

**Analyse von Signalmolekülen bei der Entstehung und Erhaltung des *Hydra*-
Kopforganisators**

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Diplom-Biologin
Corina Guder

aus Heidelberg

Berichterstatter:(1. Referent): Prof. Dr. Thomas W. Holstein

Mitberichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 02. Januar 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 2007

Darmstadt 2007

Genehmigte Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

**Analyse von Signalmolekülen bei der
Entstehung und Erhaltung des
Hydra–Kopforganisators**

vorgelegt von

Corina Guder

Januar 2007

Darmstadt — Heidelberg

Referent : Prof. Dr. Thomas W. Holstein, Heidelberg, Universität Heidelberg
Koreferent : Prof. Dr. Gerhard Thiel, TU Darmstadt
Eingereicht am : 02. Januar 2007
Mündliche Prüfung : 02. Februar 2007

Meinen Eltern

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Heidelberg, den 5. Januar 2007

Corina Guder, Diplom-Biologin

Publikationen

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

Guder C, Pinho S, Nacak TG, Schmidt HA, Hobmayer B, Niehrs C, Holstein TW (2006b): An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Development* 133:901–911

Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein TW (2006a): The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 4:7450–7460. Review

Rentzsch F, Guder C, Vocke D, Hobmayer B, Holstein W (k.A.): An ancient chordin-like gene in organizer formation of Hydra. Akzeptiert

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Publikationen	II
Zusammenfassung	1
I Einleitung	3
1 Einleitung	4
1.1 Molekulare Organisatoren und Achsenentwicklung	5
Wnt-Signaltransduktion	6
BMP-Signaltransduktion	8
1.2 <i>Hydra</i> als Modell für organisierte Musterbildung	9
<i>Hydra</i> gehört zum Phylum der Cnidaria	11
Die Biologie von <i>Hydra</i>	11
<i>Hydra</i> und das Reaktions-Diffusions-Modell der Musterbildung	14
Organisator-Regeneration und das Aktivator-Inhibitor-Modell	16
BMP- und Wnt-Signaltransduktion bei <i>Hydra</i> und anderen Cnidariern	17
1.3 Ziele dieser Arbeit	18
II Ergebnisse	20
2 Die Identifizierung von Genen des <i>Hydra</i> Kopforganisators	21
2.1 Der Signalpeptid-Sekretions-‘Screen’	22
Herstellung einer Kopforganisator-spezifischen cDNA-Bibliothek	22
‘Screening’ der Organisator-spezifischen cDNA-Bibliothek in Hefe	23
Charakterisierung Sekretions-positiver Klone	24
2.2 Das ‘Darmstadt <i>Hydra</i> -EST-Projekt’	29
Gewinnung kopfregenerationsspezifischen Materials	29
Analyse der EST-Daten	29
3 Thrombospondin-ähnliche Moleküle in <i>Hydra</i>	32
3.1 Struktur der TSR Typ I-enthaltenden Proteine	33
Die Exon/Intron-Struktur von <i>hytsr1</i> und <i>hytsr-like</i>	38
3.2 Die phylogenetische Analyse der TSR-Proteine	39
3.3 Die Expressionsanalyse der TSR-Proteine	41
Die Expression von <i>hytsr1</i> und <i>-2</i>	41
Die Expression von <i>hytsr-like</i>	46

4	Charakterisierung von HyDkk1/2/4-A	48
4.1	Die Identifizierung und Klonierung von <i>hydkk1/2/4-A</i>	48
4.2	Die phylogenetische Analyse von HyDkk1/2/4-A	49
4.3	Das Expressionsmuster von <i>hydkk1/2/4-A</i>	51
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression in <i>Hydra</i> ('Whole mounts')	52
	Drüsenzellen der oberen Körpersäule sind Harnstoff-sensitiv	53
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression während der Knospung	54
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression während der Gametogenese	55
4.4	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression bei Regeneration und Verletzung	56
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression bei Induktion der Kopfregeneration	56
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression bei Induktion der Fußregeneration	58
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression bei Verletzung	58
4.5	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Expression in pseudoepithelialen Tieren	61
	Die Regenerationsfähigkeit pseudoepithelialer Tiere	62
4.6	<i>hydkk1/2/4-A</i> und <i>hywnt3a</i> in <i>Hydra</i>	66
	<i>hydkk1/2/4-A</i> , <i>hywnt3a</i> und der Verlust der Regenerationsfähigkeit	67
	<i>hydkk1/2/4-A</i> - und <i>hywnt3a</i> -Expression in reg-16	69
4.7	Die heterologe Expression von <i>hydkk1/2/4-A</i>	70
	<i>hydkk1/2/4-A</i> -Überexpression in <i>Xenopus</i> -Embryonen	71
	Die <i>hydkk1/2/4-A</i> -Aktivität in HEK293T-Zellen	71
	<i>hywnt3a</i> -Injektionen in <i>Xenopus</i>	75
5	Ein Chordin-ähnliches Protein in <i>Hydra</i>	76
5.1	Die Exon/Intron-Struktur von <i>hychdl</i>	77
5.2	Die phylogenetische Analyse der CR-Domänen	78
5.3	HyChdl im BMP-Inhibitions-Assay	79
III	Diskussion	83
6	Signalmoleküle im Süßwasserpolyp <i>Hydra</i>	86
6.1	Zwei erfolgreiche Strategien	86
6.2	<i>Hydra</i> besitzt eine komplexe Ausstattung an Morphogenen	87
7	Struktur-Funktion-Beziehungen der TSR I-enthaltenden Matrixproteine	90
7.1	TSR I-enthaltende Proteine in <i>Hydra</i>	90
7.2	HyTSR1 und -2 fungieren in Hypostom-spezifischen Prozessen	92
7.3	HyTSR-like markiert Tentakel, basale Regionen und Wachstumszonen	95
7.4	TSR-Moleküle in der Gewebeentstehung	96
8	Konservierte Antagonismen bei der axialen Musterbildung von <i>Hydra</i>	98
8.1	Der Wnt/Dickkopf-Antagonismus bei der Achsenbildung bei <i>Hydra</i>	98
	HyDkk1/2/4 und die antagonistischen Dickkopf-Proteine	98
	HyDkk1/2/4-A antagonisiert die Wnt-Signaltransduktion	100
	Die Regulation und Funktion von <i>hydkk1/2/4-A</i>	102
	<i>hydkk1/2/4-A</i> ist komplementär zu <i>hywnt3a</i> exprimiert	102

<i>hydkk1/2/4</i> und <i>hywnt3a</i> im Reaktions–Diffusions–Modell	107
Ein oder zwei Musterbildungssysteme in <i>Hydra</i> ?	113
8.2 <i>Hydra</i> Chordin-like bei der Achsenbildung von <i>Hydra</i>	115
HyChdl ist ein abgewandeltes Chordin–Molekül	115
HyChdl, BMP und die Achsendifferenzierung in <i>Hydra</i>	119
IV Material und Methoden	125
9 <i>Hydra</i>–Methoden	126
9.1 Tiere	126
9.2 Regeneration und Verletzung	126
9.3 Abschnürregenerate	127
9.4 Induktion der Gametogenese	127
9.5 Eliminierung der i–Zelllinie in den Stämmen sf-1 und A-10	127
9.6 DAPI–Kernfärbung	127
10 Molekulargenetische Methoden	128
10.1 Verwendete Oligonukleotide	128
10.2 RNA–Isolierung	129
10.3 cDNA–Herstellung	130
10.4 Phenolische Extraktion von DNA	130
10.5 Klonierung von cDNA–Fragmenten	130
10.6 Sequenzierung von DNA–Fragmenten	131
10.7 RNA–Sonden	131
10.8 Semiquantitative PCR	132
10.9 RNA <i>in situ</i> –Hybridisierung	133
10.10 Mikroskopie und Fotografie	135
10.11 Heterologe Expressionsstudien	135
10.12 Bioinformatik	136
Sequenzen, Alignments	136
Phylogenetische Analysen	136
10.13 Signalpeptid–Selektions–‘Screening’	137
Herstellung der cDNA–Bibliothek	137
Amplifikation der Primärbank und Transformation von YTK12	139
Sequenzierung	140
10.14 Sequenzvervollständigung der <i>hytsr</i> –Transkripte	140
10.15 Klonierung von <i>hydkk1/2/4–A</i>	142
10.16 Klonierung von <i>hywnt3a</i> in den pCS2+–Vektor	143
10.17 Semiquantitative PCR–Analyse von <i>hywnt3a</i>	143
10.18 Herstellung der Chordin–Konstrukte	144
Literatur	145
V Anhang	161

A Anhang	162
Danksagung	195
Lebenslauf	196

Zusammenfassung

Der *Hydra*-Kopforganisator dient als Modell für die Musterbildung bei der Embryogenese der Eumetazoa (Gewebetiere), da er die Entstehung einer Körperachse induzieren kann. Man nimmt an, daß die oral-aborale Achse der radiärsymmetrischen *Hydra* (Cnidaria) vom Kopforganisator, in Analogie zur Induktion der Körperachsen bei den bilateralsymmetrischen Vertebraten (Wirbeltiere), durch die Sekretion von Morphogenen festlegt wird.

Neue Ergebnisse zeigen, daß Teile der hochkonservierten, molekularen Signalkaskaden, welche bei den Bilateriern die Embryogenese steuern, schon in den Cnidariern vorhanden sind und hier ähnliche Funktionen ausüben. Dadurch stellt sich die Frage, was die molekulare Minimalausstattung der gemeinsamen Vorfahren der Bilaterier und Cnidarier ('Ur-Eumetazoa') war und wie sich ausgehend von dieser Grundlage die Diversifizierung der Körperbaupläne vollzogen hat. Da die axiale Organisation von Gewebe hierbei eine entscheidende Rolle spielt, ist die Herkunft und die Evolution von Organisationszentren besonders interessant.

Um diese Fragestellungen zu bearbeiten, wurden zwei EST-Bibliotheken hergestellt, welche besonders die Transkripte aus der Organisatorregion von *Hydra* sowie aus Organisator-regenerierendem Gewebe repräsentieren. Die Analyse dieser ESTs bestätigte und erweiterte die Vermutung, daß die wichtigsten embryonalen Signalkaskaden der Bilaterier, wie die Wnt-, TGF β -, FGF-, Notch-, Hedgehog-, Cytokin- und weitere Wachstumsfaktor-vermittelten Signalwege im Apikalbereich der einfach strukturierten *Hydra* bereits vorhanden sind.

Weiterhin wurden in den Bibliotheken die besonders wichtigen Antagonisten der Wnt- und BMP (TGF β)-Signaltransduktionswege identifiziert, welche die anteroposteriore und die dorsoventrale Achse in Bilateriern spezifizieren. In dieser Arbeit wurde die molekulare Evolution der Proteindomänen des bereits klonierten *Hydra* Chordin-like (HyChdl) untersucht und die Funktion dieser Domänen bei der Antagonisierung des BMP-Signalwegs durch heterologe Expression in Zebrafisch-Embryonen untersucht. Weiterhin wurde die Spezifizierung der oral-aboralen Körperachse durch HyChdl und HyBMP5-8b mit dem Chordin/BMP-Antagonismus bei der dorsoventralen Achsenbildung der Bilateria verglichen.

Der zweite untersuchte Inhibitor, ein Wnt-antagonistisches Dickkopf-Ortholog (HyDkk1/2/4-A), konnte erfolgreich als Antagonist des Wnt-Signalwegs im *Xenopus*-Embryo eingesetzt werden. In Expressionsstudien wurde gezeigt, daß das im adulten Polypen zum *hywnt3a*-Transkript komplementär exprimierte *hydkk1/2/4-A*-Transkript bei regenerativen Prozessen aufreguliert und mit *hywnt3a* co-exprimiert wird. Dies wurde zusammen mit dem Verlust der Kopfregenerationsfähigkeit in *hydkk1/2/4*-reduzierten Polypen in Zu-

sammenhang mit einer essentiellen, Wnt-antagonistischen Rolle bei der oral-aboralen Achsenbildung gebracht.

Anhand dieser molekularen Daten wurden diese beiden wichtigen, ancestralen Signalsysteme in Einklang mit bestehenden Theorien zur axialen Musterbildung durch Selbstorganisation in *Hydra* gebracht. Daraus ließ sich ableiten, daß die Wnt/Dkk- und BMP/Chordin-Systeme in *Hydra* als Komponenten eines einzigen Musterbildungssystems parallel entlang der oral-aboralen Körperachse agieren, welches primär vom Kopforganisator koordiniert wird. Der Vergleich mit dem bilateralsymmetrischen Achsensystem der Bilaterier legte nahe, daß die ursprünglich gekoppelten Wnt/Dkk- und BMP/Chordin-Systeme im Lauf der Evolution separate Achsen innerhalb der Bilateria festlegten. Aktive Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion und die Unterdrückung von BMP-Signalen sind Voraussetzung für die Spezifizierung der achsenkoordinierenden Organisatoren von Wirbeltierembryonen und, wie diese Arbeit impliziert, höchstwahrscheinlich auch für den *Hydra*-Kopforganisator, obwohl sich die etablierten Organisatoren in ihrer Molekülkomposition unterscheiden.

Im Zusammenhang mit der Modulation von Signalkaskaden wurden neben den Antagonisten drei Thrombospondin Repeat Typ I-enthaltende Moleküle der Extrazellulärmatrix bei der Musterbildung von *Hydra* in vergleichenden Sequenz- und Expressionsanalysen untersucht. Die Domänenkomposition sowie die differentielle Expression von *hytsr1*, *hytsr2* und *hytsr-like* entlang der oral-aboralen Achse unterstützen eine adhäsive, eventuell aber auch regulative Funktion der Proteine in differenzierten Strukturen und während Gewebe-Rearrangements sowohl im Kopf als auch im basalen Bereich. Weiterhin wurde an HyTSR1 und HyTSR-like beispielhaft die Evolution von Matrixmolekülen durch 'Exon-Shuffling' und der damit verbundenen Zunahme an funktionellen Eigenschaften beschrieben.

Teil I

Einleitung

1 Einleitung

Eines der wichtigsten Ereignisse bei der Entstehung von multizellulärem Leben — und eines der größten Rätsel — ist die koordinierte Organisation von autonomen Zellen in differenzierte Gewebe innerhalb eines Organismus. Bei der Embryonalentwicklung von Tieren und Pflanzen wird dieser Prozeß, ausgehend von einer Zelle, wieder und wieder durchlaufen und ist der zentrale Gegenstand entwicklungsbiologischer Fragestellungen. Auch der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, der sowohl als einzellige Amöbe als auch in geordneten, vielzelligen Aggregaten vorkommt, wird als Modell verwendet, um die Mechanismen und Triebkräfte der Gewebebildung zu verstehen (Abbildung 1.1). Von besonderem Interesse sind hierbei die molekularen Grundlagen der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen, der funktionellen Zusammenlagerung in der Folge und schließlich der Musterbildungsprozesse, welche die uns bekannten Formen schaffen.

Es war überraschend, daß die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen in den sehr verschiedenen untersuchten Organismen einen hohen Grad an Gemeinsamkeiten aufweisen. Konnten zuerst Transkriptionsfaktoren wie die Hox-Proteine der Tiere und deren Zielgene als speziesübergreifend konserviert beschrieben werden, so gibt es heute zahllose Beispiele für weitere Proteine und deren Interaktionen. Mittlerweile hat sich ein Bild der Evolution verdichtet, nach dem die morphologische Vielfalt der Organismen in weitaus geringerem Maße vom Auftreten neuer Genfunktionen, als vielmehr von extensiven zeitlichen und räumlichen Rearrangements der Interaktionen von schon vorhandenen Genen bzw. ihren Produkten abhängt (Duboule und Wilkins 1998; Eizinger et al. 1999). Diese Erkenntnis inspirierte auch das Konzept der ‘gene regulatory networks’ (Davidson 2001), welches extrem evolutiv konservierte, d.h. fast unveränderte Kerneinheiten von netzwerkartig zusammengeschlossenen, regulatorischen Genen postuliert, und deren Rekrutierung in verschiedene molekulare Kontexte die Diversifizierung der Formen bewirkt.

Neben den Transkriptionsfaktoren sind auch die zellulären Signalkaskaden evolutiv konserviert, deren Input diese schließlich in die Regulation von Genen umsetzen. Diese Signaltransduktionswege, mit denen Zellen in Geweben untereinander kommunizieren, sind im wesentlichen sowohl für die Musterbildungsprozesse der Embryogenese, aber auch für die post-embryonalen Ereignisse im Gewebe, wie z.B. Homöostase und Regeneration, zuständig. Prominente Beispiele sind der TGF β ¹- und der Wnt-Signalweg (Croce und McClay

¹‘Transforming Growth Factor β ’

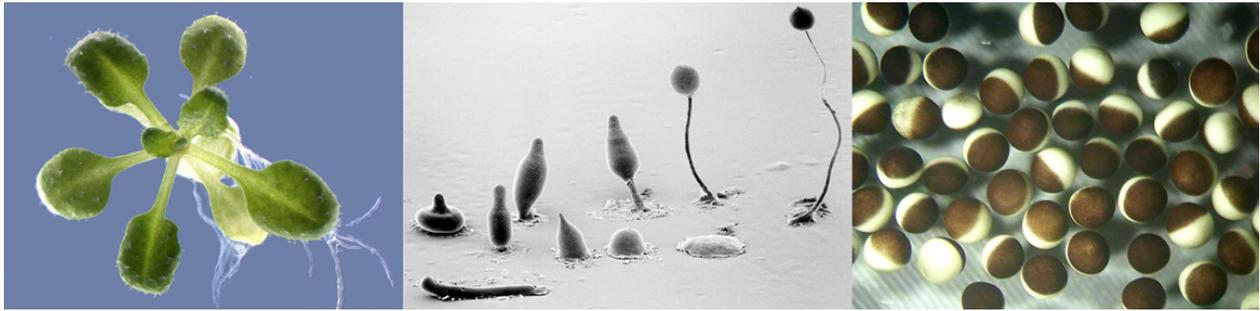


Abbildung 1.1. Modelle für Entwicklungsbiologie und Musterbildung. Links: Die Ackererschmalwand (*Arabidopsis thaliana*; http://www.gsf.de/Aktuelles/Presse/biop_2004-08-23.phtml); Mitte: Aggregationsstadien des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* (Copyright, M.J. Grimson & R.L. Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University); rechts: Oocyten des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*, Dr. Georg Nagel, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/M).

2006; De Robertis und Sasai 1996), die beide essentielle Rollen bei der frühen Embryogenese der Organismen spielen, aber auch in den anderen o.g. Prozessen fungieren. Mehr Einblick in das Ausmaß der evolutiven Konservierung von Genen bzw. Proteinen gewinnt man derzeit durch die immer zahlreicher werdenden Daten aus Genom- und Transkriptom-Projekten verschiedenster Organismen, welche die Erkenntnisse aus den 'klassischen' Modell-Spezies, den Wirbeltieren, der Fruchtfliege *Drosophila* und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ergänzen und zunehmend aus älteren metazoischen Phyla gewonnen werden. Schon im groben Überblick zeichnet sich ab, daß ganze Gruppen von rezenten Genprodukten innerhalb von Signalkaskaden sehr früh in der Evolution entstanden sein müssen (Ball et al. 2004; Croce et al. 2006; Kusserow et al. 2005; Nichols et al. 2006; Walton et al. 2006).

1.1 Molekulare Organisatoren und Achsenentwicklung

Von besonderem Interesse ist in der Entwicklungsbiologie die Entstehung von Symmetrie und Polarität im Embryo, sowie die Evolution dieser Prozesse. Die frühe Musterbildung wird von Signalzentren im Embryo gesteuert, den Organisatoren. Am besten beschrieben ist der die Embryogenese des Frosches *Xenopus laevis* steuernde Spemann-Mangold-Organisator (Harland und Gerhart 1997; Spemann 1938). Er spezifiziert im frühen Embryo dorsoanteriores Schicksal und koordiniert damit zweierlei: Die Ausbildung der dorsoventralen Körperachse und die Regionalisierung der anterior-posterioren Körperachse. Der Organisator ist molekular charakterisiert durch die Expression anterodorsalisierender und neuralisierender Faktoren.

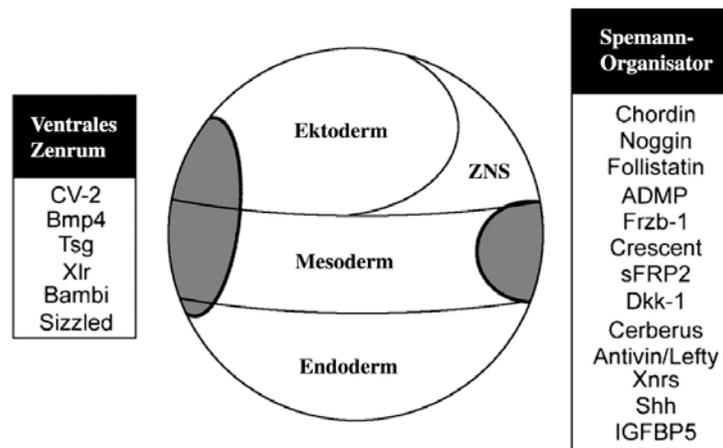


Abbildung 1.2. Der *Xenopus* Spemann–Mangold–Organisator. Die Spezifizierung der dorsoventralen Achse sowie die Entstehung der Neuralplatte entlang der anteroposterioren Achse wird von sekretierten Proteinen aus dem induktiven Organisator (graue Fläche rechts) des gastrulierenden *Xenopus*-Embryos gesteuert. Er antagonisiert v.a. die ventral-spezifischen BMP-Moleküle (graue Fläche links) mit Ausnahme von ADMP (‘anti-dorsalizing morphogenetic protein’), ein BMP-Molekül, das im Organisator exprimiert ist. Dkk1=Dickkopf1; sFRP2=‘secreted Frizzled-like protein 2’; Xnrs=‘Nodal-related proteins’; Shh=‘sonic hedgehog’; IGFBP5=‘insulin-like growth factor-binding protein’; Xlr= ‘Xolloid-related’; Tsg=‘twisted gastrulation’. Verändert nach De Robertis und Kuroda (2004).

Dies sind neben Xnr-3 v.a. die Antagonisten der BMP²-Liganden Chordin, Noggin, Follistatin, Cerberus, sowie der Wnt-Antagonist Dickkopf (De Robertis et al. 2000; Gamse und Sive 2000) (Abbildung 1.2). Die Schlüsselsysteme für die Etablierung des Organisators und die Festlegung der Körperachsen sind dementsprechend die BMP- und Wnt-Signaltransduktion mit maternalen und zygotischen Komponenten.

Wnt-Signaltransduktion

Der Wnt-Signalweg ist hochkonserviert und essentiell für die frühe Embryogenese der höheren Metazoa wie Maus, Zebrafisch, Frosch, Seeigel, *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* (De Robertis und Kuroda 2004; Kelly et al. 2000; Liu et al. 1999; Logan et al. 1999; Nusslein-Volhard und Wieschaus 1980; Thorpe et al. 1997). Maternale Wnt-Signalaktivität führt zur Dorsalisierung im sehr frühen Embryo sowie zur Bildung des Spemann–Mangold–Organisators (zusammengefaßt in Harland und Gerhart 1997). Defekte der zygotischen Wnt-Signaltransduktion führen v.a. zu schweren Störungen der Musterbildung entlang der anteroposterioren Achse. Die Regulation der Wnt-Signalübertragung und –integration ist kom-

²‘Bone Morphogenetic Proteins’

plex, so werden beispielsweise im Froschembryo *wnt*-Transkripte räumlich und zeitlich unterschiedlich exprimiert, was vor, während und nach der Gastrulation verschiedene Schicksale spezifiziert (Stern 2004).

Wnt-Liganden sind sekretierte Glykoproteine, deren Aktion zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors β -Catenin führt (=‘kanonischer’ Wnt-Signalweg) und damit zur Transkriptionsaktivierung von Zielgenen (zusammengefaßt in Cadigan und Liu 2006). Es existieren noch weitere, Wnt-abhängige Signalkaskaden, die als ‘nicht-kanonisch’ bezeichnet werden und β -Catenin-unabhängig die Transkription von Genen regulieren (zusammengefaßt in Pandur et al. 2002).

Die Ausbildung eines morphogenetischen Wnt-Gradienten wird u.a. durch extrazelluläre Antagonisten erreicht, welche die Wnt-Liganden in ihrer Bindung an Rezeptoren beeinflussen und die intrazelluläre Signalkaskade stoppen (Abbildung 1.3.) Das antagonistische Dickkopf-Protein ist hierbei von besonderer Bedeutung: Es wurde als Kopfinduktor während der Embryogenese von *Xenopus* entdeckt (Glinka et al. 1998) und wurde mittlerweile auch in anderen Modellorganismen als essentieller Faktor bei der anteroposterioren Musterbildung, der Somitogenese sowie der Gliedmaßen- und Augenentwicklung beschrieben (zusammengefaßt in Niehrs 2006). In Vertebraten sind die Dickkopf (Dkk)-Proteine in 4 Subfamilien zusammengefaßt; drei davon (Dkk1, -2 und -4) fungieren als Wnt-Antagonisten, Dkk3 hingegen kann die Wnt-Signaltransduktion nicht modulieren (Glinka et al. 1998; Krupnik et al. 1999; Mao et al. 2001a). Außerdem werden Wnt-unabhängige Funktionen von Dkk1,2,4 bei der Induktion von Apoptose und der Modulation des AP-1/JNK-Signalweges diskutiert (Gregory et al. 2003; Niehrs 2006).

Dickkopf-Moleküle binden an die Rezeptoren LRP5 und -6 und parallel an Kremen-Rezeptoren (Bafico et al. 2001; Mao et al. 2002, 2001b; Semenov et al. 2001), aber nicht an Wnt-Liganden direkt. Da dies zur Endozytose des Dkk-LRP5/6-Kremen-Komplexes führt, wird der essentielle Wnt-Co-Rezeptor LRP5/6 dadurch von der Zelloberfläche entfernt und die Wnt-Signalübertragung blockiert (Mao et al. 2002). Die rekombinante Expression der zwei funktionellen, cysteinreichen Proteindomänen der Dickkopf-Moleküle zeigte, daß die C-terminale, cysteinreiche Domäne (CRD2) sowohl die Bindung an LRP5/6 als auch den Wnt-antagonistischen Effekt vermittelt (Brott und Sokol 2002; Krupnik et al. 1999; Li et al. 2002). Die N-terminale CRD hingegen moduliert diesen Effekt, was abhängig vom zellulären Kontext auch zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Fall von Dkk2 führen kann (Mao und Niehrs 2003; Wu et al. 2000).

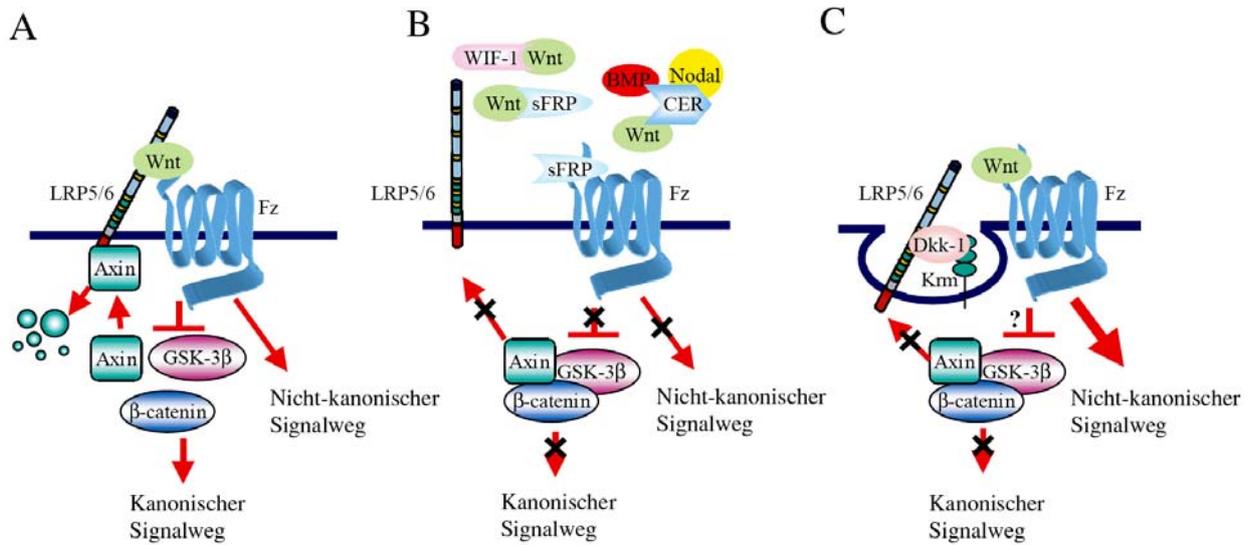


Abbildung 1.3. Der Wnt-Signaltransduktionsweg. (A) Die Interaktion zwischen Wnt-Liganden, dem Frizzled-Rezeptor (Fz) und dem LRP5/6-Rezeptor rekrutiert das Protein Axin an die Membran, das daraufhin degradiert wird. Dadurch kann die Kinase GSK3 β inaktiviert werden (über phosphoryliertes Dishevelled-Protein, nicht gezeigt), welche in aktiver Form den Transkriptionsfaktor β -Catenin phosphoryliert und so für die Degradation markiert. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin transloziert in den Nucleus und aktiviert hier in Verbindung mit Tcf/Lef die Transkription (nicht dargestellt). Über Dishevelled werden auch die nicht-kanonischen Signalkaskaden aktiviert. (B+C) Verschiedene extrazelluläre Wnt-Antagonisten wie Cerberus (CER), sFRP und WIF-1 verhindern die Bindung von Wnt an LRP5/6- und Frizzled-Rezeptoren. Beide Arten der Signaltransduktion werden blockiert (B). Der Antagonist Dickkopf1 (Dkk) verhindert die Interaktion des Wnt-Frizzled-Komplexes mit dem LRP5/6-Rezeptor und verursacht zusammen mit dem Transmembranprotein Kremen1/2 (Krm) die Internalisierung von LRP/6. Der kanonische Signalweg ist dadurch blockiert, der nicht-kanonische kann unabhängig von LRP5/6 funktionieren (C). Entnommen aus Kawano und Kypta (2003).

BMP-Signaltransduktion

Die BMP-Liganden gehören zur TGF β -Familie von Wachstumsfaktoren und spielen ebenfalls in der Embryonalentwicklung der höheren Metazoa eine evolutiv konservierte, essentielle Rolle bei der Achsen- und Keimblattentwicklung (De Robertis und Kuroda 2004). Der morphogenetische BMP-Gradient spezifiziert in Vertebraten v.a. ventrale Schicksale und wird über dorsalisierende Antagonisten modifiziert, die im Organisationszentrum des frühen Embryos exprimiert sind. Hier ist v.a. Chordin zu nennen, welches die Bindung von BMP-Liganden an die entsprechenden Rezeptoren verhindert, seinerseits aber durch eine Zink-Metalloprotease, Xolloid, inhibiert werden kann (zusammengefaßt in De Robertis und Kuroda 2004; Garcia Abreu et al. 2002). Die Regulation dieser Faktoren bei der Generierung eines achsenbildenden BMP-Gradienten ist komplex, neuerdings werden weitere Funktionen für

den Antagonisten Chordin vermutet, wie etwa der Transport von inaktiven BMP-Molekülen in entferntere Regionen (Eldar et al. 2002; van der Zee et al. 2006). Interessanterweise wurde die durch den BMP-Gradienten festgelegte Achsenpolarität im Laufe der Evolution umgekehrt: Bei Protostomiern (z.B. Insekten) spezifiziert aktive BMP-Signaltransduktion dorsale Regionen statt ventrale wie in deuterostomen Tieren (Arendt und Nubler-Jung 1997; De Robertis und Sasai 1996; Saint Hillaire 1822). Dies reflektiert die Flexibilität und Robustheit der BMP-Signalkaskade und ihrer Zielprozesse bei der Diversifizierung der Körperbaupläne.

In der Zelle werden durch die Bindung freier BMP-Moleküle an ihre Serin/Threoninkinase-Rezeptoren vom Typ I und -II, diese selbst und eine Klasse von Signaltransduktionsmolekülen, die Smad-Proteine, phosphoryliert (Abbildung 1.4). Durch die darauffolgende Translokation der Smads in den Nucleus können Zielgene aktiviert werden; die Spezifität entsteht hierbei durch weitere, interagierende Transkriptionsfaktoren (zusammengefaßt in Stern 2004; Yamamoto und Oelgeschlager 2004).

Es gibt einige Hinweise darauf, daß Wnt- und BMP-Signalwege miteinander interagieren. So aktivieren z.B. β -Catenin, der Transkriptionsfaktor Lef/Tcf und Smad4, ein Co-Smad, synergistisch die Transkription von Zielgenen (Nishita et al. 2000). β -Catenin interagiert aber auch mit dem I-Smad Smad7 (Han et al. 2006), was die Degradation von β -Catenin und damit Wnt-Inhibition zur Folge hat. Es gibt weitere Beispiele eines kooperativen oder antagonistischen Zusammenspiels beider Signalwege (zusammengefaßt in von Bubnoff und Cho 2001), aber keine prinzipielle Abhängigkeit voneinander.

1.2 Der Süßwasserpolyt *Hydra* als Modell für organisierte Musterbildung

Eine der herausfordernden Aufgaben der vergleichenden Entwicklungsbiologie ist es, den hypothetischen Vorfahren aller metazoischer Phyla zu rekonstruieren und die Basis-Ausstattung der regulatorischen Signalnetzwerke zu bestimmen, die seinen Grundbauplan spezifizierten (auch 'Evo-Devo'-Forschung genannt).

Um zu verstehen, wie Signalkaskaden bzw. Signalnetzwerke in der Genese und Evolution von Körperbauplänen funktionieren, wird die axiale Musterbildung bei dem Süßwasserpolyten *Hydra* untersucht, der einen vergleichsweise einfachen Körperbau besitzt und stammesgeschichtlich eine Verbindung zu den frühen Gewebetieren aufweist.

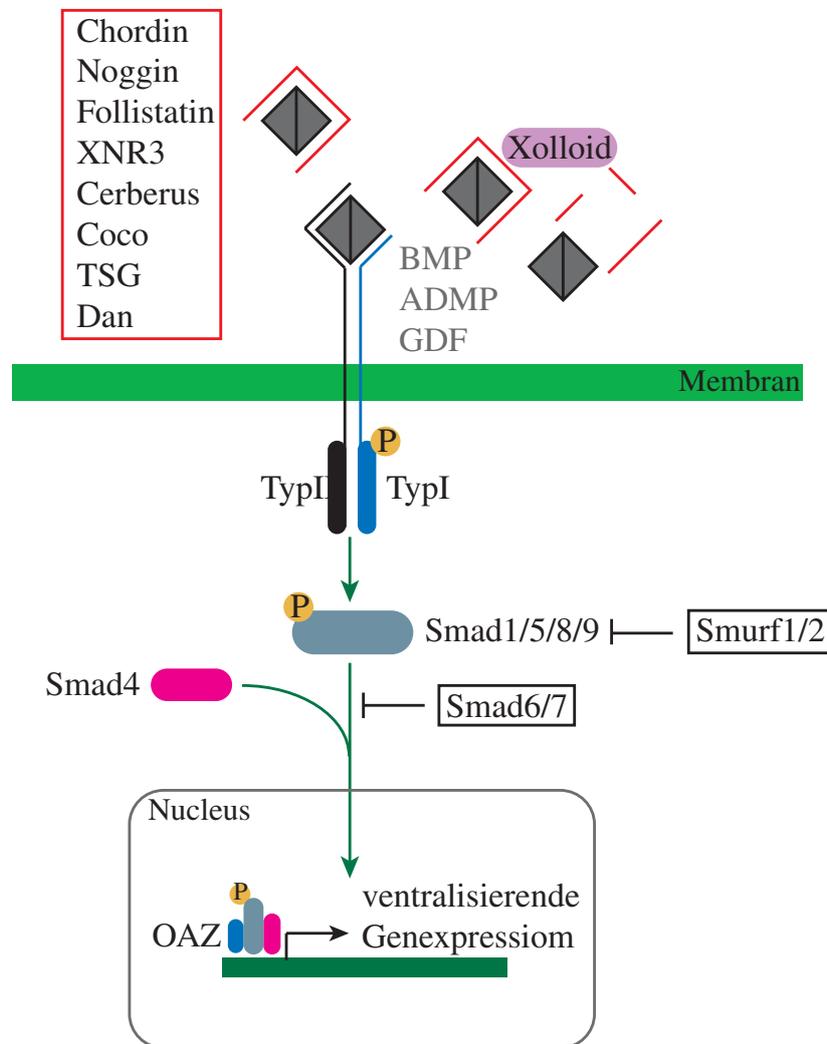


Abbildung 1.4. Die BMP-Signaltransduktionskaskade. BMP-Moleküle (auch ADMP und GDF ('growth and differentiation factor')) aktivieren als Homo- oder Heterodimere TypI- und TypII-TGF β -Rezeptoren, was durch verschiedene Antagonisten (rote Box) inhibiert werden kann. Der Inhibitor Chordin kann von Xolloid inaktiviert werden. Die BMP-induzierte Rezeptordimerisierung führt zur eigenen Phosphorylierung sowie von Smad1/5/8/9-Proteinen (R-Smads), welche daraufhin an Smad4 (Co-Smad) binden und in den Nucleus translozieren. Hier aktivieren sie zusammen mit gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren (z.B. OAZ) die Transkription von Zielgenen. Dies kann intrazellulär von Smad6/7 (I-Smads) und Smurf-Ubiquitin-Ligasen inhibiert werden. Verändert nach Stern (2004).

***Hydra* gehört zum Phylum der Cnidaria**

Nach heutiger Sicht bilden die Cnidarier eines der ältesten Phyla der ‘echten Vielzeller’, der Eumetazoa (Abbildung 1.5). Sie zeigten zusammen mit den Ctenophoren als erste Tiergruppe axiale Gewebeorganisation und entwickelten das erste, netzartig organisierte Nervensystem (zusammengefaßt in Mackie 1990). Ihre phylogenetische Position ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Der Ur-Cnidarier stand zwischen dem gemeinsamen Vorfahren aller Metazoen und dem sogenannten Urbilaterier, mit dem sich eine neue Organisationsebene des metazoischen Körperbauplans etablierte. Bilateralsymmetrische Tiere besitzen mit dem Mesoderm ein Keimblatt mehr als die ‘diploblastischen’ Cnidarier mit Ekto- und Entoderm und darüberhinaus eine durch die anteroposterior und dorsoventral verlaufenden Körperachsen charakterisierte Symmetrie. Neue Erkenntnisse schreiben nun auch einigen vormals radialsymmetrisch definierten Cnidariern eine Bilateralsymmetrie durch zwei orthogonale Körperachsen zu. Diese werden offenbar durch sehr ähnliche Moleküle wie in Bilaterien festgelegt, jedoch ist der Bezug zur anteroposterioren bzw. dorsoventralen Körperachse nicht eindeutig geklärt (de Jong et al. 2006; Matus et al. 2006a; Rentzsch et al. 2006). Die vergleichende molekulare Analyse der Musterbildungsprozesse in Cnidariern und Bilateriern kann demzufolge Einsicht in die Koordination und Beziehung ihrer achsenspezifisierenden Signalwege bringen.

Der Süßwasserpolytyp *Hydra* sp. und die Seeanemone *Nematostella vectensis* (Anthozoa) sind etablierte Modellorganismen, die nur entfernt verwandt sind und damit mittels komparativer Studien die Analyse der Diversität innerhalb der Cnidarier ermöglichen. Dies kann zusammen mit der Untersuchung weiterer Arten Aufschluß über die ancestralen Merkmale des Ur-Cnidariers auf dem Weg zum Urbilaterier geben (Collins et al. 2006).

Die Biologie von *Hydra*

Hydra gehört zur Klasse der Hydrozoa, die innerhalb der Medusozoa eingeordnet sind, aber ihr Medusenstadium sekundär verloren haben (Collins et al. 2006). Die Fortpflanzung verläuft hauptsächlich asexuell über Knospung, die seitliche Absprossung eines neuen Individuums. Bestimmte Umweltbedingungen induzieren die getrenntgeschlechtliche Gametogenese; aus der befruchteten Oocyte schlüpft der Primärpolyp (Martin et al. 1997).

Der Körper von *Hydra* ist einfach strukturiert (Abbildung 1.6). Die oral-aborale oder apikobasale Achse ist die Körperhauptachse, *Hydra* ist radiärsymmetrisch. Die Hinweise häufen sich, daß dieses Merkmal nicht ancestral ist (de Jong et al. 2006; Matus et al. 2006a;

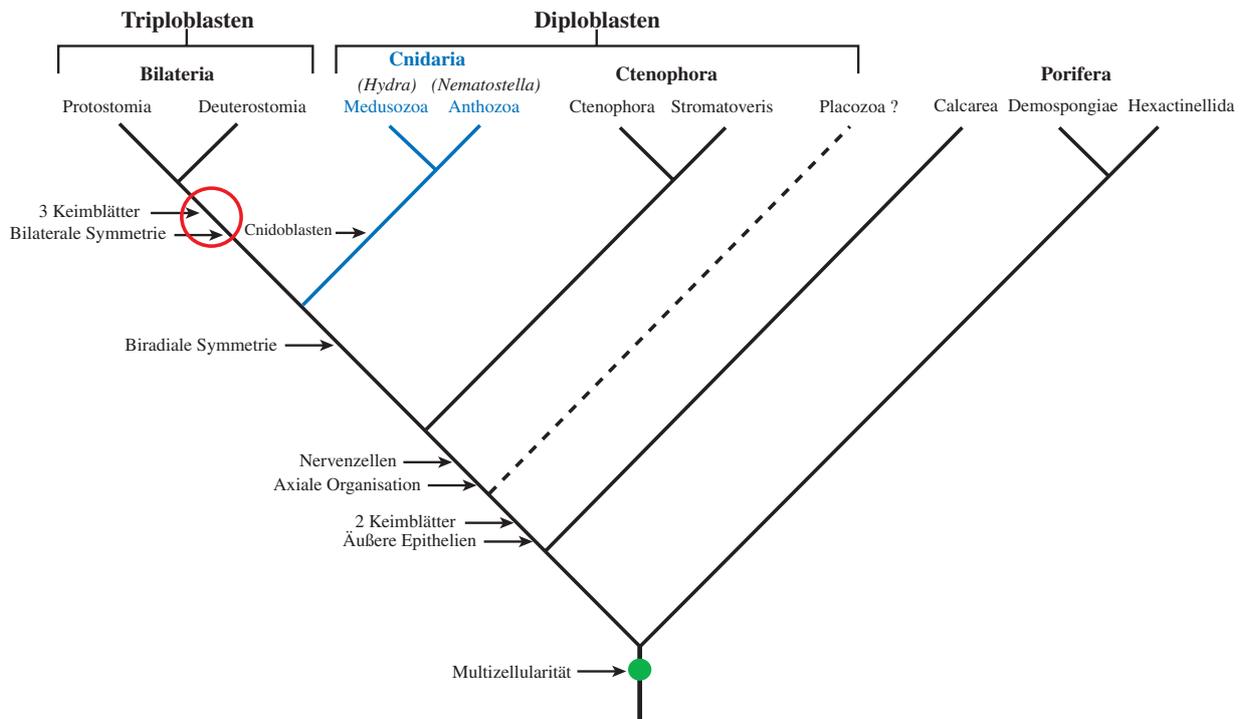


Abbildung 1.5. Die Phylogenie der Metazoa. Die Cnidarier (blau) mit den zu den Medusozoa gehörendem Hydrozoen *Hydra* sp. und dem Anthozoen *Nematostella* gehören zu den Diploblasten, den zweikeimblättrigen Tieren; die Schwämme (Porifera) werden nicht dazu gezählt, da sie keine axiale Körperorganisation und keine echten Epithelien aufweisen. Die Triploblasten, die dreikeimblättrigen Tiere, gelten als synonym mit den Bilateria. Die Stellung der Placozoa (unterbrochene Linie) innerhalb der Diploblasten als Schwestergruppe der Cnidaria wird kontrovers diskutiert. Die Cnidaria entstanden vor etwa 500 bis 700 Millionen Jahren und stammen vom gemeinsamen Vorfahren aller Metazoen (Urmethazoen, grüner Punkt) ab, welcher sich vermutlich vor etwa 1000 Millionen Jahren entwickelte. Die Bilateria besitzen einen gemeinsamen Vorfahren (Urbilateria, roter Kreis), der die Bilateralsymmetrie gekoppelt mit drei Keimblättern besaß. Die Anmerkungen an den Pfeilen geben die Neuerungen im Verlauf der Evolution an. Die Zweiglängen sind willkürlich und geben keine Auskunft über den genauen, zeitlichen Verlauf oder die Distanz zwischen den Gruppen. Verändert nach Shu et al. (2006).

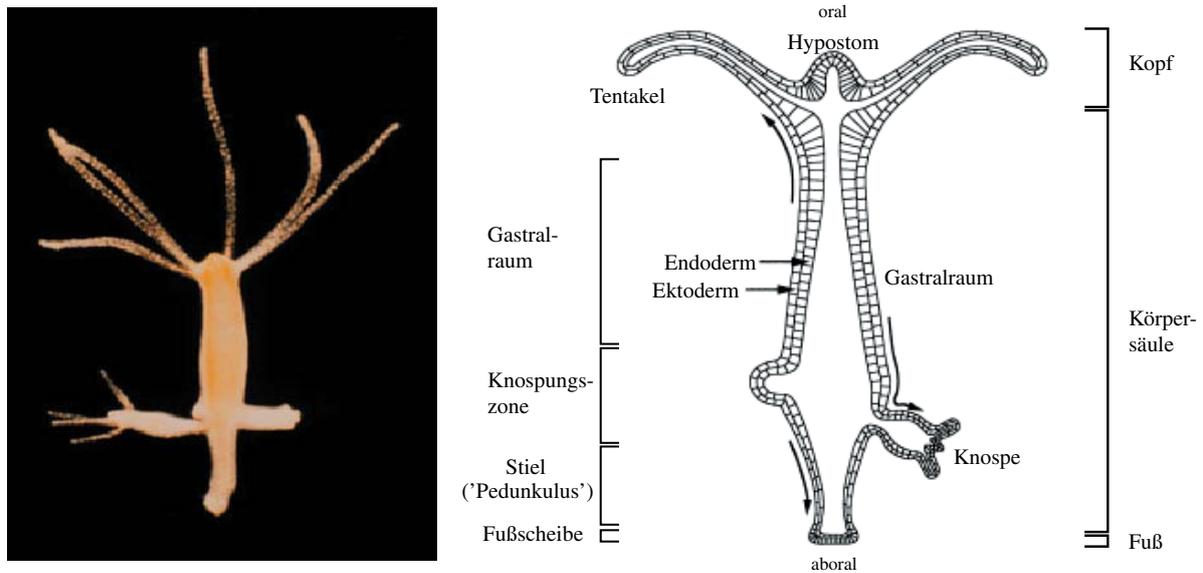


Abbildung 1.6. Der Bauplan von *Hydra*. Fotografie (links, Tim Nüchter) und schematische Darstellung (rechts) eines adulten Polypen, verändert nach Bode (2003). Die unbeschrifteten Pfeile geben die Richtung des kontinuierlichen Gewebeflusses an.

Rentzsch et al. 2006).

Der Körper von *Hydra* ist grob unterteilbar in den Kopf, die Körpersäule mit dem Gastralraum und die Fußregion. Der homogene Gastralschlauch wird von differenzierten Strukturen eingefasst: Am apikalen Ende findet sich das von ca. 7 Tentakeln umstellte Hypostom, am Fußende die Stielregion mit der adhäsiven Basalscheibe.

Als Diploblast besitzt *Hydra* nur Ekto- und Entoderm (hier 'Endoderm'), die als Epithelien den Körper umgeben bzw. auskleiden und von einer Basalmembran, der Mesogläa, separiert werden. Die Zellen beider Schichten haben Stammzellcharakter und durchlaufen permanent Mitosen. Zwischen ekto- und endodermale Zellen eingestreut befindet sich eine dritte, pluripotente Zelllinie, die interstitielle Zelllinie (i-Zellen). Aus ihr differenzieren Derivate wie Neuronen, die Nesselkapsel-bildenden Cnidocyten, die Gameten sowie zymogene und muköse Drüsenzellen. Die i-Zellen sind nicht zu verwechseln mit dem mesodermalen Keimblatt.

Das Hypostom mit der Mundöffnung entspricht dem animalen Pol der Oocyte (Freeman 1981) und ist die wichtigste Struktur des Tieres. Neben der Nahrungsaufnahme werden von hier aus Musterbildungs- und Differenzierungsvorgänge entlang der apikobasalen Achse gesteuert. Transplantationsexperimente demonstrierten, daß hypostomales Gewebe induktive Fähigkeiten besitzt, d.h. eine sekundäre Achse aus Gewebe des Wirtstieres organisieren

kann (Browne 1909; MacWilliams 1983b). Der sogenannte Kopforrganisator befindet sich am apikalen Pol des Hypostoms und ist eine molekulare Funktionseinheit, die durch Sekretion von Signalproteinen morphogenetische Gradienten entlang der Körperachse aufbaut (MacWilliams 1983a, b, Zusammenfassung in Broun und Bode 2002). Daher ist der Kopforrganisator von *Hydra* den embryonalen Organisatoren der höheren Metazoa vergleichbar, welche die embryonalen und adulten Körperachsen spezifizieren. Es ist unklar, ob sich solche Signalzentren in Laufe der Evolution mehrmals unabhängig voneinander entwickelt haben oder einen gemeinsamen Vorläufer besitzen; der Spemann–Mangold–Organisator wird als spezifische Entwicklung der Wirbeltiere postuliert (Kourakis und Smith 2005).

Der permanente Organisator im adulten Polypen übernimmt entsprechend eine konstitutive Funktion bei der Musterbildung: Das Tier erneuert sich kontinuierlich innerhalb von wenigen Tagen durch die Proliferation der 3 Stammzelllinien selbst, mit der stärksten Mitoseaktivität im mittleren Gastralbereich. Dies verursacht einen Gewebefluß in Richtung Kopf, Knospe und Fuß; an den Tentakelspitzen und an der Basalscheibe lösen sich die alten Zellen ab (Campbell 1967, 1973). Der Kopforrganisator induziert und koordiniert die Migrations- und Differenzierungsprozesse durch die Ausschüttung von Morphogenen. Die *de novo*-Bildung des Organisators findet im Embryo und auch in der sich ausstülpenden Knospe statt (zusammengefaßt in Bode 2003).

Diese Gewebeplastizität begründet die große regenerative Kapazität *Hydras*; fehlende Körperteile werden durch morphallaktische Prozesse ersetzt (Wolpert 2002), was durch die noch im Nachbargewebe vorhandenen morphogenetischen Informationen gesteuert wird. Aber auch in Abwesenheit äußerer morphogenetischer Gradienten kann Regeneration auftreten: Durch Dissoziation der Polypen gewonnene Einzelzellen können reaggregiert und komplette Tiere regenerieren (zusammengefaßt in Holstein et al. 2003). Durch diese bemerkenswerten Fähigkeiten avancierte *Hydra* zu einem Modell für Embryonalentwicklung, Regeneration und selbst-organisierende Musterbildung gleichermaßen.

***Hydra* und das Reaktions–Diffusions–Modell der Musterbildung**

Hydra ist ein Paradebeispiel für ein Modell der Musterbildung nach Reaktions–Diffusions–Prozessen aus einem homogenen, morphogenetischen Feld, wie es von Turing 1952 erstmals entwickelt wurde und die Entstehung von Punkt- oder streifenförmigen Strukturen in Tieren beschreibt. H. Meinhardt und A. Gierer vereinigten es mit dem Konzept Wolperts über durch morphogenetische Gradienten bereitgestellte Positionsinformation (Wolpert

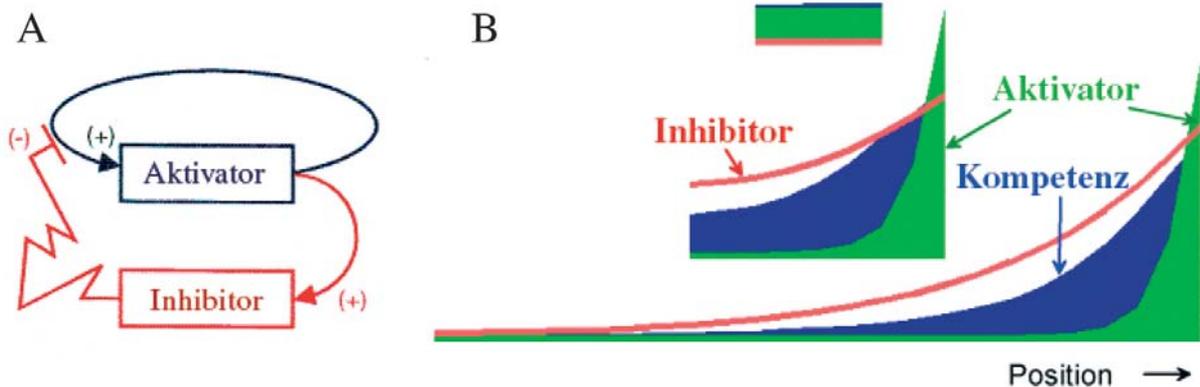


Abbildung 1.7. Das Aktivator–Inhibitor–Modell der Musterbildung. (A) Zwei Substanzen mit unterschiedlicher Diffusionsreichweite stehen in einer negativen Rückkopplungsschleife: Der Aktivator katalysiert seine eigene Produktion und die eines Inhibitors (Autokatalyse). Der Inhibitor hemmt die Produktion und Autokatalyse des Aktivators. Nach Meinhardt und Gierer (2000). (B) Das dynamische Gleichgewicht im Aktivator–Inhibitor–System generiert Positionsinformation im Gewebe: Leichter Überschuß des Aktivators führt zur Etablierung eines Aktivatorzentrums mit umgebender Inhibitor-domäne (v.o.n.u.). Die dadurch entstehenden Gradienten produzieren verschiedene Positionswerte für jeden Ort im System ('source density'), mit dem höchsten Wert im Aktivatorzentrum. Dies wiederum bedingt die unterschiedliche Kompetenz jeder Position, die Autokatalyse zu starten. Verändert nach <http://www.eb.tuebingen.mpg.de/dept4/meinhardt/competen.html>.

1969). In erweiterter Form wurde 1972 ein Reaktions–Diffusions–Modell für *Hydra* vorgeschlagen (Gierer und Meinhardt 1972; zusammengefaßt in Meinhardt und Gierer 2000).

Die einfachste, molekulare Form dieses Modells beschreibt einen autokatalytischen Aktivator mit kurzer Diffusionsreichweite, der die Produktion eines langreichweitigen Inhibitors kontrolliert, welcher wiederum den Aktivator limitiert (Abbildung 1.7). Dies destabilisiert die anfänglich homogene Verteilung der Faktoren, und ein kleiner Aktivator–Überschuß genügt für die zunehmende Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite des Aktivators. Dieser wiederum induziert eine höhere Inhibitor-konzentration, welcher in die Umgebung diffundiert und hier die Aktivatorproduktion unterdrückt. Sobald der Aktivator in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem umgebenden Inhibitorbereich steht, ist eine stabile Situation erreicht.

Der *Hydra*–Kopforganisator entspricht hervorragend dem selbsterhaltenden Aktivatorzentrum des Gierer–Meinhardt–Modells. Die parallelen, meßbaren Kopfkaktivations– und Kopfinhibitionsgradienten entlang der oral–aboralen Achse repräsentieren ein stabile Eigenschaft des Gewebes, den Gradienten von Positionswerten oder die Quelledichte. Dieses Konzept beschreibt Quellen (Zellen) im Gewebe, die den Aktivator produzieren (Meinhardt 1993) und bestimmen, wie kompetent das Gewebe zur Bildung oder Unterdrückung von Kopfstrukturen ist. Der höchste Positionswert markiert dabei den Kopf bzw. den Organisator, der niedrigste

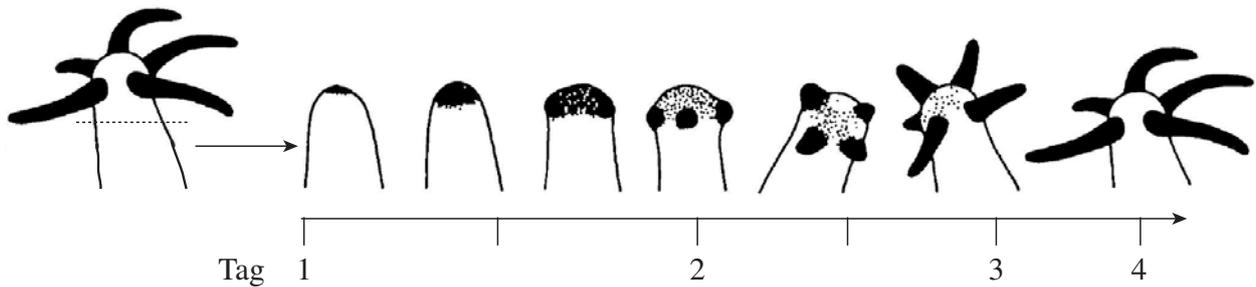


Abbildung 1.8. Kopfregeneration bei *Hydra*. Nach Enthauptung unterhalb des Tentakelkranzes und Wundverschluß steigt der Positionswert und damit das Kopfaktivationspotential in der regenerierenden Spitze, was zunächst zur Tentakelaktivierung (schwarz) und nachfolgend zur Hypostomaktivierung und Reetablierung des Kopforganisators führt, mit anschließender Differenzierung von Hypostom und Tentakeln. Verändert nach Bode et al. (1988).

Positionswert den Fuß von *Hydra*.

Die molekulare Identität von Aktivator und Inhibitor sind jedoch bis heute nicht zweifelsfrei geklärt, ebensowenig, in welcher Form und Menge sie auftreten.

Organisator–Regeneration und das Aktivator–Inhibitor–Modell

Eine enthauptete *Hydra* regeneriert innerhalb von 3 Tagen einen Kopf mit kompletten Strukturen. Im Gegensatz zur Knospung, bei welcher sich der Kopforganisator *de novo* aus einem Bereich bildet, der durch niedriges Kopfaktivations– als auch Kopfinhibitionspotential gekennzeichnet ist (Berking 2003; Meinhardt 1993), ist dies bei der Kopfregeneration erleichtert, da hier die noch bestehenden hohen Positionswerte des umgebenden Gewebes die erneute Autokatalyse des Aktivators beschleunigen.

Das Entfernen des Kopfes bewirkt den Verlust des Organisators bzw. der von ihm produzierten Morphogene (Aktivator+Inhibitor). Die Autokatalyse des Kopfaktivators muß neu gestartet werden. Es wird nach einem 2–Part–Modell angenommen, daß sich die Kopfaktivierung und –inhibition aus zwei Systemen, der Hypostom– und Tentakelaktivierung bzw. –inhibition mit eigenen Morphogenen zusammensetzt (Meinhardt 1993). Das Hypostomsystem ist dem maximal möglichen Positionswert zugeordnet und steht damit hierarchisch über dem Tentakelsystem mit den nächstniedrigen Positionswerten. Das theoretische Modell sagt voraus, daß sich im enthaupteten Polypen im verbleibenden, apikalen Gewebe der Tentakelaktivator durch Autokatalyse schneller reetablieren kann als der Hypostomaktivator, da der die Aktivierung unterdrückende Tentakelinhibitor eine kürzere Halbwertszeit als der Hypostominhibitor besitzt. Die Tentakelaktivationszone besetzt daher zunächst die apikale,

regenerierende Spitze, bis sie vom später gebildeten Hypostomaktivator bzw. dem maximalen Positionswert ringförmig nach basal verdrängt wird (Abbildung 1.8, Bode et al. 1988; Meinhardt 1993). Die stabile Quelldichte wird sodann langsam wieder angepaßt. Dieses Modell erklärt das frühe Auftreten tentakelspezifischer Gene bei der Kopfregeneration an der apikalen Spitze (Bode et al. 1988; Reinhardt et al. 2004; Technau et al. 2005). Im Gegensatz dazu bildet sich der Hypostomaktivator **vor** dem Tentakelaktivator bei der sich ausstülpenden Knospe sowie bei sehr tief geschnittenen Kopfregeneraten, da hier der Hypostominhibitor ohnehin sehr gering konzentriert ist.

Die Neubildung des Kopforganisators während dieser Prozesse verleiht dem regenerierenden Gewebe mit steigendem Positionswert sukzessive höhere induktive Fähigkeiten, welche nach 8 Stunden das Maximum erreichen (MacWilliams 1983b); diese Zeit wird daher als Neubildungszeit für den Organisator angenommen.

Die Fußregeneration bei *Hydra* verläuft innerhalb von 2 Tagen, also schneller als die Kopfregeneration. Es wird kontrovers diskutiert, ob der Fuß einen eigenen, spiegelbildlichen Organisator mit entsprechendem Fußaktivator und –inhibitor enthält (Berking 2003; Bode und Bode 1984; MacWilliams 1983a, b). Generell etabliert sich ein Fuß beim niedrigsten Positionswert. In seiner gegenwärtigen Form kann das Gierer–Meinhardt–Modell nicht die *de novo*–Entstehung des Fußes bei der Knospe erklären. Eine diesbezüglich angepaßte Version wurde von Berking (2003) vorgeschlagen, welche die Knospenbildung aus einem bereits komplett angelegten Knospenfeld mit ringförmigen Feldern aller möglichen Positionswerte simulieren kann. Dieses Modell postuliert, daß die Morphogene primär die lokalen Positionswerte anstatt direkt die Kopf– und Fußdifferenzierung über ihre Gradienten kontrollieren. In der Konsequenz redefiniert es den Kopforganisator als Ort der maximalen Expression von positionswertändernden Morphogenen, die das einzige Musterbildungssystem bei *Hydra* darstellen. Die Fuß– und Kopfregeneration erklärt sich hierbei über subtile Diffusionsprozesse dieser im Wundbereich aufregulierten Morphogene, in Abhängigkeit vom Positionswert des Nachbargewebes. Dadurch werden der finale Positionswert entsprechend der ursprünglichen axialen Polarität wieder hergestellt und die Differenzierungsprozesse in Gang gesetzt.

BMP– und Wnt–Signaltransduktion bei *Hydra* und anderen Cnidariern

Für die Präsenz der achseninduzierenden Signale der Bilaterier, die BMP– und Wnt–Signalkaskaden, gibt es in den diploblastischen Cnidariern genügend Hinweise und auch für eine zumindest ähnliche Funktion (Hayward et al. 2002; Hobmayer et al. 2000; Kusserow et al.

2005; Matus et al. 2006a; Reinhardt et al. 2004; Rentzsch et al. 2006; Samuel et al. 2001). In *Hydra* ist die ‘kanonische’ Wnt-Signaltransduktion in der Etablierung des Kopforgansators und der oral-aboralen Achse involviert (Broun et al. 2005; Hobmayer et al. 2000). Gestützt wird dies durch ähnliche Resultate aus *Hydractinia* (Plickert et al. 2006), einer anderen Hydrozoen-Art. Die hypostomale Expression von *hywnt3a* und die autokatalytische Aktivierungsfähigkeit von Wnt-Proteinen prädestinieren HyWnt3a als Komponente des Aktivatorzentrums nach dem Gierer-Meinhardt-Modell. In *Nematostella vectensis* regionalisieren verschiedene Wnt-Liganden die larvale, oral-aborale Achse durch gestapelte Expression, was an die zeitlich-räumlich regulierten Hox-Domänen entlang der anteroposterioren Achse der Bilateria erinnert (Guder et al. 2006a; Kusserow et al. 2005).

Den Hinweis auf eine Konservierung der BMP-Signalkaskade in *Hydra* geben ein apikal-spezifisches, Chordin-ähnliches Molekül (Rentzsch 2001) sowie BMP5-8-Orthologe, welche vermutlich in der aboralen Musterbildung involviert sind (Reinhardt et al. 2004).

Diese Resultate, sowie die asymmetrische Expression eines BMP2/4-Orthologs in den Anthozoen *Acropora* und *Nematostella* während der Gastrulation und das ebenfalls differentiell exprimierte *Nematostella*-Chordin lassen darauf schließen, daß zumindest ein durch den BMP-Antagonismus etablierter morphogenetischer Gradient ein ancestrales Merkmal der Metazoa ist (Hayward et al. 2002; Matus et al. 2006a; Rentzsch et al. 2006).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die Kenntnis der molekularen Struktur des Kopforgansators bei *Hydra* sowie der Signalprozesse, die zu seiner Entstehung führen und bei der Achsendifferenzierung involviert sind, kann einen wichtigen Beitrag zur Beschreibung des Körperbauplans eines ancestralen, axial organisierten Tieres sowie zur Evolution der rezenten Formen liefern. Die Fragen, die mit der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollen, sind daher:

1) Welche sekretierten Signalmoleküle werden im Kopforgansator produziert, bzw. sind an seiner Entstehung und Erhaltung beteiligt?

Zur Beantwortung dieser Frage sollte eine cDNA-Bibliothek aus Organisationspezifischem Gewebe hergestellt und sequenziert werden.

2) Inwieweit lassen sich die von Rentzsch (2001) und Hobmayer et al. (2000) implizierten Rollen für Wnt- und BMP-Signaltransduktion bei der Achsenentwicklung von *Hydra* bestätigen und erweitern?

Eine Auswahl an Organisationsmolekülen aus 1), welche mit Wnt- und BMP-Signaltransduktion

in Zusammenhang zu bringen sind, sollte durch Analyse ihrer Expressionsmuster charakterisiert werden. Außerdem sollte das Chordin-verwandte Molekül HyChdl (Rentzsch 2001) in funktionellen Analysen weiter charakterisiert werden.

3) Lassen sich aus der Beantwortung obiger Fragen neue Erkenntnisse für die Evolution der Musterbildung, speziell der Körpersymmetrie gewinnen?

Eventuelle konservierte Mechanismen bei der Achsenbildung sollten durch Vergleich der Organisator-Signalmoleküle/-wege mit denen der Bilateria gefunden und beschrieben werden.

Teil II

Ergebnisse

2 Die Identifizierung von Genen des *Hydra* Kopforganisators

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Suche und Isolierung von Genen, die für Proteine kodieren, welche instruktive Funktionen in der Regeneration, Neubildung und Erhaltung des sogenannten Kopforganisators und damit der oral–aboralen Körperachse von *Hydra* besitzen. Grundgedanke eines solchen ‘Screenings’ war es, die molekulare Zusammensetzung der bisher nur empirisch beschriebenen Kopforganisorregion zu bestimmen und damit die hier wirkenden Signalnetzwerke zu identifizieren und mit denen der Vertebraten–Embryogenese zu vergleichen.

Die morphogenetischen Prozesse der Musterbildung, deren Steuerung vermutlich durch den Kopforganisor erfolgt, werden meist durch das Vorhandensein von extrazellulären Signalproteinen und ihren zugehörigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche initiiert und reguliert. Als erste Herangehensweise wurde daher eine DNA-basierte ‘Screening’–Methode gewählt, die spezifisch auf sekretierte Signalmoleküle abzielt. Das sogenannte Signalpeptid–Selektions–‘Screening’ (‘signal peptide secretion screen’) wurde erfolgreich für andere Gewebe und Organismen angewandt (Crosier et al. 2001; Jacobs et al. 1997; Klein et al. 1996; Lee et al. 2001) und kürzlich auch für *Hydra* publiziert (Böttger et al. 2006). Es benutzt das für die Zucker–Metabolisierung verantwortliche Invertase–System der Bäckerhefe (‘yeast’, *Saccharomyces cerevisiae*), um aus einer cDNA–Bibliothek diejenigen DNA–Abschnitte zu identifizieren, die für ein Signalpeptid codieren und damit auf ein sekretiertes Protein hinweisen. So identifizierte DNA–Sequenzen aus dem Kopforganisor sollten vervollständigt und die interessantesten Kandidaten schließlich in Expressionsstudien charakterisiert werden.

Mit einer zweiten, alternativen Strategie wurde ein weniger fokussierter Ansatz verfolgt: Es sollte eine allgemeine cDNA–Bibliothek hergestellt werden, die für ‘expressed sequence tags’ (ESTs) aus dem Kopforganisor–Bereich von *Hydra* kodiert. Diese kann anschließend durch Assemblierungs– und Annotierungsverfahren mittels moderner bioinformatischer Methoden auf interessante Gene hin durchsucht werden. Mit diesem Projekt wurde im Rahmen dieser Arbeit an einer internationalen, zentral verwalteten Initiative zur Charakterisierung des *Hydra*–Transkriptoms teilgenommen (‘The Hydra EST project’).

2.1 Der Signalpeptid-Sekretions-‘Screen’

Herstellung einer Kopforganisator-spezifischen cDNA-Bibliothek aus *Hydra magnipapillata* sf-1

Unter den sekretierten Proteinen eines Gewebes können die die Signalkaskaden steuernden Liganden anteilmäßig einen sehr geringen Teil ausmachen. Es galt daher, diese von den übrigen Extrazellulärmatrix-Proteinen mit physiologischen und strukturellen Funktionen abzutrennen. Für die cDNA-Bibliothek wurde deshalb der temperatursensitive *H. magnipapillata*-Stamm sf-1 benutzt. Dieser verliert durch einen Anstieg der Kulturtemperatur um ca. 10 Grad seine interstitiellen Stammzellen (i-Zellen) und damit sukzessive den Pool an Vorläuferzellen für Derivate wie Nervenzellen, Drüsenzellen und Nematocyten (Sugiyama und Fujisawa 1978a), die einen großen Teil der sekretierten Proteine produzieren. Besonders die Nematocyten, die sehr viele strukturelle Kapselproteine sezernieren, können dadurch eliminiert werden. Es wurde gezeigt, daß die Musterbildungsprozesse bei *Hydra* hauptsächlich von der ekto- und endodermalen Zelllinie abhängen (Sugiyama und Fujisawa 1978a, b), daher werden Morphogene v.a. in den epithelialen Zellen vermutet. Um eine ausgeglichene Repräsentanz der in morphogenetische Prozesse involvierten Proteine sowie von sekretierten Matrixproteinen zu erlangen, wurden deshalb hitzebehandelte sf-1 Polypen verwendet, die weniger i-Zellderivate besitzen.

Für die Anreicherung von Organisator-spezifischen Genen aus *Hydra* wurden zwei Ansätze verfolgt, die zum einen den etablierten, sich selbst erhaltenden Organisator und zum anderen den sich neu bildenden Organisator während der Regeneration des Kopfes adressieren. Ca. 24.400 weitgehend knospenlose, hitzegeschockte sf-1 Polypen wurden unterhalb des Tentakelkranzes enthauptet. Die Köpfe mit dem Organisator wurden für die mRNA-Gewinnung benutzt. Die Stümpfe regenerierten über höchstens 24 Stunden und innerhalb dieses Zeitraums wurden ca. 17.100 regenerierende Spitzen zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert, die verschiedene Stadien eines sich wieder bildenden Organisators repräsentierten (Abbildung 2.1 und Tabelle 2.1). Frühe Regenerationsstadien wurden verstärkt verwendet, da angenommen wird, daß binnen 6 Stunden Regeneration die meisten Organisator-relevanten Gene exprimiert werden.

Aus diesem Organisator- und regenerationsspezifischen Gewebe wurde Poly(A)⁺RNA extrahiert, in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und daraus Fragmente zwischen 100 und 1000 Basenpaaren (Bp) Länge selektiert, da DNA-Abschnitte dieser Länge für Signalpep-

Regenerationszeit	reg. Spitzen	
	absolut	[%]
1-2 hr	1340	3,2
2-3 hr	1520	3,7
3-4 hr	2245	5,4
4-5 hr	2500	6,0
5-6 hr	2180	5,2
6-7 hr	650	1,6
7-8 hr	502	1,2
8-9 hr	954	2,3
9-10 hr	270	0,6
10-11 hr	1220	2,9
11-12 hr	1214	2,9
12-13 hr	2080	5,0
18-24 hr	500	1,2

Tabelle 2.1. Zusammensetzung des Materials für die Organisator-spezifische cDNA-Bibliothek (‘secretion screen’)

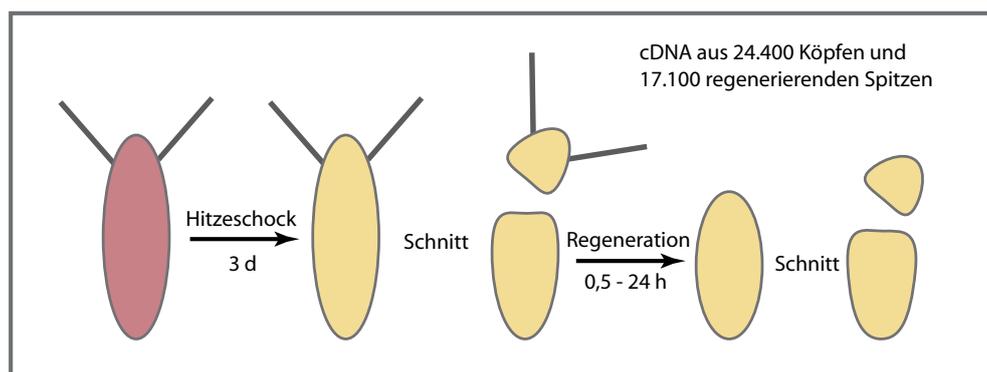


Abbildung 2.1. Gewebearreicherung für Organisator-spezifische cDNA-Bibliothek

tide kodieren sollten, ohne aber zu viel Information für nachfolgende, die Faltung störende Proteinmotive zu enthalten.

‘Screening’ der Organisator-spezifischen cDNA-Bibliothek in Hefe

Das ‘Screening’ der Bibliothek auf Signalpeptid-codierende Sequenzen erfolgte in Hefe und beruhte auf der Fähigkeit komplementierter Hefezellen, auf Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen: Hefe besitzt das sezernierte Enzym Invertase (SUC2), welches u.a. das Trisaccharid Raffinose durch Hydrolyse für die Hefezelle verfügbar macht. Der Expressionsvektor pSUC2T7F1ori kodiert für Invertase ohne Startcodon und kann daher für die Fusion mit Signalpeptid-kodierenden Sequenzen genutzt werden. Die Strategie ist in Abbildung 2.2

verdeutlicht.

Um die cDNA-Bibliothek aus *Hydra* in Hefe zu durchsuchen, wurde cDNA-Bibliothek für einen Vorabversuch amplifiziert, die Plasmid-DNA isoliert und damit Zellen des *SUC2*- und Tryptophanbiosynthese-defizienten Hefestammes YTK12 (Genetics Institute, USA) transformiert. Nach der Selektion auf Raffinose zeigten Kontroll-PCRs an willkürlich ausgewählten Klonen, daß die Insertgröße der cDNA-Fragmente in der Hefe durchschnittlich nur 300 Bp betrug, demnach trat eine deutliche Tendenz zu kleineren Inserts auf.

Charakterisierung Sekretions-positiver Klone

Aus den insgesamt ≈ 400.000 erhaltenen Hefe-Primärtransformanten konnten 336 *SUC2*-positive Transformanten ('colony forming units', CFU) auf Raffinose isoliert werden. Dies entsprach mit 0,082 % knapp einer Größenordnung mehr als dem Erwartungswert von ca. 0,0086 % (Jacobs et al. 1997), was entweder der Amplifikation der cDNA-Bank zuzuschreiben ist oder aber die erfolgreiche Anreicherung sekretierenden Gewebes reflektiert. Davon wurden die Insertionsfragmente aus 153 CFU erfolgreich von einer oder beiden Seiten sequenziert. Anschließend erfolgte die bioinformatische Aufarbeitung: Da die cDNA-Bank nicht normalisiert war, mußte mit überrepräsentierten Fragmenten gerechnet werden, abhängig von der Expressionsstärke der Gene zum Zeitpunkt der mRNA-Isolierung. Die 153 Fragmente wurden in 30 Gruppen (Cluster) zusammengefaßt. Diese Sequenzen sollten nun hauptsächlich aminoterminale Enden von sekretierten Proteinen kodieren und waren durchschnittlich 369 Bp lang. Erste Datenbank-Analysen (tblastx) gaben z.T. Aufschluß über die Identität der kodierten Proteine. Die abgeleitete Aminosäuresequenz enthüllte, ob tatsächlich ein Signalpeptid isoliert worden war. Dazu wurde die Aminosäuresequenz mit dem SignalP3.0 Server¹ überprüft, der sowohl physikochemische als auch empirische Daten zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid mit einbezieht. Durch diese Analyse ließ sich der Anteil von falsch-positiven Klonen zu bestimmen, der laut Literatur bei etwa 20 % liegen würde (Jacobs et al. 1997). Grund hierfür ist die mangelnde Konservierung der Signalpeptide von sekretierten Proteinen; sie werden am N-Terminus durch eine Folge von hydrophoben Aminosäuren auf einer Länge von etwa 20 Resten charakterisiert. Solche Bereiche können allerdings auch innerhalb von Proteinen vorkommen, was in Falsch-Positiven resultieren kann (Kaiser et al. 1987). Eine weitere Quelle für falsch-positive Klone sind cDNA-Fragmente, die bei Fusion an den Invertase-Leserahmen im richtigen Leseraster ein Start-Methionin liefern.

