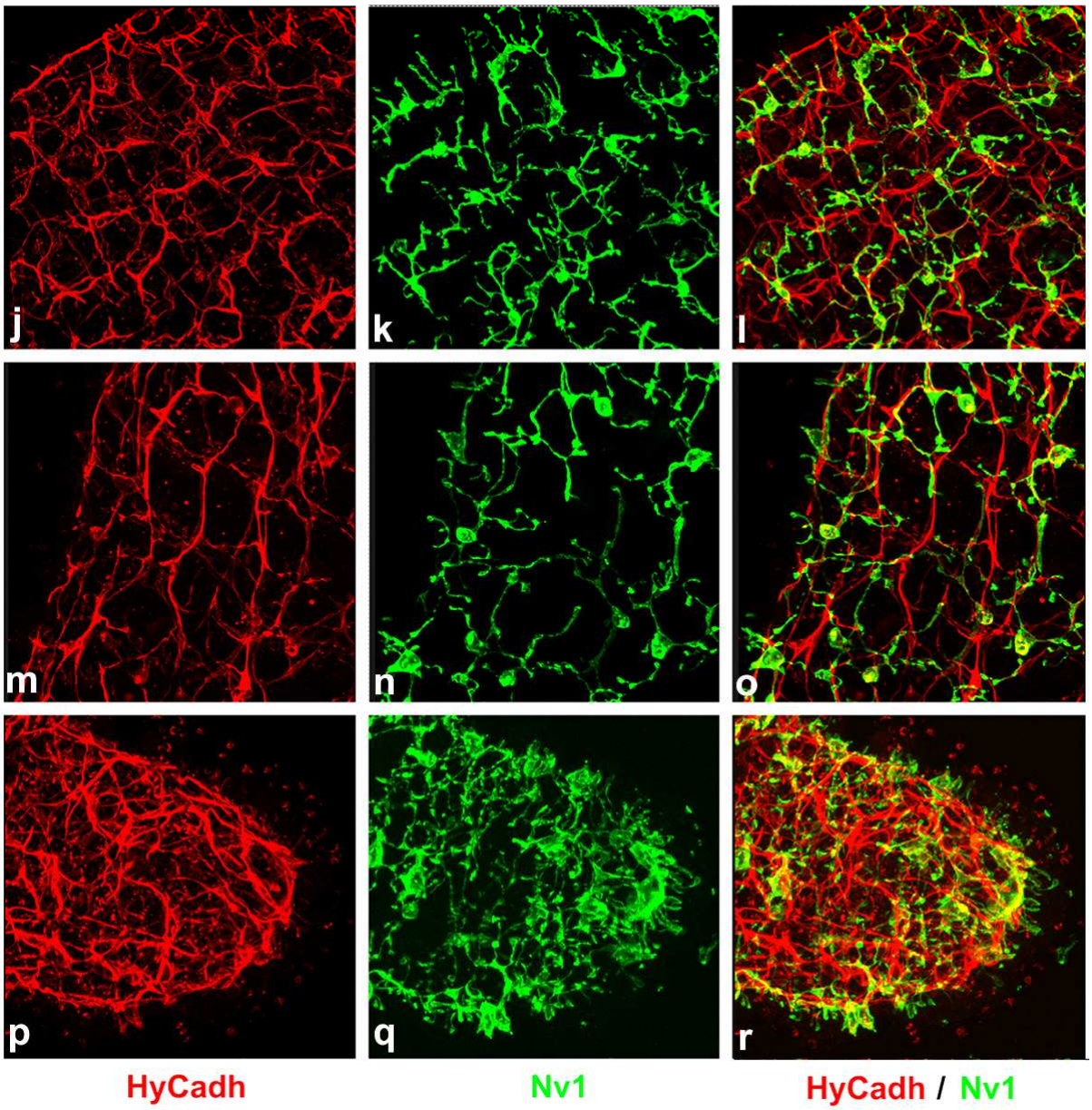

Abb. 3.22:
Doppelfärbungen mit den Antikörpern für HyCadh und Nv1 mit CLSM-Aufnahmen aus Bereichen der Tentakeln (j-l und m-o) und der Tentakelspitze (p-r, Vergr. 1:200).

3.5 *Hydra* δ-Catenin

In einem Hefe Two-Hybrid-Screen mit einem HyβCat-Fragment als „Köderstück“ wurde auch ein Fragment von 1232 Nukleotiden isoliert. Der offene Leserahmen von 410 Aminosäurese weist Ähnlichkeit zu den *armadillo-repeat*-Strukturen der Moleküle der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie auf. Diese Moleküle sind in höheren Metazoen als Interaktionspartner von β–Catenin nicht bekannt, vielmehr binden sie an das proximale Ende der cytoplasmatischen Domäne von klassischen Cadherinen nahe der Zellmembran (*juxtamembrane domain,* JMD) und sind Be-

standteil des Adhäsionskomplexes. Ihre Funktion ist nicht eindeutig geklärt, doch wird vermutet, dass sie eine Vernetzung der cytoplasmatischen Domänen der Cadherinmoleküle und somit eine Stabilisierung des Adhäsionskomplexes bewirken (Anastasiadis und Reynolds, 2000). Eine weitere Funktion in Signaltransduktionswegen als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors Kaiso wird ebenfalls diskutiert (Daniel und Reynolds 1999). Da *armadillo-repeat*-Strukturen auch in anderen Molekülen auftreten, war es wichtig, die vollständige Sequenz des Moleküls zu ermitteln, um eine bessere Einschätzung der Verwandschaft des *Hydra*-Moleküls zu anderen *armadillo-repeat*-Molekülen zu ermöglichen und so seine Funktion ableiten zu können. In einem Genbank-Screen und zwei aufeinander folgenden RACE (**r**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds)-Experimenten gelang es die vollständige Sequenz des Moleküls zu ermitteln.

3.5.1 Genbank-Screen und RACE-Experimente

Mit einer ^{32}P-markierten Sonde gegen das im Two-Hybrid-Screen isolierte Fragment konnte in einem Genbank-Screen acht Klone detektiert werden, die neben der bereits bekannten Sequenz in Richtung des aminoterminalen Bereichs weitere 750 Nukleotide aufwiesen. Das daraus resultierende Transkript wies ebenfalls eine grosse Ähnlichkeit zu Molekülen der δ-Catenin-Familie auf. Ausgehend von der so gewonnen Sequenz konnte mit zwei aufeinander folgenden RACE-Experimenten mit gegen den N-Terminus gerichteten Oligonukleotiden zwei weitere Fragmente von 790 bzw. 950 Nukleotiden gewonnen werden. Auch zum 3´-Ende konnte mit einem RACE-Experiment die letzten fehlenden 77 Nukleotide detektiert werden. Mit entgegengerichteten Oligonukleotiden, die aus den Sequenzen benachbarter Fragmente generiert wurden, ließen sich aus einer cDNA überbrückende Fragmente erwarteter Größe amplifizieren, die die fortlaufende Sequenz aus den einzelnen isolierten Fragmenten bestätigten.
Das gesamte Molekül weist demnach eine Größe von 3807 Nukleotiden auf, woraus ein offener Leserahmen von 1269 Aminosäuren resultiert (vollständige Sequenz im Anhang, Abb. 5.1). Vor der Sequenz findet sich in allen drei Leserahmen ein Codon für ein Transkriptionsende, der untranslatierte Bereich umfasst zwölf Nukleotide.

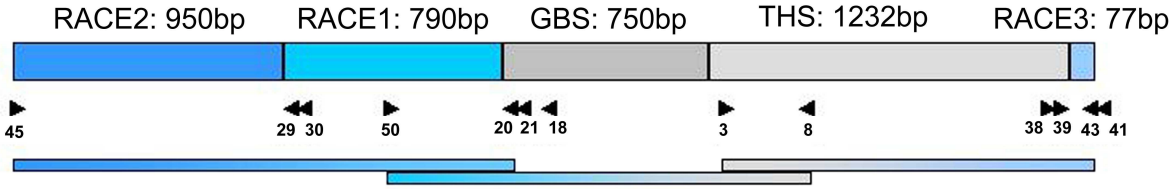

Abb. 3.23:
Schematische Darstellung der einzelnen im Two-Hybrid-Screen (THS), Genbankscreen (GBS) und den RACE-Experimenten (RACE1-3) gewonnenen Fragmente des HyδCat. Die Position und Orientierung der in den Experimenten verwendeten Oligonukleotide (p120- 3, -8, -18, -20, -21, -29, -30, -38, -39, -41, -43, -45,
-50) sowie die durch PCR amplfizierten überbrückenden Fragmente sind eingezeichnet.

3.5.2 Homologievergleich

Im Homologievergleich zeigt auch das gesamte aus *Hydra* isolierte Molekül große Ähnlichkeit mit der Gruppe der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie, die wie das β-Catenin zur Gruppe der *armadillo-repeat*-Moleküle gehört. δ-Catenine besitzen einen hochkonservierten zentralen Bereich mit der charakteristischen Abfolge von zehn *armadillo-repeats* und wenig konservierten, vermutlich schleifenbildenden Unterbrechungen zwischen den Helices der *armadillo-repeats* 4, 6 und 9. Das *Hydra*-Molekül weist dabei noch zwei weitere Unterbrechungen in den *armadillo-repeats* 5 und 10 auf (Abb. 3.24).

Abb. 3.24:
Vergleich der Aminosäuresequenzen (ClustalW) der einzelnen *armadillo-repeats* von Hyδcat beruhend auf einem ClustalW-Alignment. Die schwarzen Makierungen zeigen wenigstens 50% Übereinstimmung unter den einzelnen Sequenzen. Bei der Festlegung der einzelnen armadillo-repeats und der Unterbrechungen wurden ähnliche vergleichende Analysen mit einem humanen δ-Catenin/p120-Molekül (Anastasiadis und Reynolds, 2000), einem humanen β-Catenin (Huber et al., 1997) und dem *Hydra* β-Catenin (Hobmayer et al., 1996) als Referenz gewählt.

```
 1  ------------------EE----------SIN-LLDLLNF----IKANDQSLKS------------------------------QAACYLMHLS-----------------------    32
 2  ---------YKDEEIKKRIR----------ELD-IIPMLVK----ILADDDEDCY-----------------------------RNAACALKNLS----------------------    42
 3  -------YGRFLDDNKLAIQ----------KCGGVIACSKL----IYKTSSIDVR-----------------------------EHITCILYNIS----------------------    45
 4  --------SVKSISIEILKE----------CLE-VVSMLVI----IPLSGWEREYATIGKKPRNVIWS--------------VLLRNSTCVLRNVS----------------------    59
 5  ---------SAGRSARVKIR----------LIDGLIDSLIW----ISVLRLSKIN---RIPESDIISN--------------KIVENIMCVLRNLSY----------------------    56
 6   NDKEVDRLRYLDALKISVKDGGNFSNNTLSRDTTLPYDAT----IPRDATLDNTQILDKKESSITSKGNTSEKGFLGMKKKPFGGKIQCKISDLARDENPKPPREKWNYLIPVQENQP   116
 7  ----------VTNGVQLLWQ-----------QETVTYYILI----IKSSINPVTL------------------------------EAAAAAIHNLC----------------------    41
 8  -----AGDWNWSALLRIHVR----------LQKGLPPIGDL----ITVDQEYVVR------------------------------AVAHAIRNLA----------------------    46
 9  ----IDSRNKWSIGKYIHRN----------LLS-VLPPITA----IQRDIKPSEY-----------------------------TICAILSTLQILV--------------------    49
10  -------CNDQTNSRFIKNEG---------GIEKLVALTKEPVDGIMPQECLRVYS------------------------KKVILEANRVLLYMW----------------------    55
```

Abb. 3.25:
Homologievergleich (ClustalW-Analyse) der Hyδcat-Aminosäuresequenz mit einigen anderen bekannten Sequenzen der δ-catenin/p120/Plakophilin-Familie von Vertebraten (*Homo sapiens*, Ho)- und Invertebraten *(Hydra vulgaris*, Hy; *Drosophila melanogaster*, Dr; *Caenorhabditis elegans*, Cae)-Vertretern. Die schwarzen Makierungen zeigen wenigstens 50% Übereinstimmung der einzelnen Sequenzen. Die konservierten Bereiche der *armadillo*-Domänen sind gekennzeichnet.

```
HyDcat  : MYGGTQVARGNSRHNPFNTHKKSGSLSQVYNGFQQSSEFSSRDEKYDPRYSSLKRNGSLLARQNQS
HoDcat2 : --------------------MFARKPPGAAPLGAMPVPDQPSSASEKTSSLSPGLNTSNGDGSETET
HoARVCF : ------------------------------------------------------------MEDCNVHS
HoPlph1 : ------------------------------------------------------------------MNHSP
DrP120A : ------------------------------------------------------------------MEARS
CaY105A : ---MATSYLTESLAGPTSARGSSYSYSYESHYDNPPEEEYEHFTNDDGVHQMQKVTRVTKVTTTRS

HyDcat  : SFFNPMGNNYDIDNYSDNGRPSSNIDYGRPSSTMDYNRPPSTMDYGRPSSRQSSSASHQSSVSRNN
HoDcat2 : TSAILASVKEQELQFERLTRELEAERQIVASQLERCKLGSETGSMSSMSSAEEQFQWQSQDGQKDI
HoARVCF : AASILASVKEQEARFERLTRALEQERRHVALQLERAQQ-PGMVSGGMGSGQPLPMAWQQLVLQEQS
HoPlph1 : LKTALAYECFQDQDNSTLALPSDQKMKTGTSGRQRVQEQVMMTVKRQKSKS---------------
DrP120A : LKHSLIGLNMNSTHIN-MDLSLTHEPANMQSQFGSFQNYDQFSAAGYSS-----------------
CaY105A : VRQVPVQSPYSNIDFDSSGLPTPSPVIDRDPSLEMMARMGGASDHDSEDRSAPPPAPASRFLHEDS

HyDcat  : SISQKRSNSRQSNTVHSGEYSQPYFENNPINASSSSQQILSNTSEAIVEEERNNADGSTVLVRRKI
HoDcat2 : EDELTTGLELVDSCIRSLQESGILDPQDYSTGERPSLLSQSALQLNSKPEGSFQYPASYHSNQTLA
HoARVCF : PGSQAS--------LATMPEAPDVLEETVTVEEDP-------------------------GTPTSH
HoPlph1 : ------------------------------------------------------------SQSST
DrP120A : --------------------TPLYITKPTGVG-----------------------------AITKV
CaY105A : GIPSAPG--VPDVVDAGIGEVTVVWSAPLQSNGGEVRGYQIEMREFPDGEWESMGVDHLLKDTTCR

HyDcat  : TTVVSDNDASKVEFHISPAAETIFLPPRTSRNNSFDYVKMSSDEGSTN------------------
HoDcat2 : LGETTPSQLPARGTQARATGQSFSQGTTSRAGHLAGPEPAPPPPP---------------------
HoARVCF : VSIVTSEDGTTRRTETKVTKTVKTVTTRTVRQVPVGPDGLPLLDGG--------------------
HoPlph1 : LSHSNRGSMYDGLADNYNYGTTSRSSYYSKFQAGNGSWGYPIYNG---------------------
DrP120A : APHCSQNKIETNSTDNSIPDIENHPLATTVRYVQAGQYEDTSEYG---------------------
CaY105A : VTNLTSHEVQFRVSAYGRTGFGPASNPSLPVKIPISETDLATSAGAPLAPGRPTVIAVDGQGVLLE

HyDcat  : ----QLPYRDNFNNDKDDRNYIKEDRNYDRDNRSDRDDRNYDGDNRNYNRNDRNYDRDDRNYDRGN
HoDcat2 : -----PPREPFAP-SLGSAFHLPDAPPAAAAAALYYSSSTLPAPPRGGSPLAAPQGGSPTKLQRGG
HoARVCF : -----PPLGPFADGALDRHFLLRGGGPVATLSRAYLSS---------------------------GG
HoPlph1 : -----TLKREPDNRRFSSYSQMENWSRHYPRGSCNTTG-----------------------------
DrP120A : --------VAGLTCGIDSEYTAEAVVPYCYTSDANYTG-----------------------------
CaY105A : WTPPVADVHSSPPQGYQVEYRVYGSRDWIVANEQLVQENVFTVESLRPNGVYEFRVRGKNQDGLGH

HyDcat  : RNYDRDNRNNERDDRNNDRDDRNYDRDDRNYDRDDRNYGRDDRNYDRDDRNYDRD--DRNYDRDDR
HoDcat2 : SAPEGATYAAPRGSSPKQSPSRLAKSYSTSSPINIVVSSAGLSPIRVTSPPTVQSTISSSPIHQLS
HoARVCF : GFPE--------GPEPRDSPS-------------------------------------------
HoPlph1 : ------------------------------------------------------------------
DrP120A : ------------------------------------------------------------------
CaY105A : PSMSSGGVAIRPAAPQRHVPARKVSESVQPPGQPQMVEVGDDVVKLEWAPSVQN---ARYIVEYRE

HyDcat  : NKRNSYGSSARVNDKVYSKELNNQVNENQSNNDIRQNSQNYFEKSEAVKNQAKYSNAENYSSNYAA
HoDcat2 : STIGTYATLSPTKRLVHASEQYSKHSQELYATATLQRPGSLAAGSRASYSSQHGHLGPELRALQSP
HoARVCF : -----YGSLSRGLGMRPP------------------RAGPLGPGPGDGCFTLPGHR----------
HoPlph1 : ------------------------------------------------------------------
DrP120A : ------------------------------------------------------------------
CaY105A : VGDPEWHTANYDPIVQNGIQVEGLHRNSTYEFCVISIVDNIASQPSETSDIIHLRPTCNTSALRPA
```

```
HyDcat  : NEEYSSLKKQSIVHDSELRRFSSNNESLSQNLYSDNRKYLSNTNINIINSNHVNNANNYGSYANNI
HoDcat2 : EHHIDPIYEDRVYQKPPMRSLSQSQGDPLPPAHTGTYRTSTAPS----------------------
HoARVCF : -----EAFPVGPEPGPPGGRSLPERFQAEPYGLEDDTRSLAADD----------------------
HoPlph1 : -------------AGSDICFMQKIKASRSEPDLYCDPRGTLRKG----------------------
DrP120A : --------------------IQNTTSSIKPFSGRPFNDNINGAE----------------------
CaY105A : PNILEAPEFLEVDGDKITICWLPAQSQLPVMGYDVEFRDLQQDDRWYKVNDQPVFACKMTVGDLIM

HyDcat  : GFGNNNSNILSNSASNSNINANKVNSSNQQIFNHIASSNQQIFNNKENIHNSNLTINNQFSHSNRD
HoDcat2 : SPGVDSVPLQRTGSQHGPQNAAAATFQRASYAAGPASNYADPYRQLQYCPSVESPYSKSGPALPPE
HoARVCF : EGGPELEPDYGTATRRRPECGRGLHTRAYEDTADDGGELADERPAFPMVTAPLAQPER-GSMGSLD
HoPlph1 : TLGSKGQKTTQNRYSFYSTCSGQKAIKKCPVRPPSCASKQDPVYIPPISCNKDLSFGHSRASSKIC
DrP120A : AVADSQCRTFKSSAEFKLPQFAMSSINTVPQRLEEKDDYIEGSENDICSTMR--------------
CaY105A : DHDYQFRVLAHNASGCSQPSPPSDFVHIEPSTNRFSSDTMESPHLGHHDVVKYVEAERFGAVPLLQ

                                          armadillo repeats
HyDcat  : FNQMENSARINYHETKYN----------EESINLLDLLNFLKANDQSLKSQAAGYLMHLSYKDEEI
HoDcat2 : GTLARSPSIDSIQKDPRE--------FGWRDPELPEVIQMLQHQFPSVQSNAAAYLQHLCFGDNKI
HoARVCF : RLVRRSPSVDSARKEPR-----------WRDPELPEVLAMLRHPVDPVKANAAAYLQHLCFENEGV
HoPlph1 : SEDIECS-----------------------GLTIPKAVQYLSSQDEKYQAIGAYYIQHTCFQDESA
DrP120A : ----------------------------WRDPNLSEVISFLSNPSSAIKANAAAYLQHLCYMDDPN
CaY105A : EEMVRESPPLPERDDSPPPLRRANNNVQWRDPSLKEVIEYLSSADKDKQLNASGYLQHLTYTDNQI

HyDcat  : KKRIRELDIIPMLVKLLADDDEDCYRNAAGALKNLSYGRFLDDNKLAIQKCGGVIACSKLLYKTSS
HoDcat2 : KAEIRRQGGIQLLVDLLDHRMTEVHRSACGALRNLVYGKANDDNKIALKNCGGIPALVRLLRKTTD
HoARVCF : KRRVRQLRGLPLLVALLDHPRAEVRRRACGALRNLSYGRDTDN-KAAIRDCGGVPALVRLLRAARD
HoPlph1 : KQQVYQLGGICKLVDLLRSPNQNVQQAAAGALRNLVFR--STTNKLETRRQNGIREAVSLLRRTGN
DrP120A : KQRTRSLGGIPPLVRLLSYDSPEIHKNACGALRNLSYGRQNDENKRGIKNAGGIAALVHLLCRSQE
CaY105A : KEETREYGGIPKLIALLRSDTPRIQKNACACLKNLSFGKENDANKLAVMEADGVRLIAEVLRTTHD

HyDcat  : IDVREHITGILYNISSVKSISIEILKECLEVVSMLVIIPLSGWEREYATIGKKPRNVIWSVLLRNS
HoDcat2 : LEIRELVTGVLWNLSSCDALKMPIIQDALAVLTNAVIIPHSGWENSPLQDDRK-IQLHSSQVLRNA
HoARVCF : NEVRELVTGTLWNLSSYEPLKMVIIDHGLQTLTHEVIVPHSGWEREPNEDSKP-RDAEWTTVFKNT
HoPlph1 : AEIQKQLTGLLWNLSSTDELKEELIADALPVLADRVIIPFSGWCDGNSNMSR---EVVDPEVFFNA
DrP120A : TEVKELVTGVLWNMSSCEDLKRSIIDEALVAIVCSVIKPHSGWDAVCCG------ETCFSTVFRNA
CaY105A : ASVKEEAAAALWNLSSADMLKPVILESATEILSQQVIAPVLAVGTSDPT------RHFGSTLFKNS

HyDcat  : TGVLRNVSSAGRSARVKIRLIDGLIDSLIWISVLRLSKINRIPESDIISNKIVENIMCVLRNLSYN
HoDcat2 : TGCLRNVSSAGEEARRRMRECDGLTDALLYVIQSALGSSE-------IDSKTVENCVCILRNLSYR
HoARVCF : SGCLRNVSSDGAEARRRLRECEGLVDALLHALQSAVGRKD-------TDNKSVENCVCIMRNLSYH
HoPlph1 : TGCLRNLSS-ADAGRQTMRNYSGLIDSLMAYVQNCVAASR-------CDDKSVENCMCVLHNLSYR
DrP120A : SGVLRNVSSAGEHARGCLRNCEHLVECLLYVVRTSIEKNN-------IGNKTVENCVCILRNLSYR
CaY105A : TGVLRNVSAASQQARRRLRDIPNLIEALVHFLTHAIQKSQ-------VDSPTVENAVCLLRNLSYR

HyDcat  : IDKEVDRLRYLDALKISVKDGGNFSNNTLSRDTTLPYDATLPRDATLDNTQILDKKESSITSKGNT
HoDcat2 : LAAETS-----------------QGQHMGTDELDGLLCGEANGKD-AESSGCWGKKKKKKSQDQW
HoARVCF : VHKEVP-----------------GADRYQEAEPGPLGSAVGSQRRRRDDASCFGGKKAKEEWFHQG
HoPlph1 : LDAEVP-----------------TRYRQLEYN-------ARNAYTEKSSTGCFSNKSDKMMNNN--
DrP120A : CQEVD--------------------DPNYDKHPFITPERVIPSSSKGENLGCFGTNKKKKEANNSD
CaY105A : IQEVVD-----------------PNYDPAAAHSSSSKNMKHVASPKPEKKKKDKEKKKDKNPKN--

HyDcat  : SEKGFLGMKKKPFGGKIQGKISDLARDENPKPPREKWNYLIPVQENQPVTNGVQLLWQQETVTYYI
HoDcat2 : DGVG-------------------------------------PLPDCAEPPKGIQMLWHPSIVKPYL
HoARVCF : KKDGEM----------------------------DRNFDTLDLPKRTEAAKGFELLYQPEVVRLYL
HoPlph1 : ---------------------------------------YDCPLPEEETNPKGSGWLYHSDAIRTYL
DrP120A : ALNEYN----------------------------ISADYSKSSVTYNKLNKGYEQLWQPEVVQYYL
CaY105A : ------------------------------------------------IVTGPSVLWQPHVVKLYL
```

```
HyDcat  : LILKSSINPVTLEAAAAAIHNLCAGDWNWSALLRIHVRL-QKGLPPIGDLLTVDQEYVVRAVAHAL
HoDcat2 : TLLSECSNPDTLEGAAGALQNLAAGSWKWSVYIRAAVRK-EKGLPILVELLRIDNDRVVCAVATAL
HoARVCF : SLLTESRNFNTLEAAAGALQNLSAGNWMWATYIRATVRK-ERGLPVLVELLQSETDKVVRAVAIAL
HoPlph1 : NLMGKSKKDATLEACAGALQNLTASKGLMSSGMSQLIGLKEKGLPQIARLLQSGNSDVVRSGASLL
DrP120A : SLLQSCSNPETLEAAAGAIQNLSACYWQPSIDIRATVRK-EKGLPILVELLRMEVDRVVCAVATAL
CaY105A : KLLQDSSNIETLEASAGAIQNLAACQFPPSAEVRAAVRV-EKGLPVLVELIRLPEDFVVCAVATAL

HyDcat  : RNLAIDSRNKWSIGKY-IHRNLLSVLPPITALQRDIK--PSEYTICAILSTLQILVCNDQTNSRFI
HoDcat2 : RNMALDVRNKELIGKY-AMRDLVHRLPGGNNSNNTASKAMSDDTVTAVCCTLHEVITKNMENAKAL
HoARVCF : RNLSLDRRNKDLIGSY-AMAELVRNVRN-AQAPPRPGACLEEDTVVAVLNTIHEIVSDSLDNARSL
HoPlph1 : SNMSRHPLLHRVMGNQ-VFPEVTRLLTSHTGNTSNS-----EDILSSACYTVRNLMASQPQLAKQY
DrP120A : RNLAIDQRNKELIGKY-AMRDLVQKLPSGNVQHDQN---TSDDTITAVLATINEVIKKNPEFSRSL
CaY105A : RNLAIDPRNRELIGKY-ALRDFLDKLPEPGSPRRSA---ISDQTIGAVLGILFEIVRSSAAYTKDV

                                        armadillo repeats
HyDcat  : KNEGGIEKLVALTKEPVDGIMPQECLRVYSKKVILEANRVLLYMWDFKDCRESIKQQPWSHSKAEE
HoDcat2 : RDAGGIEKLVGISKSKGD---------KHSPKVVKAASQVLNSMWQYRDLRSLYKKDGWSQYHFVA
HoARVCF : LQARGVPALVALVASS------------QSVREAKAASHVLQTVWSYKELRGTLQKDGWTKARFQS
HoPlph1 : FSSSMLNNIINLCRSS------------ASPKAAEAARLLLSDMWSSKELQGVLRQQGFDRN----
DrP120A : LDSGGIDRLMNITKRK-E---------KYTSCVLKFASQVLYTMWQHNELRDVYKKNGWKEQDFVS
CaY105A : HELKGTDKLRALSRSY-P---------TYSHRVCKYASQVLYVMWQHKELHDGFKRSGLKEADFYS

HyDcat  : AEKNYKNLAKDMDD--------------KDRDVYAEMESQDSVKLESDPRRYLISVDNNYSSVENE
HoDcat2 : SSSTIERDRQRPYSSSRTPSISPVRVSPNNRSASAPASPREMISLKERKTDYECTGSNATYHGAKG
HoARVCF : AAATAKGPKG---------------------ALSPGGFDDSTLPLVDKSLEGEKTGS---------
HoPlph1 : ------------------------------MLGTLAGANSLRNFTSRF-----------------
DrP120A : KHFTAH--------------------------NTPPSSPNNVNNTLNRPMASQ-------------
CaY105A : GTARRGDSSTLAR------------------PISSQGRERPSMHQLDETLSSGGGYG-------TM

HyDcat  : SLYNGSQNSNKQPIGYGDVPFNEVGMQKPLLHGKISSKKCTKELLKIKK-----------------
HoDcat2 : EHTSRKDAMTAQNTGISTLYRNSYGAPAEDIKHNQVSAQPVPQEPSRKDYETYQPFQNSTRNYDES
HoARVCF : RDVIPMDALGPD--GYSTVDRRERRPRGASSAGEASEKEPLKLDPSRK------------------
HoPlph1 : ------------------------------------------------------------------
DrP120A : -GRTRYEDRTIQR-GTSTLYSANDSSGAVMSNESAMLSEMVRKQL----------------------
CaY105A : ESNNRAGTLRPASATSQTIQRRYDQVPRDGPVYSSVQKPSPRGG----------------------

HyDcat  : ---------------------------------------------NNFTCFIDLHIIIM    1265
HoDcat2 : FFEDQVHHRPPASEYTMHLGLKSTGNYVDFYSAARPYSELNYETSHYPASPDSWV---    1225
HoARVCF : -------APPPGPSRPAVRLVDAVG-------------------DAKPQPVDSWV---     962
HoPlph1 : ------------------------------------------------------------     726
DrP120A : ------------------------------------------------------------     781
CaY105A : ---------------------------------------------GGGGNIDDSWV---    1181
```

