

Ergebnisse

1. Identifikation neuer Klasse II basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Faktoren in *Hydra*

Auf der Suche nach neuen gewebe- und zelltypspezifischen (Klasse II) bHLH Homologen in *Hydra* erwiesen sich ein Hefe-*Two Hybrid Screen* (THS) und Datenbank-Analyse als die erfolgreichsten Methoden zur Identifizierung unbekannter Homologe.

1.1. Identifikation mittels heterologem Hefe-Two Hybrid Screen (THS)

1.1.1. Daughterless Köderhybrid und Selbstaktivierungskontrollen

Das Hefe THS-Verfahren ist eine etablierte Methode zur Identifizierung von Proteininteraktionspartnern (Fields *et al.*, 1989; Chien *et al.*, 1991; Fields *et al.*, 1994; Gietz *et al.*, 2002), welches neben PCR zur Identifizierung und Klonierung vieler Klasse II bHLH führte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem ubiquitär exprimiert (Klasse I) bHLH Daughterless (Da) aus *Drosophila* nach potentiellen Klasse II bHLH Interaktionspartnern gesucht. Das besondere Interesse galt dabei Proteinen, die an der Spezifizierung von interstitiellen -Zellen (I-Zellen), insbesondere den neuronalen Differenzierungsprodukten (Nerven- und Nesselzellen), beteiligt sein könnten. Obwohl es sich bei dem verwendeten Köderhybrid um ein *Drosophila* Protein handelte, konnte durch seinen erfolgreichen Einsatz in *Podocoryne carnea* demonstriert werden, dass die Konservierung des verwendeten Klasse I bHLH-Ködermotives spezieübergreifende Proteininteraktionen mit bHLH-Proteinen ermöglichte (Müller *et al.* 2003; Seipel *et al.* 2004). Leider konnte zu Beginn des Projektes nicht auf ein entsprechendes *Hydra*-Homolog zurückgegriffen werden, da weder klonierte *Hydra Daughterless/E12/E47* Homologe noch *Hydra* Sequenzdaten zur Verfügung standen. Außerdem erwies sich die Isolierung von bHLH-Homologen durch PCR als extrem problematisch. Aus diesen Gründen wurde der THS heterolog durchgeführt, wobei nicht die Protein-Protein-Interaktionen mit *Drosophila* Daughterless, sondern die Identifizierung neuer bHLH-Proteine im Vordergrund standen.

Nach erfolgreicher Transfektion von YRG2 Hefen mit dem Köderkonstrukt *pBD-Da* (Müller *et al.*, 2003) und Bestätigung des „Köder“-Phänotyps (Wachstum auf SD - WU, kein Wachstum auf SD - HU, SD - LU, SD - WLU, SD - HWLU), musste eine unspezifische Interaktion (Selbstaktivierung) des Köderkonstruktes *pBD-Da* mit der unfusionierten GAL4 Aktivierungsdomäne ausgeschlossen werden. Nachdem *pBD-Da*-Hefen mit *pAD-„leer“* (nicht fusionierte GAL4 Aktivierungsdomäne) transfiziert waren, konnte die Anwesenheit beider Plasmide durch Wachstum auf SD - WLU Medien bestätigt werden. Die Hefen zeigten jedoch keine Aktivierung

der beiden Interaktions-Reportersystem: Sie konnten nicht auf Histidin-freiem Medium (SD - HWLU) wachsen (Repostersystem I) und zeigten keine Blau-Färbung im „Filter-Lift“-Test (Reportersystem II) gegenüber mitgeführten Positivkontrollen (K⁺1: *pGAL4* Hefen, konstitutiv aktive β -Galactosidase; K⁺2: *pBD-Catenin/pAD-Cadherin*, bekannte positiv Interaktion). Nach Ausschluss von Selbstaktivierung der Reportersystem durch das Köderkonstrukt allein, wurden *pBD-Da* Hefen für den THS vermehrt und bis zum Gebrauch in regelmäßigen Abständen auf neue Medien überimpft.

1.1.2. Identifizierung von *pBD-Da* Interaktionspartnern

Nach Konvertierung der *Hydra* spezifischen Hefe-Two Hybrid Bibliothek (SAII) von der Phagemid- in die Plasmidform (*pAD::SAII*) wurden *pBD-Da* Hefen (Köderhefen) nach „High-Efficiency“ Protokoll transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion wurde jeweils ein Aliquot doppelt transfizierte Hefen auf SD-WLU Medium überführt und zur Effizienzbestimmung ausgezählt. Auf diese Weise wurden eine Zahl ca. 500.000 durchgemusterter *Hydra* cDNA-Klonen ermittelt, von denen 235 Wachstum auf Selektivmedium für Interaktion (SD-HWLU) zeigten. Von diesen primär-positiven Klonen konnten 88 durch Blaufärbung im β -Galactosidase Filter-Lift und durch Wachstum in Gegenwart von 3 Aminotriazol (SD-HWLU^{+3-AT}) bestätigt werden.

Nach Isolierung der jeweiligen *pAD::SAII* Plasmide und Sequenzierung durch die Firma GATC (Konstanz) konnten 82 auswertbare Sequenzen ermittelt werden, die im Anschluss weiter mit *blastX* analysiert wurden. Die *blastX* Analyse ergab, dass zu 4 Sequenzen keinerlei Übereinstimmungen in Datenbanken vorlag, während 78 Ähnlichkeit zu bereits bekannten Sequenzen zeigten. Unter diesen 78 positiven Datenbankeinträgen zeigten 44 Sequenzen Homologien mit einer wahrscheinliche Zufallsähnlichkeit (E-Value) zwischen e^{-11} und e^{-120} und 14 Sequenzen E-Values zwischen e^{-4} und e^{-10} , wohingegen die restlichen 20 Sequenzen nur über Übereinstimmungen mit einem E-Value von e^{-1} und darüber verfügten und daher nicht weiter berücksichtigt wurden (siehe Anhang).

Neben den bekannten im THS „Falsch-Positiv“ gewerteten Interaktionen mit ribosomalen Untereinheiten und Hitzeschock-Proteinen, ergab die *blast* Analyse, dass 8 Klone signifikante Ähnlichkeit zu Klasse II bHLH- Proteinen aufwiesen (beste E-Values jeweils zwischen $7e^{-16}$ bis $9e^{-24}$). Weitere Sequenzanalysen und Clustal W Sequenzabgleiche zeigten, dass diese 8 Klone Fragmente eines neuen *Hydra* bHLH repräsentierten, welches durch 5'RACE vervollständigt wurde. Aufgrund der Ähnlichkeit zur Achaete/Scute-Complex (AS-C)- Familie wurde das entsprechende Gen *Like Achaete/Scute* (*hyLiAS*, Genebank Acession: AY 336082) genannt (Bertulat & Holstein, in Vorbereitung). Die genauer Beschreibung erfolgt unter Abschnitt 2 und 3 (S. 20 ff, S. 26 ff), wobei die Bezeichnungen *hyLiAS* und *LiAS* synonym verwendet werden.

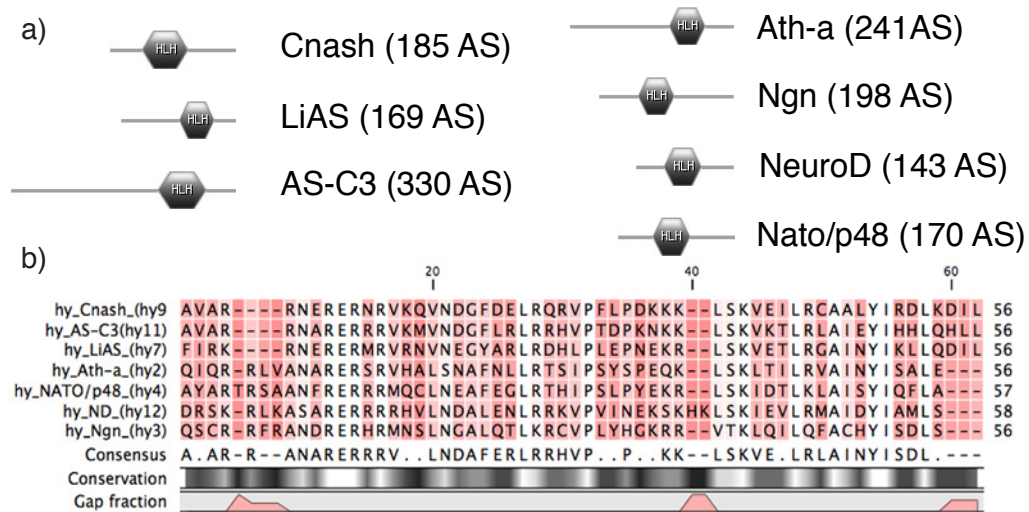


Abb. R1: Schematische Darstellung der *Hydra* AS-C- und ARP- Homologe und Vergleich des konservierten bHLH-Motivs

(a) Alle identifizierten *Hydra* Achaete/Scute-Komplex (AS-C) und Atonal Related Protein (ARP)-Homologe zeigten ein typisches bHLH- Motiv (grau hinterlegt), das durchschnittlich ca. 55 AS betrug. Die Position des bHLH-Motivs und die Länge der Proteine sind in den einzelnen Gruppen proportional dargestellt. *Links: Hydra* AS-C-Homologe; *Rechts: Hydra* ARP-Homologe. (b) Der Sequenzvergleich des konservierten bHLH-Motivs zeigte hochkonservierte (hell) sowie variable (dunkel) Bereiche. Die Mehrheitskonsensussequenz sowie eine zusätzliche graphische Darstellung von Konservierung und lückenhaften Bereichen (*gap fraction*) sind unterhalb der Sequenzen abgegeben.

Zeitgleich mit der beginnenden Charakterisierung von *LiAS* wurden erste *Hydra* EST Daten, gefolgt von genomischen *Hydra*-Sequenzen zugänglich und ermöglichten eine schnelle und gerichtete Suche nach *Hydra* ARP- und AS-C-Homologen. Daher wurde der Daughterless-THS an dieser Stelle zu Gunsten der Datenbankanalysen eingestellt.

1.2. Bestätigung der *LiAS* Sequenzen und Identifizierung weiterer bHLH Faktoren durch Datenbankanalyse

Durch Abgleich mit *Hydra*-Datenbanken konnte die ursprüngliche aus dem Daughterless-THS abgeleitet *LiAS*-Sequenz (*Hydra vulgaris*) ebenfalls mit *Hydra magnipapillata* Sequenzdaten (EST- und Genom-Datenbanken) bestätigt werden. Die ermittelte *LiAS*-Konsensussequenz ergab eine gesamt Sequenzlänge von 509 Nukleotiden (Nt). Dabei entsprach der offene Leserahmen (ORF) 169 Aminosäuren (AS) und enthielt ein typisches bHLH-Motiv von 51 AS, beginnend ab AS 91. Dabei zeigte *LiAS* zwischen den beiden *Hydra*-Stämmen *vulgaris* und *magnipapillata* keine Sequenzunterschiede, weshalb im Weiteren stellvertretend *Hydra magnipapillata* Daten beschrieben werden.

Die bioinformatische Suche nach weiteren *Hydra* AS-C- und ARP-Homologen wurde mit Voll- und Teilsequenzen (gesamt Protein und Abschnitte der bHLH-Domäne) von *Cnash* und *LiAS* durchgeführt. So konnten in den *Hydra* Datenbanken zusätzlich zu *LiAS* ein weiteres AS-C- und 4 ARP- Homologe sowie ein Twist-Homolog identifiziert werden (Abb. R1). Nach Vervollständigung der Sequenzen durch „Contig-Assembly“ wurde für jedes neue bHLH Homolog eine Konsensussequenz

ermittelt, anhand deren genspezifische Primer zur Klonierung aus cDNA erstellt wurden. Anschließend konnten mittels Touch-Down PCR das AS-C-Homolog *Hydra AS-C3* (*hyAS-C3*) und die *Hydra* ARP-Homologe *Hydra NeuroD* (*hyND*), *Hydra Atonal*-Homolog a (*hyAth-a*), *Hydra Neurogenin* (*hyNgn*) und *Hydra Nephew of Atonal/p48* (*hyNato/p48*) vollständig amplifiziert und kloniert werden, während sich die Klonierung des Twist-Homologs *Hydra Scleraxis* (*hyScl*) als problematisch erwies und trotz mehrfacher Optimierungsversuche nicht amplifiziert werden konnte.

