Untersuchungen zur dualen Funktion von β-Catenin im Wnt-Signalweg und der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bei *Hydra*

genehmigte Dissertationsschrift
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

vorgelegt am Fachbereich für Biologie
der Technischen Universität Darmstadt (D17)
von

Christoph Cramer von Laue
aus Frankfurt am Main

Referent: Prof. Dr. Thomas W. Holstein (TU Darmstadt)
Koreferent: Prof. Dr. Paul Layer (TU Darmstadt)

Eingereicht am 7. Januar 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2003

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG 3

2 EINLEITUNG 5

2.1 β-CATENIN HAT EINE DUALE FUNKTION IN ZELLVERBINDUNGEN UND IM WNT-SIGNALWEG 6
2.2 PROTEINSTRUKTUR DES β-CATENIN-MOLEKÜLS 7
2.3 REGULATION DER CYTOPLASMATISCHEN β-CATENIN KONZENTRATION 8
2.4 DER WNT-SIGNALWEG STABILISIERT CYTOPLASMATISCHES β-CATENIN 10
2.5 DIE DUALE FUNKTION VON β-CATENIN IST EVOLUTIV VERMUTLICH SEHR ALT 12

3 ERGEBNISSE 16

3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES β-CATENINS IN EINEM WNT-SIGNALTRANSDUKTIONSWEG IN *HYDRA* 16
3.1.1 Expression von HyβCat-RNA in Aggregaten von Hydra 17
3.1.2 Expressionsmuster von HyTcf in Aggregaten 18
3.1.3 HyWnt und Hybra1 markieren in Aggregaten die Regionen der Kopfbildung 19
3.2 ANALYSEN ZUR HYβCAT-EXPRESSION MIT DEN NEUEN PEPTID-ANTIKÖRPERN 20
3.2.1 Western-Blot Analysen 21
3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von HyβCat 22
3.3 EXPRESSIONSANALYSEN VON *HYDRA*-CADHERIN 26
3.3.1 Untersuchungen zur Expression von HyCadh-RNA in Regeneraten und Aggregaten 27
3.3.2 HyCadh-Expressionsuntersuchungen an dem hitzesensitiven Stamm sf-1 28
3.4 HYCADH-ANTIKÖRPER 29
3.4.1 Rekombinant exprimiertes HyCadh 30
3.4.2 Zelltyp-Western 31
3.4.3 Immuncytochemische Analysen mit dem HyCadh-Antikörper 33
3.5 *HYDRA* δ-CATENIN 38
3.5.1 Genbank-Screen und RACE-Experimente 39
3.5.2 Homologievergleich 40
3.5.3 Untersuchungen zum Expressionsmuster von HyδCat 47
3.5.4 HyδCat-Expression in Regeneraten und Aggregaten 48
3.6 PCR-ANALYSEN AN AGGREGATEN 50

4 DISKUSSION 51

4.1 IN *HYDRA*-AGGREGATEN LASSEN SICH DIE PROZESSE DER ZELLADHÄSION UND MUSTERBILDUNG UNTERSUCHEN 51
4.2 EINE AUFREGULIERUNG VON HYβCAT IM POLYPEN BERUHT AUF SEINER FUNKTION IM WNT-SIGNALWEG 54
4.3 IM SICH ORGANISIERENDEN ZELLVERBAND SIND BEIDE FUNKTIONEN VON HYβCAT 55
4.3 VON BEDEUTUNG 55
4.4 DIE BEIDEN NEUEN HYβCAT ANTIKÖRPER DEMONSTRIEREN GEMEINSAM DIE DUALE FUNKTION DES MOLEKÜLS 57
4.5 EINSCHRÄNKUNG DER LOKALEN DETEKTION 59
4.6 *HYDRA* BESITZT EIN ORTHOLOG DER δCAT/P120/PLAKOPHILIN-FAMILIE 60
4.7 DIE KOMPONENTEN EINES ADHÄSIONSKOMPLEXES SIND IN *HYDRA* VORHANDEN 62
4.8 NEMATOCYTENREIFUNG UND VERANKERUNG 64
4.9 DER HYCADH ANTIKÖRPER ZEIGT EIN KOMPLEXES BILD DES NERVENNETZES IN *HYDRA* 65

5 MATERIAL UND METHODEN 68

5.1 TIERE 68
5.2 REGENERATION UND REAGGREGATION 68
5.3 ELIMINIERUNG VON INTERSTITIELLEN ZELLEN AUS *HYDRA MAGNIPAPILLATA* SF-1 69
5.4 KLONIERUNG DES N-UND C-TERMINALEN TEILS EINES MÖGLICHEN HYDRA–δ–CATENIN 69
5.4.1 Genbankscreen 70
5.4.2 RACE-Experimente 73
5.5 RNA-INSITU-HYBRIDISIERUNG 76

5.5.1 Herstellung der RNA-Sonden ... 76
5.5.2 Durchführung ... 77
5.6 SEMIQUANTITATIVE PCR ... 78
5.7 ELUTRIATION ... 79
5.8 PROTEINGELE UND WESTERNBLOTS ... 80
5.9 HERSTELLUNG VON POLYKLONALEN PEPTIDANTIKÖRPERN GEGEN HYβCAT UND HYCADH ... 81
5.9.1 Auswahl von Peptidsequenzen, Peptidsynthese, Immunisierung und Aufreinigung der Seren ... 81
5.9.2 Test der Seren im Westernblot und Kompetitionstest ... 82
5.9.3 Zelltypwestern ... 82
5.9.4 Immuncytochemie ... 83
5.10 MIKROSKOPIE UND FOTOGRAFIE ... 83

6 LITERATUR ... 85

7 ANHANG ... 94

7.1 HYδCAT ... 94
7.2 ABKÜRZUNGEN ... 97
7.2.1 Gene, Proteine und Proteindomänen ... 97

1 Zusammenfassung

In höheren Metazoen besitzt β-Catenin aus der Familie der *armadillo-repeat*-Moleküle eine duale Funktion in Signaltransduktionswegen und in Zellverbindungen und ist damit von großer Bedeutung für frühe Entwicklungsprozesse. Als Bestandteil des Wnt-Signalweges ist es an der Ausbildung von Körperachsen beteiligt. In Cadherin-vermittelten Adhäsionskomplexen stellt es die Verbindung zwischen den Zell-Zellkontakten und dem Cytoskelett her und hat damit wesentlichen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen. Ein funktionaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Aufgaben des Moleküls ist erst ansatzweise verstanden.

Der basale Metazoe *Hydra* besitzt die aussergewöhnliche Fähigkeit, aus vereinzelten Zellen Aggregate zu bilden, in denen sich die Zellen neu organisieren und vollständige Tochterpolypen bilden. Dadurch lassen sich in *Hydra*-Aggregaten die Mechanismen der Zelladhäsion und zugleich Prozesse der Musterbildung untersuchen.

Die Analysen in dieser Arbeit zum Expressionsmuster von β-Catenin in adulten Polypen, in der Kopfregeneration und in Aggregaten zeigen, dass seine Funktion im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Kopforganisationszentren und der Ausbildung der Körperachse steht. Zugleich ist β-Catenin in *Hydra* in Mechanismen der Zelladhäsion eingebunden und scheint in dieser Funktion auch in der differentiellen Zellerkennung eine Rolle zu spielen. Die duale Funktion von β-Catenin in *Hydra* konnte sowohl durch RNA-Expressionsanalysen als auch durch zwei in dieser Arbeit generierte Antikörper bestätigt werden.

Die Isolation von zwei Zelladhäsionsmolekülen, die in höheren Metazoen gemeinsam mit β-Catenin in Zellverbindungen lokalisieren, lieferte starke Hinweise auf die Existenz eines Adhäsionskomplexes, der bislang in *Hydra* noch nicht detektiert werden konnte. Nach dem *Hydra*-Homolog eines klassischen Cadherins konnte in dieser Arbeit ein Molekül der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie kloniert werden. Die Funktion und Bedeutung dieser Molekül-Gruppe bei der Bildung und Regulation von Cadherin-vermittelten Adhäsionskomplexen ist bislang unzureichend geklärt.

Die Expressionsanalysen der δ-Catenin- und Cadherin-Moleküle in *Hydra* bestätigen ihre Funktion in Adhäsionsprozessen. Darüber hinaus scheinen beide Moleküle bei der Entwicklung und Wegfindung neuronaler Zellen von Bedeutung zu sein. Ihre

strenge Synexpression zeigt, dass in *Hydra* das δ-Catenin-Molekül schon in die frühe Phase der Bildung von Adhäsionskomplexen eingebunden ist.

Ein gegen eine kurze Peptidsequenz des *Hydra*-Cadherins generierter Antikörper lieferte keine weiteren Hinweise auf die Lokalisation von Adhäsionskomplexen in *Hydra*. Er detektiert aber in den Polypen verschiedene Subpopulationen von Ganglion- und sensorischen Nervenzellen und zeigt damit ein sehr viel komplexeres Bild des Nervengewebes in *Hydra*, als es bislang dargestellt werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass die Rolle von β-Catenin im Wnt-Signalweg und in der Zelladhäsion evolutiv konserviert ist und wahrscheinlich die Bildung von Organisationszentren begünstigt. Zugleich zeigt die Expression von β-Catenin, Cadherin und δ-Catenin in den neuronalen und epithelialen Zelllinien von *Hydra*, dass auch die neuro-epitheliale Funktion des Adhäsionkomplexes evolutiv sehr alt ist.

2 Einleitung

Die Entwicklung einer befruchteten Eizelle zu einem vielzelligen Organismus mit differenzierten Zellen, die Gewebe und Organe mit spezialisierten Aufgaben bilden, erfordert hochkomplexe Prozesse, die es den Zellen erlauben, miteinander zu kommunizieren und zu interagieren. Eine Form der Kommunikation in einem organisierten Gewebeverband besteht in der freien Diffusion von extrazellulären signalgebenden Molekülen. Diese Moleküle wirken dabei als Morphogene durch Bindung an membranständige Rezeptoren und anschließende Aktivierung einer spezifischen intrazellulären Reaktion. Aus einer lokal eng begrenzten Quelle sekretierte Morphogene rufen distinkte Antworten entlang ihres Konzentrationsgradienten hervor und setzen so Musterbildungsprozesse in Gang (Lawrence und Struhl, 1996; Neumann und Cohen, 1997; Teleman et al., 2001). Aufgrund dieser Eigenschaft sind Morphogene geeignet, um über einen weiten Bereich Positionsinformationen zu vermitteln. Tatsächlich wirken aber viele Morphogene, reguliert durch inhibierende Prozesse, nur in einem eng begrenzten räumlichen Feld (Fagotto und Gumbiner, 1996).

Eine andere Möglichkeit der direkten Kommunikation zwischen einzelnen Zellen besteht in einer an die Zellkontakte gebundenen Genaktivierung. Membranständige Adhäsionsmoleküle, die zwischen Zellen Verbindungen herstellen, besitzen selbst aber weder intrazelluläre Signaltransduktionsaktivität noch transkriptionsaktivierende Eigenschaften. Deshalb erfüllen solche Aufgaben an Adhäsionskomplexe assoziierte Moleküle (Fagotto und Gumbiner, 1996). Diese über Morphogene und Zellkontakte vermittelten Signaltransduktionen sind zwei sich ergänzende Mechanismen der embryonalen Musterbildung.

Eines der bekanntesten Beispiele für ein Molekül, das sowohl in Adhäsionsverbindungen in die Bildung von Zell-Zellkontakten eingebunden ist und zugleich als zentraler Vermittler und Transkriptionsaktivator in einem Signaltransduktionsweg fungiert, ist das β-Catenin aus der Familie der *armadillo-repeat*-Moleküle.

2.1 β-Catenin hat eine duale Funktion in Zellverbindungen und im Wnt-Signalweg

An der Zellmembran bindet β-Catenin an das cytoplasmatische Ende der transmembranständige Cadherine, die mit ihren extrazellulären Cadherin-*repeats* Dimere mit den Cadherinen benachbarter Zellen bilden und so den Kontakt zwischen den Zellen herstellen. An Cadherin assoziiertes β-Catenin interagiert mit α-Catenin, das selbst direkt Actinfilamente oder weitere Actin bindende Moleküle rekrutiert, um so Verbindungen zwischen dem Cytoskelett und den Zellverbindungen herzustellen. Die Interaktion von β-Catenin und Cadherin ist für diese Anbindung des Cytoskeletts an den Adhäsionskomplex essentiell und beeinflusst das Adhäsionsverhalten der Zelle. Cadherine, die nicht mit β-Catenin interagieren, können auch keine Zellverbindungen herstellen (Ben Ze´ev und Geiger, 1998; Provost und Rimm, 1999).

Als zentraler Vermittler im Wnt/Wg-Signaltransduktionsweg ist β-Catenin in grundlegenden Musterbildungsprozessen eingebunden (Cardigan und Nusse, 1997). Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* geht der Ausbildung der dorsoventralen Körperachse eine dorsale Anreicherung von β-Catenin im Embryo voraus (Heasman et al., 1994; Guger und Gumbiner, 1995). Die direkte Relevanz der β-Catenin-Konzentration kann demonstriert werden durch eine Injektion von β-Catenin in die ventrale Seite des Embryos, wodurch die Bildung einer zweiten Körperachse induziert wird (Funayama et al., 1995; Guger und Gumbiner, 1995). Auch in Invertebraten ist β-Catenin über den Wnt-Signaltransduktionsweg an der Regulation früher Musterbildungs- und Determinationschritte beteiligt. In der Taufliege *Drosophila melanogaster* reguliert der homologe Wg-Signalweg die Etablierung der Polarität embryonaler Segmente und die Musterbildung in den larvalen Imaginalscheiben (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Neumann und Cohen, 1997; Lecuit und Cohen, 1997). Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* wird die Entstehung der endodermalen Zelllinie durch Wnt-Moleküle kontrolliert (Thorpe et al., 1997; Rocheleau et al., 1997).
β-Catenin nimmt mit seinen Funktionen in Zellverbindungen und im Wnt-Signalweg zwei sehr verschiedene Aufgaben in der Zelle wahr, die beide von grundlegender Bedeutung in der Entwicklung von Organismen sind. Wie die Funktion von β-Catenin bestimmt wird und wie sich die beiden Funktionskomplexe gegenseitig regulieren, ist bislang erst ansatzweise verstanden.

2.2 Proteinstruktur des β-Catenin-Moleküls

Die Tertiärstruktur des β-Catenin-Moleküls konnte vor allem in seiner *armadillo-repeat*-Region weitgehend aufgeklärt werden (Peifer et al., 1994; Huber et al., 1997). Jede *armadillo*-Domäne bildet drei α-Helices, die jeweils im Winkel von 120° zueinander stehen. Die gesamte *armadillo-repeat*-Region bildet so eine Superhelix, bei der nur etwa 20% der Aminosäuren nach außen gerichtet sind (Abb. 1.1).

