fußmusterbildungsprozessen** dar, deren Verschränkung durch zahlreiche Transplantations- und Regenerationsexperimente belegt ist.

Summary

The foot of *Hydra* is a dynamic structure, a place where cells in the course of different pattern formation processes permanently change their position, function and state of differentiation.

It has been known that the developmental programs underlying these events require the concerted action of taxon specific peptides and conserved transcription factors. Recently, it has been shown, that *CnNK-2*, a homeobox transcription factor, interacts with morphogenetic peptide *Hym 346/ pedibin* on the transcriptional level, thus demonstrating the coupling of “conserved machinery” and the cnidarian “peptide system” in terms of a control circuit.

The goal of this thesis was a deeper insight in the molecular aspects of foot differentiation processes in *Hydra*.

(1) The first project aimed at the **characterization of the gene family of *PPOD1*** along the genus *Hydra*. *PPOD1* is a foot specific peroxidase originally introduced as a biochemical marker for differentiated basal disk cells.

The genomic organization as well as the regulation of the PPOD-family members showed a significant increase in complexity in the course of the genus' phylogeny, thus revealing interesting aspects of *Hydra* genome evolution. The members of this effector gene family are suitable tools to study differential gene expression in the context of foot formation as they (i) show a variety of expression patterns coupled to different signalling cascades and (ii), facing their high transcription rates, are easy to detect via *in situ* hybridization. Studying their regulation on the transcriptional level will provide a deeper understanding of foot differentiation in *Hydra*.

(2) In a second project, a recently presented **model of the transcriptional control of *CnNK-2***, a transcription factor with a crucial role in foot formation processes, could be expanded.

By electrophoretic mobility shift assays (EMSA) it could be shown, that an interspecific conserved *HNF-3 β* binding motif in the *cis* regulatory region of the *CnNK-2* gene of *H.vulgaris* and *H.oligactis* can be specifically bound by ***budhead***, a *Hydra HNF-3 β* -homologue. *Budhead* has been proposed to be involved in the maintenance and specification of head structures. Both genes show complementary expression patterns in adult *Hydras* and in the course of asexual proliferation by budding, where a new body axis, perpendicular to the adult one is formed. Thus, the observed interaction of *budhead* and the *CnNK-2 cis* regulatory region may be involved in the negative regulation of *CnNK-2* during head differentiation events.

The interlacing of different axial patterning processes in *Hydra* has been demonstrated by extensive transplantation and regeneration experiments. The result presented in this work are the first hint on the molecular basis of this cross talk between head, bud and foot patterning systems in *Hydra*.

5 Material

5.1 Organismen

Untersuchte Organismen:	<i>Hydra vulgaris</i> (Stamm Basel), <i>Hydra magnipapillata</i> (Stamm 105), <i>Hydra vulgaris</i> (Stamm AEP), <i>Hydra oligactis</i> , <i>Hydra robusta</i> , <i>Hydra circumcincta</i> , <i>Hydra viridis</i> (Stamm A99, aposymbiontisch)
Futter-Organismus:	<i>Artemia salina</i>
Empfänger-Organismus:	<i>Escherichia coli</i> (Stämme DH5 α , BI21 und XL1-Blue)

5.2 Medien

Dissoziationsmedium	3,6 mM KCl, 6 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgSO ₄ , 6 mM Natriumcitrat, 6 mM Natriumpyruvat, 6 mM Glucose, 12,5 mM TES, 50 mg/l Rifampicin, pH 6,9
Hydramedium	1 mM CaCl ₂ , 1 mM NaCl, 0,1 mM MgSO ₄ , 0,1 mM KCl, 1 mM Tris-HCl (pH 7,8)
LB-Medium (+ Ampicillin)	10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l Millipore-H ₂ O, autoklavieren (+ 100 μ g/ml Ampicillin)
Salinenmedium	31,8 g Meersalz, ad 1 l Millipore-H ₂ O
LB- Einfriermedium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 20 g NaCl, 6,3 g K ₂ HPO ₄ , 1,8 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g Natrium-Citrat, 98,8 g MgSO ₄ , 0,9 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 51,2 ml Glycerin (86 %), ad 1 l ddH ₂ O, autoklavieren
2 x YT-Medium	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l ddH ₂ O, autoklavieren
SOB-Medium	20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl, 100 μ l MgCl ₂ , 10 mM Mg ₂ SO ₄ , ad 1 l ddH ₂ O
SOC-Medium	10 ml SOB-Medium, 100 μ l 2 M Glucose (steril filtriert)

5.3 Puffer und Lösungen

5.3.1 Allgemeine Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml
APS-Stammlösung	10% (w/v) in Millipore-H ₂ O
Church Buffer	0,5 M NaH ₂ PO ₄ / NaHPO ₄ (pH 7,5), 1 % BSA, 1 mM EDTA, 7 % SDS
Denaturierungs-Lösung	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Depurinierungs-Lösung	0,25 M HCl

Denhardt's (50 x)	1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % Ficoll, 1 % BSA Fraktion V, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern
DNA-Ladepuffer (10 x)	50 % Glycerin, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 % SDS, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol
Heparin	10 mg/ml in Millipore-H ₂ O, bei -20°C lagern
Hybridisierungslösung (für RNA/DNA-Blots)	50 % Formamid (v/v), 4,8 x SSC, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1% SDS, 1 x Denhardt's, 10 % Dextransulfat
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5
IPTG-Stammlösung	200 mg/ml
Lysispuffer	0,5 M EDTA (pH 9,0 - 9,3), 1 % Natriumlaurylsarcosine, autoklavieren, vor Gebrauch Zugabe von 0,1 mg/ml Proteinase K
MOPS (10 x)	92,52 g MOPS, 8,2 g Natriumacetat, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l Millipore-H ₂ O
PCR Puffer (10 x)	Amersham Biosciences
Phosphat Puffer (PP)	1 M KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
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 Formaldehyd, 65 ml 10 x MOPS, 469 ml Millipore-H ₂ O
RNaseOut	Invitrogen
SDS-Stammlösung	10 % (w/v)
Sephadex G50	5 g Sephadex G50 in 100 ml TE-Puffer, 30 min autoklavieren
SSC (20 x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
SSPE (20 x)	3,6 M NaCl, 0,2 M NaPO ₄ (pH 7,7), 0,02 M EDTA
TAE (50 x)	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA (pH 8,0)
TBE Long Run Buffer (10 x)	1340 mM Tris-Base, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,3 - 8,7 bei 50°C
TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA (pH 8,0)
1 x Trypsin-Lösung	1 mg/ml in PBS, 1,48 mg/ml EDTA, steril filtriert, -20°C
Waschlösung1 (für Blots)	2 x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung2 (für Blots)	0,2 x SSC, 0,1 % SDS
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid

5.3.2 EMSA

Amidoblack-Lösung	26 mg Naphthol Blue Black in 100 ml Essigsäure/ Methanol (10:90)
BiPu (5 x)	50 mM Tris-HCl (pH 7,7), 2,5 mM EDTA, 5 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl, 20 % Glycerin, 2,5 mM DTT
LaPu (5 x)	125 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 % Glycerin
ZKA	20 mM Hepes/KOH (pH 7,9), 75 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 20 % Glycerin, 4 mM Pefabloc

ZKC	20 mM Hepes/KOH (pH 7,9), 420 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 20 % Glycerin, 4 mM Pefabloc
-----	---

5.3.3 Western-Blot

Protein Marker (6-175 kDa)	Biolabs
30 % Acrylamid/ 0,8% Bis-Acrylamid	Roth
Gelpuffer pH 6,8 (4 x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Gelpuffer pH 8,8 (4 x)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
TEMED	Sigma
Transferpuffer Ia (Towbin-Puffer)	3,03 g Tris-Base (25 mM), 14,4 g Glycin (192 mM), 200 ml Methanol (20%) ad 1 l, pH 8,2
Coomassie-Färbelösung	20 % Methanol, 12,5 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie-Brilliant-Blue R-250
Coomassie-Entfärber	20 % Methanol, 12,5 % Essigsäure
Blockierlösung	3 % BSA, 1 mM Natriumazid
SDS-Ladepuffer (2 x)	0,135 M Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 2 % β-Mercaptoethanol, 0,001 % Bromphenolblau

5.3.4 *in situ* Hybridisierung

Blockierlösung	80 % MAB-B, 20 % Schafserum (hitze-inaktiviert)
Glycin-Stammlösung	40 mg/ml in Millipore-H ₂ O
Hybridisierungslösung	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween® 20, 0,1 % CHAPS, 1x Denhardt's, 100 µg/ml Heparin
Levamisol-Stammlösung	1 M Levamisol
Maleinsäurepuffer (MAB)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
MAB-B	MAB, 1 % BSA FraktionV
NTM	100 mM NaCl, 100 mM Tris, 50 mM MgCl ₂ , pH 9,5
NTMT	NTM, 0,1 % Tween® 20
Proteinase K-Stammlösung	1 mg/ml, 50 µl Aliquots bei -80°C lagern
PBS	0,15 M NaCl, 0,08 M Na ₂ HPO ₄ , 0,021 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,3
PBT	PBS, 0,1 % Tween® 20
Schafserum	Hitzeinaktivierung für 30 min bei 55°C
Triethanolamin	100 mM Triethanolamin in Millipore-H ₂ O, pH 7,8
Urethan-Stammlösung	(20% w/v) in Hydramedium, Lagerung bei 4°C, vor Gebrauch 1:10 verdünnen

5.4 Kits

Dig RNA Labelling Kit (SP6/T7)	Roche
Dynabeads [®] Oligo (dT)25	Dynal Biotech
ECL (direct nucleic acid labelling and detection System)	Amersham Biosciences
GeneRuler DNA Ladders	Fermentas
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
HotScribe First-Strand cDNA labeling Kit	Amersham Biosciences
MassRuler DNA Ladder	Fermentas
Megaprime DNA labelling System	Amersham Biosciences
Microcon YM- 50	Millipore
Micropure-EZ	Millipore
Nucleobond BAC-100	Machery-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel
NucleoSpin Plamid Quick Pure	Machery-Nagel
PeqGOLD RNAPure	Peqlab
pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
SequiTherm EXCEL [™] II DNA Sequencing Kit	Epicentre
Superscript [™] Double-Stranded cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen
pCR T7 TOPO TA Expression Kit	Invitrogen

5.5 Enzyme

SP6- und T7- RNA Polymerase	Roche
Taq DNA-Polymerase	Fermentas
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	Promega
T4 Polynukleotid-Kinase	Fermentas
Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonucleasen	Fermentas
Klenow Fragment	Fermentas

5.6 Radiochemikalien

γ -[³² P]-dATP, α -[³² P]-dATP, α -[³² P]-dCTP	Amersham Biosciences
---	----------------------

5.7 Chemikalien

Adenin	Sigma	Maleinsäure	Sigma
Agar-Agar	Roth	Methanol (vergällt)	Roth
Agarose	Roth	Methanol	Roth
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma	MOPS	Roth
Ammonium-acetat	Roth	Naphthol Blue Black	Sigma
Ammonium-sulfat	Sigma	Natriumacetat	Roth
Ampicillin	Merck	Natriumchlorid	Roth
APS	Roth	Natriumcitrat	Roth
Borsäure	Roth	Natriumhydroxid	Roth
Bromphenolblau	Fluka	Nonidet P40 (NP 40)	Sigma
BSA FraktionV	Merck	Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Calciumchlorid	Sigma	Natriumdihydrogenphosphat	Roth
CHAPS	Sigma	NBT/BCIP-Stammlösung	Roche
Chloroform	Roth	Paraformaldehyd	Merck
Dextran-Sulfat	Roth	Pefabloc	Boehringer
Dimethylformamid (DMF)	Merck	Phenol	Roth
DNA-Größenstandards	Fermentas	Poly-(dIdC)(dIdC)	Fermentas
EDTA	Sigma	Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Ethanol (vergällt)	Roth	RapidGel™-XL-40%	USB
Ethanol (unvergällt)	Roth	Rotiphorese® Gel 30	Roth
Essigsäure	Roth	Salsäure (37%)	Roth
Essigsäureanhydrid	Sigma	Schaf-Serum	Sigma
Ethidiumbromid (50 mg/ml)	Merck	SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Euparal	Roth	Seesalz, Ocean Zac plus	Zoo Zajac
Formaldehyd	Merck	Sephadex G50	Pharmacia
Formamid	Roth	Substratlösung (NBT/BCIP)	Roche
Glycerol	Roth	TEMED	Merck
Harnstoff (Urea)	Roth	Terrific Broth Medium	Difco
Hefe-Extrakt	Roth	Toluidin-Blau	Merck
HEPES	Sigma	Triethanolamin	Sigma
IPTG (0,1 M)	Sigma	Tris-Base	Roth
Isopropanol	Roth	Tris-HCl	Roth
KCl	Merck	TRizol® Reagent	Invitrogen
LB Broth Base	Life Technology	tRNA (10mg/ml)	Sigma
Levamisol	Roth	Tryptic Soy Broth	Sigma
Lithiumchlorid	Roth	Trypton	Roth
LR White	Plano	Tween® 20	Merck
Magnesiumchlorid	Merck	Urea (Harnstoff)	Roth
Magnesiumsulfat	Merck	Urethan	Sigma
		X-Gal	Sigma

5.8 Vektoren

pGEM-T	Promega
pCR T7 / NT TOPO	Invitrogen
pcDNA1/Amp	Invitrogen
pCC1-BAC	Epicentre

5.9 Antikörper/-seren

Anti-Biotin-POD	Roche
Anti-Dig-AP	Roche
Anti-His Tag (Maus, monoklonal)	Roche
Anti-mouse Ig-AP	Boehringer Mannheim
Anti-rabbit Ig-AP	Boehringer Mannheim
Anti-rabbit FITC	Boehringer Mannheim
Budhead-A (Kaninchen, polyklonal)	Luis Salgado, Cinvesta, Mexiko

5.10 Geräte und sonstige Materialien

5.10.1 PCR-Maschinen (Thermocycler)

Cyclone gradient	peqLab
Primus 96 <i>plus</i>	MWG-Biotech
Primus 25	MWG-Biotech
Robocycler Gradient 96	Stratagene

5.10.2 Gelelektrophoresekammern und Blottingsystem

EasyCast minigel system B1A	Owl Separation Systems
EasyCast minigel system B2	Owl Separation Systems
EPS 3500	Amersham Biosciences
LNG 350-06	Heinzinger
Multiphor 2	Amersham Pharmacia Biotech
PFGE CHEF II System	Biorad
PS 250	Hybaid
Ready Gel Precast system	Biorad

5.10.3 Inkubatoren / Schüttler

HIS25	Grant Boekel
Thermo-Inkubator	Heraeus Instruments
KS10 (Rotationsschüttler)	Edmund Bühler
Mini 10	Thermo Hybaid
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermomixer Certomat H	B. Braun Biotech
Ultratemp 2000	Sternkopf

5.10.4 UV-Geräte

Imaging-System	Biorad
ImaGo compact imaging system	B+L Systems
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Kontaktlampe Chroma 43	Vetter GmbH

5.10.5 Elektroporationsgeräte

Gene Pulser II	Biorad
Pulse Controller II	Biorad

5.10.6 Zentrifugen

Biofuge 13	Heraeus Instruments
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5417 R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf
Minifuge RF	Heraeus Instruments
Labofuge 1	Heraeus Instruments
Speed Vac	Savant

5.10.7 Mikroskopie

AxioCam	Zeiss
Axioskop 2	Zeiss
Binokular	Leica

5.10.8 Sonstiges

Bandelin Sonoplus Model UW 2200	Bandelin Electronic GmbH
Bet A Gefriertrockner	Christ
Diamantmesser	C. Schmied Labortechnik
Elektroporationsküvetten	Peqlab
EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech
Eraser	Raytest
BioPhotometer	Eppendorf
Chromatographiepapier	Whatman
Gelatinekapseln	Pohl-Boskamp GmbH Co.
Hybond N nylon Membran	Amersham Biosciences
Hybond N ⁺ nylon Membran	Amersham Biosciences
LaminAir HB2448 (model Firefly)	Heraeus Instruments
LICOR DNA Analyser Gene Read IR 4200	MWG-Biotech
LNG 350-06	Heinzinger
Milli-Q Academic System	Millipore
Mikrotom Ultracut S	Leica
Ni NTA Agarose	Qiagen
NAP 25 Columns	Amersham Biosciences
Nyl 0,45 µm	Optiflow
Performa II 20x20-Nylon Membran	Genetix
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments
Phosphoimager FLA-5000*	FUJI
Phosphoimagingplates	FUJI
Polyprep Chromatography columns	Biorad
PVDF-Membran	Biorad
QFill*	Genetix
QPix*	Genetix
QTrays 20cm x 20 cm	Genetix
Szintillationzähler	Siemens
VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 400 EV	H+P Labortechnik GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wallac WinSpectral	Perkin Elmer

5.11 Primer (MWG Biotech)

#	Name	Sequenz 5'→3'	T _m [°C]
Vektor-spezifische Primer			
1	SP6-IRD800	CGATTTAGGTGACACTATAG	53,2

2	T7-IRD800	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2
4	SP 6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC	53,0
5	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	53,0
6	M 13 -forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	62,4
7	M 13 - reverse	AGCGGATAACAATTTACACAGG	58,9
8	HH-5'1	TGTTTGCA(AG)AAGAAAAACGAG	53,0
9	HH-3'1	AGCTGAACATTTCCCAGACT	57,3
Primer für RT-PCR			
9	GAPDH-F	GCCTTATGACAACCATTCAT	53,0
	GAPDH-R	TCAACAACAGAAACATCTGC	53,0
	AK Actin 34	AAGCTCTTCCCTCGAGAAATC	57,9
7	AK Actin 35	CCAAAATAGATCCTCCGATCC	57,9
8	St_bh_atg	AACAACATGATGGACACGGTT	56,5
9	cb_budhead_hh_3'_1	CGTATAGAGTTYTGCCASCYTYGTG	56,5
10	NK2R-vs	TTGAAGTCTCGCTCAGTTTCAG	58,4
11	NK2F_s	CGTGTCGTGTTATAGTAACGTG	58,4

5.12 Adapter und Adapterprimer (MWG Biotech)

Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]
Splinkerette		
Top-strand	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCAAC GAGCCAAG	-
Bottom -strands		-
GATC	GATCCCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA	-
CTAG	CTAGCCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA	-
CG	CGCCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA	-
Blunt	CCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA	-
Splinkeretten-Primer		
SplOutPri_1	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAA	63
SplOutPri_2	GAATCGTAACCGTTCGTACGAG	60,3
SplOutPri_3	GAATCGTAACCGTTCGTACG	57,3
SplInnPri_1	TCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCC	66,3
SplInnPri_2	CGTACGAGAATCGCTGTCCTC	61,8
SplInnPri_3	TACGAGAATCGCTGTCCTC	56,7
BstXI-Adapter (Invitrogen)	PO4 [CTTTCCAGCACA .GAAAGGTC] PO4	-
Not I-d(T)₁₈	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGAGGAA(T) ₁₈	-
Not I-Primer	GAAGAATTCGCGGCCGAG	61,0
Adapter-d(T)₁₇-Primer	GACTCGAGTCGACATCGA(T) ₁₇	-
3'-Race-Primer	GACTCGAGTCGACATCGA	56,0

5.13 Oligonukleotide für EMSA (MWG Biotech)

#	Name	Sequenz
1	BH_1	5'- TTTGTATTAGCAGGTAAGGGAAAAGTAAATATTTGAAGATTTGAA - 3' 3'- AACATAATCGTCCATTCCCTTTTCATTTATAAACTTCTAAACTT - 5'
2	BH_2	5'- AAATAATTAAGTGAATAGTTTAAATTTATTTTAAAAAAGGC - 3' 3'- TTTATTAATTCACCTTATCAAATTAATAAAATTTTTTTCCG - 5'
3	BH_3	5'- GGAGAACGTTTAATAAATACACAACTCTCTAACTTCGTA - 3' 3'- CCTCTTGCAAATTTATGTGTTTGAGAGATTGAAGCAT - 5'
4	BH_1 mu	5'- TTTGTATTAGCAGGTAAGCGCACACTCACTCTCTGAAGATTTGAA - 3' 3'- AACATAATCGTCCATTTCGCGTGTGAGTGAGAGACTTCTAAACTT - 5'
5	NK-2 (1/2)	5'- AAACAAATACACTCATAATAGACAAGTGTCATTA AAAACC - 3' 3'- TTTGTTTATGTGAGTATTATCTGTTCCACAGTAATTTTGG - 5'
6	CREB3	5'- TGGCCCATCAAATTAATTTTTTTCTAA- 3' 3'- ACCGGGTAGTTTAATTAATAAAAAAGATT- 5'

5.14 URLs und Software

„Phylogenetic footprinting“ (ConSite)

<http://www.phylofoot.org/>

Hydra im Internet

CnidBase Homepage – <http://www.ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>

Genome Project – <http://genome.jgi.ac.jp/labs/OntoGen/magni.html>

Hydra ESTs

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>

Unigene- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>

EST-Clustering- TGICL unter Linux, <http://www.tigr.org/tdb/tgi/software/>

Blast database queries

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

Proteinsequenzanalyse

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

TMpred - <http://www.ch.embnet.org/>)Molekulargewicht-<http://us.expasy.org>

Phylogenetische Sequenzanalyse- Mega2 - <http://www.megasoftware.net/>

6 Methoden

6.1 Hälterung der Versuchstiere

6.1.1 Standardbedingungen

Für die Experimente wurden verschiedene Arten des Süßwasserpolyphen *Hydra* (Cnidaria, Hydrozoa, Hydroida, Hydridae) verwendet. Diese waren *Hydra vulgaris* (Basel), *Hydra magnipapillata* (Stamm 105), *Hydra vulgaris* (AEP), *Hydra oligactis*, *Hydra robusta*, *Hydra circumcincta* und *Hydra viridis* (A99). Von *Hydra viridis* wurde ein durch „photobleaching“ von Symbionten befreiter Stamm benutzt, um bei den Experimenten auf genomischer und Transkriptebene eine DNA- bzw RNA-Kontamination durch die endosymbiontischen Algen der Gattung *Chlorella* zu vermeiden. Abgesehen von einer leicht verminderten Proliferationsrate sind die asexuellen Polypen dieses aposymbiontischen Stammes bei dem gewählten Futterregime morphologisch und ethologisch von symbiontischen nicht zu unterscheiden (Habetha et al., 2003). Alle Arten wurden unter Standardbedingungen (18°C, 12 h Tag-/Nachtrhythmus, Hydramedium) kultiviert und zwei- bis dreimal wöchentlich mit frisch geschlüpften Salinenkrebsen (*Artemia salina*) gefüttert. Die Reinigung inklusive Medien austausch erfolgte 6-8 h nach der Fütterung.

6.1.2 Peptidinkubation

Die Inkubation von Polypen mit dem Signalpeptid Pedibin erfolgte wie beschrieben in einer 10^{-6} -molaren Lösung des Peptids in Hydramedium über einen Zeitraum von bis zu 15 Tagen (Grens et al., 1999). Das Peptid wurde von Frau Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden jeden zweiten Tag gefüttert. Das Medium wurde täglich erneuert. Die Inkubation der Kontrolltiere erfolgte unter gleichen Bedingungen in Hydramedium.

6.1.3 Lithiumchlorid-Inkubation

Die Behandlung erfolgte wie beschrieben für bis zu 15 Tage mit 0,5 mM LiCl in Hydramedium (Grens et al., 1996). Die Tiere wurden jeden zweiten Tag gefüttert. Das Medium wurde täglich erneuert. Die Inkubation der Kontrolltiere erfolgte unter gleichen Bedingungen in Hydramedium.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Für die Isolierung von genomischer DNA aus verschiedenen *Hydra* Spezies wurde stets ca. 100 - 150 mg Gewebe (Abtropfgewicht) von mindestens 24 h nicht gefütterten Polypen als Ausgangsmaterial verwendet. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

6.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Hydra*

6.2.1.1.1 Genomische DNA (Standard)

Das Gewebe wurde in 500 µl 10 mM Tris (pH 8,0)/ 0,1 M EDTA zügig auf Eis mit einem Pistill homogenisiert und Zellen und Zellkerne anschließend durch Zugabe von 0,5 % SDS aufgebrochen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K unter Schwenken für 2 - 3 h bei 55 °C und anschließender Chlorophorm-Phenol-Extraktion (Sambrook et al., 1989) bei Raumtemperatur. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 M NaCl und doppeltem Volumen Ethanol. Die DNA wurde aufgewickelt, in 75 %-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris (pH 8,0) aufgenommen und gelöst. Optional schloss sich ein RNase-Verdau mit 20 µg/ml für 1 h bei 37 °C und eine Entfernung des Enzyms durch Chlorophorm-Phenol-Extraktion und anschließende Ethanolfällung an. Die so gewonnene genomische DNA ist von ausreichender Qualität für Restriktionen und verschiedene PCR- und Klonierungsanwendungen.