In ihren N- und C-terminalen Enden sind die Vertreter der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie sehr verschieden und besitzen nur wenig konservierte Motive (Abb. 3.25). Über die Funktion dieser Bereiche besteht noch wenig Klarheit, doch wird vermutet, dass sie im Adhäsionskomplex die Funktion der Cadherine durch Rekrutierung verschiedener Interaktionspartner regulieren. Charakteristische Motive in den wenig konservierten Bereichen, wie sie bei einigen anderen Vertretern dieser Familie auftreten und eine funktionale Zuordnung zu einer der Untergruppierungen ermöglichen, lassen sich in Hyδcat nicht finden. So fehlen dem Molekül eine charakteristische N-terminale *coil-coiled*-Struktur, die vor

allem in neuronal exprimierten Vertretern der Molekülfamilie zu finden ist, eine Plakophilin-typische Region und auch eine C-terminale PDZ-Bindungsdomäne (Fanning und Anderson, 1999; Bonne et al., 1999; Anastasiadis und Reynolds, 2000). Alle diese Motive scheinen für die spezifische Interaktion mit anderen Proteinen notwendig zu sein. Auch zwei bekannte charakteristische Motive im sechsten *armadillo-repeat*, die mit einer möglichen Translokalisation in den Nukleus in Zusammenhang stehen (Imamura et al., 1998; Lu et al., 1999), fehlen bei dem *Hydra*-Molekül.

In einem direkten Vergleich zeigt HyδCat 22% Übereinstimmung mit den nächstverwandten bekannten δ-Cateninen. Vergleicht man dagegen nur den konservierten Bereich der *armadillo-repeats* miteinander, so nimmt der Grad der Übereinstimmung auf 36% zu. Die Ähnlichkeit zu dem nächstverwandten *Hydra* Molekül, dem HyβCat, liegt dagegen bei nur 12%. Im Vergleich dazu beträgt die Übereinstimmung zwischen den bekannten humanen p120/δ-Cateninen etwa 30% bzw. 50% mit der *armadillo-repeat* Region. Die bekannten Plakophilinen stimmen zu 27% bzw. 35% überein. In einem Vergleich der einzelnen *armadillo-repeats* des *Hydra* δ-Catenin zueinander (Abb. 3.24) beträgt die Übereinstimmung dagegen nur 12%. Das aus *Hydra* isolierte Molekül lässt sich also nach seiner Struktur und Sequenz eindeutig der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie, aber nicht weiter einer der Untergruppen zuordnen.

In einer phylogenetischen Analyse wurden von Vertretern der Vertebraten, Arthropoden und Nematoden einige bekannte Sequenzen der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie mit weiteren *armadillo-repeat*-Molekülen der β-Catenin- und Importin/Karyopherin-Familien verglichen (Abb. 3.26). Als Außengruppe wurde für die Berechnung das β-Catenin-Ortholog des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* aardvark (Dic-Aar) gewählt. In diesem Stammbaum nimmt HyδCat eine basale Stellung innerhalb der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie ein und lässt sich einer der Unterfamilien nicht weiter zuordnen. Auffällig separieren sich die Tierstämme voneinander. Dabei kommt es bei den Vertebraten zu einer weiteren Aufspaltung zwischen den Untergruppen der p120/δ-Catenine und Plakophiline. Die Positionierung des Plakophilin 4 entspricht nicht seiner Nomenkla-

tur, da es mehr Ähnlichkeit mit der Unterfamilie der δ-Catenine zeigt als mit den übrigen Plakophilinen.

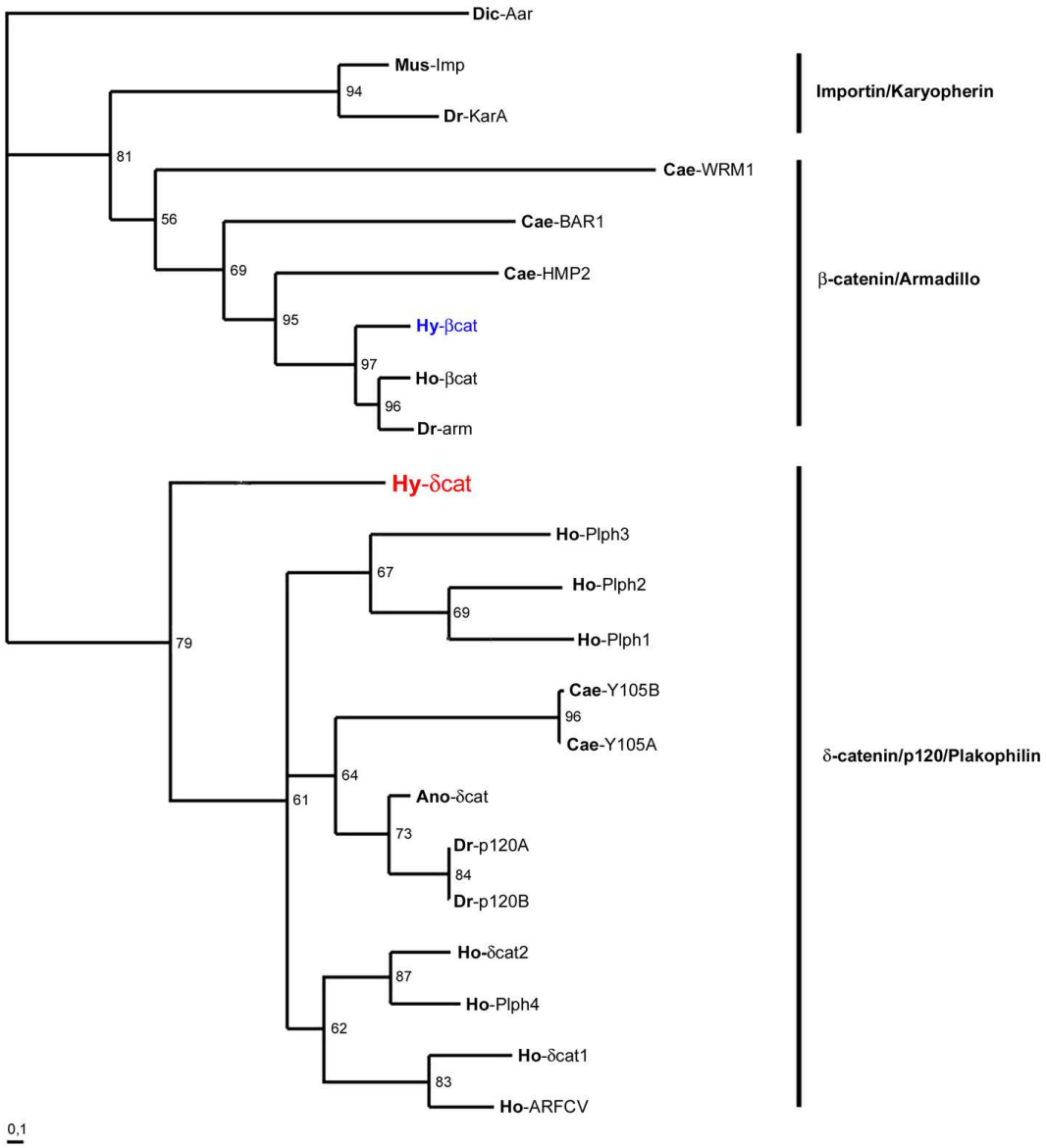

Abb. 3.26:
Phylogenetische Analyse (maximum-likelihood quartet puzzling, TREE-PUZZLE 5.0) mit den Aminosäure-Sequenzen der δ-Catenin/p120/Plakophilin-, der β-Catenin/Armadillo- und der Importin/Karyopherin-Genfamilien, die alle der Gruppe der *armadillo-repeat*-Moleküle angehören. Für jede Genfamilie wurden Vertreter der Vertebraten (*Homo sapiens*, Ho und *Mus musculus*, Mus) und Invertebraten (*Hydra vulgaris* und *H. magnipapillata*, Hy; *Drosophila melanogaster*, Dr; *Caenorhabditis elegans*, Cae) gewählt. Für die Berechnung des Stammbaumes diente als Außengruppe das β-Catenin-Ortholog des Schleimpilzes *Dictyostelium* aardvark (Dic-Aar).
Der Skalierungsbalken zeigt die Zahl der Aminosäure-Austausche pro Position. Die Zahlen an den Knotenpunkten stellen Signifikanzwerte dar. Dabei gilt ein Wert von über 70 als gute statistische Unterstützung der hier erfolgenden Auftrennung.
In der δ-Catenin/p120/Plakophilin- Familie kommt es zu einer deutlichen Auftrennung der Vertebraten- und Invertebraten. Innerhalb der Vertebratensequenzen bilden die Plakophiline eine eigenständige Gruppierung.

Wird eine phylogenetische Analyse nur mit den konservierten Bereichen der *armadillo-repeats* durchgeführt, so wird die Trennung der Molekülfamilien noch deutlicher und statistisch besser unterstützt (Abb. 3.27). Dabei nimmt innerhalb der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie HyδCat weiter eine basale Position ein.

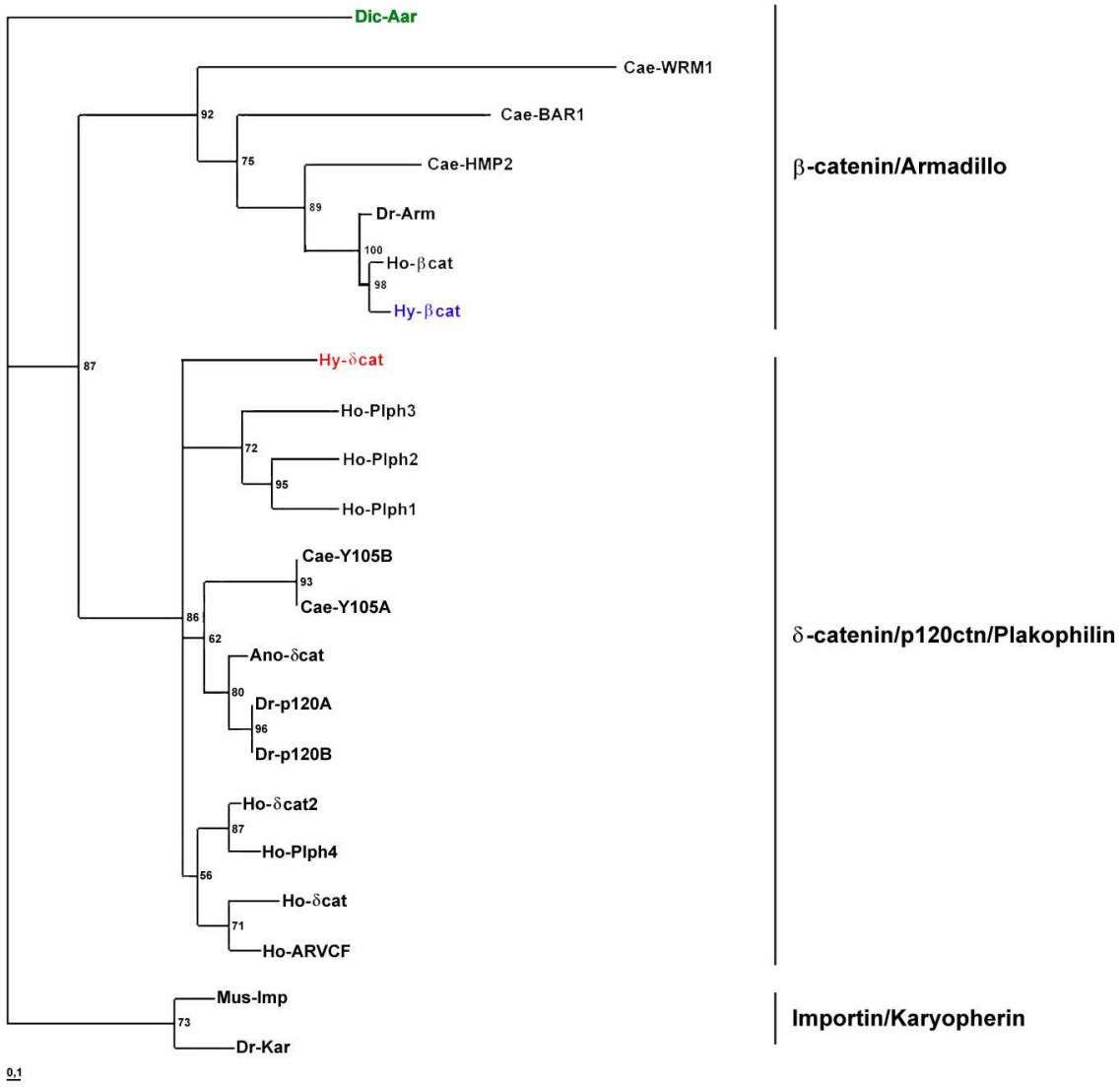

Abb. 3.27:
Stammbaumanalyse, bei der als Datengrundlage nur die Aminosäuresequenzen der konservierten *armadillo-repeat* Domänen verwendet wurden. HyδCat nimmt auch in dieser Berechnung innerhalb der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Genfamilie eine basale Stellung ein.

3.5.3 Untersuchungen zum Expressionsmuster von HyδCat

Mit einer Digoxygenin-markierten RNA-Sonde gegen den *armadillo-repeat*-Bereich wurde das Transkriptionsmuster von HyδCat untersucht. Das Expressionsmuster ähnelt sehr dem von HyCadh. In adulten Polypen ist über den gesamten Rumpf der Polypen eine schwache epitheliale Expression sowie in den Tentakeln eine erhöhte Transkription in den Epithelzellen zu erkennen (Abb. 3.28 a-e).

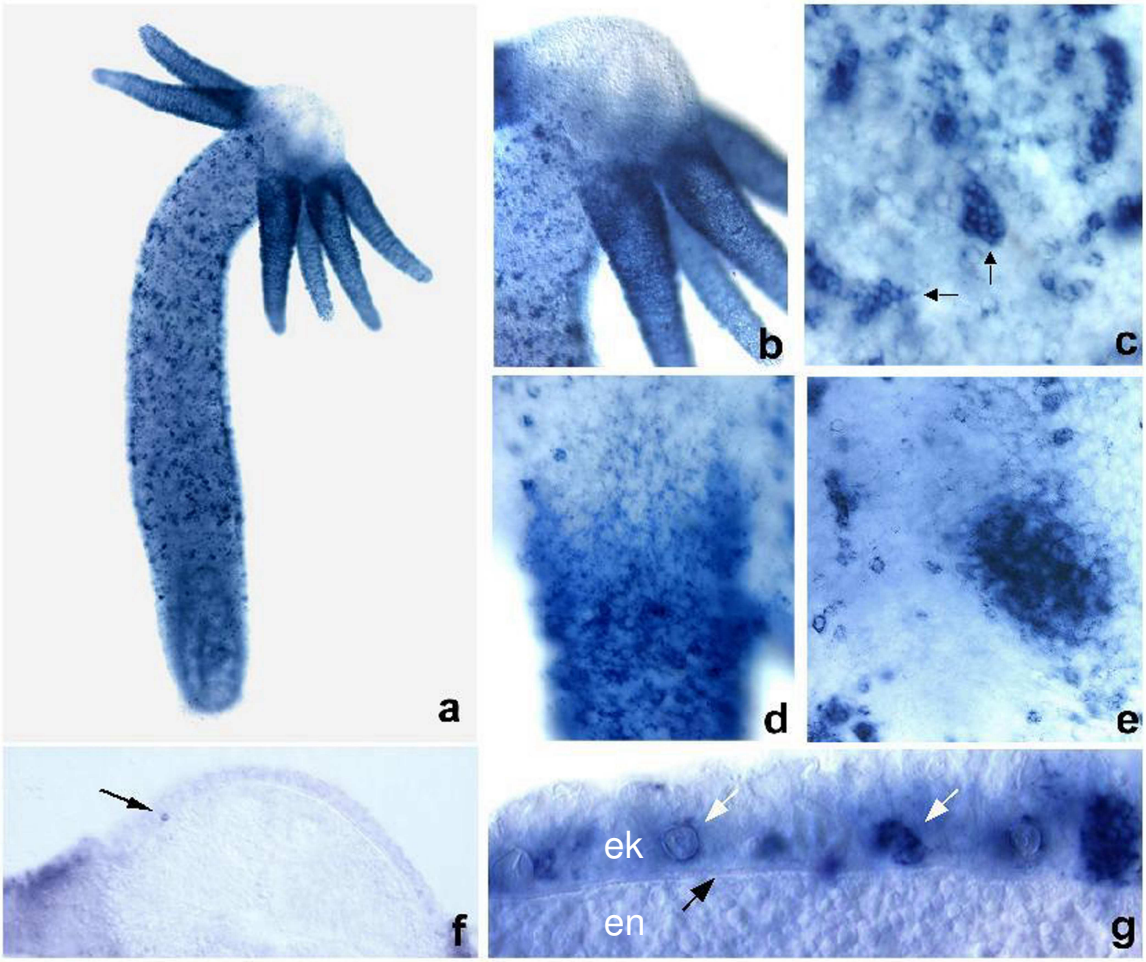

Abb. 3.28:
HyδCat RNA-InSitu-Hybridisierung: Die Übersicht (a) zeigt eine schwache epitheliale Expression über den gesamten Polypen, die Detailaufnahmen aus dem Rumpf (c), einem Tentakelansatz (d) und dem Bereich einer auswachsenden Tentakel (e) zeigen eine Aufregulierung in den Epithelzellen der Tentakeln sowie in den noch nicht im Ektoderm verankerten Nematocyten (Nematoblastennester in (c) mit schwarzen Pfeilen markiert). Im Kopfbereich (b, f) sind einzelne Stenothelen (Pfeil) im Hypostom zu sehen. Im Querschnitt (g) bleibt die Expression auf das Ektoderm (ek) beschränkt. Nester und einzelne Nematocyten (weiße Pfeile), die entlang der Mesogloea (schwarzer Pfeil) zwischen den Epithelzellen wandern, zeigen eine δ-Catenin Expression. Im Endoderm (en) ist keine Expression zu erkennen (Vergr. 1:10 (a), 1:20 (b), 1:40 (c-f), 1:100 (g)).

