

**Axiales Patterning und seine Steuerung in der Embryogenese eines
basalen Metazoen, *Hydractinia echinata***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Timo Künzel

aus Köln

Köln 2019

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Plickert
Prof. Dr. S. Roth
PD. Dr. M. Kroiher

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2019

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei (1564-1642)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 <i>Hydractinia echinata</i>	4
1.1.1 Morphologie und Lebenszyklus von <i>Hydractinia echinata</i>	4
1.2 Haushaltsgene	6
1.3 Entwicklungskontrollgene in der Muster- und Gestaltbildung	9
1.4 Neuronspezifische Gene	15
1.5 Zielsetzungen der Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen	20
2.1.2 Versuchsorganismus	20
2.1.2.1 Haltung und Zucht des Versuchstieres <i>Hydractinia echinata</i>	20
2.1.2.2 Induktion der Eiablage und Gewinnung von Zygoten	21
2.1.3. Nährmedien und -böden für Bakterien	21
2.1.3.1 LB-Medium	21
2.1.3.2 LB-Agarplatten	21
2.1.4 Bakterien und Plasmide	21
2.1.4.1 Bakterien	21
2.1.4.2 Plasmide	22
2.1.5 Enzyme und Oligonukleotide	23
2.1.5.1 Enzyme	23
2.1.5.2 Oligonukleotide	25
2.1.6 Molekulargewichtsstandards und Kits	35

2.1.6.1 Molekulargewichtsstandards	35
2.1.6.2 Kits	36
2.1.7. Geräte, Computer und Computerprogramme	36
2.1.7.1 Geräte	36
2.1.7.1.1 Laborgeräte	36
2.1.7.1.2 Optische Geräte	38
2.1.7.2 Computer	38
2.1.7.3 Computerprogramme	39
2.1.7.3.1 Allgemeine Software	39
2.1.7.3.2 Software zur Bildbearbeitung	39
2.1.7.3.3 Software zur Sequenzanalyse	39
2.1.7.3.4 Sequenzanalyse im Internet	40
2.1.7.3.5 Primeranalyse und -design im Internet	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 Allgemeine Methoden	41
2.2.1.1 Metamorphose-Induktion	41
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	41
2.2.2.1 Modifikation und Restriktion von DNA-Fragmenten	41
2.2.2.1.1 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	41
2.2.2.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	42
2.2.2.1.3 Restriktion von DNA	42
2.2.2.2 Ligation, Transformation und Analyse von Bakterien	43
2.2.2.2.1 Ligation von PCR-Fragmenten in einen pGEM-T-Vector (T/A-Klonierung)	43
2.2.2.2.2 Ligation von PCR-Fragmenten (Gerichtete Klonierung)	43
2.2.2.2.3 Transformation	44
2.2.2.2.4 Analyse von Bakterien	44
2.2.2.2.4.1 Analytische PCR	44
2.2.2.2.4.2 Übernacht-Bakterienkultur	45
2.2.2.2.4.3 Herstellung eines Glycerolstocks	46

2.2.2.3 Extraktion, Isolation und Reinigung von DNA, genomischer DNA, RNA und Plasmid-DNA	46
2.2.2.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	46
2.2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA	46
2.2.2.3.3 Isolierung von RNA aus Larven und Polypen von <i>Hydractinia echinata</i>	47
2.2.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	47
2.2.2.3.4.1 Qualitative Aufreinigung von DNA	48
2.2.2.3.5 Isolierung von RNA aus einer Synthese	49
2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
2.2.2.5 cDNA-Synthese	49
2.2.2.6 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA durch <i>in vitro</i> -Transkription	50
2.2.2.7 <i>In situ</i> -Hybridisierung	51
2.2.2.8 PCR	51
2.2.2.8.1 Standard-PCR	51
2.2.2.8.1.1 PCR mit degenerierten Primern (CODEHOP)	52
2.2.2.8.2 RACE-PCR	53
2.2.2.8.3 Splinkerette-PCR	54
2.2.2.8.4 Anfügen von 3'-Adenosin-Einzelstrangüberhängen an „blunt-end“-PCR-Fragmente	54
2.2.2.9 Präparation von gesplinkerter genomischer DNA	55
2.2.2.9.1 Präparation der Splinkerette	55
2.2.2.9.2 Restriktion von genomischer DNA	56
2.2.2.9.3 Ligation der Splinkerette an geschnittene genomische DNA	57
2.2.2.10 Synthese, Amplifikation und Präparation von RNA und DNA für die Mikroinjektion in <i>Hydractinia echinata</i>	57
2.2.2.10.1 Synthese von sense-mRNA	57
2.2.2.10.2 Schnelle Amplifikation und Präparation von DNA-Fragmenten mit überhängenden DNA-Enden	57
2.2.2.10.3 Mikroinjektion	58
2.2.2.11 Gelelektrophorese	59
2.2.2.12 Sequenzierungs-PCR, Sequenzierung und Sequenzanalyse	59

2.2.2.12.1 Sequenzierungs-PCR	60
2.2.2.12.2 Sequenzierung	60
2.2.2.12.3 Sequenzanalyse	60
3. Ergebnisse	61
3.1 Etablierung einer neuen Methode ermöglicht <i>in vivo</i> -Expressionsstudien von Reportergenkonstrukten mit einer höheren Transfektionseffizienz	62
3.2 <i>Hydractinia</i> weist mehrere Aktin Gene auf, deren Proteinkodierungen nahezu identisch sind	63
3.3 Expressionsanalysen unter der Kontrolle der genregulatorischen Regionen der Aktin-Gene <i>HeActI</i> , <i>HeActII</i> und <i>HeActIII</i>	66
3.3.1 <i>HeActI</i> ist ein schwach exprimiertes Aktin-Gen in <i>Hydractinia</i>	66
3.3.2 <i>HeActIII</i> ist nicht ubiquitär exprimiert	68
3.3.3 <i>HeActII</i> wird ubiquitär in <i>Hydractinia</i> exprimiert	70
3.3.3.1 Die Verkürzung der stromaufwärts gelegenen 5`regulatorischen Region führt zu keiner Veränderung der genspezifischen <i>HeActII</i> -Expression	75
3.3.3.2 Die 3`regulatorische Region hat keine Funktion in der Regulation der spezifischen Genexpression von <i>HeActII</i>	75
3.4 Charakterisierung des Homologs von EF1alpha aus <i>Hydractinia</i>	79
3.4.1 <i>HeEF1alpha</i> zeigt eine ubiquitäre Expression in <i>Hydractinia</i>	80
3.4.2 Die Verkürzung der stromaufwärts gelegenen 5`regulatorischen Region hat keinen Einfluss auf die Expression von <i>HeEF1alpha</i>	84
3.5 Ein cDNA-Fragment zeigt eine Homologie zu Ubiquitin	85
3.5.1 <i>HeUbiquitin</i> wird nicht ubiquitär, sondern keimblatt- und stadienspezifisch exprimiert	86
3.6 Entwicklung einer Methode für die Funktionanalyse von Proteinen in der Entwicklungskontrolle	88
3.6.1 Charakterisierung des Heß-Catenin-Homologs aus <i>Hydractinia</i>	88
3.6.1.1 Mutagenese der Phosphorylierungsstellen des <i>Heß-Cat</i>	91
3.6.1.1.1 eGFP wird als carboxyterminales Fusionsprotein von mutagenisiertem β -Catenin nicht exprimiert	92
3.6.1.1.2 Die ektopische Expression des <i>Heß-Cat^{mut.}</i> mithilfe des Separator Polypeptids 2A führt zu keinen morphologischen Veränderungen in <i>Hydractinia</i>	93
3.6.1.1.3 Das Reporterfusionsprotein <i>eGFPHeß-Cat^{mut.}</i> führt zu wesentlichen Umgestaltungen der charakteristischen Morphologie des Polypen	95

3.6.2 Beschreibung des Homologs von Goosecoid aus <i>Hydractinia</i>	100
3.6.2.1 <i>HeGsc</i> wird regional- und zelltypspezifisch in den apikalen sensorischen Nervenzellen von Larve und Polyp exprimiert	101
3.6.2.2 Die Mikroinjektion von „ <i>capped sense mRNA</i> “ zeigt keine Funktionalität in <i>Hydractinia</i>	108
3.6.2.3 Die ektopische <i>HeGsc</i> -Expression mithilfe des Genkonstrukts <i>HeGscNotI-C.eGFP</i> führt zu keinem funktionellen Reporterfusionsprotein	109
3.6.2.4 Die Überexpression des Transgens <i>eGFPHeGsc</i> zeigt keinen Effekt in der Embryonalentwicklung	109
3.6.2.5 Entwicklung einer Methode, die die Translation des analytischen Gen <i>HeGsc</i> unabhängig vom Reportergens <i>eGFP</i> ermöglicht	112
3.6.2.5.1 Die Translationsinitiation über ein IRES-Element ist nicht funktionell in <i>Hydractinia</i>	112
3.6.2.5.2 Die ektopische Expression von <i>HeGsc</i> durch ein Tandem-Expressionskonstrukts führt in der embryonalen und postmetamorphen Entwicklung zu morphologischen Veränderungen in <i>Hydractinia</i>	114
3.7 Charakterisierung eines ELAV-Homologs aus <i>Hydractinia</i>	121
3.7.1 <i>HeELAV</i> wird in allen existierenden Nervenzelltypen exprimiert und eignet sich somit in vivo als neuralspezifischer Marker des Nervensystems von <i>Hydractinia</i>	124
4. Diskussion	133
5.1 Zusammenfassung	163
5.2 Abstract	165
6. Literaturverzeichnis	167
7. Anhang	187
Danksagung	282
Erklärung	283
Lebenslauf	284

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lebenszyklus von <i>Hydractinia echinata</i>	5
Abb. 2: Aminosäuresequenzvergleich der Beta-Aktine HeActI, -II und -III	64
Abb. 3: Vergleich der N-terminalen Enden der sechs Mammalia Aktin-Isoformen mit dem entsprechenden N-terminalen Bereich des HeAct(I-III)	65
Abb. 4: Schematische Darstellung der Reportergergenkonstrukte <i>HeActI51ASActeGFP-HeEF1alpha</i> (A) und <i>HeActI51ASActeGFP</i> (B)	67
Abb. 5: Schematische Darstellung der Reportergergenkonstrukte <i>HeActIII51ASActeGFP-HydraTerm</i> (A) und <i>HeActIII51ASActeGFP</i> (B)	68
Abb. 6: Expressionsanalyse transgener <i>HeActIII51ASActeGFP-</i> und <i>HeActIII51ASActeGFPHydraTerm-Hydractinia</i>	69
Abb. 7: <i>HeActIII51ASActeGFP</i> -Expression im Polypen	70
Abb. 8: Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts <i>HeActII51ASActeGFP</i>	71
Abb. 9: Expressionsanalyse transgener <i>HeActII51ASActeGFP-Hydractinia</i>	72
Abb. 10: <i>HeActII51ASActeGFP</i> -Expression im Primär- und Polypen-Stadium von <i>Hydractinia</i>	74
Abb. 11: Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts <i>HeActII51ASActeGFP</i> (A) und des Deletionskonstrukts <i>HeActII(607 bp)51ASActeGFP</i> (B)	75
Abb. 12: Schematische Darstellung der Reportergergenkonstrukte <i>HeActII51ASActeGFP-HydraTerm</i> (A) und <i>HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha</i> (B)	76
Abb. 13: Expressionsanalyse transgener <i>HeActII51ASActeGFPHydraTerm-</i> und <i>HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha</i> -Larven	77
Abb. 14: Expression des Transgens <i>HeActII51ASActeGFPHydraTerm</i> im Gastrozoid	78
Abb. 15: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des HeEF1alpha	80
Abb. 16: Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes <i>HeEF1alpha51ASActeGFP</i>	81
Abb. 17: Expressionsanalyse transgener <i>HeEF1alpha51ASActeGFP-Hydractinia</i>	82
Abb. 18: Expression des Transgens <i>HeEF1alpha51ASActeGFP</i> im postmetamorphen Stadium	84
Abb. 19: Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts <i>HeEF1alpha51ASActeGFP</i> (A), der Deletionskonstrukte <i>HeEF1alpha(860 bp)51ASActeGFP</i> (B) und <i>HeEF1alpha(702 bp)51ASActeGFP</i> (C)	85
Abb. 20: Vergleich der Proteinsequenz des Ubiquitin-Teilfragments aus <i>Hydractinia</i> mit dem entsprechenden Bereich im Ubiquitin von ausgewählten Organismen	86

Abb. 21: Expression von <i>HeUbiquitin</i> im Ektoderm adulter Polypen	87
Abb. 22: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des He β -Cat	88
Abb. 23: Vergleich der Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Domäne verschiedener Vertreter von β -Catenin mit der des He β -Cat	89
Abb. 24: Vergleich des PDZ-Motivs in der C-terminalen Domäne des He β -Cat mit dem in β -Cateninen aus ausgewählten Vertretern	90
Abb. 25: Vergleich der Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Domäne des Wildtyp He β -Cat mit der des mutagenisierten He β -Cat	91
Abb. 26: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts <i>HeActIIIHeβ-Cat^{mut.}eGFP</i>	93
Abb. 27: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts <i>HeActIIeGFP2AHeβ-Cat^{mut.}</i>	94
Abb. 28: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts <i>HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}</i>	95
Abb. 29: Expressionsanalyse transgener <i>HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}-Hydractinia</i>	96
Abb. 30: Dokumentation der morphologischen Veränderungen in <i>HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}-</i> exprimierenden transgenen Polypen von Klon I und II	97
Abb. 31: <i>HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}</i> -Expression im transgenen Polypen Klon III	98
Abb. 32: Morphologische Veränderungen nach Expression von <i>HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}</i> in transgener Polypenkolonie	99
Abb. 33: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des HeGsc	100
Abb. 34: Proteinsequenzvergleich der eh1/GEH-Domäne im N-terminalen Bereich ausgewählter Vertreter von Goosecoid mit der entsprechenden Region des HeGsc	101
Abb. 35: Sequenzvergleich der Homöodomäne ausgewählter Vertreter von Goosecoid mit der des HeGsc	101
Abb. 36: Expression von <i>HeGsc</i> im Ektoderm des Gastrozooids	102
Abb. 37: Schema des Genkonstrukts <i>HeGsceGFP</i> (A) und <i>HeGscHeGsc^{gDNA}eGFP</i> (B)	103
Abb. 38: Expressionsanalyse transgener <i>HeGsceGFP-Hydractinia</i>	105
Abb. 39: <i>HeGsceGFP</i> -exprimierender transgener Primärpolyp	106
Abb. 40: Expressionsanalyse des Transgens <i>HeGsceGFP</i> im adulten Polypen-Stadium	107
Abb. 41: Schematische Darstellung der 5`-3` <i>GscUTReGFP</i> (A) und der <i>HeGsc</i> -mRNA (B)	108
Abb. 42: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts <i>HeActIIIHeGsceGFP</i>	109

Abb. 43: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts <i>HeActIIeGFPHeGsc</i>	110
Abb. 44: Expressionsanalyse transgener <i>HeActIIeGFPHeGsc-Hydractinia</i>	111
Abb. 45: Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte <i>HeGscHeGsc^{gDNA}-IRESeGFP</i> (A) und <i>HeActIIHeGsc^{cDNA}IRESeGFP</i> (B)	113
Abb. 46: Schematische Darstellung des Tandem-Expressionskonstrukts <i>HeActII51AsAct-eGFP-HeActIIHeGsc</i>	114
Abb. 47: Expression des Transgens <i>HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc</i> in Embryonen	115
Abb. 48: Expressionsanalyse transgener <i>HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc-Hydractinia</i> nach 72h Entwicklung	116
Abb. 49: <i>HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc</i> -Expression in Transgen V und VI	117
Abb. 50: Expressionsanalyse transgener <i>HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc-Hydractinia</i>	118
Abb. 51: Expression des Transgens <i>HeActII51ASActeGFP-HeActIIHeGsc</i> im postmetamorphem Stadium	120
Abb. 52: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des HeELAV	122
Abb. 53: Vergleich der Proteinsequenz verschiedener Vertreter von ELAV mit der des HeELAV	124
Abb. 54: <i>HeELAV</i> -Expression in ektodermalen Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Hydractinia</i>	127
Abb. 55: Schematische Darstellung der drei Expressionskonstrukte <i>HeELAV51ASActeGFP-HeEF1alpha</i> (A), <i>HeELAV51ASActeGFP</i> (B) und <i>HeELAVeGFP</i> (C)	128
Abb. 56: Expressionsanalyse in transgenen <i>HeELAV:eGFP</i> -Präplanulas	129
Abb. 57: <i>HeELAV:eGFP</i> -Expression in transgenen Planularlarven	130
Abb. 58: Expressionsanalyse transgener <i>HeELAV:eGFP</i> -Gastrozooiden	131
Abb. 59: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 5`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeActI</i>	188
Abb. 60: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 3`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeActI</i>	189
Abb. 61: Die Sequenz des 3`RACE-Fragments von <i>HeActI</i>	191
Abb. 62: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 5`/3`regulatorischen-, der codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeActII</i>	194
Abb. 63: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 5`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeActIII</i>	195

Abb. 64: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 3`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeActIII</i>	197
Abb. 65: Die Sequenz des 3`RACE-Fragments von <i>HeActIII</i>	198
Abb. 66: Die 3`genomische Nukleinsäuresequenz mit einem Teil des codierenden, untranslatierten und regulatorischen Bereichs von <i>HeActIV</i>	199
Abb. 67: Zusammengesetzte Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>HeEF1alpha</i>	201
Abb. 68: Vergleich der GTP-bindenden Domäne des HeEF1alpha mit der in ausgewählten Vertretern von EF1alpha	202
Abb. 69: Vergleich der Domäne II und Domäne III ausgewählter Vertreter von EF1alpha mit der entsprechenden Region in HeEF1alpha	203
Abb. 70: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 5`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeEF1alpha</i>	205
Abb. 71: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 3`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeEF1alpha</i>	206
Abb. 72: Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>HeUb</i>	207
Abb. 73: Zusammengesetzte Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Heβ-Cat</i>	210
Abb. 74: Vergleich der Armadillo-Repeats im Bereich der zentralen Domäne ausgewählter Vertreter von β-Catenin mit der des Heβ-Catenins	212
Abb. 75: Zusammengesetzte Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>HeGsc</i>	213
Abb. 76: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 5`/3`regulatorischen-, der codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeGsc</i>	218
Abb. 77: Zusammengesetzte Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>HeELAV</i>	219
Abb. 78: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 5`regulatorischen- und codierenden Region mit Teil eines Introns und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeELAV</i>	221
Abb. 79: Die genomische Nukleinsäuresequenz der 3`regulatorischen- und codierenden Region und der abgeleiteten Aminosäuresequenz von <i>HeELAV</i>	222

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
2A	Bezeichnung bezieht sich auf eine spezifische Region in Polyproteinen des Picornavirus und entstand aus der systematischen Nomenklatur verabschiedet von Wissenschaftlern
Act	<i>actin</i> ; Aktin
<i>arm</i>	<i>Armadillo</i>
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
β-Cat	β-Catenin
βTrCP	<i>β-transducin repeat containing protein</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
°C	Grad Celsius
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cds	<i>coding sequence</i>
CKIα	Casein Kinase Iα
CKIε	Casein Kinase Iε
CKII	Casein Kinase II
<i>Clythia</i>	<i>Clythia hemisphaerica</i>
Cngsc	Cnidaria-Goosecoid
CODEHOP	COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer
CsCl	Caesiumchlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
Dsh	Dishevelled

<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Etyhlendiamintetraessigsäure
<i>EF1α</i>	<i>eukaryotischer Elongationsfaktor 1 alpha</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eh1	<i>engrailed homology region-1</i>
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal visual system</i>
et al.	lat. <i>et alii</i> ; und andere
EtOH	Ethanol
Fz	Frizzled
G	Gramm
gDNA	genomische DNA; <i>genomic DNA</i>
GEH	<i>goosecoid engrailed homology</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gsc	<i>Goosecoid</i>
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HD	Homöodomäne
<i>He</i>	<i>Hydractinia echinata</i>
He β -Cat ^{wt}	He β -Catenin (Wildtyp)
He β -Cat ^{mut.}	He β -Catenin (mutagenisiert)
<i>HeELAV</i>	<i>HeEmbryonic lethal abnormal visual</i>
<i>H. magnipapillata</i>	<i>Hydra magnipapillata</i>
HS-DNA	Heringssperma-DNA
<i>H. vulgaris</i>	<i>Hydra vulgaris</i>
Hyb-Mix	Hybridisierungsmix
<i>Hydractinia</i>	<i>Hydractinia echinata</i>

<i>int-1</i>	<i>integration site 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lef	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
LWamid	Leucin-Tryptophan-Amid
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nukleotid-bindende Domäne; <i>nucleotide-binding domain</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Nematostella</i>	<i>Nematostella vectensis</i>
NES	<i>nuclear export signal</i> ; Kernexportsignal
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid; <i>nucleotide</i>
<i>NvElav1</i>	<i>Nematostella vectensis Elav 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
PDZ	Akronym aus den drei Anfangsbuchstaben von <i>postsynaptic density protein 95 (PSD-95)</i> , <i>discs large (Dlg)</i> und <i>zonula occludens-1 protein (ZO-1)</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pl	Picoliter

pmol	Picomol
Prd	Paired
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction</i>
RBP	RNA-bindende Proteine; <i>RNA-binding protein</i>
regul. Reg.	regulatorische Region
RFamid	Arginin-Phenylalanin-Amid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNP	Ribonukleoprotein; <i>ribonucleoprotein</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
TAD	Transaktivationsdomäne; <i>transactivation domain</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tcf	<i>T-cell-specific transcription factor</i>
TE	TE-Puffer; Tris-EDTA-Buffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
u	<i>unit</i> ; Einheit
<i>Ub</i>	<i>Ubiquitin</i>
UniProt	Universal Protein Resource
ü.N.	über Nacht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

V	Volt
Vol.	Volumen
WNT	Akronym aus <i>wingless</i> und <i>integration site 1</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>Xenopus</i>	<i>Xenopus laevis</i>

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme	22
Tab. 2: Verwendete Ausgangskonstrukte	22
Tab. 3: Verwendete Enzyme	23
Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide	25
Tab. 5: Verwendete Größenstandards	35
Tab. 6: Verwendete Kits	36
Tab. 7: Verwendete Laborgeräte	36
Tab. 8: Verwendete Optische Geräte	38
Tab. 9: Verwendete Standard-Software	39
Tab. 10: Verwendete Bildbearbeitungs-Software	39
Tab. 11: Verwendete Software zur Sequenzanalyse	39
Tab. 12: Verwendete Programme und Datenbanken	40
Tab. 13: Verwendete Programme	40

1. Einleitung

Eine grundlegende Frage der Entwicklungsbiologie beschäftigt sich mit der Musterbildung eines Organismus. Sie untersucht, wie aus anfänglich einfachen während der embryonalen Entwicklung komplexe Strukturen gebildet werden. Im Laufe der Entwicklung führen Prozesse wie Zellteilung, Musterbildung, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Apoptose und Wachstum hin zur endgültigen Gestalt. Einer der wichtigsten Vorgänge in der frühen Entwicklung ist die Festlegung der Polarität und der primären embryonalen Körperachsen. Die frühe Musterbildung spielt in der Morphogenese des sich entwickelnden Organismus eine zentrale Rolle. Diese Entwicklungsprozesse werden durch einige wenige Signalwege kontrolliert.

Um ein grundlegendes Verständnis von Kontrollmechanismen der Entwicklung zu erhalten, arbeitet man mit einfachen Modellorganismen. Der marine koloniale Hydroidpolyp *Hydractinia echinata* (Abk. *Hydractinia*) aus dem Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) dient als Modellorganismus für grundlegende Fragestellungen der Entwicklungsbiologie. Erste Fossilienfunde von Cnidariern werden ins Präkambrium datiert (Chen et al., 2000; Boero et al., 2005). Sie stellen eine ancestrale Gruppe dar, die bis heute besteht. Es erfolgte eine frühe Abspaltung in der Evolution der Metazoen von der Gruppe Bilateria (Collins, 1998). Man geht davon aus, dass gemeinsame homologe Merkmale zwischen Bilateraten und Cnidariern ursprünglicher Natur sind, so dass die Cnidaria unter evolutions- und entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten von besonderem Interesse sind. Die Cnidaria werden zusammen mit der Gruppe der Bilateria phylogenetisch als Eumetazoa bezeichnet und den Schwämmen gegenübergestellt. Sie sind gemeinsam mit oder parallel zu den Ctenophora die erste Tiergruppe mit echten Geweben, einem definierten Körperbau und einem einfachen Nervensystem (Boero et al., 2005; Watanabe et al., 2009; Dohrmann und Wörheide, 2013). Die Cnidaria werden aufgrund ihrer einfachen Organisation und Morphologie im Vergleich zu den Bilateriern als eine Tiergruppe angesehen, die ein sehr frühes Stadium der eumetazoischen Evolution repräsentiert (Boero et al., 2005; Watanabe et al., 2009; Technau und Steele, 2011).

Der Wnt-Signalweg nimmt eine bedeutende Stellung in der Regulation der embryonalen Musterbildung und Morphogenese von Metazoen ein (Komiya und Habas, 2008). Es ist bekannt, dass die beteiligten Gene des Wnt-Signalwegs auch in den Cnidariern konserviert sind (Hobmayer et al., 2000). In Funktionsanalysen konnte gezeigt werden, dass deren Expression in Korrelation mit der Entwicklungskontrolle steht (Wikramanayake et al., 2003; Primus und Freeman, 2004; Plickert et al., 2006). Folglich ist anzunehmen, dass grundlegende Funktionen des Wnt-Signalwegs konserviert sind und ermöglichen, die ursprüngliche Funktion des Wnt-Signals in der Evolution von Metazoen zu untersuchen. Es wurden bereits in *Hydractinia* einzelne Bestandteile der Wnt-Signalkaskade charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg hier eine wichtige Rolle in der Achsenbildung und in der axialen Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse spielt, ähnlich wie in höheren Metazoen, was auf eine ursprüngliche Funktion in diesen Entwicklungsprozessen hindeutet (Plickert et al., 2006).

Unter den basalen Metazoen findet sich erstmals in Coelenteraten ein Nervensystem und multizelluläre lichtwahrnehmende Organe, sogenannte Ocellen (einfache Augen). Viele Cnidaria, die keine hochentwickelten Photorezeptionsorgane besitzen, zeigen dennoch eine extraokulare Photosensitivität. Sie sind fähig, ohne erkennbare visuelle oder photosensitive Strukturen Licht wahrzunehmen und sind positiv phototaktisch (Marks, 1976; Yoshida, 1979; Musio, 1997; Taddei-Ferretti und Musio, 2000; Martin, 2002). *Hydractinia* zeigt ebenfalls eine extraokulare Photosensitivität. Dieses lichtgesteuerte Verhalten spielt zum einen eine wesentliche Funktion in einer positiven Phototaxis und zum anderen in der Gametenabgabe, die durch Licht induziert wird (Ballard, 1942; Plickert und Schneider, 2004). *Hydractinia* kontrolliert dieses lichtgesteuerte Verhalten sowie auch andere wichtige physiologische Funktionen über ein Nervensystem, das wie alle anderen Regionen spezifisch über die einzige Körperachse angelegt ist. Die Kenntnisse über Bau und Funktion des Nervensystems der Cnidaria sind bislang unvollständig. Den Aufbau hat man bisher mittels immunhistologischer Studien von Neuropeptiden untersucht. Im ausgeprägt peptidergen Nervensystem erfüllen Neuropeptide eine wesentliche Funktion in der Physiologie der Cnidaria und fungieren als Neuromodulatoren oder Neurotransmitter (McFarlane et al., 1987, 1991; Gajewski et al., 1996; Grimmelikhuijzen et al., 1996, 2002; Takahashi et al., 1997; Plickert et al., 2003, 2004). Eine Reihe von Studien zeigte die wesentlichen Funktionen des Nervensystems bei der Phototaxis und in der Metamorphose von *Hydractinia* auf (Plickert, 1989; Leitz et al., 1994;

Leitz und Lay, 1995; Gajewski et al., 1996; Katsukura, 1998; Schmich et al., 1998; Katsukura et al., 2003, 2004; Plickert et al., 2003, 2004).

Wie bei vielen marinen Wirbellosen wird auch bei *Hydractinia* die Metamorphose durch ein externes Signal ausgelöst (Müller, 1969; Leitz und Wagner, 1993). Dieses Signal bewirkt in den Larven einen gestaltbildenden Umwandlungsvorgang, der durch Prozesse wie Musterbildung, Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Morphogenese kontrolliert wird (Plickert et al., 1988; Plickert, 1989; Kroiher et al., 1990; Kroiher, 2000; Plickert et al., 2003). Weil bei der Metamorphose durch diesen Stimulus die Entwicklung der adulten Körpergestalt zuverlässig angestoßen wird, ist die Metamorphose von *Hydractinia* als experimentelles System zur Untersuchung der entsprechenden Kontrollvorgänge von marinen Invertebraten genutzt worden (Plickert et al., 1988; Walther et al., 1996; Seipp et al., 2007).

Die Sequenzierung der Genome des Süßwasserpolyphen *Hydra magnipapillata* (Abk. *H. magnipapillata*), der Seeanemone *Nematostella vectensis* (Abk. *Nematostella*) sowie der beiden Steinkorallen *Acropora digitifera* und *Acropora millepora* hat gezeigt, dass man in den Cnidariern die konservierten Gene findet, die auch in höheren Metazoen die Entwicklung kontrollieren (Putnam et al., 2007; Chapman et al., 2010; Shinzato et al., 2011; www.coralcoe.org.au/news/gene-secrets-of-the-reef-revealed-2). In einem laufenden Genomprojekt von *Hydractinia* zeigt sich bereits jetzt, dass in *Hydractinia* die Gene konserviert sind, die in den Hauptsignalwegen die tierische Entwicklung kontrollieren (Plickert et al., 2012). Demnach ist davon auszugehen, dass in diesem an der Basis der Eumetazoen stehenden Organismus wesentliche Funktionen konserviert sind, und man kann allgemeingültige Aussagen über die Kontrollmechanismen der Entwicklung erwarten. Der ursprüngliche Metazoe *Hydractinia* eignet sich daher um Fragestellungen zur Evolution von Entwicklungskontrolle zu untersuchen. Der Einblick in die Entwicklungsprozesse dieses basalen Cnidariers bietet Zugang zum Verständnis des Ursprungs und der Evolution von Entwicklungsvorgängen der Metazoen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *Hydractinia* konservierte Kontrollgene besitzt - doch was ist ihre Funktion in diesem basalen Metazoen? Ansatz dieser Arbeit war, anhand von Funktionsanalysen dieser Frage nachzugehen. Es standen dabei folgende Punkte im Fokus:

- Isolierung und Expressionsanalyse von ubiquitär aktiven Promotoren von Haushaltsgenen. Ziel war hier die Entwicklung eines Promotor-Konstruktes zur

ubiquitären ektopischen Expression und zur Funktionsanalyse von Entwicklungskontrollgenen. Insbesondere sollten Gene des Wnt-Signalwegs untersucht werden.

- Ziel war darüber hinaus die Herstellung eines Reportergenkonstruktes, das die *in vivo*-Analyse nervenzellspezifischer Differenzierung und Expression erlaubt.

1.1 *Hydractinia echinata*

1.1.1 Morphologie und Lebenszyklus

Hydractinia echinata gehört systematisch zur Klasse der Hydrozoa und ist wie sämtliche Vertreter der Cnidaria ein aquatisch lebender, radiärsymmetrischer, diploblastischer Organismus, der im Unterschied zu den Bilateraten nur eine einzige zentrale, orale-aborale Körperachse besitzt. Das charakteristischste und namensgebende Merkmal dieser Tiergruppe sind ihre Nesselzellen (Cnido- oder Nematocyten), die ihnen zum Nahrungserwerb und als Feindabwehr dienen.

Die Hydrozoen sind in der Regel marine und koloniale Tiere, die einen metagenetischen Lebenszyklus durchlaufen (Leclère et al., 2009). Bei *Hydractinia* handelt es sich um eine marin lebende Hydrozoenkolonie, welche im Nordatlantik einschließlich der Nordsee zu finden ist. Der Hydroidpolyp lebt auf Schalen von Schnecken, wie etwa der Wellhornschnecke (*Buccinum undatum*). Die Schalen sind von Einsiedlerkrebsen (*Pagurus bernhardus*) bewohnt. *Hydractinia* ernährt sich vom Nahrungsüberschuss des Einsiedlerkrebses.

Hydractinia lebt getrenntgeschlechtlich und weist einen Polymorphismus auf. Die Polypen der Kolonie zeigen eine Aufgabenteilung durch die Ausbildung mehrerer morphologischer und funktioneller Subtypen. Es existieren in *Hydractinia* mindestens vier Morphe, die als Gastrozoid (Fresspolyp), Gonozoid (Geschlechtspolyp), Dactylo- und Tentaculozoid (unterschiedliche Wehrpolypenformen) bezeichnet werden (Müller, 1964; Plickert et al., 2012). Der Fresspolyp leistet den Beutefang und die Versorgung der Kolonie. Der Geschlechtspolyp trägt die Gonophoren (Geschlechtsknospen) in denen die Gameten heranreifen. Der Wehrpolyp dagegen ist auf die Verteidigung der Kolonie spezialisiert.

Man bezeichnet *Hydractinia* als Stachelpolyp, da er durch Kalkeinlagerungen entstandene Stacheln besitzt, die dem Schutz dienen. Die Polypen der Kolonie sind über eine Stoloplatte mit darin verlaufenden Gastroderm-Kanälen miteinander verbunden, wodurch ein funktioneller Nahrungsverbund entsteht. Nahrungspartikel werden im Kanalsystem der Kolonie verteilt.

Die Eier- bzw. Spermienfreisetzung der Kolonien wird durch Licht ausgelöst (Ballard, 1942) und erfolgt bei 18°C etwa 30 Minuten nach der Belichtung (Plickert et al., 1988; Plickert, 2013). Die Embryonalentwicklung verläuft innerhalb von 72h vom befruchteten Ei zu einer auf der ganzen Oberfläche bewimperten Planularlarve (s. Abb. 1), die sich aktiv fortbewegt und dann kompetent ist die Metamorphose zu durchlaufen (Plickert et al., 1988; Plickert, 2013).

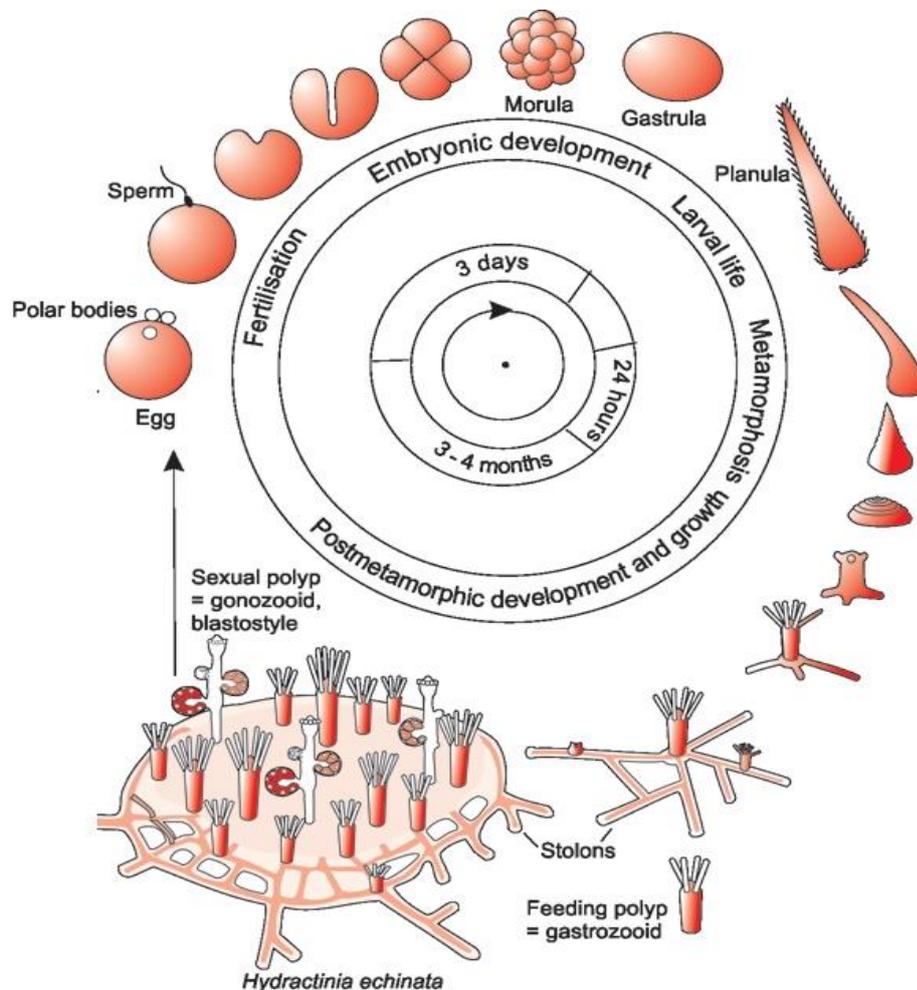


Abb. 1: Lebenszyklus von *Hydractinia echinata*. (Schema von W. A. Müller (Müller:

Entwicklungsbiologie, 5th edition. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2009) modifiziert nach Plickert et al., 2012)

Die Metamorphose von der Planularlarve zum Primärpolypen kann durch Meeresbakterien ausgelöst werden (Müller, 1969; Leitz und Wagner, 1993; Kroiher und Berking, 1999) und verläuft innerhalb eines Tages. Der entstehende Primärpolyp entwickelt sich zu einem Gastrozoid, der Stolone ausbildet, auf denen sich durch Knospung neue Polypen entwickeln und die Kolonie aufbauen (s. Abb. 1). Innerhalb von 3-4 Monaten wird diese neue Kolonie geschlechtsreif (Walther et al., 1996; Plickert et al., 2012).

Hydractinia ist als Labororganismus für entwicklungsbiologische Fragestellungen sehr gut geeignet. Die Vorteile beruhen auf der leichten Kultivierung im Labor, der täglichen licht-induzierten Abgabe der Gameten und der hierdurch guten Verfügbarkeit von Embryonen sowie dem kurzen Generationszyklus (Walther et al., 1996; Frank et al., 2001; Galliot und Schmidt, 2002; Plickert et al., 2012).

1.2 Haushaltsgene

Während gewebespezifische Gene durch die räumliche und zeitliche Expression zelltyp-spezifische Funktionen ausüben, werden Haushaltsgene (*housekeeping genes*) ubiquitär in allen Gewebe- und Zelltypen konstitutiv exprimiert und übernehmen eine wichtige Aufgabe in der Erhaltung von grundlegenden zellulären Funktionen (Butte et al., 2001; Zhu et al., 2008). Charakteristisches Merkmal der Haushaltsgene sind oftmals eine fehlende TATA- und CAAT-Box in der 5' regulierenden Region. Darüber hinaus besitzen diese oftmals verschiedene Transkriptionsstartpunkte, CpG-Inseln sowie G+C-reiche Regionen mit mehreren GC-Boxen, die die Bindestellen für den Transkriptionsfaktor *specificity protein 1* (Sp1) darstellen (Dyran, 1986; Briggs et al., 1986; Araki et al., 1987; Kageyama et al., 1989; Somma et al., 1991; Rouleau et al., 1992; Tang et al., 1997; Zhang, 1998; Samson und Wong, 2002; Zhu et al., 2008; Meier und Schindler, 2011). Da Haushaltsgene essentiell sind und immer benötigt werden, um die Grundfunktionen einer Zelle aufrechtzuerhalten, eignen sich deren ubiquitär und konstitutiv aktiven Promotoren, um fremde Gene in einem Organismus ubiquitär zur Expression zu bringen. Dies bietet die Möglichkeit Gene ektopisch zu exprimieren oder sie dort, wo sie ursprünglich aktiv sind, zu einer Überexpression zu bringen.

Zu den Haushaltsgenen gehören z.B. *Aktin*, *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)*, der *eukaryotische Elongationsfaktor 1 alpha (EF1 α)* und *Ubiquitin*.

Das in allen eukaryotischen Zellen am häufigsten vorkommende Haushaltsgen ist das hoch konservierte Strukturprotein Aktin (Stossel et al., 1985). Es existieren in den Vertebraten sechs Isoformen des Aktins. In den Muskelzellen der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur findet man drei Isoformen des α -Aktins sowie in der glatten Muskulatur die Isoform des γ -Aktins. In den Nicht-Muskelzellen werden die beiden zytoplasmatischen Isoformen β - und γ -Aktin ubiquitär exprimiert (Rubenstein, 1990; Herman, 1993; Bunnell et al., 2011). Aktin ist in seiner aktiven Form, dem sogenannten filamentösen Aktin als Polymer in Filamenten angeordnet. F-Aktin wird in seiner polymeren Form als Aktinfilament unter ATP-Hydrolyse, durch die Polymerisation der als Monomer vorliegenden globulären Aktin-Moleküle, gebildet. Dieses auch als Mikrofilament bezeichnete zweisträngige helikale Proteinfilament ist an den unterschiedlichsten Prozessen in der Zelle beteiligt und bindet an eine große Anzahl von verschiedenen Hilfsproteinen. Es wirkt so an einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen mit, wie z.B. der Muskelkontraktion durch die Wechselwirkung mit Myosin, aber auch an Zellteilung, Zellmotilität, Polarität, Sekretion, Endozytose, Lipidsynthese und der Filament-Dynamik.

Das ubiquitär exprimierte Protein EF1 α ist nach Aktin das zweithäufigste Protein in der Zelle, wobei es unter normalen Wachstumsbedingungen 1-2% der Gesamtproteinmenge ausmacht (Condeelis, 1995; Ejiri, 2002). Elongationsfaktoren sind Proteine, die eine wichtige Funktion im Elongationsschritt während der Translation übernehmen. Zu dieser Gruppe gehört auch der eukaryotische Elongationsfaktor 1 alpha, der funktionell äquivalent zu EF-Tu (*elongation factor Tu*) aus *Escherichia coli (E.coli)* ist. EF1 α gehört zusammen mit dem prokaryotischen EF-Tu zur EF-Tu/EF-1A Subfamilie der GTP-bindenden-Elongationsfaktor-Familie. In Prokaryoten und Eukaryoten läuft der Prozess der Elongation gleich ab. EF1 α bildet die eine der vier Untereinheiten des Elongationskomplex 1, der für die GTP-abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom verantwortlich ist. Neben seiner kanonischen Rolle in der Proteinbiosynthese erfüllt EF1 α auch noch andere Funktionen bei zellulären Prozessen wie z.B. Signaltransduktion, Apoptose, Interaktion mit Aktin und Komplexbildung mit dem mitotischen Apparat.

Ein weiteres Gen, dessen Namensgebung sich daraus erklärt, dass es in allen Geweben von Eukaryoten ubiquitär vorkommt, ist Ubiquitin. Dieses sehr kleine regulatorische Protein wurde als erstes aus dem Thymus vom Rind isoliert (Goldstein et al., 1975) und besteht aus 76 Aminosäuren (AS). Ubiquitin ist hoch konserviert und stellt das Gründungsmitglied einer Familie von strukturell konservierten Proteinen dar, die eine Vielzahl von Prozessen in eukaryotischen Zellen regulieren. Ubiquitin und andere Mitglieder dieser Familie verändern durch kovalente Bindung an andere Proteine in der Zelle die Stabilität, die Lokalisierung oder die Aktivität des Zielproteins (Pickart und Eddins, 2004).

Ubiquitin besitzt eine globuläre Form, aber nur die vier letzten AS am C-terminalen Ende ragen aus dem gefalteten Protein heraus (Vijay-Kumar et al., 1987; Finley und Chau, 1991). Eine für die Funktion des Ubiquitins entscheidende Rolle übernimmt das C-terminale Glycin an Position 76 (G76) sowie die 7 internen Lysine. Ubiquitin wird reversibel über eine kovalente Bindung von G76 an ein Lysin eines Zielproteins gebunden (Hershko et al., 1980) und dessen Eigenschaft durch diese Ubiquitinierung verändert wird. In den frühen 1980er Jahren wurden die ersten Ergebnisse zur zentralen Funktion von Ubiquitin in einem ATP-abhängigen- und Ubiquitin vermittelten Abbau von Proteinen gemacht (Ciechanover et al., 1980; Hershko et al., 1980). Die Form der Ubiquitinierung beeinflusst die weitere Bestimmung und Funktion des Zielproteins. Die Ubiquitinierung übernimmt eine wichtige Schlüssel-funktion bei der Regulierung einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie der Differenzierung, Endozytose, Zellteilung, Signaltransduktion, transkriptioneller Regulation, dem Transport und der Qualitätskontrolle von Proteinen (Hershko und Ciechanover, 1998; Mukhopadhyay und Riezman, 2007).

Eines der Ziele dieser Arbeit ist die Isolation von Promotoren der ubiquitär aktiven Haushaltsgene *Beta-Aktin*, *EF1 α* und *Ubiquitin* aus *Hydractinia*. Nach den Expressionsanalysen soll daraufhin der am besten geeignete Promotor ausgewählt werden, um ihn als Treiber für die ektopische Expression und damit für eine Funktionsanalyse von regulatorischen Genen der Entwicklungskontrolle einzusetzen.

1.3 Entwicklungskontrollgene in der Muster- und Gestaltbildung

Die Festlegung der Polarität und der Körperachsen ist einer der wichtigsten Prozesse in der frühen Entwicklung eines Organismus. Durch die Körperachsen wird eine Richtung vorgegeben, innerhalb derer die nachfolgende Entwicklung abläuft. Es ist bekannt, dass diese Entwicklungsprozesse durch einige wenige Signalwege gesteuert werden. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der embryonalen Musterbildung und Morphogenese von Vertebraten und Invertebraten spielt dabei der Wnt-Signalweg (Komiya und Habas, 2008). Der Name dieses Signalweges leitet sich von seinem Liganden Wnt ab, der sich aus den beiden Genen *wingless* (*wg*) aus *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*) und *integration site 1* (*int-1*) aus der Maus zusammensetzt (Nusse et al., 1991). Dieser Signalweg ist an einer Vielzahl von Entwicklungsvorgängen während der Embryogenese, aber auch an der Homöostase in adulten Geweben beteiligt. Der Wnt-Signalweg beinhaltet eine Familie von sekretierten cysteinreichen Glykoproteinen, die zelluläre Prozesse wie Zelldetermination, Motilität, Polarität, Organogenese, primäre Achsenbildung und auch die Erneuerung der Stammzellen regulieren (Miller, 2001; Clevers, 2006; Komiya und Habas, 2008).