¹<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

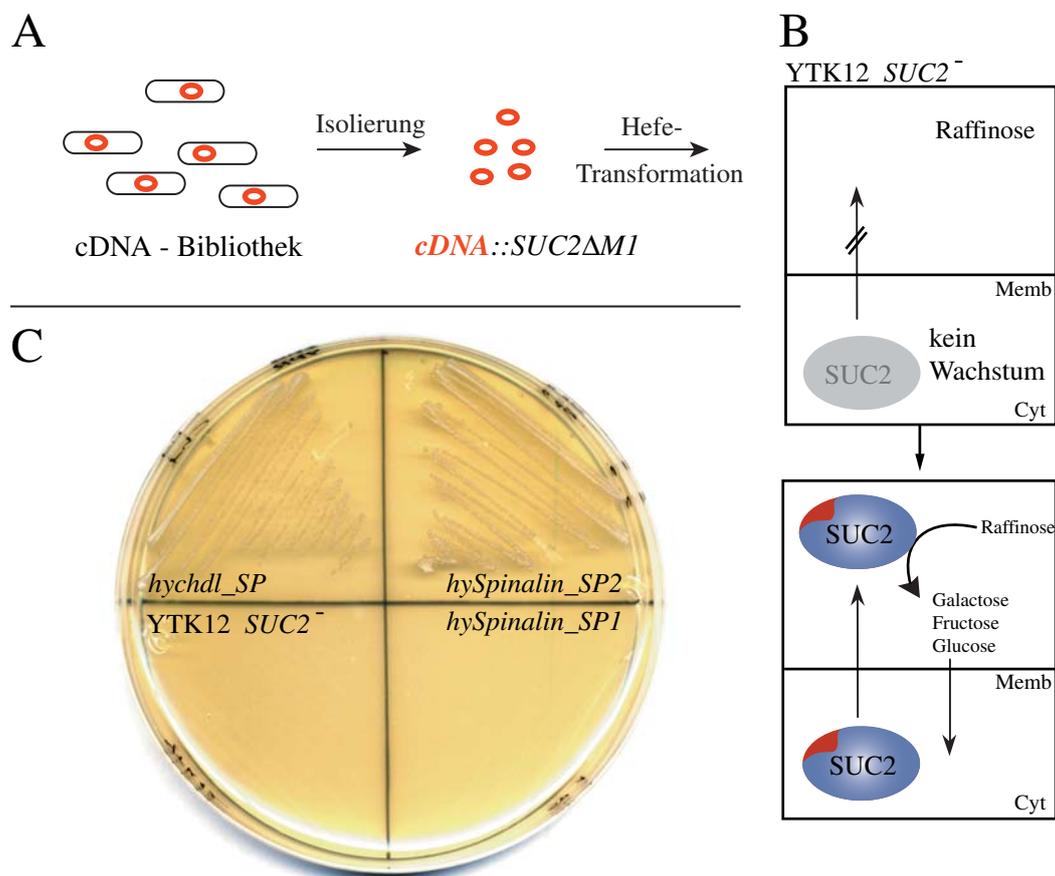


Abbildung 2.2. Prinzip des Signalpeptid-Sekretions-‘Screenings’. Mit der aus *E. coli* präparierten *Hydra*-Primärbibliothek (**A**) wurde der Invertase-defiziente Hefestamm YTK12 (*SUC*⁻) transformiert (**B**). Sofern die cDNA-Fragmente für Signalpeptide kodieren, wird Invertase produziert und sekretiert, was die Hefezelle zum Wachstum auf Raffinose befähigt. (**C**) Komplementation der *SUC2*-Defizienz am Beispiel des Signalpeptids von *Hydra* Chordin-like (*hychdl-SP*, Rentzsch 2001) und *Hydra* Spinalin (Hellstern et al. 2006; Koch et al. 1998). *hySpinalin-SP1* codiert dabei für eine kürzere Sequenz als *hySpinalin-SP2*, welche das vollständige Signalpeptid enthält. YTK12 (*SUC*⁻) allein ist nicht fähig, auf Raffinose zu wachsen. Memb=Zellmembran, Cyt=Cytosol.

Dies befähigt die transformierte Hefezelle, eine intrazelluläre Form der Invertase zu produzieren, welche den zu einem gewissen Anteil endocytierten Zucker intrazellulär hydrolysieren und dem Stoffwechsel zugänglich machen kann (Carlson und Botstein 1982). Die Analyse der 30 Cluster zeigte, daß 7 von 30 (23 %) Contigs falsch-positive Klone repräsentierten (Tabelle 2.2).

Klon	Anzahl ESTs/Cluster		Gesamtlänge [Bp]	Aminosäuresequenz Signalpeptid
	absolut	[%]		
SP1	21	13,7	203	MRFLAVLLVVAAFVAFSEA
SP2	16	10,5	556	MILSLFLAFGILSVAAG
SP3	14	9,2	268	MRPRVRLILFVALVVVITYA
SP4	13	8,5	532	f.p
SP5	10	6,5	519	MMKTLFFLSILVATMTTASA
SP6	9	5,9	360	MIKVLGFLILSSLCFA
SP7	8	5,2	207	MRFVLHVLFASILVLPPTIES
SP8	8	5,2	514	MAKVCAFFAFVFFVGVVAHA
SP9	6	3,9	243	MRSTSLILFVAIVALTYA
SP10	6	3,9	858	MKVFCALLLLGVTLA
SP11	6	3,9	383	MKIFILFAFVSVIAT
SP12	5	3,3	473	f.p
SP13	4	2,6	271	MKLMNAFTIVVISSVASG
SP14	4	2,6	294	MHLILAAMISIATA
SP15	3	2,0	286	MNFPLFFLSFIILYIKKTYT
SP16	3	2,0	373	MAMRLVLAACLVLGVAATQA
SP17	3	2,0	545	MRTIFVLSVLVATITTTASA
SP18	2	1,3	709	MIKLNIFMLVFWVCKIWQCNG
SP19	1	0,7	128	f.p
SP20	1	0,7	364	MMSVTIFVLAFIAFAQC
SP21	1	0,7	323	f.p
SP22	1	0,7	223	MKSTVILFIILCIVCSEG
SP23	1	0,7	286	f.p
SP24	1	0,7	585	MKIITIVVCLLFGEWIQA
SP25	1	0,7	165	MRSIAAFLFFAVANA
SP26	1	0,7	418	MNSVIVFIALIGLSFG
SP27	1	0,7	350	MMYSFLVFAATVALVSG
SP28	1	0,7	332	f.p
SP29	1	0,7	227	MYVAIQAVLSLYASGRTTG
SP30	1	0,7	235	MRTVVFFILVSIFLVALKPTGTQA

Tabelle 2.2. Ergebnisse des Signalpeptidsekretions-‘Screenings’. Die Cluster sind geordnet nach der Häufigkeit der ESTs, angegeben in absoluter Anzahl und [%]. Die Signalpeptidsequenzen sind angegeben bis zu ihrer putativen Abspaltungsstelle (SignalP3.0). Die angegebene Länge in Basenpaaren [Bp] stellt die Gesamt-Sequenzinformation eines Clusters dar. f.p.=falsch-positiv.

Viele der Contigs waren zu kurz, um genügend konservierte Information für Datenbankabgleiche zu besitzen, insbesondere, da die N-Termini von Proteinen generell geringer konser-

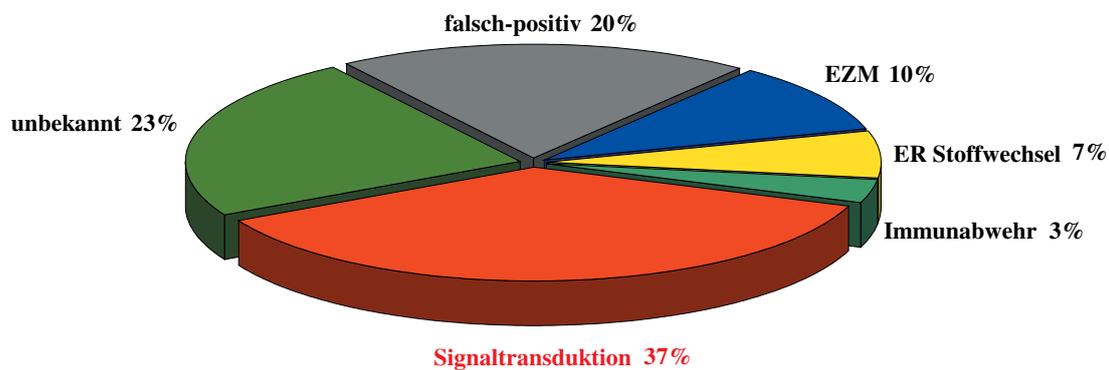


Abbildung 2.3. Funktionelle Repräsentanz der Klone aus dem Signalpeptid-Sekretions-‘Screening’. ER = Endoplasmatisches Retikulum; EZM = Extrazellulärmatrix.

viert sind. Mit Veröffentlichung des *Hydra*-EST-Projekts (siehe Abschnitt 2.2) wurde es jedoch möglich, die Cluster aus dem Sekretions-‘Screening’ durch blastn-Analysen zu verlängern. Die Gesamtsequenzen der 30 Gruppen wurden mit passenden EST-Fragmenten aus der Datenbank zu einer Konsensussequenz zusammengesetzt (assembliert) und über ihre Aminosäuresequenzen die Identität der Proteine bestimmt (Tabelle 2.3). Bioinformatische Analysen gaben zudem Aufschluß über bestimmte Eigenschaften der Proteine sowie über das Vorhandensein von konservierten Domänen (Tabelle 2.3).

Die meisten gefundenen Proteine dieses vorläufigen ‘Screenings’ konnten der Gruppe ‘Signaltransduktion’ zugeordnet werden (Abbildung 2.3), was sich prinzipiell auf Zell-Zell-Kommunikationsprozesse bezieht. Es handelte sich dabei v.a. um Proteasen und 2 Dickkopf-ähnliche Liganden. Von einer Wiederholung des Pilot-‘Screenings’ in größerem Maßstab wurde abgesehen (siehe Abschnitt 2.2 und Diskussion).

Klon	Länge mRNA [Bp]	Länge Protein [As]	Annotation	e-Wert	PredictProtein
SP1	396	92	Dickkopf-ähnlich (<i>hyDkk1/2/4-4</i>)	1,00E-35	Coiled-coil-Domäne, keine TM Domäne, globular, keine Cysteinreste
SP2	823	231	Elastase 3		
SP3	441	91	keine Ähnlichkeit		
SP4	1412	209	partielle Ähnlichkeit zu Microtubule- <i>Actin crosslinking protein</i>	5,00E-21	
SP5	1176	313	Serinprotease	2,00E-40	
SP6	700	149	Cystatin	1,00E-03	
SP7	500	95	keine Ähnlichkeit		Disulfidbrücken, globular
SP8	1553	403	Rhamnose-binding Lectin	1,00E-45	4 Gal-Lectin Domänen
SP9	444	90	keine Ähnlichkeit		74 % Ähnlichkeit zu SP3, gleiche Eigenschaften
SP10	1169	293	<i>Hydra Cathepsin</i>		
SP11	1606	405	Proteindisulfidisomerase	3,00E-100	
SP12	1093	120	Caspase 3B	6,00E-43	
SP13	685	193	keine Ähnlichkeit		PLAC Domäne, evtl. 3 Cystein-reiche Motive
SP14	478	101	keine Ähnlichkeit		kompakt, Disulfidbrücken
SP15	664	169	keine Ähnlichkeit		Transmembrandomäne, globular, Disulfidbrücken, Prokaryotische Lipoprotein-Lipid-Anheftungsstelle
SP16	682	149	<i>Hydra NCo11</i> (Minikollagen)		
SP17	1103	326	Serinprotease	2,00E-38	
SP18	1102	351	Trypsin-like Serinprotease	2,00E-45	
SP19	431	50	keine Ähnlichkeit		
SP20	1283	387	Calreticulin	1,00E-116	
SP21	1152	101	keine Ähnlichkeit		
SP22	534	95	Dickkopf-ähnlich (<i>hyDkk1/2/4-C</i>)		
SP23	666	56	<i>Ribosomales Protein S29</i>	1,00E-16	
SP24	719	203	Astacin-like Metalloprotease	2,00E-55	
SP25	714	149	Minikollagen (≠Hydra NCo11-4)	0,36	
SP26	646	140	Cystatin	4,00E-05	
SP27	350	mind. 71	'sexually induced protein 2'	7,00E-16	
SP28	1362	331	<i>PRPF38B protein</i>	1,00E-67	
SP29	993	314	<i>Hydra Actin</i>		
SP30	534	84	Theromacin	1,00E-04	

Tabelle 2.3. Identität der sekretionspositiven Klone. Angegeben sind die Transkript- und Proteinlängen (Bp bzw. As), sowie die durch blastp oder tblastx ausgegebenen Annotationen, zusammen mit zugehörigen Expect (e)-Werten. e-Werte $>10^{-03}$ wurden nicht berücksichtigt (=keine Ähnlichkeit). SP27 konnte weder mit der EST- noch der Genom-Datenbank vervollständigt werden. Falsch-Positive sind grün, bereits identifizierte *Hydra* Proteine blau gekennzeichnet.

2.2 Das ‘Darmstadt *Hydra*–EST–Projekt’

Im Zuge des gemeinsamen Bemühens mehrerer *Hydra*–Arbeitsgruppen, das Transkriptom von *Hydra* verfügbar zu machen, wurde eine Organismator–spezifische EST–Bibliothek hergestellt. Da Signalproteine in *Hydra* eher schwach exprimiert sind, kann durch diese Gewebeanreicherung die etwas verstärkte Präsenz der entsprechenden Transkripte gegenüber Haushalts– und Strukturgenen erwartet werden. Das *Hydra* EST–Projekt wurde von Hans Bode und Rob Steele (Irvine, California) koordiniert; die Sequenzierung der Banken fand am Genome Sequencing Center (Washington University School of Medicine, St. Louis) statt. Der Erfolg des Projekts ist entscheidend von der Qualität und Quantität der cDNA–Banken abhängig; die hier beschriebene cDNA–Bibliothek wurde zusammen mit der Firma GATC Biotech, Konstanz, hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gesamt–RNA aus Köpfen und regenerierenden Spitzen des *Hydra magnipapillata* Stammes sf-1 isoliert.

Gewinnung kopfregenerationsspezifischen Materials aus *Hydra magnipapillata* sf-1

Nach der im Abschnitt 2.1 beschriebenen Methode wurde Gesamt–RNA aus Köpfen und regenerierenden Spitzen des Stammes sf-1 extrahiert. Die Polypen wurden dafür nicht hitzebehandelt, da ohnehin ein Normalisierungsschritt bei der Herstellung der cDNA–Bibliothek vorgesehen war. Dadurch läßt sich ein Ausgleich der unterschiedlich stark repräsentierten Transkripte erreichen, so daß seltene mRNA–Spezies nicht mehr von häufigen, für Strukturproteine kodierende Transkripten überlagert werden konnten. Tabelle 2.4 gibt wieder, zu welchen Anteilen verschieden lang regenerierte Spitzen in die RNA–Isolierung einfließen. Insgesamt wurde 210 μ g RNA aus 2190 Köpfen und 2018 kopfregenerierenden Spitzen zur GATC–Biotech AG geschickt. Die Dokumentation der EST–Bibliothek–Herstellung findet sich im Anhang, Seite 163.

Analyse der EST–Daten

Bislang wurden insgesamt 145.105 EST–Fragmente aus allen verfügbaren *Hydra*–EST–Bibliotheken sequenziert und in UniGene (NCBI) implementiert. Diese sind in 10.369 Cluster assembliert². Die ‘Darmstadt EST I’–Bibliothek ist mit 30.715 ESTs vertreten, von denen 25.385 in 5.444 der Cluster klassifiziert wurden. Die Aufarbeitung der EST–Daten aus den

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=6085>

Regenerationszeit	reg. Spitzen	
	absolut	[%]
0,25 h	201	10,0
1 h	226	11,2
4 h	240	11,9
8 h	223	11,1
12 h	180	8,9
16 h	175	8,7
20 h	187	9,3
24 h	220	10,9
28 h	165	8,2
48 h	201	10,0

Tabelle 2.4. Zusammensetzung des Materials für die EST-Bibliothek

einzelnen Banken erfolgt zentralisiert, und ist voraussichtlich Anfang des Jahres 2007 beendet, jedoch gibt diese Arbeit einen Überblick über die organisatorspezifischen Daten (Abbildung 2.4). 17,3 % (941) der Cluster beinhalten sog. Singletons, d.h. bestehen aus nur einem EST; nur 11,2 % umfassen ≥ 10 ESTs. 20,5 % der Cluster finden sich nur in der Darmstadt-Bibliothek. Die in UniGene assemblierten Cluster sind annotiert in Bezug auf die größte Ähnlichkeit bei einer blastx-Analyse im Vergleich mit 8 sequenzierten Organismen³, was Aufschluß über Identität bzw. Ähnlichkeit der durch die Cluster adressierten Gene gibt. Dies ist jedoch limitiert, wenn man in Betracht zieht, daß unter den Invertebraten nur die abgeleiteten Gruppen der Insekten (*D. melanogaster*) und Nematoden (*C. elegans*) berücksichtigt werden und andere Protostomier (z.B. Lochotrophozoen) ganz fehlen.

³<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/FAQ.shtml>

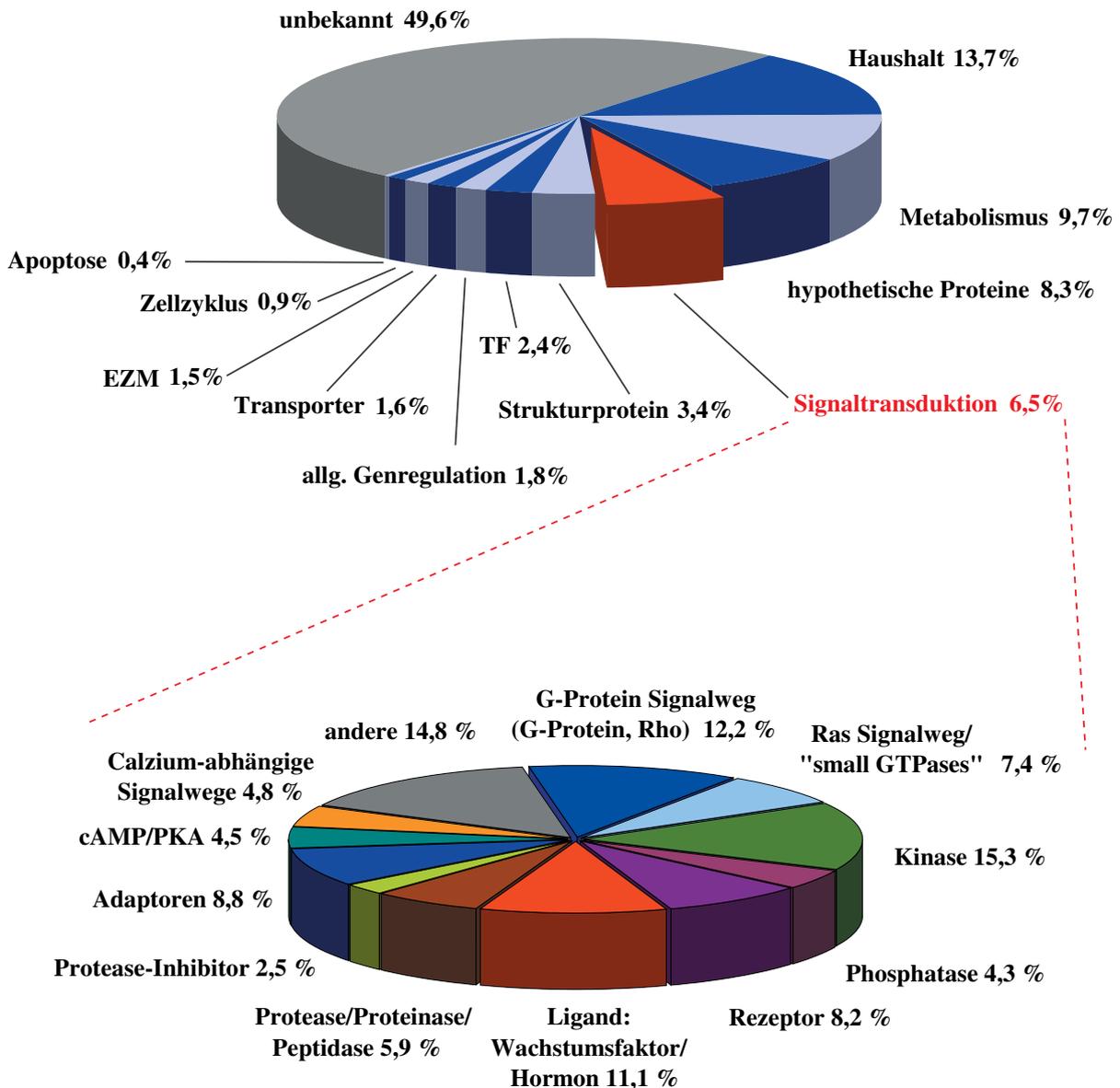


Abbildung 2.4. Funktionelle Repräsentanz der Klone aus der *Hydra* EST-Bibliothek (Darmstadt). (A) Verschiedene funktionelle Kategorien: Signaltransduktion, d.h. Proteine, die an regulatorischen Signalkaskaden in allen Zellkompartimenten einschließlich hormoneller Wege beteiligt sind (mit Ausnahme von Transkriptionsfaktoren und Apoptose-Proteinen); Extrazellulärmatrix-Proteine (EZM); an Apoptose beteiligte Proteine; Strukturproteine (Cytoskelett, Ribosom); Transkriptionsfaktoren (TF); metabolische und biosynthetische Enzyme; Zellzyklusproteine; Haushaltsproteine und schließlich die Gruppe unbekannter Proteine, die keinen Counterpart in den Datenbanken haben. (B) Subklassifizierung der Kategorie 'Signaltransduktion' aus (A). Die Annotationen beziehen sich entweder auf generelle Proteinfunktion (z.B. 'Kinase') oder Zugehörigkeit zu einem bestimmten Signaltransduktionsweg (z.B. 'Ras Signalweg'). cAMP/PKA=cyclisches AMP-abhängige Proteinkinase A. Für die Einzelauflistung der Liganden und Rezeptoren siehe Tabellen A.1 und A.2 im Anhang.

3 Die Charakterisierung Thrombospondin-ähnlicher Moleküle in *Hydra*

In *Hydra* wurden in einem ‘Two-Hybrid-Screening’ mit β -Catenin als Köder 4 Fragmente isoliert, die für ‘Thrombospondin repeat type I’ -Domänen (TSR) kodieren (B. Hobmayer, K. Kuhn, unveröffentlicht); die Interaktion mit β -Catenin bestätigte sich allerdings nicht. Die TSR-Motive sind sehr gut im Menschen beschrieben und sind funktionelle Module vieler verschiedener, hochmodularer Proteine, welche zusammen die Superfamilie der TSR-Proteine konstituieren. Proteine mit TSR-Motiven wurden zunächst bei der Blutplättchen-Aggregation, und bald darauf in einer Fülle von Prozessen der vaskulären Homöostase identifiziert, wie bei der Proliferation, Motilität, der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, der Wundheilung, der Proteolyse von Proteinen und der Inhibition der Angiogenese. Weiterhin sind TSR-enthaltende Proteine in der Extrazellulärmatrix (EZM) des embryonalen und adulten Nervensystems der Vertebraten, aber auch Invertebraten aktiv (zusammengefaßt in Adams und Tucker 2000; Tucker 2004). Besonderes Augenmerk erlangte Thrombospondin-1, ein Multidomänen-Protein mit 3 TSR-Modulen, welches das Wachstum von Tumoren durch Aktivierung von latentem TGF β -Komplex hemmen kann (Miao et al. 2001; Schultz-Cherry und Murphy-Ullrich 1993, zusammengefaßt in Lawler 2002). Das cysteinreiche TSR-Motiv besteht aus ca. 60 Aminosäureresten mit der Konsensussequenz W8, S9, W11, C14, C18, R25, R27, C29, C41, C51 and C56 (Adams und Tucker 2000).

Die TSR-kodierenden cDNA-Fragmente wurden per PCR und *in silico*-Analysen zu 3 verschiedenen TSR-Proteinen vervollständigt und HyTSR1, HyTSR2 und HyTSR-like genannt. Die Expression von *hytsr1* wurde bereits mit einer Sonde gegen eines der cDNA-Fragmente im Hypostom *Hydras* beschrieben (Abbildung 3.1, Rentzsch 2001, siehe auch Miljkovic-Licina et al. 2003).

Da die Modifikation von Signalmolekülen durch Faktoren der Extrazellulärmatrix immer häufiger diskutiert wird und einige TSR-Proteine daran beteiligt sind, lag es nahe, einen eventuellen Zusammenhang zwischen der hypostomalen *hytsr1*-Expression und dem Kopforganisator zu untersuchen; in diesem Rahmen wurden auch die 2 weiteren TSR-Moleküle in Expressionsanalysen studiert.



Abbildung 3.1. *hytsr1*-Expression im Hypostom. ISH: F. Rentzsch.

3.1 Struktur der TSR Typ I-enthaltenden Proteine

Das auffälligste Merkmal dieser 3 Proteine ist die große Anzahl der TSR-Domänen. Vergleicht man diese zunächst untereinander (Abbildung 3.3), so fällt auf, daß die Domänen von HyTSR1 und -2 einander sehr ähnlich sind. Die Sequenzen ihrer TSR-Motive zeigen hohe Konservierung im Vergleich zu anderen Tieren bzw. zum Grundmotiv der TSR Typ I-Module (Adams und Tucker 2000). Die TSR-Repeats aus dem dritten Molekül weichen hingegen in vielen Aminosäurepositionen ab, weswegen es Thrombospondin-Repeat TypI-like Protein (HyTSR-like) genannt wurde. Die TSR-Domänen von HyTSR-like zeigen abgesehen von den konservierten Cysteinresten grundsätzlich größere Variationen des Konsensusmotivs. Da dieser Typus trotz extensiver Datenbank-Recherche bisher in keinem anderen Organismus gefunden worden ist, stellt es aller Voraussicht nach ein *Hydra*- oder Cnidaria-spezifisches Derivat der TSR-Motive dar.

A

HyTSR1

	10	20	30	40	50	60
TSR1	VDGGYGPWSSFSQCSFTCGEGI-SARERTCTNPIPEGTGFDCEKFGPSTETKSKLIVE-CP					
TSR2	INGGLTEWTEFSDCSVTTCGIGF-ATKTRYCTKPPQFGGRDCEG--NLVESKSCQATE-CP					
TSR3	VDGWSWDNDPSVCSATCGSGH-KIKKRLCNPKPAPFGGKDCVG--DAEVTVPFCFTF-CP					
TSR4	VNGGWSQWSGFDDCSKSCGSGL-MKRTRECIDPLEQYGGKQCVG--EVFETIACKLKE-CP					
TSR5	INGQWGAWSDFKSCSVSCGNGV-QSRSRCCNPNPPLGGDVCIG--DHEDDRPCVLS-CP					
TSR6	VDGGYTEWSNFDCTASCGDGI-QSRYRNCNPNPLNNGKDCSSLGNVDIIKCKTAD-CP					
TSR7	IDGKFSEWTSYSSCSVSCGSGT-SYRTRKCNPNPEPQYGGKQCFG--DSLESKICKQIE-CP					
TSR8	VDGGYTEWSTFSFCSVSCGVGT-QSKTRQCTNPNPEHGGKDCSVLGKSEEFQICKQPE-CP					
TSR9	TNGGWSSEFSDCSVTTCGRGI-KTKTRTCTNPNPQFNTPCIG--DSTETIECVLKS-CP					
TSR10	VHGGLSAWSTFSPCSSSCGKGT-QTRTKLCNPNPTMYGGNPCEG--ITVESKECQLIE-CP					
TSR11	VDGGWTKWSEFSECSTTCGSGL-KVKTRSCDTPKPLFGGKDCVG--ESQITLSCFLT-CP					
TSR12	VDGGFTQWSAYGECSSSCGDGL-KTRTRTCSNPIPSFGGQNCIG--ETKENSYCNINP-CP					
TSR13	INGGFTWSDFGACSEPCGEGR-KSRSRCCNPKPEHGGKDCVG--DFVEEVKCKVRE-CP					
TSR14	IDGGLTQWSYTECSKTCGEGE-KKRSRLCTSPIPAFGGRDCEG--LLNEVLPCKVKE-CP					
TSR15	VNGGLSGWSAFSDCTKSCGSGT-KYRTRNCTNPNVQYDGDADCVG--SLKETSECNSQL-CP					
TSR16	INGGFTDWSSYAECSAECGQGS-QNRTRTCSNPPANGGKDCG--ATFQTKFCLIKE-CP					
TSR17	INGGFSQWSFSECSLTCGGGQ-RIRYRTCTNPAPAFNGAPCVG--AESQTESCNLKE-CP					
TSR18	INGGFSQWSFSECSLTCGGGQ-RIRYRTCTNPAPAFNGAPCVG--AESQTESCNLKE-CP					
TSR19	VNGGFTKWSEFSECSASCGLGI-KQRTSRCSNPNVPAYGGEDCNG--IRYETASCKTHE-CP					
TSR20	VNGGFSWSDFSACSNSCGNGE-QIRKRSNPNPSPAHGGEDCKG--SLEEKVCKNIKE-CP					
TSR21	INGGLSSWSAFSTCTKSCDGGV-KRRLCNPAPSFGLDCTE--NLIDTECNHS-CP					
TSR22	VNGGFSWSAFGICSEQCGDGI-QERTSRCTYPAPAYGGMNCEG--LQTETROCKIKD-CP					
TSR23	VNGGFSQWSVYSECSKECGNGE-QTRKRTCNPNPAPAYGGDDCQG--SLEESKACKLKE-CP					
TSR24	INGGLSSWSYSDCSKSCGGGV-KTRTRSCNPNPANGGTCND--IMIEDVPCNVQ-CP					
TSR25	IDGGMSEWSDFTPCSELQGLGS-QERQRKCTNPNPSYGGKQCGG--EFLQVRECKIKD-CP					
TSR26	ANTGYSQWSDFSECSKSCGVGV-RSRKRICENKK----YDCSG--LSEELQSCVVKP-CP					
TSR27	VNGGFSNWGDFDECSTTCGQGL-KTRTRTCTNPNPQNGGAGCFG--SRQEIQSCIVRE-CP					
TSR28	VNGMYSTWSTYSECSEPCNAGR-QKRTTRCTNPNPANGGLPCVG--PPEDARTCNIQK-CA					
TSR29	INGGLSEWSLFSKSKTCGNGI-KERKRTCTNPNPSPVGGKDCIG--SLVEVFSCKVEE-CP					
TSR30	IDGAFGEWSDFGECSEKCGSGL-QERKRECNPNLPAYGGKGCY--ETSQRECKLRE-CP					
TSR31	VNGKFTSWSSYSECTEPCNGGY-QRRTRTCTDPAPAHGGLPCSG--PVEDKKSCKIQK-CP					
TSR32	VNGDFTPWSEFSASSSCGEGE-QKRTTRCTNPNPSPAFGGTDCIG--LNEETISCKVKE-CP					
TSR33	VDGGFTNWSDFNECSKSCGEGI-KQAIRTCSNPNPKFGGKTCVG--EFVKNQICNIRE-CP					
TSR34	VDGAYSQWSAYSVCSSPCNGGK-QTRTRSCNPNPSPANGGAPCFG--PDFDSKSCNHL-CP					
TSR35	VHGGFTQWSDFSDCSKSCGEGK-KIRTRSCNPNPSPANGGSSCVG--PTEDTAFCKLKE-CP					
TSR36	VDGGLGQWSDFTECSKSCGSGI-QWRKRLCNPPEPAPYGGKDCSGL-ISSEQQECKVRE-CP					
TSR37	VNGGLSDWSLFSSEPCGLGN-QYRTRTCTNPNPANGGLGCTG--HLIESVSTLKP-CP					
TSR38	VNGNFSQWSEYSPCNTCGSGI-AQRKRTCTQPSAHGGRDCEG--PTLDTKTKLRD-CP					
TSR39	INGEFSEWSAFSICYEPCGLGK-QYRVRYCTNPNPSPFGGNDGAG--NSREVIKCKIKE-CP					
TSR40	INGGLSLWTEFSTCSQTCGIGQ-MTRSRSCNPNPSPYQGMNCIG--ELKEVNECKVRE-SP					
TSR41	LNGGLSLWTEFSTCSQTCGIGQ-MTRSRSCNPNPSPYQGMNCIG--ELKEVNECKVRE-CP					
TSR42	VDGNWSPSSFTDCSASCNIGK-QQRQRECNPNPQYGGKACIG--SAVEEKSNAFP-CP					
TSR43	VNGEVSEWGAFLCSTSCGVGE-QTRFRCTNPNPAPRHGGKDCD--PLVHTITCKIKD-CP					
TSR44	VNGGYTKWSDYSPSKTCGVGT-QTRKRFCTDPAPAFGGLACVG--PDVDTRTCEQKE-CP					
TSR45	IDGQWSKWEDYDSTLTCCGGIQRAR-RTCNPNLPKFGGADCVG--VSLDIRSCNFP-CP					
TSR46	VNGGFSWWSAYGECTTTCCGLGI-QYRKRFCDSPPNFGGRPCVG--PLFDARSCIPRD-CP					
TSR47	INGGLTEWSDFSPCSHTCGVGN-QVSTRCTKPYQHGKPCG--ELIYQKTKLAD-CA					
TSP48	VNGNWGLWGSFTPCSQTCKGGL-QRRSRQCNPNPAPAFGGMNCPG--SNFEDQACNENKDCP					
TSR49	-NGAWGSWSPYGPCLSCGVAVRRSRKRECNPNPSPGGGANCVG--YSVMSEVCNNQINCP					
TSR50	VNGEWSWGPYSACTLTCGGGV-QQRNRYCNPNPAPLYGGVSCIG--DSIQITKCNNTA----					
Consensus	G W CS CG G R R C P P GG C G C CP					

Abbildung 3.2. Sequenzanalyse von HyTSR1, -2 und HyTSR-like. Fortgesetzt auf nächster Seite.

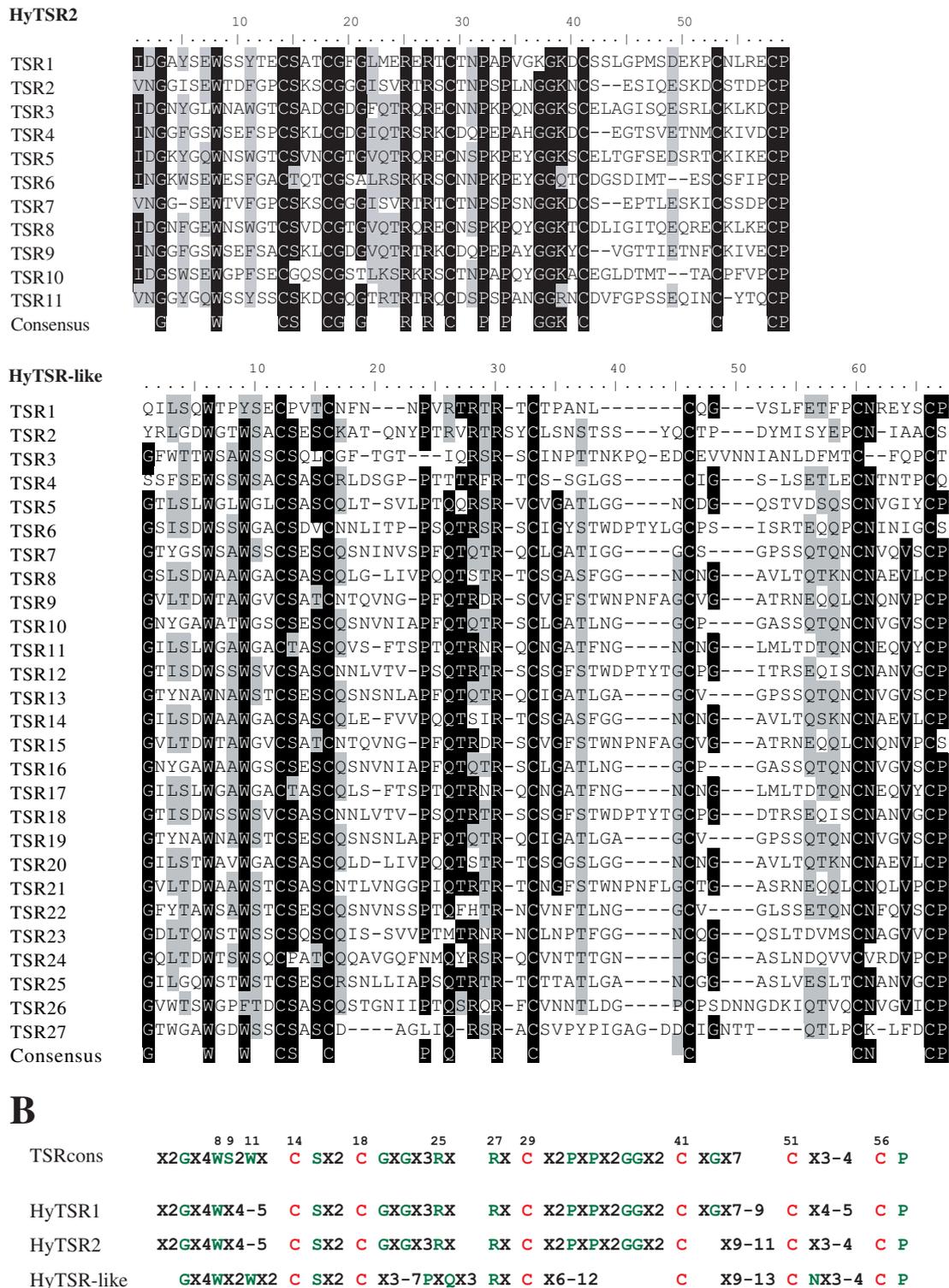


Abbildung 3.3. Sequenzanalyse von HyTSR1, -2 und HyTSR-like. (A) ClustalW-Alignments der TSR innerhalb eines Moleküls: HyTSR1 50 TSRs, HyTSR2 11 TSRs, HyTSR-like 27 TSRs. Schattierungen geben den Grad der Konserviertheit von 70 % (grau) bis 100 % (schwarz) an. **(B)** Erweiterte Konsensussequenzen der TSR-Repeats (mind. 80 %). ‘TSRcons’ gibt den Konsensus aller bekannten TSRs an, nach Adams und Tucker (2000). Konservierte Cysteinreste sind in rot dargestellt, andere konservierte Aminosäuren in grün. X=nicht-konservierte Positionen.

Die Moleküle weisen eine ungewöhnlich dichte Struktur auf, was die Anzahl und Architektur der TSR-Repeats im Molekül betrifft (Abbildung 3.4). Nur in einem anderen Protein folgen die TSR ohne Zwischenregionen direkt aufeinander wie bei diesen *Hydra*-Proteinen: Im ‘thrombospondin type 1 repeat containing protein’ oder auch ‘ventral surface vesicle protein’ aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Phytophthora cinnamomi* mit 47 aufeinanderfolgenden Repeats (Robold und Hardham 2005), welches damit die strukturell größte Ähnlichkeit zu HyTSR1 aufweist. Die TSR-Motive des Pilzproteins sind stark abgewandelt, sie sind kürzer (ca. 50 AS) und es fehlen 2 der hochkonservierten Aminosäuren (C18 und C29) des Konsensusmotivs (Adams und Tucker 2000). Es ist das bisher größte beschriebene TSR-Protein und seine Funktion wird in der Adhäsion von Pilzsporen bei der Wirtsinfektion vermutet. Ähnlich wie HyTSR1 weist es hochgradiges ein Glykosylierungspotential und viele Zellanheftungsstellen auf (Sequenzen WSXW und CSVTCG + basische AS).

Weitere bekannte Moleküle mit zahlreichen TSR-Domänen sind das transmembranale ‘Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B’ (THS7B) aus Vertebraten mit 18 TSR und unbekannter Funktion, sowie die Metalloproteinase gon-1 aus *C. elegans* (Blelloch et al. 1999) mit 17 TSR-Motiven. In beiden weisen diese jedoch größere Abstände zueinander auf als in den *Hydra*-Proteinen.

TSR Typ I-Motive kommen meistens in Kombination mit wenigstens einer, meistens mehreren anderen funktionellen Domänen vor. Auch in HyTSR2 befindet sich C-terminal eine SUEL-type-Lectin-Domäne (Abbildung 3.4), welche als L-Rhamnose- und β -Galactosid-bindende Domäne beschrieben wurde, die Zellen agglutinieren kann¹. Vermutlich hat dies Einfluß auf Differenzierungsprozesse, zelluläre Erkennung und Gewebeaufbau. HyTSR-like besitzt nach 2 N-terminalen TSR eine ‘van Willebrand Faktor A’-Domäne (vWA), die in der Extrazellulärmatrize als Bindepartner von membranalen Glykoproteinen und Bindegewebsfaktoren beschrieben wurde und in der Zelladhäsion fungiert (Whittaker und Hynes 2002). Andere Proteine mit der Kombination von vWA und TSR fand man bisher nur bei Adhäsionsmolekülen aus Vertebraten — den Hemicentinen — sowie den ‘Thrombospondin-related adhesive proteins’ (TRAP) aus dem Parasiten *Plasmodium falciparum*, die eine adhäsive Funktion bei der Wirtsinfektion ausüben (Naitza et al. 1998). HyTSR1 besteht ausschließlich aus TSR-Domänen.

In HyTSR1 und -2 existieren innerhalb der TSR-Domänen Sequenzmotive, die in der Zelladhäsion eine Rolle spielen: CSVTCG und CSKSCG (siehe Abbildung 3.4 und Adams und Tucker 2000). Das CSVTCG-Motiv fungiert beim Menschen zusätzlich in der Bindung des ‘scavenger receptors’ CD36 und dadurch in der Inhibition der Angiogenese

¹<http://www.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC50228>

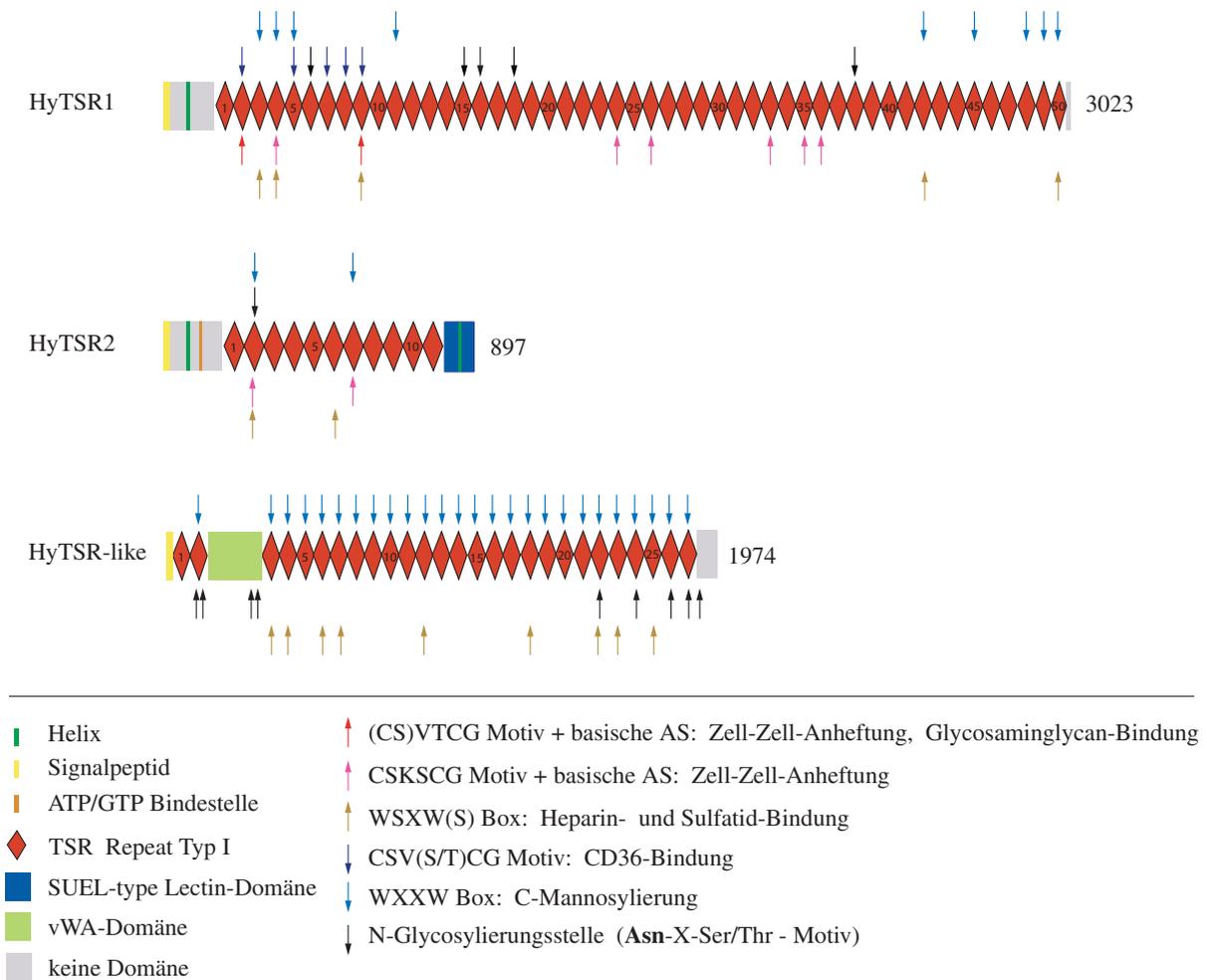


Abbildung 3.4. Domänenstruktur und putative Modifikationen von HyTSR1, HyTSR2 und HyTSR-like. Die Zahlen rechts geben die Anzahl der Aminosäuren an.

(Tolsma et al. 1993). Weiterhin sind verschiedene Bindestellen für Heparin und Sulfatide (WSXW) sowie in allen 3 Proteinen — besonders aber in HyTSR-like — Mannosylierungsstellen (WXXW) vorhanden. Die (putative) ATP-Bindestelle in HyTSR2 könnte auf eine Enzymaktivität hinweisen. Das für die Aktivierung von TGF β -Liganden essentielle KRFK-Motiv (Adams und Tucker 2000) wurde in den *Hydra*-TSR bislang nicht gefunden, ebenso wenig die TGF β -inhibitorische Sequenz GGWSHW. Zusammengenommen weisen diese Vergleiche darauf hin, dass die drei Glykoproteine aus *Hydra* höchstwahrscheinlich Zelladhäsionsmoleküle sind, die eine Rolle bei der Zellmigration spielen könnten.

Die Exon/Intron-Struktur von *hytsr1* und *hytsr-like*

Thrombospondin-Repeats des Typs I wurden als von diskreten Exons kodierte Domänen beschrieben, dies bestätigte die Hypothese des ‘Exon-Shufflings’ als Mechanismus zur Entstehung hochmodularer und –repetitiver Proteine (Bornstein et al. 1991a, b; Nolan et al. 1992; Patthy 1987; Wolf et al. 1990). Die Architektur der *Hydra*-Proteine läßt ähnliches vermuten und daher wurde die Exon/Intron-Struktur von *hytsr1* mit Hilfe der Genomdatenbank untersucht. Es stellte sich heraus, das HyTSR1 von 54 Exons codiert wird, deren Grenzen wie erwartet genau den TSR-Motivgrenzen entsprechen. Alle TSR-codierenden Exons (50) sind symmetrisch bezüglich der Phase ihrer Grenzen (1–1; siehe Tabelle A.3 im Anhang). Dies ist nicht der Fall bei den abweichenden HyTSR-like-TSR-Motiven (Tabelle A.4 im Anhang); hier treten Phasenwechsel und Asymmetrien auf. *hytsr-like* wird von 32 Exons codiert, 27 davon codieren für die TSR-Module. Während die Exongrenzen bei *hytsr1* mit den Grenzen der TSR-Domänen übereinstimmen, sind diese im *hytsr-like*-Gen um eine bis zwei Codons meist in C-terminale Richtungen verschoben.

Mit den die TSR kodierenden 27 Exons aus *hytsr-like* wurde eine intramolekulare Maximum-Parsimonie-Analyse durchgeführt, um Erkenntnisse über die Mechanismen der Entstehung des Moleküls zu gewinnen (Abbildung 3.5A).

Diese Analyse demonstrierte eine gewisse Symmetrie dergestalt, daß die Exons sich so gruppierten, daß innerhalb der Cluster fast immer ein Abstand von 6 Exons zwischen den Abspaltungen lag (Abbildung 3.5A). Ausnahmen sind die N- und C-terminalen Exons 1–5 und 24–28. Dies weist auf tandemduplizierte Exons im mittleren Bereich des Moleküls hin (Exons 6–23), während die N- und C-terminalen Exons eher divergent sind. So lassen die Positionen der verwandten Exons 4 und 24 vermuten, daß diese Exons früh in der Evolution durch Insertion des mittleren Molekülbereichs voneinander getrennt wurden und unabhängig weiter evolvierten (Abbildung 3.5B). N-terminal wurde die vWA-Domäne vermutlich über Exon-‘Shuffling’ eingefügt, C-terminal fand weitere Exon-Multiplikation statt. Der mittlere Molekülteil wird von 2 durch Duplikation entstandene Kassetten kodiert (Exons 10–21), die jeweils aus 6 Exons bestehen (Abbildung 3.5B). Theoretisch muß sich dies an den co-duplizierten Introns nachweisen lassen. Der Vergleich dieser Bereiche zeigte, daß diese innerhalb der Kassetten relativ kurz (69–318 bp) und fast identisch sind (nicht gezeigt), letzteres gilt auch für die 6 Exons der zwei Kassetten selbst. Es handelt sich daher um ein relativ junges Duplikationsereignis, sonst wären die Sequenzen divergenter.

Eine Gruppe von 4 Exons (6–9) ist den Exonkombinationen 12–15 bzw. 18–21 ebenfalls ähnlich und könnte damit eine Art Vorläufer-Kassette darstellen (Abbildung 3.5B). Die Introns zwischen den Exons 6, 7, 8, 9 sind im Gegensatz zu den Introns der Kassetten so groß, das sie gegenwärtig nicht vollständig in der Genomdatenbank enthalten sind. Dieser Vergleich

läßt vermuten, daß die Rearrangements eines Grundmusters (Exons 6–9), welche die Kombination der Exons 10–15 bzw. 16–21 hervorbrachte, lange Zeit zurückliegen muß und sowohl seine Exon- als auch Intronsequenzen währenddessen divergierten.

Durch die hohe Ähnlichkeit der beiden Kassetten könnte eine sehr leicht bei der mRNA-Prozessierung zufällig herausgespleißt werden, da die Spleißmaschinerie sie vermutlich nicht unterscheiden kann. Dies würde in einer um 1069 bp verkürzten mRNA-Species resultieren — was sich schließlich auch in der ‘Northern Blotting’-Analyse von *hytsr-like* beobachten ließ (vgl. 10.2, Seite 141, Spur 1): Die untere Bande könnte sehr wohl einem Transkript von rund 5,1 kb entsprechen. Da beide Transkripte gleich stark repräsentiert scheinen, wird offenbar in 50 % der Fälle alternativ gespleißt.

3.2 Die phylogenetische Analyse der TSR Typ I-enthaltenden Proteine in *Hydra*

Da man mit hoch-modularen Proteinen nicht ohne weiteres phylogenetische Analysen durchführen kann, wurden nicht die gesamten 3 *Hydra*-Proteinen, sondern je ein ‘typischer’ TSR-Repeat mit TSR-Modulen verschiedener Metazoa verglichen. Unter Berücksichtigung der Domänenkomposition im Protein kann dies die ähnlichsten Proteine identifizieren. Eine Sequenz-Analyse mittels WU-Blast² ergab zunächst, daß die TSR-Konsensusmotive von HyTSR1 und HyTSR2 mit den Sequenzen VNGGFSEWSDFFSECSKSCGGGIQQTRTRTCT-NPAPAFGGKDCVGPLVETKSKKIKEDCP bzw. INGGYGEWSSFGTCSKSCGDGIQTRTRSCNNPKPQYGGKDCDLLGTSQESKSKLKECP die größte Ähnlichkeit zu Rhamnospondinen ($e=10^{-13}$) aufwies, einer Gruppe von putativen Immunsystem-Molekülen aus *Hydractinia* (Schwarz et al., unveröffentlicht). Diese besitzen eine C-terminale Lectin-Domäne und mehrere Thrombospondin-Repeats, sind jedoch nicht vollständig in der Datenbank enthalten. Die Thrombospondin-1 Moleküle der Vertebraten, hochmodulare Proteine mit 3 TSR, zeigten ebenfalls bei gleichem e -Wert Ähnlichkeit zu den TSR von HyTSR1/2. Danach folgten die ADAMTS-14 Proteine ($e=10^{-12}$) aus dem Menschen, Disintegrin-Metalloproteasen mit 4 TSRs und anderen Domänen. Auch zu den TSR-Modulen von Thrombospondin A aus *Ciona intestinalis* und einem hochmodularen, hypothetischen Protein aus *Strongylocentrotus purpuratus* zeigte sich eine Verwandtschaft, jedoch unterschieden sich deren übrige Domänenzusammensetzung massiv von den *Hydra*-Proteinen. Zusammengefaßt entspricht HyTSR2 sehr wahrscheinlich den Rhamnospondinen aus *Hydractinia* und hat eventuell eine Funktion im Immunsystem von *Hydra*. HyTSR1 zeigte die gleichen Distanzen, besitzt aber

²<http://www.ebi.ac.uk/blast2/>

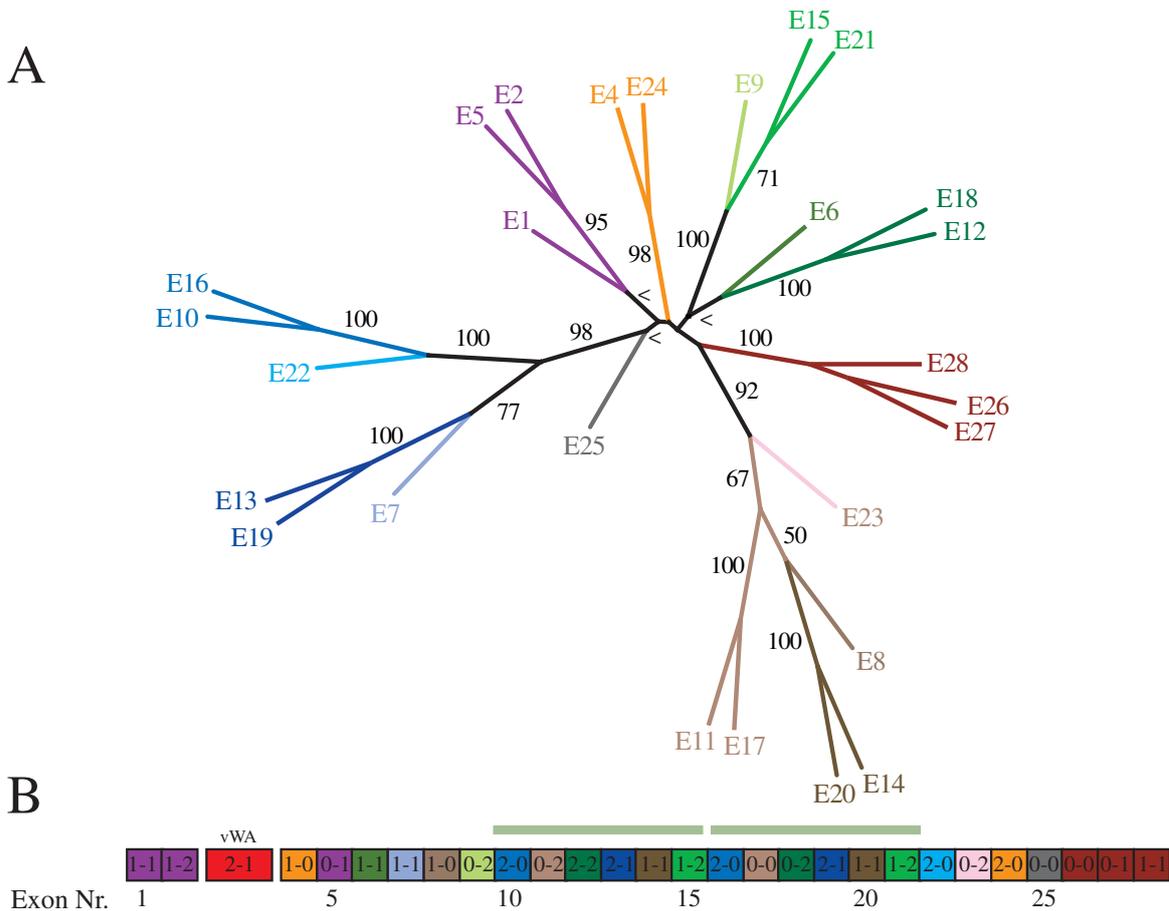


Abbildung 3.5. Maximum-Parsimonie-Analyse der *hytsr-like*-Exons. (A) Ungewurzelter Konsensus-Baum ('extended majority rule'), die Bootstrap-Werte an den Kanten geben die Wahrscheinlichkeit für den dargestellten Split an (<: Bootstrap-Unterstützung<50). Die Kantenlängen entsprechen nicht den tatsächlichen Distanzen. Software: DNApenny (Phylip), Parameter 'default'; 100 Bootstrap-Replikate (seqboot, Phylip). Die Farbkodierung ist willkürlich und dient der Markierung der Gruppenzugehörigkeit der Exons; grau=nicht zuordenbar, schwarz=innere Zweige. **(B)** HyTSR-like-Exons, farbmarkiert nach der Parsimonie-Analyse. Die Zahlen in den Boxen geben die Exon/Intron-Phase an. Die horizontalen Striche markieren sehr nah verwandte, duplizierte Kassetten. vWA=von Willebrand Faktor A-Domäne.

keine Lectin-Domäne und auch keine sonstigen Signaturen der ADAM-Metalloproteasen, seine Funktion ist zunächst nicht näher einzugrenzen. HyTSR-like zeigte aufgrund seiner abweichenden Repeat-Sequenz (GTLSDWSAWSACSASCQSNVNVAPTQTRTRSCV GATLGGGCPGASLSETQNCNANVSCP) nur Ähnlichkeiten bei e-Werten oberhalb 10^{-5} , hier sind der 'Brain-specific angiogenesis inhibitor 2' und die Semaphorine aus Vertebraten zu nennen, die beide neben den TSR noch weitere funktionelle Module besitzen. KIAA1679 aus dem Menschen sowie das oben erwähnte THS7B-Protein aus der Maus bestehen ebenfalls ausschließlich aus TSR-Domänen, die hochvariabel sind und gewisse Ähnlichkeit zu den HyTSR-like-Domänen zeigen. Diese hypothetischen Proteine v.a. scheinen im Gehirn der Tiere vorzukommen, was funktionelle Vorhersagen für *Hydra* sehr erschwert. Stammbaumanalysen mit den drei Konsensus-Repeats von HyTSR1/2 und HyTSR-like brachten keine zusätzlichen Information (nicht gezeigt).

3.3 Die Expressionsanalyse der TSR-enthaltenden Glykoproteine in *Hydra*

Die Expression der drei Transkripte wurde in *Hydra* mittels 'antisense'-mRNA-ISH untersucht. Es wurden adulte und knospende Tiere, Kopf- und Fußregenerate sowie Tiere mit erhöhter Kopfaktivierung untersucht. Für *hytsr1* sind schon ISH-Daten vorhanden (Rentzsch 2001 und Abbildung 3.1).

Die Expression von *hytsr1* und *-2*

hytsr2 in adulten Polypen

hytsr2 ist auf den ersten Blick genauso exprimiert wie *hytsr1*: In mukösen Drüsenzellen, die sich in ins Lumen des Gastralraums hineinragenden, lamellenartigen Ausfaltungen des hypostomalen Endoderms (Taeniolen) befinden (Abbildung 3.6A-C). Diese speziellen Drüsenzellen, die Mukopolysaccharide sekretieren, differenzieren aus zymogenen Drüsenzellen des subhypostomalen Gewebes (Rose und Burnett 1968a, b, 1970).

Bei der Knospung beginnt im Stadium II-III die Expression von *hytsr2* in Apexzellen (Abbildung 3.6D), die sich schließlich im ausdifferenzierten Hypostom der Knospe verdichten. Diese Zellen entstehen anders als beim 'steady-state'-Polyp aus einwandernden i-Zellen, die sich vermutlich direkt in muköse Zellen differenzieren (Rose und Burnett 1970).

Aufnahmen mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) von fluoreszent markiertem *hytsr2*-Transkript im Kopf adulter Polypen verdeutlichen die schwach beginnende

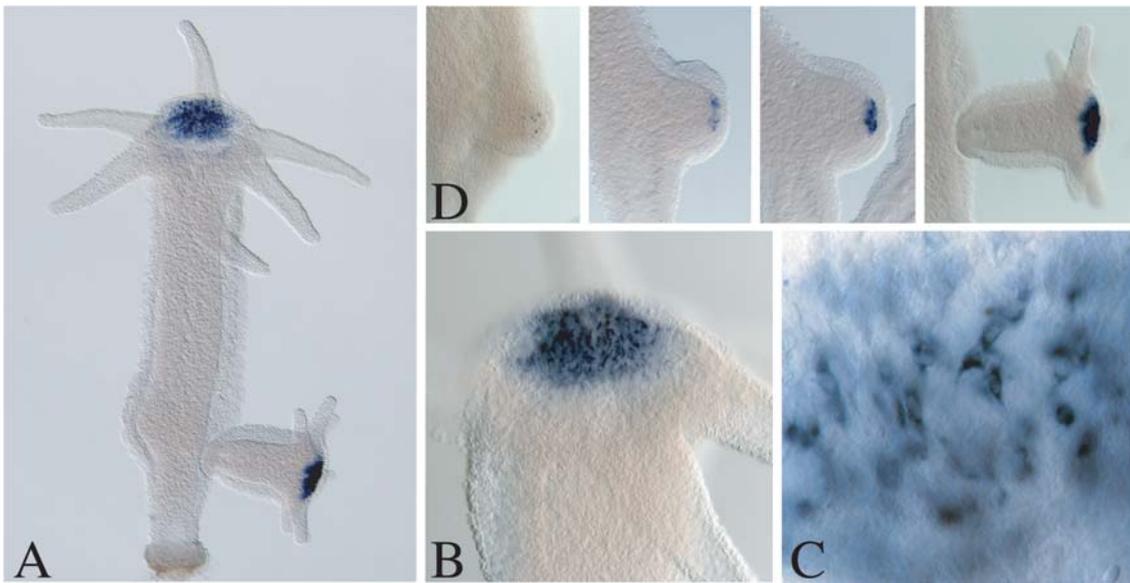


Abbildung 3.6. *hytsr2*-Expression am Apex von adulten Tieren und Knospen. (A) Expression dargestellt durch ISH im Hypostom, in (B) und (C) vergrößert. (D) Knospenstadien, v.l.n.r. Stadium II, III, IV, VIII.

Expression im unteren Hypostombereich (Abbildung 3.7). Diese Zellen stellen vermutlich Differenzierungsstadien zymogener Zellen beim Übergang zu Mukuszellen dar. Mit zunehmender Nähe zur Mundöffnung sind lange, schmale Mukuszellen stark gefärbt, vermutlich vom granulären Typ.

Der Vergleich mit *hytsr1* verdeutlicht, daß beide Transkripte in den gleichen Zellen exprimiert sind, jedoch ist die Ausdehnung der Domänen leicht verschieden: Die Transkription von *hytsr1* wird im Hypostom etwas basaler als die *hytsr2*-Expression angeschaltet, d.h. in einem früheren Stadium der Mukuszell-Differenzierung (Abbildung 3.8).

***hytsr2*-Expression während der Regeneration**

F. Rentzsch 2001 fand heraus, daß *hytsr1* sowohl bei der Kopf- als auch Fußregeneration ab mindestens 3 Stunden nach der Amputation, im Bereich der Wunde im endodermalen Epithel aufreguliert ist. Bei der Kopfregeneration bleibt diese Expression erhalten, verschwindet beim sich bildenden Fuß hingegen nach 12 und 24 Stunden (Rentzsch et al. 2005). *hytsr1*-exprimierende Mukuszellen sind nach 24 h Kopfregeneration zu erkennen. *hytsr2* verhält sich bei der Kopfregeneration ebenfalls wie *hytsr1* (nicht gezeigt). Es wurde außerdem die Fußregeneration untersucht und im Unterschied zu *hytsr1* ist hier keine Aufregulation von

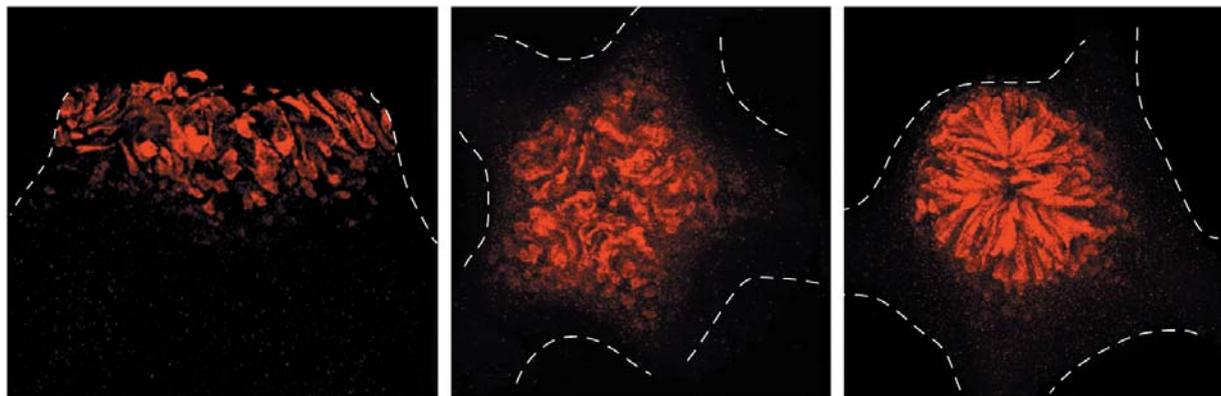


Abbildung 3.7. *hytsr2*-Expression im Hypostom. In der ISH wurde das Substrat FastRed benutzt, das in der Alkalischen Phosphatase-Reaktion ein fluoreszentes Präzipitat hervorruft. Die CLSM-Aufnahmen zeigen Projektionen der Z-Stapel von gefärbten Hypostomen seitlich (links) und in Aufsicht (Mitte, rechts) mit unterschiedlichen Öffnungszuständen des Mundes.



Abbildung 3.8. *hytsr1*- und *hytsr2*-Einzelfärbung (A,B) und Doppelfärbung (C). Aufsicht auf das Hypostom. (A) *hytsr1*-Detektion mit NTB/BCIP; Größenstandard=500 μm , für alle Bilder. (B) *hytsr2*-Detektion mit FastRed und (C) Doppelfärbung mit *hytsr1* in blau und *hytsr2* in rot. Die rote Farbreaktion wurde hier der blauen angeschlossen, dies führt durch Überlagerung zum teilweisen Verlust des blauen Farbstoffs innerhalb der *hytsr2*-Domäne.

hytsr2 zu einem der gewählten Zeitpunkte (3, 9, 12, 18, 24, 36 h) nach der Amputation festzustellen (nicht gezeigt). Damit ist *hytsr2* eines der hypostomalen Gene, die nicht wie andere transient bei Fußregeneration aufreguliert werden und offensichtlich einer anderen Regulation als *hytsr1* unterliegt.

***hytsr1/2*-Expression in Kopf-aktivierten Tieren**

Für die Herkunft der *tsr*-exprimierenden Mukuszellen im Hypostom kommen drei Zellpopulationen in *Hydra* in Betracht: Direkt differenzierende, interstitielle Stammzellen (i-Zellen) oder bereits differenzierte, gastrodermale, zymogene Drüsenzellen; letztere zeigen eine unterschiedliche Verteilung in der Körpersäule entlang der Körperachse (Rose und Burnett 1968b, 1970). Bei Induktion der Kopfregeneration sowie bei der Knospung wird auf diesen Zellvorrat zurückgegriffen. Dies legt nahe, daß die Kompetenz zur Differenzierung in spezielle (hypostomale) Zellen prinzipiell in der ganzen Körpersäule vorliegt, die tatsächliche Ausprägung aber vom Positionswert abhängt. Dieser läßt sich künstlich durch Verletzung, aber auch durch chemische Verbindungen verändern, z.B. setzt der GSK3 β -Inhibitor Alsterpaullone den Positionswert bzw. das Kopfaktivierungspotential herauf (Broun et al. 2005). Dies geschieht durch die starke, konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in den behandelten Tieren. Sie entwickeln daraufhin einige Tage später reversible ektopische Tentakel und stabile Köpfe verteilt über die gesamte Körpersäule (Broun et al. 2005; Nacak 2004). *hytsr1* und *-2*-Expression wurde in 24 h Alsterpaullone-behandelten Tieren über mehrere Tage hin untersucht. Die Zellen beginnen in der Körpersäule (mit Ausnahme der Stielregion) bereits 2 Tage nach der Behandlung die Transkripte zu exprimieren (Abbildung 3.9). Ihre Morphologie ähnelt der von gastrodermalen, zymogenen Drüsenzellen. Erstaunlicherweise sind in seltenen Fällen auch gefärbte Zellen im Ektoderm zu sehen (Abbildung 3.9, Pfeile), was auf die induzierte Differenzierung von i-Zellen hinweist. Die diffuse Verteilung der gefärbten Zellen ist abrupt geändert am 4. Tag: Größere aber wenige Gruppen von Zellen zeigen nun eine Anordnung ähnlich wie im Hypostom; dies wird als der Zeitpunkt erachtet, bei welchem sich Organisationszentren etabliert haben und Differenzierungsvorgänge starten. *hytsr1* zeigt das gleiche Muster und die gleiche Kinetik (nicht gezeigt). Zusammengefaßt bedeutet dies, daß die Transkription von *hytsr1*- und *-2* (i) flexibel auf den Positionswert der Zellen reagiert, (ii) generell während der Kopfdifferenzierung aufreguliert ist und (iii) die mukösen Drüsenzellen aus endodermalen, zymogenen Drüsenzellen der Körpersäule differenzieren, jedoch auch aus ektodermalen i-Zellen.

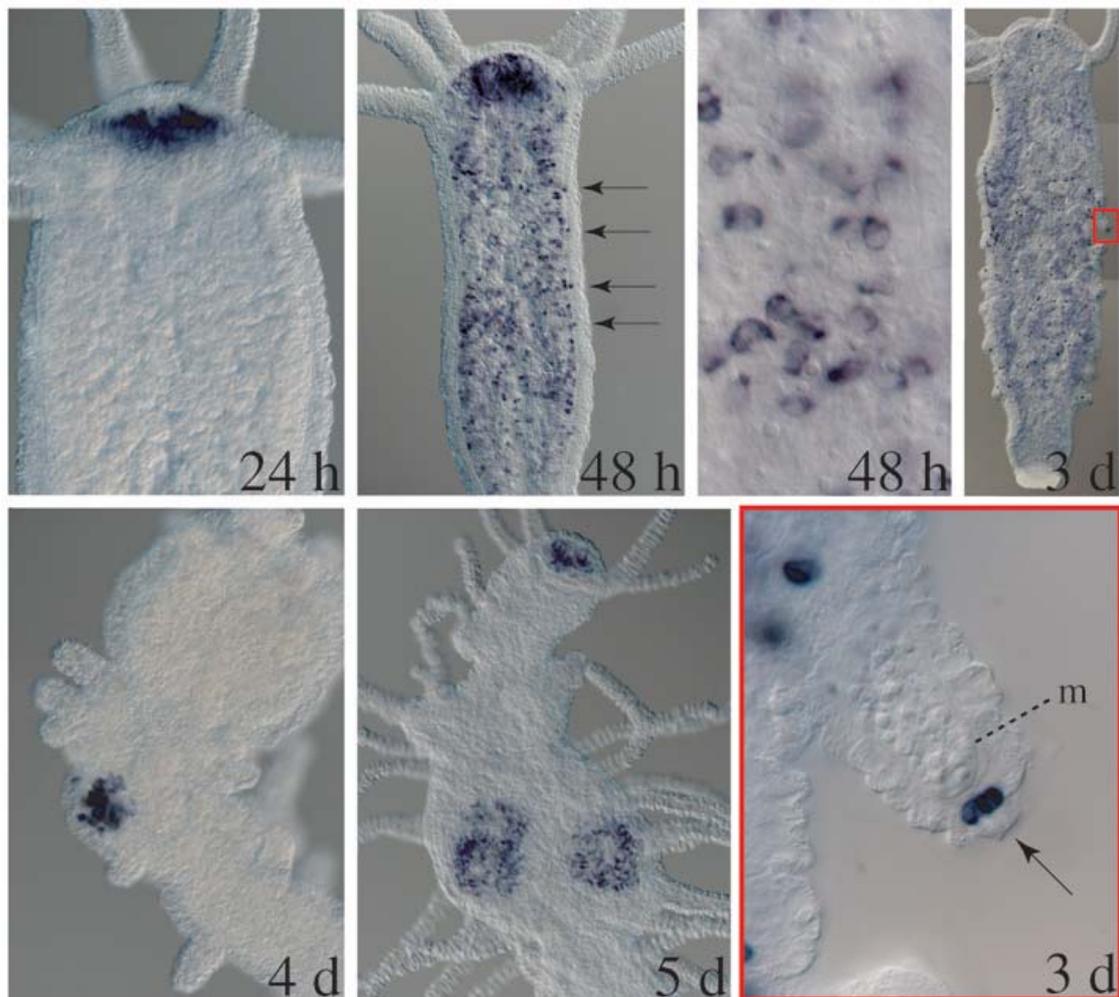


Abbildung 3.9. *hytsr2*-Expression bei ectopischer Kopfbildung zwischen 24 h und 5 Tagen. Dargestellt sind verschiedene Individuen nach 24-stündiger Alsterpaullone-Behandlung. Das rot umrahmte Bild unten rechts zeigt die Vergrößerung eines ectopischen Tentakels aus dem Bild darüber (3 d) und verdeutlicht die ectodermale Expression von *hytsr2* (Pfeile, m=Mesogläa).

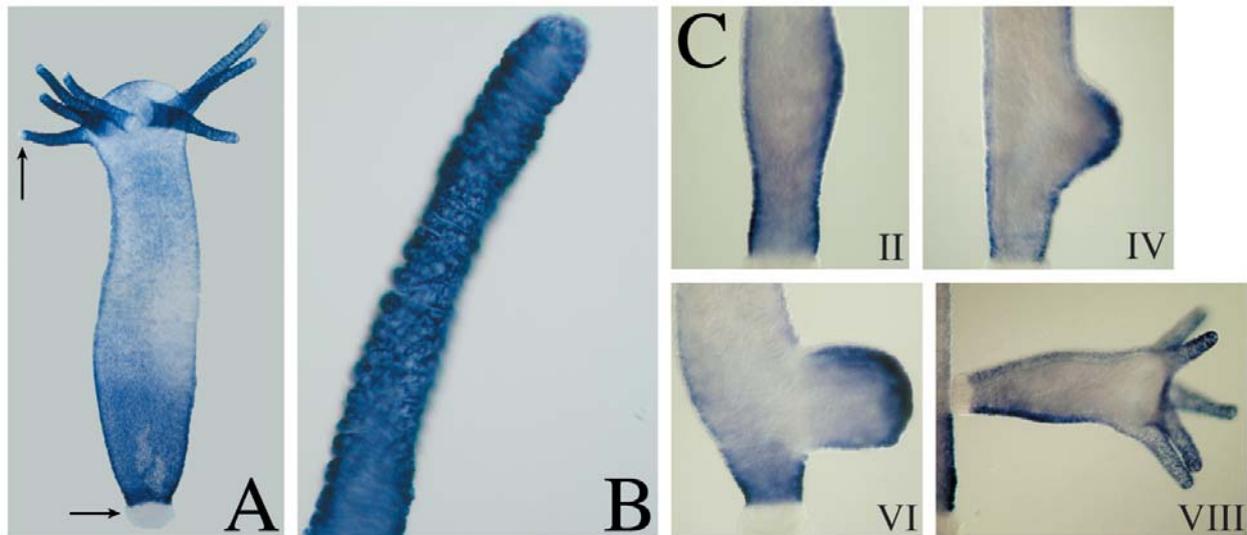


Abbildung 3.10. Ektodermale *hytsr-like*-Expression in *Hydra*. (A) gesamtes Tier, die Pfeile geben expressionsfreie Zonen an. (B) vergrößerter Tentakel; (C) Knospentadien II bis VIII.

Die Expression von *hytsr-like*

Die Expression des dritten Thrombospondin-Repeat Typ I-codierenden Gens wurde ebenfalls mittels ISH in normalen und regenerierenden Tieren untersucht. Adulte Tiere zeigten Expression in den ektodermalen Epithelzellen des gesamten Tieres, die in den Tentakeln sehr stark und direkt über der Fußscheibe ebenfalls stärker war und sich hier graduell von basal nach apikal abschwächte (Abbildung 3.10A,B). Die Fußscheibe war immer frei von Färbung, ebenso die äußersten Tentakelspitzen. Bei der Knospung erschien das Ektoderm der sich ausstülpenden Knospe stärker gefärbt als das der Knospungszone. Im weiteren Verlauf war der apikale Bereich der Knospe stärker gefärbt, was sich nach vollendeter Musterbildung auf die Tentakel und den basalen Bereich wie im adulten Tier beschränkte (Abbildung 3.10C).

hytsr-like bei Regeneration

Bei der Kopfregeneration (80 % KL) blieb das Ektoderm der regenerierenden Spitze nach Wundverschluss frei von Expression und begann erst ab 24 h im Bereich der sich später ausstülpenden Tentakelknospen *hytsr-like* aufzuregulieren (Abbildung 3.11A). Bei Fußregeneraten, die bei 20 % KL geschnitten worden waren, blieb das Ektoderm der Wunde über den gesamten betrachteten Zeitraum stark gefärbt und verlor zunehmend die Expression mit einsetzender Differenzierung der Basalscheibenzellen bei 18 bis 24 h (Abbildung 3.11B).