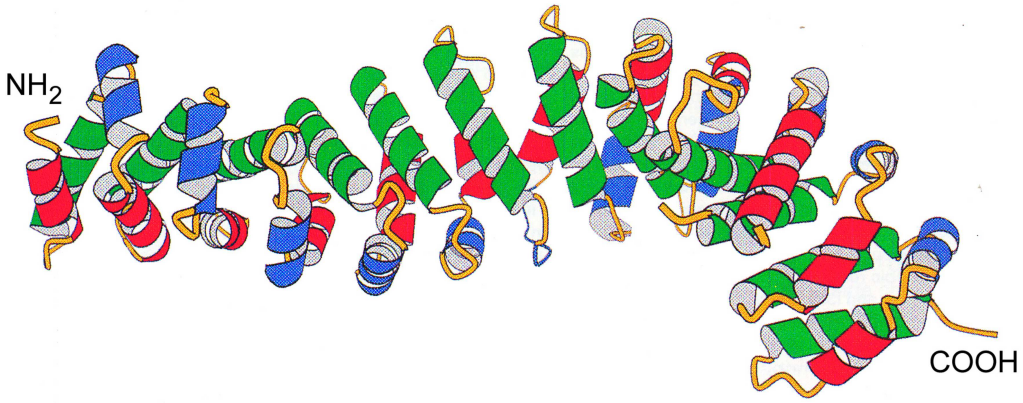


Abb. 1.1: Dreidimensionale Darstellung der *armadillo-repeat*-Region von β-Catenin. Je drei α-Helices (in rot, grün und blau dargestellt), die im Winkel von 120° zueinander stehen, bilden eine *armadillo*-Domäne (Abbildung entnommen aus Huber et al., 1997).

An der Oberfläche dieser Superhelix bilden basische Aminosäuren eine Spalte, in die sich die meisten Bindungspartner von β-Catenin mit kurzen hervorstehenden Peptiden anlagern können. Für die Interaktion mit anderen Molekülen sind häufig nur wenige Aminosäuren der β-Catenin-Sequenz essentiell, wie durch Substitutionsexperimente gezeigt werden konnte (Sadot et. al, 1998; von Kries et al., 2000). Diese essentiellen Aminosäuren können sich aber auf mehrere *armadillo*-Domänen verteilen. Durch die sehr kompakte Struktur des Moleküls erstrecken sich so die Bindungsdomänen einiger Interaktionspartner über die gesamte Länge der *armadillo-repeat*-Region (Gottardi und Gumbiner, 2001). β-Catenin ist durch seine Vielzahl von Bindungsdomänen entlang der *armadillo-repeats* aber auch an seinen Molekülenden in der Lage, Multiproteinkomplexe sowohl im Cytoplasma, als auch im membrangebundenen Adhäsionskomplex oder als die Transkription aktivierendes Molekül zu bilden (Zhurinsky et al., 2000).

2.3 Regulation der cytoplasmatischen β-Catenin Konzentration

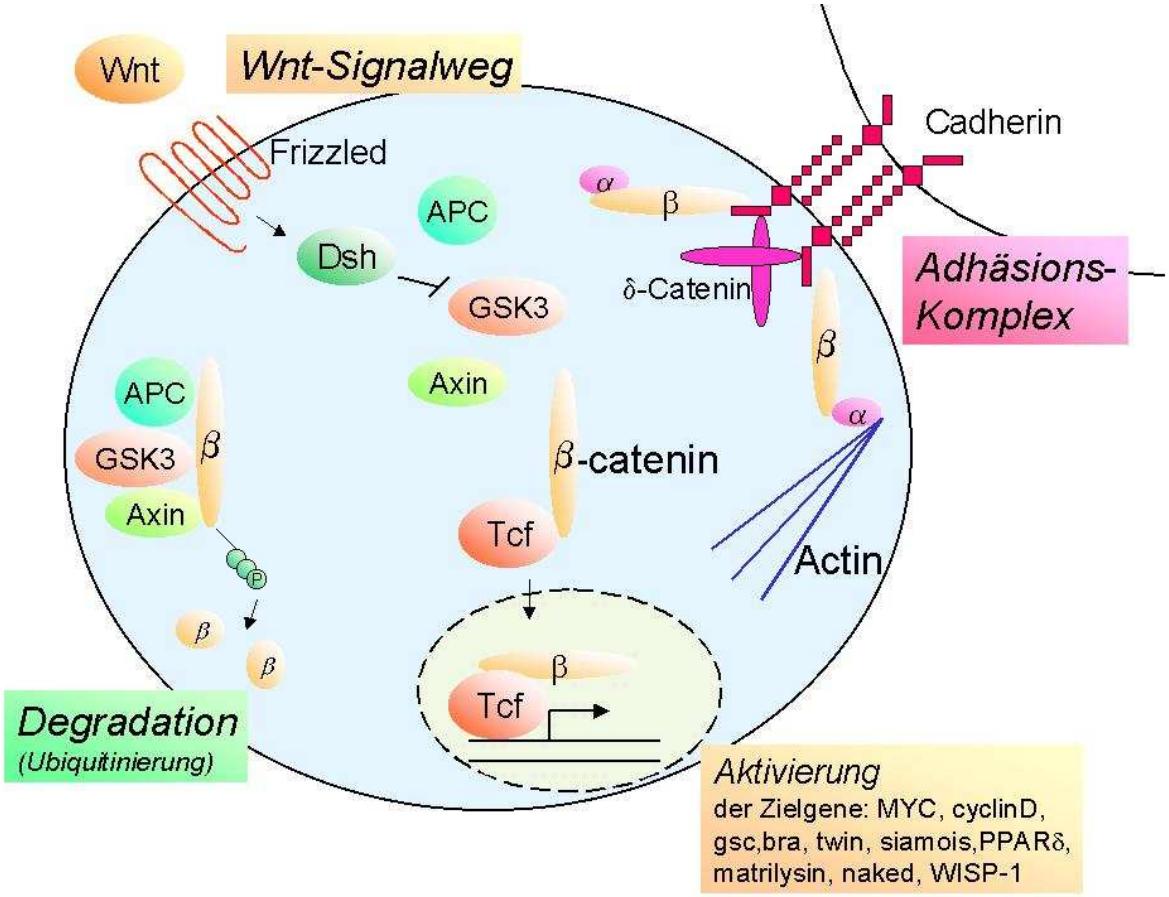


Abb. 1.2:
Im Cytoplasma unterliegt β-Catenin (β) einem permanenten Degradationsprozess. Ein Proteinkomplex aus den Molekülen GSK3, APC und Axin bindet an β-Catenin und bewirkt durch seine Phosphorylierung eine anschließende Ubiquitinierung und Degradation. Im aktivierten Wnt-Signaltransduktionsweg inhibiert Dishevelled (Dsh) die Bildung des Degradationskomplexes. Stabilisiertes β-Catenin kann gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor Tcf die Transkription einer Reihe von Genen aktivieren. Im Adhäsionskomplex bindet β-Catenin an die cytoplasmatische Domäne der transmembrangängigen Cadherine, die über δ-Catenine miteinander vernetzt sind. β-Catenin bindet außerdem über α-Catenin (α) an Actinfilamente und stellt so die Verbindung zwischen dem Cytoskelett und den Zell-Zellverbindungen her.

Cytoplasmatisches β-Catenin unterliegt einem permanenten Degradationsprozeß. Ein Proteinkomplex aus den Molekülen Glykogensynthasekinase3 (GSK3), dem Tumorsuppressorgen Adenomatous Polyposis Coli (APC) und Axin bzw. Conductin bindet an das freie β-Catenin und bewirkt eine Phosphorylierung von aminoterminalen Serinen und Threoninen (S/T), die von dem F-box-Protein β-Trcp erkannt werden können (Li et al., 1999; Behrens et al., 1998; Salic et al., 2000; Polakis, P., 2001). Die S/T-Phosphorylierung ist Vorraussetzung für einen anschließenden Abbau im Ubiquitin-Proteosomen-Weg (Aberle et al., 1997).

Die Funktionen der einzelnen Komponenten im Degradationskomplex sind nicht eindeutig geklärt. Axin scheint dabei eine verbindende Rolle zu spielen und die beteiligten Proteine zu einem Komplex zusamenzufügen, in dem die Phosphorylierung von β-Catenin durch GSK3 erfolgen kann (Bienz, 1999).

Die regulierende Funktion von APC in diesem Degradationskomplex ist nicht eindeutig zu bestimmen, da verschiedene Untersuchungen mit Mutationen, die eine Anbindung von APC an Axin oder β-Catenin verhindern, zu konträren Ergebnissen führten (Bienz et al., 1999). So ist in verschiedenen Tumoren eine Mutation in β-Catenin oder APC festzustellen, die eine Interaktion der beiden Moleküle und Phosphorylierung von β-Catenin verhindert und zu einer Stabilisierung und Anreicherung cytoplasmatischen β-Catenins und damit verstärkter Transkriptionsaktivierung führt (Morin et al., 1997; Peifer und Polakis, 2000; Liu et al., 2000; Satoh et al., 2000). In anderen Untersuchungen zeigten dagegen Mutationen, die eine Anbindung von APC an den Degradationskomplex verhindern, eine verstärkte Phosphorylierung von β-Catenin (Hart et al., 1998). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass APC in Adhäsionsverbindungen mit E-Cadherin kolokalisiert werden kann (Yu et al., 1999; Lu et al., 2001) und dort eine Loslösung des β-CateninHomolog Armadillo bewirkt (Townsley und Bienz, 2000).

Desweiteren kann APC gemeinsam mit β-Catenin im Nucleus detektiert werden und enthält zwei kurze Leucin-reiche Motive (*nuclear export signal*, NES), die es ihm ermöglichen, assoziierte Moleküle aus dem Zellkern zu transportieren (Neufeld et al., 2000). APC wird daher eine vermittelnde Funktion (*taxi function*) in der Zelle zugeschrieben, in der es β-Catenin aktiv zwischen den einzelnen Zellkompartimenten transferiert und so dessen Funktion reguliert (Bienz, 1999; Henderson, 2000; Rosin-Arbesfeld et al., 2000).

Die für den proteolytischen Abbau von β-Catenin erforderliche S/T-Phosphorylierung kann alternativ in einem Komplex erfolgen, in dem APC durch die Casein-Kinase Iα (CKIα) ersetzt wird (Liu et al., 2002). In Vertebraten wird durch das Molekül Diversin die Casein-Kinase Iε (CKIε) in einen Komplex mit β-Catenin, GSK3 und Axin gefügt, der zu dem gleichen Phosphorylierungsergebnis führt (Schwarz-Romond et al., 2002).

Ein weiterer möglicher Regulator des im Wnt-Signalweg aktiven cytoplasmatischen β-Catenins ist auch Presenilin 1 (PS1), das als Schlüsselmolekül für die familiär be-

dingte Alzheimer-Erkrankung gilt (Sherrington et al., 1997). Einige PS1-Mutationen zeigen eine cytoplasmatische Anreicherung von β-Catenin, die auch im Gehirn von Alzheimer-Patienten festgestellt werden kann und zu einer erhöhten Transkription von Zielgenen wie Cyclin D1 führt (Xia et al., 2002). Obwohl der genaue Mechanismus der regulierenden Funktion von PS1 noch unklar ist, wirkt PS1 negativ auf die Funktion von β-Catenin im Wnt-Signalweg. Das PS1-Molekül besitzt sechs bis acht Transmembrandomänen sowie eine große hydrophile Schleife, mit der es mit vielen cytoplasmatischen Proteinen in Verbindung treten und so deren Interaktion vermitteln kann (Yu et al., 1998). Vermutlich bewirkt PS1, ähnlich wie Axin, eine Rekrutierung von GSK3 an β-Catenin und damit die aminoterminale S/T-Phosphorylierung (Kang et al., 2002). PS1 bindet außerdem an die cytoplasmatische Domäne von klassischen Cadherinen und konkurriert dabei mit den Molekülen der δ-Catenin/p120-Familie um die JMD(*juxtamembrane domain)*-Bindungsdomäne nahe der Zellmembran. Durch Interaktion mit der *armadillo-repeat*-Region von β-Catenin soll es dessen Anbindung an die Catenin-Bindungsdomäne (CBD) von Cadherin sowie durch Rekrutierung von α-Catenin und Actin-bindender Moleküle die Verbindung zum Cytoskelett fördern (Baki et al., 2002).

2.4 Der Wnt-Signalweg stabilisiert cytoplasmatisches β-Catenin

Durch Aktivierung des Wnt-Signalweges wird die Bildung des Axin-vermittelten Degradationskomplexes inhibiert und cytoplasmatisches β-Catenin stabilisiert. Sekretierte Wnt-Moleküle binden an Transmembranrezeptoren der Frizzled-Familie (Bhanot et al., 1996, Yang-Snyder et al., 1996; Malbon et al., 2001), die wiederum, vermutlich über trimere G-Proteine das cytoplasmatische Protein Dishevelled aktivieren (Liu et al., 2001). Dishevelled bindet in Folge mit einer DIX (**Di**shevelled und A**x**in)-Domäne, die in beiden Molekülen auftritt, an Axin. Hierdurch wird Axin dephosphoryliert und so die Bildung des Degradationskomplex inhibiert (Willert et al., 1999; Julius et al., 2000). Als Folge reichert sich β-Catenin im Cytoplasma an und kann mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/LEF-Familie interagieren (Wodarz und Nusse, 1998). Der β-Catenin/Tcf-Komplex, reguliert durch die Interaktion mit weiteren Kotranskriptionsfaktoren (Hecht et al., 2000; Hecht und Kemler, 2000, Sun et al., 2000; Zhurinsky et al., 2000), aktiviert im Zellkern die Transkription von Zielgenen, wobei der genaue

Mechanismus hier noch wenig verstanden ist (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996; van de Wetering et al., 1997; Eastman und Grosschedl, 1999; Miller et al. 1999; Zhurinsky et al., 2000).

Die Bedeutung der Regulation des cytoplasmatischen β-Catenin wird deutlich durch die Tatsache, dass bei der Entstehung einer Reihe von humanen Tumoren eine erhöhte β-Catenin-Konzentration und -Transkriptionsaktivität zu beobachten ist (Peifer und Polakis, 2000). Neben der bereits erwähnten erhöhten CyclinD1-Expression in Zellen mit einer Mutation im APC- oder β-Catenin-Molekül, die eine Interaktion beider Moleküle verhindert, kann auch eine Fehlfunktion des Cadherin-Catenin-Komplexes zur Akkumulation und verstärkten Transkriptionsaktivierung von β-Catenin führen (Cox et al., 1996; Wodarz und Nusse, 1998; Shtutman et al., 1999). Cadherin-Mutationen in der Catenin-Bindungsdomäne sind häufig mit Metastasenbildung und erhöhter Invasivität verbunden (Takeichi, 1993; Birchmeier und Behrens, 1994; Perl et al., 1998; Christofori und Semb, 1999), die sich aber durch eine induzierte Expression von intaktem Cadherin inhibieren lässt (Vleminckx et al., 1991; Shtutman et al., 1999). Mutationen in frühen Stadien nicht invasiver Tumore lassen vermuten, dass Cadherine auch als Regulatoren von Zellwachstum und -proliferation von Bedeutung sind (Vos et al., 1997; Guilford et al., 1998).

