

Identifizierung und Charakterisierung von
basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren
im Zusammenhang mit dem interstitiellen Stammzell-System
des Süßwasserpolypen
Hydra



Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol.
Bianca Bertulat
aus Dieburg

Darmstadt
2008

Referent: Prof. Dr. Thomas W. Holstein
Koreferent: Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 14. März 2008
Tag der mündlichen Prüfung: 09. Mai 2008

Diese Arbeit wurde an den Instituten für Zoologie der Technischen Universität Darmstadt und der Universität Heidelberg angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Tagungsbeiträgen veröffentlicht bzw. befinden sich in Publikationsvorbereitung:

Posterbeiträge:

GfE-Tagung, Bonn, 2003
SFB 269-Symposium, Frankfurt am Main, 2003
GfE-Tagung, Munster, 2005
Internationaler Workshop: Hydra and the molecular logic of regeneration, Tutzing 2005
GfE-Tagung 2007, Marburg
Internationaler Workshop: Hydra and the development of animal form, Tutzing, 2007

Vorträge:

„LiAS, a novel bHLH transcription factor in Hydra neurogenesis“,
Internationaler Workshop, Tutzing, 2005

„Basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors in *Hydra magnipapillata* and intersitial stem specification cell“,
Internationaler Workshop Tutzing, 2007

Publikation in Vorbereitung:

„Interaction of the bHLH factor HyLiAS with the cytoplasmatic domain of *Hydra* Cadherin (HyCad-CPD) suggests a dual role of an AS-C-Homologe in *Hydra* and a possible function of Cadherin-positive nerves in nematocyte migration and guidance“.

Erklärung:

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig verfaßt und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt wurde.

Dieburg, den 12. März 2008

(Bianca Bertulat)

im Andenken an Gerd und Georg
für Brigitte und Katharina

Wahrlich, keiner ist Weise,
Der nicht das Dunkle kennt

Hermann Hesse, Im Nebel

Es soll sich zeigen, was ist.

Karl Jaspers, Die Philosophie in der Welt

Zusammenfassung

Meine Arbeit befasst sich mit der Superfamilie der basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit Differenzierungsmechanismen interstitieller Stammzellen (I-Zellen) im Süßwasserpolyphen *Hydra*.

Da bHLH-Dimere konservierte Funktionen bei der Auswahl von Vorläuferzellen und deren Differenzierung und Subspezifizierung zu einzelnen Zelltypen übernehmen, interessierte mich, welche bHLH-Faktoren an der Spezifizierung des I-Zell-Systems beteiligt sind, das in *Hydra* neben Gameten und Drüsenzellen alle neuronalen Zelltypen hervorbringt. Mein Fokus richtete sich dabei speziell auf die beiden neuronalen Differenzierungswege in *Hydra* (Nervenzell- und Nematocytendifferenzierungsweg) und die neuronalen bHLH-Familien des Achaete/Scute-Complex (AS-C) und der Atonal Related Proteine (ARP).

Vor dem Hintergrund, dass bislang nur ein AS-C-Homolog (Cnidarian Achaete/Scute-Homolog, Cnash) in *Hydra* beschrieben werden konnte (Grens *et al.*, 1995), gelang es mir vier ARP- und zwei AS-C-Homologe zu isolieren, von denen das AS-C-Homolog hyLiAS (*Hydra* Like Achaete/Scute) weiter charakterisiert und als erstes bHLH-Homolog speziellen Zelltypen in *Hydra* zugeordnet werden konnte (Stenotelen und Desmonemen). Zusätzlich gelang es LiAS eine Interaktion mit der cytoplasmatischen *Hydra* Cadherin-Domäne nachzuweisen, wodurch sich eine duale Funktion dieses neuen AS-C-Homologs mit Aufgaben außerhalb des Zellkerns andeutet.

Meine Arbeit zeigt, dass bereits in den Anfängen der Nervensystemen-Evolution vor etwa 650 Millionen Jahren ein komplexes Netzwerk von bHLH-Faktoren der AS-C- und ARP-Familie vorlag und unterstreicht den Wert der Cnidarier als Modellorganismen für die Evolution von Differenzierungsmechanismen und Signalwegen.

Abstract

My thesis deals with the super family of basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors and their influence on the interstitial stem cell (I-cell) system of the fresh water polyp *Hydra*.

Basic helix-loop-helix transcription factor-dimers orchestrated the selection and specification of precursor cells. My aim was to identify and characterize bHLH-factors involved in the specification of interstitial stem cells in *Hydra* which give rise to gametes, gland cells and all neuronal celltypes. In particular, I focused on the two neuronal differentiation pathways (the nerve cell- and nematocyte differentiation pathway) and the neuronal bHLH-families of the Achaete/Scute-complex (AS-C) and the Atonal Related Proteins (ARP).

In view of the fact, that so far only one AS-C homolog (Cnidarian Achaete/Scute-Homolog, Cnash) has been described in *Hydra* (Grens *et al.*, 1995), I succeeded in isolating four ARP- and two AS-C- homologs of which the AS-C-homolog hyLiAS (*Hydra* Like Achaete/Scute) was characterized as a new nematocyte specific differentiation gene (specific for stenoteles and desmonemes). In addition LiAS was proven to interact with the cytoplasmatic domain of *Hydra* cadherin, suggesting additional functions for LiAS outside the nucleus.

My results hint to a complex and old bHLH-network, acting already in the prime of nervous system evolution 650 million years ago, including AS-C- and ARP-family-members. In parallel, this work emphasizes once more the value of cnidarians as models for the evolution of differentiation mechanisms and signaling pathways.

Inhalt

Einleitung	1
1. Cnidarier: ein Überblick	1
2. Der Modellorganismus <i>Hydra spec.</i>	2
2.1. Bauplan und Allgemeines	2
2.2. Das interstitielle Stammzell (I-Zell) -System	3
2.3. Neuronale Differenzierungswege und Differenzierungsprodukte in <i>Hydra</i>	4
2.3.1. Der Nervendifferenzierungsweg (NvDP) in <i>Hydra</i>	6
2.3.2. Der Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP) in <i>Hydra</i>	6
3. Transkriptionsfaktoren der basic Helix-Loop-Helix Familie	9
3.1. Struktur und Klassifikation von bHLH- Proteinen	10
3.2. bHLH-Proteine in der Neurogenese	10
3.2.1. Die Achaete/Scute-Complex (AS-C)-Familie	13
3.2.2. Die Atonal Großfamilie (ARP)	14
3.2.3. AS-C, ARP, Evolution von Netzwerken und die Bedeutung von <i>Hydra</i>	16
Ergebnisse	17
1. Identifikation neuer Klasse II basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Faktoren in <i>Hydra</i>	17
1.1. Identifikation mittels heterologem Hefe-Two Hybrid Screen (THS)	17
1.1.1. Duaghterless Köderhybrid und Selbstaktivierungskontrollen	17
1.1.2. Identifizierung von pBD-Da Interaktionspartnern	18
1.2. Bestätigung der LiAS Sequenzen und Identifizierung weiterer bHLH Faktoren durch Datenbankanalyse	19
2. Charakterisierung der neu identifizierten <i>Hydra</i> bHLH-Sequenzen	20
2.1. Sequenzanalysen und Phylogenie der identifizierten Klasse II bHLH	20
2.1.1. Vergleichende Betrachtung der <i>Hydra</i> ARP-Homologe	23
2.1.2. Vergleichende Betrachtung der neuen <i>Hydra</i> Achaete/Scute Homologe und Cnash	25
3. Zelluläre und funktionelle Charakterisierung des <i>Hydra</i> Klasse II bHLH Faktors LiAS	26
3.1. Analyse der LiAS mRNA Expression	26
3.1.1. Die Nestgrößenanalyse von LiAS deutet auf eine Stenotelen-spezifische Funktion hin	27
3.1.2. Differenzierungszeit von LiAS positiven Nestern	29
3.2. Rekombinante Proteinexpression von LiAS zur Herstellung eines polyklonalen anti-LiAS Serums	30
3.2.1. Rekombinante Proteinexpression von LiAS in HEK293-Zellen	31
3.2.2. Herstellung eines polyklonalen anti-LiAS-Serum in Kaninchen	32
3.2.3. Expression von rekombinatem LiAS in BL21DE-Bakterien	34
3.3. Lokalisation von LiAS-Protein in whole mount Präparaten	34
3.3.1. Einzel- Immunfärbung mit anti-LiAS Serum in <i>Hydra magnipapillata</i>	34
3.3.2. Antikörperdoppelfärbung in <i>Hydra magnipapillata</i>	41

3.3.2.1. Immundoppelfärbung mit anti-LiAS und anti- β -Tubulin	42
3.3.2.2. Immundoppelfärbung mit anti-LiAS und Q94	46
4. Bestätigung der Proteininteraktion zwischen LiAS und der intrazellulären Domäne von <i>Hydra</i> -Cadherin (HyCad-ICD)	49
4.1. Systemabhängige Interaktionsbestätigung im Hefe-Two Hybrid System	49
4.2. Systemunabhängige Interaktionsbestätigung durch biochemische Methoden	49
4.2.1. Immun Co-Präzipitation von LiAS mit rekombinatem HyCad-CPD	50
4.2.2. Gelfiltration und Co-Elution	51
4.3. Antikörper Färbungen mit anti-LiAS und anti-Cadherin Antikörpern	51
4.3.1. Cadherin Färbung mit polyklonalem (anti-HyCad-EXD) und Peptid-antikörper (anti-HyCad-ICD)	51
4.3.1.1. Immunfärbung mit anti-HyCad-EXD	52
4.3.1.2. Immunfärbung mit anti-Cad-ICD Peptidantikörper	54
4.3.2. Kolokalisation von anti-HyCad-EXD/anti-LiAS	60
4.3.3. Räumliche Orientierung von anti-Cadherin im Bezug zu anti- β -Tubulin	61
Diskussion	64
1. bHLH-Faktoren in <i>Hydra</i>	64
1.1. <i>Hydra</i> bHLH-Faktoren und Differenzierung von I-Zellen	67
1.1.1. Die <i>Hydra</i> ARP-Homologe	67
1.1.2. Die <i>Hydra</i> AS-C-Homologe	70
2. Eine nähere Betrachtung des neuen <i>Hydra</i> AS-C Homologs LiAS	73
2.1. LiAS im Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP)	73
2.2. Mögliche Funktion von LiAS in Stenotelien und Desmonemen	75
3. Mögliche Bedeutung der LiAS/Cadherin Interaktion	76
3.1. Regulation von LiAS durch Interaktion mit Cadherin-Spaltprodukt?	78
3.2. Mögliche Funktion der LiAS/Cadherin Interaktion	80
4. Renaissance eines Modelorganismus	83
Material & Methoden	86
1. Organismen	86
1.1. Versuchstiere	86
1.2. Zellkultur	86
1.3. Hefen	86
1.4. Bakterien	86
2. Lösungen, Reagenzien und Medien	86
2.1. Bakterien-, Hefe- und Zellkultur-Medien	86
2.2. Lösungen und Reagenzien	87
3. Hefe- „Two-Hybrid Screen“ (THS)	87
3.1. Verwendete cDNA-Bibliothek SAll	87
3.2. Konvertierung der <i>Hydra vulgaris</i> cDNA-Bibliothek SAll	89
3.2.1. Titerbestimmung von SAll-Phagen und Helferphagen	89
3.2.2. <i>in vivo</i> „Mass Excission“ und Zirkularisierung von <i>pAD::SAll</i>	89