6.2.1.1.2 Genomische DNA (*H. viridis*, aposymbiotisch)

Nach dem Standardprotokoll isolierte genomische DNA von *H. viridis* ließ sich nur unvollständig verdauen, weshalb ein alternatives Protokoll verwendet wurde.

Die Polypen wurden auf Eis vorgekühlt und dreimal bei 2000 g abzentrifugiert und jeweils in frischem, eiskaltem Hydramedium resuspendiert. Es schlossen sich drei weitere Zentrifugations-/Waschschritte in 0,5 x PBS (pH 7,4) an. Eine Homogenisierung der Polypen erfolgte im sechsfachen Gewebevolumen 0,5 x PBS/ 10 % Trypsin-Lösung bei Raumtemperatur und 650 rpm im Schüttler für 1 h, wobei regelmäßig von Hand das Gewebe zusätzlich aufgewirbelt wurde. Die Zellsuspension wurde von absinkenden, unverdauten Geweberesten abgetrennt und die Zellen durch Zentrifugation bei 1000 g für 5 min bei 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal durch Resuspendierung und Zentrifugation (1000 g, 5 min, 4°C) in 0,5 x PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen und Aufreinigung der DNA erfolgte in 500 µl 0,2 M Tris-HCL (pH 8,5)/ 0,1 M EDTA/ 0,2 % SDS/ 100 µg/ml Proteinase K für 1 ½ bis 2 h bei 60 °C und 300 rpm im Schüttler. Es schloss sich nach Mischen mit 2 µl DEPC eine weitere Inkubation bei 60 °C für ½ h an. Nach Zugabe von 50 µl 5 M Kaliumacetat wurde für ½ h auf Eis inkubiert und viermal unter jeweiligem Übertrag des Überstandes bei 14.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 750 µl Ethanol bei Raumtemperatur. Die Lösung der DNA und der optionale RNase-Verdau schlossen sich an wie beschrieben (s.o.).

6.2.1.1.3 Genomische DNA für Pulsfeldgelelektrophorese

Um genomische DNA im Megabasenbereich zu erhalten, wurde eine sehr schonende Methode gewählt, bei der die Lyse der gewaschenen Zellen und der anschließende Restriktionsverdau der DNA eingebettet in Agarose erfolgen.

Die Polypen wurden in ein feines Sieb in einer Petrischale pipettiert und durch vorsichtiges Reiben in 2 ml Dissoziationsmedium homogenisiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1200 g für 5 min bei 4 °C pelletiert und das Zellpellet zweimal durch Resuspendierung mit abgeschnittener Pipettenspitze und Zentrifugation (1200 g/ 5 min/ 4°C) in je 1 ml Waschpuffer

(Dissoziationsmedium/ 1 mM EDTA/ 1 mM Spermin/ 1 mM Spermidin) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 100 µl Waschpuffer resuspendiert und durch Zugabe von 100 µl einer 1,5 %-igen Lösung von Inert-Agarose in Waschpuffer und Erhitzen auf 70 °C in Agarose eingeschmolzen. Die Lyse der Zellen in kleinen Agaroseblöcken erfolgte über Nacht im 10- fachen Volumen Lysispuffer. Es schlossen sich zahlreiche Waschschriffe im jeweils 10 - 20-fachen Volumen an. Die Agaroseblöcke wurden zunächst für 1 h bei 50 °C in 0,5 M EDTA (pH 9,0 - 9,3) und anschließend für 1 h auf Eis in 0,05 M EDTA (pH 8,0) gewaschen. Weiterhin schlossen sich auf Eis drei Waschschriffe für 1 h in TE/ 0,1 mM PMSF und drei für 1 h in TE an. Die in Agarblöcke eingeschmolzene DNA wurde bei 4 °C gelagert.

6.2.1.2 Isolierung von Vektor-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von in verschiedenen *E.coli*-Stämmen über Nacht propagierten Vektoren erfolgte durch SDS/ alkalische Lyse, RNase-Verdau, Zelldebrisfällung, Bindung der Vektor-DNA an eine Silica-Membran, Waschschriffe und abschließende Eluierung des Vektors.

6.2.1.2.1 Plasmide

Plasmid-Vektoren wurden im **Mini-** und **Midi-Maßstab** aus selektiven LB-Übernachtskulturen mit Kits der Firmen Machery-Nagel und Roche nach Herstellerangaben isoliert.

6.2.1.2.2 BACs

Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) wurden im **Midi-Maßstab** mit Kits der Firmen Machery-Nagel und Qiagen isoliert. Ausgangsmaterial waren stets 200 ml Übernachtskultur in selektivem 2 x YT-Medium. Im **Mini-Maßstab** wurden 5 ml 2 x YT-Kultur 5 min bei 14.000 g zentrifugiert, das Zellpellet unter Zugabe einer Spatelspitze Lysozym in 300 µl Resuspendierungspuffer eines der genannten Kits resuspendiert. Es folgte die Zugabe von von 200 µl Lysispuffer, mehrmaliges

Invertieren und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur die Neutralisierung durch 150 µl Neutralisierungspuffer. Nach 15 min auf Eis wurde für 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert und die BAC-DNA aus dem Überstand durch Phenol-Chlorophorm-Extraktion gereinigt, durch Übertragen in Ethanol gefällt, in 75 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris (pH 8,5) gelöst.

6.2.1.3 Aufreinigung von DNA/-fragmenten

Eine weitere Aufreinigung von genomischer und Vektor DNA erfolgte durch wiederholte Phenol-Chlorophorm-Extraktion und Ethanolfällung (s. 6.2.1.1). PCR-Fragmente wurden entweder direkt aus dem PCR-Ansatz oder nach Agarose-Gelelektrophorese, Gelfärbung mit Ethidiumbromid, Exzision der Fragmente und erfolgter Gelextraktion durch Bindung an Ionenaustauschsäulen mit Systemen der Firmen Qiagen und Machery-Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt.

6.2.1.4 Isolierung von RNA aus *Hydra*

Die Lagerung von RNA erfolgte kurzfristig bei -20 °C und langfristig bei -80 °C.

6.2.1.4.1 Total-RNA

Die Isolierung von totaler RNA aus Hydragewebe erfolgte durch Einschnitt-Flüssigphasen-Separation mit Phenol/ Guanidiniumthiocyanat –Systemen der Firmen Peqlab und Invitrogen nach Herstellerangaben.

6.2.1.4.2 mRNA

Die Isolierung von mRNA erfolgte entweder direkt aus Gewebe durch das Binden polyadenylierter RNA aus lysierten Zellhomogenaten an oligo-d(T)-Cellulose mit dem „QuickPrep micro mRNA Purification Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech oder aus Gesamt-RNA mit den „Dynabeads Oligo (dT)₂₅“ 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. Die Isolierung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

6.2.1.5 Konzentrierung von Nukleinsäuren

Eine Konzentrierung von Nukleinsäuren erfolgte durch Alkoholfällung (vgl. 6.2.1.1) oder Eindampfen der Nukleinsäurelösung unter Vakuum in der Speed-Vac-Zentrifuge.

6.2.1.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung erfolgte zum einen photometrisch in gepufferter (10 mM Tris, pH 8,5), verdünnter (1:60 – 1:100) Lösung bei 260 nm und im Falle von DNA-Fragmenten zusätzlich durch Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Markers mit definiertem DNA-Gehalt pro Bande (MassRuler DNA Ladder).

6.2.2 Synthese und Amplifikation von DNA

6.2.2.1 Oligonukleotidsynthese

Einzelsträngige Oligonukleotide für PCR-Anwendungen sowie die einzelnen Stänge für doppelsträngige (s. 5.11, 5.12, 5.13) wurden bei MWG-Biotech bestellt. Zur Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide wurden äquivalente Mengen der Einzelstränge (Endkonzentration je 10 µM) für 15 min denaturiert, für 2 h bei 52 °C renaturiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die dauerhafte Lagerung von Oligonukleotiden erfolgte bei -20 °C.

6.2.2.2 cDNA-Synthese

Einzelsträngige cDNA (**sscDNA**) wurde aus totaler oder ggf. mRNA ganzer Hydren oder verschiedener Gewebefractionen durch Reverse Transkription mit Hilfe des „First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit“ von Amersham Biosciences gewonnen. Es wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des Standard

Not I-d(T)₁₈ oder des Adapter-d(T)₁₇ Primers (s. 5.12) vorgegangen. Doppelsträngige cDNA (**dscDNA**) wurde aus dieser sscDNA oder aus mRNA mit Hilfe des „Superscript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit“ nach Herstellerangaben hergestellt. Dabei wird die RNA im Reaktionsansatz der Erststrangsynthese durch RNase H in kleine Fragmente zerlegt, die an die cDNA komplementär binden und DNA Polymerase I als Primer für die Zweitstrangsynthese dienen. DNA Ligase verbindet die synthetisierten Teilstücke; abschließend werden Überhänge durch T4 DNA Polymerase entfernt.

6.2.2.3 Adapterligation

Die Ligation von Adaptern an Fragmente genomischer oder cDNA und eine anschließende PCR mit sequenz- sowie adapterspezifischen Primern („Primer-walking“), ist eine klassische Methode um von bekannter DNA-Sequenz ausgehend diese zu erweitern.

cDNA wurde im Rahmen dieser Arbeit schon im Zuge der Erststrangsynthese durch Verwendung eines **5'-modifizierten poly-T-Primers (Not I-d(T)₁₈, Adapter-d(T)₁₇)** mit einem **3'-Adapter** versehen (s. 6.2.2.2), der später für 3'-RACEs genutzt werden konnte (s.u.). Gegenüber anderen Adaptern haben die sog. **Splinkeretten** den Vorteil, weniger Primer-Fehlbindung („mispriming“) und kein „end-repair-priming“ zu verursachen (Devon et al., 1995). Die fertigen, doppelsträngigen Splinkeretten lagen „blunt-ended“ und mit Überhängen passend zu den von unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen hinterlassenen vor. Sie wurden durch eine Denaturierung und mehrstündige Renaturierung von äquimolaren Mengen „Top-“ und gewünschtem „Bottom strand“ (s. 5.12) erhalten. Die Amplifikation splinkerettenligierter DNA wurde einerseits zur **Isolierung von genomischen, 5'-flankierender Gensequenzen** und andererseits zur Durchführung von **5'-RACEs** (s.u.) genutzt. Dazu wurden die Adapter an durch verschiedene Restriktionsendonukleasen verdaute genomische bzw. doppelsträngige cDNA ligiert und diese Ligationen nach Entfernung überschüssiger Adapter mit Microcon YM- 50 – Säulen als Matrizen für eine PCR benutzt (s.u.). Für die Konstruktion einer *H. viridis* cDNA-Plasmid-Bank wurden **BstXI-Adapter** der Firma Invitrogen an doppelsträngige cDNA ligiert (s. 6.2.5.3),

was eine hocheffektive Klonierung von cDNAs in voller Länge im Zuge einer nicht-komplementären Adapter-Strategie ermöglichte.

6.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von bekannten und unbekanntem DNA-Fragmenten erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

6.2.2.4.1 Standard-PCR

Standard-PCR-Applikationen waren z.B. die Amplifikation von klonierter DNA aus Plasmid-Vektoren und die Amplifikation von *Hydra*-cDNA mit konservierten, heterologen Primern gegen Sequenzen aus einer anderen Spezies. Dafür wurde das folgende Pipettierschema benutzt:

Komponente	Vol. [μ l]
PCR-Puffer mit $MgCl_2$ (10 x)	1
dNTP (1 mM)	1
Primer (vorwärts) (10 μ M)	1
Primer (rückwärts) (10 μ M)	1
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,1
Millipore- H_2O	*
DNA Matrize	*
Gesamt	10

Tab. 6.1: Pipettierschema für eine Standard-PCR.* Menge Millipore- H_2O abhängig von Matritzenmenge.

Standard-PCR-Programm: 3 - 5 min 95 °C, bis 40 x (30 s 95 °C, 15 - 30 s T_A ($T_m - 1$ °C), 1 min/1000 bp 72 °C), 5 - 8 min 72 °C

In bestimmten Fällen wurde eine Optimierung der Methode nach den Prinzipien der **Nested-**, **Hotstart-** oder **Touchdown-PCR** vorgenommen (Müller, 2001). Diese versuchen auf verschiedene Art und Weise ein unspezifisches Binden der Primer zu umgehen. Ggf. wurde der Ansatz auf 20, 50 oder 100 μ l aufgestockt.

6.2.2.4.2 Colony-Check

Eine Größenkontrolle von in Plasmidvektoren inserierter DNA erfolgte durch eine PCR mit im Vektor hybridisierenden, die inserierte DNA flankierenden Primern (vgl. Vektorkarten im Anhang, (Müller, 2001)). Dazu wurde ein Standard-PCR-Ansatz (5,9 µl Wasser) mit den Vektor tragenden Bakterien beimpft, so dass das zu überprüfende Plasmid für die PCR nach der initialen Denaturierung als Matritze zugänglich ist.

6.2.2.4.3 Splinkeretten-PCR

Das benutzte PCR-Programm wurde zur Isolierung von 5'-flankierenden genomischen und 5'-kodierenden cDNA-Sequenzen benutzt (s. 6.2.2.3). Es nutzt die Vorteile einer Touchdown-PCR, durch die Verwendung von Platinum-Taq-Polymerase, deren aktives Zentrum erst bei der initialen Denaturierung frei wird, erhielt die PCR zusätzlich einen Hotstart-Charakter. Gegen den oberen Strang des Adapters sind zwei verschachtelte Primer gerichtet, die in aufeinanderfolgenden Amplifikationen mit ebenfalls verschachtelten spezifischen Primern im Sinne einer Nested PCR kombiniert werden. Folgendes Pipettierschema wurde für erste und zweite PCR genutzt:

Komponente	Vol. [µl]
PCR-Puffer (10 x)	2
dNTP (10 mM)	0,4
MgCl ₂ (50 mM)	0,6
Primer (vorwärts) (10 µM)	2
Primer (rückwärts) (10 µM)	2
Platinum Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2
Millipore-H ₂ O	11,8
DNA Matritze (Ligationsansatz bzw. Verdünnung des 1. PCR-Ansatzes)	1
Gesamt	20

Tab. 6.2: Pipettierschema für Splinkeretten-PCR.

Splinkeretten-PCR-Programme

PCR 1: 3 min 95 °C; **20 x** (30 s 94 °C, (30 s ((T_m-1)+6) °C First; 30 s (T_m-1)°C Last; 2 min 30 s 72 °C);

20 x (30 s 94 °C; 30 s (T_m-1) °C; 2 min 30 s 72 °C)

PCR 2: 2 min 94 °C; **40 x** (30 s 94 °C, 30 s (T_m-1) °C, 2 min 72 °C), 2 min 72°C

Anschließend wurden je 5 -10 µl der PCR-Produkte aus erster und zweiter PCR auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Wurde in der zweiten PCR ein sauberes Produkt erhalten und war eine eindeutige Verschiebung der Bandengröße vorhanden, wurde direkt in einen Vektor ligiert. Z.T. wurde die Identität des PCR-Produktes zuvor noch durch ECL-Southern-Blot-Analyse überprüft.

6.2.2.4.4 Reverse Transcriptase (RT) – PCR

Die Amplifikation von revers transkribierter RNA (cDNA) wurde zur Ermittlung der vollständigen kodierenden Sequenz ausgewählter *Hydra*-Gene und zu Expressionsanalysen durch semiquantitative PCR herangezogen.

Races

3'-Races wurden unter Verwendung von Platinum-Taq-Polymerase in einem Standardansatz als semi-Nested-PCR mit zwei genspezifischen, nach 3' gerichteten, und dem Not I- bzw. 3'-Race-Primer (s. 5.12) durchgeführt. Die sscDNA wurde unverdünnt oder 1:10 verdünnt in der ersten PCR, der Ansatz der ersten PCR 1:40 verdünnt in der zweiten als Matrize eingesetzt. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Amplifikatlänge wurden verschiedene Elongationszeiten (X s) gewählt:

3'-RACE-Touchdown-PCR-Programm

5 min 95 °C; **2 x** (**10 x** (30 s 94 °C, (30 s ((T_m-1)+10) °C First, 30 s (T_m-1)°C Last), X s 72 °C)); **20 x** (30 s 94 °C; 30 s (T_m-1) °C; X s 72°C)

Als Kontrollen wurden neben einem Ansatz ohne Matrize auch Ansätze mit nur einem Primer gefahren. Gleiches galt für **5'-RACEs**, die mit splinkerettenligierter dscDNA als Matrize durchgeführt wurde.

Expressionsanalyse/ Semiquantitative RT-PCR

In einem Standard-PCR-Ansatz wurden unter Verwendung von sscDNA als Matrize Fragmente verschiedener Gene amplifiziert. Die verwendeten Annealingtemperaturen (T_A), Zyklenzahlen (n) sowie die entsprechenden Primer sind in Tab. 6.3 dargestellt. Die eingesetzten cDNA-Mengen wurden durch Co-amplifikation von GAPDH und/ oder Actin äquilibriert.

Gen	T_A	n	5' Primer	3' Primer
<i>Aktin</i>	56	20	AK Actin 34	AK Actin 35
<i>GAPDH</i>	56	27	GAPDH-F	GAPDH-R
<i>budhead</i>	56	28	St_bh_atg	cb_budhead_hh_3'_1
<i>hyfkh3</i>	56	32	Manga_F1	Manga_R1
<i>CnNK-2</i>	56	30	NK2F_s	NK2R-vs
<i>PPOD</i> (<i>AEP</i>)	52	23 27	HH-5'-1	HH-3'-1

Tab. 6.3: Semiquantitative RT-PCR: Verwendete Primer, Annealingtemperatur (T_A) und Zyklenzahl (n)

6.2.3 Markierung von Nukleinsäuren

6.2.3.1 Markierung von DNA-Fragmenten

6.2.3.1.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente erfolgte für Hybridisierungsexperimente durch „Random Primed Labelling“ und für Gelretentionsversuche (EMSAs) durch 5'-Endmarkierung. Eine Aufreinigung der markierten DNA erfolgte über 1 ml Sephadex G50 –Säulen durch Zentrifugation für 2 min bei 2000 g. Radioaktive Einbauraten wurden am Szintillationszähler bestimmt (Cerenkov-Protokoll).

Ranom Primed Labelling

Die radioaktive Markierung von aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „Megaprime DNA Labelling System“ von Amersham Biosciences. Dabei diente denaturierte DNA nach Binden von Random-Hexameren dem Klenowfragment als Matrize und es entstand unter Einbau von α - ^{32}P -dCTP (sowie ggf. zusätzlich α - ^{32}P -dATP) der markierte, komplementäre Strang.

5'-Endmarkierung

Für die Gelretentionsanalyse wurden doppelsträngige Oligonukleotide von ca. 40 bp Länge durch T4-Kinase und γ - ^{32}P -dATP nach folgendem Pipettierschema 5'-endmarkiert.

Komponente	Konzentration	Volumen [μl]
Millipore-H ₂ O	-	10,5
Kinase – Buffer A	10 x	2,0
T4-Polynukleotid-Kinase	10 U/ μl	1,0
γ - ^{32}P -dATP		5
Oligonukleotid	10 μM	1,5
Gesamt		20,0

Tab. 6.4: Pipettierschema 5'-Endmarkierung

Die Reaktionen wurden für 45 Minuten auf Eis inkubiert und die Kinaseaktivität durch Zugabe von 1 μl EDTA (0,5 M, pH 8,0) gestoppt. Der Ansatz wurde mit 79 μl TE auf ein Volumen von 100 μl verdünnt.

6.2.3.1.2 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für die nicht-radioaktive Markierung von DNA für Southern-Blot-Hybridisierungen von Splinkeretten-PCR-Produkten wurde das „ECL (direct nucleic acid labelling and detection System) Kit“ von Amersham Biosciences nach Herstellerangaben benutzt. Dabei wird eine Peroxidase an das als Probe einzusetzende DNA-Fragment kovalent gebunden. Die Detektion der DNA-Zielsequenz nach Transfer

auf eine Membran erfolgt in einer Substratreaktion unter Freisetzung eines chemolumineszenten Produktes und Belichtung eines Filmes.

6.2.3.2 Synthese von markierter RNA

Die Synthese markierter RNA für *in situ* Hybridisierungen erfolgte durch *in vitro* Transkription mit Hilfe des „RNA Labeling Kits“ der Firma Roche durch Einbau von Digoxigenin- bzw. Biotin-UTPs. Ausgehend von i.d.R. 0,25 bis 0,5 µg durch PCR mit SP6- und T7- (bzw. ggf. T3- und T7-) Primern amplifizierter und gereinigter Matrizen-DNA wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Qualität der markierten RNA-Sonde wurde nach DNase I-Verdau anhand eines Aliquots nach 5-minütiger Denaturierung bei 70 °C durch Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt, wobei eine distinkte Bande sichtbar sein sollte.

6.2.4 Separierung von Nukleinsäuren

6.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Dokumentation der DNA-Auftrennung erfolgte stets durch Ethidiumbromidfärbung der Gele in 1 x TAE (5µl/ 100 ml) und anschließender Fotografie unter UV-Licht. Die Darstellung radioaktiv markierter DNA erfolgte nach Fixierung des Geles für 30 min bei RT in 7 % TCA und anschließender Vacuum-Trocknung (1h, 80 °C) durch Autoradiographie (Phosphoimaging Screen über Nacht).

6.2.4.1.1 Standard-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,5 - 2 %-ige Agarosegele in 1 x TAE in horizontalen Gelkammern eingesetzt. Als Referenz dienten 100 bp- bzw. 1 kb-DNA-Leitern.

6.2.4.1.2 Denaturierende Alkalische Gelelektrophorese

Die radioaktiv markierten Produkte von Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese bei der Erstellung der *H. viridis*-cDNA-Bibliothek (s. 6.2.5.3) wurden durch Alkalische Agarose-Gelelektrophorese nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989) analysiert. Es wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel in 50 mM NaCl/ 1 mM EDTA gegossen und nach der Polymerisierung für 30 min in alkalischem Laufpuffer äquilibriert. Die DNA-Proben wurden durch Ethanolfällung mit Ammoniumacetat präzipitiert und in alkalischem Ladepuffer aufgenommen. Der doppelsträngige Marker wurde für 10 min im vierfachen Volumen alkalischem Ladepuffer äquilibriert. Die Elektrophorese wurde mit 7 V/cm durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte durch Autoradiographie (s.o.). Die Marker-Bahn (1kb-Leiter) wurde für 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert und dann mit Ethidiumbromid gefärbt.

6.2.4.1.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Auftrennung von Megabasen-DNA wurde in Inert-Agarose verdaute DNA eingeschmolzen und in die Taschen eines 1 %-igen Agarosegels gegossen. Als Marker wurde 1 mm in Agarose eingebetteter Low-range-marker (NEB) geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit dem „PFGE CHEF II System“ von Biorad (Puls 5 - 15 s, Winkel 120°, Laufzeit 18 h, Feldstärke 6 V/cm, Temperatur 14 °C).

6.2.4.1.4 Denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Gemischen totaler RNA für das Northern Blotting erfolgte durch denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989). Auf eine Ethidiumbromid-Färbung der Gele wurde verzichtet; die Äquilibrierung der aufgetragenen RNA-Mengen erfolgte durch vorherige photometrische Messung und anhand eines Testgels. Im Anschluss an die Hybridisierung konnte sie durch eine Methylenblaufärbung der Membran (Sambrook et al., 1989) verifiziert werden.

6.2.5 Klonierungstechniken

6.2.5.1 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von aufgereinigten (s. 6.2.1.3) PCR-Produkten erfolgte durch T/A-Klonierung mittels des pGEM-T Vektor-Systems von Promega nach Herstellerangaben. Durch vorherige Inkubation des PCR-Produktes mit 0,5 mM dATPs und 0,5 μ l Taq-Polymerase in 1 x PCR-Puffer („A-tailing“) und abschließende Abtrennung überschüssiger Nukleotide mittels PCR-Aufreinigungs-Kit konnte die Effizienz erhöht werden. Dieser Schritt machte auch die Klonierung von Fragmenten ohne Überhänge möglich. Die Ligase wurde anschließend durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

6.2.5.1.1 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von Bakterien mit rekombinanter DNA erfolgte stets durch Elektroporation mit Hilfe des Gene Pulser II Systems von Biorad in 0,1 cm Küvetten. Für eine Standardtransformation wurden 40 μ l ElectroMAX DH α 5-Zellen mit 1 μ l Ligationsmix in 9 μ l Millipore-H₂O vermischt, elektroporiert (1,8 kV, 200 Ω , 25 μ F) und sofort in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Ausplattierung der Zellen auf entsprechende Agar-Selektivmedien. Dieses waren im Fall von pGEM-T-Konstrukten mit X-Gal und IPTG (je 40 bzw. 4 μ l) imprägnierte LB-Agar-Platten mit 50 μ g/ml Ampicillin. Die Selektion positiver Klone erfolgte bei entsprechenden Vektoren durch Blau-Weiß-Selektion und/ oder Colony-Check-PCR. Eine Propagierung der gewünschten Konstrukte erfolgte in Übernacht-Flüssig-Kulturen in Selektivmedien.