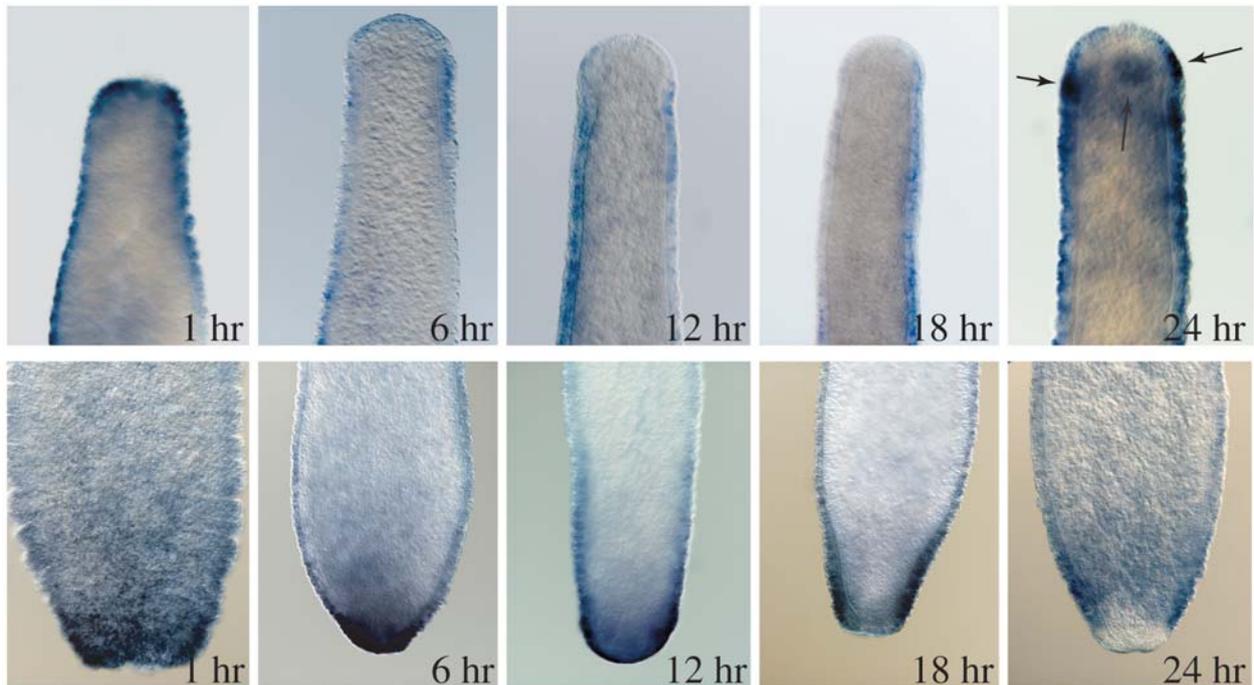


Abbildung 3.11. *hytsr-like*-Expression während Kopf- und Fußregeneration. Obere Reihe: Kopfregenerations-Zeitreihe. Die Pfeile markieren die späteren Tentakelknospen. Untere Reihe: Fußregenerate.

hytsr-like zeigt damit ein gänzlich gegensätzliches Expressionsmuster verglichen mit *hytsr1* und *-2*. Es ist denkbar, daß die Diversifizierung der TSR-Domänen von HyTSR-like mit seiner räumlichen und funktionellen Segregierung einherging. HyTSR-like ist deutlich basalen Positionswerten entlang der oral-aboralen Achse zugeordnet, hat jedoch auch eine Funktion in der sich ausstülpenden Knospe und den Tentakeln — in beiden Bereichen ist das Gewebe vermehrt forcierten Bewegungen senkrecht zur Körperachse ausgesetzt.

Direkt an sehr stark exprimierende Bereiche in den Tentakeln und unmittelbar über der Fußscheibe grenzen die einzigen expressionsfreien Regionen im Polyp: Die Tentakelspitzen und die Basalscheibe (Abbildung 3.10). Es ist denkbar, daß der Ablösungsprozeß von alten Zellen, der hier lokalisiert ist, verminderte Zelladhäsion voraussetzt, und daher *hytsr-like*-Transkription aktiv inhibiert wird.

4 Charakterisierung des *Hydra* Dickkopf-ähnlichen Proteins A (HyDkk1/2/4-A)

4.1 Die Identifizierung und Klonierung von *hydkk1/2/4-A*

Die ersten Hinweise auf das Vorhandensein von Dickkopf-ähnlichen Molekülen in *Hydra* stammten sowohl aus dem Signalpeptidselektions-‘Screening’ (Kapitel 2.1) als auch aus einer der *Hydra*-EST-Bibliotheken. Letztere lieferte einen den vollständigen Poly(A)-Bereich enthaltenden Klon taa05h01 von insgesamt 346 bp Länge. Das mit 13,7 % am häufigsten isolierte Signalpeptid im Signalpeptidselektions-‘Screening’ gehörte zu einer DNA-Sequenz von insgesamt 203 bp Länge, die mit taa05h01 überlappte. Eine blastx-Analyse der assemblierten Sequenzen lieferte eine schwache Ähnlichkeit mit dem *Dkk-4* Homolog der Maus ($e=0,009$). Ausgehend von taa05h01 wurde aus dem Stamm *H. vulgaris* Basel über RACE (‘rapid amplification of cDNA ends’) die fehlenden 5’-Sequenz und danach das vollständige Transkript kloniert. Eine ‘Northern Blotting’-Analyse (nicht gezeigt) bestätigte die geringe Größe des Transkripts von 395 Basenpaaren (Bp). Das kodierte Protein besteht aus 92 Aminosäureresten (As) und besitzt ein putatives 19 As langes Signalpeptid (Abbildung 4.1). Außerdem wurde die Vollängensequenz aus dem Stamm *H. magnipapillata* sf-1 kloniert; der Unterschied zum Molekül aus *H. vulgaris* ist hier beträchtlich: 10 Basensubstitutionen innerhalb der codierenden Sequenz, die in 7 Aminosäure-Austauschen resultieren (Abbildung A.2 im Anhang). Folgende Beschreibungen beziehen sich auf das *H. vulgaris*-Protein, das im weiteren als HyDkk1/2/4-A bezeichnet wird (siehe Abschnitt 4.2).

Das *Hydra*-Molekül ist wesentlich kürzer als die bekannten Mitglieder der Dickkopf-(Dkk)-Familie der Vertebraten, es umfaßt nur die C-terminale Hälfte dieser Proteine. In diesem Bereich befindet sich eine cysteinreiche Domäne (CRD), welche für den Wnt-antagonistischen Effekt der Dkk-Proteine genügt (siehe Einleitung). Das *Hydra*-Protein zeigt eine 33 %ige Aminosäureidentität und 47 %ige Ähnlichkeit zu dieser funktionellen Domäne (CRD2-Dkk4, Maus) (Abbildungen 4.2 und 4.3).

Ein zweites Dickkopf-ähnliches Molekül, das im Sekretions-‘Screening’ nur einmal auftauchte, ist das kürzlich anderswo beschriebene HyDkk1/2/4-C (Augustin et al. 2006). Es ist mit 54 % Aminosäureidentität deutlich verschieden von HyDkk1/2/4-A. Das zunächst identifizierte EST-Fragment mit nur 223 bp Länge enthielt nicht genügend Information um eine Ähnlichkeit mit Dickkopf zu ergeben; ein Abgleich wurde erst später mit wachsender

hydkk1/2/4-A

```

1      M R F L A V L L V V
1      gaaaacatacatcttttctgatttatcaatcATGAGATTTTTAGCAGTCCTTTTAGTTGT
11     A A F V A F S E A E S C K K D A D C K N
61     AGCTGCATTTCGTTGCATTTAGTGAAGCCGAGTCTTGCAAAAAGGATGCAGACTGCAAAA
31     G C C V N F L L T K Q C N S Y V K E G A
121    TGGTTGTTGTGTGAATTTCTTACTACTAAGCAATGTAATAGCTATGTTAAAGAAGGTGC
51     L C G F R D K F A C G C E P G L E C V K
181    ACTCTGCGGTTTTTCGTGACAAATTTGCATGCGGTTGTGAACCAGGACTCGAATGCGTAAA
71     V R G T L T G M V R R C V D N S G S G S
241    AGTACGAGGAACTTTAACTGGGATGGTTAGAAGATGCGTTGACAATTCAGGAAGTGGATC

91     L Y *
301    TTTGTATTAAattaaatacagaaaaaaaaaagataaatttaaaaaagaacaaatatat

361    aattcgagtttaattataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Abbildung 4.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *hydkk1/2/4-A*. Gelb unterlegt=Signalpeptid, hellblau unterlegt=CRD (Cystein-reiche Domäne). Rote Unterstreichungen bezeichnen das EST-Fragment aus dem Sekretions-’Screening’ (in sf-1), grüne *taa05h01*. Die horizontalen schwarzen Pfeile geben die Position der RACE-Oligonukleotide wieder, die blauen Pfeile spezifizieren die Oligonukleotide für die Vollängen-Klonierung. Der senkrechte Pfeil gibt die putative Schnittstelle im Signalpeptid wieder.

EST-Bibliothek und dem *Hydra*-Genomprojekt möglich. In dieser Arbeit wurde daher nur *HyDkk1/2/4-A* untersucht.

4.2 Die phylogenetische Analyse von *HyDkk1/2/4-A*

Um die genauen phylogenetischen Beziehungen des Dickkopf-ähnlichen Proteins aus *Hydra* zu untersuchen, wurde es in Kooperation mit Heiko A. Schmidt (Center for Integrative Bioinformatics Vienna, Wien) einer ‘Maximum-Likelihood’-Analyse unterzogen. Ziel war es, eine eindeutige Zuordnung zu einer der *Dkk*-Unterfamilien 1–4 (siehe Einleitung) zu treffen, um die Evolution dieser Protein-Familie zu beleuchten. Zugrundegelegt wurde ein Toffee-Alignment (Abbildung 4.3) der CRD2-Regionen verschiedener Dickkopf-Proteine aus Vertebraten und Invertebraten. Bei letzteren sind (mit Ausnahme der Cnidarier) nur *Dkk3*-ähnliche Moleküle aus EST-Bibliotheken bekannt.

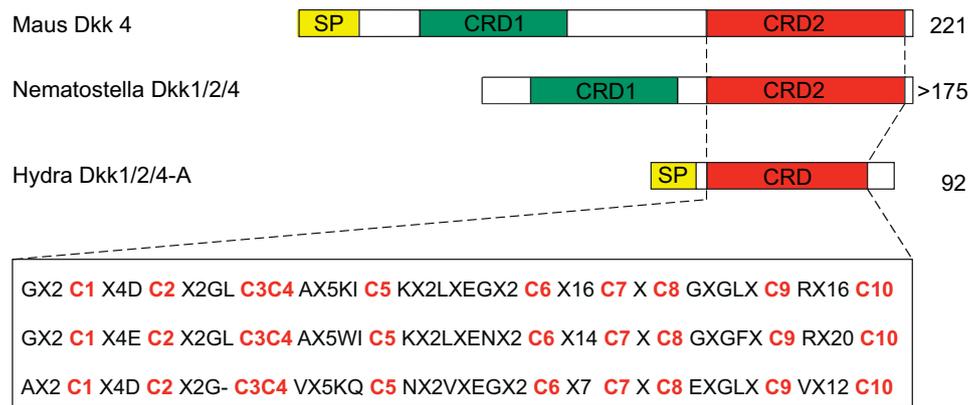


Abbildung 4.2. Domänenstruktur von HyDkk1/2/4-A im Vergleich zu Dickkopf-Proteinen aus Maus und *Nematostella vectensis* (siehe auch Abschnitt 4.2). SP=Signalpeptid, CRD=Cystein-reiche Domäne; die Zahlen rechts geben die Länge der Proteine in As an. Die Box vergleicht die Aminosäuresequenz der evolutionär konservierten CRD2 im Einbuchstaben-Code; ‘X Zahl’ steht für die Anzahl nicht konservierter Positionen.

In die Analyse wurden auch 2 übersetzte ESTs aus der Seeanemone *Nematostella vectensis* eingeschlossen. Eines zeigte 42 % Ähnlichkeit (gleiche oder ähnliche Aminosäuren) zu HyDkk1/2/4-A, das andere war zu 64 % dem Dkk3-Ortholog aus *Hydra* (Fedders et al. 2004) ähnlich (Abbildungen A.4, A.5 im Anhang). Beide *Nematostella*-ESTs kodieren für Proteine, die aus zwei, durch 12 As voneinander getrennten CRD-Motiven bestehen; sie entsprechen damit beide strukturell der Dkk3-Gruppe der Vertebraten.

Die C-terminale Domäne der Dkk1-4-Proteine besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu den Colipasen, Co-Enzymen der Lipasen aus den Vertebraten. Das Cysteinmuster wird auch als ‘Colipase fold motif’ bezeichnet (Aravind und Koonin 1998). Um etwaige Verwandtschaftsbeziehungen von HyDkk1/2/4-A zu den Colipasen zu prüfen, wurden 2 Colipase-Sequenzen aus Mensch und Maus in die Analyse einbezogen. Sie besitzen eine 19 %ige Identität innerhalb der CRD zu HyDkk1/2/4-A, was alle Cysteinreste mit einschließt.

Um dem ‘long branch attraction’-Phänomen vorzubeugen, wurden für die phylogenetische Analyse diejenigen Vertebraten- und Invertebraten-Sequenzen ausgewählt, die keine zu langen Zweige verursachten, d.h. nicht zu divergent waren. Die Analyse ergab schließlich den in Abbildung 4.4 dargestellten Baum: Die Dkk1/2/4-Gruppe der Vertebraten konstituieren wie erwartet hoch-unterstützt eine distinkte Gruppe. Die *Nematostella* und *Hydra*-Proteine bilden eigene Gruppen: Die Dkk1/2/4-ähnlichen sind deutlich von den Dkk3-ähnlichen CRD2 abgegrenzt und bilden damit 2 Unterbäume; ihre Position bezüglich der anderen Gruppen im Baum konnte nicht aufgelöst werden. Gleiches gilt für die Dkk3-CRD2 der Vertebraten und die Colipasen. Die Dkk3-ähnlichen CRD2 von *Amphioxus*, *Acropora* und *Dictyostelium*