Die Vielzahl der möglichen Interaktionen des β-Catenin mit anderen Molekülen, die dessen Funktion in Signaltransduktionswegen und in Adhäsionskomplexen bestimmen, gewinnt an Komplexität durch den Umstand, dass einige Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges auch in anderen zellulären Prozessen beteiligt sind. So sind Frizzled und Dishevelled, aber auch das Protein Diversin, das bei der Bildung des Degradationskomplexes eine vermittelnde Funktion hat, in den JNK-Signalweg eingebunden, der die planare Zellpolarität reguliert (Peifer, 2000; Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 1998; Schwarz-Romond et al., 2002). Presenilin1 ist nachweislich im Notch-Signalweg aktiv und gilt daher als Bindeglied zwischen dem Wnt- und Notch-Signalweg (Wong et al., 1997; De Strooper und Annaert, 2001). Aber auch die Bindung von β-Catenin an das cytoplasmatische Ende von Cadherin kann durch andere kompetitive Proteine inhibiert werden. Das mit β-Catenin nahverwandte *armadillo-repeat*-Molekül γ-Catenin (Plakoglobin) konkurriert mit β-Catenin um die

Catenin-Bindungsdomäne und kann bei verstärkter Expression β-Catenin aus dem Adhäsionskomplex verdrängen und ins Cytoplasma freisetzen, von wo es dann in den Zellkern gelangen und seine transkriptionsaktivierende Funktion wahrnehmen kann (Zhurinsky et al., 2000; Ben Ze´ev et al., 2000).

Einige Untersuchungen zeigen eine schnelle Verfügbarkeit von cytosolischem β-Catenin ohne eine damit verbundene verstärkte Transkription oder Translokation. Sie legen die Vermutung nahe, das im Cytoplasma noch ein „inaktiver Pool" von β-Catenin vorliegt, der weder dem Adhäsionskomplex noch dem Wnt-Signalweg oder einem proteolytischen Abbau unmittelbar zur Verfügung steht (Gottardi et al. 2001). Als Ursache werden inhibitorische Proteine wie Duplin oder ICAT (Tago et al., 2000; Sakamoto et al., 2000) aber auch posttranslationale Modifikationen angenommen (Gottardi und Gumbiner, 2001).

2.5 Die duale Funktion von β-Catenin ist evolutiv vermutlich sehr alt

Ebenso wie die Komponenten des Wnt-Signalweges und der Cadherin-vermittelten Adhäsionskomplexe, so ist auch die duale Funktion von β-Catenin in diesen beiden Sytemen vermutlich evolutiv sehr alt. In dem zellulären Schleimpilz *Dictystelium discoideum* konnte das β-Catenin-Homolog Aardvark (Aar) isoliert werden, das potentielle Bindungsdomänen für α-Catenin und GSK3 aufweist (Grimson et al., 2000; Coates und Harwood, 2001). *Dictyostelium* zeigt unter Hungerbedingungen ein Aggregationsverhalten, um sporentragende Fruchtkörper zu bilden, in denen die einzelnen Amöben den Charakter von differenzierten Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen annehmen. Dieser Prozess erfordert ein hohes Maß an Organisation, Zelldifferenzierung und -interaktion. Da Aar beim Prozess der Aggregation aufreguliert wird, könnte β-Catenin auch schon in Nicht-Metazoen Funktionen sowohl in Zell-Zellverbindungen sowie in Signalwegen besitzen.

Der Süßwasserpolyp *Hydra* gehört zum evolutiv alten Phylum der Cnidaria. Der Körperbau zeichnet sich durch seine Radiärsymmetrie, also eine einzige oral/aborale bzw. apical/basale Körperachse aus. Ein zweites Charakteristikum der Cnidaria ist das völlige Fehlen eines Mesoderms. Sie bestehen nur aus den zwei Keimblättern

des Ekto- und Endoderms, sind also diploblastische Organismen. Alle höheren, bilateralsymmetrischen Metzoa sind Triploblasten. Die Cnidaria werden daher mit zu den ursprünglichsten vielzelligen Tierstämmen gerechnet. Der einfach strukturierte Körper lässt sich in drei Regionen unterteilen: (1) Der Kopf mit seiner Mundöffnung, dem Hypostom, ist von einem Kranz mit Nesselzellen bewehrter Tentakeln umgeben, die dem Beutefang und der Nahrungsaufnahme dienen. (2) Der zylinderförmige Rumpf umschließt den Gastralraum und (3) die Fußscheibe dient zur Anheftung des Polypen an ein Substrat.

Der Kopf des Polypen hat eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung der Körperachse. So konnte in Transplantationsexperimenten gezeigt werden, dass ein in den Rumpf eines Wirtspolypen verpflanzter Kopf dort die Bildung einer zweiten Körperachse induzieren kann (McWilliams 1983).

Im unteren Drittel des Rumpfes befindet sich die Knospungszone, in der die asexuelle Form der Fortpflanzung von *Hydra* durch seitliches Auswachsen von Tochterpolypen erfolgt. Die Knospung beginnt mit der Evagination weniger ektodermaler Zellen und endet mit dem Ablösen der vollständigen Tochterpolypen, nachdem sie eine eigene Fußscheibe gebildet haben. Im gesamten Bereich des Rumpfes werden durch permanente Proliferation neue Zellen gebildet, die durch Gewebeschub zu den Knospen und den Körperenden gelangen, wo Zellen kontinuierlich abgestoßen werden. Die Dynamik des Gewebes erfordert, dass auch in den adulten Polypen die Prozesse der Musterbildung aufrechterhalten werden, die den Zellen eine lokale Identität verleihen und die Ausbildung der Körperachse ermöglichen.

Eine weitere besondere Eigenschaft von *Hydra* ist ihr hohes Potenzial der Regeneration und Aggregation (Holstein et al., 2003). So lässt sich ein Polyp in beliebig kleine Teile zerlegen, die mit Ausnahme der Tentakeln und der Fußscheibe alle in der Lage sind, aus dem restlichen Gewebe einen vollständigen Polypen zu regenerieren. Unter geeigneten Umständen können sogar die Einzelzellen vollständig dissoziierter Zellen wieder zu Klumpen aggregieren aus denen intakte Polypen auswachsen (Gierer und Meinhardt, 1972). Damit ist bei *Hydra* die Möglichkeit gegeben, an adulten Polypen die Prozesse der Musterbildung zu verfolgen.

In Aggregaten müssen die Zell-Zellverbindungen zwischen den vereinzelten Zellen wiederhergestellt werden, um einen Gewebeverband bilden zu können. Anders als in intakten Polypen befinden sich die Zellen in Aggregaten in einem homogenen Feld, in dem jede Positionsinformation aufgehoben ist. So muss zunächst eine Ordnung

geschaffen werden, in der die Zellen ihre spezifischen Aufgaben wahrnehmen können. In Aggregaten lassen sich somit die Vorgänge der Zelladhäsion und zugleich auch der Musterbildung untersuchen.

In *Hydra* konnten neben β-Catenin (Hyβcat; Hobmayer et al., 1996) fast alle Komponenten eines kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges isoliert werden: Wnt, Frizzled, Dishevelled, GSK3 und Tcf (Hobmayer et al., 2000; Minobe et al. 2000). RNA-Expressionsanalysen mit InSitu-Hybridisierungen mit dem Wnt-Homolog in *Hydra* zeigen, dass HyWnt bei der Ausbildung der Körperachse eine wichtige Funktion besitzt (Hobmayer et al., 2000). Im Polypen erscheint HyWnt in einer eng begrenzten Expressionsdomäne im Hypostom und markiert so den apikalen Pol. Auch bei der Knospenbildung, der Kopfregeneration und in Aggregaten wird durch die HyWnt-Expression die Position der Köpfe und damit ein Ende der Körperachse bestimmt.

In einem Hefe-Two-Hybrid-System (THS) wurden als weitere Interaktionspartner von Hyβcat auch die Fragmente eines Cadherins und eines *armadillo-repeat*-Moleküls isoliert, das Ähnlichkeit mit der δ-Catenin/p120/Plakophilin-Familie besitzt. Die Sequenz des Cadherins (HyCadh) konnte vollständig ermittelt werden und weist neben den Bindungsdomänen für β- und δ-Catenin Merkmale eines vermutlich ursprünglichen, klassischen Cadherins auf. Cadherine besitzen in höheren Metazoa sehr vielfältige Funktionen in der Zelladhäsion und weisen daher auch sehr unterschiedliche Lokalisationen auf. Die Identifizierung dieser Adhäsionsmoleküle ist von großem Interesse, da auch mit ultrastrukturellen Untersuchungen in *Hydra* bislang keine Zellverbindungen erkannt wurden, die den Cadherin-vermittelten Adhärenzverbindungen gleichen. Die zelldifferenzierende Funktion von Cadherinen (Nose et al., 1988; Godt und Tepass, 1998) könnte gerade in frühen Stadien von Aggregaten bei der Organisation der Zellen von Bedeutung sein. Zudem war damit ein Hinweis gegeben, dass auch in dem basalen Metazoen *Hydra* die duale Funktion des β-Catenin vorhanden ist.

In dieser Arbeit sollte durch vergleichende Expressionsanalysen von HyβCat mit anderen Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges und der Adhäsionsmoleküle in *Hydra* die duale Funktion von HyβCat überprüft werden. Für diese Untersuchung sind vor allem die Aggregate von besonderem Interesse, da beide Funkti-

onskomplexe, in die HyβCat möglicherweise eingebunden ist, in Aggregaten induziert werden sollten.

Eingehendere Untersuchungen der isolierten Adhäsionsmoleküle sollten zudem die Hinweise auf einen Adhäsionskomplex in *Hydra* belegen. Dazu war es erforderlich, die Struktur des neu isolierten *armadillo-repeat*-Moleküls vollständig zu ermitteln und durch Expressionsstudien seine Funktion zu bestimmen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Funktion des β-Catenins in einem Wnt-Signaltransduktionsweg in *Hydra*

Die Moleküle β-Catenin und Tcf, die in höheren Metazoa eine große Bedeutung in der Embryogenese haben (Cadigan und Nusse, 1997), konnten auch aus *Hydra* isoliert werden (Hobmayer et al., 1996; Hobmayer et al., 2000). Ihre Expressionsmuster wurden auf RNA-Ebene mit RNA-InSitu-Hybridisierungen in adulten Polypen, im asexuellen Fortpflanzungsmodus der Knospung sowie in Kopf-Regeneraten bereits in früheren Arbeiten eingehend untersucht und dokumentiert (Hobmayer et al. 2000). HyβCat zeigt eine gleichmäßig niedrige, epitheliale Expression im Rumpf der Polypen, lediglich das Hypostom zeigt eine erhöhte Transkription. Bei der Knospenbildung ist vor dem morphologisch sichtbaren Auswachsen der Tochterpolypen in der Knospungszone eine ringförmig um den Rumpf verlaufende Aufregulierung von HyβCat zu erkennen. Auch bei der Kopfregeneration ist HyβCat in der regenerierenden Spitze in einer breiten Expressionsdomäne aufreguliert.

In dieser Arbeit werden diese Befunde durch die Expressionsanalysen in der *de novo*-Musterbildung in Aggregaten erweitert. Hierzu wurde Gewebe aus dem Rumpfbereich von adulten Polypen in Einzelzellen dissoziiert und aus der erhaltenen Zellsuspension durch Zentrifugation kleine Zellklumpen (Aggregate) gebildet. In diesen Zellklumpen ist jegliche Organisation oder Polarität, die im ursprünglichen Gewebe vorlag, vollständig aufgehoben. Die Zellen müssen sich neu formieren und eine neue Ordnung erstellen. Nach etwa 24 Std haben Ekto- und Endoderm neue Epithelien ausgebildet, nach 50-60 Std sind erste Kopfstrukturen mit Tentakelansätzen zu erkennen und nach etwa sieben Tagen trennen sich die Aggregate in einzelne Tochterpolypen (Gierer et al., 1972). Mit der RNA-InSitu-Hybridisierung kann in den sich neu organisierenden Zellverbänden die lokale Transkription einzelner Gene untersucht und damit eine Aussage über ihre Funktion bei der Zelladhäsion und in Signaltransduktionswegen während dieses Prozesses der *de novo*-Musterbildung getroffen werden.

3.1.1 Expression von HyβCat-RNA in Aggregaten von Hydra

In frühen Stadien der Reaggregation (24 Std) ist eine gleichmäßig über das gesamte Aggregat verteilte starke Expression von HyβCat-RNA zu erkennen (Abb.3.1 a und b). In der weiteren Entwicklung (48-96 Std) bilden sich aber einzelne Expressionsdomänen heraus, die sich immer weiter einengen (*domain restriction*). In den dazwischen liegenden Bereichen nimmt die Expression hingegen ab (Abb. 3.1 c und d). Wenn die Tentakelansätze der auswachsenden Polypen zu erkennen sind (Abb. d und e), zeigt sich, dass die Expressionsdomänen von HyβCat mit den Regionen der Kopfbildung übereinstimmen. Schließlich bleibt die Expressionsdomäne auf das Hypostom der auswachsenden Polypen beschränkt. In den auswachsenden Füßen ist wie in den Polypen keine Aufregulierung von HyβCat zu erkennen.