6.2.5.1.2 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen

Durch 1:1 Verdünnungen von Bakterienkulturen in 50 % Glycerin wurden Dauerkulturen erstellt und bei -80 °C gehalten.

6.2.5.2 Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren

Für die prokaryotische Überexpression des *Hydra*-Transkriptionsfaktors *budhead* wurde das „pCR[®]T7/NT-TOPO[®] TA Expression Kit“ von Invitrogen benutzt. Ein die gesamte kodierende Sequenz des Proteins umfassendes PCR-Produkt wurde zunächst in pGEM-T kloniert. Nach Überprüfung der Sequenz durch Sequenzierung wurde das Fragment reamplifiziert und nach Herstellerangaben in den Expressionsvektor ligiert.

6.2.5.3 cDNA-Bibliothek (*H.viridis*)

Für die Suche nach PPOD-Genen in *H.viridis* wurde eine cDNA-Plasmid-Bibliothek konstruiert.

Zusammenfassend wurde dazu *H.viridis* mRNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und an diese BstXI-Adapter ligiert. Anschließend wurde die adapterligierte dscDNA säulenchromatographisch größenfraktioniert und von überschüssigem Adapter befreit. Nach Ligation in den die nichtkomplementäre Adapter-Strategie unterstützenden Vektor wurde in *E.coli* transformiert und der Transformanten-Titer bestimmt.

Im Einzelnen wurde aus 2 x 80 mg *H.viridis* (A99-aposymbiontisch) mRNA mit dem „Quickprep micro **mRNA Purification Kit**“ isoliert und daraus mit Hilfe des „Superscript double stranded cDNA Synthesis Kit“ doppelsträngige cDNA hergestellt. Der Erststrangsynthesereaktion wurde [³²P] **α-dCTP** zugesetzt, so dass die folgenden Schritte und die Ausbeuten autoradiographisch verfolgt werden konnten. Es wurde jeweils nach Herstellerangaben verfahren. Aliquots von **Erst- und Zweitstrangsynthese** wurden durch Alkaline Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele für 30 min in 7 %-iger Trichloressigsäure fixiert, getrocknet und über Nacht auf einen Phosphoimager-Screen gelegt. Die Marker-Spuren wurden separat mit Ethidiumbromid gefärbt. Um eine effiziente Ligation der dscDNA mit dem Vektor zu erreichen wurde die in Abb. 6.1 zusammengefasste **Adapterstrategie** gewählt. An die überhangsfreie dscDNA wurde über Nacht bei 4 °C in einem 30 µl-Ansatz 2 µg phosphorylierter **Adapter** mit

einer Verdünnungsreihe in LB-Medium 10, 1 und 0,1 µl davon auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. So konnte der Transformantentiter bestimmt werden. Die Erstellung der Macroarrays ist unter 6.2.6.3 beschrieben.

6.2.5.4 BAC-Bibliothek (*H.magnipapillata*)

Aus *Hydra magnipapillata* wurde wie beschrieben DNA isoliert, durch Pulsfeldgelelektrophorese gröÙenselektiert, partiell mit Hind III verdaut, nochmals gröÙenselektiert und mit dem „CopyControl BAC Cloning Kit“ (Epicentre) in den BAC-Vektor pCC1BAC kloniert. Nach Transformation in *E.coli* (DH10b) wurden Klone auf Agarplatten angezogen, in 384-Mikrotiterplatten selektiert, propagiert, auf Nylonmembranen aufgebracht (vgl. Abb. 6.2) und auf diesen denaturiert und fixiert. Die genomische *H.magnipapillata* BAC-Bank lag in Form von ca. 50.000 Klonen auf 6 Macroarrays/Filtern bereits vor.

6.2.6 Analyse von Nukleinsäuren

6.2.6.1 Restriktionsverdau von genomischer DNA

Der Verdau von genomischer und Plasmid-DNA erfolgte stets mit Enzymen der Firma Fermentas nach Herstellerangaben in 50 bzw. 100 µl-Ansätzen.

6.2.6.1.1 Verdau von in Agarose eingebetteter DNA

Die Agarblöcke mit der darin enthaltenen DNA wurden auf Parafilm mit einem Skalpell zerkleinert und in 500 µl 1 x Restriktionspuffer für 1 h auf Eis äquibriert. Der Verdau erfolgte dann in 100 µl mit 50 U Enzym zunächst für 1 h auf Eis, dann für 1 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt, der Überstand abgenommen, die Agarose mit der verdauten DNA für 5 min bei 70 °C eingeschmolzen und mit abgeschnittener Pipettenspitze direkt in die Taschen des Pulsfeldgeles aufgetragen.

6.2.6.2 Sequenzierung von klonierter DNA

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Auf dem LICOR-System sequenzierte DNA-Fragmente wurden nach dem Lauf nochmals von Hand auf dem Gelphoto kontrolliert, um evtl. Fehler, die bei der *in silico* Sequenzauswertung aufgetreten sein könnten, zu verbessern. Da auf dem MegaBACE-System diese Möglichkeit nicht besteht, aber auch hier Sequenzierfehler auftreten können, wurden die meisten Sequenzreaktionen in 3-facher Ausführung durchgeführt und anschließend abgeglichen. Die so entstandenen Konsensus-Sequenzen können als „sichere“ Sequenzen weiter verwendet werden.

6.2.6.2.1 Plasmide

Für die Sequenzierung von in Plasmidvektoren klonierter DNA wurde ein Plattensequenzierer („NEN Global IR DNA Analyzer“) von LICOR genutzt. Dabei wurde das „Cycle sequencing protocol“ des „SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kits“ der Firma Epicentre für 41 cm Gele nach Herstellerangaben mit IRD-800 fluoreszentmarkierten T7-, SP6- oder spezifischen Primern genutzt und das resultierende Bandenmuster über die eSEQ2.0 Software-Suite ausgewertet.

6.2.6.2.2 BACs

Für Sequenzierungsreaktionen mit BACs als Matrize wurde ein 48-Kapillarsequenzierer („MegaBACE 500“) von Amersham Biosciences genutzt. Das MegaBACE 500 System arbeitet mit dem „DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit“. Es wurde nach Herstellerempfehlungen unter Einsatz von 200 - 400 ng BAC-DNA vorgegangen.

6.2.6.3 Hybridisierungstechniken

Für radioaktive Hybridisierung von Nylonmembranen wurden in der Regel 1 Mio cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Je nach Charakter der Probe (homolog,

heterolog) wurde die Stringenz der Waschschrirte über Salzkonzentration (2 x SSC – 0,1 x SSC) und Temperatur (RT- 68 °C) variiert. Zur autoradiographischen Auswertung wurden die in Folie eingeschlagenen Membranen auf einen Film gelegt und bei -80 °C exponiert. Alternativ erfolgte die Auswertung durch Auflegen auf eine „Phosphoimaging“ Platte von Fuji und ein Auslesen derselben am Phosphoimager FLA-5000*.

Nach Entfernen der radioaktiven Probe („strippen“) durch ggf. wiederholte Inkubation mit kochendem 0,5 %-igem SDS konnte die Membran wieder verwendet werden. Die Vollständigkeit der Probenentfernung wurde durch Autoradiographie überprüft.

6.2.6.3.1 Southern Blotting

Eine Standardtechnik zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen ist das Southern Blotting. Dabei wird durch Gelelektrophorese separierte und im Gel denaturierte DNA auf eine Membran transferiert und fixiert. Anschließend erfolgt die Detektierung der Zielsequenz durch Hybridisierung mit markierter einzelsträngiger DNA.

Der DNA- Transfer von Agarose-Gelen auf Nylon-Membranen erfolgte durch Abwärts-Kapillartransfer unter Hochsalz- (20 x SSC) oder alkalischen Bedingungen nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989).

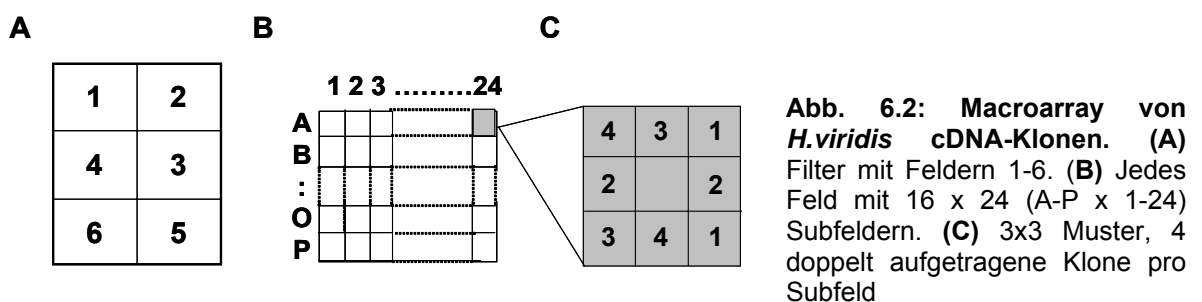
Zur Detektion wurde radioaktiv oder mit Hilfe des „ECL direct nucleic acid labelling and detection System“ markierte, frisch denaturierte DNA eingesetzt. Im Fall des ECL-Kits wurden Hybridisierung und Detektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Die radioaktiven Hybridisierungen erfolgten nach mind. 4-stündiger Prähybridisierung in Formamid- bzw. wässrigen (SSC-, SSPE- und Church-) Puffern nach Standardprotokollen unter Zusatz von 200 µg/ml Heringssperma-DNA.

6.2.6.3.2 Screening rekombinanter DNA-Bibliotheken

H. viridis-cDNA-Bibliothek/ "Colony Lifts"

Zum Auffinden von PPOD-Genen in *H. viridis* wurde eine cDNA-Bank hergestellt (6.2.5.3), Rekombinantnen selektiert und auf Nylonmembranen fixiert und mit heterologen, radioaktiv markierten PPOD-Proben hybridisiert.

In einem ersten Ansatz wurden ca. 10.000 Klone auf Agarplatten mit 100 µg/l Ampicillin in einer Dichte von ca. 2000 Klone pro Platte ausplattiert. Diese wurden mit Hilfe des Q-Pix Systems (Genetix) maschinell gepickt und in 384-Mikrotiterplatten mit Einfriermedium transferiert. Nach Anwachsen der Klone über Nacht bei 37 °C wurden diese dann wiederum mit dem Q-Pix in großer Dichte auf Performa II 20 x 20 cm -Nylon Membranen, die auf Agarplatten lagen, gespottet. Die Membranen waren in 6 Felder (Abb. 6.2 A), diese jeweils in 16 x 24 Subfelder unterteilt. Auf jedem Subfeld waren vier Klone doppelt aufgetragen. Die Klone wuchsen über Nacht bei 37 °C. Es folgte die Denaturierung und Fixierung der Klone durch Inkubation der Membran auf mit folgenden Lösungen getränktem Whatmanpapier: 7 min 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl, 7 min 0,5 M Tris/1,5 M NaCl (pH 8,0), nach 1 h Trocknungszeit 20 min 0,4 M NaOH, 7 min 5 x SSPE. Danach wurden die Filter über Nacht getrocknet und 20 min bei 80 °C gebacken.



In einem weiteren Ansatz wurden 60.000 Klone auf 3 Nylonmembranen auf Agarplatten angezogen, die 0,5 mm großen Kolonien nach einem Standardprotokoll durch Abheben auf Nylonmembranen übertragen („**Colony lift**“) und fixiert (Sambrook et al., 1989).

Die Hybridisierung fand jeweils in Church Buffer unter Zusatz von 200 µg/ml Heringssperma-DNA statt.

***H.magnipapillata* BAC Bibliothek**

Die 6 Filter der vorliegenden genomischen *H.magnipapillata* BAC-Bibliothek wurden wie im vorigen Absatz beschrieben hybridisiert und analysiert.

6.2.6.3 Northern Blotting

Zum Nachweis spezifischer Transkripte in totalen RNA-Isolaten wurde die Technik des Northern-Blottings verwendet.

Der Transfer von durch denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese separierter RNA auf Nylonmembranen erfolgte durch Abwärtskapillartransfer mit 20 x SSC ohne vorherige Depurinierung und Denaturierung. Eine Färbung der ggf. zuvor entfernten Markerbahnen erfolgte durch 0,5 µg Ethidiumbromid in 0,1 M Ammoniumacetat. Als interner Standard dienten nach der Hybridisierung in Formamidpuffer (Sambrook et al., 1989) die nach Methylenblaufärbung der Membran sichtbaren ribosomalen Banden. Eine Probenentfernung und Wiederverwendung der Membran (6.2.6.3.1) war nur vor der abschließenden Methylenblaufärbung möglich.

6.2.6.3.4 In situ- Hybridisierung

Die Analyse von Genexpressionsmustern in ganzen Hydren erfolgte durch Hybridisierung mit Digoxigenin- oder Biotin-markierter anti-sense-RNA des entsprechenden Gens, Inkubation mit einem Enzym-konjugierten Antikörper gegen diese Epitope. und anschließender Substratreaktion. Als Negativkontrolle diente die Hybridisierung mit sense-RNA. Die Synthese der markierten RNA-Sonden erfolgte mit dem „Dig RNA Labeling Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben.

Standard

Für die *in situ* Hybridisierung wurde ein leicht abgeändertes Protokoll nach Martinez et al. (1997) verwendet. Die einzelnen Schritte wurden in COSTAR Zellkultur Platten oder in 1,5 ml Eppendorftubes durchgeführt. Wenn nicht anders

angegeben, fanden alle Wasch- und Inkubationsschritte bei Raumtemperatur im Schwenkofen statt.

Vor dem **Fixieren** wurden die für 24 h nicht gefütterten Tiere für ca. 4 - 5 min. in 2 % Urethan relaxiert. Die Fixierung erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd in Hydramedium (pH 7,4) über Nacht für ca. 12 Stunden. Es folgte die Entfärbung für 10 min in Methanol und 10 min in Ethanol. Die sukzessive Rehydrierung des Gewebes erfolgte jeweils für 5 min in 75 % EtOH/ 25 % PBT, 50 % EtOH/ 50 % PBT, 25 % EtOH/ 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 PBT mit Proteinase K (10 µg/ml) inkubiert. Durch Spülen mit Glycin-Lösung wurde die enzymatische Reaktion gestoppt, die Glycinlösung wurde ersetzt und für weitere 10 min. inkubiert. Daraufhin wurde das Glycin durch dreimaliges Waschen mit PBT (je 10 min.) entfernt. Eine anschließende Behandlung mit Essigsäureanhydrid und Triethanolamin bewirkte eine Neutralisierung von NH_3^+ - und COO^- -Gruppen, die durch die Behandlung mit Proteinase K entstehen können. Dadurch kann eine unspezifische Bindung der RNA-Sonde und des Antikörpers und somit ein verstärktes Hintergrundsignal vermieden werden. Dazu 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 3 x 5 min. in PBT gewaschen. Eine **Refixierung** erfolgte für 60 min in 4 % Paraformaldehyd in PBT, gefolgt von 3 Waschschritten für je 5 min. mit PBT und 2 min in 2 x SSC. Um endogene Alkalische Phosphatasen zu inhibieren, wurde eine 20-minütige Hitzeinaktivierung bei 70 °C in vorgewärmtem 2 x SSC im Wasserbad durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung mit der RNA-Sonde wurde je 10 min mit 2 x SSC/Hybridisierungslösung (1:1) 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. tRNA blockiert potentielle unspezifische Bindungsstellen der RNA-Sonde. Die **Hybridisierung** erfolgte nach Zugabe der in Hybridisierungslösung für 10 min bei 70 °C denaturierten Probe für ca. 60 h bei 57

- 65 °C. Wurde eine Biotin-markierte Riboprobe verwendet, so wurden zusätzlich Tiere ohne Riboprobe und am nächsten Tag ohne Anti-Biotin-POD-Antikörper inkubiert. Sie dienten später zur Kontrolle der vollständigen Hemmung endogener Peroxidasen. Das Entfernen der Sonde erfolgte durch folgende Waschschrirte 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 stringenere Waschschrirte mit 2 x SSC/ 0,1 % CHAPS für jeweils 30 min. Wurde eine Biotin-markierte Riboprobe verwendet, schloss sich an dieser Stelle zusätzlich eine halbstündige Inkubation in 3 % H₂O₂ in 2 x SSC/ 0,1 % CHAPS bei Raumtemperatur sowie zwei Waschschrirte in 2 x SSC/ 0,1 % CHAPS an. Dadurch wurden endogene Peroxidasen gehemmt, was die Hintergrundfärbung bei der Substratreaktion mit Anti-Biotin-POD vermindert. Anschließend wurde die Antikörperbindung vorbereitet. Zweimaliges Waschen in MAB für 10 min. und einmal in MAB-B für 1 Stunde wurde 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 für Anti-Dig-AP, 1:1000 für Anti-Biotin-POD) in Blockierlösung ersetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung des Antikörpers wurde 2 x 30 - 60 min. in MAB-B und 6 x 30 - 60 min in MAB gewaschen. Anschließend wurde die **Farbreaktion** durchgeführt.

(A) Dig-markierte Probe + Anti-Dig-AP: Durch dreimalige Inkubation der Polypen für jeweils 5 min. in NTMT-Lösung (pH 9,5), beim letzten Mal unter Zusatz von 1 µl/ml Levamisol, wurde ein geeigneter pH-Wert für die Alkalische-Phosphatase geschaffen. Levamisol inhibiert endogene Alkalische Phosphatasen. Anschließend wurde die NTMT/ Levamisol-Lösung gegen NBT/BCIP (1:100) in NTMT ausgetauscht. Violette bis blaue Präzipitate zeigen die Orte der Genexpression an. Die Farbreaktion wurde durch Entfernen der Färbelösung und mehrmalige Spülen mit Millipore Wasser gestoppt.

(B) Biotin-markierte Riboprobe + Anti-Biotin-POD: Es wurde 3 x 10 min in Wasser und zweimal in 0,5 M NaAc (pH 5,0) gewaschen. **(1) Substratreaktion mit AEC:** Die Substrat-Stammlösung (0,32 M AEC) wurde 1:500 in 0,5 M NaAc verdünnt und die Substratreaktion durch

Zusatz von 2 µl/ml 2 % H₂O₂ gestartet. Es entstand ein rotes Präzipitat. Gestoppt wurde durch mehrfaches Spülen mit Millipore Wasser. Danach wurde über Nacht in Wasser bei 4 °C inkubiert und in 50 % Glycerin in PBS eingebettet. **(2) Substratreaktion mit DAB:** Nach 3 Waschschritten in 100 mM Tris (pH 7,3) wurde in 0,3 mg/ml DAB in 100 mM Tris (pH 7,3) präinkubiert und die schnelle Farbreaktion durch Zugabe von 0,01 % H₂O₂ gestartet. Die Färbelösung wurde am Tag zuvor angesetzt, die Lösung erfolgte bei 50 °C im Wasserbad. Anschließend wurde sterilfiltriert. Es entstand ein dunkelrotes bis braunes Präzipitat. Gestoppt wurde durch mindestens 3-maliges Waschen mit PBT/ 1 mM Natriumazid gefolgt von weiteren Waschschritten in PBT.

Die Farbreaktionen erfolgten jeweils 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

Vor der Einbettung in Euparal (Ausnahme: AEC-gefärbte Tiere, da das Präzipitat alkohollöslich ist) wurde eine Alkoholreihe zur Dehydratisierung der Tiere vorgenommen (25, 50, 75 und zweimal 100 % Ethanol). Die Auswertung erfolgte möglichst bald im Anschluss durch digitale Fotografie am Mikroskop oder Binokular.

Doppel *in situ* Hybridisierung

Zum parallelen Nachweis von verschiedenen PPOD-Transkripten wurden Digoxigenin- und Biotinmarkierte Riboproben parallel eingesetzt und mit Antikörpern, die unterschiedliche Enzyme trugen, kombiniert (s.o.). Dadurch waren Substratreaktionen mit verschiedenfarbigen Präzipitaten und damit die parallele Detektion zweier Transkripte möglich.

Die Prozedur erfolgte wie in 6.2.6.3.4 beschrieben mit folgenden Modifikationen. Bei der Hybridisierung wurde zunächst nur die Biotin-markierte Riboprobe hinzugegeben. Nach 12 h bzw. am nächsten Tag wurde die Dig-markierte hinzugefügt. Sollte der Nachweis der Biotinmarkierten Riboprobe durch Substratreaktion mit AEC erfolgen, wurde zunächst nur der Anti-Dig-AP Antikörper

verwendet, die Substratreaktion durchgeführt und nach einer aufsteigenden Ethanolreihe über Nacht in Ethanol inkubiert. Anschließend folgte die Antikörperfärbung mit Anti-Biotin-POD wie beschrieben. Bei der Substratreaktion mit DAB wurden beide Antikörper parallel eingesetzt und sukzessive die Substratreaktionen für die Alkalische Phosphatase und die Peroxidase durchgeführt.

6.2.6.3.5 Analyse von DNA/Protein-Interaktionen: Gelretentionsanalyse ("Bandshift Assay", EMSA)

Die Gelretentionsanalyse („Electrophoretic mobility shift assay“, EMSA) ist eine Standardmethode zur Analyse von DNA/ Protein-Interaktionen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide werden mit nukleären Proteinextrakten oder rekombinanten Proteinen inkubiert und auf nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das Binden eines oder mehrerer Proteine an das Oligonukleotid bzw. an Motive darauf, d.h. die Bildung von im Vergleich zum freien Oligonukleotid im Gel langsamer migrierenden DNA-/Proteinkomplexen äußert sich im Zuge der Autoradiographie des getrockneten Geles in distinkten, retardierten Banden, sog. „Shifts“. Die Spezifität der gebildeten Komplexe wird durch Zusatz von nicht markierten spezifischen sowie sequenzfremden Oligonukleotiden im Überschuss belegt, wobei im Falle einer spezifischen Bindung nur ersterer die detektierbare Komplexbildung durch Konkurrenz verhindert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen aus den 5'-flankierenden Bereich zweier *Hydra*-Transkriptionsfaktoren auf die spezifische Bindung von *Hydra*-Kernproteinen und rekombinantem *budhead*-Protein untersucht. **Oligonukleotide** mit den potentiellen Bindestellen wurden wie beschrieben **5'-endmarkiert**. Die EMSAs wurden nach etablierten Protokollen (Endl, 1999; Till, 2001) durchgeführt. Die **Bindereaktion** erfolgte auf Eis für 1 Stunde. Bei der Wahl der optimalen Poly-(dIdC)(dIdC)-Konzentration (Carrier-DNA), die Einfluss auf die erzielte Bandenschärfe hat, wurde auf Titrationsdaten aus vorhergegangenen Arbeiten zurückgegriffen (Till, 2000; Thomsen, 2001). Die Konzentration der Kernproteinisolate lag bei 1 - 2 µg/µl, die des aufgereinigten rekombinanten Proteins (6.3.3) bei 0,1 µg/µl. Im Bindeansatz kamen 1 - 2 bzw 0,4 µg Protein zum Einsatz (Tab. 6.5).