```

Col_homo      GELCMNSAQCK-S---NCC-Q-----H--SSALGLARCTSMASENSECSVKTLYG-----IYYK-C-PCERGLTCEGDKT-IVGSITNTNF---GICHDA
Col_mus       GEICLNSMCK-S---RCC-Q-----H--DTILGIARCTHKAMENSECSPKTLYG-----IYYR-C-PCERGLT-EGDRSIIIGAITNTNY---GICLDS
Dkk1_danio    GENCLRSSDCA-EG--LCCA--R---H--FWSK-I--CKPVLKEGVCTKHKRRKG---S--HGL--E-IFQR-CD-CGEGLSCTRQGGGKAS-RS--LH--T-CQRH
Dkk1_homo     GSVCLRSSDCA-SG--LCCA--R---H--FWSK-I--CKPVLKEGVCTKHKRRKG---S--HGL--E-IFQR-CY-CGEGLSCTRIQKD-HHQASNSSR-LH--T-CQRH
Dkk1_mouse    GSVCLRSSDCA-AG--LCCA--R---H--FWSK-I--CKPVLKEGVCTKHKRRKG---S--HGL--E-IFQR-CY-CGEGLACRIQKD-HHQASNSSR-LH--T-CQRH
Dkk1_xenopus  GDVCLRSSDCA-EG--LCCA--R---H--FWSK-I--CKPVLKEGVCTKHKRRKG---S--HGL--E-IFQR-CH-CGAGLSCRLQKGEFTTVPKTSR-LH--T-CQRH
Dkk2_homo     GDCPLRSSDCI-EG--FCCA--R---H--FWTK-I--CKPVLHOGEVCTKQRKKG---S--HGL--E-IFQR-CD-CARGLSCRVVWKD--ATYSSKAR-LH-V--CQKI
Dkk2_xenopus  GDLCLRSSDCI-EG--FCCA--R---H--FWTK-I--CKPVLHOGEVCTKQRKKG---S--HGL--E-IFQR-CD-CARGLSCRVVWKD--ATYSSKAR-LH-V--CQKI
Dkk2_mus      GDCPLRSSDCI-DG--FCCA--R---H--FWTK-I--CKPVLHOGEVCTKQRKKG---S--HGL--E-IFQR-CD-CARGLSCRVVWKD--ATYSSKAR-LH-V--CQKI
Dkk4_homo     GESCLRTFDCGP-G--LCCA--R---H--FWTK-I--CKPVLHOGEVCTKQRKKG---S--HGL--E-IFQR-CD-CGPGLTCSRQVT---SNRQHSR-LH-V--CQKI
Dkk4_mus      GESCLRTSDCGP-G--LCCA--R---H--FWTK-I--CKPVLHOGEVCTKQRKKG---S--HGL--E-IFQR-CD-CGPGLTCSRQVT---SNRQHSR-LH-V--CQKI
Dkk3_homo     GTICDNQRDQCP-G--LCCAFQR---GLLEFPV---CTPLPVEGELCHDPTSQLLDLITW-E-LEPDGALDR-C-PCASGLLCPH-----SHS--L--VYVC-KP
Dkk3_mus      GTICDNQRDQCP-G--LCCAFQR---GLLEFPV---CTPLPVEGELCHDPTSQLLDLITW-E-LEPDGALDR-C-PCASGLLCPH-----SHS--L--VYVC-KP
Dkk1/2/4_nematostella  GARCSKDKCECS-AG--LCCA--R---PTHGE-WI---CKPMLRENEICTVPAG-GL-AYS-----VNHNC-PCGEGFVCRKVRVRS-QHRKKRPMRMLRKRRCVST
Dkk3_hydra    GTFCDRHEDCAGEGKAACC--VREPAINPHISI---CKPFLAENWVCG-PINLFRVYVGAQ-----VOKACGPKCKQALICKQVGL--FG-----LH--EICMKE
Dkk3_nematostella  GTYCDKTSKED-E--NSCC--VRELSLSTRNSV---CKPMLNEYESC-PINLFRVYVGAQ-----VEPVCGPKCKGLQCRNVGT--KG-----LH--YAELKE
Dkk1/2/4-A_hydra  AESCKKDADCK-NG--CC--V--N---FLLTKQ--CNSYVKEGALCGFR-----DKF--ACG-CEPGLCVKVRGTLTG-----MVR--CVDN
Dkk1/2/4-C_hydra  AKSCKTDAECE-NG--CC--V--N---FLLTKQ--CNSYVKEGALCGFR-----DRET--CG-CEPGLCVKVRGTLTG-----MIRK--CVDH
Dkk3_amphioxus  LAPCNDHHC-PAG--YCCRYST--VVL-FQL---CLRPNLDPCTDPTFAS-----S--CE--CNDGLTCCQDPATAQ-----FTCQLE
DkkB_acropora  FSKCWNSSDCHP-K--ECCAGVS--HKIRGA---CYRQPLKERCNPFLLRP-----GTFE--C-PCRVMTCVTKNEQVGE-----GRCVYV
Dkk_dictyostelium  LQFCNITGFC-PTG--QCCT-----SVL-FGY---CQPLGVLGPPNKTKDS-----EHICG-CEKGLKCVDSV-----CKAS

```

Abbildung 4.3. Toffee–Alignment der CRD2 verschiedener Dkk–Proteine, von Hand nacheditiert. Die konservierten Cysteinreste sind in rot dargestellt; weitere hochkonservierte Bereiche grau unterlegt. Verwendete Sequenzen und ihre Genbank-Einträge: *Hydra* Dkk1/2/4–A und –C (CN559480); *Nematostella vectensis* Dkk1/2/4, Dkk3 (DV082197 und DV093058); *Acropora millepora* (EST GS01bF09.b1); *Branchiostoma belcheri tsingtaunese* (EST AY608670); *Danio rerio* Dkk1 (BAA82135); *Xenopus laevis* Dkk1, Dkk2 (AAC02427, XLA300197); *Mus musculus* Dkk1, Dkk2, Dkk3, Dkk4 (NM_015789, NM_020265, NM_015814, NM_145592); humane (*homo*) Dkk1, Dkk2, Dkk3, Dkk4 (BAA34651, BAA85465, BAA85488, BAA33475); *Dictyostelium discoideum* WGS_BC5V2_0 (Sanger Institute); humane and Maus Colipase (Col) (AAP35458, AAL40731).

gruppieren zusammen. Insgesamt läßt sich daher vermuten, daß die Dkk3–CRD2–Motive eine diversifizierte Gruppe gleichen Ursprungs bilden, zu welcher auch die Colipasen zählen. Zwar konnten die inneren Zweige des Baumes weder mit der Quartet–Puzzling–Analyse (TREE–PUZZLE) noch mit Bootstrap–Analysen (Abschnitt 10.12) aufgelöst werden, da die Cnidarier–Sequenzen sich einige Aminosäuremotive sowohl mit der Dkk3– als auch der Dkk1/2/4–Gruppe teilen. Zieht man jedoch die deutliche Abgrenzung beider Gruppen voneinander in der phylogenetischen Analyse, in der Domänenstruktur sowie die Aminosäureähnlichkeit aus den Blast–Analysen zusammen in Betracht, ist es durchaus plausibel, eine strukturelle Trennung der Dkk–Proteine in die 3er– und 1/2/4er–Gruppe sehr früh in der Metazoa–Evolution, mindestens auf der Organisationsebene der Cnidaria, zu vermuten. Die nur die CRD2 umfassenden *Hydra*–Proteine und ihre *Nematostella*–Verwandten mit 2 CRD wurden daher als Dkk1/2/4 bezeichnet.

4.3 Das Expressionsmuster von *hydkk1/2/4-A*

Der Wnt–Signaltransduktionsweg ist in der Embryogenese in der Organisator– und Körperachsenbildung bei Vertebraten involviert (siehe Einleitung) und auch bei *Hydra* gibt es Hinweise darauf (Hobmayer et al. 2000). Speziell in der axialen Musterbildung bei Vertebraten spielen die Dkk–Proteine eine Rolle, es war daher interessant, die *hydkk1/2/4-A*–Funktion

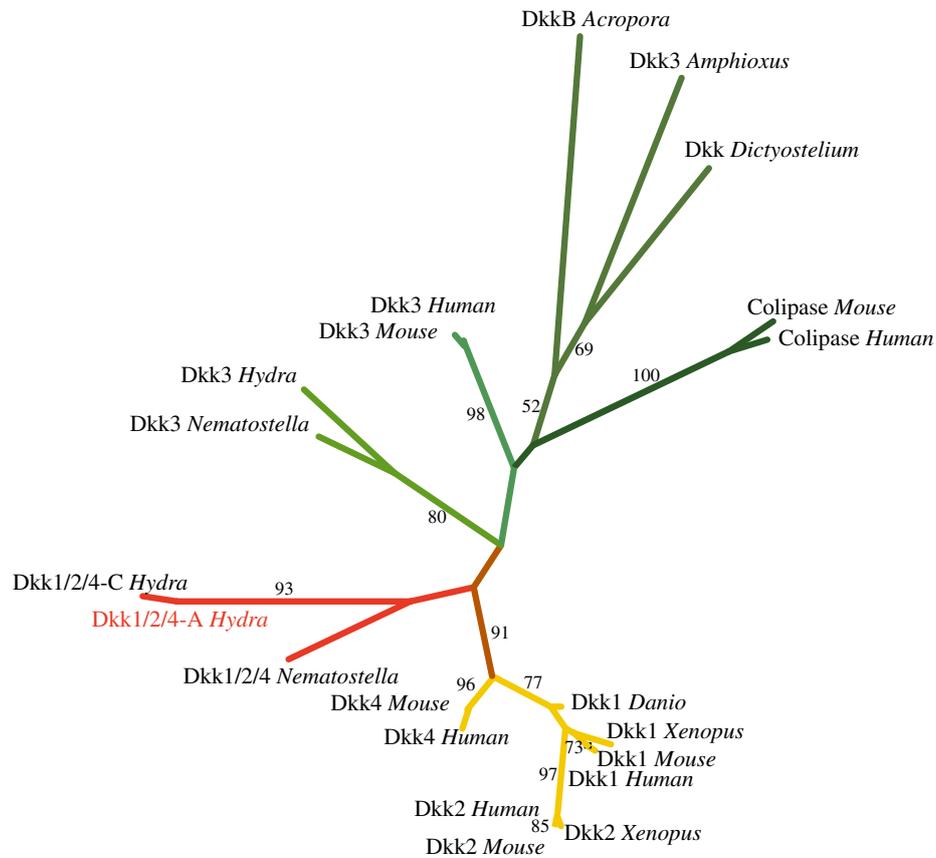


Abbildung 4.4. Maximum-Likelihood-Analyse (IQPNNI) der CRD2 verschiedener Dkk-Proteine (Heiko A. Schmidt). Die farbige abgesetzten Zweige verdeutlichen die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Dickkopf-Familie. Die Werte an den Kanten geben die TREE-PUZZLE-Unterstützung >50 an.

bei eben jenen Prozessen zu untersuchen.

Um Anhaltspunkte für die Funktion des Dickkopf-ähnlichen Moleküls in *Hydra* zu erhalten, wurden Expressionsstudien auf mRNA-Ebene (*in situ* Hybridisierung=ISH) in verschiedenen Stadien und unter im folgenden näher bestimmten Bedingungen durchgeführt.

hydkk1/2/4-A-Expression in *Hydra* ('Whole mounts')

Um die allgemeine Expression von *hydkk1/2/4-A* im adulten Tier zu untersuchen, wurden sowohl intakte Polypen als auch Einzelzellpräparate (Mazerate) der ISH unterzogen.

Das *hydkk1/2/4-A*-Transkript ist in der gesamten Körpersäule von *Hydra*, mit Ausnahme des Kopfes, exprimiert (Abbildung 4.5A). Die Expressionsgrenze verläuft scharf unterhalb

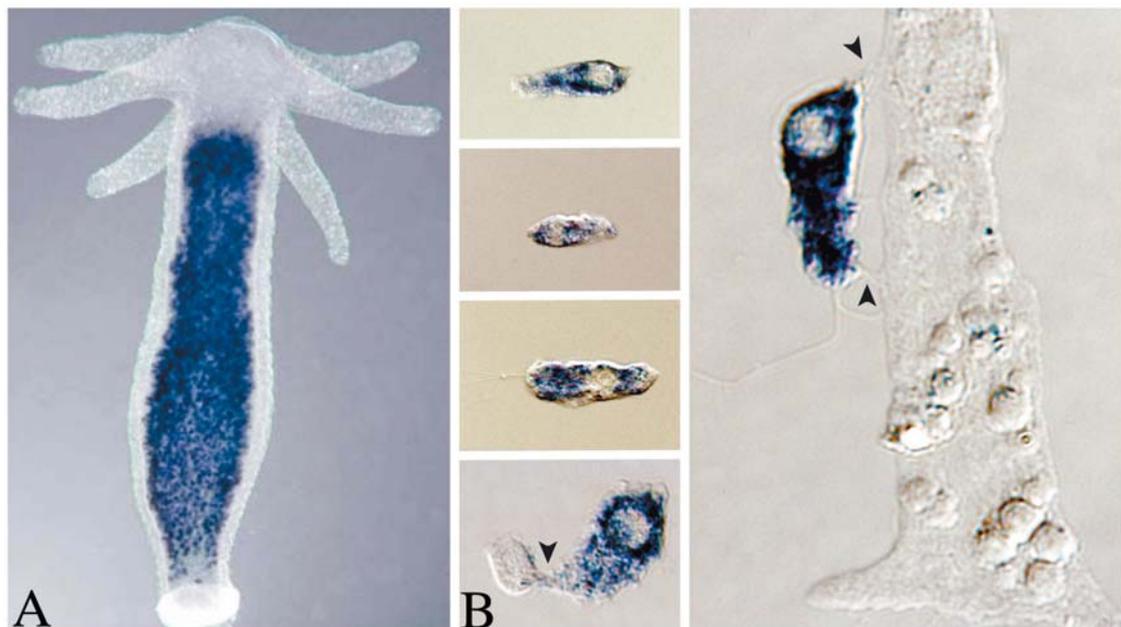


Abbildung 4.5. Detektion der *hydkk1/2/4-A* Expression mittels ISH. (A) adulter Polyp; (B) einzelne Drüsenzellen. Die Pfeile markieren die Cytoplasmabrücken.

des Tentakelkranzes. Zwischen der Knospungszone und dem Fuß wird die Dichte der exprimierenden *hydkk1/2/4-A*-Zellen schwächer. Überraschenderweise war das Transkript in Drüsenzellen exprimiert, einem Derivat der *i*-Zellen, in welchen eher keine Morphogene erwartet werden, da diese Zelllinie in geringerem Maße an der Musterbildung in *Hydra* beteiligt scheint (siehe Kapitel 2.1, Seite 22). Die Mazerat-ISH zeigte, daß *hydkk1/2/4-A* moderat im Cytoplasma begeißelter Drüsenzellen unterschiedlicher Form und Größe vorhanden ist. Gelegentlich wurden auch erhaltene Kontakte zu anderen Zellen über Cytoplasmabrücken beobachtet (Abbildung 4.5B). Als zymogene Zellen besitzen Drüsenzellen viele Vesikel; es ist möglich, daß sekretierte Proteine wie *HyDkk1/2/4-A* hier 'gelagert' werden.

Das Verhältnis von *hydkk1/2/4-A*-positiven Drüsen- zu Epithelzellen beträgt $0,33 \pm 0,12$, wie die Auszählung der Mazerat-ISH von ganzen Tieren ergab. 3 bis 5 % der ausgezählten Zellen waren nicht-gefärbte Drüsenzellen, die in Form und Größe jedoch ebenfalls variabel waren, d.h. die Expression von *hydkk1/2/4-A* ist kein Universalmarker für Drüsenzellen.

***hydkk1/2/4-A*-exprimierende Drüsenzellen der oberen Körpersäule sind Harnstoff-sensitiv**

Eine 3tägige Harnstoff (HU)-Behandlung, die zum Verlust der schnell proliferierenden *i*-Zellen führt, bewirkte eine expressionsfreie Zone kurz unterhalb der *hydkk1/2/4-A*-Grenze

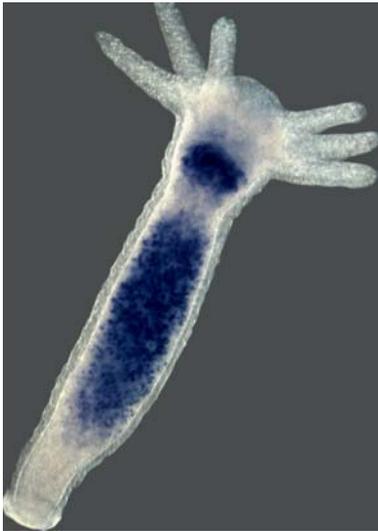


Abbildung 4.6. *hydkk1/2/4-A* Expression (ISH) nach Harnstoff-Behandlung. Das Transkript verschwindet im oberen Viertel der Körpersäule, wie an einem repräsentativen Tier gezeigt.

am Tentakelkranz (Abbildung 4.6). In anderen Körperregionen waren die Drüsenzellen nicht beeinträchtigt. Dies bedeutet, daß die Hauptdifferenzierungszone der *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen hier, im oberen Viertel der Körpersäule, liegen muß. Ausdifferenzierte Drüsenzellen haben einen langen Zellzyklus und sind daher unter den gewählten Bedingungen nicht HU-sensitiv. Es wurde jedoch gezeigt, daß die Zellzykluslänge der Drüsenzellen nicht homogen über den Körper verteilt ist, sondern in apikaleren Bereichen kürzer ist (Bode et al. 1987; Schmidt und David 1986). Dies spiegelt sich in diesem Experiment vermutlich wieder; die proliferativsten und damit noch HU-sensitiven Drüsenzellen liegen in geringer Entfernung von der Kopfgrenze.

***hydkk1/2/4-A*-Expression während der Knospung**

In Polypen mit verschiedenen Knospenstadien wurde die *hydkk1/2/4-A*-Expression untersucht: Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, füllt sich die evaginierende Knospe zunächst gleichmäßig mit *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen. Im späteren Stadium, mit Bildung der Kopfstrukturen, beginnt das Transkript im apikalen Teil der Knospe sukzessive zu verschwinden, bis schließlich die Expressionsgrenze vergleichbar dem adulten Polypen etabliert ist. Darin zeigt sich, daß differenzierte Kopfstrukturen wie Hypostom und Tentakel die Expression von *hydkk1/2/4-A* reprimieren, der frühe apikale Bereich der evaginierenden Knospe zunächst aber keinen so weitreichenden Einfluß besitzt. Die *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen differenzieren sich vermutlich im Verlauf der Kopfbildung zu kopfspezifischen, mukösen Drüsenzellen (Rose und Burnett 1968a, b, 1970), die dann das *hydkk1/2/4-A*-Transkript inaktivieren.

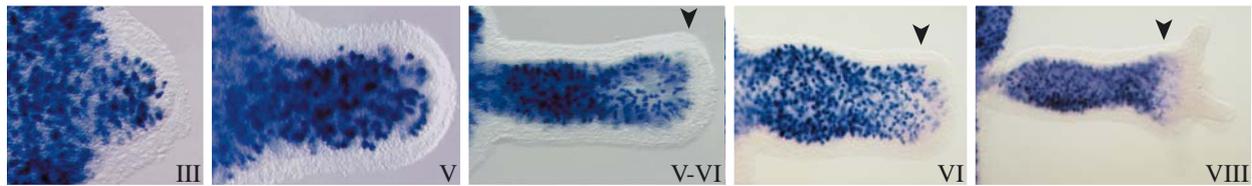


Abbildung 4.7. *hydkk1/2/4-A* Expression während der Knospung in *Hydra* (ISH). Die römischen Zahlen geben die Stadien nach Otto und Campbell (1977) an. Die Pfeile markieren die Expressionsgrenze von *hydkk1/2/4-A*.

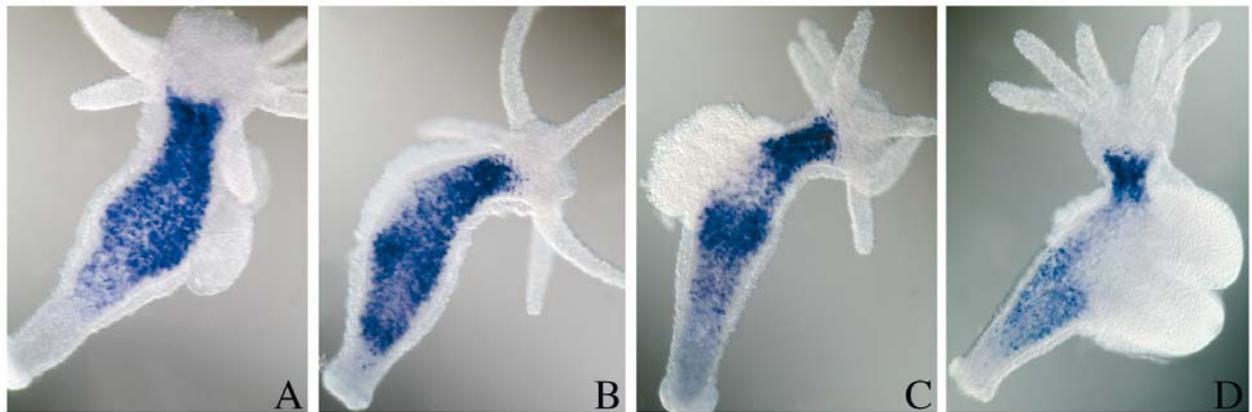


Abbildung 4.8. Die *hydkk1/2/4-A*-Expression verschwindet während der Oogenese in *Hydra*. (A) Spermatogenese. (B-D) Oogenese-Stadien 2, 3 und bereits gefurchter Embryo.

hydkk1/2/4-A-Expression während der Gametogenese

Gameten entstehen bei *Hydra* aus der interstitiellen Zelllinie. Da die Gameten in der Körpersäule — also der Expressionszone von *hydkk1/2/4-A* entstehen, war es interessant zu wissen, ob es einen Einfluß der Gametogenese auf *hydkk1/2/4-A* gibt. Dies ist nicht der Fall bei der Spermatogenese (Abbildung 4.8A), die *hydkk1/2/4-A* Expression in der Körpersäule bleibt hier gleichförmig. Im Gegensatz dazu zeigt die Region um die entstehende Oocyte (Abbildung 4.8B-D), daß diese die *hydkk1/2/4-A* Expression mit zunehmendem Entwicklungsstadium entweder aktiv reprimiert oder daß durch die Determinierung und Rekrutierung von ‘nurse cells’, die in die wachsende Oocyte inkorporiert werden, der Vorrat an i-Zellen und mithin an Drüsenzellvorläufern verarmt. Da vorhandene Drüsenzellen dem Gewebefluß folgend nach apikal und basal migrieren, entsteht sukzessive eine Drüsenzell- und damit *hydkk1/2/4-A*-freie Zone im Oocyten-Bereich.

4.4 *hydkk1/2/4-A*-Expression bei Regeneration und Verletzung

Viele Transkripte reagieren in *Hydra* mit Aufregulation bei Verletzungen und Induktion von Regeneration (eigene Beobachtungen; B. Hobmayer, T.W. Holstein, pers. Kommunikation). Dies impliziert eine Funktion bei der Reorganisation des Gewebes; aus diesem Grund wurden extensive Studien dazu an *hydkk1/2/4-A* im Rahmen dieser Arbeit und der Diplomarbeit von T. Nacak (2004) an verschiedenen *Hydra*-Species durchgeführt.

hydkk1/2/4-A-Expression bei Induktion der Kopfregeneration

Um die Kopfregeneration zu induzieren, wurden Polypen subhypostomal enthauptet; sie regenerierten dann unterschiedlich lang und wurden zu bestimmten Zeitpunkten für die ISH fixiert. Das *hydkk1/2/4-A*-Transkript wurde lokal als unmittelbare Antwort auf die Enthauptung im Wundbereich stark aufreguliert (Abbildung 4.9A); der früheste je getestete Zeitpunkt (10 min) wies schon diesen Effekt auf (nicht gezeigt). Als Kontrolle dienten Tiere, die erst nach der Fixierung enthauptet wurden (Nacak 2004). Im Verlauf der Kopfregeneration blieb die verstärkte Expression zunächst auch nach der Wundheilung bestehen, um dann relativ abrupt aus dem zukünftigen Kopfbereich zu verschwinden. Dies begann frühestens bei 3 Stunden, die Mehrzahl der Tiere aber zeigte nach 12 Stunden den Übergang. Die Kinetik dieses Vorgangs (Abbildung 4.9B) ist vermutlich abhängig von der genauen Schnitthöhe und -art. 18 h nach der Enthauptung sind die apikalen Regionen fast aller Regenerate frei von *hydkk1/2/4-A*, was dem Zustand im unverletzten Tier entspricht. Diese Expressionskinetik von *hydkk1/2/4-A* definiert möglicherweise eine Grenze auf morphologischer und morphogenetischer Ebene, nämlich den Übergang von Körpersäulengewebe zu differenzierten Kopfstrukturen mit dem Kopforganisator. Höchstwahrscheinlich wird hier, wie auch bei der Knospung, die *hydkk1/2/4-A*-Expression im Zuge der Differenzierung von kopspezifischen Zelltypen transkriptionell reprimiert (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 41).

Die *hydkk1/2/4-A* Expression in regenerierendem Gewebe wurde auch in Mazeraten untersucht, die von apikalem Gewebe 1 h regenerierender Tiere hergestellt wurden. Dies ermöglichte die Untersuchung von fixierten Einzelzellen. Hierzu wurden die Polypen bei 80 % KL enthauptet, bei einem Teil 1/10 das apikalen Stumpfteils sofort wieder abgeschnitten und mazeriert ($t=0$), beim anderen Teil erst nach einer Stunde Regeneration. Es zeigte sich auch auf Einzelzell-Ebene die stärkere *hydkk1/2/4-A*-Färbung im Vergleich zu Drüsenzellen aus einer unversehrten Körperregion (Abbildung 4.9C). Auszählungen ergaben, daß in den regenerierenden Spitzen das Verhältnis der gefärbten Drüsenzellen zu Epithelzellen von $0,33 \pm 0,12$

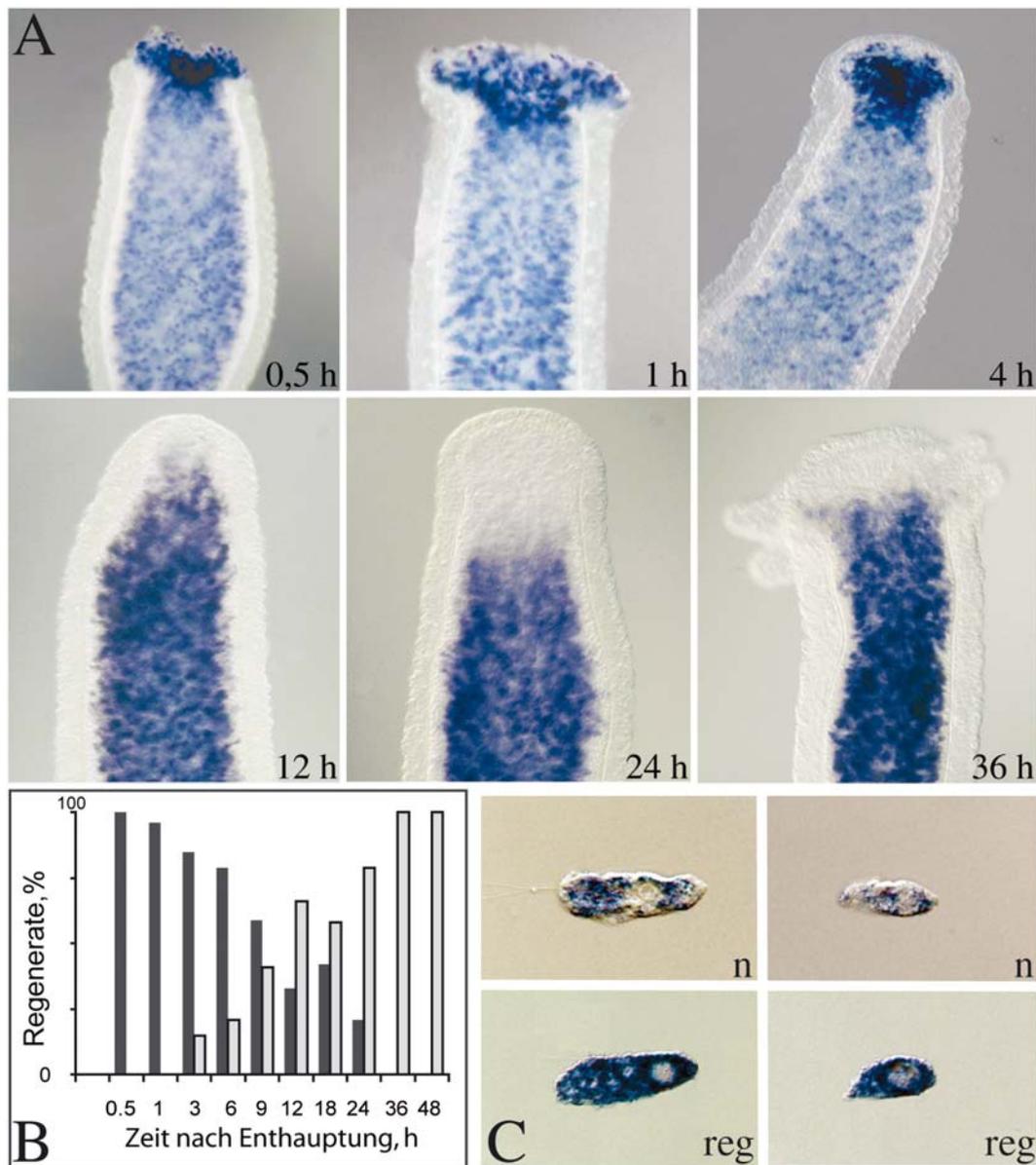


Abbildung 4.9. Dynamische *hydkk1/2/4-A*-Expression während der Kopfregeneration bei *Hydra*. **(A)** ISH; die Zeiten (h=Stunden) geben die Regenerationszeit bis zur Fixierung an. **(B)** Quantitative Auswertung der *hydkk1/2/4-A*-Kinetik. Graue Balken repräsentieren Regenerate mit apikaler *hydkk1/2/4-A*-Expression, weiße Balken bezeichnen Tiere mit expressionsfreier regenerierender Spitze. **(C)** Mazerat-ISH: *hydkk1/2/4-A* ist in Drüsenzellen in 1 h regenerierendem Gewebe (reg) aufreguliert im Vergleich zu Drüsenzellen in unversehrten Körperregionen (n).

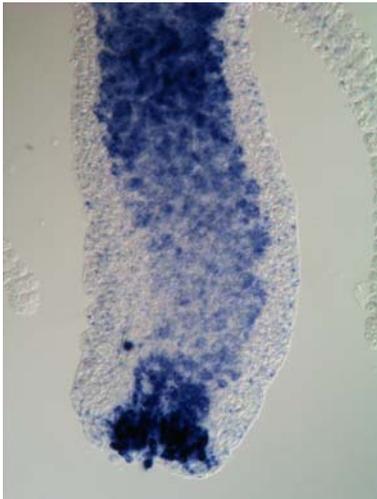


Abbildung 4.10. Aufregulation der *hydkk1/2/4-A*-Expression bei Fußregeneration. Der Fuß wurde bei 20 % KL entfernt, Regeneration: 1 h.

auf $0,62 \pm 0,05$ steigt, sich die Anzahl der *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Zellen also nahezu verdoppelt. Da ungefärbte Drüsenzellen normalerweise nur mit einem Verhältnis von 0,03 bis 0,05 auftreten, kann die Rekrutierung dieser allein nicht für den dramatischen Effekt genügen, sondern erfordert aktive Migration weiter basal liegender Drüsenzellen und/oder die verstärkte Proliferation der Drüsenzellen und/oder die verstärkte Differenzierung von Vorläuferzellen, wie von Rose und Burnett (1970) vorgeschlagen.

***hydkk1/2/4-A*-Expression bei Induktion der Fußregeneration**

Die Fußregeneration wurde ebenfalls untersucht, da die *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen bis hinunter zur Stielregion reichen, wenn auch mit geringer werdender Dichte. Auch hier führte die Amputation des Fußes zu einer Aufregulation von *hydkk1/2/4-A* nahe der Wunde (Abbildung 4.10); die Dichte der *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen scheint ebenfalls lokal zuzunehmen. Die erhöhte Transkriptkonzentration persistiert ca. 9 h.

***hydkk1/2/4-A*-Expression bei Verletzung**

Da *hydkk1/2/4-A* bei Regeneration aufreguliert wird, und zwar im apikalen und basalen Bereich, stellte sich die Frage, ob dies ein regenerationspezifischer Effekt oder eine unmittelbare Antwort auf den Wundstimulus ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Tiere an der Körpersäule und auch am Hypostom mit einem tiefen Schnitt verletzt und nach 6 Stunden (Körpersäule) bzw. 30 min (Hypostom) für die ISH fixiert. Bei einer seitlichen Verletzung ist *hydkk1/2/4-A* ebenfalls aufreguliert (Abbildung 4.11A). Hierbei scheinen sich die Drüsenzellen aktiv, vorwiegend ihrer längeren Achse nach, senkrecht zur Wunde hin zu orientieren,

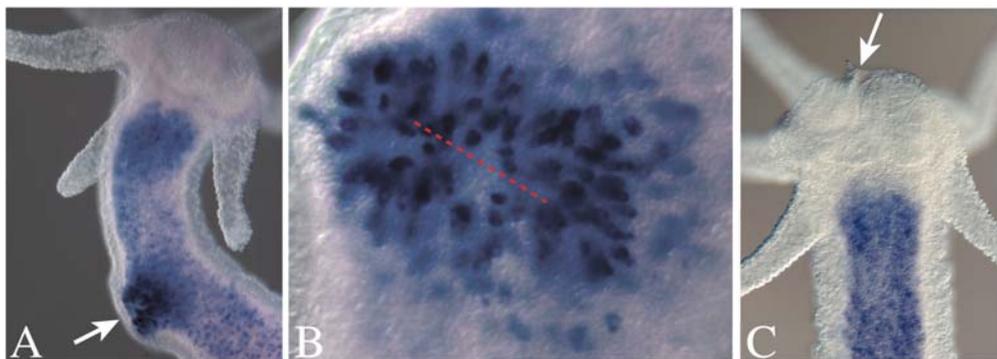


Abbildung 4.11. *hydkk1/2/4-A* Expression bei Verletzung. (A) Tier mit einem tiefen Schnitt in die Mitte der Körpersäule nach 6 h (Pfeil); (B) Schnittwunde (rote Linie); senkrechte Orientierung der Zellen zur Wunde hin; (C) Verletzung am Hypostom (Pfeil), 30 min.

mit dem Nucleus auf der wundabgewandten Seite (Abbildung 4.11B). Der sichtbare Wundverschluß erfolgt bei *Hydra* innerhalb von 2 bis 4 Stunden; die *hydkk1/2/4-A*-Expression ist mit mindestens 6 h länger aufreguliert und kehrt etwas später erst zum normalen Level zurück (nicht gezeigt). In der *hydkk1/2/4-A*-freien, hypostomalen Zone verletzte Tieren zeigen keine wundinduzierte Aufregulation (Abbildung 4.11C), d.h. es werden weder hypostomale Zellen zur *hydkk1/2/4-A*-Expression rekrutiert noch wandern Drüsenzellen aktiv ein. Kontrolltiere zeigten, daß die Heilung trotzdem erfolgte. Dies war auch der Fall bei epithelialen Tieren, die durch Hitzebehandlung ihre i-Zelllinie deren Derivate wie die Drüsenzellen verloren haben (siehe Kapitel 2.1 und 4.5). Ein Schnitt in der Körpermitte heilte ohne erkennbare Zeitverzögerung in 100 % der Fälle, auch wenn diese Tiere nachweislich keine *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen mehr besaßen. Dies bedeutet, daß HyDkk1/2/4 zwar an der Wundheilung beteiligt sein kann, wie es die wundinduzierte Aufregulation im normalen Polypen vermuten läßt, jedoch sind offensichtlich epitheliale Faktoren hierbei ausreichend oder können entsprechende Funktionen übernehmen.

Mehrfach wurde demonstriert, daß Verletzungen den Regenerationsprozeß von *Hydra* unterstützen bzw. verstärken (Kobatake und Sugiyama 1989; MacWilliams 1982, 1983b; Müller 1996). Der Verletzungsstimulus selbst wirkt auf unbekannte Weise als Signal und führt lokal zu einer transienten Erhöhung des Positionswertes, welche innerhalb von 12 bis 18 Stunden abklingt bzw. vom schon vorhandenen Positionswert-Gradienten 'überschrieben' wird (MacWilliams 1983b). Newmann (1974) demonstrierte mittels Induktion der Kopfgeneration durch Abschnürung mit einem Haar, daß die Kopfgenerationsfähigkeit erheblich vom gleichzeitigem Verletzungsstimulus abhängig ist. Die *hydkk1/2/4-A*-Expression wurde in solchen Abschnürregeneraten nicht aufreguliert (Nacak 2004). Dabei erhob sich die Frage,

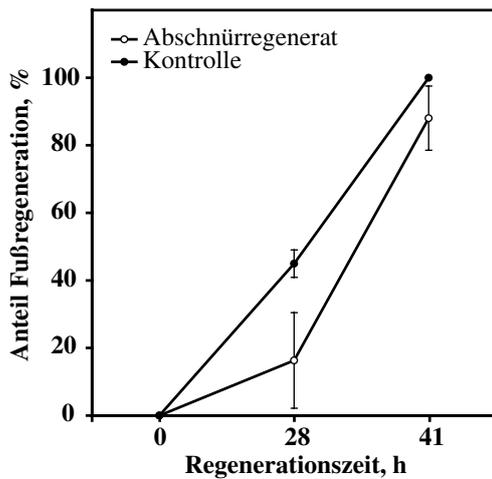


Abbildung 4.12. Verzögerung der Fußregeneration durch Minimierung des Verletzungsstimulus. Gezeigt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten; volle Kreise = Kontrolltiere (n=19, 23), offene Kreise = Abschnürregenerate (n=16, 19). Die vertikalen Linien geben die Standardabweichungen an.

ob das Phänomen der wundunterstützten Regeneration nur oder besonders für die Kopfregeneration gilt bzw. inwieweit auch die Fußregeneration beeinflusst ist. Daher wurde das Abschnürexperiment für Fußregeneration wiederholt: Knospenlosen Polypen wurde der Fuß bei 25 % KL mit einem Haar abgeschnürt, so daß keine oder nur minimale Verletzung entstand. Die so getrennten Körperteile lösten sich voneinander bzw. vom Haar innerhalb einer Stunde. Die Fußregeneration wurde nach 28 und 41 Stunden überprüft. Es trat eine Verzögerung in der Fußbildung bei den Abschnürregeneraten auf, vergleichbar mit der Verzögerung bei abgeschnürten Kopfregeneraten (Nacak 2004; Newman 1974) (Abbildung 4.12). Nach 41 h glichen sich die Abschnürregenerate den Kontrolltieren an. Damit gilt auch für basale Bereiche mit niedrigem Positionswert bzw. niedrigem Kopfaktivations- und -inhibitionspotential, daß die Regeneration durch lokale Erhöhung des Positionswertes gefördert wird.

Zusammengenommen weisen die bisherigen Ergebnisse darauf hin, daß *hydkk1/2/4-A* in der Körpersäule bei jeder Art von Verletzung schnell aufreguliert wird, vermutlich als sofortige Antwort auf den Wundstimulus. Eine physiologische Funktion bei der Wundheilung ist möglich, aber nicht essentiell, da diese offensichtlich auch ohne *hydkk1/2/4-A* (im Hypostom und bei epithelialen Tieren) stattfinden kann. Wie die Kopfregenerate und verletzten Tiere zeigen, scheint *HyDkk1/2/4-A* darüberhinaus eine Rolle in der Musterbildung zu spielen, da *hydkk1/2/4-A* länger als die zur Wundheilung benötigten Zeit von etwa 4 h anwesend bzw. aufreguliert ist.

Überexpressionsstudien oder ‘Knock out’-Manipulationen waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht möglich. Um die Genfunktion einzugrenzen, standen neben der ISH verschiedene mutante *Hydra*-Stämme zur Verfügung. Im folgenden werden Experimente mit 2 dieser Mutanten beschrieben, der Stamm sf-1 und reg-16 (beides *Hydra magnipapillata*).



Abbildung 4.13. *hydkk1/2/4-A*-Expression in pseudoepithelialen Tieren. Drei Individuen mit verschiedener Drüsenzell-Dichte nach 5 Tagen 28 °C und 2 Wochen Hungern. Im Ausschnitt links oben ist eine Vergrößerung verbliebener *hydkk1/2/4-A*-exprimierender Drüsenzellen zu sehen.

4.5 *hydkk1/2/4-A*-Expression in pseudoepithelialen Tieren

Der hitzebehandelte sf-1 Stamm von *Hydra magnipapillata* verliert seine Drüsenzellen effizient nur durch langes Hungern, wie im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde. Alle anderen i-Zell-Abkömmlinge wie Nematocyten und Neuronen gehen innerhalb der ersten Tage nach dem Hitzeschock verloren, daher nennt man diese Tiere epithelial bzw. pseudoepithelial, solange noch i-Zell-Derivate vorhanden sind. Die Anzahl der restlichen, *hydkk1/2/4-A*-positiven Drüsenzellen kann zwischen verschiedenen Polypen beträchtlich variieren (Abbildung 4.13), ist aber 46 Tage nach dem Hitzeschock generell stark gesunken von durchschnittlich 538 auf 8 Zellen im gesamten Tier; 90 % der Polypen besitzen weniger als 10 Drüsenzellen. Sehr oft sind die restlichen Zellen direkt unter dem Tentakelkranz zu finden und erscheinen rundlich und ausgefüllt mit dicht gepackten, sehr großen Vesikeln (Abbildung 4.13, Ausschnitt).

Kontroll-Tiere des nicht-hitzebehandelten Stammes sf-1 und des Wildtyp-Stammes 105 haben ebenfalls eine um ca. 20 % reduzierte Anzahl von *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen nach der Hungerphase (Abbildung 4.14), aber alle besitzen ≥ 100 Drüsenzellen. Die Differenzierung aus i-Zellen und die Selbsterhaltung der Population durch Proliferation ist demnach plausiblerweise abhängig von der Nährstoffzufuhr. Folgende Abschnitte untersuchen die Regenerationsfähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit produzierten (pseudo)epithelialen Tiere im Vergleich zu nicht-behandelten, gefütterten und gehungerten Polypen der Stämme 105 (Wildtyp), sf-1 und A-10, einer weiteren Mutante mit temperatursensitiver i-Zelllinie.

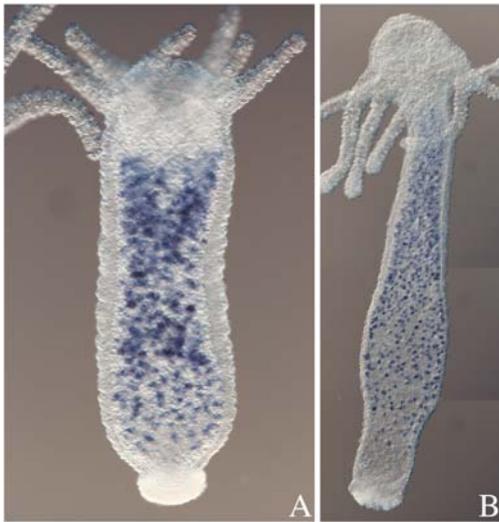


Abbildung 4.14. Gehungerte Tiere zeigen geringe Verluste *hydkk1/2/4-A*-exprimierender Drüsenzellen. *hydkk1/2/4-A*-Expression in *H. magnipapillata* 105, 55 Tage nach dem Hitzeschock (d n.HS) (A) und in *H. magnipapillata* sf-1, 35 d n.HS. (B).

Die Regenerationsfähigkeit pseudoepithelialer Tiere

sf-1-Polypen verlieren ein paar Tage nach dem Hitzeschock ihre Fähigkeit zum Fressen und werden im Lauf der Zeit kleiner und durchsichtiger. Etwa 50 Tage nach dem Beginn der Behandlung beträgt ihre Größe etwa 1 bis 2 mm, d.h. ihre Größe entspricht 1/10 bis 1/20 eines normalen, adulten Polypen. Um ihre Regenerationsfähigkeit zu untersuchen, wurden sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Hitzeschock mittelgastral oder subhypostomal geschnitten und bis zu 12 Tagen auf Kopfgeneration (50 und 70 % KL) sowie Fußregeneration (50 % KL) beobachtet. Es wurde gezeigt, daß die kleinsten, zu 100 % regenerationsfähigen Stücke etwa 300 Zellen besitzen und in der Lage sein müssen, eine Hohlkugel von etwa 0,3 mm im Durchmesser zu formen (Bode und Bode 1980; Shimizu et al. 1993). Wie aus Kernfärbungen geschätzt, besaßen die pseudoepithelialen sf-1-Regenerate eine Zellzahl von mindestens 500 Zellen und bildeten nach dem Schneiden innerhalb von 24 h Kugeln (mit Kopf oder Fuß) von mind. 0,5 mm im Durchmesser. Die Bedingungen für Regeneration bezüglich der Größe und Topologie waren somit gegeben, was sich schließlich auch darin zeigte, das alle Fuß-amputierten Polypen in der Lage waren, einen Fuß innerhalb von 3 Tagen zu regenerieren. Anders verhielten sich jedoch die Kopfgenerate. Abhängig von der vergangenen Zeit nach dem Hitzeschock regenerierten die Stümpfe zunehmend schlechter einen Kopf, gemessen am Auftreten und der Anzahl der Tentakel (Abbildung 4.15). Weiterhin zeigte sich ein Unterschied zwischen 50 und 70 % KL-Regeneraten; weiter apikal geschnittene Tiere regenerierten besser. Dies reflektiert die Verhältnisse im normalen Polypen, was mit dem höheren Kopfkaktivationspotential des Gewebes bei 70 % KL zusammenhängt (MacWilliams 1983b). Es korreliert außerdem mit der meist höheren Anzahl von *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen in apikaleren Bereichen der epithelialen Tiere.

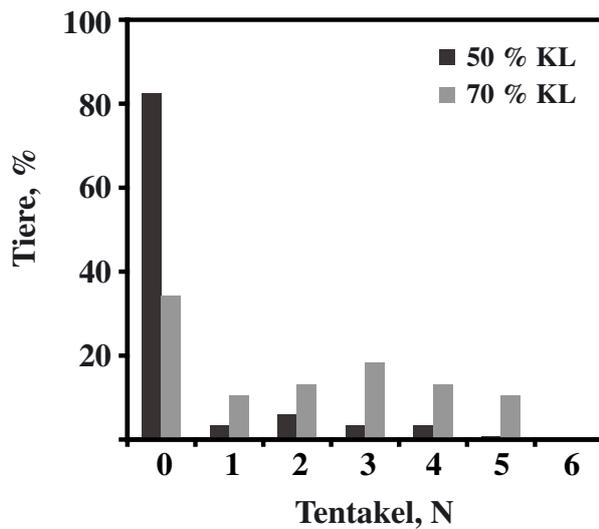


Abbildung 4.15. Kopfregenerationsfähigkeit von pseudoepithelialen Tieren (46 d n. HS) in Abhängigkeit der Schnitthöhe. Bei 50 % KL geschnittene Tiere (n=114) regenerierten 6 Tage nach Enthauptung weniger Tentakel als bei 70 % KL geschnittene Polypen (n=38).

Um diese Effekte auszuschalten, wurden extensive Untersuchungen der Regenerationsfähigkeit von 50 % KL - Regeneraten mit minimierter Anzahl von Drüsenzellen in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Hitzeschock durchgeführt. Bei einem Teil der Tiere wurden mittels ISH die verbliebenen *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen ausgezählt, beim anderen Teil wurde die Regenerationsfähigkeit untersucht. Offensichtlich korrelieren der Verlust von Kopfregenerationsfähigkeit und *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen (Abbildung 4.16). Zwischen 30 und 40 Tage nach dem Hitzeschock reduzieren sich die verbliebenen Drüsenzellen noch einmal drastisch, was ebenfalls im stärkeren Verlust der Regenerationsfähigkeit nach dieser Zeit reflektiert ist.

Wie die ISH der enthaupteten Tiere zeigte, sammeln sich die restlichen *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen um der Wunde und regulieren das Transkript auf, allerdings erst ab einer bestimmten Zelldichte (Abbildung 4.17A–C). Manche Regenerate zeigen Tentakelknospen, obwohl sie keine oder nur noch sehr wenige Drüsenzellen aufweisen (Abbildung 4.17E,F). Eine Erklärung wäre, daß zum Zeitpunkt der Enthauptung noch genügend Drüsenzellen bzw. HyDkk1/2/4-Protein vorhanden war, dies aber während der Regeneration verbraucht wurde, eine andere, daß die Anwesenheit von *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen die Regeneration massiv unterstützt, aber nicht essentiell ist (siehe Diskussion).

Um sicherzustellen, daß nicht allein die Verarmung an Nährstoffen für den Verlust der Kopfregenerationsfähigkeit verantwortlich ist, wurden Tiere der Stämme sf-1, A-10 sowie des Wildtypstammes 105 verglichen. A-10 ist eine Chimäre, deren Epithelzellen von 105, die i-Zell-Linie aber von sf-1 stammen (H. Shimizu, Michima, Japan). Die Kopfregenerationsfähigkeit wurde bei gehungerten, nicht-hitzegeschockten (105, sf-1, A-10) und gehungerten, hitzegeschockten Polypen (sf-1, A-10) untersucht. Ein Teil der nicht-hitzegeschockten, ge-

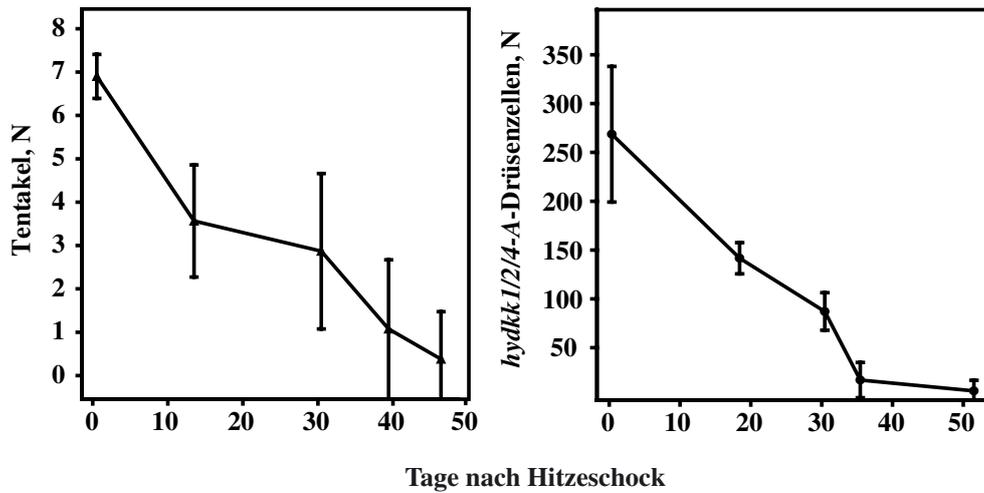


Abbildung 4.16. Kopfreparationsfähigkeit (links) und Anzahl der *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen (rechts) korrelieren in epithelialen Tieren. links: Regenerierte Tentakel bei $n=20, 101, 69, 180$ und 114 Tieren; rechts: *hydkk1/2/4-A*-Drüsenzellen in $n=5, 3, 4, 37$ und 22 Regeneraten mit zunehmender Zeit nach dem Hitzeschock. Die vertikalen Linien geben die Standardabweichung an.

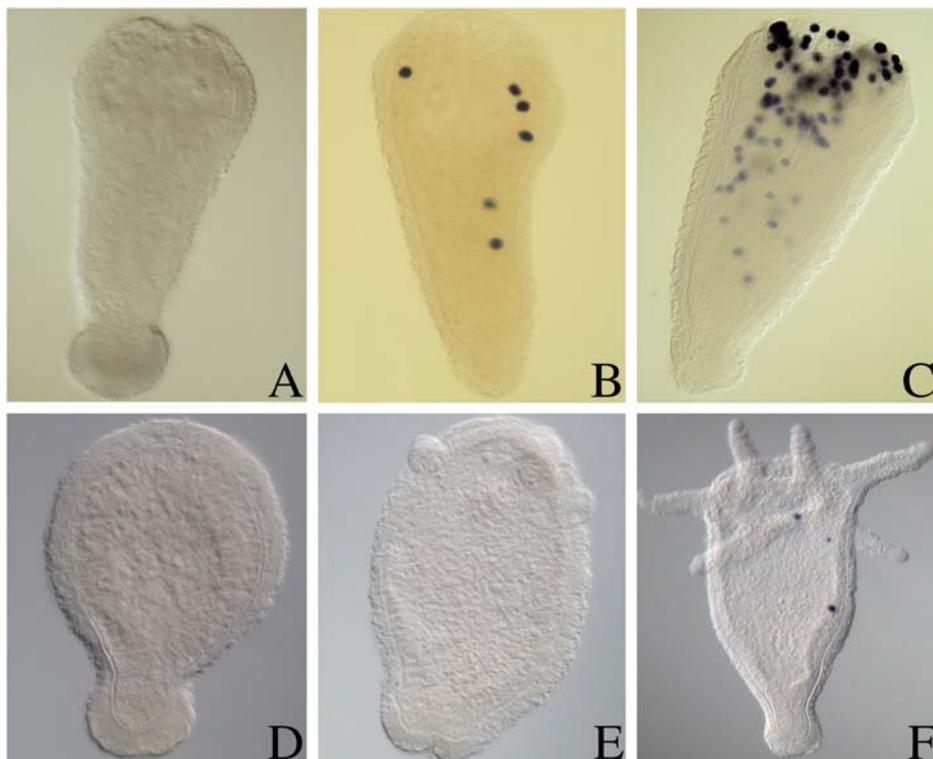


Abbildung 4.17. Unterschiedliche *hydkk1/2/4-A*-Expression in pseudoepithelialen, kopfputierten Tieren (ISH). 4 h (A-C) und 5-9 Tage (D-E) nach der Enthauptung.

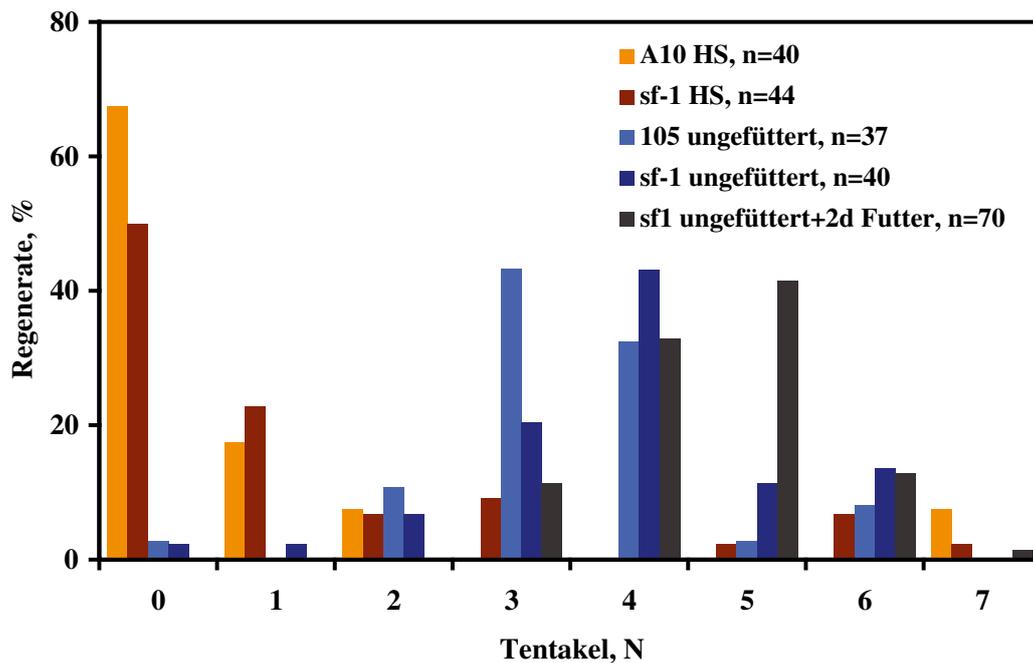


Abbildung 4.18. Gehungerte Tiere regenerieren besser als pseudoepitheliale Tiere. sf-1- und A-10-Tiere wurden hitzegeschockt (HS) und zusammen mit nicht-hitzegeschockten sf-1-, A-10- und 105-Polypen 35 Tage gehungert, bevor sie bei 50 % KL enthauptet wurden. Nach 12 Tagen Regenerationszeit wurden die Tentakel ausgezählt. Die Anzahl der Tiere (n) ist im Diagramm angegeben.

hungerten sf-1-Tiere wurde vorher 2 Tage wieder angefüttert, um darzustellen, ob und in welchem Ausmaß das Hungern allein einen Effekt auf die Regenerationsfähigkeit, unabhängig vom Verlust der i-Zellinie, bewirkt.

Wie sich zeigte (Abbildung 4.18), ist die Anzahl der regenerierten Tentakel nicht nur von i-Zell-Derivaten, sondern auch vom Futterzustand abhängig. Normalerweise regeneriert *Hydra* die ursprüngliche Tentakelzahl mit leichten Abweichungen, im Mittel 7 Tentakel. Lang gehungerte *H. magnipapillata* 105-Polypen regenerierten $3,4 \pm 1,1$, sf-1-Tiere $3,9 \pm 1,3$ Tentakel. Die wieder angefütterten sf-1-Tiere regenerierten verbessert mit $4,6 \pm 0,9$ Tentakeln. Generell regenerierten gehungerte Polypen etwa 2 Tage verzögert gegenüber gut genährten Tieren des gleichen Stammes. Verglichen mit den hitzegeschockten Polypen, die eine Regenerationsquote von $1,35 \pm 1,96$ (sf-1) und $0,85 \pm 1,87$ (A-10) Tentakeln aufwiesen, regenerierten gehungerte Tiere immer noch besser als Tiere ohne *hydkk1/2/4-A*-exprimierende Drüsenzellen und andere i-Zell-Derivate. Damit ist der Erfolg der Kopfregenerationsfähigkeit bei *Hydra* von mindestens zwei Komponenten abhängig: Von der Anzahl der Drüsenzellen — und korrelierend der Menge an *hydkk1/2/4-A*-Transkript — und moderat von der Verfügbarkeit von Nährstoffen.

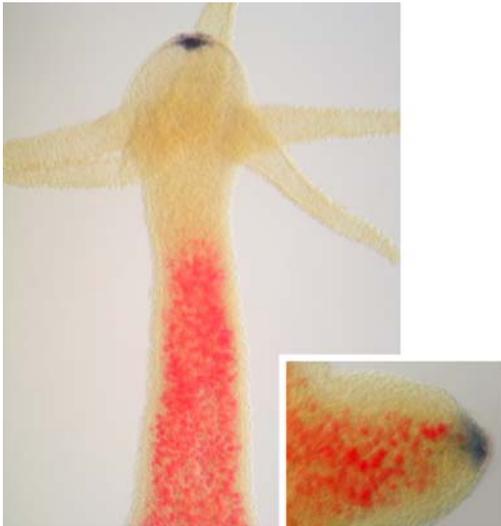


Abbildung 4.19. *hydkk1/2/4-A* (rot) und *hywnt3a*-Expression (blau) im adulten Tier und in der sich entwickelnden Knospe (Ausschnitt rechts).

4.6 Die Beziehung von *hydkk1/2/4-A* und *hywnt3a* in *Hydra*

Um einen eventuellen Zusammenhang der *hydkk1/2/4-A*-Expression und dem kanonischen Wnt-Signalweg zu untersuchen, wurden vergleichende Studien zur Expression von *hydkk1/2/4-A* und *hywnt3a* in *H. magnipapillata* 105 und epithelialen Tieren durchgeführt. Im adulten Tier schließen sich beide Expressionsdomänen weiträumig aus (Abbildung 4.19), d.h. sie markieren verschiedene Körperregionen: Kopf und Körpersäule. Die deutliche Trennung der beiden Expressionsdomänen ist aber nicht in Übergangsstadien zu finden. Bei der sehr frühen Knospe (Stadium I-III), wenn das Gewebe zu evaginieren beginnt (vgl. Abschnitt 4.3) ist *hywnt3a* unmittelbar vor der sichtbaren Evagination in der Knospungszone des Muttertieres hauptsächlich ektodermal exprimiert (Hobmayer et al. 2000; Rentzsch 2001). Die endodermalen, *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen wandern in die sich ausstülpende Knospe ein bzw. folgen dem Gewebefluß und füllen die Knospe anfangs bis hin zum apikalen Bereich. Beide Expressionsdomänen sind also an der apikalen Spitze zunächst benachbart, wenn auch weitgehend in verschiedenen Keimblättern (Abbildung 4.19). Mit weiterem Wachstum der Knospe werden beide Transkripte durch die Abschaltung der *hydkk1/2/4-A*-Transkription, wie im adulten Tier, weiträumig voneinander getrennt.

Weiterhin sind die *hywnt3a*- und *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Zellen bei der Kopfregeneration direkt benachbart (Abbildung 4.20). Dieser Zustand hält so lange an, bis *hydkk1/2/4-A* in der zukünftigen Kopfregeion herunterreguliert wird und *hywnt3a* sich auf die apikalsten 50-60 Zellen beschränkt (Rentzsch 2001). Beide Faktoren sind also mit der Musterbildung und axialen Differenzierung assoziiert und mindestens in dieser Phase könnte eine direkte Antagonisierung von HyWnt3a-Signaltransduktion durch HyDkk1/2/4-A auftreten. Da beide Proteine sekretiert werden und über ihre Diffusionsreichweiten in *Hydra* nichts bekannt

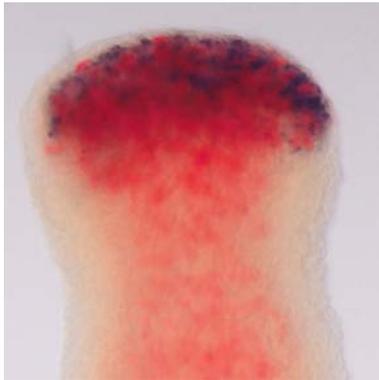


Abbildung 4.20. Synexpression von *hydkk1/2/4-A* (rot) und *hywnt3a* (blau). Doppel-ISH in einem 8 h alten Kopfregerat.

ist, wäre eine antagonistische Interaktion aber auch im normalen, adulten Tier möglich.

Die direkte Nachbarschaft von *hydkk1/2/4-A*- und *hywnt3a*-exprimierenden Zellen kann außerdem experimentell induziert werden: Die Behandlung von Polypen mit dem GSK3 β -Inhibitor Alsterpaullone, der den kanonischen Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert (Broun et al. 2005), führt zur Anhebung der Positionswerte bzw. des Kopfaktivierungspotentials im gesamten Tier. Die Polypen entwickeln infolgedessen ektopische Kopfstrukturen über die gesamte Körpersäule. Damit geht eine herdförmige Aufregulation von *hywnt3a* in der Körpersäule einher (Abbildung 4.21A, Broun et al. 2005; Nacak 2004).

Im Anfangsstadium dieser Transformation sind die *hydkk1/2/4-A*- und *hywnt3a*-exprimierende Zellen im Körpersäulengewebe zunächst direkt benachbart (Abbildung 4.21B,C). Das *hydkk1/2/4-A*-Transkript wird schließlich im Bereich entstehender ektopischer Kopfstrukturen herunterreguliert (Nacak 2004). *hywnt3a* schien dabei oft im Zentrum *hydkk1/2/4-A*-freiwerdender Regionen zu liegen (Abbildung 4.21C). Dies ist allerdings kein schneller Prozeß — die beginnende *hywnt3a*-Expression allein resultierte nicht in sofort, sondern erst einige Tage später in der Repression von *hydkk1/2/4-A*, ähnlich wie bei der Kopfregeneration und Knospenbildung.

***hydkk1/2/4-A*, *hywnt3a* und der Verlust der Regenerationsfähigkeit in pseudoepithelialen Tieren**

Die bisherigen Ergebnisse implizieren eine Rolle für einen HyWnt3a-HyDkk1/2/4-A-Antagonismus bei der Musterbildung von *Hydra*. Um die Abhängigkeit beider Faktoren genauer zu überprüfen, wurden pseudoepitheliale Tiere mit reduzierter *hydkk1/2/4-A*-Expression und Tiere der kopfregenerationsdefizienten Mutante *reg-16* auf *hywnt3a*-Expression untersucht.

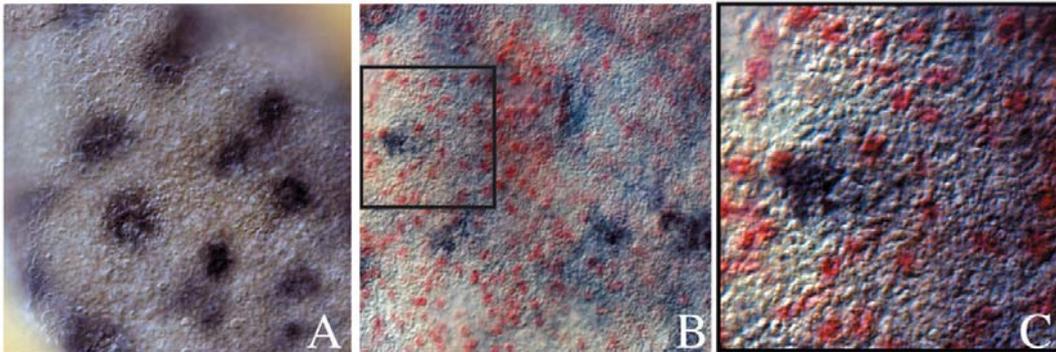


Abbildung 4.21. *hywnt3a*-Expression inhibiert sukzessive die *hydkk1/2/4-A*-Transkription. ISH und Doppel-ISH in 24 h Alsterpaullone-behandelten Tieren. (A) Ektopische *hywnt3a*-Herde in der Körpersäule, (B) Doppel-ISH mit *hywnt3a* (blau) und *hydkk1/2/4-A* (rot), (C) Vergrößerung des eingerahmten Bereichs in (B).

hywnt3a-Expression in epithelialen Tieren.

Epitheliale Tiere wirken ‘verkopft’, d.h. die Kopfregion ist größer geworden, oft auf Kosten der basalen Regionen (Marcum und Campbell 1978), und die Hypostome wirken abgeflacht. Die Ursachen dieser morphologischen Veränderung sind nicht bekannt. Nimmt man HyDkk1/2/4-A als Antagonisten des Wnt-Signalwegs an, kann man u.U. eine Vergrößerung der *wnt3a*-Domäne erwarten, da Wnt sich in einem positiven Regelkreislauf selbst aktiviert. Um zu untersuchen, ob die *hywnt3a*-Expressionsdomäne in *hydkk1/2/4-A*-freien Tieren entsprechend ihrer Morphologie verändert ist, wurden (pseudo)epitheliale Tiere mittels ISH untersucht. Tatsächlich zeigten diese im Vergleich zum Wildtyp eine Vergrößerung der hypostomalen, ektodermalen *hywnt3a*-Domäne, bezogen auf die Hypostombreite (Abbildung 4.22). Die endodermale Domäne verändert ihre Breite ebenfalls, aber weniger stark. Diese Vergrößerung der *hywnt3a*-Domäne in epithelialen Tieren wurde auch von Augustin et al. (2006) beschrieben.

Die *hywnt3a*-Expression wurde ebenfalls bei der gestörten Kopfregeneration pseudoepithelialer Tiere untersucht. Etwa 50 % der untersuchten Stümpfe wiesen zusätzliche *hywnt3a*-Domänen auf (Abbildung 4.23). In Parallelversuchen wurde die drastische Reduktion der Drüsenzellen verifiziert (nicht gezeigt). Auffällig war, daß die apikale *hywnt3a*-Expression nach Heilung der Wunde sehr oft nur noch im Endoderm anstatt in beiden Zellschichten vorhanden war.

Weiterhin wurde die *hywnt3a*-Expression bei Verwundung epithelialer Tiere untersucht. Im normalen Polypen wird *hywnt3a* nach Schnittverletzungen in ca. 50 % der Fälle leicht auf-

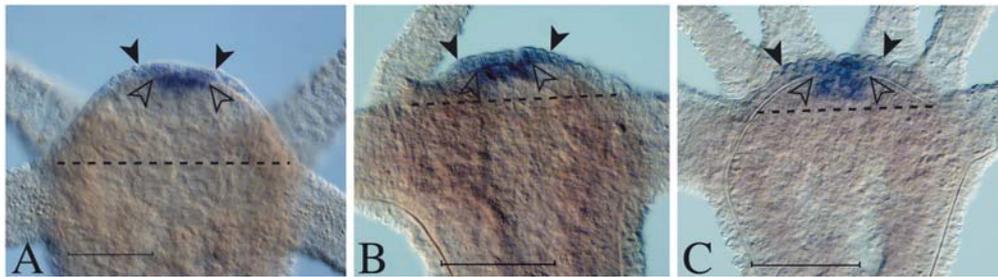


Abbildung 4.22. Die *hywnt3a*-Expressionsdomäne ist in epithelialen Tieren vergrößert. (A) Wildtyp (*H. magnipapillata* 105), (B,C) hitzegechockte sf-1-Polypen nach 35 d Hungern. Die gefüllten Pfeile geben die ektodermale Begrenzung der *hywnt3a*-Domänen an, die leeren Pfeile die endodermalen Grenzen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Breite des Hypostoms im optischen Schnitt; der Größenstandard beträgt 500 μm .

reguliert (eigene Beobachtung; T. Lengfeld, pers. Kommunikation). RT-PCR-Experimente zeigten zudem, daß *hywnt3a* auf Verletzung mit leicht verstärkter Expression reagiert (Abbildung 4.24). Auch verletzte, epitheliale Tiere regulierten das *hywnt3a*-Transkript in etwa der Hälfte der Fälle an der Wunde auf (nicht gezeigt); eine stärkere Aktivierung von *hywnt3a* nach Verletzung war daher im *hydkk1/2/4-A*-negativen Kontext nicht eindeutig nachzuweisen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, das die *hywnt3a*-Expression eine stabile Eigenschaft des Epithels in *Hydra* ist, da sie auch bei sehr kleinen, epithelialen Tieren und ebenfalls in epithelialen, enthaupteten Polypen am ursprünglichen apikalen Pol auftritt, unabhängig davon, ob die Regeneration erfolgreich beendet wurde oder nicht. Im letzteren Fall trat oft ektopische *hywnt3a*-Expression im Stumpf auf, dies könnte mit fehlender *hydkk1/2/4-A*-Expression bzw. fehlenden Drüsenzellen in Zusammenhang gebracht werden (siehe Diskussion).

hydkk1/2/4-A*- und *hywnt3a*-Expression in der kopfregenerationsdefizienten Mutante *reg-16

Die *H. magnipapillata*-Mutante *reg-16* kann keinen oder nur stark verzögert einen Kopf regenerieren (Achermann und Sugiyama 1985; Sugiyama und Fujisawa 1977). Der Grund hierfür wird in einem verzögertem Abfall des Kopfinhibitions potentials nach der Enthauptung gesehen, was die Selbstverstärkung der Kopfaktivierung behindert (siehe Einleitung). Im Gegensatz dazu ist die Kopfbildung bei der Knospung nicht gestört. Ein bestimmter Anteil enthaupteter *reg-16*-Tiere zeigt keine *hywnt3a*-Expression in der apikalen Spitze, was mit

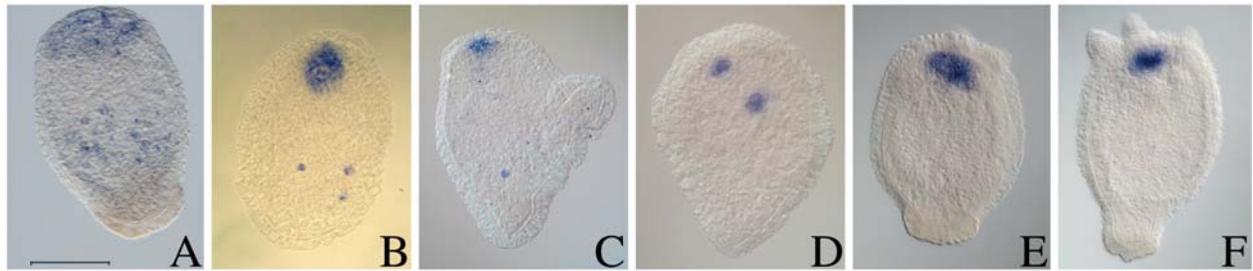


Abbildung 4.23. Die *hywnt3a*-Expression ist in nicht-regenerierenden, epithelialen Tieren verändert. Regenerate 35 d nach Hitzeschock, 9 Tage nach Enthauptung. (A-D) Nicht-regenerierende Tiere. Neben der *hywnt3a*-Domäne am apikalen Pol traten zusätzliche lokale Expressionen in der Körpersäule auf. Bei (D) fehlt die eindeutige Zuordnung einer apikalen Domäne ganz. (E,F) Erfolgreiche, epitheliale Kopfregerate. Der Größenstandard in (A) entspricht 500 μm und gilt für alle Tiere.

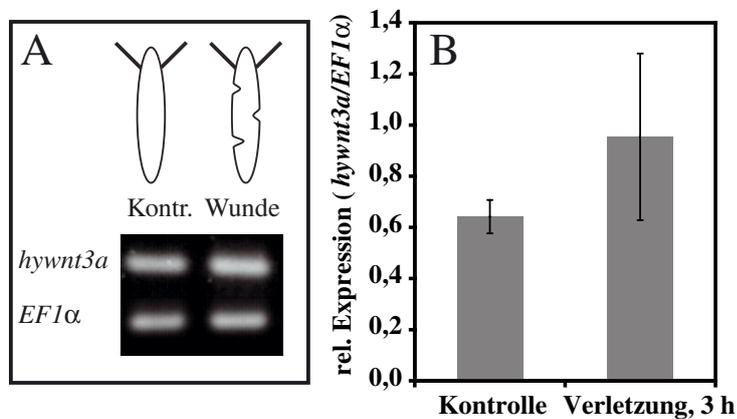


Abbildung 4.24. *hywnt3a* ist bei Verletzung leicht aufreguliert. (A) RT-PCR von *hywnt3a* und *EF1α* bei an der Seite verletzten *H. magnipapillata* 105 und unverletzten Polypen ($n=20$). (B) Quantifizierung der PCR-Bandenintensität zweier unabhängiger Experimente mit Normierung auf das Haushaltsgen *EF1α*. Die vertikalen Linien geben die Standardabweichung an.

der Anzahl regenerationsdefizienter und verzögert regenerierender Tiere korreliert (Rentzsch 2001). Im Rahmen der Untersuchung der Beziehung zwischen *hydckk1/2/4-A* und *hywnt3a* war es interessant zu wissen, ob *hydckk1/2/4-A* in diesen Tieren veränderte Expression zeigt. Im nicht manipulierten Tier wurden beide Gene normal exprimiert (nicht gezeigt). In Kopfregeraten wurde das *hydckk1/2/4-A*-Transkript apikal stark exprimiert wie im Wildtyp, unabhängig davon, ob *hywnt3a* vorhanden war ($57,4 \pm 12,0$ %) oder nicht (nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß *hywnt3a*-Expression für die Aufregulation und Erhaltung von *hydckk1/2/4-A* im Wundbereich nicht notwendig ist.

4.7 Die heterologe Expression von *hydckk1/2/4-A*

Gegenwärtig besteht noch keine verlässliche Möglichkeit, *Hydra* genetisch zu manipulieren. Daher wurde *hydckk1/2/4-A* im *Xenopus*-Embryo und in Zellkultur (HEK293T) überexprimiert, um zu erfahren, ob *HyDkk1/2/4* Wnt-antagonistisch wirkt und diese Funktion damit

evolutiv konserviert ist. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Sonia Pinho und Christof Niehrs am DKFZ in Heidelberg durchgeführt.

***hydkk1/2/4-A*-Überexpression in *Xenopus*-Embryonen**

Bei der *Xenopus*-Embryogenese ist *XDkk1* ein essentieller Faktor für der Entwicklung anteriorer Strukturen, insbesondere des Kopfes (Glinka et al. 1998; Kazanskaya et al. 2000). Es agiert nach der ‘mid blastula transition’ durch Inhibition der Wnt-Signaltransduktion im anterioren Bereich, was die Kopfentwicklung überhaupt erst ermöglicht. Überexpression von *xdkk1* führt dosisabhängig zu überproportional großen Kopfstrukturen (‘Dickkopf’) und einem generell dorso-anteriorisierten Phänotyp.

Die Injektion von *hydkk1/2/4-A* mRNA in *Xenopus* war Teil der Diplomarbeit von T. Nacak (2004) und zeigte, daß *hydkk1/2/4-A* im Frosch-Embryo morphogenetisch aktiv ist und den typischen Dickkopf-Phänotyp hervorrufen kann.

S. Pinho konnte weiterhin zeigen, daß die Injektion von *hydkk1/2/4-A* *xwnt8*-induzierte sekundäre Achsen im *Xenopus*-Embryo blockieren kann (Abbildung 4.25A), wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie endogenes *xdkk1*. Gleiches gilt für die Inhibition eines Wnt-Signalsensitiven Reportersystems (‘TOPFLASH-Assay’, siehe auch nächster Abschnitt): Die durch *xwnt8*-Injektion in alle 4 Embryoblastomeren induzierte Reporteraktivität wurde dosisabhängig durch Co-Injektion mit *hydkk1/2/4-A* reprimiert (Abbildung 4.25B; Guder et al. 2006b).

Ein weiteres Experiment adressierte die Inhibition von Wnt-aktivierten Genen durch *hydkk1/2/4-A* im ‘animal cap assay’: Das Zielgen *siamois*, welches im Frosch von *XWnt8* aktiviert wird, konnte durch *hydkk1/2/4-A*-Coinjektion genauso wie durch endogenes *xdkk1* reprimiert werden (Abbildung 4.26).

Diese Resultate zeigen, daß *hydkk1/2/4-A* die Funktion von endogenem *xdkk1* im Froschembryo dosisabhängig simulieren kann und hier den kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert.

Die *hydkk1/2/4-A*-Aktivität in HEK293T-Zellen

Parallel zum heterologen Ansatz in Frosch wurde die Wirkung von *hydkk1/2/4-A* im ‘TOPFLASH-Assay’, basierend auf einem Wnt-sensitiven Reporterkonstrukt in Zellkultur (HEK293T) analysiert; interessant war v.a. eine eventuelle Wechselwirkung mit *hywnt3a*, um

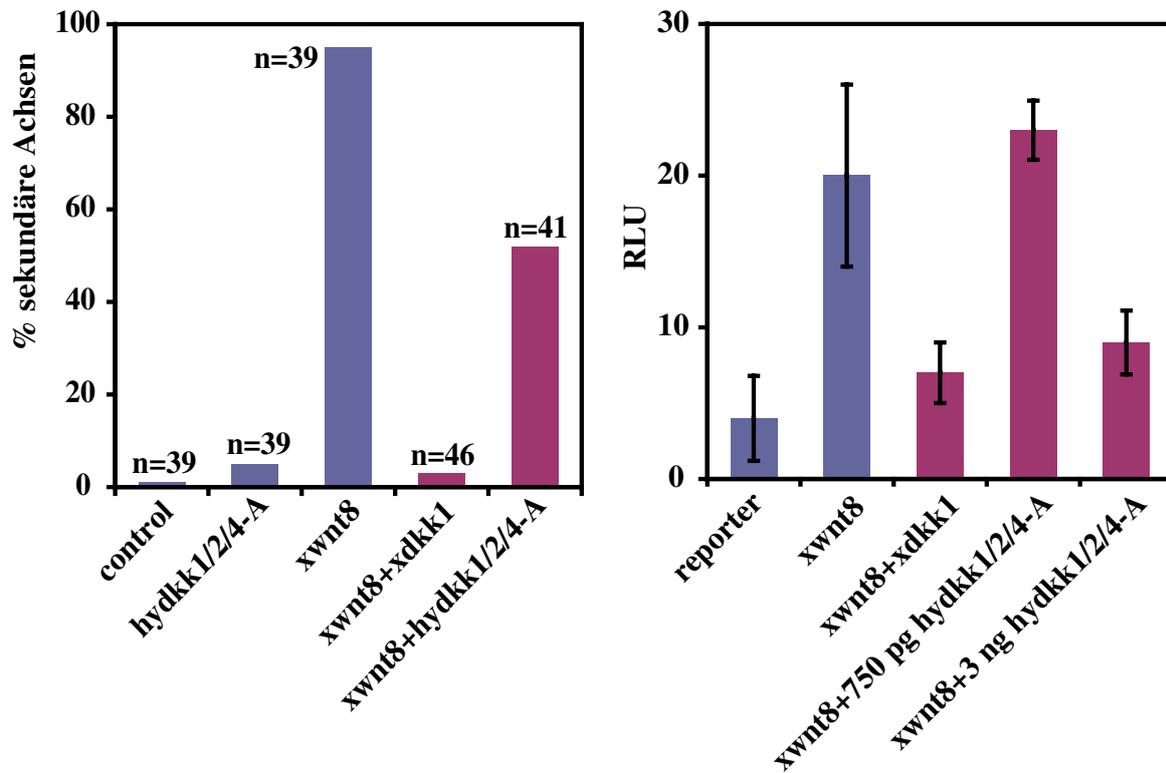


Abbildung 4.25. Blockierung des Wnt-Signalwegs durch *hydkk1/2/4-A* in *Xenopus*. (A) Blockade sekundärer Achsen. *xwnt8* mRNA (12,5 pg) wurde entweder allein oder mit *xdkk1* (10 pg) oder *hydkk1/2/4* (1 ng) co-injiziert. (B) Blockade eines Wnt-sensitiven Reporterkonstrukts (TOPFLASH-Assay). Hierfür wurden die mit *xwnt8* (150 pg), *xdkk1* (300 pg), *hydkk1/2/4* (750 pg und 3 ng) und p01234(=TOPFLASH-Reporter) injizierten Embryonen bei Stadium 10 bis 10,5 gesammelt und für das Luciferase-Assay lysiert. RLU = Relative Fluoreszenz Einheiten; vertikale Linien=Standardabweichungen aus 3 Messungen.



Abbildung 4.26. *hydkk1/2/4-A* und *xdkk1* inhibieren die *xwnt8*-vermittelte *siamois*-Transkription. ‘animal cap assay’: Von mit *xwnt8* (100 pg), *xdkk1* (200 pg) und *hydkk1/2/4-A* (6 ng) co-injizierten Embryonen wurden im Stadium 8 – 9 die Animalkappen explantiert und daraus die cDNA für RT-PCR gegen *siamois*, *brachyury* (*xbra*) und *histon-4* (*h4*) hergestellt. *brachyury* diente dabei als Kontrolle für die Mesoderm-Freiheit der animalen Kappen, nicht-injizierte Embryonen als Negativkontrolle. GE=gesamter Embryo.

die evolutionäre Konservierung des Wnt–Antagonismus zu belegen.

Das TOPFLASH-Konstrukt (Korinek et al. 1997) besteht aus dem *Luciferase*-Gen (Glühwürmchen) und einem Promotor, welcher mindestens drei optimale TCF–Bindestellen besitzt, wodurch es direkt aktivierbar durch den TCF/ β -Catenin–Komplex ist. pTOPFLASH kann in Zellkultur oder im lebendem Tier (siehe vorheriger Abschnitt) angewendet werden, die Biolumineszenz wird üblicherweise nach Lyse der Zellen und Substratzugabe im Luminometer gemessen und gibt Auskunft über den Grad der Aktivierung des Wnt–Signalwegs. Für die Experimente wurden die ORFs von *hydkk1/2/4-A* und *hywnt3a* in den Expressionsvektor pCS2+ kloniert. HEK293T–Zellen wurden zunächst mit dem Reporterkonstrukt sowie jeweils mit *hywnt3a*, *hydkk1/2/4-A* oder Maus *wnt1* (*mwnt1*) co-transformiert, um die Aktivierung bzw. Inhibition von TOPFLASH zu untersuchen. Es stellte sich heraus, das *hywnt3a* nicht aktivierend wirkte (8 bis 60 ng) und *hydkk1/2/4-A* zusammen mit *mwnt1* aktivierend auf TOPFLASH wirkte (5–78 ng; Abbildung 4.27A); ab 40 bzw. 78 ng wirkten beide Transkripte toxisch. Es wurde weiterhin untersucht, ob die unerwartete aktivierende Wirkung von *hydkk1/2/4-A* mit den bekannten Komponenten des Wnt/Dkk–Antagonismus zu beeinflussen war: LRP6, Wnt1 und Kremen.

Wnt1/LRP6. *hydkk1/2/4-A* allein konnte das Reporterkonstrukt nicht aktivieren, dazu war mindestens eine der beiden Komponenten des Wnt–Signalweges nötig, LRP6 oder Wnt1 (Abbildung 4.27B). *hydkk1/2/4-A* wies damit eine synergistische Wirkung mit LRP6 und Wnt1 auf ($2,0 \pm 0,6$ - und $2,2 \pm 0,3$ -fache Aktivierung des Reporters; $n=5$ bzw. 4).

Kremen. Für die Wnt–antagonistische Wirkung von Dickkopf-Proteinen ist die Interaktion mit Kremen–Rezeptoren essentiell (siehe Einleitung). HEK293T–Zellen besitzen nur sehr basale, endogene Level von Molekülen der Wnt–Kaskade, daher müssen für oben beschriebene Assays immer alle Komponenten zusätzlich eingebracht werden: Wnt, Frizzled, LRP6 und evtl. Kremen, wobei die Wirkung von XDkk1 auch ohne zusätzliche Kremen–Transfektion zu beobachten ist. Nachdem das *Hydra*–Dickkopf–Molekül nicht wie erwartet reprimierend wirkte, wurden die Zellen zusätzlich mit humanem Kremen1 (*hkrm1*) cotransfiziert, um den Einfluß auf das *hydkk1/2/4-A*-Verhalten zu studieren. Die *hkrm1*-Transfektion inhibierte mit *xdkk1* zusammen den Reporter, hatte aber auf die *hydkk1/2/4-A*-induzierte Aktivierung keinen antagonistischen Einfluß hat, sondern wirkt leicht zusätzlich aktivierend ($1,5 \pm 0,4$ - und $1,2 \pm 0,2$ -fach für *mwnt1* bzw. *hLRP6*; $n=3$) (Abbildung 4.28).

Zusammengefaßt bedeutet dies, daß sich *hydkk1/2/4-A* in Zellkultur anders verhält als *in vivo*, was auch ein bekannter Effekt für Dickkopf2 aus Vertebraten ist (siehe Diskussion). Dies scheint abhängig vom Molekülkontext auf der Zelloberfläche des jeweiligen Systems zu sein: In HEK293T–Zellen verhält sich HyDkk1/2/4–A als ein schwacher, synergistischer Aktivator

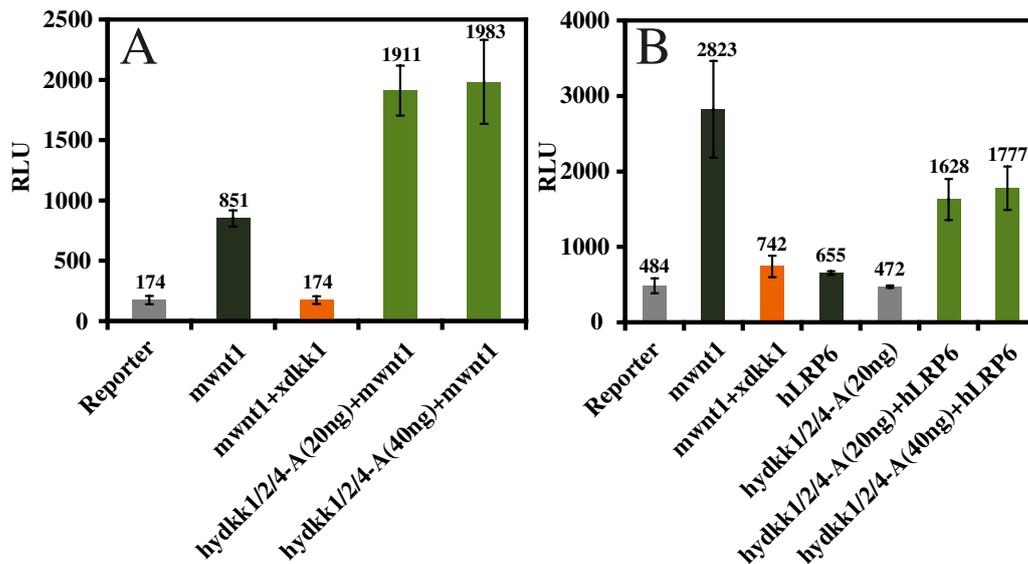


Abbildung 4.27. *hydkk1/2/4-A* im 'TOPFLASH-Assay'. (A) Synergie zwischen *hydkk1/2/4-A* und *mWnt1*. HEK293T-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt, *mWnt1* (8 ng), *xdkk1* (5 ng), *hydkk1/2/4-A* (20 und 40 ng) allein oder zusammen transfiziert. (B) Synergie zwischen *hydkk1/2/4-A* und *hLRP6*. Transfektion mit TOPFLASH, *mWnt1* (8 ng), *xdkk1* (5 ng), *hLRP6* (3 ng), *hydkk1/2/4-A* (20 und 40 ng) allein oder zusammen. Aktivierung durch Wnt-Komponenten ist dunkelgrün, durch zusätzlich *hydkk1/2/4-A* hellgrün dargestellt, Inhibition durch *xdkk1* ist orange wiedergegeben. RLU=Relative Fluoreszenz Einheiten. Vertikale Balken geben die Standardabweichung an (Triplets).

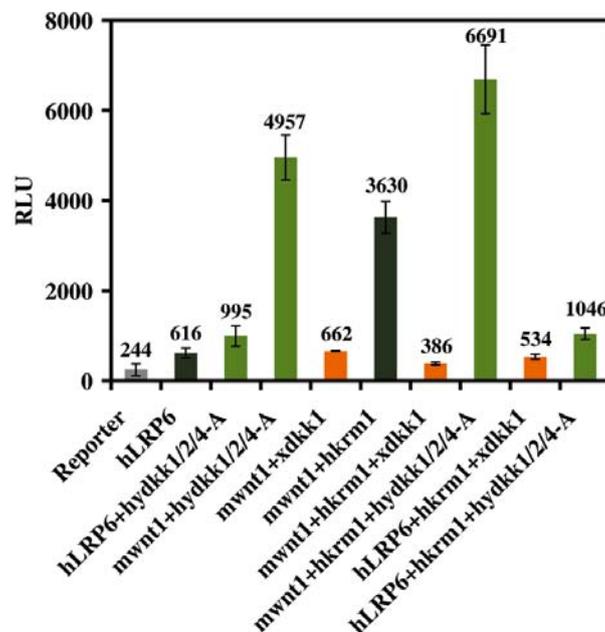


Abbildung 4.28. *hydkk1/2/4-A* aktiviert TOPFLASH auch in Anwesenheit von *hkrm1*. HEK293T-Zellen wurden mit TOPFLASH, *mWnt1* (8 ng), *xdkk1* (5 ng), *hLRP6* (3 ng), *hydkk1/2/4-A* (20 ng) und *hkrm1* (2 ng) allein oder zusammen transfiziert. RLU=Relative Fluoreszenz Einheiten. Vertikale Balken geben die Standardabweichung an (Triplets).

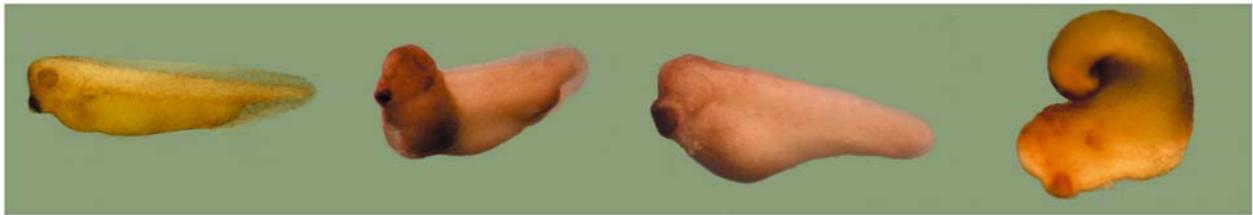


Abbildung 4.29. Gastrulationsdefekte durch *hywnt3a*-Injektion in *Xenopus*-Embryonen. 4-Zell-Stadien wurden mit 1 ng *hywnt3a*-mRNA/Blastomer radial injiziert. V.l.n.r. nicht-injiziert bis schwerer werdende Defekte.

des TOPFLASH-Reporters durch die Wnt- wie auch LRP6-vermittelte Signalkaskade; diese Aktion ist unabhängig von Kremen1. Im Gegensatz dazu verhält sich XDkk1 immer als Antagonist; dies impliziert, dass strukturelle Unterschiede der Moleküle aus Frosch und *Hydra* vorhanden sind, die im Kontext der wechselwirkenden Proteine zu sehen sind.

hywnt3a-Injektionen in *Xenopus*

hywnt3a, das in Zellkultur das TOPFLASH-Konstrukt nicht aktivieren konnte, wurde in alle Blastomeren von *Xenopus*-Embryonen im Vierzellstadium injiziert, um die Induktion sekundärer Achsen zu testen, wie sie von endogenen kanonischen Wnts, β -Catenin und auch von titHydra β -Catenin (Hobmayer et al. 2000) hervorgerufen werden. Überraschenderweise zeigten alle injizierten Embryonen im Gegensatz zu Kontrollinjektionen mit *Preprolactin*-mRNA verschieden schwere Gastrulationsdefekte bis hin zu *spina bifida* (Abbildung 4.29), ein Phänotyp, der sonst durch Überexpression von 'nicht-kanonischen' Wnt-Liganden wie XWnt5 (Du et al. 1995; Moon et al. 1993) hervorgerufen wird. Dies spiegelt zum einen die Divergenz des *Hydra*-Moleküls wieder, zum anderen wahrscheinlich die strikte Abhängigkeit vom zellulären Kontext.

5 Die Charakterisierung eines Chordin-ähnlichen Proteins (HyChdl) in *Hydra*

Chordin-Proteine sind als sekretierte Antagonisten des BMP-Signalwegs beschrieben; sie hindern durch hochaffine Bindung die BMP-Liganden an der Interaktion mit den BMP-Rezeptoren (siehe Einleitung). *Hydra* Chordin-like (HyChdl) wurde bereits von F. Rentzsch (2001) beschrieben. Er zeigte, daß HyChdl drei konservierte, cysteinreiche Domänen (CR) im C-terminalen Teil ähnlich den Chordin-Molekülen der Bilaterier besitzt. Am N-Terminus von HyChdl ist die CR-Domäne der Chordin-Proteine gegen zwei divergente, cysteinreiche Motive ausgetauscht, welche der IGFBP¹ und der Follistatin-Domäne (genauer: 'Follistatin-N-terminal domain-like') ähneln. Diese Domänen können BMP-Liganden binden und sind in HyChdl von den C-terminalen CR-Domänen durch eine 631 As lange 'Linker'-Region getrennt, die mit etwa der gleichen Länge in anderen Chordin-Molekülen die N- und C-terminalen CR separiert.

hychdl ist gradiert vom oralen zum aboralen Achsenpol im Endoderm des adulten Tieres exprimiert, in den Tentakeln stärker, und ebenfalls stärker in der gesamten, evaginierenden Knospe. Diese homogene, endodermale Färbung der Knospe verliert sich erst mit zunehmender Größe des Jungpolypen. Weiterhin zeigten Kopfregerate eine starke Aufregulation des Transkripts in Wundnähe bis zur Ausbildung des Kopfes. Das vorhandene Positionswertgefälle entlang der Achse hatte dabei keinen Einfluß auf die Kinetik der *hychdl*-Aufregulation (vgl. Rentzsch 2001). Fußregenerare regulierten das *hychdl*-Transkript ebenfalls transient in der regenerierenden Spitze auf, bis kurz vor Beginn der Fußdifferenzierung.

Die Injektion von *hychdl* in Zebrafisch-Embryonen bewirkte deren Dorsalisierung, ähnlich wie mit endogenem Chordin-Protein (Rentzsch et al., Manuskript akzeptiert).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung des *Hydra* Chordin-like Proteins fortgeführt: Die genomische Struktur, die Verwandtschaftsbeziehung der cysteinreichen Motive und die Aktion dieser Motive bei der BMP-Inhibition in Zebrafisch wurden untersucht.

¹'insulin-like growth factor binding domain'

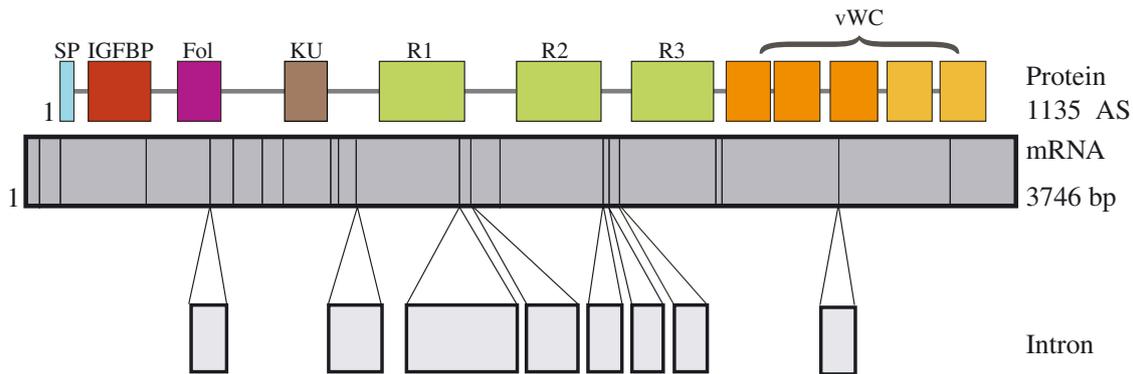


Abbildung 5.1. Die Struktur des Chordin-ähnlichen Moleküls in *Hydra*. Dargestellt sind das Transkript (grau) mit Spleißstellen, Introns (vertikale Striche; Boxen für bekannte Intronsequenzen) und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Proteins mit seinen funktionellen Domänen. SP=Signalpeptid, IGFBP=Insulin-like growth factor binding protein, Fol=Follistatin-like, KU=BPTI/Kunitz, R1-3=unbekannter Repeat 1-3, vWC=von Willebrand Faktor Typ C (=CR). Die hellgelben C-terminalen vWC-Domänen sind mit einem e -Wert von 2-4 sehr divergent.

5.1 Die Exon/Intron-Struktur von *hychdl*

Die Analyse der genomischen Daten² ergab, daß das *hychdl*-Transkript aus 21 Exons gespleißt wird (Abbildung 5.1). Die Intronsequenzen konnten durchgehend nur für 8 Introns identifiziert werden, da das *Hydra*-Genom noch nicht vollständig sequenziert ist. Der Größenbereich dieser kompletten Introns liegt zwischen 119 und 421 bp. Der Vergleich der genomischen Struktur mit den funktionellen Domänen des translatierten Proteins zeigte, daß diese nicht streng mit den Intron/Exon-Grenzen korrelieren, hierbei müssen allerdings auch noch die Ungenauigkeiten der Domänen-Vorhersageprogramme berücksichtigt werden.

Die SMART-Analyse der Aminosäuresequenz sagte neben den bereits beschriebenen IGFBP-, Follistatin-like und vWC (CR)-Domänen noch eine 'BPTI/Kunitz family of serine protease inhibitors'-Domäne ($e=2.40^{-26}$) in der Region zwischen cysteinreichem N- und C-terminalen CR-Domänen (Linkerregion) vorher. Eine RADAR-Analyse³ zum Auffinden unbekannter Repeats identifizierte 3 tandemrepetierte Motive in diesem Bereich (Abbildung 5.1) Dieser neue Repeat-Typ bei HyChdl weist keinerlei Ähnlichkeit zu anderen Motiven in der Datenbank auf. Die Linkerregion ist in allen anderen Chordin-Molekülen von 3 bis 4, bislangfunktionell uncharakterisierten, sogenannten Chordin-Domänen (CHRD) gekenn-

²Trace Archiv MegaBLAST

³EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Radar/>

zeichnet — die in HyChdl jedoch nicht zu finden sind. Damit weist HyChdl neben der Chordin-ähnlichen Domänenstruktur im Detail zusätzliche Eigenschaften auf. In dem Anthozoen *Nematostella vectensis* wurde ebenfalls ein Chordin-Molekül isoliert, das aber eine konservierte Struktur bezüglich der vWC-Domänen und CHR1 aufweist (Matus et al. 2006b; Rentzsch et al. 2006).

5.2 Die phylogenetische Analyse der cysteinreichen Domänen des HyChdl-Proteins

Die 4 vWC-Domänen der Bilaterier-Chordin-Proteine sind deutlich voneinander unterscheidbar und besitzen eine konservierte Identität (Garcia Abreu et al. 2002). Es war daher im evolutionsbiologischen Sinn interessant zu wissen, ob die *Hydra* vWC-Domänen (mit e-Werten= 10^{-4} – 10^{-12}) diesen in Identität und Reihenfolge entsprechen. Die Maximum-Likelihood-Analyse in Abbildung 5.2 zeigt die Beziehungen zwischen den cysteinreichen (CR) vWC-Domänen innerhalb der Chordin-Proteine von Bilateriern und Cnidariern. Die Domänen der Bilaterier ließen sich einheitlich 4 verschiedenen Gruppen (Clustern) zuordnen; ihre Positionen im Chordin-Protein sind konserviert, wie bereits beschrieben (Garcia Abreu et al. 2002). Die trifft auch für die vWC-Domänen wirbelloser Bilaterier zu, hier gezeigt für den Hemichordaten *Saccoglossus* und den Cephalochordaten *Branchiostoma* (Amphioxus). Die CR4 von *Saccoglossus* ist divergent. Die *Nematostella*-CR-Domänen ordnen sich in diese 4 Cluster kohärent ein; ihre Äste spalten innerhalb der Cluster bis auf CR4 basal ab, entsprechend der frühen Trennung von Cnidariern und Bilateriern in der Phylogenie. Die *Hydra*-vWC-Domänen verhalten sich anders, sie bilden eine Gruppe und scheinen der 4er-Gruppe von CR-Domänen am nächsten verwandt. Dies weist darauf hin, daß die CR-Domänen aus HyChdl *Hydra*-spezifische Duplikationen einer vWC-Domäne darstellen.

Generell sind sich die CR-Domänen recht ähnlich, was sich in den z.T. sehr niedrigen Bootstrap-Werten wiedergespiegelt. Die Zuordnung der *Hydra*-CR-Domänen zur Gruppe 4 ist ebenfalls nicht gut unterstützt und kann Resultat eines ‘long branch attraction’-Phänomens sein. Es konnte nicht das komplette Alignment verwendet werden, da zu viele Lücken vorhanden waren; es wurde daher mit der Software GBlocks auf die Positionen mit genügend phylogenetischer Information gekürzt. Das ursprüngliche Alignment findet sich im Anhang A.13.

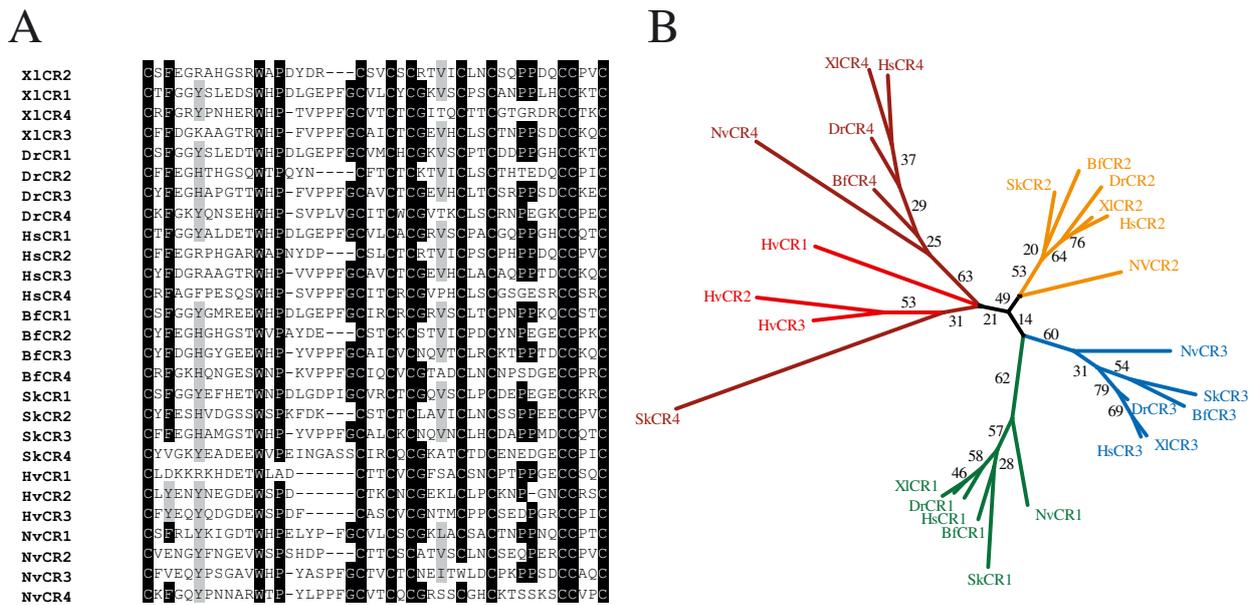


Abbildung 5.2. Die Phylogenie der cysteinreichen Domänen (CR1-4) in Chordin. (A) Zugrundeliegendes Muscle–Alignment (GBlocks) der CR–Domänen aus Mensch=Hs, *Xenopus laevis*=Xl, *Danio rerio*=Dr, *Branchiostoma floridae*=Bf, *Saccoglossus kowalevskii*=Sk, (*Nematostella vectensis*)=Nv und *Hydra vulgaris*=Hv. 60–100 % Konservierung ist durch graue und schwarze Schattierung dargestellt. (B) Maximum–Likelihood–Analyse (PHYML). Parameter: 100 Bootstrap–Replikate, JTT–Matrix, Gamma–Verteilung+invariable Positionen, 4 ‘substitution rate categories’. Die Werte an den Kanten geben die Unterstützung [%] der dargestellten Spaltungen an. Die Farben kennzeichnen die 4 Gruppen von CRD, rot sind die *Hydra*–Sequenzen dargestellt.

5.3 Die Analyse des HyChdl–Moleküls im BMP–Inhibitions–Assay in Zebrafisch

Da das vollständige HyChdl–Protein in der Lage ist, den Zebrafisch–Embryo trotz der divergenten Domänenstruktur in gleicher Weise wie endogenes Chordino dosisabhängig zu dorsalisieren (Rentzsch et al., Manuskript akzeptiert), stellte sich die Frage, ob die einzelnen cysteinreichen Domänen einen ähnlichen Beitrag wie die CR des Vertebraten–Chordins (*Xenopus*) dazu leisten. In dieser Arbeit wurden 4 von 6 Konstrukten rekombinant hergestellt, die HyChdl sukzessive zum C–Terminus hin verkürzen, um die biologische Aktivität dieser Varianten in Kooperation mit F. Rentzsch (SARS Center, Bergen, Norwegen) durch mRNA–Injektion in Zebrafisch–Embryonen zu testen. 2 der Konstrukte wurden im Rahmen einer Diplomarbeit hergestellt (Vocke 2004) und umfaßten die C–terminale vWC–Domäne (*hychdl* Δ *NCR2*) bzw. die letzten 2 CR–Motive (*hychdl* Δ *NCR1*). Das Konstrukt *hychdl* Δ *Ninker* beinhaltet alle 3 C–terminalen vWC–Domänen, *hychdl* Δ *N* ebenfalls, inklusive der Linkerregion. Die N–terminalen Domänen wurden in 2 weiteren Konstrukten

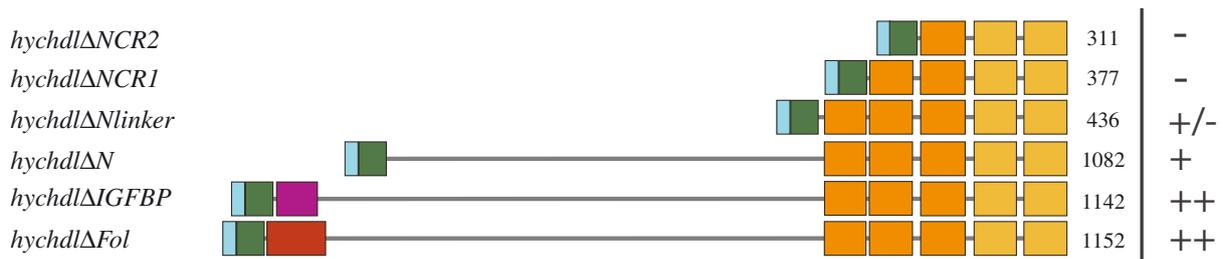


Abbildung 5.3. Verkürzte Varianten von HyChdl für die Injektion in Zebrafisch. Farb-codierung vgl. Abbildung 5.1, grün=myc-tag. Die Zahlen geben die Länge der Konstrukte in As an. Ganz rechts ist die biologische Aktivität der Konstrukte dargestellt: ‘-’=keine Dorsalisierung, ‘+/-’=intermediär (nur C1), ‘+’ und ‘++’=stärker dorsalisierend (C1 bis C3), siehe 5.3.

variiert, entweder wurde die IGFBP- (*hychdlΔIGFBP*) oder die Follistatin-like-Domäne (*hychdlΔFol*) deletiert (Abbildung 5.3). Die Sequenz der Konstrukte befindet sich im Anhang A.9, A.10, A.11, A.12.

hychdlΔNCR1 und *hychdlΔNCR2* zeigten keine Aktivität, was bedeutet, daß 2 *Hydra* vWC-Domänen allein für den BMP-Antagonismus nicht ausreichend sind und die 2 divergenten, C-terminalen vWC-Motive hier keinen weiteren Beitrag liefern. Die Penetranz und Schwere des dorsalisierten Phänotyps nahm jedoch mit größer werdenden N-terminalen Bereichen zunahm (Abbildung 5.3, Tabelle 5.3 und Rentzsch et al., akzeptiert). Jeweils eine der beiden N-terminalen Domänen konnte im Vergleich zum Wildtyp-*hychdl* (71,8 %) noch 52,2 % (*hychdlΔFol*) bzw. 54,5 % (*hychdlΔIGFBP*) der Embryonen dorsalisieren. Fehlten beide, so waren nur noch 35,7 % Embryonen dorsalisiert. Die Linkerregion trug hier offenbar auch zur BMP-Inhibition bei, da bei fehlendem Linker nur noch 10 % der Embryonen mild dorsalisiert wurden.

Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse, daß (i) HyChdl die Funktion eines BMP-Inhibitors in Zebrafisch übernehmen kann, (ii) die antagonistische Wirkung von der Länge des Moleküls bzw. der Anzahl funktioneller Domänen abhängt und (iii) die IGFBP- und Follistatin-like-Domäne das CR1-Motiv anderer Chordin-Proteine ersetzen können und einen gleichwertigen Beitrag zur BMP-Inhibition leisten.

mRNA	pg/Embryo	n	WT (%)	C1 (%)	C2 (%)	C3 (%)	C4 (%)
<i>hychdl</i>	150	64	43,8	43,8	9,4	3,0	0
<i>hychdlΔNlinker</i>	150	60	90,0	10,0	0	0	0
<i>hychdl</i>	150	85	28,2	38,8	20	11,8	1,2
<i>hychdlΔN</i>	150	221	64,3	28,9	6,8	0	0
<i>hychdlΔFol</i>	150	134	47,8	32,8	16,4	3,0	0
<i>hychdlΔIGFBP</i>	150	196	45,5	38,3	13,3	3,1	0

Tabelle 5.1. Effekt des HyChdl-N-Terminus auf die Dorsalisierung von Zebrafisch-Embryonen. WT=Wildtyp, C1-C4: Grad der Dorsalisierung mit C1=mild (Verlust der Schwanzflosse) und C4=stark (nach oben verdrehter Schwanzbereich); n=Anzahl der Embryonen. *hychdlΔNlinker* wurde in einem separatem Experiment getestet. Daten nach F. Rentzsch.

Teil III

Diskussion

Diskussion

Die Grundbausteine komplexer, zellulärer Signaltransduktionssysteme der hochentwickelten Bilateria sind bereits in scheinbar einfachen und sehr alten Organismen wie den Cnidariern wiederzufinden. Diese Tiergruppe steht stammesgeschichtlich an einem Übergangspunkt in der Entwicklung von Körperbauplänen bezüglich der Symmetrie und Keimblattstruktur. Um zu verstehen, wie bereits bestehende Mechanismen im Verlauf der Evolution rearrangiert und komplementiert wurden, um alternative Baupläne entstehen zu lassen bzw. was die Natur der konservierten Grundeinheiten ist, muß die Vernetzung der involvierten Signaltransduktionswege vergleichend analysiert werden. Darüberhinaus ist die Evolution der Moleküle selbst interessant; ihre Untersuchung gibt Aufschluß über die Grundlagen der Plastizität von Protein-Protein-Interaktionen und der resultierenden Signalnetzwerke. Der Cnidarier *Hydra* ermöglicht dabei aufgrund seines vergleichsweise einfachen Bauplans eine Annäherung an die ancestralen Merkmale von axialer Gewebeorganisation.

Ein Ansatzpunkt sind diejenigen Signalmoleküle, die als morphogenetisch wirksame, extrazelluläre Liganden an Rezeptoren binden und damit intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren oder antagonisieren. Bekannte Beispiele aus der aktuellen Forschung an Cnidariern sind der Wnt-Signaltransduktionsweg, der eng im Zusammenhang mit der Bildung und Erhaltung des Kopfororganisators sowie der Achsendifferenzierung steht (Broun et al. 2005; Hobmayer et al. 2000; Kusserow et al. 2005; Müller et al. 2004; Rentzsch 2001), sowie TGF β -Signalwege, die auch bei Cnidariern in die Achsenspezifizierung involviert scheint, daneben aber auch verschiedene Funktionen in terminaler Gewebedifferenzierung besitzen (Reber-Müller et al. 2006; Reinhardt et al. 2004; Rentzsch et al. 2006). Weiterhin sind RTK¹-vermittelte und Hedgehog-Signalwege präsent, denen ebenfalls Rollen in der Entwicklung zugeschrieben werden (zusammengefaßt in Steele 2002).

Um diese Signalwege a) in *Hydra* weiter zu charakterisieren und b) bisher unbekanntes Signaltransduktionsmechanismen zu finden, wurden Proteine des sich neu bildenden und sich selbst erhaltenden Kopfororganisators identifiziert und auf die Rolle zweier Moleküle, dem Dickkopf-Protein und einem Chordin-ähnlichen Molekül, im Kontext des Wnt- und BMP-Antagonismus fokussiert.

Weiterhin wurden eine Reihe von Extrazellulärmatrix-Proteinen analysiert, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Thrombospondin-Repeat-Typ I-enthaltenden Proteinen der Bilaterier aufweisen, welche u.a. in der Modifikation von Signalmolekülen, besonders TGF β -Liganden, aber auch in der Zelladhäsion involviert sind. Da TSR-Domänen im gesamten Metazoenreich

¹Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

vorkommen, können die *Hydra*-Proteine Aufschluß über die Evolution von TSR-Proteinen der Extrazellulärmatrix geben und daher wurde ein Schwerpunkt auf die genomische Organisation der *hytsr*-Gene in *Hydra* gelegt.

6 Signalmoleküle im Süßwasserpolytyp *Hydra*: Große molekulare Vielfalt — einfache Körperform

6.1 Zwei erfolgreiche Strategien zur Identifikation von Signalmolekülen im Kopfororganismus

Das Isolieren von gering konzentrierten Liganden und ihren Antagonisten erfordert fokussierte Ansätze, um sie vom gewaltigen Rest der anderen intra- und extrazellulären Proteinen abzutrennen. In dieser Arbeit wurde für die Isolierung von Morphogenen ihre natürliche Anreicherung im Kopfbereich von *Hydra* und besonders während der Regeneration dieser Region ausgenutzt. Hier sind Schlüssel-Moleküle für die Achsenbildung und -differenzierung zu erwarten, da der Kopfororganismus von *Hydra* nachweislich induktive Eigenschaften besitzt (Browne 1909; MacWilliams 1983b). Die Herstellung von 'expressed sequence tag' (EST)-Bibliotheken ausgehend von induktivem Gewebe war somit ein leicht fokussierter Ansatz, der mit dem Signalpeptid-Selektions-'Screening' die gezielte Selektion extrazellulärer Moleküle wie Liganden, Rezeptoren und Modulatoren erreichte. Das dafür benutzte Hefe-Invertase-System stellte sich als elegante und gut funktionierende Methode bei *Hydra* heraus, wie die Ergebnisse in Abschnitt 2.1 und in Böttger et al. (2006) zeigen.

Da ein prinzipielles Problem die Tendenz zu geringen Fragmentgrößen der cDNA-Bibliothek nach der Hefe-Transformation ist, kann eine Identitätsbestimmung der cDNA-Fragmente nur durch den anschließenden Abgleich mit einer vollständigen, molekularen Datenbank erfolgen. Für *Hydra* liegt diese mittlerweile in Form von hinreichenden EST- und genomischen Daten vor, die sich relativ einfach per Stichwort, blastn und tblastx durchsuchen lassen und damit das Signalpeptid-Selektions-'Screening' vervollständigen konnten.

Die zusätzliche Beteiligung am *Hydra*-EST-Projekt war daher eine notwendige und sehr gute Ergänzung sowie Weiterführung des Signalpeptid-Ansatzes. Vorteil der beigesteuerten regenerations- und organisspezifischen EST-Bibliothek ist zum einen die Anreicherung von morphogenetisch aktivem Gewebe nach dem Schema der Sekretionsbibliothek und zum anderen die Normalisierungsprozedur (Kapitel 2.2), die die Überrepräsentation von Haushalts- und strukturellen Proteinen ausgleicht.

Mit über einer Million primären Klonen bot die *Hydra*-EST-Bibliothek hinreichende Abdeckung; etwa 1/60 wurde sequenziert. Die Identifizierung von Signalmolekülen erfolgte über

die systematische Aufarbeitung der UniGene-Annotationen (siehe nächster Abschnitt). Alternativ läßt sich die Bibliothek anhand einer Sequenz per Blast durchsuchen, was sie zu einem wichtigen und allgemeinen Werkzeug macht. Mit 5.444 Clustern (=Zuordnungseinheiten) stellt die Darmstadt-EST-Bibliothek damit gut die Hälfte aller UniGene-Cluster (10.369) bei *Hydra*. Das Hydra-EST-Projekt liegt zwar mit insgesamt 145.040 ESTs im Bereich >10facher Abdeckung für die UniGene-Cluster, andererseits existieren noch 36.585 weitere EST-Fragmente (davon 5330 in der Darmstadt-Bibliothek), die gegenwärtig nicht in Cluster eingeordnet sind, da zwischen ihnen und anderen ESTs keine Verbindung hergestellt werden konnte. Es ist unklar, wieviel Genen sie entsprechen, solange die EST-Sequenzen nicht gegen das *Hydra*-Genom kartiert bzw. Contigs assembliert sind. Aus dem Anthozoen *Nematostella vectensis* sind 12.547 Peptiden entsprechende ESTs bekannt (Technau et al. 2005), wobei hier noch keine Sättigung erreicht wurde. Mit dem Abschluß des *Nematostella* Genom-Projektes wird die Anzahl der Gene jedoch auf 27.273 geschätzt (DOE Joint Genome Institute). Aktuelle Schätzungen für die abgeleiteten Bilaterier *Drosophila* und *C. elegans* sagen 13.854¹ bzw. 20.082² Protein-kodierende Gene voraus; beide Spezies haben sekundär sehr viele Gene verloren. Daher dürfte die Anzahl der *Hydra*-Gene weitaus höher als 10.369 liegen. Einen vollständigen Überblick über die Genausstattung von *Hydra* wird in Kürze verfügbar sein, zusammen mit der GO³-Annotation, die Auskunft über die Funktion der kodierten Proteine im zellulären Kontext gibt. Unter den gegebenen Einschränkungen des bisherigen Gruppierungs- und Annotationsprozesses (UniGene) läßt sich dennoch schon ein guter Überblick über die Signalproteinvielfalt bei *Hydra* schaffen.

6.2 Die Apikalregion in *Hydra* besitzt eine komplexe Ausstattung an Morphogenen

Sowohl mit dem Signalpeptid-basierten als auch dem EST-Ansatz konnten eine Reihe von Molekülen identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich bei der extra- oder intrazellulären Transduktion von Signalen beteiligt sind, wie Liganden, Rezeptoren, GTPasen, G-Proteine und viele Kinasen.

13,1 % der Cluster aus der EST-Bibliothek, die eine hinreichende Ähnlichkeit mit einem Eintrag in der Datenbank aufwiesen ($e \leq 10^{-6}$), wurden der Kategorie 'Signaltransduktion' zugeordnet, und davon wiederum 11,1 % den eigentlichen extrazellulären Signalmolekülen, dies

¹http://flybase.bio.indiana.edu/static_pages/docs/release_notes.html

²http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/WORMBASE/release.shtml

³'gene ontology', beschreibt Genprodukte bezüglich ihrer assoziierten, biologischen Prozesse, zellulärer Komponenten and molekularer Funktionen in einer Spezies-unabhängigen Weise

sind Liganden wie die Wnt-Moleküle, TGF β ⁴-Proteine, ein Notch-Rezeptor-bindender Faktor, eine Reihe von Wachstumsfaktoren (HGF⁵, EGF⁶, Cytokine) sowie putative Antagonisten des Wnt- (Dickkopf, Cerberus) und des BMP-Signaltransduktionsweges (Chordin-like, Cerberus, Gremlin-1 und -2; siehe Tabelle A.1). 8,2 % der Signaltransduktion-assoziierten ESTs entsprechen Rezeptoren, die Liganden binden bzw. extrazelluläre Signale ins Innere der Zelle weiterleiten (Tabelle A.2). Die Liste der Rezeptoren identifiziert zusätzliche Signalwege, die über die Liganden nicht abgedeckt werden; hier sind die FGF⁷- und Activin (TGF β)-Signalkaskade und v.a. die Rezeptorkinasen und -phosphatasen zu nennen, denen wichtige Rollen in vielen regulativen Signalprozessen zugesprochen werden (zusammengefaßt z.B. in Kim et al. 2002; van der Geer et al. 1994). Weiterhin findet man bekannte, im Zellmetabolismus involvierte Rezeptoren. Es befinden sich vermutlich weitere, nicht erkennbare Signalmoleküle unter den unbekanntesten ESTs, verdeckt durch zu geringe Ähnlichkeit der EST-Sequenz mit bekannten Proteinen.

Neben den Kandidaten für Orthologe tauchten auch Art-spezifische Proteine auf, wie die Neuropeptide, welche Zelldifferenzierung und auch Musterbildung bei *Hydra* steuern (zusammengefaßt in Bosch und Fujisawa (2001)). Es ist zu vermuten, daß einige der im Moment nicht identifizierbaren ESTs ebenfalls Cnidaria-spezifische Entwicklungen sind.

Im Sekretions-basierten Ansatz traten neben den zwei Wnt-antagonistischen Dickkopf-Proteinen zwei weitere Liganden auf: Mit geringerer Ähnlichkeit Theromacin, ein aus Invertebraten bekanntes antibakterielles Peptid (Tasiemski et al. 2004) sowie ein dem 'sexually induced protein 2' ähnliches Molekül, welches zur Gruppe der SIG-Proteine in einer Diatomeen-Art gehört und dort vermutlich in der Gameten-Erkennung eine Rolle spielt (Armbrust und Galindo 2001). Die seltenen Orthologe der Morphogene tauchten hier nicht auf, vermutlich weil der Umfang des Pilot-Selektions-'Screenings' nicht groß genug dafür war. Die Identität der unbekanntesten Sequenzen aus dem Signalpeptid-Selektions-'Screening' muß über systematische Expressions- und Funktionsanalysen geklärt werden.

Ein Signalweg, der ebenfalls in der Frühentwicklung der höheren Bilaterier eine wichtige Rolle spielt und Cytokin-Signale vermittelt, ist der JAK/STAT-Signalweg (zusammengefaßt in O'Shea et al. (2002)). Die Janus-Kinase (JAK) konnte in den Hydra-ESTs nicht identifiziert werden, ebensowenig STAT-Proteine⁸. Da STAT-Faktoren in *Dictyostelium* vorkommen, je eine JAK- und eine STAT-ähnliche Sequenz im *Nematostella*-Genom existieren und der sekundäre Verlust dieses Signalwegs bereits für Nematoden beschrieben ist (Pires-daSilva und Sommer 2003), könnte auch *Hydra* diese Kaskade sekundär reduziert ha-

⁴'transforming growth factor β '

⁵'hepatoma-derived growth factor'

⁶'epidermal growth factor'

⁷'fibroblast growth factor'

⁸'signal transducer and activator of transcription'

ben. Es bleibt festzustellen, inwiefern dies mit Besonderheiten des Körperbauplans korreliert. Auffällig ist, daß für nahezu ein Viertel der selektionierten Faktoren im Sekretions-’Screening’ und für fast die Hälfte aller Cluster in der EST-Bibliothek keinerlei Ähnlichkeit mit anderen identifizierten Faktoren gefunden wurde. Dies reflektiert einerseits die geringe Größe der auf 8 Organismen beschränkten, verwendeten Datenbank (UniGene), andererseits weist es auf die Schwierigkeiten hin, kürzere *Hydra*-Sequenzen in Blast-Suchen zu identifizieren.

Zusammengenommen, stützen diese Ergebnisse die immer weiter wachsende Erkenntnis, daß eine scheinbar einfache Körperstruktur nicht notwendigerweise mit einem einfachen molekularen System korreliert, sondern daß der eumetazoische Körperbau offensichtlich eine komplexe Grundausstattung von Molekülen bzw. vernetzten Signalkaskaden benötigt. Diese könnten als Basis für Variationen genutzt worden sein, wie die Veränderungen und Multiplikation der Moleküle selbst und v.a. die Neukombination regulatorischer Signalkaskaden. Nach bisherigem Erkenntnisstand läßt sich vermuten, daß alle wesentlichen Signaltransduktionswege der höheren Metazoa schon vor mindestens 500 bis 700 Millionen Jahren vorhanden gewesen sein müssen, als sich Metazoa symmetrisch zu organisieren begonnen haben, wahrscheinlich sogar noch früher.

Die vollständige Kartierung und sorgfältige Annotation der *Hydra*-Gene mithilfe der genomischen Daten (J. Craig Venter Institute) wird sehr hilfreich sein bei der Identifizierung konservierter und *Hydra*-spezifischer Gene. Ausgehend von dieser Basis kann dann der eigentlich herausfordernde Teil der Arbeit beginnen: Die Charakterisierung der einzelnen Moleküle im Kontext von Signalnetzwerken, die an der Entwicklung des Körperbauplans von *Hydra* beteiligt sind — im Vergleich mit anderen Cnidariern sowie bilateralsymmetrischen Tieren, um zu verstehen, wie konservierte Signaltransduktionsmechanismen für verschiedene Körperformen integriert worden sind.

7 Überlegungen zu Struktur–Funktion–Beziehungen der TSR I–enthaltenden Matrixproteine bei *Hydra*

1,5 % der Sequenzen aus der Darmstadt–EST–Bibliothek kodieren für Extrazellulärmatrixproteine. In der Extrazellulärmatrix (EZM) liegt die Basis für die dauerhafte, organisierte Interaktion von Zellen im Gewebekontext. Matrixmoleküle verleihen nicht nur strukturelle Eigenschaften wie z.B. die Kollagene, sondern erlauben und limitieren auch die Kommunikation zwischen den Zellen durch die Modifikation von Signalproteinen. Thrombospondin–ähnliche Proteine übernehmen Funktionen in diesem Bereich und wie viele Matrixproteine, erreichen sie dies durch eine hochmodulare Molekülstruktur, die sie zur Wechselwirkung mit außerordentlich vielen extrazellulären Proteine befähigt. Dementsprechend vielfältig sind ihre Aufgaben (siehe Kapitel 3). Das funktionelle Motiv, der evolutiv konservierte Thrombospondin–Repeat–Typ I (TSR) ist unter diversen Matrixmolekülen der Metazoa weitverbreitet, wurde aber auch bei Pflanzen und dem Protisten *Plasmodium* entdeckt. Eine sehr interessante Entdeckung — die Tatsache, daß TSR–Proteine TGF β –Liganden binden, aktivieren und auch inhibieren können (Schultz–Cherry et al. 1995) — war maßgeblich für Erforschung Thrombospondin–ähnlicher Proteine in *Hydra*, um herauszufinden, ob diese Art der Signalmodifikation ein altes und konserviertes Prinzip darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden drei TSR–Proteine aus *Hydra* in Bezug auf die Expressionsmuster der Transkripte und Aspekte der Evolution der Molekülstruktur charakterisiert.

7.1 TSR I–enthaltende Proteine in *Hydra* besitzen eine ungewöhnliche Architektur

Allen drei Proteinen ist gemeinsam, daß sie aus einer sehr großen Anzahl von direkt aneinander anschließenden TSR–Modulen bestehen, im Extremfall 50 Motive wie bei HyTSR1. Dies ist fast einzigartig; es gibt nur sehr wenige Proteine im Metazoenreich, die ebenfalls sehr viele TSR–Domänen besitzen, auch als ausschließliches funktionelles Element wie z.B. das putative Membranprotein THS7B aus Vertebraten und das 'thrombospondin type 1 repeat containing protein' des Oomyceten *Phytophthora cinnamomi* (Robold und Hardham 2005).

HyTSR1 und –2 besitzen hochkonservierte TSR im Gegensatz zu HyTSR–like (siehe Abbildung 3.3B, Seite 35) nicht nur in Bezug auf die Cysteinreste, sondern auch auf die dazwischenliegenden Aminosäurepositionen. Das von Adams und Tucker (2000) definierte, 11

Positionen enthaltende Konsensusmotiv liegt zwar auch HyTSR-like zugrunde, im Vergleich zeigen diese TSR-Motive aber zwischen den Cysteinresten wesentlich größere Abweichungen bezüglich der Anzahl und Aminosäureidentität. Die in den EST-Daten des Cnidariers *Nematostella vectensis* gefundenen TSR-Motive zeigen größere Ähnlichkeit mit dem allgemeinen TSR-Konsensus.

Die Diskrepanz zwischen den TSR von HyTSR1/2 und HyTSR-like spiegelt sich in der Struktur der kodierenden Gene wieder: Während die TSR-Einheiten von HyTSR1 genau mit den Exon-Grenzen übereinstimmen und diese immer symmetrisch nach der ersten Base im ersten TSR-Codon gespleißt werden, wechseln sowohl die Phase als auch die gespleißten Aminosäurepositionen im *hytsr-like*-Gen. Nach bisherigen Erkenntnissen werden TSR-Module mit wenigen Ausnahmen in der Phase 1→1 gespleißt (Nolan et al. 1992; Wolf et al. 1990) und dienen daher als Musterbeispiel für die These des 'Exon-Shufflings' (Patthy 1987), welche die Evolution einiger hochmodularer Matrix-Proteine erklärt. Danach entstanden *hytsr1* und *hytsr2* beispielsweise durch kontinuierliches 'Shuffling' der TSR-kodierenden Exons via Tandemduplikationen; die symmetrische Phase der Intron/Exon-Grenzen verhinderte dabei den Abbruch des Leserahmens und erlaubte die Entstehung der Riesenmoleküle. Das gleiche gilt für *hytsr-like*, wobei hier nicht alle 'Shuffling'-Ereignisse zur Vergrößerung des Moleküls führen konnten, da die Phasen bei 17 der 27 TSR-kodierenden Exons asymmetrisch sind (Abbildung 7.1A) und Leserahmenabbrüche bei solchen Exon-Rearrangements entstehen würden. Es ist anzunehmen, daß ein initialer Phasenwechsel in einem Ur-TSR-Modul durch Insertion oder Deletion eines Basenpaares im Bereich der Exon/Intron-Grenzen Ausgangspunkt für *hytsr-like*-ähnliche Proteine in *Hydra* gewesen sein könnte: Dies führte zur Verschiebung der Exon/Intron-Grenzen um ein oder mehrere Codons, wie in *hytsr-like* beobachtet und forcierte die Kopplung von weiteren, asymmetrischen Exons (Abbildung 7.1B). Diese neuen Einheiten könnten dann mitsamt des Introns wiederum tandemdupliziert worden sein (siehe Abbildung 7.1C).

Darüber, wie lang diese ursprünglichen Ereignisse zurückliegen, läßt sich nur spekulieren. Die Tandemduplikation bzw. das 'Shuffling' von ganzen Kassetten mit mehreren TSR könnte die Vergrößerung der Moleküle in allen drei Fällen (HyTSR1/2 und HyTSR-like) beschleunigt haben. Warum und wie häufig eine Leserahmen-verändernde Mutation speziell an einer Exon/Intron-Grenze auftritt, bleibt ebenfalls unklar. Die weniger gut konservierten TSR-Motive von HyTSR-like und die Tatsache, das keine Mischung dieses TSR-Typs mit dem gut konservierten Typ von HyTSR1/2 in einem Molekül zu beobachten ist, läßt vermuten, das die Segregation beider TSR-Exon-Typen am Anfang der Evolution der TSR-Moleküle im *Hydra*-Vorfahren stattfand. Die HyTSR-like-Module schienen mit höherer Rate zu evol-

vieren, was zu ihrer stärkeren Diversifizierung führte. Die genomische Trennung der Exons bzw. Gene sollte in unterschiedlichen, transkriptionellen Regulationsmechanismen der Gene resultieren — und das ist exakt, was für HyTSR1/2 und HyTSR-like zu beobachten ist.

7.2 HyTSR1 und –2 fungieren in Hypostom–spezifischen Prozessen

hytsr1 ist wie *hytsr2* ein hypostomal exprimiertes Gen (Miljkovic-Licina et al. 2003; Rentzsch 2001; siehe Kapitel 3.3). Die Expressionsanalysen zeigten, daß beide in mukösen Drüsenzellen exprimiert werden, die sich normalerweise aus zymogenen Drüsenzellen differenzieren (Rose und Burnett 1968a, b, 1970). Ihre Differenzierung wird durch den Positionswert reguliert: Muköse Drüsenzellen kommen nur in Organisatornähe bzw. in Regionen mit erhöhtem Kopfkaktivationspotential vor. *hytsr1* und *hytsr2* sind beides Marker für diese Zellen und werden mit beginnender Differenzierung exprimiert, wie die Expression während der Kopfgeneration (Rentzsch 2001) und auch die Versuche mit dem GSK3 β –Inhibitor Alsterpaullone demonstrierten (siehe Abbildung 3.9, Seite 45).

Strukturelle Vergleiche beider *Hydra*–Moleküle mit TSR–Proteinen anderer Organismen lassen vermuten, daß sie adhäsive Glykoproteine sind, die bei der Migration der sie exprimierenden und umgebender Zellen im Hypostom eine Rolle spielen. Das Sporennadhäsins aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Phytophthora cinnamomi* (Robold und Hardham 2005) weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit HyTSR1 auf. Der Pilz benötigt dieses Protein mit 47 TSR–Modulen vermutlich bei der Infektion der Wirtspflanze zur Anheftung der Sporen. Hierbei wird es aus Vorratsvesikeln an der Pilz–Pflanzen–Interaktionsfläche ausgeschüttet. Ähnliches ist bei Parasiten der Klasse Apicomplexa zu beobachten: Sie besitzen TSR–Moleküle (TRAP), die bei der Wirtsinvasion Kalzium–Signal–vermittelt aus dem Apikalkomplex sekretiert werden und bei Gleitbewegungen der Parasiten involviert sind (Deng et al. 2002).

Die Mukuszellen in *Hydra* sind vergleichsweise groß, befinden sich in den Taeniolen und konstituieren einen großen Teil des hypostomalen Gewebes. Dieses ist hochflexibel, um das Öffnen und Schließen des Mundes zu ermöglichen. Dabei kommt es zu einer massiven Stauchung und Dehnung des Gewebes, es ist daher denkbar, daß die Mukuszellen das entsprechende ‘Gleitmittel’ bereitstellen, um die Bewegungen der Zellen gegeneinander zu erleichtern, gleichzeitig aber die Gewebeintegrität durch Adhäsion zu erhalten. Eine hohe Anzahl von TSR–Modulen könnte diese Eigenschaft durch multiple Bindestellen für Matrixproteine sowie Glykosylierungsmöglichkeiten unterstützen. Etwa die Hälfte der Repeats von HyTSR1

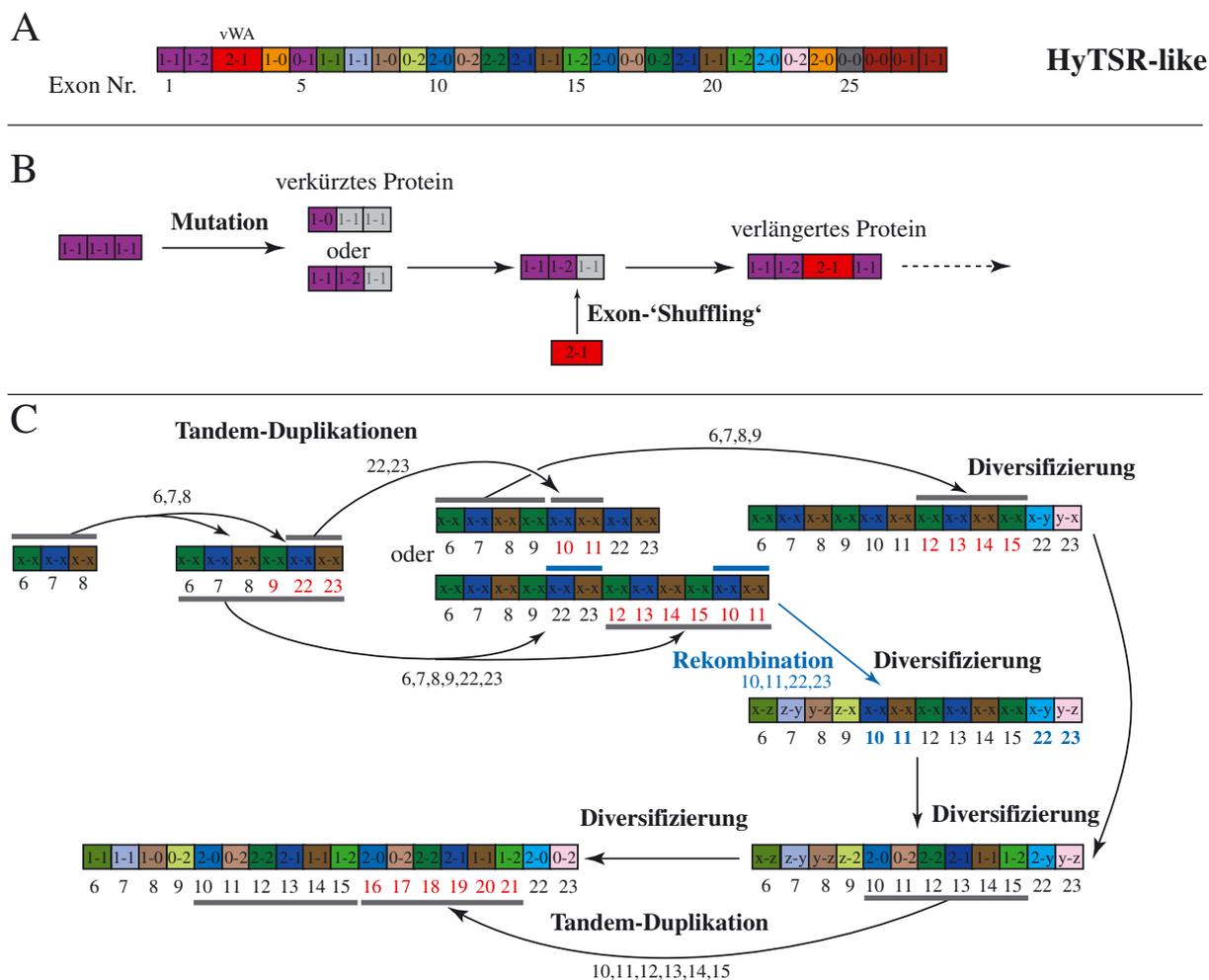


Abbildung 7.1. Hochmodulare TSR-Moleküle in *Hydra* entstanden durch Exon-‘Shuffling’ und Tandemduplikationsereignisse. Am Beispiel von HyTSR-like (A) (vgl. Seite 40) ist verdeutlicht, wie durch Kombination von Mutationen und Exon-Rearrangements eine Grundstruktur expandiert werden kann. Die Farbkodierung markiert die Verwandtschaft zwischen den Exons. Die Zahlen in den Boxen geben die Exon/Intron-Phase an. (B) Exon-‘Shuffling’: Exon-kodierte Domänen (z.B. vWA) können bei passender Exon/Intron-Phase funktionell in ein anderes Gen inseriert werden. Grau=nicht-translatierte Exons durch Leserahmen-Abbrüche. (C) Am Beispiel des mittleren Molekülteils von HyTSR-like ist demonstriert, wie Grundeinheiten, z.B. 3 TSR-kodierende Exons mitsamt ihrer Introns, durch Tandemduplikation, Mutation und Exon-‘Shuffling’ (hier Rekombination) verlängert werden, während die ursprünglichen Exons währenddessen diversifizierten. Die Diversifizierung der Exons (=Mutation etc.) ist durch hellere Farben reflektiert. Die Kassetten, die als Einheit dupliziert wurden, sind durch einen horizontalen Strich gekennzeichnet; die Zahlen über den Pfeilen geben die Nummern der rearrangierten Exons (rot) an. Blaue Zahlen kennzeichnen eine intramolekulare Rekombination von TSR-Domänen. x,y,z: unbekannte Exon/Intron-Phasen.

trägt allerdings nicht die entsprechenden Bindemotive, ihre Funktion muß woanders liegen. HyTSR2 besitzt wesentlich weniger TSR–Motive als HyTSR1 und damit seltener Anheftungsstellen für Zucker oder andere Moleküle. Die genaue Funktion der zusätzlichen, C-terminalen SUEL-type Lectin–Domäne ist unbekannt. Man findet sie in nur wenigen Proteinen, z.B. bei dem Ei–Lectin von Wels und Seestern (Hosono et al. 1993; Ozeki et al. 1991). HyTSR2 besitzt eine putative ATP-Bindestelle, die zu einer enzymatischen Aktivität beitragen könnte, wie man sie von TSR–enthaltenden Matrix-Metalloproteasen kennt, allerdings fehlen Proteasedomänen. Die erst kürzlich bei *Hydractinia* — einem kolonialen Hydrozoen — entdeckten Rhamnospondine, die vermutlich bei der Immunabwehr fungieren (Schwarz et al., unveröffentlicht), besitzen zumindest in ihrem identifizierten Sequenzbereich die gleiche Domänenkomposition wie HyTSR2. Das basale Immunsystem *Hydras* arbeitet vermutlich mit Peptiden, ist aber an keinen spezifischen Zelltyp gekoppelt (Bosch und David 1986). Das hypostomale Epithel kommt durch die Nahrungsaufnahme beständig mit Pathogenen in Kontakt; eine Funktion von HyTSR2 bei der Etablierung einer Zutrittsbarriere ist daher sehr gut vorstellbar.

Die Modifikation von Wachstumsfaktoren wie TGF β –Komplexe ist für HyTSR1/2 mit den bisher bekannten Mechanismen fraglich, da entsprechende diagnostische Sequenzmotive fehlen. Unlängst wurden die R–Spondine aus Vertebraten als positive Modulatoren von Wnt–Liganden identifiziert; sie besitzen ebenfalls ein TSR–Motiv (Kim et al. 2006). Dieses scheint aber nicht essentiell für die Wnt–Aktivierung zu sein (Kazanskaya et al. 2004), somit existiert bisher kein Hinweis auf eine Interaktion von TSR–Domänen mit Wnts.