Das Wnt-Signal wird durch mindestens drei unterschiedliche intrazelluläre Signalwege, den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg und die beiden nicht-kanonischen Wnt/Calcium(Ca^2)- und Wnt/Planarer Zellpolaritäts(*planar cell polarity*; PCP)-Signalwege, weitergeleitet (Miller, 2001). Im weiteren Verlauf wird der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg nur noch mit Wnt-Signalweg bezeichnet. Auf die beiden nicht-kanonischen Wnt-Signalwege wird nicht weiter eingegangen.

Im Wnt-Signalweg nimmt das Zelladhäsionsmolekül β -Catenin eine entscheidende Schlüssel-funktion bei der Weiterleitung des extrazellulären Wnt-Signals in den Zellkern ein. In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird zytoplasmatisches β -Catenin durch einen Multiprotein-Zerstörungskomplex (*destruction complex*) phosphoryliert und dadurch wird die Degradation eingeleitet (Akiyama, 2000; Miller, 2001). Die Phosphorylierung des β -Catenin führt zur Ubiquitinierung und zum Abbau im Proteasom (Aberle et al., 1997). In Anwesenheit eines Wnt-Signals kommt es zur Interaktion des Wnt-Liganden mit dem Frizzled (Fz)-Rezeptor und dem Co-Rezeptor *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP 5/6). Durch die Bindung von Wnt an den Rezeptorkomplex wird das Signal an Dishevelled (Dsh) übermittelt, welches direkt mit dem Fz-Rezeptor interagiert (Wallingford und Habas, 2005; MacDonald et

al., 2009). Die Aktivierung von Fz/LRP5/6 führt zur Phosphorylierung von Dsh durch die Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) und/oder Casein Kinase II (CKII) (Peters et al., 1999; Sakanaka et al., 1999; Miller, 2001). Das aktivierte Dsh besitzt eine Dishevelled/Axin(DIX)- und eine PDZ(Akronym aus den drei Anfangsbuchstaben von *postsynaptic density protein 95* (PSD-95), *discs large* (Dlg) und *zonula occludens-1 protein* (ZO-1))-Domäne, mit diesen es nun Axin binden und dessen Aktivität inhibieren kann (Kishida et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Capelluto et al., 2002; Cheyette et al., 2002). Durch die Bindung an Axin kommt es zur Abtrennung vom β -Catenin-Zerstörungskomplex (Kishida et al., 1999). Das GSK3-Bindeprotein (GBP) bindet sowohl Dsh als auch die Glycogen Synthase Kinase-3 beta (GSK3 β) und verhindert so die Interaktion zwischen Axin und GSK3 β . Durch diese Inhibition der GSK3 β wird die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von β -Catenin verhindert, wodurch es nicht zum Abbau im Proteasom kommt (Li et al., 1999; Farr et al., 2000; Miller, 2001). Unphosphoryliertes β -Catenin kann nicht mehr degradiert werden. Es akkumuliert in der Zelle und wird in den Zellkern transportiert, wo es Corepressoren wie *c-terminal binding protein* (CtBP) und Groucho verdrängt. Es fungiert dort als Coaktivator bei der Interaktion mit Mitgliedern der *T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer factor*(Tcf/Lef)-Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer *high mobility group*(HMG)-Box und stimuliert die Expression von Wnt-Zielgenen (Nusse, 1999; Miller, 2001; Aihara et al., 2006; Clevers, 2006).

Das multifunktionale Protein β -Catenin wirkt einmal als die Schlüsselkomponente im Wnt-Signalweg, als transkriptionaler Transaktivator im Zellkern und spielt außerdem eine Rolle in der Regulierung der Zelladhäsion an der Plasmamembran (Giarré et al., 1998; Lyashenko et al., 2011). Man findet es in der Zelle in den drei Kompartimenten Plasmamembran, Zytoplasma und Zellkern. Dort übernimmt β -Catenin eine duale Funktion, die in Abhängigkeit von seiner subzellulären Lokalisation in der Zelle einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Organismus hat (Orsulic et al., 1999). Das Protein β -Catenin ist das Homolog zum Segmentpolaritätsgen *Armadillo* (*arm*) in *Drosophila*, die beide zur Armadillo-Familie gehören. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie werden durch den Besitz von Armadillo-Repeat-Domänen gekennzeichnet, die erstmals im Gen *arm* aus *Drosophila* beschrieben worden (Riggelman et al., 1989; Peifer et al., 1994; Geis et al., 1998). β -Catenin weist eine 130 AS N-terminale-, eine 550 AS zentrale und 100 AS C-terminale Domäne auf (Miller und Moon, 1996; Cadigan und Nusse, 1997; Willert und Nusse, 1998; Akiyama, 2000). Die N-

terminale Domäne ist entscheidend für die Regulation der Stabilität von zytosolischem β -Catenin. Sie hat charakteristische Sequenzmotive, die die sogenannte Phosphorylierungsstelle bilden. Diese Phosphorylierungsstelle enthält spezifische Serin- und Threonin-Reste, die von den Kinasen GSK3 β , Casein Kinase I α (CKI α) und/oder CKI ϵ phosphoryliert werden können. Die Phosphorylierung dieser AS-Reste ist ein Signal zur Degradation des β -Catenin im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (Yost et al., 1996; Aberle et al., 1997; Willert und Nusse, 1998). β -Catenin mit Punktmutationen in den Serin- und Threonin-Resten des Konsensus-Motivs konnte man in verschiedenen Tumoren nachweisen. Ein mutiertes β -Catenin im Bereich der Phosphorylierungsstelle ist stabilisiert und vor der Degradation geschützt. Es bildet in dieser Form einen konstitutiv aktiven Komplex mit Tcf/Lef und führt zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen. Die Akkumulation von β -Catenin ist entscheidend in der kolorektalen Tumorgenese (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997; Harada, 1999; Morin, 1999; Polakis, 1999; Romagnolo, 1999; Akiyama, 2000). Die zentrale Domäne des β -Catenins enthält 12 sogenannte Armadillo-Repeats. Jeder Repeat besteht aus ca. 42 AS und enthält jeweils 3 α -Helices. Diese Helices formen eine Superhelix, die eine große positiv geladene Furche bildet. Die basische Furche interagiert mit sauren AS-Resten, die man in den β -Catenin-bindenden-Regionen der β -Catenin-interagierenden Proteine wie E-Cadherin, Adenomatöses Polyposis Coli (*adenomatous polyposis coli*; APC)-Protein und der Tcf/Lef-Familie findet (Rubinfeld et al., 1993; Peifer et al., 1994; Rubinfeld et al., 1995; Huber et al., 1997; Orsulic et al., 1999; Akiyama, 2000). Die C-terminale Region des β -Catenins besitzt eine Transaktivationsdomäne (TAD; *transactivation domain*), die notwendig und ausreichend für die Aktivierung von Wnt-Zielgenen ist (Vleminckx et al., 1999; Akiyama, 2000).

Die beteiligten Gene dieses ursprünglichen Wnt-Signalwegs sind bereits in den Cnidariern vorhanden (Hobmayer et al., 2000). Im Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris* (*H. vulgaris*), der dem Stamm der Cnidaria und der Klasse Hydrozoa angehört, konnten Elemente des Wnt-Signalwegs charakterisiert werden. Die Expression der Gene *Wnt*, *β -Catenin* und *Tcf* der Wnt-Signalkaskade werden bei der Festlegung des mutmaßlichen Kopf-Organisators, der im oberen Bereich des Hypostoms von *H. vulgaris* liegt, in der frühen Knospenbildung und der Kopfregeneration hoch reguliert. Im Embryo wird *Wnt* nicht exprimiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass an der Festlegung der Achse in *H. vulgaris* der Wnt-Signalweg beteiligt ist (Hobmayer et al., 2000). In *Hydractinia* konnten bereits Bestandteile der Wnt-Signalkaskade

wie *Wnt3a*, *Frizzled* und *Tcf* charakterisiert werden (Plickert et al., 2006). Entscheidend für die spätere Achsenfestlegung ist bereits in der unbefruchteten Oozyte von *Hydractinia* vorhandene maternale mRNA von *Wnt* und *Tcf*. Sie sind an dem Pol deponiert, an dem die Polkörper abgegeben werden und an dem auch die Furchung beginnt. Diese polarisierte Verteilung der mRNA führt dazu, dass am Ort des *Wnt*-mRNA Depots der posteriore Pol der larvalen Körperachse festgelegt wird und damit auch der zukünftige orale Pol des adulten Polypens (Plickert et al., 2006). Darüber hinaus spielt der Wnt-Signalweg auch eine wesentliche Rolle bei der Musterbildung längs der anterior-posterioren Achse in der Entwicklung der Larve und der Metamorphose von der Planularlarve in den Primärpolypen von *Hydractinia* (Plickert et al., 2006). Die pharmakologische Inhibition der GSK3 β mithilfe der spezifischen Inhibitoren Lithium und Alsterpaullone führt zur Nachahmung des Wnt-Signals. Dieser künstliche Eingriff in den Signalweg während der Gastrulation führt dazu, dass die polare Expression von *Tcf* ubiquitär wird. Durch die Umverteilung des polaren Expressionsmusters von *Tcf* in eine nicht-polare Verteilung kommt es zur Transformation des anterioren Pols der Planularlarve in einen zweiten ektopischen posterioren Pol. In der Metamorphose entwickeln sich aus bipolaren Larven zweiköpfige Polypen teilweise ohne aborale Strukturen, das heißt diesen fehlten die Stolone. Eine Behandlung mit dem spezifischen GSK3 β -Inhibitor Azakenpaullone während der Induktion der Metamorphose führt zu gravierenden Unterschieden in der axialen Musterbildung. Es entwickelten sich Polypen mit ektopischen Tentakeln, die teilweise entlang der Körperachse verteilt waren. Die Tentakel besetzte Region des Körpers konnte als ein übergroßes Hypostom oder als eine übergroße Tentakelregion angesehen werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Wnt-Signalweg in *Hydractinia* sowohl die Achsenbildung als auch axiale Musterbildung entlang der anterior-posterioren Achse in ähnlicher Weise wie in höheren Metazoen steuert und deutet auf eine ursprüngliche Funktion des Wnt-Signalwegs in diesen Prozessen in der Evolution der Tiere hin (Plickert et al., 2006).

In vorangegangenen Arbeiten konnte mithilfe von pharmakologischen Inhibitoren in den Wnt-Signalweg eingegriffen und Erkenntnisse über die Funktion in der Achsenfestlegung und der axialen Musterbildung in *Hydractinia* gewonnen werden (Plickert et al., 2006; Müller et al., 2007). Ein Hauptschwerpunkt dieser Arbeit ist es, die Schlüsselkomponente des Wnt-Signalwegs β -*Catenin* aus der cDNA von *Hydractinia* zu isolieren und zu charakterisieren. Eine Aufgabe wird es sein, die N-terminalen Phosphorylierungsstellen durch Punktmutationen in

den Serin- und Threonin-Resten zu verändern, um β -Catenin zu stabilisieren, damit es vor Degradation im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg geschützt ist und akkumulieren kann, um im Zellkern konstitutiv aktiv zur Expression von Wnt-Zielgenen zu führen. Es ist aus Studien in der Tumorgenese bekannt, dass mutiertes β -Catenin im Bereich für die Phosphorylierung stabilisiert ist und einen konstitutiv aktiven Komplex mit Tcf/Lef bildet, welcher zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt (Aberle et al., 1997; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997). Mithilfe eines ubiquitär exprimierten Promotors soll dieses mutagenisierte β -Catenin ektopisch dort zur Expression gebracht werden, wo es nativ nicht vorkommt oder wo es normalerweise aktiv ist, um eine Überexpression zu bewirken. Eine der Aufgaben dieser Arbeit ist es ein Expressionskonstrukt zu entwickeln, dass sich zur funktionellen Analyse dieses und anderer Proteine eignet, um folgend deren mögliche Funktion durch ektopische Expression zu untersuchen. Ziel ist die molekulare und funktionelle Untersuchung eines β -Catenins und anderer funktionsrelevanter Gene (s.u.) in *Hydractinia*.

Neben der Rolle von β -Catenin in der Gestaltbildungskontrolle soll darüber hinaus auch die Funktion beteiligter Gene, die indirekt über den Wnt-Signalweg reguliert werden, untersucht werden, um neue Erkenntnisse zur axialen Musterbildung in der Embryogenese hin zur Planularlarve von *Hydractinia* zu gewinnen. Ein solches Gen ist *Gooseoid* (*Gsc*).

Die Genexpression von *Gsc* wird durch zwei „Growth-factor-responsive-elements“ reguliert. Ein proximales Element vermittelt die Aktivierung durch ein β -Catenin/Wnt-Signal und ein distales Element aktiviert durch ein *transforming growth factor- β* (TGF- β)-Signal der *Activin/vegetalising factor-1* (Vg-1)/*nodal-related*-Familie (Watabe et al., 1995). Das β -Catenin/Wnt-Signal wird durch die Bindung des Homöodomänproteins Siamois vermittelt, welches ein Zielgen des maternalen β -Catenin-Signals ist (Laurent et al., 1997; De Robertis, 2004). Das Homöoboxprotein *Gsc* ist ein Transkriptionsfaktor, der im Organisator oder seinen Äquivalenten während der Gastrulation im Frosch, Huhn, Zebrafisch und der Maus exprimiert wird (Boucher et al., 2000). Das Gen konnte ursprünglich im Jahre 1991 aus einer cDNA-Bank isoliert werden, die aus dorsalen Urmundlippen von *Xenopus laevis* (Abk. *Xenopus*) hergestellt worden war (Blumberg et al., 1991). Der Name von *Gsc* wurde aufgrund der Ähnlichkeiten in seiner Homöobox zu den Genen *Gooseberry* und *Bicoid* aus *Drosophila*, die Mitglieder der Paired-Homöobox-Familie sind, von diesen beiden abgeleitet. *Gsc* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine funktionelle Ähnlichkeit in der DNA-Bindungsspezifität wie

das für anteriore Musterbildung verantwortliche Morphogen Bicoid aus *Drosophila* besitzt (Struhl et al., 1989; Blumberg et al., 1991). Gsc hat zwei konservierte Regionen. Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich eine konservierte Region, die als *engrailed homology region-1* (eh1)/*goosecoid engrailed homology*(GEH)-Domäne bezeichnet wird. Dieses aus sieben AS bestehende Sequenzmotiv findet man in einigen Klassen von Homöoboxproteinen (Engrailed, Goosecoid, *muscle segment homeobox*(Msh), NK (benannt nach den Initialen der Erstbeschreiber Nirenberg und Kim)1 und 2) und ist eine transkriptionelle Repressordomäne (Smith und Jayne, 1996; Jiménez et al., 1997, 1999; Mailhos et al., 1998). Der zweite konservierte Bereich von Gsc ist die Homöodomäne (HD), die ein konserviertes Lysin an Position 50 (K50) enthält, was charakteristisch ist für einige Proteine der Paired (Prd) Homöobox-Familie (Wilson et al., 1993). Die Proteine der Prd-Klasse werden durch eine HD, ähnlich der des *Prd*-Genes in *Drosophila* definiert. Sie sind gekennzeichnet durch unveränderliche Aminosäurereste, die diese von anderen HD-Klassen unterscheidet (Frigerio et al., 1986; Schneitz et al., 1993). Gsc zählt aufgrund seiner Homöobox und dessen DNA-Bindungsspezifität, ähnlich der von Bicoid, zu den Mitgliedern der Bicoid-Subfamilie der Paired Homöobox-Proteinfamilie.

Gsc war das erste isolierte Gen, bei dem gezeigt werden konnte, dass die Verteilung der mRNA in *Xenopus*-Embryonen, der erwarteten Lokalisierung des Organisatorgewebes entsprach (Cho et al., 1991). Die Mikroinjektion von *Gsc*-mRNA in die ventrale Seite von *Xenopus*-Embryonen, in welchem die Expression nicht vorhanden ist, führt zu einer zusätzlichen kompletten Körperachse mit viel notochordalem Gewebe und in einigen wenigen Fällen sogar zu kompletten Kopfstrukturen. Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der Menge der injizierten *Gsc*-mRNA eine Dorsalisierung von mesodermalem Gewebe hervorgerufen wird. Das Ergebnis legt nahe, dass *Gsc* eine wichtige Rolle in der dorso-ventralen Musterbildung in der frühen Gastrulation von *Xenopus* zukommt (Niehrs et al., 1994). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass *Gsc* die Eigenschaften des Spemann-Organisator imitiert und eine entscheidende Funktion im biochemischen Signalweg des Spemann'schen Organisatorphänomens übernimmt (Cho et al., 1991; Robertis et al., 1992).

In *H.vulgaris* konnte das Homolog von *Gsc* ebenfalls isoliert werden und wird hier als Cnidaria-Goosecoid (Cngsc) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass Cngsc funktionell konserviert ist und in einem Gewebe exprimiert wird, das als Organisator wirkt. In der *H.vulgaris* übernimmt dieses Aufgaben in der Organisator-Funktion, der Kopfbildung und in

der Differenzierung anteriorer Nervenzellen ähnlich den Funktionen, die *Gsc* in *Drosophila* und in Vertebraten übernimmt (Broun et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Homolog von *Gsc* aus der cDNA von *Hydractinia* isoliert und charakterisiert werden. Es soll dabei zum einen unter Kontrolle eines ubiquitär exprimierten Promotors ektopisch zur Expression gebracht werden und zum anderen das Expressionsmuster untersucht werden, indem man das Reportergen *green fluorescent protein (GFP)* unter die Kontrolle des Promotors von *Gsc* zur Expression bringt. Diese Untersuchungen sollen Erkenntnisse zur Genexpression, Proteinfunktion und Regulation von *Gsc* liefern und dadurch Rückschlüsse über seine mutmaßliche Rolle in *Hydractinia*, aber auch zur ursprünglichen Funktion in der Evolution der Metazoen ermöglichen.

1.4 Neuralspezifische Gene

Der Tierstamm der Cnidaria stellt Metazoen dar, die bereits ein Nervensystem ausgebildet haben. Sie besitzen ein gut entwickeltes Nervensystem, das ihnen ermöglicht einfache Bewegungen zu koordinieren und aktiv Beute zu fangen. Das Nervensystem besteht aus einem diffusen Nervennetz, das zusätzlich bei Polypen und Medusen zu Nervenringen ausgebildet ist (Pantin, 1952; Grimmelikhuijzen und Spencer, 1984; Grimmelikhuijzen, 1985). Das Nervensystem wird aus Nervenzellen und deren Fortsätzen gebildet, die zwischen den epithelialen Zellen der beiden Zellschichten eingestreut sind (Watanabe et al., 2009). Es gibt drei Zelltypen, die das Nervensystem der Cnidaria bilden. Das sind sensorisch-motorische, ganglionische Neuronen und mechanosensorische Zellen, die auch Nematozyten oder Cnidozyten genannt werden (Galliot und Quiquand, 2011).

Die Vertreter der Klasse der Hydrozoa aus dem Stamm der Cnidaria besitzen eine multipotente Zelllinie von migratorischen Stammzellen, aus denen alle Zelltypen des Nervensystems hervorgehen. Sie werden, da sie im interstitiellen Raum der Epithelzellen angesiedelt sind, als sogenannte interstitielle Zellen oder I-Zellen bezeichnet (Müller et al., 2004). Es konnte in *Hydra* gezeigt werden, dass die I-Zelllinie verschiedene Zelltypen hervorbringt, wie z.B. Keimzellen, entodermale Drüsen- und Schleimzellen, vier Typen von Nesselzellen, aber auch sensorische und ganglionische Neuronen. Die ektodermalen und entodermalen Epithelzellen gehen beide jeweils aus einer eigenen ektodermalen sowie einer entodermalen Zelllinie

hervor (David und Campbell, 1972; Campbell und David, 1974; David und Gierer, 1974; Bode und David, 1978; Bode, 1996; Bosch, 2007, 2008, 2009; Frank et al., 2009). Im Unterschied zu *Hydra* besitzt *Hydractinia* pluripotente Stammzellen. Von dieser I-Zelllinie stammen nicht nur Nematocyten, Nervenzellen und Keimzellen ab, sondern auch alle andere Zelltypen (Müller, 1967; Müller et al., 2004; Künzel et al., 2010; Plickert et al., 2012). Es existieren in *Hydractinia* verschiedene Nervenzelltypen, wie sensorische und ganglionische Neuronen, neurosekretorische und mechanosensorische Zellen, die alle durch neuronale Differenzierung aus einer I-Zelle hervorgegangen sind. Die neuronale Vielfalt entsteht aus Neuroblasten, die durch asymmetrische Zellteilungen aus einer Stammzelle hervorgehen und ausdifferenzieren. In *Hydractinia* ist bisher noch nicht bekannt, welcher molekulare Mechanismus oder welche neuronalen Gene an der Differenzierung der verschiedenen Nervenzelltypen aus einer I-Zelle beteiligt sind. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe transgener Tiere das Entstehen von neuronalen Elementen und Strukturen zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass sogenannte RNA-bindende Proteine (RBP; *RNA-binding protein*) an vielen Prozessen der neuronalen Entwicklung benötigt werden und eine entscheidende Rolle während der neuronalen Differenzierung spielen. Diese RBPs, wie zum Beispiel die Gene von *embryonic lethal abnormal visual system (ELAV)*, *Musashi* und *Staufen*, werden im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert. Sie sind dort an einer Vielzahl von zytoplasmatischen und nukleären RNA-Prozessen wie alternativem Spleißen, Stabilisierung, Transport und translationaler Repression von RNAs beteiligt (Agnès und Perron, 2004). In Mutationsstudien konnte man zeigen, dass einige RBPs in der neuronalen Entwicklung an Entscheidungen des Zellschicksals mitwirken. So werden die beiden Gene *Staufen* und *Musashi* in *Drosophila* während der asymmetrischen Zellteilung von neuronalen Vorläuferzellen benötigt (Broadus et al., 1998; Okano et al., 2002). ELAV wurde als erstes konserviertes Mitglied einer Familie von neuronalen RNA-bindenden Proteinen in Metazoen beschrieben (Yao et al., 1993). ELAV ist das Homolog der ELAV-ähnlichen-/Hu-Antigen-Proteine (*ELAV-like-/Hu-antigen proteins*) im Menschen und gilt als das Gründungsmitglied der ELAV/Hu-Familie von RBPs. Der Name des Gens *ELAV (embryonic lethal abnormal visual system)* leitet sich von Phänotypen aus *Drosophila* ab (Campos et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, dass das Gen *ELAV* in der frühen neuronalen Ausdifferenzierung von unreifen zu reifen Nervenzellen mitwirkt (Robinow et al., 1988). Die Expression von *ELAV* wird nicht nur ausschließlich in Nervenzellen am Beginn der neuronalen Differenzierung benötigt (Robinow und White,

1991), sondern ist auch lebenswichtig für die Entwicklung und den Fortbestand des Nervensystems (Campos et al., 1985). Seit seiner ersten Beschreibung im Jahre 1991 wird ELAV als der neuronale und post-mitotische Marker angesehen (Robinow und White, 1991).

Die Gene der ELAV/Hu-Familie sind in einer Vielzahl von Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen worden (Good, 1995; Antic und Keene, 1997). Neurale Gene wie *ELAV* und *Musashi* konnten bereits in den Genomen von *Hydra* und der zur Klasse der Anthozoa gehörenden Seeanemone *Nematostella* identifiziert werden (Watanabe et al., 2009). Aber es liegen über eine mögliche Funktion bei der neuralen Entwicklung oder neuronalen Differenzierung noch kaum Erkenntnisse bei Cnidariern vor. Es sind bislang nur Studien zum Gen *Nematostella vectensis Elav 1 (NvElav1)* aus *Nematostella*, das ein Homolog zum Bilateria *Elav1* ist, gemacht worden. *NvElav1* ist, wie Untersuchungen zeigten, für die normale Entwicklung in einer Teilgruppe von ektodermalen Neuronen erforderlich (Nakanishi et al., 2012). Die Kenntnisse zum Bau und der Funktion des Nervensystems der Cnidaria sind lückenhaft. Befunde zum Nervensystem in *Hydractinia* wurden mithilfe immunhistologischer Studien über Neuropeptide gewonnen. *Hydractinia* zeigt ein dichtes Nervennetz, das sich durch die Körpersäule und Kopfreion von Gastro-, Gono- und Spiralzoid zieht (Grimmelikhuijzen, 1985). Im Polyp von *Hydractinia* wurde das Neuropeptid Arginin-Phenylalanin-Amid (RFamid) in Nervenzellen nachgewiesen. RFamide-immunreaktive sensorische Nervenzellen sind in der Epidermis des Hypostoms mit grösster Dichte um die Mundöffnung herum vorhanden (Grimmelikhuijzen, 1985; Plickert, 1989). In Neuronen von *Hydractinia* wird auch das Neuropeptid Leucin-Tryptophan-Amid (LWamid) exprimiert (Leitz und Lay, 1995; Gajewski et al., 1996). Die LWamid-neurosekretorischen Nervenzellen kommen wie die RFamid-immunreaktiven Nervenzellen im anterioren Teil der sich entwickelnden sowie der reifen Larve vor (Plickert, 1989; Leitz und Lay, 1995; Gajewski et al., 1996; Plickert et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass LWamide eine entscheidende Rolle in der Metamorphose der Larve zum Primärpolypen übernehmen (Leitz et al., 1994; Gajewski et al., 1996; Plickert et al., 2003). Den RFamiden wird eine Funktion als Neurotransmitter in der lichtgerichteten Lokomotion der Larven zugeschrieben (Plickert et al., 2004).

Die Ergebnisse der Studien dieser beiden Neuropeptide brachten einen ersten Einblick in das Nervensystem von *Hydractinia*, das spezifisch über die einzige Körperachse angelegt ist. Über dieses Nervensystem werden wichtige Lebensfunktionen gesteuert, wie z.B. auch das lichtgesteuerte Verhalten. Die Untersuchung der Funktion neuraler Gene in Cnidariern bietet

die Möglichkeit, Einblicke in die Entwicklung des Nervensystems zu erhalten.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist es ein neuralspezifisches Gen aus *Hydractinia* zu isolieren, das in möglichst allen oder in sehr vielen Nervenzellen aktiv ist, insbesondere in solchen, die noch nicht aus immunhistologischen Studien mit anti-Neuropeptid-Antikörpern bekannt sind. Es soll das Expressionsmuster durch die Expression von *GFP* unter Kontrolle des Promotors *in vivo* analysiert werden. Das Ziel ist mit einem Expressionskonstrukt transgene *Hydractinia* zu erzeugen. In diesen sollen die Nervenzellen bzw. deren Vorläufer *in vivo* detektierbar werden. Die Untersuchungen an dem neuronalen Gen *ELAV* soll neue Einblicke in die Entwicklung und Funktion des Nervensystems des einfachen Metazoen *Hydractinia* geben.

1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Hydractinia echinata ist ein ursprünglicher Metazoe wie *Acropora*, *Hydra* und *Nematostella*, deren Genomprojekte gezeigt haben, dass bereits in den basalen Cnidariern die konservierten Gene existieren, die auch in höheren Metazoen die Entwicklung steuern (Putnam et al., 2007; Chapman et al., 2010; Shinzato et al., 2011; www.coralcoe.org.au/news/gene-secrets-of-the-reef-revealed-2). Es soll untersucht werden, ob auch in *Hydractinia* wesentliche Funktionen von Entwicklungsprozessen konserviert sind und dadurch einen Zugang zu allgemeingültigen Aussagen der Kontrollmechanismen der Entwicklung ermöglichen. Dass dies ein aussichtsreicher Ansatz ist, lässt sich beispielsweise an den Untersuchungen zur Achsenbildungskontrolle in *Hydractinia* belegen (Plickert et al., 2006). In *Hydractinia* sind auch die Gene konserviert, die in den Hauptsignalwegen die tierische Entwicklung kontrollieren, wie sich bereits jetzt im noch laufenden Genomprojekt von *Hydractinia* (Heiermann, Plickert, Schiffer) zeigt (Plickert et al., 2012). Es ist zu erwarten, dass neben diesen noch weitere Gene in *Hydractinia* konserviert sind, die auch in höheren Metazoen die Entwicklung kontrollieren. Aber welche Funktionen übernehmen diese Gene hier?

Das Ziel dieser Arbeit ist der Einstieg in die Funktionsanalyse von Proteinen in der Entwicklungskontrolle. Hierzu soll versucht werden, Expressionskonstrukte herzustellen, die eine ektopische Expression von Entwicklungskontrollgenen in transgenen Tieren von *Hydractinia* ermöglichen. Diese Studie soll dazu beitragen einen Zugang zum Verständnis der molekularen Mechanismen der axialen und neuralen Musterbildung in der Embryogenese und post-

embryonalen Entwicklung zu erhalten. Der Einblick in die Entwicklungsvorgänge dieses basalen Organismus ermöglicht den Ursprung und die Evolution von Entwicklungsprozessen der Metazoen besser zu verstehen. Dabei bestehen folgende Schwerpunkte:

1. Unterschiedliche Promotoren von ubiquitär exprimierten Haushaltsgenen sollen ermittelt und isoliert werden. Nachfolgend soll deren Expression in Transgenen untersucht werden. Es soll der erfolgversprechendste Promotor zur Entwicklung eines Expressionskonstruktes ausgewählt werden, um mit diesem funktionell zu untersuchende Gene ektopisch zur Expression zu bringen.
2. Eine zentrale Aufgabe ist mit einem ubiquitär exprimierten Promotor ein Expressionskonstrukt zu entwickeln, mit dem man die Funktion von Proteinen durch ektopische Expression untersuchen kann. Eine erste funktionelle Studie ist mit einem mutagenisiertem β -*Catenin* geplant, um die Funktion des zentralen Signals im Wnt-Weg weitergehend zu charakterisieren. Es soll außerdem das indirekt über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg regulierte Homolog von *Gsc* isoliert und charakterisiert werden. Dabei soll zum einen das Expressionsmuster untersucht werden und zum anderen soll die Funktion mithilfe einer ektopischen Expression erforscht werden.
3. Ein weiteres Projekt ist die Isolation eines neuralspezifischen Gens, um über dessen kinetische Expression *in vivo* neue Einblicke in die Entwicklung und Funktion des Nervensystems von *Hydractinia* zu erhalten. Das Ziel ist es mit einem Expressionskonstrukt transgene *Hydractinia* zu erzeugen in denen Nervenzellen und ihre Vorstadien *in vivo* detektierbar werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösungen sowie spezielle Reagenzien und Materialien werden im Zusammenhang mit den einzelnen Methoden aufgeführt. Wenn nicht gesondert erwähnt, wurden die Chemikalien und Produkte von den Firmen Applichem (Darmstadt), J. T. Baker (Griesheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) bezogen. Die verwendeten Chemikalien und Zutaten für die Nährmedien verfügen über analytischen Reinheitsgrad.

2.1.2 Versuchsorganismus

2.1.2.1 Haltung und Zucht des Versuchstieres *Hydractinia echinata*

Die Kolonien von *Hydractinia echinata* stammen aus den Küstengewässern vor der Hochseeinsel Helgoland (Deutschland) und vor Roscoff/Bretagne (Frankreich). Sie wurden in einer Klimakammer bei 15°C in einem 250l fassenden Aquarium mit Filteranlage in künstlichem Seewasser kultiviert. Der künstliche Tag-/Nachtrhythmus war auf 13h hell und 11h dunkel eingestellt. Die adulten Tiere werden dreimal wöchentlich mit frisch geschlüpften Nauplius-Larven von *Artemia salina* und gefrorenem Fisch/Muschelfleisch (mit einem handelsüblichen Küchenmixer zerkleinert) gefüttert. Die Fütterung erfolgt nach dem Ablachen in einem belüfteten 10l Eimer mit frischem Seewasser. Die adulten Tiere wurden anschließend ausgewaschen und ins Seewasserbecken zurückgesetzt.

2.1.2.2 Induktion der Eiablage und Gewinnung von Zygoten

Die tägliche lichtinduzierte Gametenabgabe von *Hydractinia* erfolgt etwa 1 - 2 Stunden nach Lichteintritt (Ballard, 1942; Plickert et al., 1988; Walther et al., 1996). Die befruchteten Eier wurden aus Abblaischalen abgesammelt, gesäubert und standen für Injektionen oder Anzucht von Embryonen zur Verfügung. Das Gelege und die sich daraus entwickelnden Embryonen wurden bei konstanten 15°C in einem Raum mit künstlichem Tag-/Nachtrhythmus kultiviert.

2.1.3. Nährmedien und -böden für Bakterien

2.1.3.1 LB-Medium

Für 1l LB-Medium: 10g Trypton, 5g Yeast Extract, 5g NaCl abwiegen und 800ml A.dest hinzugeben, pH-Wert auf 7,5 mit NaOH einstellen. Danach auf 1l mit A.dest. auffüllen und autoklavieren.

2.1.3.2 LB-Agarplatten

Für LB-Agarplatten: 10g Trypton, 5g Yeast Extract, 5g NaCl abwiegen und 800ml A.dest hinzugeben, pH-Wert auf 7,5 mit NaOH einstellen und 15g Agar Agar hinzugeben. Anschließend auf 1l mit A.dest auffüllen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren das Medium im Wasserbad auf 60°C herunterkühlen, 100mg Carbenicillin (Konzentration von 100µg/ml) unter Rühren hinzugeben und unter sterilen Bedingungen die Platten gießen. Plattenlagerung bei 4°C im Kühlschrank.

2.1.4 Bakterien und Plasmide

2.1.4.1 Bakterien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme von *E.coli* sind nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bezugsquelle/Referenz
C600	Dr. R. Heiermann
NEB 10-beta Competent <i>E.coli</i> (High Efficiency)	New England Biolabs (Ipswich, England)

2.1.4.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Ausgangskonstrukte sind in Tabelle 2 angeführt. Die DNA-Sequenzen sind im Begleitheft des Herstellers oder im Anhang aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Ausgangskonstrukte

Vektor	Verwendung	Hersteller/Referenz
<i>HeActIIPrGFPRas2HeActIITerm</i>	Expressionskonstrukt	Geschenk von W. Tilmann (Sequenz noch nicht veröffentlicht)
<i>HeActIIPrGFP2ARas2HeActIITerm</i>	Expressionskonstrukt	Geschenk von W. Tilmann (Sequenz noch nicht veröffentlicht)
<i>HeActIIPr51AsAct2AGFPHeActIITerm</i>	Expressionskonstrukt	Geschenk von Dr. R. Heiermann und W. Tilmann (Sequenz noch nicht veröffentlicht)
<i>HsActinPromotorGFPΔEcoRI</i> (<i>pAct-I:51Act-eGFP</i>)	Expressionskonstrukt	Geschenk von Dr. R. Heiermann (Sequenz noch nicht veröffentlicht)

<i>HsActinPromotorGFPΔSpHI</i>	Expressionskonstrukt	Geschenk von Dr. R. Heiermann (Sequenz noch nicht veröffentlicht)
pGEM-T-Vector	Klonierung, Run-off-Transkription	Promega, Madison (USA)
pWPI	Expressionskonstrukt (IRES-Kassette)	Addgene (USA); Geschenk von AG Roth (Universität Köln)

2.1.5 Enzyme und Oligonukleotide

2.1.5.1 Enzyme

Die in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführten Enzyme kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Die in Kits enthaltenen und verwendeten Enzyme sind hier nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller/Referenz
ApaI	Fermentas, St. Leon-Rot
BcuI (SpeI)	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot
Eco32I (EcoRV)	Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
HindIII	Fermentas, St. Leon-Rot
KpnI	Fermentas, St. Leon-Rot
NcoI	Fermentas, St. Leon-Rot

NotI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (native)	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes Oy, Espoo (Finnland)
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot
PstI	Fermentas, St. Leon-Rot
PvuI	Fermentas, St. Leon-Rot
PvuII	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuclease-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roche, Mannheim
RNase T1	Roche, Mannheim
SP6 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>Taq</i> DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Geschenk von Dr. M. Kroiher (Universität Köln)
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison (USA)
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynucleotide Kinase	Fermentas, St. Leon-Rot
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
XbaI	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert, gereinigt und lyophilisiert. Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer sind mit Namen und Sequenz in Tabelle 4 aufgelistet und in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide

Primernamen:	Sequenz (5'→3')
Genspezifische Primer	
HeActPrIfwd	aaggggtgtgtgcatcatattaaagctgcg
HeActPrIII	cgaggacaataacatgactcaaacgagcc
HeActIPrSeqPr632bprev	attatcataagttaatctcccatcg
AktIpromotorbefore ATGrev	tttgtaaattatttagttttgtacac
HeAktITermGFPoverhang-fwd	gatgaactatacaataagtttttctaatttagaac
HeAktIIITermGFPoverhang-fwd	gatgaactatacaataactttccgacgcctactgg
ActTermIIIIfwdout	tcgtcgactacaaaaagattcgcattagg
ActTermIIIIfwdin	gctgaataagtagagatgtttgggggacg
HeActTermIIIApaIrev	tagggcccgttcttgacatcagaaattatagacttaagaaagcc
HeActinTermApaIrev	tagggcccacacagcttcttttatcttaactaagcg
HeActPrISeq.Primerrev	ggtaccgaaaaggacgcctcgtgc
H.eAktinIIforStopwithout Notrev	aaagcatttctgtggacaatggatgggccc
HeActinRealtimeafter1.Intro-nrev	agttcattgtagaaagtgtgatgcc

HeActinIIRealtimebeforATG fwd	gacaagacgttcatttttctcttac
HeActinTerm.III fwd	taactttccgacgctcctacttggtattac
HeActinTerm.Ifwd	taagtttttctaaatttagaacttttgaataagg
HeNewActKozakSeq.Pr.fwd	gcgttctattgttttgagtcaacaatgg
Schwarz_fow	ggttggtatgggacaaaaagatt
HeAct_rev	tcccagttggtgacgattccgtg
HeActIbeforATGfwdin	aaacgtttgtgttacctttttgtagtgttac
HeActIbeforATGfwdout	gtatttctaatcacttcgacttcataagagctcg
HeActIIIbeforATGfwdin	tactcaccaagttagagaagacaacacgtagc
HeActIIIbeforATGfwdout	gatctgtgttctctacagtttactcaccaag
HeNewActPrbeforeStopNotI-rev	tagcggccgcaaagcattttctgtggacaatggatgggc
HeTermforXbaActPr.with-Stopfwd	taagtccttgaagtaaaagtcacatccacaac
HeActTermPLA6rev	ttaaagaatatctcaaagtcctgaccagcc
HeActTermPLA5rev	ctttgcaaaatatttctacgccattcgcg
HeActProm.IHindIII fwd	taaagcttcactagaatagccaatcaaaaagcgcg
HeTermforXbaActPr.rev (Doubleconstruct)	gtttccaactttggaacgatgtagtgg
HeTermforXbaActPr.ApaI rev	tagggcccgtttccaactttggaacgatgtagtgg
HeTermforXbaActPr.withStopfwd	taagtccttgaagtaaaagtcacatccacaac

ActinSeq.Primerrev	gtttggagatccacatctgttgaagg
HeActin5UTRbeforATGrev	tttgagtttagtttttacgaagtgaagagaaa
HeActATGStartfwd	atggccgatgatgatgttctgctctcg
HeActTermPLA1rev	ctcgccgtctgaagcattattttcaggc
HeActTermPLA3rev	tatttccatcgagcgtaaacgaacgaacc
HeActPr2Seqfwd	acacgatctaattcactgtctcctaaagatc
HeActPr2revbeforATG	tttgaaattgtttttagagctacgtgtgt
HeActTerm fwd	atcgctggcgccttggttaatcc
HEnewActPromAS51Notrev	tagcggccgcttttgcccataccaacctgactccg
HEnewActPromXbafwd	atactagtgaatgttcacttcgatatttagcaaggcgg
HEnewActPromSeq681fwd	ctgcgtgcaacaatctgagattg
HEnewActPromSeq530rev	gttttaagctaatacctgccgg
HeAct5UTRrevin	actttaagttcgtaatgaacctggtgagc
HeActinrevout	cgcttgcttgagcttcatctccacag
HeActinrevin	ttttgtccataccaacctgactccctg
HeActin5UTRbeforATGrev	tttgagtttagtttttacgaagtgaagagaaa
HeActinfwdout	gacgtcgacatccgtaaagattgtacgcc
HeActinfwdin	ctggtggtacgactatgttcctggtattgc
HeNewActPrXbaOhneSpeI-fwd (doubleconstruct)	gaatgttcacttcgatatttagcaaggcgg
HeActIIIPrSeqPprev	ttcagtattcagtgatttaggcgtcg
HeActIIIPrSeqPrfwd	taaagatcacctcggatctcctagg

HeActITermSeqPr.fwd	ttcgcgataaggatgtgaacgg
HeActIIITermSeq.fwd	ctttgatcatttttagcagccgcc
H.e.3`Bcat fow400	gcgtggtgtgtgagttggc
H.e.5`Bcat rev1800	agcttgacaagtcttggtac
HeßCat_rev_in	agaacagctgcggcatacg
HeßCat_out_rev	gacttttatcttccgacatgcg
He_b_cat_NotITArev	tagcggccgccatatccgaatcaaaccacggggtt
He_b_catATGfwd	atggcacttattgatgacctaagtct
betCatS99Arev	ttgaataccagcatcaatggtatagcc
betCatT103S107Afwd	gctgctgcaccagcaataaaaggtgg
HeEF1beforStoprevNotNEW	tagcggccgcttctttttccggtagccttctgagc
HeEF1alpharevtosplinkin	caatgaccagtgaacagcacagcacc
HeEF1ailpha5Utrfwd	gagataacagaggggaaaattccttgaa
HeEF1alphaafterTATArev	ggcgtacaaagtgacttttcacggtc
H.e.EF1alpharevout	ttcccatctctgggcttcttctcca
H.e.EF1alpharevin	tcgatttgccagagtcgacatgacc
H.e.EF1alphabeforStopwitho utNotrev	cttctttttccggtagccttctgagcgg
HeEF1alphabeforeStopNotIr ev	tagcggccgccataggtcacttctttttccggtagcc
H.e.3kbEF1Pr.alphaSequenz- Pr.603bpfwd	ctcgtgtgtattggctgcgatatagc

H.e.3kbEF1Pr.alphaSequenz-Pr.1308bprev	gcgcgtagactaaagctatattcggc
HeEF1SeqPrimerrev	ccaacagggacagtccaatgccacc
HeEF1SeqPrimerfwd	atggcaccaaaggctgttgagaaaatcc
HeEf1Termrev(doubleconstruct)	gcggcaacaagatttatcaaattcgcgc
HeEF1Pr.alphabeforATGrev	tttgacgtgggatctaaaaataaagactaaaactaa
HeEF1alphaTerminatorfwd	tgacctatgaaaataaatactgcataatgttatcc
HeEF1revORF	agagtcgacatgaccgattacaacaatgttg
HeEF13SeqUtrfwd	gccgaagcactaccaggtgataatg
HeEF1Pr.SeqPrfwd	ggctgcgatatagctatattgcagcc
HeEf1TermApaIrev	tagggcccgcggcaacaagatttatcaaattcgcgc
HeEF1alphaPr.1kbHindfwd	taaagcttaattcttttttttagtcaaattctcaatg
HeEF1alphaORF24AsNotrev	tagcggccgctcgattgccagagtcgacatgacc
HeEF1alpha3`RACEfwdout	tggttacaatcccaaagctgttgcttttg
HeEF1alpha3`RACEfwdin	caatttctggtggcatggggataacatg
HeElavBrevin	gaattccgttaatgtcgaagccgatggcgc
HeELAVBTermSeq.rev	gtaacaccgtcctccttaggagc
HeELAVBrevout	gagtgtgagctcgatggcgtccgatgg
HeElavBTermSeq.Primerrev	gccaaaatgcattgtgggaacctgtcc
H.e.ElavBbeforStopwithout-Notrev	agccatagataaattaccttggcttttgggacgc
HeElavBStartATGfwd	atggctacagcgcatttaatgaatggacacac

HeElavBPr.EcoRI fwd	tagaattccaagtttgactgtttgttgaaataagtatgg
HeElavBPr.SeqPrlongrev	cagaagtgtttcaactaatttcccgcacg
HeElavBtermApaIrev	tagggcccgcctaaagctgaagttccggcagtagctcg
HeElavBPr.longSeq.rev	agtaccttttcttcacaaatacactttcttacg
HeElavBTermfwd	taagatattggctaaatcatcttttatttgaatgtgg
HeElavBTermfwdout	tcgacgcaaaggcttgaaacgctttcc
HeElavBTermfwdin	agggcgtttttagcctctgcgtagaagg
HeElavBfwdout	agcgccatcggcttcgacattaaacgg
HeElavBfwdin	gtgtattgtatacaacctccatcggacgcc
ElavPromBbeforATGrev	accaatttagacagtgttgattataaaacaataatgg
ElavPromBforTATAnew	ccttttgcgagacctggttccattcgcgc
HeElavBPr.afterTATAbox-revin	ttagaacgattttgaggctgggaattttatgac
HeElavBPr.beforTATAbox-revout	gctgagacctggttccattcgcgcac
HeElavPrsearchrevout	cttggtgcagataatttataattaagttgtagc
HeElavPrsearchrevin	attttcatcgtctatattctgttgatcagcttcg
HeGSCrev	ctgtgcaatttttcgcgcatcagtagc
HeGSCfow	tactgatgcgcgaaaaaattgcacaga
H.e.GSCATGfwd	atgagttccttcttgatcaaaaactgctc
H.e.GSCrevStop	tagcggccgcaacgtttgtgttattttgac
H.e.GSC-Pr.fwd	ccgattttaatgtaattcattccctgg

H.e.GSC-Pr.rev	catataccactcatagcacaccg
H.e.GSCProm.HindIII fwd	taaagcttctagagatgtaaaattgaaaaaacgagc
HeGSCTerminatorApaI rev	tagggcccttctaataactctcctatagataaccagactc
HeGSCTerminator fwd	taaactggttccaatatgttaaataatattataatc
HeGSCPrbeforATG rev	tcttctctattatataagttgtgctctccac
GSCPrLongHindIII fwd	taaagcttctgatacagacatcactcactgtgacag
HeGSCwithoutNotIrevStop	aacgttggkgtttatgttcacatcttgcg
GSCPr.Seq.overXBA-Siterev	ttgtgggcaacatctcggcg
GSCPr longSeq.Prrev	gtgctgccagtccttaaacattcag
HeGSCTermlongfwdin	ccgattactattatattctcctaacataaagcg
HeGSCTermlongfwdout	gcattctcgattaagtctatgttgcagaccag
HeGSCPromRevin	ccttatattcaattatcacctcttctagcgcg
HeGSCPromRevout	ctcgttctcagatacaatgtggcacc
HeGSCTermlongNEW fwd	gtgtcgtcttctcgcgatgtttcttccaacc
HeGSCPr.afterEcoRIsiterev	aaagataatgagatgcaaattggcgctcgcc
HeGSCPr.after2.EcoRIsiterev	actctaagtaaactgccctagtagcaaaacc
HeGscTermlongafterEcoRIsitefwdin	taaattcagctgttccgtcttttgcacg
HeGscTermlongafterEcoRIsitefwdout	gctaaaatgaaagaagcggagctacctgc
HeGSC5UTRT7Teil fwd	cgactcactataggggtttaaatcgattgcactggcacagacagg
HeGSC3UTR rev	cgtaaatcctttatgaagtaaatatatacaaatattag

HeGSCTermlongApaIrev	taaagcttaatctgtgaaaaagggttcttcttggggc
H.e.GSCbeforStopwithout-Notrev	aacgtttgtgtttatgttcacatcttcgctg
HeGSCwithStoprev	ttaaagctttgtgtttatgttcacatcttcgc
H.e.GSCrevout	atctgtgcaatttttcgcgc
H.e.GSCfwdout	ccagacgtactgatgcgcgaa
GSCStoprevneu	tagcggccgcaacgtttgkgtttatgttc
HeGSCTermfwdout	acgtccgagaaattatgttggcgtgagaa
HeGSCTermfwdin	gacagcgaagatgtgacaaaaataacacaaacg
H.e.GSCProm.fwdout	aacgagccaagactagagatgtaaaattttaa
HeGSCPr3,7kbHindIII fwd	taaagcttgaaccatttctactgcagttgatttgcg
CODEHOP-Primer:	
Elav ClytB KGFGFrev	ggccatgttcacgaagccrwanccy
Elav ClytB VKFANfwd	cgagccaatcacctgaarttygnaa
GSCfow	ttcaataagacgcactaccngayg
GSCrev	ggctcgtcgattttgaaccanacyc
Ubidegfwd	atgcagatttctgttaaacnctnacngnaa
Ubidegrev	gcagggtagactcttttggatgtrtarc
Expressionsvektor-Primer:	
KSENDApaIfwd	tagggcccggaaacagctatgacatgattacgcc

KSStartApaIrev	tagggccccacatttccccgaaaagtgccac
GFPrev	ccatgcatgtgtaatcccagcagc
GFPfwd	gccatgcccgaaggttatgtacagg
HewntVectorRev	tttgtaaataatttagttttgtacacactac
LigDVectGFP-Fusion+TA	tagcggccgctgcagccccggt
GFPbeforStoprev	ttgtatagttcatccatgccatgtgtaatcc
KSStartApaIfwd	tagggcccgtggcacttttcggggaaatgtgc
EGFP-ATG-Startfwd	atgagtaaaggagaagaacttttactgg
KS-EndApaI NEWfwdout	tagggcccagcggataacaatttcacacagg
KSStartNewApatermrev	tagggcccttcattaaattaatggataagggaaaagaaagg
KS-Endrev	ggcgtaatcatggcatagctgtttcctg
KSSeq.Pr.inPromÜbergang-fwd	gcttccggctcgtatgttgtgtgg
KSSeq.Pr.inTermÜbergang-rev	cagggtattgtctcatgagcg
KSEndSpelfwd	taactagtgggaaacagctatgaccatgattacgcc
KSENDApaIfwd	tagggcccggaaacagctatgaccatgattacgcc
A2vecfusrev	tggctctgggttttcttctaca
A2vecfusfwd	ggatccggagcaacaacttc
GFPrepairELAV-Konfwd	ctatacaataagatattggctaataatcatctttattttg
GFPrepairELAV-Konrev	ttcatccatgccatgtgtaatcccagcagc
IRESfwd	ccccccccctaacgttactggcc

IRESrev	ggtattatcatcgtgttttcaaaggaaaacc
Vektorspezifische Primer:	
T7	taatacgaactcactataggg
Sp6long	cgccaagctatttaggtgacactatag
Adapterspezifische Primer:	
Splinkerette:	
Splink top	cgaatcgtaaccgttcgtacgagaatcgtacgagaatcgtgtcctctccaacgagcc aaga
Splink ecoI	aatttcttggtcgtttttttgcaaaaa
Splink Xba	ctagtcttggtcgtttttttgcaaaaa
Splink hind	Agcttcttggtcgtttttttgcaaaaa
Splinkeretten-Primer:	
Splink0	cgaatcgtaaccgttcgtacgagaa
Splinki	tcgtacgagaatcgtgtcctctcc
Primer für cDNA-Synthese/ RACE:	
TRsa	cgcagtcggtac(t) ₁₃
TS-oligo	aagcagtggtatcaacgcagagtacgcrgrgrg

DAP-TS	cgacgtggactatccatgaacgcaaacgagtggtatcaacgcagagt
DAP	cgacgtggactatccatgaacgca
DAP-TRsa	cgacgtggactatccatgaacgcacgcagtcggtac(t) ₁₃
TS-PCR	aagcagtggtatcaacgcagagt

Nomenklatur der Wobble-Basen der CODEHOP-Primer: R=A+G, W=A+T, Y=C+T, N=A+G+C+T

2.1.6 Molekulargewichtsstandards und Kits

2.1.6.1 Molekulargewichtsstandards

Die Bestimmung der Größe eines DNA- oder RNA-Fragments erfolgte mit verschiedenen Größenstandards. Es wurden jeweils 5µl eines Größenstandards (100ng/µl) neben der Probe auf das Agarosegel aufgetragen.