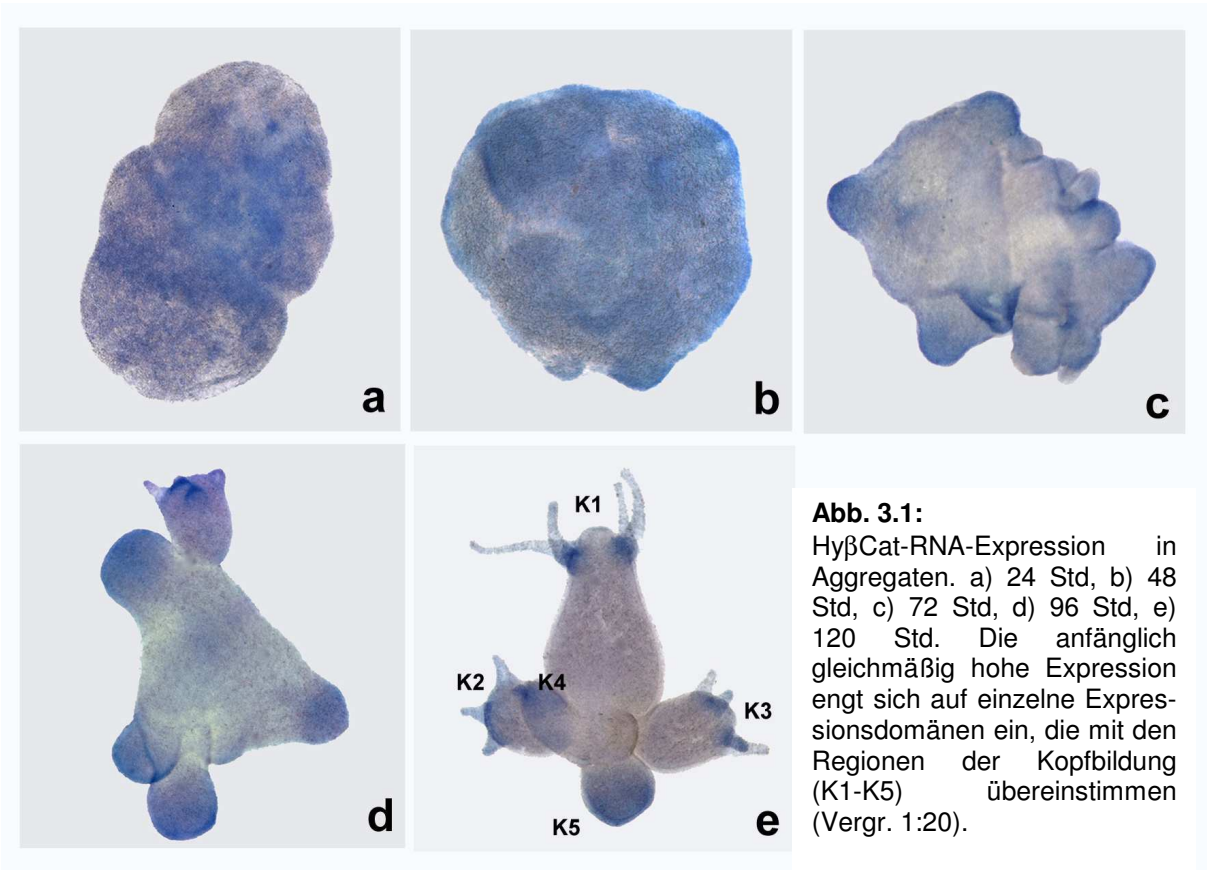


Abb. 3.1: HyβCat-RNA-Expression in Aggregaten. a) 24 Std, b) 48 Std, c) 72 Std, d) 96 Std, e) 120 Std. Die anfänglich gleichmäßig hohe Expression engt sich auf einzelne Expressionsdomänen ein, die mit den Regionen der Kopfbildung (K1-K5) übereinstimmen (Vergr. 1:20).

3.1.2 Expressionsmuster von HyTcf in Aggregaten

Zur Überprüfung der Funktion von HyβCat in den *de novo*-Musterbildungsprozessen in Aggregaten sollte vergleichend die Expression des Interaktionspartners von HyβCat und Zielgen des Wnt-Signaltransduktionsweges, dem Transkriptionsfaktor Tcf, untersucht werden. Das RNA-Expressionsmuster von HyTcf in Aggregaten zeigt das gleiche *domain restriction*-Verhalten wie HyβCat. Auch hier ist zunächst über das gesamte Aggregat eine gleichmäßig hohe Expression zu erkennen, die sich auf die Regionen der Kopfbildung einengt. In den dazwischen liegenden Bereichen ist dagegen nur eine schwache Expression zu erkennen (Abb. 3.2).

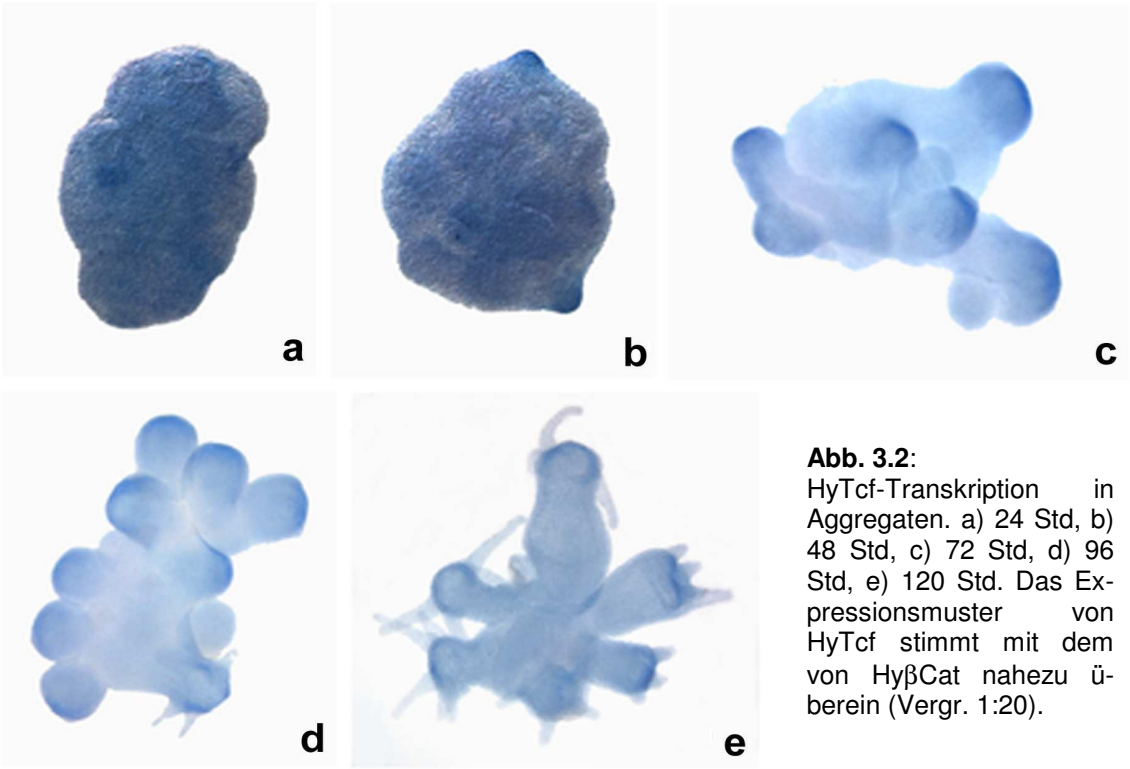


Abb. 3.2: HyTcf-Transkription in Aggregaten. a) 24 Std, b) 48 Std, c) 72 Std, d) 96 Std, e) 120 Std. Das Expressionsmuster von HyTcf stimmt mit dem von HyβCat nahezu überein (Vergr. 1:20).

Im Falle von HyTcf war genügend Datenmaterial für eine statistische Auswertung vorhanden (Abb. 3.3). Sie zeigen in frühen Stadien der Reaggregation zunächst eine Zunahme der einzelnen Expressionsdomänen, die schnell einen Maximalwert erreicht und der Zahl der mit zeitlicher Verzögerung in einem Aggregat gebildeten Köpfe bzw. der auswachsenden Tochterpolypen entspricht. Aus jeder HyTcf-Expressiondomäne entwickelt sich somit ein Kopf.

Aufgrund des identischen RNA-Expressionsmusters lässt sich diese Aussage auf HyβCat übertragen. Es besteht demnach ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von HyβCat, wie von HyTcf und der Kopfbildung. Da die Expression von HyβCat und HyTcf der morphologisch sichtbaren Bildung eines Kopfes vorausgeht, legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass in *Hydra* eine funktionelle Notwendigkeit der Expression dieser beiden Gene für den Musterbildungsprozess der Kopfbildung besteht.

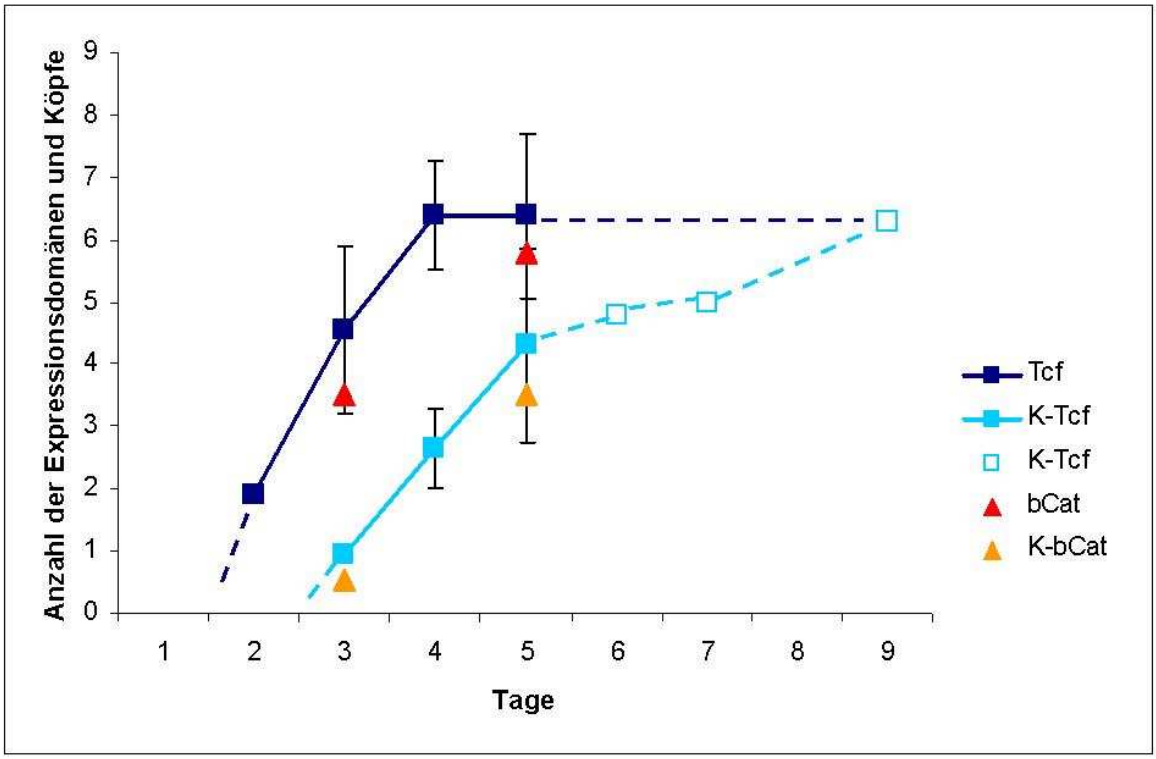


Abb. 3.3:
Verlauf der Ausbildung von HyTcf-Expressionsdomänen (Tcf) und der Köpfe (K-Tcf) in *Hydra*-Aggregaten. Die Datenpunkte der Kopfbildung bei 6, 7 und 9 Tagen stellen Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen dar. Eingetragen sind auch die Ergebnisse aus einer Expressionsanalyse von HyβCat (bCat und K-bCat) in Aggregaten. Die Datenpunkte entsprechen ebenfalls den Mittelwerten aus zwei Versuchsreihen und liegen im Rahmen der Standardabweichung der HyTcf-Daten.

3.1.3 HyWnt und Hybra1 markieren in Aggregaten die Regionen der Kopfbildung

Um das Expressionsmuster von HyβCat auf eine Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg und bei der Kopfbildung überprüfen zu können, sollte es mit der Transkription von HyWnt und einem zweiten Molekül, das in *Hydra* Regio-

nen der Kopfbildung kennzeichnet, dem *Hydra*-Homolog des Mesoderm-Markers Brachyury (Hybra1), verglichen werden (siehe auch Hobmayer et al., 2000; Technau et al., 2000).

Die HyWnt-Transkripte sind erstmals nach etwa 24 Std als kleine Expressionsdomänen von nur wenigen Zellen zu erkennen (Abb. 3.4). In der weiteren Entwicklung der Aggregate dehnen sich die Domänen auf etwa 50-60 Zellen aus und bleiben auf die apikale Spitze der auswachsenden Köpfe beschränkt. Die dazwischen liegenden Bereiche bleiben von jeglicher Expression frei. Das Expressionsmuster von Hybra1 gleicht in etwa dem von HyWnt, doch sind die Expressionsdomänen breiter angelegt.

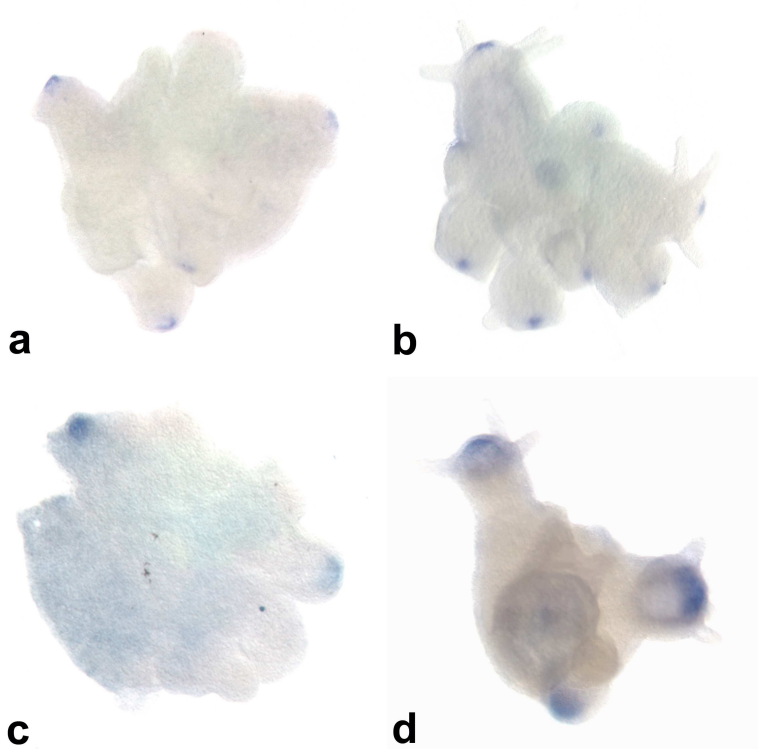


Abb. 3.4:
RNA-InSitu-Hybridisierung mit einer HyWnt- (a und b) und einer Hybra1- (c und d) Sonde in 48 Std (a und c) und 96 Std (b und d) alten Aggregaten. Die Expressionsdomänen beschränken sich auf die apikalen Spitzen der auswachsenden Köpfe (Vergr. 1:20).

3.2 Analysen zur HyβCat-Expression mit den neuen Peptid-Antikörpern

Die InSitu-Hybridisierungen erlauben eine Aussage über die Expression der RNA der untersuchten Gene, nicht jedoch über die intrazelluläre Lokalisation und lokale Funktion ihrer Transkripte. Um die mit der InSitu-Hybridisierung gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen, sollte die intrazelluläre Lokalisation des HyβCat-Proteins mit den neuen Antikörpern detektiert werden.

Nicht einer der getesteten kommerziellen Antikörper gegen verschiedene Fragmente homologer Moleküle aus Mensch oder Maus zeigte eine Kreuzreaktion mit einem Protein aus *Hydra*. Weder in Western-Blot Analysen mit *Hydra*-Zellextrakt noch in Inkubation mit fixiertem Gewebe konnte einer dieser Antikörper mit dem β-Catenin von *Hydra* reagieren. Daher sollten spezifische HyβCat-Antikörper generiert werden. Da sich mit verschiedenen getesteten Proteinexpressionssystemen rekombinantes HyβCat-Protein nicht in ausreichender Menge exprimieren und aufreinigen ließ, um eine Immunisierung für die Gewinnung von Antiseren durchzuführen, wurden schließlich zwei synthetisch hergestellte Peptide für die Immunisierung und spätere Aufreinigung der Seren verwendet.