Die Aufregulierung beider Transkripte im epithelialen Endoderm während der Kopfgeneration ist das erste Beispiel bei *Hydra* für die Aufhebung der strikten Spezifität eines Transkripts für die i–Zelllinie. Offensichtlich wird in den Endodermzellen nahe der Schnittwunde ein normalerweise reprimierter Zustand der Gene aufgehoben. Ein positiver Regulator könnte der lokal erhöhte Positionswert im Wundbereich sein (MacWilliams 1983b). Das Epithel unterliegt hier massiven Umwandlungen, um die Heilung zu ermöglichen: Ein Schnitt zerstört die durch die EZM–vermittelte Spannung im Gewebe bzw. veranlaßt sie zum Rückzug aus der Wundregion (Shimizu et al. 2002). Dies führt zu direktem Kontakt zwischen Ekto– und Endoderm und induziert dadurch vermutlich Signalprozesse zur Transkriptionsinitiation von EZM–Komponenten. Zunächst aber verändern die Epithelzellen ohne den Kontakt zur EZM ihre Morphologie und strecken sich über die Wunde, um sie zu verschließen (Shimizu et al. 2002), v.a. das Ektoderm. Da die Integrität zwischen Ekto– und Endoderm in Bezug auf die Matrix anschließend wieder hergestellt werden muß, erscheint die Anwesenheit von Molekülen, welche die Zellschichten gegeneinander beweglicher machen, Zellformänderungen ermöglichen und gleichzeitig die Adhäsivität wieder herstellen, plausibel. Ungeklärt bleibt

allerdings hierbei, warum das epitheliale Endoderm und nicht ansässige, zymogene Drüsenzellen die Produktion von HyTSR1/2 übernehmen und weiterhin, was die Transkription im rekonstituierten Epithel anschließend wieder unterdrückt.

Die Expression von *hytsr1* bei der Fußregeneration, aber nicht von *hytsr2* könnte bedeuten, daß *hytsr1* auf die lokale Erhöhung des Positionswertes in der Wunde (MacWilliams 1983b u.a.) reagiert, *hytsr2* aber nur bei sehr hohen Positionswerten wie in unmittelbarer Organisationsnähe transkribiert wird. Dies würde die beobachtete, räumliche Differenz der Initiation beider Transkripte im Hypostom erklären (siehe Abbildung 3.8, Seite 43). Ein aktiver Inhibitor könnte auch die Expression von *hytsr2* generell in nicht-hypostomalem Gewebe unterdrücken. Deutlich wird hierbei in jedem Fall, daß die beiden TSR-Moleküle unterschiedliche Funktionen in den Zellen wahrnehmen. Eine Immunfunktion von HyTSR2 wird allerdings weniger wahrscheinlich, bedenkt man, daß eine Aufregulation im Wundbereich besser damit zu vereinbaren wäre, da sich Pathogene gerade hier leicht Zutritt verschaffen könnten.

7.3 HyTSR-like markiert Tentakel, basale Regionen und Wachstumszonen abhängig vom Positionswert

Das dritte TSR-Supermolekül, HyTSR-like, zeigt überraschenderweise eine zu HyTSR1/2 völlig komplementäre Expression. Es ist ektodermal stark in der Stiel- und Knospungsregion sowie sehr stark in den Tentakeln exprimiert. Abgeschwächt findet es sich im gesamten Ektoderm, dadurch entsteht ein Gradient vom aboralen zum oralen Achsenpol. Terminale Bereiche wie die Fußscheibe und die Tentakelspitzen bleiben dabei frei. Die graduelle Verteilung des *hytsr-like*-Transkriptes legt eine Abhängigkeit vom Positionswert und damit eventuell eine Funktion bei der Musterbildung nahe, z.B. durch die Modifikation von Morphogendiffusion oder -Aktivation. Die für die Aktivierung von latentem TGF β -Komplex diagnostischen Sequenzen der TSR-Moleküle der Vertebraten sind allerdings auch bei HyTSR-like nicht zu finden. HyTSR-like wird mit hoher Wahrscheinlichkeit mannosyliert und bindet Heparin sowie Sulfatide (vgl. Abbildung 3.4, Seite 37); dadurch könnte es strukturelle EZM-Komponenten vernetzen.

In der sich ausstülpenden Knospe ist das Transkript statt basal stärker in apikalen Regionen zu finden (siehe Abbildung 3.10, Seite 46). Da tentakelspezifische Transkripte in der Knospe erst mit Beginn der Tentakeldifferenzierung erscheinen (Reinhardt et al. 2004; Smith et al. 2000; Technau und Holstein 1995), kann sich die Funktion von HyTSR-like nicht allein auf Tentakelmorphogenese beschränken. Sowohl das Gewebe in sich ausstülpenden, wachsenden Knospen als auch in Tentakeln unterliegt starker Spannung, wechselndem Muskeltonus und beständiger Reorganisation; eine Funktion von HyTSR-like in der Elastizität der EZM

in diesen Regionen ist daher in Betracht zu ziehen. Dabei geht allerdings der Bezug zur Hauptkörperachse verloren, sieht man davon ab, daß sowohl Tentakel als auch die Knospe einen Symmetriebruch zu dieser darstellen. Bei Umformungsprozessen wie Knospen– oder Tentakelausstülpung ist der Planare Zellpolaritäts–Signalweg (‘planar cell polarity’, PCP), vermittelt durch nicht–kanonische Wnt–Liganden wie z.B. Wnt5a und Wnt11 (I. Philipp, pers. Kommunikation), involviert. Möglich ist daher, daß *hytsr-like* positiv durch PCP–Signaltransduktion in evaginierendem Gewebe reguliert ist. Die Aufregulation von *hytsr-like* bei der Fuß–, aber nicht bei der Kopfregeneration zeigt hingegen wieder deutlich einen Bezug zur Positionswertgefälle entlang der Körperachse und bedeutet weiterhin, daß *hytsr-like* keine allgemeine Funktion in der Reetablierung der EZM im Wundbereich besitzt. Möglich ist, daß *hytsr-like* auf zwei verschiedene Schwellenwerte des Positionswertgradienten reagiert: Sowohl auf Tentakelaktivationslevel als auch bei sehr niedrigem Positionswert in der Fußgegend.

Gemessen an der Aufregulation der *hytsr-like*–Transkription in sich morphologisch verändernden und differenzierenden Regionen besteht Grund zur Annahme, daß HyTSR-like auch eine Funktion in der Modifikation bzw. Aktivierung von Signalmolekülen besitzt. Auffällig ist z.B., daß es weitgehend ektodermal co-exprimiert ist mit dem BMP–Ortholog *hybmp5-8b* in differenzierenden Tentakeln und basalen Bereichen (Reinhardt et al. 2004). Dies weist nach dem Synexpressionsprinzip (Niehrs und Pollet 1999) zumindest auf einen Zusammenhang hin, der durch biochemische Interaktionsstudien beider Proteine demonstriert werden könnte. Ein deutlicher Hinweis auf eine Adhäsionsfunktion von HyTSR-like gibt aber die Beobachtung, daß an den Tentakelspitzen und in der Basalscheibe die Expression verschwindet; der hier stattfindende Abschürfungsprozeß von dem Gewebefluß unterliegenden Zellen erfordert sicherlich eine Verringerung der Adhäsion zwischen den Zellen.

Die Ähnlichkeit der HyTSR-like TSR–Motive zu putativen, gehirnspezifischen Proteinen aus Maus und Mensch (THS7B und KIAA1679) mag bedeutungsvoll im Zusammenhang mit Gewebeplastizität sein, welche für neuronale Funktionen im Gehirn nötig ist, allerdings exprimieren die neuronalen Zellen in *Hydra hytsr-like* nicht.

7.4 TSR–Moleküle in der Gewebeentstehung

Die drei TSR-enthaltenden Proteine aus *Hydra* sind ein Beispiel für die Koevolution von Molekülen und Gewebespezialisierung. Sie sind in stark differenzierten Bereichen des Polypen exprimiert: Dem Hypostom — dem Sitz des Mundes und des Organisators (*hytsr1/2*) — sowie den Tentakeln (*hytsr-like*). HyTSR1 und -2 fungieren hauptsächlich in einem spezialisier-

ten Zelltyp, der mit den besonderen Funktionen der hypostomalen Region zusammenhängt. Das Vorhandensein von HyTSR-like scheint mehr mit dynamischen Gewebeeigenschaften zusammenzuhängen, es könnte z.B. die autonome Gewebeentwicklung innerhalb eines vielzelligen Organismus unterstützen, ohne daß der Kontakt zwischen beiden verloren geht. Vermutlich ermöglichte erst die sukzessive Akkumulation von TSR-Modulen spezialisierende Eigenschaften von Zellen zu Beginn der Gewebeevolution, z.B. die Einbettung der Zellen in eine regulative und strukturgebende Matrix. Bei *Hydra* ist die Produktion solcher EZM-Moleküle auf sekretorische Zellen beschränkt oder aber großflächig auf das (basale) ektodermale Epithel verteilt. Mit dieser Abgrenzung, gekoppelt an subtile Veränderungen im molekularen Aufbau, vollzog sich offenbar die Diversifizierung und Spezialisierung von Geweben wie hier am Beispiel der Tentakel, des Hypostoms und der Fußregion. Das jedoch z.B. im Fall von HyTSR-like zwei völlig verschiedene Bereiche, Tentakel und die Basalregion das gleiche Transkript exprimieren, zeigt, daß nicht allein das Vorhandensein eines Transkripts die Funktion des Gewebes bestimmt, sondern dessen Regulation in einer Population verschiedener Moleküle ausschlaggebend ist. Ein vollständiges Bild zur funktionsgekoppelten Evolution der TSR-Proteine wird sich erst durch das weitere, komparative Studium von Spezies der alten Phyla ergeben.

8 Konservierte Antagonismen bei der axialen Musterbildung von *Hydra*

8.1 Der Wnt/Dickkopf-Antagonismus bei der Achsenbildung bei *Hydra*

HyDkk1/2/4 und die antagonistischen Dickkopf-Proteine haben einem gemeinsamen Ursprung

Der größte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit einem putativen Antagonisten des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges in *Hydra*: Dem Dickkopf-1/2/4-A Molekül. Die strukturelle Analyse legt nahe, daß das cysteinreiche Motiv von HyDkk1/2/4-A nah verwandt ist mit der zweiten, C-terminalen cysteinreichen Domäne (CRD2) der Dickkopf (Dkk)-Subfamilien 1, 2 und 4 (siehe Kapitel 4.2).

Seit der ersten Beschreibung dieser überaus wichtigen Antagonistenklasse durch Glinka et al. (1998) brachte deren Erforschung zutage, daß die Inhibition des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Dickkopf1, -2 und -4 ein essentieller Prozeß bei der axialen und neuronalen Musterbildung im Vertebraten-Embryo ist (Glinka et al. 1998; Hashimoto et al. 2000; Kazanskaya et al. 2000; Mukhopadhyay et al. 2001; Shinya et al. 2000). Da in *Hydra* der kanonische Wnt-Signalweg ebenfalls in der Festlegung der Körperachse involviert ist (Broun et al. 2005; Hobmayer et al. 2000), stellt sich die Frage, ob dieser das ursprüngliche Wnt-System reflektiert und ob Wnt-Antagonisten wie Dickkopf, welche die Wnt-vermittelte Musterbildung entlang von Körperachsen beeinflussen, auch schon Komponenten des ancestralen Wnt-Signalwegs waren.

Die Wnt-Moleküle in *Hydra* bzw. den Cnidaria sind den Wnt-Liganden der höheren Bilateria hinreichend ähnlich, konstituieren aber nicht alle der 13 bekannten Wnt-Klassen (Hobmayer et al. 2000; Kusserow et al. 2005; T. Lengfeld, pers. Kommunikation). Die Tatsache, daß die inhibitorische Funktion der Dickkopf-Moleküle sich im wesentlichen auf die zweite cysteinreiche Domäne konzentriert (Brott und Sokol 2002; Li et al. 2002), deutet eine antagonistische Rolle des kurzen HyDkk1/2/4-A-Proteins im Wnt-Signalweg bei *Hydra* an. Die phylogenetische Zuordnung ist nicht problemlos, da *Hydra*-Sequenzen generell divergent

sind. Die genauen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den *Hydra*- und den Vertebraten-Dickkopf-Proteinen ließen sich trotz extensiver Analysen (Heiko A. Schmidt) nicht auflösen, doch ist klar eine Abgrenzung zwischen Dkk-ähnlichen Proteinen innerhalb der Cnidarier darstellbar, die aufgrund der Gesamtstruktur der Proteine die Nomenklatur Dkk1/2/4 und Dkk3 berechtigt erscheinen läßt (siehe Kapitel 4.2). Dies deutet auf eine sehr frühe, funktionelle Separation der Dkk-Moleküle hin, wobei der Dkk1/2/4-Vorläufer im weiteren Verlauf der Metazoa-Evolution dupliziert worden sein könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Paralogie-Analyse des menschlichen Genoms, welche die genomischen Loci der Wnt-antagonistischen Dkk-Proteine 1, 2 und 4 in verwandten, chromosomalen Bereichen zeigen konnte, welche viele duplizierte Gene beherbergt. Hingegen liegt das *dkk3*-Gen nicht im gleichen Set paraloger Regionen (Guder et al. 2006b).

Spekulativ bleibt die Antwort auf die Frage, wie das ancestrale Dickkopf-Molekül aussah: Besaß es eine oder zwei CRD, und war es Dkk3- oder 1/2/4-ähnlich? Strukturelle Molekülvergleiche lassen vermuten, daß das Grundmuster der CRD2 entsprach, da nicht nur in den ancestralen Cnidariern, sondern auch im Schleimpilz *Dictyostelium* ein CRD2-ähnliches Motiv vorhanden ist. Dies setzt sich in *Amphioxus*, einem bilateralsymmetrischen Invertebraten fort; aus dem Seeigel *Strongylocentrotus* und dem Polychaeten *Platynereis* (P. Steinmetz, pers. Kommunikation) sind Mischformen zwischen CRD1 und -2 bekannt. Dennoch existierte auch das CRD1-Motiv mindestens auf dem Organisationsniveau der Cnidaria: *Nematostella vectensis* besitzt wenigstens zwei Dkk-ähnliche Proteine, die jeweils aus beiden CRD-Typen bestehen (*N. vectensis* EST-Datenbank und Lee et al. 2006). Eines davon wurde anhand seiner CRD2 der 1/2/4-Gruppe zugeordnet, das andere weist in seinem C-terminalen Motiv mehr Ähnlichkeit mit der Dkk3-Gruppe auf. Der Abstand zwischen den Domänen beträgt bei beiden 12 Aminosäuren; dieser Abstand war bisher diagnostisch für Dkk3-Proteine. In dem Urochordaten *Ciona* existiert dagegen ein Dkk3-ähnliches Protein, dessen zwei CRD durch 33 Aminosäurereste getrennt sind — dies liegt genau zwischen der Dkk3- und 1/2/4-Gruppe mit ca. 50 Aminosäureresten und stellt vielleicht eine Übergangsform dar. Die Diversifizierung eines ursprünglichen, cysteinreichen Motivs in CRD1 und -2 bzw. in Dkk3- und -1/2/4-spezifische Domänen muß sehr früh in der Evolution geschehen sein. Neue EST-Daten aus dem Schwamm *Oscarella carmela* (Nichols et al. 2006)¹ geben Hinweise auf ein Dkk3-ähnliches Molekül mit 2 CRD, getrennt von 12 As². Außerdem existiert eine etwas abgewandelte CRD2³, allerdings in unklarem Sequenzkontext, die Dkk1/2/4-ähnlich ist. Dies bedeutet, daß die beiden Dickkopf-Proteinfamilien mit der Entwicklung der Eumetazoa schon präsent waren, und mit Hinblick auf *Dictyostelium* vermutlich

¹<http://cigbrowser.berkeley.edu/cgi-bin/oscarella/nph-blast.pl>

²EST-Nr. G840P33RM5.T0

³EST-Nr. G840P310RP20.T0

sogar schon früher. Ursprünglich innerhalb der Eumetazoa sind wahrscheinlich zwei CRD mit einem kurzen Abstand von 12 As.

Die Variabilität der Dkk-Proteine außerhalb der Vertebraten mag sich in ihrer Funktion bei der Musterbildung niederschlagen. Im Extremfall gingen die Dickkopf-Moleküle wie bei Insekten sogar gänzlich verloren. Neue Analysen des *Hydra*-Genoms ergaben, daß ein weiteres Dkk-Molekül in *Hydra* existiert (siehe A.3 im Anhang), welches 2 CRD besitzt und HyDkk3 (Fedders et al. 2004) sehr ähnlich ist. In keinem Organismus ist bisher mehr als ein Dkk3-Protein beschrieben. Die Struktur der Wnt-antagonistischen Dkk-Moleküle der Vertebraten mit den zwei spezifischen, durch ca. 50 Aminosäuren getrennten CRD etablierte sich erst mit der Abspaltung der Wirbeltiere; vermutlich wurden die 4 Subfamilien hier in den Dienst einer verfeinerten und komplexeren Regulation der musterbildenden Ereignisse gestellt.

Auffällig ist die Ähnlichkeit der Dkk-CRD2 zu den Colipasen, die als Coenzyme der Lipasen bei Vertebraten beschrieben sind. Sie teilen das als 'Colipase Fold Motif' bezeichnete Cysteingerüst (Aravind und Koonin 1998) mit den Dkk-Proteinen. Es dient bei Colipasen aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften vermutlich als Adaptor zwischen hydrophoben Lipidmicellen und den Lipasen (Hermoso et al. 1997). Daher steht zu vermuten, daß auch der Mechanismus des Wnt-Antagonismus Membran-assoziiert ist; so z.B. könnte die Interaktion zwischen dem LRP5/6-Rezeptor, Dkk und Kremen, welche schließlich zur Internalisierung des LRP-Rezeptors führt, die dafür nötige Wechselwirkung mit der Zellmembran bewirken. Das Colipasen und Dkk-CRD2 aus dem gleichen Ursprungsmotiv entstanden sind, ist wahrscheinlich, jedoch nicht zwingend, das 'Colipase fold motif' könnte auch durch Konvergenz entstanden sein.

HyDkk1/2/4-A antagonisiert die Wnt-Signaltransduktion im Frosch

Ein deutliches Indiz für eine antagonistische Rolle von HyDkk1/2/4-A im Wnt-Signalweg ist die Tatsache, daß es heterolog im Froschembryo als Wnt-Inhibitor funktioniert und den typischen 'Dickkopf'-Phänotyp hervorruft sowie XWnt8-induzierte sekundäre Achsen im Embryo blockieren kann (siehe Kapitel 4.7, Seite 72 und Nacak 2004). Es stellt sich die Frage nach den strukturellen Minimalanforderungen für diese Funktion. Die Dkk3-CRD2 der Vertebraten besitzt ebenfalls das 'Colipase Fold Motif' und kann dennoch weder sekundären Achsen blockieren, noch Wnt-induzierte Zielgene aktivieren (Brott und Sokol 2002; Krupnik et al. 1999). Ebenso wenig haben überexprimierte Colipasen keinen Effekt im

Frosch-Embryo (C. Niehrs, pers. Kommunikation). Damit ist der dosisabhängige HyDkk1/2/4-A-Effekt in *Xenopus* spezifisch, (vgl. Abbildung 4.25). Die dafür nötige, relativ hohe Menge an *hydkk1/2/4-A*-mRNA (≥ 10 fach *xdkk1*) mag die dennoch große, phylogenetische Distanz des *Hydra*-Moleküls zum endogenen XDkk1 widerspiegeln. Der entsprechende Injektionsversuch mit den CRD2-Motiven des sehr ähnlich exprimierten HyDkk1/2/4-C (Augustin et al. 2006) sowie der beiden Dkk3-ähnlichen Moleküle aus *Hydra* gäbe schließlich Aufschluß über etwaige funktionelle Differenzen dieser Proteine.

Die heterologe Expression von HyDkk1/2/4-A zeigte Diskrepanzen zwischen den Wnt-Aktivations-Assays in *Xenopus* und HEK293T-Zellen (siehe Kapitel 4.7): HyDkk1/2/4-A inhibierte die frühe und späte Wnt-Signaltransduktion im Frosch-Embryo, wirkte aber synergistisch mit LRP6 und Wnt1 bei der Aktivierung des TOPFLASH-Reporters in Zellkultur. Die Tatsache, daß die Wnt-inhibitorische Aktivität der Dickkopf-Proteine 1,2,4 nicht grundsätzlich molekülinhärent ist (Brott und Sokol 2002; Li et al. 2002; Wu et al. 2000), liefert eine mögliche Erklärung dafür: Die CRD2 von Dkk1 und -2 kann in *Xenopus* abhängig vom zellulären Kontext inhibierend oder aktivierend auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg wirken. Die Aktivität der Gesamtmoleküle wird überdies durch die CRD1-Module auf unbekannte Weise mitbestimmt. Weiterhin wirken Dkk1 und Dkk2 in *Xenopus* als gegenseitige Antagonisten, vermutlich in der koordinierten Modifikation der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion (Wu et al. 2000). Der LRP5/6-Rezeptor, Co-Rezeptor für den Wnt-Frizzled-Komplex, besitzt selbst eine β -Catenin-stabilisierende Eigenschaft, allerdings wesentlich schwächer als in Gegenwart von Wnt-Liganden (Brennan et al. 2004; Mao et al. 2001a, c). Die aktivierende Wirkung von Dkk1/2/4-CRD2 bzw. XDkk2 geschieht demzufolge in Synergie mit LRP5/6. Die Konzentration der Dkk-Moleküle im Verhältnis zu LRP5/6 und Wnt ist hierbei ausschlaggebend (Niehrs 2006). Diese Resultate weisen daraufhin, daß es eine LRP-vermittelte, Dkk1/2/4-abhängige Stabilisierung von β -Catenin gibt, die vom Rezeptorkontext auf der Zelloberfläche bzw. der Stöchiometrie der interagierenden Moleküle abhängt. Im HyDkk1/2/4-A-Molekül scheinen ebenfalls beide Aktivitäten für die differentielle, kontextabhängige Koordination der β -Catenin-Signaltransduktion vereint zu sein.

Es muß natürlich geklärt werden, ob HyDkk1/2/4-A in *Hydra* aktivierend oder inhibierend auf kanonische Wnt-Signaltransduktion wirkt. Dies wird erschwert durch die Tatsache, daß bisher keine vollständigen LRP5/6- sowie Kremen-ähnliche Rezeptoren bei *Hydra* gefunden werden konnten. Zwar konnte aus der EST-Datenbank ein Fragment identifiziert werden, das für ein extrazelluläres Protein mit einer WSC-Domäne kodiert, welche große Ähnlichkeit zur WSC-Domäne von Kremen1 aufwies. Die weitere Analyse ergab jedoch, daß die übrigen CUB- und Kringle-Domänen fehlen (A. Kuhn, pers. Kommunikation). Auch in *Nematostel-*

la vectensis konnten bisher LRP5/6 oder Kremen nicht identifiziert werden. Allerdings wurde gezeigt, daß Dkk1 die Wnt–LRP6–Interaktion auch in Abwesenheit von Kremen blockieren kann (Semenov et al. 2001).

Die Regulation und Funktion von *hydkk1/2/4–A*

hydkk1/2/4–A ist komplementär zu *hywnt3a* exprimiert

hydkk1/2/4–A ist im adulten Polypen endodermal in der Körpersäule in zymogenen Drüsenzellen, Derivaten der i–Zellen, komplementär zu *hywnt3a* exprimiert und folgt damit dem leichten Gradienten der Drüsenzeldichte von apikal nach basal (Kapitel 4.3). Dieses Muster impliziert, daß *hydkk1/2/4–A* und *hywnt3a* verschiedene Körperregionen in *Hydra* markieren und spezifizieren. Die morphologische Grenze verläuft unmittelbar unterhalb des Tentakelkranzes, markiert von der apikalen Grenze der *hydkk1/2/4–A*–Expression. An dieser Übergangsstelle wird die Entscheidung zur Differenzierung der Körpersäulenzellen in kopfspezifische Zellen getroffen, z.B. differenzieren hier die zymogenen Drüsenzellen vermutlich zu hypostomalen, mukösen Drüsenzellen, einhergehend mit der Expression TSR–enthaltender Proteine (siehe Kapitel 7.2, Seite 92). Dem Übergang von der Körpersäule zum Kopf kommt nach dem Aktivator–Inhibitor–Modell der Musterbildung im homogenen Feld (Bode et al. 1988; Bode und Bode 1980; Gierer und Meinhardt 1972; MacWilliams 1982; Meinhardt 1993) ein Schwellen–Positionswert zu, unterhalb dessen die Kopfinhibition höher als die Kopfaktivierung (Hypostom– und Tentakelaktivierung, siehe Einleitung Seite 14) ist. Die hohe Diffusionsreichweite des Inhibitors bestimmt im stabilen Gleichgewicht die Länge der Körpersäule des adulten Polypen; diese wird von der *hydkk1/2/4–A*–Expressionszone markiert. Der apikalste Punkt am Hypostom, der dem Aktivationszentrum in diesem Modell entspricht, ist hingegen durch *hywnt3a*–Transkripte markiert.

Die komplementäre Expression zweier Faktoren ist zwar kein ausreichendes Kriterium für einen Antagonismus zwischen ihnen, im *Xenopus*-Embryo z.B. überlappen die Domänen von *xwnt3a* und anderen kanonischen Wnt–Liganden mit *xdkk1* zunächst (Glinka et al. 1998; Wolda et al. 1993). Durch die Transkriptionsregulation via 'feedback-loops' jedoch kann die Expression eines Gens restriktive Folgen für ein anderes haben; so ist *dkk1* ein positiv reguliertes Zielgen des kanonischen Wnt–Signalwegs (Chamorro et al. 2005; Gonzalez-Sancho et al. 2005) und inhibiert in einem negativen 'feedback-loop' die Auto–Aktivierung von kanonischen Wnts, um dadurch Wnt–freie Bereiche zu schaffen (Hashimoto et al. 2000, Mukhopadhyay et al. 2001; Schneider und Mercola 2001a). Das Expressionsmuster von β -Catenin bei *Hydra* (*hy β cat*) entspricht der *hywnt3a*–Domäne am Hypostom (Hobmayer et al.

2000), d.h. es ist konsistent mit einem positiven Rückkopplungsmechanismus des Wnt-Signalwegs. Da Antikörperfärbungen gegen Hy β Cat das Protein jedoch im gesamten Tier nachweisen, könnte *hydkk1/2/4-A* durch Hy β Cat in der Körpersäule aktiviert werden. Das Expressionsmuster von *hy β cat*-mRNA am Hypostom wird durch die stärkere Kernlokalisation des Hy β Cat-Proteins in Kopforganisatornähe von *Hydra* reflektiert (Broun et al. 2005; Cramer von Laue 2003); die Körpersäulen-Expression von *hy β cat* liegt vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze der *in situ*-Hybridisierung.

Die Regulation von der zwei *hydkk1/2/4*-Gene in *Hydra* ist komplex

Für das zweite Dkk1/2/4-ähnliche Molekül in *Hydra*, HyDkk1/2/4-C, wurde eine deutlich stärker gradierte Transkriptverteilung von apikal bis basal gezeigt (Augustin et al. 2006); es weist damit eine kontinuierliche Abhängigkeit vom Positionswert ab dem Tentakelkranz auf. Einen weiteren Unterschied gibt es in der Reaktion auf eine Absenkung des Kopffaktivierungspotentials durch Lithiumchlorid (LiCl): Die *hydkk1/2/4-C* wird im Gegensatz zur *hydkk1/2/4-A*-Expression inhibiert (Augustin et al. 2006). Weiterhin wird *hydkk1/2/4-C* durch LiCl-Konzentrationen, die den Positionswert anheben (Hassel et al. 1993), aufreguliert. Die Inhibition der GSK3 β -Aktivität durch Alsterpaullone bzw. die Anhebung des Kopffaktivierungspotentials bewirkt wiederum eine sukzessive Abschaltung beider Transkripte (siehe Abschnitt 4.6 und Augustin et al. 2006). Augustin et al. (2006) führen das zunächst widersprüchliche Verhalten von *hydkk1/2/4-C* auf die unterschiedliche Wirkungsweise von Alsterpaullone und LiCl zurück. *hydkk1/2/4-C* wird also von sehr niedrigen (Fuß) und sehr hohen Positionswerten (Hypostom) negativ reguliert, aber durch moderate, LiCl-vermittelte Anhebung des Kopffaktivierungspotentials aktiviert, während *hydkk1/2/4-A* nur von sehr hohen Positionswerten (Hypostom) negativ reguliert wird.

Betrachtet man eine erhöhte *wnt*-Expression als synonym mit dem maximalen Positionswert bzw. dem Organisator, sind diese Ergebnisse im Hinblick auf einen möglichen Wnt-Dkk-Antagonismus verwirrend, denn auch normalen Tieren gibt es nicht nur im Kopf *wnt*-Expression. Bei der Knospung z.B. werden *hywnt3a* und andere *wnt*-Transkripte früh aufreguliert, ebenso bei der Induktion der Kopfregeneration durch einen Schnitt (Hobmayer et al. 2000; Rentzsch 2001, T. Lengfeld, pers. Kommunikation). In beiden Fällen erhöht sich der Positionswert des betroffenen Gewebes lokal (MacWilliams 1983b; Reinhardt et al. 2004). Das *hydkk1/2/4-C*-Transkript reagiert jedoch überraschenderweise nicht darauf, im Gegensatz zu *hydkk1/2/4-A*, welches bei jeder Verletzung stark aufreguliert wird (siehe Abschnitt 4.4, Seite 56). Dies zeigt deutlich, daß die Expression beider *dkk1/2/4*-Gene in *Hydra* i) differentiell reguliert wird, ii) eine Wnt-induzierte Erhöhung des Positionswertes nicht zwangsweise in

der Expression oder Repression der *hydkk1/2/4*-Transkripte mündet, sondern iii) es weitere kopfassozierte Faktoren gibt, welche diese regulieren. Dafür spricht auch die Tatsache, daß das Verschwinden des *hydkk1/2/4-A/C*-Transkriptes in Alsterpaullone-behandelten Tieren ein tagelanger Prozeß ist, obwohl die Wnt-Aktivierung vergleichsweise schnell geschieht (Kapitel 4.6, Broun et al. 2005; Nacak 2004).

Vor diesem Hintergrund kann ein negativer Wnt/Dkk-‘feedback’-Mechanismus bei *Hydra* zumindest für HyDkk1/2/4-A zutreffen, jedoch steht dieser Regelkreislauf hier auch unter dem Einfluß anderer Signalkaskaden. Für die erforderlichen TCF/Lef-Bindestellen im *hydkk1/2/4-A*-Promotor liegen noch keine Daten vor.

Die Schaffung Inhibitor (HyDkk1/2/4)-freier Regionen mit fortschreitender Differenzierung von Kopfgewebe bzw. Organisatorbildung erscheint sinnvoll, um die maximal mögliche Autokatalyse von Aktivatoren (z.B. des Tentakelaktivators) erreichen zu können. In Frage kommt für die Inaktivierung von *hydkk1/2/4* z.B. ein epigenetischer Mechanismus, z.B. die Hypermethylierung der Gene an CpG-Inseln, dies wurde nachgewiesen für humanes *dkk1* (Aguilera et al. 2006; Gonzalez-Sancho et al. 2005). In welchem Ausmaß die *Hydra* Dkk-Gene C/G-Boxen besitzen und wie konserviert dieser Mechanismus bei *Hydra* ist, wird erst die vollständige Analyse der genomischen Daten zeigen.

Die Regulation von *hydkk1/2/4-A* bei Verletzung und Regeneration

Bei *hydkk1/2/4-A* ist auffällig, daß es bei jeder Art von Verletzung — außer im Hypostom — stark und schnell aufreguliert wird (vgl. Abbildung 4.11). Denkbar ist, daß als unmittelbare Antwort auf den Wundstimulus HyDkk1/2/4-A und andere Proteine aus den Vesikeln der zymogenen Zellen entlassen werden. Eine Wnt-unabhängige Auto-Aktivierung von HyDkk1/2/4-A über LRP5/6 ist möglich und könnte sogar die *wnt*-Expression in der Wunde über β -Catenin initialisieren, zieht man das Aktivierungspotential von HyDkk1/2/4-A in Betracht. Ob die genaue Funktion von HyDkk1/2/4-A auch eine physiologische Komponente bei der Wundheilung besitzt, bleibt unklar. Am ehesten wäre eine Rolle beim Ab- und Umbau der EZM-Matrix und Lipidmembranen wahrscheinlich, denkt man an die Funktionalität des ‘Colipase Fold Motif’ bei enzymatischen Prozessen an Membranen. Jedoch wäre dies keine allgemeine Funktion in *Hydra*, da Verletzungen im Hypostom und in epithelialen Tieren ohne *hydkk1/2/4-A*-Aufregulation heilen (siehe Kapitel 4.4).

Die Sensoren des Verletzungsstimulus sind nicht bekannt, man vermutet jedoch evolutiv konservierte, frühe Prozesse wie die Aktivierung von MAP-Kinasen wie ERK und Jun-N-terminaler Kinase (JNK) sowie von ‘Grainyhead’-Transkriptionsfaktoren (Moussian und Uv

2005; Ramet et al. 2002). H_2O_2 wird hierbei als ‘second messenger’ diskutiert (Rojkind et al. 2002). In *Drosophila* wurde außerdem die Beteiligung einer generellen, JNK-induzierten, epigenetischen Derepression durch Deaktivierung von reprimierenden Polycomb-Faktoren bei Verwundung und Regeneration beschrieben (Maurange et al. 2006). In Übereinstimmung damit wird eine Dedifferenzierung der wundnahen Zellen diskutiert, um die zelluläre Plastizität in Wundnähe zu verstärken und Blasteme zu generieren (Odelberg 2005). In dieser Hinsicht ist es interessant, daß Dkk1 einerseits als Inhibitor der humanen, mesenchymalen Stammzell-Differenzierung beschrieben wurde (Gregory et al. 2005, 2003) und andererseits als Inhibitor der JNK/AP-1-Signaltransduktion (Gregory et al. 2003). Dickkopf1 wurde außerdem in Verbindung mit Apoptose bei der Organogenese gebracht (Grotewold und Ruther 2002a). In *Hydra* tritt Apoptose u.a. in der Nähe von Verletzungen durch den Verlust der Zell-Matrix-Integrität auf (Kuznetsov et al. 2002). Weiterhin wurde Dkk1 als positives Zielgen von c-jun beschrieben (Grotewold und Ruther 2002b), was zusammen mit der Beobachtung der wundstimulierten Aufregulation von *hydkk1/2/4-A* die Verbindung: Verletzung \rightarrow JNK-Induktion \rightarrow Genaktivierung \rightarrow *hydkk1/2/4-A*-Expression herstellen könnte. In *Hydra* wird aktive JNK-Signaltransduktion mit dem Planaren Zellpolaritäts-Signalweg (‘planar cell polarity’, PCP) in Verbindung gebracht (I. Philipp, pers. Kommunikation). Zusammengefaßt könnten diese Hinweise bedeuten, daß die Anwesenheit von HyDkk1/2/4-A in einem negativen ‘feedback loop’ die JNK-Aktivität inhibiert und damit die Aktivierung von JNK-Zielgenen ausbalanciert, auch in einer Wunde (Abbildung 8.1). Da bei der Kopfregeneration der JNK-Weg zur Ausbildung der Tentakel nötig ist (I. Philipp, pers. Kommunikation), erscheint es in diesem Szenario verständlich, daß *hydkk1/2/4-A* in der zukünftigen Tentakelzone herunterreguliert werden muß, falls es tatsächlich JNK-Signaltransduktion inhibiert. Die Bedeutung der Apoptose bei der Wundheilung in *Hydra* bleibt unklar, erinnert jedoch an ihre Notwendigkeit bei der Musterbildung von Vertebraten, bei welcher Wnt-, BMP- und FGF-Signalwege durch die positive Regulation von Dkk1 den Programmierten Zelltod stimulieren (Grotewold und Ruther 2002a).

Die Regulation von *hydkk1/2/4-A* bei der Oogenese

Apoptose wird in *Hydra* auch massiv bei der Oogenese in den ‘nurse cells’ beobachtet (Technau et al. 2003), die die Oocyte umgeben und später von ihr phagozytiert werden. GSK3 β übernimmt hierbei eine pro-apoptotische Funktion in einer vermutlich β -Catenin-unabhängigen Weise (Rentzsch et al. 2005). *wnt*-Transkripte sind in diesem Stadium bisher nicht beschrieben. Das *hydkk1/2/4-A*-Transkript verschwindet zunehmend aus dem Oocytenbereich (siehe Abbildung 4.8B-D, Seite 55) und hat damit höchstens anfänglich

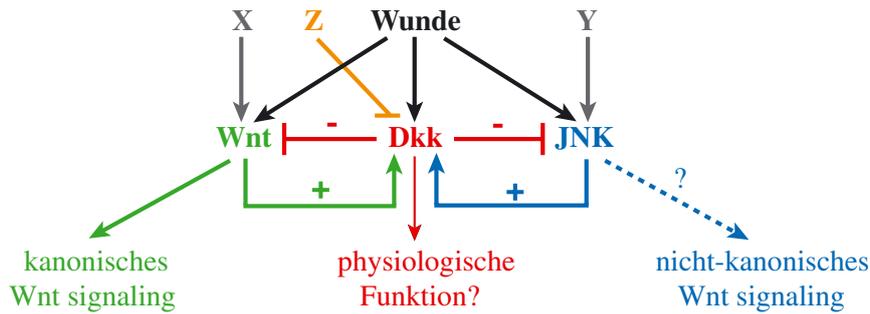


Abbildung 8.1. Modell eines HyDkk1/2/4-A-vermittelten Wnt- und JNK-Antagonismus. Die gleichzeitig durch den Wundstimulus aufregulierte Expression von *hydkk1/2/4-A*, *JNK* und *wnt* resultiert in einer Ausbalancierung der Wnt- und JNK-vermittelten Musterbildung durch parallele, negative Rückkopplungsmechanismen. ‘+’ = Aktivation, ‘-’ = Inhibition. X, Y: weitere positive Regulatoren von Wnt- bzw. JNK-Signaltransduktion; Z: Inhibitor der HyDkk1/2/4-A-Expression.

eine Funktion in der Apoptose-Induktion, abhängig von der Halbwertszeit des Proteins. Das Verschwinden des Transkripts erinnert an die Kopfdifferenzierung, jedoch ist hier vermutlich keine Kopfaktivierung der Grund, sondern einfach die Verarmung an Vorläuferzellen der *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen, den i-Zellen. Die selbst-proliferativen Drüsenzellen haben zwar einen längeren Zellzyklus als die schnell proliferierenden ‘nurse cells’ (Holstein und David 1990; Miller et al. 2000), was ihr Bestehen für gewisse Zeit sichert. Jedoch zeigte die Behandlung mit Harnstoff (Abbildung 4.6, Seite 54), daß schon nach drei Tagen Behandlung die *hydkk1/2/4-A*-Expression im oberen Viertel der Körpersäule verschwunden ist. In dieser Region befinden sich demnach noch differenzierende (HU-sensitive), *hydkk1/2/4-A*-exprimierende Drüsenzellen, die, dem kontinuierlichen Gewebefluß folgend, schnell nach apikal und basal auswandern. Analog dazu verschwindet dieser Zelltyp und damit die *hydkk1/2/4-A*-Expression im Oocytenbereich durch den Gewebefluß in Richtung Extremitäten, ohne daß er ersetzt wird. Eine andere Möglichkeit wäre die früher beobachtete Dedifferenzierung in multipotente Stammzellen (Davis 1970; Znidaric und Lui 1969; Znidaric et al. 1980), aus der dann ‘nurse cells’ differenzieren könnten, dies wurde bisher nicht weiter bestätigt. Die Spermatogenese greift zwar ebenfalls auf die Stammzellpopulation zurück, allerdings auf eine Subpopulation von determinierten i-Zellen, die verglichen mit der ‘nurse cell’-Genese nicht in gleich starkem Maße aus i-Zellen rekrutiert werden (Littlefield 1986), daher kann die Zahl der *hydkk1/2/4-A*-exprimierenden Drüsenzellen hier stabil bleiben.

Die Anwendung des Reaktions–Diffusions–Modells auf *hywnt3a* und *hydkk1/2/4*

hydkk1/2/4–A wird durch Tentakelaktivierung negativ reguliert

Die scharfe Expressionsgrenze von *hydkk1/2/4*–A unterhalb des Tentakelkranzes (vgl. Abbildung 4.5A, Seite 53) läßt einen präzisen Inhibitionsmechanismus vermuten, der mit der Tentakelzone gekoppelt ist. Die Tentakelaktivierung stellt eine Erweiterung des Aktivator–Inhibitor–Modells um ein sekundäres System dar: Das Maximum eines graduell entlang der oral–aboralen Achse verteilten Aktivators (Quelldichte, ‘source density’) spezifiziert das Hypostom, nächstniedrigere Werte die Tentakelzone (Berking 1979; Bode und Bode 1980; Meinhardt 1993). Bei der Kopfregeneration apikal geschnittener Tiere werden dabei die tentakelspezifischen Positionswerte transient durchlaufen, bevor diese durch das später entstehende Aktivator–Maximum (den höchsten Positionswert) ringförmig nach basal verschoben werden und hier die Tentakelzone mit den Tentakeln entsteht (Bode et al. 1988; Bode und Bode 1987; Meinhardt 1993, siehe Einleitung).

Frühe Kopfregerate zeigen eine massive Aufregulation von *hydkk1/2/4*–A parallel zu *hywnt3a* (siehe Abbildung 4.20). Mindestens in dieser Konstellation kann der inhibitorische Rückkopplungsmechanismus zwischen Wnt und Dkk auftreten, was den Vorgaben des Aktivator–Inhibitor–Modells entsprechen würde und die Etablierung des höchsten Positionswertes bewirken könnte. Das gleiche gilt für die apikale Spitze der evaginierenden Knospe (vgl. Abbildungen 4.7 und 4.19, Seiten 55 und 66). HyDkk1/2/4–A kann jedoch nicht allein die Inhibitor–Instanz darstellen, da bei der Kopfregeneration die *hydkk1/2/4*–A–Expression in der apikalen Spitze des Kopfregerats relativ plötzlich selbst inhibiert wird, spätestens zwischen 18 und 24 h nach der Enthauptung (siehe Abbildung 4.9). Diese Kinetik läßt sich auch in Alsterpaullone–aktivierten Tieren verfolgen: Etwa gleichzeitig mit der Evagination der ektopischen Tentakel verschwindet die *hydkk1/2/4*–A– und –C–Expression (Augustin et al. 2006; Nacak 2004). Mit dem Zeitpunkt der Abschaltung der *hydkk1/2/4*–A–Expression in der kopfregerierenden Spitze etabliert sich also der tentakelaktivierte Zustand (Bode et al. 1988; Meinhardt 1993), begleitet von zunehmender Konzentration des *hywnt3a*–Transkriptes auf die apikale Spitze, auch dies gilt gleichfalls für die Knospe (Hobmayer et al. 2000; Rentzsch 2001). Der Ursprung der Inhibition der *hydkk1/2/4*–A–Expression muß demnach in der Tentakelaktivationszone, bei bestimmtem und genügend hohem Positionswert, liegen.

HyDkk1/2/4-A und Wnt-Proteine als Gegenspieler in der oral-aboralen Musterbildung bei *Hydra*

Die *hywnt3a*-Expression erstreckt sich nicht in die Tentakelzone adulter Polypen und es ist unklar, wie weit die Wnt-Liganden oder Dkk-Moleküle diffundieren können. In der Literatur sind umfassend sowohl kurz- als auch langreichweitige Wnt-Effekte beschrieben (zusammengefaßt in Christian 2000; Howes und Bray 2000). Inwieweit daher ein direkter Dkk/Wnt-Antagonismus im adulten Tier bei der Erhaltung des Kopfes eine Rolle spielt, ist unsicher. Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist jedoch nachweislich in regenerativen Prozessen bei anderen Organismen beteiligt (Kawakami et al. 2006), die Notwendigkeit einer zeitlich-räumlichen Regulation durch Inhibitoren wie Dkk liegt somit auf der Hand.

F. Rentzsch 2001 fand bei der Regeneration von *Hydra hywnt3a*-Aufregulation nach frühestens 1 h in der kopfregenerierenden Spitze; neuere Daten zeigen, daß es eine schwache, wundstimulierte Aufregulation von *hywnt3a* gibt (siehe Abschnitt 4.6). Dies paßt in das erwähnte Schema der unspezifischen Aufregulation von Genen bei Verletzungen, was bei *Hydra* zur lokalen Erhöhung des Positionswertes führen könnte. Einige andere *hywnt*-Transkripte zeigen ein ähnliches Verhalten (T. Lengfeld, pers. Kommunikation). Da *hydkk1/2/4-A* bei Verwundung und Regeneration präsent ist, könnte sich, unabhängig von den initialen Aktivierungsprozessen, in der Wundregion ein Antagonismus zwischen HyDkk1/2/4-A und Wnt-Proteinen nach dem Aktivator-Inhibitor-Modell aufbauen, der als Teil des Gesamtsystems die Musterbildung in die richtige Richtung steuert.

Berking (2003, 2006) schlägt ein Aktivator-Inhibitor-Modell auf der Grundlage von Meinhardts Modell (Meinhardt 1993) vor, bei dem Morphogene nicht direkt Kopf- und Fußmusterbildung, sondern lokale Änderungen des Positionswerts kontrollieren. Diese steuern dann sekundäre Musterbildungssysteme, die in der Folge Fuß oder Kopfbildung verursachen. Berking nimmt einen Aktivator 'A' und zwei Inhibitoren 'B' und 'C' an, wobei B die Autokatalyse von A inhibiert und C den Positionswert kontrolliert. Es bleibt wie auch bei Meinhardts Modell offen, wieviele verschiedene Morphogene das System in *Hydra* tatsächlich konstituieren. Die Präsenz von Organisationszentren, welche die gesamte Musterbildung des Körpers durch diffundierende Morphogene steuern, ist in diesem Szenario problematisch. Die beobachteten Expressionsmuster von *hywnt3a* und *hydkk1/2/4-A* bei der Kopf- und Fußregeneration decken sich jedoch gut mit einigen Voraussagen von Berkings Modell, was im folgenden erklärt wird.

Die Balance zwischen Aktivator-Autokatalyse (Wnt-Signalaktivität) und der Inhibition die-

ser (HyDkk1/2/4 u.a.) wird hierbei durch den Gradienten der umgebenden Positionswerte gesteuert. Die Amputation des Kopfes (oder des Fußes) erhöht den Positionswert in der Wunde lokal, da hier Morphogene, Aktivator und v.a. Inhibitor, durch die Wunde verloren gehen. Dies startet die Autokatalyse des Aktivators, seine Ausschüttung ins umliegende Gewebe und auch die Aktivierung der Inhibitorproduktion. Bei der Kopfregeneration ist der Positionswert im apikalen Bereich des Stumpfes im Vergleich zum Positionswert in der Wunde relativ hoch durch die noch existierende, hohe Quelldichte des benachbarten Gewebes; mit anderen Worten, der Gradient der Positionswerte ist im regenerierenden Apikalbereich sehr flach bis kaum vorhanden. Berkings Simulationen besagen, das dadurch netto kaum Inhibitor C in die Wunde vom umliegenden Gewebe importiert wird, was die Aktivator–Autokatalyse(=Wnt–Aktivierung) in der Wunde unterstützt — ein Kopf entsteht.

Bei der Fußregeneration entsteht durch die lokale Erhöhung des Positionswertes der Wunde ein steiles Gefälle zum benachbartes Gewebe mit vergleichsweise niedrigem Positionswert. Hier nun erfährt die Wundregion einen netto–Influx von Inhibitor C aus benachbarten Bereichen, was in der Verringerung des Positionswertes bis zum Minimum bzw. zunehmender Repression des Aktivators resultiert. In der Folge entsteht ein Fuß.

Bei Verletzungen an der Körpersäule ist der Verlust von Morphogenen (v.a. Inhibitor), die Aktivator–Autokatalyse bzw. der Gradient der Positionswerte im Gewebe nicht stark genug, weswegen die Musterbildung in Richtung Kopf oder Fuß nicht startet.

HyDkk1/2/4–A könnte innerhalb des Wnt/Dkk–antagonistischen Systems Bestandteil des inhibitorischen Systems im Aktivator–Inhibitor–Modell sein, z.B. des langreichweitigen Inhibitors ‘C’, welcher den Positionswert reguliert und die Produktion des Aktivators (Wnt) in den Zellen antagonisiert (Abbildung 8.2). Dafür sprechen die *hydkk1/2/4–A*–Expressionsmuster in der Körpersäule und während der Regeneration. Jedoch ist mindestens eine weitere, epithelial generierte inhibitorische Substanz nötig (Inhibitor B), da *hydkk1/2/4–A* nicht im Aktivatorzentrum — dem ausdifferenzierten Kopf bzw. dem Organisator — und auch nicht in epithelialen, regenerationsfähigen Tieren exprimiert ist. Dies stimmt mit der Idee der Feinadjustierung der Morphogenese durch die i–Zelllinie, welche die epithelialen Basissysteme unterstützen, überein (Marcum und Campbell 1978) (siehe unten).

HyDkk1/2/4–A ist Teil des kopfinhibitorischen Systems bei *Hydra*

Nimmt man HyDkk1/2/4–A als eine Komponente (C) des inhibitorischen Systems in *Hydra* an, das die beobachtbare Kopfinhibition relaisartig in der Körpersäule verstärkt und damit

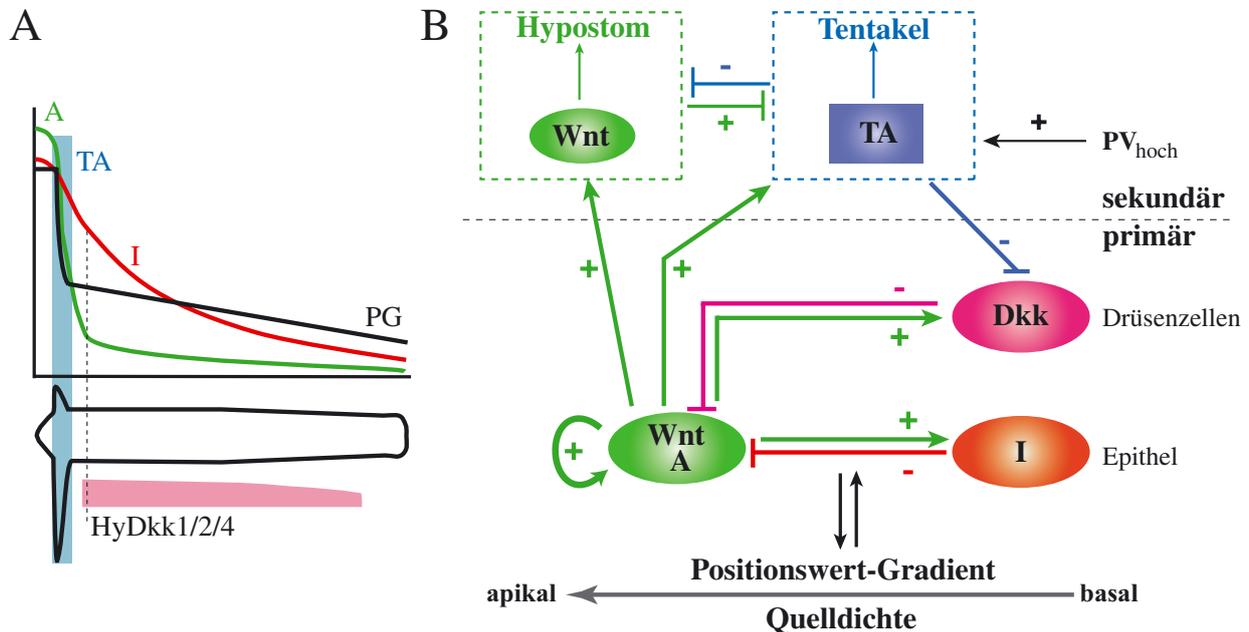


Abbildung 8.2. Der HyDkk1/2/4–A/Wnt–Antagonismus am Beispiel der Kopfregeneration. (A) Gradienten der Kopfaktivierung (A, grün) und –inhibition (I, rot) definieren den Gradienten der Positionswerte (PG, auch Quaddichte) von apikal nach basal im intakten Polyp (nach Gierer und Meinhardt 1972). Unmittelbar unterhalb des maximalen Positionswertes entsteht sekundär eine Zone der Tentakelaktivierung (TA, blau). *hydkk1/2/4–A*–Expression beginnt unterhalb der TA–Zone. Nach der Kopfamputation fällt I schnell durch Verlust von Morphogenen aus der Wunde drastisch ab, was die Aktivator–Autokatalyse (Wnt) startet und zum lokalen Anstieg des Positionswertes führt (nicht gezeigt). (B) Verletzung durch Enthauptung führt zur Aufregulation von *wnt*–Genen (grün) und *hydkk1/2/4–A* (pink) im Wundbereich und schließlich zur Stabilisierung der Autokatalyse des Aktivators (A, Wnt) und der Produktion von Inhibitoren (I und HyDkk1/2/4–A) im primären Musterbildungssystem. (Dies ist zunächst auch bei Fußamputation so.) Die Feinregulation der Aktivator– und Inhibitorproduktion wird durch die Stärke des Gefälles der Positionswerte zwischen Wunde und Nachbargewebe bestimmt (schwarze Pfeile). Hohe ursprüngliche Positionswerte (PV) in der Nähe des früheren Kopfes erleichtern zudem früh die Tentakelaktivierung (rechts oben), zunächst aber ohne Tentakeldifferenzierung. Die maximale Quaddichte und die langreichweitige Kopfinhibition mit Hydkk1/2/4–A und dem zweiten Inhibitor ‘I’ als ihre Komponenten werden im regenerierenden Kopf langsam reetabliert. Sekundär wird bei entsprechendem Positionswerten das Tentakelmusterbildungssystem (blaue Box) sowie die Hypostomaktivierung (grüne Box) mit eigenen aktivierenden und inhibitorischen Morphogenen induziert (Meinhardt 1993), wobei die *wnt*–Gene auch Komponenten der Hypostomaktivierung sind. Die Tentakelaktivierung inhibiert die *hydkk1/2/4–A*–Expression lokal und wirkt auch in wechselseitigem Antagonismus auf die Hypostomaktivierung, was die primäre Aktivatorproduktion (Wnt) auf das apikale Zentrum, um die Mundöffnung herum, beschränkt. HyDkk1/2/4–Proteine sind nach diesem Modell Teil des primären, langreichweitigen Inhibitorsystems entlang der apikobasalen Achse der Körpersäule.

langreichweitig die Aktivator–Autokatalyse (Wnt) antagonisiert und den Positionswert reguliert, so muß in epithelialen Tieren ohne *hydkk1/2/4*-Expression die netto–Kopfinhibition schwächer sein und die Form des Positionswertgradienten verändert sein. Dies spiegelt sich z.B. in gestörter Proportionsregulation und zunehmender 'Verkopfung' der epithelialen Tiere wieder. Die Amputation des Kopfes führt auch hier zur Aufregulation von *hywnt3a* in den Endodermzellen und von *hydkk1/2/4-A* in den restlichen Drüsenzellen. Die Autokatalyse des Aktivators (Wnt) am apikalen Pol ist daher nicht gestört, sein Verhältnis zum zweiten, epithelial generiertem Inhibitor (B) könnte allerdings so verändert sein, daß die Kopfdifferenzierung nicht mehr erreicht werden kann. Dies hängt empfindlich von der Balance zwischen Aktivator– und restlicher InhibitorKonzentration ab, die aufgrund der Variabilität der pseudoepithelialen Tiere unterschiedlich ist, was die z.T. nach langer Zeit ansatzweise (ein oder 2 Tentakel) oder erfolgreiche Kopfregeneration erklären könnte (siehe Kapitel 4.5).

Die in epithelialen Tieren immer erfolgreiche Fußregeneration ließe sich ebenfalls mit diesem Modell erklären: Auch in Tieren mit schwacher Kopfinhibition bzw. vergrößertem Kopfkaktivierungsbereich ist das Schicksal 'Fuß' am basalen Ende begünstigt, weil der Positionswert hier am niedrigsten im gesamten Tier ist, *per definitionem* die Minimalbedingung für die Fußentstehung (Berking 2003). Die Erniedrigung des Positionswertes wird durch den netto–Influx von (epitheliale) Inhibitor (B) erreicht, was nur von der Steilheit des Positionswertgradienten abhängig ist, die in epithelialen Tieren wie beim normalen Tier gegeben ist. Zu hohe InhibitorKonzentrationen inhibieren die Fußdifferenzierung allerdings, weswegen diese am basalsten Ende des Tieres erst nach Degradation des Inhibitors eintreten kann (Berking 2003).

Ähnliches, aber aus anderen Gründen, läßt der Abschnürversuch vermuten, bei dem der Fuß normaler Tiere ohne Verletzung und damit ohne Erhöhung des Positionswertes entfernt wurde (siehe Kapitel 4.4): Die in Verbindung mit der Positionswert–Erhöhung induzierte Aktivator–Autokatalyse sowie die Positionswert–erniedrigende Inhibitorproduktion startet hier nicht oder zumindest verzögert, da die Morphogene nicht aus der Wunde abfließen können. Der Netto–Inhibitor–Influx ist schwach, da der Gradient der Positionswerte nicht steil genug ist. Dies verzögert die Fußregeneration in dem Maße, wie die Morphogene entsprechend ihrer Halbwertszeit in der basalen Region abgebaut werden. Sobald der niedrigste Positionswert erreicht ist, verläuft die Fußdifferenzierung wie beobachtet schnell.

Analog dazu hängt die Regeneration von abgeschnürten Kopfregeneraten (Nacak 2004, Newman 1974) zunächst nur von der InhibitorDiffusion und –stabilität ab, bis der Positionswert genügend angehoben ist, um die Autokatalyse zu starten. Unklar ist allerdings, warum die Tentakelaktivierung bei diesen Tieren gestört ist, wie die oft unvollkommen regenerierten

Tentakel zeigen — möglich ist, daß die zeitliche Regulation der Positionswert-Erhöhung eine wichtige Rolle bei Ablauf der kopfregenerativen Prozesse spielt. Noch anschaulicher ist dies bei der kopfregenerationsdefizienten *reg-16*-Mutante zu beobachten, deren Autoaktivierung gar nicht stattfindet oder auf Tentakelniveau steckenbleibt (Achermann und Sugiyama 1985) und nur durch 'künstliche' Erhöhung des Positionswertes durch erneuter Verwundung gerettet werden kann (Kobatake und Sugiyama 1989; Müller 1995). Wird bei diesen Tieren die *i*-Zelllinie entfernt, so können sie nahezu normal regenerieren (Sugiyama und Wanek 1993), was mit dem Sitz einer weiteren, feinregulatorischen Kopfinhibitionskomponente in der *i*-Zelllinie — z.B. *HyDkk1/2/4* — vereinbar ist (Nishimiya et al. 1986), und die in *reg-16* offenbar mutiert ist.

Auch frühe Experimente an einer anderen Kopfinhibitionsmutante zeigten, daß das Vorhandensein und die Komposition der *i*-Zell-Derivate die Transmission der Kopfinhibition entlang der Körperachse beeinflußt (Rubin und Bode 1982a, b).

Der Vorteil einer Positionswert-Erhöhung in der Wunde gekoppelt an schnelle Inhibitor-Neuproduktion ist demnach v.a. eine Beschleunigung der musterbildenden Prozesse und insbesondere für die apikale Musterbildung wichtig. Dies komplementiert eine Studie, welche demonstrierte, daß die zeitliche Länge der Wundöffnung ausschlaggebend für die Erhöhung des Kopfaktivierungspotentials und damit den Regenerationserfolg ist, bzw. daß beschleunigte Wundheilung die Regeneration supprimiert (Shimizu und Sugiyama 1993).

Zusammengenommen bedeutet dies für die *HyDkk1/2/4*-Proteine:

- (a) Das *HyDkk1/2/4-A* (und *-C*)-Protein spielt eine inhibitorische Rolle bei der axialen Musterbildung in *Hydra*, vermutlich als Gegenspieler zu *Wnt*-Proteinen, welche den Aktivator im Reaktions-Diffusions-Modell konstituieren. Dies repräsentiert die evolutive Konservierung des *Wnt/Dkk*-Antagonismus bei der Achsenbildung und stellt damit ein molekulares Beispiel für ein Reaktions-Diffusions-Modell dar. Die Rolle der Drüsenzellen bzw. der *i*-Zelllinie bei musterbildenden Prozessen in *Hydra* ist dabei offenbar wichtiger als bisher eingeschätzt.
- (b) Da in epithelialen Tieren ohne *hydkk1/2/4-A*-exprimierende Drüsenzellen noch viele der Musterbildungsprozesse wie Homöostase, Wundheilung und Fußregeneration in *Hydra* funktionieren, kann *HyDkk1/2/4-A* nicht die einzige oder Hauptkomponente des Kopfinhibitors sein, spielt aber vermutlich eine Rolle in der Etablierung der langreichweitigen Inhibition. Dafür spricht die zugunsten des Kopfes gestörte Proportionsregulation und der Verlust der Kopf-/Tentakelregenerationsfähigkeit in epithelialen Tieren, Prozesse die einen Inhibitor für die morphogenetische Feinregulation benötigen.

Die genaue Natur der Inhibitoren in *Hydra* sowie die Art und Weise ihrer Verteilung entlang

der oral–aboralen Achse sind molekular gegenwärtig noch nicht zu erklären, genausowenig wie die Beziehungen zwischen den 3 Zelllinien dabei.

Es muß betont werden, daß diese Betrachtungen eine rein qualitative Interpretation der molekularen Daten anhand des Reaktions–Diffusions–Modells nach Berking (2003) sind und erst durch entsprechende Simulationen wirklich gültig werden. Ein Hinweis, daß der Wnt/Dkk–Antagonismus den Vorgaben des Gierer–Meinhardt–Modell folgt, kommt von einer aktuellen Studie, welche die erfolgreiche Modellierung des Wnt/Dkk–Antagonismus bei der Haarfollikel–Bildung der Maus nach einem 2–Komponenten–Modell aus Aktivator (Wnt) und Inhibitor (Dkk) beschreibt (Sick et al. 2006). Es wäre von großer Wichtigkeit für das Verständnis der musterbildenden Prozesse bei *Hydra*, aber auch für alle anderen selbstorganisierende Systeme, die wachsende molekulare Datenmasse mit den verfügbaren theoretischen Modellen in Einklang zu bringen.

Ein oder zwei Musterbildungssysteme in *Hydra*?

Mehrere Autoren proklamierten einen Fußorganisator, der analog und spiegelbildlich zum Kopforganisator Musterbildung durch morphogene Substanzen induziert, hierarchisch aber unter dem Kopforganisator steht (Bode und Bode 1984; MacWilliams 1983a, b; Schiliro et al. 1999; Shenk et al. 1993). Beide Musterbildungssysteme wirken antagonistisch entlang der oral–aboralen Achse. Substanzen, die die Fußbildung verstärken oder fußspezifisch exprimiert sind, können auf zweierlei Art erklärt werden: Sie könnten a) das Fußaktivierungspotential anheben oder aber b) schlicht den Positionswert verringern. Oft zeigen sie keine graduelle Expression von basal nach apikal, z.B. Hym-323, Cnox-2, Pedibin (Hym-346) (Harafuji et al. 2001; Hoffmeister 1996; Shenk et al. 1993; Takahashi et al. 1997), andere sind spezifisch in der Stielregion von *Hydra* und leicht graduell exprimiert wie CnNK-2, BMP5-8b (Reinhardt et al. 2004; Siebert et al. 2005) und das Peptid Pedin (Hoffmeister 1996). Letztere brauchen aber prinzipiell keine Aktivierung innerhalb eines Fußorganisators, sondern Aktivierung durch einen genügend geringen Positionswert, bzw. nachlassendes Kopfaktivierungspotential. Sie stünden damit allein unter der Kontrolle des inhibitorischen Systems, da dieses den Positionswert zwar moduliert, den Fuß aber antagonisiert (Berking 2003) und genügend große Reichweite besitzt. Die beiden mehr oder weniger stark gradiert exprimierten HyDkk1/2/4–A–Proteine wären dafür ein Beispiel. Sekundär senken die basal exprimierten, fußspezifischen Faktoren dann den Positionswert weiter ab, gleichzeitig mit der Differenzierung von Fußstrukturen.

Es braucht weniger komplexe Annahmen, die Musterbildung in *Hydra* komplett unter die Kontrolle **eines** Positionswert-vermittelndes System zu stellen (Berking 2003). Problematisch ist dabei insbesondere die vermutete Analogie zwischen Kopf- und Fußorganisator (Bode und Bode 1984), die beide nach dem gleichen Musterbildungsmechanismus aufgebaut sein sollen. Bisher liegen dazu keine schlüssigen, molekularen Daten vor, z.B. existiert derzeit kein Wnt-analoges Modell für den Fuß.

Die Existenz des Kopforganisators, der morphogenetisch wirksame Substanzen sekretiert, muß nicht durch Berking's Modell angezweifelt werden. Man muß nur definitionsgemäß seine Bildung von dem etablierten und sich selbst-erhaltenden Organisator trennen, und entsprechend die Änderungen und Stabilisierung der Positionswerte von der koordinierten Differenzierung von Kopfstrukturen.

Welches der Modelle der Realität am nächsten kommt, wird die weitere Analyse der nun in Genom- und EST-Projekten zugänglichen Gene in *Hydra* zeigen.

8.2 *Hydra* Chordin-like bei der Achsenbildung von *Hydra*

HyChdl ist ein abgewandeltes Chordin-Molekül

Hydra Chordin-like (HyChdl) wurde als Chordin-Homolog mit putativ BMP-bindenden, cysteinreichen Domänen am N- und C-Terminus beschrieben (Rentzsch 2001), da seine Architektur den Chordin-Proteinen aus Bilateriern ähnelt. Die HyChdl CR-Domänen (CRD) zeigen das konservierte Grundmuster der Cysteinpositionen in Chordin-CR-Domänen. Aufgrund der dennoch augenscheinlichen Sequenzunterschiede wird es als Chordin-ähnlich ('Chordin-like') bezeichnet. Es besitzt N-terminal anstelle des CR-Motivs 1 (CR1) zwei andere cysteinreiche Domänen mit Ähnlichkeiten zur IGFBP⁴-Domäne und zu dem Follistatin-like-Motiv. C-terminal liegen 3 vWC⁵- oder CR-Domänen, gefolgt von zwei weiteren, stark divergenten vWC-Domänen. N- und C-terminale Cystein-Domänen sind durch eine lange Region, ähnlich wie bei Chordin-Molekülen anderer Organismen, getrennt. Diese weist aber nicht die diagnostischen 'Chordin-Domänen' (CHRD) der Chordin-Proteine auf, sondern eine BPTI/Kunitz-Domäne gefolgt von 3 unbekanntem repetitiven Modulen auf (siehe Abbildung 5.1, Seite 77). HyChdl besitzt vermutlich eine permissive Funktion bei der Kopforgansator-Bildung (Rentzsch et al., Manuskript akzeptiert).

In dieser Arbeit wurden ergänzende, strukturelle und phylogenetische Studien durchgeführt, um eine mögliche konservierte Funktion des Moleküls als BMP-Antagonist in *Hydra* näher einzugrenzen.

Die genomische Organisation von *hychdl* ist nicht evolutiv konserviert

Das *hychdl*-Gen besitzt 21 Exons, die von Introns variabler Länge getrennt werden (siehe Abbildung 5.1, Seite 77) und ist damit den Bilateria-*chordin*-Genen mit 22 bis 23 Exons vergleichbar. Das kürzlich identifizierte *Nematostella* Chordin (NvChd) wird von 19 Exons (Rentzsch et al. 2005), das Chordin-Ortholog Short gastrulation (Sog) in *Anopheles* oder *Drosophila* dagegen nur von 6 Exons⁶ kodiert. Daran zeigt sich, daß die genomische Struktur der *chordin*-Gene im Laufe der Evolution vielen Veränderungen ausgesetzt war und in stark spezialisierten Tiergruppen wie den Insekten drastische Reduktionen der Introns erfahren hat. *nvchd* zeigt eine zum humanen *chordin* sehr ähnliche genomische Struktur bezüglich der Intron/Exon-Grenzen (Rentzsch et al. 2005). Dies ist jedoch nicht in *hychdl* wiederzufinden: Die 20 Exon/Intron-Grenzen verteilen sich hier völlig anders. In Bilateriern

⁴'insulin-like growth factor binding domain'

⁵van Willebrand Faktor-Domäne C

⁶<http://www.ensembl.org/index.html>

und *Nematostella* sind die funktionellen Domänen in Chordin-Proteinen nicht von einzelnen Exons kodiert – anders als z.B. bei den TSR-enthaltenden Proteinen (siehe 2. Kapitel der Diskussion). Damit ist klar, daß sie nicht so leicht durch Exon-‘Shuffling’-Ereignisse kombinierbar sind, was vielleicht die hohe Konservierung der Domänenstruktur in Chordin-Proteinen mitbegründet. Im *Hydra*-Protein dagegen sind die IGFBP-, die Kunitz- und die 3 unbekannt tandemrepetierten Motive von distinkten Exons kodiert und damit leicht inserierbar bzw. deletierbar. Im Bereich der CR-Domänen am C-Terminus gibt es nur 2 Introns, wiederum im Gegensatz zum z.B. humanen *chordin* oder *nvchd*, die hier 5 bzw. 6 Introns besitzen (Rentzsch et al. 2005). Daher ist die Intronzahl von *hychdl* nicht homologisierbar mit anderen *chordin*-Genen, und ebensowenig die Exon/Intron-Grenzen, da die Domänenkomposition in *hychdl* verändert ist.

Ein weiteres, Chordin-ähnliches Molekül wurde bisher trotz intensiver Datenbank-Suche in *Hydra* nicht gefunden.

Die CR-Domänen im Wandel

Die vier BMP-bindenden CR-Domänen der Bilateria-Chordin-Moleküle sind in Bezug auf ihre Position im Protein konserviert, d.h. CR2 ist zwischen zwei verschiedenen Spezies ähnlicher zueinander als beispielsweise zu CR1 im gleichen Molekül (siehe Abbildung 5.2, Seite 79). Dies ist wichtig für die Funktion der einzelnen Domänen im Molekülkontext, da die BMP-Bindeaktivität für jede CR-Domäne verschieden und damit nicht ohne weiteres austauschbar ist (Larrain et al. 2000). Auch die NvChd-Domänen folgen diesem Muster, wie aus der phylogenetischen Analyse ersichtlich, und spalten bis auf die CR4-Gruppe immer an der Basis der CR-Gruppen ab, was die tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen der betrachteten Arten widerspiegelt. Dies gilt ebenfalls für die anderen Spezies, nur die CR4 von *Saccoglossus*, einem Hemichordat, macht hier eine Ausnahme durch offensichtlich große Distanz der Aminosäuresequenz. Prinzipiell ist die Maximum-Likelihood-Baumstruktur damit trotz der schlechten Unterstützung an den inneren Zweigen valide. Die 3 C-terminalen HyChdl-CR-Domänen passen sich nicht in dieses Bild ein, sie fallen alle in die CR4-Gruppe. Ob dies die wirklichen phylogenetischen Beziehungen widerspiegelt, ist aufgrund der schlechten Unterstützung und der relativ langen Zweige nicht sicher; in Neighbor-Joining-Analysen bildeten die *Hydra*-CRD eine eigene Gruppe ohne aufgelöste Abzweigung. Da keine Außen-Gruppe verwendet wurde, sind die phylogenetischen Beziehungen zwischen den einzelnen CR-Domänen nicht erkennbar. Für die *Hydra*-CR-Motive aber gilt, daß sie zueinander näher verwandt sind als zu einer der CR1-4-Gruppen der Chordin-Proteine, was bedeutet, daß sie vermutlich durch Duplikationen aus einer Vorläufer-CRD in *Hydra* entstanden sind.

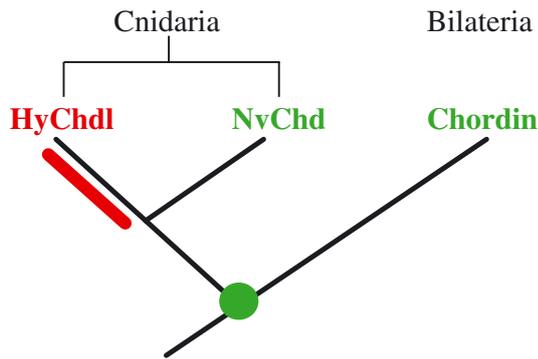


Abbildung 8.3. HyChdl ist ein sekundär verändertes Molekül. Der gemeinsame Vorfahr von Bilateria und Cnidaria (grüner Punkt) besaß schon ein komplexes Chordin-Protein, dessen Struktur hochkonserviert ist. Im Lauf der Cnidaria-Evolution entwickelte sich ein abgeleitetes, Chordin-ähnliches Molekül (roter Balken), zumindest innerhalb der Hydrozoen, zu denen *Hydra* gehört.

Ob dieses ursprüngliche CR-Motiv ancestralen Charakter besitzt oder von einer der 4 Chordin-CR abgeleitet ist, ist nur durch die Analyse weiterer CR-Domänen innerhalb und außerhalb der Cnidarier zu klären. Das *Hydra*-Genom war im Lauf der Cnidaria-Evolution offenbar dramatischen Änderungen ausgesetzt, die in einem Chordinmolekül resultierten, welches die vermutlich ancestrale 4-CR-Struktur sekundär verloren hat, diese aber konvergent durch ähnliche Domänen ersetzt wurden (Abbildung 8.3).

Die Hypothese, daß HyChdl einem ancestralen Chordin-Typ ähneln mag, aus dem sich die rezenten Chordin-Moleküle entwickelten, läßt sich angesichts der Monophylie der Cnidaria nicht halten. Andernfalls müßte *Nematostella* den Bilateria-Chordin-Typ unabhängig entwickelt haben, was sehr unwahrscheinlich ist, oder aber die Cnidaria paraphyletisch sein, was nach bisherigen Phylogeniestudien nicht der Fall ist (Collins et al. 2006).

Veränderte Domänen — robuste Funktion

Zieht man die strikt zugeordneten Funktionen der Chordin-CR-Domänen in Betracht, stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die *Hydra*-CRD BMP binden können. Nachweislich binden CR1 und CR3 aus *Xenopus* Chordin BMP4 am stärksten (Larrain et al. 2000). Dies wird aber erst im gesamten Molekülkontext kooperativ um das 5- bis 10-fache verstärkt. Die *Hydra*-CRD zeigen in der phylogenetischen Analyse mit geringer Unterstützung die engste Verwandtschaft zu CR4, welche in *Xenopus* die schwächste biologische Aktivität unter den CRD aufweist (Larrain et al. 2000). Direkte Vergleiche können nur über biochemische Protein-Bindestudien mit einem BMP-Molekül gemacht werden. In *Hydra* stehen derzeit noch keine gereinigten BMP-Proteine zur Verfügung.

HyChdl kann trotz der Sequenzunterschiede Zebrafisch-Embryonen dosisabhängig dorsalisieren, wenn auch 20-fach schwächer als endogenes Chordino (Rentzsch et al., Manuskript akzeptiert). Dies ist der bisher stärkste Hinweis auf eine konservierte Proteinfunktion in *Hydra*. Wie diese Arbeit zeigt, haben die einzelnen Domänen einen unterschiedlichen Beitrag

zur dorsalisierenden Funktion; so besitzt nur der gesamte C-Terminus, alle CR-Domänen einschließlich, überhaupt einen Effekt auf die BMP-Signaltransduktion in Zebrafisch (siehe Abbildung 5.3, Seite 80). Die beiden vorletzten CR-Domänen und die beiden divergenten vWC-Domänen am C-Terminus können zusammen BMP-Signaltransduktion nicht antagonisieren, ein Gegensatz zu *Xenopus* Chordin, dessen CR-Domänen auch unabhängig voneinander BMP-inhibitorische Funktion aufweisen (Larrain et al. 2000). Der schwach dorsalisierende Effekt aller C-terminalen *Hydra*-CR-Domänen verstärkt sich mit der Verlängerung des HyChdl-Konstruktes um die Linkerregion von 10 % dorsalisierter Embryonen auf knapp 50 %, verglichen mit dem intakten Molekül. Dies mag von einer topologisch unterstützenden Wirkung eines längeren Moleküls oder aber einer zusätzlichen, intrinsischen BMP-Interaktionsfähigkeit der Linkerregion herrühren. Zur Klärung müßte dieser allein im Dorsalisierungs-Assay getestet werden. Interessanterweise hat der entsprechende Bereich in *Xenopus* Chordin keine erkennbare Auswirkung auf den BMP-Antagonismus (Larrain et al. 2000). Erst die zusätzliche Anwesenheit einer der beiden N-terminalen, cysteinreichen Domänen, die in HyChdl CR1 ersetzen, resultiert in etwa 70 %iger Dorsalisierungsaktivität verglichen mit dem vollständigen HyChdl.

In *Xenopus* Chordin besitzt CR1 die höchste intrinsische BMP-Bindeaktivität. Die Synergie mit den anderen CRD resultiert vermutlich aus der flexiblen Struktur des Moleküls durch die Linkerregion, was die 4 CRD effektiv um ein BMP-Molekül herum positioniert (Larrain et al. 2000). HyChdl kann trotz gravierender Unterschiede zu allen anderen bekannten Chordin-Molekülen deren BMP-antagonistische Wirkung imitieren. Limitierend wirkt bei HyChdl die Gesamtzahl der funktionellen Module bzw. Aminosäuren, die eher linear statt kooperativ zum BMP-Antagonismus beitragen. Es ist denkbar, daß das HyChdl nicht in der gleichen effizienten Weise wie Chordin mit BMP-Molekülen im Fisch interagieren kann. Die schwächere Aktivität von vollständigem HyChdl zeigt dies ebenfalls. Vermutlich kann HyChdl aufgrund seiner schwächeren Bindeeigenschaften erst durch hohe Konzentrationen das Gleichgewicht der BMP-Bindung auf seine Seite verschieben. Die Injektion der vereinzelt IGFBP- und Follistatin-like-Domäne könnte klären, ob der BMP-antagonistische Effekt v.a. auf diesen Domänen beruht, da die C-terminalen CR-Domänen dabei offenbar eher unterstützende Wirkung besitzen. Die Komplementierung des dorsalisierten Phänotyps in einer *chordino*-Mutante von Zebrafisch (Schulte-Merker et al. 1997) durch Injektion von *hychdl* wäre eine weitere Möglichkeit, das Dorsalisierungspotential von HyChdl zu testen.

Zusammengefaßt ist die an HyDkk1/2/4-A erinnernde, funktionelle Robustheit von HyChdl im heterologen Assay beeindruckend und zeigt, daß die Diversifizierung eines Proteins durch die Veränderung der Aminoäuresequenz oder Domänenkomposition nicht zwangsweise zum

Verlust der ursprünglichen Funktion führt. Es scheint eher, daß bei bestimmten Schlüssel-molekülen der Eumetazoa, wie z.B. Chordin, Änderungen in der Sequenz zwar die Vielfalt von Bauplänen erlaubten, die Grundfunktion jedoch durch strukturelle Fixierung beibehalten wurden (z.B. bei der axialen Musterbildung). Es ist interessant zu erforschen, welche Mechanismen die evolvierenden Proteine auf bestimmte Strukturen, wie z.B. die CR-Topologie in Chordin-Molekülen, festlegen.

HyChdl, BMP und die Achsendifferenzierung in *Hydra*

Im normalen, adulten Tier ist *hychdl* leicht gradiert von apikal nach basal exprimiert, allerdings ist das Hypostom frei. Da es bei der Kopfregeneration in der regenerierenden Spitze stark aufreguliert ist, wird v.a. eine frühe Funktion in der Etablierung der oral-aboralen Körperachse und des Kopforganisators vermutet (Rentsch 2001; Rentsch et al., Manuskript akzeptiert). In zwei Punkten besteht Diskussionsbedarf: Erstens, inwieweit existiert ein achsenbildender BMP-Chordin-Antagonismus in *Hydra*, vergleichbar mit den Bilateriern? Zweitens: Warum ist *hychdl* auch bei der Fußregeneration transient, und bei der Knospung in der gesamten Knospe gleichmäßig aufreguliert? Im folgenden werden diese Fragen behandelt.

Für *hychdl* und *hybmp5-8b* existieren unterschiedliche Schwellen-Positionswerte

In *Hydra* wurden bisher zwei BMP5-8-Orthologe isoliert, von denen eines, HyBMP5-8b, näher beschrieben wurde (Reinhardt et al. 2004). Sie sind Orthologe zu BMP5, -6, -7 und -8 der Chordaten sowie zu 'Screw' und 'glass bottom boat' in Insekten und fungieren bei Bilateriern in der axialen Musterbildung (Arora et al. 1994; Bangi und Wharton 2006; Lowe et al. 2006). Die BMP2 und -4-Familie ist v.a. in der dorsoventralen Musterbildung in Chordaten und Insekten (Dpp) involviert (De Robertis 2006). In dem Hydrozoen *Podocoryne* und in den Anthozoen *Nematostella* und *Acropora* sind BMP2/4-Orthologe beschrieben, die transient asymmetrisch entlang der direktiven Achse, später jedoch symmetrisch am Blastoporus exprimiert sind. (Finnerty et al. 2004; Hayward et al. 2002; Reber-Müller et al. 2006; Rentsch et al. 2006). Dies sind Hinweise für eine evolutiv konservierte Rolle der BMP-Moleküle in der axialen Musterbildung der Metazoa, soweit diese polarisierte Gewebestrukturen besitzen, die damit eine erstaunlich hohe, ancestrale Komplexität aufweisen (Rentsch et al. 2006).

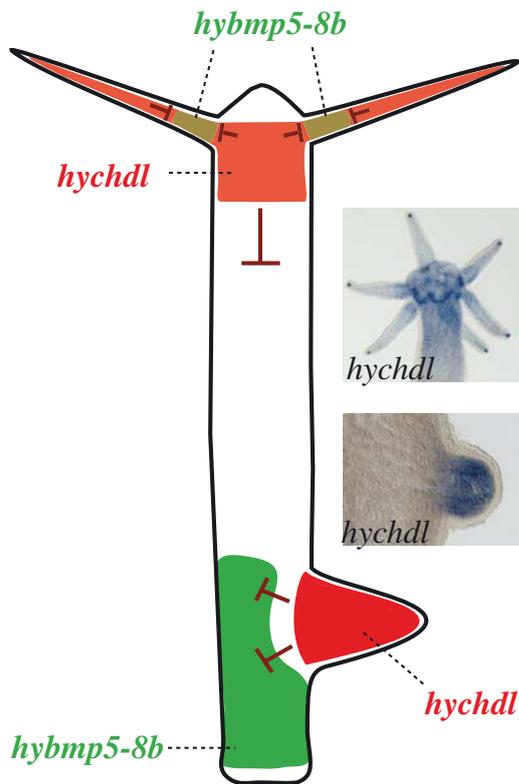


Abbildung 8.4. BMP5-8b und HyChdl markieren die Körperachse in *Hydra* komplementär. Die ISH-detektierten Expressionsmuster von *hychdl* (siehe ISH-Fotos links), rot, und *hybmp5-8b* (Reinhardt et al. 2004), grün, sind stark schematisiert dargestellt. *hychdl* ist endodermal in der Knospe, und im adulten Tier im Kopfbereich exprimiert, im Hypostom nur sehr schwach. *hybmp5-8b* ist ektodermal in der Stielregion bis zur Knospungszone exprimiert und zusätzlich endodermal an der Tentakelbasis. Die mutmaßliche Hemmung von BMP5-8b-Signalen durch HyChdl ist durch rote Striche dargestellt.

HyBMP5-8b, das einzige in Expressionsstudien getestete BMP-Molekül in *Hydra*, ist im adulten Tier endodermal stark an der Tentakelbasis, in Tentakelbildungszonen sowie etwas schwächer, aber weiträumig im Ektoderm der basalen Körperregionen exprimiert (Reinhardt et al. 2004; Abbildung 8.4). Damit spezifiziert *hybmp5-8b* primär basale Regionen mit niedrigem Positionswert und *hychdl* apikale Regionen mit hohem Positionswert. Sekundär existieren kleine *hybmp5-8b*-Domänen an der Tentakelbasis, inmitten der *hychdl*-Expressionsdomäne. Falls HyChdl BMP5-8b in *Hydra* antagonisiert, so muß hier mindestens ein weiterer Faktor existieren, der die HyChdl-Aktivität an der Tentakelbasis hemmt. Dafür käme z.B. Tolloid in Frage, eine extrazelluläre Protease, welche Chordin in Bilateriern inaktiviert. Mehrere Cluster aus dem EST Darmstadt I-Projekt mit Ähnlichkeit zu Tolloid-1 geben einen Hinweis auf die Konservierung dieses Mechanismus'. Ein BMP-Chordin-Antagonismus könnte demnach a) in der Polarisierung der oral-aboralen Achse und b) in der Feinregulation der Kopfstrukturen von *Hydra* involviert sein.

Regeneration

hybmp5-8b wurde als tentakelspezifisches Transkript beschrieben, dessen Expression im Einklang mit dem redefinierten Reaktions-Diffusions-Modell nach Meinhardt (1993) steht (Reinhardt et al. 2004, siehe Einleitung). Es reagiert auf erhöhte Positionswerte (Tentakelaktivationslevel). Wie *hychdl* wird *hybmp5-8b* bei der apikalen Kopfregeneration früh aufreguliert, was durch das theoretische Modell über eine transiente Tentakelaktivierung in der apikalen, regenerierenden Spitze erklärt wird. Die Aufregulation des Transkripts bei der Fußregeneration (Reinhardt et al. 2004) wird allerdings dadurch nicht erklärt. Auch *hychdl* wird bei der Fußregeneration transient exprimiert (Rentzsch 2001). Höchstwahrscheinlich unterliegen beide Transkripte dem gleichen Mechanismus der regenerationspezifischen Aufregulation wie *hydkk1/2/4-A* (siehe Seite 108). Die *hychdl*-Aufregulation bleibt bei der Kopfregeneration bis zur Kopfdifferenzierung bestehen, konsistent mit einer Funktion bei der Etablierung des Kopforganisators. In Fußregeneraten wird *hychdl* nach 24 h abgeschaltet, da der niedrigste, Fuß-spezifisierende Positionswert etabliert wird. *hybmp5-8b* bleibt dagegen auch während der Fußregeneration aufreguliert, d.h. es wird sowohl bei hohen, tentakelspezifischen, als auch bei niedrigen Positionswerten aktiviert.

Die parallele Expression beider Transkripte bei der Regeneration erscheint zunächst verwirrend im Hinblick auf einen Antagonismus, jedoch ist es durchaus möglich, daß HyChdl BMP5-8b auf Proteinebene antagonisiert, so daß keine BMP-Signaltransduktion stattfinden kann. Während der Etablierung des Kopforganisators bei der Kopfregeneration kann es z.B. nötig sein, die positionswertabhängige Aufregulation von BMP zu kompensieren, damit ein Organisator entstehen kann, ähnlich zum Vertebratenembryo, bei dem die BMP-Signale im zukünftigen Organisatorbereich unterdrückt werden müssen (De Robertis und Kuroda 2004). Die spätere Funktion von HyBMP5-8b bei der Tentakeldifferenzierung könnte wiederum durch Chordin-Antagonisten gewährleistet sein. In diesem Zusammenhang ist es hochinteressant, Antagonisten wie Tolloid in *Hydra* zu charakterisieren. Bei der Fußregeneration wird *hychdl* allmählich herunterreguliert, was die Fußspezifizierung im Anschluß ermöglicht, z.B. durch HyBMP5-8b-Signale.

Knospung

Während der Knospung wird *hychdl* durch hohe Positionswerte in der gesamten evaginierenden Knospe aufreguliert, nicht aber *hybmp5-8b*, was sich von der Situation bei der Regeneration unterscheidet. In der Knospungzone sind *hychdl* und *hybmp5-8b* daher komplementär exprimiert (Abbildung 8.4), was ein Hinweis auf einen Antagonismus zwischen sein kann und mit der Unterdrückung von HyBMP5-8b-Signalen bei der Kopforganisorbildung konsistent

ist. *hybmp5-8b* wird erst mit Beginn der Tentakeldifferenzierung in der Knospe, sowie später in basalen Knospenregionen exprimiert (Reinhardt et al. 2004).

hychdl reagiert offensichtlich im Gegensatz zu *hybmp5-8b* auf eine größere Spannweite an hohen Positionswerten, da es in der Knospe bzw. im jungen Polypen nicht sofort nach Etablierung des Kopfes und Fußes abgeschaltet wird, um das adulte Expressionsmuster zu zeigen. Eine theoretische Erklärung wäre der im Vergleich zum Adulttier veränderte Gradient der Positionswerte: Die Knospe und kleine Polypen besitzen ein steileres Positionswertgefälle, da Kopf (= Maximum) und Basalregion mit dem Fuß (= Minimum) im Verhältnis zur Körperlänge viel größer sind, und alle möglichen Positionswerte damit auf einer geringeren Länge verteilt sind. Der Positionswert wird vom Verhältnis des Aktivators zum Inhibitor bestimmt; möglicherweise existiert in der Knospe und im Jungpolypen noch nicht jenes Verhältnis der Aktivator-/Inhibitorkonzentration, welches zur Abschaltung des *hychdl*-Transkripts führt, sondern dieses stellt sich erst mit zunehmendem Wachstum bzw. der Entzerrung und Stabilisierung des Gradienten ein. Entsprechend kann HyChdl in der Knospe verstärkt morphogenetische Aufgaben wahrnehmen, beispielsweise bei der Neurogenese in Analogie zur neuralisierenden Funktion von Chordin im Vertebratenembryo (Sasai et al. 1995).

Konservierte Antagonismen definieren die Körperachse in *Hydra*

Bislang läßt sich für *Hydra* ein Szenario mit 2 verschiedenen, antagonistischen Systemen ableiten, die parallel entlang der oral-aboralen Körperachse des adulten und knospenden Tieres agieren (Abbildung 8.5A). Wnts und HyChdl definieren dabei den oralen (apikalen), Dkk1/2/4-A und HyBMP5-8b den aboralen (basalen) Bereich dieser Achse, letzteres zusätzlich die Tentakelbasis (siehe auch Diskussion zu Wnt/HyDkk1/2/4-A). Da *hychdl* im stabilen Zustand nicht mit dem höchstmöglichen Positionswert im Tier assoziiert ist, sondern sekundär durch nächstniedrigere Werte spezifiziert wird, steht es möglicherweise zusammen mit dem ebenfalls positionswertabhängigen *hybmp5-8b* hierarchisch unter dem Wnt/Dkk-System, welches den Positionswert primär etabliert — dies ist eine momentan nicht testbare Hypothese.

Die Kopplung der beiden antagonistischen Musterbildungssysteme ist nicht strikt, das BMP/Chordin-System wird schon in Cnidariern für die Etablierung 'sekundärer' Achsen benutzt (Abbildung 8.5B): Bei *Hydra* scheint ein isoliertes BMP/Chordin-System in der Tentakeldifferenzierung involviert zu sein. In der *Nematostella*-Entwicklung markiert ein Chordin-BMP2/4-System die direktive Achse, was zusammen mit der differentiellen Expression von *wnt*- und einem *dkk1/2/4*-Transkript entlang der oral-aboral-Achse eine quasi-Bilateral-

symmetrie schafft (Kusserow et al. 2005; Lee et al. 2006; Rentzsch et al. 2006). In Bilateriern schließlich findet sich die Entkopplung der antagonistischen Systeme für die 2 orthogonalen Hauptkörperachsen, anterior–posterior und dorsal–ventral, wobei hier sowohl Wnt/Dkk– als auch BMP/Chordin–Systeme noch in weitere Musterbildungsprozesse des Embryos isoliert rekrutiert wurden (Darras und Nishida 2001; Schneider und Mercola 2001b; Sick et al. 2006). Im *Xenopus*–Embryo sind außerdem maternale Komponenten des Wnt–Signalwegs in der dorsoventralen Achsenbildung involviert und XWnt8 spezifiziert ventrale Schicksale, antagonisiert von weiteren Inhibitoren wie Frzb, Cerberus, WIF-1 im Spemann–Organisator. Dies bedeutet, daß Wnt–Signaltransduktion immer noch parallel zum BMP/Chordin–System auftritt und die evolutive Konservierung dieses Prinzips verdeutlicht.

In Cnidariern scheinen indes weitere Orthologe der BMP–Antagonisten zu existieren, z.B. Gremlin (Krause 2005; Rentzsch et al. 2006), Follistatin (Böttger et al. 2006; Matus et al. 2006a) und Noggin (Matus et al. 2006a). In *Hydra* gibt es außerdem Hinweise auf ein Cerberus–ähnliches Molekül (unveröffentlicht), was sowohl als Wnt–, Nodal– und BMP–Antagonist in der Literatur bekannt ist (Piccolo et al. 1999).

Zukünftige BMP2/4–Daten für *Hydra* und auch *Nematostella*, sowie Interaktionsstudien zwischen BMP–Molekülen und den putativen Antagonisten werden abzuwarten sein, um das Szenario der Körperachsevolution bei Diplo– und Triploblasten verfeinern zu können.

Weiterhin wird die komparative Analyse Aufschluß über die Verwandtschaft von Kopforgansatoren bzw. der blastoporale Organisationszentren der Cnidarier mit den embryonalen Organisationszentren der Bilaterier geben, denn es existieren einige Unterschiede in der Molekülkomposition der etablierten Organisationszentren: Die klassischen Organisationsmoleküle Dickkopf-1 und Chordin befinden sich bei *Hydra* außerhalb des Organisationszentrums, dafür werden die *wnt*–Gene im Kopforgansator exprimiert — umgekehrte Verhältnisse also. Etwas anders ist die Situation im *Nematostella*–Embryo, hier befinden sich Chordin am Blastoporus und einige *wnt*–Transkripte auch außerhalb des putativen Organisationszentrums, was eher dem Spemann–Mangold–Organisator vergleichbar ist. Aborale *nvdkk1/2/4*– und blastoporale *bmp2/4*–Expression verhalten sich aber wiederum entgegengesetzt zu diesem. Das Organisationsprinzip scheint somit weniger an die Identität bestimmter Moleküle gekoppelt zu sein, als vielmehr an Polarisierung von Gewebe durch antagonistisch wirkende Moleküle — die Orientierung der dafür rekrutierten Agonist/Antagonisten–Systeme bestimmt dann die Symmetrieverhältnisse des Organismus. Klare Analogie besteht aber in der Etablierung des Organisationszentrums: Wnt–Signale und parallel die Unterdrückung von BMP–Signalen sind sowohl für die Bildung des Spemann–Mangold–Organisationszentrums als auch den *Hydra* Kopforgansators essentiell.

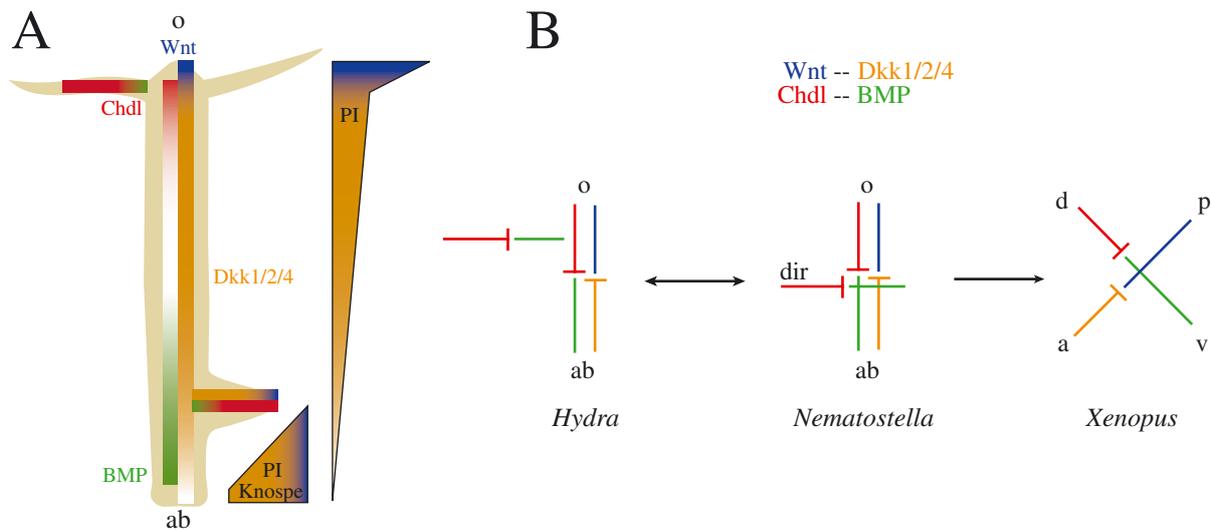


Abbildung 8.5. Die unterschiedliche Kopplung antagonistischer Systeme definiert die Körpersymmetrie. (A) Die putativen Wnt/Dkk- und BMP/Chordin-antagonistischen Systeme spezifizieren parallel die Körperachsen in *Hydra*: Die oral-aborale Hauptkörperachse und die entstehende Achse während der Knospung. Das Wnt/Dkk-System definiert möglicherweise als hierarchisch übergeordnetes Musterbildungssystem den Gradienten der Positionswerte ('Quelldichte', PG). Das BMP/Chordin-System könnte sekundär für die Tentakelmusterbildung rekrutiert worden sein. (B) Die Kopplung und Entkopplung der konservierten, antagonistischen Systeme im Verlauf der Evolution spezifiziert orthogonale Körperachsen der Eumetazoa. Beispiele: *Hydra*, *Nematostella*-Planularlarve und *Xenopus*-Embryo. o=oral, ab=aboral, dir=direktiv, a=anterior, d=dorsal, p=posterior, v=ventral.

Teil IV

Material und Methoden

9 *Hydra*-Methoden

9.1 Tiere

Es wurden Polypen der Wildtyp-Stämme *Hydra vulgaris* Basel und *Hydra magnipapillata* 105 sowie die Mutanten sf-1 (Sugiyama und Fujisawa 1978a) und reg-16 (Achermann und Sugiyama 1985), als auch die *H. magnipapillata*-Chimäre A-10 (H. Shimizu) verwendet. Die Tiere wurden bei $18\pm 1^\circ\text{C}$ kultiviert und mit frisch geschlüpften Krebslarven (*Artemia salinas*) gefüttert; das Kulturmedium (HM: 1 mM CaCl_2 , 0,1 mM MgCl_2 , 0,1 mM KCl, 1 mM NaH_2CO_3 , pH 7,8) wurde zweimal täglich gewechselt. Vor allen Experimenten wurden die Tiere an mindestens drei aufeinanderfolgenden Tagen gefüttert und 24 h nach der letzten Fütterung verwendet.

9.2 Regeneration und Verletzung

Für alle Versuche wurden knospense Polypen benutzt.

Verletzung

Die Polypen wurden mit einem tiefen Schnitt (ca. 1/3 der Körperbreite) in der Körpersäule oder am Hypostom (ca. 1/3 der Kopflänge) verletzt und danach in frisches Kulturmedium bei 18°C überführt.

Regeneration

Die Tiere wurden bei 20, 50, 70 oder 80 % der Körperlänge (KL) amputiert (vom Fuß aus gemessen) und in Petrischalen mit frischem HM (mindestens 1 ml pro Regenerat) überführt und bei 18°C gehalten.

Wurden nur die regenerierenden Spitzen benötigt, wurden diese zu verschiedenen Zeitpunkten nach der ersten Amputation erneut abgeschnitten (ca. 1/10 der ursprünglichen KL) und sofort für die RNA-Isolation verwendet (Abschnitt 10.2).

9.3 Abschnürregenerate

Mit einem Haar wurden die Füße knosploser Polypen bei 25 % KL abgeschnürt. Die Regenerate wurden danach in frisches Hydramedium überführt und bei 18 °C gehalten.

9.4 Induktion der Gametogenese

Versuche zur Oogenese wurden am *Hydra vulgaris* Stamm AEP durchgeführt (Martin et al. 1997). 7 bis 10tägiger Futterentzug induzierte die Gametenbildung, anschließend wurden die Tiere drei Wochen lang zweimal wöchentlich gefüttert und die verschiedenen Oogenese- und Spermatogenesestadien abgesammelt.

9.5 Eliminierung der i-Zelllinie in den Stämmen sf-1 und A-10

Aus Tieren der *Hydra magnipapillata* Stämme sf-1 und A-10 (H. Shimizu) können die interstitiellen Stammzellen (i-Zellen) und ihre Derivate (Nervenzellen, Nematocyten und Drüsenzellen) durch eine Hitzebehandlung selektiv entfernt werden (Sugiyama und Fujisawa 1978a). Dafür wurden die Tiere bis zu 5 Tagen bei 28–30 °C und täglicher Fütterung gehalten. Anschließend wurden sie bei 18°C gehalten und täglich gefüttert, bis sie kein Futter mehr fangen konnten durch den Verlust der Nematocyten (ca. 3 Tage). Dies wurde außerdem exemplarisch für einige Tiere durch Mazeration überprüft (David 1973). Für Langzeitversuche, die auf die Eliminierung der Drüsenzellen abzielten, wurden die hitzebehandelten Tiere bis zu 50 weiteren Tagen bei 18 °C ohne Futter gehalten und mindestens 3 mal pro Woche gewaschen.

9.6 DAPI-Kernfärbung

Die Tiere wurden mit 2 % Urethan in Hydramedium relaxiert und mit Lavdovsky-Fixativ (Ethanol, Formaldehyd Essigsäure, H₂O 50:10:4:36) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach kurzem Waschen mit PBS (0,15 M Natriumchlorid, 0,08 M Na₂HPO₄, 0,02 M NaH₂PO₄, pH 7,34) wurden sie in DAPI bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml in PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt.

10 Molekulargenetische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, stammten alle verwendeten Chemikalien von der Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

10.1 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden manuell oder mit entsprechender Software (siehe Punkt 10.6) abgeleitet. Synthetisiert wurden sie bei MWG-Biotech AG, Ebersberg; Sigma-Ark, Darmstadt; Sigma-Genosys, Cambridge, U.K.; Operon, Köln.

Tabelle 10.1. Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide

Verwendung in Abschnitt	Name, T_m	Sequenz Oligonukleotid
2.1 Seite 25	ChdSPfor, 45 °C	5'ctgcttacaagaattctacatg
2.1 Seite 25	ChdSPrev, 45 °C	5'gttttatcagatgcctcgagaattca
2.1 Seite 25	Spin5', 50 °C	5'ccactatcggaggaattcaaatatgg
2.1 Seite 25	Spin3'243, 50 °C	5'agcttgatggtgctcgagtccgc
10.13 Seite 138	pSUC2for, 46 °C	5'cctcgtcattgttctcgttccctt
10.13 Seite 138	pSUC2rev, 46 °C	5'gggtggaagtggaccaaaggtcta
4.1 Seite 143	HyDi5'RACE1, 65 °C	5'ccgcagagtgcaccttctttaacatagctattacattgc
4.1 Seite 143	HyDi5'RACE2, 65 °C	5'gcagctcgcacacctttttgcaagactcggc
4.1 Seite 142	1-B1RACE3', 65 °C	5'gcgactgcgaaaatggttgetgtg
4.1 Seite 142	Hydi5'2, 55 °C	5'gaaaacatacatcttttctgatttatcaatc
4.1 Seite 142	Hydi3'1, 55 °C	5'tttttttttttttttataatttaactcg
4.7 Seite 143	HyDkkKozak_Cla, 42 °C	5'tacatcgattctgatgccaccatgag
4.7 Seite 143	HyDkkpCS_XbaRev, 42 °C	5'tctagatttaatacaagatcacttcc
4.7 Seite 143	HyWntKozak_Cla, 47 °C	5'catcgatttgcgccaccatgggcagc
4.7 Seite 143	HyWntpCS_XbaRev, 47 °C	5'tttctagactatttacaggtgtattcag
4.6 Seite 144	wnt3aforw, 60 °C	5'tctgeggagttgcgttttc
4.6 Seite 144	wnt3arev, 60 °C	5'ccttcgtccgtttgacctcg
4.6 Seite 144	EF1aforw, 57 °C	5'gttggtcgtgtgaaactgg

Tabelle 10.1 – Fortsetzung

Verwendung in Abschnitt	Name, T_m	Sequenz Oligonukleotid
4.6 Seite 144	EF1arev, 57 °C	5'tctggaagagattcgtgatg
3.1 Seite 141	Tsrp1_5'for, 59 °C	5'cagtttgcttgcgttgctatg
3.1 Seite 141	Tsrp1_5'rev, 59 °C	5'gttattacactcacgctgtctctgc
10.14 Seite 141	HyThr1, 55 °C	5'gtggagctgggttattacactcacgctgctc
10.14 Seite 141	HyThr5, 60 °C	5'ccacctcctcaatttggtgggcgcg
5.3 Seite 144	ChdBamHI.b_for, 55 °C	5'gggatcctggtaccatgaagagcatgaaactg
5.3 Seite 144	HyChd_SP_rev_myc, 55 °C	5'atcgattgcagggaggacaggtttatcag
5.3 Seite 144	HyChd3Xho2, 52–56 °C	5'ccgctcgagtcattgaccatctgctac
5.3 Seite 144	ChdK1EcoFw, 55 °C	5'gttcgacatccgaattctc
5.3 Seite 144	ChdK4EcoFw, 52 °C	5'cagctgtatatcgaattctcag
5.3 Seite 144	K6forw, 56 °C	5'gcagtaagaattctaaactcc
5.3 Seite 144	K5forw1, 60 °C	5'atgcatctgagaattcctgtcc
5.3 Seite 144	K5rev2, 60 °C	5'ctcgagcgactagtttatctgac
5.3 Seite 144	K5forw3, 55 °C	5'gtaaactagtacaaaaaattccg

10.2 RNA-Isolierung

Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser hergestellt bzw. mit 0,1 % DEPC über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. Gesamt-RNA aus *Hydra* wurde nach einem Protokoll für Pflanzen nach Suzuki et al. (2001) extrahiert. Das Protokoll wurde gemäß der Anzahl der Polypen skaliert. 50 Tiere wurden in 500 'Solution D' (4,2 M Guanidiniumisothiocyanat (Sigma); 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 0,5 % *N*-Lauroylsarkosin (Sigma), 5 % 2-Mercaptoethanol (Sigma)) durch Schütteln aufgelöst. Das Lysat wurde mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat, pH 4,0 angesäuert und die RNA mit 1 Volumen (550 μ l) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde nach 10 min Eis durch Zentrifugation bei 10000xg (10 min, 4 °C) separiert und in ein neues Gefäß überführt (ca. 400 μ l). Die RNA wurde daraus mit je 1/2 Volumen von 1,2 M Natriumchlorid, 0,8 M Natriumcitrat und Isopropanol (Sigma) nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur ausgefällt und bei 10.000xg (20 min, 4 °C) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, 10 bis 15 min an der Luft getrocknet und in DEPC-H₂O oder TE-Puffer (5 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

Die für die cDNA-Herstellung benötigte Poly(A)⁺RNA wurde aus der Gesamt-RNA mit

dem 'Oligotex mRNA Mini Kit' (70022, Qiagen) oder dem 'PolyATtract® mRNA Isolation System III' (Z5200, Promega) nach den Herstellerangaben extrahiert.

10.3 cDNA–Herstellung

Die cDNA wurde aus Poly(A)⁺RNA mit 'SuperScript III Reverse Transcriptase' (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung eines Oligo-d(T)–Oligonukleotides hergestellt. Dabei wurden stets 400 bis 500 ng RNA pro Reaktion eingesetzt. Die cDNA wurde unverdünnt, 1:5, 1:10 oder 1:100 verdünnt in PCR–Reaktionen eingesetzt.

10.4 Phenolische Extraktion von DNA