In den Knospen ist zunächst keine Aufregulierung zu sehen, erst zum Zeitpunkt, wenn die Tentakeln auswachsen, sind deren Ansätze durch eine verstärkte Expression zu erkennen (e). Über den Rumpf verteilt sind deutlich einzelne Nematocytennester aber auch einzelne Nematocyten zu sehen (c). Im Hypostom können einzelne Stenothelen erkannt werden (b, f). Die Querschnitte zeigen deutlich, dass die Expression auf das Ektoderm beschränkt bleibt (g). In Nematocyten ist eine Färbung nur in noch nicht ausdifferenzierten Nestern sowie in reifen Nematocyten zu erkennen, die noch nicht im Ektoderm verankert sind, sondern noch nahe der Mesogloea zwischen den Epithelzellen wandern (c, g).

3.5.4 HyδCat-Expression in Regeneraten und Aggregaten

In den frühen Stadien der Kopfregeneration ist keine Aufregulierung zu erkennen (Abb. 3.29a und b). Die Epithelzellen in den regenerierenden Spitzen zeigen keine erhöhte Transkription. Auch hier sind die auswachsenden Tentakeln zuerst durch die verstärkte epitheliale Expression zu erkennen (Abb. 3.29 c und d). Das Expressionsmuster in den Nematocyten bleibt in der Regeneration unverändert.

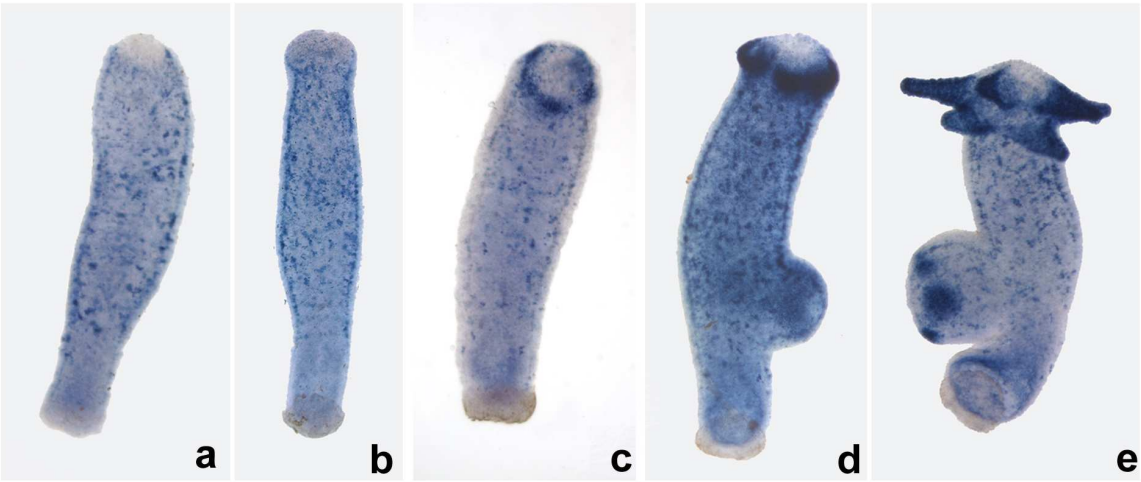

Abb. 3.29:
HyδCat-Transkription in einer Regenerationsreihe: (a) 2 Std, (b) 6 Std, (c) 12 Std, (d) 24 Std und (e) 36 Std alte Kopfregenerate (Vergr.1:10). HyδCat ist in der regenerierenden Spitze nicht aufreguliert.

Polypen des Stammes sf-1, deren Stammzellen durch Hitzebehandlung entfernt wurden, zeigen eine deutliche Verringerung der Zahl HyδCat exprimierender Nematocyten (Abb. 3.30b). Reife, bereits im Epithel des Rumpfes verankerte Nematocyten zeigen dagegen keine Expression.

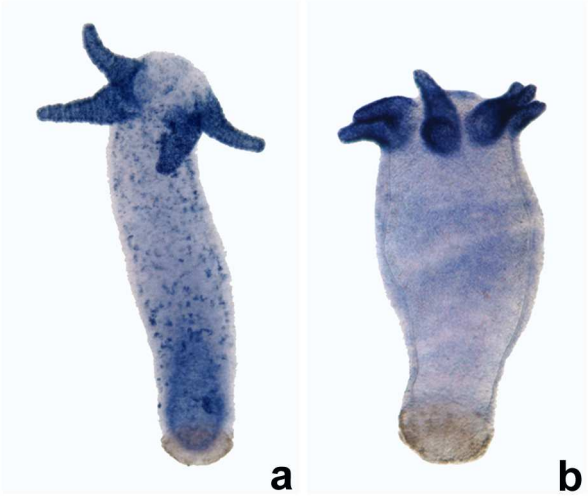

Abb. 3.30:
HyδCat-Transkription in Kopfregeneraten des Stammes *H. magnipapillata* sf-1: (a) ohne und (b) mit Hitzeschockbehandlung zur Eliminierung der interstitiellen Stammzellen und ihrer neuronalen Differenzierungsprodukte (Vergr. 1:10).

In Aggregaten verhält sich das Expressionsmuster von HyδCat auch ganz ähnlich wie das von HyCadh. In den frühen Stadien der Reaggregation liegt eine gleichmäßig hohe Expression in den Aggregaten vor, die langsam abnimmt (Abb. 3.31). Eine deutliche Aufregulierung ist, wie in den Knospen und Regeneraten, erst in den Epithelzellen der auswachsenden Tentakeln zu erkennen.

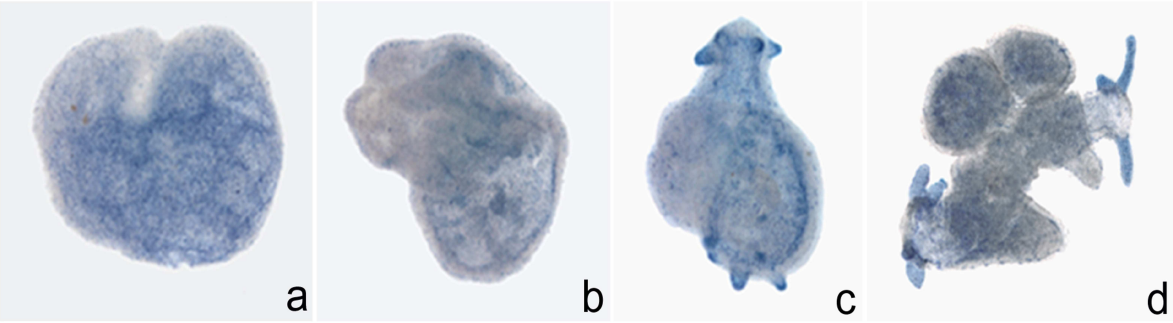

Abb. 3.31:
HyδCat-RNA-Expression in (a) 24 Std, (b) 48 Std, (c) 72 Std und (d) 96 Std alten Aggregaten (Vergr. 1:20). Die anfangs gleichmäßig hohe Transkription nimmt in weiteren Entwicklung der Aggregate ab und wird erst in den auswachsenden Tentakeln wieder aufreguliert.

3.6 PCR-Analysen an Aggregaten

Um die Funktion der einzelnen in dieser Arbeit untersuchten Moleküle beim Prozess der Reaggregation auch zeitlich genauer eingrenzen zu können, wurden PCR-Analysen mit cDNA durchgeführt, die aus Aggregaten verschiedener Entwicklungsstadien gewonnen wurde (Abb. 3.32). Als Referenz für die untersuchten Moleküle diente der Elongationsfaktor 1α (HyEF1α), der in allen Reaggregationsstadien ein gleich hohes Expressionsniveau zeigt und auch schon in den jüngsten, gerade erst durch Zentrifugation geformten Aggregaten (0,5 Std) transkribiert wird. HyβCat kann dagegen erst in 6 Std alten Aggregaten detektiert werden, ebenso wie seine zwei Interaktionspartner HyTcf und HyCadh. Auch die weiteren untersuchten Moleküle aus der Wnt-Signalkaskade und dem Adhäsionskomplex, HyWnt bzw. HyδCat werden zeitgleich exprimiert. Bei diesen beiden Molekülen scheint die Transkription in späteren Entwicklungsstadien sogar abzunehmen.

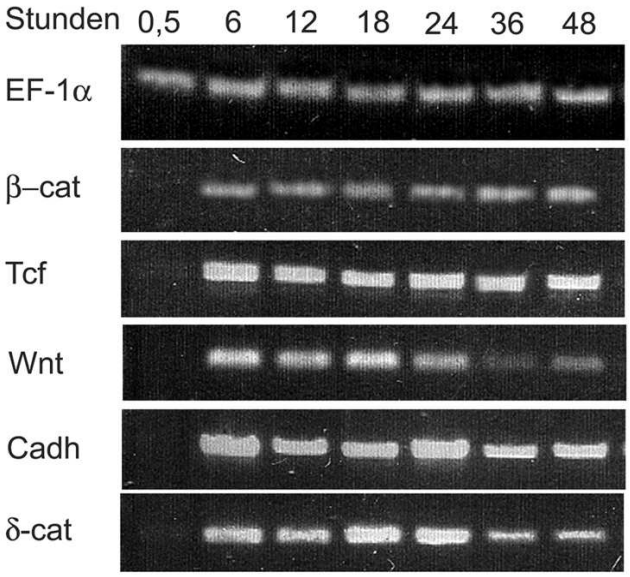

Abb. 3.32:
Semiquantitative PCR-Analysen mit cDNA-Proben aus verschieden alten Aggregate-Stadien (0,5-48 Std). Die *Hydra*-Homologe der Gene β-Catenin, Tcf, Wnt, Cadherin und δ-Catenin wurden mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Als Referenz diente der Elongationsfaktor EF-1α. In dieser Analyse zeigen alle untersuchten Gene eine etwa zeitgleiche Aufregulierung.

4 Diskussion

In der Embryogenese sind wenige konservierte Signaltransduktionswege und die Prozesse der Zelladhäsion von fundamentaler Bedeutung. β-Catenin hat in seiner dualen Funktion im Wnt-Signalweg und in Cadherin-vermittelten Adhäsionskomplexen auf die Entwicklung mehrzelliger Organismen somit großen Einfluss. Die gegenseitige Regulation dieser beiden Funktionskomplexe und damit die Bestimmung der β-Catenin-Aktivität ist nur unzureichend verstanden.
In *Hydra* konnte die Funktion von HyβCat als Bestandteil eines kanonischen Wnt-Signalweges im Achsenbildungsprozess demonstriert werden (siehe auch Hobmayer et al., 2000). Die Isolation von *Hydra*-Homologen der Adhäsionsmoleküle Cadherin und δ-Catenin gab einen Hinweis auf eine zweite Funktion von HyβCat in einem Adhäsionskomplex. Diese duale Funktion von HyβCat galt es in dieser Arbeit zu überprüfen und dazu weitere Belege für einen Adhäsionskomplex in *Hydra* zu finden.

4.1 In *Hydra*-Aggregaten lassen sich die Prozesse der Zelladhäsion und Musterbildung untersuchen

Die besondere Fähigkeit von *Hydra*, aus vereinzelten Zellen wieder Aggregate zu bilden, aus denen intakte Polypen mit differenzierten Zelltypen auswachsen, erlaubt es, Prozesse der Musterbildung und zugleich der Zelladhäsion zu untersuchen. Die Funktion von HyβCat in diesen beiden Aufgabenbereichen sollte in Zellaggregaten aktiviert werden.
In der frühen Phase der Reaggregation ist eine Ordnung der ekto-und endodermalen Zellen zu beobachten. Die Separierung der Zellen aus einer anfänglich zufälligen Verteilung lässt sich mit einem für die ektodermalen Zellen spezifischen Antikörper nach bereits 90 Minuten nachweisen. Nach 6-10 Stunden haben die ektodermalen Zellen eine geschlossene Zellschicht gebildet die die endodermalen Zellen einschließt (Hobmayer et al., 2001) und nach 24 Stunden haben Ekto- und Endoderm zwei getrennte einschichtige Epithelien gebildet (Gierer et al., 1972, Technau und Holstein, 1992). Der Verlauf dieses Aussortierens der Zelltypen lässt sich noch besser in Aggregaten verfolgen, die nicht durch Zentrifugation gebildet wurden. Die dissoziierten Zellen können sich dabei in einer Suspension frei zu Zellverbänden vereinen. Unmittelbar nach der Dissoziation beginnen die Zellen wieder zu aggregieren.

Auch hier zeigt sich, dass sich in der Anfangsphase ektodermale und endodermale Zellen getrennt voneinander verbinden. Erst ab einer Größe der sich so bildenden Zellklumpen von etwa 10-20 Zellen kommt es zu einer Vereinigung, wobei sich die ektodermalen Zellen um die endodermalen Zellen legen (Hobmayer et al., 2001). Dieser Zustand kann schon nach 60 Minuten erreicht werden.

Ein homotypische Adhäsionsverhalten lässt sich theoretisch durch unterschiedliche Expressionsniveaus eines einzigen für die Zelladhäsion verantwortlichen Moleküls erklären (Steinberg, 1970; Graner und Glacier, 1992; Steinberg und Takeichi, 1994). Zellen mit einem hohen Expressionsniveau verbinden sich nur mit Zellen eines ebenso hohen Expressionsniveaus. Der Übergang von der zunächst homotypischen zur heterotypischen Adhäsion erfolgt erst durch die regulierende Funktion eines weiteren Moleküls, das erst ab dem Erreichen einer bestimmten Größe der Zellklumpen aktiviert würde. Zellen unterschiedlich hohen Expressionsniveaus des Adhäsionsmoleküls verbinden sich, wobei sich die Zellen mit den stärkeren Adhäsionskräften im Innern vereinen und die Zellen mit den schwächeren Kräften außen anlagern.

Interessanterweise entspricht bei den *Hydra*-Aggregaten die Größe der Zellklumpen, die ihr Adhäsionsverhalten ändern, mit 10-20 Zellen etwa der Größe der Kopforganisationszentren in Polypen, die für die Ausbildung eines Kopfes und einer Körperachse erforderlich sind. Diese minimale Anzahl von Zellen, um als Kopforganisationszentren fungieren zu können, wurde bestimmt, indem verschieden große Klumpen markierter Zellen, die aus regenerierenden Spitzen gewonnen wurden, in Aggregate eingesetzt wurden. In lateralen Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass regenerierende Spitzen im Empfängerpolypen die Ausbildung zusätzlicher Köpfe initiieren und somit ein erhöhtes Kopfbildungspotenzial besitzen (MacWilliams, 1983). Die zur Aktivierung der Kopfbildung minimale Größe solcher Klumpen betrug 5-15 Zellen (Technau et al., 2000). Erst wenn genügend Zellen erhöhten Kopfbildungspotenzials dicht beieinander liegen, können sie als Kopforganisator fungieren.

Die Entstehung solcher Kopforganisationszentren in einem homogenen Feld kann mit Reaktions-Diffusions-Modellen erklärt werden (Gierer und Meinhardt, 1972; MacWilliams, 1983). Danach erfordert dieser Prozess einen autokatalytischen, kurzreichweitigen Aktivator, der zugleich die Expression eines langreichweitigen Inhibitors initiiert. Im Kopf besitzen Aktivator und Inhibitor zugleich ihr höchstes Niveau und bilden ein sich selbst erhaltendes Aktivationszentrum, das von einem Bereich mit langsam abnehmender Inhibition umgeben ist. In der Umgebung eines vorhandenen

Kopfes wird so die Bildung weiterer Köpfe unterdrückt. Wird das Kopfaktivationszentrum mit der Quelle für Aktivator und Inhibitor durch das Abschneiden des Kopfes entfernt, entsteht durch den vom Kopf abnehmenden Gradienten des Kopfaktivationspotenzials aus der regenerierenden Spitze ein neuer Kopf.

In *Hydra* ist in allen Prozessen der Kopfbildung bzw. mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Kopforganisationszentren eine Verbindung mit der Expression von HyWnt zu erkennen (Hobmayer et al., 2000). In RNA-InSitu-Hybridisierungen erscheint die HyWnt-Expressionsdomäne als punktförmige Markierung von nur etwa 50-60 Zellen in der apikalen Spitze im Hypostom der Polypen. Bei der Knospenbildung kann eine HyWnt Expression im Rumpf detektiert werden, bevor an dieser Position die auswachsende Knospe morphologisch zu erkennen ist. Auch bei der Regeneration geht der Neubildung eines Kopfes immer eine HyWnt Expression voraus und in Aggregaten wachsen die Köpfe an den Positionen der HyWnt Domänen aus. HyWnt scheint damit gut geeignet zu sein, um Kopforganisationszentren in *Hydra* zu markieren. In Aggregaten ist eine Expression von HyWnt und auch die eines zweiten Kopfmarkers, des Transkriptionsfaktors HyBra1, erst nach einer Trennung der beiden Epithelschichten zu erkennen (Technau et al., 2000). Eine grundlegende Ordnung des epithelialen Gewebes scheint demnach Voraussetzung für die Entstehung von Organisationszentren zu sein.

HyβCat kann bei beiden initialen Organisationsprozessen der Reaggragation eine fundamentale Rolle spielen. Die Interaktion von HyβCat mit den Adhäsionsmolekülen HyCadh und HyδCat sowie ihre gemeinsame Expression im ektodermalen Epithel belegen die Funktion von HyβCat bei der Zelladhäsion in *Hydra*. Als essentieller Vermittler im Wnt-Signaltransduktionsweg ist HyβCat an der Entstehung von Kopforganisationszentren und der Etablierung von Körperachsen beteiligt (Hobmayer et al., 2000). Im Hypostom der Polypen, bei der Knospenbildung und bei der Regeneration eines neuen Kopfes ist jeweils eine die Expressionsdomäne von HyWnt umschließende Expression von HyβCat und des Transkriptionsfaktors HyTcf, dem letzten Glied der Wnt-Signalkette und direkten Interaktionspartner von HyβCat, zu erkennen. Die enge Verbindung zwischen Zelladhäsion, der Initiierung von Signalkaskaden und Bildung von Körperachsen wird durch die duale Funktion von HyβCat anschaulich demonstriert.

4.2 Eine Aufregulierung von HyβCat im Polypen beruht auf seiner Funktion im Wnt-Signalweg

Bei der Knospenbildung geht der HyWnt-Aktivierung eine die gesamte Knospungzone umfassende Aufregulierung von HyβCat und HyTcf voraus (Hobmayer et al., 2000). Die ringförmige Expressionsdomäne bestimmt offenbar einen Bereich, der für die Verarbeitung eines nachfolgenden HyWnt-Signales kompetent ist. Unklar ist, ob die Eingrenzung der Domänen von HyβCat und HyTcf durch die Expression von HyWnt initiiert wird oder ob umgekehrt diese Einengung die Lage der punktförmigen Expression von HyWnt bestimmt.

Auch bei der Regeneration definiert die Aufregulierung von HyβCat gemeinsam mit HyTcf offenbar einen Bereich, in dem eine erneute Kopfbildung erfolgen kann. In semiquantitativen RT-PCR Experimenten konnte festgestellt werden, dass in den regenerierenden Spitzen bereits eine halbe Stunde nach dem Schneiden das Maximum der HyβCat Expression erreicht wird und dann für etwa 48 Stunden erhöht bleibt (Hobmayer et al., 2000). Wenn man diese regenerierenden Spitzen in den Rumpf anderer Polypen lateral transplantiert, so können sie dort die Bildung weiterer ektopischer Köpfe aktivieren (MacWilliams et al., 1983). Dieses Kopfaktivationspotenzial beginnt zwei Stunden nach dem Schneiden anzusteigen und erreicht nach 6-7 Stunden sein Maximum. Die frühe Aufregulierung von HyβCat und HyTcf selbst ist also kein Signal für die Kopfbildung, bestimmt aber wie bei der Knospenbildung einen kompetenten Bereich, in dem das Signal für die Ausbildung eines Kopfes durch eine lokale Expression von HyWnt umgesetzt werden kann. Eine Aufregulierung von HyβCat und HyTcf kann vor allem in Kopfregeneraten und nur vereinzelt in Fußregeneraten beobachtet werden. Da in Fußregeneraten eine HyWnt Expression ausbleibt, können hier auch keine Köpfe ausgebildet werden.

Die Aufregulierung von HyβCat ist nicht auf einen generellen Wundheilungseffekt zurückzuführen, da eine gleichzeitige Aufregulierung der interagierenden Adhäsionsmolekülen HyCadh und HyδCat fehlt (Abb. 3.11 und 3.29). Die niedrige epitheliale Expression von HyCadh und HyδCat und demnach vermutlich auch eine vergleichbar niedrige Expression von HyβCat scheinen ausreichend zu sein, um neue Zellverbindungen zu bilden und die Wunde zu schließen. Die Aufregulierung der HyβCat-Expression ist daher allein durch seine Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg zu erklären.