Komponente	Konzentration	Volumen [μ l]
Millipore-H ₂ O	-	(variabel)
BiPu	5 x	4
Poly (dIdC)(dIdC)	0,1 μ g/ μ l	2
Oligo	14 fmol/ μ l	1
Nukleäres Protein (Rekombinantes Protein)	1 – 2 μ g/ μ l (0,1 μ g/ μ l)	1 (4)
Gesamt		20

Tab. 6.5: EMSA- Bindeansatz.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Ansätze mit Ladepuffer (5 μ l 5 x LaPu) versetzt und der Reaktionsansatz vollständig im Gel aufgetrennt. **Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe** erfolgte in einem 5 %-igen, nativen PAA-Gel in 0.5 x TBE-Puffer (Sambrook et al., 1989). Dieser ging ein Gel-Vorlauf von 1 h bei 200 V voraus. Nach Austausch des Laufpuffers erfolgte die Gelelektrophorese bei einer Anfangsstromstärke von 15 mA (ca. 30 min), die nach dem Einlaufen der Proben auf 25 mA (ca. 2 h) gesteigert wurde. Vorlauf und Auftrennung erfolgten gekühlt bei 4°C, um eine Erhitzung des Gels und damit den Verlust von Komplexen zu vermeiden. Im Anschluss wurde das Gel auf Whatman-Filterpapier überführt, bei 80 °C für 1 h im Vakuum-Gel-Trockner getrocknet und über Nacht bzw. bis zu drei Tagen auf Röntgenfilm (BioMax MS) bei -80 °C exponiert.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus *Hydra vulgaris* (Basel)

Für die Isolierung wurden 20 – 30 Tiere nach Entfernung des Hydramediums in 100 μ l SDS-Ladepuffer aufgenommen (1,5 ml Eppendorftube). Nach vollständiger Homogenisierung mit einem Pistill folgte eine Denaturierung für 5 min auf 94 °C. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10.500 g konnte der proteinhaltige Überstand im SDS-Gel aufgetrennt werden.

6.3.2 Isolierung von Kernprotein

Zur Vermeidung von Denaturierungen erfolgte die Isolierung gekühlt auf Eis sowie bei konstanten pH-Werten der Isolierungspuffer. Die Puffer enthielten einen frisch vor der Nutzung hinzugefügten Protease-Inhibitor (PefaBloc) zur Einschränkung von Degradationsverlusten. Pro Isolierung wurden 100 Polypen in zwei 1,5 ml Tubes überführt, das Hydramedium entfernt, je 0,5 ml Dissoziationsmedium (DiMe) mit 5 % Nonidet P40, einem nichtionischen Detergenz, zugegeben und das Gewebe mit einem sterilen Pistill homogenisiert. Die Abtrennung des Zelldebris erfolgte durch Sedimentation auf Eis für 15 Minuten. Die Überstände wurden in ein Eppendorf-Tube überführt und 12 Minuten bei 6.800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Entfernung des Überstandes folgte zweimaliges Waschen des rötlich-weißen Pellets in 0,5 ml ZKA durch Resuspension und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 6.800 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 65 µl ZKC-Puffer resuspendiert. Die Freisetzung der nukleären Proteine erfolgte durch osmotischen Aufbruch der Kernhülle für 45 Minuten auf Eis bei 4 °C. Im Anschluss ermöglichte eine 30-minütige Zentrifugation bei 20.500 g und 4 °C eine Trennung des Debris von den sich in Lösung befindlichen Proteinen. Die Lagerung der isolierten Proteine erfolgte aliquotiert bei –80 °C. Die Proteinkonzentration wurde nach der Amidoblack-Methode bestimmt. Je 2 mal 3 µl einer 0, 1, 5, 10 und 15 µg/ml BSA-Eichlösung sowie 2 mal 3 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 300 µl Amidoblack-Lösung zusammenpipettiert, der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min lang bei 15.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Entfernung des Überstandes folgten drei Waschschrte mit 100 µl PW-Lösung, die Lösung des tiefblauen Pellets aus Farbstoff-Protein-Komplexen in je 1 ml 0.1 N NaOH und die Bestimmung der Extinktion bei $\lambda = 630$ nm. Nach linearer Regression der Eichwerte konnte der Proteingehalt bestimmt werden. Die Proteinkonzentrationen schwankten bei verschiedenen Isolationen zwischen 1 – 2 µg/µl.

6.3.3 Herstellung von rekombinantem Protein

Für den Einsatz in EMSA-Experimenten wurde rekombinantes Protein des *Hydra* Transkriptionsfaktors *budhead* hergestellt. Ein ***budhead* cDNA-Klon** wurde in den

Expressionsvektor pCR[®]T7/NT-TOPO kloniert (6.2.5.2) und durch **Elektroporation** in *E.coli*- BL(DE3)pLys transformiert. 50 - 70 µl der Transformation wurden auf selektive Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) gebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Überprüfung der Insertgröße durch Colony-Check (6.2.2.4.2) und des korrekten Leserahmens durch Sequenzierung (6.2.6.2) erfolgte die **Pilotexpression** nach Herstellerangaben. Ein positiver Klon sowie eine Kultur ohne Konstrukt als Negativkontrolle wurden in je 10 ml LB-Medium (34 µg/ml Chloramphenicol/ 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht angezogen. Darauf folgte die Beimpfung von 10 ml frischem LB-Medium (34 mg/ml Chloramphenicol, 100 µg/ml Ampicillin) und Inkubation für ca. 2 Stunden bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀= 0,5 - 0,8 (mid-log). Die Kulturen wurden in je zwei 5 ml Kulturen geteilt. Es folgte die IPTG-Induktion (Endkonzentration 1 mM) von jeweils einer der Kulturen und die Inkubation bei Raumtemperatur unter Agitation für 24 Stunden. Zu den Zeitpunkten 0 (Zeitpunkt der Induktion), 3, 6 und 24 h wurden 0,5 ml Unterproben genommen und zur Western-Blot-Analyse (6.3.4) verwandt. Hierzu wurden die Proben für 5 min bei 10.500 g zentrifugiert und das entstandene Pellet in 80 µl SDS-Ladepuffer resuspendiert. Nach einer Denaturierung von 5 min auf 95 °C erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 min, 10.5000 g) und die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus dem Überstand (6.3.4.).

Die **Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins** erfolgte nach mehreren Optimierungsschritten wie folgt: Ein positiver Klon wurde über Nacht bei 37 °C unter Agitation in einer 5 ml Terrific-Broth-Vorkultur (34 µg/ml Chloramphenicol) angezogen. Der Beimpfung von 350 ml Terrific-Medium (34 µg/ml Chloramphenicol) mit der gesamten Kultur folgte eine 10 stündige Inkubation unter Agitation auf 37 °C, die Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀ > 2), Induktion mit IPTG (1 mM Endkonzentration) sowie die Inkubation bei Raumtemperatur unter Agitation für weitere 14 Stunden. Die Zellernte erfolgte bei 4600 rpm (Heraeus Multifuge) für 20 min, die Lagerung des Pellets ggf. bei -20 °C. Alle folgenden Schritte geschahen auf Eis. Das Pellet wurde in 18 ml Phosphatpuffer (PP) resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen sowie zur Scherung genomischer DNA folgte eine 1 minütige Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonoplus UW 2000, 32% Leistung), eine zehnmünütige Inkubation auf Eis sowie eine erneute 1 minütige Beschallung. Zellfragmente wurden durch

Zentrifugation für 60 min bei 4600 rpm sedimentiert, der Überstand, der die nativen Proteine enthielt, durch 0,45 µm filtriert. Die Chromatografie-Säulen wurden mit 3 ml Ni-NTA-Agarose beschickt sowie nach dem Absetzen viermal mit Phosphatpuffer (PP) äquilibriert und der filtrierte Überstand auf die Säule gegeben. Nach einem Waschschrift mit 5 ml Phosphatpuffer (10 mM Imidazol) erfolgte die Elution mit 2 ml Phosphatpuffer (0,5 M Imidazol). Erfahrungsgemäß enthalten die ersten 6 Tropfen kein Protein und wurden verworfen. Die NAP-Säulen, die zum Pufferaustausch nach dem Prinzip der Adsorptions-Chromatographie genutzt werden sollten, wurden fünfmal mit dem ZKC-EMSA-Puffer (+4 mM Pefabloc) äquilibriert. Das Volumen des Eluats wurde bestimmt und auf die NAP-Säule gegeben. Die Differenz zur Säulenkapazität (2,5 ml) wurde durch Addition von ZKC ausgeglichen. Eluiert wurde mit 3,5 ml ZKC. Zur Prüfung der erfolgreichen Aufreinigung wurde ein Aliquot des Eluats mit gleichem Volumen SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 94 °C denaturiert, 5 min bei 10.500 g zentrifugiert und im Westernblotverfahren analysiert. Weiterhin wurde zur möglichen Lokalisierung des rekombinanten Proteins in der nicht löslichen Fraktion ein Aliquot des nach der Ultraschallbehandlung erhaltenen Pellets mit 80 µl des SDS-Ladepuffers wie oben geschildert behandelt. Die Konzentration der rekombinanten Proteinlösung betrug 0,1 µg/µl.

6.3.4 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse umfasst den Elektrotransfer von durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen auf eine Membran mit hoher Proteinbindekapazität (PVDF oder Nitrocellulose) und die anschließende Immundetektion ausgewählter Proteine.

Für die **Auftrennung von Proteingemischen** wurden diskontinuierliche SDS-PAGE-Gele in einer Biorad-Gelelektrophoreseapparatur (Ready Gel Precast System) verwandt. Ein Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,8, 4% Acrylamid) überschichtete ein Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8, 15% Acrylamid).

Komponente	Sammelgel (4%) [ml]	Trenngel (15%) [ml]
30% Acrylam. 0,8% Bisacryl.	0,440	3,350
Gelpuffer pH 6,8	0,820	0,000
Gelpuffer pH 8,8	0,000	1,650
Millipore	2,000	1,600
SDS-Lösung	0,033	0,067
TEMED	0,005	0,005
APS 10 %	0,050	0,050
Σ Volumen	3,348	6,722

Tab. 6.6: Pipettierschema für zwei Minigele

Die vorbereiteten „Gel-Sandwichs“ wurden im Gel-Gieß-Stand mit je ca. 3,33 ml der Trenngel-Lösung gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Eine scharfe Trennlinie zwischen Gel und Isopropanol zeigte nach ca. 30 min die erfolgte Polymerisation an. Das Isopropanol wurde entfernt, das Trenngel mit ca. 1,5 ml der Sammelgel-Lösung überschichtet und die Kämme eingeführt. Nach Polymerisation des Sammelgels erfolgte der Aufbau der Elektrophoresezelle nach Herstellerangaben. Die Lademengen korrespondierten mit den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Isolierungen und variierten zwischen 7,5 und 15 µl. Die Auftrennung erfolgt bei 15 mA bis zum Erreichen des Trenngels. Dann wurde die Stromstärke auf 25 mA gesteigert. Erreichte die Bromphenolblau-gefärbte Lauffront das Ende des Gels, wurde die Elektrophorese beendet.

Bei zu blottenden Gelen erfolgte nach der Elektrophorese die Trennung von Sammelgel- und Trenngel, die Inkubation der auf Maß geschnittenen PVDF- (Polyvinylidendifluorid)-Membran in Methanol für 5 min und der luftblasenfreie Zusammenbau des „Transfer-Sandwichs“ in Transferpuffer Ia gemäß Herstellerangaben. Der **Transfer** erfolgte gekühlt auf Eis oder bei 4°C für 2 Stunden bei 75 mA sowie anschließend die Inkubation der PVDF-Membran über Nacht in **Blockierlösung** zur Verminderung von unspezifischer Antikörperbindung. Der Entfernung der Blockierlösung durch mehrmaliges Waschen in PBT für je 10 min folgte die Inkubation der Membran für 2 h bei Raumtemperatur in kleinstmöglichem Volumen Antikörperlösung. Die primären Antikörper wurden in Verdünnungen von 1/4000 (*budhead*-Antiserum) sowie 1/3000 (Anti-His-Tag-Antikörper) verwendet. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt. Die Inkubationen erfolgten unter Agitation. Der Entfernung des

ersten Antikörpers folgten erneut mehrere Waschschriffe in PBT (4 x 10 min) und die Inkubation für 2 Stunden mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit 1/1000, Anti-Mouse 1/5000), der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert war. Weiteren Waschschriffen (4 x 10 min PBT) folgte die Schaffung eines alkalischen Milieus mit NTMT (2 x 5 min) sowie die Färbereaktion mit NBT/BCIP (10% in NTMT). Die enzymatische Reaktion wurde durch mehrfaches Spülen mit PBS gestoppt.

.Zur **Visualisierung der Proteine** respektive zur Prüfung der Bloteffizienz wurden Acrylamidgele für 2 h oder über Nacht in Coomassiefärbelösung unter Agitation inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Coomassie-Entfärber (30 °C). Gefärbte Gele wurden im Anschluss auf Whatman-Chromatographiepapier plaziert, mit Folie überdeckt und bei 75 °C für 45 min im Vakuum-Gel-Trockner getrocknet.

6.3.5 Immunohistochemie

Die Immunocytochemie ermöglicht die *in situ* Detektion von Proteinen auf Gewebeebene. Sie ist die Standardmethode zur qualitativen Erkennung spezieller Protein-Antigene.

Die Fixierung der Tiere erfolgte wie beschrieben (6.2.6.3.4). Das Fixativ wurde durch dreimaliges Waschen in PBS (10 min) entfernt. Es folgten zwei Inkubationen für je 30 min in 0,1 % TritonX-100/ PBS und 50 mM Ammoniumchlorid in PBS. Nach drei Waschschriffen in PBS (10 min), erfolgte die Blockung unspezifischer Epitope für 1 h in 1 % BSA in PBS. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1/100 *budhead* Antiserum in Blockierlösung) erfolgte über Nacht in 50 µl Volumen bei 4 °C (25 Tiere). In einem Kontrollansatz mit ca. 25 Kontrolltieren erfolgte die Inkubation ohne ersten Antikörper. Durch dreimaliges Waschen mit Blockierlösung (10 min) wurde die Antikörperlösung entfernt und im Anschluss der zweite Antikörper (1/100 Anti-rabbit FITC in Blockierlösung, 1 h) zugegeben. Nach fünf Waschschriffen mit Blockierlösung erfolgte die Einbettung in vorgewärmtes (37 °C) DABCO/Mowiol. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch unter Anregung im FITC-Kanal (480 nm).

6.3.6 Peroxidase-Assay

Zum Nachweis der Aktivität von der fußspezifischen *Hydra*-Peroxidase, *PPOD1*, bzw. von terminal differenzierten Basalscheibenzellen wurde der etablierte Peroxidase-Assay in folgender Abwandlung angewendet (Hoffmeister und Schaller, 1985; Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Seit 24 h nicht gefütterte Tiere wurden für 2 - 5 min in frisch angesetztem 2 % Urethan in Hydramedium relaxiert und über Nacht bei 4 °C in 3,7 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4, fixiert. Große Tiere aus der Oligactis-Gruppe wurden vor dem Relaxieren 1 h auf Eis gekühlt und für bis zu 24 h fixiert. Anschließend wurde über Nacht in 5 % Saccharose in PBS inkubiert und nach 3-maligem Waschen für 15 min in PBS in 0,02 % Diaminobenzidin/ 0,003 % Wasserstoffperoxid in PBT gefärbt. Die Reaktion wurde durch 3 - 5-maliges Spülen mit PBT gestoppt. Nach Entwässern und Entfärben der Tiere über eine Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Euparal. Tiere der Oligactis- bzw. Viridis-Gruppe wurden sehr vorsichtig durch tropfenweise Zugabe von Euparal zu ca. 4 bzw. 15 Tieren in 300 µl Ethanol und je 5 min Inkubation bis zu einem Verhältnis Euparal/Ethanol von 1/8 vorbehandelt. Anschließend wurden die Tiere auf Objektträger überführt, mit einem Deckgläschen versehen. Mit Filterpapier wurden in 3-minütigen Abständen aufsteigende Konzentrationen von Euparal unter das Deckgläschen gezogen (1/4, 1/2, 1/1, 2/1, Euparal). Durch dieses Einbettungsverfahren wurde ein Kollabieren der sehr großen Oligactis- bzw. der filigranen Viridis-Tiere vermieden. Die Dokumentation erfolgte durch digitale Aufnahmen am Binokular bzw. Mikroskop.

6.4 Histologische Methoden

Zur Dokumentation des spezifischen Effekts der LiCl-Inkubation, der ektopischen Bildung von Fußstrukturen, wurden **longitudinale Semidünnschnitte von *Hydra*-Füßen** angefertigt und mit Toluidinblau eingefärbt.

Die **Fixierung** der Tiere erfolgte wie beschrieben (6.2.6.3.4). Die Lagerung der Tiere erfolgte ggf. in Methanol bei -20 °C. Es folgten zwei Schritte in 70 % EtOH (2 x 20 min) sowie die **Überführung in** das niedrigviskose und hydrophile Harz **LR White** durch Inkubation in: 70 % EtOH – LR White (2-1 (v/v), 30 min), 70 %

EtOH – LR White (1-1 (v/v), 30 min), 70 % EtOH – LR White (1-2 (v/v), 30 min), LR White (1 h), LR White (über Nacht). Hierauf wurden die Tiere nach Erneuerung von LR White blasenfrei in Gelatine kapseln überführt und es folgte die Trocknung bei 60 °C für 20 – 24 h. Für die lichtmikroskopische Analyse wurden **Semidünnschnitte** (0,5 µm) angefertigt. Dies erfolgte unter Verwendung des Mikrotoms Ultra cut S (Leica) sowie eines Diamantmessers. Die Dünnschnitte wurden auf einen Objektträger gebracht. Es wurde ein Tropfen H₂O hinzugegeben und die Objekte getrocknet. Die **Färbung der Semidünnschnitte** erfolgte mit 0,05 % Toluidinblau in Millipore-H₂O/ 0,01 M Tris gepuffert, pH 8,0. Ein Tropfen der Färbelösung wurde auf das Präparat aufgebracht und nach 2 minütiger Inkubation durch Spülung mit H₂O wieder entfernt. Abschließend erfolgte die Einbettung in Euparal.

6.5 In silico-Analysen

6.5.1 “phylogenetic footprinting” mit der ConSite Plattform

ConSite ermöglicht die komparative Analyse von potentiell regulatorischen Regionen orthologer Gene und die Voraussage von möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen (Lenhard et al., 2003; Sandelin et al., 2004a; Sandelin et al., 2004b). Das Programm verwendet die nach dem Prinzip der positions-spezifisch gewichteten Matrix (PSSM) modellierte nicht redundante JASPAR-Datenbank für DNA-Bindepräferenzen verschiedener eukaryotischer Transkriptionsfaktoren sowie einen Algorithmus nach dem Prinzip des „Phylogenetischen Footprintings“. Das Programm ermöglicht den globalen Vergleich orthologer, genomischer Sequenzen, die z.T. kurze kolineare Segmente mit hohen Ähnlichkeiten enthalten. Die Erstellung eines **Konservierungsprofils**, das die Grundlage für eine anschließende **Bindestellenvorhersage** bildet, erfolgt, indem ein Analysefenster mit wählbarer Größe („window size“, WS, [Anzahl der Nukleotide]) über das „Alignment“ bewegt wird und Segmente mit einem gewählten Minimum an identischen Nukleotiden, als „conservation cutoff“ (CC, [%]) bezeichnet, identifiziert werden. Nur die durch diese Vorauswahl definierten Segmente sind Ziel der anschließenden Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen. Die Modellierung der JASPAR-Bindeprofile erfolgte durch Integration bekannter

Zielsequenzen einer großen Anzahl von Vertebraten-Transkriptionsfaktoren in Form von gewichteten Matrizen. Auf der Basis dieser Matrizen läßt sich für einen zu analysierenden Sequenzabschnitt ein Informationsgehalt berechnen, ausgedrückt als Score mit der Einheit bits, der ein Maß für die Spezifität der Bindung bildet. Dieser Score-Wert korreliert direkt mit der Protein-DNA-Bindeenergie (Stormo, 2000). Der mögliche Scorebereich für einen speziellen Transkriptionsfaktor liegt zwischen einem Minimum, bei dem das Motiv gerade noch erkannt wird und einem Maximum, das dem Motiv mit der höchsten Konservierung respektive mit der höchsten potentiellen Bindeenergie zukommt. Da die Scorebereiche für Profile verschiedener Transkriptionsfaktoren, z.B. durch die unterschiedliche Länge ihrer Bindemotive, variieren, werden sie von ConSite in eine relative Einheit konvertiert. Hierbei wird der Score der *in silico* detektierten potentiellen Bindestelle in Bezug zum möglichen Scorebereich des Transkriptionsfaktors gesetzt und ein relativer Matrix Score eingeführt (Lenhard et al., 2003). Der Nutzer kann durch die Wahl eines „TF score treshhold“ (ST, [%]) die Untergrenze der relativen Matrix-Scores für vorausgesagte Bindestellen einschränken. Durch die Heraufsetzung dieser Variablen steigt die Stringenz der Analyse.

7 Referenzen

- Aitken, A., Jones, D., Soneji, Y., Howell, S., 1995. 14-3-3-Proteins - Biological Function and Domain-Structure. *Biochemical Society Transactions* 23, 605 - 611.
- Amano, H., Koizumi, O., Kobayakawa, Y., 1997. Morphogenesis of the atrichous isorhiza, a type of nematocyst, in *Hydra* observed with a monoclonal antibody. *Dev Genes Evol* 413 - 416.
- Augustin, R., 2004. Molekulare Analysen zur Musterbildung im einfachen Vielzeller *Hydra* (Dissertation, Zoologisches Institut, Universität Kiel).
- Ball, E. E., Hayward, D. C., Saint, R., Miller, D. J., 2004. A simple plan - Cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nature Reviews Genetics* 5, 567 - 577.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., Schubert, D., 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77, 817 - 827.
- Berking, S., 2003. A model for budding in hydra: pattern formation in concentric rings. *J.Theor.Biol.* 222, 37 - 52.
- Bode, H. R., 2003. Head regeneration in Hydra. *Dev.Dyn.* 226, 225 - 236.
- Bosch, T. C., 2003. Ancient signals: peptides and the interpretation of positional information in ancestral metazoans. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 136, 185 - 196.
- Bosch, T. C. und Fujisawa, T., 2001. Polyps, peptides and patterning. *Bioessays* 23, 420 - 427.
- Bosch, T. C. G. und David, C. N., 1986. Immunocompetence in *Hydra*: epithelial cells recognize self-non-self and react against it. *J.Exp.Zool.* 238, 225 - 234.
- Bridge, D., Cunningham, C. W., Desalle, R., Buss, L. W., 1995. Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria - Molecular and Morphological Evidence. *Molecular Biology and Evolution* 12, 679 - 689.
- Bridge, D., Cunningham, C. W., Schierwater, B., Desalle, R., Buss, L. W., 1992. Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria - Evidence from Mitochondrial Genome Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8750 - 8753.
- Bridge, D. M., Stover, N. A., Steele, R. E., 2000. Expression of a novel receptor tyrosine kinase gene and a paired-like homeobox gene provides evidence of differences in patterning at the oral and aboral ends of hydra. *Dev.Biol.* 220, 253 - 262.
- Broun, M. und Bode, H. R., 2002. Characterization of the head organizer in hydra. *Development* 129, 875 - 884.

- Broun, M., Sokol, S., 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.
- Campbell, R. D., 1987. A new species of *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa) from North America with comments on species clusters within the genus. *Zool.J.Linn Soc.* 91, 253 - 263.
- Campbell, R. D., 1989. Taxonomy of the European *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa): a re-examination of its history with emphasis on the species *H. vulgaris* Pallas, *H. attenuata* Pallas and *H. circumcincta* Schulze. *Zool.J.Linn Soc.* 95, 219 - 244.
- Chen, C. Y. und Schwartz, R. J., 1995. Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J.Biol Chem.* 270, 15628 - 15633.
- Collins, A. G., 2000. Towards understanding the phylogenetic history of Hydrozoa: Hypothesis testing with 18S gene sequence data. *Scientia Marina* 64, 5 - 22.
- Collins, A. G., 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 418 - 432.
- Davis, L. E., 1973. Histological and ultrastructural studies of the basal disk of Hydra. I. The glandulomuscular cell. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* 139, 1 - 27.
- Davis, L. E., 1975. Histological and ultrastructural studies of the basal disk of Hydra. III. The gastrodermis and the mesoglea. *Cell Tissue Res.* 162, 107 - 118.
- Davis, L. E. und Bursztajn, S., 1973. Histological and ultrastructural studies of the basal disk of Hydra. II. Nerve cells and other epithelial cells. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* 139, 29 - 45.
- Devon, R. S., Porteous, D. J., Brookes, A. J., 1995. Splinkerettes--improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res.* 23, 1644 - 1645.
- Dübel, S., Hoffmeister, S. A., Schaller, H. C., 1987. Differentiation pathways of ectodermal epithelial cells in hydra. *Differentiation* 35, 181 - 189.
- Duboule, D. und Wilkins, A. S., 1998. The evolution of 'bricolage'. *Trends in Genetics* 14, 54 - 59.
- Endl, I., Lohmann, J. U., Bosch, T. C., 1999. Head-specific gene expression in Hydra: complexity of DNA- protein interactions at the promoter of ks1 is inversely correlated to the head activation potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1445 - 1450.
- Forman, B. J. und Javois, L. C., 1999. Interactions between the foot and the head patterning systems in *Hydra vulgaris*. *Dev.Biol.* 210, 351 - 366.