Wäßrige DNA–Lösungen wurden mit 1 Volumen Phenol–Isoamylalkohol–Chloroform (25:24:1) versetzt, 1 min lang kräftig geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 4 °C, 7.000xg, 7 min. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1/10 Volumen Natriumacetat pH 5,2, sowie 2,5 Volumen Ethanol (alternativ 1 Volumen Isopropanol) versetzt, mehrmals invertiert und bei -20 °C 4 bis 24 h inkubiert. Die DNA wurde bei 4 °C, 13.000xg, 45 min lang sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde 15 min an der Luft getrocknet und in MilliQ–Wasser oder TE–Puffer aufgenommen.

10.5 Klonierung von cDNA–Fragmenten

PCR–Amplifikation:

Standardmäßig wurden Plasmid–DNA–Matritzen 1:100 verdünnt eingesetzt. Die 50 µl–Reaktionen beinhalten 1 µl DNA–Matrize; je 0,2 µM Oligonukleotide; 0,4 mM dNTPs; 1,5 mM Mg²⁺; 1xPCR–Puffer und 0,25 µl 'Phusion High-Fidelity' DNA–Polymerase (Finnzymes) oder taq–Polymerase (Amersham). PCR–Programm: 3 min 94 °C; 30 x (30 sec 94 °C, 30 sec 'Annealing' bei X °C, 1 min/1000 Bp 72 °C); 5 min 72 °C. 1/10 Volumen des PCR–Ansatzes wurde durch Agarose–Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung im UV–Licht sichtbar gemacht.

Aufreinigung und Ligation von PCR–Fragmenten:

PCR–amplifizierte DNA–Fragmente wurden entweder direkt aus der Reaktion oder nach Aufreinigung aus einem Agarosegel in die Vektoren pGEM-T (Promega) oder pCR4.0-TOPO

(Invitrogen) nach Herstellerangaben kloniert. Die Isolierung aus Agarosegelen erfolgte entweder über Glaswolle oder mit Kits verschiedener Hersteller (z.B. Machery-Nagel, Qiagen). Alternativ wurden DNA-Fragmente in 'low melting'-Agarose aufgetrennt und ausgeschnitten. Die Stückchen wurden anschließend 10 min bei 72 °C aufgeschmolzen, kurz bei 37 °C äquilibriert und 4 μ l davon in eine vorbereitete, ebenfalls 37 °C warme Ligationsreaktion mit pCR4.0-TOPO pipettiert. Nach 5 min wurden 2 μ l davon für die Transformation der Bakterien verwendet.

Transformation von E. coli:

Mit 2 bis 4 μ l Ligationsreaktionen wurden Rubidiumchlorid-chemokompetene E. coli-Stämme (DH5 α , Top10 oder Top10F', Invitrogen) nach Sambrook und Russell (2001) transformiert. Die Bakterien wurden auf LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH 7,5; 15 g/l Agar) plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse wurden die Kolonien in flüssiges LB-Medium überimpft und 16 h bei 37 °C kultiviert.

Präparation von Plasmid-DNA:

Die Plasmid-DNA wurde mit Kits verschiedener Hersteller präpariert (z.B. Machery-Nagel, Qiagen).

Restriktionsverdau von Plasmid-cDNA:

3 bis 5 μ l einer Plasmid-Präparation wurde in einem 20 μ l-Ansatz mit den jeweiligen Restriktionsenzymen und Puffern sowie BSA (NEB, Amersham) nach Herstellerangaben 1 bis 24 h verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

10.6 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

cDNA-Fragmente aus dieser Arbeit wurden mit Ausnahme der ESTs von der Firma GATC Biotech, Konstanz, oder der Firma MWG-Biotech, Eberbach, sequenziert.

10.7 RNA-Sonden

In 'Northern Blotting'- und *in situ*-Hybridisierungsanalysen wurden die Transkripte der zu untersuchenden Gene durch Digoxigenin-markierte, einzelsträngige 'antisense'-RNA-Sonden detektiert. Die Matrize für die RNA-Polymerisierungsreaktion wurde auf zwei verschiedene Arten hergestellt: Mit den Standardoligonukleotiden M13forward und M13reverse wurden die betreffenden, klonierten cDNA-Fragmente inklusive der Promotoren für T7 oder

Sp6 RNA-Polymerasen per PCR amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend durch Größenausschlußchromatografie (P6-Säulen, Biorad) aufgereinigt. Die ‘antisense’-Sonden wurden je nach Orientierung des cDNA-Fragments mit einer der RNA-Polymerasen hergestellt. Bei der 2. Methode wurde ein das Genfragment tragende Plasmid mit einem Restriktionsenzym so linearisiert, daß das Fragment am 3’ oder 5’-Ende geschnitten wurde. Das Plasmid wurde anschließend entweder mit dem ‘MinElute PCR Purification Kit’ (Qiagen) oder via phenolische Extraktion aufgereinigt.

Zur Sonden-Synthese wurden Digoxigenin- oder FITC-markierte Uracilnukleotide (RNA Labeling Kit (SP6/T7), Roche) verwendet; Digoxigenin und FITC können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Sondenreaktionen wurden über Größenausschlußchromatografie (P6-Säulen, Biorad) aufgereinigt und die Ausbeute über Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt.

Die verwendeten Sonden waren komplementär zu folgenden cDNA-Fragmenten:

- *hywnt3a* (534 Bp): Nukleotide (nt) von Aminosäuren (As) 185–362, dies entspricht der C-terminalen Hälfte des Moleküls.
- *hydkk1/2/4-A* (395 Bp): komplettes Transkript.
- *hytsr1* (995 Bp, 5’ Ende): nt 1–995, entspricht As 1–281; *hytsr1* (1948 Bp, 3’ Ende): nt 7399–9348, entspricht As 2467–9219
- *hytsr2* (900 Bp): nt 1–900, entspricht As 1–287.
- *hytsr-like* (754 Bp): nt 3608–4317, entspricht As 1163–1399.

10.8 Semiquantitative PCR

Zur Untersuchung der Dynamik der mRNA-Expression von *hywnt3a* bei Verletzung wurden semiquantitative PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde cDNA aus je 20 unverletzten und an der Körpersäule mehrfach verletzten Polypen (*H. magnipapillata*) 30 min nach der Verwundung hergestellt. Die cDNA-Synthese aus je 433 ng aus Poly(A)⁺-RNA mit einem oligo-dT-Primer erfolgte wie oben beschrieben. Für die PCR-Experimente wurden spezifische Oligonukleotide der Gene *hywnt3a* und *EF1α* (*wnt3a*for/rev und *EF1α*for/rev) verwendet. *EF1α* wird als Haushaltsgen in jeder Zelle und jedem Stadium unverändert exprimiert und eignet sich daher für die Normierung des differentiell exprimierten *hywnt3a*-Transkriptes. Die PCR wurde für beide Transkripte in einem Durchgang durchgeführt unter folgenden Bedingungen im 25 µl Ansatz: 0,5 µl cDNA (1:10 verdünnt); 1 x Puffer; 0,1 µl taq-Polymerase; 2,4 mM Mg²⁺; 0,64 mM dNTPs. Programm: 3 min 94 °C; 25 x (*EF1α*) oder 30 x (*hywnt3a*)

(30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C (*EF1 α*) oder 60 °C (*hywnt3a*), 30 sec 72 °C).

Die Intensität der PCR-Banden wurde mit der Software ImageG 1.34s (NIH, USA) quantifiziert.

10.9 RNA *in situ*-Hybridisierung

‘Whole mount’ *in situ*-Hybridisierung (ISH):

Die ISH an ganzen Tieren wurde nach dem Protokollen von Grens et al. (1996) und Martinez et al. (1997) durchgeführt. Die Tiere wurden mit 2 % Urethan in HM 1 min relaxiert, dann mit frischem, 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) in HM 24 h bei 4 °C fixiert. Das PFA wurde anschließend durch Methanol ersetzt und die fixierten Tiere wurden bei –20 °C bis zum Versuchsbeginn gelagert. Nach der schrittweisen Rehydrierung (je 5 min 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBT (=PBS + 0,1 % Tween 20) wurden die Tiere 3 x 5 min in PBT gewaschen. Danach wurden sie 10 min mit Proteinase K (Sigma) inkubiert (10 μ g/ml in PBT), um das Gewebe für die Sonden besser zugänglich zu machen. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit Glycin gestoppt (4 mg/ml in PBT). Nach Äquilibration in 0,1 M Triethanolamin (TEA, 2 x 5 min) wurden die Tiere jeweils 5 min mit 0,25 % (w/v) und 0,5 % (w/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M TEA inkubiert. Nach der Refixierung (20min 4 % PFA in PBT) und 5 x 5 min Waschen in PBT wurden die Tiere in 50% Prähybridisierungslösung in PBT, dann 10 min in 100 % Hybridisierungslösung (50 % Formamid; 5 x SSC [0,75 M Natriumchlorid; 0,075 M Natriumcitrat pH 7,0]; 200 μ g/ml aufgereinigte Hefe-RNA; 1 x Denhardt's [1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % Ficoll, 1 % BSA]; 100 μ g/ml Heparin; 0,1 % Tween 20; 0,1 % CHAPS; 10 % DEPC-H₂O) überführt. Anschließend erfolgte die Prähybridisierung für mindestens 2 Std. bei 55 °C bis 60 °C. Die Sonden wurden in einer Endkonzentration von 0,05 ng/ μ l verwendet und vor der Zugabe zu den Tieren 10 min bei 75 °C in Prähybridisierungslösung denaturiert. Hybridisiert wurde 1,5 bis 3 Tage bei 55 bis 60 °C. Danach erfolgten schrittweise stringenter werdenden Waschungen, um nicht-gebundene Sonde zu entfernen: Je 5 min bei 55 °C in 100 %, 75 %, 50 %, 25 % in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat pH 7,0), schließlich mit 2 x SSC + 0,1 % CHAPS (3 x 30min). Nach der Äquilibration in Maleinsäurepuffer (MAB, pH 7,5; 2 x 10min) wurde ein Blockierungsschritt mit 1 % Blockierungsreagenz (Roche) in MAB entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Zur Detektion der markierten RNA-Sonden wurde ein Anti-Digoxigenin-Antikörper mit konjugierter Alkalischer Phosphatase (Roche) in einer Verdünnung von 1:4000 in Blockierungslösung verwendet (2 h bei Raumtemperatur oder 4 °C über Nacht). Ungebundener Antikörper wurde durch 8 bis 12 Waschungen mit á 30–60

min mit MAB entfernt. Optional wurde ein MAB-Schritt über Nacht zugefügt. Die anschließende Farbreaktion wurde mit dem Substrat NBT/BCIP (Roche) durchgeführt, welches von der Alkalischen Phosphatase des Antikörpers zu einem blauen Präzipitat umgesetzt wird. Für die Farbreaktion wurden die Tiere für 2 x 10 min in alkalischen Puffer (NTMT: 100 mM NaCl, 100 mM TRIS, pH 9,5; 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20, 1 mM Levamisol (Sigma)) überführt. Die Substratlösung wurde 1:50 in NTMT verdünnt und auf die Tiere gegeben. Die Reaktion wurde bei 37 °C im Dunkeln durchgeführt. Die Präparate wurden anschließend regelmäßig unter einem Binokular betrachtet und die Reaktion bei Erreichen eines optimalen Signal/Hintergrund-Verhältnisses mit 100 % Ethanol abgestoppt (meist zwischen 20 und 90min). Zur Auswertung wurden die Tiere in PBS/Glycerin (1:9) überführt und auf Objektträger montiert.

Doppel-ISH:

Die Hybridisierung mit zwei Sonden wurde wie oben, adaptiert nach Hansen et al. (2000) und Philipp et al. (2005) durchgeführt. Die unterschiedlich markierten Sonden (FITC, Digoxigenin) wurden parallel zugegeben und nacheinander mit NBT/BCIP und FastRed (Sigma) detektiert. NBT/BCIP wurde mit 100 % Ethanol für 20 min fixiert, danach wurden die Tiere sukzessive in MAB rehydriert, erneut blockiert und mit Antikörper inkubiert. Nach der Äquilibrierung mit NTMT wurde die Färbereaktion mit FastRed nach Herstellerangaben durchgeführt und mit TE-Puffer gestoppt.

Mazerat-ISH:

Für die *hydkk1/2/4-A*-ISH an Mazeraten (David 1973) wurde das Protokoll wie folgt adaptiert:

Beschichtung der Objektträger: Die Objektträger wurden in 70 % Ethanol/ 1 % HCL 15 min angeätzt und anschließend mit DEPC-H₂O gewaschen. Danach wurden sie mit 1:10 verdünnter, 0,1 %iger Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma) für 5 min inkubiert und über Nacht getrocknet. **Mazeratherstellung:** Je 10 Polypen (*H. vulgaris*) wurden bei 80 und 50 % KL geschnitten und durften 1 h regenerieren. Anschließend wurde die regenerierenden Spitzen (ca. 1/5 KL) isoliert und mit je 4 Tropfen Mazeratlösung (Glycerin, Eisessig, H₂O; 1:1:13) ca. 20 min bei 4° mazeriert. Als Kontrolle wurden 5 ganze Polypen in 10 Tropfen Mazeratlösung benutzt. Nach Zugabe von je 1 Volumen 8 %igem PFA in HM wurden je 100 µl der Suspensionen auf mehrere beschichtete, mit Tween 20 benetzte Objektträger ausgestrichen, welche dann 45 in bei Raumtemperatur trockneten (David 1973).

ISH: Die Objektträger mit der fixierten Zellsuspension wurden für 5 min mit PBS und PBT gewaschen und anschließend 2 h bei 60 °C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 0,1 ng/ μ l Sonde für 18 h bei 60 °C, danach wurde frische Sonde zugegeben und weitere 12 h auf den Objektträgern belassen. Anschließend wurde ungebundene Sonde mit 2 x SSC für 2 x 5 min bei 60 °C und dann mit 2 x SSC + 0,1 % CHAPS bei 50 und 40 °C je 5 min gewaschen. Danach erfolgte die Äquilibrierung bei Raumtemperatur in MAB für 2 x 30 min, gefolgt von einem 3-stündigem Blockierungsschritt mit 1 %iger Blocking-Reagenz (Roche) in MAB. Die Inkubation mit dem 1:4000 verdünntem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Objektträger wurden danach 3 x 20 min in MAB gewaschen, gefolgt von 10 min Inkubation in NTMT sowie 5 min in NTMT + 1 mM Levamisol (Sigma). Die Objektträger wurden mit verdünnter NBT/BCIP-Lösung gut benetzt und bis zu vier Stunden bei 37 °C im Dunkeln gehalten und regelmäßig unter dem Mikroskop untersucht. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 100 %igem Ethanol. Die Mazerate wurden anschließend in PBS/Glycerin (1:9) eingedeckelt.

10.10 Mikroskopie und Fotografie

Die visuelle Auswertung aller Präparate erfolgte mit einem Zeiss Stemi SV 11 Binokular, dem Zeiss Axiovert 100 Mikroskop, dem Nikon Eclipse-80i Mikroskop sowie dem Nikon C1Si Spectral Imaging Confocal Laser Scanning System (in Verbindung mit dem Nikon TE2000-E Inversmikroskop). Die Mikroskope sind alle mit Interferenzkontrast ausgerüstet. Fotografien wurden mit der Diagnostic Instruments Spot-II-Kamera, der Canon PowerShot G5 oder der Nikon DSL-1 Kamera aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Software der jeweiligen Hersteller in Kombination mit MetaMorph oder der Adobe Photoshop Software prozessiert.

10.11 Heterologe Expressionsstudien

Die allgemeinen *Xenopus*-Methoden, die Injektionen in Embryonen, der ‘Animal Cap Assay’, die Blockierung sekundärer Achsen, der TOPFLASH/Luciferase-Assay in *Xenopus* und in HEK293T-Zellen sind in Guder et al. (2006b) beschrieben.

in vitro-Transkription

Je 10 μ g der Expressionsvektoren (*hydkk1/2/4-A* und *hywnt3a*) wurden mit *NotI* linearsiert, phenolisch extrahiert und präzipitiert. Die mRNA wurde mit dem mMESSAGING mMACHI-

NE® SP6 Kit (Ambion) nach Herstellerangaben produziert. Die präzipitierte und in Tris-Puffer (pH 8) aufgenommene mRNA wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

10.12 Bioinformatik

Sequenzen, Alignments

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit den Programmen Jellyfish (LabVelocity) und Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) verarbeitet. Für Assemblierungen wurde das in Bioedit implementierte 'CAP contig assembly program' (Huang 1992) benutzt. Für Alignments und ihre Darstellung wurden neben o.g. lokale Software oder Web-Interfaces von ClustalW/X (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>); (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/unix/clustalx/>), Toffee (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee>), Muscle (<http://www.drive5.com/muscle/>), Seaview (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>), MACAW (<http://iubio.bio.indiana.edu:7780/archive/00000057/>), Genedoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>); für Proteinanalyse der ExPASy Proteomics Server (<http://us.expasy.org/>) und der SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) und zum Oligonukleotid-Design die Freeware PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) und das 'Oligo Analysis & Plotting Tool' von Operon (<http://www.operon.com/oligos/toolkit.php>) benutzt.

Phylogenetische Analysen

Für die Baum-Erstellung mit 'Neighbour-Joining' oder 'Maximum-Likelihood' wurden die Programme TREE-PUZZLE 5.2 (Schmidt et al. 2002), IQPNNI (Vinh und Von Haeseler 2004); (<http://www.cibiv.at/software/iqpnni/>), Phyml (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>), und die Programme seqboot und DNAPenny aus dem Phylip-Package (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) mit dem JTT Modell der Evolution benutzt (Heiko A. Schmidt). Zur Darstellung wurden die Programme TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) oder NJPlot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) verwendet.

Für die phylogenetische Maximum-Likelihood-Analyse der Dkk-CRD2 in Abschnitt 4.2 wurde der IQP-Algorithmus ('Important Quartet Puzzling') in IQPNNI und in TREE-PUZZLE benutzt. Die Parameter wurden wie folgt gesetzt: 300 repetitions (IQPNNI), 10.000 'intermediate trees' in TREE-PUZZLE. Für beide wurde das WAG-Model der Evolution benutzt.

10.13 Signalpetid–Selektions–‘Screening’

Herstellung der cDNA–Bibliothek

Vorbereitung der Tiere. Etwa 24.400 Tiere des Stammes *Hydra magnipapillata* sf-1 wurden nacheinander in Kulturschalen für drei Tage bei 28 °C inkubiert, anschließend wurde der Verlust der i-Zellen mittels Mazeraten überprüft (David 1973). Anschließend wurden die Tiere bei 80 % Körperlänge enthauptet, die Köpfe wurden gesammelt, in ‘Solution D’ lysiert und bei –80 °C gelagert. Die Stümpfe regenerierten in Gruppen von 1 bis zu 24 h, anschließend wurden erneut die apikalen 20 % Gewebe entfernt und diese regenerierenden Spitzen ebenfalls in ‘Solution D’ lysiert und bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Das übrige Gewebe wurde nicht weiter verwendet.

cDNA-Synthese aus *Hydra magnipapillata* sf-1. 3,55 mg Gesamt–RNA wurde wie unter Punkt 10.2 beschrieben gewonnen, daraus wurde sukzessive 45,7 µg Poly(A)⁺RNA mit dem PolyATtract® mRNA Isolation System III (Z5200, Promega) extrahiert. Die Qualität der RNA wurde spektrometrisch und per Agarose-Gelelektrophorese (1 %) überprüft. 14,2 µg Poly(A)⁺RNA wurde anschließend mit dem SuperScript™ Choice System for cDNA Synthesis Kit (18090-019, Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers in drei Einzelreaktionen in doppelsträngige cDNA umgeschrieben; dafür wurden jeweils 150 ng ‘random’–Oligonukleotid 5’cgattgaattctagacctgcctcgagnnnnn (modifiziert nach (Jacobs et al. 1997) benutzt, welches eine *Xho*I–Schittstelle einführt. Anschließend wurden wie im Protokoll angegeben *Eco*RI–Adaptoren an die cDNA ligiert und die cDNA mit 80 U *Xho*I in 150 µl Ansatz 3 h verdaut (pro 5 µg eingesetzte Poly(A)⁺RNA).

Größenselektion der cDNA. Die cDNA (aus einem Ansatz) wurde über Gelelektrophorese mit 1 % Low Melting Agarose (Roth) oder 2,5 % NuSieve® GTG® Agarose (Cambrex) 2 h bei 110 V aufgetrennt und der Bereich von 100 bis 1000 bp ausgeschnitten. Für die phenolische Gelextraktion wurde 100 g kristallines Phenol (Sigma) im Wasserbad bei 65 °C geschmolzen. Pro 25 ml flüssiges Phenol wurden 15 ml steriles ddH₂O, 100 µl 5 M Natriumchlorid und 400 µl 1M Tris–Cl pH 8,0 zugegeben, und das Gemisch mehrere Male invertiert. Die Phasentrennung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden zu je etwa 500 µl Volumen auf Reaktionsgefäße verteilt, kurz herunterzentrifugiert und bei 65 °C für 10 min geschmolzen und 6 min auf 37 °C äquilibriert. Pro 500 mg Gel wurde 250 µl 37 °C warmes Phenol zugegeben und die cDNA durch kräftiges Schütteln extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation (v_{max} Tischzentrifuge) bei Raumtemperatur wurden 360 µl

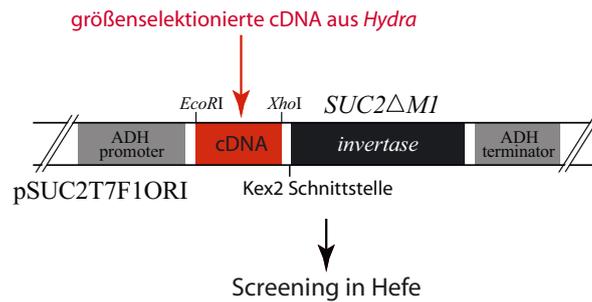


Abbildung 10.1. Die Klonierungsstelle von pSUC2T7F1ori.

wäßriger Überstand abgenommen und erneut mit 1 Volumen Phenol geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde die cDNA aus ca. 300 μl Überstand mit 1/50 Vol 5M NaCl, 2,5 Vol Ethanol 100 % und 1 μl Glycogen (Sigma) 1,5 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht ausgefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Pellets mit je 180 μl 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Die cDNA wurde anschließend in 10 μl 5mM Tris pH 8,0 aufgenommen und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Herstellung der Primärbank in *E. coli*. Der Hefeexpressionsvektor pSUC2T7F1ori (pSUC2T7M13ori, Jacobs et al. 1997, siehe Abbildungen 10.1, A.1) wurde in einem Doppelverdau mit je 2 U *EcoRI*/*XhoI* pro 20 μg Vektor-DNA geschnitten (über Nacht, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) und anschließend mit CIP (Roche) nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Er wurde dann mit der cDNA in verschiedenen Verhältnissen in die Ligationsreaktion eingesetzt, um die Transformationseffizienz zu optimieren. Für die Transformation wurden elektrokompente Zellen des *E. coli*-Stamms DH10B (ElectroMAX, 18290-015, Invitrogen und Elektroporationsküvetten mit 0,1 cm Weite (P410-50, Invitrogen) benutzt. Das effektivste Verhältnis von Vektor:cDNA wurde in einem 10 μl Ansatz zu 1:10 bei 100 ng Vektor, 1,0 μl T4-Ligase und einer angenommenen cDNA-Durchschnittsgröße von 600 bp (19,6 ng) bei Übernacht-Ligation ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) bestimmt. Die Effizienz lag bei $1 \cdot 10^6$ CFU/ μg DNA. Anschließend wurden alle Ligationsansätze vereinigt und mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,2, und 2,5 Vol Ethanol 100 % und 1 μl Glycogen (Sigma) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen wurde die ligierte DNA in ddH₂O auf etwa 100 ng/ μl eingestellt. Jeweils 40 μl *E. coli* Zellen wurden mit 2 μl Ligation elektroporiert und auf LB-Platten (Ampicillin 100 ng/ μl) ausgestrichen. Kontroll-‘colony’-PCRs mit den Oligonukleotiden pSUC2for und pSUC2rev zeigten eine gleichmäßige Verteilung der cDNA-Inserts im 1000 Bp-Bereich an, mit durchschnittlich ca. 570 Bp Länge (Standard-PCR [Punkt 10.5]; Kolonien wurden mit sterilem Zahnstocher angepickt und in den vorbereiteten 25 μl -Reaktionsansatz transferiert; initialer Denaturierungsschritt 5 min $95\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Amplifikation der Primärbank und Transformation des Hefestammes YTK12

Etwa 1×10^5 Primärtransformanten wurden von den Agarplatten abgeschabt und in Flüssigkultur (pro 100 mm Platte 12 ml SOC) für 30 min bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen. Der Titer wurde anschließend zu $1,9 \times 10^8$ CFU bestimmt, d.h. der Amplifikationsfaktor betrug 1900. Aus der Kultur wurde anschließend Plasmid-DNA präpariert und mit je 500 μ l (≈ 178 ng Plasmid) 10×10^8 Hefezellen (YTK12) transformiert (nach Gietz und Woods 2002). Die Hefezellen wurden zu je 300 μ l auf großen Tryptophan-Mangelmedium-Platten (SCTrp⁻) vorsichtig verteilt und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Die maximal erreichte Transformationseffizienz betrug $1,8 \times 10^5$ CFU/ μ g DNA. Für die weitere Selektion auf den *SUC2*⁺-Phänotyp wurden die Hefe-CFU per ‘replica plating’ auf Platten mit Raffinose-Medium (YPR) übertragen und bis zu 7 Tagen bei 30 °C inkubiert. Diese Platten enthielten Antimycin A, welches die Vergärung anderer Substrate verhindert und dadurch Falsch-Positiven vorbeugt. Durchgewachsene Kolonien wurden zur Verifizierung nochmals auf YRP ausgestrichen. Positive Klone wurden erneut auf SCTrp⁻ Platten ausgestrichen und per ‘colony-PCR’ (siehe unten) auf Vektor bzw. Insert überprüft. Zur Lagerung wurden Zellen in Mikrotiterplatten in je 250 μ l SCTrp⁻/15 % Glycerin transferiert und bei -80 °C eingefroren.

Medien:

- YPR: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Raffinose, 2 mg/ml Antimycin A (A-8674 Sigma).
- ‘Synthetic Complete drop out’ Medium ohne Tryptophan (SCTrp⁻: 0,4 % Difco Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids) 1,2 % Glucose, 0,05 % Synthetic Complete Drop Out Mix (alles w/v), pH 5,6.
- Drop Out Mix: 2 g Adenin-Hemisulfat, 2 g Arginin-HCl, 2 g Histidin-HCl, 2 g Isoleucin, 2 g Leucin, 2 g Lysin-HCl, 2 g Methionin, 3 g Phenylalanin, 6 g Homoserin, 2 g Tyrosin, 1,2 g Uracil, 9 g Valin werden gut gemischt; pro 600 ml SCTrp⁻ werden 0,422 g Mixtur zugegeben.

Hefe-‘colony-PCR’ 5 μ l Glycerin-Flüssigkultur wurden mit 20 μ l Lysispuffer (1 % TritonX, 20 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA) 10 min bei 100 °C gekocht, davon 2 μ l in eine 50

μl Standard-PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden pSUC2for und pSUC2rev eingesetzt (Punkt 10.5).

Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (28104, Qiagen) aufgereinigt und je 0,5 μl davon in eine Sequenzierungsreaktion mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (4337449, Applied Biosystems) eingesetzt: 5 pmol 5'cctcgtcattgttctcgttccctt, 2 μl Premix, 1 μl 5xPuffer, ad 10 μl ddH₂O. Programm: 94 °C 5 min; 25 x 96 °C 10 sec, 46 °C 5 sec, 60 °C 4 min. Die Produkte wurden mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer analysiert und der Freeware Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) verarbeitet.

10.14 Sequenzvervollständigung der *hytsr*-Transkripte

Es lagen 4 cDNA-Fragmente mit den Größen 995 Bp (*hytsr1* 5'-Ende), 1948 Bp (*hytsr1* 3'-Ende), 900 Bp (*hytsr2* 5' Ende) und 754 Bp (*hytsr-like*) vor (B. Hobmayer, K. Kuhn). Die Endständigkeit der Transkripte wurde anhand eines kodierten Signalpeptides (5' Ende) bzw. des Poly(A)-Schwanzes erkannt.

Northern-Analyse der *hytsr*-Transkripte:

Eine 'Northern Blotting'-Analyse gegen *hytsr-like* wurde nach dem Protokoll auf der Seite <http://www.bioinformatics.vg/Methods/dignorthernf.htm> mit Digoxigenin-markierten Sonden durchgeführt, um die Größen der Transkript-Fragmente zu bestimmen. Aufgetragen wurde 0,6 μg Poly(A)⁺-RNA (*H. vulgaris*) und 8 μl eines Digoxigenin-markierten RNA-Markers (Roche). Die Prähybridisierung erfolgte in 10 ml Lösung bei 68 °C für 2,5 h; für die Hybridisierung wurde eine komplette Sondenreaktion zugegeben, der Blot über Nacht hybridisiert. Die Antikörperinkubation erfolgte mit 1:10000 verdünntem anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) für 30 min bei Raumtemperatur. Detektiert wurde mit dem ECL-System (Amersham), die Exposition erfolgte 3 h lang. Mit der 'Northern'-Analyse wurden zwei der Fragmente als zu einem Transkript mit der Größe von ca. 7–9 KB (*hytsr1*) gehörend identifiziert. Ein weiteres 5'-Ende gehörte danach zu einem Transkript von ca. 2,8 Kb (*hytsr2*) (Abbildung 10.2, Spuren 2 und 3; [R. Anton]). Eine weitere 'Northern'-Analyse wurde mit einer Sonde gegen das 4. Fragment durchgeführt, diese lieferte 2 Banden von etwa 5 und 6 Kb Länge (*hytsr-like*, Abbildung 10.2, Spur 1).

Herstellung und Verwendung von spezifischer cDNA für die *hytsr1*-Klonierung:

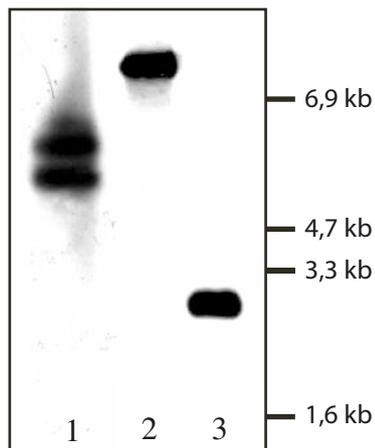


Abbildung 10.2. Northern Blotting-Analyse von *hytsr-like* (1), *hytsr1* (2) und *hytsr2* (3). Das *hytsr-like*-Transkript existiert in 2 Spleißvarianten. Sonden zur Detektion siehe Abschnitt 10.7. Die Zahlen rechts geben den RNA-Größenstandard wieder.

Sequenzspezifische cDNA wurde für die Klonierung von *hytsr1* benutzt: Aus 20 μg Total-RNA aus *H. vulgaris* wurde unter Verwendung von 2 pmol des Oligonukleotids HyThr1 die cDNA bei 55 °C hergestellt (siehe Abschnitt 10.3). Die cDNA wurde 1:5 verdünnt in die PCR-Reaktion eingesetzt.

***hytsr1*-PCR:**

Das *hytsr1*-Transkript wurde per PCR ausgehend von den vorhandenen 5'- und 3'-Endstücken unter Verwendung der *hytsr1*-spezifischen cDNA vervollständigt. PCR-Bedingungen: 0,5 μl cDNA (1:5 verdünnt); 1 mM dNTPs; 1 μl DAP (Goldstar); 1xDAP-Puffer; je 0,4 μM spezifische Oligonukleotide Tsrp1_5'for und Tsrp1_5'rev in einem 50 μl -Ansatz. Programm: 2 min 95 °C, 33 x (30 sec 94 °C, 30 sec 59 °C, 9 min 72 °C), 5 min 72 °C. *hytsr1* umfaßt 9347 bp und codiert für ein Protein aus 3023 Aminosäureresten (in *Hydra vulgaris*, NCBI: CAJ65510). Das PCR-Fragment wurde in den pCR4.0-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und durch 'Primer-Walking' sequenziert. *hytsr2* wurde ausgehend von einem 5'-Fragment per 'sequence walking' mit Hilfe der EST- und Genomdatenbank (*H. maginapapillata*) verlängert; es besteht aus 2897 bp und codiert für 897 Aminosäuren (NCBI: CAJ80765). Das *hytsr-like* 3'-Fragment wurde ebenfalls *in silico* in 5'-Richtung auf 6203 bp (1974 AS) verlängert. Die Nukleotidsequenzen der drei Transkripte und der abgeleiteten Aminosäuresequenz befinden sich im Anhang (A.6, A.7, A.8).

Sequenzierung von *hytsr1*:

Das mittlere PCR-Fragment von *hytsr1* sowie die flankierenden 5'- und 3'-Enden wurden bei der Firma MWG, Eberbach, per 'Primer walking' sequenziert. Dafür wurde jeweils präzipitiertes Plasmid versandt und die folgenden Oligonukleotide so gewählt, das mindestens doppelte Sequenzierung erreicht wurde:

5'-Fragment. M13_uni, T7, SP6. **PCR-Fragment.** vorwärts 5'→3' gtggtgaaggaatttcagc, HyThr5, tggatcaatggggtgcatgg, agacaatgcactaaccttacc, gtctgttgatggtggttttactc, gatggtgctgattgtgttggttctc, caagaagctgttcaaatcctgtac, gtggattaccatgtgttgacacctc; rückwärts 5'→3' gt-

tattacactcagctgtctctg, ctctccatttatggggcagctctc, ggctcaggattgttacataagcgc, taccaccatttgatggcgcagg, catgcactaaattcagaccatggcg, tggctccgctacaaggcagctcc, ctgtctgcttccaaagcaacctgc, atatccgtgttgctgggcag, ggggcactctttgattttacaagc, ggacattgttgaacattgcatgg, ggggcactctttgattttacaagc, ctctccgtgtgcaggtgaagggc, attcagctcctacacaaggtgcccc, gagtccggtaactagttctctgagcc, cattcaacaattttgcatgacttgg. **3'-Fragment.** vorwärts 5'→3' spezifisches vorwärts-Oligonukleotid für pAD-Gal4 2.1-Vektor, gtgggggttggtactcaaactcg, cttgcacgaaaccctacc; rückwärts 5'→3' spezifisches rückwärts-Oligonukleotid für pAD-Gal4 2.1-Vektor.

10.15 Klonierung von *hydkk1/2/4-A*

Ausgehend vom EST taa05h01 (CA303262 und CA301626, dbEST Library ID.14408; *H. magnipapillata* Stamm 105; H. Bode, Irvine, CA) wurde eine 5' RACE-Reaktion ('rapid amplification of cDNA ends') mit cDNA aus *H. vulgaris* Stamm Basel durchgeführt. Die 5' RACE-cDNA wurde aus Poly(A)⁺RNA mit dem 'GeneRacer Kit' (Invitrogen) nach Herstellerangaben hergestellt. Die 1. RACE-PCR wurde unter folgenden Bedingungen im 50 µl-Ansatz durchgeführt: 1 µl cDNA (Reverse Transkriptase-Reaktion); 0,6 µM 5'GeneRacer-Oligonukleotid (Invitrogen); 0,2 µM des Oligonukleotids HyDi5'RACE1; 1 mM dNTPs; 1xPCR-Puffer (Amersham); 0,5 µl taq-Polymerase (Amersham). PCR-Programm: 2 min 94 °C; 5 x (30 sec 94 °C, 1,5 min 72 °C); 5 x (30 sec 94 °C, 30 sec 68 °C, 1,5 min 72 °C); 30 x (30 sec 94 °C, 30 sec 65 °C, 1,5 min 72 °C); 5 min 72 °C. 1 µl dieser Reaktion wurde danach in die 2. RACE-PCR eingesetzt: 0,2 µM 5'nested GeneRacer-Oligonukleotid (Invitrogen); 0,2 µM des Oligonukleotids HyDi5'RACE2; 1 mM dNTPs; 1xPCR-Puffer (Amersham); 0,5 µl taq-Polymerase (Amersham). PCR-Programm: 2 min 94 °C; 30 x (30 sec 94 °C, 30 sec 65 °C, 1,5 min 72 °C); 5 min 72 °C. Das PCR-Produkt von ca. 150 Bp wurde direkt in den pCR4.0-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Vom 5' Ende des so erhaltenen Fragmentes wurde das Oligonukleotid HyDi5'2, und vom 3' Ende des ESTs taa05h01 das Oligonukleotid HyDi3'1 für die Vollängenklonierung abgeleitet. Die anschließende PCR-Reaktion lieferte eine ca. 400 Bp langes Produkt, welches aus dem Agarosegel gepickt und in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert wurde. PCR-Bedingungen: Standardreaktion (siehe Abschnitt 10.5), 'Annealing'-Temperatur 55 °C. Das Insertionsfragment wurde nochmals sequenziert.

Ausgehend vom das 5' Ende umfassenden EST 'SP1' aus dem Signalpeptidselektions-'Screening' wurde das Oligonukleotid 1-B1RACE3' für die 3' RACE aus *H. magnipapillata* Stamm sf-1 abgeleitet. 3' RACE-cDNA dieses Stammes wurde ebenfalls mit dem 'GeneRacer Kit' (Invitrogen) nach Herstellerangaben hergestellt. Es wurde eine RACE-Reaktion unter folgenden Bedingungen im 50 µl-Ansatz durchgeführt: 1 µl cDNA (Reverse Transkriptase-

Reaktion, 1:100); 0,6 μ M 5'GeneRacer-Oligonukleotid (Invitrogen); 0,2 μ M des Oligonukleotids Hydi5'RACE1; 0,5 mM dNTPs; 1xPCR-Puffer (Amersham); 0,25 μ l taq-Polymerase (Amersham). PCR-Programm: 2 min 94 °C; 5 x (30 sec 94 °C, 1 min 72 °C); 5 x (30 sec 94 °C, 30 sec 68 °C, 1 min 72 °C); 30 x (30 sec 94 °C, 30 sec 65 °C, 1 72 °C); 5 min 72 °C. Die größte der so produzierten Banden (etwa 330 Bp) wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mittels Glaswolle eluiert und in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert. Es wurde kein Vollängentranskript aus sf-1 kloniert.

Für die Transfektion der HEK293T-Zellen wurde der ORF ('open reading frame') von *hydkk1/2/4-A* in den pCS2+-Vektor (Rupp et al. 1994; Turner und Weintraub 1994) kloniert. Der ORF wurde mit den Oligonukleotiden HyDkkKozak_Cla und HyDkkpCS_XbaRev aus *H. vulgaris* cDNA amplifiziert. HyDkkKozak_Cla enthielt eine die Kozak-Sequenz vor dem Startcodon. PCR-Bedingungen: Standard-Reaktion mit DAP (Goldstar). Das PCR-Produkt wurde in den pCR4.0-TOPO-Vektor (Invitrogen) zwischenkloniert. Aus diesem wurde es mit den Restriktionsenzymen *Cla*I und *Xba*I herausgeschnitten, auf einem Agarosegel separiert, ausgeschnitten und in den *Cla*I/*Xba*I-verdauten pCS2+ ligiert. Die Fehlerfreiheit von *hydkk1/2/4-A* wurde durch Sequenzierung überprüft.

10.16 Klonierung von *hywnt3a* in den pCS2+-Vektor

Für die Transfektion der HEK293T-Zellen und Injektion in *Xenopus* wurde der ORF von *hywnt3a* in den pCS2+-Vektor (Rupp et al. 1994; Turner und Weintraub 1994) kloniert. Der ORF wurde mit den Oligonukleotiden HyWntKozak_Cla und HyWntpCS_XbaRev aus *H. vulgaris* cDNA amplifiziert; es war eine Reamplifikation aus 1 μ l PCR nötig. HyWntKozak_Cla enthielt eine die Kozak-Sequenz vor dem Startcodon. PCR-Bedingungen: Standard-Reaktion mit DAP (Goldstar). Das Fragment wurde aus 'low melting'-Agarose aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor (Promega) zwischenkloniert. Aus diesem wurde es mit den Restriktionsenzymen *Cla*I und *Xba*I herausgeschnitten, auf einem Agarosegel separiert, ausgeschnitten und in den *Cla*I/*Xba*I-verdauten pCS2+ ligiert. Die Fehlerfreiheit von *hywnt3a* wurde durch Sequenzierung überprüft.

10.17 Semiquantitative PCR-Analyse von *hywnt3a*

Zur Untersuchung der Dynamik der mRNA-Expression von *hywnt3a* bei Verletzung wurden semiquantitative PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde cDNA aus je 20 unverletzten und an der Körpersäule mehrfach verletzten Polypen (*H. magnipapillata*) 30 min nach der

Verwundung hergestellt. Die cDNA-Synthese aus je 433 ng aus Poly(A)⁺-RNA mit einem oligo-dT-Primer erfolgte wie oben beschrieben. Für die PCR-Experimente wurden spezifische Oligonukleotide der Gene *hywnt3a* und *EF1α* (*wnt3a*for/rev und *EF1α*for/rev) verwendet. *EF1α* wird als Haushaltsgen in jeder Zelle und jedem Stadium unverändert exprimiert und eignet sich daher für die Normierung des differentiell exprimierten *hywnt3a*-Transkriptes. Die PCR wurde für beide Transkripte in einem Durchgang durchgeführt unter folgenden Bedingungen im 25 µl Ansatz: 0,5 µl cDNA (1:10 verdünnt); 1 x Puffer; 0,1 µl taq-Polymerase; 2,4 mM Mg²⁺; 0,64 mM dNTPs. Programm: 3 min 94 °C; 25 x (*EF1α*) oder 30 x (*hywnt3a*) (30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C [*EF1α*] oder 60 °C [*hywnt3a*], 30 sec 72 °C).

10.18 Herstellung der Chordin-Konstrukte *hychdlΔNlinker*, *hychdlΔN*, *hychdlΔIGFBP* und *hychdlΔFol*

Alle Konstrukte enthielten das Chordin-Signalpeptid (As 4–37), welches über *Bam*HI und *Cla*I (Oligonukleotide ChdBamHI.b_for und HyChd_SP_rev_myc) in den Expressionsvektor pCS2+MT (Rupp et al. 1994; Turner und Weintraub 1994) N-terminal eines ‘myc-tags’ kloniert war (=pCS2+MT_SP) (Vocke 2004). Die HyChdl-Sequenzbereiche für *hychdlΔNlinker*, *hychdlΔN* und *hychdlΔIGFBP* wurden mit dem ‘rückwärts’-Oligonukleotid HyChd3Xho2 (Rentsch 2001) und den ‘vorwärts’-Oligonukleotiden ChdK4EcoFw, K6forw bzw. ChdK1EcoFw amplifiziert und über die Schnittstellen *Eco*RI und *Xho*I in pCS2+MT_SP C-terminal des ‘myc-tags’ eingefügt. Für *hychdlΔFol* wurde sequentiell kloniert: Zunächst wurde ein mit K5forw1 und K5rev2 amplifiziertes *hychdl*-Fragment via *Eco*RI und *Spe*I in pCS2+MT_SP kloniert (=IGFBP), anschließend wurde in den so entstandenen Vektor das mit K5forw3 und HyChd3Xho2 amplifizierte C-terminale Fragment ohne Follistatin-like-Domäne über *Spe*I und *Xho*I hineinkloniert.

Alle Expressionsplasmide wurden mit *Not*I linearisiert; die mRNA wurde von F. Rentsch hergestellt und in Zebrafisch-Embryonen im 1-2-Zellstadium injiziert im Vergleich mit Wildtyp-*hychdl* (Rentsch et al., Manuskript akzeptiert).

Literatur

- Achermann J, Sugiyama T (1985): Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. X. Morphogenetic potentials of a regeneration-deficient strain (reg-16). *Dev Biol* 107:13–27.
- Adams JC, Tucker RP (2000): The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218:280–299.
- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, Gonzalez-Sancho JM (2006): Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25:4116–4121.
- Aravind L, Koonin EV (1998): A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists—the Dickkopfs. *Curr Biol* 8:477–478. Letter.
- Arendt D, Nubler-Jung K (1997): Dorsal or ventral: similarities in fate maps and gastrulation patterns in annelids, arthropods and chordates. *Mech Dev* 61:7–21. Comparative Study.
- Armbrust EV, Galindo HM (2001): Rapid evolution of a sexual reproduction gene in centric diatoms of the genus *Thalassiosira*. *Appl Environ Microbiol* 67:3501–3513.
- Arora K, Levine MS, O'Connor MB (1994): The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 8:2588–2601.
- Augustin R, Franke A, Khalturin K, Kiko R, Siebert S, Hemmrich G, Bosch TC (2006): Dickkopf related genes are components of the positional value gradient in *Hydra*. *Dev Biol* 296:62 – 70.
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA (2001): Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3:683–686.
- Ball EE, Hayward DC, Saint R, Miller DJ (2004): A simple plan—cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nat Rev Genet* 5:567–577.
- Bangi E, Wharton K (2006): Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *Dev Biol* 295:178–193.
- Berking S (1979): Analysis of head and foot formation in *Hydra* by means of an endogenous inhibitor. *Wilhelm Roux ArchDevBiol* 186:189–210.
- Berking S (2003): A model for budding in *hydra*: pattern formation in concentric rings. *J Theor Biol* 222:37–52.
- Berking S (2006): Principles of branch formation and branch patterning in Hydrozoa. *Int J Dev Biol* 50:123–134.

- Blelloch R, Anna-Arriola SS, Gao D, Li Y, Hodgkin J, Kimble J (1999): The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 216:382–393.
- Bode HR (2003): Head regeneration in Hydra. *Dev Dyn* 226:225–236.
- Bode HR, Heimfeld S, Chow MA, Huang LW (1987): Gland cells arise by differentiation from interstitial cells in *Hydra attenuata*. *Dev Biol* 122:577–585.
- Bode PM, Awad TA, Koizumi O, Nakashima Y, Grimmelikhuijzen CJ, Bode HR (1988): Development of the two-part pattern during regeneration of the head in hydra. *Development* 102:223–235.
- Bode PM, Bode HR (1980): Formation of pattern in regenerating tissue pieces of hydra attenuata. I. Head-body proportion regulation. *Dev Biol* 78:484–496.
- Bode PM, Bode HR (1984): Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. II. Degree of proportion regulation is less in the hypostome and tentacle zone than in the tentacles and basal disc. *Dev Biol* 103:304–312.
- Bode PM, Bode HR (1987): Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. IV. Three processes combine to determine the number of tentacles. *Development* 99:89–98.
- Bornstein P, Devarayalu S, Li P, Distèche CM, Framson P (1991a): A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8636–8640.
- Bornstein P, O'Rourke K, Wikstrom K, Wolf FW, Katz R, Li P, Dixit VM (1991b): A second, expressed thrombospondin gene (Thbs2) exists in the mouse genome. *J Biol Chem* 266:12821–12824.
- Bosch TC, David CN (1986): Immunocompetence in Hydra: Epithelial cells recognize self-nonsel and react against it. *J Exp Zoology* 238:225–234.
- Bosch TC, Fujisawa T (2001): Polyps, peptides and patterning. *Bioessays* 23:420–427.
- Böttger A, Strasser D, Alexandrova O, Levin A, Fischer S, Lasi M, Rudd S, David CN (2006): Genetic screen for signal peptides in Hydra reveals novel secreted proteins and evidence for non-classical protein secretion. *Eur J Cell Biol* 85:9 – 10.
- Brennan K, Gonzalez-Sancho JM, Castelo-Soccio LA, Howe LR, Brown AMC (2004): Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene* 23:4873–4884.
- Brott BK, Sokol SY (2002): Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol* 22:6100–6110.
- Broun M, Bode HR (2002): Characterization of the head organizer in hydra. *Development* 129:875–884.
- Broun M, Gee L, Reinhardt B, Bode HR (2005): Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132:2907–2916.

- Browne E (1909): The production of new hydranths in *Hydra* by the insertion of small grafts. *J Exp Zool* 7:1–24.
- Cadigan KM, Liu YI (2006): Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 119:395–402.
- Campbell RD (1967): Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J Morphol* 121:19–28.
- Campbell RD (1973): Vital marking of single cells in developing tissues: India ink injection to trace tissue movements in hydra. *J Cell Sci* 13:651–661.
- Carlson M, Botstein D (1982): Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28:145 – 54.
- Chamorro M, Schwartz D, Vonica A, Brivanlou A, KR C, HE V (2005): FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* 24:73–84.
- Christian JL (2000): BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go? *Curr Opin Cell Biol* 12:244–249.
- Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina M, Schierwater B (2006): Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst Biol* 55:97–115.
- Cramer von Laue C (2003): *Untersuchungen zur dualen Funktion von β -Catenin im Wnt-Signalweg und der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bei Hydra..* Doktorarbeit, Fachbereich für Biologie, Technische Universität Darmstadt.
- Croce J, Wu S, Byrum C, Xu R, Duloquin L, Wikramanayake A, Gache C, McClay D (2006): A genome-wide survey of the evolutionarily conserved Wnt pathways in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300:121–31.
- Croce JC, McClay DR (2006): The canonical Wnt pathway in embryonic axis polarity. *Semin Cell Dev Biol* 17:168–174.
- Crosier PS, Bardsley A, Horsfield JA, Krassowska AK, Lavallie ER, Collins-Racie LA, Postlethwait JH, Yan YL, McCoy JM, Crosier KE (2001): In situ hybridization screen in zebrafish for the selection of genes encoding secreted proteins. *Dev Dyn* 222:637 – 44.
- Darras S, Nishida H (2001): The BMP signaling pathway is required together with the FGF pathway for notochord induction in the ascidian embryo. *Development* 128:2629–2638.
- David CN (1973): A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Wilhelm Roux Arch EntwMech Org* 171:259–268.
- Davidson E (2001): *Gene Regulatory Systems. Development and Evolution*. Academic Press, San Diego.
- Davis LE (1970): Cell division during dedifferentiation and redifferentiation in the regenerating isolated gastrodermis of *Hydra*. *Exp Cell Res* 60:127–132.

- de Jong D, Hislop N, Hayward D, Reece-Hoyes J, Pontynen P, Ball E, Miller D (2006): Components of both major axial patterning systems of the Bilateria are differentially expressed along the primary axis of a 'radiate' animal, the anthozoan cnidarian *Acropora millepora*. *Dev Biol* 298:632–43.
- De Robertis EM (2006): Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:296–302.
- De Robertis EM, Kuroda H (2004): Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:285–308.
- De Robertis EM, Larrain J, Oelgeschlager M, Wessely O (2000): The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Genet* 1:171–181.
- De Robertis EM, Sasai Y (1996): A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380:37–40.
- Deng M, Templeton TJ, London NR, Bauer C, Schroeder AA, Abrahamsen MS (2002): *Cryptosporidium parvum* genes containing thrombospondin type 1 domains. *Infect Immun* 70:6987–6995.
- Du SJ, Purcel SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT (1995): Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15:2625–34.
- Duboule D, Wilkins AS (1998): The evolution of 'bricolage'. *Trends Genet* 14:54–59.
- Eizinger A, Jungblut B, Sommer RJ (1999): Evolutionary change in the functional specificity of genes. *Trends Genet* 15:197–202.
- Eldar A, Dorfman R, Weiss D, Ashe H, Shilo BZ, Barkai N (2002): Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning. *Nature* 419:304–308.
- Fedders H, Augustin R, Bosch TCG (2004): A Dickkopf-3-related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan *Hydra*. *Dev Genes Evol* 214:72–80.
- Finnerty JR, Pang K, Burton P, Paulson D, Martindale MQ (2004): Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science* 304:1335–1337.
- Freeman G (1981): The role of polarity in the development of the hydrozoan planula larva. *Roux's Arch Dev Biol* 190:168–184.
- Gamse J, Sive H (2000): Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neurectoderm as a paradigm. *Bioessays* 22:976–986.
- Garcia Abreu J, Coffinier C, Larrain J, Oelgeschlager M, De Robertis EM (2002): Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems. *Gene* 287:39–47.
- Gierer A, Meinhardt H (1972): A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12:30–39.

- Gietz RD, Woods RA (2002): Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350:87 – 96.
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998): Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391:357–362.
- Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A (2005): The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24:1098–1103.
- Gregory CA, Perry AS, Reyes E, Conley A, Gunn WG, Prockop DJ (2005): Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 280:2309–2323.
- Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ (2003): The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 278:28067–28078.
- Grens A, Gee L, Fisher DA, Bode HR (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. Comparative Study.
- Grotewold L, Ruther U (2002a): Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol* 46:943–947.
- Grotewold L, Ruther U (2002b): The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* 21:966–975.
- Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, Holstein TW (2006a): The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 4:7450–7460. Review.
- Guder C, Pinho S, Nacak TG, Schmidt HA, Hobmayer B, Niehrs C, Holstein TW (2006b): An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Development* 133:901–911.
- Han G, Li AG, Liang YY, Owens P, He W, Lu S, Yoshimatsu Y, Wang D, Ten Dijke P, Lin X, Wang XJ (2006): Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development. *Dev Cell* 11:301–312.
- Hansen GN, Williamson M, Grimmelikhuijzen CJ (2000): Two-color double-labeling in situ hybridization of whole-mount Hydra using RNA probes for five different Hydra neuropeptide prohormones: evidence for colocalization. *Cell Tissue Res* 301:245–253.
- Harafuji N, Takahashi T, Hatta M, Tezuka H, Morishita F, Matsushima O, Fujisawa T (2001): Enhancement of foot formation in Hydra by a novel epithelipeptide, Hym-323. *Development* 128:437–446.
- Harland R, Gerhart J (1997): Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:611–667.

- Hashimoto H, Itoh M, Yamanaka Y, Yamashita S, Shimizu T, Solnica-Krezel L, Hibi M, Hirano T (2000): Zebrafish *Dkk1* functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Dev Biol* 217:138–152.
- Hassel M, Albert K, Hofheinz S (1993): Pattern formation in *Hydra vulgaris* is controlled by lithium-sensitive processes. *Dev Biol* 156:362–371.
- Hayward DC, Samuel G, Pontynen PC, Catmull J, Saint R, Miller DJ, Ball EE (2002): Localized expression of a *dpp/BMP2/4* ortholog in a coral embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8106–8111.
- Hellstern S, Stetefeld J, Fauser C, Lustig A, Engel J, Holstein TW, Ozbek S (2006): Structure/function analysis of spinalin, a spine protein of *Hydra* nematocysts. *FEBS J* 273:3230–3237.
- Hermoso J, Pignol D, Penel S, Roth M, Chapus C, Fontecilla-Camps JC (1997): Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle. *EMBO J* 16:5531–5536.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW (2000): WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407:186–189.
- Hoffmeister SA (1996): Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from *Hydra vulgaris*. *Development* 122:1941–1948.
- Holstein TW, David CN (1990): Cell cycle length, cell size, and proliferation rate in *hydra* stem cells. *Dev Biol* 142:392–400.
- Holstein TW, Hobmayer E, Technau U (2003): Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev Dyn* 226:257–267.
- Hosono M, Kawauchi H, Nitta K, Takayanagi Y, Shiokawa H, Mineki R, Murayama K (1993): Purification and characterization of *Silurus asotus* (catfish) roe lectin. *Biol Pharm Bull* 16:1–5.
- Howes R, Bray S (2000): Pattern formation: Wingless on the move. *Curr Biol* 10:222–226.
- Huang X (1992): A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics* 14:18 – 25.
- Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kriz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, Stover J, Williamson MJ, McCoy JM (1997): A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene* 198:1 – 2.
- Kaiser CA, Preuss D, Grisafi P, Botstein D (1987): Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. *Science* 235:312 – 7.
- Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Marti M, Dubova I, Izpisua Belmonte J (2006): Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev* JOURNAL ARTICLE.

- Kawano Y, Kypta R (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116:2627–2634.
- Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W (2004): R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 7:525–534.
- Kazanskaya O, Glinka A, Niehrs C (2000): The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127:4981–4992.
- Kelly C, Chin AJ, Leatherman JL, Kozlowski DJ, Weinberg ES (2000): Maternally controlled (beta)-catenin-mediated signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Development* 127:3899–3911.
- Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, Abo A, Tomizuka K, Funk WD (2006): R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* 5:23–26.
- Kim L, Harwood A, Kimmel AR (2002): Receptor-dependent and tyrosine phosphatase-mediated inhibition of GSK3 regulates cell fate choice. *Dev Cell* 3:523–532.
- Klein RD, Gu Q, Goddard A, Rosenthal A (1996): Selection for genes encoding secreted proteins and receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7108 – 13.
- Kobatake E, Sugiyama T (1989): Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XIX. Stimulation of regeneration by injury in the regeneration-deficient mutant strain, reg-16. *Development* 105:521–528.
- Koch AW, Holstein TW, Mala C, Kurz E, Engel J, David CN (1998): Spinalin, a new glycine- and histidine-rich protein in spines of *Hydra nematocysts*. *J Cell Sci* 111:1545–1554.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997): Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275:1784–1787.
- Kourakis MJ, Smith WC (2005): Did the first chordates organize without the organizer? *Trends Genet* 21:506–510.
- Krause A (2005): *Charakterisierung von Gremlin-ähnlichen Molekülen in Hydra magnipapillata*. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt.
- Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA (1999): Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238:301–313.
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW (2005): Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433:156–160.

- Kuznetsov SG, Anton-Erxleben F, Bosch TCG (2002): Epithelial interactions in Hydra: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *J Exp Biol* 205:3809–3817.
- Larrain J, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S, De Robertis EM (2000): BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* 127:821–830.
- Lawler J (2002): Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 6:1–12.
- Lee PN, Pang K, Matus DQ, Martindale MQ (2006): A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Semin Cell Dev Biol* 17:157–167.
- Lee YN, Kang JS, Krauss RS (2001): Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation by signal sequence trapping in yeast. *Mol Cell Biol* 21:7696 – 706.
- Li L, Mao J, Sun L, Liu W, Wu D (2002): Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem* 277:5977–5981.
- Littlefield CL (1986): Sex determination in hydra: control by a subpopulation of interstitial cells in Hydra oligactis males. *Dev Biol* 117:428–434.
- Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A (1999): Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 22:361–365.
- Logan CY, Miller JR, Ferkowicz MJ, McClay DR (1999): Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Development* 126:345–357.
- Lowe CJ, Terasaki M, Wu M, Freeman RMJ, Runft L, Kwan K, Haigo S, Aronowicz J, Lander E, Gruber C, Smith M, Kirschner M, Gerhart J (2006): Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS Biol* 4:e291.
- Mackie G (1990): The Elementary Nervous System Revisited. *Amer Zool* 30:907–920. From the Plenary Session on Organismal System: Animals and Behavior presented at the Centennial Meeting of the American Society of Zoologists, 27–30 December 1989, at Boston, Massachusetts.
- MacWilliams HK (1982): Numerical simulations of hydra head regeneration using a proportion-regulating version of the Gierer-Meinhardt model. *J Theor Biol* 99:681–703.
- MacWilliams HK (1983a): Hydra transplantation phenomena and the mechanism of hydra head regeneration. I. Properties of the head inhibition. *Dev Biol* 96:217–238.
- MacWilliams HK (1983b): Hydra transplantation phenomena and the mechanism of Hydra head regeneration. II. Properties of the head activation. *Dev Biol* 96:239–257.
- Mao B, Niehrs C (2003): Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302:179–183.

- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002): Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417:664–667.
- Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001a): LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321–325.
- Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001b): LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321–325.
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GHR, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D (2001c): Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7:801–809.
- Marcum BA, Campbell RD (1978): Development of Hydra lacking nerve and interstitial cells. *J Cell Sci* 29:17–33.
- Martin VJ, Littlefield CL, Archer WE, Bode HR (1997): Embryogenesis in hydra. *Biol Bull* 192:345–363.
- Martinez DE, Dirksen ML, Bode PM, Jamrich M, Steele RE, Bode HR (1997): Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Dev Biol* 192:523–536.
- Matus DQ, Pang K, Marlow H, Dunn CW, Thomsen GH, Martindale MQ (2006a): Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11195–11200.
- Matus DQ, Thomsen GH, Martindale MQ (2006b): Dorso/ventral genes are asymmetrically expressed and involved in germ-layer demarcation during cnidarian gastrulation. *Curr Biol* 16:499–505.
- Maurange C, Lee N, Paro R (2006): Signaling meets chromatin during tissue regeneration in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev* 16:485–489.
- 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, Gierer A (2000): Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* 22:753–760.
- Miao WM, Seng WL, Duquette M, Lawler P, Laus C, Lawler J (2001): Thrombospondin-1 type 1 repeat recombinant proteins inhibit tumor growth through transforming growth factor-beta-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 61:7830–7839.
- Miljkovic-Licina M, Gauchat D, Galliot B (2003): Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *Biosystems* 76:75–87.
- Miller MA, Technau U, Smith KM, Steele RE (2000): Oocyte development in Hydra involves selection from competent precursor cells. *Dev Biol* 224:326–338.

- Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J, Fraser S (1993): Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* 119:97–111.
- Moussian B, Uv AE (2005): An ancient control of epithelial barrier formation and wound healing. *Bioessays* 27:987–990.
- Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Belmonte JC, Westphal H (2001): Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 1:423–434.
- Müller WA (1995): Competition for factors and cellular resources as a principle of pattern formation in Hydra. I. Increase of the potentials for head and bud formation and rescue of the regeneration-deficient mutant reg-16 by treatment with diacylglycerol and arachidonic acid. *Dev Biol* 167:159–174.
- Müller WA (1996): Head formation at the basal end and mirror-image pattern duplication in *Hydra vulgaris*. *Int J Dev Biol* 40:1119–1131.
- Müller WA, Teo R, Mohrlen F (2004): Patterning a multi-headed mutant in *Hydractinia*: enhancement of head formation and its phenotypic normalization. *Int J Dev Biol* 48:9–15.
- Nacak T (2004): Charakterisierung von Signalmolekülen während der Kopfregeneration in *Hydra vulgaris*.
- Naitza S, Spano F, Robson KJ, Crisanti A (1998): The Thrombospondin-related Protein Family of Apicomplexan Parasites: The Gears of the Cell Invasion Machinery. *Parasitol Today* 14:479–484.
- Newman SA (1974): The interaction of the organizing regions in hydra and its possible relation to the role of the cut end in regeneration. *J Embryol Exp Morphol* 31:541–555.
- Nichols SA, Dirks W, Pearse JS, King N (2006): Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12451–12456.
- Niehrs C (2006): Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25:7469–7481.
- Niehrs C, Pollet N (1999): Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* 402:483–487.
- Nishimiya C, Wanek N, Sugiyama T (1986): Genetic Analysis of Developmental Mechanisms in Hydra. XIV. Identification of the Cell Lineages Responsible for the Altered Developmental Gradients in a Mutant Strain, reg-16. *Dev Biol* 115:469–478.
- Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, Cho KW (2000): Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403:781–785.
- Nolan KF, Kaluz S, Higgins JM, Goundis D, Reid KB (1992): Characterization of the human perporin gene. *Biochem J* 287:291–297.

- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.
- Odelberg SJ (2005): Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat* 287:25–35.
- O’Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002): Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl:121–131.
- Otto JJ, Campbell RD (1977): Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. *J Exp Zool* 200:417–428.
- Ozeki Y, Matsui T, Suzuki M, Titani K (1991): Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. *Biochemistry* 30:2391–2394.
- Pandur P, Maurus D, Kuhl M (2002): Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays* 24:881–884.
- Patthy L (1987): Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Lett* 214:1–7.
- Philipp I, Holstein TW, Hobmayer B (2005): HvJNK, a *Hydra* member of the c-Jun NH2-terminal kinase gene family, is expressed during nematocyte differentiation. *Gene Expr Patterns* 5:397–402.
- Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM (1999): The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397:707–710.
- Pires-daSilva A, Sommer RJ (2003): The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet* 4:39–49.
- Plickert G, Jacoby V, Frank U, Muller WA, Mokady O (2006): Wnt signaling in hydroid development: formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent patterning. *Dev Biol* 298:368–378.
- Ramet M, Lanot R, Zachary D, Manfruelli P (2002): JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* 241:145–156.
- Reber-Müller S, Streitwolf-Engel R, Yanze N, Schmid V, Stierwald M, Erb M, Seipel K (2006): BMP2/4 and BMP5-8 in jellyfish development and transdifferentiation. *Int J Dev Biol* 50:377–384.
- Reinhardt B, Broun M, Blitz IL, Bode HR (2004): HyBMP5-8b, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in *hydra*. *Dev Biol* 267:43–59.
- Rentzsch F (2001): Achsenbildung in Cnidariern: Die Rolle der Wnt- und BMP/Chordin Signaltransduktionswege.

- Rentzsch F, Anton R, Saina M, Hammerschmidt M, Holstein TW, Technau U (2006): Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning. *Dev Biol* 296:375–387.
- Rentzsch F, Guder C, Vocke D, Hobmayer B, Holstein W (k.A.): An ancient chordin-like gene in organizer formation of Hydra. Akzeptiert.
- Rentzsch F, Hobmayer B, Holstein TW (2005): Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in Hydra gametogenesis. *Dev Biol* 278:1–12.
- Robold AV, Hardham AR (2005): During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Curr Genet* 47:307–315.
- Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P (2002): Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 59:1872–1891.
- Rose PG, Burnett AL (1968a): An Electron Microscopic and Histochemical Study of the Secretory Cells in *Hydra viridis*. *Wilhelm Roux Archiv* 161:281–297.
- Rose PG, Burnett AL (1968b): An Electron Microscopic and Radioautographic Study of Hypostomal Regeneration in *Hydra viridis*. *Wilhelm Roux Archiv* 161:298–318.
- Rose PG, Burnett AL (1970): The Origin of Mucous Cells in *Hydra viridis*. II. Mid-Gastric Regeneration and Budding. *Wilhelm Roux Archiv* 165:177–191.
- Rubin DI, Bode HR (1982a): Both the epithelial cells and the nerve cells are involved in the head inhibition properties in *Hydra attenuata*. *Dev Biol* 89:332–338.
- Rubin DI, Bode HR (1982b): The aberrant, a morphological mutant of *Hydra attenuata*, has altered inhibition properties. *Dev Biol* 89:316–331.
- Rupp RA, Snider L, Weintraub H (1994): *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev* 8:1311–1323.
- Saint Hillaire E (1822): Considérations générales sur la vertèbre. *MemMusHistNat* 9:89–119.
- Sambrook J, Russell D (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd labmn edition Auflage.
- Samuel G, Miller D, Saint R (2001): Conservation of a DPP/BMP signaling pathway in the nonbilateral cnidarian *Acropora millepora*. *Evol Dev* 3:241–250.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM (1995): Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 377:757. Published Erratum.
- Schiliro DM, Forman BJ, Javois LC (1999): Interactions between the foot and bud patterning systems in *Hydra vulgaris*. *Dev Biol* 209:399–408.
- Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A (2002): TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18:502–504.

- Schmidt T, David CN (1986): Gland cells in Hydra: cell cycle kinetics and development. *J Cell Sci* 85:197–215.
- Schneider VA, Mercola M (2001a): Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15:304–315.
- Schneider VA, Mercola M (2001b): Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15:304–315.
- Schulte-Merker S, Lee KJ, McMahon AP, Hammerschmidt M (1997): The zebrafish organizer requires chordino. *Nature* 387:862–863. Letter.
- Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Krutzsch HC, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE (1995): Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem* 270:7304–7310.
- Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE (1993): Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 122:923–932. In Vitro.
- Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X (2001): Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11:951–961.
- Shenk MA, Bode HR, Steele RE (1993): Expression of Cnox-2, a HOM/HOX homeobox gene in hydra, is correlated with axial pattern formation. *Development* 117:657–667.
- Shimizu H, Sawada Y, Sugiyama T (1993): Minimum tissue size required for hydra regeneration. *Dev Biol* 155:287–296.
- Shimizu H, Sugiyama T (1993): Suppression of head regeneration by accelerated wound healing in hydra. *Dev Biol* 160:504–511.
- Shimizu H, Zhang X, Zhang J, Leontovich A, Fei K, Yan L, Sarras MPJ (2002): Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development* 129:1521–1532.
- Shinya M, Eschbach C, Clark M, Lehrach H, Furutani-Seiki M (2000): Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* 98:3–17.
- Shu DG, Morris SC, Han J, Li Y, Zhang XL, Hua H, Zhang ZF, Liu JN, Guo JF, Yao Y, Yasui K (2006): Lower Cambrian vendobionts from China and early diploblast evolution. *Science* 312:731–734.
- Sick S, Reinker S, Timmer J, Schlake T (2006): WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science* 314:1447–1450.
- Siebert S, Thomsen S, Reimer MM, Bosch TCG (2005): Control of foot differentiation in Hydra: phylogenetic footprinting indicates interaction of head, bud and foot patterning systems. *Mech Dev* 122:998–1007.
- Smith KM, Gee L, Bode HR (2000): HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in hydra. *Development* 127:4743–4752.

- Spemann H (1938): *Embryonic Development and Induction*. New Haven, CT: Yale University Press.
- Steele RE (2002): Developmental signaling in Hydra: what does it take to build a "simple" animal? *Dev Biol* 248:199–219.
- Stern CD, Herausgeber (2004): *Gastrulation*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sugiyama T, Fujisawa T (1977): Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. III. Characterization of a regeneration deficient strain. *J Embryol Exp Morphol* 42:65–77.
- Sugiyama T, Fujisawa T (1978a): Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra. II. Isolation and characterization of an interstitial cell-deficient strain. *J Cell Sci* 29:35–52.
- Sugiyama T, Fujisawa T (1978b): Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. V. Cell lineage and development of chimera hydra. *J Cell Sci* 32:215–232.
- Sugiyama T, Wanek N (1993): Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XXI. Enhancement of regeneration in a regeneration-deficient mutant strain by the elimination of the interstitial cell lineage. *Dev Biol* 160:64–72.
- Suzuki Y, Makino A, Mae T (2001): An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. *J Exp Bot* 52:1575–1579.
- Takahashi T, Muneoka Y, Lohmann J, Lopez de Haro MS, Solleder G, Bosch TC, David CN, Bode HR, 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.
- Tasiemski A, Vandenbulcke F, Mitta G, Lemoine J, Lefebvre C, Sautiere PE, Salzet M (2004): Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *J Biol Chem* 279:30973–30982.
- Technau U, Holstein TW (1995): Head formation in Hydra is different at apical and basal levels. *Development* 121:1273–1282.
- Technau U, Miller MA, Bridge D, Steele RE (2003): Arrested apoptosis of nurse cells during Hydra oogenesis and embryogenesis. *Dev Biol* 260:191–206.
- Technau U, Rudd S, Maxwell P, Gordon PMK, Saina M, Grasso LC, Hayward DC, Sensen CW, Saint R, Holstein TW, Ball EE, Miller DJ (2005): Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends Genet* 21:633–639.
- Thorpe CJ, Schlesinger A, Carter JC, Bowerman B (1997): Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* 90:695–705.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N (1993): Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122:497–511.
- Tucker RP (2004): The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 36:969–974.

- Turing A (1952): The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 327:37–72.
- Turner DL, Weintraub H (1994): Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8:1434–1447.
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251–337.
- van der Zee M, Stockhammer O, von Levetzow C, Nunes da Fonseca R, Roth S (2006): Sog/Chordin is required for ventral-to-dorsal Dpp/BMP transport and head formation in a short germ insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16307–16312.
- Vinh LS, Von Haeseler A (2004): IQPNNI: moving fast through tree space and stopping in time. *Mol Biol Evol* 21:1565–1571.
- Vocke D (2004): *Funktionale Charakterisierung von Hydra-Chordin zur Vorbereitung von Injektionsexperimenten und Protein-Interaktionsstudien mittels Blau-Nativer-PAGE*. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt.
- von Bubnoff A, Cho KW (2001): Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* 239:1–14.
- Walton K, Croce J, Glenn T, Wu S, McClay D (2006): Genomics and expression profiles of the Hedgehog and Notch signaling pathways in sea urchin development. *Dev Biol* 153–64.
- Whittaker CA, Hynes RO (2002): Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 13:3369–3387.
- Wolda SL, Moody CJ, Moon RT (1993): Overlapping expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in neural tissue of *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 155:46–57.
- Wolf F, Eddy R, Shows T, Dixit V (1990): Structure and Chromosomal Localization of the Human Thrombospondin Gene. *Genomics* 6:685–691.
- Wolpert L (1969): Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *Journal of Theoretical Biology* 25:1–47.
- Wolpert L (2002): *Principles of development*. New York: Oxford University Press., 2nd ed Auflage.
- Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C (2000): Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr Biol* 10:1611–1614.
- Yamamoto Y, Oelgeschlager M (2004): Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development. *Naturwissenschaften* 91:519–534.
- Znidaric D, Lui A (1969): Dedifferentiation of Gland Cells in Hydra and Further Development of Interstitial Cells Arising from them. *Wilhelm Roux Archive* 162:374–383.

Znidaric D, Lui A, Kalafatic M (1980): Elimination of zymogen cells and their derivatives in Hydra. *Z Mikrosk Anat Forsch* 94:179–187.

Teil V

Anhang

A Anhang

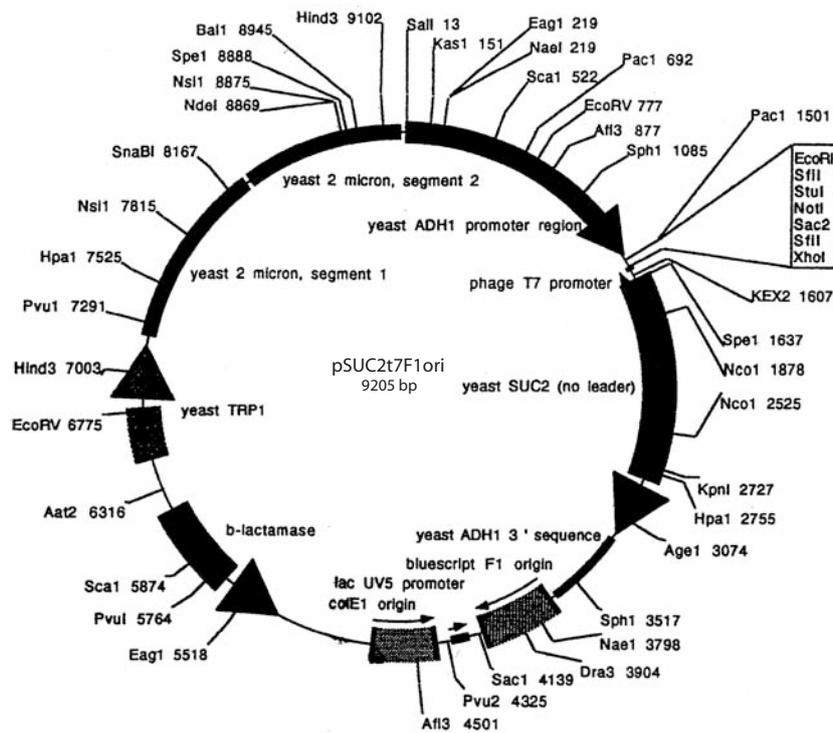


Abbildung A.1. Der Hefeexpressionsvektor pSUC2T7F1ori für die Herstellung der organisatorspezifischen cDNA-Bibliothek



Construction of a normalized cDNA library from *Hydra*

1 Material supplied

Hydra total RNA (0,7 µg/µL) in water, delivered on dry ice.

2 RNA

After a cleanup on RNeasy spin columns (Qiagen) that included an on-column DNase treatment, the total RNA was analyzed for its integrity by denaturing agarose gel electrophoresis (see Fig. 1).

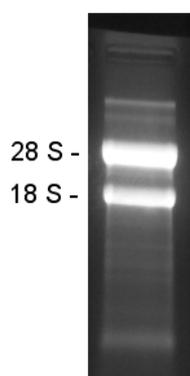


Fig. 1: Analysis of total RNA from *Hydra* (2.5 µg) on a 1.2 % denaturing agarose gel.

Prior to cDNA synthesis, RT-PCR was performed with 250 ng of *Hydra* total RNA in the presence and absence of reverse transcriptase, the latter to test whether genomic DNA has been removed from the RNA sample. RT-PCR was carried out with a primer pair that generates a 165 bp fragment of the EF1 gene. The PCR products obtained after 30 PCR-cycles were analyzed by agarose gel electrophoresis (see Fig. 2).

After 30 PCR-cycles the EF1 fragment is only detectable in the presence but not in the absence of reverse transcriptase, demonstrating that no genomic contamination is present within the RNA sample. For cycle thresholds (C_T -values) see Tab. 1.

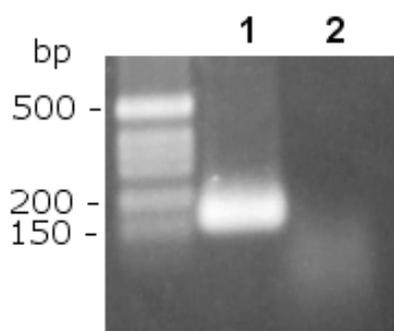


Fig. 2:

RT-PCR (30 cycles) from 250 ng total RNA with (lane 1) and without (lane 2) reverse transcriptase using a primer pair that generates a 165 bp fragment from the *Hydra* EF1 gene.



3 cDNA synthesis

From 2 µg of the total RNA poly A+ RNA was prepared and first-strand cDNA synthesis was performed using an oligo(dT)-*Not*I primer and M-MLV-RNase H⁻ reverse transcriptase. Synthesis of the second strand was carried out with a random primer and Klenow DNA-polymerase. The resulting NO cDNA was amplified with 13 cycles of LA-PCR (Barnes 1994, PNAS 91:2216-2220) (see Fig. 3).

4 Normalization

Normalization was achieved by one cycle of denaturation and reassociation of the cDNA, resulting in N1 cDNA. A Cot-value of approximately 90 was achieved with the N1 cDNA. Reassociated ds cDNA was separated from the remaining ss cDNA (normalized cDNA) by passing the mixture over a hydroxyapatite column. After hydroxyapatite chromatography, the N1 ss cDNA was amplified with 15 LA-PCR cycles (see Fig. 3)

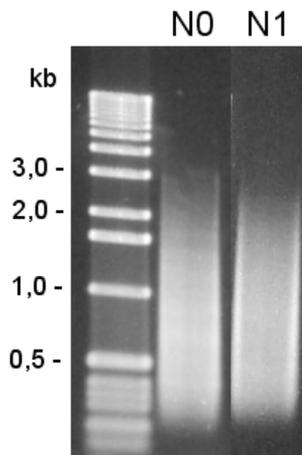


Fig. 3: Agarose gel electrophoresis (1.3 % agarose) of the NO and N1 cDNA from *Hydra* (100 ng each).

5 Cloning

For directional cloning, the N1 cDNA was first subjected to a limited exonuclease treatment to generate *Eco* RI overhangs at the 5' ends and was subsequently cleaved with *Not* I.

Prior to cloning, the N1 cDNA was size fractionated. For that purpose, the cDNA was separated on a 1.3 % agarose gel. Following elution of cDNAs larger than 0.5 kb (see Fig. 4), the cDNA was ligated into *Eco* RI and *Not* I digested pBluescript II SK(+) vector.

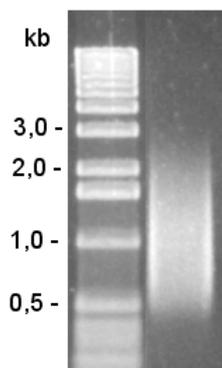


Fig. 4: Size fractionated N1 cDNA from *Hydra* (1.3 % agarose gel).



The following adapter sequences remain attached to the 5' and 3' ends of the cDNAs:

5' end (*Eco* RI site) 5'-GAATTCGTGAGCCAGAGGACGAGACAA-3'
 3' end (*Not* I site) 5'-GCGGCCGC(dT₂₅)-3'

The cDNA inserts can be released from the pBluescript II SK (+) vector by cleavage with *Eco* RI / *Not* I (underlined bases).

Ligations were electroporated into T1 Phage resistant TransforMax™ EC100™ (Epicentre) electro-competent cells. After transformation, glycerol was added to a final concentration of 15 % (v/v) and the cells were frozen at - 70 °C in 8 x 450 µL aliquots. After a freezing thawing cycle, the titer of the library was determined to be about 500 cfu per µL bacterial suspension. In total, a number of 1.8 x 10⁶ recombinant clones was achieved.

6 Quality control

6.1 Quantitative PCR analysis

To analyze the success of the normalization process we performed real time PCR with three gene specific primer pairs amplifying a frequent transcript (EF1 gene, 165 bp) a medium transcript (Tcf gene, 241 bp) and a rare transcript (Wnt gene, 209 bp).

The appearance of the PCR fragments during 30 cycles was monitored for the N0 and N1 cDNA using SYBRgreen fluorescence. The measured C_T values are listed in Tab. 1. The PCR products were checked by agarose gel electrophoresis (not shown).

Tab. 1: Real time PCR analysis of N0 and N1 cDNA

	ng	target gene	length of fragment	C _T value
RNA + RT	250	EF1	165 bp	10.5
RNA - RT	250	EF1	165 bp	no product
N0 cDNA	10	EF1	165 bp	10.6
N0 cDNA	10	Tcf	241 bp	14.5
N0 cDNA	10	Wnt	209 bp	18.2
N1 cDNA	10	EF1	165 bp	15.0
N1 cDNA	10	Tcf	241 bp	14.9
N1 cDNA	10	Wnt	209 bp	15.6

With the EF1 specific primers the C_T-values of the RNA +RT sample and the N0 sample are identical. Assuming a 100 % transcription of the mRNA into cDNA during the RT step, it can be estimated that the mRNA fraction within the 250 ng total RNA is about equal to the cDNA amount present in the N0 sample (10 ng). 10 ng mRNA are 4 % of 250 ng total RNA. According to the literature, 1 - 5 % of total RNA is mRNA. Therefore it can be concluded that the mRNA was successfully transcribed into N0 cDNA.



For the EF1 fragment a C_T -value difference of about 5 between the N0 and the N1 cDNA was obtained which approximately corresponds to a 30-fold reduction of the EF1 cDNA concentration. In the N1 cDNA all three genes exhibit C_T values of about 15 indicating that they are now equally represented in the library.

6.2 Single colony PCR of N1 cDNA

With 48 randomly chosen clones, colony PCR analysis was performed (Fig. 5). The PCR reactions were carried out with vector specific primers that bind 200 bp upstream and 200 bp downstream from the multiple cloning site. Therefore, each fragment contains the insert specific sequence plus additional 400 bp.

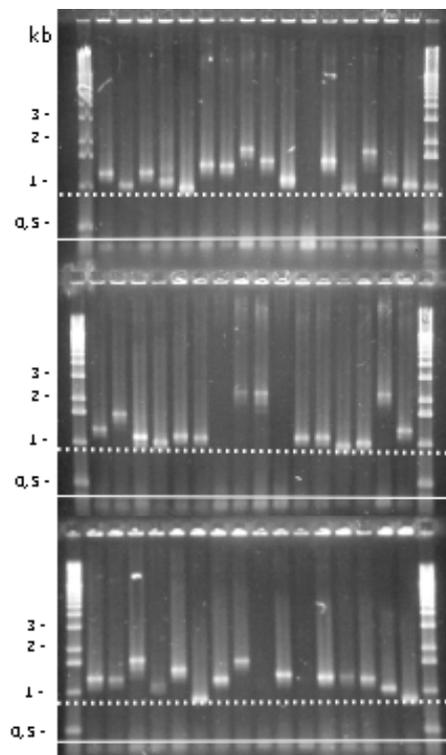


Fig. 5: Colony PCR analysis. PCR products were run on a 1.5 % agarose gel. The solid lines mark the position of PCR fragments obtained from plasmids without insert. The dotted lines represent cDNA inserts of 500 bp.

Tab. 2: Statistical evaluation of colony PCR

Insert size	Number	Percent
< 500 bp	0	0
≥ 500 bp	43	90
≥ 1.000 bp	13	27
no product	5	10
without insert	0	0



6.3 Whole library PCR of N1 cDNA

To get a comprehensive impression on the distribution of the insert sizes within the library, about 1 000 colonies grown overnight on a Petri dish were suspended in water. An aliquot of the bacterial suspension was used for PCR in the presence of a pair of oligonucleotides that bind to the T3 and T7 promoter of the pBluescript II SK(+) vector. Therefore, together with the insert, 127 bp of plasmid DNA are co-amplified.

The PCR products obtained after 17 cycles were analyzed on a 1.3 % agarose gel (Fig. 6).

Fig. 6 shows that the obtained PCR products very well reflect the size distribution of the fractionated N2 cDNA (see Fig. 2) used for cloning.

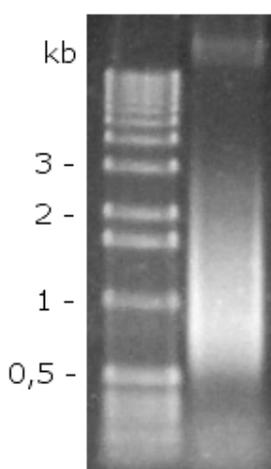


Fig. 6: PCR amplification of cDNA inserts from plasmids of about 1.000 colonies of the normalized library. PCR products were run on a 1.3 % agarose gel.

7 Bioinformatic analyses

288 (3 x 96) randomly selected clones from the N1 library were picked and DNA was prepared. All of these clones were sequenced with the M13FP primer (resulting in 5' sequence) and one 96 well plate was sequenced with the M13RP primer (3' sequence), in addition. After quality and vector trimming, 319 out of 384 sequences were of high quality and could be analyzed. The average read length is 607 bp.

The sequences were clustered in SeqMan and the resulting 253 contigs were blasted against the GenBank nucleotide and protein databases as well as a database of contaminating sequences (containing the *E. coli* genome as well as *Nematostella* mitochondrial sequences). The results are shown in Tab. 3.

Tab. 3: Blast results

	BlastN search	BlastX search	Contam search
hits	28 (11.1 %)	136 (53.8 %)	0 (0 %)
no hits	225 (88.9 %)	117 (46.2 %)	253 (100 %)



To evaluate the redundancy of the library, 243 5' reads were clustered. The result is shown in Tab. 4.

Tab. 4: Clustering of 5' reads

Reads per cluster	Number of clusters
1	229 (97.4 %)
2	4 (1.7 %)
3	2 (0.9 %)

Liganden**Hormone**

- Hma.725 , weakly similar to NP_112250.1 thyroglobulin [Rattus norvegicus]
 Hma.1500 Hym-176 preprohormone
 Hma.3139 LWamid- and MWamid-containing preprohormone
 Hma.4142 Hym-355 preprohormone

Neuropeptide

- Hma.861 Neuropeptide precursor, 1303bp
 Hma.3139 LWamid- and MWamid-containing preprohormone
 Hma.1255 Neuropeptide precursor, 558bp
 Hma.3002 Neuropeptide precursor, 628bp
 Hma.1014 , moderately similar to XP_511114.1 PREDICTED: similar to GABA(A) receptor-associated protein like 2; ganglioside expression factor 2 [Pan troglodytes]

Wachstumsfaktoren

- Hma.4891 , weakly similar to NP_649865.1 CG18005-PA [Drosophila melanogaster] ; RED protein, cytokine
 Hma.4452 , weakly similar to XP_516671.1 PREDICTED: similar to OCC1 [Pan troglodytes] ; follistatin-related protein
 Hma.4970 , weakly similar to NP_501754.1 egg laying defective family member (egl-20) [Caenorhabditis elegans] ; Wnt5
 Hma.703 , weakly similar to XP_526136.1 PREDICTED: similar to wingless-related MMTV integration site 7A; postaxial hemimelia [Pan troglodytes] ; wnt-4
 Hma.5779 , weakly similar to cPREDICTED: similar to HAH-P [Pan troglodytes], epidermal growth factor receptor
 Hma.4681 , weakly similar to NP_033885.2 bone morphogenetic protein 1 [Mus musculus]
 Hma.5067 , weakly similar to NP_031952.1 small inducible cytokine subfamily E, member 1 [Mus musculus]
 Hma.5162 , weakly similar to NP_004506.2 interleukin enhancer binding factor 2; nuclear factor of activated T-cells, 45-kDa [Homo sapiens]
 Hma.4886 , weakly similar to NP_032259.1 hepatoma-derived growth factor-related protein 2 [Mus musculus]
 Hma.3650 , weakly similar to XP_418095.1 PREDICTED: similar to WNT-3 proto-oncogene protein precursor [Gallus gallus]
 Hma.4506 , weakly similar to NP_116020.1 hepatoma-derived growth factor 2 [Homo sapiens]
 Hma.2788 , weakly similar to XP_513634.1 PREDICTED: similar to member 2B isoform WNT-2B1; XWNT2 [Xenopus]
 Hma.2055 , weakly similar to XP_508375.1 PREDICTED: similar to apoptosis inhibitor 5; API5-like 1; fibroblast growth factor 2-interacting factor 2 [Pan troglodytes]
 Hma.3291 , weakly similar to NP_932158.1 nudix-type motif 6 isoform b; antisense basic fibroblast growth factor [Homo sapiens]
 Hma.8674 , weakly similar to XP_527023.1 PREDICTED: similar to WNT8d precursor [Pan troglodytes]
 Hma.6794 , weakly similar to XP_414848.1 PREDICTED: similar to Growth factor, erv1 (S. cerevisiae)-like (augmenter of liver regeneration) [Gallus gallus]
 Hma.2219 , weakly similar to XP_342393.2 PREDICTED: similar to Neurogenic locus notch homolog protein 1 precursor (Notch 1) [Rattus norvegicus]
 Hma.8794 , weakly similar to NP_006123.1 bone morphogenetic protein 1 isoform 4, precursor; PCP; procollagen C-endopeptidase [Homo sapiens]
 Hma.8436 , weakly similar to XP_414466.1 PREDICTED: similar to IK cytokine [Gallus gallus]

Antagonisten

- Hma.4159 Dickkopf-like protein Dlp-2 precursor (hydkk1/2/4-A)
 Hma.3029 Dickkopf-3 related protein
 Hma.1941 Chordin-like protein
 Hma.1699 Dickkopf-like protein Dlp-1 precursor = hydkk1/2/4-C
 Hma.4705 weakly similar to cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1, BMP
 Hma.4672 weakly similar to Gremlin2, Gremlin1, DAN, Cerberus
 Hma.567 weakly similar to NP_005445.1 Cerberus 1, Cerberus-related 1
 Hma.4110 , weakly similar to NP_057525.1 cysteine-rich motor neuron 1; cysteine-rich repeat-containing protein S52 precursor [Homo sapiens], CRIMI

Andere

- Hma.2549 , weakly similar to NP_081629.1 CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2 [Mus musculus]
 Hma.1813 Epithelpeptide HYM-301

Tabelle A.1. Übersicht über die sekretierten Signalmoleküle aus der Darmstadt I EST-Bibliothek. Angegeben sind die originalen UniGene-Einträge mit Cluster-Bezeichnung (Hma.xxxx) und der besten Entsprechung (blastx). In runden Klammern am Ende stehen zusätzliche 'Gene Ontology' (GO) -Einträge zur besseren Erklärung. 'weakly similar' bedeutet eine Ähnlichkeit von <70 %, 'moderately similar' 70-90 % Ähnlichkeit in der alignierten Region.

Rezeptoren**Wachstumsfaktor-abhängige Rezeptoren**

- Hma.2333 , weakly similar to NP_033076.1 ret proto-oncogene [Mus musculus], receptor tyrosine kinase
- Hma.511 , weakly similar to XP_421303.1 PREDICTED: similar to SEL1L [Gallus gallus] Membrane; single-pass type I membrane protein (Notch-Signaltransduktion)
- Hma.41 , weakly similar to NP_990841.1 cck1 protein [Gallus gallus] ; fibroblast growth factor receptor 1
- Hma.8587 , weakly similar to NP_524480.2 CG6383-PA [Drosophila melanogaster]; crumbs
- Hma.5296 , weakly similar to NP_648518.1 CG5906-PA [Drosophila melanogaster] (Rezeptor-Signalprotein-Aktivität)
- Hma.8921 , weakly similar to XP_319612.1 ENSANGP0000013910 [Anopheles gambiae str. PEST] ; Frizzled/Smoothed family membrane region
- Hma.7566 , weakly similar to NP_775960.2 crumbs homolog 2 [Homo sapiens]
- Hma.592 , weakly similar to NP_733403.1 CG12072-PA [Drosophila melanogaster] warts (Rezeptor-Signalprotein-, Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität)
- Hma.3792 , weakly similar to NP_057276.2 transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2; tomoregulin [Homo sapiens]
- Hma.1114 , weakly similar to NP_001005908.1 growth hormone inducible transmembrane protein [Rattus norvegicus]
- Hma.8935 , weakly similar to NP_989577.1 transforming growth factor, beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) [Gallus gallus]
- Hma.8581 , weakly similar to NP_032084.1 frizzled 8 [Mus musculus]
- Hma.4701 , weakly similar to NP_075417.1 fibroblast growth factor receptor 2 isoform 10 precursor: hydroxyaryl-protein kinase; keratinocyte growth factor receptor; protein tyrosine kinase, receptor like 14; EGF receptor; bacteria-expressed kinase; fibroblast growth factor receptor BEK; tyrosylprotein kinase; K-sam protein [Homo sapiens]
- Hma.9176 , weakly similar to NP_001965.3 egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1 [Homo sapiens] (Zelladhäsion, Signaltransduktion)
- Hma.7595 , weakly similar to XP_507889.1 PREDICTED: bone morphogenetic protein receptor, type IA [Pan troglodytes]
- Hma.8070 , weakly similar to NP_002838.1 N polypeptide 2 isoform 1 precursor; protein tyrosine phosphatase receptor pi; tyrosine phosphatase IA-2 beta; phogrin [Homo sapiens] (Zelladhäsion)

Metabolismus

- Hma.2710 , weakly similar to XP_517214.1 PREDICTED: scavenger receptor class B, member 2 [Pan troglodytes], CD36 antigen (collagen type I receptor thrombospondin receptor)-like 1
- Hma.4444 , weakly similar to NP_572563.2 CG12139-PB [Drosophila melanogaster], low-density lipoprotein receptor activity; Very low-density lipoprotein receptor precursor
- Hma.4581 , weakly similar to XP_512323.1 PREDICTED: insulin receptor [Pan troglodytes]
- Hma.2353 , weakly similar to XP_414495.1 PREDICTED: similar to hyaluronan receptor - human [Gallus gallus]
- Hma.8011 , weakly similar to XP_547577.2 PREDICTED: similar to Atrial natriuretic peptide receptor A precursor (ANP-A) (ANPRA) (GC-A) (Ganylate cyclase) [Canis familiaris]
- Hma.1913 , weakly similar to NP_000806.2 gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta [Homo sapiens]

Hormon-Rezeptoren

- Hma.112 , weakly similar to XP_418892.1 PREDICTED: similar to thyroid hormone receptor interactor 13 [Gallus gallus]
- Hma.3543 , weakly similar to XP_533292.1 PREDICTED: similar to progesterone membrane binding protein [Canis familiaris]

Andere

- Hma.2817 , weakly similar to NP_076980.1 leukocyte receptor cluster (LRC) member 5 [Homo sapiens] (Immunabwehr)
- Hma.150 , weakly similar to NP_113782.1 purinergic receptor P2X4 [Rattus norvegicus] (ATP-abhängiger Ionenkanal)
- Hma.6403 , weakly similar to XP_416444.1 PREDICTED: similar to Lipin-beta 1 (Protein tyrosine phosphatase receptor type f polypeptide-interacting protein binding protein 1) (hSCT2) [Gallus gallus] (Zelladhäsion)

Tabelle A.2. Übersicht über die Rezeptormoleküle aus der Darmstadt I EST-Bibliothek. Angegeben sind die originalen UniGene-Einträge mit Cluster-Bezeichnung (Hma.xxxx) und der besten Entsprechung (blastx). In runden Klammern am Ende stehen zusätzliche GO-Einträge zur besseren Erklärung; 'weakly similar' bedeutet eine Ähnlichkeit von <70 %, 'moderately similar' 70–90 % Ähnlichkeit in der alignierten Region.

hydkk1/2/4-A sf-1