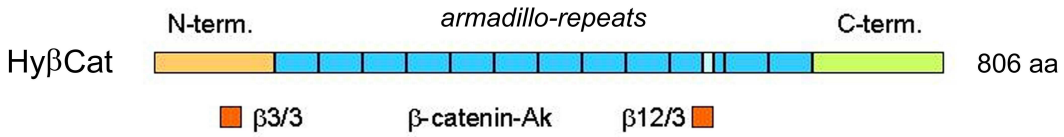


Abb. 3.5:
Es wurden zwei HyβCat-Antikörper generiert, die gegen zwei kurze Peptidsequenzen im N-Terminus (β3/3) bzw. in der zehnten armadillo-Domäne (β12/3) gerichtet sind.

3.2.1 Western-Blot Analysen

Beide HyβCat-Antikörper, die gegen zwei verschiedene Peptidsequenzen aus dem N-Terminus bzw. dem zehnten *armadillo-repeat* von HyβCat generiert wurden (Abb. 3.5), detektieren in einem Western-Blot eine Protein-Bande von etwa 90 kD, was in etwa der erwarteten Größe des HyβCat-Proteins mit 806 Aminosäuren entspricht (Abb. 3.6a).

In einem Kompetitionstest konnte die Spezifität der beiden Antikörpern gegen die Peptidsequenzen überprüft werden (Abb. 3.6b und c). Wenn die Antikörper mit den jeweils spezifischen synthetisierten Peptiden präinkubiert wurden, konnten sie im Westernblot das native HyβCat aus dem *Hydra*-Proteinextrakt nicht detektieren.

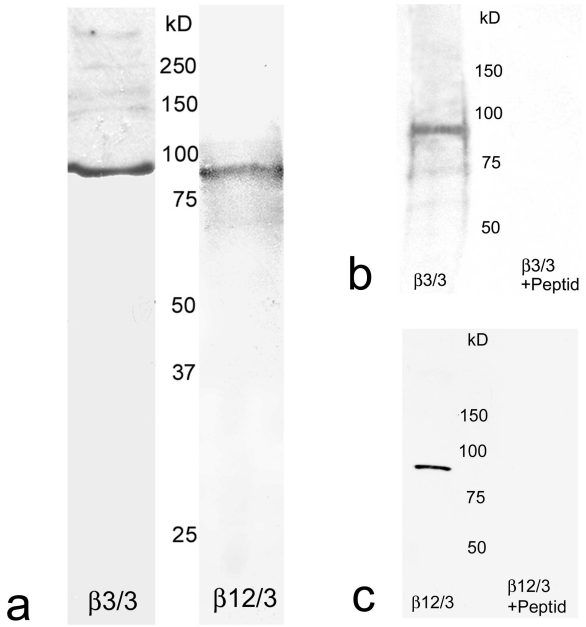


Abb. 3.6:
(a) Die HyβCat-Antikörper β3/3 und β12/3, die gegen verschiedene Epitope des Moleküls generiert wurden, detektieren beide im *Hydra*-Extrakt ein Protein in der erwarteten Größe von HyβCat.
(b und c) Durch Präinkubation der Antikörper mit den spezifischen, für die Immunisierung synthetisierten Peptiden kann die Detek-tion des HyβCat-Proteins inhibiert werden.

3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von HyβCat

In immuncytochemischen Versuchen an fixiertem Gewebe von *Hydra*-Polypen bindet der Antikörper β3/3 an die Zellwände der Epithelzellen (Abb. 3.7). Die Färbung bleibt auf eine schmale Zone von etwa 0,3-0,5 µm am Außenrand der ektodermalen Epithelzellen beschränkt (Abb. 3.7b). In den Präparaten sind die Zellwände gleichmäßig gefärbt. Strukturen, die auf einen Adhäsionskomplex hinweisen, sind nicht zu erkennen. Auch eine lokal verstärkte Expression in verschiedenen Regionen der Polypen ist mit dem Antikörper β3/3 nicht zu erkennen.
Der HyβCat-Antikörper β12/3 zeigt dagegen ein ganz andere Lokalisation (Abb. 3.8). Im fixierten Gewebe detektiert er vor allem die Zellkerne der ektodermalen Epithelzellen im Rumpf der Polypen. Hier initiiert β-Catenin gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor Tcf und anderen Kotranskriptionsfaktoren die Expression von verschiedenen Zielgenen. In den Tentakeln der Polypen ist mit dem Antikörper β12/3 kein HyβCat in den Zellkernen zu detektieren (Abb. 3.8 a und d). Vereinzelt sind in den Präparaten auch Zellgrenzen zu erkennen (Abb. 3.8e), jedoch weniger deutlich als mit dem Antikörper β3/3. In Regionen, die in der InSitu-Hybridisierung eine erhöhte Konzentration der HyβCat-RNA zeigen, wie etwa im Hypostom (Abb.

3.8d) oder in den auswachsenden Knospen, ist keine stärkere Expression des Proteins zu erkennen.

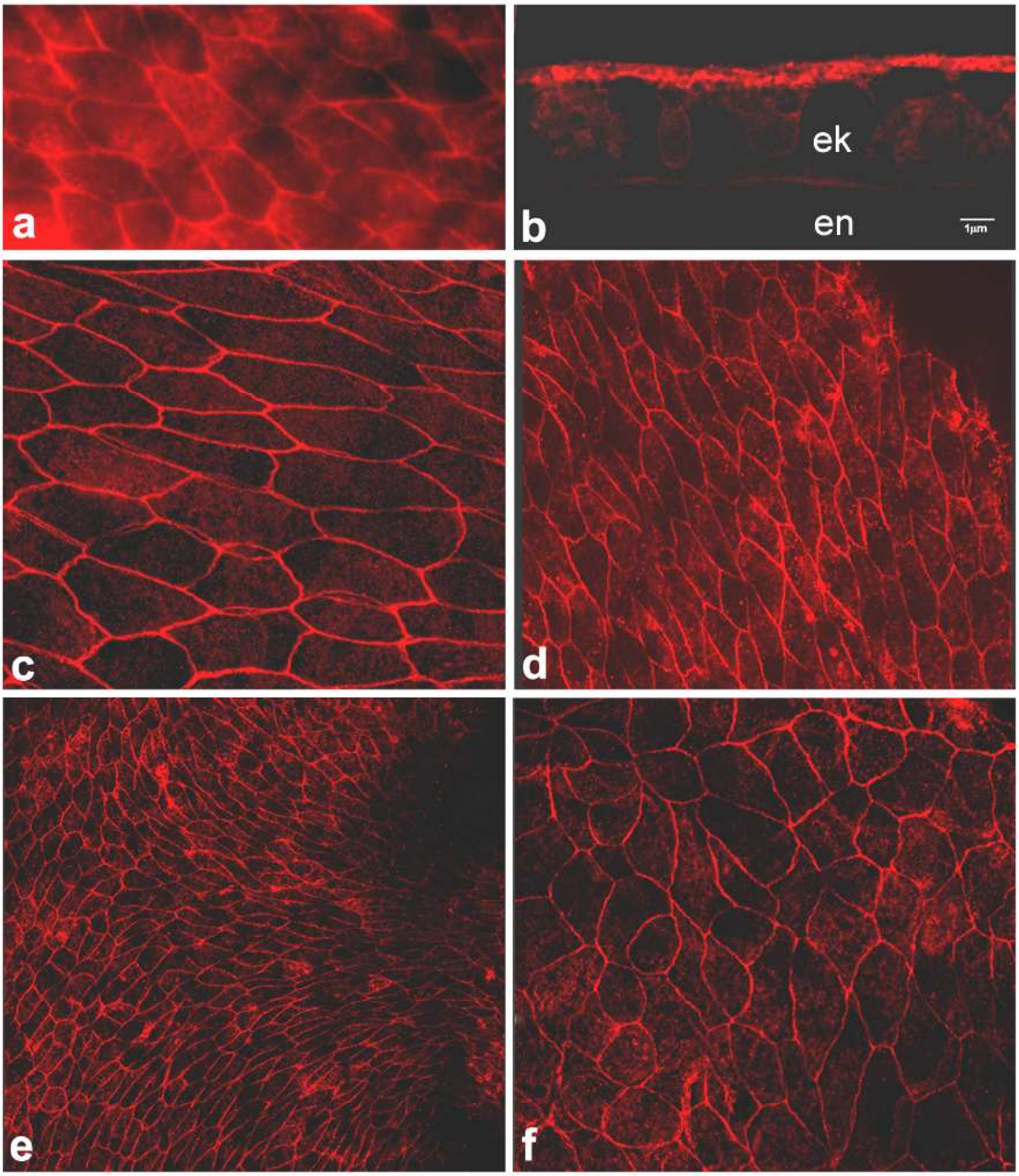


Abb. 3.7:
Der HyβCat-Antikörper β3/3 detektiert in fixiertem *Hydra*-Gewebe die Zellgrenzen.
Eine Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop (a) zeigt eine hohe Hintergrundfärbung, die sich in Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, b-f) reduzieren läßt. Im Querschnitt (b) bleibt die Detektion auf die apikalen Zellgrenzen der ektodermalen Epithelzellen (ek) beschränkt. Im Endoderm (en) zeigt der Antikörper keine Färbung. Die Zellgrenzen sind gleichmäßig gefärbt. Eine lokal verstärkte Expression, etwa im Bereich der Knospenbildung (e), ist nicht zu erkennen (Vergr. 1:5000).

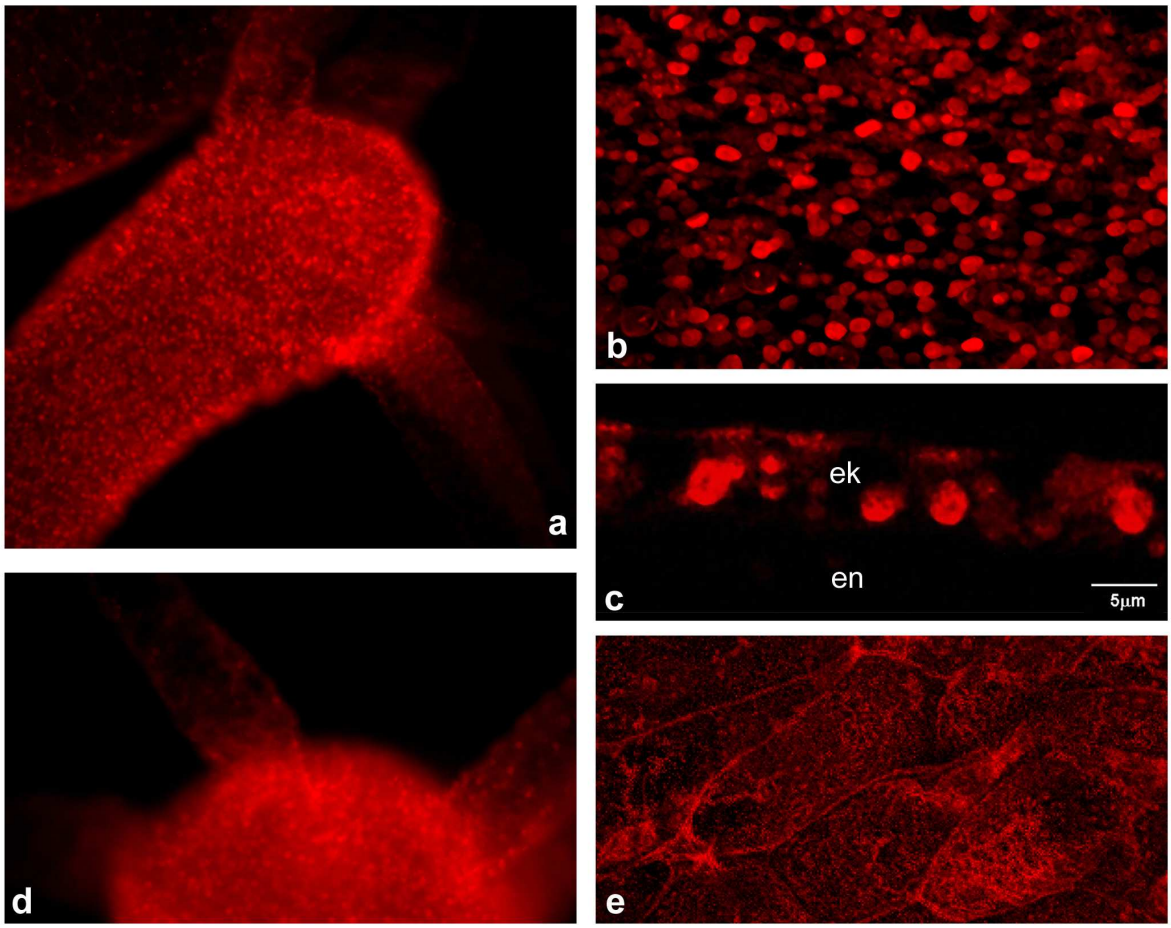


Abb. 3.8:
Der HyβCat-Antikörper β12/3 zeigt eine gleichmäßige Anfärbung der Zellkerne über den gesamten Rumpf der Polypen, nicht aber in den Tentakeln (a, b und d). Im Querschnitt (c) beschränkt sich die Lokalisation auf das Ektoderm (ek). Vereinzelt sind auch schwach die apikalen Zellgrenzen zu erkennen (e). (a und d, 1:50) Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop, (b, c und e, 1:500 bzw. 1:5000) CLSM-Aufnahmen.

Um die Funktion von HyβCat während des Reaggregationsprozesses auch auf Proteinebene verfolgen zu können, wurden immunocytochemische Untersuchungen an Aggregaten durchgeführt. Die in Polypen detektierten Lokalisationen von HyβCat lassen sich auch in den Aggregaten reproduzieren. Bereits in 24 Std alten Aggregaten sind mit dem Antikörper β3/3 deutlich Zellgrenzen zu erkennen, die in der weiteren Entwicklung der Aggregate an Expressionsstärke zunehmen (Abb. 3.9). Das deutet darauf hin, dass die Epithelbildung schon in den ersten 24 Std der Aggregation erfolgt.

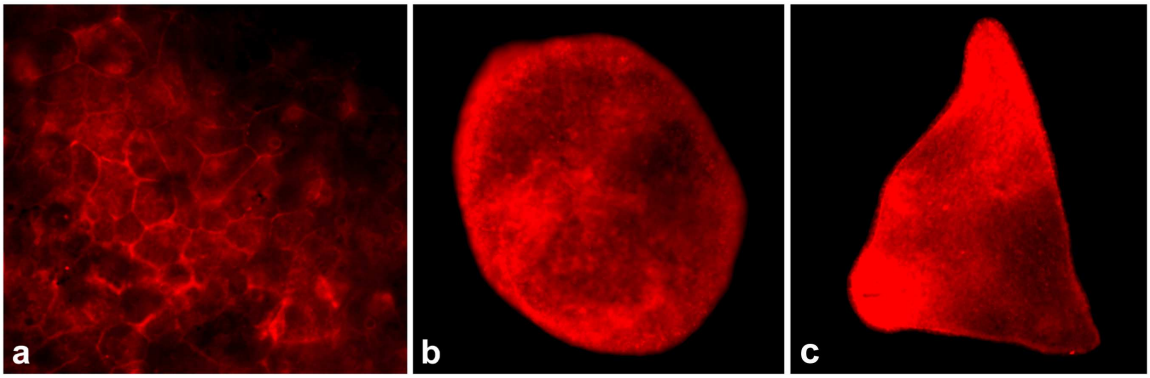


Abb. 3.9:
Der HyβCat-Antikörper β3/3 erkennt schon in 24 Std alten Aggregaten apikale Zellgrenzen (a und b), die in der weiteren Entwicklung der Aggregate zunehmen (c, 48 Std).Vergr. 1:100 (a) und 1:20 (b).