3.3. Köderplasmide und Kontrollplasmide	90
3.4. Hefetransfektion	90
3.4.1. „Quick& Easy“ Hefetransfektion	91
3.4.2. „High Efficiency“ Hefetransfektion	91
3.5. Selbstaktivierungskontrollen von Köder- und Zielkonstrukten	91
3.6. Selektion und Überprüfung möglicher Interaktionspartner	93
4. Charakterisierung von positiven Hefe-THS Interaktionspartnern	93
4.1. Plasmidisolierung aus Hefe, Amplifikation und Sequenzierung	93
4.2. „Rapid amplification of cDNA ends“ (RACE)	94
4.3. Ligation, Transformation und Plasmidpräparation	94
4.4. Sequenzanalyse und Phylogenie	94
5. Expressionsanalyse	95
5.1. „Whole mount“ RNA <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH)	95
5.2. Bromdesoxyuridin (BrdU) Markierung in Kombination mit ISH	96
6. Herstellen eines polyklonalen anti-LIAS Antikörpers	96
6.1. Klonierung rekombinanter LiAS Konstrukte	96
6.2. Rekombinante Proteinexpression in HEK 293, EBNA	97
6.3. Rekombinante Proteinexpression in BL21DE3	97
6.4. Reinigung des rekombinanten Proteins und Antikörperproduktion	98
6.4.1. Reinigung von rekombinanten Protein aus HEK 293, EBNA Zellen und Antikörperproduktion	98
6.4.2. Reinigung von bakteriell exprimierten rekombinanten Protein	98
6.5. Ammoniumsulfat-Fällung des Kaninchen Anti-Serums	99
6.6. Affinitätsreinigung des anti-HyLiAS-Antikörpers	99
7. Immunologische Techniken	100
7.1. SDS-PAGE und Western Blotting	100
7.2. Coomassie Färbung	100
7.3. Immunhistochemie: Einzel- und Mehrfachfärbungen	100
7.4. Konkurrenz der Antikörperfärbung mit rekombinatem Protein	102
8. Biochemischer Interaktionsnachweis	102
8.1. Gelfiltration und Koelution	102
8.2. Co-Immünpräzipitation von HyLiAS und HyCadherin (ICD)	102
9. Inhibitorstudien mit DAPT	102
10. Mikroskopie und Bildbearbeitung	103
Anhang	104
1. Abkürzungen	104
2. Angaben aus dem THS Bank-Datenblatt	106
3. Sequenz- und Vektordaten	106
3.1. Primersequenzen	106
3.2. Sequenzdaten der neu identifizierten bHLH- Gene	107

3.2.1. LiAS /hyLiAS	107
3.2.2. <i>Hydra</i> AS-C3	108
3.2.3. <i>Hydra</i> Ath-a	109
3.2.4. <i>Hydra</i> Ngn	109
3.2.5. <i>Hydra</i> NeuroD	110
3.2.6. <i>Hydra</i> NATO/p48	110
3.2.7. <i>Hydra</i> Scleraxis (hyScl)	111
4. Positive Klone des Daughterless -THS	112
5. Ergebnisse der Sequenzanalyse mit PSORT	114
5.1. Wahrscheinliche zelluläre Lokalisationen	114
5.2. Ergebnisse der PSORT Subprogramme	114
5.2.1. Details der PSORT-Analyse für LiAS	114
5.2.2. Details der PSORT-Analyse für Hy-AS-C3	115
5.2.3. Details der PSORT-Analyse für Hy-Ath-a	116
5.2.4. Details der PSORT-Analyse für Hy-Ngn	117
5.2.5. Details der PSORT-Analyse für Hy-NeuroD	118
5.2.6. Details der PSORT-Analyse für Hy-NATO/p48	119
5.2.7. Details der PSORT-Analyse für Hy-Scleraxis	120
6. Vorläufige ISH-Daten zu <i>hyAS-C3</i> und <i>hyNgn</i>	121
6.1. Vorläufige ISH-Ergebnisse für <i>hyAS-C3</i>	121
6.2. Vorläufige ISH-Experimente mit <i>hyNgn</i>	122
7. Kontrollexperimente mit polyklonalem anti-LiAS Serum	123
7.1. Kontrollen mit affinitätsgereinigtem anti-LiAS-Serum	123
7.2. Konkurrenz der LiAS Antikörper-Färbung mit bakteriell exprimierten LiAS-Protein	124
8. Erste DAPT-Experimente und Auswirkungen auf anti-Cadherin und anti-LiAS Immunfärbungen.	125
9. Lösungen & Rezepte	127
Quellenverzeichnis	128
1. Links:	128
2. Literaturverzeichnis	128
Danksagung	141
Lebenslauf	142

Abbildungsverzeichnis

E 1: <i>Hydra</i> Bauplan in schematischer Übersicht	2
E 2: Das interstitielle Stammzell-System in <i>Hydra</i>	4
E 3: Die neuronalen Differenzierungswege in <i>Hydra</i>	5
E 4: Verschiedene Darstellungen des Nematocyten-Batteriezell-Komplex	8
E 5: Schematische Darstellung eines bHLH-Dimers nach Bertrand <i>et al.</i> (2001)	10
E 6: Überblick über die bHLH-Superfamilie nach Massari <i>et al.</i> (2000)	12
R 1: Schematische Darstellung der <i>Hydra</i> AS-C- und ARP-Homologe und Vergleich des konservierten bHLH-Motivs	19
R 2: bHLH-Protein Alignment für die phylogenetische Rekonstruktion von Stammbäumen	21
R 3: <i>Neighbour Joining</i> Stammbaum Rekonstruktion von AS-C- und ARP-Homologen	22
R 4: Vergleichende Betrachtung der <i>Hydra</i> ARP-Homologe	24
R 5: Vergleichende Betrachtung der <i>Hydra</i> AS-C-Homologe	25
R 6: Verteilung von <i>LiAS</i> mRNA und Vergleich mit den Nematocyten-spezifischen Genen <i>Cnash</i> , <i>HyZic</i> und <i>NOWA</i>	28
R 7: BrdU-Dauermarkierungsexperiment zur Bestimmung der Differenzierungszeit <i>LiAS</i> -positiver Nester	30
R 8: Nachweis von HEK293-exprimierten <i>LiAS</i> (r <i>LiAS</i>) durch Western Blot mit anti-penta-His Antikörper und polyklonalem <i>LiAS</i> -Antiserum	31
R 9: Rekombinante <i>LiAS</i> -Expression in BL21DE3-Bakterien	33
R 10: Polyklonales anti- <i>LiAS</i> -Serum erkennt rekombinantes und Wildtyp Protein	33
R 11: Vergleich zwischen <i>LiAS</i> -Antikörper und ISH	36
R 12: Charakteristische Verteilung von <i>LiAS</i> -Signalen in <i>Hydra</i>	37
R 13: anti- <i>LiAS</i> CLSM-Aufnahmen (Maximumprojektion)	38
R 14: CLSM-Ausschnittsvergrößerungen typischer anti- <i>LiAS</i> -Signale	39
R 15: Ausschnittsvergrößerungen optischer Schnitte (CLSM-Aufnahmen) zeigen unterschiedliche zelluläre Lokalisation von anti- <i>LiAS</i> -Signalen im Rumpf	40
R 16: Einzelfärbung mit anti- β -Tubulin	41
R 17: CLSM-Aufnahmen von anti- <i>LiAS</i> /anti- β -Tubulin-Doppelfärbung im Rumpf	43
R 18: Ausschnitte von anti- <i>LiAS</i> /anti- β -Tubulin Spinning-Disk-Aufnahmen	44
R 19: Spinning-Disk-Ausschnittsvergrößerungen von anti- <i>LiAS</i> /anti- β -Tubulin Färbungen aus Tentakel-Batteriezellen	45
R 20: Einzelfärbung mit dem Nematocyten-Membran-Marker Q94	47
R 21: Q94/anti- <i>LiAS</i> Co-Färbungen (Spinning-Disk-Aufnahmen)	48
R 22: Biochemischer Interaktionsnachweis von <i>LiAS</i> und Cadherin durch Immunpräzipitation und Co-Elution	50
R 23: CLSM-Aufnahmen mit anti-Cad-EXD zeigen Signale in Tentakel und Rumpf	53
R 24: Fluoreszenz-Aufnahmen von anti-Cad-EXD in den Tentakeln	54
R 25: Fluoreszenz-Aufnahmen mit neu etabliertem anti-HyCad-ICD Immunfärbungs-Protokoll zeigen Färbung von Nervennetz und I-Zell-Nestern im Rumpf	55
R 26: CLSM-Detailaufnahmen von anti-HyCad-ICD-positiven Nervenzellen in Tentakel und Rumpf	56
R 27: anti-HyCad-ICD und DAPI Co-Färbung, Details (Spinning-Disk)	57
R 28: Kontakte zwischen anti-HyCad-ICD-positiven Nervenzellen und Nestern	58
R 29: Co-Lokalisation von <i>LiAS</i> und Cadherin an der Basis von Nematocyten in Batteriezellen im Tentakel	60
R 30: anti- β -Tubulin/anti-HyCad-ICD-Co-Färbung (Spinning Disk)	61
R 31: anti-Cadherin Co-Färbung mit anti- β -Tubulin und Q94 Antikörper	62