2. Charakterisierung der neu identifizierten *Hydra* bHLH-Sequenzen

Alle identifizierten Sequenzen wurden zunächst *in silico* mit verschiedenen bioinformatischen Programmen analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen erlaubten die Zuordnung der neu identifizierten Homologe zu einzelnen bHLH-Familien sowie die phylogenetische Stammbaumrekonstruktion im Vergleich mit anderen bHLH-Homologen. Parallele Bemühungen, das Expressionsmuster der jeweiligen Gene *in vivo* durch RNA *in situ* Hybridisierung (ISH) näher zu charakterisieren, erwiesen sich für einige Gene als problematisch und gelangen nur für *Cnash* und *LiAS* verlässlich.

2.1. Sequenzanalysen und Phylogenie der identifizierten Klasse II bHLH

LiAS und die durch Datenbankanalyse gefundenen bHLH-Proteinsequenzen zeigten signifikante Übereinstimmungen mit Klasse II bHLH Transkriptionsfaktoren (E-Value kleiner als e^{-15}). Allen identifizierten Proteinen war ein konserviertes bHLH-Motiv von 53-56 Aminosäuren gemeinsam, das mit den Programmen *SMART* (Ponting, *et al.*, 1999; Schultz, *et al.* 2000, Schulz *et al.* 1998) und *ProtScan* als c-Myc/Max ähnliches bHLH-Motiv identifiziert wurde (Abb. R1).

Für die weitere phylogenetische Analyse wurde in Anlehnung an Ledent und Vervoort (2001) nur das bHLH-Motiv berücksichtigt, da bHLH-Protein außerhalb des konservierten Motivs zu stark von einander abweichen (Abb. R2 und R3). Die phylogenetische Rekonstruktion erfolgte unter Verwendung verschiedener Außengruppen (E-Protein Daughterless und muskelspezifische Proteine MyoD, *Hydra Scleraxis*) wobei kaum Unterschiede hinsichtlich dem Verzweigungsmuster festgestellt werden konnten. Der in Abbildung R3 (S. 22) stellvertretend gezeigte Stammbaum wurde mit der Außengruppe *Hydra Scleraxis* (*hy_Scl*) mittels *Neighbour Joining* Algorithmus (1000 puzzling steps) rekonstruiert und zeigte deutlich die Zugehörigkeiten der verschiedenen *Hydra*-Homologe zu AS-C- (rote Box) und ARP- (blaue Box) Großfamilien. Unabhängig von den jeweils verwendeten Außengruppe konnten *LiAS*, *AS-C3* sowie *Cnash* anhand familientypischer Unterschiede eindeutig in die Familie der AS-C-Homologe (ASH) eingeordnet werden, ebenso wie *hy_Ath-a*, *Hydra*, *hy-Ngn*, *hy_ND* und *hy_Nato/p48* der ARP-Großfamilie zugeordnet werden konnten.

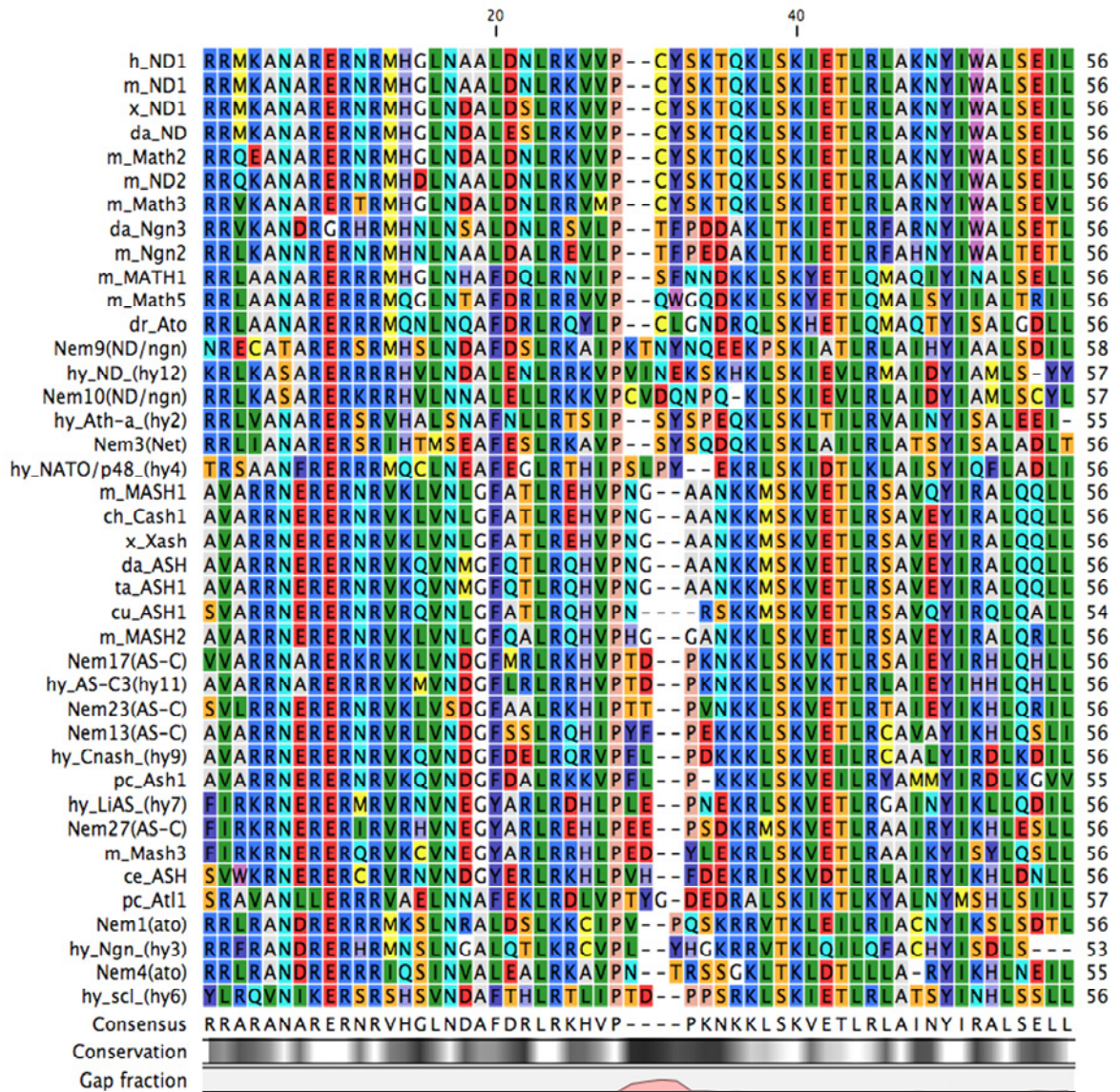


Abb. R2: bHLH-Protein Alignment für die phylogenetische Rekonstruktion von Stammbäumen

Als Grundlage für die Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume wurden repräsentative AS-C- und ARP-Subfamilien (Ato, NeuroD, Ngn) Homologe verschiedener Bilaterier mit Cnidarier-Sequenzen verglichen. Mehrheitskonsensus sowie graphische Darstellung der konservierten Abschnitte und Bereiche mit eingefügten Leerstellen (*Gap fraction*) sind unterhalb des Alignments gezeigt. Dem Proteinnamen wurde jeweils ein Organismenkürzel vorangestellt: Mensch (h), Maus (m), Huhn (ch), *Xenopus laevis* (x), *Danio reio* (da), *Takifugu rubripes* (ta), *Drosophila* (dr), *C. elegans* (ce), *Cupennius salei* (cu), *Nematostella vectensis* (Nem), *Hydra magnipapillata* (hy), *Podocoryne carnea* (pc). Bei *Hydra*-Homologen wurde zusätzlich noch Namen in Klammern die Bezeichnungen von Simionato *et al.* (2007) angegeben und für *Nematostella*-Homologe vollständig übernommen.

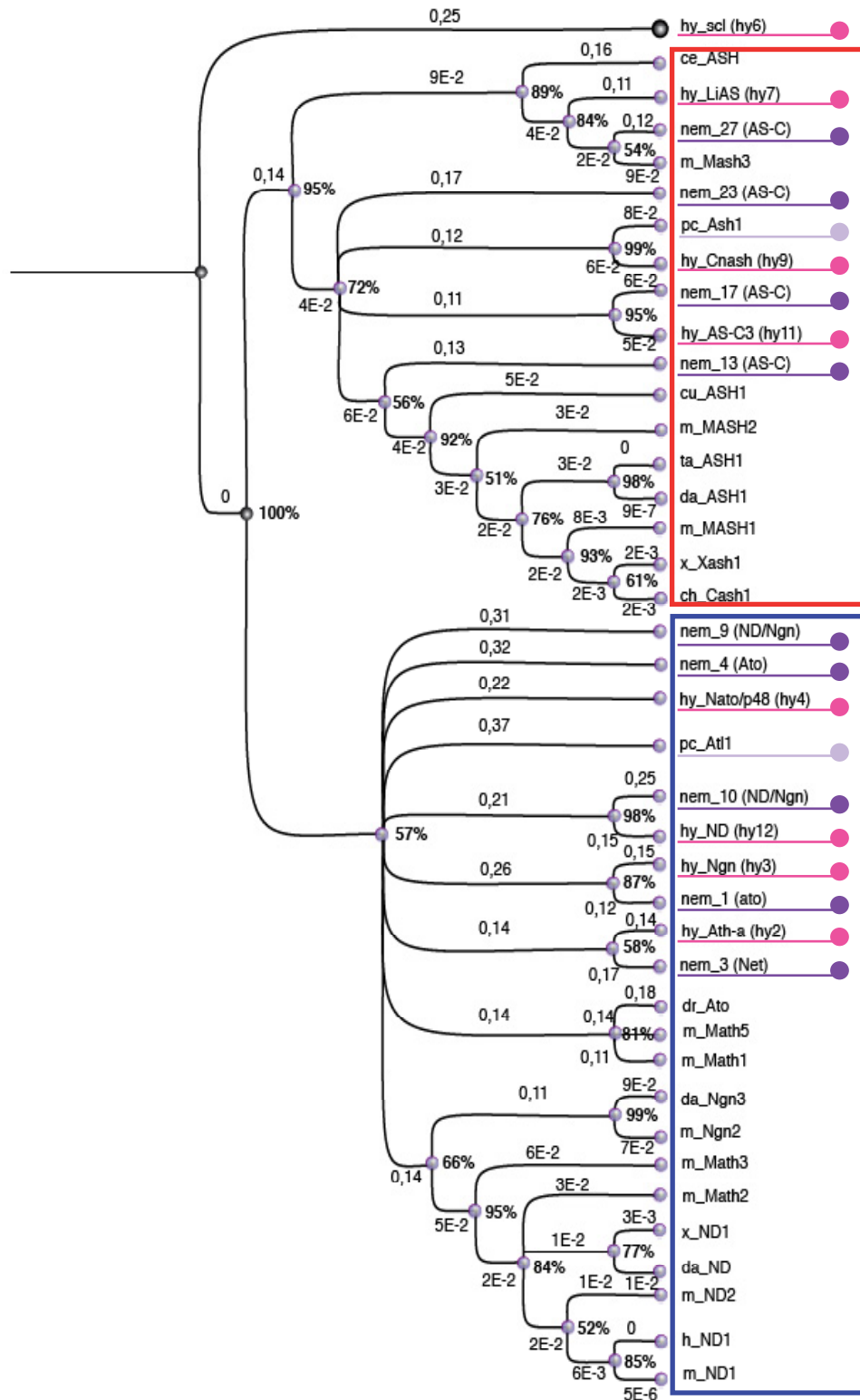


Abb. R3: Neighbour Joining Stammbaum Rekonstruktion von AS-C- und ARP-Homologen

Basierend auf Alignments (Abb. R2) wurde mit der Außengruppe *Hydra*-Scleraxis (hy_Scl) ein phylogenetischer Stammbaum der AS-C- und ARP-bHLH-Motive erstellt. Die Unerstützung der jeweiligen Knotenpunkte ist in Potenzen angegeben, Substitutionsraten der jeweiligen Zweige sind als Potenzen aufgelistet. Cnidarier-Sequenzen wurden farbig hervorgehoben (*Hydra*: pink; *Nematostella*: violett; *Podocoryne*: grau), AS-C- und ARP-Familienmitglieder sind rot bzw. blau umrandet.