```

1           M R F L A V F L V V A A F V A F
1  atttatcaatcATGAGATTTTTAGCAGTCTTTTTAGTTGTAGCTGCATTCGTTGCATTTA
21  S E A G R C N K D A D C E N G C C V N Y
61  GTGAAGCCGGCGTTGCAATAAGGATGCAGACTGCGAAAATGGTTGCTGTGTGAATTACT
41  L L T K Q C N S Y V K E G E L C G F R D
121 TACTTACTAAGCAATGTAATAGCTATGTTAAAGAAGGTGAACTCTGCGGTTTTTCGTGACA
61  K F A C G C E P G L E C V K V R G T L T
181 AATTTGCATGCGGTTGTGAACCAGGACTCGAATGCGTAAAAGTACGAGGAACTTTAACTG
81  G M V R R C V D N S G S G S L Y *
241 GGATGGTCAGAAGATGCGTTGACAATTCAGGAAGTGGATCTTTGTATTAAattaaataca
301 gaaaaaaaaaagataaatttaaaaaagaacaaatatataattcagagtaaattattta
361 aaaaaaaaaaaaaaaaaaagaaa

```

Abbildung A.2. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *hydkk1/2/4-A Stamm sf-1*. Gelb unterlegt=Signalpeptid, hellblau unterlegt=CRD, rot die konservierten Cysteine. Die Sequenz des SP1-Klons aus dem Signalpeptidsekretions-‘Screening’ ist mit einer roten Linie, das 3’ RACE-Oligonukleotid mit einer schwarzen Linie gekennzeichnet. Der senkrechte Pfeil gibt die putative Schnittstelle im Signalpeptid wieder, grüne Buchstaben bezeichnen Veränderungen gegenüber der *H. vulgaris*-Variante.

hydkk3B

```

1                                     M Y D P H R H
1 ccacgcgtccgtttgtatatattgttttttaatattaatatATGTACGACCCACACAGACAC
8 I M F Y I L S T L L I G A L V K T G L A ↓
62 ATAATGTTTTATATACTCTCCACGCTCCTGATCGGAGCGCTGGTCAAACCTGGGTTAGCT

28 T D G E F T L K K D T D E S G S M K V K
122 ACTGATGGAGAATTTACGCTTAAAAAAGATACAGATGAGTCCGGAAGTATGAAAGTAAAG

48 K M I A P G Y Y S Q E C N V H K P C P D
182 AAGATGATTGCCCCGGATATTACTCTCAAGAATGCAACGTTCATAAACCGTGTCTCTGAC

68 P T K Y C H M F L C V D C L K E N V A C
242 CCCACGAAATATTGTCATATGTTTTGTGCGTCGATTGCTTAAAAGAAAACGTTGCTTGC

88 T Q N G Q C C P G T E C T Y G R C K K G
302 ACTCAAAATGGTCAGTGTGGCCCTGGAACAGAATGCACGTATGGAAGATGTAAAAAAGGA

108 S S K G A A G T F C D R Q K D C V G P D
362 TCCTCTAAAGGAGCTGCAGGTTACTTTTTGCGATAGACAAAAGATTGCGTTGGTCCGGAT

128 L C C V R E P A I N P V I S I C K P A L
422 TTGTGTTGCGTTCGTGAACCTGCTATTAATCCTGTCATCAGTATTTGTAAGCCTGCGCTT

148 D E H Q T C G P Y N Q F R T V Y I G G T
482 GATGAACATCAAACCTTGTGGACCGTACAACCAATTTAGAACAGTATATATAGGAGGAACA

168 V Q P V C G P C K Q G L V C K Q V G I F
542 GTTCAACCAGTTTGTGGACCTTGTAACAAGGATTAGTTTGCAAACAAGTGGGAATTTTT

188 G V H E I C L P S G G K G K K *
602 GCGTTCATGAGATCTGTTTGCCATCTGGAGGTAAAGGAAAGAAATAAGcaaaggaaaaa

662 gaaaagttcacgaaagcaaagttaaaagctataataaattgaaattagccattccttaa

722 agtacattcaataatatattggaattaacaatactttgaagaaaatttaaagcttcatag

782 tttagttgcatggctaccgagcatgttttttagtaatgtttttttttaaacaattatt

842 aatttatctttatacaacaattgcttacactttgttacgcacaattaaagtagccatta

902 aatataactttgatacttttacaagttaaaactgacttttaacttagaataatcgtgtat

962 caatcta

```

Abbildung A.3. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *hydkk3B*, abgeleitet aus EST- und Genomdatenbank. Gelb unterlegt=Signalpeptid, hellgrün=CRD1, hellblau=CRD2, rot die konservierten Cyseinreste. Der senkrechte Pfeil gibt die putative Schnittstelle im Signalpeptid wieder.

nvdkk1/2/4 EST

```

1   S T R E S L T D A N K V F K Y E C R K D
1   TCTACCAGAGAGAGTCTGACAGATGCGAACAAAGTTTTTAAGTATGAGTGCAGGAAAGAC

21  K Y C G Q G K Y C H R H Y G T C H D V K
61  AAGTATTGCGGGCAAGGAAAATACTGTACAGGCACTACGGAAGTTGCCATGATGTGAAA

41  P L G A H C R R D H V C A A G M E C V F
121 CCTCTGGGAGCGCATTGTGCGCCGGGATCATGTCTGCGCTGCTGGCATGGAGTGCCTTTC

61  G K C R K T I T S G T E G A R C S K D K
181 GGAAAATGCAGGAAAATACTATTACGTCTGGCACCGAAGGAGCTCGGTGTAGCAAGGATAAA

81  E C S A G L C C A P T H G E W I C K K M
241 GAATGCAGCGCAGGACTTTGTTGCGCTCCAACACACGGGGAATGGATCTGCAAGAAGATG

101 L R E N E I C T V P A G G L A Y S V N H
301 CTGCGAGAGAACGAAATTTGCACGGTTCCTCGCGGGTGGACTGGCGTACTCTGTAAACCAC

121 N C P C G E G F V C R K V R S Q H R K K
361 AATTGTCCCTGTGGCGAGGGATTTGTCTGCAGAAAGGTGCGAAGCCAGCATAGGAAAAAA

141 R P M R M L R K E R R C V S T F R *
421 AGGCCCATGAGAATGCTTCGAAAAGAACGGCGTTGTGTGAGTACGTTTAGATGAagacgc

481 catggagaacattacatthttgtaagtgtccaagacacgggtccgtcccgtatctgtgctc

541 atgctcaggggtacgctaaaatatatthttatagatatatthtttttagtaaactttggct

601 acagacaatthttatgtacacaggcacgagaataactcgttcaattataacagaaacagattt

661 aggaaaagtcaaaat

```

Abbildung A.4. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *nvdkk1/2/4*. EST DV082197; das 5' Ende ist nicht vollständig, der Translationsstart fehlt. Hellgrün=CRD1, hellblau=CRD2, rot die konservierten Cysreste.

nvdkk3

```

1   R F V Y G P D D V S Q M I S Q L S L L R
1   CGATTTGTATACGGCCCTGACGACGTGTCACAGATGATTAGTCAGCTCTCGCTGCTCAGA

21  Y R T Q L F R G N E D E C N I N K P C P
61  TACCGCACCCAGCTCTTCCGCGGTAACGAAGACGAGTGTAACATCAACAAGCCGTGCCCA

41  K D Q F C D A H M C R S C L H E S T P C
121 AAGGACCAGTTCTGTGATGCGCACATGTGTGCTCTTGTCTGCACGAGAGTACGCCCTGT

61  H F I G T C C Q G F V C Q Y G Q C T K G
181 CACTTTATCGGAACTTGTGTCAAGGATTTGTGTGTCAATATGGACAATGTACTAAGGGA

81  V K Q G M P G T Y C D K T S E C D E N S
241 GTTAAGCAAGGGATGCCTGGGACTTATTGTGACAAGACTTCTGAATGCGATGAAAACAGC

101 C C V R E L S L S T R N S V C K P M L N
301 TGCTGTGTTCCGGGAGCTATCGTTAAGCACTCGGAATTCGGTTTGTAAGCCAATGCTGAAC

121 E Y E S C G P I N L F H Q V Y T D G R V
361 GAATACGAGTCATGTGGGCCGATTAACCTATTTTCATCAGGTTTATACCGATGGACGTGTA

141 E P V C G P C K Q G L Q C K N V G T K G
421 GAGCCAGTTTGTGGTCCATGTAAACAGGGCTTACAGTGCAAAAATGTTGGGACGAAAGGT

161 L H Y A C L K E N V T *
481 CTCCATTACGCATGTCTCAAGGAAAATGTAACCTTGAgcatagagctcacctacggcaggg

541 ctgaaactccatctacactaacaatcttttggttgacaatTTTTatgtgagaattttacta

601 gtggagaggggagaaaagtaggcaatTTTTatgtggcaactatggtggttgcttaaagtta

661 gcagaattcttttatctcagctatTTTTatTTTTatTTTTatTTTTatTTTTatTTTTt

721 tTTTTtaaaaaaattgtcacacatgaaaaattgccatga

```

Abbildung A.5. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *nvdkk3*. EST DV093058, das 5' Ende ist nicht vollständig, der Translationsstart fehlt. Hellgrün=CRD1, hellblau=CRD2, rot die konservierten Cyseinreste.

Tabelle A.3. Positionen und Phasen der HyTSR1-codierenden Exons. Phasen der Intron-Exon-Grenzen nach (Patthy 1987). UTR='untranslated region'.

Exon Nr.	Motiv	Exon			Phase	
		Position [Bp]	5' Sequenz	3' Sequenz	5'	3'
1		5-100	GTTT (UTR)	TTAG (UTR)		
2		101-210	AAAA (UTR)	AA GG		2
3		211-382	A CAA	T TTG	2	0
4		383-635	GCT T	AAA A	0	1
5	TSR1	636-815	AT GT	CCA A	1	1
6	TSR2	816-986	TA AA	CCA G	1	1
7	TSR3	987-1157	TT GA	CCA G	1	1
8	TSR4	1158-1328	TT AA	CCA A	1	1
9	TSR5	1329-1499	TA AA	CCT G	1	1
10	TSR6	1500-1676	TT GA	CCA A	1	1
11	TSR7	1677-1847	TT GA	CCT G	1	1
12	TSR8	1848-2024	TT GA	CCA A	1	1
13	TSR9	2025-2195	CT AA	CCA G	1	1
14	TSR10	2196-2366	TT CA	CCT G	1	1
15	TSR11	2367-2537	TG GA	CCT G	1	1
16	TSR12	2538-2708	TT GA	CCC A	1	1
17	TSR13	2709-2879	TT AA	ACA C	1	1
18	TSR14	2880-3050	AA TG	CCT G	1	1
19	TSR15	3051-3221	TT AA	CCT A	1	1
20	TSR16	3222-3392	TA AA	CCA C	1	1
21	TSR17	3393-3563	TA AA	CCA G	1	1
22	TSR18	3562-3737	TA AA	CCA G	1	1
23	TSR19	3738-3908	TT AA	CCA G	1	1
24	TSR20	3909-4079	TA AA	CCA A	1	1
25	TSR21	4080-4250	TT AA	CCA G	1	1
26	TSR22	4251-4421	TA AA	CCA G	1	1
27	TSR23	4422-4592	TT AA	CCC A	1	1
28	TSR24	4593-4763	TC AA	CCA A	1	1
29	TSR25	4764-4934	TT GA	CCA G	1	1
30	TSR26	4935-5089	CC AA	CCC A	1	1
31	TSR27	5090-5261	TT AA	CCA G	1	1
32	TSR28	5262-5432	TT AA	GCA A	1	1
33	TSR29	5433-5603	TA AA	CCA A	1	1
34	TSR30	5604-5774	TT GA	CCA G	1	1
35	TSR31	5775-5945	TT AA	CCA G	1	1
36	TSR32	5946-6116	TT AA	CCA G	1	1
37	TSR33	6117-6287	TT GA	CCT G	1	1
38	TSR34	6288-6458	TT GA	CCA G	1	1

Tabelle A.3 – Fortsetzung

Exon Nr.	Motiv	Position [Bp]	Exon		Phase	
			5' Sequenz	3' Sequenz	5'	3'
39	TSR35	6457-6629	TG CA	CCA G	1	1
40	TSR36	6630-6803	TT GA	CCT G	1	1
41	TSR37	6804-6974	TT AA	CCA G	1	1
42	TSR38	6975-7145	TG AA	CCC A	1	1
43	TSR39	7146-7316	TA AA	CCA A	1	1
44	TSR40	7317-7487	TA AA	CCA G	1	1
45	TSR41	7488-7658	TT GA	CCT G	1	1
46	TSR42	7659-7829	TC AA	CCA G	1	1
47	TSR43	7830-8000	TT AA	CCA A	1	1
48	TSR44	8001-8171	TT GA	CCA G	1	1
49	TSR45	8172-8342	TC AA	CCA A	1	1
50	TSR46	8343-8513	TA AA	GCA G	1	1
51	TSR47	8514-8687	TA AA	CCA G	1	1
52	TSR48	8688-8864	TT AA	CCA G	1	1
53	TSR49	8865-9035	TA AA	ACT G	1	1
54	TSR50	9036-9301	AA TG	TAAA (UTR)	1	

Tabelle A.4. Positionen und Phasen der HyTSR-like-codierenden Exons. Phasen der Intron-Exon-Grenzen nach (Patthy 1987).

Exon Nr.	Motiv	Exon			Phase	
		Position [Bp]	5' Sequenz	3' Sequenz	5'	3'
1	TSR1	171-341	TA GT	CCA G	1	1
2	TSR2	342-522	AA TA	CA TC	1	2
3	vWA	523-1124	A GTA	GAA A	2	1
4	TSR3	1125-1306	CT CA	TAC T	1	0
5	TSR4	1307-1469	TCC T	TGT C	0	1
6	TSR5	1470-1646	AA GC	CCT G	1	1
7	TSR6	1647-1835	GA AG	GGT A	1	1
8	TSR7	1836-2005	CA TA	T CCT	1	0
9	TSR8	2006-2181	GGT A	CA GG	0	2
10	TSR9	2182-2368	A GTA	A GGT	2	0
11	TSR10	2369-2541	AAT T	CA GG	0	2
12	TSR11	2542-2715	C ATT	CA GG	2	2
13	TSR12	2716-2903	A ACA	GGT A	2	1
14	TSR13	2904-3077	CT TA	GGT A	1	1
15	TSR14	3078-3249	TT TT	CA GG	1	2
16	TSR15	3250-3436	A GTA	A GGT	2	0
17	TSR16	3437-3607	AAT T	T CCA	0	0
18	TSR17	3608-3783	GGC A	CA GG	0	2
19	TSR18	3784-3971	A ACA	GGT A	2	1
20	TSR19	3972-4145	CT TA	GGT A	1	1
21	TSR20	4146-4317	TT TT	CA GG	1	2
22	TSR21	4318-4507	A GTA	A GGT	2	0
23	TSR22	4508-4680	T TTT	CA GG	0	2
24	TSR23	4681-4855	G GAT	A GGT	2	0
25	TSR24	4856-5026	CAA T	TC CT	0	0
26	TSR25	5027-5206	GGT A	T GGT	0	0
27	TSR26	5207-5390	GTT T	CCA G	0	1
28	TSR27	5391-5561	TA AG	CCA A	1	1
29		5562-5729	AA TC	CAA G	1	1
30		5730-5818	CT TG	A TTA	1	0
31		5819-5998	ATT A	C GGT	0	0
32		5999-6187	TGG A	T AGT	0	0

Abbildung A.6. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *hytsr1*. Gelb=Signalpeptid. Die vertikalen Striche geben den Beginn eines TSR (=Thrombospondin Repeat Typ I) an.