Mit dem Antikörper β12/3, der HyβCat in den Zellkernen lokalisiert, ist in 24 Std alten Aggregaten eine gleichmäßige Verteilung zu erkennen (Abb. 3.10a und b). Eine regionale Aufregulierung von HyβCat, etwa im Bereich der auswachsenden Köpfe, ist auch in älteren Aggregaten mit beiden Antikörpern nicht eindeutig zu detektieren (Abb. 3.10c und 3.11c). Allerdings ist gerade die Färbung der Zellgrenzen nur vereinzelt und in einer hohen Auflösung mit dem Mikroskop zu erkennen (Abb. 3.10a). Ein Grund könnte in der stark gewölbten und ungleichmäßigen Oberfläche sowie der hohen Zelldichte der sehr kompakten Aggregate liegen.

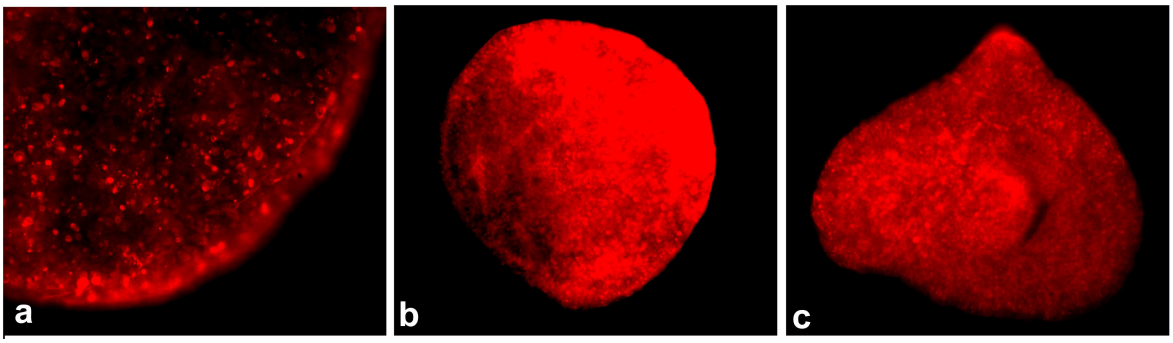


Abb. 3.10:
Der Antikörper β12/3 lokalisiert HyβCat in den Zellkernen. (a und b) 24Std, (c) 48 Std. Eine regionale Aufregulierung ist nicht eindeutig zu erkennen (Vergr. 1:100 und 1:20).

In den Präparaten ist mit beiden Antikörpern sowohl in den Polypen wie in den Aggregaten eine hohe Hintergrundfärbung zu sehen. In Kontrollpräparaten, die mit präinkubierten Antikörpern behandelt wurden, ist dieser Hintergrund auch zu erkennen, nur fehlt hier die spezifische Färbung (keine Abbildung). Um eine möglichst kontrastreiche Auflösung der Aufnahmen zu erreichen, wurde auch mit ei-

nem konfokalen Lasermikroskop der Fa. Leica mit zugehöriger Software gearbeitet, das eine starke Reduzierung des Hintergrundes ermöglicht. Dadurch könnte aber unter Umständen auch die Detektion einer schwachen Expression ebenso wie bei einer hohen Hintergrundfärbung verloren gehen.

Obwohl die beiden HyβCat-Antikörper so unterschiedliche Resultate ergeben, liefern sie doch gemeinsam deutliche Hinweise auf die in höheren Metazoen bekannte duale Funktion von β-Catenin, auf seine Einbindung in den Cadherin vermittelten Adhäsionskomplex sowie als transkriptionsaktivierendes Glied der Wnt-Signalkaskade.

3.3 Expressionsanalysen von *Hydra*-Cadherin

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde von Kerstin Kuhn ein *Hydra*-Cadherin als Interaktionspartner von HyβCat isoliert und die Sequenz von Barbara Kostron vollständig ermittelt (Abb. 3.14). Das Molekül HyCadh besitzt 4412 Aminosäuren und in seiner extrazellulären Domäne die außergewöhnlich hohe Zahl von 31 *Cadherin-repeats.* Daneben weist der extrazelluläre Bereich eine Abfolge von Motiven auf, wie sie bei verschiedenen klassischen Cadherinen niederer Metazoa gefunden wird. Dazu gehören eine Nichtchordaten-Domäne, eine LamininA-ähnliche Domäne sowie eine Cystein-reiche Domäne. Weitere charakteristische Merkmale sind eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne mit den konservierten Bindungsdomänen für β- und δ-Catenin (Kostron et al., eingereichte Arbeit).

Erste von Frau Kostron an adulten Polypen durchgeführte RNA-Expressionsanalysen wurden in dieser Arbeit bestätigt und ergänzt. Die RNA-InSitu-Hybridisierung mit einer HyCadh-Sonde zeigte eine sehr schwache Expression in den ektodermalen Epithelzellen des Rumpfes. In den Epithelzellen der Tentakeln ist die HyCadh-Expression dagegen sehr hoch. Eine ebenfalls erhöhte Expression ist in den Nematocyten des Rumpfes zu sehen. Dabei zeigen nur die noch nicht differenzierten, in Nestern angeordneten Nesselzellen sowie die bereits differenzierten aber noch zwischen den Epithelzellen wandernden und dort noch nicht verankerten Nematocyten eine Färbung. Während der Knospung kommt es zu

keiner Aufregulierung in den Epithelzellen, erst in den auswachsenden Tentakeln ist eine erhöhte Expression zu erkennen.

Die Aufregulierung von HyβCat-RNA in Kopfregeneraten und in Aggregaten könnte nicht nur durch seine Funktion im Musterbildungsprozess sondern auch durch die Notwendigkeit begründet sein, vermehrt Adhäsionsmoleküle zu exprimieren. In Kopfregenraten muss zunächst die durch das Abschneiden des Kopfes verursachte Wunde geschlossen werden. In Aggregaten müssen sich Einzelzellen zusammenfügen und Zell-Zellverbindungen bilden. Eine vergleichende Expressionsanalyse mit HyCadh sollte mehr Klarheit bringen.

3.3.1 Untersuchungen zur Expression von HyCadh-RNA in Regeneraten und Aggregaten

Eine Untersuchung mit einer HyCadh-Sonde zeigte keine gesteigerte Expression in den frühen Stadien der Kopfregeneration (Abb. 3.11).

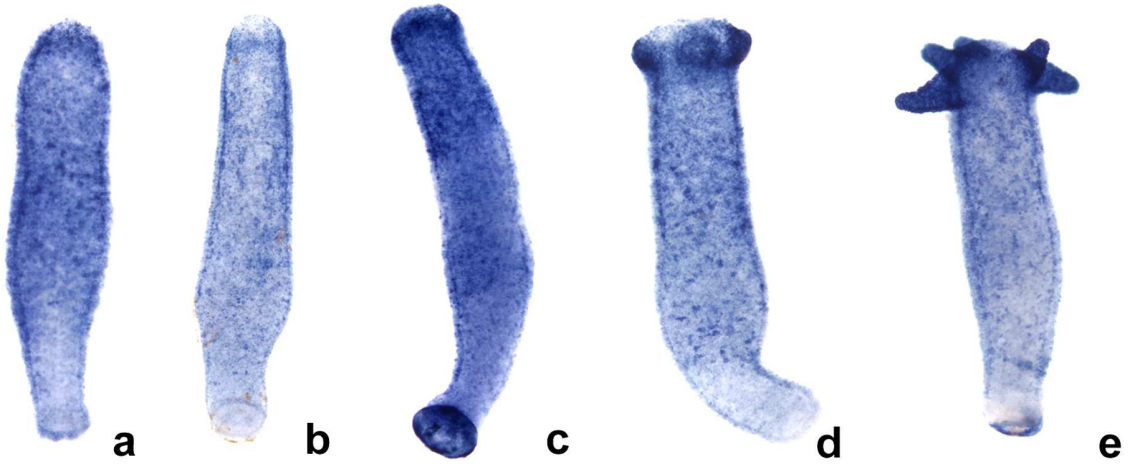


Abb. 3.11:
HyCadh-RNA-Expression in einer Reihe von Kopfregeneraten: (a) 2 Std, (b) 6 Std, (c) 12 Std, (d) 24 Std und (e) 48 Std. HyCadh ist in der regenerierenden Spitze nicht aufreguliert (Vergr. 1:10).

Wie im Rumpf intakter Polypen bleibt im Gewebe der regenerierenden Spitzen das Expressionsniveau in den Epithelzellen unverändert niedrig. Die Ansätze der neu auswachsenden Tentakeln sind durch die lokal eng begrenzte erhöhte Transkription in den Epithelzellen zu erkennen, die in den Tentakeln der vollständig regenerierten Köpfe unvermindert hoch bleibt.

In Aggregaten zeigte die InSitu-Hybridisierung in frühen Stadien der Reaggregation eine gleichmäßig hohe Expression, die in späteren Stadien abnimmt (Abb. 3.12). Erst wenn die Tentakelansätze der auswachsenden Köpfe zu erkennen sind, ist wie in den Kopfregeneraten eine verstärkte Expression in den Epithelzellen zu sehen. Eine Aufregulierung über eine größere Domäne von zusammenhängenden Zellen, die den Bereich der auswachsenden Polypen markieren, ist aber nicht zu erkennen. HyCadh zeigt also in allen Stadien der Aggregation eine homogene Expression und nicht das in HyβCat beobachtete *domain restriction* Verhalten.

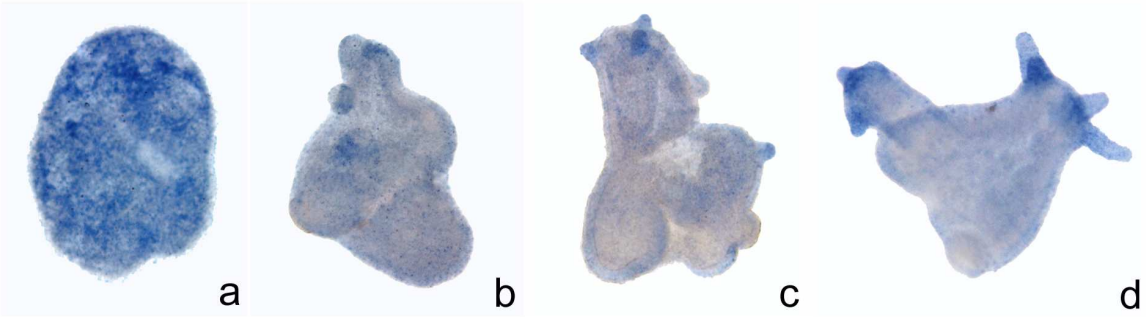


Abb. 3.12:
HyCadh-Transkription in (a) 24 Std, (b) 48 Std, (c) 72 Std und (d) 96 Std alten Aggregaten. Die anfänglich gleichmäßig hohe Expression (a) verschwindet bald und erscheint erst wieder in den auswachsenden Tentakeln (Vergr. 1:20).

3.3.2 HyCadh-Expressionsuntersuchungen an dem hitzesensitiven Stamm sf-1

In der hitzesensitiven Mutante sf-1 des Stammes *H. magnipapillata* können durch eine Hitzeschockbehandlung die interstitiellen Stammzellen eliminiert und damit die resultierenden Differenzierungsprodukte (Nervenzellen, Nematocyten und Drüsenzellen) sukzessive vermindert werden (Sugiyama und Fujisawa, 1978). Führt man mit hitzebehandelten sf-1 Tieren Regenerationsexperimente durch, so ist die Regenerationsfähigkeit der Tiere nicht eingeschränkt, doch ist in einer RNA-InSitu-Hybridisierung im Rumpf der Tiere eine HyCadh-Expression nur noch in den wenigen verbliebenen Nematocyten zu erkennen (Abb. 3.13). Die Expression in den Epithelzellen bleibt dagegen erhalten. So zeigen die Tentakeln wie in unbehandelten Tieren eine erhöhte Expression.

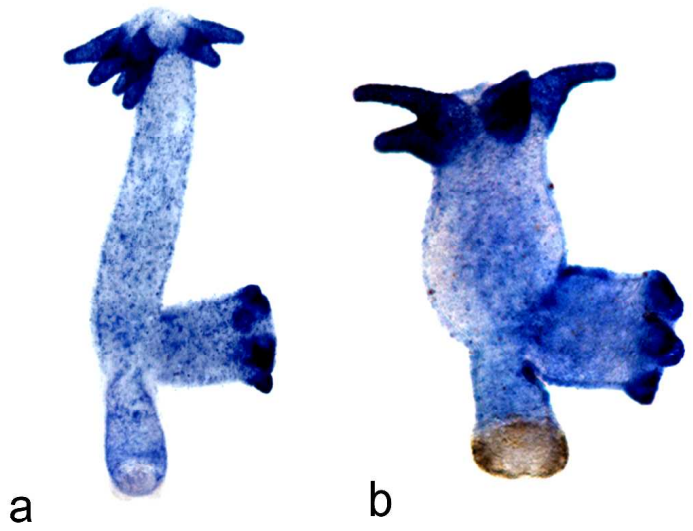


Abb. 3.13:
HyCadh-Transkription in 72 Std alten Regeneraten des hitzesensitiven Stammes *H. magnipapillata* sf-1 ohne (a) und mit (b) vorausgegangener Hitzeschockbehandlung zur Eliminierung der interstitiellen Stammzellen. (Vergr. 1:20)

3.4 HyCadh-Antikörper

Da in *Hydra* klassische Adhäsionskomplexe bisher noch nicht detektiert werden konnten, sollte mit einem spezifischen Antikörper gegen HyCadh die intrazelluläre Lokalisation des Moleküls festgestellt und bei einer Kolokalisation mit HyβCat mögliche Adhäsionskomplexe detektiert werden. Da kein kommerzieller Antikörper zur Verfügung stand, der mit HyCadh kreuzreagierte, wurde auch für dieses Molekül ein spezifischer Peptidantikörper hergestellt. Der Antikörper ist gegen ein Peptid von sechzehn Aminosäuren aus dem mittleren Bereich der intrazellulären Domäne von HyCadh gerichtet, das im wenig konservierten Bereich zwischen den Bindungsdomänen für β- und δ-Catenin liegt (Abb. 3.14).