Bei näherer Betrachtung ließ der Stammbaum mit einer Knotenwahrscheinlichkeit von 95% zwei Schwestergruppen innerhalb der AS-C-Gruppe erkennen. In die eine, tiefer abspaltende Gruppe fielen LiAS (hy7 nach Simionato *et al*, 2007) zusammen mit Maus Mash3, *Nematostella* AS-C #27 und *C.elegans* ASH, in die andere Gruppe alle übrigen Bilaterier AS-C-Homologe, mit den Cnidarier (*Nematostella vectensis*, *Podocoryne carnea*, *Hydra magnipapillata*) Sequenzen an der Basis. Innerhalb dieser zweiten Gruppe zeigen die *Hydra* AS-C-Homologe Cnash und AS-C3 die größte Ähnlichkeit mit andern Cnidarier-Sequenzen (Cnash: *Podocoryne Ath 1*; hy-AS-C3: *Nematostella* AS-C#17) und ließen sich im Gegensatz zu LiAS nicht mit anderen Bilaterier-Sequenzen homologisieren. Analog fielen auch in der ARP-Gruppe alle Cnidarier-Sequenzen an deren Basis, was eine Zuordnung der einzelnen Homologe zu bestimmten ARP-Subfamilien erschwerte. Die Auflösung innerhalb dieser Gruppe konnte auch nicht durch separate Berechnung unter Ausschluss der AS-C-Homologe oder eine Änderung der Außengruppe verbessert werden.

2.1.1. Vergleichende Betrachtung der *Hydra* ARP-Homologe

Da die phylogenetische Stammbaumrekonstruktion keine eindeutige Zuordnung der *Hydra* ARP-Homologe zu einer ARP-Subfamilie ermöglichte, wurden die *Hydra*-Homologe entsprechend ihrer besten *blastX* Treffer benannt. Die jeweiligen E-Values der einzelnen Homologe lagen dabei zwischen e^{-4} und e^{-15} und konnten verschiedenen ARP-Subfamilien zugeordnet werden. Um die Resultate mit dem kürzlich erschienenen bHLH-Phylogenie Artikel von Simionato *et al.* (2007) zu vergleichen, wurde die dort verwendeten Bezeichnungen in Klammern ergänzt.

Die isolierten *Hydra* ARPs unterschieden sich in Gesamtlänge und Lage des durchschnittlich 54 Aminosäure langen bHLH-Motivs (Abb. R4, S. 24). Dabei stellt hyAth-a mit 241 Aminosäuren (AS) das größte Homolog dar, gefolgt von hyNgn mit 198 AS und hyNato/p48 Homolog mit 170 AS, die beide im Größenbereich von LiAS (169 AS) und Cnash (185 AS) angesiedelt sind. Das bislang kleinste *Hydra*-ARP wird von *Hydra* NeuroD, mit nur 143 AS repräsentiert. Bis auf hyAth-a, mit deutlich C-Terminal-orientiertem bHLH-Motiv, ähneln die drei anderen ARP-Homologe in Lage der bHLH-Domäne eher Cnash, mit einem mittig bzw. eher N-Terminal-orientierten Motiv (Abb. R1, S.22 und R4, S. 27). Im Rahmen einer Ähnlichkeitsanalyse wurde aus den vier ARP-Sequenzen eine Mehrheits (*Majority*)-Konsensussequenz erstellt (Abb. R4). Im direktem Sequenzvergleich mit der ermittelten Mehrheits Konsensussequenz zeigte sich, dass alle *Hydra* ARP-Homologe deutlich stärker variierten als die *Hydra* AS-C- Homologe (vgl. Abschnitt 2.1.2.). Beim Vergleich des 55 AS langen bHLH-Motivs der ARP-Homologe ergaben sich für hyNgn 53 %, für hyNATO/p48 und hyNeuro D jeweils 49 % und hyAth-a 42 % Übereinstimmung mit der ermittelten Konsensussequenz. Wurde die Ähnlichkeitsanalyse auf einzelne Motivabschnitte beschränkt und die Loop-Region nicht berücksichtigt, erhöhten sich die ermittelten Ähnlichkeitswerte und betragen für die DNA-Interaktionsdomäne (basic-Domäne) von hyAth-a 77 % Mehrheitskonsens bzw.

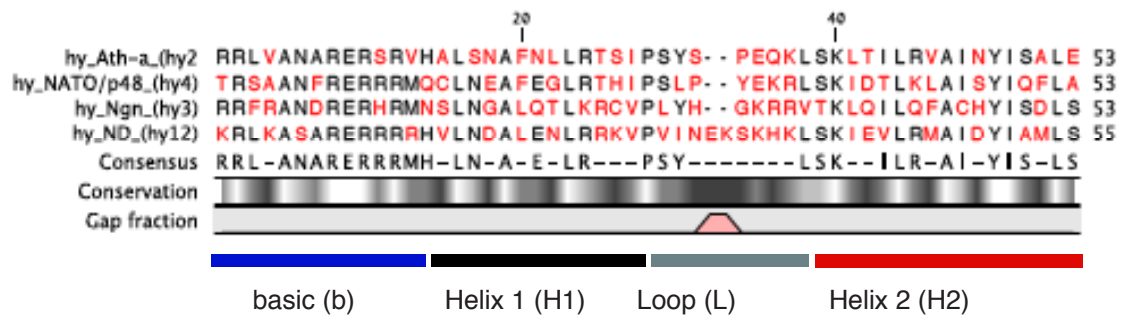


Abb. R4 : Vergleichende Betrachtung der *Hydra* ARP-Homologe

Die Abbildung zeigt den Sequenzvergleich des konservierten bHLH-Motivs der isolierten *Hydra* ARP-Homologe hyAth-a (hy2), hyNATO/p48 (hy4), hyNgn (hy3) und hyND (hy12). Zusätzlich wurden die einzelnen Domänen farblich unterlegt: blau für basische DNA Bindedomäne; schwarz für Helix 1; grau für Loop Domäne und rot für die interaktions vermittelnde Helix 2. Auf Grund des etwas längeren Loops in hyND mussten in den übrigen ARP-Homologe Lücken eingeführt werden (Gaps). Dieser Bereich ist ebenfalls graphisch gekennzeichnet (*Gap fraction*). Aus allen vier *Hydra*-Sequenzen wurde ein Mehrheitskonsens erstellt (*Consensus*), in dem hochvariable Stellen durch Striche gekennzeichnet sind. Diese Abschnitte entsprechen dunklen Bereichen im Konservierungs-Balken, während helle Bereiche konservierte Abschnitte kennzeichnen.

von je 69 % Identität für die basic Domänen der übrigen drei *Hydra*-ARP. Analog ergaben sich für Helix 1 (H1) im Falle von *Hydra* NeuroD 50 %, von hyNato/p48 43 %, von hyAth-a 36 % und von hyNgn 29 % Übereinstimmung. Im Bereich der Interaktions-vermittelnden Helix 2 (H2) zeigte hyAth-a Werte von 67 %, hyND 61 % und hyNato/p48 und hyNgn je 50 % Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz.

Neben der Ähnlichkeitsanalyse wurden die ARP-Homologe mit weiteren Sequenzanalyse-Programmen untersucht, darunter auch das Programm „PSORT“ (Nakai& Horton, 1999; Horton *et al.*, 2007; Nakai& Horton, 2007). Diese Programm ermittelte anhand der Aminossequenz und aus den Ergebnissen verschiedener Subprogrammen, typische Sequenzmotive wie Kernimportmotive und die wahrscheinliche zelluläre Lokalisation des betreffenden Proteins. Nach PSORT „*k-Nearest-Neighbour*“ (k-NN) Algorithmus bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei alle *Hydra* ARP-Homologe um nukleäre Proteine handelt. Diese Annahme wurde durch das Vorhandensein von verschiedenen Kernlokalisationsmotiven unterstützt. So verfügte hyAth-a über vier *pat4*- und drei *bipartide*- Motive, hyNgn über ein *pat4*-, zwei *pat7*- und ein *bipartide*- Motiv und hyND über zwei *pat4* und drei *bipartide* Motive, die charakteristische Kernlokalisationssequenzen repräsentierten. Einzig das *Hydra* Nato/p48 Homolog zeigt nach PSORT Ergebnis keines dieser typischen Motive (vollständige Analyse-Ergebnisse siehe Anhang).

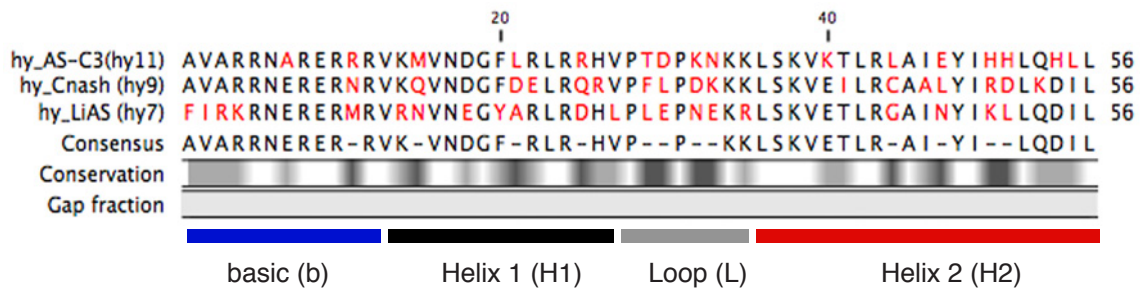


Abb. R5: Vergleichende Betrachtung der *Hydra* AS-C-Homologe

Die Abbildung zeigt die bHLH-Motive von *Hydra* AS-C3 (hy11), Cnash (hy9) und LiAS (hy7). Abweichende Positionen sind durch rote Buchstaben hervorgehoben und die einzelnen Domänenabschnitte farblich gekennzeichnet. Zusätzlich sind Mehrheitskonsensussequenz und Konservierung graphisch aufgetragen, wobei waagrechte Striche in der Konsensussequenz und dunkle Bereiche variable Positionen, helle Bereiche konservierte Abschnitte entsprechen. Zusätzlich wurden in Klammern die alternativen Bezeichnungen nach Simionato *et al.* (2007) angegeben. Da alle verglichenen bHLH gleichlang sind, mussten keine zusätzlichen Lücken eingefügt werden, was in der graphischen Darstellung (*Gap fraction*) zu einer leeren, graue Spalte führte.

2.1.2. Vergleichende Betrachtung der neuen *Hydra* Achaete/Scute Homologe und Cnash

Ähnlich wie die oben beschriebenen ARP-Homologe unterschieden sich auch die *Hydra* AS-C-Homologe LiAS, AS-C3 und Cnash hinsichtlich ihrer Gesamtlänge und Lage des bHLH-Motivs. Mit 509 Nt war LiAS 49 Basenpaare kleiner als Cnash (558 Nt) und repräsentierte damit das bisher kleinste AS-C-Homolog. Hingegen stellte hyAS-C3 mit 998 Nt nicht nur das größte AS-C, sondern auch das bislang größte bHLH-Homolog dar (Abb. R5). Bezüglich Lage des konservierten Motives im Protein verfügten LiAS und hyAS-C3 über ein deutlich C-Terminal-orientiertes bHLH-Motiv, das bei Cnash mittig bzw. eher N-Terminal lokalisiert war.

Aus allen drei *Hydra* AS-C-Homologen wurde analog zu den ARP-Homologen eine Konsensussequenz des 56 AS langen bHLH-Motivs erstellt (Abb. R5). Diese Sequenz enthielt 12 variable Positionen (in Abb. R5 als waagrechte Striche dargestellt), die für die Ähnlichkeitsanalyse nicht berücksichtigt wurden. Im Vergleich mit dem Konsensus ergab sich für AS-C3 eine Ähnlichkeit von 52 %, für Cnash 51 % und für LiAS 48 % Übereinstimmung, bezogen auf das gesamte bHLH-Motiv. Wurden nur einzelnen Domänen miteinander verglichen und der hochvariable Loop nicht berücksichtigt, ergab sich für die basische DNA-Interaktionsdomäne (basic) von Cnash eine Ähnlichkeit von 92 %, für hyAS-C3 85 % und für LiAS 62 %. Die Übereinstimmung mit der Konsensussequenz in Helix 1 betrug für AS-C3 79 %, für Cnash 64 % und für LiAS 57 % und in der Interaktions-vermittelnden Helix 2 bei LiAS 81 % und bei Cnash und AS-C3 je 67 %. Diese Werte zeigten, dass die *Hydra* AS-C-Homologe im Vergleich zu den *Hydra* ARP-Homologen über weniger variable Positionen bei einem etwa gleichlangem bHLH-Motiv verfügten. Des Weiteren verfügten sie über einen kürzeren Loop-Bereich sowie eine etwas längere Helix 2.