Tab. 5: Verwendete Größenstandards

DNA-Marker	Hersteller
1KBp DNA-Leiter	MBBL Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
Lambda Bst EII	MBBL Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
Lambda EcoRI/HindIII	MBBL Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
Lambda Hind III	MBBL Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
pBR328 Mix	MBBL Dr. Bartling GmbH, Bielefeld
pUC19 MspI	MBBL Dr. Bartling GmbH, Bielefeld

2.1.6.2 Kits

Die in Tabelle 5 aufgeführten Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt und nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers ausgeführt.

Tab. 6: Verwendete Kits

Bezeichnung des Kits	Hersteller
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City (USA)
GeneJET [™] Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneJET [™] PCR Purification Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
mMESSAGE mMACHINE [®] T7 ULTRA Kit	Ambion [®] , Austin (USA)
NucleoSpin [®] Extract II	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin [®] RNA Clean-up XS	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
pGEM [®] -T Vector System I	Promega, Madison (USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript [™] II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.7. Geräte, Computer und Computerprogramme

2.1.7.1 Geräte

2.1.7.1.1 Laborgeräte

Tab. 7: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Fluoreszenz-Beleuchtung HXP 120	Carl Zeiss AG, Jena

Fluoreszenz-Beleuchtung HGFI	Intensilight C-	Nikon GmbH, Düsseldorf
Heizblock TH26		HLC Bio Tech, Bovenden
iCycler		Bio Rad, Hercules (USA)
Injektionsanlage 820	Pneumatic PicoPump PV	World Precision Instruments, Sarasota (USA)
Kaltlichtquelle (KL) 1500 electronic		SCHOTT AG, Mainz
Kaltlichtquelle (KL) 1500 LCD		SCHOTT AG, Mainz
Mastercycler [®] gradient		Eppendorf, Hamburg
Mastercycler [®] personal		Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator		Ernst Leitz GmbH, Wetzlar
NanoDrop [®] ND-1000 meter	UV/Vis-Spektralphoto-	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten PIPETMAN [®] (P2, P10, P20, P200, P1000)		Gilson, Inc., Middleton (USA)
Schüttler SM 30 mit Inkubationshaube TH 30		Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Tiefkühlschrank (-80°C) MDF-U53V		SANYO Electric Co., Ltd., Moriguchi (Japan)
Trockenschrank WTB		Binder GmbH, Tuttlingen
Ultra Turrax T 25		Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Vortexer REAX 1R		Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim

Waage Sartorius BP310 S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Julabo 20B	Julabo GmbH, Seelbach
Vakuumpumpe VACUUM PUMP UNIT	VACUUBRAND GmbH + Co, Wertheim
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg

2.1.7.1.2 Optische Geräte

Die Dokumentation und Auswertung erfolgte mit den in Tabelle 7 aufgeführten optischen Geräten und der entsprechenden Software des Herstellers.

Tab. 8: Verwendete Optische Geräte

Gerät	Hersteller
AlphaImager [®]	Alpha Innotech Corporation, Santa Clara (USA)
AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Jena
AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Jena
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss AG, Jena
LSM 510	Carl Zeiss AG, Jena
SMZ1500	Nikon GmbH, Düsseldorf

2.1.7.2 Computer

Asus, Notebook (X73B), AMD Brazos Dual Core E450 1,65GHz

2.1.7.3 Computerprogramme

2.1.7.3.1 Allgemeine Software

Tab. 9: Verwendete Standard-Software

Software	Hersteller
Office Home and Student 2010	Microsoft
Windows 7 Home Premium	Microsoft

2.1.7.3.2 Software zur Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der Bilder, die mit den unter 2.1.7.1.2 beschriebenen optischen Geräten erstellt wurden, erfolgte mit der in Tabelle 10 angegebenen Software.

Tab. 10: Verwendete Bildbearbeitungs-Software

Software	Hersteller
Office Home and Student 2010	Microsoft
Windows 7 Home Premium	Microsoft

2.1.7.3.3 Software zur Sequenzanalyse

Tab. 11: Verwendete Software zur Sequenzanalyse

Software	Verwendung	Internetadresse/Referenz
Chromas LITE Version 2.1	Analyse von Sequenzierungsdaten	Technelysium Pty Ltd www.technelysium.com.au

2.1.7.3.4 Sequenzanalyse im Internet

Tab. 12: Verwendete Programme und Datenbanken

Software	Verwendung	Internetadresse/Referenz
ClustalW2	Multiples Sequenzalignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Expasy translate tool	Übersetzung von DNA-Sequenzen in Protein-Sequenzen	http://web.expasy.org/translate/
NCBI-BLAST	Homologiesuche mit DNA- und Proteinsequenzen	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NCBI-Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
NCBI-Conserved Domains and Protein Classification	Analyse und Charakterisierung von Proteinen und Protein-Domänen/-Motiven	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml ; Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2009 und 2011
Universal Protein Resource (UniProt)	Proteinsequenzdatenbank, Analyse von Proteinen und Proteindomänen	http://www.uniprot.org/

2.1.7.3.5 Primeranalyse und -design im Internet

Tab. 13: Verwendete Programme

Software	Verwendung	Internetadresse/Referenz
Oligo Calc	Analyse von Primern	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html ; W. A. Kibbe, 2007

CODEHOP	Design von degenerierten Primern	http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html ; Rose et al., 1998, 2003
---------	----------------------------------	--

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden

Die biologischen Versuche mit dem Versuchsorganismus *Hydractinia echinata* wurden alle bei einer Temperatur von 18°C durchgeführt. Während der gesamten Dauer der Experimente wurden die Tiere, wenn nicht anders angegeben, nicht gefüttert.

2.2.1.1 Metamorphose-Induktion

Um Primärpolypen für die Bildung einer Polypenkolonie zu gewinnen, wurden 3 Tage alte Larven in 112mM CsCl in Seewasser inkubiert. Die Metamorphose-Induktion wurde für 3h im Dunkeln durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz dreimal mit frisch filtriertem Seewasser ausgewaschen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Protokollen von Sambrook und Russell (2001) ausgeführt. Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeitsabläufe erfolgten, falls nicht anders angeführt, bei Raumtemperatur.

2.2.2.1 Modifikation und Restriktion von DNA-Fragmenten

2.2.2.1.1 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die PCR-Fragmente, die in einen dephosphorylierten Vektor ligiert werden, müssen phosphoryliert sein. Die synthetisch hergestellten Oligonukleotide (s. 2.1.5.2), die zur

Amplifikation in einer PCR eingesetzt werden, besitzen keine 5`Phosphatgruppe. Die Phosphorylierung von PCR-Fragmenten erfolgt mit der T4-Polynukleotid-Kinase, indem diese die endständige γ -Phosphatgruppe von ATP auf das 5'-Hydroxyende von einzel- und doppelsträngiger DNA überträgt. Die Phosphorylierung von aufgereinigten DNA-Fragmenten wurde mit der T4-Polynukleotid-Kinase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nachfolgend fand eine Aufreinigung statt (s. 2.2.2.3.2). Im Anschluss wurde das phosphorylierte DNA-Fragment in der Ligation (s. 2.2.2.2.2) eingesetzt.

2.2.2.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Ein linearisierter Plasmid-Vektor, der glatte oder kompatible Enden aufweist, muss für die Ligation dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierung wurde mit der FastAPTMThermosensitive Alkaline Phosphatase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nachfolgend fand eine Aufreinigung statt (s. 2.2.2.3.2). Im Anschluss wurde der dephosphorylierte Vektor in der Ligation (s. 2.2.2.2.2) eingesetzt.

2.2.2.1.3 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers des Restriktionsenzymes mit dem entsprechenden Reaktionspuffer durchgeführt. Die Restriktion fand, wenn nicht anders angegeben, in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l statt. Im Anschluss an die Auswertung über ein Agarosegel erfolgte die Aufreinigung des geschnittenen DNA-Fragments (s. 2.2.2.3.1 oder 2.2.2.3.2). Ein geschnittener Vektor, der zur Klonierung eingesetzt werden soll, wurde nach der Restriktion dephosphoryliert (s. 2.2.2.1.2).

2.2.2.2 Ligation, Transformation und Analyse von Bakterien

2.2.2.2.1 Ligation von PCR-Fragmenten in einen pGEM-T-Vector (T/A-Klonierung)

Die Ligation von PCR-Fragmenten mit einem A-Überhang (s. 2.2.2.8.4) erfolgte in den linearisierten pGEM-T-Vector mit einem T-Überhang. Diese Methode der T/A-Klonierung wurde mit dem pGEM[®]-T Vector System I durchgeführt. Das Insert (PCR-Fragment) wurde in einem molaren Verhältnis von 3:1 zum Vektor mit 0,3µl T4-DNA-Ligase (3Weiss units/µl), 5µl 2X Rapid Ligation Buffer in der Ligation in einem 10µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Reaktion wurde 1h bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 15µl TE-Puffer (TE) verdünnt. Es fand eine Hitzeinaktivierung für 10min bei 65°C statt. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz für eine anschließende Transformation auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

Lösung:

TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

2.2.2.2.2 Ligation von PCR-Fragmenten (Gerichtete Klonierung)

Die Ligation von PCR-Fragmenten, die mithilfe der Splinkerette-PCR (s. 2.2.2.8.3) aus gesplinkelter genomischer DNA amplifiziert wurden, erfolgte richtungsorientiert in einen Vektor. Dafür wurden das Insert (PCR-Fragment) und der Vektor mit demselben Restriktionsenzym geschnitten (s. 2.2.2.1.3). Das Insert und der Vektor wiesen an den Enden nun jeweils ein „sticky end“ (klebriges Ende) und ein „blunt end“ (glattes Ende) auf. Im Anschluss wurde das „blunt end“ des Inserts phosphoryliert (s. 2.2.2.1.1) und das des Vektors dephosphoryliert (s. 2.2.2.1.2). Das Insert wurde in einem molaren Verhältnis von 5:1 zum Vektor mit 0,3µl T4-DNA-Ligase (5/µl), 1µl 10x T4 DNA Ligase Buffer in der Ligation in einem 10µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Reaktion wurde 1h bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 15µl TE verdünnt. Es fand eine Hitzeinaktivierung für 10min bei 65°C statt. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz für eine anschließende Transformation auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

Lösung:

TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

2.2.2.2.3 Transformation

Die Transformation der chemisch kompetenten *E.coli* erfolgte modifiziert nach dem Protokoll „High Efficiency Transformation Protocol“ von New England Biolabs. Ein 50µl Aliquot kompetenter Zellen wurde 10min auf Eis aufgetaut. Es wurde 12,5µl des verdünnten Ligationsansatzes (s. 2.2.2.2.1) zu den Zellen pipettiert und durch vorsichtiges schnippen mit einem Finger gegen das Reaktionsgefäß gemischt. Danach wurde der Transformationsansatz 30min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine 30sek Hitzebehandlung bei 42°C in einem Wasserbad. Der Transformationsansatz wurde sofort für 5min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 950µl bei RT gelagertes SOC-Medium hinzupipettiert und durch mehrmaliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt. Es folgte unter Schütteln (250rpm) eine 45-minütige Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C. Die carbenicillinhaltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml) wurden 30min vor dem Ausplattieren bei 37°C vorgewärmt. Im Anschluss wurden 100µl direkt aus dem Transformationsansatz ausplattiert. Der verbleibende Teil des Transformationsansatzes wurde 1min bei 1000 x g abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde resuspendiert und ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht (ü.N.) im Brutschrank bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 4°C gelagert.

Lösung:

SOC-Medium: 2% Vegetable Peptone, 0,5% Yeast Extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose

2.2.2.2.4 Analyse von Bakterien

2.2.2.2.4.1 Analytische PCR

Die Analyse, ob die Integration des gewünschten Inserts in den Vektor und dessen Aufnahme in die Bakterien während der Transformation (s. 2.2.2.2.3) erfolgte, wurde nach einem

Protokoll von Dr. R. Heiermann mithilfe einer analytischen PCR durchgeführt. Diese Methode zur schnellen Analyse von vielen Bakterienkolonien stellt eine Modifikation der Colony-PCR dar und bietet auch die Möglichkeit direkt die Orientierung des Inserts im Vektor zu untersuchen. Zur Analyse wurde eine einzelne Bakterienkolonie mit einer 200µl-Pipettenspitze von der carbenicillinhaltigen LB-Agarplatten gepickt und in einer mit 200µl carbenicillinhaltigen LB-Medium (400µg/ml) gefüllten Kavität einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten resuspendiert. Danach folgte eine Inkubation für 90min bei 37°C im Brutschrank. Es wurden 100µl aus der Kavität in ein Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt und 5min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 20µl H₂O resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe mit einem Reaktionsgefäßverschluss gesichert für 5min bei 100°C inkubiert und danach 4min auf Eis gestellt. Nachfolgend fand eine Zentrifugation für 5min bei 14.000rpm statt. Der Überstand wurde als Matrize in einer analytischen PCR eingesetzt. Es wurden 5µl des Überstandes mit 2µl 10X *Taq* Puffer mit KCl, 0,4µl dNTP-Mix (10mM), 2µl MgCl₂ (50mM), 1µl 5`Oligonukleotid (10pmol), 1µl 3`Oligonukleotid (10pmol) und 1µl *Taq* Polymerase (von Dr. M. Kroiher selbst präpariert) in eine 20µl Reaktion eingesetzt. Es wurde eine PCR mit 20 Zyklen nach den Parametern einer Standard-PCR (s. 2.2.2.8.1) durchgeführt. Alternativ erfolgte die analytische PCR bei klonierten DNA-Fragmenten, die in einer PCR aus genomischer DNA amplifiziert worden sind, mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase. Diese 20µl Reaktion wurde mit 5µl des Überstandes, 4µl 5X Phusion™ HF Buffer (7,5mM MgCl₂), 0,4µl dNTP-Mix (10mM), 0,4µl MgCl₂ (50mM), 1µl 5`Oligonukleotid (10pmol), 1µl 3`Oligonukleotid (10pmol) und 1µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (0,4u/µl) angesetzt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung über ein Agarosegel. Aus der Kavität, die eine positive Bakterienkolonie enthielt, wurden 100µl als Starter einer Übernacht-Bakterienkultur (s. 2.2.2.4.2) eingesetzt.

2.2.2.2.4.2 Übernacht-Bakterienkultur

5ml LB-Medium wurde in ein steriles Reagenzglas pipettiert (Geräte, Deckel und Gläser wurden durch kurzes Abflämmen sterilisiert). Das Antibiotikum Carbenicillin wurde mit einer Endkonzentration von 400µg/ml in den Ansatz pipettiert. 100µl einer einzelnen Bakterienkolonie wurden aus der Mikrotiterplatte entnommen und in das Reagenzglas mit dem vorbereiteten Medium zum Animpfen der Bakterienkultur pipettiert. Die Kultur wurde ü.N. bei

mindestens 250rpm geschüttelt und maximal 17h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur verarbeitet, indem die Plasmid-DNA aus den Bakterien mithilfe einer Plasmid-Präparation isoliert wurde (s. 2.2.2.3.4) und ein Teil der Kultur zur Aufbewahrung dieses Bakterien-Klons als Glycerin-Stammkultur verwendet (s. 2.2.2.2.4.3).

2.2.2.2.4.3 Herstellung eines Glycerolstocks

Zur Aufbewahrung eines Bakterienklons aus einer Übernacht-Bakterienkultur (s. 2.2.2.2.4.2) wurden 850µl aus der Kultur entnommen und in ein autoklaviertes mit 150µl sterilem Glycerin gefülltes 4ml Rotilabo®-Probenfläschchen mit Schraubkappe (Roth) pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Extraktion, Isolation und Reinigung von DNA, genomischer DNA, RNA und Plasmid-DNA

2.2.2.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit oder dem QIAquick Gel Extraction Kit durchgeführt. Die Bande des zu isolierenden DNA-Fragments wurde mithilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung des DNA-Fragments wurde nach dem Protokoll des Herstellers ausgeführt.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-, Restriktions- oder anderen DNA-modifizierenden Reaktionen erfolgte mit dem GeneJET™ PCR Purification Kit, dem NucleoSpin® Extract II oder dem QIAquick Gel Extraction Kit. Die Aufreinigung des DNA-Fragments wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte nach einem in dieser Arbeit erarbeiteten Protokoll. Es wurden Polypen von den *Hydractinia*-Kolonien auf den Schneckenschalen mit

speziellen Scherenwerkzeugen abgeschnitten und gründlich mit Seewasser gewaschen. Es wurde möglichst viel Seewasser abgenommen, dass die Tiere dabei aber nicht trocken fallen. Sie wurden 3x mit 0,5M NaCl und anschließend 2x mit 1ml 10mM Tris Cl, pH8, 200mM EDTA gewaschen. Das Medium wurde soweit abgenommen, dass die Polypen (ca.100-120µl) nicht trocken fallen. Dazu wurden dann 500µl Lysis Buffer sowie 2,5µl Proteinase K (20mg/ml) pipettiert. Der Ansatz wurde im Heizblock bei 57°C auf einem Rotationstisch (Heidolph) für 3h inkubiert bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte. Die gesamte Lösung wurde in ein vorzentrifugiertes (1.500 x g, 1,5 min) 2ml Phase Lock Lock Gel Heavy-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach den Angaben des Protokolls zur Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen (Eppendorf, März 2002). Die genomische DNA wurde in TE in Lösung gebracht und anschließend bei 4°C gelagert.

Lösungen:

Lysis Buffer: 50mM Tris Cl, pH 8, 200mM EDTA, 400mM NaCl, 1% SDS

TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

2.2.2.3.3 Isolierung von RNA aus Larven und Polypen von *Hydractinia echinata*

Die Isolation der Total-RNA wurde nach einem von der AG Plickert modifizierten Protokoll nach Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt.

2.2.2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus einer Übernacht-Bakterienkultur (s. 2.2.2.2.3.2) wurde nach einem von der AG Plickert modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50µl RNase-Mix/TE gelöst. Es erfolgte eine Restriktionsanalyse (s. 2.2.2.1.3) der Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 10µl und die Auswertung über ein Agarosegel (s. 2.2.2.11).

Lösung:

RNase-Mix/TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, RNase A 20µg/ml, 2u RNase T1/ml

2.2.2.3.4.1 Qualitative Aufreinigung von DNA

Im Anschluss an enzymatische Reaktionen (s. 2.2.2.3.4; 2.2.2.10.2) wurde die DNA qualitativ aufgereinigt, um Proteine und Komponenten der Reaktion zu entfernen. Diese qualitative Aufreinigung der DNA wurde modifiziert nach einem Protokoll von Dr. R. Heiermann durchgeführt. Zu einem Reaktionsansatz wurde Phenol (pH 8,0) und Chloroform im Verhältnis 1:1 mit der DNA-Probe pipettiert. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer durchmischt und 1min (14.000rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein eine neues Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt. Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzupipettiert und anschließend auf dem Vortexer gut durchmischt. Es folgte ein Zentrifugation für 1min bei 14.000rpm. Der Überstand wurde in ein eine neues Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt und mit 1/5 Vol. 10M Ammoniumacetat gemischt. Die Reaktion wurde mit 2,5 Vol. 100% EtOH gemischt und 5min bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet (1-2min). Anschließend wurde dieses in TE gelöst und danach mit 1/10 Vol. 10M Ammoniumacetat gemischt. Der Ansatz wurde mit 2,5 Vol. 100% EtOH gemischt und 5min (14.000rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Es folgte ein Zentrifugation für 1min bei 14.000rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet (1-2min). Anschließend wurde dieses in TE gelöst und danach mit 1/20 Vol. 5M NaCl gemischt (optional wird hier bei der Aufreinigung von DNA-Fragmenten für Injektionen mit 1/10 3M KCl gefällt). Der Ansatz wurde mit 2,5 Vol. 100% EtOH gemischt und 5 min (14.000rpm) zentrifugiert. Im Anschluss folgte zweimal hintereinander ein Waschschrift mit 70% EtOH und entsprechend jeweils eine Zentrifugation (1min) bei 14.000rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet (1-2min). Das Pellet wurde bei einer Aufreinigung von Plasmid-DNA in TE gelöst und bei DNA-Fragmenten für Injektionen in Elutionspuffer.

Lösungen:

Elutionspuffer: 10mM Tris-HCl, pH 8,0

TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

2.2.2.3.5 Isolierung von RNA aus einer Synthese

Die Isolierung von RNA aus enzymatischen Reaktionen wurde mit dem NucleoSpin® RNA Clean-up XS nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mithilfe einer spektrophotometrischen Messung mit dem NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer.

2.2.2.5 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA mithilfe der reversen Transkription aus der isolierten Total-RNA (s. 2.2.2.3.3) erfolgte durch die SuperScript™ II Reverse Transcriptase modifiziert nach der Methode B des Protokolls “Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate“ (M. Matz, 2002). Die cDNA-Synthese wurde mit den Komponenten aus dem Kit der SuperScript™ II Reverse Transcriptase durchgeführt. Es wurde Total-RNA von Larven und Polypen eingesetzt. Zu 4µl in RNase-freiem H₂O gelöster RNA (3µg) wurde 1µl (10µM) des Oligonukleotid TRsa pipettiert. Der Ansatz wurde für 3min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Zu diesem Reaktionsansatz wurden 2µl 5x First-strand buffer, 1µl DTT (0,1M), 1µl des Oligonukleotid TS-oligo (5µM), 1µl SuperScript™ II Reverse Transcriptase, 0,5µl dNTP-Mix (10mM) hinzupipettiert und 1h bei 42°C inkubiert. Danach wurden 1µl MnCl₂ (20mM) in den Ansatz pipettiert und für weitere 15min bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion zum Abstoppen 3min auf 65°C erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Tricine KOH/EDTA-Buffer auf 100µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Lösung:

Tricine KOH/EDTA-Buffer: 50mM Tricine KOH, pH 7,0, 1mM EDTA, pH 8,0

2.2.2.6 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA durch *in vitro*-Transkription

Die Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden erfolgte mithilfe einer *in vitro*-„run-off“-Transkription. Die Transkription der sense- und antisense-Sonden erfolgte mit der SP6- und T7 RNA Polymerase. Ein in den pGEM-T-Vector kloniertes und mit einem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiertes DNA-Fragment diente als DNA-Matrize für die RNA-Polymerase. Die für die Synthese linearisierten Matrizen wurden im Anschluss an die Restriktion aufgereinigt (s. 2.2.2.3.1) und mit 20µl DEPC-H₂O eluiert. Die *in vitro*-run-off-Transkription wurde modifiziert nach dem Protokoll von Roche mit linearisierter DNA (500-1000ng), 2µl DIG RNA Labeling Mix, 2µl 10x Transcription Buffer, 1,5µl RNA-Polymerase (20u/µl) und 0,5µl Ribonuclease-Inhibitor (40u/µl) in einem 20µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Die Synthese erfolgte 18h ü.N. bei 37°C und wurde im Anschluss mit 2µl 200mM EDTA (pH 8) gestoppt. Zur Kontrolle der Quantität und Qualität der RNA-Sonden-Synthese wurde 2µl des Reaktionsansatzes auf ein 0,8% Agarose-Gel geladen. Die Aufreinigung erfolgte mit einem Kit (s. 2.2.2.3.6) oder manuell wie nachfolgend beschrieben. Die RNA wurde mit 2,5µl LiCl und 75µl 100% EtOH 2h bei -20°C gefällt und anschließend für 10min bei 14000rpm zentrifugiert. Daraufhin folgte ein Waschschriff mit 500µl 70% EtOH und eine erneute Zentrifugation für 10min (14000rpm). Im Anschluss wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 50µl DEPC-H₂O aufgenommen. Es wurde 0,5µl Ribonuclease-Inhibitor (40u/µl) hinzupipettiert und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 80µl DEPC-H₂O, 140µl 4M Ammoniumacetat und 700µl 70% EtOH 4h bei -20°C gefällt und anschließend 10min (14000rpm) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 500µl 70% EtOH und eine erneute Zentrifugation für 10 min (14000rpm). Das Pellet wurde kurz (2min) an der Luft getrocknet und in 20µl DEPC-H₂O aufgenommen. Es wurde 0,5µl Ribonuclease-Inhibitor (40u/µl) hinzupipettiert und 30min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Quantität der RNA-Sonde erfolgte mithilfe einer spektrophotometrischen Messung (s. 2.2.2.4). Der Reaktionsansatz wurde auf die gewünschte Konzentration mit Hybridisierungsmix (Hyb-Mix) verdünnt und bei -20°C gelagert.

Lösung:

Hyb-Mix: 50% Formamide, 5x SSC, 1mg/ml HS-DNA, 0,1mg/ml Heparin, 0,1% Tween20; gelagert bei -20°C

2.2.2.7 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll der AG Plickert für „whole-mount“ *in situ*-Hybridisierung bei marinen Hydrozoen, wie es beschrieben und publiziert (Gajewski et al., 1996; Plickert et al., 1997) worden ist, durchgeführt. Die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurden in einer Konzentration von 150-200ng/ml eingesetzt.

2.2.2.8 PCR

Diese Technik wird aufgrund der exponentiellen Vermehrungsrate der DNA als Polymerase-Kettenreaktion und abgekürzt als „PCR“ (*polymerase chain reaction*) bezeichnet. Diese *in vitro*-Amplifikation von DNA wurde 1983 von Kary Mullis erarbeitet, wofür er 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Die erste Publikation zu dieser neuen Technik stammt von Saiki et. al. (1985). Die in dieser Arbeit eingesetzten Varianten dieser molekularbiologischen Technik wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Protokollen des Methodenbuchs „PCR“ nach Müller (2001) durchgeführt. Die Analyse der Eigenschaften und die Berechnung der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer erfolgte im Internet mit dem Programm Oligo Calc (s. 2.1.7.3.5), das entwickelt und beschrieben wurde von W. A. Kibbe (2007).

2.2.2.8.1 Standard-PCR

Diese PCR wurde eingesetzt um mithilfe von spezifischen 5`- und 3`Oligonukleotiden DNA-Fragmente in cDNA, genomischer- und Plasmid-DNA zu amplifizieren. Die PCR wurde mit 1µl DNA-Matrize, 10µl 5X Phusion™ HF Buffer (7,5mM MgCl₂), 1µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP-Mix (10mM), 2,5µl 5`Oligonukleotid (10pmol), 2,5µl 3`Oligonukleotid (10pmol) und 0,5µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2u/µl) in einem 50µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die eingesetzte Menge der DNA-Matrize betrug bei genomischer DNA 50ng, bei cDNA 1µl aus der cDNA-Synthese (s. 2.2.2.5) und 5ng bei Plasmid-DNA. Die PCR erfolgte in einem Thermozykler (s. 2.1.7.1.1). Um eine Amplifikation von unspezifischen DNA-Fragmenten durch eine unspezifische Anlagerung der Oligonukleotide bei nicht optimalen Temperaturen zu verhindern, wird die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase erst in einem 2-minütigem Schritt bei 80°C in den Reaktionsansatz hinzupipettiert, anschließend erfolgte

eine initiale Denaturierung für 2min bei 98°C. Im Anschluss wurden 40 Zyklen bzw. bei der Amplifikation von Plasmid-DNA 15 Zyklen mit dem nachfolgenden Temperaturprofil durchgeführt:

Denaturierung:	15 sek	98°C	} 40/15 Zyklen
Annealing:	30 sek	xx°C	
Elongation:	x min	72°C	

Die Temperatur für das „Annealing“ (Anlagerung) richtete sich nach dem berechneten Schmelzpunkt der eingesetzten Oligonukleotide. Die Zeit für die „Elongation“ (Verlängerung) wurde durch die erwartete Länge des zu amplifizierenden PCR-Fragments bestimmt und unter der Annahme, dass die Polymerase 1000 Basen in 60sek amplifiziert. Im Anschluss wurde eine 2. PCR durchgeführt um eine höhere Ausbeute des PCR-Amplifikats zu erhalten. Der Reaktionsansatz wurde mit einem 1µl aus der 1. PCR als DNA-Matrize wie oben beschrieben angesetzt. In dieser 2. PCR wurden 25 Zyklen bzw. bei der Amplifikation von Plasmid-DNA 15 Zyklen nach demselben Temperaturprofil wie in der 1. PCR durchgeführt. Im Anschluss wurde das PCR-Amplifikat aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 2.2.2.3.1).

2.2.2.8.1.1 PCR mit degenerierten Primern (CODEHOP)

Die Amplifikation und Isolation eines Homologs aus *Hydractinia* zu einem aus in anderen Organismen bekanntem Gen, bei dem bislang noch keine DNA-Sequenzinformationen vorhanden waren, wurde mit degenerierten Primern durchgeführt. Das Primerdesign für diese degenerierten Primer erfolgte im Internet mithilfe des Programms CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) (s. 2.1.7.3.5), welche aus den konservierten Sequenzbereichen von Proteinen abgeleitet werden. Das Prinzip dieser CODEHOP-PCR basiert auf dem Einsatz von Primern, die aus einer längeren nicht-degenerierten 5`Consensus-clamp-Region und einer kurzen 3`degenerierten-Kern-Region bestehen (Rose et al., 1998, 2003). Die Reaktion wurde mit 1µl DNA-Matrize, 5µl 10X Taq Puffer mit KCl, 4µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP-Mix (10mM), 2,5µl 5`Oligonukleotid (10pmol), 2,5µl 3`Oligonukleotid

(10pmol) und 0,2µl *Taq/Pfu*-Polymerase-Mix in einem 50µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die CODEHOP-PCR wurde wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben durchgeführt.

Lösung:

Taq/Pfu-Polymerase-Mix: 4,75u/µl *Taq* DNA Polymerase, 0,125u /µl *Pfu* DNA Polymerase

2.2.2.8.2 RACE-PCR

Die RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction*) bedeutet so viel wie eine „schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden“ und ist entwickelt worden um vollständige cDNA-Sequenzen zu synthetisieren (Frohmann et al., 1988). Die Reverse Transkription ist gerade bei längeren Fragmenten (> 1000 Basen) durch degradierte mRNA oder ineffiziente Reverse Transkriptasen nicht immer effizient bei der Synthese von vollständigen cDNA-Sequenzen (Müller, 2001). Die RACE-PCR ist eine erfolgreiche Methode, um mithilfe von genspezifischen 5`- und 3`Oligonukleotiden sowie einem adapterspezifischen Oligonukleotid, das spezifisch an in der cDNA-Synthese (s. 2.2.2.5) angehängte Adaptersequenzen bindet, die 5`- und 3`-Enden der cDNA zu isolieren. Die RACE-PCR wurde mit den adapterspezifischen Oligonukleotiden für die 5`- und 3`RACE nach dem Protokoll von M. Matz (2002) durchgeführt. Die PCR wurde mit 1µl aus der cDNA-Synthese (s. 2.2.2.5), 10µl 5X Phusion™ HF Buffer (7,5mM MgCl₂), 1µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP-Mix (10mM), 2,5µl genspezifisches Oligonukleotid „außen“ (10pmol), 2µl adapterspezifisches Oligonukleotid (5`RACE 10x Universal Primer Mix - DAP-TS (0,4pmol/µl) + DAP (2pmol/µl); 3`RACE universal Primer - DAP-TRsa (10pmol/µl)) und 0,5µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2u/µl) in einem 50µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die RACE-PCR wurde wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben ausgeführt. In der 2. PCR wurde eine Nested-PCR (geschachtelte PCR) mit genspezifischen- und adapterspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, die innerhalb der in der 1. PCR amplifizierten DNA-Matrize binden. Der Reaktionsansatz wurde wie oben beschrieben modifiziert mit einem 1µl aus der 1. PCR als DNA-Matrize, 2,5µl genspezifisches Oligonukleotid „innen“ (10pmol) und 2µl adapterspezifisches Oligonukleotid (5`RACE nested Primer - TS-PCR (10pmol/µl); 3`RACE nested universal Primer - TRsa (10pmol/µl)) angesetzt. Die Reaktion wurde nach demselben Temperaturprofil wie in der 1.

PCR durchgeführt. Im Anschluss wurde das PCR-Amplifikat aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 2.2.2.3.1).

2.2.2.8.3 Splinkerette-PCR

Diese PCR-Methode macht die Isolierung von unbekannt genomschen DNA-Sequenzen, die stromauf- bzw. abwärts von bereits bekannter genomischer DNA-Sequenz liegen, möglich. Die Splinkerette-PCR ist erfolgreich, um mithilfe von genspezifischen 5'- und 3'-Oligonukleotiden sowie einem splinkerettenspezifischen Oligonukleotid die unbekannt 5'- und 3'-Enden von bekannten genomischen DNA-Fragmenten zu amplifizieren (Devon et al., 1995). Das splinkerettenspezifische Oligonukleotid bindet spezifisch an eine Adaptersequenz (Splinkerette), die an die gesplinkerte genomische DNA ligiert wurde (s. 2.2.2.5). Diese PCR-Methode wurde modifiziert nach einem Protokoll von Dr. R. Heiermann durchgeführt. Die PCR wurde mit 1µl gesplinketer gDNA (1ng/µl), 10µl 5X Phusion™ HF Buffer (7,5mM MgCl₂), 1µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP-Mix (10mM), 1µl genspezifisches Oligonukleotid „außen“ (10pmol), 1µl splinkerettenspezifisches Oligonukleotid „außen“ (Splink0 (10pmol/µl)) und 1µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (0,4u/µl) in einem 50µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die Splinkerette-PCR wurde wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben modifiziert mit 30 Zyklen ausgeführt. In der 2. PCR wurde eine Nested-PCR mit einem genspezifischen und einem splinkerettenspezifischen Oligonukleotid durchgeführt, die innerhalb der in der 1. PCR amplifizierten DNA-Matrize binden. Der Reaktionsansatz wurde wie oben beschrieben modifiziert mit einem 1µl aus der 1. PCR als DNA-Matrize, 1µl genspezifisches Oligonukleotid „innen“ (10pmol) und 1µl splinkerettenspezifisches Oligonukleotid „innen“ (Splinki (10pmol/µl)) angesetzt. Die Reaktion wurde nach demselben Temperaturprofil wie in der 1. PCR abgeändert mit 15 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss wurde das PCR-Amplifikat aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 2.2.2.3.1).

2.2.2.8.4 Anfügen von 3'-Adenosin-Einzelstrangüberhängen an „blunt-end“-PCR-Fragmente

Die PCR-Fragmente, die von einer DNA-Polymerase mit einer Korrekturlesefunktion amplifiziert werden (s. 2.2.2.8.1), sind „blunt-end“-linearisierte DNA-Fragmente und weisen

keinen 3`Überhang auf. Eine solche „Proofreading“(Korrekturlesen)-DNA-Polymerase ist auch die in dieser Arbeit verwendete Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase. Diese verfügt über eine 3`-5`Exonukleaseaktivität, die es ermöglicht ein fehlerhaft eingebautes Nukleotid zu erkennen und wieder zu entfernen. Um diese PCR-Fragmente in einer T/A-Klonierung einsetzen zu können, macht man sich die Fähigkeit einer thermostabilen DNA-Polymerase zunutze, die eine 3`Adenylierungsaktivität besitzt und an das 3`Ende eines amplifizierten PCR-Fragments ein einzelnes Nukleotid anfügt (Müller, 2001). Eine DNA-Polymerase, die eine solche 3`Adenylierungsaktivität aufweist, ist die *Taq* DNA Polymerase. In einem Reaktionsvolumen von 50µl wurde ein aufgereinigtes PCR-Fragment (s. 2.2.2.3.2) mit 5µl 10X Puffer mit KCl, 4µl MgCl₂ (25mM), 4µl dATP (10mM), 0,5µl *Taq* DNA Polymerase (5u/µl) 30min bei 72°C inkubiert. Im Anschluss wurden zu dieser Reaktion 1/20 Vol. 5M NaCl, 1µl Glycogen (20mg/ml), 1µl 200mM EDTA und 2,5 Vol. 100% EtOH hinzupipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 2min bei 14.000rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 100µl 70% EtOH gewaschen. Daraufhin folgte eine Zentrifugation für 1min (14.000rpm). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3µl H₂O gelöst. Diese PCR-Fragmente mit einem A-Überhang wurden zur Ligation in den linearisierten pGEM-T-Vector mit einem T-Überhang (s. 2.2.2.2.1) eingesetzt.

2.2.2.9 Präparation von gesplinketer genomischer DNA

Die Präparation von gesplinketer genomischer DNA macht die Isolierung von unbekanntem genomischen DNA-Sequenzen mithilfe der Splinkerette-PCR (s. 2.2.2.8.3) möglich. Die gesplinkerte genomische DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Dr. R. Heiermann durchgeführt, der dieses aus dem ursprünglichen Protokoll von Devon et al. (1995) und dem von Stover (2001) abgeleitet hat.

2.2.2.9.1 Präparation der Splinkerette

Die für die Amplifikation eines unbekanntem genomischen DNA-Fragments in der Splinkerette-PCR mithilfe eines genspezifischen und adapterspezifischen Oligonukleotid benötigte Adaptersequenz ist die an die geschnittene gDNA ligierte Splinkerette. Diese Splinkerette setzt sich aus einem oberen und unteren Strang zusammen, die nur am 3`Ende

des oberen Stranges komplementär sind. Der untere Strang bildet durch die Adenosin- und Thymidin-Nukleotide am 3`Ende eine Haarnadel-Struktur aus, die die Amplifikation von DNA-Artefakten durch fehlerhafte Oligonukleotid-Anlagerung reduziert (Devon et al., 1995). Die Splinkerette wird durch die Anlagerung des Oligonukleotides für den oberen Strang und des Oligonukleotides für den unteren Strang gebildet. Die Splinkerette ist so konstruiert, dass sie durch das Oligonukleotid des unteren Stranges einen passenden Überhang für eine bestimmte Restriktionsschnittstelle aufweist, um an die geschnittenen gDNA (s. 2.2.2.9.2) ligiert zu werden (s. 2.2.2.9.3). Die Präparation der Splinkerette erfolgte mit 20µl MgCl₂ (25mM), 1µl Tris-Cl, pH 7,4 (1M), 10µl Oligonukleotide oberer Strang (Splink top (100pmol/µl)) und 10µl Oligonukleotide unterer Strang (Splink ecoI, -Xba und -hind (100pmol/µl)) in einem 100µl Reaktionsvolumen. Die Reaktion wurde 1min bei 94°C im Heizblock inkubiert und dieser dann ausgeschaltet. Die Splinkerette wurde durch Abkühlen auf Raumtemperatur, indem sich die beiden Oligonukleotide des oberen- und unteren Stranges aneinanderlagern, gebildet. Der Reaktionsansatz wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.9.2 Restriktion von genomischer DNA

Es wurden ca.10µg genomischer DNA (s. 2.2.2.3.2) 20h mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und XbaI nach Angaben des Herstellers in einem 50µl Reaktionsvolumen verdaut. Es wurde zum Test auf einen vollständigen Verdau der genomischen DNA 1/10 der Reaktion mit der gleichen Menge ungeschnittener genomischer DNA als Kontrolle auf einem Agarosegel (s. 2.2.2.11) analysiert. Im Anschluss folgte die Fällung der geschnittenen gDNA mit 1/20 Vol. 5M NaCl und 2,5 Vol. 100% EtOH für 5min bei 14.000rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 200µl 70% EtOH gewaschen. Daraufhin folgte eine Zentrifugation für 1min (14.000rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet (1-2min). Das Pellet wurde in TE gelöst und die Quantität der geschnittenen gDNA mit einer spektrophotometrischen Messung (s. 2.2.2.4) bestimmt.