- Frobius, A. C., Genikhovich, G., Kurn, U., Anton-Erxleben, F., Bosch, T. C., 2003. Expression of developmental genes during early embryogenesis of Hydra. *Dev. Genes Evol.* 213, 445 - 455.
- Galliot, B., 2000. Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 629 - 637.
- Galliot, B. und Schmid, V., 2002. Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 39 - 48.
- Galliot, B., Welschof, M., Schuckert, O., Hoffmeister, S., Schaller, H. C., 1995. The cAMP response element binding protein is involved in hydra regeneration. *Development* 121, 1205 - 1216.
- Galperin, M. Y., Walker, D. R., Koonin, E. V., 1998. Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome Res.* 8, 779 - 790.
- Gauchat, D., Mazet, F., Berney, C., Schummer, M., Kreger, S., Pawlowski, J., Galliot, B., 2000. Evolution of Antp-class genes and differential expression of Hydra Hox/paraHox genes in anterior patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4493 - 4498.
- Genikhovich, G., 2004. Molecular analysis of *Hydra* embryonic development by means of subtractive hybridisation (Dissertation, Zoologisches Institut, Universität Kiel).
- Grens, A., Gee, L., Fisher, D. A., Bode, H. R., 1996. *CnNK-2*, an NK-2 homeobox gene, has a role in patterning the basal end of the axis in hydra. *Dev. Biol.* 180, 473 - 488.
- Grens, A., Mason, E., Marsh, J. L., 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, 517 - 524.
- Gumucio, D. L., Heilstedtwilliamson, H., Gray, T. A., Tarle, S. A., Shelton, D., Tagle, D. A., Slightom, J. L., Goodman, M., Collins, F. S., 1992. Phylogenetic Footprinting Reveals A Nuclear-Protein Which Binds to Silencer Sequences in the Human-Gamma and Human-Epsilon Globin Genes. *Molecular and Cellular Biology* 12, 4919 - 4929.
- Habetha, M., Anton-Erxleben, F., Neumann, K., Bosch, T. C., 2003. The Hydra viridis / Chlorella symbiosis. (I) Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. *Zoology* 106, 101 - 108.
- Hand, A. R., 1976. Ultrastructural localization of catalase and L-alpha-hydroxy acid oxidase in microperoxisomes of Hydra. *J. Histochem. Cytochem.* 24, 915 - 925.

- Harafuji, N., Takahashi, T., Hatta, M., Tezuka, H., Morishita, F., Matsushima, O., Fujisawa, T., 2001. Enhancement of foot formation in Hydra by a novel epitheliopeptide, Hym-323. *Development* 128, 437 - 446.
- Hassel, M., Albert, K., Hofheinz, S., 1993. Pattern formation in Hydra vulgaris is controlled by lithium-sensitive processes. *Dev.Biol.* 156, 362 - 371.
- Hassel, M. und Berking, S., 1990. Lithium Ions Interfere with Pattern Control in Hydra-Vulgaris. *Roux's Archives of Developmental Biology* 198, 382 - 388.
- Hassel, M., Bridge, D. M., Stover, N. A., Kleinholz, H., Steele, R. E., 1998. The level of expression of a protein kinase C gene may be an important component of the patterning process in Hydra. *Dev.Genes Evol.* 207, 502 - 514.
- Hemrich, G., 2004. Struktur und Funktion des kopfspezifischen Gens "KS1" bei Hydra. (Diplomarbeit, AG Bosch).
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U., Holstein, T. W., 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407, 186 - 189.
- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241 - 251.
- Hoffmeister, S. und Schaller, C., 1985. A new biochemical marker for foot-specific cell differentiation in hydra. *Roux's Dev Biol* 194, 453 - 461.
- Hoffmeister, S. A., 1991. Analysis of a foot regeneration deficient strain of Hydra oligactis. *Mech.Dev.* 35, 181 - 192.
- Hoffmeister, S. A., 1996. Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from Hydra vulgaris. *Development* 122, 1941 - 1948.
- Hoffmeister-Ullerich, S. A., 2001. The foot formation stimulating peptide pedibin is also involved in patterning of the head in hydra. *Mech.Dev.* 106, 37 - 45.
- Hoffmeister-Ullerich, S. A., Herrmann, D., Kielholz, J., Schweizer, M., Schaller, H. C., 2002. Isolation of a putative peroxidase, a target for factors controlling foot-formation in the coelenterate hydra. *Eur.J.Biochem.* 269, 4597 - 4606.
- Holland, W. H., 1999. The future of evolutionary developmental biology. *Nature* 402,
- Holstein, T., 1995. Cnidaria:Hydrozoa.
- Holstein, T. und Campbell, R. D., 1990. Identity crisis. *Nature* 346, 21 - 22.
- Holstein, T. W., Hobmayer, E., Technau, U., 2003. Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev.Dyn.* 226, 257 - 267.

- Iwama, H. und Gojobori, T., 2004. Highly conserved upstream sequences for transcription factor genes and implications for the regulatory network. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*
- Javois, L. C. und 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.
- Kaloulis, K. und Galliot, B., 2000. Molecular Basis of Morphogenetic Events in *Hydra*: Study of the CREB and Hedgehog Pathways during Budding and Regeneration.
- Klein, P. S. und Melton, D. A., 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8455 - 8459.
- Kobayakawa, Y. und Kodama, R., 2002. Foot formation in hydra: commitment of the basal disk cells in the lower peduncle. *Dev.Growth Differ.* 44, 517 - 526.
- Koizumi, O., Sato, N., Goto, C., 2004. Chemical anatomy of hydra nervous system using antibodies against hydra neuropeptides: a review. *Hydrobiologia* (in press),
- Kumpfmuller, G., Rybakine, V., Takahashi, T., Fujisawa, T., Bosch, T. C., 1999. Identification of an astacin matrix metalloprotease as target gene for *Hydra* foot activator peptides. *Dev.Genes Evol.* 209, 601 - 607.
- Kuznetsov, S. G., Anton-Erxleben, F., Bosch, T. C., 2002. Epithelial interactions in *Hydra*: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *J.Exp.Biol.* 205, 3809 - 3817.
- Lenhard, B., Sandelin, A., Mendoza, L., Engstrom, P., Jareborg, N., Wasserman, W. W., 2003. Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J.Biol.* 2, 13 -
- Leontovich, A. A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagase, H., Sarras, M. P., Jr., 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, 907 - 920.
- Lohmann, J. U. und Bosch, T. C., 2000. The novel peptide HEADY specifies apical fate in a simple radially symmetric metazoan. *Genes Dev.* 14, 2771 - 2777.
- Mäder, M., 1985. Zur enzymatischen Differenzierung der pflanzlichen Zellwand. *BIUZ* 15, 141 - 151.
- Marcellini, S., Technau, U., Smith, J. C., Lemaire, P., 2003. Evolution of Brachyury proteins: identification of a novel regulatory domain conserved within Bilateria. *Dev.Biol.* 260, 352 - 361.

- Marcum, B. A. und Campbell, R. D., 1978. Developmental roles of epithelial and interstitial cell lineages in hydra: analysis of chimeras. *J.Cell Sci.* 32, 233 - 247.
- Marques, A. C. und Collins, A. G., 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123, 23 - 42.
- Martin, V. J., Littlefield, C. L., Archer, W. E., Bode, H. R., 1997. Embryogenesis in hydra. *Biol.Bull.* 192, 345 - 363.
- Martindale, M. Q., Pang, K., Finnerty, J. R., 2004. Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development* 131, 2463 - 2474.
- Martinez, D. E., Dirksen, M. L., Bode, P. M., Jamrich, M., Steele, R. E., Bode, H. R., 1997. Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Dev.Biol.* 192, 523 - 536.
- Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D., Sogin, M. L., 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9707 - 9712.
- Meinhardt, H., 1993. A model for pattern formation of hypostome, tentacles, and foot in hydra: how to form structures close to each other, how to form them at a distance. *Dev.Biol.* 157, 321 - 333.
- Meinhardt, H., 2001. Strukturbildungsprozesse. Auf- und Abbau von Mustern in der Biologie. *BIUZ* 31, 22 - 29.
- Meinhardt, H., 2004. Models for the generation of the embryonic body axes: ontogenetic and evolutionary aspects. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 446 - 454.
- Meinhardt, H. und Gierer, A., 2000. Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* 22, 753 - 760.
- Miljkovic, M., Mazet, F., Galliot, B., 2002. Cnidarian and bilaterian promoters can direct GFP expression in transfected hydra. *Dev.Biol.* 246, 377 - 390.
- Müller, H.-J., 2001. PCR- Polymerase-Kettenreaktion.
- Muller, W. A., 1990. Ectopic head and foot formation in Hydra: diacylglycerol-induced increase in positional value and assistance of the head in foot formation. *Differentiation* 42, 131 - 143.
- Müller, W. A., 1995. Competition for factors and cellular resources as a principle of pattern formation in Hydra. II. Assistance of foot formation by heads and buds and a new model of pattern control. *Dev.Biol.* 167, 175 - 189.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G., Fessler, J. H., 1994. Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J.* 13, 3438 - 3447.

- Otto, J. J. und Campbell, R. D., 1977. Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. *J.Exp.Zool.* 200, 417 - 428.
- Overdier, D. G., Porcella, A., Costa, R. H., 1994. The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol.Cell Biol.* 14, 2755 - 2766.
- Pennacchio, L. A. und Rubin, E. M., 2001. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat.Rev.Genet.* 2, 100 - 109.
- Percell, K., Willner, J., Signorovitch, J., Holstein, T., Campbell, R., Martinez, D., 2003. A molecular Phylogeny of the Genus *Hydra*.
- Philpott, D. E., Chaet, A. B., Burnett, A. L., 1966. A Study of the Secretory Granules of the Basal Disk of *Hydra*. *J.Ultrastructural Research* 14, 74 - 84.
- Reinhardt, B., Broun, M., Blitz, I. L., Bode, H. R., 2004. HyBMP5-8b, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in *hydra*. *Dev.Biol.* 267, 43 - 59.
- Rodaway, A. und Patient, R., 2001. Mesendoderm: An ancient germ layer? *Cell* 105, 169 - 172.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989. *Molecular Cloning.* 2,
- Sandelin, A., Alkema, W., Engstrom, P., Wasserman, W. W., Lenhard, B., 2004a. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research* 32, D91 - D94.
- Sandelin, A., Wasserman, W. W., Lenhard, B., 2004b. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Research* 32, W249 - W252.
- Sarras, M. P., Jr. und Deutzmann, R., 2001. *Hydra* and Niccolo Paganini (1782-1840)--two peas in a pod? The molecular basis of extracellular matrix structure in the invertebrate, *Hydra*. *Bioessays* 23, 716 - 724.
- Schiliro, D. M., Forman, B. J., Javois, L. C., 1999. Interactions between the foot and bud patterning systems in *Hydra vulgaris*. *Dev.Biol.* 209, 399 - 408.
- Shostak, S., 1974. The complexity of *Hydra*: homeostasis, morphogenesis, controls and integration. *Q.Rev.Biol.* 49, 287 - 310.
- Siebert, S., Thomsen, S., Reimer, M. M., Bosch, T. C. G., 2004. Control of foot differentiation in *Hydra*: Phylogenetic footprinting indicates interaction of head, bud and foot patterning systems. *Mech.Dev.* (eingereicht),
- Smith, K. M., Gee, L., Blitz, I. L., Bode, H. R., 1999. CnOtx, a member of the Otx gene family, has a role in cell movement in *hydra*. *Dev.Biol.* 212, 392 - 404.

- Smith, M. L., Hjortsberg, K., Ohlsson, P. I., Paul, K. G., 1983. The mechanism of spontaneous heme release from horseradish peroxidase isoenzyme A2. *Biomed.Biochim.Acta* 42, 805 - 811.
- Steele, R. E., 2002. Developmental signaling in Hydra: what does it take to build a "simple" animal? *Dev.Biol.* 248, 199 - 219.
- Stormo, G. D., 2000. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics.* 16, 16 - 23.
- Takahashi, T., Muneoka, Y., Lohmann, J., Lopez de Haro, M. S., Solleder, G., Bosch, T. C., David, C. N., Bode, H. R., Koizumi, O., Shimizu, H., Hatta, M., Fujisawa, T., Sugiyama, T., 1997. Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: LWamide and PW families. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 1241 - 1246.
- Tardent, P., 1972. Experimente zum Knospungsprozess von *Hydra attenuata* Pall. *Symp.Soc.Dev.Biol.* 79, 355 - 375.
- Technau, U. und Bode, H. R., 1999. HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development* 126, 999 - 1010.
- Technau, U., Miller, M. A., Bridge, D., Steele, R. E., 2003. Arrested apoptosis of nurse cells during Hydra oogenesis and embryogenesis. *Dev.Biol.* 260, 191 - 206.
- Technau, U. und Scholz, C. B., 2003. Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int.J.Dev.Biol.* 47, 531 - 539.
- Thomsen, S., Till, A., Wittlieb, J., Beetz, C., Khalturin, K., Bosch, T. C., 2004. Control of foot differentiation in Hydra: in vitro evidence that the NK-2 homeobox factor CnNK-2 autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene. *Mech.Dev.* 121, 195 - 204.
- Trembley, A., 1744. *Memoires pour servir a l'histoire d'un genre de polyps d'eau douce.*
- Turing, A., 1952. The chemical basis of morphogenesis. *Phil Trans B* 237, 37 - 72.
- Wasserman, W. W., Palumbo, M., Thompson, W., Fickett, J. W., Lawrence, C. E., 2000. Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat.Genet.* 26, 225 - 228.
- Westheide, W. und Rieger, R., 1996. *Spezielle Zoologie, Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere.*
- Wolpert, L., 1999. *Entwicklungsbiologie.*
- Xiao, S. H., Yuan, X. L., Knoll, A. H., 2000. Eumetazoan fossils in terminal Proterozoic phosphorites? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13684 - 13689.

- Yan, L., Fei, K., Zhang, J., Dexter, S., Sarras, M. P., Jr., 2000a. Identification and characterization of hydra metalloproteinase 2 (HMP2): a meprin-like astacin metalloproteinase that functions in foot morphogenesis. *Development* 127, 129 - 141.
- Yan, L., Leontovich, A., Fei, K., Sarras, M. P., Jr., 2000b. Hydra metalloproteinase 1: a secreted astacin metalloproteinase whose apical axis expression is differentially regulated during head regeneration. *Dev.Biol.* 219, 115 - 128.
- Yum, S., Takahashi, T., Hatta, M., Fujisawa, T., 1998a. The structure and expression of a preprohormone of a neuropeptide, Hym-176 in *Hydra magnipapillata*. *FEBS Lett.* 439, 31 - 34.
- Yum, S., Takahashi, T., Koizumi, O., Ariura, Y., Kobayakawa, Y., Mohri, S., Fujisawa, T., 1998b. A novel neuropeptide, Hym-176, induces contraction of the ectodermal muscle in *Hydra*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 248, 584 - 590.
- Zacharias, H., Anokhin, B., Khalturin, K., Bosch, T. C. G., 2004. Genome sizes and chromosomes in the basal metazoan *Hydra*. *Zoology* 107, 219 - 227.
- Zeretzke, S. und Berking, S., 2002. In the multiheaded strain (mh-1) of *Hydra magnipapillata* the ectodermal epithelial cells are responsible for the formation of additional heads and the endodermal epithelial cells for the reduced ability to regenerate a foot. *Dev.Growth Differ.* 44, 85 - 93.

8 Anhang

8.1 PPOD-cDNA-Sequenzen

Die dargestellten cDNA-Sequenzen aus verschiedenen *Hydra*-Spezies sind das Ergebnis von RT-PCR-Experimenten mit Primern gegen konservierte Regionen der zu Beginn der Arbeit bekannten *H. vulgaris* (Basel) *PPOD1+2* Gene und anschließender 5'- und 3'-RACEs. Sie wurden für die Erstellung der in Abb. 8.1 und Abb. 8.2 gezeigten Sequenzvergleiche benutzt. Die Sequenzen für *H. vulgaris* (Basel)-*PPOD1+2* finden sich auch bei Genbank (# AY 034095, AY 034096). Grüne Sequenzbereiche kennzeichnen offene Leserahmen, schwarze 5'- und 3'-untranslatierte Regionen. Unterstrichene Bereiche entsprechen den für *in situ* Hybridisierungen eingesetzte Riboproben.

8.1.1 PPOD1-cDNA-Sequenzen

H. vulgaris (Basel) *PPOD1*

ATCAGACTGACTGCAAGCAGGTTATGATTTTTAAAAGTCAGAAATATTTTCAGCTAAAATGAACTATACATTACAGTCTTAATGATCT
 TAACCTGCGTGTTCGAAAAGAAAAACGAGGTATACCTGGTTGGAACAAAGCTTACACAGTAGCTATCAAATCGTTTACCAATGGAAA
 ATTCGTATGCGCTGAAAATATCGGAAATCAACCATTAAATGGCAATAGAGATGCTATTGGTTTATGGGAAACTTTTGAAATTCGTTTC
 ACTAACGCACAACATTTGCATTGAAATCACATGCAGACGGTAAGTTGTGAGTGCAGGTAATGGTGGAAATAACTTGCTCATTGCAA
 ATAAAGACCACGCTGCAGTATGGGAGACTTTACCTTAGTTCACAAAAATGGAGCCTTTGGATTAAATCAAATGGTAATGCAAAGTT
 AGTGACTGCTGAAGAAGCAGGAAACAAACCACTTGCAGCTAATCGCATGTTCTTGACGCTCTGGGAAATGTTTACGCTTAGTCTACGTC
 TGGCCATCAGTACACAAAGTGGCAATAAAGCATTGGTTAATGGTTTATTTGTATGTGCTGAAAATGCCGGAAGCAATCATTAATTTG
 CTAACAGAGGCCAAATAGGGCCTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCTACTAACCTCCAAACATTTACTCTCAAATCTCTTGCAAACGG
 CAAATTTGGTTTGGCGAGAAAATAATGGGAAATCTCCTCTTATTGCTAATAGAGAACATATTGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGGTT
 CAAAAATAAGAGGCTTTGCTTTCAAATCACACGCAATGGAAAATTAGTGACTGCTGAAAACGCAGGTCATAGTAACCTAATTGCCA
 ACCGCGATAATCCTGATATTGGGAAAGATTCGTTTTTATTTACTTGTGAATAATCTTAAATATTTATGTTGATTGTAACCTAAATCGA
 AAATAAGTTTTTATAAATAGATTCAATTTACTTTCTTTGTTTAAAGTTGGATAGTTTCAATTAATGTAGGTAATAAGTTAATAAT
 TTGTTTACAATTTATTAATAATGTTCTTTTGTAAATTTAATTTTTCTTTCTGTATAGTAACGTTTAAAAAACATCATTAATAAAAA
 AAAAAA

H. magnipapillata *PPOD1*

ATAAATCAAACATATAAATATTTCATTTGTTTAAATATAACTTATTAATTTATCTGGTTAACTGCAAGGAGTTTGTGTGTCTAAAAT
 GAAGCTATGCATAACAGTGTTCATGATGGTTATCTGCGTGATTGCAAAAGAAAAACGAGATACACCTGCATGGACAAAAGCTTATACA
 GTAGCTCTCAAATCGTTTACCAACGGAAAATTTGTATGTGCTGAAAATGTAGGAAGTCAACCATTGATTGCCAATAGAGATGCTATTG
 GTTTATGGGAAACTTTTGAAATTCGTTTCACTAACGCACAACATTTGCATTGAAATCACATGCAAAATGGGAAAGTTTGTGAGTGAAG
 TAATGGTGGAAATAACTTGCTTATTGCCAACAAGACCAGGCTGCAGTATGGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAATTAATGGAACCTTTT
 GGATTTAAATCGAATGGTAATGCAAAATTTGGGCTGCTGAAGAAGCAGGAAGTAAATCACTTGCAGCTAACCGCAACGCTCTTGACG
 TTTGGGAAATGTTTACGCTTGGTCTACGTGTTGGCCATCAGTTCATAAAGTGGCAATAAAGCATTGGTCAATGGCTTATACGTATGTGC
 TGAAAATGCTGGAAAGCAATCATTAATTTGCTAACAGAGGCCAAATAGGCCCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGCTTTACTGACCACCAA
 ACATTTACTCTCAAATCACTTGGCAACGGCAAGTTAGTTTGTGCAGAAAATAATGGCAATCTCCTCTTATTGCTAATAGAGACCAA
 TTGGACCGTGGGAGACTTTTACGCTCGTTCAAATAAGGAAGGTGTTGCTTTTAAATCACACGCTAATGGAAAATTAGTGACAGCAGA
 AAACGCAGGACATGATAACCTAATTTGCCAACCGGATTAATCTGATATTGGGAAAGATTGCTTTTTATCTACTTGTGAATAACTTTA
 ATATTTAAGTTGATTGTAAGCTAAATCGAAAATAAGTTTTTATATAAATAAGATTCAATTTAGTTTTTAAATAATGTTTGGTGATAAGT
 TTATATTTCAATCACGTTTTTATTAATAATTTTTTTTTGATTTTACTTTTTTTCTGTATATATATATTTTTTAAATTTTACTTTT
 TTTTTCTGTATATTTTTTTCTGTATATTAACGTTTATAAAAACATCAGTATAAAGAACAACGTCGTTGTTATTGCTGTTGTTGTGA
 CTTTTTTTGTATTTAGTCCAAAATATTTGTAGCCCTTTTTATTTCAACTTTCCCATATTTTTTACCTTTTTAAGGGCGGCCGCTCA
 AAGGATCCAAGCTTACGTACCCGTCATGCGAAAGTATAACCTTTTTATAGTGCACCTAAATTAATTAATTAATGAGGCTGTTTACAACGC
 TTGACTGGAAAACCTGAGTCTTACGGATCCCATGTTATAGCCTTGGAGCAAATCCCC

***H. vulgaris* (AEP) PPOD1**

```
TTATTTTTCATCTGCAAGGAGTTTGGTTGTGTTGCTCTAAATGAAGCTATGCATAACAGTGTTCATGATTGTACCTGCGTATTGCAAAA  

GAAAAACGAGATACACCTGTATGGACAAAAGCTTACACAGTAGCTATCAAATCGTTTACCAACGAAAGTTTGTATGTGCTGAAAAATG  

TAGGAAGTCAACCATTGATTGCCAATAGAGATGCTATTTGGTTTATGGGAAACTTTTGAAATTCGTTTACTAACGCAAAACATTTGC  

ATTGAAATCCTATGCAAAACGGGAAGTTTGTCAAGTGCAGGTAATGGTGGAAATAACTTGCTCATTTGCCAATAAGGACCAGGCTACAGTA  

TGGGAGACTTTTCACCTTAGTTTCCAATTTATGCCACTTTTGATTAAAAATCAAATGGTAACGCAAAAGTTTGTACTGCTGAAGAAGCAG  

GAAGTAAATCACTTGCAGCTAACCGCAACGTTCTTGCAGTTTGGGAAATGTTCAAGTTTGGTCATCGTGTGGCCATCAGTTTCATAAAGT  

TGCAATAAAGCATTGGTCAATGGCTTATACGTTATGTGCTGAAAATGCCGAAAGCAATCATTAAATGCTAACAGAGGAAAAATAGGC  

CCTTGGGAAACATTTGAAATTCGCTTCTACTGACCTCAAACATTTACTCTCAAATCTGTTGGCAACGGCAAATTTGGTTTGGCGAGAAA  

ATAATGGCCGATCTCCTCTTATTTGCTAATAGAGACCAAATTTGGACCGTGGGAGACCTTTTCGCTAGTTCAAATAAAGAAGGTGTTC  

TTTTAAATCACACGCTAATGGAAAATTTAGTGACTGCAGAAAACGAGGACGTTGATAACCTAATTGCCAACCGCGATAATCCTGATATT  

TGGGAAAGATTTCGCTTTTATTTACTTGTAAATAACTTAAATATTTAAGTTGATTTGTAAGCTTAAATCGGACAAAAAGTTTCATATAAA  

AGTTTCAATTTAGTTTAAATAGTGTGGTAATAAATTTATATTTTGTGACGGTTTATTAATAATGTTTTACTAAAAA  

AAAAA
```

Es wurden Transkripte mit unterschiedlich langer 3'-untranslatierter Region isoliert. Die alternative Andenylierungsstelle ist rot hervorgehoben.