R 32: Statistische Auswertung der Orientierung des Stilettapparates von Stenotelen gegenüber anti-Cad-positiven Nervenzellen	63
D 1: Vergleich des <i>Hydra</i> -Daughterless-Homologes mit dem verwendeten THS-Köderkonstrukt	66
D 2: Mögliche Stellung von <i>Cnash</i> und <i>LiAS</i> im NemDP	72
D 3: Nematocyten-Batteriezell-Mesogloea-Komplex (NBM) nach Wood & Novak	75
D 4: Schema der γ -Sekretase-Spaltung von Cadherin und Auswirkungen auf CBP (nach Marambaud, 2003)	77
D 5: anti-HyCad-ICD erkennt ringförmige Strukturen in I-Zell-Nestern	81
D 6: Schematische Zusammenfassung möglicher LiAS-Funktionen	82
M 1: Fließschema des „Two Hybrid Screen“ (THS)	88
M 2: Konvertierung der subklonierten <i>Hydra vulgaris</i> cDNA-Bibliothek in die Plasmidform	89
M 3: Fließschema der „Quick&Easy“-Transfektion nach Gietz (1997)	92
M 4: Fließschema einer indirekten Immunfärbung	101
A 1: Vorläufige ISH-Ergebnisse mit <i>hyAS-C3</i> -Sonden	121
A 2: Vorläufige ISH-Ergebnisse mit <i>hyNgn</i> -Sonden	122
A 3: Dot-Blot Kontrolle des affinitäts gereinigten anti-LiAS Antikörpers	123
A 4: Immunfärbung mit affinitäts gereinigtem anti-LiAS-Serum (AF- α -LiAS)	123
A 5: Konkurrenz mit rekombinantem LiAS-Protein	124
A 6: Immunfärbung mit anti-HyCad-ICD nach DAPT-Inkubation	125
A 7: Immunfärbung mit anti-LiAS nach DAPT-Inkubation	126

Tabellenverzeichnis

Tab. M 1: Verhalten von YRG 2 Hefen auf Selektivmedium (SD)	92
Tab. M 2: Immunisierungs-Schema zur Antikörperherstellung	99
Tab. M 3: Verwendete Erstantikörper für <i>whole mount</i> Immunfärbungen	102
Tab. A 1: Verwendete Vektoren	106

Daten CD

Diss_BB_2008	vorliegende Arbeit im pdf Format
Sequenzen.doc	Sequenz der isolierten bHLH als Word-Datei
Bilder	zusätzliche Aufnahmen von ISH und Antikörperfärbungen
Filme	Animationen von Antikörper-Aufnahmen

Einleitung

1. Cnidarier: ein Überblick

Die Cnidarier (Nesseltiere) präsentieren sich als ein ungemein formenreicher Stamm an der Basis der Eumetazoa mit überwiegend mariner Lebensweise. Gleichzeitig kommt diesem Stamm eine große ökologische Bedeutung zu, sei es als Komponente des Zooplanktons und Räuber an Fischlarven oder als riffbildende Korallen. Nach heutigem Stand sind etwa 9000 Arten beschrieben (Heeger, 2004), deren Dimensionen zwischen mikroskopisch klein und mehreren Metern einschließlich hunderten von Kilogramm variieren (Heeger, 2004; Hofrichter, 2003; Storch, 1993). In den gegenwärtig vier unterschiedenen Klassen Scyphozoa (Scheibenquallen), Cubozoa (Würfelquallen), Hydrozoa (Wassertiere) und Anthozoa (Korallentiere) finden sich freischwimmende wie sessile Arten, die solitär leben oder Kolonien bilden und sich auf unterschiedliche Arten fortpflanzen (ungeschlechtlich, geschlechtlich, mit oder ohne Generationswechsel). Als Erscheinungsform treten Polypen und Medusen auf, die entweder zwei unterschiedliche Lebensabschnitte bzw. die einzige oder Haupterscheinungsform darstellen. Im Falle der beiden artenreichsten Gruppen treten bei Anthozoen (~ 6000 Arten) hauptsächlich Polypen und im Falle von Hydrozoen (~2700 Arten) Polyp oder Meduse auf (Storch & Welsch, 1993).

Als gemeinsame Merkmale aller Cnidarier gelten: (i) eine aborale-orale Hauptkörperachse, (ii) die Entwicklung aus nur zwei Keimblättern, die begriffsgebend für Ekto- und Endoderm wurden (Allman, 1853; Haeckel, 1874), (iii) Nesselzellen (Cniden oder Nematocyten), die zum Beutefang, zur Verteidigung und zur Fortbewegung eingesetzt werden und die bei einigen Arten extrem wirksame und auch dem Menschen gefährliche Toxine enthalten (hauptsächlich Cubozoa, z. B. *Chiropsalmus quadrigatus*, *Chironex fleckeri* aber auch einige Hydrozoen wie *Physalis physalis*).

Durch ihre evolutionäre Stellung und eine Entwicklungsgeschichte, die vor mindestens 650 Millionen Jahren begann, bilden die Cnidarier eine hervorragende Vergleichsgruppe zu höheren Metazoen. Hauptsächlich im Bezug auf die molekulare Evolution von Signalwegen und die damit verbundene Entstehung von Körperachsen, die Entwicklung von Nervensystemen und die Regerationsfähigkeit, waren und sind Cnidarier Gegenstand der Forschung. Dabei etablierten sich einige Cnidarier nicht nur in der Grundlagenforschung als Modellorganismus, sondern auch in anwendungsorientierten Forschungsbereichen, beispielsweise als Bioindikatoren oder als mögliche Lieferanten von antibiotischen Substanzen in der Pharmakologie.

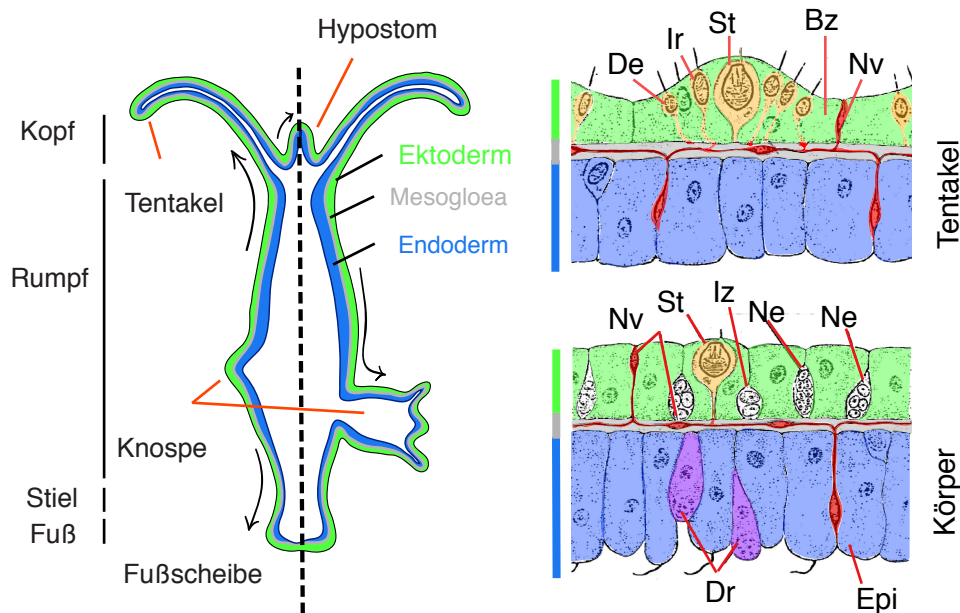


Abb. E1: Hydra Bauplan in schematischer Übersicht

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite den schematische Querschnitt durch Hydra (modifiziert nach Bode, 1996) und auf der rechten Seite vereinfacht die Anordnung der Zellen in Körper und Tentakel (modifiziert nach Gierer, 1974). Die Pfeile deuten die Richtung des Gewebeflusses an und die gestrichelte Linie symbolisiert die oral/ aborale Hauptkörperachse. In allen Zeichnungen wurde das ektodermale Epithel grün, das Endoderm blau und die zwischen den Epithelien liegende Mesogloea in grau eingefärbt. Rechts oben ist eine Batteriezelle (Bz) mit integrierten Nematocyten (orange) dargestellt, die basal einen speziellen Batteriezell-Nematocyten-Mesogloea-Komplex bilden und Verbindung mit dem Nervensystem (rot) eingehen. Rechts unten ist ein Ausschnitt der Körpersäule gezeigt. Dort finden sich vorwiegend einzeln integrierte Stenothelen (St) im Ektoderm sowie zahlreiche Stammzellen (Iz) und I-Zell Nester (Ne) in verschiedenen Entwicklungsphasen, deren Differenzierungsprodukte Drüsenzellen (Dr, violett), Nervenzellen (rot) und Nematocyten (orange) sind. (Details siehe Text)

2. Der Modellorganismus *Hydra spec.*

2.1. Bauplan und Allgemeines

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten *Hydra vulgaris* und *Hydra magnipapillata* sind solitäre Süßwasser-Polypen der Klasse Hydrozoa mit einer Größe von 0,5 bis 2 cm. Die Tiere vermehren sich unter optimalen Bedingungen durch asexuelle Knospung, doch kann auch Gametenproduktion durch Temperatur und Hunger induziert werden (Littlefield *et al.*, 1991; Loomis, 1954). Nach neuesten Erkenntnissen verfügt der säulenförmige Körper über zwei Körperöffnungen: eine aborale Pore in der Basalscheibe des Fußes (Shimizu *et al.*, 2007) sowie eine Mundöffnung im von Tentakeln umgebenen Hypostom (Abb. E1). Durch beide Öffnungen verläuft die aboral-orale Hauptkörperachse, um die der Körper radiärsymmetrisch aufgebaut ist. *Hydra* lässt sich morphologisch in 5 Regionen unterteilen: (1) in den Fuß mit Basalhaftscheibe und aboraler Pore, (2) den zur Fußregion zählenden Stiel (Peduncle), (3) die Körpersäule (Body), die Gastralraum und Knospungsregion umfasst, (4) die Kopfregion (Head), beginnen unterhalb des Tentakelkranzes und einschließlich des Hypostoms und (5) den Tentakeln.

Zu den Besonderheiten des Organismus zählt neben einem enormen Regenerationsvermögen und der Fähigkeit zur Selbstorganisation nach vollständiger Dissoziation (Gierer *et al.*, 1972; Noda, 1971; Technau *et al.*, 2000) ein permanenter Gewebefluss, der durch Proliferation der drei Hauptzelllinien (interstitielle Zellen, ekto- und endodermale Epithelzellen) im Bereich der Körpersäule erzeugt wird (Campbell, 1967a; Campbell, 1967b; Dübel, 1987). Dieser ständige Gewebeschub in Richtung von Kopf, Fuß und Knospe (Abb. E1) bedingt gleichzeitig eine permanente Aktion und Reaktion von bzw. auf Positionssignale und Musterbildungsprozesse, die *Hydra* einem „permanenten Embryo“ vergleichbar machen. In welcher Weise Zellen auf diese Positionsinformationen reagieren, wie Morphogengradienten selbst erzeugt werden, aus welchen Komponenten sie bestehen und welche Schlüsse daraus auf die Evolution von Signalwegen gezogen werden können, sind einige der aktuellen Forschungsschwerpunkte am Modellorganismus *Hydra* (Bode *et al.*, 1999; Bosch, 2007b; Bosch & David, 1984; Bosch & David, 1991; Bosch & Fujisawa, 2001; Fujisawa, 2003; Guder *et al.*, 2006; Holstein *et al.*, 2003; Meinhardt, 2002; Meinhardt, 2004; Meinhardt, 2008; Steele, 2002).