Lösung:

TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

2.2.2.9.3 Ligation der Splinkerette an geschnittene genomische DNA

Es wurden 200ng geschnittener gDNA (s. 2.2.2.9.2) mit 1µl Splinkerette (s. 2.2.2.9.1), 10X T4 DNA Ligasepuffer und 1µl T4 DNA Ligase (0,25u/µl) ü.N. in einem 10µl Reaktionsvolumen ligiert. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit TE auf 200µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Lösung:

TE: 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA

2.2.2.10 Synthese, Amplifikation und Präparation von RNA und DNA für die Mikroinjektion in *Hydractinia echinata*

Die Mikroinjektion ist eine erfolgreiche Methode, um artfremde DNA oder RNA in eine Oozyte einzubringen und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Erzeugung transgener *Hydractinia echinata* eingesetzt.

2.2.2.10.1 Synthese von sense-mRNA

Die Synthese von sense-mRNA für die Mikroinjektion erfolgte mit dem mMACHINE[®] T7 ULTRA Kit nach den Angaben des Herstellers. Die zur Transkription eingesetzte DNA-Matrize war ein PCR-Fragment, das die Promotorsequenz der T7-RNA-Polymerase enthielt. Die RNA wurde im Anschluss aufgereinigt (s. 2.2.2.3.5) und bei -80°C gelagert.

2.2.2.10.2 Schnelle Amplifikation und Präparation von DNA-Fragmenten mit überhängenden DNA-Enden

Die Amplifikation eines transgenen DNA-Konstrukts für die Mikroinjektion erfolgte mithilfe einer PCR aus Plasmid-DNA. Dieses transgene DNA-Konstrukt bestand aus einer 5`regulatorischen Region- und 3`regulatorischen Region eines Genes sowie dem Reportergen

enhanced GFP (eGFP) mit oder ohne einem Fusionsgen. Die in dieser Arbeit neu entwickelte Methode um schnell und viel DNA-Fragment für eine Mikroinjektion herzustellen, wird nachfolgend beschrieben. Das Prinzip dieser Methode ist die Amplifikation eines transgenen DNA-Konstrukts aus Plasmid-DNA mithilfe von Primern, die eine Restriktionsschnittstelle enthalten. Das transgene Reporterkonstrukt wird ohne den Replikationsstart, das Selektionsgen und die vollständige Klonierungsstelle amplifiziert. Die in dieser Amplifikation eingesetzten Primerpaare besitzen eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *ApaI* oder *SpeI*. Diese Restriktionsenzyme erzeugen ein DNA-Fragment mit überhängenden DNA-Enden. In dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders erwähnt, das Primerpaar mit der Restriktionsstelle für *ApaI* zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Mikroinjektion eingesetzt. Die PCR wurde mit 3µl Plasmid-DNA (5ng/µl), 20µl 5X Phusion™ HF Buffer (7,5mM MgCl₂), 2µl MgCl₂ (50mM), 2µl dNTP-Mix (10mM), 0,5µl KSEND*ApaI*fwd (100pmol), 0,5µl KSS*StartApaI*rev (100pmol/µl) und 1µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (0,8u/µl) in einem 100µl Reaktionsvolumen angesetzt. Es wurden 10 Reaktionen angesetzt und diese wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben modifiziert mit 20 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss wurden je 5 Reaktionen in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1/20 Vol. 5M NaCl, 3µl 200mM EDTA versetzt und gemischt. Es wurden 2,5 Vol. 100% EtOH hinzugegeben und 6min bei 14.000rpm gefällt. Das Pellet wurde mit 1ml 70% EtOH gewaschen und 1min zentrifugiert (14.000rpm). Anschließend wurde das Pellet in 86µl Elutionspuffer gelöst und es folgte eine Restriktion (s. 2.2.2.1.3) mit 10µl 10X Puffer Blau und 4µl *ApaI* (10u/µl) in einem 100µl Reaktionsvolumen ü.N.. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 2.2.2.3.4.1 beschrieben. Die Konzentration des DNA-Fragments wurde bestimmt (s. 2.2.2.4) und danach bei -20°C gelagert.

Lösung:

Elutionspuffer: 10mM Tris-HCl, pH 8,0

2.2.2.10.3 Mikroinjektion

Zur Mikroinjektion kam sense-mRNA (s. 2.2.2.10.1) oder DNA-Fragment (s. 2.2.2.10.2). Es wurde in befruchtete Eier von *Hydractinia* im Stadium der einsetzenden 1. Furchung und im 2-Zellstadium injiziert. Es wurden ca. 100pl DNA (1-2,5µg/µl) oder RNA (5-80ng/µl)

eingesetzt. Die injizierten Embryonen wurden nach 24h mithilfe von Blaulicht-Anregung und einem Binokular auf augenscheinliche Transgenität analysiert. Die Embryonen, die eine GFP-Fluoreszenz zeigten, wurden einzeln in eine Blockschale selektiert. Es folgte täglich ein Austausch des Mediums mit frischem filtriertem Seewasser. Nach 72h wurden bei den nun entwickelten Planularlarven die Metamorphose zu einem Primärpolypen auf einem Objektträger ausgelöst (s. 2.2.1.1). Die Primärpolypen, die sich nach 24h gebildet hatten, wurden täglich mit Nauplius-Larven von *Artemia salina* gefüttert. Es fand ein täglicher Austausch des Mediums mit frischem filtriertem Seewasser statt. Die Analyse und Dokumentation der transgenen *Hydractinia* erfolgte mit den unter 2.1.7.1.2 genannten optischen Geräten.

2.2.2.11 Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden abhängig von der Fragmentlänge in einem 0,8-1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 0,5xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5µg/ml) hinzupipetiert und gut gemischt. Danach wurde diese in eine mit einem Kamm versehene abgedichtete Gelkammer gefüllt und nach der Polymerisation mit 0,5xTBE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/5 Vol. 6x Probenpuffer versetzt, gemischt und in die Geltaschen pipetiert. Die Elektrophorese und Auftrennung der DNA nach Molekülgröße erfolgte innerhalb eines Gleichstromfeldes bei 100 Volt. Die Ergebnisse wurden mithilfe des AlphaImager[®] dokumentiert und ausgewertet.

Lösungen:

6x Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 15% Ficoll 400

10x TBE-Puffer: 0,9M Tris Base, 0,9M Borsäure, 20mM EDTA

2.2.2.12 Sequenzierungs-PCR, Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierungen in dieser Arbeit beruhen auf dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruch-Verfahren.

2.2.2.12.1 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR wurde nach den Vorgaben des Protokolls vom Servicelabor des Cologne Center for Genomics (Köln) durchgeführt. Es wurde das BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) für die Sequenzierungs-PCR verwendet.

2.2.2.12.2 Sequenzierung

Die Aufreinigung und der Sequenzierungslauf der Proben der Sequenzierungs-PCR erfolgte im Servicelabor des Cologne Center for Genomics (Köln).

2.2.2.12.3 Sequenzanalyse

Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mit dem Programm Chromas LITE Version 2.1. Die genaueren Analysen und Charakterisierungen der DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit den in Tabelle 12 aufgeführten Programmen und Datenbanken im Internet durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer neuen Methode ermöglicht *in vivo*-Expressionsstudien von Reportergenkonstrukten mit einer höheren Transfektionseffizienz

In anfänglichen Arbeiten im Labor konnten mithilfe von Elektroporation und Mikroinjektion zum ersten Mal transgene *Hydractinia* erzeugt werden (persönliche Mitteilung K. Hensel und Prof. Dr. G. Plickert, 2008). Die Versuche wurden mit einer zirkulären Plasmid-DNA des Expressionskonstrukts *HsActinPromotorGFPΔEcoRI* (*pAct-I:51Act-eGFP*) von Dr. R. Heiermann durchgeführt. Dieses Reporterkonstrukt enthält die 5' regulatorische Region mit dem codierenden Bereich der ersten 51AS des *AktinI* aus *Hydractinia symbiolongicarpus* (*H. symbiolongicarpus*) und ist das Ortholog von *HeAktinI*. Die Analyse der transgenen Tiere mittels Elektroporation zeigte eine geringe Transfektionseffizienz und eine erhöhte Mortalität in der Embryonalentwicklung. Im Vergleich dazu war in den durch Mikroinjektion erzeugten transgenen *Hydractinia* eine höhere Transfektionseffizienz, aber kein negativer Einfluss auf die Mortalität bzw. die Entwicklung zu beobachten (Diplomarbeit Katrin Hensel, 2009).

In weiterführenden Arbeiten konnte durch die Mikroinjektion von linearisiertem transgenem DNA-Fragment die Transfektionseffizienz erfolgreich verbessert werden. Dieses Resultat wurde mit einer modifizierten Variante des *HsActinPromotorGFPΔEcoRI* erzielt. Diese Variante enthielt zwei flankierende Restriktionsschnittstellen der Meganuklease I-SceI. Transgen-DNA-Fragmente mit überhängenden DNA-Enden nach I-SceI-Restriktion führten in Einzelfällen zu einer stabilen Transfektion bis ins postmetamorphe Stadium von *Hydractinia*. Auch eine Integration ins Genom konnte nachgewiesen werden (Diplomarbeit Markus Bause, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die aufgestellte Hypothese aus diesem Ergebnis, dass ein linearisiertes DNA-Fragment ohne die spezifischen Plasmid-Gensequenzen eine stabilere Transfektion und Integration ins Genom von *Hydractinia* ermöglicht (Etchberger und Hobert, 2008), aufgegriffen.

In Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue effektive Methode („Schnelle Amplifikation und Präparation von DNA-Fragmenten mit überhängenden DNA-Enden“) entwickelt werden mit der schnell und viel DNA-Fragment für die Mikroinjektion erzeugt werden kann. Eine detaillierte Durchführung ist unter 2.2.2.10.2 beschrieben. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der Amplifikation eines transgenen Reporterkonstrukts aus Plasmid-DNA mithilfe von Primern, die eine spezifische Restriktionsschnittstelle enthalten. Die zur Restriktion eingesetzten spezifischen Restriktionsenzyme erzeugten ein Transgen-enthaltendes DNA-Fragment mit überhängenden DNA-Enden. Die DNA-Fragmente wurden ohne die spezifischen Plasmid-Gensequenzen für den Replikationsstart, das Selektionsgen und die vollständige Klonierungsstelle amplifiziert. Das transgene Reporterkonstrukt enthielt die 5`- und 3`regulatorischen Regionen eines Genes, die das Reportergen *eGFP* mit oder ohne ein Fusionsgen flankierten. Die in dieser Arbeit erstellten Reportergenkonstrukte wurden aus den Ursprungskonstrukten *HsActinPromotorGFPΔEcoRI* und *HsActinPromotorGFPΔSpHI* von Dr. R. Heiermann modifiziert.

Mittels der Mikroinjektion von transgenem DNA-Fragment in befruchtete Eier von *Hydractinia*, die im Stadium der einsetzenden 1. Furchung und im 2-Zellstadium (s. 2.2.2.10.3) waren, konnten erfolgreich transgene Tiere erzeugt werden. Es wurde in vergleichenden Versuchen nachgewiesen, dass die linearisierten DNA-Fragmente mit überhängenden DNA-Enden eine sehr hohe Transfektionseffizienz hatten. Im Unterschied dazu konnte mit der zirkulären Plasmid-DNA desselben Reporterkonstrukts eine sehr geringe Transfektionseffizienz erzielt werden. In den meisten Fällen wurde keine *eGFP*-Expression oder nur in wenigen Zellen beobachtet. Zudem wurde in den mit der zirkulären Plasmid-DNA injizierten Versuchstieren eine höhere Mortalität beobachtet.

Zusammenfassend kann anhand dieser Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass ein Transgen ohne die spezifischen Plasmid-Gensequenzen eine höhere Transfektion in *Hydractinia* ermöglicht. In den nachfolgend beschriebenen *in vivo*-Expressionsstudien konnte diese für *Hydractinia* neu entwickelte Methode entscheidend zum Gewinn neuer Erkenntnisse beitragen.

3.2 *Hydractinia* weist mehrere Aktin-Gene auf, deren Proteinkodierungen nahezu identisch sind

Ausgehend von zwei bekannten *HeAktin*-Teilsequenzen konnten mittels Splinkerette-PCR im Genom von *Hydractinia* vier Aktin-Gene identifiziert werden. Der Vergleich der Nukleinsäuresequenz eines der isolierten Gene mithilfe des BLAST-N-Programms auf NCBI zeigte die höchste Homologie mit einem E-Value von Null und einer maximalen Identität von 94% zu dem Nicht-Muskelaktin-Gen *AktinI* (HM370516.1) aus *H. symbiolongicarpus*. Das isolierte Gen wird aufgrund dessen als *AktinI* aus *Hydractinia* (*HeActI*) bezeichnet. Die drei anderen isolierten Aktin-Gene werden entsprechend als *HeAktinII* (*HeActII*), *HeAktinIII* (*HeActIII*) und *HeAktinIV* (*HeActIV*) benannt.

Mithilfe weiterer PCRs konnten die fehlenden Sequenzinformationen vervollständigt und infolgedessen die 5` und 3`regulatorischen Regionen den Aktin-Genen *HeActI*, *-II* und *-III* zugeordnet werden (Sequenzen s. Anhang; 7.1.1-7.1.3). Die Nukleinsäuresequenz des Gen *HeActIV* (Sequenz s. Anhang; 7.1.4), die einen Teil des 3`regulatorischen Bereich sowie des codierenden Bereichs enthält, konnte nicht weiter vervollständigt werden. Die Analyse der Nukleinsäuresequenz von *HeActIV* zeigte, dass die 3`regulatorische Region unterschiedlich ist zu den Aktin-Genen *HeActI-III* trotz einer identischen Aminosäuresequenz. Die drei Aktin-Gene *HeActI*, *-II* und *-III* weisen ebenfalls unterschiedliche Nukleinsäuresequenzen in den 5`- und 3`regulatorischen Regionen auf, wenn gleich die Aminosäuresequenzen bis auf eine AS identisch sind, wie im Proteinvergleich in Abb. 2 zu sehen. Das Ergebnis beweist, dass es sich um vier unterschiedliche Aktin-Gene aus *Hydractinia* handelt.

Die einzige Varianz in den Aminosäuresequenzen der Aktine *HeActI*, *-II* und *-III* ist die AS Serin anstelle eines Alanins an der Position 273 des *HeActIII* (s. Abb. 2). Ein Proteinvergleich mithilfe des BLAST-P-Programms auf NCBI zeigte, dass an dieser Position eine Varianz selten und die AS Alanin konserviert ist. Das Aktin eines anderen Cnidariers *Chrysaora quinquecirrha* aus der Klasse der Scyphozoa hat beispielsweise ebenfalls ein Serin an dieser Position in der Aminosäuresequenz (NCBI: AFS65047.1).

```

HeActI      MADDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQ 60
HeActII     MADDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQ 60
HeActIII    MADDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQ 60
*****

```

HeActI	SKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKM	120
HeActII	SKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKM	120
HeActIII	SKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKM	120

		NES-1
HeActI	TQIMFETFNSPAMYVAIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDVSHSTVPIYEGYALPHAIIRLD	180
HeActII	TQIMFETFNSPAMYVAIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDVSHSTVPIYEGYALPHAIIRLD	180
HeActIII	TQIMFETFNSPAMYVAIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDVSHSTVPIYEGYALPHAIIRLD	180

		NES-2
HeActI	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLAYVALDFEQEMQTAASSSLEKS	240
HeActII	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLAYVALDFEQEMQTAASSSLEKS	240
HeActIII	LAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLAYVALDFEQEMQTAASSSLEKS	240

HeActI	YELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVL	300
HeActII	YELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVL	300
HeActIII	YELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESSGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVL	300
	***** ; *****	
HeActI	SGGTTMFPGIADRMQKEISALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
HeActII	SGGTTMFPGIADRMQKEISALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360
HeActIII	SGGTTMFPGIADRMQKEISALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK	360

HeActI	QEYDESGPSIVHRKCF	376
HeActII	QEYDESGPSIVHRKCF	376
HeActIII	QEYDESGPSIVHRKCF	376

Abb. 2: Aminosäuresequenzvergleich der Beta-Aktine HeActI, -II und -III. He (*Hydractinia echinata*), HeActI (HeAktinI), HeActII (HeAktinII), HeActIII (HeAktinIII) und NES (nuclear export signal). Die Nukleotid-bindende Domäne der Zuckerkinase/HSP70/Aktin-Superfamilie ist dunkelgrau gekennzeichnet. Die Aminosäuresequenz ist am rechten Rand durchnummeriert. Die potentiellen NES-1- und NES-2-Sequenzen (Wada et al., 1998) sind rot dargestellt.

Die HeActI, -II und -III zeigen den für Aktin-Proteine charakteristischen Aufbau mit einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBD, *nucleotide-binding domain*) und zwei Kernexportsignalen (NES, *nuclear export signal*) (s. Abb. 2). Die NBD ist kennzeichnend für die Proteine der Zuckerkinase/HSP70/Aktin-Superfamilie und verändert durch Nukleotid-Hydrolyse den Konformationszustand des Aktins (Hurley, 1996). Im Endbereich der NBD ist das NES-1 (AS 171-182), das erste der beiden potentiellen nukleären Exportsignale für Aktin

(Wada et al., 1998), lokalisiert. In einem Abstand von 29 AS ist das zweite mögliche Kern-exportsignal (NES-2, AS 212-223) zu identifizieren.

Es existieren sechs verschiedene Aktin-Isoformen in den Vertebraten (Rubenstein, 1990). Der Unterschied beträgt in der Proteinsequenz bei keiner Isoform weniger als 93% (Perrin und Ervasti, 2010). Die Klassifizierung der Aktin-Isoform erfolgt in den AS des N-terminalen Endes. Die drei Aktin-Gene *HeActI*, *-II* und *-III* konnten mithilfe eines Alignments im N-terminalen Bereich mit sechs Aktin-Isoformen der Mammalia (modifiziert nach Perrin und Ervasti, 2010) charakterisiert werden (s. Abb. 3).

HeAktin	--D-D-D-V-A-A-L-V-V-D-
^β zyto.-Aktin	---D-D-D-I-A-A-L-V-V-D-
^γ zyto.-Aktin	---E-E-E-I-A-A-L-V-I-D-
^α skeletal.-Aktin	-D-E-D-E-T-T-A-L-V-C-D-
^α kardial.-Aktin	-D-D-E-E-T-T-A-L-V-C-D-
^α glatt.-Aktin	-E-E-E-D-S-T-A-L-V-C-D-
^γ glatt.-Aktin	---E-E-E-T-T-A-L-V-C-D-

Abb. 3: Vergleich der N-terminalen Enden der sechs Mammalia Aktin-Isoformen mit dem entsprechenden N-terminalen Bereich des HeAct(I-III). He (*Hydractinia echinata*), HeAktin (identischer N-terminaler Bereich der HeActI-III (10 AS in der Position 3-12)), ^βzyto.-Aktin (Beta-zytoplasmatisches Nicht-Muskelaktin), ^γzyto.-Aktin (Gamma-zytoplasmatisches Nicht-Muskelaktin), ^αskeletal.-Aktin (Alpha-skelettales Muskelaktin), ^αkardial.-Aktin (Alpha-kardiales Muskelaktin) und ^γglatt.-Aktin (Gamma-glattes Muskelaktin). Die AS in gelb zeigen die größte Variabilität innerhalb und zwischen den Nicht- und Muskelaktin-Isoformen. Die AS-Reste in rot unterscheiden sich vorwiegend zwischen den Nicht- und Muskelaktin-Isoformen. Die türkisen AS variieren zwischen der zytoplasmatischen ^β- und ^γ-Aktin-Isoform. Die Abb. wurde modifiziert nach Perrin und Ervasti (2010).

Diese drei Aktine aus *Hydractinia* sind eine zytoplasmatische Aktin-Isoform bzw. werden auch als Nicht-Muskelaktin bezeichnet. Es existieren zwei nahezu identische zytoplasmatische Isoformen, die als Beta- und Gamma-Aktin bezeichnet werden. Diese beiden Nicht-Muskelaktine unterscheiden sich nur in vier biochemisch ähnlichen AS, die in den zehn N-terminalen Aminosäureresten (s. Abb. 3) zu finden sind (Perrin und Ervasti, 2010). Wie der Vergleich der N-terminalen Region in Abb. 3 veranschaulicht, handelt es sich bei den Genen *HeActI*, *-II* und *-III* um das zytoplasmatische *Beta-Aktin* (β -Aktin) von *Hydractinia*. Die

einzigste Varianz ist das Valin an Position 4 von HeActI, -II und -III anstelle eines Isoleucins wie im Mammalia β -Aktin. Dieser Austausch der biochemisch ähnlichen AS ist, wie ein Proteinvergleich mithilfe des BLAST-P-Programms auf NCBI zeigte, auch bei der Beta-Aktin-Isoform anderer Organismen zu finden.

Die Auswertung der Nuklein- und Aminosäuresequenzen erbrachte den Nachweis, dass es sich bei den isolierten Genen um vier verschiedene Aktin-Gene aus *Hydractinia* handelt. Die Gene *HeActI*, *HeActII* und *HeActIII* konnten als zytoplasmatisches *Beta-Aktin* klassifiziert werden, wohingegen *HeActIV* aufgrund der fehlenden Sequenzinformation im N-terminalen Bereichs nicht charakterisiert werden konnte.

3.3 Expressionsanalysen unter der Kontrolle der genregulatorischen Regionen der Aktin-Gene *HeActI*, *HeActII* und *HeActIII*

3.3.1 *HeActI* ist ein schwach exprimiertes Aktin-Gen in *Hydractinia*

Die Reportergenkonstrukte *HeActI51ASActeGFPHeEF1alpha* und *HeActI51ASActeGFP* (Sequenzen s. Anhang; 7.2.1.1 und 7.2.1.2) konnten *in vivo* zeigen, dass die 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeActI* (Sequenzen s. Anhang; 7.1.1.1 und 7.1.1.2) funktionell sind. In diesen Konstrukten ist die 5`regulatorische Region von *HeActI* im Leserahmen fusioniert mit dem codierenden Bereich der ersten 51 AS von *HeActI*, einer Klonierungskassette (bez. als *NotI-Klonierungskassette* bzw. *NotI-Cassette*) und dem Reportergen *eGFP* gefolgt von einer 3`regulatorischen Region. Die Transkription wird im *HeActI51ASActeGFP-HeEF1alpha* durch die 3`regulatorische Region von *HeEF1alpha* und im *HeActI51ASActeGFP* durch die 3`regulatorische Region von *HeActI* beendet (s. Abb. 4).

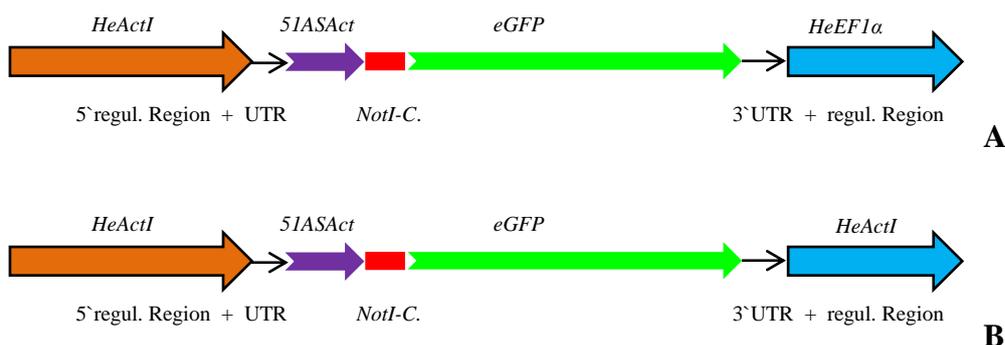


Abb. 4: Schematische Darstellung der Reporterengenkonstrukte *HeActI51ASActeGFP-HeEF1alpha* (A) und *HeActI51ASActeGFP* (B). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActI* (*HeAktinI*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinI*), *eGFP* (*enhanced GFP*), *HeEF1α* (*HeElongationsfaktor 1 alpha*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI*-C. (*NotI*-Cassette).

Mithilfe von *HeActI51ASActeGFPHeEF1alpha* und *HeActI51ASActeGFP* wurden *eGFP*-exprimierende transgene *Hydractinia* erzeugt. Die Analyse der Expressionsstudien zeigte, dass beide Konstrukte schwach exprimiert wurden. In 24h alten Embryonen war eine *eGFP*-Fluoreszenz verstreut in wenigen Zellen zu beobachten. In der weiteren Entwicklung bis hin zur Planularlarve waren die *eGFP*-exprimierenden Zellen ausgeprägter im Entoderm und nur vereinzelt im Ektoderm lokalisiert. Die Auswertung der Expressionen zeigte, dass die Transgenen *eGFP* nur gering und transient exprimierten. Die *eGFP*-Fluoreszenz war nach der Metamorphose der Larven zum Primärpolypen nicht mehr nachweisbar. Ein weiterer Versuch bestätigte erneut dieses Ergebnis der transient transgenen *HeActI51ASActeGFP*-Expression mit dem Verlust der *eGFP*-Fluoreszenz während der Metamorphose. Das *HeActI* ein Gen ist, das auch im postmetamorphen Stadium von *Hydractinia* exprimiert wird, konnte in einer Realtime-PCR nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung W. Tilmann, 2011).

Die Auswertung der Expressionen der Reporterengenkonstrukte *HeActI51ASActeGFP* und *HeActI51ASActeGFPHeEF1alpha* konnten zeigen, dass der *HeActI*-Promotor nur schwach in *Hydractinia* aktiv ist. Seine Aktivität ist während der Entwicklung zur Planula ausgeprägter im Entoderm und nur schwach im Ektoderm zu finden.

3.3.2 *HeActIII* ist nicht ubiquitär exprimiert

Die Funktionalität der 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeActIII* (Sequenzen s. Anhang; 7.1.3.1 und 7.1.3.2) konnte mithilfe der Expressionskonstrukte *HeActIII51ASAct-eGFPHydraTerm* und *HeActIII51ASActeGFP* (Sequenzen s. Anhang; 7.2.3.1 und 7.2.3.2) *in vivo* gezeigt werden. In diesen Konstrukten ist die 5`regulatorische Region von *HeActIII* im Leserahmen fusioniert mit dem codierenden Bereich der ersten 51 AS von *HeActIII*, der *NotI*-Klonierungskassette und *eGFP* gefolgt von einer 3`regulatorischen Region. Die Transkriptionstermination wird im *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm* durch den *Hydra-Aktin*-Terminator (Khalturin et al., 2007) und im *HeActIII51ASActeGFP* durch die 3`regulatorische Region von *HeActIII* reguliert (s. Abb. 5).

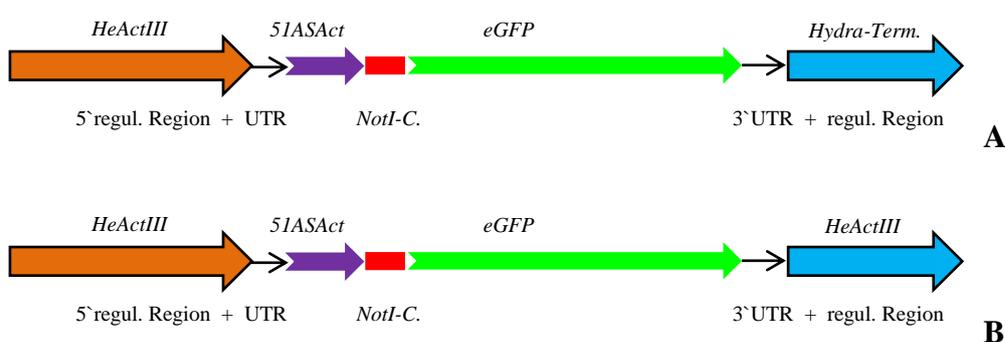


Abb. 5: Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm* (A) und *HeActIII51ASActeGFP* (B). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActIII* (*HeAktinIII*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinIII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), *Hydra-Term.* (*Hydra*-Terminator), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI*-C. (*NotI*-Cassette).

Die Reportergerkonstrukte *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm* und *HeActIII51ASActeGFP* können *eGFP* in transgenen *Hydractinia* zur Expression bringen. Die Auswertung der Expressionsmuster zeigte, dass beide Konstrukte augenscheinlich gleich exprimiert werden. Eine mosaikartige Verteilung von *eGFP*-exprimierenden Zellen war in 24h alten Embryonen sichtbar. Die *eGFP*-Expression kann 48 Stunden nach der Befruchtung im Stadium der Präplanula (Abb. 6A) und in der weiteren Entwicklung bis hin zur Planularlarve augenscheinlich in entodermalen Zellen beobachtet werden. Die Spezifizierung der Zelltypen im Entoderm war durch die kontrastreiche *eGFP*-Fluoreszenz schwierig. In Abb. 6B sind in einer

HeActIII51ASActeGFPHydraTerm-Larve mehrere *eGFP*-exprimierende Epithelzellen erkennbar.

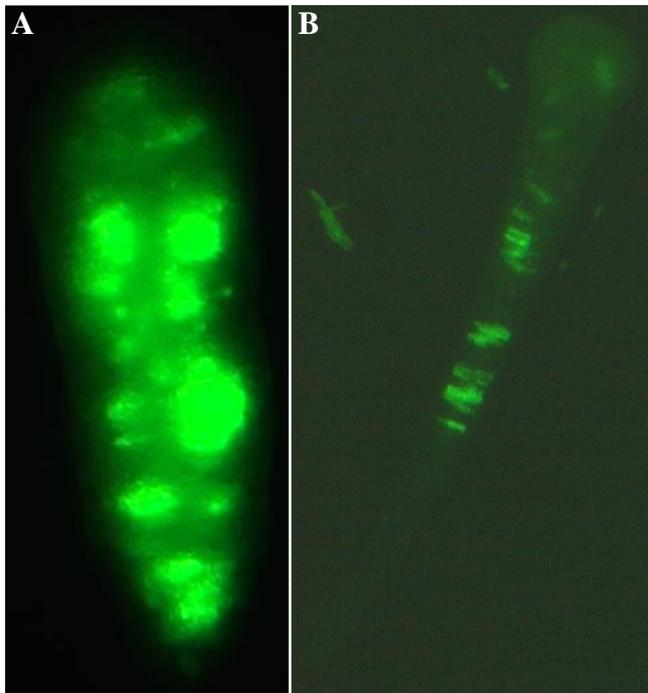


Abb. 6: Expressionsanalyse transgener *HeActIII51ASActeGFP*- und *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm*-*Hydractinia*. (A) *eGFP*-Fluoreszenz-Aufnahme einer 48h alten *HeActIII51ASActeGFP*-Präplanula. (B) *eGFP*-Expression in Epithelzellen einer *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm*-Planularlarve.

Die *HeActIII51ASActeGFP*-Expression in den Larven war transient transgen. Die *eGFP*-Fluoreszenz war nach der Metamorphose zum Primärpolypen nicht mehr zu detektieren. Mit der Ausnahme von zwei transgenen Tieren, die *eGFP* in wenigen Zellen exprimierten. Die *eGFP*-Expression war im postmetamorphen Stadium von *Hydractinia* ausschließlich in den Epithelzellen im Tentakel (s. Abb. 7A) und im Stolon zu erkennen. Dieses Ergebnis war konnte auch in einem *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm*-exprimierenden Polypen beobachtet werden, indem die *eGFP*-Fluoreszenz nur in Epithelzellen in den Tentakeln vorhanden war.

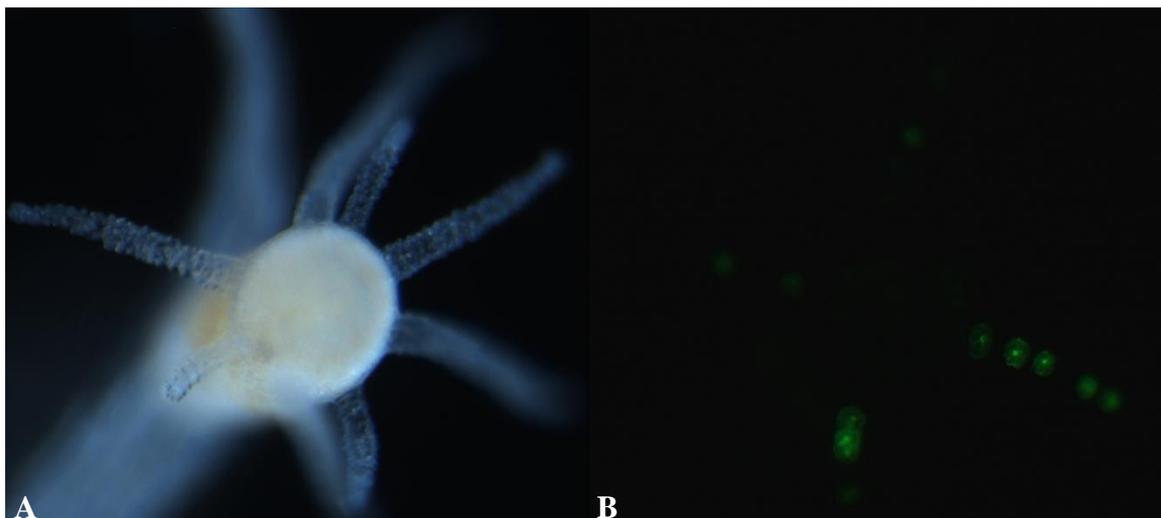


Abb. 7: *HeActIII51ASActeGFP*-Expression im Polypen. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme eines Polypen. *eGFP*-Expression in Epithelzellen im Tentakel.

Es konnten in den untersuchten Transgenen in keinem Entwicklungsstadium Nervenzellen beobachtet werden. Die Untersuchungen der Expressionen der Reporterkonstrukte *HeActIII51ASActeGFP* und *HeActIII51ASActeGFPHydraTerm* konnten zeigen, dass Aktin-Gen *HeActIII* nicht ubiquitär in *Hydractinia* exprimiert wird.

3.3.3 *HeActII* wird ubiquitär in *Hydractinia* exprimiert

Die Teilsequenzen der 5`- und 3`regulatorischen Region (Sequenz s. Anhang; 7.1.2.1) des unter 3.2 beschriebenen *HeActII* wurden auf potentielle regulatorische Elemente der Gentranskription untersucht. In den 5`regulatorischen Regionen sind keine der charakteristischen regulatorischen Kontrollelemente der Gentranskription identifizierbar. Mithilfe einer 3`RACE konnte der 3`nicht-translatierte Bereich in der 3`regulatorischen Region bestimmt werden. Im 3`nicht-translatierten Bereich vom Translationsstopcodon bis zum potentiellen Polyadenylierungsstartpunkt konnten zwei der typischen Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) bei nt 3484-3489 und 3618-3623 lokalisiert werden (Sequenz s. Anhang; 7.1.2.1).

Das Expressionskonstrukt *HeActII51ASActeGFP* (Sequenz s. Anhang; 7.2.2.3) zeigt *in vivo*, dass die 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeActII* funktionell sind. Dieses Genkonstrukt konnte *eGFP* in transgenen *Hydractinia* erfolgreich exprimieren. Die 5`- und 3`regula-

torischen Regionen flankieren im Konstrukt das Reportergen *eGFP*. In diesem wurde der 5`regulatorische Region folgend der codierende Bereich der ersten 51 AS von *HeActII* und die *NotI-Klonierungskassette* im Leserahmen mit dem *eGFP* fusioniert (s. Abb. 8).



Abb. 8: Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts *HeActII51ASActeGFP*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (NotI-Cassette).

Die ersten Zellen mit einer *HeActII51ASActeGFP*-Expression waren 10h nach der Injektion detektierbar (Bachelorarbeit Diana Gerards, 2010). In 24h alten Embryonen sind die *eGFP*-exprimierenden Zellen mosaikartig verstreut. Es war aufgrund der starken *eGFP*-Expression nicht möglich einzelne Zelltypen zu spezifizieren. In der weiteren Entwicklung waren nach 48h im anterioren Bereich der Präplanula in Abb. 9A mehrere sensorische Nervenzellen (s. weiße Pfeilspitzen) zu erkennen. Die *eGFP*-exprimierenden Zellen waren entlang der anterior-posterioren Körperachse verteilt. Ektodermal konnten vereinzelt Zellen beobachtet werden. Die meisten Zellen waren im Entoderm lokalisiert. Der Zelltyp der ekto- und entodermalen Zellen war nicht zu bestimmen. In diesem Entwicklungsstadium und auch in der weiteren Entwicklung waren *eGFP*-exprimierenden Zellen ohne eine sichtbare Polarität zufällig verteilt.

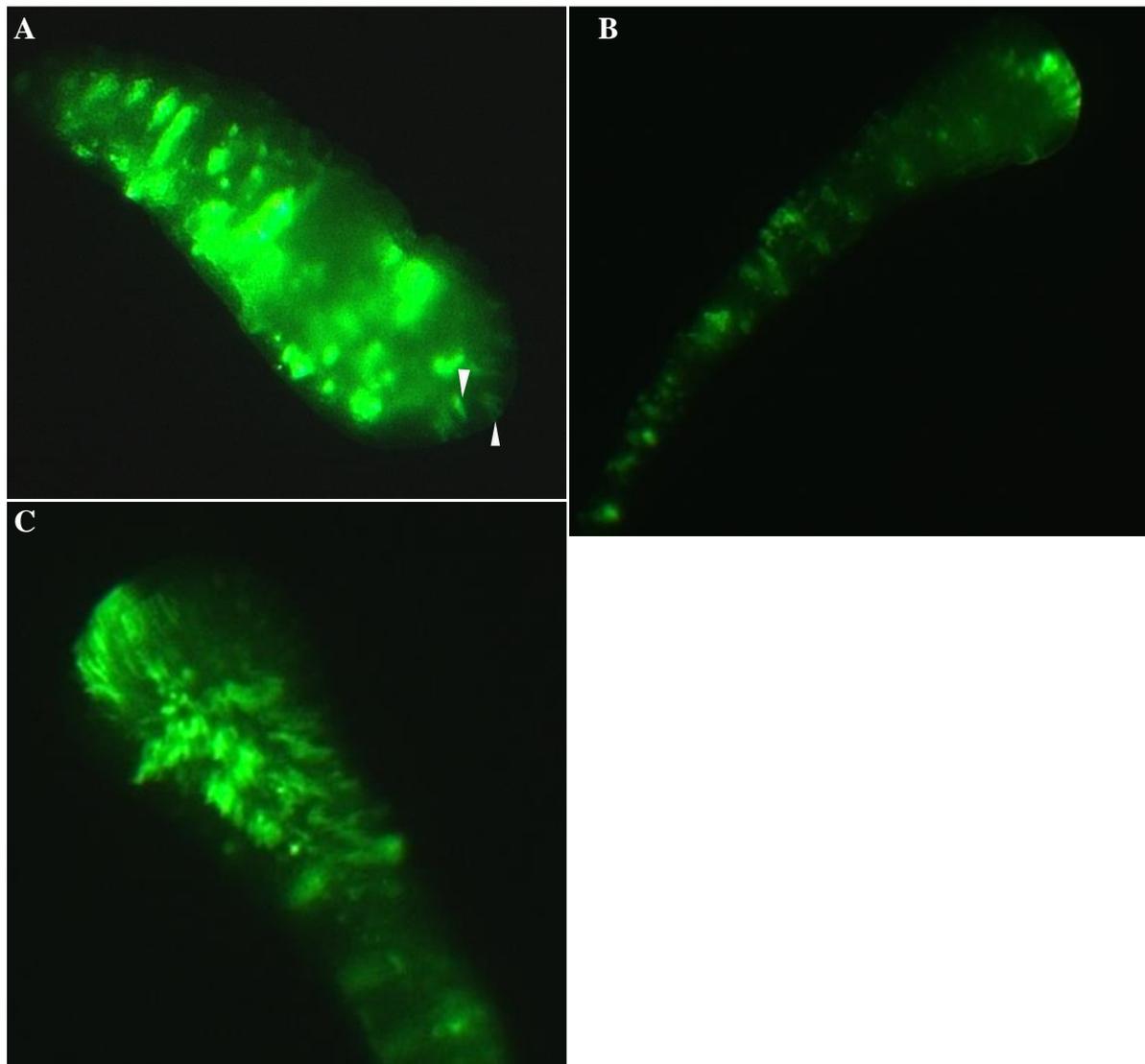


Abb. 9: Expressionsanalyse transgener *HeActII51ASActeGFP-Hydractinia*. (A) eGFP-markierte sensorische Nervenzellen (s. weiße Pfeilspitzen) in der apikalen Region einer 48h alten Präplanula. (B) 72h Planularlarve. *eGFP*-Expression verteilt im ganzen Tier. (C) Teilansicht der Larve aus (B) in einer anderen Perspektive. Eine Vielzahl *eGFP*-exprimierender sensorischer Nervenzellen in der apikalen Region und im anterioren Bereich.

Die Spezifizierung der einzelnen Zelltypen in den Stadien der Embryonalentwicklung bis hin zur Planularlarve war aufgrund der kontrastreichen eGFP-Fluoreszenz schwierig. In Abb. 9B ist eine Planularlarve exemplarisch gezeigt. In der Teilsansicht dieser Larve sind eine Vielzahl *eGFP*-exprimierender sensorischer Nervenzellen gut in der apikalen Region und im anterioren Bereich (s. Abb. 9C) zu erkennen. Die weiteren eGFP-markierten Zellen posterior zum Schwanz waren schwer zu spezifizieren (s. Abb. 9B).

Es konnten in den Transgenen neben I-Zellen auch verschiedene I-Zellderivate, wie z.B. ekto- und entodermale Epithelzellen sowie sensorische und ganglionische Neuronen, identifiziert werden. Die *HeActII51ASActeGFP*-exprimierenden Larven waren transient transgen. Die eGFP-Fluoreszenz war nach der Metamorphose zum Primärpolypen oder nach wenigen Tagen im Polypen-Stadium nicht mehr nachzuweisen. In wenigen Fällen zeigten Polypen eine persistente *eGFP*-Expression im adulten Stadium von *Hydractinia*. Die *eGFP*-exprimierenden Zellen waren mosaikartig verstreut in allen Körperstrukturen im postmetamorphen Stadium zu beobachten. Es waren eGFP-markierte I-Zellen und I-Zellderivate in den Transgenen erkennbar, wie beispielsweise in den Stolonen des Primärpolypen in Abb. 10B zu sehen. In den ekto- und endodermalen Epithelzellen des Tentakels war das Fusionsprotein 51ASActeGFP mit dem kortikalen endogenen Aktin des Zytoskeletts assoziiert, wie in den Epithelzellen in Abb. 10C zu erkennen. Die zytoplasmatischen Fäden (s. weiße Pfeilspitzen) an denen der Zellkern in der Zelle aufgehängt ist, sind ebenfalls durch die Anlagerung des Fusionsproteins sichtbar.

Neben diesen epidermalen Epithelzellen konnten im Tentakel auch zwei weitere in *Hydractinia* vorkommende Zelltypen spezifiziert werden. Die eGFP-Fluoreszenz war in den sensorischen Nervenzellen und Nematocyten detektierbar. In den Nematocyten im Tentakel konnte man sehr gut die Nematocysten erkennen, die frei von eGFP waren. In den Stolonen wurde auch ein weiterer in *Hydractinia* vorkommender Nervenzelltyp, *eGFP*-exprimierende ganglionische Nervenzellen identifiziert. Es konnten bipolare Nervenzellen im Stolon des Polypen und in der Larve mit einer Länge von mindestens 250µm beobachtet werden (Künzel et al., 2010).

Die *in vivo*-Expressionsstudien des Reportergenkonstrukt *HeActII51ASActeGFP* zeigen, dass das Gen *HeActII* ubiquitär in *Hydractinia* exprimiert wird. Dieses Konstrukt gibt erstmals *in vivo* einen neuen Einblick in die komplexe Gestaltung des Nervensystems in *Hydractinia* (Künzel et al., 2010).

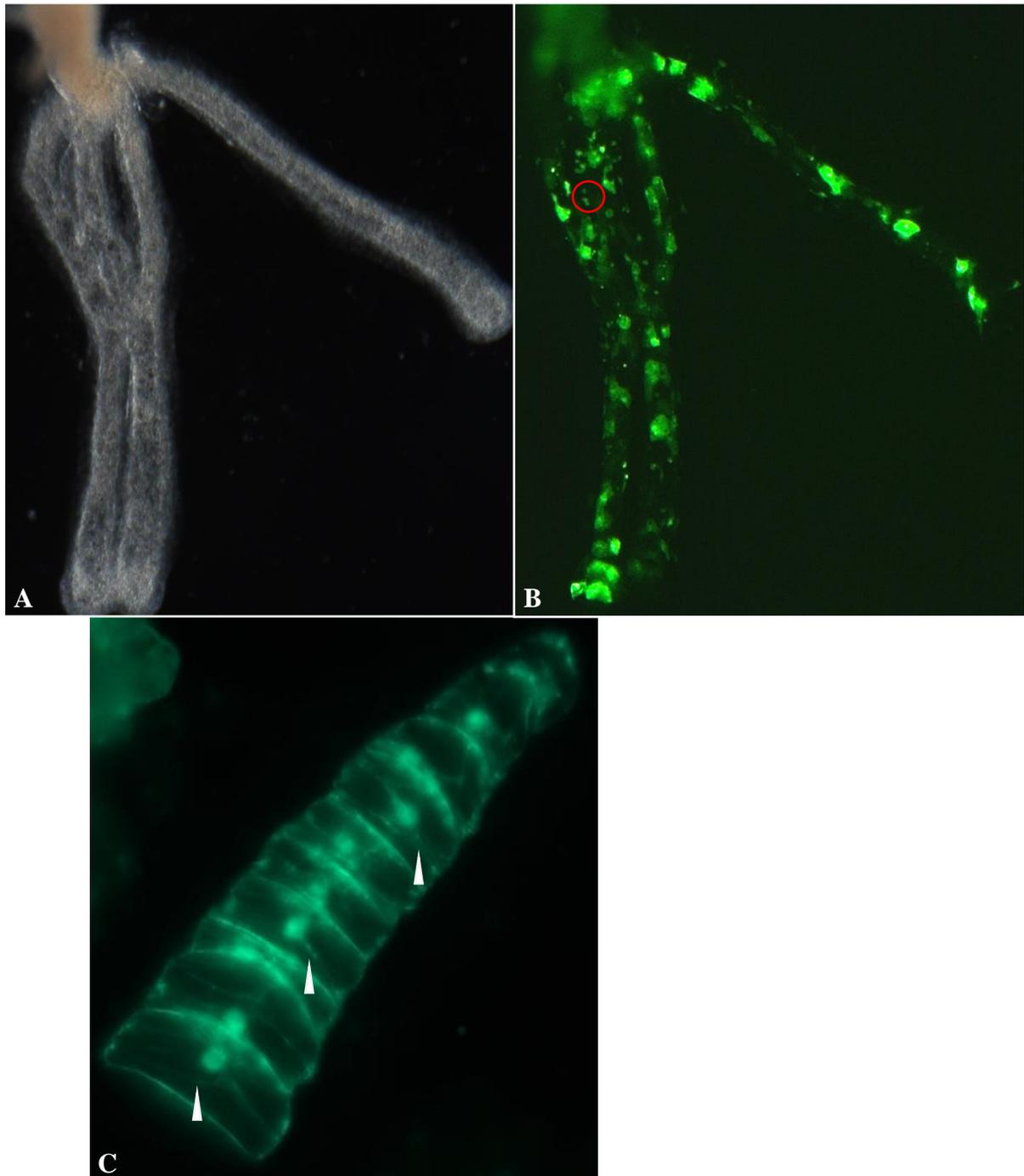


Abb. 10: *HeActII51ASActeGFP*-Expression im Primär- und Polypen-Stadium von *Hydractinia*. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme der Stolone eines Primärpolypens. *eGFP*-Expression in I-Zellen (s. roter Kreis) und I-Zellderivate. (C) eGFP-markierte Epithelzellen in einem Tentakel. Das Fusionsprotein 51ASActeGFP ist mit dem kortikalen endogenen Aktin des Zytoskeletts und den zytoplasmatischen Fäden (s. weiße Pfeilspitzen) assoziiert.