Weiter Sequenzanalysen mit dem Programm *PSORT* (Nakai & Horton 1999; Horton, Park et al. 2007; Nakai & Horton 2007) ergaben 91,3 % wahrscheinliche Kernlokalisierung für Cnash, 73,9 % für LiAS und 65,2 % für hyAS-C3. Die Wahrscheinlichkeit einer cytoplasmatischen Lokalisation betrug für LiAS und hyAS-C3 jeweils 17,4 % während eine ähnliche Lokalisations-Wahrscheinlichkeit für Cnash nicht ermittelt wurde. Darüber hinaus bestand für Cnash und LiAS eine wahrscheinliche Cytoskelett-Lokalisation von 4,3 % (Cnash) und 17,4 % (LiAS). Zusätzlich konnten ähnlich wie bei *Hydra* ARP-Homogen ein oder mehrere Kernlokalisationsmotive identifiziert werden, die teilweise im Bereich der basischen DNA Bindedomäne des bHLH Motivs lokalisiert waren (vgl. PSORT-Ergebnisse im Anhang).

3. Zelluläre und funktionelle Charakterisierung des *Hydra* Klasse II bHLH Faktors LiAS

Von den isolierten *Hydra* bHLH-Homologen gelang es das AS-C-Homolog LiAS auf mRNA- und Proteinebene näher zu charakterisieren. Die Analyse umfasste dabei morphologische Studien, Untersuchungen zum Zellzyklus-Status und zur Differenzierungszeit LiAS positiver Zellen. Darüber hinaus wurde LiAS selbst in einem eigenständigen Teilprojekt (Bednorz, 2004) als Köderkonstrukt eines weiteren Hefe-THS eingesetzt. Auf diese Art wurde *Hydra* Cadherin als potentieller Proteininteraktionspartner identifiziert und konnte im Rahmen dieser Arbeit biochemisch als Interaktionspartner bestätigt werden.

3.1. Analyse der LiAS mRNA Expression

Da in RNA *in situ* Hybridisierungen (ISH) keine artspezifischen Unterschiede zwischen den *Hydra*-Stämmen *vulgaris* und *magnipapillata* beobachtet werden konnten, werden im Weiteren repräsentativ die Ergebnisse für *Hydra magnipapillata* beschrieben. Mit anti-sense (as) LiAS-Proben konnten ausschließlich interstitielle Zell- (I-Zell) Nester verschiedener Größen beobachtet werden (Abb. R6, S. 28), während die mitgeführte sense-Kontrolle keine Signale zeigte. Dabei beschränkten sich die as-LiAS-Signale auf die Körpersäule und endeten mit einer relativ scharfen Grenze im Fuß- und Kopfbereich, welche jeweils zusammen mit den Tentakeln signalfrei blieben.

Zusätzlich konnten in LiAS RNA ISH zwei morphologisch verschiedene Nest-Typen unterschieden werden, die als Typ I und Typ II bezeichnet wurden (Abb. R6). Während Typ II Nester auf Grund ihrer charakteristischen Größe (~10 µm Durchmesser) und Form späten Stenotelen-Differenzierungsstadien zugeordnet werden konnten, handelte es sich bei Typ I Nestern um ca. 5 µm große Zellen, die über ausgeprägte cytoplasmatische Verbindungen verfügten. Eine genauere Zuordnung diese Typ I Nester zu einem bestimmten Nematocytentyp (Stenotelen, holotriche und atriche Isorhizen oder Desmonemen) war morphologisch nicht

möglich. Durch die mikroskopische Auswertung des ISH-Musters konnte *LiAS* so als erster *Hydra* bHLH-Faktor mit einem speziellen Nematocytensubtyp in Verbindung gebracht werden (Stenotelen) und wurde dadurch als ein weiteres Gen des NemDP (Nematocytendifferenzierungsweg) identifiziert. Dabei schien *LiAS* in verschiedenen Nest Differenzierungsstadien oder in verschiedenen Nematocytensubtypen exprimiert zu werden, was durch Typ I und Typ II Nester und unterschiedlich ausgeprägte cytoplasmatische Brücken zum Ausdruck gebracht wurde. Hingegen konnte in reifen, wandernden oder eingebauten Nematocytensubtypen kein *LiAS* Signal beobachtet werden.

Allgemein zeigte das *LiAS* RNA-Expressionsmuster große Ähnlichkeit zu *Cnash* und weiteren Genen des NemDP, wie z. B. zum Zinkfinger-transkriptionsfaktor *HyZic* (Lindgens *et al.* 2004) oder zum Nematocytensubtyp-Differenzierungsmarker *NOWA* (Engel *et al.* 2001). Die genannten Gene sind ebenfalls in I-Zell Nestern exprimiert und räumlich auf die Körpersäule beschränkt (Abb. R6k), unterscheiden sich aber in Nestgrößenverteilung und hinsichtlich ihrer Zellteilungsfähigkeit, wie weiter unten beschrieben.

3.1.1. Die Nestgrößenanalyse von *LiAS* deutet auf eine Stenotelen-spezifische Funktion hin

Eine Eigenschaft NemDP-assoziiierter Gene (Abb. R6k) wie *Cnash*, *HyZic* (frühe und proliferierende I-Zell Nester) und *NOWA* (alle späten, differenzierende Stadien) ist, dass sie sich trotz ähnlicher Expressionsmuster hinsichtlich der Nestgrößen-Verteilung in charakteristischer Weise voneinander unterscheiden (Lindgens *et al.*, 2004). Gleichzeitig sind sowohl die vorherrschende Nestgröße als auch die Nestgrößenverteilung diagnostische Hinweise auf bestimmte Nematocytensubtypen und die Stellung des betreffenden Gens im NemDP. Beispielsweise ist der früh exprimierte Transkriptionsfaktor *HyZic* bereits in 2-Zell-Nestern detektierbar und kommt nur zu einem relativ geringen Anteil in größeren, älteren Nestern (>16 Zellen) vor. Analog lässt sich der terminale Differenzierungsmarker *NOWA* nicht oder kaum in frühen (<4 Zellen), dafür aber verstärkt in späten Nestern (>8 Zellen) detektieren (Abb. R6i).

Um *LiAS* in ähnlicher Weise zu charakterisieren, wurden in mehreren unabhängigen Experimenten die Zellanzahl in *LiAS*-positive Nestern ausgewertet, statistisch erfasst und mit den entsprechenden Ergebnissen für *Cnash* sowie Markern für frühe (*HyZic*) und späte Differenzierungsstadien (*NOWA*) verglichen (Abb. R6i). Die Resultate der statistischen Auswertung sind in Abbildung R6 (i) (S. 28) prozentual dargestellt. Dabei entsprechen die Säulen den jeweiligen Anteilen an 2-Zell (2er), 4-Zell (4er), 8-Zell (8er), 16-Zell (16er) und 32-Zell (32er) Nestern und sind für *HyZic* in grau, für *Cnash* in hellblau, für *LiAS* in dunkelblau und *NOWA* in rot aufgetragen.

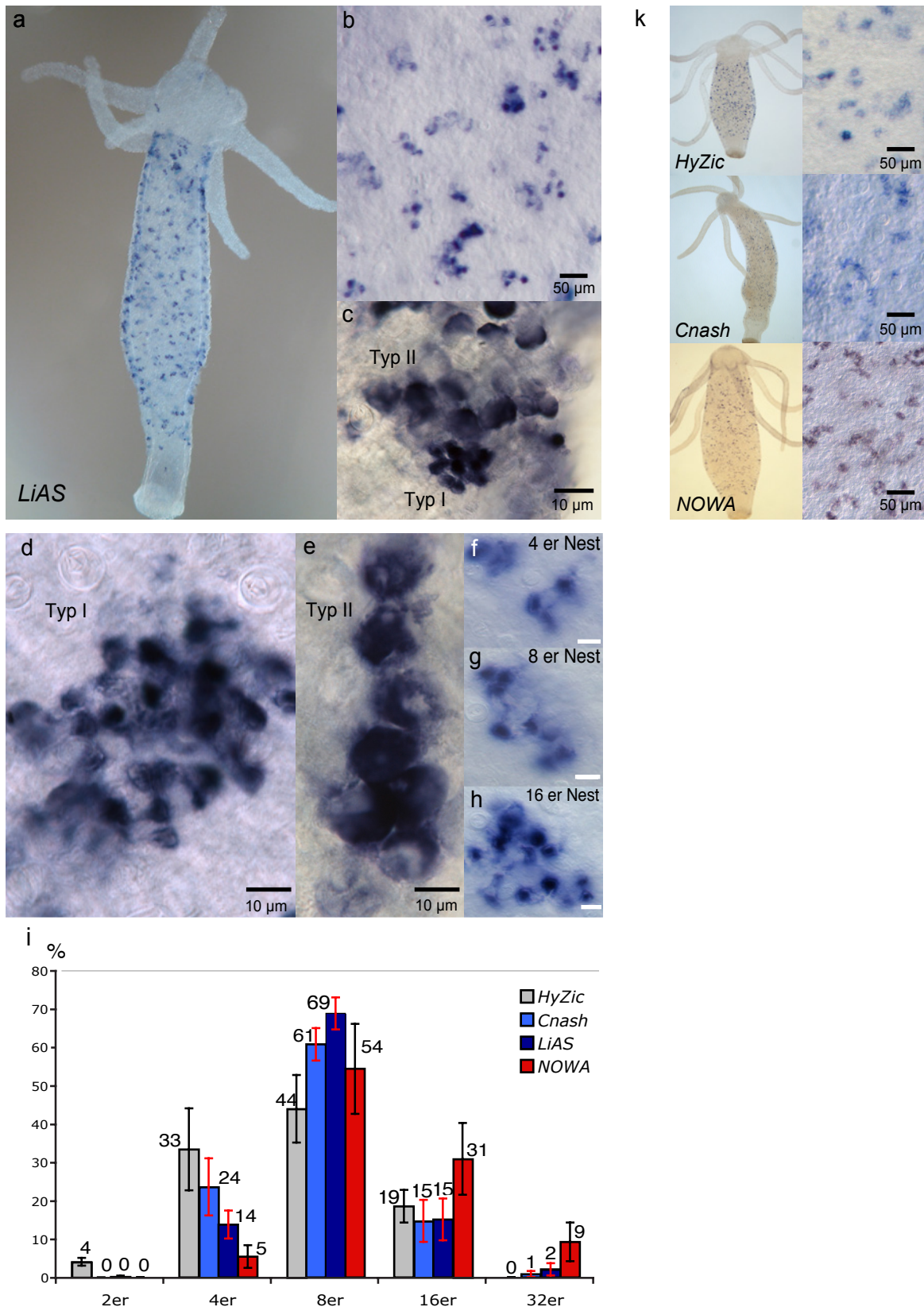


Abb. R6 : Verteilung von *LiAS* mRNA und Vergleich mit den Nematocysten-spezifischen Genen *Cnash*, *HyZic* und *NOWA*

Das *LiAS*-ISH Muster (a-i) ähnelte in seiner Verteilung Nematocysten spezifischen Genen (k), unterschied sich jedoch bezüglich der Nestgrößenverteilung (i) von typischen, dem NemDP assoziierten Genen (k, i). Ähnlich wie der früh exprimierte Zinkfinger- Transkriptionsfaktor *HyZic* (grau), *Cnash* (hellblau) und der Differenzierungs-Marker *NOWA* (rot) wurde *LiAS* in I-Zell Nestern verschiedener Größe (f-h) lokalisiert (i). Bei genauerer Betrachtung konnten zwei Typen Nester (c-e) morphologisch unterschieden werden, die in (d) und (e) vergrößert abgebildet sind (Erklärung siehe Text). Maßstabsbalken in (f)-(h): jeweils 10 µm.