Ein weiterer interessanter Forschungsaspekt in *Hydra* ist das interstitielle Stamm-Zell (I-Zell) System (Abb. E2, S.4). Mit seinen verschiedenen Differenzierungsprodukten eignet es sich besonders zur Untersuchung von Differenzierungsmechanismen und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.2. Das interstitielle Stammzell (I-Zell) -System

Die interstitiellen Zellen (I-Zellen) sind eine der drei Hauptzelllinien in *Hydra* (Abb. E1, S. 2). Sie bilden eine multipotente Stammzellpopulation, deren Differenzierungsprodukte neben Keim- und Drüsenzellen alle neuronalen Zelltypen umfassen (Bode, 1996; Bode *et al.*, 1987; Bosch, 2007a; Bosch & David, 1991; Bosch, 1997; Koizumi *et al.*, 1990; Schmidt & David, 1986). I-Zellen bilden im Ektoderm der Körpersäule Zellgruppen von 2^n Zellen, die über cytoplasmatische Brücken miteinander verbunden sind (David & Plotnick, 1980). Nach einer charakteristischen Anzahl synchroner Teilungen differenzieren diese I-Zellnester synchron in 2 bis 32 Zellen eines Typs. Dabei interpretieren sie Positionsinformationen entlang der Körpersäule und scheinen ebenfalls in der Lage, ihre Proliferationsrate an die Dichte der Population anzupassen (Holstein & David, 1990; Sproull & David, 1979; Yaross & Bode, 1978a; Yaross & Bode, 1978b). Auf welche Weise I-Zellen Informationen über die Zelldichte ihrer Population erhalten ist bislang unbekannt, jedoch scheint eine Zunahme der I-Zellen mit einer Abnahme der Proliferationsrate zu korrelieren (Sproull & David, 1979).

Der aktuelle Kenntnisstand über die verschiedenen Differenzierungsprodukte der I-Zellen, ist unterschiedlich: Während noch recht wenig über die Differenzierungsmechanismen der Drüsenzellen bekannt ist, geht man im Falle der Keimzellen von einer kleinen unipotenten I-Zell-Subpopulation aus (Holstein & David, 1990), die unter den entsprechenden Umständen stark proliferiert und Oozyten oder Spermatozyten erzeugt (Littlefield *et al.*, 1985; Littlefield *et al.*, 1991;

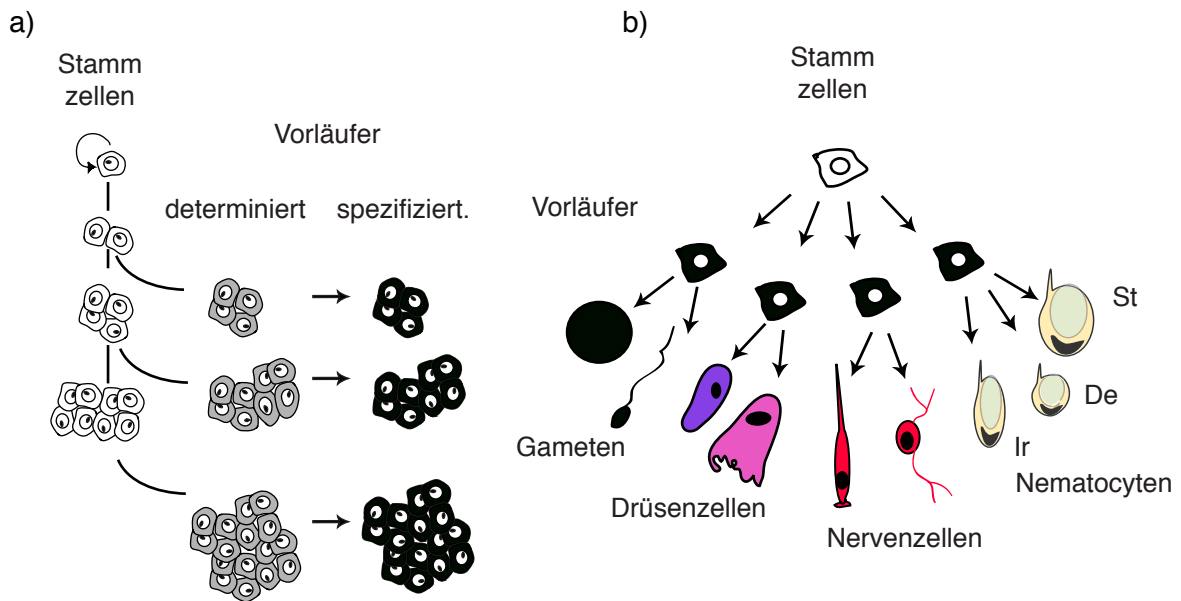


Abb E2: Das interstitielle Stammzell-System in *Hydra*

Aus einer Population multipotenter Stammzellen werden auf noch unbekannte Weise Vorläuferpopulationen etabliert, die in (a) als hellgrau schematisiert wurden. Diese determinierten Vorläufer verlieren im Laufe ihrer Differenzierung die Fähigkeit sich zu teilen und spezifizieren schließlich eines der I-Zell Differenzierungsprodukte in (b). Zu diesen Produkten zählen neben Gameten und Drüsenzellen alle neuronalen Zelltypen, die durch den Nervendifferenzierungsweg (NvDP) oder Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP) erzeugt werden. Dabei ist zu beachten, dass jede Entwicklungslinie über mehrere Subtypen verfügt. Im Falle der Nematocyten handelt es sich dabei um verschiedene Nesselzellen: Isorhizen (Ir), Desmonemen (De) und Stenotelen (St), Details siehe Text.

Miller *et al.*, 2000; Nishimiya-Fujisawa & Sugiyama, 1993; Nishimiya-Fujisawa & Sugiyama, 1995). Die übrigen I-Zell-Differenzierungsprodukte sind neuronaler Natur und werden entweder durch den Nervendifferenzierungsweg (NvDP) oder den Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP) gebildet (Abb. E3). Sie stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit.

2.3. Neuronale Differenzierungswege und Differenzierungsprodukte in *Hydra*

Ungefähr 50 % aller I-Zellen schlagen einen der beiden neuronalen Differenzierungswege ein (Abb. E3), die zu Nervenzellen oder Nesselzellen (Nematocyten) führen. Wie von Bosch sehr anschaulich zusammengefasst (Bosch, 2007a), geht man heute davon aus, dass die Differenzierung und Erhaltung der neuronalen Differenzierungsprodukte nach konservierten Mechanismen erfolgt, die auch in anderen Organismen zur Regulation der Neurogenese beitragen.

Anders als in höheren Metazoen, in denen viele neurogene Prozesse auf einen bestimmten und meist sehr frühen Entwicklungsabschnitt beschränkt sind, müssen diese Mechanismen in *Hydra* auf Grund der Gewebedynamik immer aktiv sein. Da ständig Nematocyten und Nervenzellen „verloren“ und gleichzeitig im Bereich der Körpersäule aus Stammzellen neu differenziert werden, befindet sich auch das Nervensystem von *Hydra* in einem Fließgleichgewicht. Daher muss

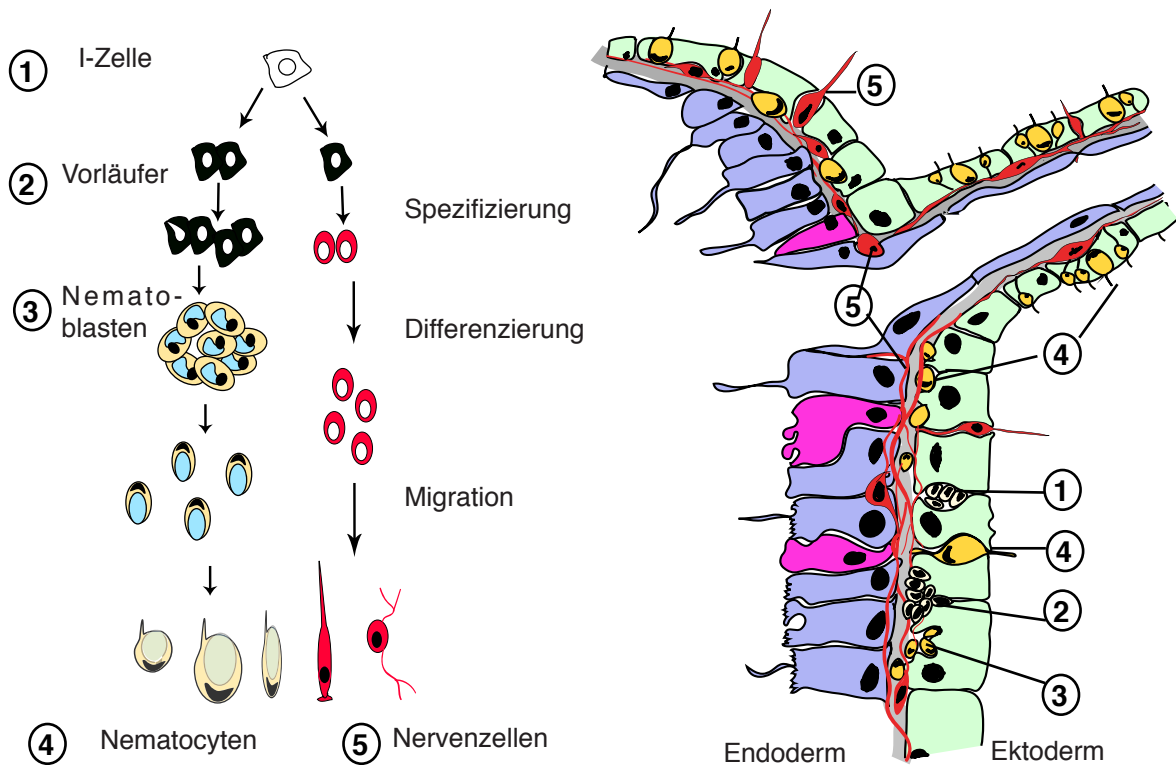


Abb. E3: Die neuronalen Differenzierungswege in *Hydra*

Auf der linken Seite sind schematisch die beiden neuronalen Differenzierungswege des I-Zellsystems zu sehen, die in zwei getrennten Linien zu Nematocyten (4) und Nervenzellen (5) führen. Die Lokalisation dieser Zellen im Gewebe wird rechts an einem schematischen Schnitt durch Hypostom und Tentakelbasis dargestellt., wobei die sich die Nummerierungen links und rechts entsprechen. Nach gegenwärtiger Auffassung werden Stammzellen (1) im Rumpf auf noch unbekannte Weise in Richtung Nerven- oder Nematocyten-differenzierungsweg spezifiziert. Die entsprechenden Vorläuferpopulationen (2) beenden die Zellteilungsphase und beginnen zu differenzieren (3). Im Falle von Nematocyten ist die beginnende Differenzierung an dem entstehenden Kapsel-vesikel (türkis) zu erkennen, das später den Großteil des Zellvolumenens beansprucht und den Zellkern an den Rand drängt (4). In der späten Differenzierungsphase lösen sich die bis dahin syncytial verbundenen Nester voneinander und beginnen zu wandern, bis sie an ihrem Zielpunkt in das Gewebe integriert werden.