3.3.3.1 Die Verkürzung der stromaufwärts gelegenen 5`regulatorischen Region führt zu keiner Veränderung der genspezifischen *HeActII*-Expression

In der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von Diana Gerards (2010) wurde die stromaufwärts gelegene 5`regulatorische Region von *HeActII* im Expressionskonstrukt *HeActII51ASActeGFP* von 1978 Basenpaare (bp) auf 607 bp verkürzt. Das Deletionskonstrukt *HeActII(607 bp)51ASActeGFP* unterscheidet sich zu dem in 3.3.3 beschriebenen nur in der kürzeren 5`regulatorischen Region des *HeActII* (s. Abb. 11).

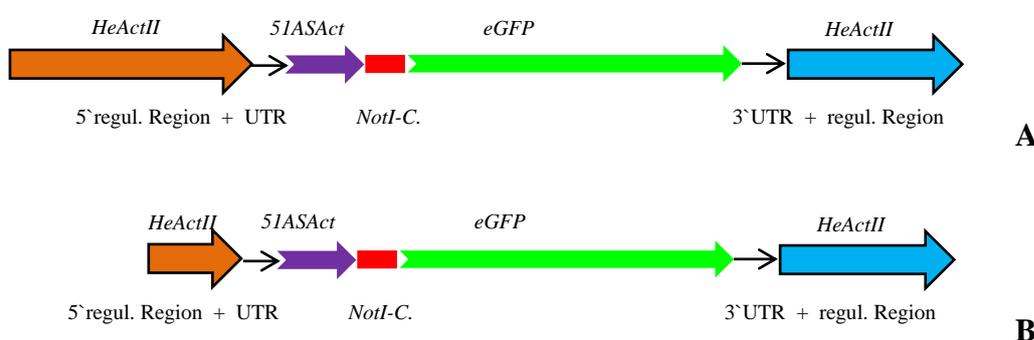


Abb. 11: Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts *HeActII51ASActeGFP* (A) und des Deletionskonstrukts *HeActII(607 bp)51ASActeGFP* (B). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (*NotI*-Cassette).

Die Analyse der Expressionsstudien zeigt, dass diese Deletion keinen Einfluss auf die Expression von *HeActII* hat. Die verkürzte 5`regulatorische Region treibt die Expression in denselben Zelltypen wie die längere 5`regulatorische Region des *HeActII* im Reportergenkonstrukt *HeActII51ASActeGFP* (Bachelorarbeit Diana Gerards, 2010).

3.3.3.2 Die 3`regulatorische Region hat keine Funktion in der Regulation der spezifischen Genexpression von *HeActII*

Es konnte durch die Reporterkonstrukte *HeActII51ASActeGFPHydraTerm* und *HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha* (Sequenzen s. Anhang; 7.2.2.1 und 7.2.2.2) gezeigt

werden, dass die 5`regulatorische Region von *HeActII* entscheidend für die genspezifische Expression von *HeActII* ist. Im Unterschied zu dem in 3.3.3 beschriebenen *HeActII51AS-ActeGFP* wurde in diesen Genkonstrukte das *eGFP* nicht mit der 3`regulatorischen Region von *HeActII* fusioniert (s. Abb. 12). Die Termination der Transkription erfolgt im *HeActII51-ASActeGFPHydraTerm* durch den *Hydra-Aktin-Terminator* (*Hydra-Term.*; Khalturin et al., 2007) und im *HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha* durch die 3`regulatorische Region von *HeEF1alpha*.

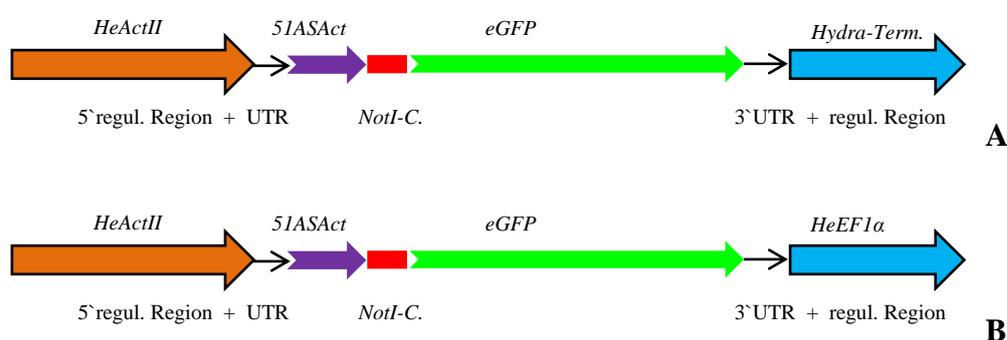


Abb. 12: Schematische Darstellung der Reporter-genkonstrukte *HeActII51ASActeGFP-HydraTerm* (A) und *HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha* (B). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *Hydra-Term.* (*Hydra-Terminator*), *HeEF1α* (*HeElongationsfaktor 1 alpha*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (*NotI-Cassette*).

Mit beiden Konstrukten konnte *eGFP* erfolgreich exprimiert werden. Neben vorwiegend ekto- und entodermal *eGFP*-exprimierenden Epithelzellen waren auch einzelne I-Zellderivate in den Planularlarven zu beobachten. In Abb. 13A ist in einer *HeActII51ASActeGFPHydraTerm*-exprimierenden Larve eine Vielzahl eGFP-markierter Epithelzellen verteilt über den Körper sichtbar. In deren apikalen Region ist eine *eGFP*-exprimierende sensorische Nervenzelle (s. weiße Pfeilspitze) sichtbar. Mehrere eGFP-markierte sensorische Nervenzellen (s. rote Pfeile in Abb. 13B) waren im apikalen Bereich einer *HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha*-transgenen Planularlarve lokalisiert.

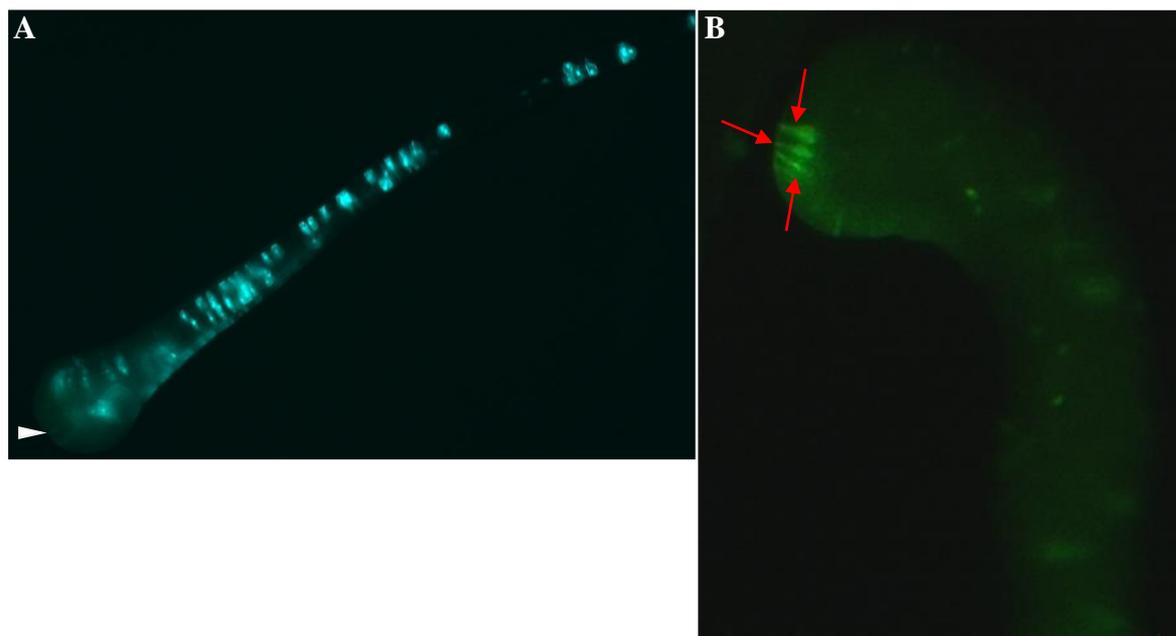


Abb. 13: Expressionsanalyse transgener *HeActII51ASActeGFPHydraTerm*- und *HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha*-Larven. (A) *eGFP*-Expression in einer *HeActII51ASActeGFPHydraTerm*-transgenen Planularlarve. Sensorische Nervenzelle (s. weiße Pfeilspitze) im apikalen Bereich und eine Vielzahl Epithelzellen verteilt über den Körper. (B) *eGFP*-exprimierende sensorische Nervenzellen (s. rote Pfeile) in der apikalen Region (*HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha*).

In einer detaillierten Analyse waren unter dem Mikroskop in einem *HeActII51ASActeGFPHydraTerm*-exprimierenden Gastrozoiden verschiedene *eGFP*-markierte Zellerivate der I-Zellen zu sehen. In diesem Gastrozoid war die *eGFP*-Fluoreszenz vermehrt in Epithelmuskelzellen, wie exemplarisch im Hypostom-Bereich in der Abb. 14A zu sehen. Im Gastralbereich in Abb. 16B sind die Zellfortsätze (s. rote Pfeilspitzen) einer ganglionischen Nervenzelle, die zwischen mehreren Epithelmuskelzellen gelegen ist, zu erkennen. Diese Nervenzelle innervierte in den Tentakel und verlief über den Gastralraum nach basal in Richtung des Fußbereichs des Polypen. In der Abb. 16C ist ein Verband von Epithelmuskelzellen zu sehen. Die Muskelfortsätze waren zwei- und mehrfach verzweigt. Es konnten im adulten Polypen auch *eGFP*-markierte Nematocyten beobachtet werden.

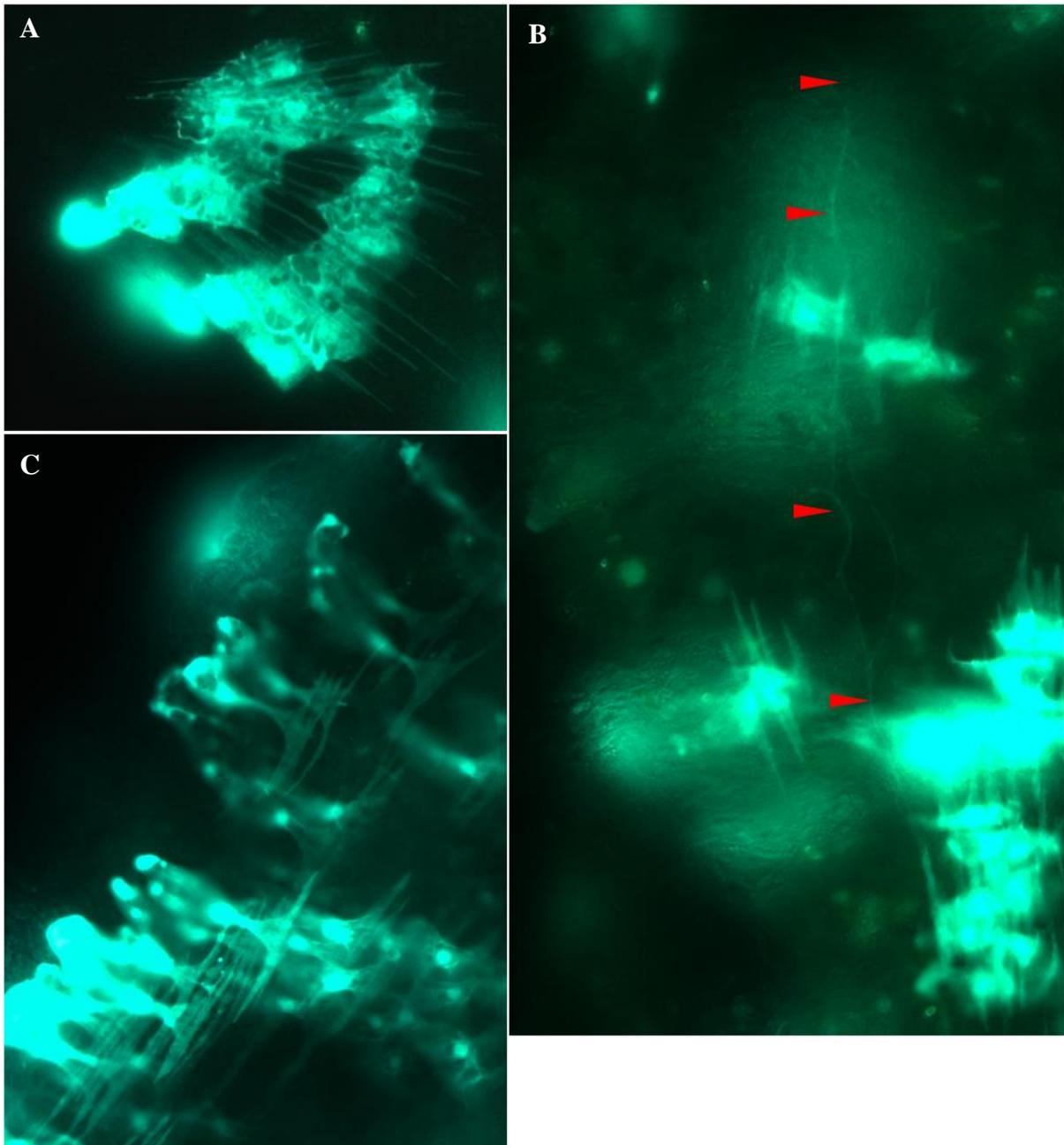


Abb. 14: Expression des Transgens *HeActII51ASActeGFPHydraTerm* im Gastrozoid. (A) eGFP-Fluoreszenz in Epithelmuskelzellen im Hypostom. (B) Zellfortsatz einer *eGFP*-exprimierenden ganglionischen Nervenzelle (s. rote Pfeilspitzen) im Gastralbereich zwischen mehreren Epithelmuskelzellen gelegen. (C) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. Verband von Epithelmuskelzellen mit zwei- und mehrfach verzweigten Muskelfortsätzen.

Die Auswertung der Expressionsmuster von *HeActII51ASActeGFPHydraTerm* und *HeActII51ASActeGFPHeEF1alpha* zeigt, dass diese beiden Reportergernekonstrukte in den-

selben Zelltypen wie *HeActII51ASActeGFP* exprimiert werden. Die genspezifische Regulation von *HeActII* erfolgt nicht in der 3`regulatorischen Region.

Anhand dieses Ergebnisses kann der Schluss gezogen werden, dass die spezifische Expression von *HeActII* in der 607 bp langen 5`regulatorischen Region reguliert wird, die ausreichend ist um die genspezifische *HeActII*-Expression zu treiben (s. 3.3.3.1).

3.4 Charakterisierung des Homologs von EF1alpha aus *Hydractinia*

In einer 5`- und 3`RACE-PCR konnte ausgehend von zwei bekannten *HeEF1alpha* (*HeElongationsfaktor 1 alpha*)-Teilsequenzen (J. Schmich, NCBI: AY949981 und AY949982) das 5`- und 3`Ende des Homologs von EF1alpha aus *Hydractinia* isoliert werden. Die fehlende Sequenzinformation zwischen diesen beiden Fragmenten wurde in einer weiteren PCR vervollständigt. Die zusammengesetzte Gesamtsequenz des Gens ist 1697 bp lang und codiert für ein Protein mit einer Länge von 465 AS (Sequenz s. Anhang; 7.1.5.1). Einer 178 bp langen 5`untranslatierten Region folgt ein offenes Leseraster von 1395 bp. In der 111 bp langen 3`untranslatierten Region mit einem Poly(A)-Schwanz beginnend bei nt 1685 sind fünf mögliche Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) an den Positionen nt 1586-1591, 1613-1618, 1630-1635, 1647-1652 und 1667-1672 vorhanden (Sequenz s. Anhang; 7.1.5.1).

Das EF1 α -Homolog aus *Hydractinia* zeigt den charakteristischen Aufbau eines GTP-bindenden Proteins. Es besitzt die für die Mitglieder der GTP-bindenden-Elongationsfaktor-Familie typischen strukturellen drei Domänen. Diese werden als Domäne I (GTP-bindende Domäne), Domäne II und Domäne III bezeichnet (Ejiri, 2002) und sind schematisch in Abb. 15 dargestellt.

In der N-terminalen Region liegt der charakteristische GTP-bindende Bereich, der in EF1 α -Proteinen sehr hoch konserviert ist (Dever et al., 1987; Woolley und Clark, 1989) wie der Sequenzvergleich im Bereich der GTP-bindenden Domäne zeigt (s. Anhang; 7.1.5.2, Abb. 69). Im N-terminalen Bereich des HeEF1alpha konnten in der konservierten charakteristischen GTP-bindenden Domäne die für G-Proteine typischen Konsensussequenzen GxxxxGKS (Motiv I oder Motiv G-1), DxxG (Motiv II oder Motiv G-3) und NKxD (Motiv III oder Motiv G-4) identifiziert werden (s. Schematische Darstellung in Abb. 15). Diese Motive sind für die Bindung von GTP verantwortlich (Dever et al., 1987; Ejiri, 2002).

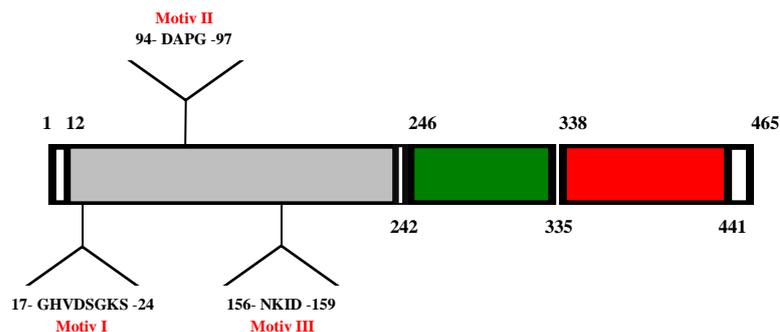


Abb. 15: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des HeEF1alpha. Die Zahlen kennzeichnen die Position der AS im Protein. Die GTP-bindende Domäne ist hellgrau dargestellt und das Motiv I, II und III sind rot sowie die AS der Motive schwarz hervorgehoben. Die Domäne II ist grün und die Domäne III rot gekennzeichnet.

Der Proteinsequenzvergleich der Domäne II und der C-terminalen Domäne III zeigt, dass diese im HeEF1alpha konserviert sind (s. Anhang; 7.1.5.3, Abb. 70). In den beiden Domänen erfolgt die Bindung geladener tRNA (Nissen et al., 1995; Wang et al., 1997).

Die Auswertung der Proteinstruktur und der Sequenzvergleiche erbrachte den Nachweis, dass es sich bei dem isolierten Gen um das *EF1alpha*-Homolog aus *Hydractinia* handelt.

3.4.1 *HeEF1alpha* zeigt eine ubiquitäre Expression in *Hydractinia*

Aus dem Genom von *Hydractinia* wurden mittels Splinkerette-PCR Teilbereiche der 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeEF1alpha* (Sequenzen s. Anhang; 7.1.5.4 und 7.1.5.5) isoliert. In der 5`regulatorischen Region kann keine der charakteristischen regulatorischen Kontrollelemente der Gentranskription identifiziert werden. Die 3`regulatorische Region enthält im 3`nicht-translatierten Bereich vom Translationsstopcodon bis zum potentiellen Polyadenylierungsstartpunkt fünf mögliche Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) an den Positionen nt 13-18, 40-45, 57-62, 74-79 und 94-99 (Sequenz s. Anhang; 7.1.5.5).

Das Reporterkonstrukt *HeEF1alpha51ASActeGFP* (Sequenz s. Anhang; 7.2.4.1) konnte *in vivo* zeigen, dass die 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeEF1alpha* funktionell sind. Das Genkonstrukt kann *eGFP* in transgenen *Hydractinia* treiben. Im *HeEF1alpha51AS-ActeGFP* flankieren die 5`- und 3`regulatorischen Regionen das Reportergen *eGFP*. Der 5`regulatorischen Region folgt im Leserahmen der codierende Bereich der ersten 51 AS von

HeActII und die *NotI*-Klonierungskassette fusioniert mit dem *eGFP* (s. Abb. 16). Im Unterschied zu der aus dem Genom isolierten 5' regulatorischen Region (nt 2949-2951, Sequenz s. Anhang; 7.1.5.4) fehlt diese Region im Genkonstrukt mit den letzten drei stromaufwärts gelegenen Nukleotide der untranslatierten Region vor dem Translationstart. Diese Varianz der Sequenz des Translationsstartbereichs ist funktionell und hat keinen Effekt auf Initiation der Translation.

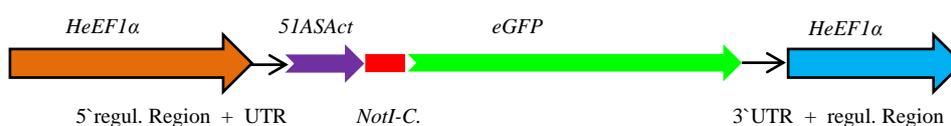


Abb. 16: Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes *HeEF1alpha-5IASActeGFP*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeEF1alpha* (*HeElongationsfaktor 1 alpha*), *5IASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (*NotI*-Cassette).

Die ersten *HeEF1alpha5IASActeGFP*-exprimierenden Zellen konnten 11 Stunden nach der Injektion beobachtet werden (Bachelorarbeit Diana Gerards, 2010). Die *eGFP*-Expression war in 24h alten Embryonen (s. Abb. 17A) und auch in der weiteren Entwicklung mosaikartig verteilt. Nach 28 Stunden (s. Abb. 17B) konnte die *eGFP*-Fluoreszenz mit dem Sichtbarwerden der anterior-posterioren Achse in den Zellen des Ekto- und Entoderms lokalisiert werden. Die *eGFP*-exprimierenden Zellen waren in diesem Stadium und auch in der weiteren Entwicklung ohne eine polarisierte Anordnung zufällig verstreut. In den einzelnen Entwicklungsstadien bis hin zur Planularlarve konnten einzelne Zelltypen aufgrund der starken *eGFP*-Fluoreszenz nur schwer unter dem Stereomikroskop spezifiziert werden. Neben ekto- und entodermalen *eGFP*-exprimierenden Epithelzellen waren noch Nervenzellen gut zu erkennen. In einer detaillierten Analyse konnten unter dem Mikroskop in der Planularlarve I-Zellen und noch weitere I-Zellderivate mit *eGFP*-markiert detektiert werden. Es waren verschiedene Zellderivate der I-Zellen, wie z.B. Drüsenzellen, Nematocyten und unterschiedliche Nervenzelltypen von *Hydractinia*, zu identifizieren. Dieses sind die *eGFP*-exprimierenden sensorischen und ganglionischen Neuronen. Das Expressionskonstrukt *HeEF1alpha5IASActeGFP* wird wie auch *HeActII5IASActeGFP* ubiquitär exprimiert. Diese beiden Genkonstrukte erlauben

erstmals *in vivo* Einblicke in den vielfältigen Aufbau und die Entstehung des Nervensystems in *Hydractinia* (Künzel et al., 2010).

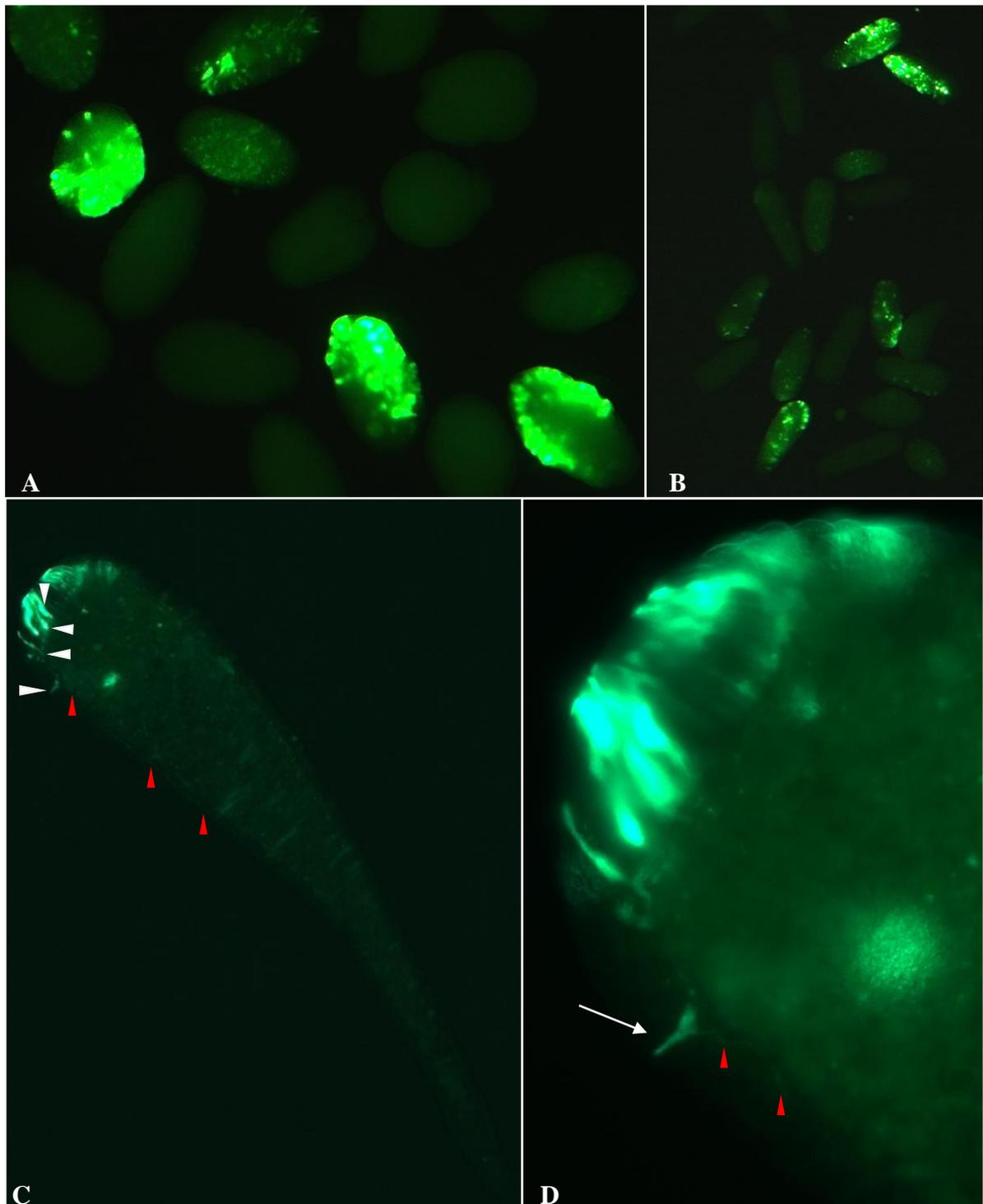


Abb. 17: Expressionsanalyse transgener *HeEF1alpha51ASActeGFP-Hydractinia*. (A, B)

eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme von 24h - (A) und 28h alten Embryonen (B). (C) eGFP-markierte sensorische Nervenzellen (vier exemplarisch durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet) in der apikalen sensorischen Furche des anterioren Bereichs einer Planularlarve. (D) In der Detailaufnahme zu (C) ist eine sensorische Nervenzelle (s. weiße Pfeile) zu erkennen. Diese ist mit einer ganglionischen Nervenzelle verschaltet ist. Der Zellfortsatz (s. rote Pfeilspitzen in (C) und (D)) dieser bipolaren Nervenzelle verläuft nach posterior.

Die *HeEF1alpha5IASActeGFP*-exprimierenden Nervenzellen zeigten eine Vernetzung des Nervensystems sowohl longitudinal als auch transversal zur anterior-posterioren Körperachse der Larve. In der apikalen sensorischen Grube im anterioren Bereich der Larve (Plickert, 1989) waren vermehrt sensorischen Nervenzellen markiert, wie exemplarisch in Abb. 17C (s. weiße Pfeilspitzen) zu sehen. In Abb. 17D ist im Detail eine sensorische Nervenzelle (s. weißer Pfeil) zu erkennen, die mit einer ganglionischen Nervenzelle verschaltet ist. Der Zellfortsatz (s. rote Pfeilspitzen in Abb. 17, C und D) der bipolaren Nervenzelle verläuft nach posterior, wie in der Gesamtansicht dieser Larve in Abb. 17D zu sehen.

Die transgenen *HeEF1alpha5IASActeGFP*-exprimierenden Larven zeigten eine transiente *eGFP*-Expression, die nach der Metamorphose zum Primärpolypen nicht mehr detektierbar war. Mit der Ausnahme eines einzigen Primärpolypen zeigte kein weiterer eine eGFP-Fluoreszenz. Dieser zeigte 24h nach der Induktion der Metamorphose *eGFP*-exprimierende Zellen in Tentakel- und Stolonregion sowie im Hypostom und der Körpersäule. In dieser Aufsicht unter dem Stereomikroskop und aufgrund der starken eGFP-Fluoreszenz sind nur einzelne Zelltypen spezifizierbar (s. Abb. 18B).

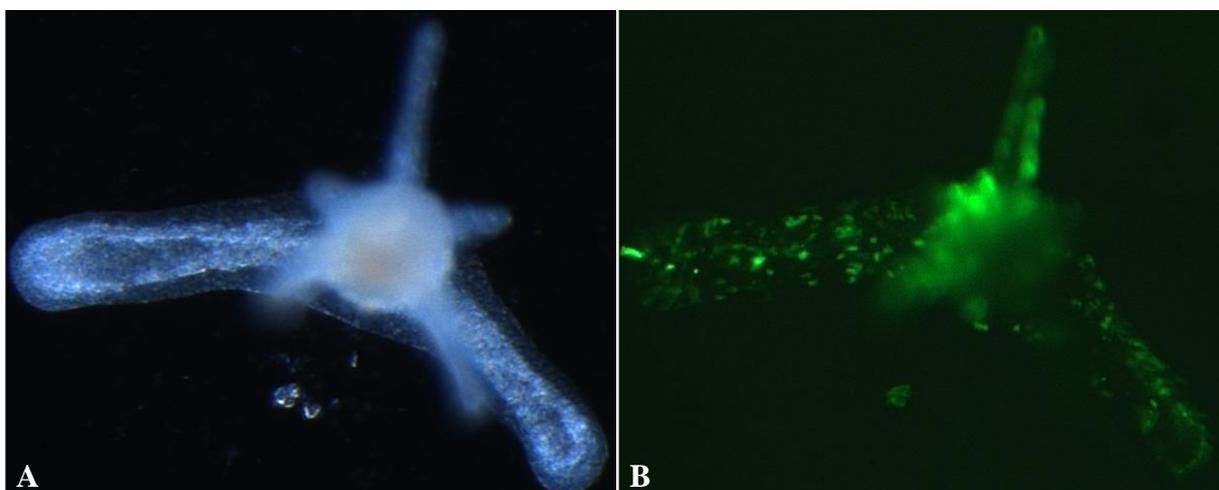


Abb. 18: (s. vorhergehende Seite) **Expression des Transgens *HeEF1alpha51ASActeGFP* im postmetamorphen Stadium.** (A) Hellfeld eines 24h alten Primärpolyps. (B) *eGFP*-Expression in den Stolonen des Primärpolyps aus A.

Es sind I-Zellen und I-Zellderivate *eGFP*-markiert. Nach zwei Tagen zeigte sich, dass die *eGFP*-Expression nur transient war. In wenigen Zellen war die *eGFP*-Fluoreszenz noch in ekto- und endodermalen Epithelzellen eines Stolons sichtbar. In der weiteren Entwicklung zeigten auch diese Epithelzellen keine *eGFP*-Expression mehr. In weiteren Versuchen konnte erneut dieses Ergebnis der transient transgenen *HeEF1alpha-51ASActeGFP*-Expression mit einem Verlust der *eGFP*-Fluoreszenz während der Metamorphose bzw. nach wenigen Tagen im Polypen-Stadium gezeigt werden. Das Ergebnis konnte im Rahmen der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von Diana Gerards (2010) wiederholt beobachtet werden. In dieser Arbeit zeigte ein einziger Polyp im adulten Stadium von *Hydractinia* keine transiente, sondern eine persistent transgene Expression. Dieser exprimierte noch nach 19 Tagen stabil *eGFP* und auch in zwei von sechs entwickelten Sekundärpolypen konnte eine *eGFP*-Fluoreszenz in Zellen detektiert werden.

Die Analyse der *in vivo*-Studien des Reportergenkonstrukts *HeEF1alpha51ASActeGFP* belegt die ubiquitäre Expression von *HeEF1alpha* in *Hydractinia*. Es gibt erstmalig einen neuen Einblick in die komplexe Organisation und die Entwicklung des Nervensystems in der Larve (Künzel et al., 2010).

3.4.2 Die Verkürzung der stromaufwärts gelegenen 5`regulatorischen Region hat keinen Einfluss auf die Expression von *HeEF1alpha*

Eine Verkürzung der stromaufwärts gelegene 5`regulatorischen Region von *HeEF1alpha* im Expressionskonstrukt *HeEF1alpha51ASActeGFP* von 2948 bp auf 860 bp konnte *eGFP* erfolgreich treiben. Der einzige Unterschied des Deletionskonstrukts *HeEF1alpha(860 bp) 51ASActeGFP* zu dem unter 3.4.1 beschriebenen liegt in der kürzeren 5`regulatorischen Region von *HeEF1alpha* (s. Abb. 19). Diese verkürzte 5`regulatorischen Region wurde abweichend zu der unter 2.2.2.10.2 dargestellten Methode mithilfe eines 5`Oligonukleotids mit einer HindIII-Restriktionsstelle amplifiziert und dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten. In der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von Diana Gerards (2010) wurde die stromauf-

wärts gelegene 5`regulatorische Region von *HeEF1alpha* weiter auf eine Länge von 702 bp (Deletionskonstrukt *HeEF1alpha(702 bp)51ASActeGFP*) verkürzt (s. Abb. 19).

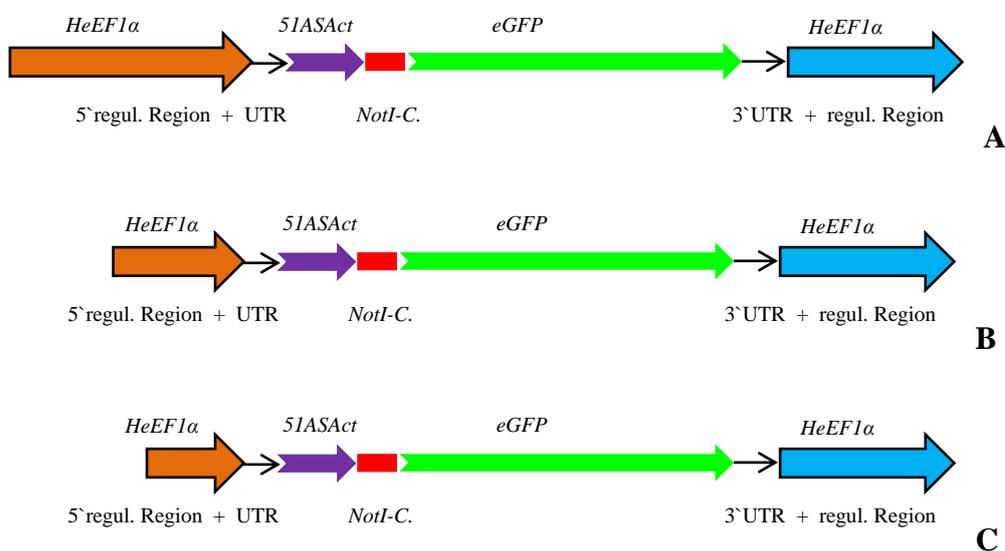


Abb. 19: Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts *HeEF1alpha51AS-ActeGFP* (A), der Deletionskonstrukte *HeEF1alpha(860 bp)51ASActeGFP* (B) und *HeEF1alpha(702 bp)51ASActeGFP* (C). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeEF1alpha* (*HeElongationsfaktor 1 alpha*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (*NotI-Cassette*).

Die Expressionsanalyse zeigt, dass diese Deletion keinen Einfluss auf die ubiquitäre *HeEF1alpha*-Expression hat. Die Expression wird von der verkürzten 5`regulatorischen Region in denselben Zelltypen wie von der längeren 5`regulatorischen Region des *HeEF1alpha* im Reportergenkonstrukt *HeEF1alpha51ASActeGFP* getrieben (Bachelorarbeit Diana Gerards, 2010).

3.5 Ein cDNA-Fragment zeigt eine Homologie zu Ubiquitin

In cDNA konnte mittels CODEHOP-Oligonukleotiden eine Teilsequenz des Homologs von Ubiquitin aus *Hydractinia* isoliert werden (Sequenz s. Anhang; 7.1.6.1). Die aus dieser Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt in einem Sequenzvergleich eine

Homologie zu Ubiquitin (s. Abb. 20). In diesem Proteinbereich sind 4 funktionelle Lysine an den AS-Positionen 16, 18, 22 und 37 lokalisiert. Weitere Ubiquitin-Moleküle können über diese Lysine kovalent gebunden und im Prozess der Poly-Ubiquitinierung zu Ubiquitin-Ketten geformt werden (Pickart und Fushman, 2004; Hicke et al., 2005). Die Proteinsequenz ist wie der Sequenzvergleich mit dem entsprechenden Bereich in anderen Ubiquitinen in Abb. 20 zu sehen, vollständig konserviert und zeigt, dass es sich bei diesem Teilfragment um das Homolog von Ubiquitin aus *Hydractinia* handelt.

```

HeUb   1-  TITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLI FAGKQLEDGRTLS  -46
HsUb   12- TITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLI FAGKQLEDGRTLS  -57
NvUb   12- TITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLI FAGKQLEDGRTLS  -57
MmUb   12- TITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLI FAGKQLEDGRTLS  -57
DmUb   12- TITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLI FAGKQLEDGRTLS  -57
*****

```

Abb. 20: Vergleich der Proteinsequenz des Ubiquitin-Teilfragments aus *Hydractinia* mit dem entsprechenden Bereich im Ubiquitin von ausgewählten Organismen. He (*Hydractinia echinata*), Ub (Ubiquitin), Hs (*Homo sapiens*; 751846A), Nv (*Nematostella vectensis*; XP_001640566), Mm (*Mus musculus*; CAA35999) und Dm (*Drosophila melanogaster*; AAA28997). Die Zahlen vor und nach der Aminosäuresequenz zeigt die Position im Protein an. In hellgrau markiert sind die funktionellen Lysine über die kovalent weitere Ubiquitin-Moleküle gebunden und die Ubiquitin-Ketten im Prozess der Poly-Ubiquitinierung geformt werden können (Pickart und Fushman, 2004; Hicke et al., 2005).

3.5.1 *HeUbiquitin* wird nicht ubiquitär, sondern keimblatt- und stadienspezifisch exprimiert

Die Analyse der *in situ*-Hybridisierung ergab eine regionale Expression des *HeUbiquitins* (*HeUb*) in adulten Polypen. Im adulten Gastrozoid ist die Expression ausschließlich in den ektodermalen Zellen lokalisiert wie in Abb. 21 (A-D) zu sehen. Die Expression im Gonozoid war ebenfalls nur auf die Zellen des Ektoderms begrenzt. In heranreifenden Gonophoren ist das Gen stärker exprimiert, wohingegen die Expression in reiferen Gonophoren deutlich schwächer ist (s. Abb. 21E). Die Expression in 72h alten Larven war nur auf die Zellen des Entoderms beschränkt (nicht gezeigt).

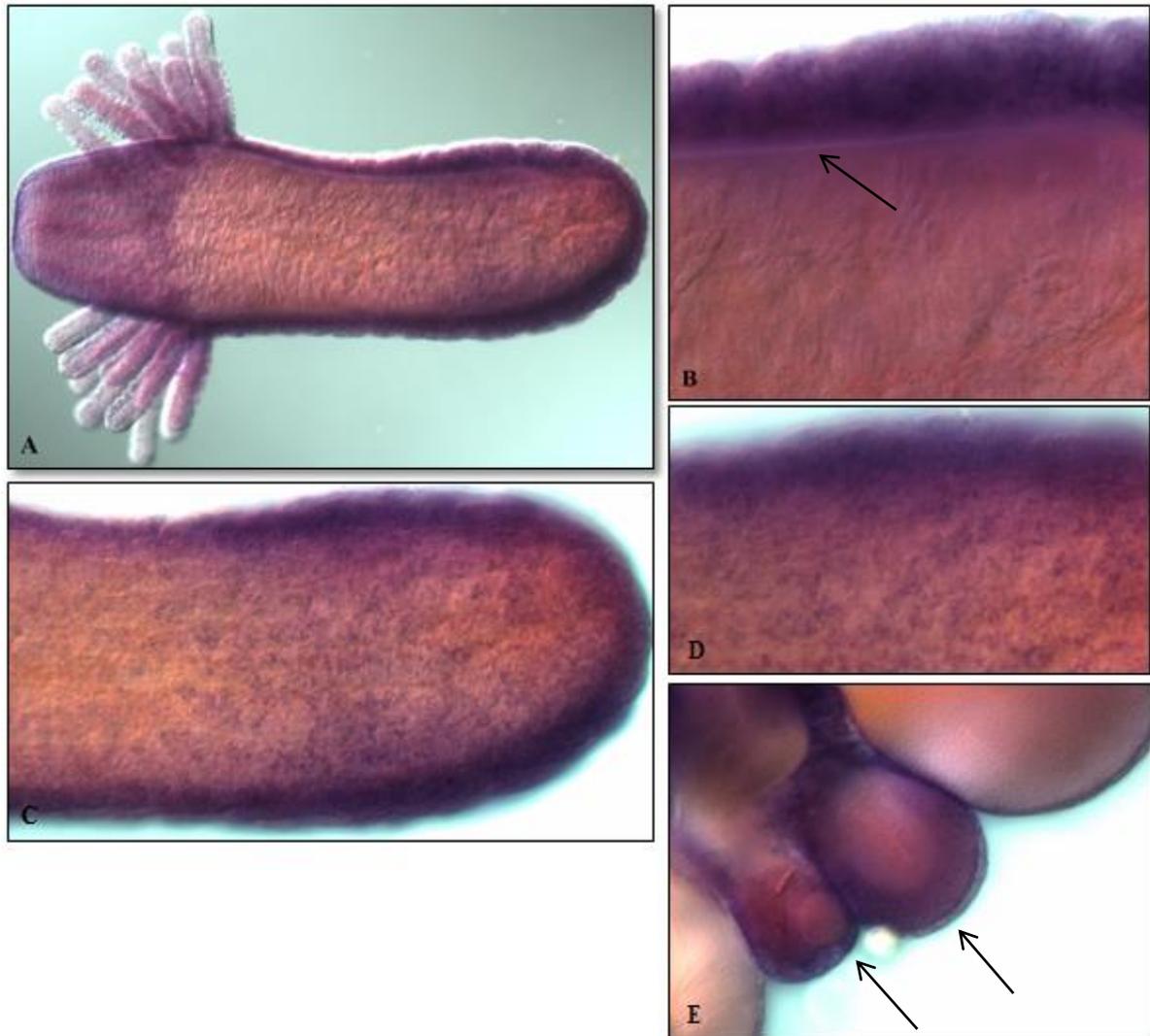


Abb. 21: Expression von *HeUbiquitin* im Ektoderm adulter Polypen. (A) Gesamtansicht eines Gastrozooids. (B) Detailaufnahme von A. Schwarzer Pfeil markiert die Mesogloea. (C) Teilansicht eines Gastrozooids. (D) Detailaufnahme von C. (E) Teilansicht eines männlichen Gonozooids. Schwarze Pfeile markieren heranreifende Gonophoren.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse zeigt, dass *HeUb* keimblatt- und stadienspezifisch, aber nicht ubiquitär in *Hydractinia* exprimiert wird.