***H. oligactis* PPOD1**

```
ATGAACTATGCATTACAGTCTTCATGATCTTTACCTGCGTGTTCGAGAAGAAAAACGAGGCATACCTGGATGGAACAAAGCTTATA  

CAGTAGCTATCAAATCGCATATCAACCGCAAAATTTGTATGCGCTGAAAATAGCGGAAACCAACCATTAAATGGCAATAGAGGCGCTAT  

TGGTTTTATGGGAAACTTTCGAAATTCGTTTCACTAATGCAAAAACATTTACATTGAAATCCCATGCAAAACGAAAGTTTGTCAAGTGC  

GGTAACCGGTGGAAATAACATGCTCATTGCTAATAGAGACCACGCTGCAGTATGGGAGACTTTTCACTTTAGTTTCCAAGACATGAAGCCG  

TTGGATTTAAATCAAATGGTAATGCAAAACTAGTCACCGCTGAAGAAGCAGGAAATAAACCACTTGCAGCTAACCGCGCTGTGTTTGA  

CGTCTGGGAAATGTTACAGTTTGGTCTACGTTGCGCTGCGCATCAGTACAAAAGTGGCAATAAAGCATTGGTTAATGGTTTTATTTGATGT  

GCTGAAAATGCCGAGACAGCAATCATTAAATGCTAACAGAGGCAAAATAGGGCTTTGGGAAACATTTGAAATCCGTTTCACTGACCC  

AAACATTTACTCTCAAATCTCTTTCGAAAACGGCAAATTTGGTTTGCACAGAGAATAATGGGCAATCTCTCTTATTTGCTAATAGAAATCA  

AATGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGTTTCAAATAAAGAAGGTGTTCGCTTCAAATCACACGCTAATGGAAAATTTAGTGACTGCT  

GAAAATGCAGGACATAGTAACCTAATTGCCAACCGCGATAATTTCTGATATTTGGGAAAGATTGTGTTTTGTTTACTTGTAAATAACTT  

AAATACCCATGTCGACTGTAAGCCAAATAAAAATAAGTTTTATATAAATAAGATAAAATTTAATTTTTCTAGTTTAAGTTGGATAGT  

TTCATTAATGTTAGGCTAGGTTGATACTTTTATTAATGTTAGGTAATAAGTTAATATTTGATTCATAATTATAAAAAATGTTCA  

TTTGTAAATTTACTTTTTTAATGTATATTACCGATTGAAA
```

8.1.2 PPOD2-cDNA-Sequenzen

***H. vulgaris* (Basel) PPOD2**

```
GGCACGAGGTTAAAGGTTAAATACATGAAATTTAAAGCTAAATGAACTATGCATATTGTTTATGATGGTTACCAGCTTGTGTTGCAA  

AAGAAAAACGAGCTACAATTGAATGGAIAAAGTTTATACAGTTGCTTAAATTCGCTTATCAACGGAATTTGTATGTGCTGAAAA  

AAACGGAAAGTGAAACATTGATTGCCAAACAAAGACTCTTTGGCTTATGGGAAACTTTTGAAATTTGTTTTATCGACACACAAGCAATT  

GCATTAATCTTATGGAAACGGAAAGTTCGTCACTGCAGTTAATACTGACATAACCTGCTCCTTGCACAAAGACCAGGCTACAG  

TATGGGAGACTTTTACCTTAGTTCCAAGTTTCGGAACCTTTGGATTAAAGTCAATGGCAATCAAATAATAGTACCAGTGAAGAAGC  

GGGAAACAAACCACTTACAGCTAACCGCGATGTTCTTGACGCTGGGAAATGTTTCACTGCTTGGCTACGTTGGCCATCAGTGCATAAA  

GTGGCAATAAAGCTTTGGTTAATGGTTTATTGTTATGTGCTGAAAAGGCCGGAAACCAATCATTACGTTGCTAACCGAGCTCAAATAG  

GCCCTTGGGAAACATTTGAAATTTAGCTTTCAGTGCATTAACAACATTGACTCTCAAATTTTGGCAACCGCAAATTTGTTGGCGAGA  

AAAGAATGGACAATTCCCACTTATTGCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCAACAATAGTTTCCAATAAGGAAGGTGT  

GCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAGTTTGTGACAGCAGAAAACGCAGGAAAAGTTACTTAAATGGCAATCGCGATAATGCCGACA  

TTTGGGAAAGATTGTTTATCATCTACTTGTGAATATCAAATTTAAGTAAAGCTTATTATAATTTTGAACATTTTCCAATTT  

TGACTTATGATAAAGTCTGTTTAAAGTTTATTTATTTTATTTTATTTTATTTTGTATTTTAAATTTAAAAAACATCAGTATAAAAAA  

TAGTGAATAAATTTTATGTTGCTTAAAAA  

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

***H. vulgaris* (Basel) PPOD2-short (kürzere Splice-Variante)**

```
AATACATGAAATTTAAAGCTAAATGAACTATGCATATTGTTTATGATGGTTACCAGCTTGTGTTGCAAAGAAAAACGAGCTACATT  

AGTGCATAAAGTGGCAATAAAGCTTTGGTTAATGGTTTATTGTTATGTGCTGAAAAGGCCGGAAACCAATCATTACGTTGCTAACCGA  

GCTCAAATAGGCCCTTTGGGAAACATTTGAAATTTAGCTTTAGTGTATTCACAAACATTGACTCTCAAATCTTTTGGCAACCGCAAATTT  

TTTGGCGAGAAAAGAAATGGACAATTTCCCACTTATTGCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCAACAATAGTTTCCAATAA  

GGAAGTGTGTTGCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAGTTCGTGACAGCTGAAAACGCAGGAAAAGTTACTTAAATGGCAATCGCGAT  

AATGCCGACATTTGGGAAAGATTGTTTATCATCTACTTGTGAATATCAAATTTAAGTAAAGCTTATTATAATTTTGAACATTTTCCAAT  

TTTCCAATTTGACTTATATATAAGTCTTTTAAAGTTTATTTATTTTATTTTATTTTATTTTGTATTTTATTATAATTTAAAAAACATCA  

GTATAAAAAATAGTGAATAAATTTTATGTTGCAATC
```

Startcodon

H.v. PP1 ATGAAACTATACATTACAGCTTTAATGATCTTAACCTGCGTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGG	62
H.o. PP1 ATGAAACTATGCATTACAGCTTTAATGATCTTAACCTGCGTGTTTGCAAGAAAAACGAGG	62
H.m. PP1 ATGAAGCTATGCATAACAGGTTAATGATGGTTATCTGCGTGAATTGCAAAAGAAAAACGAGA	62
AEP PP1 ATGAAGCTATGCATAACAGGTTAATGATGGTTATCTGCGTGAATTGCAAAAGAAAAACGAGA	62
H.v. PP2	ATGAAATTTAAAGCTAAAATGAAACTATGCATAT...TGTTAATGATGGTTACCACTTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGC	77
H.m. PP2	ATGAAATTTAAAGCTAAAATGAAACTATGCATAT...TGTTAATGATGGTTACCACTTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGC	77
H.m. PP2like ATGAAACTATGCATAA...TGTTAATGATGGTTATCTGCAATTTGCAAAAGAAAAACGAGC	59

Exon/ Intron-Grenze

H.v. PP1	TATACCTGTTTGGAAACAAAGCTTACACAGTAGCTATCAAAATCGTTTACCAATGGAAATTCGTATGCCTGAAAATATCG	142
H.o. PP1	CATACCTGTTTGGAAACAAAGCTTATACAGTAGCTATCAAAATCGCATATCAACGGCAAATTTGTATGCCTGAAAATATCG	142
H.m. PP1	TACACCTGCTATGGACAAAAGCTTATACAGTAGCTCTCAAAATCGTTTACCAACGGAAAATTTGTATGTCCTGAAAATGTAG	142
AEP PP1	TACACCTGTTATGGACAAAAGCTTACACAGTAGCTATCAAAATCGTTTACCAACGGAAAGTTTGTATGTCTGAAAATGTAG	142
H.v. PP2	TACATTAGAAATGGAAAAAAGTTTATACAGTTGCTATAAAATCGCTTATCAACGGAAAATTTGTATGTCTGAAAAAAGCG	157
H.m. PP2	TACATTAGAAATGGAAAAAAGTTTATACAGTTGCTATAAAATCGCTTATCAACGGAAAATTTGTATGTCTGAAAAAAGCG	157
H.m. PP2like	TACATTAGAAATGGAAAAAAGTTTATACAGTTCCTATCAAAATCGTTTACCAACGGGAAAATTTGTATGTCTGAAAATAACG	139

H.v. PP1	GAAATCAACCATTAAATTGCCAATAGAGATGCTATTGGTTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTCACTAAAGCACAAAACA	222
H.o. PP1	GAAACCAACCATTAAATGGCAATAGAGGGCTATTGGTTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTCACTAATGCAAAAACA	222
H.m. PP1	GAAATCAACCATTGATTGCCAATAGAGATGCTATTGGTTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTCACTAAAGCACAAAACA	222
AEP PP1	GAAATCAACCATTGATTGCCAATAGAGATGCTATTGGTTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTCACTAAGCACAAAACA	222
H.v. PP2	GAAATCAACCATTGATTGCCAACAAGACTCTTTGGCTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTATCGACACACAAGACA	237
H.m. PP2	GAAATCAACCATTGATTGCCAACAAGACTCTTTGGCTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTATCGACACACAAGACA	237
H.m. PP2like	GAAATCAACCATTGATTGCCAACAAGACTCTATTGGTTTATGGGAAACTTTGAAATTCGTTTCACTGACACACAACA	219

H.v. PP1	TTTGCATTGAAATCACATGCGAGAGTTTCTCAGTGCAGGTAAGGTTGGAAATAACTTGCTCAATTGCCAATAAAGA	302
H.o. PP1	TTTACATTGAAATCCCATGCAAAAGGAAAGTTTCTCAGTGCAGGTAAGGTTGGAAATAACTTGCTCAATTGCCAATAAAGA	302
H.m. PP1	TTTGCATTGAAATCACATGCAAAAGGAAAGTTTCTCAGTGCAGGTAAGGTTGGAAATAACTTGCTCAATTGCCAATAAAGA	302
AEP PP1	TTTGCATTGAAATCCCATGCAAAAGGAAAGTTTCTCAGTGCAGGTAAGGTTGGAAATAACTTGCTCAATTGCCAATAAAGA	302
H.v. PP2	ATTGCATTAAATCTTATGCAAAAGGAAAGTTTCTCAGTGCAGGTTAATACTGACACTAAGCTGCTCCTTGGCAACAAGA	317
H.m. PP2	ATTGCATTAAATCTTATGCAAAAGGAAAGTTTCTCAGTGCAGGTTAATACTGACACTAAGCTGCTCCTTGGCAACAAGA	317
H.m. PP2like	TTTGTATTAAATCCCATGCAAAAGAAATTTCTCAGGAAATTAATAGCGAAATAACTTGCTCAATTGCCAATAAAGA	299

H.v. PP1	CCACGCTGCAGTATGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAAAAATGGACCTTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAGT	382
H.o. PP1	CCACGCTGCAGTATGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAAGACATGACCGCTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAAC	382
H.m. PP1	CCAGGCTGCAGTATGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAATTAATGGAACTTTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAAT	382
AEP PP1	CCAGGCTGCAGTATGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAATTAATGGAACTTTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAGT	382
H.v. PP2	CCAGCTGCAGTATGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAAGTTTGGAACTTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAGT	397
H.m. PP2	CCAGGCTGCAGTATGGAGACTTTACCTTAGTTCCAAAGTTTGGAACTTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAGT	397
H.m. PP2like	CCAGGCTGCAGTATTTGAGACTTTACCTTAGTTCCAAAGATTGGAACTTTTGGATTTAAATCAAAATGTAATGCAAAAAT	379

H.v. PP1	TACTGACCTGCTGAAGAAGCAGGAAACAAAACACTTTGCAGCTAAACCGGATTCCTTGACGCTCTGGGAAATGTTGAGCTTA	462
H.o. PP1	TACTCACCGCTGAAGAAGCAGGAAATAAACCCTTTGCAGCTAAACCGGATTCCTTGACGCTCTGGGAAATGTTGAGCTTG	462
H.m. PP1	TTCTGGCTGCTGAAGAAGCAGGAAATAAACCCTTTGCAGCTAAACCGGAAACCTCTTGACGCTTTGGGAAATGTTGAGCTTG	462
AEP PP1	TTCTGACCTGCTGAAGAAGCAGGAAATAAACCCTTTGCAGCTAAACCGGAAACCTCTTGACGCTTTGGGAAATGTTGAGCTTG	462
H.v. PP2	TACTCACCGCTGAAGAAGCAGGAAACAAAACACTTTGCAGCTAAACCGGATTCCTTGACGCTCTGGGAAATGTTGAGCTTG	477
H.m. PP2	TACTCACCGCTGAAGAAGCAGGAAACAAAACACTTTGCAGCTAAACCGGATTCCTTGACGCTCTGGGAAATGTTGAGCTTG	477
H.m. PP2like	TACTGACAGCTGAAGAAGCAGGAAACAAAACACTTTGCAGCTAAACCGGAAACCTCTTGACGCTCTGGGAAATGTTAAATTTG	459

Alternative PPOD2-splice-Stelle

H.v. PP1	GTCACGCTGCGGCCATCAGTACATAAAAGTGCCATAAAAAGCAATGGTTAATGGTTTATTTGTATGTCGCTGAAAATGCCGG	542
H.o. PP1	GTCACGCTGCGGCCATCAGTACATAAAAGTGCCATAAAAAGCAATGGTTAATGGTTTATTTGTATGTCGCTGAAAATGCCGG	542
H.m. PP1	GTCACGCTGCGGCCATCAGTTCATAAAAGTGCCATAAAAAGCAATGGTTCAATGGCTTATACGTATGTCGCTGAAAATGCCGG	542
AEP PP1	GTCATCGTGGCCATCAGTTCATAAAAGTGCCATAAAAAGCAATGGTTCAATGGCTTATACGTATGTCGCTGAAAATGCCGG	542
H.v. PP2	GTCACGCTGCGGCCATCAGTTCATAAAAGTGCCATAAAAAGCTTTGGTTAATGGTTTATTTGTATGTCGCTGAAAAGGCCGG	557
H.m. PP2	GTCACGCTGCGGCCATCAGTTCATAAAAGTGCCATAAAAAGCTTTGGTTAATGGTTTATTTGTATGTCGCTGAAAAGGCCGG	557
H.m. PP2like	GTCACGCTGCGGCTCAGTTCATAAAAGTGCCATAAAAAGCAATGATCAATGGTTTGTTTGTATGTCGCTGAAAATGCCGG	539

H.v. PP1	AAAGCAATCAATTAATGCTAAACAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	622
H.o. PP1	AAAGCAATCAATTAATGCTAAACAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	622
H.m. PP1	AAAGCAATCAATTAATGCTAAACAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	622
AEP PP1	AAAGCAATCAATTAATGCTAAACAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	622
H.v. PP2	AAAGCAATCAATTAATGCTAAACAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	637
H.m. PP2	AAAGCAATCAATTAATGCTAAACAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGAAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	637
H.m. PP2like	AAAGCAATCCATTAATGCTAATAGAGCCAAAATAGGCTTTGGGAAACATTTGTAATTCGTTTCACTAACCTCCAAAACAT	619

(Fortsetzung Abb. 8.1)

H.v. PP1	TTACTCTCAAATCTCTTGCAAAACGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGACAA	702
H.o. PP1	TTACTCTCAAATCTCTTGCAAAACGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGAAAT	702
H.m. PP1	TTACTCTCAAATCTCTTGCAAAACGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGACAC	702
AEP PP1	TTACTCTCAAATCTCTTGCAAAACGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGACAC	702
H.v. PP2	TCACTCTCAAATTTTTTGCAAAACGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGACAT	717
H.m. PP2	TCACTCTCAAATTTTTTGCAAAACGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGACAT	717
H.m. PP2like	TTACTCTCAAATCTCTTGCDAATGGCAAATTGGTTTGGCAGAAAAAATGGAATCTCCTCTTATTGCDAATAGACAT	699
H.v. PP1	CATATTGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGGTTCAAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	782
H.o. PP1	CAATTGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGGTTCAAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	782
H.m. PP1	CAATTGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGGTTCAAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	782
AEP PP1	CAATTGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGGTTCAAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	782
H.v. PP2	CAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAAATAGTTCCAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	797
H.m. PP2	CAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAAATAGTTCCAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	797
H.m. PP2like	CAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAAATAGTTCCAAAATAAGAAAGCTTTGCTTTCAAATCACACGCCAATGGAAAATT	779
H.v. PP1	AGTGACTGCTGAAAAACGCAGGTCATAGTAACCTAATTGCCAACCGCGATAATCCTGATATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	862
H.o. PP1	AGTGACTGCTGAAAAACGCAGGTCATAGTAACCTAATTGCCAACCGCGATAATCCTGATATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	862
H.m. PP1	AGTGACTGCTGAAAAACGCAGGTCATAGTAACCTAATTGCCAACCGCGATAATCCTGATATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	862
AEP PP1	AGTGACTGCTGAAAAACGCAGGTCATAGTAACCTAATTGCCAACCGCGATAATCCTGATATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	862
H.v. PP2	TGTGACAGCAGAAAAACGCAGGAAAAGTTACTTAATTGCCAACCGCGATAATGCGCACATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	877
H.m. PP2	TGTGACAGCAGAAAAACGCAGGAAAAGTTACTTAATTGCCAACCGCGATAATGCGCACATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	877
H.m. PP2like	TGTGACAGCAGAAAAACGCAGGAAAAGTTACTTAATTGCCAACCGCGATAATGCGCACATTGGGAAAAGATTGCTTTTA	859
H.v. PP1	TTTACTTGTGA	872
H.o. PP1	TTTACTTGTAA	872
H.m. PP1	TCTACTTGTGA	872
AEP PP1	TTTACTTGTAA	872
H.v. PP2	TCTACTTGTGA	887
H.m. PP2	TCTACTTGTGA	887
H.m. PP2like	TTTACTTGTGA	869

Stopcodon

Abb. 8.1: Vergleich von Hydra-PPOD-cDNA-Sequenzen. Einbezogen sind die offenen Leserahmen ohne untranslatierte Regionen. Start- und Stopcodons, die Exon- Intro-Grenze und die alternative PPOD2-Splice-Stelle sind eingezeichnet. H.v., *H. vulgaris* (Basel); H.m., *H. magnipapillata*; AEP, *H. vulgaris* (AEP); H.o., *H. oligactis*; PP, PPOD.

H. magnipapillata PPOD2