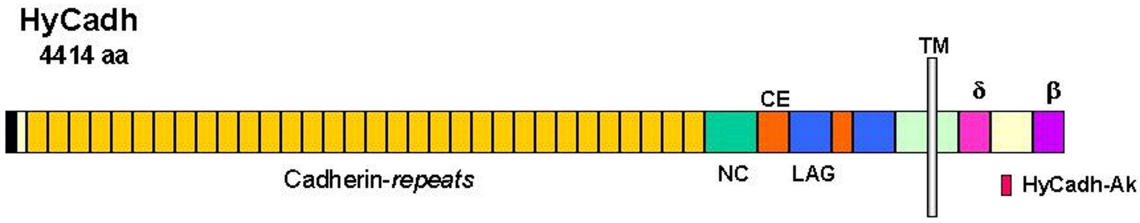


Abb. 3.14:
HyCadh weist in seinem extrazellulären Bereich die außergewöhnlich hohe Zahl von 31 Cadherin-*repeats* auf sowie ein für primitive klassische Cadherine typisches Motiv, bestehend aus einer Nichtchordatendomäne (NC) und LamininA-ähnlichen (LAG) und Cystein reichen (CE) Domänen. Im cytoplasmatischen Teil des Moleküls schließen sich an die Transmembrandomäne (TM) die Bereiche der JMD (*juxtamembrane domain*, δ) mit der Bindungsdomäne für das δ-Catenin und die Cateninbindungsdomäne (CBD, β) an, die mit β-Catenin interagiert. Für den HyCadh-Antikörper wurde eine Peptidsequenz gewählt, die zwischen diesen beiden hochkonservierten Domänen liegt (HyCadh-Ak).

In einem Western-Blot detektiert der HyCadh-Antikörper zwei hochmolekulare Banden im Bereich von etwa 270 kD und 150 kD sowie eine weitere Bande bei 55 kD (Abb. 3.15). In einem Kompetitionstest, bei dem der Antikörper zuvor mit dem synthetischen Peptid inkubiert wurde, werden diese Proteinbanden nicht erkannt. HyCadh kann von dem Antikörper im Western-Blot nicht als einzelne hochmolekulare Proteinbande von über 400 kD detektiert werden, vielmehr erscheinen drei Fragmente, die mit dem Antikörper kreuzreagieren. Da diese Banden im Kompetitionstest ausbleiben, muss es sich um spezifische Antikörperbindungen handeln. Der Peptidantikörper erkennt ein nur relativ kleines Fragment aus der cytoplasmatischen Domäne des hochmolekularen HyCadh-Moleküls. Es ist daher nicht auszuschließen, dass noch weitere Fragmente existieren, die nicht detektiert werden konnten.

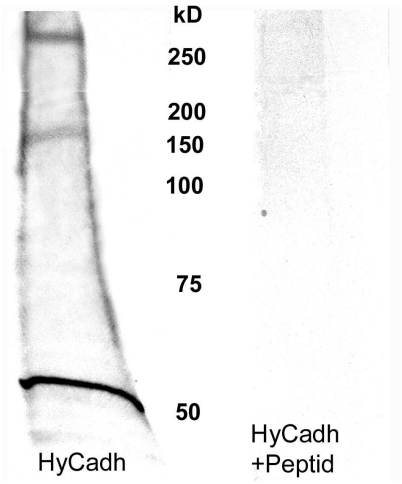
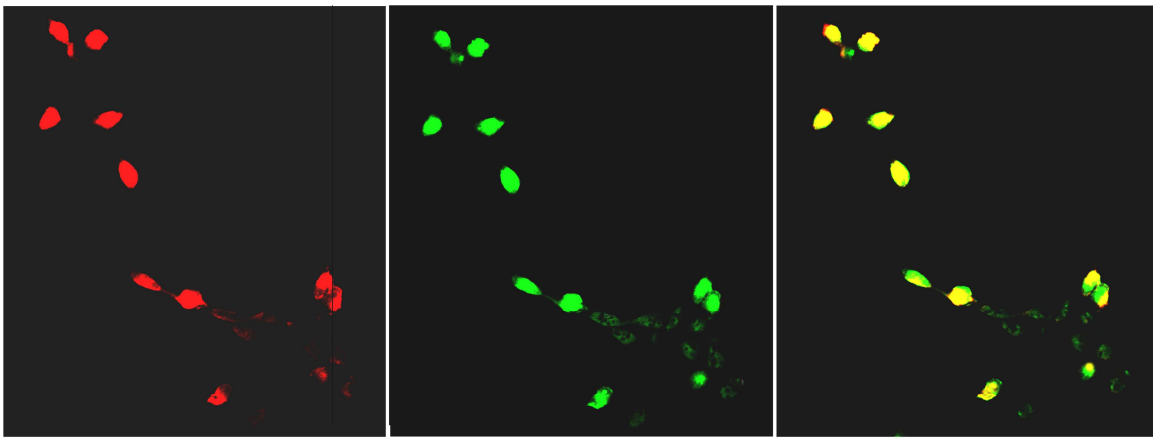


Abb. 3.15:
Westernblot-Analyse mit dem HyCadh-Antikörper. Im Hydra-Zellextrakt detektiert der Antikörper drei Fragmente, die in einem Kompetitionstest nach Präinkubation mit dem spezifischen Peptid nicht erkannt werden.

3.4.1 Rekombinant exprimiertes HyCadh

In Zellkultur konnte in Zusammenarbeit mit Barbara Kostron und Anne Lehmkuhl die cytoplasmatische Domäne des HyCadh rekombinant in 293-EBNA-Zellen (Fa. Invitrogen) exprimiert werden. Das HyCadh-Fragment wurde dabei so in den modifizierten pCEP-Pu Expressionsvektor (Kohfeldt et al., 1997) kloniert, dass bei erfolgreicher Transkription eine Erkennungssequenz (RGSHHHHHH) koexprimiert wird, die mit einem spezifischen His-Antikörper nachgewiesen werden kann.

Tranzfizierte und induzierte Zellen wurden auf Objektträger fixiert und eine Detektion mit dem (Kaninchen-)HyCadh-Antikörper und dem (Maus-)His-Antikörper durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle Zellen, die für den HyCadh-Antikörper positiv waren, auch mit dem His-Antikörper detektiert werden konnten (Abb. 3.16). Die Signalstärke ist in beiden Fällen gleich hoch. Da die Zellen von dem His-Antikörper nur erkannt werden können, wenn sie das HyCadh-Fragment exprimieren, detektiert der HyCadh-Antikörper die cytoplasmatische Domäne des Moleküls in den 293-Zellen.



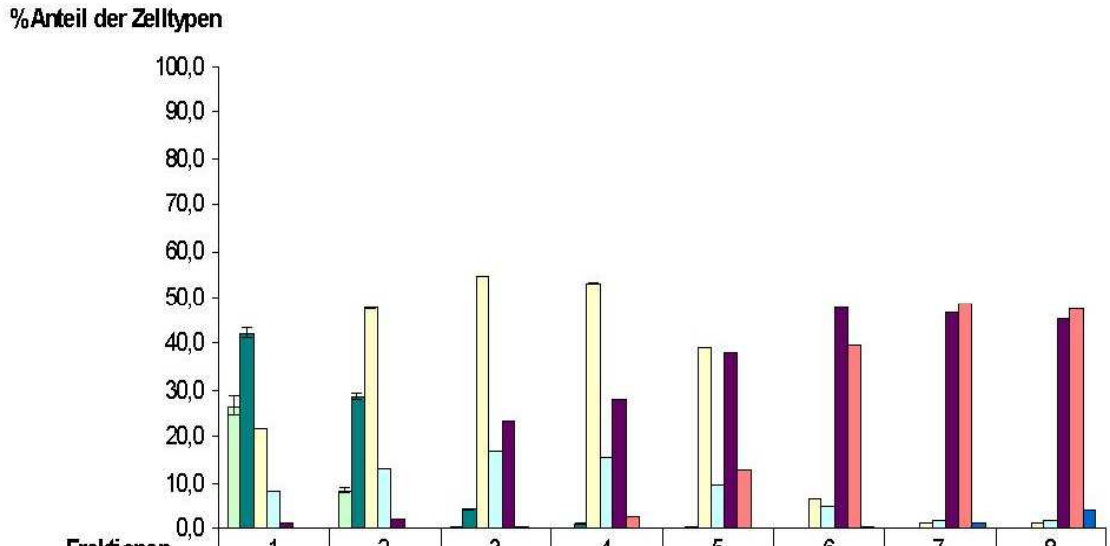
HyCadh His HyCadh/His

Abb. 3.16:
Die in Zellkultur rekombinant exprimierte und mit einem Poly-His-Ende markierte cytoplasmatische Domäne von HyCadh wird von dem HyCadh- und einem Anti-His-Antikörper mit der gleichen Signalstärke detektiert.

3.4.2 Zelltyp-Western

Mit der Gegenfluss-Zentrifugation-Elutriation Methode können dissoziierte *Hydra*-Zellen nach ihrer Größe in Fraktionen aufgetrennt werden. Hier wurden die Zellen in acht Fraktionen aufgetrennt und die Verteilung der unterschiedlichen Zelltypen mikroskopisch ausgewertet. Nervenzellen und interstitielle Zellen sind vor allem in den ersten drei Fraktionen enthalten, Nematocyten finden in der Verteilung ihr Maximum in den Fraktionen drei bis fünf, dagegen sind die relativ großen ekto- und endodermale Epithelzellen in den hinteren Fraktionen vertreten. Wie die Abbildung der Auswertung (Abb. 3.17) zeigt, streuen alle Zelltypen über mehrere Fraktionen. Die starke Streuung der Nematocyten ist bedingt durch die Interferenz

ihrer hohen Masse, die hier neben der Zellgröße zu einem weiteren wichtigen Parameter bei der Auftrennung wird.



Fraktionen	1	2	3	4	5	6	7	8
% Nerven	26,7	8,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
% I-Zellen	42,3	28,9	4,4	1,0	0,3	0,1	0,0	0,0
%Nemat.	21,7	47,8	54,6	53,0	39,5	6,7	1,4	1,1
%Drüsenz.	8,1	13,0	16,7	15,6	9,3	4,8	1,8	1,7
%Ektos	1,2	2,0	23,4	28,1	38,3	48,1	46,9	45,6
%Endos	0,0	0,2	0,5	2,4	12,7	40,0	48,9	47,5
%Batteriez.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,1	4,2

Abb. 3.17: Verteilung der Zelltypen auf die Fraktionen der Elutriation. Nerven- und interstitielle Zellen (I-Zellen), Nematocyten (Nemat.), Drüsenzellen (Drüsenz.), ekto- (Ektos) und endodermale (Endos) Epithelzellen sowie Batteriezellen (Batteriez., Verbände von Nesselzellen) reichern sich nach ihrer Größe und Masse in verschiedenen Fraktionen der Elutriation an.

Von den einzelnen Fraktionen wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und davon Proben gleicher Konzentration auf einem Proteingel aufgetrennt. Der anschließende Western-Blot wurde mit dem HyCadh-Antikörper detektiert (Abb. 3.18). Die Proteinbanden bei 55 kD, 150 kD und 270 kD werden wie in der Kontrollprobe mit unbehandelten Tieren (wm) in den ersten vier Zelltyp-Fraktionen detektiert. Vor allem die Bande bei 55 kD ist stark exprimiert, in den Fraktionen fünf bis acht fehlt hingegen diese Bande. In Fraktion acht erscheint dafür neben den hochmolekularen Banden eine Bande bei 45 kD, die schwach exprimiert auch schon in den Fraktionen eins bis vier erscheint, nicht jedoch bei der unbehandelten Proteinprobe. Die zusätzlich auftretende Bande ist womöglich ein weiteres

Fragment, das durch die Prozedur der Elutriation, etwa durch den Pronase E-Verdau zu Beginn der Dissoziation, entstanden sein könnte.

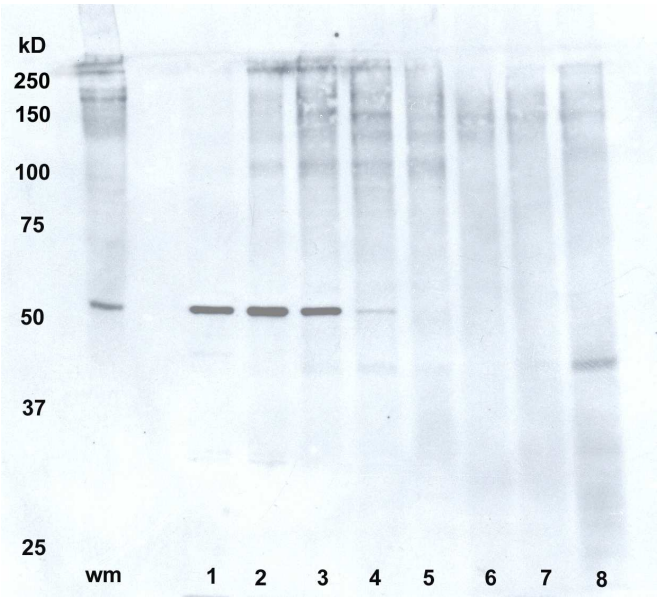


Abb. 3.18:
Zelltyp-Westernblot mit den Elutriationsfraktionen und dem HyCadh-Antikörper. Die in den ganzen Polypen (wm) detektierten Proteinbanden werden vor allem in den Fraktionen 1-3 erkannt, in denen Nervenzellen ihre maximale Verteilung aufweisen.

Die stärkste Kreuzreaktion zeigt der HyCadh-Antikörper im Zelltyp-Western-Blot mit den Fraktionen eins bis drei, in denen die Nervenzellen und interstitiellen Zellen ihr Maximum aufweisen. In den Fraktionen, in denen die ektodermalen Epithelzellen ihre maximale Verteilung aufweisen, ist hingegen keine vergleichbar hohe Kreuzreaktion zu sehen. Der HyCadh-Antikörper detektiert demnach ein Molekül, das in neuronalen Zellen, nicht jedoch in den Epithel- oder interstitiellen Zellen exprimiert wird.

3.4.3 Immuncytochemische Analysen mit dem HyCadh-Antikörper

Um die Spezifität des HyCadh-Antikörpers für neuronale Zellen zu überprüfen, wurden Immuncytochemische Untersuchungen an fixiertem *Hydra*-Gewebe durchgeführt (Abb. 3.19 und 3.20). Über den gesamten Polypen detektiert der Antikörper verschiedene Nervenzelltypen (Abb. 3.19a). Im Rumpf, den Tentakeln (Abb. 3.19 c und d) und in der Fußscheibe (Abb. 3.20k) wird ein dichtes Netz von Ganglionzellen angefärbt. Auch in den auswachsenden Knospen sind Nervenzellen zu erkennen, die aber noch keine weite Vernetzung aufweisen (Abb. 3.20j). Im Hypostom sowie in den Tentakeln werden dazu epidermale sensorische Zellen erkannt (Abb. 3.20f-i). Dagegen werden einzelne Nematocyten oder Nema-

toblastennester, die in der RNA-InSitu-Hybridisierung gefärbt wurden, von dem Antikörper nicht detektiert.