sichergestellt werden, dass aus proliferierenden Stammzellen entsprechende Vorläuferpopulationen für die beiden neuronalen Differenzierungswege etabliert werden (Abb. E2 und E3). Diese Vorläufer müssen anschließend ausreichend proliferieren, bevor sie in die Differenzierung eintreten. Parallel dazu muss die Differenzierung kontextabhängig erfolgen und sich an Positionssignalen der Körperachse orientieren, um in ausreichender Zahl und an den richtigen Stellen genügend Differenzierungsprodukte zur Verfügung zu stellen (David & Hager, 1994; David & Plotnick, 1980; Fujisawa *et al.*, 1986; Herlands & Bode, 1974a; Herlands & Bode, 1974b; Koizumi & Bode, 1986; Koizumi *et al.*, 1990; Moore & Campbell, 1973; Rubin & Bode, 1982; Smid & Tardent, 1984; Teragawa & Bode, 1995; Venugopal & David, 1981; Yaross & Bode, 1978a; Yaross & Bode, 1978b; Yaross & Bode, 1978c).

Neben diesen logistischen Aspekten muss die Identität von Stammzellen und determinierten Zellen bzw. differenzierenden Zellen erhalten und unterschieden werden. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird in der Neurogenese aller Organismen zeitlich und räumlich koordiniert und folgt einem erstaunlich konservierten und hoch

komplexen Zusammenspiel von verschiedensten Faktoren. Einige dieser Faktoren konnten ebenfalls in den neuronalen Differenzierungswegen von *Hydra* entdeckt werden, was auf eine gemeinsame Evolution von Neurongenesemechanismen vor der Spaltung von Vertebraten und Invertebraten hindeutet.

2.3.1. Der Nervendifferenzierungsweg (NvDP) in *Hydra*

Im Falle des Nervendifferenzierungswegs (NvDP) konnten in *Hydra* verschiedene Nervenzell-Subpopulationen durch die Expression von Neuropeptiden der RF-Amid-Familie und anderer Gene charakterisiert werden (zur Übersicht siehe Bode, 1996; Bosch, 2007a). Durch die Untersuchung einiger dieser Gene gelang es Fujisawa und Kollegen (Fujisawa, 1989), eine Gliederung des Nervensystems im Bereich des Fußnervennetzes nachzuweisen, die mit Positionssignalen der Körpersäule verknüpft ist.

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen, die zur Differenzierung der einzelnen neuronalen Subtypen führen, noch nicht im Detail bekannt sind, scheinen dabei Peptide eine wichtige Rolle zu spielen (Takahashi *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1997). So konnte dem Neuropeptid Hym-355 ein positiver Effekt auf die Nervendifferenzierung nachgewiesen werden, während PW-Peptide (wie z. B. Hym-33H) eher negativ auf die frühe Nervenentwicklung wirken (Bosch, 2007a; Takahashi *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1997). Aktuelle Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet deuten auf einen Feedbackmechanismus zwischen Hym-335 und Vertretern der PW-Peptidfamilie hin und nehmen weiterhin eine direkte Kommunikation zwischen Epithelzellen und sich entwickelnden Nervenzellen an (Bosch, 2007a).

Trotz intensiver Forschungsprojekte sind viele Details der Nervendifferenzierung in *Hydra* noch weitestgehend ungeklärt. Als gesichert gilt jedoch, dass Nervenzellen aus einer Population proliferierender I-Zellen im Rumpf eines Tieres hervorgehen (David & Gierer, 1974). Etwa die Hälfte dieser Population wandert Richtung Kopf oder Fuß, um sich dort zu differenzieren, während der Rest mehr oder weniger stationär bleibt und an Ort und Stelle in das Nervensystem integriert wird. Nach welchen Maßstäben die dafür notwendigen Entscheidungen getroffen werden und welche Mechanismen die Wanderung, bzw. die Integration neuer Nerven in das bestehende Nervennetz ermöglichen, ist ebenfalls unklar. Gleichzeitig ermöglicht die Erforschung solcher offenen Fragen am Modellorganismus *Hydra* Einblicke in die Evolution von Zellmigration und Zellintegration.

2.3.2. Der Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP) in *Hydra*

Ähnlich zum NvDP (Abb. E3) ist auch die Situation im *Hydra*-Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP): Auch hier gehen aus 4er bis 32er Zellnestern im Rumpf des Tieres spezialisierte Nematocytensubtypen hervor (Fujisawa & David, 1981; Fujisawa & David, 1982; Fujisawa *et al.*, 1986). Nachdem I-Zellen auf eine noch unbekannt Art früh in Richtung NemDP determiniert werden, beginnen diese Nematoblasten nach einigen Zellteilungen (2-5) synchron

mit der Bildung eines post-Golgi-Vesikels, das zur späteren Kapsel (Nematocyste) heranreift. Während dieser Differenzierungsphase bleiben Nematoblasten-Nester über cytoplasmatische Brücken miteinander verbunden, die sich erst gegen Ende der Differenzierung zurückbilden.

Nach Reifung des Kapselvesikels zerfallen die Nester in einzelne Nematocyten mit ausdifferenzierten Kapseln (Nematocysten). Dabei geht aus einem Nest jeweils einer von vier morphologisch eindeutig zu bestimmenden Kapseltypen hervor (Stenotelen, Desmonemen, atriche und isotriche Isorhizen). Gleichzeitig beginnen die reifen Nematocyten zu wandern, bis sie im Ektoderm der Körpersäule oder in spezialisierten Epithelzellen der Tentakel (Batteriezellen) integriert werden. Wie im NvDP sind auch hier die genauen Mechanismen der Migration und die Signale, die zum Einbau in das Gewebe führen, unbekannt. Mit der Verankerung der Nematocyten im Ektoderm bzw. in einer Batteriezelle endet der NemDP. Als besondere Struktur entstehen dabei die Batteriezellen der Tentakel.

Eine Batteriezelle bildet eine Einheit von mehreren Nematocyten unterschiedlichen Typs und einer ektodermalen Epithelzelle, die diese Nematocyten umschließt und wahrscheinlich nach deren Entladung phagozytiert. Gleichzeitig sind Batteriezellen in enger Nachbarschaft zum Nervensystem lokalisiert, das Kontakt zu den einzelnen montierten Nematocyten aufnimmt. Auf Ultrastrukturebene wurde ein spezieller Nematocyten-Batteriezell-Mesogloea-Komplex (NBM) beschrieben (Campbell, 1987; Novak & Wood, 1983; Slautterback, 1967; Tardent & Holstein, 1982), der vermutlich aus Mikrotubuli aufgebaut wird und zur Verankerung der Zellen notwendig ist (Abb. E4). Auch hier sind die genauen Vorgänge zum Aufbau des Komplexes, seine einzelnen Komponenten und ihre genaue Funktion unbekannt und werden im Rahmen der Evolution von Zell-Zellverbindungen und Zell-Matrix-Kontakten untersucht (Day & Lenhoff, 1981).

Ähnlich interessant und gleichfalls ungeklärt sind die Differenzierungsprozesse, die zu den unterschiedlichen Kapselvesikeln selbst führen, die zu den kompliziertesten Sekretionsprodukten im Tierreich zählen (Holstein, 2003). Auf molekularer Ebene wird für den NemDP eine Differenzierungskaskade postuliert, die homolog zur Nervendifferenzierung in anderen Organismen von Zinkfingertranskriptionsfaktoren zu basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteinen führt und mit der Expression terminaler Differenzierungsmarker endet. Speziell aus der Neurogenese von Vertebraten ist bekannt, dass durch koordiniertes Zusammenspiel verschiedener bHLH-Familien Vorläufer selektioniert und Subpopulationen spezifiziert werden, wobei nicht nur die Wirkungsweise, sondern auch die Funktion der spezifizierten Strukturen konserviert erscheinen (Bertrand *et al.*, 2002; Fritsch, 2001).

Diese Kaskade beginnt in *Hydra* mit dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor HyZic (Lindgens *et al.*, 2004) und schließt das Cnidarian Achaete/Scute- Homolog Cnash (Grens *et al.*, 1995) ein. Cnash ist das erste isolierte Homolog einer bekannten neuronalen Subfamilie der bHLH-Proteine, die in konservierter Weise an der Neurogenese in allen bisher untersuchten Metazoen beteiligt ist (Eine ausführliche