In Übereinstimmung mit Lindgens *et al.* (2004) zeigte nur der früh exprimierte Transkriptionsfaktor *HyZic* einen Anteil von 2er Nestern (4 %; ± 1 %), während der Differenzierungsmarker *NOWA* und die beiden AS-C-Homologe *Cnash* und *LiAS* nicht signifikant (*NOWA*, *Cnash* je 0 %; *LiAS*: 0,2 %, $\pm 0,3$ %) in dieser Fraktion vertreten waren. Beide AS-C Homologe (*Cnash* und *LiAS*) zeigten einen ähnlichen Größenbereich positiver Nester zwischen 4 und 32 Zellen, unterschieden sich aber in den prozentualen Anteilen der einzelnen Nestgrößen an der Gesamtfärbung. So betrug der Anteil 4er Nestern bei *Cnash* 24 % ($\pm 7,4$ %) gegenüber 14 % ($\pm 3,7$ %) bei *LiAS*. Betreffend des Anteils an 8er Nestern zeigt *LiAS* mit 69 % ($\pm 4,2$ %) die größte 8er Fraktion aller verglichenen Gene, was einem 8 % größeren Anteil im Vergleich zu *Cnash* (61 %; $\pm 4,2$ %) entsprach. In der 16er Fraktion glichen sich beide AS-C-Homologe mit jeweils 15 % (je $\pm 5,5$ %) Anteil an der Gesamtfärbung, während in der 32er Fraktion erneut kleinere Unterschiede beobachtet wurden. Neben der 2er Fraktion stellte die 32er Fraktion bei beiden AS-C-Homologen jeweils den geringsten Anteil an der Gesamtfärbung dar, welcher für *Cnash* 1 % ($\pm 0,8$ %) und *LiAS* 2 % ($\pm 1,6$ %) betrug. Da eine bekannte Korrelation zwischen 8-Zell Nestern und differenzierenden Stenotelen besteht, während Desmonemen und Isorhizen aus größeren Nestern (>8 Zellen) hervorgehen, wiesen morphologische Beobachtungen (Typ II Nester) und Nestgrößenanalyse (hauptsächlich 8er Nester) auf eine Stenotelen-assoziierte Funktion für *LiAS* hin.

3.1.2. Differenzierungszeit von *LiAS* positiven Nestern

Die Differenzierungszeit und die Zellzykluslänge sind neben Nestmorphologie und Nestgrößenverteilung weitere diagnostische Merkmale zur Bestimmung einzelner Nematocytentypen (Campbell & David 1974; David & Gierer 1974). Um die Differenzierungszeit und den Zellzyklus-Status (proliferierend oder nicht-proliferierend) von *LiAS*-positiven (*LiAS*+) Nester zu bestimmen, wurden BrdU-Deoxyuridin (BrdU) Markierungsexperimente mit *LiAS* ISH kombiniert und die Ergebnisse mit Literaturwerten (Abb. R7b, S.30) verglichen.

In Puls-Experimenten von 1 h wurden sich teilenden Zellen BrdU markiert und anschließend mittels *LiAS* ISH auf doppelt markierte (BrdU+/ *LiAS*+) Nester überprüft. In der mikroskopischen Auswertung konnten keine BrdU+/ *LiAS*+ Nester beobachtet werden.

Zur Bestimmung der Differenzierungszeit (d) von *LiAS*-positiven Nestern wurden in Dauermarkierungsexperimenten die Zeitspanne bis zu einer völligen BrdU-Markierungen aller *LiAS*+ Nester ($t^{100\%}$) bestimmt. Vom entsprechenden Wert wurde die durchschnittliche S-Phasen-Länge interstitieller Zellen (12 h) subtrahiert und ergab die Zeitspanne zwischen letzter S-Phase und terminaler Differenzierung. Die entsprechende Zeit-spanne wurde durch Extrapolation aus unabhängigen Zeitwerten (n=6) ermittelt und betrug für *LiAS*+ Nester ca. 94,6 h (Abb. R7, S. 30). In diesem Zeitraum nahm die Anzahl BrdU+/ *LiAS*+ Nester stetig zu und erreichte zwischen 60 und 70 h 50% der *LiAS*- Population. Basierend auf den

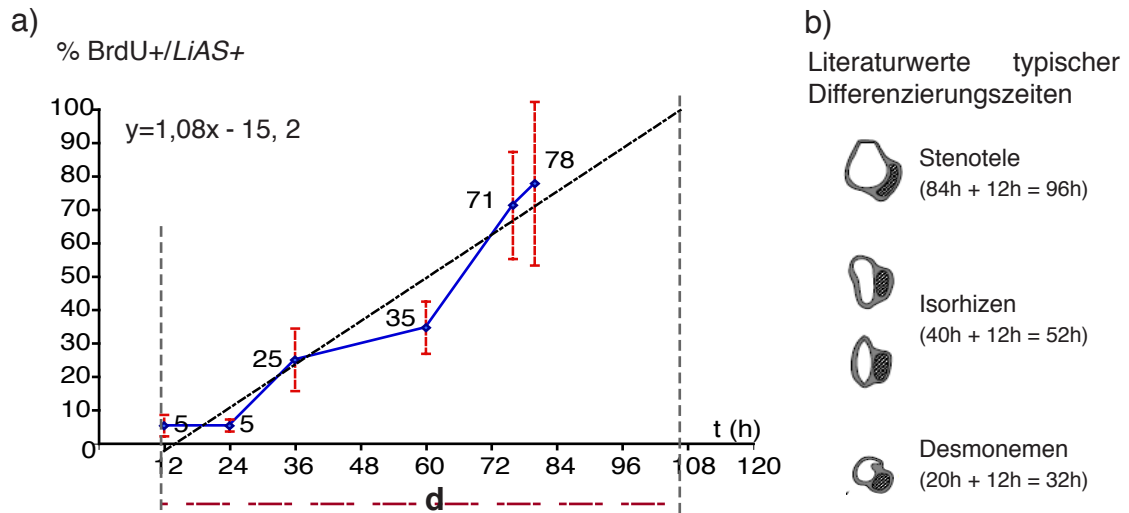


Abb. R7: BrdU-Dauermarkierungsexperiment zur Bestimmung der Differenzierungszeit LiAS-positiver Nester

(a) Darstellung der prozentualen Anteile doppelmarkierter Nester (BrdU+/LiAS+) je Zeitwert. Mittels Regressionsgerade ($y = 1,08x - 15,2$) wurde der Zeitpunkt an dem alle LiAS-positiven Nester BrdU markiert sein würden auf ca. 106,7 h berechnet. Abzüglich einer durchschnittlichen S-Phasenlänge von 12 h ergab sich daraus eine Differenzierungszeit d von ca. 96,7 h für LiAS-positive Zellen. (b) Literaturwerte von Nematocyten-typischen Differenzierungszeiten nach Campbell & Gierer (1974) und David & Gierer (1974). Details siehe Text.

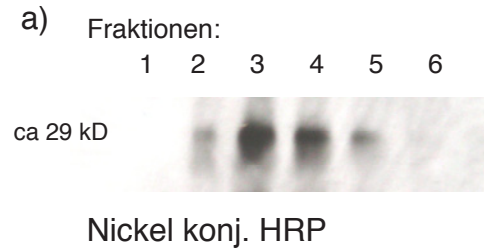
ermittelten Werten ergab sich eine Regressionsgerade mit der Gleichung $y = 1,08x - 15,2$, gemäß der eine 100% Doppelmarkierung nach $\sim 106,7$ h ($t^{100\%}$) erfolgte. Diese Resultate für LiAS+ Zellen lagen damit zwischen publizierten Werten typischer Nematocytendifferenzierungszeiten (Campbell & David, 1974; David & Gierer, 1974), die für Stenotelern mit 96 h, für Desmonemen mit 32 h bzw. für Isorhizen mit 52 h angegeben wurden.

3.2. Rekombinante Proteinexpression von LiAS zur Herstellung eines polyklonalen anti-LiAS Serums

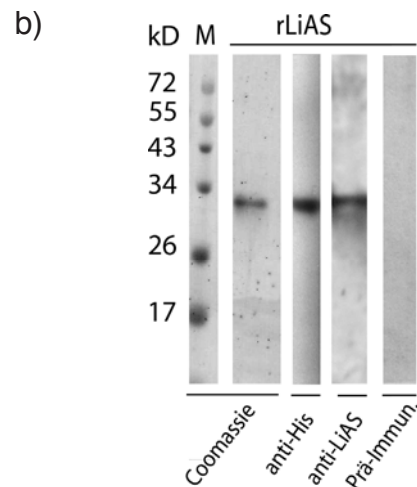
Zur Charakterisierung auf Proteinebene wurde LiAS in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und rekombinant sowohl in HEK293-Zellen als auch in BL21DE3-Bakterien exprimiert. Ausgehend von rekombinantem Protein wurde anschließend ein polyklonales Kaninchen-Antikörper gegen HEK293-exprimiertes LiAS-Protein hergestellt und in Western-Blot und *whole mount* Immunfärbungen eingesetzt.

Abb. R8: Nachweis von HEK293-exprimierten LiAS (rLiAS) durch Western Blot mit anti-His Antikörper und polyklonalem LiAS-Antiserum

a) Nach Expression in HEK 293-Zellen wurde das in den Zellüberstand sekretierte Protein mittels Nickel-Säule isoliert und anschließend fraktioniert eluiert. Rekombinantes LiAS (rLiAS) konnte anschließend in Western Blots mit Nickel-konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) nachgewiesen werden. Die Hauptmenge rekombinanten Proteins wurde dabei in den Fraktionen 3 und 4 eluiert, wie hier exemplarisch gezeigt.



b) Für die Immunisierung eines Kaninchens wurden verschiedene positiv getestete rLiAS Fraktionen vereint und über Vivaspin-Proteinkonzentratoren aufkonzentriert und in PBS umgepuffert eingeschickt. Mit dem erzeugten polyklonale Antiserum (anti-LiAS) konnte in Western Blots im Gegensatz zu Prä-Immunsrum (Prä-Imm.) rekombinantes LiAS erkannt werden, das parallel ebenfalls in Coomassie-Färbungen und mit anti-penta-His (anti-His) nachgewiesen wurde. Im Vergleich zum jeweils mitgeführten Marker (M) wich dabei die aus dem Blot ermittelte Größe von ca. 29 kD um ca. 4 kD von der errechneten Größe des rekombinanten Proteins ab (Näheres siehe Text)



3.2.1 Rekombinante Proteinexpression von LiAS in HEK293-Zellen

Für die rekombinante Expression von LiAS-Protein wurde der Expressionsvektor *pCep-Pu* gewählt, der die Sekretion rekombinanter Proteine ins Medium ermöglichte. Dabei betrug die errechnete Größe des rekombinanten LiAS-Proteins 24,7 kD und setzte sich aus LiAS (19,8 kD) und einem His/Myc-Tag (4,9 kD) zusammen. Nach erfolgreicher Klonierung des Konstruktes wurden *HEK293*-Zellen transfiziert, stabil transfizierte Klone in Puromycin-haltigem Medium selektioniert und die proteinhaltigen Überstände mehrerer Passagen gesammelt. Insgesamt wurden so ca. 3 l Zellüberstand gewonnen, woraus mittels Ni-NTA-Agarose Säule in mehreren Durchgängen rekombinantes LiAS-Protein fraktioniert isoliert wurde (Abb. R8a). Pro durchgeführte Proteinisolation wurden je 10 Fraktionen gesammelt, deren Qualität mit His-Tag-spezifischen Antikörpern oder Nickel-konjugierter Meerrettichperoxidase (Ni konj. HRP) in Western Blot-Experimenten überprüft wurde (Abb. R8a). Dabei fiel im Vergleich mit einem „Pre-stained“ Größenstandard (Page Ruler) auf, dass rekombinantes LiAS-Protein (rLiAS) auf einer Höhe von ca. 29 kD, d.h. etwa 4 kD über dem errechneten Wert von rund 25 kD detektiert wurde. In der Regel konnten pro Proteinisolation insgesamt ca. 4 ml rekombinantes Protein isoliert werden, das sich hauptsächlich auf die

Fraktionen 3 und 4 verteilte. Nach positiver Kontrolle dieser Fraktionen durch Coomassie-Färbung und Western Blot wurden die Volumina vereint und durch Zentrifugation in Vivaspin-Proteinkonzentratoren auf ein Volumen von ca. 1 ml reduziert und gleichzeitig in PBS umgepuffert.