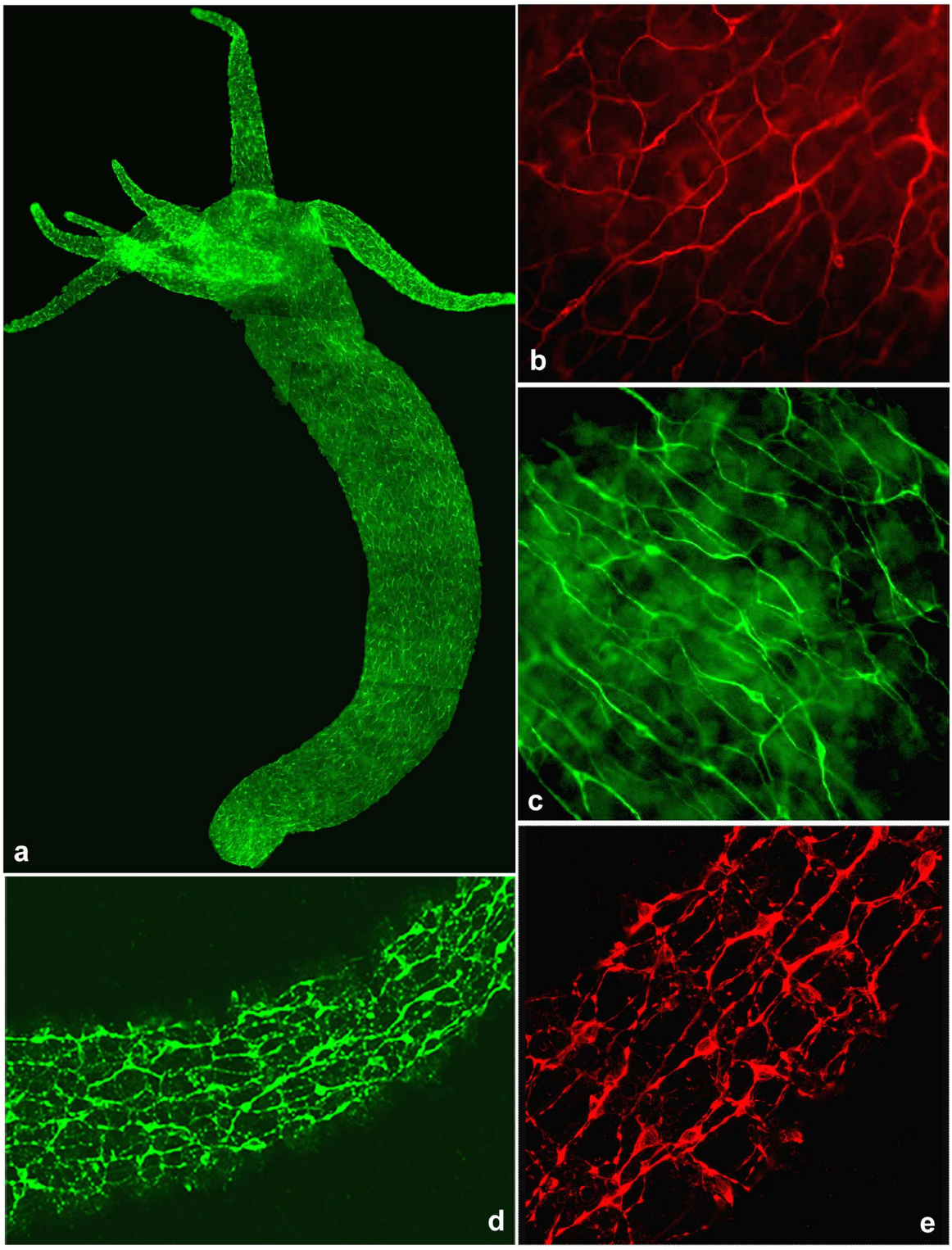


Abb. 3.19:
Immuncytochemische Analysen an fixiertem *Hydra*-Gewebe mit dem HyCadh-Antikörper. (a) Über den gesamten Polypen detektiert der Antikörper ein dichtes Nervennetz. (b und c) Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop aus dem Rumpfbereich, (d und e) CLSM-Aufnahmen von Tentakeln (Vergr. 1:20 (a) und 1:200 (b-e).

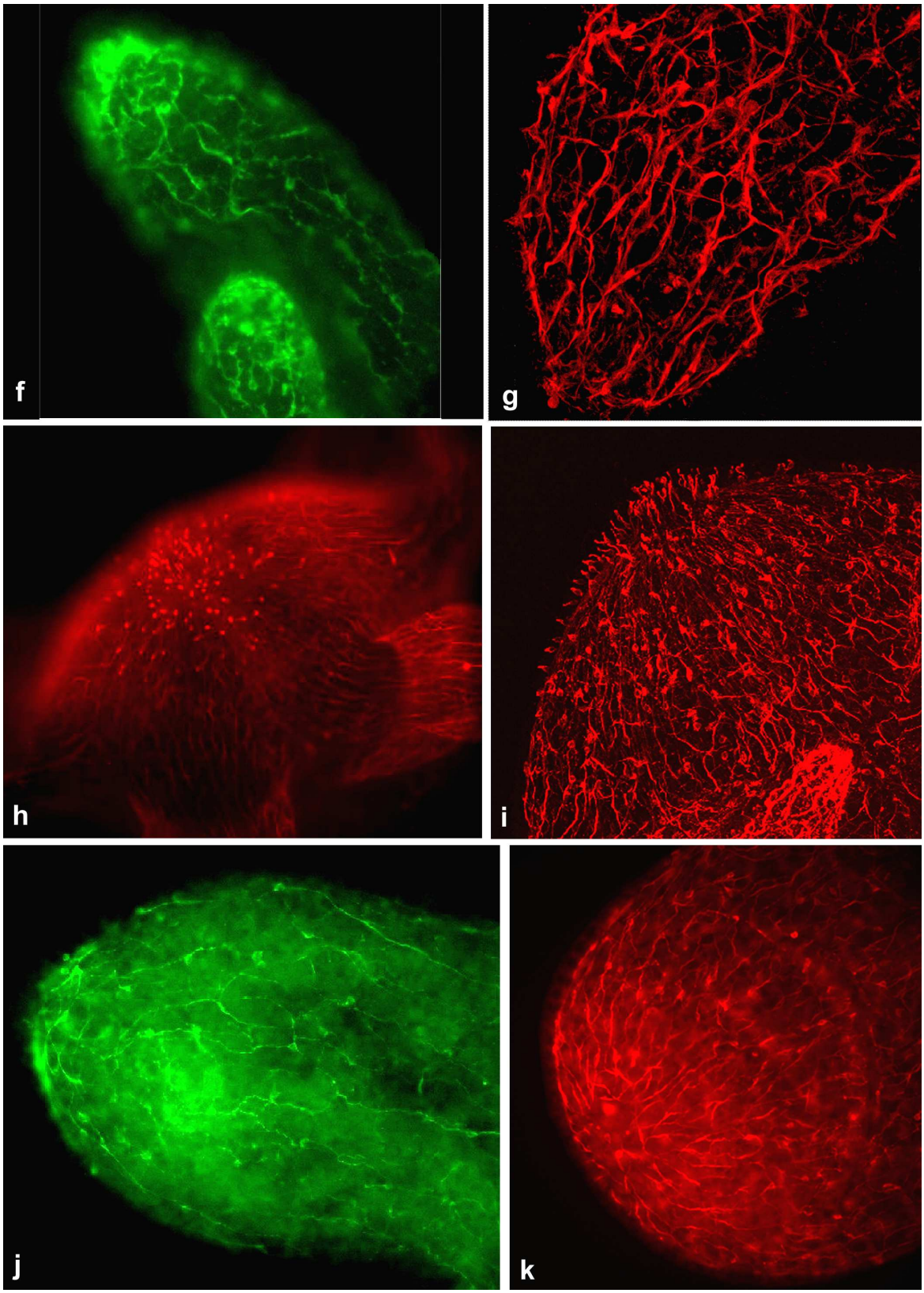


Abb. 3.20:
HyCadh-Antikörperfärbungen an fixiertem *Hyda*-Gewebe. In den Tentakelspitzen (f und g) sind vereinzelt sensorische Zellen zu erkennen, die im Hypostom (h und i) vermehrt auftreten. Auch in der auswachsenden Knospe (j) und in der Fußscheibe (k) wird ein dichtes Netz von Nervenzellen angefärbt. (f, h, j und k) Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop, (g und i) CLSM-Aufnahmen (Vergr. f,g und i 1:200, h und k 1:100, j 1:40).

Da der HyCadh-Antikörper alle Nervenzellen in *Hydra* zu erkennen schien, wurde die Beobachtung durch eine Doppeldetektion mit einem zweiten für *Hydra*-Nervenzellen spezifischen Antikörper überprüft (Abb. 3.21 und 3.22). Der monoklonale Antikörper Nerv-1 detektiert in *Hydra vulgaris* nur einzelne Populationen von Nervenzellen im Kopfbereich und in den Tentakeln (Hobmayer et al., 1990 a und b). In der Doppelfärbung zeigt es sich, dass der HyCadh-Antikörper nicht alle Nervenzellen detektiert. So bleiben die meisten Nerv-1-positiven Ganglionzellen im Rumpf und in den Tentakeln vom HyCadh-Antikörper unerkannt (Abb. 3.21g-i, 3.22j-l und m-o). Vielmehr hat es den Anschein, als lägen die Nerv-1-positiven Zellen wie ein Netz um die im Gewebe tiefer gelegenen und weiter verzweigten HyCadh-positiven Zellen. Vereinzelt sind Kontakte zwischen diesen zwei Nervennetzen zu erkennen. Einzelne Zellkörper scheinen von beiden Antikörpern erkannt zu werden, wobei die zugehörigen Axone hingegen nur von einem Antikörper detektiert werden. Dann wieder scheinen HyCadh- und Nv1-positive Zellen parallel zueinander zu liegen, ohne sich zu berühren. Interessanterweise werden in den verschiedenen Körperregionen von den Antikörpern sowohl Ganglion- als auch sensorische Zellen detektiert. So werden im Hypostom weit mehr sensorische Zellen vom HyCadh-Antikörper erkannt als vom Nv-1-Antikörper (Abb. 3.21a-c und d-f). In den Tentakelspitzen ist das Verhältnis umgekehrt, hier sind die meisten sensorischen Zellen Nv-1-positiv und werden von dem HyCadh-Antikörper nicht erkannt (Abb. 3.22p-r). In beiden Fällen treten aber Zellen auf, die von beiden Antikörpern detektiert werden.

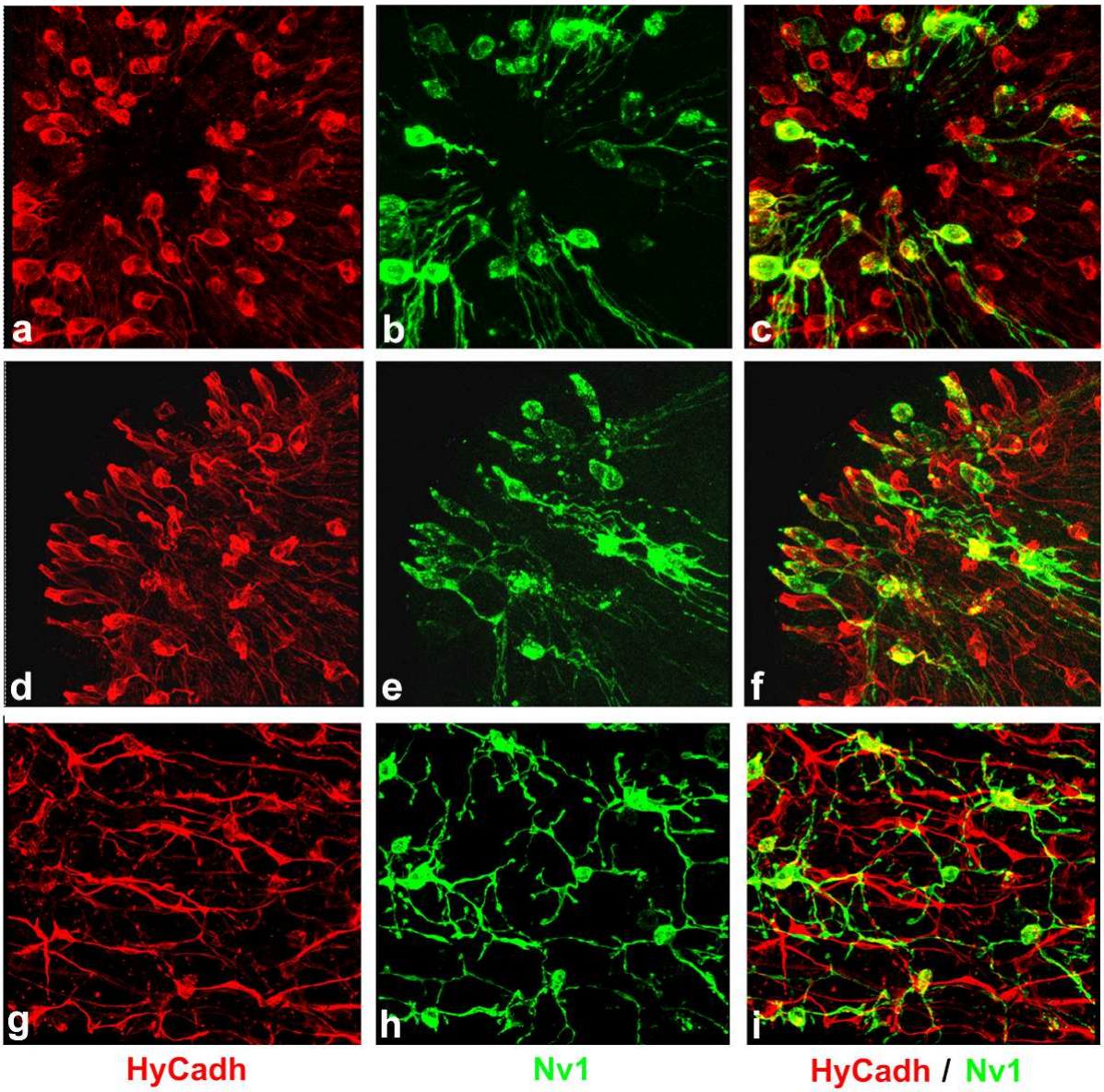


Abb. 3.21:
Doppelfärbungen mit dem HyCadh-Antikörper (rot) und dem für Hydra-Nervenzellen spezifischen Antikörper Nerv1 (Nv1, grün). Im Hypostom (a-c und d-f) werden die meisten sensorischen Zellen von dem HyCadh-Antikörper detektiert, nur wenige Zellen sind für beide Antikörper positiv. (g-i) Die Nv1-positiven Zellen spannen sich über die im Gewebe tiefer gelegenen HyCadh-positiven Nervenzellen (Vergr. 1:200)

Der gegen ein kurzes Fragment aus der cytoplasmatischen Domäne von HyCadh gerichtete Antikörper detektiert demnach eine Vielzahl von Nervenzellen verschiedener Typen. Auffallend ist, dass mit dem HyCadh-Antikörper keine Lokalisation in den Nematocyten oder Epithelzellen zu erkennen ist. So ist auch keine Kolokalisation mit dem HyβCat-Antikörper β3/3 festzustellen, die einen Hinweis auf mögliche Adhäsionskomplexe in *Hydra* geben könnte.