4.3 Im sich organisierenden Zellverband sind beide Funktionen von HyβCat von Bedeutung

Anders als in Regeneraten oder bei der Knospenbildung erfolgt die Kopfbildung in Aggregaten nicht aus einem polarisierten Gewebe mit vorgegebener Positionsinformation sondern aus einem homogenen, unorganisierten Ausgangszustand. Im ersten Schritt der Reaggregation müssen die dissoziierten Zellen neue Zellverbindungen aufbauen, um eine Organisation zu ermöglichen. Wie bereits erwähnt, beginnen die Zellen unmittelbar nach der Dissoziation zu aggregieren. Die Adhäsionsmoleküle HyCadh und HyδCat zeigen aber, wie HyβCat, zu diesem Zeitpunkt noch keine erhöhte Expression (Abb. 3.32). Demnach müssten die vorhandenen Transkripte für das initiale Aggregationsverhalten ausreichend sein. Interessanterweise zeigen die InSitu-Analysen, dass HyCadh und HyδCat nur im Ektoderm exprimiert werden (Abb. 3.28). Die ausschließliche ektodermale Expression spricht dafür, dass die anfängliche Separierung der ekto- und endodermalen Zellen zu Beginn der Reaggregation nicht allein durch unterschiedlich hohe Expressionniveaus eines einzelnen Adhäsionsmoleküls erfolgt, sondern dass anscheinend schon für die frühe Ordnung im Aggregat verschiedene Adhäsionskomplexe verantwortlich sind. Die besondere Funktion von Cadherinen bei den frühen embryonalen Differenzierungsprozessen und der Ausbildung von getrennten Geweben konnte in verschiedenen Organismen beschrieben werden (Nose et al., 1988; Godt und Tepass, 1998). In *Hydra* könnten HyCadh und HyδCat durch die ausschließliche Expression in ektodermalen Zellen diese Rolle bei der Zellerkennung und Differenzierung spielen.

Die gleichmäßig hohe Expression von HyβCat und HyTcf und die nachfolgende Eingrenzung der Expressionsdomänen auf die Bereiche der Kopfbildung (*domain restriction,* Abb. 3.1 und 3.2) lässt sich gut mit den Vorgängen bei der Regeneration oder der Knospenbildung vergleichen. Demnach scheint anfangs das gesamte Aggregat eine gleichmäßige Kompetenz zur Ausbildung von Köpfen zu tragen. Erst die lokale Expression von HyWnt markiert die spätere Lage der Köpfe, bevor diese morphologisch sichtbar werden. Die Beschränkung der Zahl der HyβCat und HyTcf Domänen auf die Anzahl der später tatsächlich auswachsenden Köpfe (Abb. 3.3) entspricht den mit HyWnt und dem weiteren Kopfmarker HyBra1 gemachten Beobachtungen (Technau et al., 2000). Demnach werden also keine überschüssigen Kopfbildungs-

domänen ausgebildet, die durch einen nachfolgenden regulierenden Prozess wieder inhibiert werden. Die Korrelation der Expression der in *Hydra* isolierten Moleküle des Wnt-Signalweges und der Kopfbildung wird dadurch weiter unterstützt.

Die Adhäsionsmoleküle und die Moleküle des Wnt-Signalweges werden zeitgleich aufreguliert, wie die Transkriptionsanalysen in der InSitu-Hybridisierung und den RT-PCR Experimenten zeigen. In der Anfangsphase der Reaggregation kann daher die Aufregulierung von HyβCat, anders als in den Regeneraten, auch mit seiner dualen Funktionen in Zusammenhang gebracht werden. Das Zeitfenster, in dem in der frühen Phase der Reaggregation die Transkription aller untersuchten Moleküle ihr Maximum erreicht, ist sehr eng (Abb. 3.32). Die für die Bildung der Kopforganisationszentren notwendige minimale Größe und die damit verbundene Transkription der Moleküle des Wnt-Signalweges ist demnach zwischen 0,5 und 6 Stunden erreicht und im Einklang mit den früheren Beobachtungen.

Weiterhin ungeklärt bleibt, ob das *domain restriction* Verhalten von HyβCat und HyTcf erst durch ein lokales HyWnt-Signal initiiert wird. Denkbar wäre auch, dass die Adhäsionskräfte der Zellen mit ihrem Kopfbildungspotenzial korrelieren. Bei einer Kompetition des HyCadh-vermittelten Adhäsionskomplexes mit dem HyWnt-Signalweg um cytoplasmatisches HyβCat könnten in Zellen mit hohem Kopfaktivierungspotenzial die Adhäsionskräfte verringert sein. Umgekehrt würde in Zellen mit hoher HyCadh-Expression HyβCat an die Zellmembran gebunden und stünde dem Wnt-Signalweg nicht zur Verfügung.

Der regulierende Einfluss von Cadherin auf die Signalingfunktion von β-Catenin konnte durch den inhibitorischen Effekt einer verstärkten Cadherin-Expression auf die transkriptionsaktivierende Aktivität in verschiedenen Studien gezeigt werden (Heasman et al., 1994; Fagotto et al., 1996). Eine ungleichmäßige Expression der Adhäsionsmoleküle HyCadh und HyδCat könnte so die Verfügbarkeit von cytoplasmatischem HyβCat und damit die Bildung von Kopforganisationszentren in Aggregaten regulieren.

In *Hydra* konnte aber gezeigt werden, dass dissoziierte Zellen apikalen Ursprungs ein höheres Adhäsionsvermögen zeigen als Zellen, die aus tiefer im Rumpf gelegenen Regionen entstammen (Technau und Holstein, 1992). Demnach müssten die Zellen, die im HyWnt-Gradienten eine höhere Konzentration des Signalmoleküls aufweisen, auch eine stärkere Expression des Adhäsionsmoleküls HyCadh zeigen.

Nach einem weniger kompetitiven Modell beruht die Bildung von Organisationszentren auf einer lokalen Stabilisierung durch den Wnt-Signalweg. In Zellen mit aufregulierter HyWnt-Expression wird das intrazelluläre HyβCat stabilisiert und kann akkumulieren. Bei einer gleichzeitigen Aufregulierung von HyCadh könnte HyβCat auch vermehrt für die Ausbildung von Adhäsionskomplexen verwendet werden.
In Drosophila konnte gezeigt werden, dass durch die über den Wg-Signalweg vermittelte Stabilisierung des β-Catenin-Homologs Armadillo auch die Expression von E-Cadherin aktiviert wird (Yanagawa et al., 1997). In Zellkulturen kann allgemein beobachtet werden, dass vereinzelte Zellen ihre zelltypspezifische Genexpression vermindern und verstärkt Moleküle der Zelladhäsion und des Cytoskeletts exprimieren. Die zelltypspezifische Transkription setzt dann wieder ein, wenn sich die Zellen verbinden (Ben Ze´ev et al., 2000). Nach einem synergistischen Modell (Fagotto und Gumbiner, 1996) bewirkt die lokale Aufregulierung von Wnt bei zeitgleicher verstärkter Expression von Cadherin die Erhöhung der Adhäsionskräfte in kleinen Zellverbänden, die sich von den übrigen Zellen abgrenzen. β-Catenin bewirkt dabei in seiner dualen Funktion als Vermittler zwischen den Adhäsionskomplexen und dem Wnt-Signalweg, dass sich so selbststabilisierende Organisationszentren bilden können. Für eine genauere zeitliche Eingrenzung der möglichen Abfolge der einzelnen Transkriptionsprozesse in *Hydra* wären eingehendere Untersuchungen der Anfangsphase der Reaggregation vor allem in den ersten sechs Stunden notwendig.

4.4 Die beiden neuen HyβCat Antikörper demonstrieren gemeinsam die duale Funktion des Moleküls

Auch die Untersuchungen der HyβCat Expression auf Proteinebene demonstrieren die duale Funktion des Moleküls. Beide HyβCat–Antikörper detektieren im Westernblot ein Fragment von erwarteter Größe (Abb. 3.6). Eine Kreuzreaktion lässt sich in einem Kompetitionstest mit den synthetischen Peptiden unterdrücken. Demnach sind beide Antikörper spezifisch für HyβCat. Interessanterweise zeigen die beiden Antikörper im fixierten *Hydra*-Gewebe ganz verschiedene Lokalisationen.
Einen Beleg für die Funktion von HyβCat als transkriptionsaktiverendes Molekül liefert der Antikörper β12/3 mit seiner Lokalisation in den Zellkernen (Abb. 3.8). Auffällig ist dabei das völlige fehlen dieser Lokalisation in den Tentakeln und die scharfe

Grenze an der Tentakelbasis, was damit erklärt werden kann, dass die Zellen in den Tentakeln im G_2-Stadium des Zellzyklus verbleiben und auch keine HyβCat aktivierte Transkription aufweisen sollten (Dübel et al. 1987). Eine regionale Konzentrierung von HyβCat, wie sie in der InSitu-Hybridisierung zu erkennen ist, etwa in den Knospen oder im Hypostom, ist mit dem Antikörper β12/3 nicht eindeutig zu erkennen.

Der Antikörper β3/3 lokalisiert HyβCat an der Zellwand und gibt damit einen Beleg für die Einbindung des Moleküls in die Zelladhäsion (Abb.3.7). Die Zellwände sind gleichmäßig gefärbt und lassen keine Strukturen erkennen, die auf einen Adhäsionskomplex deuten. Dabei beschränkt sich die Färbung auf den apikalen Rand (0,3-0,5 μm) der ektodermalen Epithelzellen (Abb. 3.7b).

In Vertebraten sind hier als Zell-Zellverbindungen die *tight junctions* lokalisiert, die den *septate junctions* der Invertebraten entsprechen. Sie verschweißen die Zellen an ihren apikalen Enden miteinander und verhindern so eine Diffusion gelöster Stoffe durch das Epithel. Die um die transmembranständigen Cadherine organisierten Adhärenzverbindungen stellen eine Verbindung zum Cytoskelett her und befinden sich in Vertebraten in der lateralen Zellwand gerade unterhalb der *tight junctions*. Bei Invertebraten sind die Verhältnisse umgekehrt: Die Adhärenzverbindungen liegen apikal über den *septate junctions*, heben sich aber als lokale Punktverbindungen ab. Im Epithel von *Hydra* konnten diese Zellverbindungen auch mit ultrastrukturellen Untersuchungen bislang noch nicht gefunden werden. Obwohl die wichtigsten Komponenten der Adhärenzverbindungen in *Hydra* isoliert wurden, konnten sie auch mit den neuen Antikörpern nicht lokalisiert werden. Interessanterweise können mit den beiden Antikörpern nur ektodermale Zellen detektiert werden. HyβCat könnte daher in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül wie HyCadh und HyδCat eine Rolle bei der Differenzierung der Epithelien spielen.

Auch in den 24 Stunden alten Aggregaten demonstrieren beide Antikörper zusammen, dass HyβCat in der frühen Phase der Zellorganisation seine beiden Funktionen wahrnimmt. Der Antikörper β12/3 zeigt seine gleichmäßige Lokalisation in den Zellkernen (Abb. 3.10). Eine lokale Konzentration des Moleküls ist nicht zu erkennen. In der Frühphase der Zellorganisation ist die Transkription einer Vielzahl unterschiedlicher Gene erforderlich, die auch durch die aktivierende Funktion von HyβCat erfolgt. Mit dem Antikörper β3/3 sind schon nach einem Tag vereinzelt die apikalen Zellgrenzen zu erkennen, die in den späteren Stadien der Aggregation weiter zunehmen

(Abb. 3.9). Die durch HyCadh gebildeten Zellverbindungen werden demnach schon in der frühen Aggregationsphase durch *septate junctions* stabilisiert. Auch in anderen Organismen können an diesen Zellverbindungen verschiede Moleküle detektiert werden, die außerdem eine cytoplasmatische Signalfunktion besitzen und im Zellkern lokalisiert werden. So reguliert in *Drosophila* das an die *septate junctions* gebundene *Disc-large (Dlg)* auch das Auswachsen der Imaginalscheiben (Anderson, 1996) und in Vertebraten sind die *tight junction* Moleküle ZO-1 und ZO-2 auch im Zellkern anzutreffen (Gotthardi et al., 1996; Fagotto und Gumbiner, 1996).

4.5 Einschränkung der lokalen Detektion

Die Tatsache, dass die Antikörper das *Hydra* β-Catenin in jeweils nur einer seiner Funktionen detektieren können, liegt womöglich in der Überlagerung und Kompetition der Bindungsdomänen der Antikörper mit denen interagierender Moleküle. Das β-Catenin Molekül weist über seine gesamte Länge, vor allem aber in seiner *armadillo-repeat*-Domäne, eine Vielzahl von Bindungsdomänen auf (Abb. 4.1). So liegt die Erkennungssequenz des Antikörpers β3/3 im N-Terminus des Moleküls im Bereich der Bindungsdomäne von GSK3, dem cytoplasmatischen Molekül, das in Komplexbildung mit den Molekülen APC und Axin die Phosphorylierung und anschließende Degradation des β-Catenin im Cytoplasma initiiert (Behrens et al., 1998; Li et al., 1999; Salic et al., 2000). Eine Lokalisation von HyβCat im Cytoplasma könnte durch diese Kompetition um die Bindungsdomänen inhibiert werden. Die Bindungsdomäne für das Cadherin erstreckt sich dagegen über die gesamte Länge der *armadillo repeats* (Huber und Weis, 2001), die Bindungsdomäne für β3/3 bleibt davon unberührt, so dass der Antikörper mit dem an der Zellwand lokalisiertes β-Catenin kreuzreagieren kann. Die Erkennungssequenz für den Antikörper β12/3 liegt im zehnten *armadillo-repeat* und könnte hier gleich mit mehreren Molekülen um die Bindungsdomäne konkurrieren, wodurch die Detektion von HyβCat beeinträchtigt werden könnte. Die Struktur der *armadillo-repeat*-Region ist in Komplexen mit Tcf und Cadherin aber auch beim ungebundenen β-Catenin sehr ähnlich, so dass vermutlich nicht eine besondere Konformation des Moleküls die Anbindung eines Liganden begünstigt (Graham et al., 2000). Dagegen wird im Übergang vom N-terminalen Bereich zu den *armadillo-repeats* die Anbindung von α-Catenin durch eine vorherige Anlagerung

von β-Catenin an Cadherin und die damit veränderten sterischen Bedingungen am N-Terminus vermutlich begünstigt (Giannini et al., 2000; Gottardi und Gumbiner, 2001), was auch für die Detektion von membrangebundenen HyβCat mit dem Antikörper β3/3 von Bedeutung sein könnte.

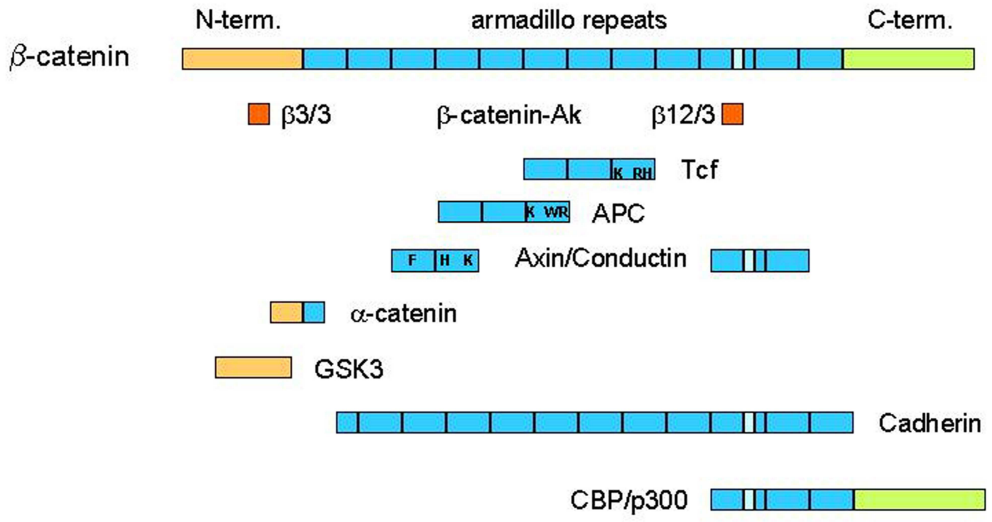

Abb. 4.1:
Struktur des humanen β-Catenin-Moleküls mit der ungefähren Positionierung der Bindungsdomänen für einige Interaktionspartner. Für eine Anbindung essentielle Aminosäuren sind hervorgehoben. Die Position der Peptiderkennungssequenzen für die HyβCat-Antikörper (β-Catenin-Ak) β3/3 und β12/3 sind rot eingezeichnet.

Die Bedingungen für eine Detektion mit den HyβCat-Antikörpern scheinen noch nicht optimal zu sein. Obwohl beide Antiseren gegen die synthetischen Peptide aufgereinigt wurden, ist die unspezifische Hintergrundfärbung stets sehr hoch. Möglicherweise lässt sie sich noch durch geeignetere Fixierungsbedingungen oder Blockierungsmethoden reduzieren.

4.6 *Hydra* besitzt ein Ortholog der δCat/p120/Plakophilin-Familie

In der Gruppe der *armadillo-repeat*-Moleküle grenzt sich die Familie der δCat/p120/-Plakophilin-Familie gerade durch die Konserviertheit der namensgebenden Domäne ab (Abb. 3.27). Dagegen ist in den N- und C-terminalen Bereichen innerhalb der Familie und in den Unterfamilien die große Variabilität auffällig. Ein funktionaler Zusammenhang einzelner Domänen der wenig konservierten Bereiche mit der Lokalisation des Moleküls ist in jedem Fall nicht gesichert. Das in einem Two-Hybrid-Screen isolierte HyδCat unterscheidet sich hier auch völlig von den übrigen Vertretern dieser

Familie. Die große Ähnlichkeit in seiner gesamten Struktur (Abb. 4.2), die Zahl und Ordnung der *armadillo-repeats* und vor allem die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in diesem Bereich unterscheiden das *Hydra*-Molekül aber eindeutig von seinem nächstverwandten arteigenen Molekül, dem HyβCat und ordnen es der δCat/p120/Plakophilin-Familie zu.

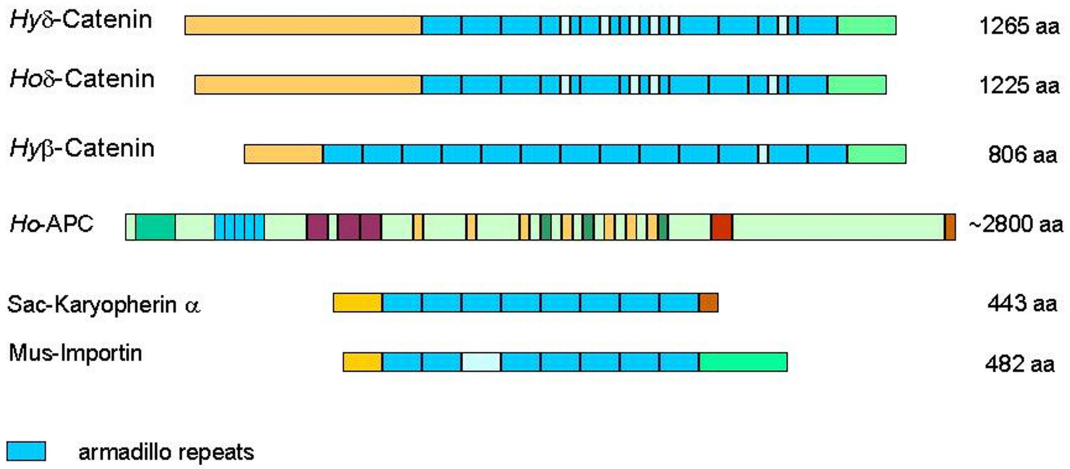

Abb. 4.2:
Strukturvergleich des HyδCat mit dem p120/δ-Catenin-Molekül des Menschen (Hoδ–Catenin), sowie dem nächstverwandten Molekül in *Hydra* (Hyβ-Catenin) und drei weiteren *armadillo-repeat*-Molekülen (humanes Adenomatous polyposis coli (Ho-APC), Karyopherin α der Bierhefe (Sac-Karyopherin α) und Importin aus der Maus (Mus-Importin)).

Die einzelnen *armadillo-repeats* des HyδCat sind ihren jeweiligen Orthologen der δ-Catenin-Familie ähnlicher, als sich selbst zueinander (Abb. 3.24 und 3.25). Im Grad dieser Übereinstimmung liegt das *Hydra*-Molekül im mittleren Bereich zwischen den bekannten Werten für die Unterfamilien der p120/δ-Catenine und der Plakophiline, so dass auch dieses Kriterium keine weitere Klassifikation ermöglicht. Die phylogenetischen Analysen bestätigen die isolierte Stellung des *Hydra*-Moleküls in der Familie der δ–Catenine. HyδCat nimmt im Stammbaum eine eigene basale Stellung ein und lässt sich auch nicht in eines der Cluster der Vertebraten oder Invertebraten einordnen (Abb. 3.26 und 3.27). HyδCat zeigt in diesem Punkt große Übereinstimmung mit seinem Interaktionspartner HyCadh, das im Vergleich mit anderen bekannten Cadherin-Sequenzen eine ähnlich basale Position einnimmt und sich innerhalb der Gruppe der klassischen Cadherine einer weiteren Eingruppierung entzieht (Kostron et al., eingereichte Arbeit).

Die Stammbaumanalysen zeigen die frühe Differenzierung der armadillo-repeat Moleküle und phylogenetisch konservierte Funktion der δ-Catenine. So sind im basalen

diploblastischen Metazoen *Hydra* mit HyδCat und HyβCat wenigstens zwei Vertreter der *armadillo-repeat* Familie vorhanden. Zum Anderen ist es in der Familie der δ-Catenine schon früh zu einer weiteren Differenzierung gekommen. So scheint innerhalb der Gruppe der Vertebraten die Differenzierung der δ-Catenine und Plakophiline ebenso konserviert zu sein wie die Auftrennung der Vertebraten- und Invertebraten-Moleküle. Die gleiche Auftrennung innerhalb der Familien lässt sich auch im Vergleich der konservierten *armadillo-repeat*-Domänen erzielen. Die funktionalen Unterschiede beruhen also nicht allein auf den Unterschieden in den wenig konservierten Bereichen. Auffällig ist die relativ lange N-terminale Sequenz des *Hydra*-Moleküls. Von anderen Vertretern der Familie ist bekannt, dass sie in verschiedenen Isoformen auftreten,die zelltypspezifisch exprimiert werden. Allein von HoδCat1 sind über dreißig verschieden Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen verschiedene Translatiosstarts und somit unterschiedlich lange N-Termini aufweisen (Reynolds et al., 1994; Keirsebilck et al., 1998). Zudem unterscheiden sie sich durch verschiedene Exons im *armadillo-repeat* 6 und im C-Terminus. Die zelltypspezifische Expression der verschiedenen Isoformen korreliert vermutlich auch mit funktionellen Unterschieden. So ist die Isoform mit der längsten N-terminalen Sequenz nur in Zellen zu finden, die N-Cadherin exprimieren, die kürzeren Isoformen werden dagegen häufiger in Zellen zusammen mit E-Cadherin exprimiert. Durch das alternative Spleißen bleiben die *armadillo-repeats* und die Bindungsdomäne für die Cadherine unberührt. Die funktionellen Unterschiede der Isoformen beruhen vermutlich in ihrem Vermögen, verschiedene Bindungspartner für die Cadherinkomplexe zu rekrutieren und so deren Funktion zu regulieren (Anastasiadis und Reynolds, 2000).