3.2.2. Herstellung eines polyklonalen anti-LiAS-Serum in Kaninchen

Zur Herstellung des polyklonalen Antikörperserums wurden aus rund 340 ml HEK-Zellüberständen 570 µg rekombinantes LiAS isoliert und in 1 ml PBS aufgenommen. Diese Menge wurde zur Immunisierung eines Kaninchens an die Firma Eurogentec (Belgien) geschickt und nach firmeneigenem Standard-Immunisierungsprotokoll in drei Injektionen à 190 µg Protein appliziert. Auf diese Weise konnten etwa 3 ml Präimmunserum (PI), ca. 3 ml Antiserum vom Immunisierungstag 38 (*first bleed*; FB), ca. 20 ml vom Immunisierungstag 66 (*Small bleed*; SB) und etwa 60 ml vom 87. Immunisierungstag (*Large bleed*; LB) gewonnen werden, die zunächst in Western Blot Experimenten mit rekombinantem LiAS Protein (aus HEK293-Zellen) getestet wurden.

Während in Western Blot-Experimenten (Abb. R8b) mit dem Präimmunserum kein rekombinant exprimierte LiAS Protein nachgewiesen werden konnte, zeigten sich mit anti-LiAS Serum (anti-LiAS-SB und anti-LiAS-LB) Signale, die in Kontroll-Experimenten mit anti-penta His bzw. Nickel konjugierter HRP bestätigen wurden (Abb. R8b). Auch hier wurde die berechnete Proteingröße im Vergleich mit einem „Pre-stained“ Größenstandard um ca. 4 kD übertroffen und betrug bei HEK293 exprimierten rekombinanten LiAS etwa 29 kD.

Da in Western Blot-Experimenten mit polyklonalem anti-LiAS-Serum eine Kreuzreaktion mit BSA beobachtet wurde und ein erhöhter Hintergrund im Vergleich zu anti-penta-His Kontrollexperimenten auftrat, wurde eine Affinitätsreinigung (AF) mit Ammoniumsulfat-gefälltem und 2,5 x aufkonzentrierten anti-LiAS-Serum (anti-LiAS-LBg) durchgeführt. Im Verlauf der Affinitätsreinigung wurde der anti-LiAS-Antikörper jedoch so stark verdünnt, dass er anschließend aufkonzentriert werden musste. In den folgenden Western Blot-Experimenten zeigte affinitätsgereinigtes anti-LiAS-Serum keine Kreuzreaktion mit BSA und bestätigte die bisherigen Ergebnisse mit rekombinantem Protein (vgl. Anhang).

Parallel zu rekombinant exprimierten LiAS-Protein wurde Hydralysat im Western-Blot analysiert (Abb. R10, S. 36). Im Rahmen dieser Experimente konnten mit anti-LiAS-LBg in der Äquivalentmenge eines Tieres mehrere Banden beobachtet werden. Die drei prominentesten Signale (ca. 24 kD, ca. 34 kD und ca. 40 kD) konnten ebenfalls mit affinitätsgereinigtem Antiserum bestätigt werden, wobei das 24 kD Signal die stärkste Intensität zeigte und die errechnete Wildtyp-Größe von 19,8 kD ebenfalls um etwa 4 kD übertraf (Abb. R10). Zusätzlich war es mit affinitätsgereinigtem Serum ebenfalls möglich ein 24 kD Signal in *Hydra*-Kernextrakten nachzuweisen, das sehr schwach auch in cytoplasmatischen Fraktionen beobachtet werden konnte (Abb. R10).

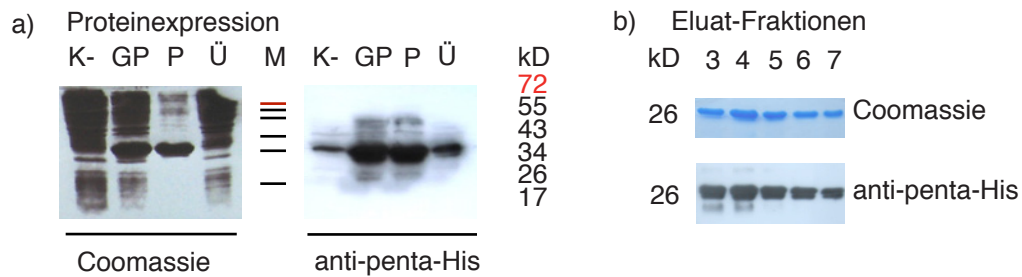


Abb. R9: Rekombinante LiAS-Expression in BL21DE3-Bakterien

(a) Vor und nach Induktion rekombinanter Proteinexpression wurden Proben entnommen und äquivalente Probemengen nach Aufschluss mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei entsprach K- nicht induzierten Bakterien, GP dem Gesamtprotein, P dem nicht löslichen und Ü dem löslichen Bestandteil des Gesamtproteins. Im Vergleich mit K- konnte sowohl durch Coomassie-Färbung als auch im Western Blot mit anti-penta-His rekombinantes LiAS nachgewiesen werden, das hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion P vorlag. (b) Durch Modifikation der Aufschlussmethode wurde das rekombinante Protein in Lösung gebracht, mittels Ni- Säule isoliert und fraktioniert eluiert. In Coomassie und Western Blot-Experimenten konnte anschließend in den Fraktionen 3 bis 7 rekombinantes LiAS detektiert werden, das sich im Vergleich zum Größenstandard M 4 kD oberhalb des errechneten Wertes von 22,4 kD bei ca. 26 kD, befand.

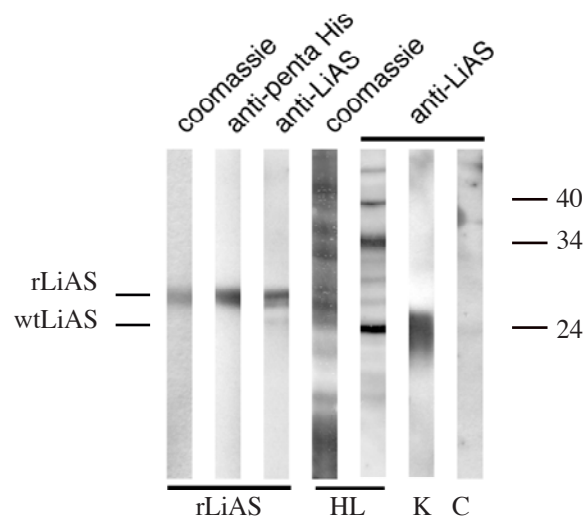


Abb. R10: Polyklonales anti-LiAS-Serum erkennt rekombinantes und Wildtyp Protein

Das rekombinant exprimierte LiAS-Protein (rLiAS) wurde sowohl von anti-penta-His als auch von affinitätsgereinigtem anti-LiAS-Antikörper erkannt. In Hydralysaten (HL) wurden mit anti-LiAS-Serum mehrere Banden beobachtet von denen die 3 prominentesten (40, 34 und 24 kD) mit affinitätsgereinigtem anti-LiAS bestätigt werden konnten. Zusätzlich konnte mit dem affinitätsgereinigtem Antikörper in *Hydra*-Kernextrakten (K) ein starkes Einzelsignal von ca. 24 kD detektiert werden, dass äußerst schwach auch in der cytoplasmatischen Fraktion (C) nachgewiesen wurde. Sowohl rekombinantes als auch Wildtyp LiAS-Protein übertrafen dabei die berechneten Proteingrößen um rund 4 kD.

3.2.3. Expression von rekombinantem LiAS in BL21DE3-Bakterien

Um die Effizienz der rekombinanten Proteinexpression zu steigern, wurde LiAS in den Expressionsvektor *pET19-b* kloniert und bakteriell in BL21DE Zellen exprimiert. Die erwartete Größe des rekombinanten Proteins wurde auf 22,4 kD berechnet und setzte sich aus 19,8 kD LiAS und einem penta-His-Tag von 2,6 kD zusammen. Die während der Proteinexpression entnommenen Proben zeigten, dass nach 2 h Induktion ausreichend Protein erzeugt werden konnte, jedoch nach Aufschluss mit flüssigem Stickstoff hauptsächlich in der unlöslichen Pelletfraktion vorlag (Abb. R9a). Daher wurde die Aufschlussmethode modifiziert und die Proteine mit Guanidiniumhydrochlorid in Lösung gebracht. Mittels Ni-NTA-Säule wurde rekombinantes LiAS-Protein isoliert und anschließend fraktioniert in insgesamt 10 Fraktionen à 1,5 ml eluiert. Proben aus alle Fraktionen zeigten in Coomassie-Färbung und Western Blot einen Konzentrationsgradienten rekombinanten Proteins von Fraktion 3 zu 8, wobei die Protein Hauptmenge in Fraktion 3, 4 und 5 beobachtet wurde (Abb. R9b, S. 33).

Anschließende Kontrollexperimente zeigten, dass bakteriell exprimiertes LiAS-Protein sowohl von anti-penta-His als auch von anti-LiAS-Antikörpern detektiert werden konnte. Doch ähnlich wie HEK293-exprimiertes LiAS wurde das bakteriell exprimierte Protein im Vergleich zu einem „Pre-stained“ Größenstandart ca. 4 kD über der errechneten Größe, bei etwa 26 kD detektiert.

3.3. Lokalisation von LiAS-Protein in whole mount Präparaten

Aufbauend auf den durchgeführten Western Bot-Experimenten wurde nicht-affinitätsgereinigtes (anti-LiAS- LBg) und affinitätsgereinigtes (AF-anti-LiAS) Serum für indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen eingesetzt. Da in ersten Versuchen hinsichtlich der Signale kein Unterschied zwischen AF-anti-LiAS und anti-LiAS-LBg beobachtet werden konnte, wurde für *whole mount* Immunfärbungen aus praktischen Gründen das nicht affinitätsgereinigte Serum (anti-LiAS-LBg) eingesetzt, um die Charakterisierung des neuen Hydra AS-C-Homologs auf zellulärer Ebene fortzusetzen. Hierfür wurde zunächst Einzel-Immunfärbungen analysiert, die anschließend mit weiteren Antikörperfärbungen kombiniert und verglichen wurden. Parallel wurden *LiAS*-ISH-Daten und anti-LiAS- Färbung einander gegenübergestellt, Kontrollen mit Zweitantikörpern und Präimmunserum durchgeführt und die Spezifität der Immunfärbung durch Kompetitionsversuche mit rekombinantem Protein (siehe Anhang) bestätigt.

3.3.1. Einzel- Immunfärbung mit anti-LiAS Serum in Hydra magnipapillata

Für *whole mount* anti-LiAS Färbung (Abb. R11-R24, S. 36 ff) erwiesen sich kurze Fixierungszeiten (10 bis 30 min) in Methanol oder Formaldehyd als optimal. Während weder mit 2.AK alleine noch mit Präimmunserum spezifische Signale beobachtet wurden, konnten mit polyklonalem anti-LiAS Serum (anti-LiAS-LBg) in Verdünnungen von 1:1.000 bis 1:15.000 spezifische Resultate erzielt werden.

In anti-LiAS Immunfärbungen (Abb. R11, S.36) konnten zusätzlich zu den bereits in LiAS-ISH Experimenten beschriebenen differenzierenden Nestern im Rumpf (vgl. Abb. R11b) auch einzelne, reife (d.h. ins Ectoderm integrierte) und migrierende Nematocyten beobachtet werden (Abb. R12, S. 37). Weiterhin konnten im Tier vier Bereiche mit einer charakteristischen Signalverteilung charakterisiert werden, die in Abbildung R12 (S. 37) in Ausschnitten (a,c,e,g) und Ausschnittsvergrößerungen (b,d,f,h) gezeigt sind.