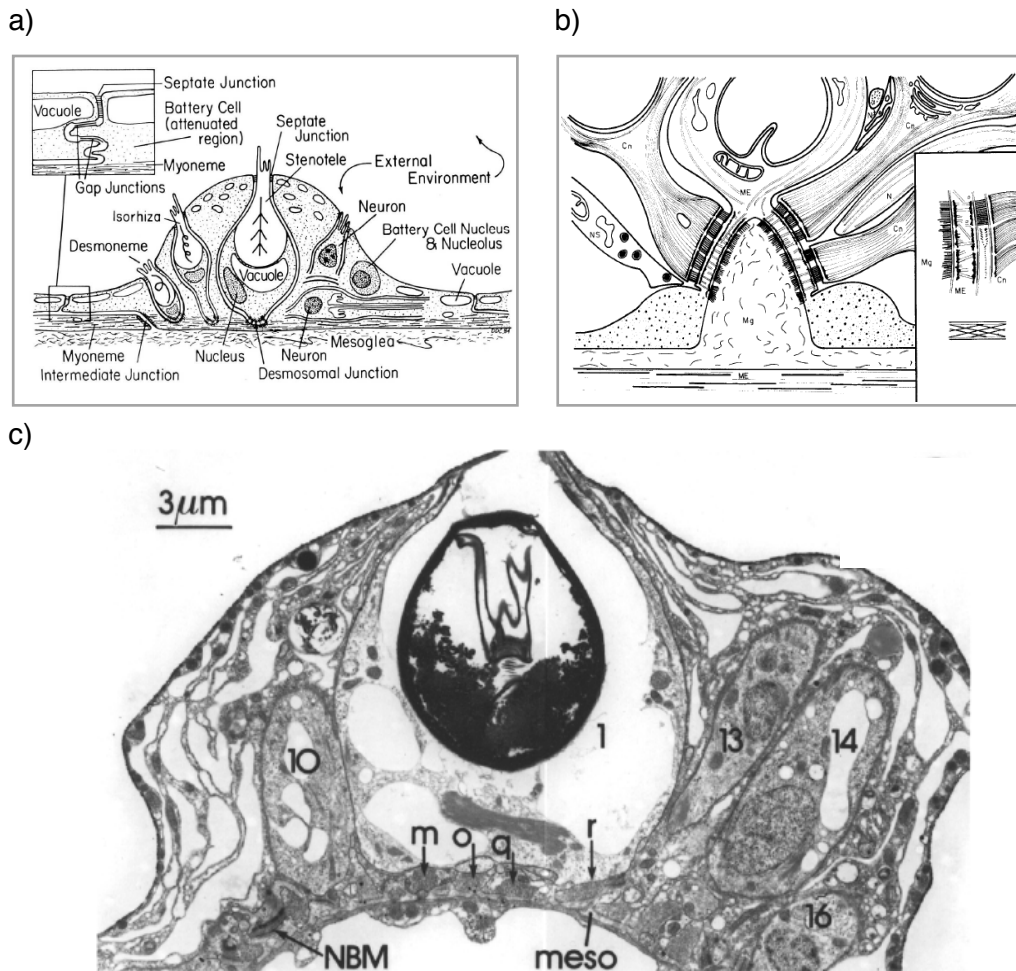


Abb. E4: Verschiedene Darstellungen des Nematocyten-Batteriezell- Komplex

Die oben gezeigten Abbildungen zeigen in (a) und (b) die schematischen Darstellungen des Nematocyten-Batteriezell-Mesoglea-Komplexes (NBM). Abbildung (a) wurde einem Übersichtsartikel von Kass-Simon und Scappaticci (1987) entnommen und Abbildung (b) Slauterback (1967.) In beiden Zeichnungen wird ein Zellverbindungskomplex gezeigt, der in seinem Aufbau einem Hemidesmosom ähnelt. Dieser Komplex wurde ebenfalls durch Ultrastrukturdaten von Campbell (1987) in Abbildung (c) dargestellt. Dort deutlich zu erkennen ist eine eingebaute Stenothele mit ihrem charakteristischen Kapselvesikel. Die Nematocyte wird hier von der Batteriezelle umschlossen, bleibt aber basal mit der Mesoglea (meso) verbunden. Vermutlich finden auch in diesem basalen Bereich Kontakte zum Nervennetz der Tentakel statt.

Beschreibung der bHLH-Familien erfolgt in Abschnitt (3). In seiner Erstbeschreibung wurde *Cnash* von Grens (1995) als Nematocyten-spezifisches Gen definiert und galt bis zu dieser Arbeit als einziges neurales bHLH-Gen in *Hydra*. Allerdings konnte *Cnash* mittlerweile von Hayakawa (Hayakawa *et al.*, 2004) auch in Nervenzellen der Tentakel beobachtet werden, jedoch sind die Signale dort im Vergleich mit den von Grens beschriebenen *Cnash*-positiven (*Cnash*+) Nestern im Rumpf wesentlich schwächer. Wie Lindgens (2004) zeigte, überlappt innerhalb des NemDP die Expression von *Cnash* mit der Expression des terminalen Differenzierungsmarkers *NOWA* (Engel *et al.*, 2002), der für ein Strukturprotein der Kapselwand codiert.

Homologe der beschriebenen Genkaskade sind ebenfalls aus vielen Neurogeneseprozessen anderer Organismen bekannt (Quan *et al.*, 2004; Quan & Hassan, 2005). Daher stellten sich folgende Fragen: (i) In der Neurogenese aller untersuchten Organismen wirkt ein Netzwerk aus mindestens zwei bHLH-Proteinfamilien an der Etablierung und Differenzierung von Vorläuferpopulationen sowie von spezialisierten Zellen mit. Mit *Cnash* wurde der Vertreter einer dieser Familien im NemDP identifiziert. Repräsentiert diese Familie die einzige bHLH-Gruppe in *Hydra* oder sind weitere bHLH-Proteine an der Spezifizierung des I-Zell-Stammsystems beteiligt? (ii) Es ist möglich, bHLH-Proteine in früh agierende (selektionierende) Gene und später agierende Differenzierungsgene zu unterscheiden. Dabei sind frühe Gene hauptsächlich in sich teilenden Vorläuferstadien aktiv. Wie Lindgens (2004) zeigen konnte wird *Cnash* in nicht proliferierenden Nestern exprimiert. Könnten daher weitere bHLH in den proliferierenden (*HyZic* positiven) Stadien exprimiert sein? Diese Fragen und die damit verbundene Suche nach weiteren Homologen der bHLH-Superfamilie im interstitiellen Stammzellsystem sind Kernthemen der vorliegenden Arbeit.

3. Transkriptionsfaktoren der basic Helix-Loop-Helix Familie

Die Superfamilie der basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine zählt mehr als 350 Mitglieder, die sich in 44 Familien gliedern (Ledent & Vervoort, 2001; Massari & Murre, 2000). Zwei dieser Familien sind ausschließlich in Hefe präsent, vier sind pflanzenspezifisch und weitere zwei Familien sind sowohl in Hefe als auch in Tieren vertreten. Die restlichen 36 Familien konnten bislang nur in Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen werden und sind dort an der Selektionierung von Vorläufern und deren Differenzierung beteiligt. Dabei deutet die weite, spezieübergreifende Verbreitung auf eine frühe Entstehung dieser Familie hin. Gleichzeitig lässt die erstaunliche Konservierung in Struktur und Funktion interessante Rückschlüsse und Spekulationen über die Entwicklung von regulatorischen Netzwerken in vielzelligen Organismen zu.

Während bHLH-Faktoren in Hefen hauptsächlich mit dem Metabolismus verknüpft sind (Hoshizaki *et al.*, 1990; Nikoloff *et al.*, 1992), beteiligen sie sich in den übrigen Organismen an der Differenzierung von spezialisierten Zelllinien. Beispielsweise steuert ein komplexes Netzwerk von bHLH-Faktoren in Vertebraten die koordinierte Entwicklung von Herz, Pankreas und Haut sowie Myogenese und Neurogenese (zur Übersicht siehe: Bertrand *et al.*, 2002; Kageyama & Nakanishi, 1997; Kageyama *et al.*, 1995; Karp & Greenwald, 2004; Lee, 1997a; Massari & Murre, 2000; Quan & Hassan, 2005; Ross *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 1995). Dabei wirken in der Regel verschiedene bHLH-Familien gemeinsam an der Etablierung von Vorläuferpopulationen, deren Proliferation und anschließender Differenzierung mit. Speziell in der Neurogenese konnte dabei ein erstaunliches Maß an Konserviertheit beobachtet werden, das sich über die Struktur der beteiligten Proteine bis hin zu ganzen regulatorischen Kaskaden erstreckte.

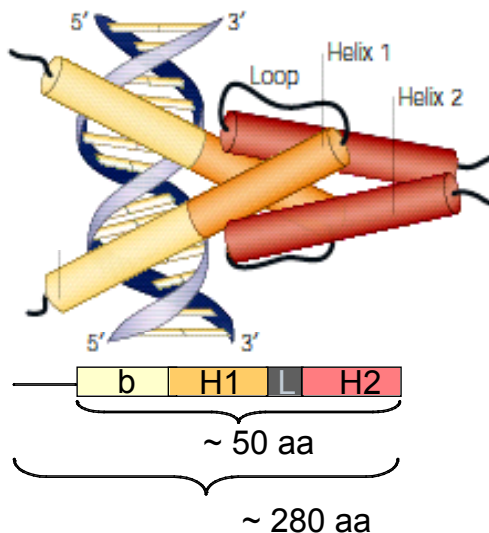


Abb. E5: Schematische Darstellung eines bHLH-Dimers nach Bertrand *et al.* (2001)

Die nebenstehende Abbildung aus Bertrand *et al.* (2001) zeigt ein typisches bHLH-Dimer, das über seine basische Domäne (b) mit DNA interagiert. Darunter ist der Aufbau des Monomers mit typischen Durchschnittsgrößen von gesamt Protein und bHLH-Motiv skizziert. Der Farbcode entspricht der Abbildung aus Bertrand *et al.* (2001)

3.1. Struktur und Klassifikation von bHLH- Proteinen

Die Gemeinsamkeit aller bHLH-Proteine ist ein in der Regel C-terminale gelegenes basic Helix-Loop-Helix Motiv aus ca. 50-60 Aminosäuren (AS). Dieses konservierte Motiv besteht aus einem kurzen Abschnitt mit vorwiegend basischen AS (basic, b) dem zwei α -Helices (H1 und H2) folgen, welche durch einen variablen Loop (L) miteinander verbunden sind (Abb. E5). Der basic Abschnitt von 10-15 AS ermöglicht bHLH-Proteinen mit DNA zu interagieren, während H2 als Dimerisierungsdomäne die Proteininteraktion mit andern bHLH-Faktoren vermittelt.

Je nach DNA-Erkennungsmotiv, Dimerisierungsverhalten und Vorkommen im Gewebe werden vier bis sieben bHLH-Klassen unterschieden, die je Autor von I bis VII nummeriert (Massari & Murre, 2000) bzw. von A bis F bezeichnet werden (Atchley & Fitch, 1997; Ledent & Vervoort, 2001). Zur Vereinfachung werden an dieser Stelle nur die in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden Klassen behandelt und im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben. Dabei richtet sich die Nomenklatur zum besseren Überblick nach Massari *et al.* (2000), die entsprechenden Gruppen nach Ledent *et al.* (2001) sind in Klammern angegeben. Nicht behandelt werden die Klasse IV (B) der Myc/Max-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, sowie Klasse III (einige Vertreter der Gruppe B) und VII (C), die zusätzlich zur bHLH-Domäne weitere Motive wie Leucin-Zipper (III/B) oder PAS-Domänen (VII) enthalten (Abb. E6).

3.2. bHLH-Proteine in der Neurogenese

Für die Neurogenese sind ubiquitäre und gewebe- bzw. zelltypspezifische sowie inhibitorische bHLH-Proteine von Bedeutung. Nach Massari *et al.* (2000) werden ubiquitäre exprimierte bHLH-Proteine in Klasse I (A) zusammengefasst. Klasse I bHLH-Proteine können sowohl Homo- als auch Heterodimer bilden (Murre *et al.*, 1989b) und sind nicht auf eine spezielle Zelllinie beschränkt. Vertreter dieser Klasse sind in der Lage, mit einer charakteristischen Hexanucleotidsequenz, der sog. „E-Box“ (CANNTG), zu interagieren und werden daher auch als E-Box- oder

E-Proteine bezeichnet. Zu den E-Proteinen zählen *Drosophila* Daughterless und sein Vertebraten-Homolog E12. Dabei resultiert E12 als Spleißvariante aus E2A zusammen mit dem weiteren E-Protein E47 (Murre et al., 1989a), anhand dessen Dimer-Kristallstruktur die ersten 3D Strukturmodelle der bHLH-Familie ermittelt werden konnten (Ellenberger et al., 1994).