4.7 Die Komponenten eines Adhäsionskomplexes sind in *Hydra* vorhanden

HyCadh und HyδCat zeigen sowohl in ihrer Kolokalisation und zeitgleichen Aufregulierung ihrer Transkripte eine strenge Synexpression und deuten auf einen engen funktionalen Zusammenhang. Gemeinsam mit der Tatsache, HyCadh und HyδCat als Interaktionspartner von HyβCat identifiziert wurden, deutet die gleichmäßig niedrige Expression von allen drei Molekülen im ektodermalen Epithel sowie die gleichzeitige Aufregulierung in der frühen Phase der Reaggregation, in der Zellverbindungen auf-

gebaut und eine erste Ordnung erstellt wird, auf die Existenz eines Adhäsionskomplexes in *Hydra*.

Über die Funktion der δ-Catenin-Moleküle bei der Bildung von Adhäsionskomplexen herrscht noch keine einheitliche Meinung. Einige Untersuchungen sprechen dafür, dass benachbarte Zellen mit ihren extrazellulären Cadherin-*repeats* erst interagieren können (trans-Dimerisierung), nachdem in jeder Zelle zwei Cadherinmoleküle sich verbunden haben (Shapiro et al., 1995; Pertz et al., 1999). Diese laterale (cis-) Dimerisierung soll durch δ-Catenine aktiviert werden (Yap et al., 1998; Navarro et al., 1998; Thorensen et al., 2000). Auch bei der cytoplasmatischen Vernetzung und damit Verankerung der Cadherine in der Zellmembran spielen δ-Catenine eine wichtige Rolle und tragen zur Stabilisierung der Zellverbindung bei (Anastasiadis und Reynolds, 2000). Unklar ist, ob die Vernetzung der Cadherine durch δ-Catenine erst erfolgen kann, nachdem sie sich zu einem Cluster vereinigt haben oder ob die einzelnen Cadherine durch die vermittelnde Funktion der δ-Catenine zusammengeführt werden. In dieser Arbeit zeigen HyCadh und HyδCat überall eine zeitgleiche Synexpression. Auch in den unreifen und wandernden Nematocyten ist kein Unterschied in der Expression der beiden Moleküle zu erkennen. Wenn HyδCat nur zur Stabilisierung bestehender Adhäsionskomplexe benötigt würde, dann wäre seine Expression auch erst in den im Epithel fest verankerter Nematocyten zu erwarten. Tatsächlich ist sie schon in den frühen Stadien der Nematocytenreifung zu erkennen. Auch die InSitu- und RT-PCR-Experimente mit den Aggregaten zeigen die frühe und zeitgleiche Expression von HyδCat und HyCadh. Alle Ergebnisse sprechen für einen frühen regulierenden Einfluss von HyδCat auf die Funktion von HyCadh.

Ein Hinweis auf eine Funktion von HyδCat in Signaltransduktionswegen ist nicht zu erkennen. So fehlen dem *Hydra*-Molekül charakteristische Domänen, etwa die NLS-Domäne (*Nuclear Localization Signal*; Imamura et al., 1998) im sechsten *armadillo-repeat* (CW/FGxKKxKxKK), die bei anderen Vertretern der Familie identifiziert wurden und denen eine Bedeutung beim Transfer in den Zellkern zugesprochen wird (Lu et al., 1999).

4.8 Nematocytenreifung und Verankerung

Neben der epithelialen Expression zeigen HyCadh und HyδCat eine Funktion bei der Entwicklung der für Cnidarier charakteristischen Nesselzellen. Die Entwicklung der Nematocyten beginnt im Rumpf der Polypen, wo sie sich aus den multipotenten interstitiellen Stammzellen differenzieren. Durch mehrfache Teilung bilden sie zunächst Nester von 2-32 Nematoblasten, in denen die Bildung der Kapselwand erfolgt. Ist die Reifung abgeschlossen, lösen sich die Nester auf und die Nematocyten wandern im Zellfluß entlang der Mesogloea zu den Tentakeln, wo sie in Komplexe mit ektodermalen Epithelzellen eingebunden werden. In diesen sogenannten Batteriezellen sind die Nematocyten über desmosomale Kontakte mit den ektodermalen Epithelzellen verbunden, die wiederum über hemidesmosomale Verbindungen an der Mesogloea verankert sind. In den Desmosomen der Triploblasten stellen Cadherine die Verbindungen zwischen den benachbarten Zellen her. Die hohe Synexpression von HyCadh und HyδCat in den Batteriezellen kann daher auf diese desmosomalen Verbindungen zwischen Nematocyten und Epithelzellen zurückgeführt werden. Die frühzeitige Expression der Adhäsionsmoleküle garantiert die Verankerung der Nematocyten, wenn sie in den Tentakeln auf Epithelzellen mit gleichfalls hoher Expression treffen. HyβCat zeigt in den Tentakeln dagegen keine erhöhte Expression, so dass die Aufregulierung von HyCadh und HyδCat allein in die desmosomalen Verbindungen der Batteriezellen fließen kann. Da die Expression von HyCadh und HyδCat schon in unreifen Nematoblasten und wandernden Nematocyten zu erkennen ist, muß ihre Funktion nicht nur in der Verankerung in den Tentakeln liegen. Möglicherweise übernehmen sie auch noch anderen Funktionen in der Zelldifferenzierung und Wegfindung der Nematocyten zu den Tentakeln. Für diese organisierende Funktion dieser beiden Moleküle spricht die ausschließliche Expression im Ektoderm und die fehlende Expression von HyβCat in den Nematocyten.

Auffällig ist die geringe Transkription von HyβCat in den Tentakeln und die fehlende Lokalisation des Moleküls in den Zellkernen. Im allgemeinen Zellfluß aus dem Rumpf zu den Tentakeln gelangen die Zellen zunächst in den Kopfbereich der Polypen, wo sie aufgrund seiner Funktion im Kopforganisationszentrum eine Aufregulierung des HyβCat erfahren. Wandern die Zellen weiter in die benachbarten Tentakeln, so besitzen sie schon ein erhöhtes Expressionsniveau. Hier verharren die ausdifferenzier-

ten Zellen in der G_2-Phase des Zellzyklus und die Funktion des HyβCat beschränkt sich auf die Zelladhäsion. Vermutlich wird das cytoplasmatische HyβCat ganz durch das hier stark aufreguliert vorkommende HyCadh bei der Verankerung der Nematocyten in Anspruch genommen.

4.9 Der HyCadh Antikörper zeigt ein komplexes Bild des Nervennetzes in *Hydra*

Die InSitu-Analysen mit der HyCadh RNA-Sonde ermittelte Expression des Transkriptes in den neuronalen Zellen konnte mit dem neuen HyCadh-Antikörper reproduziert werden. Die Spezifität des Antikörpers wird durch die Detektion des rekombinant exprimierten HyCadh bestätigt (Abb. 3.16), er ist demnach in der Lage, HyCadh zu erkennen. In den Westernblotanalysen kann mit diesem Antikörper nicht nur ein einzelnes Molekül detektiert werden, vielmehr erscheinen konstant drei Fragmente (Abb. 3.15). In einem Kompetitionstest lässt sich die Detektion aller drei Banden inhibieren. Keine der Banden repräsentiert dabei die erwartete Größe des HyCadh in seiner gesamten Länge. Ob es sich um drei unterschiedlich große Fragmente des sehr langen HyCadh-Moleküls handelt, die alle die cytoplasmatische Domäne und damit das Erkennungsepitop des Antikörpers enthalten, ließe sich zweifelfrei nur durch Isolation und Sequenzierung der Proteinbanden klären. Die Beschränkung der detektierten Proteinbanden auf die neuronalen Zellen im Zelltyp-Western (Abb. 3.18) bestätigt ein früheres Ergebnis einer Zelltyp-Northernblot-Analyse, bei der mit einer HyCadh-RNA-Sonde die Transkripte in den gleichen Elutriationsfraktionen festgestellt wurden (B. Kostron, persönliche Mitteilung). In beiden Analysen fehlt aber eine Detektion in den ektodermalen Epithelzellen, die nach den RNA-InSitu-Untersuchungen zu erwarten wären. Die neuronale Spezifität des Antikörpers setzt sich in den imuncytochemischen Untersuchungen im fixierten Hydragewebe fort. So können mit dem neuen Antikörper in *Hydra* erstmals über den gesamten Polypen verschiedene Nervenzelltypen angefärbt werden und zeigen ein sehr viel komplexeres Bild des Nervengewebes in *Hydra*, als es bislang dargestellt werden konnte (Abb. 3.19 und 3.20). Dabei werden aber mit dem HyCadh-Antikörper doch nicht alle Nervenzellen erkannt, wie die Doppelfärbungen mit dem zweiten nervenzellspezifischen Antikörper Nv-1 zeigen (Abb. 3.21 und 3.22). Wie der Vergleich der sensorischen Zellen im Hypostom und den Tentakelspitzen zeigt, ist die Verteilung der HyCadh- und Nv-1-positiven Zellen in den verschiedenen

und Nv-1-positiven Zellen in den verschiedenen Körperregionen unterschiedlich. Die Detektion mit dem HyCadh-Antikörper ist demnach nicht auf einen Nervenzelltyp beschränkt, vielmehr scheint sie ein Merkmal für die funktionale Differenzierung der Nervenzellen zu sein. Aufgrund der Aminosäuresequenz lässt sich HyCadh nach seiner Struktur den klassischen Cadherinen zuordnen und repräsentiert dabei vermutlich eine sehr ursprüngliche Form dieser Molekülfamilie, wie sie nur bei Nichtchordaten gefunden wird (B. Kostron, persönl. Mitteilung). Eine genauere Klassifikation innerhalb der klassischen Cadherine ist aufgrund der Sequenz nicht möglich. Die Ergebnisse der Expressions-Analysen auf RNA-Ebene mit InSitu-Hybridisierung und Zelltyp-Northern sowie die Antikörper-Analysen im Zelltyp-Western und im fixierten Gewebe legen aber eine Zuordnung zu den in neuronalen Zellen exprimierten N-Cadherinen nahe. Cadherine übernehmen durch die Regulierung differentieller adhäsiver Interaktionen wichtige Aufgaben bei der Ausbildung und Entwicklung von Nervensystemen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). So sind sie speziell von besonderer Bedeutung bei der Neurulation, der Separierung des Neuroektoderms, beim Auswachsen und der Bündelung der Axone, der Migration und Wegfindung neuronaler Zellen sowie der Ausbildung und Stabilisierung synaptischer Verbindungen (Tepass et al., 2000; Angst et al. 2000; Ranscht, 2000). In *Xenopus*-Embryonen ändern zu Beginn der Neurulation die Zellen, aus denen sich das Neuralrohr bildet, ihr Expressionsverhalten. Anstelle von E-Cadherin exprimieren sie nun N-Cadherin, die benachbarten Epithelzellen dagegen weiter E-Cadherin (Fujimori, 1990; Kintner, 1992). Bei der Entwicklung des zentralen Nervensystem des Menschen lassen sich deutlich eingegrenzte Regionen bestimmen, die ausschließlich bestimmte klassische Cadherine exprimieren (Redies, 2000). Im Menschen sind bislang mehr als 80, in *Drosophila* 16 und in *C.elegans* 14 verschieden klassische Cadherine identifiziert worden (Tepass et al., 2000). Cadherin-Catenin Komplexe sind ein wichtiger Bestandteil der synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen und tragen zu ihrer Stabilität bei (Uchida et al. 1996). Dabei können unterschiedliche Cadherine in verschiedenen Populationen von Synapsen gefunden werden. Cadherine haben daher vermutlich eine wichtige Funktion bei der spezifischen Interaktion und Aktivität der Synapsen (Tanaka et al., 2000; Ranscht et al. 2000). Da der HyCadh-Antikörper nicht mit allen Nervenzellen kreuzreagieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass auch in *Hydra* bereits verschiedene Cadherine vorhanden sind, die eine genauere funktionelle Differenzierung ermöglichen. Das könnte auch erklären, warum die in

der InSitu-Analyse beobachtete Expression in den Epithelzellen mit dem Antikörper nicht reproduziert werden konnte.

Die für die InSitu-Hybridisierungen verwendete RNA-Sonde umfasst die gesamte cytoplasmatischen Domäne von HyCadh, die auch die hochkonservierten Bindungsdomänen für β- und δ-Catenin enthält. Vor allem die an die Zellmembran angrenzende *junxtamembrane domain* (JMD) stellt den konserviertesten Abschnitt des Moleküls dar, der die größten Übereinstimmungen unter allen klassischen Cadherine zeigt (Ohkubo und Ozawa, 1999; Thorensen et al., 2000). Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die InSitu-Sonde, die einen Bereich von fast 1000 Aminosäuren umfasst, verschiedene aber sehr ähnliche Cadherine in *Hydra* detektieren kann. Der HyCadh-Antikörper erkennt dagegen ein kurzes Epitop aus dem Bereich zwischen den Catenin-Bindungsdomänen, einem Bereich, der in der cytoplasmatischen Domäne der klassischen Cadherinen die größte Variabilität aufweist (Abb. 3.14). Es ist also möglich, dass die InSitu-Sonde auch ein epithelial exprimiertes Cadherin detektiert, das von dem spezifischeren Antikörper nicht erkannt werden kann.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für eine ausbleibende Detektion des Antikörpers könnte sein, dass das Epitop nicht immer frei zugänglich ist. Neben einer blockierenden Wirkung eines Bindungspartners, der eine Kreuzreaktion des Antikörpers verhindert, wird diskutiert, dass die cytoplasmatische Domäne von klassischen Cadherinen durch die Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern auch eine Konformationsänderung erfährt (Anastasiadis und Reynolds, 2000). Hier wird auch wieder die besondere Bedeutung von δ-Cateninen deutlich, die in verschiedenen Isoformen an Cadherine binden und z.B. durch die Rekrutierung verschiedener Bindungspartner die spezifische Funktion der Cadherine in unterschiedlichen Zelltypen regulieren können. Danach könnte also auch HyCadh nur in einer spezifischen Konformation und Funktion in bestimmten Nervenzellen, nicht aber in Epithelzellen von dem Antikörper erkannt werden.

Sehr wahrscheinlich sind aber auch bereits in *Hydra* verschiedene Cadherine mit verschiedenen Funktionen in der Zelladhäsion, der Separierung der Epithelien, der Etablierung von Organisationszentren sowie der Ausbildung des Nervensystems vorhanden. Gemeinsam mit der Interaktion und regulierenden Funktion von verschiedenen Bindungspartnern, wie z.B. HyδCat, wären damit in *Hydra* ein vielfältiges Instrument der zelltypspezifischen Differenzierung gegeben.

5 Material und Methoden

5.1 Tiere

Als Versuchstier diente der Süßwasserpolyp *Hydra vulgaris* (Stamm Basel). Für immuncytochemische Analysen wurde außerdem der Stamm *Hydra magnpapillata* (Stamm 105, Sugiyama und Fujisawa, 1977), für die Untersuchung zelltyp-spezifischer Genexpression der temperatursensitive Stamm *Hydra magnpapillata* sf-1 (Sugiyama und Fuyisawa, 1978) verwendet. Die Hydren wurden bei 18±1°C in Kulturmedium (1mM $CaCl_2$, 0,1mM $MgCl_2$, 0,1 mM KCl, 1mM NaH_2CO_3, pH 7,8) gehalten, mit frisch geschlüpften Krebslarven (*Artemia salinas*) gefüttert und anschließend zweimal mit frischem Medium gewaschen. Vor den Experimenten wurden die Tiere an mindestens fünf aufeinander folgenden Tagen gefüttert, die letzte Fütterung erfolgt 24Std vor Beginn der Versuche.

5.2 Regeneration und Reaggregation

Für die Regenerationsversuche wurde knospenlosen Polypen von *Hydra vulgaris,* die in eine Petrischale mit Hydramedium gegeben wurden, mit einem Skalpell der Kopf abgetrennt (ca. 80% der Rumpflänge vom Fuß aus gemessen). Anschließend wurden die Rümpfe der geschnittenen Tiere in eine neue Petrischale mit frischem Hydramedium umgesetzt und weiter bei 18°C gehalten.

In den Reaggregationsversuchen wurde 300 knospenlosen Polypen mit einem Skalpell Kopf und Fuß abgetrennt, um Bereiche, die ein erhöhtes Musterbildungspotential tragen, zu entfernen. Die Polypen wurden jeweils dreimal zunächst mit frischem Hydramedium, dann mit Dissoziationsmedium (3,6mM KCl, 6mM $CaCl_2$, 1,2mM $MgSO_4$, 6mM NaCitrat, 6mM NaPyruvat, 6mM Glucose, 12,5mM TES, 50mg/l Rifampicin, pH 6,9) gewaschen, anschließend weitere 10 Minuten in Dissoziationsmedium inkubiert. Durch Auf- und Absaugen mit einer Dissoziationspipette wurden die Polypen zu einer Zellsuspension mechanisch dissoziert. Durch Zentrifugation (1000 rpm/ 5min, Beckham GS6, 21cm Ausschwing-Rotor) in 50ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) wurden kleinere Zellbestandteile entfernt. Das Pellet wurde in ca. 25ml Dissoziationsme-

dium resuspendiert, auf 0,4ml Plastikröhrchen (Fa. Roth) verteilt und für weitere fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die resultierenden Zellklumpen wurden in Petrischalen mit frischem Dissoziationsmedium überführt, das innerhalb von 24 Std (100%/ 0-4 Std, 75%/ 4-12 Std, 50%/ 12-18 Std, 25%/ 18-24 Std) schrittweise in Hydramedium gewechselt wurde. Die Reaggregate wurden anschließend täglich in frisches Hydramedium umgesetzt und von Verunreinigungen befreit. Aus 300 Polypen konnten so 50-55 Aggregate hergestellt werden.

5.3 Eliminierung von interstitiellen Zellen aus *Hydra magnipapillata* sf-1

Bei Tieren des hitzesensitiven Stammes sf-1 von *Hydra magnipapillata* können die interstitiellen Stammzellen durch Hitzebehandlung selektiv eliminiert werden (Sugiyama und Fujisawa, 1978). Das führt dazu, daß auch die daraus resultierenden Differenzierungsprodukte (Nervenzellen, Nematocyten und Drüsenzellen) sukzessive verloren gehen. Hierfür werden die Tiere für 48 Std bei 26°C und anschließend noch weitere 48 Std bei 18°C gehalten und dabei durchgehend gefüttert. Durch diese Behandlung konnten die interstiellen Stammzellen und die resultierenden Differenzierungsprodukte vollständig entfernt werden, was durch Begutachtung von mazerierten Tieren festgestellt wurde (David, 1973).

5.4 Klonierung des N-und C-terminalen Teils eines möglichen Hydra-δ–catenin

Um das in einem Hefe-Two-Hybrid-Screen isolierte Fragment eines *armadillo-repeat*-Moleküls zu vervollständigen, wurden zunächst ein Genbankscreen und anschließend zwei aufeinander folgende 5´RACE- und ein 3´RACE-Experiment durchgeführt.

5.4.1 Genbankscreen

5.4.1.1 Ausplattieren und Filterlifts

Für den Genbankscreen wurde eine cDNA-Bank verwendet, die von Dr.Hans Bode und Dr. Mike Sarras von der University of California, Irvine, zur Verfügung gestellt wurde. Die von der Firma Stratagene erstellte *Hydra vulgaris* cDNA-Bank wurde mit einem Gemisch aus Oligo(dT)- und Zufalls (random)-Oligonukleotiden revers transkribiert und über die *Eco RI*-Schnittstelle in LambdaZap ® Vektoren (Fa. Strata-gene) kloniert.

Als Wirtszellen für die Lambdaphagen diente der *E. coli*-Bakterienstamm XL1-Blue MRF (Stratagene). Von einer Übernachtkultur in LB-Medium mit 10mM Mg_2SO_4, 0,2% Maltose und 5µg/ ml Tetracyclin wurde 1ml in 49ml frisches Medium ohne Tetracyclin gegeben, zu einer optischen Dichte von OD_{600} = 1,0 herangezogen und anschließend abzentrifugiert (50ml Greinerröhrchen, 13000 rpm/ 10 min/ RT, Beckham GS6, 21 cm Ausschwing-Rotor). Das Pellet wurde in kaltem Mg_2SO_4 gelöst, die Suspension auf eine optische Dichte von OD_{600} = 0,6 eingestellt und bei 4°C aufbewahrt.

Von der Phagenbank wurde mit SM-Puffer eine Verdünnungsreihe erstellt, je 100 µl Phagenverdünnung wurden mit 100 µl XL1-Blue in Mg_2SO_4 gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde zu 3 ml NZY-Top-Agarose (52°C) gegeben, auf NZY-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gebildeten Plaques wurden ausgezählt und mit den bekannten Verdünnungen konnte der Phagentiter in pfu/ ml (plaque forming units) berechnet werden. Für die nachfolgenden Screens wurde eine Phagenverdünnung von ca. 80-100000 pfu eingestellt. 100 µl Phagenverdünnung wurden mit 100 µl XL1-Blue für 15 min bei 37°C inkubiert, in 40 ml NZY-Top-Agarose auf eine 22x22 cm NZY-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C gehalten. Durch Filterlifts wurde die DNA auf zwei Nylonmembranen (Biodyne A, 1,2 µm, Fa. Pall) übertragen. Die erste Membran wurde 90 Sekunden, die zweite Membran 180 Sekunden auf die NZY-Platte mit der Phagenbank aufgelegt. Die Filterlifts und die darauf befindliche DNA wurden jeweils fünf Minuten denaturiert (0,5M NaOH, 1,5M NaCl), neutralisiert (0,5M Tris-Cl pH 7,4, 1,5M NaCl) und gewaschen (2xSSC). Durch UV-Bestrahlung (UV Stratalinker, Fa. Stratagene) wurde die nun einzelsträngige DNA kovalent an die Membran gebunden.