3.6 Entwicklung einer Methode für die Funktionsanalyse von Proteinen in der Entwicklungskontrolle

3.6.1 Charakterisierung des Heß-Catenin-Homologs aus *Hydractinia*

In einer 5`-RACE-PCR wurde ausgehend von einer bekannten das 3`Ende enthaltenen *Heß-Catenin*-Teilsequenz (W. Tilmann, persönliche Mitteilung und Daten, 2008) das Gen *Heß-Catenin* (β -Cat) aus *Hydractinia* bis zum 5`-Ende verlängert. Das β -Cat konnte mit dieser neu gewonnenen 1892 bp langen Nukleinsäuresequenz vervollständigt werden und hat zusammengesetzt eine Gesamtsequenzlänge von 2764 bp (Sequenz s. Anhang; 7.1.7.1). Der 120 bp langen 5`untranslatierten Region folgt ein offenes Leseraster von 2445 bp. Dieses codiert für ein Protein mit einer Länge von 815 AS. Der 188 bp langen 3`untranslatierten Region folgt der Poly(A)-Schwanz bei nt 2754. Ein mögliches Polyadenylierungssignal (Beaudoing et al., 2000) ist an der Position nt 2744-2749 (W. Tilmann, persönliche Mitteilung und Daten, 2008) vorhanden (Sequenz s. Anhang; 7.1.7.1).

Das isolierte β -Catenin-Homolog aus *Hydractinia* zeigt, wie schematisch in Abb. 22 zu sehen, die drei kennzeichnenden konservierten Regionen, die als die N-terminale-, zentrale- und C-terminale Domäne bezeichnet werden (Miller und Moon, 1996; Akiyama, 2000).

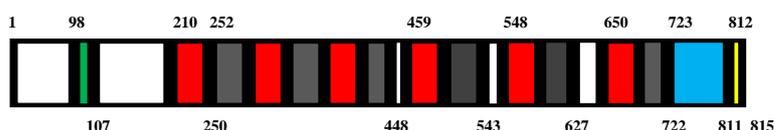


Abb. 22: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Heß-Cat. Die Zahlen kennzeichnen die Position der AS im Protein. In der N-terminalen Domäne ist die Phosphorylierungsstelle der GSK3 β grün markiert. Die ungeradzahlig nummerierten Armadillo-Repeats sind rot und die geradzahlig nummerierten Armadillo-Repeats sind dunkelgrau in der zentralen Domäne dargestellt. In der C-terminalen Domäne ist die TAD hellblau und das PDZ-Motiv gelb gekennzeichnet.

Die N-terminale Domäne enthält die für die Regulation der Stabilität von zytosolischem β -Catenin charakteristischen Sequenzmotive, die die sogenannte Phosphorylierungsstelle bilden (AS 98-107) (s. Abb. 23). Diese weist das Konsensusmotiv S/TxxxS/T (X: jede beliebige AS) zur Phosphorylierung durch die GSK3 β auf (Yost et al., 1996; Aberle et al., 1997). Dieses

zeigt in *Hydractina* und drei anderen Vertretern der Hydrozoa einen Unterschied zum GSK3 β -Phosphorylierungsmotiv der Vertebraten wie im Sequenzvergleich in Abb. 23 zu sehen. Die letzten vier AS des Motivs einschließlich der dritten Phosphorylierungsstelle der GSK3 β fehlen komplett. Die AS Serin (S107) an der letzten Position der Phosphorylierungsstelle wird durch die Kinase CKI α und/oder CKI ϵ phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist essentiell für die Phosphorylierung des Serins an Position 99 (S99) und des Threonins an Position 103 (T103) durch die GSK3 β (Huelsen und Behrens, 2002; Polakis, 2002). Innerhalb der Phosphorylierungsstelle befindet sich die Konsensussequenz DSG(X)_{2+n}S (X: jede beliebige AS) des Zerstörungsmotivs des β -transducin repeat containing protein (β TrCPs), das ein Teil eines Ubiquitin-Ligase-Komplex ist (Winston et al., 1999; Latres et al., 1999; Uchida et al., 2011). Dieses leitet die Ubiquitinierung des β -Catenins ein, sobald das S99 und das T103 des Konsensusmotivs durch die GSK3 β phosphoryliert sind. Die Bindung des β TrCPs bewirkt, dass das β -Catenin über das N-terminal vor dem Zerstörungsmotiv gelegene Lysin an der Position 84 (K84, s. Sequenz im Anhang; 7.1.7.1, Abb. 74) mit Ubiquitin für die Degradation im Proteasom verbunden wird (Aberle et al., 1997; Polakis, 2002; Wu et al., 2003; Xu et al., 2009). Die typische Konsensussequenz enthält ein Serin an der Position 6 des Zerstörungsmotivs. Es existieren Sequenzvarianten in denen das Motiv ein Threonin in der sechsten Position aufweist (Uchida et al., 2011; Silverman et al., 2012) wie im β -Catenin-Homolog aus *Hydractinia* und den drei Vertretern der Hydrozoa in der Abb. 23 zu sehen.

Hs β -Cat	32-	DSGIHSGAT	T	TAPS	-	45
Mm β -Cat	32-	DSGIHSGAT	T	TAPS	-	45
Bt β -Cat	32-	DSGIHSGAT	T	TAPS	-	45
Ch β -Cat	96-	DSGIQT		----	AAPS	-105
Pc β -Cat	98-	DSGIQT		----	AAPS	-107
Hv β -Cat	99-	DSGIQT		----	AAPS	-108
He β -Cat	98-	DSGIQT		----	AAPS	-107
		****	:	:	***	

Abb. 23: Vergleich der Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Domäne verschiedener Vertreter von β -Catenin mit der des He β -Cat. Hs (*Homo sapiens*; P35222), β -Cat (β -Catenin), Mm (*Mus musculus*; Q02248), Bt (*Bos taurus*; Q0VCX4), Ch (*Clytia hemisphaerica*; AFI99111), Pc (*Podocoryne carnea*; ABI74628), Hv (*Hydra vulgaris*; AAQ02885) und He (*Hydractinia echinata*). Die Zahlen vor und nach der Aminosäuresequenz zeigt die Position im Protein an. Die Sequenz des Phosphorylierungsmotivs der GSK3 β ist dunkelgelb dargestellt und die zu phosphorylierenden Serin- und Threonin-Reste sind gelb markiert. Das durch die Kinasen CKI α und/oder CKI ϵ zu phosphorylierende Serin ist rot gekennzeichnet. Die Sequenz des Zerstörungsmotivs des β TrCP ist rot unterstrichen.

Die zentrale Domäne enthält die charakteristischen 12 Armadillo-Repeats, die entscheidend für die Interaktion mit Proteinen sind. Die Armadillo-Repeats bestehen aus jeweils 3 α -Helices. Diese Helices formen eine Superhelix, die eine große positiv geladene Furche bildet. Die basische Furche interagiert mit sauren AS-Resten, die man in den β -Catenin-bindenden-Regionen der β -Catenin-interagierenden Proteine wie E-Cadherin, APC und der Tcf/Lef-Familie findet (Riggelman et al., 1989; Peifer et al., 1994; Rubinfeld et al., 1995; Orsulic et al., 1999; Akiyama, 2000). Die 12 potentiellen Armadillo-Repeats des β -Catenins-Homologs aus *Hydractinia* (Sequenz s. Anhang; 7.1.7.1, Abb. 74) wurden mithilfe der gut charakterisierten Armadillo-Repeats in den β -Catenin-Proteinsequenzen dreier Vertreter der Vertebraten (*Homo sapiens*; P35222; *Mus musculus*; Q02248 und *Bos taurus*; Q0VCX4) auf der Internetseite der Proteinsequenzdatenbank UniProt identifiziert. Die Armadillo-Repeats des putativen β -Catenins aus *Hydractinia* sind konserviert, wie der Sequenzvergleich in diesem Bereich der zentralen Domäne mit drei Vertretern der Vertebraten und zwei Hydrozoen im Anhang (s. Anhang; 7.1.7.2, Abb. 75) zeigt.

Im Anschluss an das 12. Armadillo-Repeat folgt in der C-terminalen Region die TAD, die entscheidend ist für die Aktivierung von Wnt-Zielgenen (Vlaminckx et al., 1999; Akiyama, 2000). Die letzten vier AS (812-815) des C-terminalen-Endes bilden das PDZ-Motiv (s. Abb. 24).

Hs β -Cat	778- DTDL -781
Bt β -Cat	778- DTDL -781
Mm β -Cat	778- DTDL -781
He β -Cat	812- DSDM -815
Pc β -Cat	809- ESDM -812
	: : * :

Abb. 24: Vergleich des PDZ-Motivs in der C-terminalen Domäne des He β -Cat mit dem in β -Cateninen aus ausgewählten Vertretern. Hs (*Homo sapiens*; P35222), β -Cat (β -Catenin), Bt (*Bos taurus*; Q0VCX4), Mm (*Mus musculus*; Q02248), He (*Hydractinia echinata*) und Pc (*Podocoryne carnea*; ABI74628). Die Zahlen vor und nach der Aminosäuresequenz zeigt die Position im Protein an. Die funktionell konservierten AS der Konsensussequenz X-S/T-X- Φ (X: jede beliebige AS; Φ : eine hydrophobe AS) des PDZ-Motivs sind rot markiert.

Das Bindungsmotiv für Proteine mit einer sogenannten PDZ-Domäne enthält die Konsensussequenz X-S/T-X- Φ (X: jede beliebige AS; Φ : eine hydrophobe AS). Dieses weist in

Hydractinia ebenso in *P.carnea* wie der Sequenzvergleich in Abb. 24 belegt, im Unterschied zu PDZ-Motiven der anderen Vertreter, in der vierten Position anstelle des Leucins ein Methionin auf (Songyang et al., 1997; Harris und Lim, 2001; Lee und Zheng, 2010; te Velthuis et al., 2011).

Die Sequenzvergleiche der konservierten funktionellen Motive sowie der kennzeichnende Aufbau belegen, dass das isolierte Gen das β -Catenin aus *Hydractinia* darstellt.

3.6.1.1 Mutagenese der Phosphorylierungsstellen des *He β -Cat*

Es ist aus Untersuchungen in der Tumorgenese bekannt, dass Punktmutationen im N-terminalen Bereich für die Phosphorylierung β -Catenin stabilisiert und dadurch einen konstitutiv aktiven Komplex mit Tcf/Lef bildet, dieser zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt (Aberle et al., 1997; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997).

In dieser Arbeit wurden die Phosphorylierungsstellen der Serin/Threoninkinase durch Punktmutationen verändert, um das β -Catenin zu stabilisieren. Es sollte dadurch vor Degradation im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg geschützt werden und so akkumulieren können, um im Zellkern konstitutiv aktiv zur Expression von Wnt-Zielgenen zu führen.

Die Punktmutationen in der Phosphorylierungsstelle wurden in der codierenden Nukleinsäuresequenz des Wildtyp *He β -Cat* (*He β -Cat^{wt}*) (nt 121-2565; Sequenz s. Anhang; 7.1.7.1) durch Mutagenese-Oligonukleotide in einer PCR eingeführt. In der translatierten Proteinsequenz des mutagenisierten *He β -Cat* (*He β -Cat^{mut.}*) sind die durch die GSK3 β zu phosphorylierende AS-Reste Serin (S99)- und Threonin (T103) und der durch die Kinasen CKI α und/oder CKI ϵ zu phosphorylierende Serin (S107)-Rest (Huelsen und Behrens, 2002; Polakis, 2002) gegen unpolare, aliphatische Alanin-Reste ausgetauscht, wie im Vergleich zu der im *He β -Cat^{wt}* in Abb. 25 zu sehen.

Heβ-Cat^{wt}	98-	DSGIQT	AAPS	-107
Heβ-Cat^{mut.}	98-	DAGIQ	AAPA	-107

Abb. 25: Vergleich der Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Domäne des Wildtyp *He β -Cat* mit der des mutagenisierten *He β -Cat*. He (*Hydractinia echinata*) He

(*Hydractinia echinata*), He β -Cat^{wt} (HeBeta-Catenin Wildtyp) und He β -Cat^{mut.} (HeBeta-Catenin mutagenisiert). Die Zahlen vor und nach der Aminosäuresequenz zeigt die Position im Protein an. Die Sequenz des Phosphorylierungsmotivs der GSK3 β ist dunkelgelb dargestellt. Im He β -Cat^{wt} sind der durch die GSK3 β zu phosphorylierende Serin- und Threonin-Rest gelb und der durch die Kinasen CKI α und/oder CKI ϵ zu phosphorylierende Serin-Rest ist rot markiert (Huelsen und Behrens, 2002; Polakis, 2002). Im He β -Cat^{mut.} sind diese AS-Reste gegen Alanin-Reste ausgetauscht und hellgrün gekennzeichnet. Die Sequenz des Zerstörungsmotivs des β TrCP ist im He β -Cat^{wt} rot unterstrichen. Das β TrCP wird im He β -Cat^{mut.} nicht dargestellt, da es aufgrund der Mutagenese potentiell nicht mehr funktionell bzw. als solches zu charakterisieren ist.

Dieses mutagenisierte β -Catenin soll mithilfe der regulatorischen Regionen des ubiquitär exprimierten *HeActII* in *Hydractinia* zur Expression gebracht werden, um eine Über- und/oder ektopische Expression zu bewirken. In allen in dieser Arbeit hergestellten Reporter-genkonstrukten wurden die 5`- und 3`regulatorischen Region des *HeActII* anstelle der des zweiten isolierten ubiquitär exprimierten Gens *HeEF1alpha* eingesetzt. Im Unterschied zum Transgen *HeEF1alpha51ASActeGFP* konnte beobachtet werden, dass das Transgen unter der Kontrolle vom *HeActII* eine Stunde früher und auch häufig im adulten Stadium persistent transgen exprimiert wurde (Bachelorarbeit Diana Gerards, 2010). Dies ermöglicht die Funktionsanalyse von Proteinen im embryonalen, larvalen und aber auch im postmetamorphen Stadium von *Hydractinia*. Dafür wurden verschiedene Varianten von Überexpressionskonstrukten eingesetzt und untersucht, wie in den Versuchen nachfolgend beschrieben.

3.6.1.1.1 eGFP wird als carboxyterminales Fusionsprotein von mutagenisiertem β -Catenin nicht exprimiert

Das *He β -Cat^{mut.}* soll unter der Kontrolle der regulatorischen Regionen des *HeActII* in *Hydractinia* zur Expression gebracht werden. Das Reporterkonstrukt *HeActII51ASActeGFP* (s. 3.3.3) wird für diesen Zweck als Ursprungskonstrukt eingesetzt. Im Unterschied zum *HeActII51ASActeGFP* ist im *HeActIIHe β -Cat^{mut.}eGFP* (Sequenz s. Anhang; 7.3.1.1) die 5`regulatorische Region des *HeActII* im Leserahmen mit dem codierenden Bereich von *He β -Cat^{mut.}* fusioniert mit der *NotI-Klonierungskassette* und dem *eGFP*, gefolgt von der 3`regulatorischen Region des *HeActII* (s. Abb. 26).



Abb. 26: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts *HeActIIHeβ-Cat^{mut.}eGFP*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *Heβ-Cat^{mut.}* (*HeBeta-Catenin* mutagenisiert), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (*NotI-Cassette*).

Es konnte mit dem Reporterergenkonstrukt *HeActII51ASActeGFP* *in vivo* bereits nachgewiesen werden, dass die 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeActII* in *Hydractinia* funktionell sind, wie unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Dagegen wurde in keinem Entwicklungsstadium von *Hydractinia* *HeActIIHeβ-Cat^{mut.}eGFP*-exprimierende Transgene identifiziert. Es waren weder eGFP-markierte Zellen erkennbar noch wurden während der Entwicklung zur Planularlarve ersichtliche Auffälligkeiten beobachtet. Die Versuchstiere hatten nach 72h ihre charakteristische Morphologie entwickelt.

Das Überexpressionskonstrukt *HeActIIHeβ-Cat^{mut.}eGFP* konnte demnach kein funktionelles Reporterfusionsprotein *Heβ-Cat^{mut.}eGFP* erzeugen.

3.6.1.1.2 Die ektopische Expression des *Heβ-Cat^{mut.}* mithilfe des Separator Polypeptids 2A führt zu keinen morphologischen Veränderungen in *Hydractinia*

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Reporterfusionsprotein *Heβ-Cat^{mut.}NotI-C.eGFP* weder grün leuchtet noch Anhaltspunkte für eine Funktionalität des mutierten β -Catenins lieferte. Um eine potentielle Ursache dafür, wie etwa eine Missfaltung des Fusionsproteins in der Proteinbiosynthese zu vermeiden, wurde ein neuer Ansatz untersucht um das *Heβ-Cat^{mut.}* ungebunden vom eGFP funktionell aktiv in der Zelle zu haben. Dafür wurde die Nukleinsäuresequenz, die für das Separator Polypeptid 2A codiert, im Leserahmen zwischen das *eGFP* und das *Heβ-Cat^{mut.}* fusioniert. Das 2A-Peptid ist 18-22 AS lang und wurde zuerst von Ryan et al. (1991) im Maul- und Klauenseuche-Virus (*foot-and-mouth disease virus*; FMDV), einem Mitglied des Picornavirus, identifiziert. Die Bezeichnung 2A bezieht sich auf eine spezifische Region in Polyproteinen des Picornavirus und entstand aus

der systematischen Nomenklatur. Die Spaltung des 2A erfolgt in den beiden letzten AS des C-Terminus (Ryan et al., 1991; Kim et al., 2011). Entgegen der früheren Vermutung der Spaltung durch eine Proteinase (Ryan et al., 1991) zeigten die neusten Untersuchungen, dass der Mechanismus dieser Spaltung keine proteolytische Reaktion, sondern ein neuartiger translationaler Effekt, einem mutmaßlichen ribosomalen „Überspringen“ („*skip*“) ist (Donnelly et al., 2001). Das Ribosom überspringt die Synthese der Glycyl-Prolyl-Peptidbindung am C-Terminus des Peptids 2A und dieses führt zur Spaltung zwischen dem 2A-Peptid und dem unmittelbar nachgeschalteten Peptid. Daraus resultierend hat das stromabwärts abgespaltete Peptid das Prolin an seinem N-Terminus (Donnelly et al., 2001; de Felipe et al., 2010; Kim et al., 2011).

Mithilfe der Überexpressionskonstrukte *HeActIIPrGFP2ARas2HeActIITerm* und *HeActIIPr-5IASAct2AGFPHeActIITerm* konnte gezeigt werden, dass 2A funktionell ist in *Hydractinia* (persönliche Mitteilung W. Tilmann, 2010). Das *HeActIIPrGFP2ARas2HeActIITerm* diente als Ursprungskonstrukt (Dr. R. Heiermann und W. Tilmann, persönliche Mitteilung und Daten, 2010) für das nachfolgend beschriebenen Überexpressionskonstrukt *HeActIIeGFP-2AHeβ-Cat^{mut.}* (Sequenzen s. Anhang; 7.3.1.3.1). In diesem flankieren die 5`- und 3`regulatorischen Regionen des ubiquitär exprimierten *HeActII* das Reporterfusionsgen bestehend aus *Heβ-Cat^{mut.}*, 2A und *eGFP*. Der 5`regulatorischen Region folgt im Leserahmen das *eGFP* mit dem 2A vor dem stromabwärts gelegenen *Heβ-Cat^{mut.}* (s. Abb. 27).

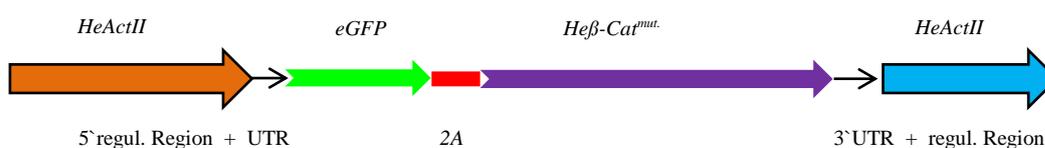


Abb. 27: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts *HeActIIeGFP2A-Heβ-Cat^{mut.}*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *Heβ-Cat^{mut.}* (*HeBeta-Catenin* mutagenisiert), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und 2A (Bez. bezieht sich auf eine spezifische Region in Polyproteinen des Picornavirus und entstand aus der systematischen Nomenklatur, die von Wissenschaftlern verabschiedet wurde).

Es konnten bei der Analyse der Versuchstiere vereinzelt eGFP-markierte Zellen detektiert werden (nicht gezeigt). Die *HeActIIeGFP2AHeβ-Cat^{mut.}*-exprimierenden Transgene zeigten

augenscheinlich keine morphologischen Veränderungen in der Entwicklung hin zur Larve. Nach 72h hatten die Versuchstiere die typische Gestalt der Planularlarve ausgebildet.

Der Einsatz des selbst-spaltenden Polypeptid 2A hatte keinen ersichtlichen Effekt auf die Proteinsynthese eines funktionsfähigen Fusionsproteins eGFP2AHeß-Cat^{mut}. Das Überexpressionskonstrukt *HeActIIeGFP2AHeß-Cat^{mut}* konnte trotz der nachgewiesenen eGFP-Fluoreszenz mithilfe des 2A kein funktionelles Reporterfusionsprotein erzeugen, das in *Hydractinia* morphologische Veränderungen bewirkt.

3.6.1.1.3 Das Reporterfusionsprotein *eGFPHeß-Cat^{mut}* führt zu wesentlichen Umgestaltungen der charakteristischen Morphologie des Polypen

In den zuvor beschriebenen Studien wurde gezeigt, dass die Reporterfusionsproteine Heß-Cat^{mut}NotI-C.eGFP und eGFP2AHeß-Cat^{mut} offenbar nicht funktionell waren. Wie im Folgenden beschrieben, wurde daher ein neuer Ansatz konzipiert. Diesmal wurde das *eGFP* mit dem N-Terminus des analytischen Gens fusioniert. Es konnte nämlich bereits anhand des Überexpressionsgenkonstrukts *HeActIIPrGFPRas2HeActIITerm* gezeigt werden, dass das Reporterfusionsprotein eGFPRas2, bestehend aus einem eGFP N-terminal vor dem analytischen Protein HeRas2, funktionell ist (persönliche Mitteilung W. Tilmann, 2011). Das *HeActIIPrGFPRas2HeActIITerm* diente als Ursprungskonstrukt (W. Tilmann, persönliche Mitteilung und Daten, 2011) für das nachfolgend beschriebene Überexpressionskonstrukt *HeActIIeGFPHeß-Cat^{mut}* (Sequenz s. Anhang; 7.3.1.2). In diesem folgt der 5`regulatorische Region des *HeActII* im Leserahmen das vor dem codierenden Bereich von *Heß-Cat^{mut}* stromaufwärts gelegene *eGFP*, fusioniert mit der 3`regulatorischen Region des *HeActII* (s. Abb. 28).

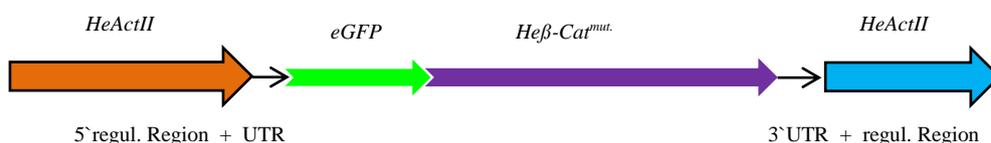


Abb. 28: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts *HeActIIeGFPHeß-Cat^{mut}*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), *Heß-Cat^{mut}* (*HeBeta-Catenin* mutagenisiert), regul. Region (regulatorische Region) und UTR (untranslatierte Region).

In 24h alten Embryonen konnten vereinzelt *HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}*-transgene Versuchstiere anhand der *eGFP*-markierten Zellen identifiziert werden. Die *eGFP*-Fluoreszenz war in diesem Embryonalstadium (s. Abb. 29B) und auch in der weiteren Entwicklung mosaikartig in den Transgenen verteilt. Die Versuchstiere entwickelten sich ohne ersichtliche morphologische Veränderungen bis ins Stadium der Planularlarve. In diesem Entwicklungsstadium nach 72h zeigten sie ihre typische morphologische Gestalt, wie exemplarisch an der *HeActII-eGFPHeβ-Cat^{mut.}*-exprimierenden Larve in Abb. 29D dargestellt ist.

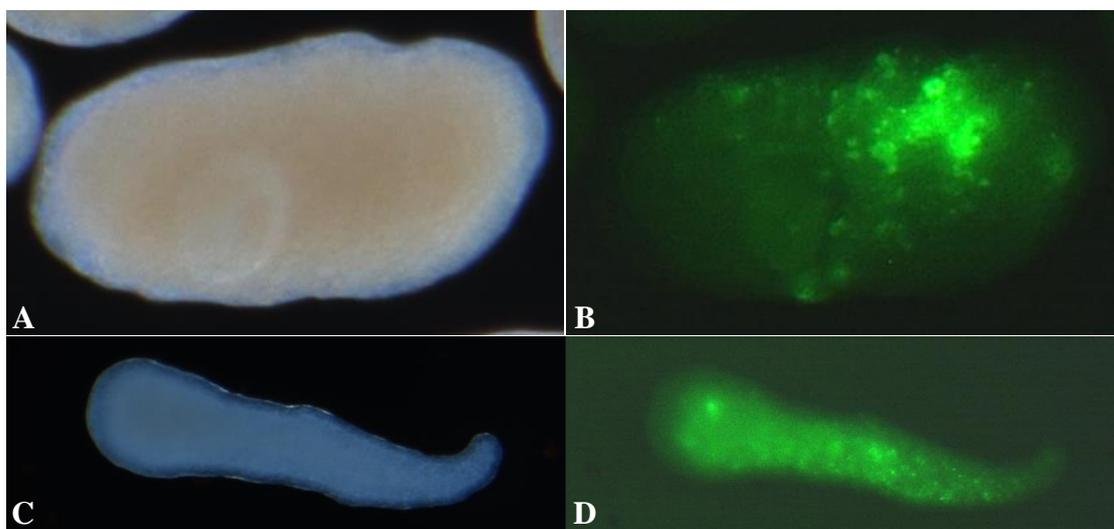


Abb. 29: Expressionsanalyse transgener *HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}*-*Hydractinia*. (A) Hellfeld-Aufnahme von 24h altem Embryo. (B) *eGFP*-Fluoreszenz-Aufnahme zu (A). Mosaikartige Verteilung der *eGFP*-Expression. (C, D) Hellfeld- und *eGFP*-Fluoreszenz-Aufnahme einer normal entwickelten 72h alten Planularlarve mit *eGFP*-markierten Zellen.

Die Expression des Transgens *HeActIIeGFPHeβ-Cat^{mut.}* war transient in den Larven. Nach der Metamorphose konnte bei fast allen Tieren keine *eGFP*-Fluoreszenz beobachtet werden. In zwei Transgenen konnten im Polypen-Stadium *eGFP*-exprimierende Zellen detektiert werden. Bei der Analyse der Versuchstiere fielen Polypen auf, die Veränderungen in der charakteristischen Morphologie aufwiesen. Es wurden unterschiedliche Morphe identifiziert, die stets Ausbildung der Kopf- und Tentakelregion betrafen sowie zusätzliche ektopische Tentakel- und Polypenanlagen in der Körpersäule entwickelten. Dabei traten morphologische Veränderungen bei Polypen mit und ohne *eGFP*-Expression auf. In den Polypen mit *eGFP*-Fluoreszenz (Klon I und II) konnte eine mosaikartige Verteilung der *eGFP*-exprimierenden

Zellen im gesamten Polypen sowie in den Stolonen beobachtet werden. Die Tiere zeigten eine Veränderung in der Tentakelregion. In dieser sind die Tentakel, abweichend von der typischen Anlage, unsymmetrisch und zufällig angeordnet (Abb. 30 A, C).

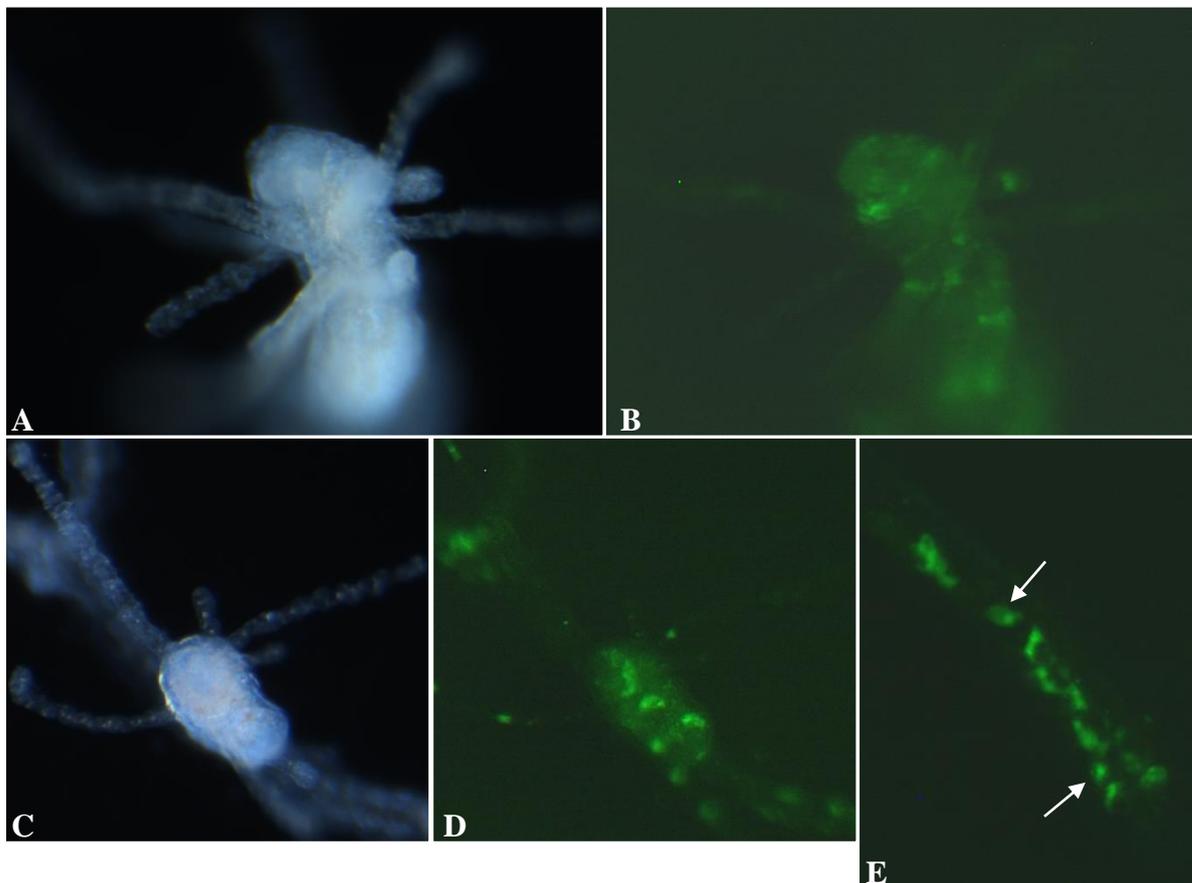


Abb. 30: Dokumentation der morphologischen Veränderungen in *HeActII-eGFPHeβ-Cat^{mut}*-exprimierenden transgenen Polypen von Klon I und II . (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme von Klon I. Unsymmetrische Anordnung (A, B) der Tentakel in der Tentakelregion. (C, D) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme von Klon II. Tentakel unsymmetrisch ausgebildet in der Tentakelansatzregion (E) *eGFP*-exprimierende Zellen im Stolon von Klon II. Das Fusionsprotein *eGFPHeβ-Cat^{mut}* ist im Zytosol der Epithelzellen (s. weiße Pfeile) lokalisiert.

Im Stolon von Klon I konnten vermehrt *HeActII-eGFPHeβ-Cat^{mut}*-exprimierende Epithelzellen identifiziert werden (s. Abb. 30E). In diesen ist das Fusionsprotein *eGFPHeβ-Cat^{mut}* über das gesamte Zytosol der Zelle (s. weiße Pfeile) verteilt.

Im Polypen des Klon III konnten keine *eGFP*-exprimierenden Zellen detektiert werden. Im unteren Drittel der Körpersäule entwickelte sich eine Knospe mit zwei ektopischen kleinen

Tentakeln (s. rote Pfeilspitzen in Abb. 31A). Unterhalb der Tentakelregion im Kopfbereich des Polypen konnte die Ausbildung von unsymmetrisch angeordneten Tentakeln beobachtet werden (s. weiße Pfeilspitzen in Abb. 31A). In etwa der Mitte der Körpersäule war eine Anlage für einen weiteren ektopischen Tentakel auffällig (s. roter Pfeil in Abb. 31, A und B). Zwei Tage später waren die Tentakel weiter ausgewachsen und ein weiterer dritter Tentakel war hinzugekommen (weißer Pfeil in Abb. 31B). Unterhalb der regulären Tentakelregion war ein ektopischer Tentakel mit einer Verzweigung vorhanden (gelber Pfeil in Abb. 31B).

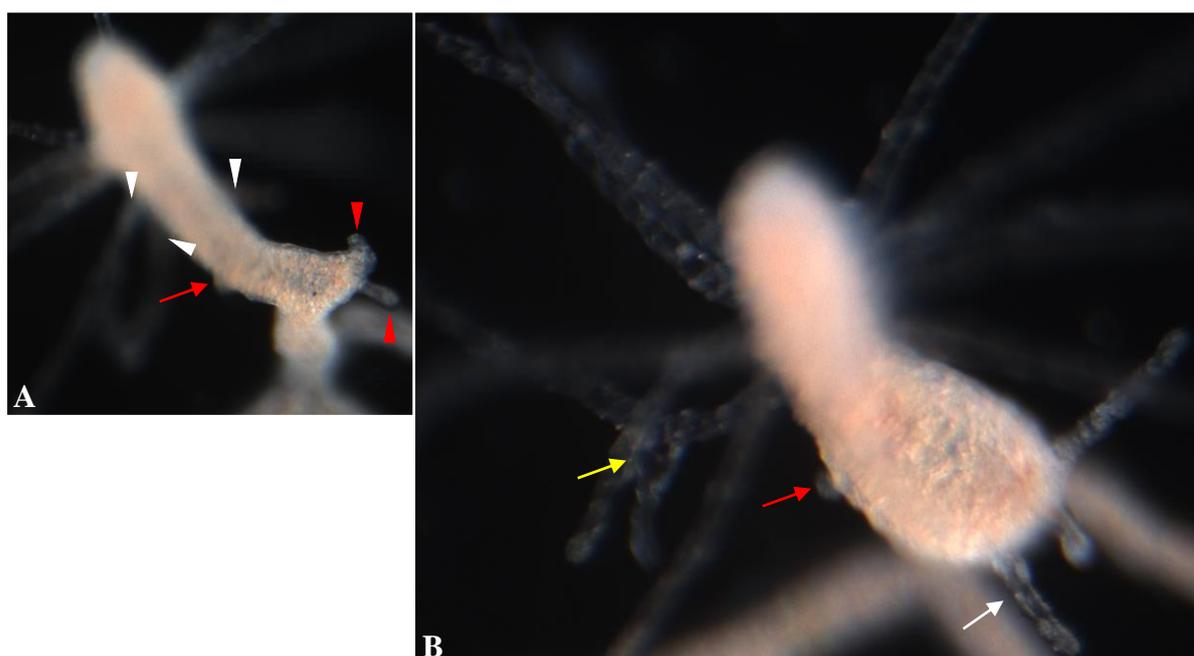


Abb. 31: *HeAct11eGFPHeß-Cat^{mut}*-Expression im transgenen Polypen Klon III. (A) Anlage einer ektopischen Körperachse mit zwei apikalen kleinen Tentakeln (rote Pfeilspitzen) im unteren Drittel der Körpersäule des Ausgangspolypen. Unsymmetrische Anordnung der Tentakel unterhalb der Tentakelregion (weiße Pfeilspitzen). Anlage eines ektopischen Tentakels roter Pfeil (A und B) etwa mittig in der Körpersäule. (B) Detail der als Seitenachse ektopischen Bildung, nach zwei Tagen. Die Tentakel haben an Länge zugenommen und ein weiterer Tentakel (weißer Pfeil) ist entstanden. Ein Tentakel unterhalb der Tentakelregion des Ausgangspolypen zeigte eine Verzweigung (gelber Pfeil).

In einer kleinen Polypenkolonie bestehend aus drei Polypen konnten zwei unterschiedliche Typen von Morphen beobachtet werden. Es wurden vereinzelt eGFP-exprimierende Zellen in den Polypen detektiert. Der Ansatzpolyp (aus einer transgenen Larve hervorgegangen) entwickelte im Zuge der Metamorphose einen lateral verzweigten Primärpolypen. Die zusätz-

liche Körperachse entstand im unteren Drittel der Körpersäule und bestand aus einem vollständig entwickelten Polypen-Oberteil mit Körpersäule, Kopf- und Tentakelregion. (weißer Pfeil in Abb. 32A). Der erste Sekundärpolyp wurde als „Doppelkopf-Polyp“ gebildet. Dieser besaß auf einer einzigen Körperachse zwei Köpfe (s. rote Pfeile in Abb. 32B), die jeweils ein Hypostom mit Tentakelregion entwickelt hatten. Zusätzlich waren mehrere ektopische Tentakel (weißer Pfeil in Abb. 32B) ausgebildet. Ein weiterer Sekundärpolyp zeigte keine ersichtlichen morphologischen Veränderungen.

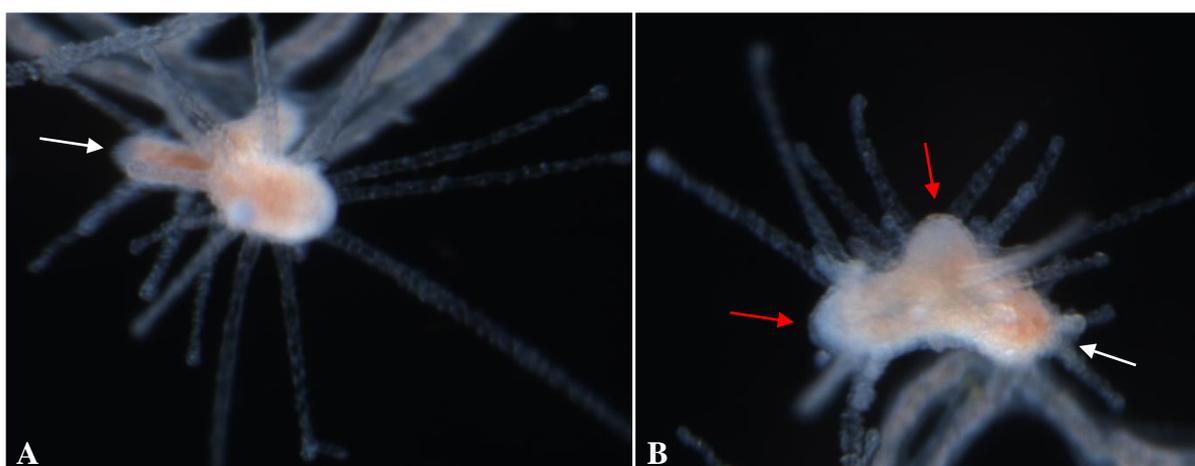


Abb. 32: Morphologische Veränderungen nach Expression von *HeAct11eGFPHeß-Cat^{mut.}* in transgener Polypenkolonie. (A) Ansatzpolyp mit lateraler Doppelachsbildung, Kopf- und Tentakelregion der Seitenachse (weißer Pfeil) im unteren Drittel der Körpersäule des Ausgangspolypen. (B) Der erste, auf Stolonen entstandene Sekundärpolyp ist ein „Doppelkopf-Polyp“, der eine Körpersäule mit zwei apikalen Köpfen (rote Pfeile) besaß. Jeder Kopf hatte ein Hypostom und eine Tentakelregion ausgebildet. Der weiße Pfeil markiert einen Körperbereich mit zusätzlichen ektopischen Tentakeln

Eine transgene Expression des Reporterkonstrukts *eGFPHeß-Cat^{mut.}* hatte keinen ersichtlichen Effekt auf die Embryonalentwicklung zur reifen Larve. In den beobachteten Fällen zeigte sich nach 72h die charakteristische Morphologie der Planula von *Hydractinia*. Im Verlauf der Metamorphose von der larvalen zur postmetamorphen Gestalt erfolgten wesentliche morphologische Veränderungen in der typischen Körperform des adulten Polypen von *Hydractinia*. Diese Änderungen treten in der beobachteten Form auch nach Injektionen natürlicherweise nicht auf und müssen in der Expression des Konstrukts begründet sein.

3.6.2 Beschreibung des Homologs von Goosecoid aus *Hydractinia*

Aus cDNA konnte mittels PCR mit degenerierten Primern und 5'- und 3'-RACE-PCRs ein Klon voller Länge von *HeGoosecoid* (*HeGsc*) bestimmt werden. Die zusammengesetzte Nukleinsäuresequenz hat eine Länge von 1273 bp (Sequenz s. Anhang; 7.1.8.1). Der 310 bp langen 5'-untranslatierten Region schließt sich ein offenes Leseraster von 876 bp an, dass für ein Protein mit 292 AS codiert. Die 74 bp lange 3'-untranslatierten Region ist ab nt 1260 polyadenyliert und weist mögliche Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) an den Positionen nt 1209-1214 und 1245-1250 (Sequenz s. Anhang; 7.1.8.1) auf.

Das Protein aus *Hydractinia* weist die zwei für Goosecoid-Homologe typischen konservierten Regionen auf und ist schematisch in Abb. 33 dargestellt. Im N-terminalen Bereich befindet sich ein konserviertes Sequenzmotiv, das als sogenannte eh1/GEH-Domäne bezeichnet wird. Dieses konservierte Heptapeptid mit der Konsensussequenz FSIDNIL hat eine Funktion als Repressordomäne (Smith und Jayne, 1996; Jiménez et al., 1997, 1999; Mailhos et al., 1999).

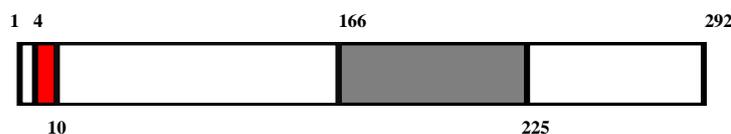


Abb. 33: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des HeGsc. Die Zahlen kennzeichnen die Position der AS im Protein. Die eh1/GEH-Domäne ist rot und die Homöodomäne grau dargestellt.

In der eh1/GEH-Domäne des HeGsc sind vier AS (1, 3, 5 und 7) des Heptapeptids konserviert. Dies wird im Sequenzvergleich mit den verschiedenen Vertretern der Gsc-Proteine in Abb. 34 dargestellt.

```

MmGsc      1- MPASMFSIDNILA -13
SsGsc      1- MPASMFSIDNILA -13
XlGsc      1- MSPGMFSIDNILA -13
HeGsc      1- --MSSFFLIKNLLN -11
HvGsc      1- --MSSFLMENILK -11
CiGsc      1- -MSLQFSIDNILG -12
           *  : . * : *

```

Abb. 34: Proteinsequenzvergleich der eh1/GEH-Domäne im N-terminalen Bereich ausgewählter Vertreter von Goosecoid mit der entsprechenden Region des HeGsc. Mm (*Mus musculus*; NP_034481.1), Gsc (Goosecoid), Ss (*Sus scrofa*; XP_003482361.1), Xl (*Xenopus laevis*; P29454), Hv (*Hydra vulgaris*; AAF14575), He (*Hydractinia echinata*) und Ci (*Ciona intestinalis*; NP_001071728.1). Die Zahlen vor und nach der Aminosäuresequenz zeigt die Position im Protein an. Die eh1/GEH-Domäne ist rot dargestellt.