Während der Fuß ähnlich wie in der ISH signalfrei blieb, folgte im Anschluss ein relativ kleiner Bereich (1/4 des Tieres ab Basalscheibe; „*lower peduncle*“), in dem hauptsächlich ausdifferenzierte und in das Gewebe integrierte Stenotelen vertreten waren (Abb. R12g, h). Dieser Zone schloss sich die Körpersäule mit einer Mischung aus Nestern in verschiedenen Differenzierungsstadien, zerfallenden Nestern, migrierenden und integrierten Nematocyten an (Abb. R12e, f). Dabei konnte beobachtet werden, dass es sich bei integrierten Nematocyten im Rumpf um Stenotelen handelte (Abb. R12f), während integrierte Desmonemen nur in Tentakel-Batteriezellen beobachtet werden konnten. In der Kopfregion (oberes 1/4 des Tieres) ging die Anzahl differenzierender Nester zugunsten von einzelnen, wandernden Nematocyten zurück (Abb. R12c, d), bis schließlich auf Höhe des Tentakelkranzes und an der Tentakelbasis fast ausschließlich migrierende Desmonemen und Stenotelen beobachtet wurden. Einige dieser migrierenden Zellen wurden exemplarisch in Abbildung R12 d (S. 37) mit einer Pfeilspitze markiert.

In den Tentakel selbst lagen beide Nematocytentypen hauptsächlich integriert in Batteriezellen vor, wobei an der Tentakelbasis noch einzelne, migrierende Zellen beobachtet werden konnten. Im weiter distalen Bereich der Tentakel (Abb. R12b; R13b, S. 38) konnten integrierte Desmonemen anhand ihrer Größe und durch einen fadenartigen Zellausläufer in Richtung Mesogloea eindeutig von Stenotelen unterschieden werden. Stenotelen wiederum zeichneten sich in Regel durch Größe, ihre zentrale Lage innerhalb der Batteriezelle (vgl. auch Abb. R18, S. 44; R21, S. 48) und ein auffälliges kissenartiges Signal am Mesogloea zugewanten Zellpol aus (Abb. R12b; R13b). Darüberhinaus konnten auch im Hypostom vereinzelt Stenotelen, jedoch keine Desmonemen beobachtet werden.

Die LiAS Antikörper Färbung erwies sich damit spezifisch für Stenotelen und Desmonemen, die zwei verschiedene Nematocyten-Subtypen repräsentieren und in verschiedenen Entwicklungsstadien (Abb. R12f; R13) sowie als terminal differenzierte Zellen (integriert ins Gewebe oder in Batteriezellen) erkannt wurden (Abb. R12b, h; R13b). Dabei fielen besonders im Rumpf Nester mit einer typischen Signalverteilung auf, deren charakteristische Nestmorphologie in Abbildung R14 (S. 39) zusammengefasst wurden. Diese unterschiedlichen Nesttypen schienen verschiedene Entwicklungsstadien zu repräsentieren, die punktförmige Signale (Abb. R14a) und um den Zellkern gebogene Strukturen (Abb. R14b,c) einschlossen.

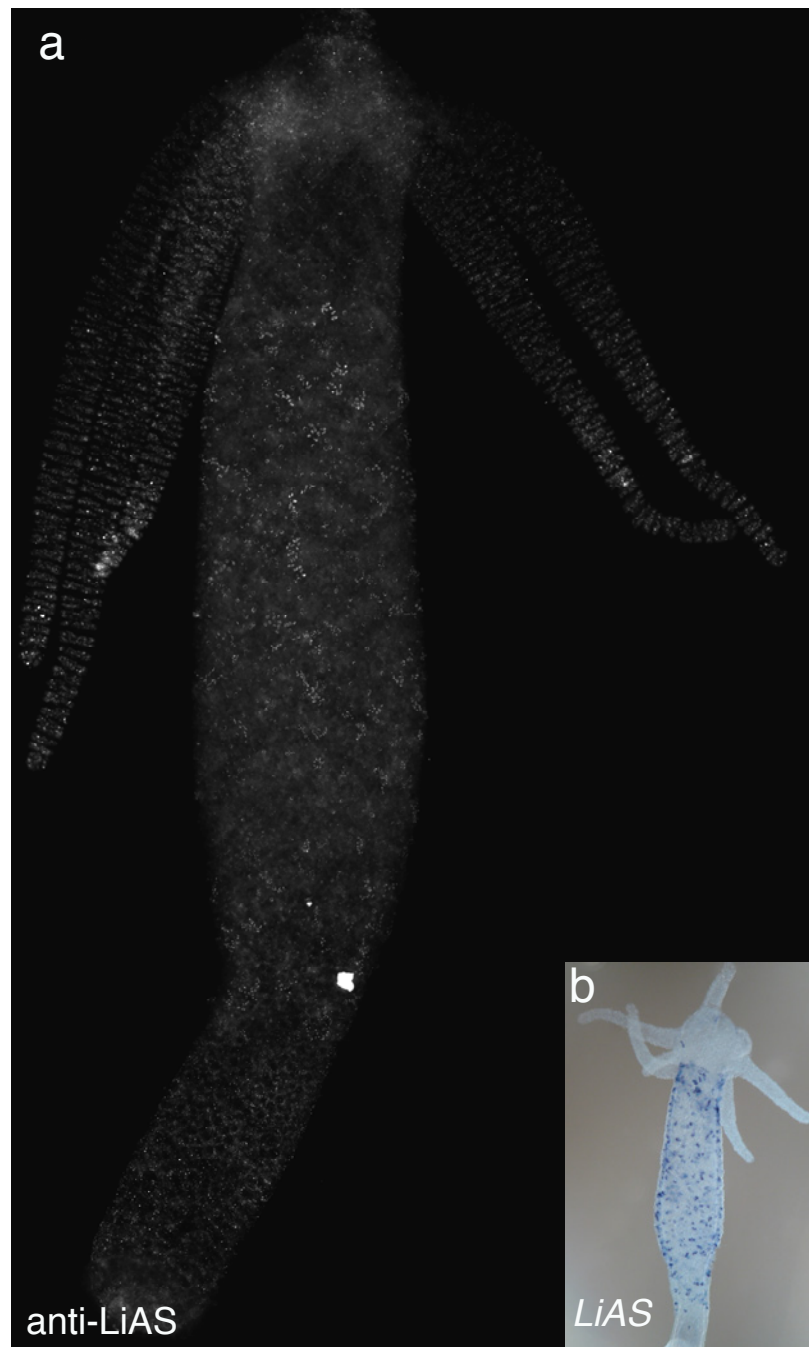


Abb. R11: Vergleich zwischen LiAS-Antikörper und ISH

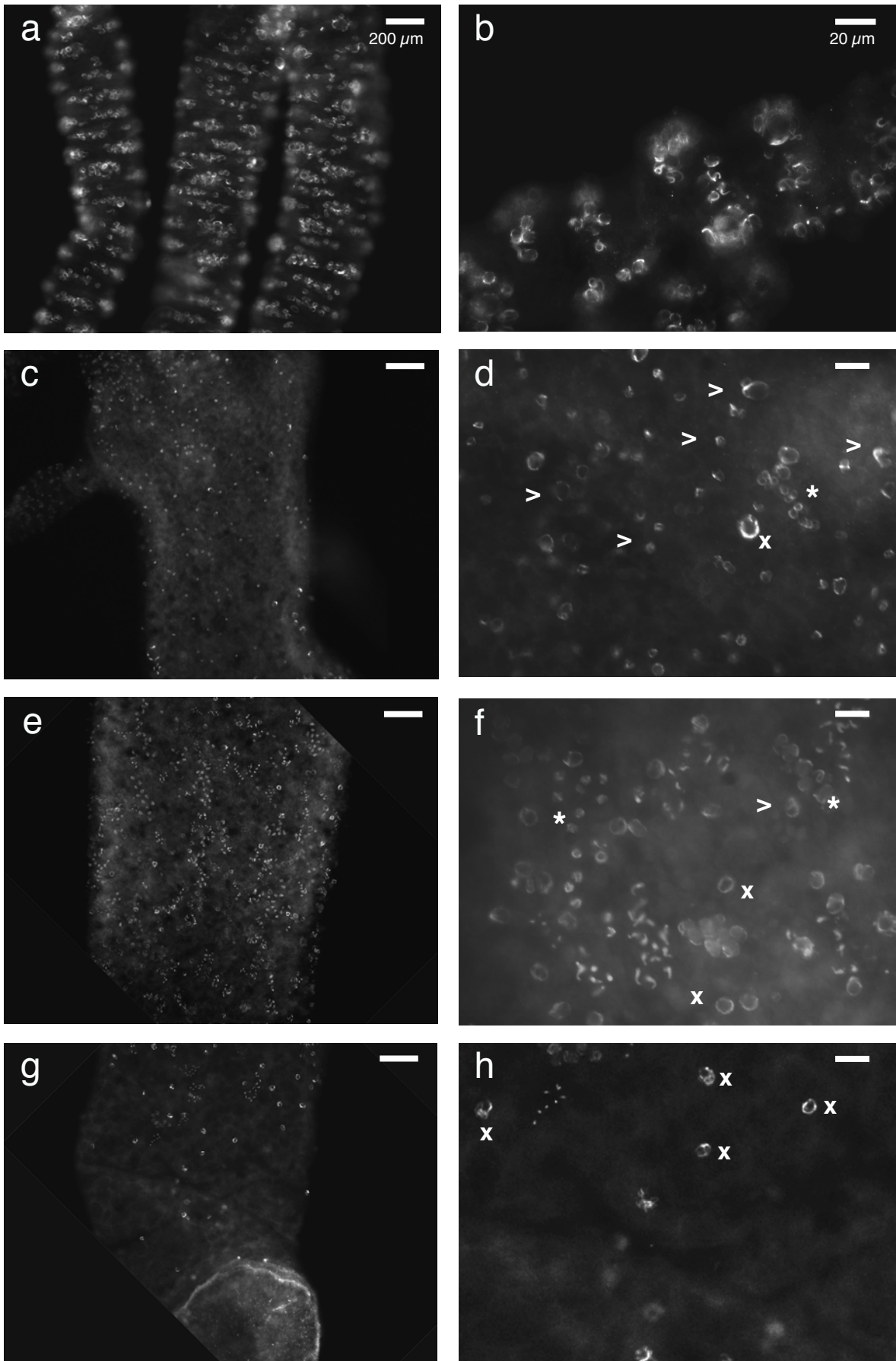
Während Kontrollen mit Prä-Immunsereum und Zweitantikörper keine Signale ergaben, konnte mit polyklonalem anti-LiAS-Serum Signale in I-Zell-Nestern und reifen Nematocysten detektiert werden (siehe folgende Abbildung). Ein Vergleich von Übersichtsaufnahmen der Immunfärbung mit zuvor durchgeführten ISH-Experimenten zeigte einige Unterschiede bezüglich der Signalverteilung im Tier. Details siehe Text.

(Seite 40)

Abb. R12: Charakteristische Verteilung von LiAS-Signalen in Hydra

Tentakel (a-b), Kopf (c-d), Körpersäule (e-f) und Fußregion (g-h) zeigen eine typische Verteilung von anti-LiAS-Signalen. Dabei wurde den Einzelausschnitten auf der linken Seite jeweils Vergrößerungen auf der rechten Seite gegenübergestellt. Abweichend zu ISH zeigten sich neben differenzierenden Nestern auch zerfallende Nester im Rumpf (Stern), einzelne wandernde (>) und integrierte Nematocysten (X), die als Stenotelen und Desmonemen identifiziert werden konnten und exemplarisch in den Ausschnittsvergrößerungen markiert wurden. Maßstab: auf der linken Seite 200 µm; rechts je 20 µm, Details siehe Text.