5.4.1.2 Herstellung der Gen-Sonde und Hybridisierung

Zum Absuchen der *Hydra vulgaris* cDNA-Bank wurde eine radioaktiv markierte Sonde verwendet, bei der in ein 1,2 kb großes Fragment des im Two-Hybrid-Screens isolierten *armadillo-repeat*-Moleküls ^{32}P-dATP eingebaut wurde (Prime It II Random Primer Labeling Kit, Fa. Stratagene). Syntheseprimer für die Markierungsreaktion waren p120-2 (5´-GCATGAGCAACAGCACG-3´) und p120-3 (5´-CATCATGTGTGT-TTTGCGTAATC-3´). Nach anschließender Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide (Nick Column Sephadex G-50 DNA Grade, Fa. Pharmacia), Szintillationsmessung (860 cpm/ µl) und kurzer Denaturierung (95°C/ 5 min) wurden 200 µl der so hergestellten Sonde zu 20ml Hybridisierungspuffer (6x SSC, 5x Denhardts, 0,1% SDS, 50% Formamid, 0,05M NaPi, 6% ddH_2O) gegeben. Die Membranen wurden zunächst für zwei Stunden in Hybridisierungspuffer prähybridisiert, anschließend über Nacht mit der verdünnten Sonde inkubiert und schließlich 2x 20 min mit 50 ml 2x SSC/ 2% SDS gewaschen. Alle diese Schritte erfolgten bei 42°C in Glasröhren, die in einem Hybridisierungsofen (400 HY-E, Fa. Bachofer) rotierten. Auf die hybridisierten Lifts wurde für 48 Std bei -80°C ein Röntgenfilm (Fa. Kodak) aufgelegt. So konnten drei Bereiche identifiziert werden, die auf beiden Lifts positive Signale zeigten. Diese Bereiche wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette aus der Platte mit der cDNA-Bank ausgestochen und die Agarstückchen in je 1 ml SM-Puffer mit 20 µl Chloroform aufgenommen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C konnten die diffundierten Phagen in SM-Puffer für eine Neuinfektion von XL1-Blue Zellen verwendet werden. Da die Dichte der Plaques auf der cDNA-Bank Platte zu groß war, um einzelne Klone zu isolieren, wurde von den ausgestochenen Bereichen Verdünnungen ausplattiert. Wieder wurden Filterlifts hergestellt, hybridisiert und auf Röntgenfilm detektiert. Nun war eine eindeutige Zuordnung von insgesamt acht einzelnen Plaques zu positiven Signalen auf dem Film möglich. Diese Plaques wurden wiederum ausgestochen und in SM-Puffer mit Chloroform aufgenommen.

5.4.1.3 In vivo Excision

In den linearisierten LambdaZap ® Vektor sind zu beiden Seiten der Klonierungsstelle Fragmente des Plasmidvektors pBluescript SK eingebaut. Die Plasmidsequenzen

werden von den Replikationsstart- und Replikationsstop-Sequenzen des Bakteriophagen f1 flankiert. Bei gleichzeitiger Infektion von *E.coli*-Zellen mit den Lambda-Zap-Phagen und sogenannten Helferphagen, die f1-Phagen-DNA enthalten, wird die zwischen dem f1-Replikationsstart und –stop einklonierte DNA von den f1-Proteinen repliziert, zikularisiert und verpackt und schließlich aus den Bakterien ausgeschleust. Nach Abtrennung der Bakterien können die so entstandenen Phagmidpartikel zur Transformation nicht infizierter Phagen verwendet und auf Ampicillin-Resistenz und β-Galactosidase-Aktivität (Blau- oder Weissfärbung) selektioniert werden. Nur Bakterien, die einen Phagemidvektor enthalten, können auf dem Medium mit Ampicillin wachsen, solche, bei denen ein cDNA-Fragment in das β-Galactosidase-Gen eingebaut wurde, zeigen eine Weissfärbung.

Zur Durchführung der in vivo-Excission wurden 200 µl der aus den Filterlifts isolierten einzelnen Phagensuspensionen mit 200 µl *E.coli* XL1-Blue Zellen (OD_{600} = 1,0) und 1 µl des Ex-Assist Helper Phage (>10^6 pfu/ml) gemischt, 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend zu 3 ml NZY-Medium gegeben und über Nacht im Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Lösung zum Abtöten der Bakterien und Pagen für 20 min auf 70°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert (2000 rpm/ 15 min, Beckham GS6, 21 cm Ausschwing-Rotor). Der die Phagemidpartikel enhaltene Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt.

5.4.1.4 Selektion und Auswertung

Zur Selektion wurden 200µl des *E.coli* Stammes XLOLR (OD_{600} = 1,0) mit 100 µl des Phagemid-Überstandes gemischt, für 15 min bei 37°C inkubiert, zu 300 ml NZY-Medium gegeben und noch für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden verschiedene Mengen (20, 100 und 200 µl) auf LB-Platten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. XLOLR Zellen sind gegen eine Infektion mit Lambda-Phagen resistent und auch Helferphagen können sich in diesen Zellen nicht vermehren, so dass nach der Excission keine neue Infektion mit Lambda-Phagen erfolgen kann.

Von den Platten wurden einzelne weiße Klone gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C herangezogen. Die anschließende Plasmidpräparationen erfolgten mit dem Plasmid Mini Prep Kit der Fa. Qiagen. Die Größe der einklonierten cDNA-Fragmente wurde mit einem Eco RI-Restriktionsver-dau bestimmt. Die

Sequenzierung geeigneter Klone erfolgte durch PCR mit Didesoxynucleotiden (Sanger et al.1977) und markierten Standardprimern (T7 und T3) des Thermo-Sequenase-Kits der Fa Pharmacia. Die Sequenzreaktionen wurden auf einem automatischen Sequenziergerät (ALF ExpressII, Fa. Pharmacia) aufgetrennt und die Sequenzdaten mit der OMIGA 1.1.3. Software der Fa. Oxford Molecular ausgewertet.

5.4.2 RACE-Experimente

5.4.2.1 RNA Isolation

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen aus Hydragewebe gewonnen. Dazu wurden je 40 Hydren in 600 µl Lysispuffer mit einer Pipette homogenisiert. Die weitere Aufreinigung und Isolation erfolgte nach dem Spin-Protokoll des Herstellers. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgt mit je 100 µl DEPC-H_2O, je 2 µl wurden davon zur Kontrolle auf ein Agarosegel (1%) geladen. Zur Isolation der polyA$^+$-RNA aus der Gesamt-RNA wurde das Oligotex mRNA Mini Kit der Fa. Qiagen verwendet. Je zwei Ansätze der Isolation von Gesamt-RNA wurden vereinigt, mit DEPC-H_2O auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt und mit weiteren 250 µl DEPC-H_2O und 15 µl Oligo(dT)-Latexkugelsuspension für 3 min bei 70°C und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere polyA$^+$-RNA-Selektion erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte mit 100 µl Elutionpuffer (5mM TrisCl, pH 7,5). Die RNA wurde mit ½ Volumen 3M NaAcetat pH 5,2 und einem Volumen Isopropanol bei -20°C über Nacht gefällt, anschließend bei 14000 rpm für 15 min zentrifugiert (Beckman Avanti^{TM} 30 Centrifuge, Rotor F2402), das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und mit 10 µl DEPC-H_2O resuspendiert. Die Konzentration der polyA$^+$-RNA wurde mit einem Photometer (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000) bestimmt und betrug 92 ng/µl bei einer Ratio 260 nm/280 nm von 1,9.

5.4.2.2 cDNA-Synthese und RACE Reaktionen

Die cDNA-Synthesereaktionen wurden mit jeweils ca 300 ng polyA$^+$-RNA und bei 42°C mit der Superscript II Reversen Transkriptase der Fa. Gibco durchgeführt. Bei der Synthese wurde an ein Ende der Transkripte ein Oligonukleotid bekannter Sequenz ansynthetisiert. In den RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Experimen-

ten konnten so mit einem dem Oligonukleotid komplementären und einem genspezifischen Primer die gesuchten Fragmente amplifiziert werden.

5.4.2.3 RACE 1

In den ersten RACE Experimenten wurde cDNA verwendet, die mit dem SMART System der Fa. Clontech in einem Gesamtvolumen von je 12 µl synthetisiert wurden. An das 5´-Ende der Transkripte wurde das SMART II Oligonukleotid (5´-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3´) ansynthetisiert. Für die 5´RACE wurde eine genspezifische cDNA mit dem spezifischen Synthese-Primer p120-18 (5´-GCCTGTGATTTTAAACTTTGGTCATTTGCC-3´) hergestellt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl mit dem genspezifischen Primer p120-21 (5´-GAGAAGATCAAGGAGATTAATGC-3´) und dem Primer QII (5´-GCAGTGGTAAC AACGCAGAG-3´). Die PCR Bedingungen waren 1x 95°C/ 1 min, 35x (95°C/ 1 min, 56°C/ 1 min, 72°C/ 4 min), 1x 72°C/ 5 min. 2 µl der PCR Reaktion wurden als DNA-Probe (template) in eine zweite PCR Reaktion mit den Primern p120-20 (5´-GATTGAAGTTTCTATTTGAATGGG-3´) und Q II und gleichen Bedingungen eingesetzt.

Für das 3´RACE Experiment wurde eine cDNA mit dem 3´-Syntheseprimer QT (5´-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC$(T)_{15}$-3´) hergestellt. In der ersten PCR-Reaktion wurden die Primer p120-38 (genspezifisch, 5´-GCTGAA ATGGAGTCTCAGGACTCAG-3´) und Q0 (5´-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3´), in der darauf folgendenden zweiten PCR-Reaktion die Primer p120-39 (genspezifisch, 5´-AGAGTCCGATCCACGACGTTACCT-3´) und QI (5´-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3´) verwendet. Die PCR Bedingungen waren 1x 95°C/ 1 min, 35x (95°C/ 1 min, 58°C/ 1min, 72°C/ 1 min), 1x 72°C/ 5 min.

Die Banden der auf einem Agarosegel aufgetrennten Amplifikationsprodukte wurden ausgeschnitten, mit dem NucleoTrap Kit der Fa. Macherey-Nagel aufgereinigt, in den pGEM-T Vektor der Fa. Promega ligiert und nach Standardmethoden in *E. coli* XL-1 Bakterien transformiert (Sambrook et al., 1989). Mit einzelnen auf Ampicillin-Resistenz und β-Galaktosidase-Aktivität selektionierten Kolonien wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt (Plasmid Mini Prep Kit, Fa. Qiagen) und der Erfolg der Transformation durch einen ApaI/ SacI-Restriktionsverdau (Fa. Pharmacia) überprüft. Die Sequenzierung geeigneter Klone erfolgte mit markierten Standardprimern

(T7 und Sp6) des Thermo-Sequenase-Kits der Fa Pharmacia. Die Sequenzreaktionen wurden auf einem automatischen Sequenziergerät (ALF ExpressII, Fa. Pharmacia) aufgetrennt und die Sequenzdaten mit der OMIGA 1.1.3. Software der Fa. Oxford Molecular ausgewertet.

5.4.2.4 RACE 2

Da die mit dem SMART System synthetisierte cDNA in den RACE Reaktionen kein vollständiges 5´-Ende des Moleküls ergab, wurde in einem zweiten RACE Experiment cDNA verwendet, die mit dem GeneRacer Kit der Fa. Invitrogen hergestellt wurde. Die Methode soll garantieren, daß nur RNA mit einem vollständigem 5´-Ende revers transkribiert wird. Dazu wird zunächst die RNA dephosphoryliert, wovor intakte RNA durch ihre Cap-Struktur, einem 7-Methylguanosin-Rest, geschützt ist. Anschließend wird die Triphosphatbrücke, über die die Cap-Struktur mit dem 5´Ende der RNA verbunden ist, durch eine Pyrophosphatase gespalten. Nur RNA mit einem intakten 5´-Ende trägt nun noch eine freie Phosphatgruppe am 5´Ende, an das ein RNA-Oligonukleotid mit bekannter Sequenz (5´-CGACUGGAGCACGAGGACACUGAC AUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3´) anligiert werden kann. Die First-strand cDNA-Synthese erfolgte mit einem Random Primer ($p(dN)_6$, Fa. Boehringer Mannheim, 1st Strand cDNA Synthesis Kit). Das Gesamtvolumen der cDNA-Synthese betrug 20 µl. In die 50 µl PCR-Reaktionen wurden davon je 1 µl (1:10 verdünnt) und von den Primern je 20 pmol eingesetzt. Primer für die 5´RACE PCR-Reaktion 1 waren p120-30 (genspezifisch, 5´-CTCTGTCATAATTTCTATCATCCC-3´) und GR5´-1 (5´-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3´). Die PCR Bedingungen waren 1x 95°C/ 1 min, 35x (95°C/ 1 min, 58°C/ 1 min, 72°C/ 4 min), 1x 72°C/ 5 min. 2 µl der PCR Reaktion 1 wurden als template in eine zweite PCR Reaktion mit gleichen PCR Bedingungen eingesetzt, die PCR Primer waren p120-29 (genspezifisch, 5´-GTCAT AATTTCTATTACCTCTGTC-3´) und GR5´-2 (5´-GGACACTGACATGGACTGAA-GGAGTA). Die weitere Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte wie im ersten RACE Experiment.

5.4.2.5 Amplifikation überbrückender Fragmente

Zur Kontrolle, dass die im Two-Hybrid-Screen, Genbank-Screen und den RACE Experimenten erhaltenen Fragmente tatsächlich einem einzigen Molekül entstammen,

sollten mit den zugrunde liegenden Sequenzdaten unabhängig Fragmente generiert werden, die die einzelnen Abschnitte überbrücken. Dazu wurde eine neue cDNA mit dem genspezifischen Primer p120-41 (5´-TACTATATTTACGCTTAACGCTATT GTTAT-3´) aus dem C-terminalen Bereich hergestellt. PCR-Reaktionen wurden durchgführt mit den Primer-Kombinationen p120-45 (5´-GTAACATTGTTGAGG GTTAATGAG-3´) und p120-20 (5´-GATTGAAGTTTCTATTTGAATGGG-3´), p120-50 (5´-CGAGATAATAGAAGTGACAGAGAT-3´) und p120-8 (5´-CTGAGGCGGTCAA CTTCC-3´) sowie p120-3 (5´-CATCATGTGTGTTTTGCGTAATC-3´) und p120-43(5´-ACGCTATTGTTATAATTTACATTA-3´). Die Amplifikationsprodukte wurden kloniert und sequenziert wie oben beschrieben.

5.4.2.6 Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der OMIGA 1.1.3. Software der Fa. Oxford Molecular. Mit dem BLAST-Programm (National Center for Biotechnologie Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) wurde nach Homologien in der Datenbank gesucht. Für die phylogenetischen Analysen wurde zunächst die Aminosäuresequenzen mit ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) und mit anderen ausgewählten Sequenzen verglichen. Für die graphische Darstellung wurden die Sequenzvergleiche mit dem Programm GeneDoc (http://www.psc.edu/biomed/ genedoc/) bearbeitet. Die Daten der ClustalW-Analyse gingen auch ein in die Berechnung der Stammbäume mit der Puzzle-Software (Schmidt et al., 2002; http://www.zi.biologie.uni-muenchen.de/ ~strimmer/puzzle.html) nach der *Neighbour Joining plus Quartet sampling*-Methode und dem Modell der Aminosäuresubstitution nach Jones et al. (1992).

5.5 **RNA-InSitu-Hybridisierung**

5.5.1 Herstellung der RNA-Sonden

Zur *in vitro*-Detektion der Transkripte der untersuchten Gene dienten Digoxygenin-markierte einzelsträngige antisense RNA-Sonden. Von den cDNA-Fragmenten, die in pGEM-T (Fa. Promega) bzw. pBluescript SK (Fa. Stratagene) -Vektoren kloniert wa-

ren, wurden mit den Standardprimern M13 forward und M13 reverse PCR-Produkte hergestellt, die neben den cDNA-Fragmenten flankierend die Promotoren für T7- und sp6- bzw.T3-RNA-Polymerasen enthalten. Die Transkription erfolgte je nach verwendetem Vektor und Orientierung der enthaltenen cDNA mit je einer dieser Polymerasen. Bei der Synthese der anti-sense RNA-Sonden wurden Digoxygenin-markierte Uracilnukleotide eingebaut die mit einem Digoxygenin-Antikörper detektiert werden können. Die Sonden wurden auf einem Agarosegel überprüft und in Hybridisierungslösung bei –80°C aufbewahrt.
Die verwendeten RNA-Sonden wurden mit folgenden cDNA-Fragmenten synthetisiert: Für Hyβcat wurde ein Fragment von 1560 Nukleotiden gewählt, das die gesamte *armadillo-repeat*-Region umfasst. Auch von Hyδcat wurde die *armadillo-repeat* Domäne mit 1156 Nukleotiden verwendet. Die HyCadh-Sonde enthält die gesamte cytoplasmatische Domäne sowie einen Teil der Transmembrandomäne (2966 Nukleotide). HyTcf wird durch ein 866 Nukleotide großes Fragment vertreten. Die HyWnt-Sonde repräsentiert die C-terminale Hälfte des Moleküls mit 534 Nukleotiden. Die Hybra1-Sonde enthält mit 926 Nukleotiden die vordere Hälfte des Moleküls, inklusive des untranslatierten Bereichs (UTR) und der ersten T-Box.

5.5.2 Durchführung

Die Tiere wurden zunächst in 2% Urethan in Hydramedium für eine Minute relaxiert, anschließend in frischem 4% Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Bis zum Versuchsbeginn wurden die fixierten Tiere in Methanol bei –20°C aufbewahrt oder gleich in Ethanol überführt, um das Paraformaldehyd auszuwaschen. Nach einer schrittweisen Rehydrierung in PBT (je 5 min in 75%, 50%, 25% Methanol bzw. Ethanol in PBS+0,1% Tween) wurden die Tiere für 10 min mit Proteinase K (Fa. Sigma, 10 µg/ ml in PBT) inkubiert, um das Gewebe für die Sonden besser zugäng-lich zu machen, und die Reaktion mit Glycin (4 mg/ ml in PBT) gestoppt. Nach jeweils 2x5 min Äquilibrierung in 0,1M Triethanolamin (TEA) und Inkubation in Essigsäure-anhydrid (2,5 µl/ ml 0,1M TEA) wurde das Gewebe 20 min in 4% Paraformaldehyd in PBT erneut fixiert und anschließend 5x5 min in PBT gewaschen. Die Prähybridi-sierung erfolgte jeweils für 10 min bei Raumtemperatur mit zunächst 50%, dann 100% Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5xSSC, 200 µg/ ml Hefe-RNA, 1x Denhardts, 100 µg/

ml Heparin, 0,1% Tween, 0,1% CHAPS, 10% DEPC-H_2O). Nach weiteren 2 Std Prähybridisierung im Wasserbad bei 55°C wurden die Proben mit einer der Sonden (Hyβcat: 0,02 ng/ µl bzw. HyTcf, HyWnt, Hybra1, Hyδcat oder *Hy*Cadh: 0,05 ng/ µl in Hybridisierungslösung) für 2,5 Tage bei 55°C inkubiert. Nicht hybridisierte Sonden wurden durch Waschen bei 55°C mit zunächst schrittweise verdünnter Hybridisierungslösung (jeweils 5 min 100%, 75%, 50%, 25% in 2xSSC), anschließend mit 2xSSC + 0,1% CHAPS (2x30 min) entfernt. Nach 2x10 min Äquilibrierung bei RT in Maleinsäurepuffer (MAB, pH 7,5) und einem Präblockierungsschritt in Rinderserumalbumin (BSA 1% in MAB, 1 Std) erfolgte eine Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen mit einer Blockierungsreagenz der Fa. Roche (1% in MAB) für 2 Std bei 4°C. Die Bindung an die markierte RNA-Sonde erfolgte bei 4°C über Nacht mit einem Anti-Digoxygenin-Antikörper (1:2000 verdünnt in der Blockierungsreagenz) mit konjugierter Alkalischer Phosphatase (Fa. Roche). Ungebundener Antikörper wurde durch häufiges Waschen (12 x 30 min und 1x über Nacht) mit MAB entfernt. Nach Äquilibrierung in alkalischem NTMT-Puffer (100mM NaCl, 100mM Tris, pH 9,5 , 50mM $MgCl_2$, 0,1% Tween, 1mM Levamisol, 3x5 min) erfolgte die Farbreaktion bei 37°C im Dunkeln mit dem Substrat NBT/BCIP (Fa. Roche, 1:50 in NTMT), das durch die Alkalische Phosphatase umgesetzt wird und einen blauen Niederschlag bildet. Die Farbreaktion wurde durch periodisches Betrachten der Präparate unter dem Binokular kontrolliert und schließlich mit 100% Ethanol gestoppt. Für die Auswertung wurden die Tiere in PBS/Glycerin (1:9) überführt und auf Objektträger montiert.

5.6 Semiquantitative PCR

Zur Untersuchung der Dynamik der RNA-Expression im Prozess der Reaggregation wurden semiquantitative PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde cDNA verwendet, die aus Aggregaten verschiedener Entwicklungsstufen (0,5 , 6, 12, 18, 24, 36 und 48 Std alt) gewonnen wurde. Die dazu nötige RNA-Isolation und cDNA-Synthese mit einem oligo-dT-Primer erfolgte wie oben beschrieben. Für die PCR-Experimente wurden spezifische Oligonukleotide der Gene Hyβcat, HyTcf, HyWnt, HyCadh und Hyδcat verwendet. Als Positivkontrolle für die cDNA wurde der *Hydra* Elongationsfaktor EF1-α gewählt , der als *housekeeping*-Gen in jeder Zelle und jedem Reaggregationsstadium ein unverändertes Expressionsniveau besitzt und sich so auch für eine ungefähre Abschätzung gleicher cDNA-Konzentrationen für die ver-

gleichenden PCR-Experimente eignet. Die PCR-Reaktionen wurden gemeinsam angesetzt und unter gleichen Bedingungen (95°C/ 5 min, 30x (95°C/ 1 min, 53°C/ 1min, 72°C/ 1 min), 72°C/ 8 min) durchgeführt.