Klasse II bHLH-Proteine (Gruppe B nach Ledent *et al.*) sind gewebe- oder zelltypspezifisch exprimiert und in der Regel nur als Heterodimere mit Klasse I bHLH aktiv (Cabrera & Alonso, 1991; Lassar, 1991; Van Doren *et al.*, 1992). Gewöhnlich führt ihre Interaktion mit E-Proteinen zu transkriptionellen Aktivierung verschiedener Zielgene und damit zur Aktivierung von unterschiedlichen Entwicklungsprogrammen (Anderson, 1999; Arnold & Braun, 2000; Bertrand *et al.*, 2002). Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem die muskelspezifischen Faktoren MyoD (Weintraub, 1993) und Myogenin sowie proneurale Gene der Achaete/Scute- und Atonal- Gruppe (Bertrand *et al.*, 2002) die weiter unten ausführlicher beschrieben werden.

Den aktivierenden bHLH-Faktoren der Klasse I und II stehen inhibitorische Proteine der Klasse V (D) und VI (E) gegenüber. Die Vertreter dieser beiden Klassen üben dabei auf unterschiedliche Art ihren inhibitorischen Effekt aus: Klasse V bHLHs umfassen die „Inhibitors of Differentiation“ (Id)-/Extramacrochaete (Emc)-Familie in Vertebraten bzw. in *Drosophila*, denen die basische DNA Interaktionsdomäne fehlt. Diese Proteine wirken so als kompetitive Interaktionspartner und bilden inaktive Dimere. Klasse VI umfasst die HES/ Enhancer of Split (E(Spl))/Hairy Familie. Sie bilden funktionstüchtige Dimere, bevorzugen jedoch im Gegensatz zu E-Box/Klasse II Dimeren eine andere Promotorsequenz (N-Box; CACGCG oder CACGAG) und zeichnen sich durch einen Prolin-Rest innerhalb der basischen Region aus.

Die herausragendste Rolle im bHLH-Netzwerk kommt den gewebe- und zellspezifischen bHLH der Klasse II zu. Speziell in der Neurogenese sind die beiden Großfamilien der „Acheate/Scute-Complex“ (AS-C)-Homologen und „Atonal Related Proteins“ (ARP) an der Regulation aller grundlegenden Differenzierungsschritte beteiligt. Verschiedene Studien konnten eine koordinierte Aktion von früh (proneuralen), mittel (intermediate/ neural) und spät (neuronal) agierenden bHLH-Genen beobachten, die schrittweise zur Spezifizierung einzelner neuronaler Gewebe oder Organsysteme führte (Birmingham et al., 1999; Dambly-Chaudiere and Vervoort, 1998; Guillemot et al., 2006; Kageyama & Nakanishi, 1997; Lee, 1997a; Lee, 1997b; Ross *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 1995).

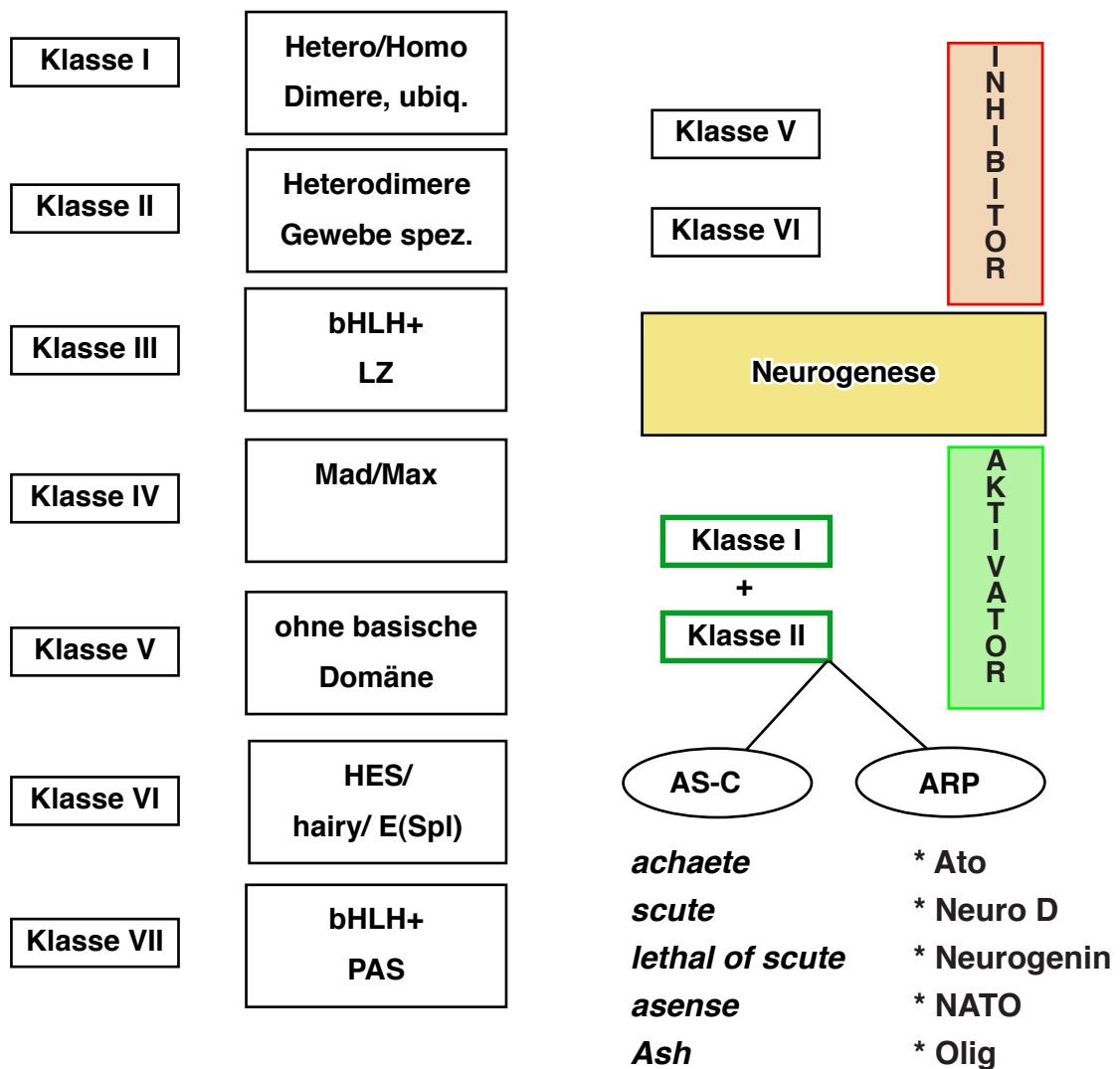


Abb. E6: Überblick über die bHLH-Superfamilie nach Massari *et al.* (2000)

Auf der Linken Seite sind die verschiedenen bHLH-Klassen zusammen mit ihren Charakteristika aufgelistet. Dabei orientiert sich die Einteilung der Klassen an einem Übersichtsartikel von Massari *et al.* (2000). Speziell für die Neurogenese sind die Klassen I und II und die Klassen V und VI von Bedeutung (rechte Seite). Während V und VI auf unterschiedliche Weise inhibierend auf die Neurogenese wirken, sind Heterodimere aus ubiquitären Klasse I und gewebespezifischen Klasse II bHLHs Aktivatoren der Neurogenese. Dabei unterscheidet man bei den gewebespezifischen Klasse II Faktoren die neuronalen Subgruppen AS-C (Achaete/Scute-Complex) und ARP (Atonal Related Proteine). Nach heutigem Kenntnisstand umfassen die AS-C vier Gene (*achaete*, *scute*, *lethal of scute*, und *asense*) und deren Homologe (*Ash*), während die ARPs weiter in die aufgelisteten Subfamilien unterschieden werden. (Details siehe Text)

3.2.1. Die Achaete/Scute-Complex (AS-C)-Familie

Die ersten Erkenntnisse über die Achaete/Scute- Gruppe stammen aus der genetischen Analyse der drei benachbarten *Drosophila* Gene *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*) und *lethal of scute* (*l'(sc)*), die unter der Bezeichnung Achaete/Scute Complex zusammen gefasst und später um das Gen *asense* (*ase*) erweitert wurden (Dambly-Chaudiere & Vervoort, 1998; Garcia-Bellido & Santamaria, 1978). Dabei zeigte sich, dass diese Gene eine wichtige Rolle in der Entwicklung des *Drosophila* Nervensystems spielen, wobei speziell die Gene *ac* und *sc* für die Bildung externer Sinnesborsten verantwortlich sind (Garcia-Bellido & Santamaria, 1978; Ghysen & Dambly-Chaudiere, 1989; Ghysen & Dambly-Chaudiere, 1990; Ghysen & Dambly-Chaudiere, 2003; Ghysen & Richelle, 1979). Dieser Zusammenhang konnte an „Loss of Function“ (LOF) Mutanten gezeigt werden: fehlt nur ein Gen (*as-* oder *sc-*), werden bestimmte Subpopulationen nicht gebildet, fehlen beide (*ac-/sc-*), fehlen alle externen Sinnesrezeptoren.

Da AS-C Gene in proliferierenden Zellen eines proneuralen Clusters exprimiert werden und diesen die Kompetenz verleihen, sich zu neuronalen Vorläuferzellen zu entwickeln, bezeichnet man diese Gene als proneural. Ein weitere Eigenschaft proneuraler Gene ist, dass ihr LOF Phänotyp zur Deletion der Zelllinie führt, die sie spezifizieren. Die Expression dieser proneuralen Gene ist in *Drosophila* auf epidermale proneurale Zellcluster beschränkt und wird mit beginnender Differenzierung einzelner Vorläufer eingestellt. Ab diesem Zeitpunkt wird das Vorläuferstadium von *ase* aufrechterhalten (Brand *et al.*, 1993; Jarman *et al.*, 1993a), bis weitere bHLH-Faktoren anderer Familien zelltypspezifische Differenzierungsprogramme initiieren.