```

AAGCAGATTGTGAGTGACTGTTAAAGGTTGAATACATGAAATTTAAAGCTAAAATGAAACTATGCATATTGTTTCATGATGGTTACCAG
CTTGTTTGC AAAAGAAAACGAGCTACATTAGAATGGAAAAAGTTTACACAGTTGCTATAAAAATCGCTTATCAACGGAAAATTGTGTA
TGTGCTGAAAAAACGGAAGTCAACCATTTGATTGCCAACAAAGACTCTTTTGGCTTATGGGAAACTTTTGAAATTTGTTTTATCGACA
CACAAGCAATTGCATTAATAATCTTATGAAACGGAAAGTTTCGCTACTGCAGTTAATACTGACACTAACCTGCTCATTGCCAACAAAAGA
CCAGGCTACAGTATGGGAGACTTTCACCTTAGTTCCAAGTTTCGGAACCTTTGGATTTAAGTCACATGGCAATTCAAAATTAGTCACC
GCTGAAGAAGCGGGAAAACAAACCACTTACAGCTAACCGGATGTTCTTGACAGCTGAAAACGCAGGAAAAGTTACTTAATTGGCAATCGCGA
TAAATGCCGACATTTGGGAAAGATTTGTTATCATCTACTTGTGAATATCAAAATTATCTAAGTAAAGCTTATTATAATTATTGAAACA
TTTTCCAATTGGACTTATTATAAAGTCGTTTAAAGTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT
AGTATAAAAAATAGTGAATAAATTTTGTGTTGCTTAAAAAATAAAAAATCAACAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
AAATTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
AGCTTTTTTTTTATGGGGCCCCCTAAAATTCAAATCCCGGGGCCGGGGTTTTAACACGGTCGGAAATGGGAAAAACCTGGGGGTTCC
CCACATTAATATCCCTTGGCGACA

```

	Startcodon	
H. v. PP2+UTRGGCAGCAGTTAAAGGTTAAATACATGAAATTTAAAGCTAAAATGAACTATGCATATTGT	61
H. m. PPOD2+UTRAAGCAGATTGTGAGTGAGTGTAAAGGTTGAATACATGAAATTTAAAGCTAAAATGAACTATGCATATTGT	72
H. v. PP2sh+UTRAATACATGAAATTTAAAGCTAAAATGAACTATGCATATTGT	42
H. m. PP2sh+UTR	CATTATCCAAAGCAGATTGTGAGTGAGTGTAAAGGTTGAATACATGAAATTTAAAGCTAAAATGAACTATGCATATTGT	80
	Exon/ Intron-Grenze	
H. v. PP2+UTR	TCATGATGGTTACCAGCTTGTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGCTACATTAGAATGGAAAAAGTTTATACAGTTGCTATAAAA	141
H. m. PPOD2+UTR	TCATGATGGTTACCAGCTTGTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGCTACATTAGAATGGAAAAAGTTTATACAGTTGCTATAAAA	152
H. v. PP2sh+UTR	TCATGATGGTTACCAGCTTGTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGCTACATT.....	88
H. m. PP2sh+UTR	TCATGATGGTTACCAGCTTGTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGCTACATT.....	126
H. v. PP2+UTR	TCGCTTATCAACGGAAAAATTTGTATGTGCTGAAAAAAACGGAAAGTCAACCATTGATTGCCAACAAAGACTCTTTTGGCTT	221
H. m. PPOD2+UTR	TCGCTTATCAACGGAAAAATTTGTATGTGCTGAAAAAAACGGAAAGTCAACCATTGATTGCCAACAAAGACTCTTTTGGCTT	232
H. v. PP2sh+UTR	88
H. m. PP2sh+UTR	126
H. v. PP2+UTR	ATGGGAAACTTTTGAATTTGTTTATCGACACACAAGCAATTGCATTTAAAATCTTATGGAAAACGAAAAGTTCGTCACCTG	301
H. m. PPOD2+UTR	ATGGGAAACTTTTGAATTTGTTTATCGACACACAAGCAATTGCATTTAAAATCTTATGGAAAACGAAAAGTTCGTCACCTG	312
H. v. PP2sh+UTR	88
H. m. PP2sh+UTR	126
H. v. PP2+UTR	CAGTTAATACTGACACTAACCTGCTCTTCCCAACAAAGACCAGGCTACAGTATGGGAGACTTTCACCTTAGTTCCAAAT	381
H. m. PPOD2+UTR	CAGTTAATACTGACACTAACCTGCTCTTCCCAACAAAGACCAGGCTACAGTATGGGAGACTTTCACCTTAGTTCCAAAT	392
H. v. PP2sh+UTR	88
H. m. PP2sh+UTR	126
H. v. PP2+UTR	TTCCGAAACCTTTGGATTAAAGTCACATGGCAATTCAAAATTTAGTACCAGCTGAAGAAGCGGAAAAACAAACCACTTACAGC	461
H. m. PPOD2+UTR	TTCCGAAACCTTTGGATTAAAGTCACATGGCAATTCAAAATTTAGTACCAGCTGAAGAAGCGGAAAAACAAACCACTTACAGC	472
H. v. PP2sh+UTR	88
H. m. PP2sh+UTR	126
	Alternative Splice-Stelle	
H. v. PP2+UTR	TAACCCGCGATGTTCTTGACGCTGGGAAATGTTTACGCTTGGTCTACGTGTGGCCATCAGTGCATAAAGTGGCAATAAAAAG	541
H. m. PPOD2+UTR	TAACCCGCGATGTTCTTGACGCTGGGAAATGTTTACGCTTGGTCTACGTGTGGCCATCAGTGCATAAAGTGGCAATAAAAAG	552
H. v. PP2sh+UTRAGTGCATAAAGTGGCAATAAAAAG	111
H. m. PP2sh+UTRAGTGCATAAAGTGGCAATAAAAAG	149
H. v. PP2+UTR	CTTTGGTTAAATGGTTTATTGTATGTGCTGAAAAGGCCGGAAAAACAATCATTACGTGCTAACCGAGCTCAAATAGGCCCT	621
H. m. PPOD2+UTR	CTTTGGTTAAATGGTTTATTGTATGTGCTGAAAAGGCCGGAAAAACAATCATTACGTGCTAACCGAGCTCAAATAGGCCCT	632
H. v. PP2sh+UTR	CTTTGGTTAAATGGTTTATTGTATGTGCTGAAAAGGCCGGAAAAACAATCATTACGTGCTAACCGAGCTCAAATAGGCCCT	191
H. m. PP2sh+UTR	CTTTGGTTAAATGGTTTATTGTATGTGCTGAAAAGGCCGGAAAAACAATCATTACGTGCTAACCGAGCTCAAATAGGCCCT	229
H. v. PP2+UTR	TGGGAAACATTTGAAATTAGCTTTAGTGATTCCAAACATTGACTCTCAAATTTTTGCAAACGGCAAAATTTGTTTGGCG	701
H. m. PPOD2+UTR	TGGGAAACATTTGAAATTAGCTTTAGTGATTCCAAACATTGACTCTCAAATTTTTGCAAACGGCAAAATTTGTTTGGCG	712
H. v. PP2sh+UTR	TGGGAAACATTTGAAATTAGCTTTAGTGATTCCAAACATTGACTCTCAAATTTTTGCAAACGGCAAAATTTGTTTGGCG	271
H. m. PP2sh+UTR	TGGGAAACATTTGAAATTAGCTTTAGTGATTCCAAACATTGACTCTCAAATTTTTGCAAACGGCAAAATTTGTTTGGCG	309
H. v. PP2+UTR	AGAAAAGAAATGGACAATTCCTCTTATGTCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAATAGTTCCAAATA	781
H. m. PPOD2+UTR	AGAAAAGAAATGGACAATTCCTCTTATGTCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAATAGTTCCAAATA	792
H. v. PP2sh+UTR	AGAAAAGAAATGGACAATTCCTCTTATGTCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAATAGTTCCAAATA	351
H. m. PP2sh+UTR	AGAAAAGAAATGGACAATTCCTCTTATGTCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAATAGTTCCAAATA	389
H. v. PP2+UTR	AGGAAGGTGTTGCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAGTTTGTGACAGCGAAAAACGGCAAAAAAGTTACTTAAATTGCC	861
H. m. PPOD2+UTR	AGGAAGGTGTTGCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAGTTTGTGACAGCGAAAAACGGCAAAAAAGTTACTTAAATTGCC	872
H. v. PP2sh+UTR	AGGAAGGTGTTGCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAGTTTGTGACAGCGAAAAACGGCAAAAAAGTTACTTAAATTGCC	431
H. m. PP2sh+UTR	AGGAAGGTGTTGCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAGTTTGTGACAGCGAAAAACGGCAAAAAAGTTACTTAAATTGCC	469
	Stopcodon	
H. v. PP2+UTR	AAATCGCGATAATGCCGACATTTGGGAAAGATTTGTTATCATCTACTTTGATATCAAATTTATTAAGTAAAGCTTATT	941
H. m. PPOD2+UTR	AAATCGCGATAATGCCGACATTTGGGAAAGATTTGTTATCATCTACTTTGATATCAAATTTATTAAGTAAAGCTTATT	952
H. v. PP2sh+UTR	AAATCGCGATAATGCCGACATTTGGGAAAGATTTGTTATCATCTACTTTGATATCAAATTTATTAAGTAAAGCTTATT	511
H. m. PP2sh+UTR	AAATCGCGATAATGCCGACATTTGGGAAAGATTTGTTATCATCTACTTTGATATCAAATTTATTAAGTAAAGCTTATT	549
H. v. PP2+UTR	ATAATTATTTGAAACATTTTCCAAATGTGACTTATATAAAGTCGTTTTAAGTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	1020
H. m. PPOD2+UTR	ATAATTATTTGAAACATTTTCCAAATGTGACTTATATAAAGTCGTTTTAAGTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	1031
H. v. PP2sh+UTR	ATAATTATTTGAAACATTTTCCAAATGTGACTTATATAAAGTCGTTTTAAGTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	590
H. m. PP2sh+UTR	ATAATTATTTGAAACATTTTCCAAATGTGACTTATATAAAGTCGTTTTAAGTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	629
H. v. PP2+UTR	GTATTTTATTTATTTAAAAAAACATCAGTATAAAAAATAGTGAATAAAATTTGATGTTGCTT.....	1081
H. m. PPOD2+UTR	GTATTTTATTTATTTAAAAAAACATCAGTATAAAAAATAGTGAATAAAATTTGATGTTGCTTAAAAAAAATCAACAA	1111
H. v. PP2sh+UTR	GTATTTTATTTATTTAAAAAAACATCAGTATAAAAAATAGTGAATAAAATTTGATGTTGCAATC.....	653
H. m. PP2sh+UTR	GTATTTTATTTATTT.....	642

Abb. 8.2: Sequenzvergleich von PPOD2-cDNA-Sequenzen einschließlich untranslatierter Regionen. Die hohe Übereinstimmung von langen und kurzen Transkripten auch in untranslatierten Bereichen zeigt, dass es sich um Splicing-Varianten desselben Gens, PPOD2, handelt. H.v., *H. vulgaris* (Basel); H.m., *H. magnipapillata*; sh, „short“, kürzere Splicing-Variante; UTR, untranslatierter Region.

H. magnipapillata PPOD2-short (kürzere Splice-Variante)

CTTATTCCAAGCAGATGTGTGAGTGAGTGATAAAGGTTGAATACATGAAATTTAAAGCTAAAATGAAACTATGCATATTGTTTCATGATG
GTTACCAGCTTTGTTTGCAAAAGAAAAACGAGCTACATAGTGCATAAAGTGGCAATAAAAAGCTTTGGTTAATGGTTTATTTGTATGTG
CTGAAAAGGCCGGAAAAACAATCATTACGTGCTAACCGAGCTCAAATAGGCCCTTGGGAAACATTTGAAATTAGCTTTAGTGATTGCGCA
AACATTGACTCTCAAATCTTTTGCAAAACGGCAAATTTGTTTGGCGAGAAAAGAATGGACAATTCCTCTTATTGCTAATAGAGATCAA
GCTGGACCATGGGAGACATTCACAATAGTTCCAATAAGGAAGGTGTTGCTCTAAAATCACACGCTAATGGAAAAGTTGTTGACAGCTG
AAAACGCAGGAAAAAGTTACTTAATTGCCAATCGCGATAATGCCGACATTTGGGAAAAGATTTGTATCATCTACTTGTGAATATCAAAA
ATTATCTAAGTAAAGCTTATTATAATTATTTGAAACATTTCCAAAAATGTGACTTATTATAAAGTCGTTTTAAGTTTATTTTATTTTA
TTATATTTTTTTTGTATTTTATTATT

8.1.3 PPOD2-like-cDNA-Sequenz

H. magnipapillata PPOD2-like

AATCCAAGCATATTGTGTGCGTGTAAAGTACATTAAGTTTTAGCTAAAATGAAACTATGCATAATGTTTCATGATGGTTATCTGCAT
GTTTGCAAAAGAAAAACGAGCTACATTAGAATGGAAAAAGTTTATACAGTCGCTATCAAATCGTTTACCAACGGGAAATTTGTATGT
GCTGAAAATAACGGAAATGAACCATTGATTGCCAACAGGGACTCTATTGGTTTATGGGAAACTTTTGAAATTCGTTTCACTGACGCAC
AAACATTTGTATTAATAATCCCATGCAAAACGAAAAATTTGTCACGGAAGTTAATAGCGAAAATAACTTGCTCATTGCCAATAAAGACCA
GGCTACAGTATTGAGACTTTACCTTAGTTCCAAGATTCGGAACCTTTGGTTTAAATCAAATGATAATAAAAAATTAGTGACAGCT
GAAGAAGCAGGAAAAAAACCCTTGCAGCTAACCGCAAAGTTCTTGACGCTCTGGGAAATGTTTAAATTTGGTCTACGTGTGGCCTTCAG
TACATAAAGTGGCGATAAAAGCATTAGTCAATGGTTTGTGTTATGCGCTGAAAATGCCGGAAAAACAATCCTTAATTGCTAATAGAGG
CCAAATAGGCCCTTGGGAAACATTTGTAATTAGCTTTACTGACCTCCAAACATTTACTCTTAAATCTTTGCTAATGGCAAATTTGGTT
TGCGCAGAAAATAGTGGACAATTTCCCTTATTGCAAAACAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACATTCACAAATAGTTCCAAATAAGG
AAGGTGTTGCGCTAAAATCACACGCTAATGGAAAATTTGTGACCGCTGAAAATGCAGGAAATGGTAACCTAATTGCTAATCGCGATAA
GGCCGATATTGGGAAACGATTGTTTATAGTTTACTTATGATTGACTTGAATATTTATGTTGAGCAAATTTGTAATTTTAAAGAAATAAAA
CATTGCTTTATTCGTGGTTTACTAAAAATGTTTTTTAAATTTAGTTTTTCAGTATAGTAAATGTTAAGCAACAGATAAATAGAAAAT
GTTATTTTTATCTTAAATATTGTTATTATTGAGACTAATTTAGTTTTTGGTACAAAATATTTCTATAAATGGAAAGTT

8.2 PPOD-Protein-Sequenzen

Die dargestellten Aminosäuresequenzen wurden durch Übersetzung der offenen Leserahmen (beginnend mit dem ersten Methionin-Codon) der klonierten cDNA-Sequenzen erhalten und für die Erstellung der in Abb. 8.3 dargestellten Sequenzvergleiche sowie des Phylogentischen Sequenz-Stammbaums in Abb. 2.5 A benutzt.

8.2.1 PPOD1-Protein-Sequenzen

H. vulgaris PPOD1

MKLYITVLMILTCVFAKEKRGIPGWNKAYTVAIKSFTNGKFVCAENIGNQPLIANRDAIGLWETF EIRFTNAQTFALKSHADGK FVSA
GNGGNLLIANKDHAAVWETF TLVPKNGAFGFKSNGNAKLVTAEEAGNKPLAANRIVLDVWEMFSLVYVWPSVHKVAIKALVNGLFVC
AENAGKQSLIANRGQIGPWETF EIRFTNLQFTLKLSLANGKLVCAENNGKSPLIANREHIGPWETF TLVQNKEGFVFKSHANGKLVTA
ENAGHSNLIANRDNPD IWERFVFIYL

H. magnipapillata PPOD1

MKLCITVFMVVICVIAKEKRDTPAWTKAYTVALKSFTNGKFVCAENVGSQPLIANRDAIGLWETF EIRFTNAQTFALKSHANGK FVSA
SNGGNLLIANKDQAAVWETF TLVPNYGTGFKSNGNAKFVAEEAGSKSLAANRNALDVWEMFSLVYVWPSVHKVAIKALVNGLYVC
AENAGKQSLIANRGQIGPWETF EIRFTDHQFTLKLSLANGKLVCAENNGQSPLIANRDQIGPWETF TLVQNKEGVAFKSHANGKLVTA
ENAGHDNLIANRDNPD IWERFVFIYL

H. vulgaris (AEP) PPOD1

MKLCITVFMIVTCVIAKEKRDTPVWTKAYTVAIKSFTNGKFVCAENVGSQPLIANRDAIGLWETFEIRFTNAKTFALKSYANGKFVSA
 GNGGNLLIANKDQATVWETFTLVPNYATFGFKSNGNAKFVTAEEAGSKSLAANRNVLDVWEMFSLVIVWPSVHKVAIKALVNGLYVC
 AENAGKQSLIANRGKIGPWETFEIRFTDPQFTLKSIVANGKLVCAENNGRSPLIANRDQIGPWETFTLVQNKQGVAFKSHANGKLVTA
 ENAGRDNLIANRDNPDIERFAFIYL

H. oligactis PPOD1

MKLCITVFMIFTCVFAEEKRGIPGWNKAYTVAIKSHINGKFVCAENSGNQPLIANRGAIGLWETFEIRFTNAKTFLLKSHANGKFVSA
 GNGGNMLIANRDHAAVWETFTLVPRHEAVGFKSNGNAKLVTAEEAGNKPLAANRVVLDVWEMFSLVYVWPSVHKVAIKALVNGLFVC
 AENAGQSLIANRGQIGPWETFEIRFTDPQFTLKSIVANGKLVCTENNGQSPLIANRNQIGPWETFTLVQNKQGVAFKSHANGKLVTA
 ENAGHSNLIANRDIPDIWERFVFIYL

8.2.2 PPOD2-Protein-Sequenzen***H. vulgaris (Basel) PPOD2***

MKFKAKMKLCILFMMVTSLFAKEKRATLEWKKVYTVAIKSLINGKFVCAEKNSEPLIANKDSFGLWETFEICFIDTQAIALKSYGNG
 KFVTAVENTDTNLLLANKDQATVWETFTLVPSFGTFGFKSHGNSKLVTAEEAGNKPLTANRDVLDVWEMFSLVYVWPSVHKVAIKALVN
 GLFVCAEKAGKQSLRANRAQIGPWETFEISFSDSQTLTLKSFANGKFVCAEKNQFPLIANRDQAGPWETFTIVPNKEGVALKSHANG
 KFVTAENAGKSYLIANRDNADIWERFVFIYL

H. vulgaris (Basel) PPOD2-short (kürzere Splice-Variante)

MKFKAKMKLCILFMMVTSLFAKEKRATLVHKVAIKALVNGLFVCAEKAGKQSLRANRAQIGPWETFEISFSDSQTLTLKSFANGKFVC
 AEKNQFPLIANRDQAGPWETFTIVPNKEGVALKSHANGKFVTAENAGKSYLIANRDNADIWERFVFIYL

H. magnipapillata PPOD2

MKFKAKMKLCILFMMVTSLFAKEKRATLEWKKVYTVAIKSLINGKFVCAEKNQSPLIANKDSFGLWETFEICFIDTQAIALKSYGNG
 KFVTAVENTDTNLLIANKDQATVWETFTLVPSFGTFGFKSHGNSKLVTAEEAGNKPLTANRDVLDVWEMFSLVYVWPSVHKVAIKALVN
 GLFVCAEKAGKQSLRANRAQIGPWETFEISFSDSQTLTLKSFANGKFVCAEKNQFPLIANRDQAGPWETFTIVPNKEGVALKSHANG
 KFVTAENAGKSYLIANRDNADIWERFVFIYL

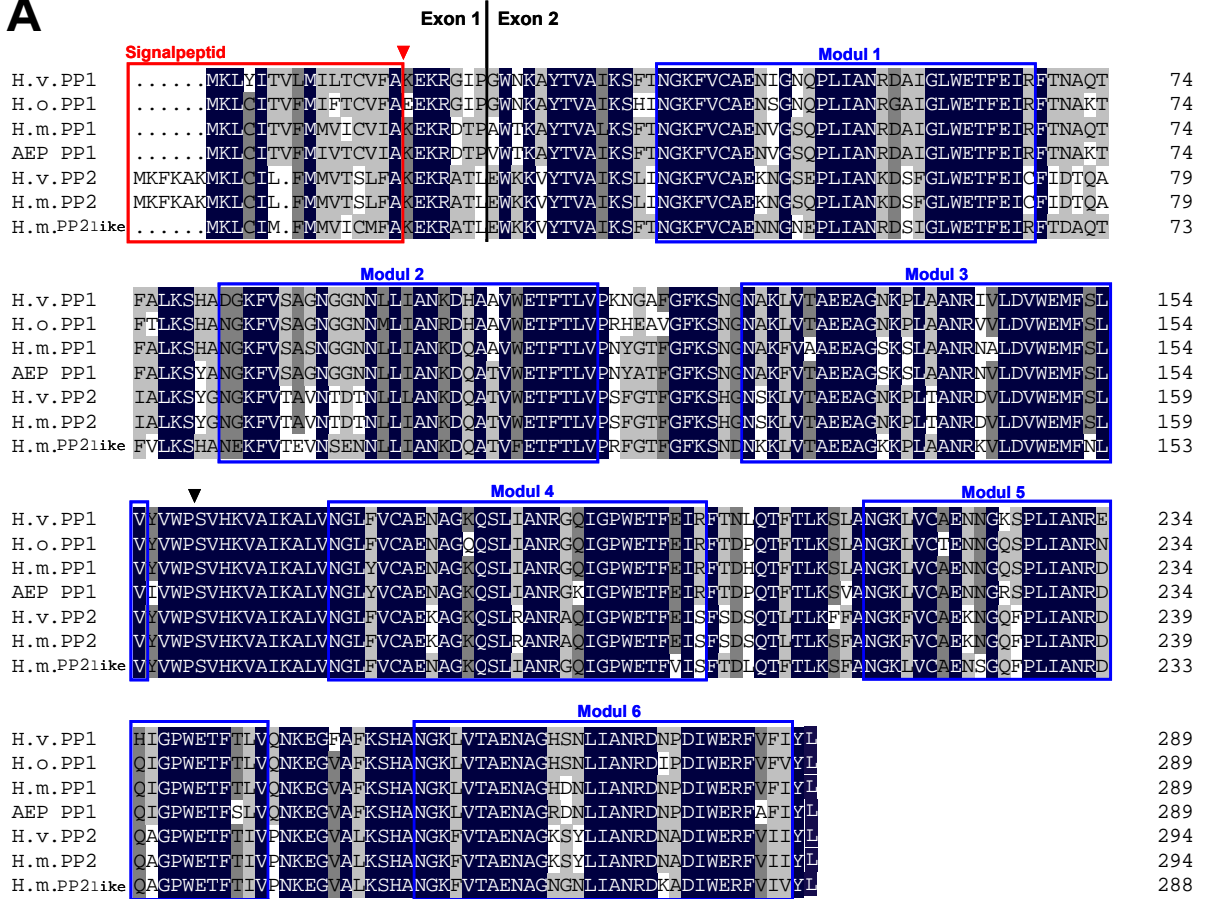
H. magnipapillata PPOD2-short (kürzere Splice-Variante)

MKFKAKMKLCILFMMVTSLFAKEKRATLVHKVAIKALVNGLFVCAEKAGKQSLRANRAQIGPWETFEISFSDSQTLTLKSFANGKFVC
 AEKNQFPLIANRDQAGPWETFTIVPNKEGVALKSHANGKFVTAENAGKSYLIANRDNADIWERFVFIYL

8.2.3 PPOD2-like-Protein-Sequenz***H. magnipapillata PPOD2-like***

MKLCIMFMMVICMFAKEKRATLEWKKVYTVAIKSFTNGKFVCAENNGNEPLIANRDSIGLWETFEIRFTDAQTFVLKSHANEKVFTEV
 NSENNLLIANKDQATVFETFTLVPRFGTFGFKSNDNKKLVTAEEAGKKPLAANRNVLDVWEMFNLVYVWPSVHKVAIKALVNGLFVCA
 ENAGKQSLIANRGQIGPWETFVISFTDLQFTLKSIVANGKLVCAENSGQFPLIANRDQAGPWETFTIVPNKEGVALKSHANGKFVTA
 NAGNGLIANRDKADIWERFVFIYL

A



B

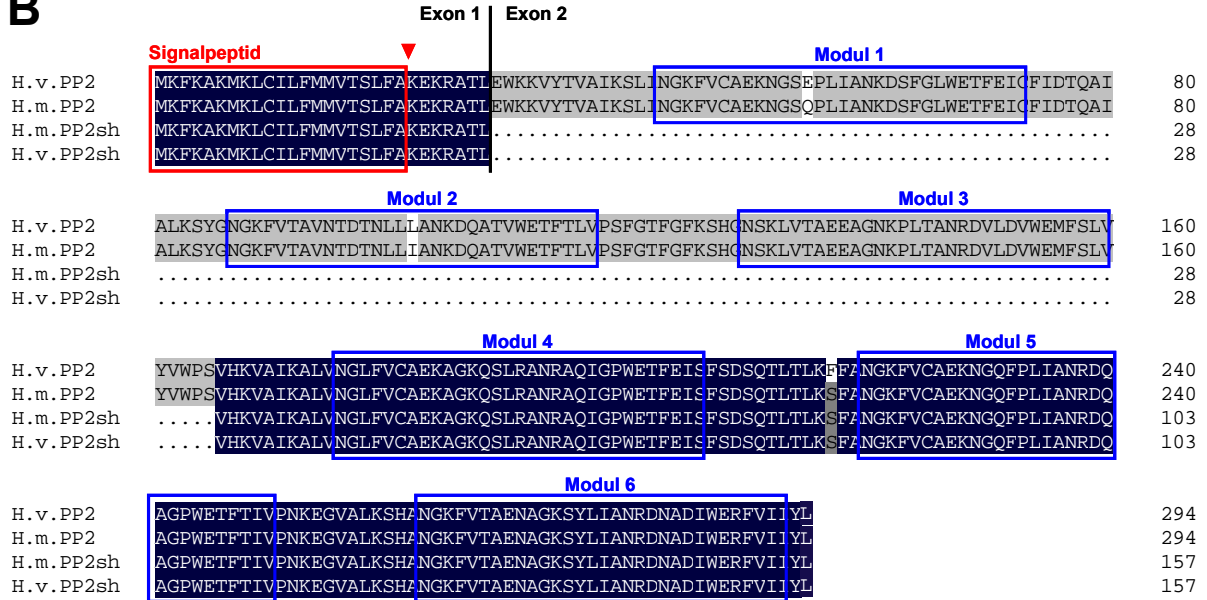


Abb. 8.3: Vergleich von Hydra-PPOD-Proteinsequenzen, gemeinsame Strukturmerkmale. (A) Für alle isolierten PPOD-Gene wird ein Signalpeptid inkl. einer Schnittstelle vorhergesagt (roter Kasten, rote Pfeilspitze). Die für *H.vulgaris* (Basel) *PPOD1+2* beschriebene modulare Struktur (Module 1-6) findet sich auch in PPOD-Genen anderer Spezies. **(B)** *PPOD2*-Splice-Varianten. Die für *H.vulgaris* (Basel) und *H.magnipapillata* nachgewiesenen kürzeren Transkripte umfassen neben dem allen PPOD-Genen gemeinsamen Exon 1 nur die Module 4-6 des zweiten Exons. H.v., *H.vulgaris* (Basel); H.m., *H.magnipapillata*; AEP, *H.vulgaris* (AEP); H.o., *H.oligactis*; PP, PPOD; sh, „short“, kürzere Splice-Variante.

8.3 Genomische PPOD-Sequenzen

Die dargestellten genomischen Sequenzen aus verschiedenen *Hydra*-Spezies sind das Ergebnis von PCR-Experimenten mit adapterligierter, verdauter genomischer DNA. Kombiniert wurden sequenz- und adapterspezifische Primer. 5'-flankierende Sequenzabschnitte gleicher Länge wurden zur Erstellung der Konservierungsprofile in Abb. 2.5 D, E bzw. zur Suche nach „phylogenetic footprints“ (s. Abb. 2.19) herangezogen. Aus den 5'-Bereichen der *H. vulgaris*-Sequenzen (*PPOD1-3*) wurden aus Bereichen ohne Sequenzähnlichkeit genspezifische Proben generiert (Abb. 2.7). Grüne Sequenzbereiche kennzeichnen kodierende Bereiche; Exon-Intron-Grenzen und 5'-untranslatierte Regionen, so bekannt, sind durch Boxen gekennzeichnet. Punkte deuten inkomplett sequenzierte Introns an. Als genspezifische Proben verwendete 5'-flankierende Sequenzen sind durch Unterstrich markiert.

H. vulgaris (Basel) – *PPOD1*