5.7 **Elutriation**

Hydra-Zellsuspensionen lassen sich durch Elutriation in einzelne Fraktionen verschiedener Zelltypen auftrennen (Greber et al. 1992). Im Elutriator werden die dissoziierten Zellen durch Zentrifugalkraft und einen dagegen wirkenden Fluss des Mediums, das durch die Elutriationskammer gepumpt wird, nach Größe und Masse voneinander separiert. Bei einem spezifischem Verhältnis dieser beiden Kräfte werden die einzelnen Zelltypen aus der Elutriationskammer gespült und können als getrennte Fraktionen aufgefangen und gesammelt werden. Dazu wurden zunächst ca. 1000 Tiere in 20 ml Dissoziationsmedium (3,6mM KCl, 6mM $CaCl_2$, 1,2mM $MgSO_4$, 6mM NaCitrat, 12,5mM NaPyruvat (TES), 6mM Glucose, 6mM TES, 50mg/ l Rifampicin, pH 6,9) mit 160mg Pronase E in einer 75 ml-Zellkulturflasche (Fa. Renner) für 2 Std / RT bei leichtem Schwenken inkubiert. Die Suspension wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) 5 min / 800 rpm/ RT zentrifugiert (Beckham GS6, 21 cm Ausschwing-Rotor), der Überstand in einem neuen Greiner-Röhrchen nochmals zentrifugiert (10 min/ 1300 rpm/ RT). Die Pellets wurden gemein-sam in 10 ml Dissoziationsmedium resuspendiert und mit einer Einmalspritze (Fa. Braun) in das Elutriationssystems (JE-5.0) in einer Zentrifuge (J6, beide Fa. Beck-man) gespritzt. Die Ausgangsbedingungen der Elutriation waren dabei 4000 rpm in der Zentrifuge und eine Fließgeschwindigkeit von 15 ml Medium/ min im Elutriator. Acht Fraktionen mit je 100 ml wurden aufgefangen. Die Bedingungen für die einzelnen Fraktionen waren 4000, 3000, 2500, 2200, 1800, 1300 und 1100 rpm mit 15 ml/ min sowie 1100 rpm mit 30ml/ min. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend sofort abzentrifugiert (Fraktionen 1 und 2 bei 1500 rpm/ 10min/ 4°C, Fraktionen 3-8 bei 800 rpm/ 10min/ 4°C, Beckman GS6, 21cm Ausschwing-Rotor) und die Pellets bei –20°C aufbewahrt. Zur Kontrolle der Auftrennung der Zelltypen wurde zuvor von den 100 ml jeder Fraktion je 2 ml abgenommen, abzentrifugiert und die Pellets in 30 µl Dissoziationsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden mit 30 µl Formol fixiert und auf Objektträger gebracht. Das Auszählen der verschiedenen Zelltypen erfolgte unter einem Mikro-

skop, für die statistische Auswertung von insgesamt vier Läufen wurde das Computerprogramm Excel 97 (Fa. Microsoft) verwendet.

5.8 Proteingele und Westernblots

Zur Detektion verschiedener Moleküle aus *Hydra* wurden Extrakte lysierten Gewebes mit Acrylamidgelen aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Dazu wurde jeweils eine *Hydra* in 20 µl 2x Lämmli-Proben-puffer (135mM Tris pH 6,8 , 4% SDS, 20% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau) lysiert, eine Minute bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte mit Gelkammern der Fa. Hoefer Pharmacia Biotech (8x 10x 0,1 cm, Mighty Small II SE 250 Aparatur).

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (19:1)	5% bzw 10%	4%
TrisHCl	0,375M, pH 8,8	0,125M, pH 6,8
SDS	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,1 %	0,1 %
APS	0,5 %	0,25 %

	Laufpuffer
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

Die Transferierung auf eine Nylon-Membran (Biodyne A, Fa. Pall) erfolgte ebenfalls in einer Apparatur der Fa. Hoefer (TE22) über Nacht bei 4°C. Für den Transfer wurde der Laufpuffer mit 20% Methanol verwendet.
Zur Detektion mit spezifischen Antikörpern wurden die Membranen zunächst 3x 10 min mit PBT (PBS mit 0,1% Tween) gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen für eine Stunde in 5% Magermilchpulver in PBT geschwenkt. Die Inkubation mit den Antikörpern (verdünnt in PBS mit 0,5% Magermilchpulver und 0,02% Natriumazid) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach weiterem dreimaligem Wa-

schen in PBT wurden die Membranen für eine Std mit einem sekundären Antikörper (anti-rabbit Ig HRP, Fa. Amersham Bioscience) mit konjugierter Meerrettichperoxidase inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch erneutes Waschen (3x 10 min mit PBT) entfernt. Anschließend wurde auf die Membranen für 1 min das ECL-Substrat der Fa. Amersham Bioscience (ECL^{TM} detection reagents RPN 3004) gegeben, das durch die Meerettichperoxidase eine chemoluminiszente Umsetzung erfährt, die durch Auflegen eines Fotofilms (Hyperfilm, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) detektiert werden kann.

5.9 Herstellung von polyklonalen Peptidantikörpern gegen Hyβcat und HyCadh

5.9.1 Auswahl von Peptidsequenzen, Peptidsynthese, Immunisierung und Aufreinigung der Seren

Anhand der Aminosäuresequenzen von Hyβcat und HyCadh wurden Proteinepitopanalysen durchgeführt, die mit den Algorithmen der von Parker et al. (1986) veröffentlichten Methode die Oberflächenprofile der Proteine erstellten. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Aminosäuren identifizieren, die im nativen Protein besonders exponiert und für die Peptidantikörper am besten zugänglich erscheinen. Unter Berücksichtigung einer möglichst großen Zahl geladener Aminosäuren und unter Vermeidung von N-Glykosylierungsstellen wurden schließlich für die Synthese der Peptide folgende Aminosäuresequenzen ausgewählt: Für das Hyβcat die Sequenz NH_2-AAPTVKGYDDDEVASHH-$CONH_2$ (β3/3), die im N-terminalen Ende des Moleküls den Aminosäuren 106-120 entspricht sowie die Sequenz NH_2-YQDIQRRGPGAQNMQD-$CONH_2$ (β12/3), die den Aminosäuren 603-618 im zehnten armadillo-repeat des Moleküls entspricht. Für das HyCadh wurde die Sequenz NH_2-VTRNQQDQQENRFSNQ-$CONH_2$ gewählt, die im cytoplasmatischen Abschnitt des Moleküls den Aminosäuren 4372-4388 entspricht, die im wenig konservierten Bereich zwischen den Bindungs-domänen für β- und δ-Catenin liegt. Die Synthese der Peptide, die Immunisierung von jeweils 3 Kaninchen mit den Peptiden sowie die anschließende Gewinnung der Seren am 160. Immunsierungstag und Aufreinigung der mo-

nospezifischen IgG-Fraktionen über Antigen-gekoppelte Sepharosesäulen wurden von der Firma Dr. J. Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt.

5.9.2 Test der Seren im Westernblot und Kompetitionstest

Um die Sensivität der Seren zu testen wurde auf eine Nylonmembran jeweils eine Verdünnungsreihe des für die Immunisierung verwendeten Peptids (in Wasser 50 µg, 5 µg, 0,5 µg und 0,05 µg) aufgetragen. Die getrocknete Membran wurde 3x 10 min in PBT gewaschen, eine Stunde mit 5% Magermilchpulver in PBT blockiert und über Nacht mit den Antiseren in einer Ver-dünnung von 1:4000 (in PBS mit 0,5 % Magermilchpulver und 0,02% Natriumazid) bei 4°C inkubiert. Die weitere Detektion mit dem sekundären Anti-Kaninchen-Anti-körper und dem ECL-Substrat erfolgte wie oben beschrieben.
Für alle weiteren Western-Analysen wurden die drei Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 (in PBS mit 0,02% Natriumazid) verwendet. Um die Spezifität der Seren für die Peptidsequenzen zu testen, wurden sie in einer Endkonzentration von 1:2000 (in PBS mit 0,02% Natriumazid) mit dem jeweiligen, für die Immunisierung verwendeten synthetischen Peptid (Endkonzentration 25µg/ ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese präinkubierten Seren wurden auf die Westernblots von *Hydra*-Zellextrakten gegeben (über Nacht, 4°C) und wie oben beschrieben mit einem anti-Kaninchen-HRP-Sekundärantikörper und dem ECL-System detektiert. Die Blots wurden anschließend 3x10 min mit PBT gewaschen und zur Kontrolle mit den nicht präinkubierten Seren (Endkonzentration 1:2000) detektiert.

5.9.3 Zelltypwestern

Von den einzelnen Zelltypfraktionen der Elutriation wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des RCDC-Kit der Fa. Biorad durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit einer Verdünnungsreihe von Rinderserum-Albumin (BSA) und von *Hydra*-Extrakt eine Eichkurve erstellt. Auf ein 5%-Acryamidgel wurden der Extrakt einer *Hydra* und gleichgroße Proteinmengen der einzelnen Elutriationsfraktionen

aufgetragen. Gelelektrophorese, Westernblot und Detektion mit dem HyCadh-Antikörper (1:2000) erfolgten wie in 2.8 und 2.9.2 beschrieben.

5.9.4 Immuncytochemie

Für Antikörperfärbungen im intakten Gewebe wurden die Polypen oder Aggregate zunächst 2 min mit Urethan (2% in Hydramedium) relaxiert. Als Fixativ wurde für die Hyβcat-Antikörper Lavdovsky (50% Ethanol, 10% Formaldehyd, 4% Essigsäure, 36% H_20), für den HyCadh-Antikörper 0,5% Paraformaldehyd in 87,5% Methanol gewählt. Die Fixierung erfolgte bei 4°C über Nacht. Die fixierten Tiere wurden 3x10 min mit PBT (PBS mit 0,1% Tween) gewaschen und mit den Antikörpern (Hyβcat-Antikörper β3/3 und β12/3: 1:10 bzw. HyCadh-Antikörper: 1:1000 verdünnt in PBT mit 0,2% Natriumazid) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 3x10min Waschen mit PBT wurden die Tiere mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (ALEXA Fluor 568 goat-anti-rabbit IgG, Fa. Molecular Probes, 1:200 verdünnt in PBT) für 4 Std im Dunkeln inkubiert. Bei einigen Tieren wurde eine Doppelfärbung mit dem Cadherin-Antikörper und dem monoklonalen Maus-Antikörper Nerv1, der spezifische Nervenzelltypen von *Hydra* erkennt, durchgeführt. Mit 0,5% Paraformaldehyd (in 87,5% Methanol) fixierte Tiere wurden mit einem Gemisch aus Nerv1 (unverdünnt) und Cadherin-Ak (1:500 verdünnt) inkubiert, als Sekundärantikörper wurden ALEXA Fluor 488 goat-anti-mouse IgG und ALEXA Fluor 568 goat-anti-rabbit IgG (Fa. Molecular Probes) verwendet. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch nochmaliges Waschen (3x10 min) mit PBT entfernt. Anschließend wurden die Tiere in PBT/ Glycerin (1:9) überführt und auf Objektträger montiert.

5.10 **Mikroskopie und Fotografie**

Die visuelle Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit einem Axioskop II Mikroskop der Fa. Zeiss mit Fluoreszenzlampe (Atto Arc 2, Fa. Zeiss) und einer digitalen SPOT Kamera (Fa. Diagnostic Instruments Inc.), gesteuert durch die Software MetaMorph (Version 3,6; Fa. Universal Imaging Corp.). Für die Auswertung der immuncytoche-

mischen Analysen wurde auch mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) mit zugehöriger Software gearbeitet.

6 Literatur

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. und Kemler, R. (1997). β-catenin is a target for ubiquitine-proteasome pathway. EMBO J. 16 (13): 3797- 3804

Anastasiadis, P.Z. und Reynolds, A.B. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. J Cell Sci 113: 1319-1334

Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T.und Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. Genes Dev 12(16): 2610-22

Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich V.L.Jr. und Robakis, N.K. (2002). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. Proc Nat Acdad Sci 98(5): 2381-2386

Behrens, J., Jerchow, B.-A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D. und Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an Axin homolog, Conductin, with β-Catenin, APC, GSK3β. Science 280: 596- 599

Ben Ze´ev, A. und Geiger, B. (1998). Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer.Curr Opin Cell Biol 10(5): 629-39.

Ben Ze´ev, A., Shtutman, M. und Zhurinsky, J. (2000). The integration of cell adhesion with gene expression: The role of β-catenin. Exp Cell Res 261: 75-82

Bhanot, P., Brink, M., Harryman Samos, C., Hsieh, J.-C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J. und Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. Nature 382: 225-230

Bienz, M. (1999). APC: the plot thickens. Curr Opin Genet Dev 9(5): 595-603

Bienz, M.und Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. Cell. 103(2): 311-20

Birchmeier, W. und Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta 1198(1): 11-26

Bonne, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P. und van Roy, F. (1999). Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. J Cell Sci 112: 2262-2276

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. und Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar cell polarity and wingless signaling. Cell 94: 109-118

Cadigan, K.M. und Nusse, R. (1997). Wnt signaling. A common theme in animal development. Gen Dev 11: 3286-3305

Christofori,G. und Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. Trends Biochem Sci 24(2): 73-6

Coates, J.C. und Harwood, A. J. (2001). Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. J Cell Sci 114: 4349-4358

Cox, R.T., Pai, L.M., Miller, J.R., Orsulic, S., Stein, J., McCormick, C.A., Audeh, Y., Wang, W., Moon, R.T. und Peifer M.(1999). Membrane-tethered Drosophila Armadillo cannot transduce Wingless signal on its own. Development 126(6): 1327-35

Daniel, J.M. und Reynolds, A.B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domin zinc finger transcription factor. Mol Cell Biol 19: 3614-3623

David, C.N. (1973). A quantitative method for maceration of *Hydra* tissue. Roux Arch Dev Biol 171: 259-268

De Strooper, B. und Annaert, W. (2001). Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. J Cell Biol 152(4): F17-20

Dübel, S., Hoffmeister, S.A.H. und Schaller, H.C. (1987). Differentiation pathways of ectodermal epithelial cells in *hydra*. Differentiation 35: 181-189

Eastman, Q. und Grosschedl, R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. Curr Opin Cell Biol 11(2): 233-40

Fagotto, F. und Gumbiner, B.M. (1994). β-catenin localization during *Xenopus* embryogenesis: accumulation at tissue and somite boundaries. Development 120: 3667-3679

Fagotto, F. und Gumbiner, B.M. (1996). Cell contact dependent signaling. Dev Biol 180: 445-454

Fanning, A.S. und Anderson, J.M. (1999) PDZ domains: fundamental building blocks in organization of protein complexes at the plasma membrane. J Clin Invest 103: 767-772

Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P. und Gumbiner BM. (1995). Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of beta-catenin: evidence for intracellular signaling. J Cell Biol 128(5): 959-68

Giannini, A.L., Vivanco, M.d.M und Kypta, R.M. (2000). α-catenin inhibits β-catenin signaling by preventing formation of a β-catenin-T-cell factor-DANN complex. J Biol Chem 275: 21883-21888

Gierer, A., Berking, S., Bode, H.R., David, C.N., Flick, K.M., Hausmann, G., Schaller, H. und Trenkner, E. (1972). Regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. Nature New Biol 239: 98-101

Gierer, A. und Meinhardt, H. (1972). A theory of biological pattern formation. Kybernetik 12: 30-39

Godt, D. und Tepass, U. (1998). Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. Nature 395: 387-391

Gottardi, C.J., Wong, E. und Gumbiner, B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. J Cell Biol 153(5): 1049-60

Gottardi, C.J. und Gumbiner, B.M. (2001). Adhesion signaling: How β-Catenin interacts with ist partners. Current Biology 11: R792-R794

Graham, T.A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D. und Xu, W. (2000). Crystal structure of a β-catenin/Tcf complex. Cell 103: 885-896

Graner, F. und Glacier, J.A. (1992) Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. Phys Rev Lett 69: 2013-2016

Greber, M.J., David, C.N. und Holstein, T.W. (1992). A quantitative method for separation of living *Hydra* cells. Roux´s Arch Dev Biol 201: 296-300

Grimson, M.J., Coates, J.C., Reynolds, J.P., Shipman, M., Blanton, R.L. und Harwood, A.J. (2000). Adherens junction and β-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. Nature 408: 727-731

Guger, K.A. und Gumbiner, B.M. (1995). beta-Catenin has Wnt-like activity and mimics the Nieuwkoop signaling center in Xenopus dorsal-ventral patterning. Dev Biol 172(1):115-25

Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A. und Reeve AE. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature 392(6674): 402-5

Hart, M.J., de los Santos, R., Albert, I.N., Rubinfeld, B. und Polakis, P. (1998). Down-regulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. Curr Biol 8(10): 573-81.

Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kinter, C., Noro, C.Y. und Wylie, C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of β-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. Cell 79: 791-803

Henderson, B.R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. Nat Cell Biol 2(9): 653-60

Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F. und Kemler, R. (2000). The p300/CBP acetytransferase function as transcriptional coactivators of β-catenin in vertebrates

Hecht, A. und Kemler, R. (2000). Curbing the nuclear activities of β-catenin. EMBO reports 1(1): 24-28

Hobmayer, E., Holstein, T.W. und David, C.N. (1990). Tentacle morphogenesis in hydra. I. The role of head activator. Development 109: 887-895

Hobmayer, E., Holstein, T.W. und David, C.N. (1990). Tentacle morphogenesis in hydra. II. Formation of a complex between a sensory nerve cell and a battery cell. Development 109: 897-904

Hobmayer, E., Hatta, M., Fischer, R., Fujisawa, T., Holstein, T.W. und SugiYama, T. (1996). Identification of a *Hydra* homologue of the *β-catenin/plakoglobin/armadillo* gene family. Gene 172: 155-159

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

Hobmayer, B., Snyder, P., Alt, D., Happel, C.M. und Holstein, T.W. (2001). Quantitative analysis of epithelial cell aggregation in the simple metazoen *Hydra* reveals a switch from homotypic to heterotypic cell interactions

Holstein, T.W., Hobmayer, E. und Technau, U. (2003). Cnidrians: An evolutionary conserved model system for regeneration? Dev Dynamics 226: accepted

Huber, A.H., Nelson, W.J. und Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo-repeat region of beta-catenin. Cell 90: 871-882

Huber, A.H. und Weis, W.I. (2001). The structure of the β-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by β–catenin

Imamura; H., Takaishi, K., Nakano, K., Kodama, A., Oishi, H., Shiozaki, H., Monden, M., Sasaki, T. und Takai, Y. (1998). Rho and rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesion in MDCK cell. Mol Biol Cell 9: 2561-2575

Jones, D.T., Taylor, W.R. und Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comp Appl Biosci 8: 275-282

Julius, M.A., Schelbert, B., Hsu, W., Fitzpatrick, E., Jho, E., Fagotto, F., Costantini, F.und Kitajewski, J. (2000). Domains of axin and disheveled required for interaction and function in wnt signaling. Biochem Biophys Res Commun 276(3): 1162-9

Kang, D.E., Soriano, S., Xia, X., Eberhart, C.G., De Strooper, B., Zheng, H. und Koo, E.H. (2002). Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. Cell 110(6): 751-62

Kostron, B., Cramer von Laue, C., Kuhn, K., Hatta, M., Holstein, T.W. und Hobmayer, B.: Cadherin-catenin interaction in Hydra. Eingereichte Arbeit

Li, L., Yuan, H., Weaver, C.D., Mao, J., Farr, G.H., Sussman, D.J., Jonkers, J., Kimelman, D. und Wu, D. (1999). Axin and FRAT1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. EMBO J. 18 (15): 4233-4240

Liu, T., DeCostanzo, A.J., Liu, X., Wang, H., Hallagan, S., Moon, R.T. und Malbon, C.C. (2001). G Protein signaling from activated rat frizzled-1 to the β-catenin-LEF-Tcf pathway. Science 292: 1718-1722

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. und He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell 108(6): 837-47

Lu, Q., Paredes, M., Medina, M., Zhou, J., Cavallo, R., Peifer, M., Orecchio, L. und Kosik, K.S. (1999). Delta-catenin, an adhesive junction-associated protein, which promotes cell scattering. J Cell Biol 144: 519-532

MacWilliams, H.K. (1983). *Hydra* transplantation phenomena and the mechanism of *Hydra* head regeneration II. Properties of the head activation. Dev Biol 96: 239-257

Malbon, C.C., Wang, H.-Y., und Moon, R.T. (2001). Wnt signaling and heterotrmeric G-proteins: Strange bedfellows or a classic romance? Biochem Biophys Res Communic 287: 589-593

Miller, J.R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R.L. und Moon RT. (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in Xenopus embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation.J Cell Biol 146(2): 427-37

Minobe, S., Fei, K., Yan, L., Sarras, M.P. und Werle, M.J. (2000). Identification and characterization of the epithelial polarity receptor „Frizzled“ in *Hydra vulgaris*. Dev Gen Evol 210: 258-262

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V. Roose, J., Destree, o. und Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates β-catenin induced axis formation in *Xenopus* embryos. Cell 86: 391-399

Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R. und White, R.L. (2000). APC-mediated down-regulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. EMBO Rep 1(6): 519-23

Neumann, C. und Cohen, S.M. (1997). Morphogens and pattern formation. BioEssays 19(8): 721-729

Nüsslein-Vollhard, C. und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. Nature 275: 795-801

Ohkubo, T. und Ozawa, M. (1999). P120ctn binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. J Biol Chem 274(30): 21409-21415

Peifer, M., Berg, S. und Reynolds, A.B. (1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. Cell 76(5): 789-91

Peifer, M. und Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. Science 287(5458):1606-9

Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb. H. und Christofori G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature 392(6672):190-3

Polakis, P. (2001). More than one way to skin a catenin. Cell 105: 563-566

Provost, E. und Rimm, D.L. (1999). Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion-complex. Curr Opin Cell Biol 11: 567-572

Rocheleau, C.E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.-H., Ali., M., Priess, J.R. und Mello, C.C. (1997). Wnt signaling and a APC-related gene specify endoderm in early *C.elegans* embryos. Cell 90: 707-716

Rosin-Arbesfeld, R. Townsley, F.M. und Bienz, M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. Nature 406(6799): 1009-12

Sadot, E., Simcha, I., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. und Geiger, B. (1998). Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives.Proc Natl Acad Sci 95(26): 15339-44.

Sakamoto, I., Kishida, S., Fukui, A., Kishida, M., Yamamoto, H., Hino, S., Michiue, T., Takada, S., Asashima, M. und Kikuchi, A. (2000). A novel beta-catenin-binding protein inhibits beta-catenin-dependent Tcf activation and axis formation. J Biol Chem 275(42): 32871-8.

Salic, A., Lee, E., Mayer, L. und Kirschner, M.W. (2000). Control of β-Catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the Wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. Moll Cell 5: 523-532

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology 24:104-8

Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kühl, M., Schaeffer, H.-J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M. und Birchmeier, W. (2002). The anykrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Ie to the b-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. Genes Dev 16(16). 2073-2084

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G. und Holman, K. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375(6534): 754-60

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. und Ben-Ze'ev A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci 96(10): 5522-7

Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M. und von Haeseler, A. (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. Bioinformatics 18(3):502-4.

Sugiyama, T. und Fujisawa, T. (1977). Genetic analysis of developmental mechanism in *Hydra* III. Characterization of a regeneration-deficient strain. J Embryol Exp Morph 42: 65-77

Sugiyama, T. und Fujisawa, T. (1978). Genetic analysis of developmental mechanism in *Hydra* III. Isolation and Characterization of an interstitial cell-deficient strain. J Cell Sci 29: 35-52

Steinberg, M.S. (1970). Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among a population of embryonic cells. J Exp Zool 173: 395-434

Steinberg, M.S. und Takeichi, M. (1994). Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. Proc Natl Acad Sci 91: 206-209

Sun, T.Q., Lu, B., Feng, J.J., Reinhard, C., Jan, Y.N., Fantl, W.J., Williams, L.T. (2001). PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. Nat Cell Biol 3(7): 628-636

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H. und Akiyama, T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein.Genes Dev 14 (14):1741-1749.

Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. Curr Opin Cell Biol 5(5):806-11

Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G.R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley, G.W., Benson, D.L. und Colman, D.R. (2000). Molecular modification of N-Cadherin in response to synaptic activity. Neuron 25: 93-107

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

Technau, U. und Holstein, T.W. (1992). Cell sorting during the regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. Dev Biol 151: 117-127

Teleman, A., Stringini, M. und Cohen, S.M. (2001). Shaping morphogens gradient. Cell 105: 559-562

Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. und Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. Nature Rev Mol Cell Biol 1: 91-100

Thorpe, C.J., Schlesinger, A., Carter, J.C., Bowerman, B. (1997). Wnt signaling polarizes an early *C.elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. Cell 90: 695-705

Townsley, F.M. und Bienz, M. (2000). Actin-dependent membrane association of a Drosophila epithelial APC protein and its effect on junctional Armadillo. Curr Biol 10(21): 1339-48

van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M. und Clevers, H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of segment polarity gene dTCF. Cell 88: 789-799

van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K. und van Roy, F. (1999). Nuclear localization of the p120ctn armadillo.like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. Proc Natl Acad Sci 96: 7980-7985

Vleminckx, K., Wong, E., Guger, K., Rubinfeld, B., Polakis, P. und Gumbiner, B.M. (1997). Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein has signaling activity in Xenopus laevis embryos resulting in the induction of an ectopic dorsoanterior axis. J Cell Biol 136(2): 411-20

von Kries, J.P., Winbeck, G. Asbrand, C., Schwarz-Romond, T., Sochnikova, N., Dell´Oro, A., Behrens, J. und Birchmeier, W. (2000). Hot spots in β-catenin for interaction with LEF-1, conductin and APC. Nature Struct Biol 7(9): 800-807

Vos, C.B., Cleton-Jansen; A.M., Berx, G., de Leeuw, W.J., ter Haar, W.T., van Roy, F., Cornelisse, C.J., Peters, J.L. und van de Vijver, M.J. (1997). E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis.Br J Cancer 76(9):1131-3

Willert, K., Logan, C.Y., Arora, A., Fish, M. und Nusse, R. (1999). A Drosophila Axin homolog, Daxin, inhibits Wnt signaling.Development. 1999 Sep;126(18):4165-73.

Wodarz, A. und Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol 14:59-88

Yanagawa,S., Lee, J.S., Haruna, T., Oda, H., Uemura, T., Takeichi, M. und Ishimoto, A. (1997). Accumulation of Armadillo induced by Wingless, Dishevelled, and dominant-negative Zeste-White 3 leads to elevated DE-cadherin in Drosophila clone 8 wing disc cells. J Biol Chem 272(40):25243-51

Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J. und Moon, R.T. (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. Curr Biol 6: 1302-1306

Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St George-Hyslop, P.H. und Fraser, P.E. (1998).

The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. J Biol Chem 273(26):16470-5

Yu, X., Waltzer, L. und Bienz, M. (1999). A new Drosophila APC homologue associated with adhesive zones of epithelial cells. Nat Cell Biol 1(3):144-51.

Zhurinsky, J.; Shtutman, M. und Ben Ze´ev,A. (2000). Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. Mol Cell Biol 20(12):4238-52

7 Anhang

7.1 Hyδcat

Abb. 5.1: Gesamte Nukleotid (nc)- und Aminosäure (aa)-Sequenz des Hyδcat mit dem kurzen untranslatierten Bereich. Der konservierte Bereich der *armadillo-repeats* ist gekennzeichnet.

```
nc          TAATGAGTAAAAAAAAGAATGTATGGAGGTACTCAGGTTGCTCGTGGTAACAGTCG
aa           *  *  V  K  K  R  M  Y  G  G  T  Q  V  A  R  G  N  S  R

CCATAACCCATTTAATACACACAAGAAATCGGGTTCTTTGAGTCAAGTTTATAATGGTTTTCAACAAAGCAGT
 H  N  P  F  N  T  H  K  K  S  G  S  L  S  Q  V  Y  N  G  F  Q  Q  S  S

GAGTTTAGCAGTAGAGATGAAAAGTATGATCCACGTTATTCTTCATTAAAACGCAATGGAAGTTTGTTGGCAA
 E  F  S  S  R  D  E  K  Y  D  P  R  Y  S  S  L  K  R  N  G  S  L  L  A

GACAAAACCAAAGTTCATTTTTTAATCCTATGGGAAACAATTATGATATTGACAATTATTCAGATAATGGTAG
R  Q  N  Q  S  S  F  F  N  P  M  G  N  N  Y  D  I  D  N  Y  S  D  N  G  R

ACCTTCATCAAATATAGATTATGGTCGCCCATCTTCAACCATGGATTATAATCGTCCACCTTCAACCATGGAT
 P  S  S  N  I  D  Y  G  R  P  S  S  T  M  D  Y  N  R  P  P  S  T  M  D

TATGGTCGTCCATCTTCAAGACAAAGTTCATCAGCATCACATCAAAGTTCAGTATCTAGAAATAATTCTATAT
 Y  G  R  P  S  S  R  Q  S  S  S  A  S  H  Q  S  S  V  S  R  N  N  S  I

CACAAAARAGATCAAATTCTCGACAAAGTAACACAGTGCATAGTGGAGAATATTCTCAACCATATTTTGAAAA
S  Q  K  R  S  N  S  R  Q  S  N  T  V  H  S  G  E  Y  S  Q  P  Y  F  E  N

TAATCCAATAAATGCAAGTAGTTCCAGTCAACAAATACTTTCAAATACTTCTGAAGCTATTGTAGAAGAAGAA
 N  P  I  N  A  S  S  S  S  Q  Q  I  L  S  N  T  S  E  A  I  V  E  E  E

AGAAATAATGCTGATGGTTCAACTGTTTTAGTCAGACGAAAAATTACTACTGTTGTTTCTGATAATGATGCCT
 R  N  N  A  D  G  S  T  V  L  V  R  R  K  I  T  T  V  V  S  D  N  D  A

CCAAAGTTGAATTTCATATAAGCCCTGCAGCAGAGACAATTTTTCTACCTCCAAGAACAAGTCGAAATAATTC
S  K  V  E  F  H  I  S  P  A  A  E  T  I  F  L  P  P  R  T  S  R  N  N  S

TTTTGATTATGTCAAAATGTCTTCAGATGAAGGAAGTACAAATCAACTACCATACAGGGATAATTTTAACAAC
 F  D  Y  V  K  M  S  S  D  E  G  S  T  N  Q  L  P  Y  R  D  N  F  N  N

GACAAAGATGATAGAAATTACATCAAAGAAGACAGAAATTATGATCGAGATAATAGAAGTGACAGAGATGATA
 D  K  D  D  R  N  Y  I  K  E  D  R  N  Y  D  R  D  N  R  S  D  R  D  D

GAAATTATGACGGAGATAATAGAAATTACAACAGAAATGATAGAAATTATGACAGAGATGACAGAAATTATGA
R  N  Y  D  G  D  N  R  N  Y  N  R  N  D  R  N  Y  D  R  D  D  R  N  Y  D

CAGAGGTAATAGAAATTATGACAGAGATAATAGAAATAACGAAAGAGATGATAGAAATAATGACAGAGATGAT
 R  G  N  R  N  Y  D  R  D  N  R  N  N  E  R  D  D  R  N  N  D  R  D  D

AGAAATTATGACAGAGATGATAGAAATTATGACAGGGATGATAGAAATTATGGCAGAGATGATAGAAATTATG
 R  N  Y  D  R  D  D  R  N  Y  D  R  D  D  R  N  Y  G  R  D  D  R  N  Y

ACAGAGATGATAGAAATTATGACAGAGATGATAGAAATTATGACAGAGATGACAGAAATAAGAGAAATTCATA
D  R  D  D  R  N  Y  D  R  D  D  R  N  Y  D  R  D  D  R  N  K  R  N  S  Y

TGGGAGTTCTGCAAGAGTCAATGACAAAGTTTACTCAAAAGAATTGAACAATCAAGTCAATGAAAATCAATCA
 G  S  S  A  R  V  N  D  K  V  Y  S  K  E  L  N  N  Q  V  N  E  N  Q  S
```

```
AACAATGATATTAGACAGAACAGTCAAAATTATTTTGAAAAGTCAGAAGCAGTTAAAAATCAGGCAAAGTATA
 N  N  D  I  R  Q  N  S  Q  N  Y  F  E  K  S  E  A  V  K  N  Q  A  K  Y

GCAATGCAGAAAACTATTCAAGCAACTATGCAGCCAATGAAGAGTATAGTTCTTTAAAAAAACAAAGTATTGT
S  N  A  E  N  Y  S  S  N  Y  A  A  N  E  E  Y  S  S  L  K  K  Q  S  I  V

TCATGATAGTGAATTAAGAAGATTTAGCTCCAATAATGAAAGTTTATCTCAAAACTTATATTCAGATAACAGA
 H  D  S  E  L  R  R  F  S  S  N  N  E  S  L  S  Q  N  L  Y  S  D  N  R

AAATATCTTAGTAATACAAATATAAATATTATTAACTCAAATCATGTAAACAATGCTAATAATTATGGGAGTT
 K  Y  L  S  N  T  N  I  N  I  I  N  S  N  H  V  N  N  A  N  N  Y  G  S

ATGCAAATAATATTGGTTTTGGCAATAACAATAGTAACATTCTTTCTAATAGTGCTAGCAATTCTAATATTAA
Y  A  N  N  I  G  F  G  N  N  N  S  N  I  L  S  N  S  A  S  N  S  N  I  N

TGCCAATAAAGTTAATTCAAGTAATCAGCAGATTTTTAACCATATTGCTTCAAGTAACCAACAGATTTTTAAT
 A  N  K  V  N  S  S  N  Q  Q  I  F  N  H  I  A  S  S  N  Q  Q  I  F  N

AACAAAGAGAACATTCACAATTCTAACTTAACAATTAACAATCAGTTTTCCCATTCAAATAGAGACTTCAATC
 N  K  E  N  I  H  N  S  N  L  T  I  N  N  Q  F  S  H  S  N  R  D  F  N
                                                      armadillo-repeats
AAATGGAGAATTCAGCCAGAATTAATTATCATGAAACAAAATATAATGAAGAAAGCATTAATCTCCTTGATCT
Q  M  E  N  S  A  R  I  N  Y  H  E  T  K  Y  N  E  E  S  I  N  L  L  D  L

TCTCAATTTTTTGAAGGCAAATGACCAAAGTTTAAAATCACAGGCTGCAGGATATTTGATGCATCTTTCTTAC
 L  N  F  L  K  A  N  D  Q  S  L  K  S  Q  A  A  G  Y  L  M  H  L  S  Y

AAGGACGAAGAGATCAAAAAAAGAATACGTGAGCTCGATATTATTCCTATGTTAGTAAAACTACTTGCTGATG
 K  D  E  E  I  K  K  R  I  R  E  L  D  I  I  P  M  L  V  K  L  L  A  D

ACGATGAAGATTGCTACCGAAATGCTGCTGGTGCTCTAAAGAACCTGTCATATGGTAGATTTTTAGATGATAA
D  D  E  D  C  Y  R  N  A  A  G  A  L  K  N  L  S  Y  G  R  F  L  D  D  N

TAAGTTAGCTATTCAAAAATGTGGAGGTGTTATTGCCTGTTCTAAACTTTTGTACAAAACATCGTCAATTGAT
 K  L  A  I  Q  K  C  G  G  V  I  A  C  S  K  L  L  Y  K  T  S  S  I  D

GTAAGGGAGCATATAACAGGCATCCTGTATAACATTAGTTCTGTGAAGTCAATCAGCATTGAGATTTTGAAAG
 V  R  E  H  I  T  G  I  L  Y  N  I  S  S  V  K  S  I  S  I  E  I  L  K

AATGTTTAGAAGTTGTTTCGATGCTTGTCATAATACCTCTATCTGGTTGGGAACGAGAATATGCAACTATTGG
E  C  L  E  V  V  S  M  L  V  I  I  P  L  S  G  W  E  R  E  Y  A  T  I  G

AAAGAAACCAAGAAATGTGATATGGTCTGTTTTACTTAGAAATTCTACAGGTGTTTTAAGAAATGTCTCATCT
 K  K  P  R  N  V  I  W  S  V  L  L  R  N  S  T  G  V  L  R  N  V  S  S

GCTGGGCGATCTGCTAGAGTTAAAATTCGATTAATTGATGGTTTAATAGATTCATTGATTTGGATCTCCGTGC
 A  G  R  S  A  R  V  K  I  R  L  I  D  G  L  I  D  S  L  I  W  I  S  V

TGCGATTGAGCAAAATAAACAGGATCCCAGAGAGTGATATTATTAGCAATAAGATTGTTGAAAACATTATGTG
L  R  L  S  K  I  N  R  I  P  E  S  D  I  I  S  N  K  I  V  E  N  I  M  C

TGTTTTGCGTAATCTTTCATATAACATTGATAAGGAAGTTGACCGCCTCAGATATTTAGATGCATTAAAGATT
 V  L  R  N  L  S  Y  N  I  D  K  E  V  D  R  L  R  Y  L  D  A  L  K  I

TCTGTTAAAGATGGTGGAAATTTTTCTAATAATACTTTATCTCGTGATACAACATTACCTTACGATGCAACAT
 S  V  K  D  G  G  N  F  S  N  N  T  L  S  R  D  T  T  L  P  Y  D  A  T

TACCTCGTGATGCAACATTAGATAACACTCAAATTCTTGATAAAAAAGAGTCAAGTATTACCAGCAAAGGAAA
L  P  R  D  A  T  L  D  N  T  Q  I  L  D  K  K  E  S  S  I  T  S  K  G  N

CACATCTGAGAAAGGTTTTTTGGGTATGAAAAAAAAACCCTTTGGTGGTAAAATTCAAGGAAAAATATCTGAC
 T  S  E  K  G  F  L  G  M  K  K  K  P  F  G  G  K  I  Q  G  K  I  S  D
```

```
TTAGCGAGAGATGAAAATCCTAAACCACCTCGTGAGAAGTGGAATTATCTTATTCCTGTACAAGAAAATCAGC
 L  A  R  D  E  N  P  K  P  P  R  E  K  W  N  Y  L  I  P  V  Q  E  H  Q

CTGTCACAAATGGTGTTCAGTTACTTTGGCAGCAAGAGACAGTTACATACTATATATTGATCCTAAAGAGTAG
P  V  T  N  G  V  Q  L  L  W  Q  Q  E  T  V  T  Y  Y  I  L  I  L  K  S  S

TATCAATCCTGTAACGTTGGAAGCTGCTGCTGCAGCTATTCACAATTTATGTGCTGGAGATTGGAATTGGTCT
  I  N  P  V  T  L  E  A  A  A  A  A  I  H  N  L  C  A  G  D  W  N  W  S

GCATTGCTGAGGATACATGTAAGGTTGCAAAAGGGTCTCCCACCAATTGGTGACCTTTTGACAGTTGATCAAG
 A  L  L  R  I  H  V  R  L  Q  K  G  L  P  P  I  G  D  L  L  T  V  D  Q


AGTATGTTGTTCGTGCTGTTGCTCATGCATTAAGAAATTTAGCTATAGATTCTAGAAATAAATGGTCAATAGG
E  Y  V  V  R  A  V  A  H  A  L  R  N  L  A  I  D  S  R  N  K  W  S  I  G

AAAATATATCCATAGAAATCTTTTATCAGTGCTTCCCCCTATAACTGCTCTTCAAAGAGATATAAAACCATCT
  K  Y  I  H  R  N  L  L  S  V  L  P  P  I  T  A  L  Q  R  D  I  K  P  S

GAGTATACAATTTGTGCTATTTTGTCCACATTACAAATACTTGTATGCAATGATCAAACAAATTCAAGGTTTA
 E  Y  T  I  C  A  I  L  S  T  L  Q  I  L  V  C  N  D  Q  T  N  S  R  F

TAAAAAATGAAGGAGGCATTGAAAAGTTAGTGGCTTTGACAAAAGAACCTGTAGATGGAATAATGCCACAAGA
I  K  N  E  G  G  I  E  K  L  V  A  L  T  K  E  P  V  D  G  I  M  P  Q  E
                                          armadillo-repeats
GTGCCTTCGAGTGTATTCAAAAAAAGTTATACTGGAAGCCAACAGGGTTTTGCTATACATGTGGGATTTCAAA
  C  L  R  V  Y  S  K  K  V  I  L  E  A  N  R  V  L  L  Y  M  W  D  F  K

GATTGTCGTGAGTCGATCAAACAACAACCTTGGTCTCACTCCAAAGCCGAAGAGGCTGAAAAAAATTATAAAA
 D  C  R  E  S  I  K  Q  Q  P  W  S  H  S  K  A  E  E  A  E  K  N  Y  K

ATCTAGCTAAAGATATGGATGATAAAGATAGAGATGTTTATGCTGAAATGGAGTCTCAGGACTCAGTAAAATT
N  L  A  K  D  M  D  D  K  D  R  D  V  Y  A  E  M  E  S  Q  D  S  V  K  L

AGAGTCCGATCCACGACGTTACCTAATTTCCGTTGATAACAACTACTCAAGTGTAGAAAATGAATCTTTGTAC
  E  S  D  P  R  R  Y  L  I  S  V  D  N  N  Y  S  S  V  E  N  E  S  L  Y

AATGGATCTCAAAATTCTAATAAACAACCAATAGGTTATGGTGATGTGCCTTTTAATGAAGTTGGTATGCAAA
 N  G  S  Q  N  S  N  K  Q  P  I  G  Y  G  D  V  P  F  N  E  V  G  M  Q


AGCCTTTGCTTCACGGCAAAATTTCCAGTAAAAAATGTACAAAAGAGCTGCTAAAAATAAAAAAAAATAATTT
K  P  L  L  H  G  K  I  S  S  K  K  C  T  K  E  L  L  K  I  K  K  N  N  F

TACATGTTTTATAGATTTACATATTATTATAATGTAA  3807
  T  C  F  I  D  L  H  I  I  I  M  *   1269
```

7.2 **Abkürzungen**

7.2.1 Gene, Proteine und Proteindomänen

Aar	Aardvark, β-Catenin Homolog von *Dictyostelium*
Arm	Armadillo, β-Catenin Homolog in *Drosophila*
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BAR1	β-Catenin Homolog in *C. elegans*
Bra	Brachyury
CBD	Catenin Bindungs Domäne
CKIα/ε	Casein Kinase Iα oder ε
DIX	Dishevelled/Axin-Domäne
Dlg	Disc large
Dsh	Dishevelled
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HMP2	β-Catenin Homolog in *C. elegans*
ICAT	Inhibitor of β-Catenin
JMD	juxta membrane domain
LEF	lymphoid enhancer factor
Tcf	T-cell factor
Wg	wingless
WRM1	β-Catenin Homolog in *C. elegans*
Wnt	Wingless/int-1
ZO1/2	zonula occludens 1 und 2

7.2.2 Allgemeine Abkürzungen, Einheiten und Chemikalien

aa	Aminosäuren
bp	Basenpaare
cDNA	durch reverse Transkription gewonnene DNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
kb	Kilobasen
nc	Nukleotide
RNA	Ribonucleinsäure
GBS	Genbankscreen
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
THS	Two Hybrid Screen

cpm	counts per minute
min	Minuten
OD	optische Dichte
pfu	plaque forming unit
rpm	rounds per minute
RT	Zimmertemperatur
Std	Stunden
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinder Serum Albumin
CHAPS	3-(3-choloamidopropyl)diethylammonio-1propansulfonat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
LB	Luria-Bertani Medium
MAB	Maleinsäure-Puffer
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NTMT	NaCl,Tris,$MGCl_2$, Tween
NZY	NZamin
^{32}P	radioaktives Phosphor
PBS	Phosphate buffered saline
PBT	PBS+Tween
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid,Natriumsulfat-Puffer
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne andere als die angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Darmstadt, den 6.1.2003

Christoph Cramer von Laue

Lebenslauf

Christoph Cramer von Laue

Geboren am 17. Mai 1969 in Frankfurt am Main

Verheiratet, ein Sohn

1975-1979	Grundschule Falkenstein i.Ts.
1979-1988	Taunusschule Königstein i.Ts. 1988 Abschluss mit Abitur
9´1988-4´1990	Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes im Kreisverband Hochtaunus
10´1990-6´1996	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main Diplomprüfung in Zoologie, Botanik und Umweltrecht Diplomarbeit 1995/1996 bei Prof. Dr. B. Streit im Arbeitskreis für Ökologie und Evolution zum Thema: „Populationsgenetische Untersuchungenan *Lacerta agilis* unter besonderer Berücksichtigung von Isolationsfaktoren in fragmentierten Landschaften“
1´1997-11´1997	Teilnehmer am Graduiertenkolleg „Infektiologie“der Julius Maximilians Universität Würzburg
5´1998-1´2003	Doktorarbeit an der Technischen Universität Darmstadt bei Prof. Dr. Th. W. Holstein im Arbeitskreis für Zellbiologie zum Thema: „Untersuchungen zur dualen Funktion von β-Catenin im Wnt-Signalweg und der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bei *Hydra*“

Wissenschaftliche Publikationen

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

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

Kostron, B., Cramer von Laue, C., Kuhn, K., Hatta, M., Holstein, T.W. und Hobmayer, B.: Cadherin-Catenin interaction in *Hydra*. Eingereichte Arbeit

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Thomas Holstein, in dessen Arbeitsgruppe ich unter großzügigen Bedingungen diese Arbeit anfertigen konnte und der mir als kompetenter Ansprechpartner zur Hilfe stand.

Dr. Bert Hobmayer, der die Arbeit mit initiierte und betreute, konnte auch bei nicht ganz trivialen Problemen den Blick auf das Wesentliche lenken und wusste fast immer guten Rat. Dr. Uli Technau danke ich für die vielen hilfreichen Anregungen und Kommentare.

Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bin ich zu großem Dank verpflichtet. Wenn ich Einzelne hervorhebe, werde ich den Anderen nicht gerecht. Die zahlreichen praktischen Hilfen, mitunter bis spät in die Nacht und im dicken Winter, haben mir die Arbeit häufig sehr viel leichter und angenehmer gemacht. Viel wichtiger war aber meist der Gedankenaustausch und die Unterstützung wissenschaftlicher Art.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie und vor allem meiner Frau Anja. Sie haben soviel mit getragen und ertragen und haben so die Arbeit erst für mich möglich gemacht. Jetzt ist es geschafft!