Alle vier Gene des AS-C zeigten verschiedene Phänotypen in den jeweiligen LOF Mutanten, scheinen aber funktionell redundant, da jedes einzelne in der Lage ist, den *as-/sc-* LOF Phänotyp zu retten, was für proneurale Kapazität aller AS-C Gene spricht (Dominguez & Campuzano, 1993; Hinz *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1990). Dabei scheinen sich *ac* und *sc* in besonderer Weise gegenseitig zu regulieren (Jan, 1993). Einige AS-C Gene sind darüber hinaus auch an der Entwicklung anderer Strukturen beteiligt und funktionieren dort auf eine Weise, die ihrem Verhalten in der Neurogenese entspricht. Beispielsweise ist *ac* ebenfalls an der Entwicklung des Malphigi Organs beteiligt, und agiert auch in diesem Kontext als Selektorgen von Vorläuferzellen (Flybase; Interactive Fly). In ähnlicher Weise wirken das Gen *sc* an der Geschlechtsbestimmung und *l'(sc)* an der Muskelvorläuferspezifizierung mit.

Als Klasse II bHLH Proteine bilden AS-Cs aktive Dimere mit E-Proteinen wie Daughterless (*Da*), die an klassische DNA E-Box Motive binden können (s. o.). Die Wichtigkeit der Interaktion mit Klasse I bHLH konnte ebenfalls an LOF Mutanten gezeigt werden: ohne *Daughterless* werden keine neuronalen Zellen gebildet. In ihrer Aktivität werden AS-Cs entweder durch die inhibitorische Interaktion mit Klasse V bHLHs (*extramacrochaete*, *emc*) oder durch bHLHs der Hairy/Enhancer of split-Familie (Klasse VI) und Notch-Signalkaskade reguliert.

In allen untersuchten Vertebraten konnten bislang mindestens zwei AS-C Homologe (ASh) identifiziert werden, in *Xenopus* sogar vier (Lee, 1997a). Dabei bestätigten die entsprechenden Faktoren in „Gain of Funktion“ (GOF) Experimenten in *Xenopus* ihren proneurale Charakter durch ihre Fähigkeit, ektopisch neurale Strukturen im Ektoderm zu induzieren (Cau *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1994; Parras *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 1996).

Aus diesen Ergebnissen schloss man auf ein konserviertes bHLH-Netzwerk, das in Vertebraten und Invertebraten die Selektion, Spezifizierung und letztlich Differenzierung von Vorläufer-Zellen koordinieren. Im Vergleich zu ihren *Drosophila* Homologen scheinen die Vertebraten-AS-C, mit Ausnahme von *CASH4* (*chicken ASh 4*) und *Xash3a* und *b* (*Xenopus ASh 3a und b*), jedoch keine vergleichbar frühe Rolle auf Ebene des Neuroektoderms zu spielen und werden erst in späteren Neurogenese-Stadien aktiv (Quan & Hassan, 2005). Darüber hinaus sind, ähnlich wie in *Drosophila*, für einige Vertebraten-ASh ebenfalls Funktionen außerhalb der Neurogenese beschrieben: beispielsweise ist das Maus Homolog Mash 3 an der Entwicklung von Speicheldrüsen beteiligt (Yoshida *et al.*, 2001).

Wie in einem Übersichtsartikel von Skaer *et al.* (Skaer *et al.*, 2002) anschaulich beschrieben, nimmt man an, dass der AS-C aus einer Reihe von Genduplikationen (Taylor & Raes, 2004) hervorgegangen ist, die eine neue Flexibilität in der Transkriptionsregulation eröffneten. Diese Duplikationsereignisse fallen mit der Entwicklung komplexerer Baupläne zusammen und gelten als eine der möglichen Triebkräfte der Evolution (Ohno, 1970; Ohno, 1993; Ohno, 1997; Ohno, 1998; Ohno, 1999; Ohno *et al.*, 1968). Da bis zu dieser Arbeit nur ein AS-C in Cnidariern (Cnash) bekannt war, nahm man an, dass dieses Duplikationsereignis an der Basis der Triploblasten aufgetreten sei (Skaer *et al.*, 2002).

3.2.2. Die Atonal Großfamilie (ARP)

Bei Studien des AS-C in *Drosophila* und den Auswirkungen von LOF Experimenten auf das dortige Nervensystem zeigte sich, dass AS-C Gene für die Etablierung externer chemo- und mechanosensorischer Sinnesorgane (zusammengefasst als Externe Sinnes Organe, ESO) und für einige mulidentrische Neurone von Bedeutung sind. Allerdings zeigte die Deletion von AS-Cs keine Wirkung auf interne „streich“ Rezeptoren (Chordotonale Organe, CHO) oder olfaktorische Sinnesorgane, die weitere Komponenten des Peripheren Nervensystems (PNS) in *Drosophila* bilden. Da jedoch alle diese Strukturen durch den Verlust des ubiquitären Interaktionspartners *Daughterless* eliminiert werden konnten, vermutete man, dass weitere proneurale bHLH an der Entwicklung dieser Organe beteiligt sein könnten. Die Suche nach diesen weiteren Faktoren führte zur Identifizierung der „Atonal Related Protein“ (ARP) Familie (Brand *et al.*, 1993; Hassan & Bellen, 2000; Jarman & Ahmed, 1998; Jarman *et al.*, 1993a; Jarman *et al.*, 1993b; Jarman *et al.*, 1994), die gemeinsam mit der AS-C Gruppe die aktivierenden bHLHs der Neurogenese stellen.

ARPs repräsentieren damit die zweite Großfamilie von Klasse II bHLH-Proteinen, welche für die Selektion und Differenzierung von Vorläuferpopulationen von Bedeutung ist. In *Drosophila* umfasst diese Familie die Gene *atonal* (*ato*), *absent multidentritic neurons and olfactory sensilla* (*amos*), *cousin of atonal* (*cato*) und *target of ponx/biparous* (*tap*). Dabei scheint *cato* (ähnlich wie *ase*) weniger an der Selektion sondern hauptsächlich an Erhalt und Differenzierung bereits etablierter Vorläufer beteiligt. Durch die Identifizierung weiterer Vertebraten-ARPs wurden bald innerhalb dieser Gruppe verschiedene Subfamilien definiert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt unterscheidet man folgende Subgruppen: (i) Atonal Homologe (mammalian Ato Homologe, MATH/Math), (ii) Neurogenin (Ngn), (iii) NeuroD (ND), (iv) NATO (Nephew of Atonal) und (v) Olig-Familie. Zusätzlich sind weitere Familien im Gespräch, jedoch auf Grund fehlender Homologe in anderen Organismen noch nicht allgemein charakterisiert (Bertrand *et al.*, 2002).

Ähnlich der AS-C-Gruppe wirken auch die ARP-Familien kontext- und zeitabhängig miteinander auf entsprechende Vorläufer ein, um diese weiter zu spezifizieren und schließlich deren terminale Differenzierung einzuleiten. Bei der Analyse von GOF- und LOF-Phänotypen konnte *ato* eine besondere Bedeutung für die Differenzierung von Mechano- und Riechrezeptoren, in der Entwicklung des Gleichgewichtssinnes sowie von Ohr und Auge nachgewiesen werden. In einem vergleichbaren zellulären Kontext wirken auch ARP- Homologe in Vertebraten (Ben-Arie *et al.*, 2000; Bermingham *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2002; Guillemot, 1995; Guillemot, 1999; Guillemot *et al.*, 2006; Hassan & Bellen, 2000; Isaka *et al.*, 1999; Jarman, 2000; Kageyama *et al.*, 1995; Kanekar *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002; Lee, 1997a; Lee, 1997b; Ma *et al.*, 1996; Morrow *et al.*, 1999). Diese erstaunliche Konservierung eines Genes im gleichen zellulären Kontext, beispielsweise in den Innenohr-Haarzellen und dem Johnston Organ (Gleichgewichtsorgan in *Drosophila*) oder bei der Augenentwicklung in *Drosophila* und der Spezifizierung von Retina-Zellen von Zebrafisch bis Maus, bot Anlass zu zahlreichen Diskussionen über Homologien, konvergente Evolution und einen molekularen „Ur“-Mechanismus oder eine „Ur“-Funktion der ARPs und des bHLH-Netzwerkes im allgemeinen.

Auch einige Gruppen der ARP üben wie Vertreter der AS-Cs außerhalb der Neurogenese eine ähnliche Funktion in der Etablierung spezieller Zellpopulationen aus. Beispielsweise ist eine Kaskade von Neurogenin und NeuroD essentiell für eine korrekte Differenzierung des Pankreas. In diesem Kontext führte in Maus der Verlust von Ngn 1 ebenfalls zum Verlust von NeuroD-positiven Zellen, die wiederum essentiell für die Differenzierung einer ausreichenden Population insulinproduzierender Betazellen verantwortlich sind. Mäuse mit entsprechenden Defekten zeigten neben neuronalen Auffälligkeiten einen letalen diabetischen Phänotyp und starben kurz nach der Geburt.

3.2.3. AS-C, ARP, Evolution von Netzwerken und die Bedeutung von Hydra

Durch die Forschung der letzten Jahrzehnte und den Vergleich verschiedener Modellorganismen und unterschiedlicher Zellsysteme (Retina, Ohr, Geruchsinn, Zentrales und Peripheres Nervensystem, Mechanorezeptoren, usw.) entwickelte sich das Bild eines bHLH-Netzwerk es mit internen Abhängigkeiten und einem großen Maß an Redundanz. Dieses Netzwerk ist nicht nur kompliziert, es ist komplex, da es räumlich, zeitlich, dosis- und kontextabhängig auf verschiedenste Signale reagiert und vielfältig antwortet. Unter die verschiedenen Einflussgebiete der bHLH-Proteine fallen beispielsweise die Regulation des Zellzyklus (nur eine einzige Zellteilung zuwenig oder zuviel kann auf Ebene der Vorläuferzellen verheerende Wirkung haben) und die Adhäsionseigenschaften der jeweiligen Zellen (inklusive Migrationsverhalten).

Gerade diese Vielzahl an Möglichkeiten und Ebenen machen das bHLH-Netzwerk zu einem Studienobjekt für die Evolution von Differenzierungsmechanismen und die Robustheit von Netzwerken im Allgemeinen. Für die Erforschung dieser Wechselbeziehungen werden vermehrt systembiologische Ansätze wichtig, die organismenübergreifende Modelle erstellen. Für einen solchen Ansatz ist aber die Vielfalt der Daten entscheidend. Aus diesem Grund sind gerade Organismen außerhalb von Insekten und Vertebratenmodellen von Wert. Neben Tunikaten und Echinodermen bieten sich hier Cnidarier an. Gerade das I-Zellsystem in *Hydra* hat das Potenzial viele Wirkungsgebiete der bHLH-Familien abzudecken: Erhalt der Stammzellqualität, Spezifizierung von einzelnen Vorläuferzelllinien, Definition von Subtypen, Unterscheidung von zwei neuronalen Linien, Zellteilung, Zellwanderung, Zell-Zell-Kontakte, und so weiter. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass die beteiligten Faktoren ständig aktiv sind und sich ihre Wirkung nicht auf ein bestimmtes Zeitfenster in der Embryonalentwicklung beschränkt.