Abb. R12: Charakteristische Verteilung von LiAS-Signalen im Tier



* :zerfallende Nester; > :wandernde Nematocyten; x: integrierte Nematocyten

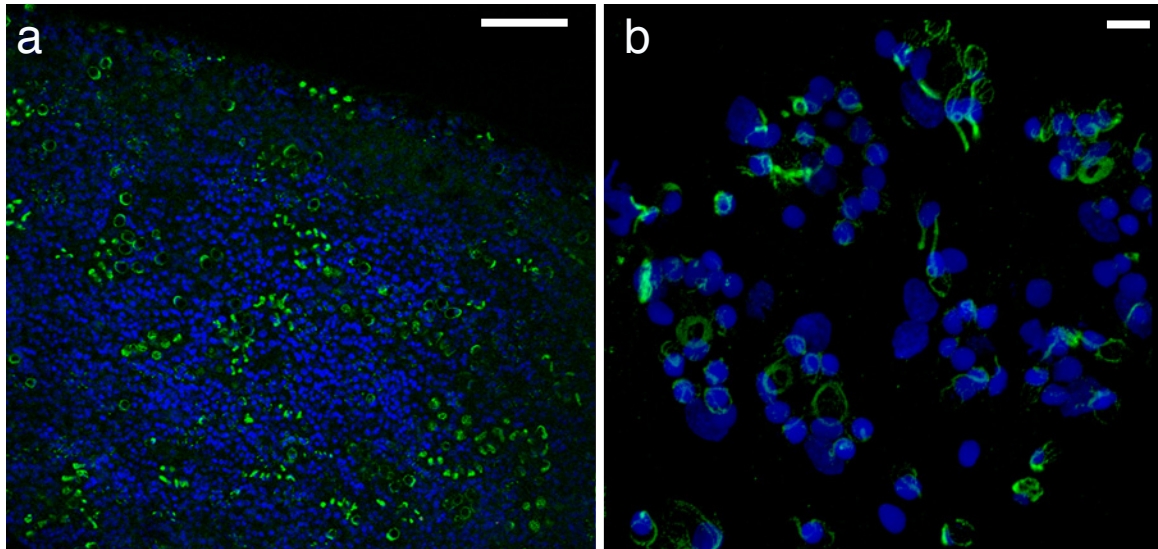
DAPI, LiAS

Abb. R13: anti-LiAS CLSM-Aufnahmen (Maximumprojektion)

Ausschnitte aus Rumpf (a) und Tentakel (b) in Kombination mit DAPI- Kernfärbungen (blau) zeigen die jeweils charakteristische Verteilung des anti-LiAS Signals (grün) in Nestern und reifen Nematocyten. Maßstab: (a) 100 μm , (b) 10 μm , Details siehe Text.

Die Reihenfolge der Einzelbilder in Abbildung R14 (S. 42) gibt eine mögliche Abfolge der Neststadien wieder, deren genauer Ablauf noch unklar ist aber mit integrierten Nematocyten (Abb. R13b; R14g) in Rumpf oder Tentakel endet. Abhängig vom jeweiligen Stadium konnte LiAS im Zellkern (Abb. R14d, S. 39; R15 a, a') und Zellkern nah (Abb. R15b,c) detektiert werden.

In Batteriezell-integrierten Nematocyten sowie Stenotelen, die in der Körpersäule integriert waren, konnte hingegen keine deutliche Kernlokalisierung beobachtet werden (Abb. R14g). In diesen terminal differenzierten Zellen zeigte sich dafür ein anti-LiAS-positives Netz aus dünnen Filamenten (Abb. R14 bis R20), welches Kapselvesikel und Zellkern korbartig einschloss (Abb. R14g; vgl. auch R18, S. 44) und das terminal differenzierte Stadium repräsentierte. Dabei erschienen die Maschen dieses Netzes in Richtung des Cnidocilapparates ausgerichtet.

Zusätzlich erschien das LiAS-Signal in Tentakeln am basalen Pol der Zell (der Mesogloea zugewandt) konzentrierter und bildet dort eine kissen-artige Struktur, die in einigen Aufnahmen (abhängig vom Beobachtungswinkel) aus parallelliegenden Ringen oder aus spiralförmigen Strukturen aufgebaut schien (vgl. Abb. R20c, S. 47) und in der Regel horizontal zur Mesogloea verlief (Ausführlichere Beschreibung in Abschnitt 3.3.2, S. 41 ff).

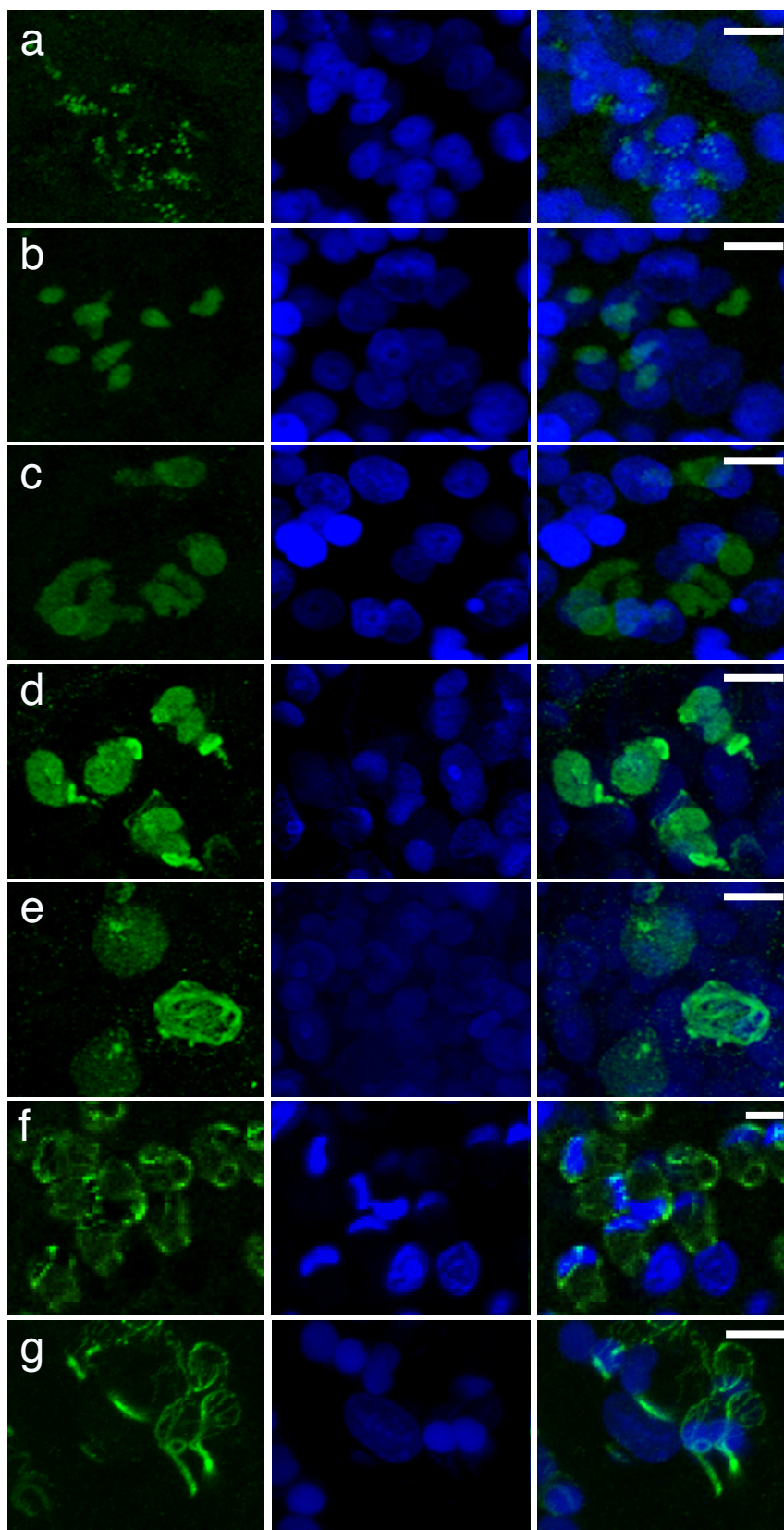


Abb. R14: CLSM-Ausschnittsvergrößerungen typischer anti-LiAS-Signale

Repräsentativ wurden typische anti-LiAS-Signale aus Rumpf (a-f) und Tentakel (g) zusammengefasst und in einer möglichen Differenzierungsreihe angeordnet. Während integrierte Nematocyten eindeutig Stenotelen oder Desmonemen zuzuordnen sind (g), fällt die Unterscheidung einiger Neststadien (a-d) schwer und kann erst in späten Entwicklungsphasen (e,f) anhand der deutlich unterschiedlichen Größe getroffen werden. Maßstab: je 10 μm , Details siehe Text.

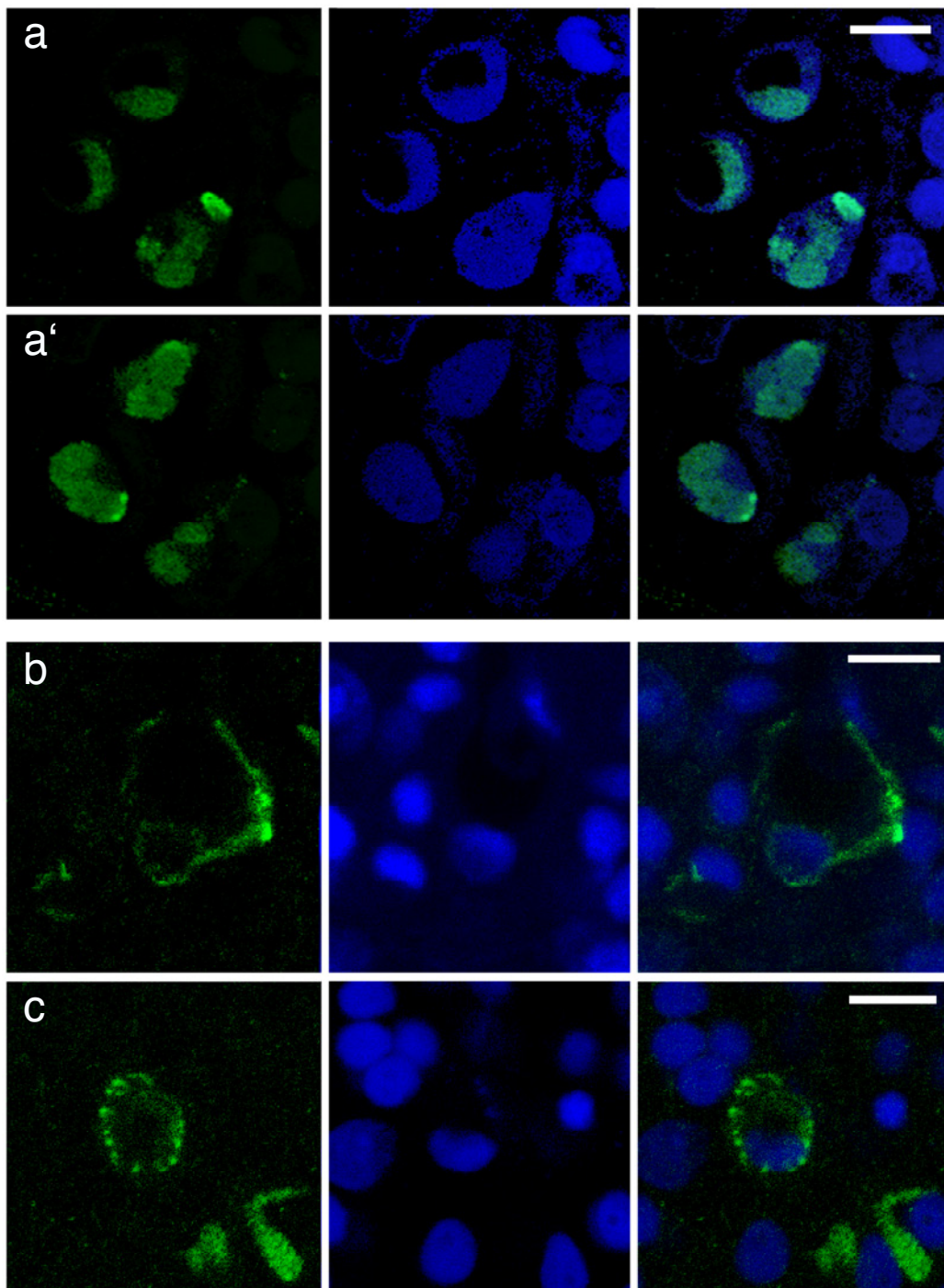


Abb. R15: Ausschnittsvergrößerungen optischer Schnitte (CLSM-Aufnahmen) zeigen unterschiedliche zelluläre Lokalisation von anti-LIAS-Signalen im Rumpf

Optische Schnitt durch anti-LIAS-positive Zellen zeigten in Abhängigkeit zum Differenzierungsstadium Lokalisation im Zellkern (a, a') und nahe dem Zellkern (b, c). In grün: anti-LIAS, in blau: DAPIKernfärbung. Maßstab: je 10 μm ; (Details siehe Text)