Der zweite konservierte Bereich von Gsc ist die Homöodomäne, in der auch in *Hydractinia* das für Proteine der Prd-Homöobox-Familie charakteristische konservierte Lysin an Position 50 (K50) vorhanden ist (Frigerio et al., 1986; Schneitz et al., 1993; Wilson et al., 1993) (Abb. 35). Ausserhalb der Homöodomäne weisen die Mitglieder der Gsc-Proteinfamilie nur wenig Ähnlichkeit auf (nicht gezeigt).

```

MmGsc      160- KRRHRTIFTDEQLEALENLFQETKYPDVGTREQLARKVHLREEKVEVWFKNRRAKWRRQK -219
SsGsc      160- KRRHRTIFTDEQLEALENLFQETKYPDVGTREQLARKVHLREEKVEVWFKNRRAKWRRQK -219
XlGsc      148- KRRHRTIFTDEQLEALENLFQETKYPDVGTREQLARRVHLREEKVEVWFKNRRAKWRRQK -207
HeGsc      166- RRRHRTIFSDEQLQLLERMFSQTHYPDVLMLREKIAQIINLTEEKVEVWFKNRRARWRKQK -225
HvGsc      139- KRRHRTIFSDEQLNVLERLRFNKTHYPDVIVREEVAGIINLTEEKVEVWFKNRRARWRKQK -198
CiGsc      126- KRRHRTIFTEDQLEALENMFQKTHYPDVVMREQLAEKVELKEERVEVWFKNRRAKWRRQK -185
           :*****::** : ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Abb. 35: Sequenzvergleich der Homöodomäne ausgewählter Vertreter von Goosecoid mit der des HeGsc. Mm (*Mus musculus*; NP_034481.1), Gsc (Goosecoid), Ss (*Sus scrofa*; XP_003482361.1), Xl (*Xenopus laevis*; P29454), Hv (*Hydra vulgaris*; AAF14575), He (*Hydractinia echinata*) und Ci (*Ciona intestinalis*; NP_001071728.1). Die Zahlen vor und nach der Aminosäuresequenz zeigt die Position im Protein an. Das konservierte Lysin (K50) in der HD ist rot gekennzeichnet.

3.6.2.1 HeGsc wird regional- und zelltypspezifisch in den apikalen sensorischen Nervenzellen von Larve und Polyp exprimiert

Um einen Einblick und Zugang zur möglichen Funktion des *HeGsc* in *Hydractinia* zu erhalten, wurde die Expression mittels *in situ*-Hybridisierung und *in vivo*-Expressionsstudien in

der Embryonalentwicklung bis zum postmetamorphen Stadium untersucht. *HeGsc* ist in Gastrozoiden in der apikalen Region des Hypostoms (Abb. 36, A und B) sowie in einzelnen Zellen der Tentakel exprimiert (s. Abb. 36C). *HeGsc*-Expression war auf Zellen der Epidermis beschränkt.

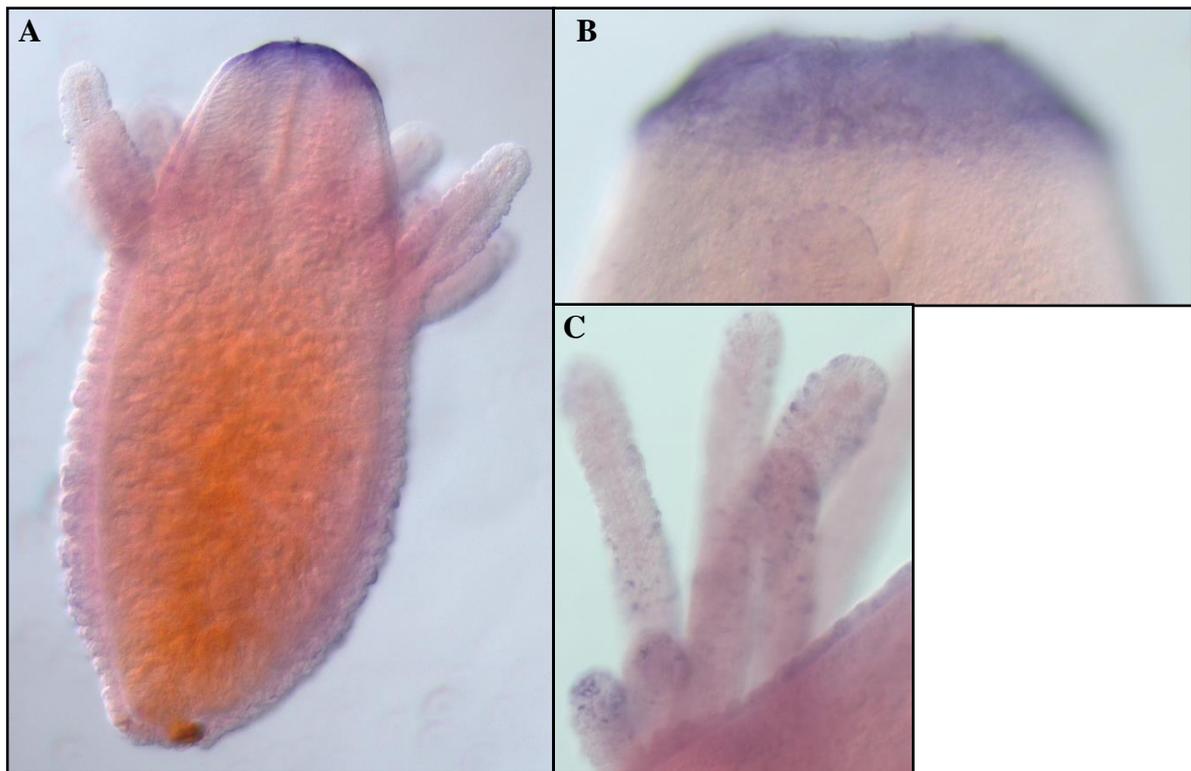


Abb. 36: Expression von *HeGsc* im Ektoderm des Gastrozoids. (A) Gesamtansicht. (B) Detailaufnahme in der apikalen Region des Hypostoms. (C) Teilansicht der Tentakelregion.

Die Auswertung der *in situ*-Hybridisierung erbrachte keine Erkenntnisse zur spezifischen Expression bzw. der Funktion von *HeGsc* in der Embryonalentwicklung von *Hydractinia*. Diese Fragestellung wurde daher durch *in vivo*-Expressionsstudien des Reportergens *eGFP* unter Kontrolle der 5'- und 3'-regulatorischen Regionen von *HeGsc* weiter untersucht. Aus genomischer DNA von *Hydractinia* wurden die Teilbereiche der 5'- und 3'-regulatorischen Regionen sowie der gesamte codierende Bereich des *HeGsc* isoliert (Sequenz s. Anhang; 7.1.8.2). In der 5'-regulatorischen Region ist eine mögliche TATA-Box mit dem Sequenzmotiv TATAAATA (nt 3605-3612) im charakteristischen Abstand stromaufwärts zum potentiellen Transkriptionsstart (nt 3634) vorhanden (Bucher, 1990; Patikoglou et al., 1999). Weitere bekannte

regulatorische Kontrollelemente der Gentranskription konnten nicht identifiziert werden. Im 3`nicht-translatierten Bereich der 3`regulatorischen Region können vom Translationsstopcodon bis zum potentiellen Polyadenylierungsstartpunkt zwei potentielle Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) an den Positionen nt 6537-6542 und 6573-6578 (Sequenz s. Anhang; 7.1.8.2) lokalisiert werden.

Die Funktionalität der 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeGsc* wurden anhand der beiden Reportergenkonstrukte *HeGscHeGsc^{gDNA}eGFP* und *HeGscceGFP* (Sequenzen s. Anhang; 7.2.5.1 und 7.2.5.2) untersucht. Dabei konnte mit dem Genkonstrukt *HeGscceGFP* *in vivo* der Nachweis erbracht werden, dass die isolierten 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeGsc* funktionell sind. In diesem Konstrukt flankieren die 5`- und 3`regulatorischen Regionen das Reportergen *eGFP* (s. Abb. 37). Eine Expression des Reporterkonstrukts *HeGscHeGsc^{gDNA}eGFP* konnte dagegen nicht festgestellt werden, da Transgene keinerlei *eGFP*-Fluoreszenz entwickelten. Im Unterschied zum *HeGscceGFP* enthält dieses Konstrukt im Leserahmen des GFP vorgeschaltet die proteinkodierende genomische Sequenz einschließlich Introns von *HeGSC* sowie die *NotI*-Klonierungskassette. Der proteincodierenden Sequenz von *eGFP* ist der 3`regulatorische des *HeGsc* angefügt (s. Abb. 37).

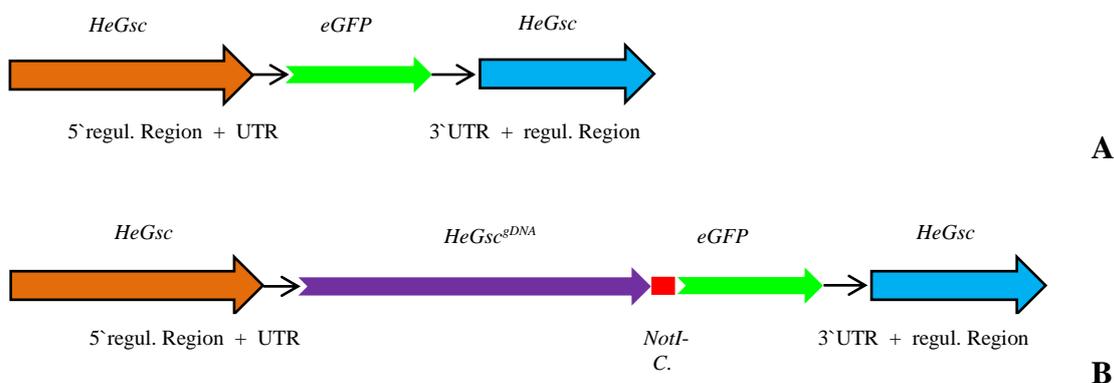


Abb. 37: Schema des Genkonstrukts *HeGscceGFP* (A) und *HeGscHeGsc^{gDNA}eGFP* (B). *HeGsc* (*HeGoosecoid*), *HeGsc^{gDNA}* (*HeGsc* codierende genomische DNA), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI*-C. (*NotI*-Cassette).

In 24h alten Embryonen konnten transgene Versuchstiere anhand der *eGFP*-Fluoreszenz erkannt werden. Die *eGFP*-exprimierenden Zellen waren in diesem Stadium (s. Abb. 38A) und im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung bis ins Larvenstadium mosaikartig ver-

teilt zu beobachten. Im Stadium der Planularlarve waren eGFP-markierte Zellen in der gesamten Larve zu beobachten. In der apikalen Region der Larve konnten als differenzierte Zellen sensorische Nervenzellen identifiziert werden, die *eGFP*-exprimierten (Abb. 38D, weiße Pfeilspitzen). Neben den sensorischen Nervenzellen waren in Embryonen und Larven transgene Zellen vorhanden, die sich nicht typisieren liessen.

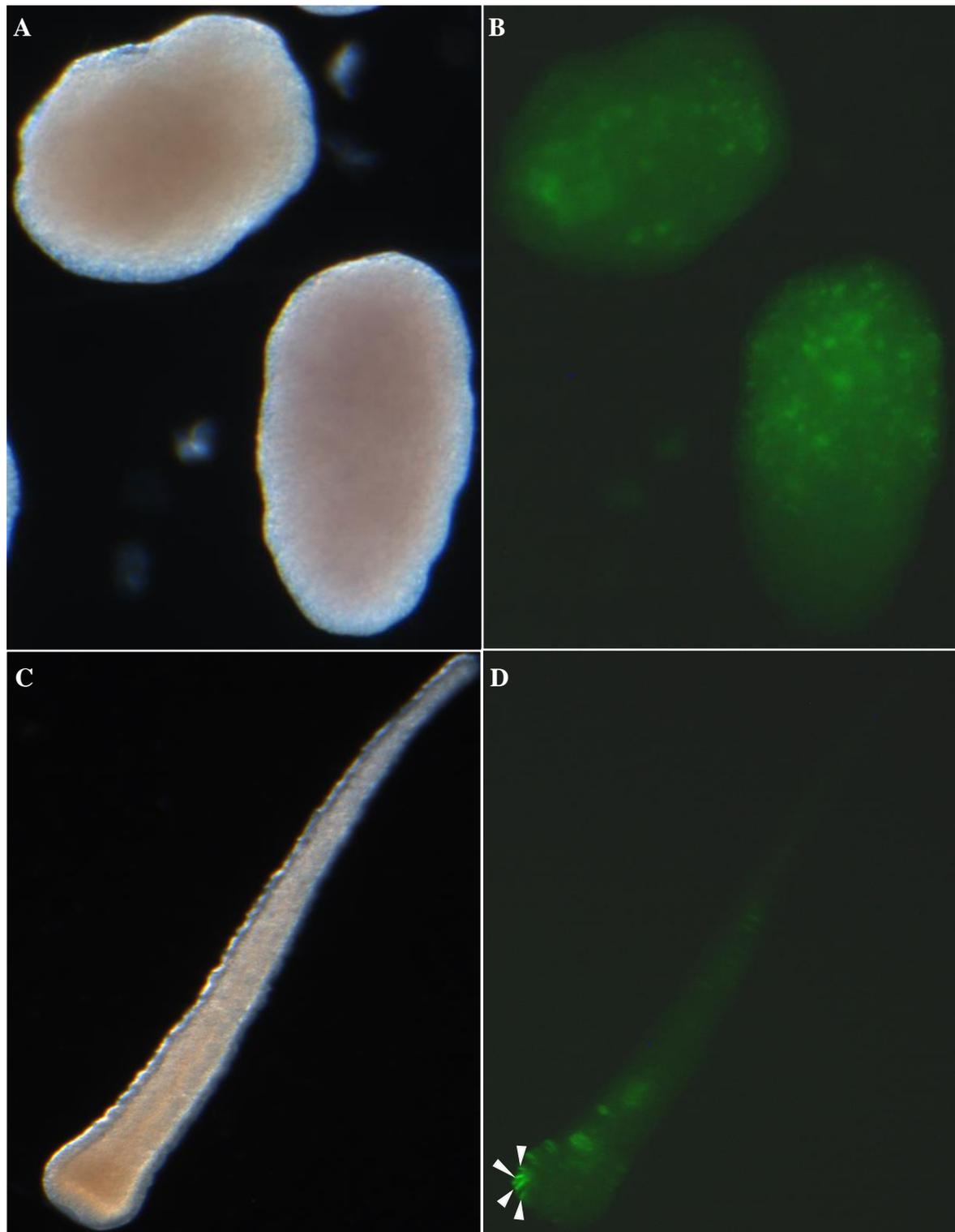


Abb. 38: Expressionsanalyse transgener *HeGsceGFP-Hydractinia*. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme von 24h alten Embryonen. (C, D) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme einer Planularlarve. *eGFP*-exprimierende sensorische Nervenzellen (s. weiße Pfeil-spitzen) in der apikalen Region.

Die Expression des Transgen *HeGsc:eGFP* war in Larven überwiegend transient. eGFP-Fluoreszenz war in den meisten Versuchstieren 24h nach der Metamorphose-Induktion nicht mehr nachweisbar. Als Ausnahme konnte in vier transgenen Primärpolypen *eGFP* beobachtet werden. In den Polypen konnten einzelne eGFP-markierte Zellen in apikalen und basalen Bereichen beobachtet werden. Desweiteren waren in zwei Versuchstieren in den Tentakeln vereinzelt schwach *eGFP*-exprimierende Zellen erkennbar, (Abb. 39). In dieser Aufsicht unter dem Stereomikroskop waren in dieser frühen Entwicklungsphase des Primärpolypen die einzelnen Zelltypen im Hypostom-, Tentakelbereich und Stolon nicht spezifizierbar.

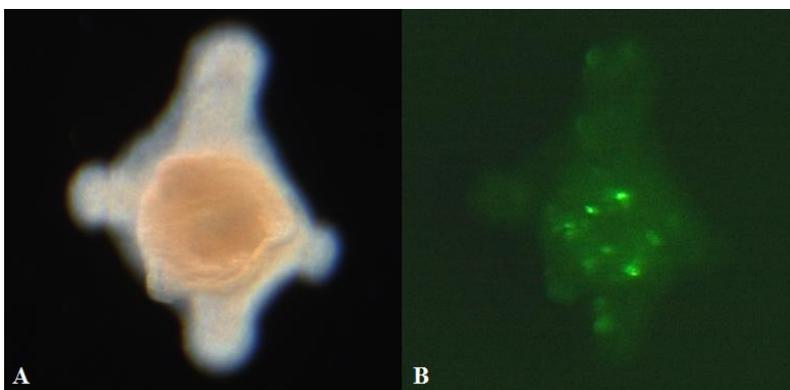


Abb. 39: *HeGsc:eGFP*-exprimierender transgener Primärpolyp. (A) Hellfeld-Aufnahme. (B) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme zu (A). *eGFP*-exprimierende Zellen im Hypostom-,Tentakelbereich und Stolon.

Auch im postmetamorphen Polypenstadium von *Hydractinia* ist *Gsc* in Zellen des Nervensystems exprimiert. Bei den hier identifizierten *eGFP*-exprimierenden Zellen handelt es sich zweifelsfrei um sensorische Nervenzellen (weiße Pfeile in Abb. 40A). Sie liegen in der Epidermis des apikalen Bereichs des Hypostoms in unmittelbarer Nähe der Mundöffnung und entsenden axonale Ausläufer in basale Richtung (Abb 40A, rote Pfeilspitzen). Dieser Bereich des Hypostoms, in dem die drei Nervenzellen lokalisiert sind, entspricht dem Bereich starker *Gsc*-mRNA Expression (Abb. 36B). In anderen Polypen zeigten sich ebenfalls in der apikalen Region und im gesamten Mundkegel kleine *eGFP*-exprimierende Zellen, die vermutlich Nervenzellen sind. Im Tentakel und Stolon von drei Polypen konnten eGFP-markierte Zellen beobachtet werden. In Stolonen konnten zudem auch zahlreiche *eGFP*-exprimierende Epithelzellen identifiziert werden. Die eGFP-Fluoreszenz war in transgenen Polypen nach wenigen

Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Expression des Transgens *HeGsc:eGFP* im Polypen-Stadium von *Hydractinia* war nicht persistent, sondern transient.

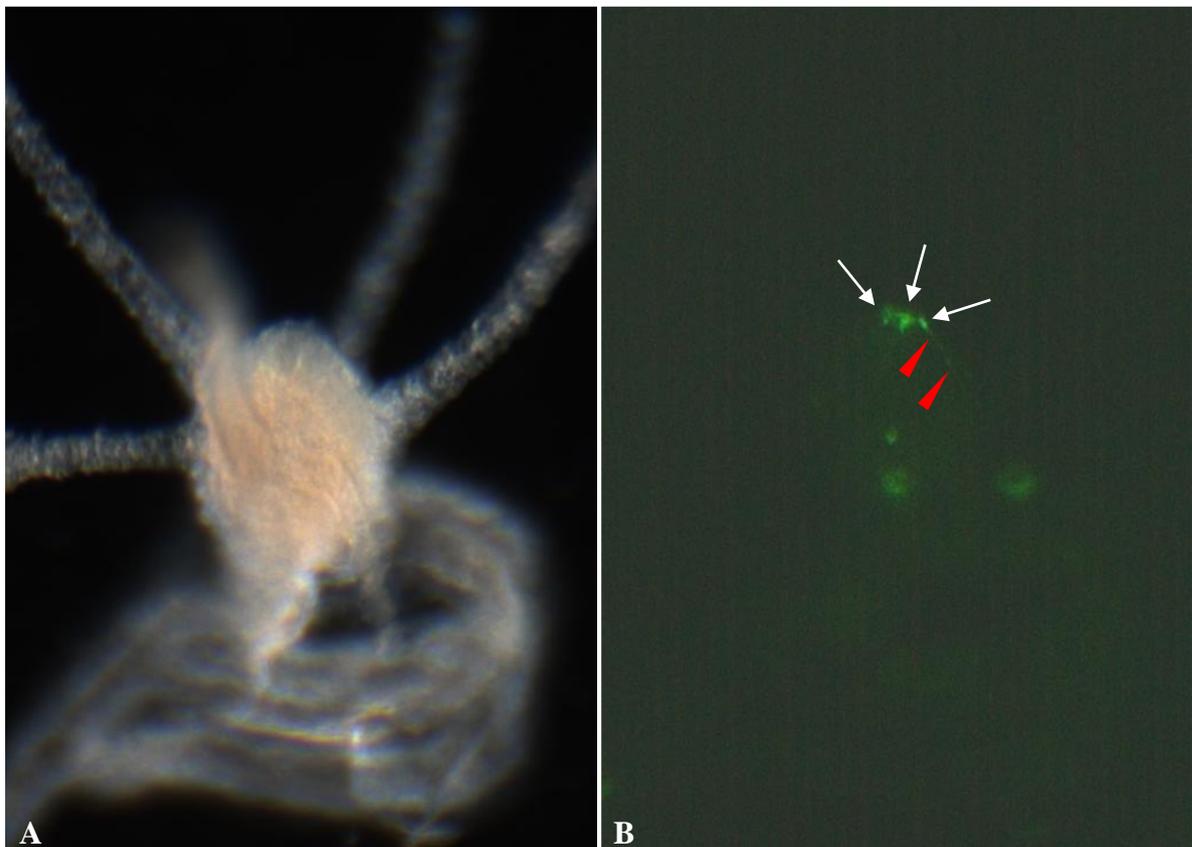


Abb. 40: Expressionsanalyse des Transgens *HeGsc:eGFP* im adulten Polypen-Stadium. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. Drei *eGFP*-exprimierende sensorische Nervenzellen (s. weiße Pfeile) im apikalen Bereich des Hypostoms. Im Fokus ist hier ein Zellfortsatz (s. rote Pfeilspitzen), der mit einer der drei Nervenzellen verschaltet ist und in basaler Richtung verläuft.

Offenbar wird *HeGsc* im Hypostom-, im Tentakel- und Stolonbereich des Polypen sowie in allen Regionen der Larve exprimiert. *HeGsc* ist regional- und zelltypspezifisch im apikalen Bereich von Larve und Polyp in sensorischen Nervenzellen und möglicherweise in weiteren nicht-sensorischen Nervenzellen des Polypen lokalisiert.

3.6.2.2 Die Mikroinjektion von „capped sense mRNA“ zeigt keine Funktionalität in *Hydractinia*

Um weitere Erkenntnisse und einen Zugang zu anderen Aufgaben während der Embryonalentwicklung zu gewinnen, sollte *HeGsc* ektopisch überexprimiert werden. Diese Überexpression wurde durch den Einsatz von „capped sense mRNA“ von *HeGsc* angegangen. Zu diesem Zweck ist als analytische mRNA (*HeGsc*-mRNA) die codierende Sequenz sowie die 5`- und 3`untranslatierte Region von *HeGsc* (nt 1-1260; Sequenz s. Anhang; 7.1.8.1) eingesetzt worden. Als Kontroll-mRNA (5`-3`*GscUTReGFP*-mRNA) wurde die Sequenz von *eGFP*, flankiert von der 5`- und 3`UTR von *HeGsc*, verwendet (Abb. 41).

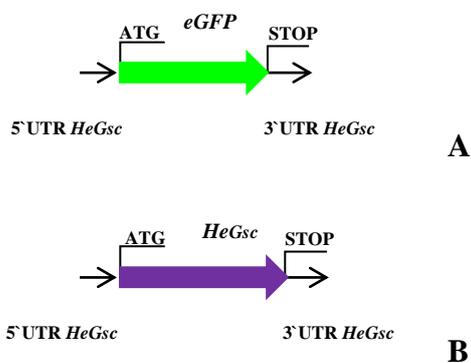


Abb. 41: Schematische Darstellung der 5`-3`*GscUTReGFP* (A) und der *HeGsc*-mRNA (B). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeGsc* (*HeGoosecooid*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region).

In keinem Entwicklungsstadium vom Embryo hin zur Planularlarve waren Versuchstiere zu erkennen, die Anlass gaben, auf eine erfolgte Translation der injizierten mRNAs zu schließen. Es konnten keine eGFP-markierte Zellen beobachtet werden. Auffälligkeiten in der Morphologie, wie sie nach Überexpression von *Gsc* durch *HeGsc*-mRNA hätten auftauchen können, wurden nicht beobachtet. Alle Versuchstiere zeigten eine typische Morphologie. Die injizierten mRNAs hatten keine offensichtlichen Effekte. Der Einsatz dieser „capped sense mRNA“ war in *Hydractinia* nicht funktionell.

3.6.2.3 Die ektopische *HeGsc*-Expression mithilfe des Genkonstrukts *HeGscNotI-C.eGFP* führt zu keinem funktionellen Reporterfusionsprotein

Um einen Zugang zu einer möglichen *HeGsc*-Funktion während der Embryonalentwicklung von *Hydractinia* zu erhalten, sollte *HeGsc* ektopisch durch die regulatorischen Regionen des ubiquitär exprimierten *HeActII* zur Expression gebracht werden. Für dieses Vorhaben wird das Expressionskonstrukt *HeActII51ASActeGFP* (s. 3.3.3) verwendet. Dieses dient als Ursprungs-konstrukt für das *HeActIIHeGsc-eGFP* (Sequenz s. Anhang; 7.3.2.1), indem der codierende Bereich der ersten 51 AS von *HeActII* gegen den aus cDNA isolierten codierenden Bereich des *HeGsc* ausgetauscht worden ist (s. Abb. 42).

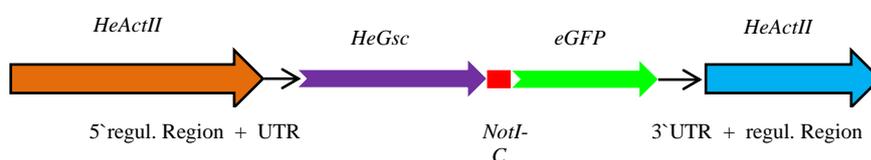


Abb. 42: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts *HeActIIHeGsc-eGFP*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *HeGsc* (*HeGoosecoid*), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C*. (*NotI-Cassette*).

In keiner Entwicklungsphase konnten Versuchstiere beobachtet werden, die das Transgen *HeActIIHeGsc-eGFP* exprimierten. Es wurden weder Zellen mit eGFP-Fluoreszenz sichtbar noch waren während der Entwicklung der Embryonen hin zur Planularlarve erkennbare Auffälligkeiten zu sehen. Die Versuchstiere zeigten eine normale Morphologie.

3.6.2.4 Die Überexpression des Transgens *eGFPHeGsc* zeigt keinen Effekt in der Embryonalentwicklung

Die Auswertung des vorangegangenen Versuchsansatzes zeigte, dass durch das Überexpressionskonstrukt *HeActIIHeGsc-eGFP* kein fluoreszierendes Fusionsprotein *HeGscNotI-C.eGFP* gebildet wurde. Es konnte bereits unter 3.6.1.1.3 sowie von W. Tilmann (persönliche Mitteilung, 2011) gezeigt werden, dass ein Reporterfusionsprotein mit dem eGFP N-terminal vor

analytischen Proteinen in *Hydractinia* funktionell ist. Ein entsprechender Ansatz wurde mit dem Überexpressionskonstrukt *HeActIIeGFPHeGsc* (Sequenz s. Anhang; 7.3.2.2) verfolgt, indem das *eGFP* stromaufwärts gelegen vor das *HeGsc* fusioniert wurde. Als Ursprungskonstrukt wurde das *HeActIIPrGFPRas2HeActIITerm* (W. Tilmann, persönliche Mitteilung und Daten, 2011) eingesetzt. Im *HeActIIeGFPHeGsc* folgt der 5`regulatorischen Region des *HeActII* im Leserahmen das vor dem codierenden Bereich des *HeGsc* stromaufwärts gelegene *eGFP*, als Terminationselement fusioniert mit der 3`regulatorischen Region des *HeActII* (s. Abb. 43).

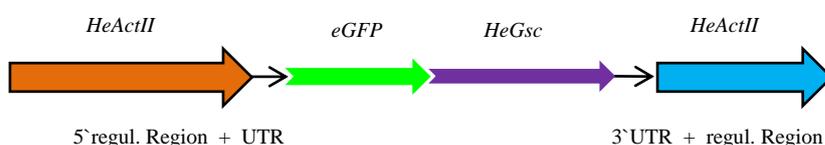


Abb. 43: Schematische Darstellung des Überexpressionskonstrukts *HeActIIeGFPHeGsc*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), *HeGsc* (*HeGoosecoid*), regul. Region (regulatorische Region) und UTR (untranslatierte Region).

Unter 24h-Entwicklungsstadien waren einige wenige Tiere, die offenbar das Konstrukt *HeActIIeGFPHeGsc* exprimierten. In diesen Transgenen waren eGFP haltige Zellen wie üblich mosaikartig verteilt (Abb. 44A) zu sehen. Diese Verteilung von eGFP-markierten Zellen wurde auch in den nachfolgenden Entwicklungsstadien von Präplanula- und Planularlarve beobachtet. Die *HeActIIeGFPHeGsc*-exprimierenden Transgene entwickelten ohne augenscheinliche Veränderungen ihre typische Morphologie (Abb. 44, B und C). Einige der besonders intensiv fluoreszenten Strukturen entsprechen in ihrer Größe der von Zellkernen (Abb. 44, B und C, weiße Pfeilspitzen). Alle Versuchstiere hatten nach 72h die charakteristische Gestalt der Larve ausgebildet.

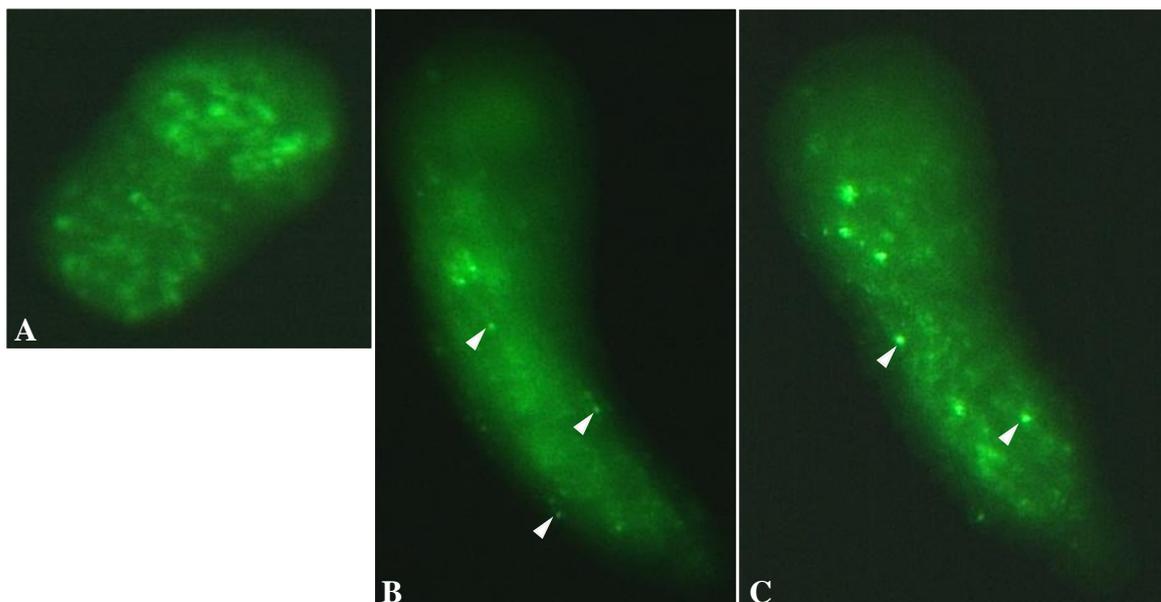


Abb. 44: Expressionsanalyse transgener *HeActIIeGFPHeGsc-Hydractinia*. (A) eGFP-Fluoreszenz mosaikartig verteilt in einem 24h alten Embryo. (B, C) *eGFP*-Expression in einer 48h alten Präplanula (B) und einer 72h alten Planularlarve (C). Grün leuchtende Punkte (s. weiße Pfeilspitzen in (B, C) könnten eGFP-markierte Zellkerne sein.

Die *HeActIIeGFPHeGsc*-Expression in den Larven war transient. Sie war nach der Metamorphose mit der Ausnahme von zwei Versuchstieren nicht mehr detektierbar. Diese zwei Transgene zeigten vereinzelt *eGFP*-exprimierende Zellen im adulten Stadium von *Hydractinia* (nicht gezeigt). Es konnte kein Polyp mit ersichtlichen morphologischen Veränderungen beobachtet werden. Die Versuchstiere hatten ihre typische Polypen-Gestalt entwickelt.

Die Auswertung der Ergebnisse hat gezeigt, dass mit diesem Überexpressionskonstrukt erfolgreich *HeActIIeGFPHeGsc*-transgene *Hydractinia* erzeugt werden können. Die eGFP-Fluoreszenz zeigt, dass das N-terminale eGFP im Reporterfusionsprotein eGFPHeGsc intakt ist. In einigen wenigen Zellen waren offenbar eGFP-markierte Zellkerne erkennbar, was bedeutet, dass der Transkriptionsfaktor HeGsc bzw. dessen NLS-Signal teilweise zur Lokalisation des Fusionsproteins in diesem Zellkompartiment geführt hat. Die in dem Umfang beobachtete Expression des Reporterfusionsprotein eGFPHeGsc hat zu keinen sichtbaren Veränderungen in der Entwicklung von *Hydractinia* geführt

3.6.2.5 Entwicklung einer Methode, die die Translation des analytischen Gens *HeGsc* unabhängig vom Reporter-gen *eGFP* ermöglicht

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen lieferten keine weiteren Erkenntnisse zur Rolle von *HeGsc* in der Embryonalentwicklung von *Hydractinia*. In den eingesetzten Versuchsansätzen konnten keine effektiven Mengen HeGsc-Protein bzw. -Reporterfusionsprotein in *Hydractinia* erzeugt werden. Um auszuschliessen, dass die mangelnde biologische Effizienz des Reporterfusionsproteins in der Fusion der Proteine selbst begründet ist, etwa in sterischen Effekten oder in Fehlern der Tertiärstruktur wurden zwei neue Ansätze entwickelt. Es wurde versucht, den Transkriptionsfaktor HeGsc ungebunden vom eGFP funktionell aktiv im Zellkern zu exprimieren.

3.6.2.5.1 Die Translationsinitiation über ein IRES-Element ist nicht funktionell in *Hydractinia*

In diesem neuen Versuchsansatz wurde eine Methode verfolgt, um das analytische Gen *HeGsc* unabhängig vom *eGFP* in den gleichen Zellen zur Translation zu bringen. Dazu wurde ein Reportergenkonstrukt hergestellt, in dem das Transgen in Form einer bi-cistronischen Transkriptionseinheit vorliegt. Dessen Expression und Regulation soll durch die Kontrolle der regulatorischen Regionen von nur einem Gen erfolgen. Das ermöglicht die Expression beider Proteinkodierungen in einer transgenen mRNA, die anschließend getrennt voneinander in zwei Proteinen umgesetzt wird. Für diesen Zweck wurde eine *internal ribosome entry site* (IRES) in das Reporterkonstrukt eingeführt. Das IRES-Element ist eine spezifische Faltung bzw. Sekundärstruktur der mRNA, die zuerst als virale IRES im Polio- und Encephalomyocarditis-Virus entdeckt wurde (Jang et al., 1988; Pelletier und Sonenberg, 1988). Kurze Zeit später konnte auch die erste zelluläre IRES-mRNA vom *immunoglobulin heavy-chain binding protein* (BiP) im Menschen nachgewiesen werden (Macejak und Sarnow, 1991). Das IRES-Element vermittelt die Bindung des Ribosoms direkt an das Transkript und ermöglicht dadurch die sogenannte Cap-unabhängige Initiation der Proteinbiosynthese (Hellen und Sarnow, 2001; Mokrejš et al., 2006, 2010).

Um die Funktionalität des IRES-Elements in *Hydractinia* zu untersuchen, wurde dieses in den zwei unterschiedlichen Reportergerkonstrukten *HeGscHeGsc^{gDNA}IRESeGFP* und *HeActIIHeGsc^{cDNA}IRESeGFP* (Sequenzen s. Anhang; 7.3.3.1 und 7.3.3.2) eingesetzt.

Das *HeGscHeGsc^{gDNA}IRESeGFP* wurde aus dem Genkonstrukt *HeGscHeGsc^{gDNA}eGFP* (s. 3.6.2.1) modifiziert, in welchem das *IRESeGFP*-Element vom codierenden genomischen Bereich von *HeGsc* und *eGFP* flankiert wird. Die codierende *HeGsc*-Sequenz ist nicht im Leserahmen mit *IRESeGFP* fusioniert. Der Leserahmen wird durch das eingeführte erste Stopcodon von *HeGsc* (nt 6515-6517; Sequenz s. Anhang; 7.1.8.2) unterbrochen und die Translation terminiert. Der Aufbau des Transgens ist schematisch in Abb. 45 zu sehen.

Für das Reporterkonstrukt *HeActIIHeGsc^{cDNA}IRESeGFP* diene als Ursprungskonstrukt das *HeActIIHeGsc^{cDNA}eGFP* (s. 3.6.2.3), indem die *NotI*-Klonierungskassette gegen *IRESeGFP* ausgetauscht ist. Ein weiterer Unterschied ist, dass *IRESeGFP* nicht im Leserahmen mit der codierenden *HeGsc*-Sequenz aus cDNA kloniert ist. Der *HeGsc*-Sequenz folgt das erste *HeGsc*-Stopcodon (nt 1187-1189; Sequenz s. Anhang; 7.1.8.1), welches die Proteinsynthese beendet (s. Abb. 45).

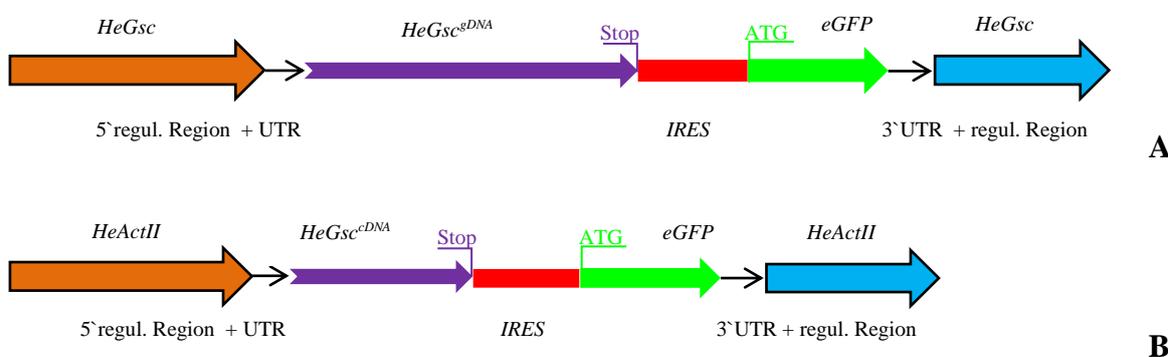


Abb. 45: Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte *HeGscHeGsc^{gDNA}IRESeGFP* (A) und *HeActIIHeGsc^{cDNA}IRESeGFP* (B). *He* (*Hydractinia echinata*), *HeGsc^{gDNA}* (*HeGoosecoid* codierende genomische DNA), *HeGsc^{cDNA}* (*HeGoosecoid* codierende cDNA), *eGFP* (*enhanced GFP*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *IRESeGFP* (*internal ribosome entry site*).

Bei der Untersuchung der Injektionsansätze konnte kein Versuchstier beobachtet werden, welches offenbar das Transgen *HeGscHeGsc^{gDNA}IRESeGFP* bzw.

HeActIIHeGsc^{cDNA}IRESeGFP exprimiert. Wenngleich die regulatorischen Regionen der beiden Gene *HeGsc* und *HeActII* funktionell sind und eGFP erfolgreich in *Hydractinia* treiben können (s. 3.6.2.1 und 3.3.4), waren in keinem Entwicklungsstadium eGFP-markierte Zellen erkennbar und auch in der Embryonalentwicklung waren keine sichtbaren Auffälligkeiten zu sehen. Alle Versuchstiere hatten nach 72h die charakteristische Morphologie der Planularlarve entwickelt.

Von diesen Reportergergenkonstrukten konnten offenbar keine Proteine prozessiert werden. Der Einsatz eines IRES-Elements ist offenbar in *Hydractinia* nicht möglich.

3.6.2.5.2 Die ektopische Expression von *HeGsc* durch ein Tandem-Expressionskonstrukt führt in der embryonalen und postmetamorphen Entwicklung zu morphologischen Veränderungen in *Hydractinia*

Um das analytische Gen unabhängig vom Reportergergen zur Expression zu bringen, wurde ein Genüberexpressionskonstrukt hergestellt, in dem diese Gene beide jeweils unter der Kontrolle der 5`- und 3`regulatorischen Regionen des *HeActII* stehen. Dieses Genkonstrukt wird aufgrund der Anordnung der beiden transgenen Geneinheiten im Tandem hintereinandergeschaltet als Tandem-Expressionskonstrukt bezeichnet. In diesem wurde das Expressionskonstrukt *HeActII51ASActeGFP* (s. 3.3.3) modifiziert durch das nachgeschaltete Transgen *HeActIIHeGsc*, in welchem die 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeActII* die aus cDNA isolierte codierende Sequenz des *HeGsc* flankieren. Der Aufbau des Tandem-Expressionskonstrukts *HeActII51ASActeGFP-HeActIIHeGsc* (Sequenz s. Anhang; 7.3.4.1) ist schematisch in Abb. 46 abgebildet.

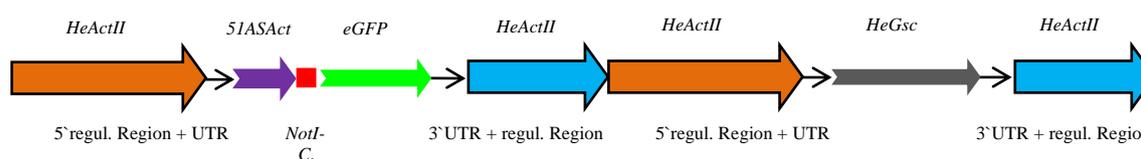


Abb. 46: Schematische Darstellung des Tandem-Expressionskonstrukts *HeActII51ASActeGFP-HeActIIHeGsc*. *He* (*Hydractinia echinata*), *HeActII* (*HeAktinII*), *51ASAct* (codierender

Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), *HeGsc* (*HeGoosecoid*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (NotI-Cassette).

Es konnten in 24h alten Embryonen einige *HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc*-transgene Versuchstiere anhand der eGFP-Fluoreszenz identifiziert werden. Die eGFP-exprimierenden Zellen waren in diesem Embryonalstadium (s. Abb. 47A) und im weiteren Verlauf der Entwicklung mosaikartig verstreut in den Transgenen zu beobachten.

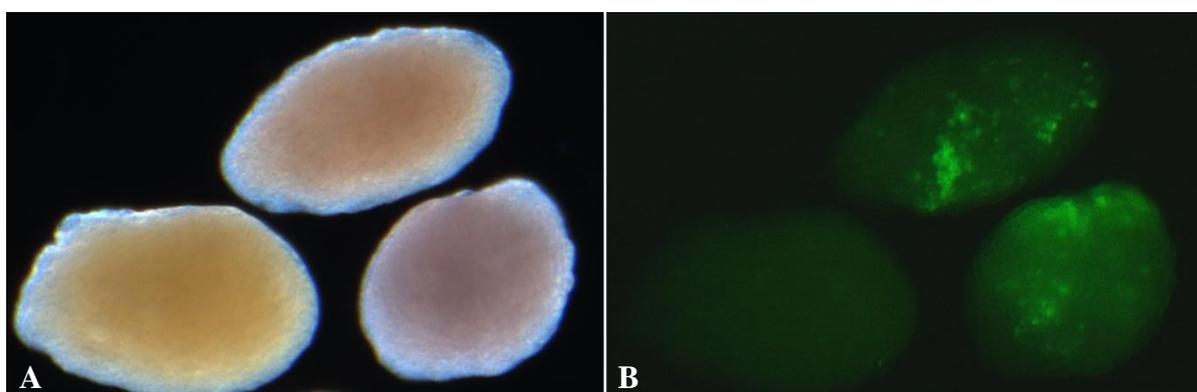


Abb. 47: Expression des Transgens *HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc* in Embryonen. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. *eGFP*-exprimierende Zellen mosaikartig verstreut im 24h alten Embryonalstadium.

Nach 48h Entwicklung wurden bei den Versuchstieren Abwandlungen der typischen Morphologie im Stadium der Präplanula beobachtet. Es konnten Veränderungen in der Ausbildung der apikalen und terminalen Region sowie der anterior-posterioren Polarität beobachtet werden. In Abb. 48A sind sechs Versuchstiere (Transgen I-VI) mit einer atypischen Gestalt im Vergleich zu den normal entwickelten Präplanulas (s. weiße Pfeile) zu erkennen. Diese Abnormitäten waren verschieden stark ausgeprägt. Dabei lässt sich die unterschiedlich starke Ausprägung der veränderten Morphologie nicht in Korrelation mit der Intensität der eGFP-Fluoreszenz (s. Abb. 48B) bringen.

Es konnten verschiedene Gestaltvarianten mit Anomalien den anterior-posterioren Bereich bzw. die apikale und terminale Region betreffend beobachtet werden. Im Transgen I waren keine *eGFP*-exprimierenden Zellen (s. Abb. 48B) zu beobachten. Dieses Tier zeigte eine Ein-

schnürung im posterioren Schwanzbereich und caudal einen gestauchten, verdickten Schwanz (s. Abb. 48A). Ein zweites Versuchstier (Transgen II, s. Abb. 48A) hatte in der Schwanzregion einen kleinen Auswuchs von entodermalen Zellen (weiß eingekreist), wodurch in diesem Bereich eine Abknickung ausgebildet war. Es sind nur wenige schwach *eGFP*-exprimierende Zellen nach caudal im Transgen II (s. Abb. 48B) zu detektieren. Ein drittes Versuchstier (Transgen III) mit einer geringen *eGFP*-Fluoreszenz zeigte ebenfalls eine Fehlbildung im posterioren Bereich sowie auch im anterioren Bereich der Präplanula (s. Abb. 48A). Das Transgen III war gedrungen ohne die Ausbildung des typischen, zentralen Körperbereichs, aber hatte dafür eine vergrößerte, rundliche apikale Region entwickelt. Das terminale Schwanzende war verdickt und abgerundet.