```

AAAGACAAGGTCAATGGTTAACTATTGAATAATTTAGGCTAGCTTGAGCTGTTGATCCTAAAATCTTTTAGATTTCGTAACCTCTATTT
ATTTTTGATAATGTTTGAAGTTATATTTTATATTTTTTGTCTTTTATTAACCTTTTCGTTTCTTAACCTCTTACTAATTTTCTTTCT
GTATATATTTTTTCATGCTACGGATTTGTAAAAATCCACTTTCTGAGTTATATTAATAATTAGATTACAAAATACTGGTGTCTATTTTA
TTGCTAAAAGTCATTTATTTTTCTTTCTATATGCATATTCAGAGGTGATTTCTACAAAATAAAATGAGGGTAGGGTAGGGGTTGGGGTGAAT
CCTTTAAAAGTAAACGATTTGGTTCTTTAAAAAAAATAGTTTTTATAACTAAAACCTGCCCTGCATTGTGTCAAATACTCAACTAACG
GATTAATTTAAAAAAAACCGCTTTTACTTTGACACACACACACACAAAACACACACACACAAAACACACAAAACATACACACACAAT
CACACACGCACAAAACACACACACACACACACACACACACATAACACACACACACCTCAAATTCCTCGGTGTATATTATATAAATTC
TAAATAGCAAATGAGATAAAATAACTAAATAAATGTTTAAACAGTAATCAATGTAAAAAGATTGACTACGTAATTTTTTTTAAAG
AATATGTCCAAAGCAATATATCCATGTATTGCGTGAGCAATATATTATGTCATTCGTGATAAAAACAATATCATTAAATGACTGT
ATTTTTTTTTTCTATAAATAGCAACAAAATTACAGTCTCATTGTGTTGAGAATACCTAAAACATATAAATTCCTCATTGTTTATTA
TAATTTATTTTTTAATCAGACTGACTGCAAGCAGGTTATGATTTTTAAAAGTCAGAAAATATTTTCAGCTAAAATGAAACTATACATTACA
GTCCTTAATGATCTTAACCTGCGGTGTTTGCAAAAGAAAACGAGGTATACCTGGTAAAGCAACTACTTTAGAGTTTAAAAGTTTATAT
GCATTTAATTTTTTTTTTAAAGCTTTTAAACAATGGTAAATATAATTTTTATAAAATATTTGTTTGGTGGAGCGTTATATGACA
GAACGCTTTAAATAAAAGTTAGATATGTAACAATAAACAATGCTCCATTAAGAGATACAGAACTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAA
GGCCATCCAGTCTCGAAAAGGAAACAAAGAGACCAAAAAATAAGATTTATATTTTTTCTATTCTTTAATATTTTTTAATCAAAA
ATTTAAATAAAATTTTTAAAGGTAAAAAAAATTAACATAACAAAATTTGTTTGTATTAGATAGCCAAATCGAATATTACAAG
TTAACATCATATTTCTAAGCAATTGATAAAAATTAACATTAATTTAAATCATATTAATGTTAATTTTAAACATATTAAGCTGACAT
TCATAAATATCTCATTTTATGAATGTGAGCTTTAATTTTTAAAGTAAAGCTAGTATGACGCCTACTTTCAAATCTCAATTCGATCAA
GAACCTATTCAAAGACGGACGTTAATTCATTGTTTAAAGCAAAAATTCCTGCG.....
.....
.....
CTAGATGTAGCTCTTGACGAAAATATAACACGGAAAGATCATATAAAATATATCGAAGGTAAAGTATCAAGGAGCATGGGTCTTCTTA
ATAGGACAAAACCTGATTTTTAAATTTAAGTTATTTAAACTTATATATTTCTCTTTTATTTTATTTCTTGTAAATCTGGCATTGCATG
GTATAGTACCAATAAAAATAAATTAAAAAACAAAAAGGAGGGGAGTAAGGACGGACTGCTATTCCAACAACACTTCCCCTCCTG
CGCCTCGTAAGTCAGTCAACCTGAAATATAAGTTTGCCTCTTCTAAAATATAAGTTTCTCATTACGGAGTTCTGCAATTAATAGAATG
TAAATAAAAATAGTAAACAACAACCATTTTACATACATCTTTTATAAACTTGCTCGTATTTAATGCAGAAAAGTAAATGAGGT
TTATCTTTTTCCGGCTAATTTGCCATACAGAGACCCACATACAAAGTTCCGTGAAGAAGAGTTCAGCTCACTAAAGAGCATATAAACC
CTTTGCAGACCAAGAGTAAGTAAAATTAAGAAGAACGAAGGATAATAGAGTCAAAGTCAGAAAAGTTGAGATAGAAGATAGCATAG
AGAAAGCGGACAGATATTAACCTGATGTAAGAATGTGGAACTAATTAATATCTTATATTTATAAGATATTAATTTTTTTCGAAGCCTT
TGTAATTAATGGCAGAAAAGTAAAGAGAGGTGTTTGTATAAAGAAAAGATTTTTTATAACTAATTTAAGTAAATAGAGTAAATTTAA
TGCTTTTTTGTGTTTAAATTTTTTATGGGCGAAAACCTCGTATGGCAACCCCTCTGCTCGGCAATCCCGTGAATCTACTTGTCTTT
ATATGCTAAACTTTTTTTCGATGAAAACCTGTTATGGCAACCCCTCCCATAGCATTTCCCTAAAATCTACTTGCAACGGCCCCA
TTCAAAGATATGATCCACCAATATTTCCAGCAATGACGAGTAAATTTTAAATGAAAGGTGGACATCCACGCTTAATAAAAAATAGA
TAAAGTTGTTTCTTCTGACTTGTCTTTACTCTACAAAATACTTGACACCTCTTTTACATCTGCTTTCAATGATAGAAGTTTTCAG
TAGACTAAAGATTACAAATTTACCTGTATTTAGCAATGACAAAACAAATTTCTTTTGGATTAATATTAATTTTTTATTTGAATGCAAGCTT
GCTGAGGGCATTAACCTTGCATATGAATATATGTTTTGCTTCAACGCAGTGAACACAGACATCCGTAAGACATCTGTATAAAGCTT
TCAAGTCAATATGGTGTCTTAAAACATCTAAAGAACGTTCTGTACCCGCTGGAATGAAATCTCGCAGAAAATTTATTTATAAATTA
GCAAGAGAGTAAATATCTTTCTTAATGACTTGCCTCCAGTAATAAGTATTTTTTAAATATACTTTCAAATGAACTGACCATGCAATCG
TAATAATTTTACGTTTTTAACTGTAACGATAACTGTTAAACCAAGAAAACCTTAGCAAACTCAAATTTAGATGCTTTAGTGTCTTCAAGCGT
ACTTAATAGTTATGCGAAAGGCACATAAAAACATTGATAAAAATATTTTATCACAAGTGCAATTTCTGAAAAAAAATATTTCAACAAA
TAATATGCCACCCGCAACCTTGTGCGACCCGACTCATTCTATGCTTACAAAAAAAATTAACCTCATGATTTTTTAAATAAATAAAA
ATTTATTTATTTCCATGTTACATTACATGAATACATCAAGTTAATATCGCTTTTGTAAATTTTTTAAATAATAGATGTTTATTTGTTAAT
ATATCAATTTTACGTTTTTATTTTATATAAATTAACCTGAAATGGTTATTTTTAAATTAACCTTATATTTACGCAATTTCTCAAGGAG
CTTGGCGATAAGACATATTAATCTTTTCTTGCCCTGCTACCTGTATGCTTGTGACGGTTAGTTACAGGGTTAGTACAGGGTTAGT

```

TATTAGTAACATACGGATTATATACTTACATGGCAAAAATAAAAAAATTTAAAAAATGGCCATATTCTAACTAAATATAAATTTCTT
 ATTTTTATTFTAACATATTGTTTTATTTCCTFAAATAAAAAATATATCTAAGTAACGTAACGCAATTTACAAATTATCTCAATATTA
 AAAAAAATTAACCAATTTTAGGTGGAAACAAAGCTTACACAGTAGCTATCAAAATCGTTTACCAATGGAAAATTCGTATGTGCTGAAA
 ATATCGGAATTCACACATCAATTCGTAATAGAGATGCTATTGGTTTATGGGAAACTTTTGAAAATTCGTTTACTFAACGCACAAACATT
 TGCATTGAAAATCACATCGACACGGTAAAGTTTGTCACTGCAAGTAATGGTGGAAAATAACTTGCCTATTGCAAAATAAAGACCACCGTGCA
 GTATGGGAGACTTTCACCTTAGTTCCAAAAATGGAGCCTTTGGATTTAAATCAAATGGTAATGCAAAAGTTAGTGCATGCTGGAAGAAG
 CAGGAACAACACCACTTGCAGCTAATCGCAATGTCTTGCAGCTGGGAAAATGTTCAGCTTAGTCTACGCTTGCCCATCAGTACACAA
 AGTGGCAATAAAAAGCATTGGTTAATGGTTTATTTGTATGTGCTGAAAATGCCGAAAGCAATCATTAAATGCCTAACAGAGGCCAATA
 GGGCCTTGGGAAACATTTGAAAATTCGTTTACTTAACCTCCAAACATTTACTCTCAAATCTCTTGCAAAACGGCAAAATGGTTTGGCGAG
 AAAATAATGGAAAATCTCCTCTTATTTGCTAATAGAGAATATTTGGACCATGGGAGACCTTTACGCTGGTTCAAATAAAGAGGCTT
 TGCTTTCAAATCACACGCAAAATGGAAAATTAAGTACTGCTGAAAACCGCAGGTATAGTAACCTAATTGCCAACCGCGATAATCTCGAT
 ATTTGGGAAAGATTCTGTTTTATTTACTTTGGATAAATCTTAAATATTTATGTGATTGTAACCTAAATCGAAAATAAGTTTTTATAAA
 CTAGATTCAAATTTACTTTCTTTTGTAAAGTTGGATAGTTTCAAT

H. vulgaris (Basel) – PPOD2

ACAGTGATTTGTTTTTATTAATTTTCATTACACAAACAGTTGGTTGTGCGTTTTCTTATTATTAAATTAAAAAAAAAAATGTTCTT
 CAACTCTTACCAGACAGCTTGTTCGCAAAAATGAAAGGGCAAAAAAATACATGGGCAAAAAAATAGCAAAAAGAAATGAAAGGGCAA
 AAAAAATACATGGGCAAAAAAATAGGAAAATTAATAATTAATTTAAAAGTAGGAAGAATTAAGCAGCATAATTCATGCTCAT
 ATATAATATATATATTTTAATATAAAAAAGTGTATATTTTATTATTATTATTCAAATATTATTAATGCAAAATGTTTCAAA
 CTCGCTTTAATGGCAATGGTTTGGAAACATTTTTTTTACTGTTTTCAATCAAAGATATATACAACTACATAAACTAATTTATTC
 ATTAATAAGTTTTTAAAAATGTAGTTGTATGTAATAAAATTAAGATAAAAAGACATTTTCAACCGAAATCTGCATTTATAAGCATT
 ATAAGTTTCAGAAAAATAATAAAAAGAGTTGCTTAACTCGTTAAAAAACGTTGCAACTAACGTTTACGATTGGAGTTTTTAAATCT
 AAAACCTTTTAGAGTTTTTAAACAGCTTTTCTTTTAAACAAAATACGTTTTTCAATTTTAAAGACTTTTTGCTTTTTTAAAT
 ATTTTCTTTTTGCAATATTATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AGACGCTCCCGCATTAATTTCTGTTTTATGTTTGTATATTTTGAATGGCAAAAAGAAAGTCAAGTAACCTAATTTTATTGATTAAAA
 TGTATATCATCAAAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ATGATTTACGTATAAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ATAATGTCTGCGATTACAGTTTCAATTTTGTAGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TATTTGGCTTATCCAAAGCAGATTGTGAGTGAGTGATAAAGTTGAATACATGAAAATTTAAAGCTAAAATGAAACTATGCATATTTGT
 CATGATGGTTTACAGCTTTTGGCAAAAAGAAAACGAGCTACATTTAGGTAAAGCATTATCAACTACTTTGGCAGAAAGTTTAAAGT
 TTAGTTTTGCAATTTAAATTAATGCTACTTTTTCAACAACTTTTAAAGCTAAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAA
 AGTTTACGGCAATTACGCACGGGGGCTAGGTATGCCAAAATAAGTTAGTTTATTTGTTAGACTTGATTTGTAGCAATATAAGTTAC
 AAGCAAAAATTTGTTGAATTCATTGGTAAAATTAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 CATAAATAGCTCGGTTATAGATGCGAGGTTTTCTGAGTTGTATGTTTTAGTTATCAAAGTTTCCGAATCCTCATGGATTAGAAAAGT
 GTTATGTTATTTTTTTTTTAAACTTGTCAATTTTTTAAATCAAAATAGTATTCTAACAAAATTTCAAATACAAACTGTTTAAAGCAAAA
 AGATTTTTAATTTGTTAGAAATGTTTTAAAC... ..

AAATTTCTGAAAATTAATTTTACTTTATAAATAAATACATTAATCATTTACGATTATCTCAATATAAAAATATATCAAACATATTAT
 TATTTTTTAGAAFGGAAAAGTTTATACAGTTGCTATAAAATCGCTTATCAACGGAAAATTTGTATGTGCTGAAAANAAACGGAAAGTG
 AACCTTTGATTGCAACAAAGACTCTTTTGGCTTATGGGAAACTTTTTGAAAATTTGTTTTATCGACACACAAGCAATTCATTAAAAATC
 TTATGGAAACGGAAAGTTTCGTCAGTGCAGTTAATACTGACACTAACCTGCTCTTTGCCAACAAAGACCAGGCTACAGTATGGGAGACT
 TTCACCTTAGTTCCAAAGTTTCCGAACTTTGGATTTAAGTGCATGCAATCAAATTTAGTACCCGTGAAAGAAGCCGGGAAACAAAC
 CACTTACAGCTAACCGCATGTTCTTGACGCTGGGAAATGTTCAGCTTGGTTTACGTTGGTGGCCATCAAAATAGGGAATGGAATAAA
 AGCTTTGGTTAATGTTTTATTTGTATGTGCTGAAAAGCCGGAAAACAATCATTACGCTGTAACCGAGCTCAAATAGGCCCTTTGGGAA
 ACATTTGAAATTTAGCTTTAGTATTCACAACATTGACTCTCAAATTTTTTGCAACCGCAAAATTTGTTTGGCGAGAAAAGAAATGGAC
 AATTCACACTTATTGCTAATAGAGATCAAGCTGGACCATGGGAGACTTTACAAATAGTTCCAAATAAGGAAGGTTGTTGCTCTAAAATC
 ACACGCTAATGGAAAGTTGTGACAGCAGAAAACGGGAAAAGTTACTTAAATGCCAAATCGCGATAATGCCGACATTTGGGAAAGA
 TTTGTTATCACTACTTTGTGAAATATCAAAAATTTTAAAGTAAAGCTTATTATAAATTTTGAACATTTTCCAATTTGTGACTTATGAT
 AAAGTCGTTTTAAGTTT

H. vulgaris (Basel) – PPOD3

CGGTTGTCAAAAACCTACGATGTAACAACATAAATAAAGATTCTGTGATGATGAGCACATAAAATGATTATATTGAAAGATTATCAA
 ATATTTTGTTTTTTCAACTGCTATCTTCTATATAAAGTATATATCAAAAATAGTCAGATAAATTTAAGTAGATTTTTTTATGGTCT
 TTTTTTAAATGTGCTTTAAAGAGTTTTTTGTGGACGGGACTTATAAACTGTTTTAAAGTACAATGCTTTAAGTAGGGGATTTATTGAAAC
 ATTATGATTTGGGTTTTGTAGAACGTTTAAACTGTATGTCATCAATTAATGTTTGTTCATTGTTTCAAATAAATGTTCTTGATGA
 AATAAAGGATCTTTCTATATTCAGCATGTGTTTTAGCTAAATCAATTTTTTTGGAGCACAAGTTGTTGGCAATGCTTTTTTTTATCTT
 TATCAATTTTGACCATAAACTGTTGGTTATGACATTTGATTATTTTGAATTTGTTAAAAAATAAATGTTTTTAACTCTTACCAGAT
 ACATTTGATGCGAAAAGAAGAGCGAAAAAATCATGCAAAAAGTGTATAGATACATACAAAATTACAGCAGAAAAGTCTATAAG
 TCTTTTAAAACTAATAAATAAAGGAAATAGAAAATAAATAAATAAAGGAAACCTTAGACAATATAATCTAAAACTGTAATAAATTT
 GCATTTACTTAAGAATAACAAAAATGAAGCAGCAAAACATGTTTGGGTTGCAAAAGGCAAAACATTTTCTATTTGAAATCTTCTTATACGTT
 ACGCATTTGTAATACTTTTTTAAATTTGGGCTCGGTAATAAGACTTTTTAAAGGCTCAATTTATTTGTTTCATAATTTGTATATTTCTGA
 ATGGCAAAAATAAAAGAAAACATAAATAAATCAATTTATGATTAAAAAGTGTATCATATAAAAACTAATCTTTTTTTTATTGTTGCTA
 ATTATCTCTCAGGCAAAAGCACGTAATTTGTTGCGTTACGTCATAGTTTGGCGTATAAAGATACTTTCTTTTCTAAAACTAATATT
 TTTATTGTAAGTTCTTTCTATACAATTAACGATTTTACGTTTCAATTTTGTGAGATTAACGAAAGCCTATAAATCTTTACTTTGAT
 TAAATAAATTTATGTTAAGTTTATTTGGCTCACYCTCAGCAGATGTGTGTGTTTAAAGTCAAAGCAATGAAATTTTGTGTTAA
 AATGAAACTATGCAWAGTTTCATGATGATTACTGCTTGTTTGCAAAAAGAAAACGAG

H. oligactis – PPOD1

CGATTAGCTATGCTATGACGATGCTTCTTTTTTTGAATAACATTTAAACAATAGCAATTTGTTTAAATTAATAACAATATTGCTTT
 AATTGAATTAACATTTACATTTTATTTATTTTAAATTTGTAATTTATTAGCAATATTGATTAAAAAGACAAAGACAAATGGTAAATTAAT
 GAATAGTTTAGGCTAACTAGAGCTAGGCTAAGCCTGGCTCTAGTTAGTACTTAGTACTTAGTACTTAGTACTTAGTACTTAGTACTTAGTACT
 AGTACTAAGTAAACCTTTTTGAAAACCTTTAAAGACTTGTAAACACTATTTATTTTTTATTTTTAAAGTTTCAAATTTTTTGTAGCAGGTT
 AAAGCGACCCCTTCTCCTTACACACATACCAAAAATCGCCTCTGTGTATATAAATAAATAAAGACTTCAAAGAGCGAAATTTGAGAT
 AAAATAAAGGAAACAAATTTATGCTTTAAAACAACAGTCAATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
 TATGTCAATGATTTGCGTGAGTAATTCATGTCAATTTATTGCGTAAATAAACAAGTATCATTTAATGACTGTAATTTTTTCTCTATAT

ATAGTTACAAGGTTACAGTTTCATTGTTCTTGAAAAATACTAAAACATATAAAATCTACATTTTTTTAAACATAATTTATTTATTATCA
 GGCTAACTGCAAGCAGGTTGTGTGTATAAAAAGCTGAAATTTTTCTGACTAAAATGAAACTATGCATTACAGTCTTCATGATCTTT
 ACCTGCGTGTTCAGAGAAGAAAACGAGGC

8.4 Genomische *CnNK-2*-Sequenzen

H. vulgaris (Basel) – *CnNK-2*

CGCTAACGAACTCCAGCACGAATAAATATATTTGTGCGACCCTTCTAATAGTGTGAAAAAAAAGTTTGTACAACTTTTTCTAA
 ATTACATACTTTTCAGTCTGTTATAAATACATTATTTTAAATATAAATGGTGTCAATTGTTTAAAGAGTACCATGGCGTTAATATTTAG
 TAATGGCTTGATAACGTAATAGCAAAGTTAGTTTTGTTTTATAAAAACCTTAATGATAATGTAAAGTAACTGCTGCAATGTGGTTAT
 GTTACATTTGTGCTGAACCTTCAGTCATTTATGTATCAAGATGACAGTACGATAAGTCCCTTTGGATAATTCAGGTATTCAGTAACATAGA
 TATTATTCACTACTAATTAATTCCTTTGTGTAAAAATAAAAAGCTAAAATTTTTTAAAGTTCGTATACTTGCATACTATTGCAACG
 TTATTGCAATACTCAAGATATTGTGATCAGATAAGTTTGTACACTTTTTGTATTTTACAGAAATATATTTGTTCTGTAGTTTGTATTA
 GCAGGTAAGGGAAAAGTAAATATTTGAAGATTTGAAAATCAAGATATGTAAAAATAAGAAGACAAACAAGTAGAAGATTACAAACAGAA
 ACAAATAGCTTGCACCTCAAATGAATTGAAGAGGGAGGTTCTAAGTTTTAAAAAATAGATTGCGGTTGATTAAGAAAAGTTTAGATGT
 GTTTATCAGCTAGACTTATAACAACGTTAACTGTTTTAAATACGAGTGTACGAGTAATACAAGTCGTGCGAGTATTGTCAAACATTT
 CTAATACTACTTTTTTATATAAAAAATATTTAACTGTATAAATAAAAAACATTTCCCTTAAAGTATAAAAAATTTGGATCATTTAT
 AAACGTTTTAAAAATGTTAAGGGTCCCTGGCAACTAGCCCTGAAAAATAACGCATAGCGTACATTTTTAGAAAAATAGTTTTTAAAGAA
 ATTTGATTTGTTTTCGGTAAAATCTAATGGTCTTACCAAGTTTTTTAGTATTTTGATTAAAAAATAATTAAGTGAATAGTTTAAATTT
 ATTTTAAAAAAGGCTCACTTTTTCTTATCTTTTCTCCCTTTTCTTCTTATTTCCGACCTTACGTGACGTAACCTTTAAAAAC
 ACAGAAAAAATACTCATAATAGACAAGTGTCAATTAACCACTCATGGGAGAAGCTTTAATAAATACACAACTCTTAACCTTCG
 TAACCTAACTTTTTGTAAATCACCTTCTAGCAAATAAAAAATATTTCTATTAGTTTATTTGTTTTTAGCAGCATTTTCGTGTCGTGTTAT
 AGTAACTGTGAGTTTTTTTTTTAGTTTTTCAGTTTTGAATTTCTAATG

H. oligactis – *CnNK-2*

TCCAACGAGCCAAGGACTTACGCAATACTATTGCAACGCTTATTGGAAACACATGTAACGCTATTGCAACACATGCAACGTTATTG
 TAAAAACATCTAACTCTATTGCAATACTTGCATATTGCAACCAAGTAAAAATGTACTTTTTTGCATTCTACAGAACAGATTTTTGTTT
 TGTAGTTTTAGTTAGCAGGTAAGGGAAAAGTAAATATTTAACGaTTTGAATAATGTAAAAATAAGAAGACAAACAAGTTGAAGATT
 ACAAACAGAAAATATTGAAAATGAATTTGAAGAGGGAGGTTCTAATTTTTGAAAAATATTTTGCAGTATTGAAACGATATTATAGATACGT
 TTATTAGCTATACTTTAACAACGCTTAACTACTTTAAATATTTTTGCAGTATTGAAACGATATTATCTATTTTTTACTACTATTTTT
 ATTTATAAACTATAAGTTACTCTATGACTTGTGAACTTATAAAAAAAGTTTTAAAAAATAATGGAACGTATGAA
 AACATTTGAAAAAATGTTAAGAGTCCCTGACAATCAGCCCTTAAAAGCGGATACCGTACATTTTGAGAAAAAGTTTTTTAGAACT
 GTTYCGTTTTCTGAAAAATCGAATGATGCATGATTTAATTGAACAAATATTAATGAGTATTAGTTTATTAAAAAATCCCTTTTTT
 TATATAAGTTTTTTACTTTCCCTTACTTTGTTCTGCCCTTACCGTACGTAACCTTTAAAAACAAGTAAACCAAATACACTTAGAA
 TAGACAAGTGCCATTAATAATCATCATGGGAGAAGCTTTAATAAATACACAACTCTCTAAATTTGTAACTACCGTTTTGTAGCCAT
 CGTCAAGCAAATAAAATTTATCTGTTATTATTAGTTATAGCAACGTTTCGTGTAGTGTATAGTTACGTTTCGGTTTTTTTTAAAG
 TTTTTAGTTTTGCATTTTTTAAATG

8.5 PPOD-Gene in der genomischen *H. magnipapillata*-BAC-Bibliothek

Die Koordinaten der PPOD-positiven BAC-Klone auf den mit einer PPOD-Probe hybridisierten Macroarrays und die Kennzeichnung der korrespondierenden, bei -80 °C aufbewahrten Klone in Mikrotiterplatten sind Tab. 8.1 zu entnehmen.

BAC-#	Position auf Makroarray					384-Mikrotiterplatte		
	Filter	Feld	Platte	Zeile	Spalte	Platte	Zeile	Spalte
1	1	1	1	j	4	1	J	4
2	1	1	1	k	4	1	K	4
3	1	1	1	l	5	1	L	5
4	2	5	2	d	3	42	D	3
5	2	5	2	g	18	42	G	18
6	2	5	3	d	23	43	D	23

Tab. 8.1: Klone mit PPOD-Genen in einer genomischen *H. magni-papillata* BAC-Bibliothek. Stand: November 2003.

9 Danksagung

Diese Arbeit entstand zwischen Februar 2002 und Dezember 2004 am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C.G. Bosch.

Herrn Professor Bosch möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit, sein stetes Interesse, seinen Rat und seine Begeisterungsfähigkeit danken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für jegliche Hilfe im beruflichen und privaten Bereich, für Anregungen und Diskussionen, für Bekanntschaft und Freundschaft und die freundliche, motivierende Arbeitsatmosphäre.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für die unkomplizierte, großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Insbesondere danke ich meiner Familie, meinen Eltern und meinen beiden Brüdern, für ihre mir immer gegenwärtige und gewisse Liebe und Unterstützung. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Kiel, im Januar 2005

10 Erklärung

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

Kiel, den