```

1 aaagtttgtttactacggagaataatttgagaagtcatttgaacagaataaaaaagggaagaaacgtaaagggaaatttcaaa
1
91 ttttttagaaaaatttgcgaaatttcttttttcaaatttcttaaaacttcagttaaaATGAAGTATTACTTTCTCAAAGTGGTGGCC
11 S M L T A S L I K G Q G V K Q H V T C E R K F Q K V G C F S
181 TCAATGCTGACAGCTTCATTGATTAAGGACAAGGTGTAAGCAACATGTAACCTGTGAAAGAAAATTTCAAAAAGTTGGATGTTTTTCT
41 Q N K D S L K S E L L I T D R D K S S S S Y D G Y W L D W N
271 CAAAATAAAGATTCCCTAAAATCTGAATTGCTTATAACAGACAGAGACAAGTCCAGCTCGTCATATGATGGATATTGGTTAGATTGGAAT
71 K F D A S L H S L A C R C Y E K A K A K G F E Y F S I R F W
361 AAATTTGATGCCTCTCTACACAGTTGGCTTGTGCTGCTATGAAAAGCTAAAGCTAAAGTTTTGAATATTTTCAATTCGATTTTGG
101 G E C W G G K D Y K V I E N A L K D P K M Q S S E C H S I N
451 GGTGAATGCTGGGGTGGAAAGACTACAAGTTATTGAAAATGCACTAAAGGATCCTAAAATGCAATCAAGTGAATGTCATAGCATCAAC
131 Y K Q C S L S S E T E C A G K A N T E Y V Y T V A D R N Q A
541 TATAACAATGTAGTCTCTCTCAGAGACAGAGTGTGACAGAAAAGCTAATACTGAATATGTATACACCGTTGCTGATAGGAACCAAGCA
161 K N | V D G G Y G P W S S F S Q C S F T C G E G I S A R E R T
631 AAAAATGTTGATGGTGGTTATGGACCATGGCTTCATTTTACAGTGTTCATTTACATGTGGTGAAGGAATTTACAGTAGAGAAAGAACT
191 C T N P I P E G T G F D C E K F G P S T E T K S C K I V E C
721 TGTACGAACCCCAATTCTGAAGAACAGGATTTGATTTGAAAAGTTGGTCCCTCAACAGAAACCAAGTCATGCAAAATTTGTTGAATGT
221 P | I N G G L T E W T E F S D C S V T C G I G F A T K T R Y C
811 CCAATAAATGGTGGGTGACAGAATGGACAGAATTTAGTACTGTTCTGTTACATGTGGTATTGGATTGCTACAAAACCCGTTATTTG
251 T K P P P Q F G G R D C E G N L V E S K S C Q A T E C P | V D
901 ACAAACACCTCCTCAATTTGGTGGGCGTATTGTGAAGGAAATTTAGTTGAAGTAAATCTTGTCAAGCTACAGAATGCCAGTTGAT
281 G S W S D W N D P S V C S A T C G S G H K I K K R L C N N P
991 GGTAGCTGGAGTGATTTGGAATGATCCATCTGTGTGTTCCGCAACATGTGGGTGAGGTCATAAAAATAAAAAGCGTTTATGTAACAACCC
311 K P A F G G K D C V G D A E V T V P C F E T F C P | V N G G W
1081 AAACCTGCATTTGGTGGTAAAGACTGTGTTGGTGATGACAGAAGTTACTGTACCTGTTTTGAAACATTTTGTCCAGTTAATGGCGGTTGG
341 S Q W S G F D D C S K S C G S G L M K R T R E C I D P L P Q
1171 TCACAGTGGTCTGGATTGATGATTTGCTCAAAATCTTGTGGCAGTGGTTAATGAAAAGAACAAGAGAATGCATTGATCCGCTTCCACAA
371 Y G G K Q C V G E V F E T I A C K L K E C P | I N G Q W G A W
1261 TATGGTGGTAAACAATGTGTTGGTGAAGTCTTTGAAACAATGCATGCAAGCTAAAAGAATGTCCAATAAATGGTCAATGGGGTGCATGG
401 S D F K S C S V S C G N G V Q S R S R E C N N P S P P L G G
1351 AGTGATTTTAAATCTTGCAGTGTCTCTTGTGGTAATGGAGTTCAGAGCAGGTCCTCGGAATGCAATAACCCCAAGTCTCCACTAGGTGGA
431 D V C I G D H E D D R P C V L S P C P | V D G G Y T E W S N F
1441 GATGTTTGCATAGGGGATCATGAGGATGACAGACCTTGTGTTCTCTCCATGTCCTGTTGATGGGGTTACACAGAATGGTCGAATTTT
461 D T C T A S C G D G I Q S R Y R N C S N P T P L N N G K D C
1531 GATACATGCACAGCATCTTGTGGTGTGGAATTCATCTAGATACCGTAATTTCTAATCCAACCTCCTTTAAATAATGGAAAGGACTGT
491 S S L G P N V D I I K C K T A D C P | I D G K F S E W T S Y S
1621 TCTTCATTAGGACCTAATGTAGATATTATCAATGCAAACTGCAGATTGTCCAATTGATGGAAAATTTTCTGAATGGACTTCGTTACTCT
521 S C S V S C G S G T S Y R T R K C N N P E P Q Y G G K Q C F
1711 AGTTGTTCTGTGAGTTGTGGCTCAGGAAGTACCAGGACTCGAAAGTCAATAACCCCTGAACCACAATATGGTGGTAAACAATGCTTTT
551 G D S L E S K I C K Q I E C P | V D G G Y T E W S T F S F C S
1801 GGAGATCTTTGGAATCTAAGATTTGCAACAATAGAATGCCCTGTTGATGGTGGATATACTGAGTGGTCAACTTTTCTTCTGCTCT
581 V S C G V G T Q S K T R Q C T N P Y P E H G G K D C S V L G
1891 GTAAGTTGCGGTGTTGGAACCCAATCTAAAACCTAGACAATGCACCTAACCTTACCTGAGCATGGAGGAAAAGACTGTAGTGTTTTAGGA
611 K S E E F Q I C K Q P E C P | T N G G W S S F S D F S D C S V
1981 AAGTCTGAAGAATTTAGATTTGTAACAACCTGAATGTCCAATAATGGTGGTGGAGCAGTTTTTCTGATTTTTCTGATTTGTTCTAGTA

```

Abbildung A.6. Fortsetzung 1 von *hytsr1*.

641 T C G R G I K T K T R T C T N P S P Q F N G T P C I G D S T
2071 ACATGTGGCGTGGCATTAAAACAAAAACGCGTACATGTACAAATCCTAGTCCACAATTTAATGGAACCTCTGCATAGGCGATTCAACT

671 E T I E C V L K S C P | V H G G L S A W S T F S P C S S S C G
2161 GAAACCATAGAGTGTGTTTTGAAAAGTTGCCAGTTCATGGTGGTTTTATCAGCTTGGTCAACATTTTCCCCATGTTTCATCATCCTGTGGG

701 K G T Q T R T K L C N N P T P M Y G G N P C E G I T V E S K
2251 AAAGGAACTCAAACCGTACTAAGTTATGCAACAATCAAACCTCTATGTATGGTGGTAATCCTTGTGAGGGAATTACAGTTGAAAGTAAA

731 E C Q L I E C P | V D G G W T K W S E P S E C S T T C G S G L
2341 GAATGTCAGCTCATTGAATGCCCTGTGGATGGAGGTTGGACCAATGGAGTGAGCCTAGTGAGTGTCTACAACATGTGGTCTGTGGTCTT

761 K V K T R S C T D P K P L F G G K D C V G E S Q I T L S C F
2431 AAAGTTAAAACACGTAGTGCACCTGACCCCAAACATTATTTGGTGGAAAAGATTGTTGGAGAAAAGTCAAATCACTCTTAGTTGTTTT

791 L T N C P | V D G G F T Q W S A Y G E C S S S C G D G L K T R
2521 TTGACAAATTTGCTGTTGATGGTGGTTTTACTCAGTGGTCAGCATATGGTGAATGCAGTCAAGTTGTGGGATGGTTTTAAAAACAAGA

821 T R T C S N P I P S F G G Q N C I G E T K E N S Y C N I N P
2611 ACACGTACATGTTCAAATCCTATACCAAGCTTCGGTGGTCAAACCTGTATTGGTGAACATAAGAGAATTCATATTGTAACATAAACCTT

851 C P | I N G G F T E W S D F G A C S E P C G E G R K S R S R K
2701 TGCCCCATTATGGAGGTTTTACGGAATGGTCTGATTTTTGGAGCATGTCTGAACCTTGTGGAGAGGGAAGAAAATCTAGAAGTCGAAAA

881 C E N P K P E H G G L N C V G D F V E E V K C K V R E C P | I
2791 TGTGAGAATCCAAACCTGAACATGGTGGTCTAAATGTGTTGGTGATTTTTGTTGAAGAAGTAAATGTAAAGTTCGAGAATGCCTATT

911 D G G L T Q W S S Y T E C S K T C G E G E K K R S R L C T S
2881 GATGGTGGCCTCACACAATGGTCAAGCTATACAGAATGCTCAAAAACATGCGGTGAAGGTGAAAAGAAAAGATCTCGTCTGTGTACTAGC

941 P I P A F G G R D C E G L L N E V L P C K V K E C P | V N G G
2971 CCTATACCTGCTTTTGGTGGTAGAGATTGTGAAGGCTACTTAATGAAGTGTGCCTTGTAAAGTTAAAGAATGCCCTGTAAATGGTGGT

971 L S G W S A F S D C T K S C G S G T K Y R T R N C T N P V P
3061 TTATCTGGTTGGAGTGCATTTAGTGATGTACAAAATCATGTGGATCTGGCACTAAATACAGAAGTAAAGTTCGACAAAATCCAGTCCCT

1001 Q Y D G A D C V G S L K E T S E C N S Q L C P | I N G G F T D
3151 CAATATGATGGTGTGATGTGTTGGTCTCTTAAAGAAACATCAGAATGTAATAGCCAACTTTGTCCATAAAATGGTGGTTTCACTGAT

1031 W S S Y A E C S A E C G Q G S Q N R T R T C S N P P P A N G
3241 TGGTCATCTTATGCTGAATGTTTACGAGAGTGTGGCCAAGGAAGCCAGAATAGAACAAAGAACTTGTCTTAATCCCCACCAGCAAATGGA

1061 G K D C E G A T F Q T K F C L I K E C P | I N G G F S Q W S S
3331 GGAAAAGACTGTGAAGGAGCTACGTTTCAAACAAAGTTTTGTTAATAAAGAGTGCCTAAATGGTGGTTTCACTCAATGGTCTTCA

1091 F S E C S L T C G G G Q R I R Y R T C T N P A P A F N G A P
3421 TTTTCTGAATGTTCTTTGACTTGTGGTGGTCAAGAATACGCTATCGAACTGTACAAATCCTGCTCTGCTTTTAAATGGGGCACCT

1121 C V G A E S Q T E S C N L K E C P | V N G G L S E W F N F G N
3511 TGTGTAGGAGTGAATCGCAAACAGAATCTTGTAAATTTAAAGGAGTGTCCAGTAAATGGAGGATTATCAGAATGGTTAATTTCCGAAAT

1151 C S K E C G E G T Q L Q I R T C T N P A P A F G G E N C K D
3601 TGCTCAAAAGAATGTGGAGAAGAACTCAGTTACAGATAAGAAGCTTGTACAAATCCAGCTCCTGCATTTGGTGGTAAAAATGTAAAGAT

1181 Q L L S K I L L C K I K E C P | V N G G F T K W S E F S E C S
3691 CAGCTCTTTCAAAAATCTTCTTTGCAAAAATTAAGAATGCCAGTTAATGGTGGTTTTACAAAATGGTCAAGATTTAGTGAATGTTCA

1211 A S C G L G I K Q R T R S C S N P V P A Y G G E D C N G I R
3781 GCTAGTGTGGGCTAGGTATTAAGCAGCGTACAAGAAGCTGTTCAAATCCTGTACCAGCTTATGGAGGAGAAGATTGCAATGGAATAAGA

1241 Y E T A S C K T H E C P | V N G G F S E W S D F S A C S N S C
3871 TATGAAACTGCATCCTGTAAAACCTCACGAATGTCCAGTAAATGGTGGTTTCTCAGAGTGGAGTCACTTCACTGATGTTCAAACAGTTGT

1271 G N G E Q I R K R S C N K P S P A H G G E D C K G S L E E K
3961 GGAAATGGGGAGCAAATTCGAAAACGTTCTTGTAAACAAGCCTTCACTGCACACGGAGGAGAAGACTGTAAAGGAAGCCTTGAAGAAAA

1301 K V C N I K E C P | I N G G L S S W S A F S T C T K S C D G G
4051 AAAGTTGCAATATTAAGAGTGTCCAATTAATGGTGGTTTGTCTCTTGGTCACTTTTAGCACTTGTACAAAGTCATGTGATGGTGGT

Abbildung A.6. Fortsetzung 2 von *hytsr1*.

1331 V K R R T R L C N N P A P S F G G L D C T E N L I D D T E C
 4141 GTAAAAAGACGCACTAGATTATGTAACAATCCTGCACCTAGCTTTGGAGGTTTGGATTGCACAGAAAACCTAATGTATGATACCTGAATGT

1361 N S H S C P | V N G G F S E W S A F G I C S E Q C G D G I Q E
 4231 AATTCATTCATGTCCAGTAAATGGTGGTTTTAGTGAATGGTCAGCATTCCGGTATATGCTCAGAGCAATGTGGTGATGGTATTCAAGAA

1391 R T R S C T Y P A P A Y G G M N C E G L Q T E T R Q C K I K
 4321 AGAACAGATCTGTACATATCCTGCACCAGCCTATGGTGGAACTGACTGTGAAGGTTTACAAACTGAACTAGACAATGTAAATTTAAA

1421 D C P | V N G G F S Q W S V Y S E C S K E C G N G E Q T R K R
 4411 GATTGTCCAGTTAATGGAGGTTTTAGTCAATGGAGTGTTCACAGTGAATGTTCTAAGGAATGTGGAATGGGAAACAAAACAAGAAAAGA

1451 T C N N P A P A Y G G D D C Q G S L E E S K A C K I K E C P |
 4501 ACATGTAACAATCCTGCACCTGCTTATGGTGGAGATGATTGTCAAGGAAGCTTAGAGGAATCAAAGCTTGTAAAATCAAAGAGTGCCCC

1481 I N G G L S S W S S Y S D C S K S C G G G V K T R T R S C T
 4591 ATCAATGGTGGATTATCATCTTGGTCATCGTACTCCGACTGTTCTAAATCATGTGGTGGTGGGGTTAAAAACGCAACACGATCATGTACT

1511 N P A P N F G G T I C N D I M I E D V P C N V Q Q C P | I D G
 4681 AATCCAGCCCCAAATTTGGTGGCACAATTTGTAATGATATAATGATTGAAGATGTACCATGCAATGTCAACAATGTCCAATTTGATGGA

1541 G M S E W S D F T P C S E L C G L G S Q E R Q R K C T N P A
 4771 GGAATGAGTGAATGGTCAGATTTTACACCTGTCTGAATTATGTGGTCTTGGTCTCAAGAACGGCAAAGAAAATGTACTAACCCCTGCA

1571 P S Y G G K Q C G G E F L Q V R E C K I K D C P | A N T G Y S
 4861 CCTTCTTATGGTGGCAAGCAATGTGGTGGGGAATTTCTCCAAGTCAGAGAATGTAAAATCAAAGACTGCCAGCCAACACGGGATATTC

1601 Q W S D F S E C S K S C G V G V R S R K R I C E N K K Y D C
 4951 CAATGGTCTGACTTTAGTGAGTGTCAAATCTTGTGGTGTGGTGTTCGATCTCGAAAACGAATATGTGAAAATAAAAAGTATGACTGT

1631 S G L S E E L Q S C E V K P C P | V N G G F S N W G D F D E C
 5041 TCAGGATATCAGAGGAAC TACAAAGCTGTGAAGTAAAACCTTGCCAGTTAATGGAGGATTTTCCAATTTGGGGTGAATTTTGATGAATGT

1661 S T T C G Q G L K T R T R T C T N P T P Q N G G A G C F G S
 5131 TCTACAACCTGTGGACAAGGCTTAAAGACAAGAAGCTAGAACATGTACAAATCCTACTCCTCAAAATGGTGGTGCAGGTTGCTTTGGAAGC

1691 R Q E I Q S C I V R E C P | V N G M Y S T W S T Y S E C S E P
 5221 AGACAGGAAATTCAGAGTTGATTGTGAGAGAGTGCCAGTTAATGGTATGTACTCAACATGGTCAACTTATTCTGAATGCAGTGAACCA

1721 C N A G R Q K R T R T C T N P S P A N G G L P C V G P P E D
 5311 TGTAATGCAGGAAGGCAAAAAGAACAAGGACTTGTACCAACCCATCTCCTGCTAATGGTGGATTACCATGTGTTGGACCTCCAGAAGAT

1751 A R T C N I Q K C A | I N G G L S E W S L F S S C S K T C G N
 5401 GCTCGAACATGCAATATCCAAAAGTGTGCAATAAATGGTGGTCTCAGCGAGTGGTCATTATTTTCTAGCTGTTCAAAAACATGTGGAAT

1781 G I K E R K R T C T N P A P S V G G K D C I G S L V E V F S
 5491 GGCATTAAGAAGACGCAAGCGTACCTGTACAAATCCTGCTCCATCAGTTGGAGGAAAAGATTGTATTGGATCTTTAGTTGAAGTCTTTTCA

1811 C K V E E C P | I D G A F G E W S D F G E C S E K C G S G L Q
 5581 TGTAAGTAGAAGAGTGTCCAATTTGATGGTGTCTTTGGGGAGTGGTCAGACTTTGGTGAATGCTCAGAAAATGTGGATCTGGACTACAA

1841 E R K R E C N N P L P A Y G G K G C Y G E T S Q Q R E C K L
 5671 GAAAGAAAACGAGAATGCAATAATCCTTTACCTGCATATGGAGGTAAAGGGTGTATGGAGAACTTCTCAACAACGTGAATGTAAACTT

1871 R E C P | V N G K F T S W S S Y S E C T E P C N G G Y Q R R T
 5761 CGAGAATGTCCAGTTAATGGCAAATTTACAAGTTGGTCAAGTTACAGTGAATGTACAGAACCTTGTAAATGGAGGGTATCAGCGTAGAACA

1901 R T C T D P A P A H G G L P C S G P V E D K K S C N I Q K C
 5851 AGAACTTGACATGATCTGCTCCTGCTCATGGAGGACTGCCTTGTAGCGGACCAGTTGAAGCAAAAAAGTTGCAATATTCAAAGTGC

1931 P | V N G D F T P W S E F S A C S S S C G E G L Q K R T R T C
 5941 CCAGTTAATGGAGATTTACGCCATGGTCTGAATTTAGTGCATGTTCCAGCAGTTGTGGTGAAGGGTGCAGAAAACGTACACGAACATGC

1961 T N P S P A F G G T D C I G L N E E T I S C K V K E C P | V D
 6031 ACAATCCTTCTCCTGCATTTGGCGGAACAGACTGCATTGGTTTAAATGAAGAACTATTAGTTGTAAAGTAAAAGAGTGTCCAGTTGAT

1991 G G F T N W S D F N E C S K S C G E G I K Q A I R T C S N P
 6121 GGAGGTTTTACAACTGGAGTGACTTTAATGAATGCTCAAAGGTTGTGGGGAAGGTATCAAACAAGCAATAAGGACCTGTTCAAATCCT

Abbildung A.6. Fortsetzung 3 von *hytsr1*.

2021 E P K F G G K T C V G E F V K N Q I C N I R E C P | V D G A Y
 6211 GAACCCAAATTTGGTGGTAAAACCTGTGTTGGAGAATTTGTTAAAAATCAAATATGCAATATCAGAGAATGTCTGTTGATGGTGCCTAT

2051 S Q W S A Y S V C S S P C N G G K Q T R T R S C T N P P P S
 6301 AGTCAATGGTCAGCTTACTCTGTCTGCTCATCTCCATGTAATGGTGGTAAACAACTAGGACTAGGTCTTGTAATAATCCACCTCCAAGT

2081 N G G A P C F G P D F D S K S C N I H L C P | V H G G F T Q W
 6392 AATGGAGGTGCACCTTGTGTTGGACCTGATTTTGATTCAAAAAGTTGTAATATTCATTTATGTCCAGTGCATGGTGGGTTTACTCAATGG

2111 S D F S D C S K S C G E G K K I R T R S C S N P A P S N G G
 6481 TCAGATTTCACTGACTGCTCAAAATCTTGTGGAGAAGGGAAAAAATTCGAACACGATCATGTTCTAATCTGCACCATCAAATGGTGGT

2141 S S C V G P T E D T A F C K L K E C P | V D G G L G Q W S D F
 6571 AGTAGTTGTGTAGGACCAACGGAAGACACTGCATTCTGTAATACTAAAAGAATGTCCAGTTGATGGTGGTGGTGGTCAATGGTCTGATTTT

2171 T E C S K S C G S G I Q W R K R L C N N P E P A Y G G K D C
 6661 ACTGAATGTTCTAAATCTTGTGGATCTGGTATTCAATGGCGCAAGCGCTTATGTAACAATCCTGAGCCTGCTTATGGTGGCAAGACTGT

2201 S G L I S S E Q Q E C K V R E C P | V N G G L S D W S L F S E
 6751 TCTGGATTAATAAGTAGTGAACAACAAGAATGTAAGTCAGAGAATGCCTGTAAATGGAGGATTAAGTACTGGTCATTATTCTCCGAA

2231 C S E P C G L G N Q Y R T R T C T N P S P A N G G L G C T G
 6841 TGTTCAGAACCTTGGCGCTTAGGAAATCAGTATCGTACCAGAACCTGCCTAATCCATCTCCAGCAAATGGTGGTTTAGGTTGACTGGT

2261 H L I E S V S C T L K P C P | V N G N F S Q W S E Y S P C S N
 6931 CATTTGATTGAATCAGTTAGTTGCACTTTAAAACCATGCCAGTGAATGGTAATTTTTTACAAATGGTCAGAATACAGTCCATGTTCTAAT

2291 T C G S G I A Q R K R T C T Q P S P A H G G R D C F G P T L
 7021 ACTTGTGGAAGTGGGATGCTCAGAGAAAACGAACCTGTACACAACCATCACCAGCACATGGGGGTAGAGATGCTTTGGGCCAACATTG

2321 D T K T C K L R D C P | I N G E F S E W S A F S I C Y E P C G
 7111 GATACTAAAACCTGTAATAAAGAGACTGCCCCATAAATGGAGAGTTTAGTGAATGGTCAGCATTCTCTATATGTTATGAGCCTTGTGGT

2351 L G K Q Y R V R Y C T N P P P S F G G N D C A G N S R E V I
 7201 CTTGAAAACAATATAGAGTTCGTTATTGCACAAATCCCCCTCCATCATTTGGAGGAAATGACTGTGCTGGTAATAGTCGAGAAGTAAT

2381 V C K I K E C P | I N G G L S L W T E F S T C S Q T C G I G Q
 7291 GTTTGCAAAATTAAGAATGCCCAATAAATGGAGGTTTATCATTTGTGGACAGAGTTCAGTACTTGTCTCAAACCTGTGGAAATGGACAA

2411 M T R S R S C T N P P P Q Y Q G M N C I G E L K E V N E C K
 7381 ATGACCAGATCTAGATCATGTACTAACCTCCTCCACAATATCAAGGCATGAATTGCATTGGAGAGTAAAAGAGGTTAATGAATGCAAA

2441 V R E C P | V D G N W S P F S S F T D C S A S C N I G K Q Q R
 7471 GTTCGGAATGCCAGTTGATGGTAATGGAGTCCATTTTCTTACTGATTGTTCTGCTTCAATGTAACATTGGTAAACAGCAGAGA

2471 Q R E C N N P A P Q Y G G K A C I G S A V E E K S C N A F P
 7561 CAGCGTGAGTGAATAACCCAGCTCCACAATATGGTGGAAAAGCTTGTATCGGAAGTGTGTTGAAGAAAAATCTGTAATGCGTTTCCA

2501 C P | V N G E V S E W G A F G L C S T S C G V G E Q T R F R T
 7651 TGTCTGTCAATGGCGAAGTTTCAGAGTGGGGTGCCTTTGGATTGTGCTCTACAAGTTGTGGAGTTGGTGAACAACAAGATTTAGAACT

2531 C T N P A P R H G G K D C T D P L V H T I T C K I K D C P | V
 7741 TGCACAAATCTGCTCCAAGACATGGTGGAAAAGATTGCACTGATCCTTTAGTGCATACTATAACTTGTAAAATTAAGATTGTCCAGTT

2561 N G G Y T K W S D Y S P C S K T C G V G T Q T R K R F C T D
 7831 AATGGTGGTTACACAAAATGGTCAGACTACAGCCCATGTTCAAAAACATGTGGGGTGGTACTCAAACCTGTAAGATTTTGCACCGAT

2591 P A P A F G G L A C V G P D V D T R T C E Q K E C P | I D G Q
 7921 CCAGCTCCTGCCTTTGGCGGACTTGCTTGTGTAGGACCAGATGTGGATAACAAGAACTTGTGAGCAGAAAAGAATGCCAATTTGATGGCCAA

2621 W S K W E D Y D S C T L T C G G G G I Q R A R R T C N N P L P
 8011 TGGAGCAAATGGGAGGACTATGATTCCTGTACATTAACATGTGGAGGTGGAATTCAAAGAGCTCGACGTACTTGTAAATAATCCATTACCT

2651 K F G G A D C V G V S L D I R S C N N F P C P | V N G G F S S
 8101 AAATTTGGCGGAGCTGATTGTGTTGGAGTTAGTTTAGATATCAGATCATGTAATAATTTTCCATGTCCAGTCAATGGTGGTGGTTTTCATCT

2681 W S A Y G E C T T T C G L G I Q Y R K R F C D S P P P N F G
 8191 TGGTCAGCATATGGAGAATGTACCACAACCTGTGGCCTTGGTATTCAATATAGAAAAAGATTTTGTGATTCCTCCTCCGAATTTCCGGA

Abbildung A.6. Fortsetzung 4 von *hytsr1*.

2711 G R P C V G P L F D A R S C I P R D C P ^{TSR46} I N G G L T E W S D
 8281 GGCAGACCATGTGTTGGACCTTTATTTGATGCCAGATCATGTATACCAAGAGATTGTCCAATAAATGGAGGTTTAAACAGAATGGAGTGAT

2741 F S P C S H T C G V G N Q V S T R T C T K P Y P Q H G G K P
 8371 TTCAGTCCTGTAGTCACACATGTGGAGTTGGAAATCAAGTTTCAACTCGAACTTGACGAAACCCTACCCTCAACATGGAGGAAAACCA

2771 C E G E L I Y Q K T C K L A D C A ^{TSR47} V N G N W G L W G S F T P
 8461 TGTGAAGGAGAGCTTATTTATCAGAAGACATGCAAACCTTGACAGATTGTGCAGTAAATGGAACTGGGGCTTATGGGAAGTTTACCCCT

2801 C S Q T C K G G L Q R R S R Q C N S P A P A F G G M N C P G
 8551 TGTTCTCAAACCTTGCAAAGGTGGTTTGCAGCGAAGATCAAGGCAGTGTAAATAGCCCTGCTCCTGCATTCCGGTGGTATGAATTGCTCCTGGA

2831 S N F E D Q A C N E N K D C P ^{TSR48} V N G A W G S W S P Y G P C S
 8641 TCTAATTTTGAAGATCAAGCTTGTAAACGAAAATAAAGATTGTCCAGTTAATGGAGCATGGGGTTCTTGGTCTCCGTACGGACCTTGCAGT

2861 L S C G V A V R R S R K R E C N N P A P S G G G A N C V G Y
 8731 CTTTCTTGTGGCGTCGCGGTGCGTCGCTCGAGAAAAAGAGAATGCAACAACCCTGCACCGTCTGGAGGTGGTGCGAATTGCGTCGTTAT

2891 S V M S E V C N N Q I N C P ^{TSR49} V N G E W S S W G P Y S A C T L
 8821 AGTGTATGTCTGAAGTTTGCACAACCAAATTAATTGTCCAGTAAACGGTGAATGGAGCAGCTGGGGTCCATATTCTGCTTGTACGTTG

2921 T C G G G V Q Q R N R Y C N N P A P L Y G G V S C I G D S I
 8911 ACGTGTGGTGGTGGCGTACAACAGAGAAACAGGTATTGCAATAATCCTGCTCCTCTTTATGGCGGCGTTTCGTGATTGGTGACAGTATT

2951 Q I T K C N ^{TSR50} T A L C T E W S S W G E W G Q C S R T C G G G A
 9001 CAAATAACTAAGTGAACACTGCTTTATGTACTGAATGGTATCATATGGGGTGAATGGGACAGTGCAGTCAACGTGTGGAGGCGGTGCT

2981 Q V R T R V C P G S N C V G S G T F V Q V C N V E K C P D T
 9091 CAAGTTCGTACGCGTGTGTGTCAGGATCAAATTGCGTTGGCTCTGGGACATTTGTTCAAGTTTGAACGTTGAAAAATGCCAGACACA

3011 F F S F F D I K K L L G K *
 9181 TTTTTCAGTTTTTTTGATATAAAAAAGCTACTTGGAAAGTGActtattttaaaaacatttgcgaagtgtttttaacgatgctaataaaaat

9271 gattttgaaataaacattgataaaaataaaactttttttattacacttggtatataattttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Abbildung A.7. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *hytsr2*. Gelb=Signalpeptid, hellgrün=Galectin-Domäne. Die vertikalen Striche geben den Beginn eines TSR (=Thrombospondin Repeat Typ I) an.

```

1          M A W R I V F L L T A G F V Y A Y A A
1  ATCTCGTGAATAGAAGAGAAAGAGAATTTAAGAATGGCTTGGAGGATCGTTTTTCTACTGACAGCTGGTTTTGTCTATGCTTATGCTGCT

20  K P P V T C Q R S F S K I G C F K E V N S R P D L A L N P M
91  AAACCTCCTGTAACATGTCAAAGAAGTTTGTAGTAAATGGTTGGTTCAAAGAGGTAATAGCAGACCAGATCTTGCATTAAATCCAATG

50  K L E I N D R D P S S S K Y Q G Y L I D W K N M E A S V H S
181 AAACCTTGAGATTAACGATCGCGATCCAAGCAGTTCGAAGTACCAAGGTTATCTTATTGACTGGAAAAATATGGAAGCATCAGTGCACAGT

80  L A C R C A S A A R S L K M N Y F S L R F W G E C W V G K T
271 TTAGCTTGCAGATGCGCTAGTGTGCAAGAAGTTTAAAAATGAATACTTTTCGTTGGCTTTTGGGGTGAATGTTGGGTTGGAAAAACA

110 D M G K L V I T L R D P K W V S T D C V N S W S F L G V C D
361 GATATGGGAAACTTGTATAACTCTTCGAGATCCAAAATGGGTGCAACAGATTGCGTAAACTCTTGGTCATTCTTGGTGTTTGTGAC

140 H K H E K E C V A K A G S G Y I Y F L D D K S E E N | I D G A
451 CATAACATGAAAAAGAAATGCGTTGCAAAAGCAGGCTCAGGATACATCTACTTTTGTAGACGACAAAAGTGAAGAAAATATTGACGGTGCA

170 Y S E W S S Y T E C S A T C G F G L M E R E R T C T N P A P
541 TATTCTGAATGGAGCAGCTATACAGAGTGTCTGCCACCTGCGGATTTGGCTTAATGGAACGAGAAGCTACATGCACAAAATCCTGCCCA

200 V G K G K D C S S L G P M S D E K P C N L R E C P | V N G G I
631 GTAGGTAAGGAAAAGACTGCAGTAGTCTAGGACCAATGAGCGATGAAAAACCTGTAATTTACGAGAGTGTCCAGTGAATGGAGGAATA

230 S E W T D F G P C S K S C G G G I S V R T R S C T N P S P L
721 AGTGAATGGACAGATTTTGACCATGTCTAAATCTTGTGGAGGTGGAATATCAGTGAGAACAAAGAGCTACAAAACCCATCCCCATTA

260 N G G K N C S E S I Q E S K D C S T D P C P | I D G N Y G L W
811 AACGGAGGAAAAAATGTCAGTGAATCAATCAAGAATCTAAAGATTGTCTACTGATCCATGCCCTATTGATGGTAATATGGATTATGG

290 N A W G T C S A D C G D G F Q T R Q R E C N N P K P Q N G G
901 AATGCTTGGGGAACATGTTCTGCTGATTGTGGTGATGGCTTCAAACCTGTCAGCGAGAATGTAATAACCCAAAACCTCAAATGGAGGG

320 K S C E L A G I S Q E S R L C K L K D C P | I N G G F G S W S
991 AAAAGTTGTGAATGGCTGGTATTAGTCAGGAGAGCAGGCTCTGTAAACTCAAGGATTGTCCTATAAATGGTGGGTTGGAAGCTGGAGT

350 E F S P C S K L C G D G I Q T R S R K C D Q P E P A H G G K
1081 GAATTTTCTCCTTGCTCTAAATATGTGGTGATGGAATTCAAACCTCGCTCAAGGAAATGTGATCAACCTGAACCTGCACATGGAGGAAAA

380 D C E G T S V E T N M C K I V D C P | I D G K Y G Q W N S W G
1171 GATTGTGAAGGACATCTGTTGAAACAAACATGTGCAAAATAGTTGATTGCCCTATTGATGGTAAATATGGTCAATGGAATTCTTGGGGA

410 T C S V N C G T G V Q T R Q R E C N S P K P E Y G G K S C E
1261 ACTTGTTCAGTAAATGTGGTACTGGGTTCAAACACGTCAAAGAGAATGTAATAGTCCAAAACAGAAATATGGTGGAAAATCTTGTGAA

440 L T G F S E D S R T C K I K E C P | I N G K W S E W E S F G A
1351 CTGACTGGCTTTAGCGAAGATAGTAGAACTTCAAAAATCAAAGAATGCCCAATTAATGGAAAATGGAGCGAATGGGAATCATTGGTGCA

470 C T Q T C G S A L R S R K R S C N N P K P E Y G G Q T C D G
1441 TGCACCCAAACATGTGGTTCTGCACTTCGATCAAGAAAAAGGTCAATGTAATAATCCAAAACAGAAATATGGTGGTCAAACATGTGATGGA

500 S D I M T E S C S F I P C P | V N G G L S E W T V F G P C S K
1531 TCAGATATAATGACTGAATCCTGTTCTTTATACCATGCCAGTGAATGGTGGTTAAGTGAATGGACAGTTTTTGGACCATGTCTAAA

530 S C G G G I S V R T R T C T N P S P S N G G K D C S E P T L
1621 TCTTGTGGTGGTGGCATCTCAGTGAGAACAAAGAACCTGTACAAAACCCATCTCCATCTAATGGAGGTAAAGACTGCAGCGAACCAACACTA

560 E S K I C S S D P C P | I D G N F G E W N S W G T C S V D C G
1711 GAAAGCAAAATTTGTTCCTCAGATCCATGCCCTATTGATGGTAATTTCCGTTGAGTGGAAATTCATGGGGAACCTGTTCTGTTGATTGTGGT

590 T G V Q T R Q R E C N S P K P Q Y G G K T C D L I G I T Q E
1801 ACCGGTGTCAAACACGCCAAAGGGAATGTAACAGTCCAAAACCTCAATATGGTGGAAAAACATGTGATTTAATGGAAATTACTCAAGAA

620 Q R E C K L K E C P | I N G G F G S W S E F S A C S K L C G D
1891 CAAAGGGAATGTAACCTCAAAGAATGCCCAATAAATGGTGGATTTGGTAGCTGGAGTGAATTTTCTGCATGCTCTAAATATGTGGTGTAT

650 G V Q T R T R K C D Q P E P A Y G G K Y C V G T T I E T N F
1981 GGAGTACAGACTCGCACAAAGAAAGTGTGATCAGCCTGAACCTGCATATGGTGGAAAATATTGTGTCGGAACAACAATTGAAACAAACTTT

```

Abbildung A.7. Fortsetzung von *hytsr2*.

```

680   C K I V E C P | I D G S W S E W G P F S E C G Q S C G S T L K
2071 TGCAAAATTGTTGAATGCCCCATTGATGGAAGTTGGAGTGAATGGGGACCATTTAGTGAGTGGGTCAAAGTTGGTTCTACACTTAAA

710   S R K R S C T N P A P Q Y G G K A C E G L D T M T T A C P F
2161 TCAAGAAAAAGGTCTTGTACAAACCCAGCACCACAATATGGTGGTAAGGCCTGTGAAGGACTTGATACAATGACTACAGCATGCCCCCTTT

740   V P C P | V N G G Y G Q W S S Y S S C S K D C G Q G T R T R T
2251 GTACCATGTCCAGTTAATGGTGGATATGGACAATGGCTAGTTACAGCAGTTGCTCAAAGATTGTGGACAAGGACTCGAACCAGAACA

770   R Q C D S P S P A N G G R N C D V F G P S S E Q I N C Y T Q
2341 AGACAATGTGACTCACCTTCACCAGCAAAATGGTGGAAAGAACTGTGATGTATTTGGACCATCTAGTGAACAGATTAATTGTTATACTCAG

800   C P | T Q S A V A C E A E D L N I N C Y G R G T I Q I S A A N
2431 TGCCCAACTCAATCGGCAGTAGCCTGTGAGGCTGAAGATCTTAATATAAAATTGCTATGGAAGAGGAACATACAATAAGCGCAGCTAAT

830   Y G R R A D H I C T R W P N R W N R N C G N E W N S R N V V
2521 TATGGGAGAAGAGCAGACCATATATGTACAAGATGGCCTAATCGTTGGAATAGAACTGTGGAATGAATGGAACCTCGCAACGTTGTT

860   T S R C Q N Q A A C S V R A G N E V F G D P C W G I Y K Y L
2611 ACAAGTAGATGTCAAACCAAGCAGCCTGTAGTGTGAGAGCTGGTAATGAAGTTTTTGGAGACCCATGTTGGGGAAATTTACAAATACCTT

890   E V Q Y Y C S G *
2701 GAAGTACAGTATTACTGCAGTGGATAAcagactttatgttttacaatttgattgaattattttatttatacattgtcctaaatat

2791 atttatataaatatttgatactgatttaatatcaagaatgttttaattactttttattgaattaatagagtagcacatatgcaagttgaa

2881 aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Abbildung A.8. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *hytsr-like*. Gelb=Signalpeptid, blau=von Willebrand Faktor Typ A-Domäne. Die vertikalen Striche geben den Beginn eines TSR (=Thrombospondin Repeat Typ I) an.

```

1 agtttggtgcctctttcatcaattgcttggttggtgctgaccaagacgagcaaatctaagattttctaagaagttgcccgttcatgaaaag
1
91 tagtaagaagctttaatagaaaaagaaaaATGAAGTACTTGGTTGGCTTCTACTTTTATTTTCTTATTTGCATCTTCAATAGTCAAGCT
TSR1
21 | Q I L S Q W T P Y S E C P V T C N F N N P V R T R T R T C T
182 CAAATACTCTCTCAGTGGACACCATACAGTGAATGCCAGTTACATGCAATTTCAATAATCCTGTACGCACACGCACACGAAGTGTACT
TSR2
51 P A N L C Q G V S L F E T F P C N R E Y S C P | E Y R L G D W
271 CCTGCAAAATTTATGTCAAGGAGTTAGTCTATTTGAAACTTTTCCCTGTAACAGAGAATATTCATGTCCAGAATATAGGCTTGGTGATTGG
81 G T W S A C S E S C K A T Q N Y P T R V R T R S Y C L S N S
361 GGTACTTGGAGTGTGTTTCAGAATCATGCAAAGCAACTCAAATATCCAACGCGTGTTCGAACTCGTTCTTATGTCTGAGTAATTCA
111 T S S Y Q C T P D Y M I S Y E P C N I A A C S | S V K S C S S
451 ACATCTTCATATCAATGTACTCCTGATTATATGATTAGTTATGAACCTTGTAATATAGCAGCATGTTTCATCAGTAAAGTCTTGACAGCT
141 L N F T F V F V L D S S S T I D T Q E W I D E K N L V L A F
541 T T A A C T T T A C T T T T G T C T T T G T G T T G G A T T C A T C G T C C A C G A T T G A T A C T C A G G A A T G G A T A G A T G A A A A A A T T T A G T T T T A G C T T T T
171 V R S S A F G V N P N V D V A V V N F A S S T Q V E A D C G
631 G T T C G T A G C T C A G C A T T T G G A G T T A A T C T A A T G T T G A T G T A G C T G T A G T A A A C T T T G C T A G T A G T A C T C A A G T A G A A G C T G A T T G T G G T
201 T Y R S Y S A F E T F M N N L K T I N G G T A I H R G L I A
721 A C A T A T C G A A G C T A C T C A G C T T T T G A A A C A T T T A T G A A C A A T T T G A A A C A A T A A A T G G T G G A A C T G C C A T A C A T A G A G G G C T T A T A G C T
231 G E T A F Q K C Q K L N N N P V I I L L T D G Y E N I D T N
811 G G A A A A C T G C A T T C C A A A A A T G C C A A A A A C T G A A T A A A T C C T G T T A A A T T C T T A C T G A T G G T T A T G A A A C A T A G A T A C A A A T
261 I D S N I A I E N R I K N Q A L L V A G A V N E Y K K D E I
901 A T T G A C A G T A A C A T A G C T A T T G A A A A T C G T A T A A A A A C C A A G C G C T T T T A G T G C A G G T G C T G T A A A T G A A T A C A A A A A A G A T G A A A T A
291 D R I T S Y I V D G Q N I S Y S Y F A S N F T A L Y N T I G
991 G A T A G A A T A A C A A G T T A T A T T G T T G A T G G A C A G A A T A T A T C T T A T A G T T A C T T T G C T T C A A A C T T T A C A G C T C T T T A T A A C A C C A T T G G T
321 N T L Y S R V V A R T G C E T Q | G F W T T W S A W S S C S Q
1081 A A C A C A C T G T A T T C T A G A G T T G T T G C A C G G A C C G G A T G T G A A A C T C A A G G A T T C T G G A C A A C T T G G T C T G C T T G G A G T A G T T G T T C T C A A
351 L C G F T G T I Q R S R S C I N P T T N K P Q E D C E V V N
1171 C T T T G T G G A T T T A C T G G T A C C A T A C A A C G T T C T C G A T C T T G T A T A A A T C C A A C T A C A A T A A A C C T C A A G A A G A C T G T G A A G T A G T T A A T
381 N I A N L D F M T C F Q P C T | S S F S E W S S W S A C S A S
1261 A A T A T A G C T A A C C T T G A C T T T A T G A C C T G T T T C A G C C A T G T A C T C C T C A T T T T C T G A A T G G A G T T C T T G G A G T G C T T G C T C A G A A C G
411 C R L D S G P P T T T R F R T C S S G L G S C I G S L S E T
1351 T G C C G A T T A G A T A G T G G T C C T C C A A C T A C A A C T C G G T T T A G A A C A T G T T C T T C T G G G C T T G G A T C T T G A T T G G A T C T T T A T C A G A G A C T
441 L E C N T N T P C Q | G T L S L W G L W G L C S A S C Q L T S
1441 C T A G A A T G C A A C A A A T A C T C C T T G T C A A G G C A C A T T A T C T T T G T G G G G A T T A T G G G G A C T G T G T T C A G T T C C T G T C A A T T A A C A T C A
471 V L P T Q Q R S R V C V G A T L G G N C D G Q S T V D S Q S
1531 G T A T T A C C A A C T A A C A A C G A T C T C G T G T T T G T G T T G G A G C A A C T C T T G G A G G A A A T T G T G A T G G A C A A T C T A C T G T T G A T T C A C A A A G T
501 C N V G I Y C P | G S I S D W S S W G A C S D V C N N L I T P
1621 T G C A A T G T T G G A A T T T A T T G T C C T G G A A G T A T A T C A G A T T G G A G T T C A T G G G G C G C A T G C T C T G A T G T T T G T A A T A A T C T T A T T A C A C C A
531 P S Q T R S R S C I G Y S T W D P T Y L G C P S I S R T E Q
1711 C C T T C T C A A A C C A G A A G T C G A T C T T G A T T G G A T A T T C A A C A T G G G A T C C T A C C T A T T T G G G T T G T C C T A G T A T T T C A A G A A C T G A A C A A
561 Q P C N I N I G C S | G T Y G S W S A W S S C S E S C Q S N I
1801 C A A C C T T G C A A T A T T A A C A T T G G T T G T T C A G G T A C A T A T G G C T C T T G G A G T G C A T G G A G T A G T T G C T C A G A A A G C T G T C A G T C T A A T A T T
591 N V S P F Q T Q T R Q C L G A T I G G G C S G P S S Q T Q N
1891 A A T G T G T C C A T T T C A A A C T C A A A C T A G A C A G T G T T T A G A G A C T A C A A T A G G A G G T G G T T G T T C T G G A C C A A G T T C T C A A A C T C A A A A C
621 C N V Q V S C P | G S L S D W A A W G A C S A S C Q L G L I V
1981 T G C A A T G T G C A A G T G T C T T G T C C T G G T A G T T T A A G T A T T G G G C A G C A T G G G G A G C T T G C T C A G C C T C T T G T C A A C T T G G C C T T A T T G T T
651 P Q Q T S T R T C S G A S F G G N C N G A V L T Q T K N C N
2071 C C T C A A C A A A C C A G T A C C C G C A C T T G T T C T G G T G C T T C G T T T G G T G G T A A T T G T A A T G G A G C A G T T T T A A C T C A A A C T A A A A C T G T A A T

```

Abbildung A.8. Fortsetzung 1 von *hytsr-like*.

681 A E V L C P |^{TSR9} G V L T D W T A W G V C S A T C N T Q V N G P F
 2161 GCAGAGGTTTTATGTCCAGGAGTATTAAGTATTGACTGCATGGGGCGTATGTTCTGCCACGTGTAATACTCAAGTCAATGGACCATT

711 Q T R D R S C V G F S T W N P N F A G C V G A T R N E Q Q L
 2251 CAAACTAGAGATCGATCTTGTGTTGGTTTTCTACATGGAATCCAAATTTTGCGGTGTGTTGGTCTACTAGAAACGAGCAACAACT

741 C N Q N V P C P |^{TSR10} G N Y G A W A T W G S C S E S C Q S N V N I
 2341 TGTAATCAAATGTCCATGTCCAGGTAATTATGGTGCATGGGCTACATGGGGATCCTGCTCAGAATCATGTCAATCTAATGTTAATATA

771 A P F Q T Q T R S C L G A T L N G G C P G A S S Q T Q N C N
 2431 GCTCCATTTCAAACCTCAGACTAGGTCATGTCTCGTGTACATTAATGGTGGATGCTCTGGAGCAAGTTCTCAAACCTCAAACCTGTAAT

801 V G V S C P |^{TSR11} G I L S L W G A W G A C T A S C Q V S F T S P T
 2521 GTTGGAGTTTCTTGTCCAGGCATTTTAAAGTTTATGGGGAGCATGGGGAGCATGTACAGCAAGTTGTCAAGTAAGTTTACTTCCACTACT

831 Q T R N R Q C N G A T F N G N C N G L M L T D T Q N C N E Q
 2612 CAAACAAGAAATCGTCAATGTAATGGTGTACTTTTAAATGGCAATTGTAATGGATTAATGTTGACTGATACTCAAATTTGCAATGAGCAA

861 V Y C P |^{TSR12} G T I S D W S S W S V C S A S C N N L V T V P S Q T
 2701 GTTACTGTCCAGGAACAATATCGGATTTGGAGTTCTTGGAGTGTATGTTCTGCATCTTGTAAACAATCTTGTACTGTACCATCTCAAAC

891 R T R S C S G F S T W D P T Y T G C P G I T R S E Q I S C N
 2791 AGAACTCGATCATGTTCTGGGTTTTCTACTTGGGATCCTACCTATACAGGTTGTCTGGTATCACTAGAAAGTGAACAAATTTCTTGTAAAT

921 A N V G C P |^{TSR13} G T Y N A W N A W S T C S E S C Q S N S N L A P
 2881 GCAAATGTTGGTTGCTTGGTACTTTATAACGCATGGAATGCATGGAGTACTTGGCTCAGAATCTTGCCAATCTAATTCAAATTTAGCACCT

951 F Q T Q T R Q C I G A T L G A G C V G P S S Q T Q N C N V G
 2971 TTCCAAACTCAGACTAGACAATGTATAGGTGCAACACTAGGAGCTGGTTGTGTTGGGCCTAGTTCTCAAACCTCAAACCTGCAATGTAGGA

981 V S C P |^{TSR14} G I L S D W A A W G A C S A S C Q L E F V V P Q Q T
 3061 GTGTCTTGTCCAGGTATTTAAGTGTATGGGCTGCATGGGGAGCCTGCTCAGCCTCTTGTCAACTTGAATTTGTTGTTCTCAACAAAC

1011 S I R T C S G A S F G G N C N G A V L T Q S K N C N A E V L
 3151 AGTATCCGCACTTGTCTGGTGTCTCGTTTTGGTGGCAATTGTAATGGAGCAGTTTTAACTCAATCTAAAACCTGTAACGAGAAGTTTTTA

1041 C P |^{TSR15} G V L T D W T A W G V C S A T C N T Q V N G P F Q T R D
 3241 TGTCAGGAGTATTAAGTATTGACTGCATGGGGCGTATGTTCTGCCACGTGTAATACTCAAGTCAATGGACCATTCCAAACTAGAGAT

1071 R S C V G F S T W N P N F A G C V G A T R N E Q Q L C N Q N
 3331 CGATCTTGTGTTGGTTTTCTACATGGAATCCAAATTTTGCGGTGTGTTGGTCTACTAGAAACGAAACAACAACTTTGTAATCAAAT

1101 V P C S |^{TSR16} G N Y G A W A A W G S C S E S C Q S N V N I A P F Q
 3421 GTTCCATGTTCAAGTAATTATGGTGCATGGGCTGCATGGGGATCCTGCTCAGAATCATGTCAATCTAATGTTAATATAGTCCATTTCAA

1131 T Q T R S C L G A T L N G G C P G A S S Q T Q N C N V G V S
 3511 ACTCAGACTAGGTCATGTCTCGTGTACATTAATGGTGGATGCTCTGGAGCAAGTTCTCAAACCTCAAACCTGTAATGTTGGAGTTTCT

1161 C P |^{TSR17} G I L S L W G A W G A C T A S C Q L S F T S P T Q T R N
 3601 TGTCAGGCATTTTAAAGTTTATGGGGAGCATGGGGAGCATGTACAGCAAGTTGTCAATTAAGTTTACTTCCACTACTCAAACAAGAAAT

1191 R Q C N G A T F N G N C N G L M L T D T Q N C N E Q V Y C P |^{TSR18}
 3691 CGTCAATGTAATGGTGTACTTTTAAATGGCAATTGTAATGGATTAATGTTGACTGATACTCAAATGCAATGAGCAAGTTTACTGTCCA

1221 G T I S D W S S W S V C S A S C N N L V T V P S Q T R T R S
 3781 GGAACAATATCAGATTGGAGTTCTTGGAGTGTATGTTCTGCATCTTGTAAACAATCTTGTACTGTACCTTCTCAAACCTAGAACTCGTTCA

1251 C S G F S T W D P T Y T G C P G D T R S E Q I S C N A N V G
 3871 TGTTCTGGGTTTTCTACTTGGGATCCTACCTATACAGGTTGTCTGGTGCATGACTAGAAAGTGAACAAATTTCTGTAATGCAATGTTGGT

1281 C P |^{TSR19} G T Y N A W N A W S T C S E S C Q S N S N L A P F Q T Q
 3961 TGCTCTGGTACTTTATAACGCCTGGAATGCATGGAGTACTTGGCTCAGAATCTTGCCAATCTAATTCAAATTTAGCACCTTTCCAAACTCAG

1311 T R Q C I G A T L G A G C V G P S S Q T Q N C N V G V S C P |^{TSR20}
 4051 ACTAGACAATGTATAGGTGCAACACTAGGAGCTGGTGTGTTGGGCCTAGTTCTCAAACCTCAAACCTGCAATGTAGGAGTGTCTTGTCCA

1341 G I L S T W A V W G A C S A S C Q L D L I V P Q Q T S T R T
 4141 GGTATTTTAAAGTACTTGGGCTGTATGGGGAGCCTGCTCAGCCTCTTGTCAACTTGACTTAATGTTCTCAACAAACCTGACCCGCTACT

1371 C S G G S L G G N C N G A V L T Q T K N C N A E V L C P |^{TSR21} G V
 4231 GTTCTGGTGGTTCTTAGGTGTAATTGTAATGGAGCAGTTTTAACTCAAACCTAAAACCTGTAATGCAGAGTTTATGTCCAGGAGTA

Abbildung A.8. Fortsetzung 2 von *hytsr-like*.

1401 L T D W A A W S T C S A S C N T L V N G G P I Q T R T R T C
4321 TTAAC TGATGGGCTGCATGGAGCACATGTTCTGCATCGTGAATACTCTAGTCAATGGTGACCAATTCAAAC TAGAACTCGAACTTGT

1431 N G F S T W N P N F L G C T G A S R N E Q Q L C N Q L V P C
4411 AATGGTTTTCTACATGGAATCCAAACTTTTTGGGTTG TACTGGTGC TAGTAGGAATGAACAACAGTTATGTAATCAACTTGTTCCATGT

1461 P | G F Y T A W S A W S T C S E S C Q S N V N S S P T Q F H T
4501 CCAGGTTTTATACATGCTTGGTCAGCATGGAGTACTTGTCTGAATCATGTCAATCTAATGTTAATAGTTCTCCACTCAGTTTCACACA

1491 R N C V N F T L N G G C V G L S S E T Q N C N F Q V S C P | G
4591 AGAAATGTGTTAACTTTACATGGAATGGTGGTTGTGTTGGCCTAAGTCTGAAACTCAAAATGCAATTTCCAAGTATCATGTCCAGGG

1521 D L T Q W S T W S S C S Q S C Q I S S V V P T M T R N R N C
4681 GATCTTACACAGTGGTCAACATGGTCTTCATGCAGTCAGTCTTGCCAGATTAGCTCAGTAGTACCAACAATGACCAGAAATCGAAATGT

1551 L N P T F G G N C Q G Q S L T D V M S C N A G V V C P | G Q L
4771 TTAATCCTACTTTTGGTGGTAATGTCAAGGACAATCACTTACAGATGTAATGT CATGTAATGCAGGCGTAGTATGTCCAGGTCAATG

1581 T D W T S W S Q C P A T C Q Q A V G Q F N M Q Y R S R Q C V
4861 ACTGATGGACATCATGGAGTCAATGTCCAGCTACATGTCAACAAGCAGTTGGTCAATTTAATATGCAGTACAGATCAAGACAATGTGTT

1611 N T T T G N C G G A S L N D Q V V C V R D V P C P | G I L G Q
4951 AATACAAC TACTGGAAATGTGGTGGAGCTTCGTTAAACGATCAAGTTGTTGTGTTAGAGATGTTCCCTTGCTGATACTTGGCCAA

1641 W S T W S T C S E S C R S N L L I A P S Q T R T R T C T T A
5041 TGGAGCACTTGGAGTACGTGTT CAGAGTCTGTGAGAAGCAACTGTTGATAGCCCCATCTCAAAC TAGAACAGACATGCACAACAGCT

1671 T L G A N C G G A S L V E S L T C N A N V G C P | G V W T S W
5131 ACACTTGGTGCCAATGTGGTGGTGC TCCCTGTTGAATCCCTCACTTGTAAATGCTAATGTAGGATGTCCTGGTGTGGACCAGTTGG

1701 G P F T D C S A S C Q S T G N I I P T Q S R Q R F C V N N T
5221 GGACCATTTACTGATTGCTCTGCATCTTGCCAGTCTACTGGTAATATTATTCCAAC TCAATCGCGTCAAAGTCTCTGTGTTAATAACT

1731 L D G P C P S D N N G D K I Q T V Q C N V G V I C P | V R G T
5311 CTTGATGGACCTTTCCTTCTGATAAATAATGGTGATAAAATCCAAACTGTTCAATGTAATGTTGGAGTTATTGTCCAGTAAGGGAAC T

1761 W G A W G D W S S C S A S C D A G L I Q R S R A C S V P Y P
5401 TGGGGTGC TGGGGTGATTGGTCTTCATGCAGTGAAGTTGTGATGCTGGTCTTATTCAAAGATCACGAGCATGCTCAGTTCTTACCA

1791 I G A G D D C I G N T T Q T L P C K L F D C P | K S C A I A K
5491 ATAGGGGCTGGTGTGATGATTGATTGGCAACACTACGCAAACTCTCCGTGTAAC TGTGTTGACTGTCCAAAATCATGTGCTATTGCTAAA

1821 R C N C S Q V K Q W S S V P T F D Q F Q S R G L T L G G I E
5581 CGCTGCAACTGTTCTCAAGTTAAACAATGGTCTTCTGTTCCTACATTTGACCAATTTCAATCAAGAGGCTTAACTCTCGGAGGAATTGAA

1851 T V L G Y L S S Y G D D T V D K A C Q A C N T M M L T T L R
5671 ACCGTGCTTGGATATTTAAGTTCATACGGAGATGATACTGTTGATAAAGCATGTCAAGCTTGCAACACTATGATGTTAAACCATTTGAGA

1881 S N V A D Q L T Q A K A A R A K L E L I K N D L R D V I Y C
5761 TCGAATGTTGCTGATCAGTTAACTCAAGCTAAGGCTGCAAGAGCAAAACTTGAATTAATTA AAAATGATTTACGTGACGTCACTACTGT

1911 N G V I L N N P G L W N L Y D L L F E R A T M L D G V I I E
5851 AATGGAGTAATTTTGAACAATCCGGGTTTATGGAACCTCTACGATTTATTATTTGAGCGAGCAACCATGTTAGACGGGGTTATTATAGAG

1941 L N A I Y L R F D A A L T S C Q S Y G W I H Q T F K T I L R
5941 TTAACGCTATTTACTTACGTTTTGATGCTGCGTTGACTTCTGTCAATCGTACGGTTGGATACATCAAACCTTCAAACAATTTTACGC

1971 K C T F *
6031 AAATGCACCTTTTAAaatgatttttttaaaatacatatacatagcttttttctattttcttactgaatgcaatatgtgtaaaactaaacacat

6122 ttattcaatcttgattttttatgtatgcaactatttagtcattaattttttaagttacaatatagtaaaaaaa

Abbildung A.9. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *hychdlΔIGFBP*. Hellblau=N-terminaler HyChdl-Bereich, das Signalpeptid ist umrandet; grün=myc-tag; lila=Follistatin-like; hellgrün=unbekannter Repeat-Typ; gelb=van Willebrand Faktor C-Domäne (vWC); hellgelb=divergente vWC.

hychdlΔIGFBP

BamHI

1 | M K L L L L Q L L F F G V Y S K
1 | GATCCTGGTACCATGAAACTGTTACTTTTGCAATTATTATTCTTTGGAGTTTACAGCAA

17 | P A T K V I L D A S D K T C P P C N R F
61 | CCCGCTACAAAAGTAATTCTAGATGCATCTGATAAACCTGTCTCCCTGCAATCGATTT

37 | K A M E Q K L I S E E D L N E M E Q K L
121 | AAAGCTATGGAGCAAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAAAGCTC

57 | I S E E D L N E M E Q K L I S E E D L N
181 | ATTTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAAT

77 | E M E Q K L I S E E D L N E M E S L G D
241 | GAAATGGAGCAAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGACTTGGGCGAC

EcoRI

97 | L T M E Q K L I S E E D L N S G R C E T
301 | CTCACCATGGAGCAAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATTCAGGGCGCTGTGAGACA

117 | E L C S S T T C G R H Q W C K V D N E L
361 | GAGCTTTCAGCAGTACAACATGCGGAAGGCATCAGTGGTGTAAAGTTGATAATGAGTTA

137 | P T C F C R N D C E S D E E K L C D N D
421 | CCAACATGTTTTTCAGAAAATGACTGTGAATCGGATGAAGAAAAGTTGTGTGATAATGAT

157 | G N K Y K N I C E L R S K E C K L Q Q K
481 | GGTAATAAGTATAAAAACATATGTGAACTGCGCAGTAAAGAATGTAAACTCCAACAAAA

177 | I P H F S C K D C Q R T A E S K L E T I
541 | ATTCCGCACTTTTCATGCAAAGATTGCCAACGTACTGCAGAAAAGTAAATTAGAAACAATT

197 | E S G V V L N T S R M C E K E E C V N G
601 | GAGTCTGGTGTGTTCTAAACACATCCAGGATGTGTGAAAAAGAAGAATGTGTAAATGGG

217 | V F K V S L D N T C L K A E G F T C S E
661 | GTATTTAAAGTATCATTAGACAATACTTGTTTAAAGGCAGAAGTTTTACTTGTTCGGAA

237 | G S N I H Q D I T C P V G Y Y C N I T K
721 | GGTTCAAACATTCATCAGGATATCACCTGCCAGTAGGATATTACTGTAATATAACAAAA

257 | L E L N P E Y G Y P N L G Q C S A I D S
781 | TTAGAGCTTAACCTGAGTATGGATATCAAATCTTGGACAATGTCTGCAATTGATAGC

277 | S E V C K L A P D T G A C Y A Y F P R W
841 | TCTGAAGTTTGTAAACTTGCACCAGATACTGGTGCTTGGCTACGCTATTTTCCAAGATGG

397 | H F D I S T G T C K E F I Y G G C Q G N
901 | CATTTTGACATTTCTACTGGTACTTGCAAAAGAGTTTATTTATGGTGGTTGCCAGGGTAAC

317 | K N N F K S K D E C L R L C G D R D K P
961 | AAAAATAATTTCAAGTCAAAGATGAATGTCTTAGATTGTGTGGAGATAGAGATAAGCCT

337 | L A A M P M N A F P F V G M P M F P F A
1021 | TTAGCAGCAATGCCAATGAATGCGTTTCTTTTGTGGGTATGCCAATGTTTCTTTTGTCT

357 | G K V Q E R P M S D K S M T I S G L V I
1081 | GGCAAAGTCCAGGAAAGACCAATGAGTGATAAATCAATGACCATAAGTGGATTAGTTATT

Abbildung A.9. Fortsetzung 1 von *hychdl*Δ*IGFBP*.

377 L P Q T I Q I P P K S C L V V H F Q D V
 1141 TTACCACAAACCATCCAAATTCCTCCAAAATCGTGTTAGTTGTTTCATTTCCAAGATGTC

 397 T L A D V A S R I I A T Q I V H F S E V
 1201 ACTTTAGCAGATGTTGCATCCCGATTATAGCTACTCAAATTGTACATTTTTCTGAGGTC

 417 T T K D V I D Y K I N S K M P L P E D I
 1261 ACCACTAAAGATGTAATTGATTATAAGATTAATAGTAAGATGCCCTTACCAGAAGATATC

 437 G R I Y S V R A F L N I G W C S R T V D
 1321 GGTAGAATATACTCTGTTAGAGCATTCTAAACATTGGTTGGTGCAGCAGAACAGTAGAT

 457 D G R S I Q K K D Y L S D E R T T V M L
 1381 GATGGTAGATCTATTCAAAGAAAGATTATCTTTCAGATGAGAGAACCACAGTTATGTTA

 477 S N D K D E Y I K D I T I K C Y D C D K
 1441 AGTAATGACAAAGATGAATATATAAAAGATATTACTATAAAATGTTATGACTGTGATAAA

 497 T D L L T D I Q M G F P M E E P E F E L
 1501 ACAGATTTGCTTACTGATATACAAATGGGATTTCCAATGGAAGAACCTGAATTTGAACTA

 517 E K K E E S D F S G D D D T D S K F P Y
 1561 GAAAAGAAAGAAGAAATCTGATTTTAGTGGTGATGATGATACGGATTCCAATTTCTTAT

 537 D G P Q M S S T V I E I R G S V K F S N
 1621 GATGGACCTCAAATGAGCAGCACTGTGATAGAAATAAGAGTTTCAGTTAAATTTCTCTAAT

 557 I T E S V L K K D S C L W I S L S D V T
 1681 ATCACTGAAAGTGTATTAAGAAAGATTCTTGCCTTTGGATCTCTTTGAGTGATGTCACA

 577 L Q D A K S I T L S S T F M D M S F Y K
 1741 TTACAAGACGCAAATCTATAACTCTTTCTTCAACATTTATGGATATGTCGTTCTACAAA

 597 V G K S I Q Y V L Q S M K P M N E E L S
 1801 GTAGGTAAGTATTCAATATGTTCTTTCAGTCAATGAAACCGATGAATGAAGAATTGAGT

 617 R T Y V V Q A V L N N G W C Y K K G S D
 1861 CGTACTTATGTGGTTCAAGCTGTCTTAAATAACGGATGGTGTATAAAAAAGGTTTCAGAT

 637 K W L K K G D F L N T V T H T I N L N K
 1921 AAATGGCTCAAAAAGGGGATTTTTTAAATACAGTAACCCACACTATTAATCTAAATAAG

 657 E S N S Y N L D V N V I C Y E C E T K E
 1981 GAATCAAACAGCTATAATTTAGATGTAAACGTAATATGCTATGAATGTGAAACCAAAGAA

 677 D L S S A S K S L N N G N E M M W V N G
 2041 GATTTATCATCGGCCTCAAAATCTCTAAATAATGGTAATGAAATGATGTGGGTAATGGT

 697 T L F F P D V P K V N A S S C L I V S F
 2101 ACATTATCTTTCTGATGTACCTAAAGTCAATGCATCGTCTTGCTTGATAGTTTCATTC

 717 R D V S I A D Y K S K T L A M L V L S V
 2161 AGAGATGTTTCTATTGCTGATTATAAGTCAAAAACCTCTCGCCATGCTTGTGTTAAGCGTA

 737 S Q F K D K E Y N Y V L Q I K K P S D L
 2221 TCACAATTTAAAGACAAAGAATATAACTATGTTCTCCAGATAAAAAAGCCATCCGATTTA

 757 S G R F S V H A V L N V N W C S S D S S
 2281 TCTGGACGTTTTAGTGATGATGACTAAATGTAACTGGTGCTCGTCAGATTCATCT

Abbildung A.9. Fortsetzung 2 von *hychdlΔIGFBP*.

777 Q K W I E K G D Y L T V T S Y Q V D L K
 2341 CAAAAATGGATTGAAAAAGGAGACTACTTGACAGTTACTTCTTACCAAGTTGATCTTAAA

 797 E N T N T Y S Q D V H L I C Y S C I S S
 2401 GAAAATACAAACACTTATAGCCAAGATGTGCACCTAATTTGTTACAGCTGTATATCAAGT

 817 S Q K E D S K K F C L D K K N N I T R K
 2461 TCTCAGAAAGAAGATAGCAAAAAGTTTTGCCTGGATAAAAAAATAACATAACTCGCAAA

 837 H D E T W L A D P C T T C V C D D G F S
 2521 CACGATGAAACATGGCTAGCTGATCCATGTACTACATGTGTGTGTGATGATGGATTTTCA

 857 A C A I K S C V S N C P T P I P K P G E
 2581 GCCTGTGCAATTAAGTTGTGTGTCTAACTGCCCTACACCAATTCCAAAACCAGGAGAA

 877 C C S Q C S S T C L Y E N K F Y N E G D
 2641 TGTGTTCTCAATGCTCAAGTACATGTTTATATGAAAATAAATTTTACAATGAAGGAGAT

 897 E W S P D S C T K C N C I N G E K L C S
 2701 GAATGGTCCCCAGATTCATGTACTAAATGCAATTGCATTAATGGGGAGAAATTATGCTCA

 917 V V D C L P D S M L P C K N P V L I E G
 2761 GTTGTGATTGTCTACCAGATAGCATGTTGCCGTGCAAAAATCCTGTGTTGATAGAAGGT

 937 N C C R S C P I L M S S P V K Q E C F Y
 2821 AATGTTGCAGATCATGTCCATACTGATGCATCACCAGTAAAAACAAGAATGTTTCTAT

 957 E Q T N K T Y Q D G D E W T S P D F C A
 2881 GAACAAACAAACAAACTTATCAAGATGGTGATGAGTGGACTTCGCCAGATTTTTTGCCT

 977 S C V C D K G N T M C A T P M C A L P P
 2941 TCATGTGTTTTGTGACAAAGGTAATACCATGTGTGCAACACCAATGTGTGCTTTACCTCG

 979 C S E D K I I N I P G R C C P I C P E T
 3001 TGCTCAGAAGATAAGATAATTAATATCCAGGCAGATGTTGCCCTATTTGTCCCTGAGACA

 1017 N V C K D L N T N R A Y T E G E I W Q N
 3061 AATGTTTGTAAAGACCTTAACACCAATCGAGCATATACTGAGGGAGAAATATGGCAAAAT

 1037 S D C N V C R C T S N D T V C E K P L A
 3121 TCAGATTGTAATGTTTGTAGATGTACTTCAAATGACACAGTTTGTGAAAAACCATTAGCT

 1057 D Y E S C E N K V K L T K N C P A F C F
 3181 GATTATGAAAGTTGTGAAAACAAGGTTAAGTTAACAAAAAATTGTCTGCATTCTGCTTT

 1077 I E T D S K P K C E D S S N Y Y S V G Q
 3241 ATTGAAACGGACAGCAAGCCTAAATGTGAAGATAGTAGTAATTATTACTCAGTCGGACAA

 1097 E I E R D C N K C I C V E Q G K W E C T
 3301 GAAATAGAAAGAGATTGCAATAAATGTATATGTGTTGAGCAAGGCAAATGGGAATGTACT

 1117 K R S C P I M I E G L P S G A T D E A E
 3361 AAACGTAGTTGTCCATTTATGATAGAGGGCTTACCATCTGGAGCAACAGATGAAGCTGAA

 1137 V A D D G P *
 3421 GTAGCAGATGATGGTCCATGAC|

XhoI

Abbildung A.10. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *hychdlΔNlinker*. Hellblau=N-terminaler HyChdl-Bereich, das Signalpeptid ist umrandet; grün=myc-tag; gelb=van Willebrand Faktor C-Domäne (vWC); hellgelb=divergente vWC.

hychdlΔNlinker

BamHI

1 | D P G T M K L L L L Q L L F F G V Y S K
 1 | GATCCTGGTACCATGAACTGTTACTTTTGCAATTATTATCTTTGGAGTTTACAGCAA

17 | P A T K V I L D A S D K T C P P C N R F
 61 | CCCGCTACAAAAGTAATTCTAGATGCATCTGATAAACCTGTCCCTCCTGCAATCGATTT

37 | K A M E Q K L I S E E D L N E M E Q K L
 121 | AAAGCTATGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAAGCTC

57 | I S E E D L N E M E Q K L I S E E D L N
 181 | ATTTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAAT

77 | E M E Q K L I S E E D L N E M E S L G D
 241 | GAAATGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGAGCTTGGGCGAC

EcoRI

97 | L T M E Q K L I S E E D L N S Q K E D S
 301 | CTCACCATGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATTCTCAGAAAGAAGATAGC

117 | K K F C L D K K N N I T R K H D E T W L
 361 | AAAAAGTTTTGCCTGGATAAAAAATAACATAACTCGCAAACACGATGAAACATGGCTA

137 | A D P C T T C V C D D G F S A C A I K S
 421 | GCTGATCCATGTACTACATGTGTGTGTGATGGATTTTCAGCCTGTGCAATTAAGT

157 | C V S N C P T P I P K P G E C C S Q C S
 481 | TGTGTCTAACTGCCCTACCAATTCCAAAACCAGGAGAATGTTGTTCTCAATGTCTCA

177 | S T C L Y E N K F Y N E G D E W S P D S
 541 | AGTACATGTTTATATGAAAATAAATTTTACAATGAAGGAGATGAATGGTCCCCAGATCA

197 | C T K C N C I N G E K L C S V V D C L P
 601 | TGTACTAAATGCAATTGCATTAATGGGGAGAAATTATGCTCAGTTGTTGATTGTCTACCA

217 | D S M L P C K N P V L I E G N C C R S C
 661 | GATAGCATGTTGCCGTGCAAAAATCCTGTGTTGATAGAAGTAATTGTTGCAGATCATGT

237 | P I L M S S P V K Q E C F Y E Q T N K T
 721 | CCTATACTGATGTCATCACCAGTAAAAACAAGAATGTTTCTATGAACAAAACAAAAC

257 | Y Q D G D E W T S P D F C A S C V C D K
 781 | TATCAAGATGGTGTGAGTGGACTTCGCCAGATTTTTCGCTTCATGTGTTGTGACAAA

277 | G N T M C A T P M C A L P P C S E D K I
 841 | GGTAAATCCATGTGTGCAACACCAATGTGTGCTTTACCTCCGTGCTCAGAAGATAAGATA

297 | I N I P G R C C P I C P E T N V C K D L
 901 | ATTAATATTCAGGCAGATGTTGCCCTATTTGCTCCTGAGACAAATGTTGTAAAGACCTT

317 | N T N R A Y T E G E I W Q N S D C N V C
 961 | AACACCAATCGAGCATATACTGAGGGAGAAATATGGCAAAATTCAGATTGTAATGTTTGT

337 | R C T S N D T V C E K P L A D Y E S C E
 1021 | AGATGTACTTCAAATGACACAGTTTGTGAAAAACCATTAGCTGATTATGAAAGTTGTGAA

357 | N K V K L T K N C P A F C F I E T D S K
 1081 | AACAGGTTAAGTTAACAAAAAATGTCCTGCATTCTGCTTATTGAAACGGACAGCAAG

377 | P K C E D S S N Y Y S V G Q E I E R D C
 1141 | CCTAAATGTGAAGATAGTAGTAATTATTACTCAGTCGGACAAGAAATAGAAAAGAGATTC

397 | N K C I C V E Q G K W E C T K R S C P I
 1201 | AATAAATGTATATGTGTTGAGCAAGGCAATGGGAATGTAATAACCTAGTTGTCTTATT

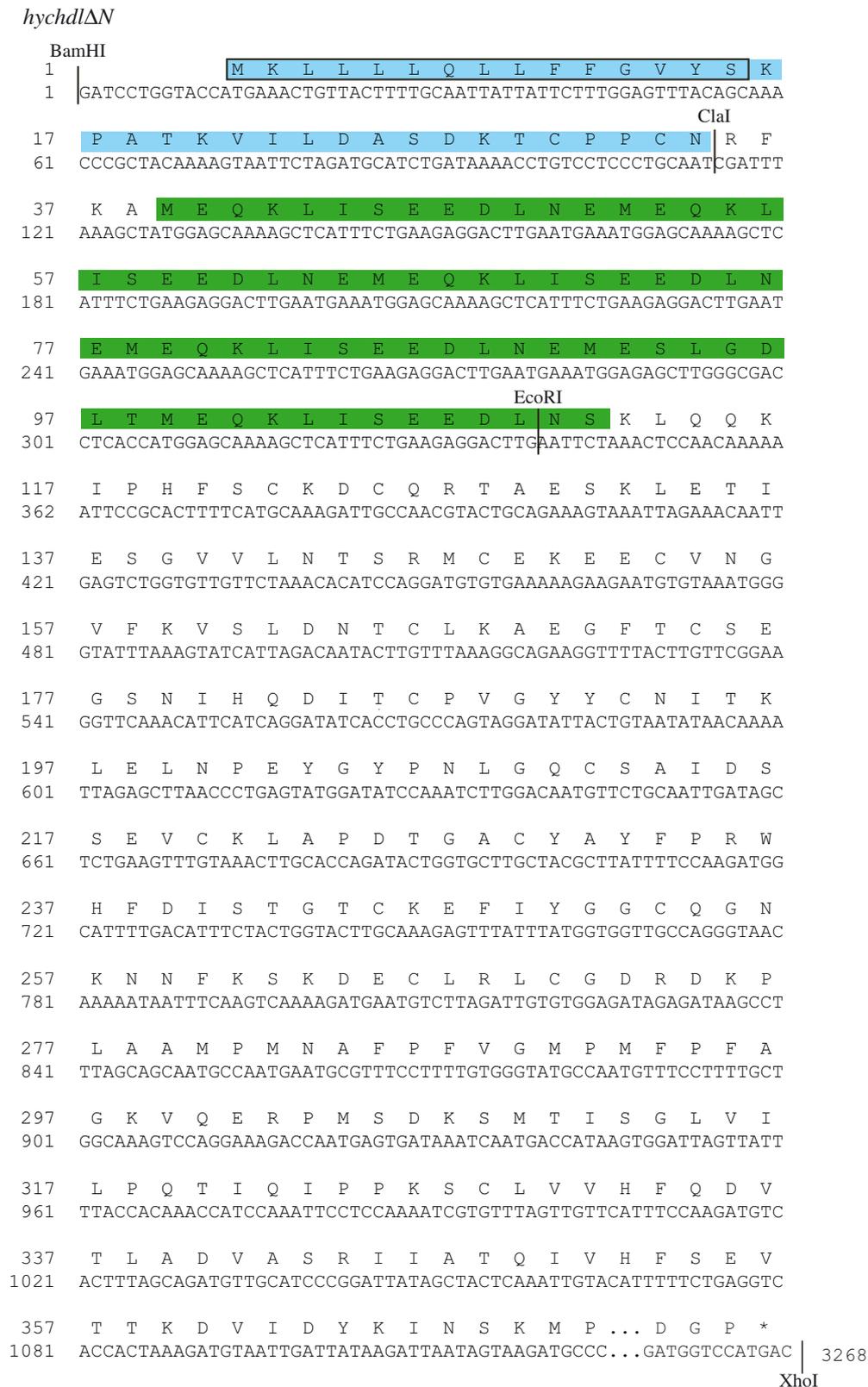
417 | M I E G L P S G A T D E A E V A D D G P
 1261 | ATGATAGAGGGCTTACCATCTGGAGCAACAGATGAAGCTGAAGTAGCAGATGATGGTCCA

437 | *
 1321 | TGAC |
 XhoI

Abbildung A.11. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *hychdl*Δ*NFol*. Hellblau=N-terminaler HyChdl-Bereich, das Signalpeptid ist umrandet; grün=myc-tag; violett=IGFBP. Die Darstellung ist verkürzt; siehe A.9.



Abbildung A.12. Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *hychdl*Δ*N*. Hellblau=N-terminaler HyChdl-Bereich, das Signalpeptid ist umrandet; grün=myc-tag. Die Darstellung ist verkürzt; siehe A.9.



```

XlCR2 CSFEG--QLRAHGSRW-APDYDR-----KCSVCSQ-----KRTVICDPV--CPP-LNCSQP--VHLPDQCCPVC
XlCR1 CTFGG--KFYSLEDSW-HPDLGEPFGVM-HCVLCYCE-PQRSRRGKPSGKVSCKNIKHDPS-PSGANP--LLLPLHCCKTC
XlCR4 CRFGR--HWYPNHERW-HP-TVPPFGEM-KCVTCTCA-----EGITQRRQE--CTG-TTCGTG---SKRDRCCCKC
XlCR3 CFFDGDERSWKAAGTRW-HP-FVPPFGLI-KCAICTCK-----GSTGEVHCEKVT--CPK-LSCTNP--IRANPSDCCKQC
DrCR1 CSFEG--RFYSLEDTW-HPDLGEPFGVM-HCVMCHCE-PQRSRRGKVFVKVSCRNMKQDCPD-PTCDDP--VLLPGHCCKTC
DrCR2 CFFEG--EQHTHGSOW-TPQYN-----TCFTCTCQ-----KKTVICDPVM--CPT-LSCTHT--VQPEDQCCPIC
DrCR3 CYFEGDQKMHPGTW-HP-FVPPFGLI-KCAVCTCK-----GSTGEVHCEKVT--CPP-LTCSR-IRRNPSCCKEC
DrCR4 CKFGK--NYYQNSEHW-HP-SVPLVGEM-KCITCWCD-----HGVTKCQRKQ--CPL-LSGRNP--IRTEGKCCPEC
HsCR1 CTFGG--KVYALDETW-HPDLGEPFGVM-RCVLCACEAPQWGRRTGPGRVSCCKNIKPECPT-PACGQP--RQLPGHCCKQC
HsCR2 CFFEG--QQRPHGARW-APNYDP-----LCSLCTCQ-----RRTVICDPVV--CPP-PSCPHP--VQAPDQCCPVC
HsCR3 CYFDGDRSWRAAGTRW-HP-VVPPFGLI-KCAVCTCK-----GGTGEVHCEKVQ--CPR-LACAQP--VRVNPDCCKQC
BfCR1 CRFAG--QWFPEQSW-HP-SVPPFGEM-SCITCRG-----AGVPHCERDD--CSLPLSCGSG---KESRCCSRC
BfCR2 CSFEG--NYYGMREBW-HPDLGEPFGVM-FCIRCRV--QTSRKGKVDGRVSCCKNIKKECPK-LTCPNP--VLNPKQCCSTC
BfCR3 CYFEG--EYHGHGSTW-VPAYDE-----KSTCKCQ-----KSTVICDPVA--CPQ-PDCYNP--VIPEGECCKPK
BfCR4 CYFDGDKKFHGYGEEW-HP-YVPPFGLI-KCAICVCE-----KGTNQVTCNRVR--CPV-LRCKTP--IRVNPDCCKQC
SkCR1 CRFAG--DTHQNGESW-NP-KVPPFGVM-KCIQCVC-----NGTADCRPK--CDK-LNCNPSDVVKEDGECCPRC
SkCR2 CSFEG--NFYEFHETW-NPDLGDPFGVM-LCVRCTCE--RVVKGELMGQVSCRNIKNECPKELPCDEP--ILPEGECCKRC
SkCR3 CYFES--EYHVDGSSW-SPKFDK-----KSTCTCT-----RLAVICDPVV--CPT-LNCSSP--VELPEECCPVC
SkCR4 CFFEGDKKFHAMGSTW-HP-YVPPFGYM-KCALCKM-----PGNQVNSKIR--CPE-LHCDAP--VRLNPMDCCKQC
HvCR1 CYVVK--RRYEADEEW-VPEINGASSPTSRCIRCQCK-----EGKATCKLRK--CPK-TDCENE--MYIDGECCKPIC
HvCR2 CLDKKNNITRKHDETW-LAD-----PCTTCVCD-----DGFSAKAIS--C--VSNCPPT--IPKPEGECSSQC
HvCR3 CLYEN--KFYNEGDEW-SPD-----SCTKNCI-----NGEKLCSVVD--CLPDSMLPCKNPVLEIGNCCRSC
NvCR1 CFYEQTNKTYQDGDWTSDF-----CASCVC-----KGNMTCATPM--CAL-PPCSEDKIINI-PGRCCPIC
NvCR2 CSFRL--RHYKIGDTW-HPPELYP-FGIQ-RCVLCSCI--KDSKRQGSYKGLACQSTRHRCPR-SACTNP--IYKPNQCCPTC
NvCR3 CVENG--ERYFNGEVW-SPSHDP-----ICTTCSCK-----DATVSCFPVV--CLP-LNCSEQ-LIMMPERCCPVC
NvCR4 CFVEQKGFYPSGAVW-HP-YASPFGYM-KCTVCTCK-----AETNEITWNNIQ--CPR-LDCPKP--FKMHPSCCAQC
NvCR4 CKFGQ--NTYPNNARW-TP-YLPPFGLI-KCVTCCQ-----NGRSSCSTVT--CPA-GHCKTS-LDSLKSCCVPC

```

Abbildung A.13. Muscle-Alignment der cysteinreichen vWC-Domänen aus Chordin (CR1–4). Mensch=Hs, (*Xenopus laevis*)=Xl, (*Danio rerio*)=Dr, *Branchiostoma floridae*=Bf, *Saccoglossus kowalevskii*=Sk, (*Nematostella vectensis*)=Nv und *Hydra vulgaris*=Hv. 60–100 % Konservierung ist durch graue und schwarze Schattierung dargestellt.

Danksagung

Ohne die Unterstützung vieler Menschen im Kleinen und Großen wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Zeilen heute zu schreiben — ich danke euch von Herzen!!!

Ich möchte mich namentlich und besonders bedanken bei:

- Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas W. Holstein für die Möglichkeit und Ermutigung, diese Arbeit unter seiner Betreuung zu beginnen, weiterzuführen und schließlich erfolgreich zu beenden. Besonders zu schätzen weiß ich sein stetes Vertrauen, seine immerwährende Unterstützung in allen Bereichen sowie seine Kompetenz und den unerschöpflichen Einfallsreichtum in wissenschaftlichen Fragen. Die wilden paper-Tage haben Spaß gemacht!!!
- Dr. Bert Hobmayer und Dr. Ulrich Technau. Mein ganz besonderer Dank für eure Begleitung während meiner Doktorarbeit, auch nachdem ihr *Hydra & Nematostella* ein neues Zuhause in Innsbruck bzw. Bergen gegeben habt. Dank euch für immerwährende Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion und Unterstützung, für Gespräche im *Hydra*-Raum und das gelegentliche, leider viel zu seltene, gemeinsame Bier.
- Dr. Heiko A. Schmidt für seinen Beitrag zur Dickkopf-Phylogenie und seine sonstige Unterstützung im Baum-Dschungel.
- Allen früheren und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Holstein. In guten wie in schlechten Zeiten habt ihr mir geholfen und eine außerordentlich angenehme, humorvolle Atmosphäre im Labor wie auch bei den gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors entstehen lassen. An Dirk, Tanju und Annekatrin: Danke für eure Arbeit, Kritik, Anregungen, das Lob und Durchhaltevermögen.
- Den Menschen, die ich durch die Arbeit kennenlernen durfte und die mir durch ihre Persönlichkeit über die wissenschaftliche Begegnung hinaus ihre Unterstützung und gemeinsame Zeit gegeben haben: Bianca, Edi, Holger, Melanie, Rita, Stefan S., Stefan T.. Besonders danken möchte ich Isa für geteilte Freude und geteiltes Leid beim Promovieren sowie ihr und Stefan S. für das Lesen dieser Arbeit.
- Meinen Freunden außerhalb des Uni-Lebens, mit deren Hilfe ich mir den genauso wichtigen 'Rest' der Welt bewahrt habe und die mir immer zur Seite standen. Mein besonderer Dank an Boni für die \LaTeX -Unterstützung.
- Meinen Eltern, die immer an mich glauben und mir meine Ausbildung ermöglicht und alle erdenkliche Unterstützung gegeben haben.
- Meinem Freund Patrick für seine Geduld und große emotionale wie wissenschaftliche Unterstützung in der Endphase meiner Doktorarbeit, die hilfreichen Diskussionen zu jeder Uhrzeit sowie die konstruktiven Korrekturen an der Arbeit.
- Den Schokoladenherstellern dieser Welt.

Lebenslauf

Name	Corina Guder
Wohnort	Bergheimer Straße 38, 69115 Heidelberg
Geburtstag	26. April 1976
Geburtsort	Dresden
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982–1986	9. Polytechnische Oberschule, Coswig
1986–1989	Leonhard-Frank-Oberschule, Coswig
1989–1992	Martin-Niemöller-Schule, Riedstadt; Realschulabschluß
1992–1995	Prälat-Diehl-Gymnasium, Groß-Gerau
<i>Abschluß:</i>	Abitur

Studium

10/1995–09/2001	Biologiestudium, Technische Universität Darmstadt
<i>Schwerpunkte:</i>	Genetik Molekulare Zell- und Entwicklungsbiologie Biochemie
<i>Abschluß:</i>	Diplom
<i>Diplomarbeit:</i>	'Charakterisierung des trimeren CCAAT-bindenden Transkriptionsfaktors AnCF in <i>Aspergillus nidulans</i> ' angefertigt bei Prof. Dr. Axel Brakhage, Technische Universität Darmstadt und Universität Hannover
11/2001–02/2007	Promotionsstudium am Institut für Zoologie der TU Darmstadt, Abteilung Zell- & Entwicklungsbiologie, sowie am Institut für Zoologie, Universität Heidelberg, Abteilung Molekulare Evolution & Genomik

Publikationen	Guder C. , Pinho S., Nacak T.G., Schmidt H.A., Hobmayer B., Niehrs C., Holstein T.W. (2006) An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in <i>Hydra</i> . <i>Development</i> 133:901–911.
	Guder C. , Philipp I., Lengfeld T., Watanabe H., Hobmayer B., Holstein T.W. The Wnt code: cnidarians signal the way. Review. <i>Oncogene</i> 25:7450–7460
	Rentzsch F., Guder C. , Vocke D., Hobmayer B., Holstein T.W. An ancient chordin-like gene in organizer formation of <i>Hydra</i> . Akzeptiert.

Förderungen

2001–2004	Kollegiatin im Graduiertenkolleg 340 "Kommunikation in biologischen Systemen: Vom Molekül zum Organismus in seiner Umwelt", TU Darmstadt
------------------	--