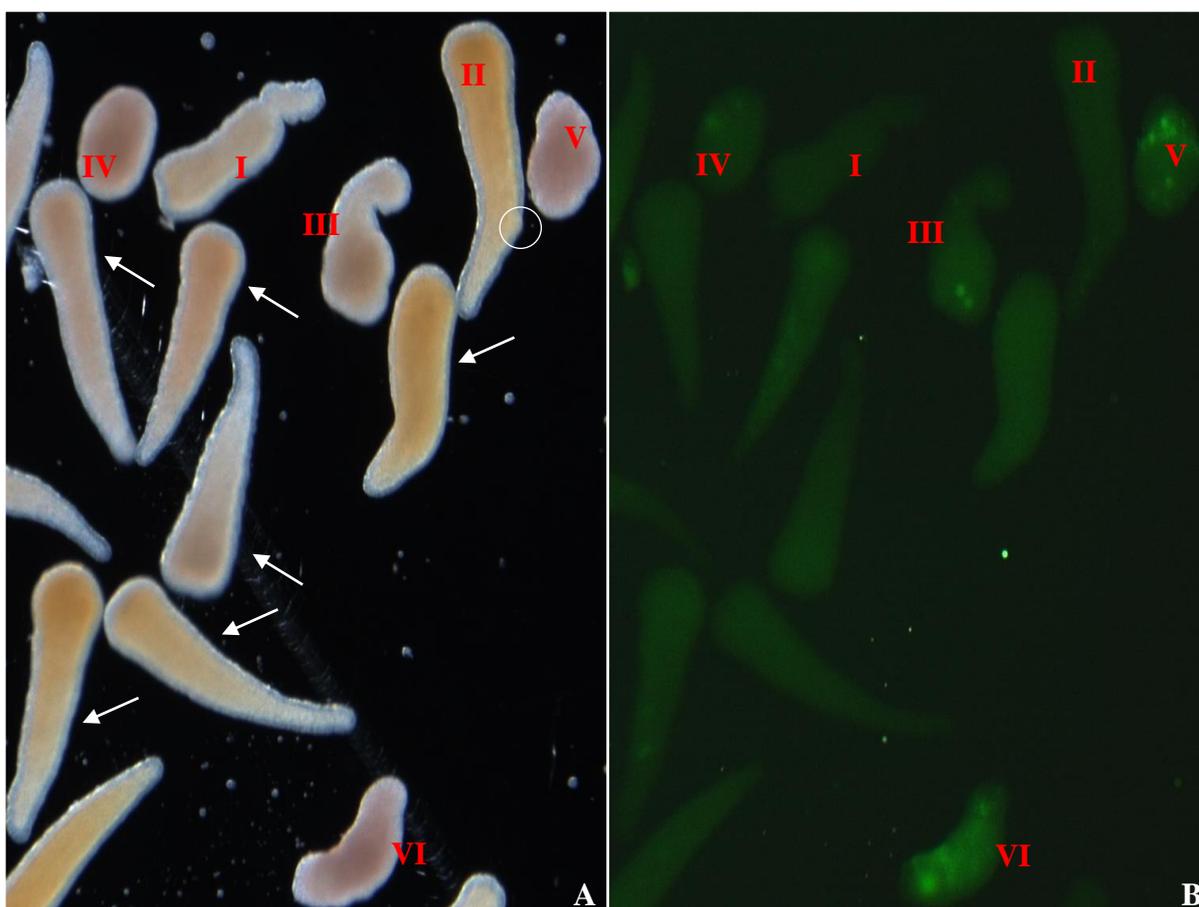


Abb. 48: Expressionsanalyse transgener *HeActII51AsActeGFP-HeActIIIHeGsc-Hydractinia* nach 72h Entwicklung. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. Vergleich von sechs Versuchstieren mit atypischer Gestalt (Transgen I-VI durch rote römische Zahlen gekennzeichnet) zu normal entwickelten Präplanulas (s. weiße Pfeile). Transgen II mit kleinem Auswuchs von entodermalen Zellen (weiß eingekreist) in der Schwanzregion.

In einem weiteren beobachteten Phänotyp war keine Polarität ausgebildet worden, wie bei den zwei Versuchstieren (Transgen IV und -V) in Abb. 48A zu erkennen. Diese zeigten eine apolare, ellipsenförmige Gestalt bzw. noch das Aussehen wie im Stadium eines 24h alten Embryos. Das Transgen IV weist kaum eGFP-markierte Zellen auf, wohingegen Transgen V einige *eGFP*-exprimierende Zellen besitzt, wie in Abb. 49B zu sehen. Ein anderes Versuchstier (Transgen VI, s. Abb. 48A und 49C) zeigte einen Phänotyp ohne sichtbare Anzeichen für eine anteriore-posteriore Polarität. Es hatte eine bipolare Morphologie ohne eine apikale- und terminale Region ausgebildet, wie im Vergleich zu einer normal entwickelten Präplanula in Abb. 49C zu erkennen. Die eGFP-Fluoreszenz war mosaikartig verteilt im Versuchstier zu detektieren (s. Abb. 49D).

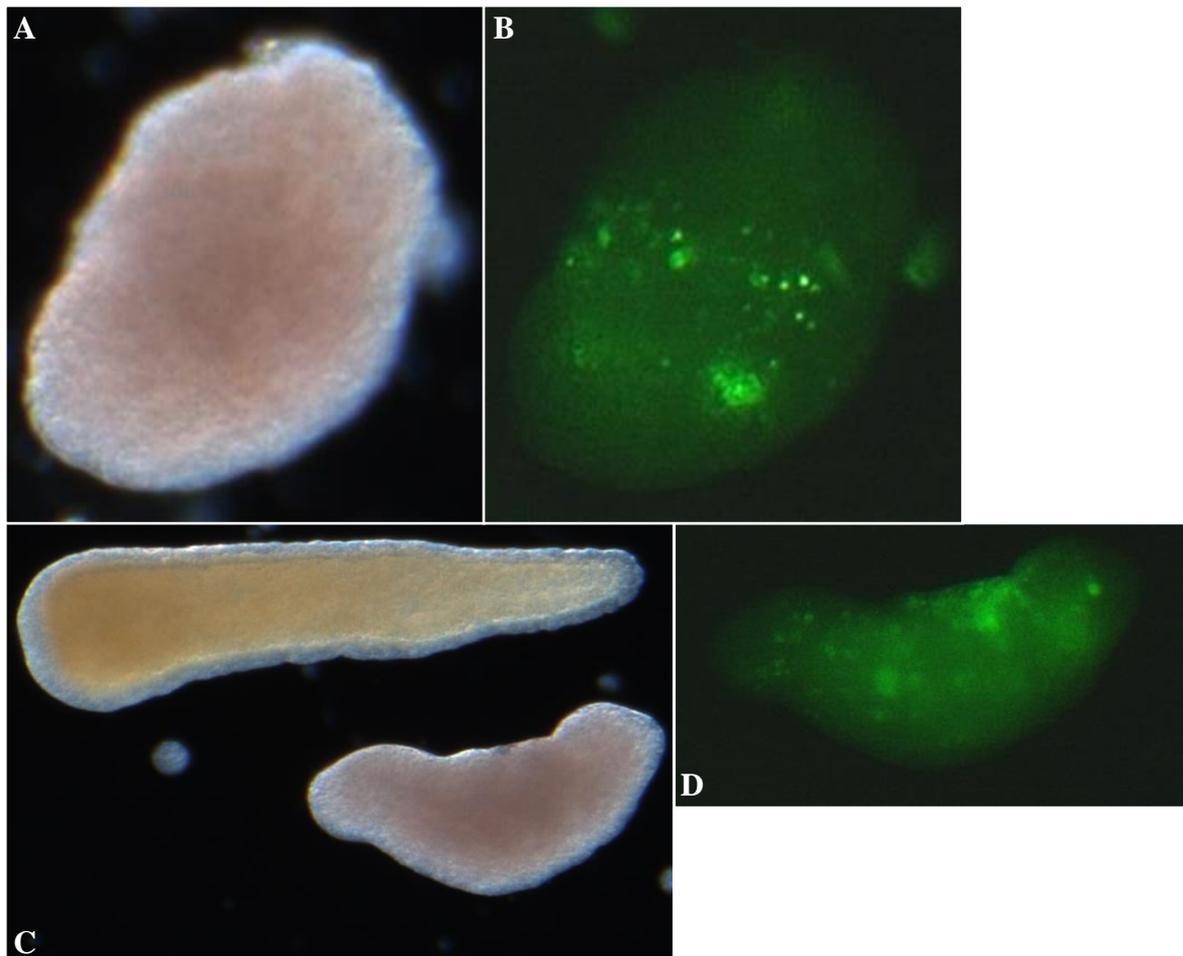


Abb. 49: *HeActII51AsActeGFP-HeActIIHeGsc*-Expression in Transgen V und VI. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme vom Transgen V. (C) Hellfeld-Aufnahme vom Transgen

VI mit ausgebildeter bipolarer Morphologie im Vergleich zu einer normal entwickelten Präplanula. (D) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme von Transgen VI.

Nach 72h Entwicklung konnten in diesem Tier keine weiteren Veränderungen der atypischen Gestalt registriert werden. In einem *eGFP*-exprimierenden Tier konnte weder eine sichtbare Polarität noch eine apikale- bzw. terminale Region identifiziert werden konnte. Der Körper dieses Versuchstiers war aus verschiedenen großen kugelartigen Gewebebereichen aufgebaut (s. Abb. 50A).

Es konnten aber auch Versuchstiere mit eGFP-Fluoreszenz ohne ersichtliche Auffälligkeiten beobachten werden. Diese hatten die typische Morphologie ausgebildet, wie exemplarisch an der Planularlarve in Abb. 50C gezeigt. Das ekto- und endodermale Keimblatt war in allen Versuchstieren normal entwickelt.

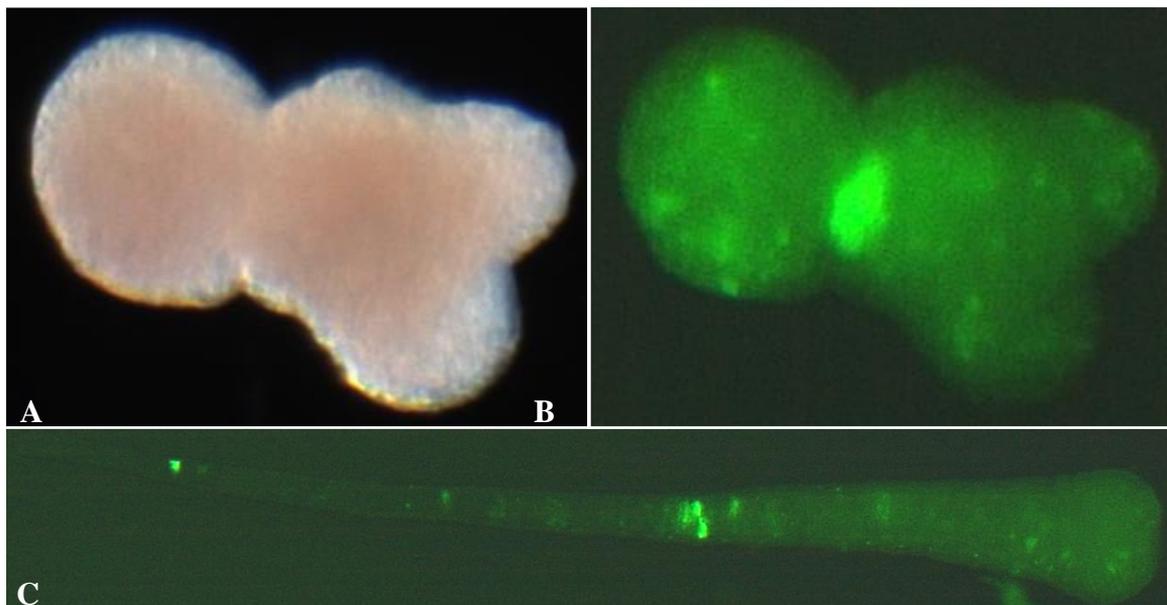


Abb. 50: Expressionsanalyse transgener *HeActII51AsActeGFP-HeActIIIHeGsc-Hydractinia*. (A, B) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. Versuchstier nach 72h Entwicklung mit eGFP-Fluoreszenz ohne sichtbare Polarität sowie apikale- bzw. terminale Region. Der Körper ist aufgebaut aus unterschiedlich großen kugelartigen Gewebebereichen. (C) Normalentwickelte *eGFP*-exprimierende Planularlarve mit charakteristischer Morphologie.

In den wenigsten dieser Transgene konnte die Metamorphose induziert werden. Ein Versuchstier ohne eGFP-Fluoreszenz war teilweise metamorphosiert (s. Abb. 51A). Es zeigte ein Zwischenstadium der Metamorphose während des Übergangs vom larvalen zum postmetamorphenen Stadium. Das posteriore Ende der Larve hatte den apikalen Bereich eines Primärpolypens mit einem Hypostom-Ansatz, einem gestauchten Apex und fünf Tentakeln ausgebildet.

Ein Primärpolyp zeigte 24h nach der Metamorphose-Induktion noch keine vollständig entwickelte typische Gestalt. Dieses transgene Versuchstier hatte noch keine Stolon-Anlage entwickelt. Die Ansätze der Tentakel waren dagegen bereits angelegt (s. Abb. 51B). Die *eGFP*-Expression war in Zellen über den gesamten Körper verteilt. Im unteren Drittel der Körpersäule war ektopisch ein rundlicher, knospenähnlicher Auswuchs (s. roter Pfeil in Abb. 51,B und C) ausgebildet, indem zwei eGFP-markierte sensorische Nervenzellen (s. weiße Pfeilspitzen in Abb. 51C) lokalisiert waren. Zwei Tage nach dem Auslösen der Metamorphose war bei diesem Versuchstier die charakteristische Morphologie des Primärpolypens vollentwickelt (s. Abb. 51D). Dieses hatte sich mit der neu ausgebildeten Basalscheibe mit einem Stolon auf dem Bodengrund festgesetzt. Der ektopische Auswuchs war nicht mehr sichtbar. Der Polyp zeigte eine weiter andauernde Expression des Transgens *HeActII51ASActeGFP-HeActIIIHeGsc*. Es konnten auch nach sechs Tagen viele *eGFP*-exprimierende Zellen in allen Körperteilen beobachtet werden. Parallel dazu traten weitere Veränderungen der Morphologie auf: Der Polyp zeigte eine morphologische Veränderung in der typischen Anlage der Tentakelregion. Die Tentakel waren unsymmetrisch angeordnet (Abb. 51F). Es waren ektopisch angelegte Tentakel unterhalb der Tentakelansatzregion sowie auch etwa in der Mitte der Körpersäule (s. weiße Pfeile in Abb. 51F) zu beobachten.

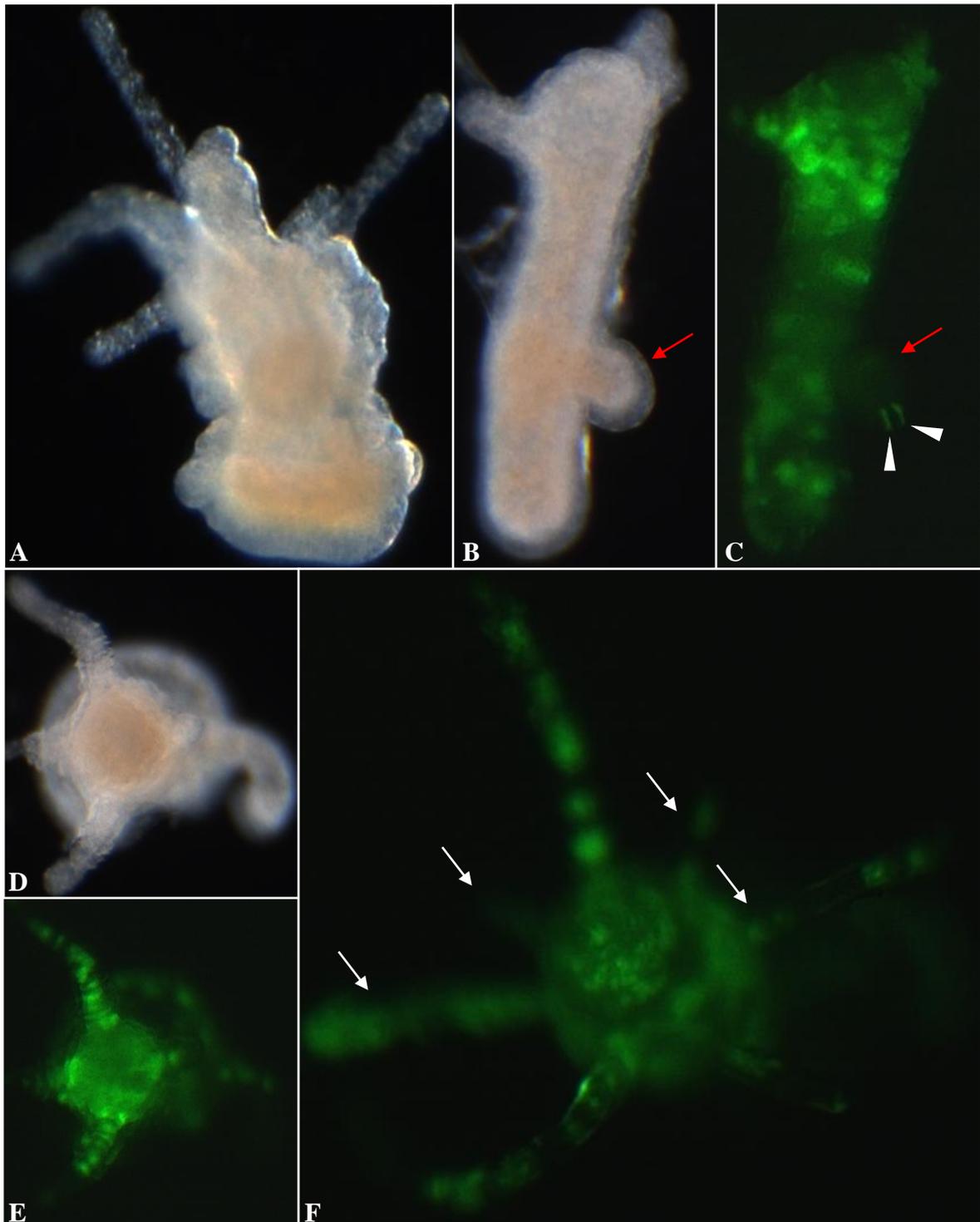


Abb. 51: Expression des Transgens *HeActII51ASActeGFP-HeActIIHeGsc* im postmetamorphem Stadium. (A) Hellfeld-Aufnahme eines teilweise metamorphosierten Versuchstiers mit sichtbaren ausgebildeten apikalen Strukturen eines Primärpolypens sowie noch vorhandenem anteriorem larvalem Bereich. (B) Hellfeld-Aufnahme eines Primärpolypen 24h nach der Metamorphose-Induktion. Ohne entwickelte Stolon-Anlagen, aber mit erkennbaren Tentakel-Ansätzen. Im unteren Drittel der Körpersäule ist ein rundlicher, knospenähnlicher Auswuchs (s. roter Pfeil in (A) und (B)) ausgebildet. (C) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme zu (B). Die eGFP-Expression war verteilt im

ganzen Körper zu sehen. Im Auswuchs sind zwei eGFP-markierte sensorische Nervenzellen (s. weiße Pfeilspitzen) lokalisiert. (D, E) Hellfeld- und eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. Zwei Tage nach der induzierten Metamorphose hatte dieser Primärpolyp die charakteristische Morphologie vollständig entwickelt. (F) Der sechs Tage alte Polyp hatte ektopische unsymmetrisch angeordnete Tentakel unterhalb der Tentakelansatzregion sowie etwa mittig an der Körpersäule (s. weiße Pfeile) ausgebildet.

Die Ergebnisse zeigen dass das Tandem-Expressionskonstrukt *HeActII51ASActeGFP-HeActIIIHeGsc* funktionell ist. Sowohl das Reporter-gen als auch das analytische Gen werden offenbar zur Expression gebracht. Die ektopische Expression von *HeGsc* unter der Kontrolle der 5`- und 3`regulatorischen Region vom *HeActII* führte während der embryonalen- und larvalen Entwicklung offenbar zu tief greifenden Veränderungen der Morphologie. Die Abwandlung von der typischen Gestalt betraf die Entwicklung der anterior-posterioren Polarität wie auch der apikalen und terminalen Region. Auch nach der Metamorphose zeigte die andauernde ektopische *HeGsc*-Expression Effekte auf die weitere Entwicklung des adulten Stadiums von *Hydractinia*.

Offenbar greift der Transkriptionsfaktor *HeGsc* in die Entwicklungskontrolle in *Hydractinia* ein. Die Analyse dieses Versuchsansatzes legt somit nahe, dass eine unabhängige Genexpression von Reporter- und Funktionsgen durch Tandem-Expressionskonstrukte funktionell sind und erfolgreich für *in vivo*-Funktionsproteinstudien eingesetzt werden können.

3.7 Charakterisierung eines ELAV-Homologs aus *Hydractinia*

Aus gDNA konnte mit degenerierten Oligonukleotiden ein Teilfragment eines ELAV-Homologs aus *Hydractinia* isoliert werden. Diese Oligonukleotide, wurden anhand des konservierten Bereichs der RNA-bindenden Domänen 2 und 3 eines multiplen ELAV-Alignments und der DNA-Sequenz des *ELAVB* (Tsuoshi Momose, Daten, 2008) aus dem Hydrozoen *Clythia hemisphaerica* (Abk. *Clythia*) angefertigt.

Ausgehend von dieser Nukleinsäuresequenz konnte in einer 5`Splinkerette-PCR sowie in 5`- und 3`RACE-PCRs das Gen des Homologs eines ELAVs aus *Hydractinia* bis hin zum 5`- und 3`Ende vervollständigt werden (Sequenz s. Anhang; 7.1.9.1). Das 5`RACE-Amplifikat enthielt ein Mischung zweier cDNA-Varianten, die eine unterschiedliche Länge der untransla-

tierten Region aufwiesen. Das längere Fragment besaß eine 146 bp und das kürzere eine 56 bp lange 5`untranslatierte Region vor dem Start ATG des offenen Leserasters. Das kürzere Amplifikat besitzt vor der untranslatierten Region eine 45 bp lange „Spliced leader“ (SI) Sequenz. Diese wird im mRNA-Reifungsprozess des sogenannten „Trans-Splicings“ an das 5`Ende von prä-mRNAs „angespleißt“. Die genaue Funktion ist bisher nicht bekannt. Die Nukleinsäuresequenz, die auf den SI folgt, ist ab nt 91 identisch mit der nicht gespleißten untranslatierten Region der längeren cDNA-Variante (Sequenz s. Anhang; 7.1.9.1).

Dieses ELAV-Homolog aus *Hydractinia* hat eine zusammengesetzte Gesamtsequenz, die die nicht gespleißte untranslatierte Region der längeren cDNA-Variante enthält, von 1542 bp und codiert für ein hypothetisches Protein mit 385 AS (Sequenz s. Anhang; 7.1.9.1). Einer 146 bp langen 5`untranslatierten Region folgt ein offenes Leseraster von 1155 bp. In der 228 bp langen 3`untranslatierten Region folgt der Poly(A)-Schwanz bei nt 1530. Es sind zwei mögliche Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) an den Positionen nt 1377-1382 und 1412-1417 (Sequenz s. Anhang; 7.1.9.1) vorhanden.

Dieses Homolog eines ELAVs aus *Hydractinia* zeigt den für ein RNA-bindendes Protein (RBP; *RNA-binding protein*) charakteristischen Aufbau. Es besitzt die für ELAV/Hu-Familie von RBPs typischen strukturellen drei RNA-bindenden Domänen, die als sogenannte *RNA recognition motifs* (RRM) bezeichnet werden. Die ersten beiden RRM sind im Tandem angeordnet und von der dritten RRM durch einen 82 AS langen Bereich abgegrenzt, der als Linker-Region (*hinge region*) bezeichnet wird. Die Proteinstruktur ist schematisch in Abb. 52 dargestellt.

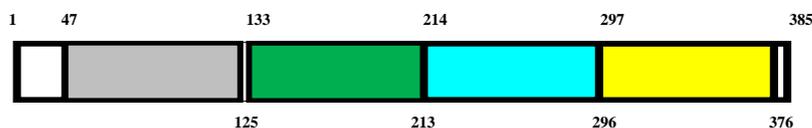


Abb. 52: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des HeELAV. Die Zahlen kennzeichnen die Position der AS im Protein. Das RRM 1 ist hellgrau, das RRM 2 grün, die Linker-Region türkis und das RRM 3 gelb dargestellt.

Eine RRM-Domäne besteht aus 80-90 AS und enthält zwei hoch konservierte kurze Ribonukleoprotein (RNP; *ribonucleoprotein*)-Motive. Das eine der beiden ist ein Octamer-Peptid und wird als RNP-1-Motiv, das andere ist ein Hexamer-Peptid und wird als RNP-2-Motiv bezeichnet (Kenan et al., 1991; Birney et al., 1993; Burd und Dreyfuss, 1994; Robinow et al., 1988). Die RRM-Domänen sind bei allen Mitgliedern der ELAV/Hu-Familie hoch konserviert wie der Sequenzvergleich verschiedener ELAV-Proteine in Abb. 53 belegt, wohingegen die AS im N-terminalen Bereich und in der Linker-Region weniger konserviert sind (Okano und Darnell, 1997).

		RNP-2	
CpELAV	-METQLSNGPTCNNTTNGPTT---INNCCSSPVDSGNTED-----SKTNLIVNYLPQN		49
MmELAV	-METQLSNGPTCNNTANGPTT---VNNCCSSPVDSGNTED-----SKTNLIVNYLPQN		49
MdELAV	-METQLSNGPTCNNTANGPTT---INNCCSSPVDSGNTED-----SKTNLIVNYLPQN		49
HeELAV	MATAHLMNGH-THHLMNGTLN--PHMAMNGYPIDQKVEADQQNIDDENATNLIINYLPQE		57
HmELAV	MATIHMMNGHGHHLMNGVINGLAHVNLSGYPLNLEQDPD-----DENPTNLIINYLPQE		55
	:: ** :: ** . . *:: * . *****:*****:		
		RNP-1	
CpELAV	MTQEELKSLFGSIGEIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYIDPKDAEKAINTLNGLRLQTKT		109
MmELAV	MTQEELKSLFGSIGEIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYIDPKDAEKAINTLNGLRLQTKT		109
MdELAV	MTQEELKSLFGSIGEIESCKLVRDKITGQSLGYGFVNYIDPKDAEKAINTLNGLRLQTKT		109
HeELAV	MTEEELRTLFSSIGPLESCKLIRDKVTRASLGYAFVKYERTNDAKKAIESLQGMKLTNKT		117
HmELAV	MTEEELRTLFSSVGPLSCKLIRDKVTRASLGYAFVNYQHAADARKAIESLQGMKLTNKT		115
	::*::**:* :*****:***:* *****.**:* . **.****::**::** .**		
		RNP-2	RNP-1
CpELAV	IKVSYARPSSASIRDANLYVSGI PKTMTQKELEQLFSQYGRITSRILVDQVTGIS	RGVG	169
MmELAV	IKVSYARPSSASIRDANLYVSGI PKTMTQKELEQLFSQYGRITSRILVDQVTGIS	RGVG	169
MdELAV	IKVSYARPSSASIRDANLYVSGI PKTMTQKELEQLFSQYGRITSRILVDQVTGVS	RGVG	169
HeELAV	IKVSVARPSSNEIKNANLYVSGI PLTVTEHELRLVLFARYGPIITSKVLIDE--SSQS	RGVG	176
HmELAV	IKVSVARPSCTEIKNANLYVSGI PLTCNENDLRELFASYGSIITIKVLYEE--SGQS	RGVG	174
	**** ****. .**::***** * .**::* ** ** *** **: : . *****		
CpELAV	FIRL DKRIEAEAAIKGLNGQKPP--GATEPITVKFANNPSQKTNQAILSQLYQSPNRRYP		227
MmELAV	FIRL DKRIEAEAAIKGLNGQKPP--GATEPITVKFANNPSQKTNQAILSQLYQSPNRRYP		227
MdELAV	FIRL DKRIEAEAAIKGLNGQKPP--GATEPITVKFANNPSQKTNQAILSQLYQSPNRRYP		227
HeELAV	FVRL DKRADAEEAINGLNNRIPELNGAIKPLTVKFANPPSQK-IQPYLDILTQAKG-LAG		234
HmELAV	FVRL DKRNDAEEAINGLNNRIPEINGAIKPLTVKFANPPSQK-IQPYLDILAQAKG-LAG		232
	::** **: **:*:**. : * ** :***** **** * * * * : .		
CpELAV	GPLAQQAQRFSRFSPTIDGMTSLAG-INIPGHPG-----		261
MmELAV	GPLAQQAQRFSRFSPTIDGMTSLAG-INIPGHPG-----		261
MdELAV	GPLAQQAQRFSRFSPTIDGMTSLAG-INIPGHAG-----		261
HeELAV	SAFLRQAVGLSLSPLMSSTGASLSTSPIASPLSPNSASLLRNNMVVNQAPSASTLNGIQN		294
HmELAV	SAFLRQ-VGLSQLSPINSSGASLTTSPINSPNSPN--SSVLRNNLVVN--SSNSSLN---N		285
	. . . : * :**:*:**. * : . * * . .		
		RNP-2	RNP-1
CpELAV	TGWCIFVYNLAPDADESILWQMFPGFPAVTVNKVIRDFNTNKC	KGFGFVTMTNYDEAAMA	321
MmELAV	TGWCIFVYNLAPDADESILWQMFPGFPAVTVNKVIRDFNTNKC	KGFGFVTMTNYDEAAMA	321
MdELAV	TGWCIFVYNLAPDADESILWQMFPGFPAVTVNKVIRDFNTNKC	KGFGFVTMTNYDEAAMA	321

HeELAV	<u>SSWC</u> <u>VFVYNL</u> PSDAIELTLFQLFSKFGAIQSTRVVYDENTKKC <u>KGFGFVN</u> MAHYEDATMA	354
HmELAV	<u>PSWC</u> <u>VFVYNL</u> PSDASELTLFQLFSKFGAIQSTRVVYDENTKKC <u>KGFGFVN</u> MAHYEDATMA	345
	. . * : * * * * * . . * * * * * : * : * : * * * : . . : * : * * : * * * * * * * * . * : * : * * :	
CpELAV	<u>IASLNGYRLG</u> -DRVLQVSFKTNKTHKA----	347
MmELAV	<u>IASLNGYRLG</u> -DRVLQVSFKTNKTHKA----	347
MdELAV	<u>IASLNGYRLG</u> -DRVLQVSFKTNKTHKA----	347
HeELAV	<u>ILHLNGYCC</u> ERGKPLQVSFKRPKSQNLSMA	385
HmELAV	<u>ILHLNGYCC</u> ERGKPLQVSFKRPRNQAGMSIM	376
	* * * * * . : * * * * * . . :	

Abb. 53: Vergleich der Proteinsequenz verschiedener Vertreter von ELAV mit der des HeELAV. Cp (*Cavia porcellus*; XP_003479295), ELAV (*embryonic lethal abnormal visual*), Mm (*Mus musculus*; NP_997569), Md (*Monodelphis domestica*; XP_001364932), He (*Hydractinia echinata*) und Hm (*Hydra magnipapillata*; XP_002162771). Die Aminosäuresequenzen sind am rechten Rand durchnummeriert. Das RRM 1 ist hellgrau, das RRM 2 dunkelgelb, die Linker-Region türkis und das RRM 3 gelb gekennzeichnet. Das RNP-2 und -1 ist in roten Buchstaben hervorgehoben. Die potentiellen RNPs des HeELAVs sind unterstrichen.

Der Sequenzvergleich des ELAVs aus *Hydractinia* mithilfe des BLAST-X-Programms von NCBI zeigt die höchste Homologie mit einem E-Value von Null zu einem ELAV aus *Hydra magnipapillata* (XP_002162771). Ein Sequenzvergleich mit verschiedenen Vertretern der Familie von RNA-bindenden ELAV/Hu-Proteinen konnte keinen eindeutigen Nachweis erbringen, um welche ELAV Variante es sich bei diesem Homolog von *Hydractinia* handelt. Aufgrunddessen wird dieses Gen als *HeEmbryonic lethal abnormal visual (HeELAV)* bezeichnet.

3.7.1 *HeELAV* wird in allen existierenden Nervenzelltypen exprimiert und eignet sich somit *in vivo* als neuralspezifischer Marker des Nervensystems von *Hydractinia*

Die Untersuchungen der *in situ*-Hybridisierungen in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *Hydractinia* belegen, dass *HeELAV* keimblattspezifisch exprimiert wird. Das Gen war ausschließlich in ektodermalen Zellen zu finden. Im 1- und 2-Zellstadium konnte keine maternale mRNA nachgewiesen werden. Die *HeELAV*-Expression war 24h nach der Befruchtung im Ektoderm des ganzen Embryos verteilt (s. Abb. 54A). Die Expression war nicht ubiquitär in den ektodermalen Zellen vorhanden, sondern wurde nur in spezifischen Zelltypen lokalisiert. Beginnend in 28h alten Embryonen (s. Abb. 54B) wurde erstmalig eine gradi-

entenförmige Expression von posterior nach anterior zunehmend erkennbar. Diese war im Verlauf der weiteren Entwicklung bis ins Planula-Stadium nachweisbar.

Die höchste *HeELAV*-exprimierende Zellen traten am anterioren Pol, in dessen apikalem Bereich in größter Dichte auf (48h alte Präplanulas in Abb. 54C; Teilansicht einer Planula in Abb. 54D). Im adulten Stadium war die Expression im Ektoderm des Gastrozoiden sichtbar (s. Abb. 54E). Die meisten *HeELAV*-exprimierenden Zellen konnten am anterioren Pol des Gastrozoiden im Hypostombereich und der Tentakelregion lokalisiert werden (s. Abb. 54F). Die Anzahl der Zellen mit *HeELAV*-Expression nahm anfangend unterhalb der Tentakelansatzregion nach basal stark ab (s. Abb. 54E). Die Expression ist auch in diesem Stadium ausschließlich in ektodermalen Zellen vorhanden.

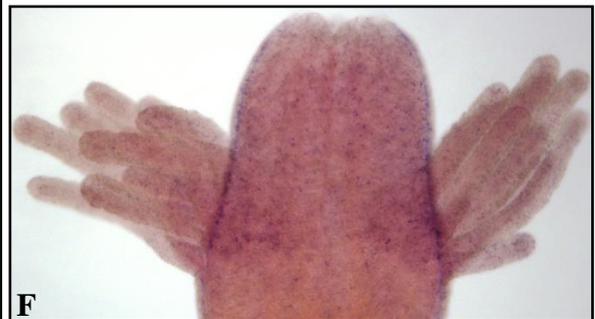
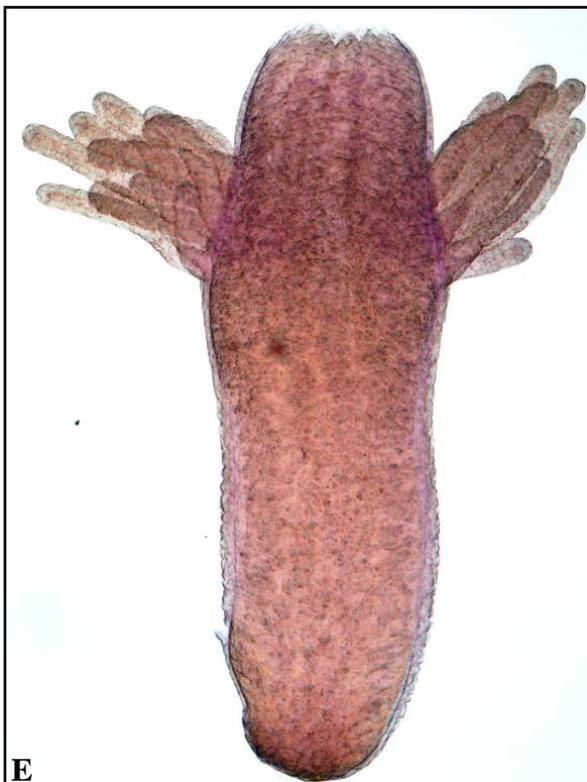
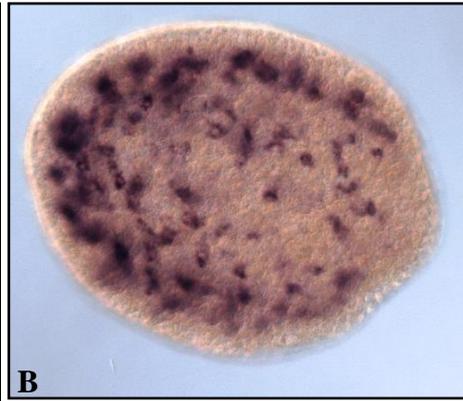
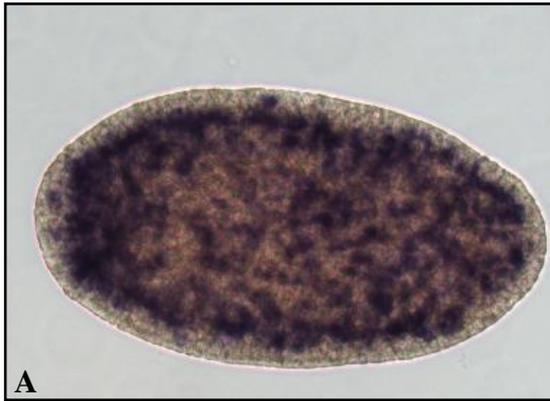


Abb. 54: (s. vorhergehende Seite) *HeELAV*-Expression in ektodermalen Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Hydractinia*. (A) Verteilung in 24h alten Embryonen. (B) In 28h alten Embryonen erstmalig eine leichte gradientenförmige Zunahme der Expression von posterior nach anterior sichtbar. (C) 48h alte Präplanulas. (D) Teilansicht einer Planularlarve. (E) Gesamtansicht eines Gastrozoids. Expression von apikal nach basal. (F) Teilansicht zu (E). Lokalisation der meisten *HeELAV*-expri-mierenden Zellen im Hypostombereich und der Tentakelregion.

Die Eignung von *HeELAV* als neuralspezifischer Marker von möglichst vielen Zellen bzw. verschiedenen Zelltypen des Nervensystems in *Hydractinia*, sollte durch *in vivo*-Expressionsstudien anhand des Reportergens *eGFP* unter der Kontrolle der 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeELAV* untersucht werden. Aus dem Genom von *Hydractinia* konnten mittels Splinkerette-PCR Teilbereiche der 5`- und 3`regulatorischen Regionen sowie der codierenden Sequenz von *HeELAV* (Sequenzen s. Anhang; 7.1.9.2 und 7.1.9.3) isoliert werden. In der 5`regulatorischen Region kann eine potentielle TATA-Box mit dem Sequenzmotiv CATAAATT (nt 1472-1479; Sequenz s. Anhang; 7.1.9.2) im charakteristischen Abstand zum potentiellen Transkriptionsstart (nt 1501) lokalisiert werden (Bucher, 1990; Patikoglou et al., 1999). Stromaufwärtsgelegen vor dieser TATA-Box kann noch ein weiteres kennzeichnendes regulatorisches Kontrollelement der Gentranskription identifiziert werden. Es sind drei mögliche CCAAT-Box-Sequenzmotive (Bucher, 1990) an den Positionen nt 1361-1365, 1394-1398 und 1405-1409 (Sequenz s. Anhang; 7.1.9.2) vorhanden. Die 3`regulatorische Region enthält im 3`nicht-translatierten Bereich vom Translationsstopcodon bis zum potentiellen Polyadenylierungsstartpunkt zwei mögliche Polyadenylierungssignale (Beaudoing et al., 2000) an den Positionen nt 277-282 und 312-317 (Sequenz s. Anhang; 7.1.9.3).

Die Funktionalität der 5`- und 3`regulatorischen Regionen von *HeELAV* wurden mithilfe der drei Reportergenkonstrukte *HeELAV5IASActeGFPHeEF1alpha*, *HeELAV5IASActeGFP* und *HeELAVeGFP* (Sequenzen s. Anhang; 7.2.6.1, 7.2.6.2 und 7.2.6.3) untersucht. Im Genkonstrukt *HeELAV5IASActeGFPHeEF1alpha* ist der 5`regulatorischen Region von *HeELAV* folgend der codierende Bereich der ersten 51 AS von *HeActII* und die *NotI*-Klonierungskassette im Leserahmen mit *eGFP* fusioniert, gefolgt von der 3`regulatorischen Region von *HeEF1alpha* (s. Abb. 55). Die Termination der Transkription erfolgt in den beiden anderen Expressionskonstrukten durch die 3`regulatorische Region von *HeELAV*. Im *HeELAV-5IASActeGFP* folgt der 5`regulatorischen Region im Leserahmen der codierende Bereich der ersten 51 AS von *HeActII* und die *NotI*-Klonierungskassette fusioniert mit *eGFP* (s. Abb. 55).

Dagegen flankieren im *HeELAVeGFP* die 5⁻- und 3⁻regulatorischen Regionen nur das Reportergen *eGFP* (s. Abb. 55).

Alle drei Konstrukte führten in Transgenen erfolgreich zur Expression von GFP. Die Expressionsmuster der drei Genkonstrukt-Varianten von *HeELAV* waren offensichtlich gleich. Es konnten 19 Stunden nach der Injektion sowohl im Transgen *HeELAV51AS-ActeGFP-HeEF1alpha* als auch im *HeELAV51ASActeGFP* mit der 3⁻regulatorischen Regionen von *HeELAV* die ersten eGFP-exprimierenden Zellen detektiert werden. Die 51 AS des HeActII N-terminal vor dem eGFP hatten keinen Einfluss auf die Expression bzw. die Lokalisation des Reporterproteins. Auch liessen sich keine Unterschiede der Expression in Abhängigkeit der terminierenden Region ausmachen. Aufgrund dieser Beobachtungen werden die Expressionsstudien dieser drei Reportergenkonstrukte nachfolgend unter der Bezeichnung des Transgens als *HeELAV:eGFP* zusammengefasst beschrieben.

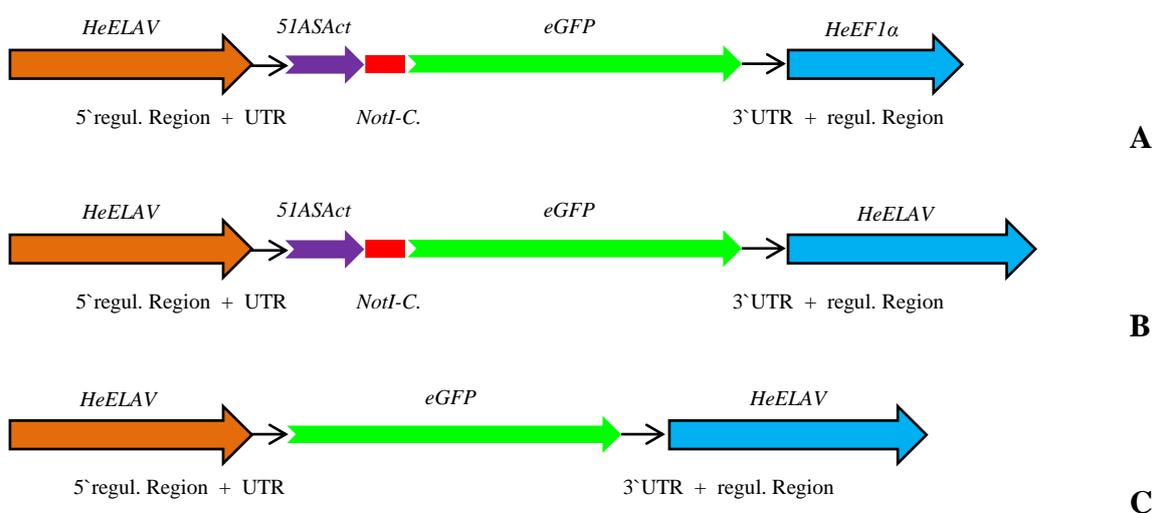


Abb. 55: Schematische Darstellung der drei Expressionskonstrukte *HeELAV51ASAct-eGFPHeEF1alpha* (A), *HeELAV51ASActeGFP* (B) und *HeELAVeGFP* (C). He (*Hydractinia echinata*), *HeELAV* (*HeEmbryonic lethal abnormal visual*), *51ASAct* (codierender Bereich der ersten 51 AS von *HeAktinII*), *eGFP* (*enhanced GFP*), *HeEF1α* (*HeElongationsfaktor 1 alpha*), regul. Region (regulatorische Region), UTR (untranslatierte Region) und *NotI-C.* (NotI-Cassette).

Es wurden bereits 19 Stunden nach der Injektion transgene Versuchstiere mit ersten wenigen eGFP-exprimierenden Zellen entdeckt. Nach 5 Stunden weiterer Entwicklung konnten in den 24h alten Embryonen deutlich mehr Zellen mit eGFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Die

Verteilung der *HeELAV:eGFP*-exprimierenden Zellen war in diesem Stadium und auch in den späteren Entwicklungsstadien einschließlich der Planularlarve zufällig in den Transgenen. In der weiteren Entwicklung bis hin zur Planularlarve konnten I-Zellen und I-Zellderivate, wie z.B. Nematocyten, sensorische und ganglionische Neuronen, beobachtet werden. Nach 48 Stunden konnten im Ektoderm des apikalen Bereichs der Präplanulas (Abb. 56 A, B) vermehrt sensorische Nervenzellen (s. rote Pfeile) identifiziert werden.

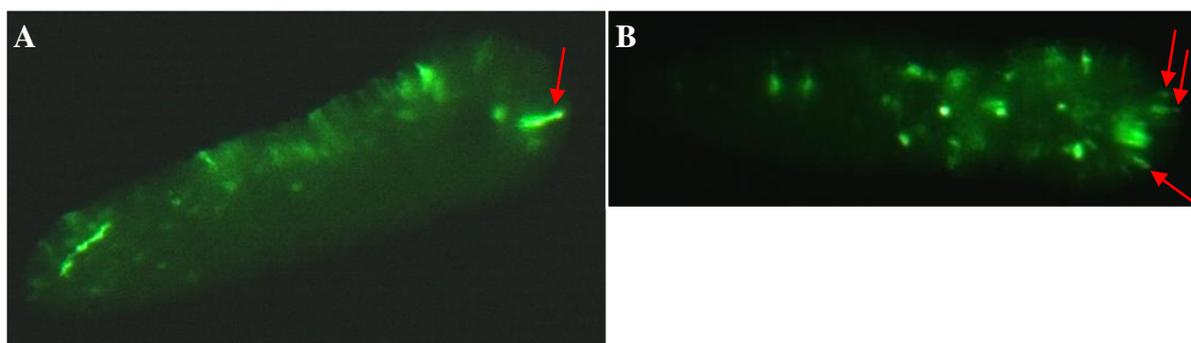


Abb. 56: Expressionsanalyse in transgenen *HeELAV:eGFP*-Präplanulas. (A, B) *eGFP*-exprimierende sensorische Nervenzellen (s. rote Pfeile) im apikalen Bereich.

Nach 72h Entwicklung konnten eine Vielzahl von eGFP-markierten sensorischen Nervenzellen im anterioren Bereich (s. Abb. 57A) sowie in der Region der apikalen sensorischen Grube (s. Abb. 57B) der Planularlarven (Plickert, 1989) detektiert werden. In Abb. 57C ist eine Larve gezeigt, in der apikal eine sensorische Nervenzelle im Ektoderm lokalisiert (s. roter Pfeil) und mit dem Zellfortsatz (s. weißer Pfeil) einer ganglionischen Nervenzelle verschaltet ist. Der Nervenzellfortsatz verläuft von apikal nach posterior (s. weiße Pfeilspitzen). Es konnten vermehrt bipolare Nervenzellen beobachtet werden, die aus dem anterioren Bereich bis in den posterioren Schwanzbereich verlaufen, wie beispielsweise in Abb. 57D gezeigt. Wie anhand dieser drei *eGFP*-exprimierenden Nervenzellen der Planularlarve in Abb. 57D zu sehen, ist das Nervensystem von *Hydractinia* sowohl longitudinal (s. weiße Pfeilspitzen) als auch transversal (s. rote Pfeilspitzen) zur Körperachse vernetzt. Die Perikarya (s. weißer Pfeil) der obersten sowie der von anterior nach posterior verlaufenden bipolaren Nervenzellen sind aufgrund der intensiven eGFP-Fluoreszenz identifizierbar.

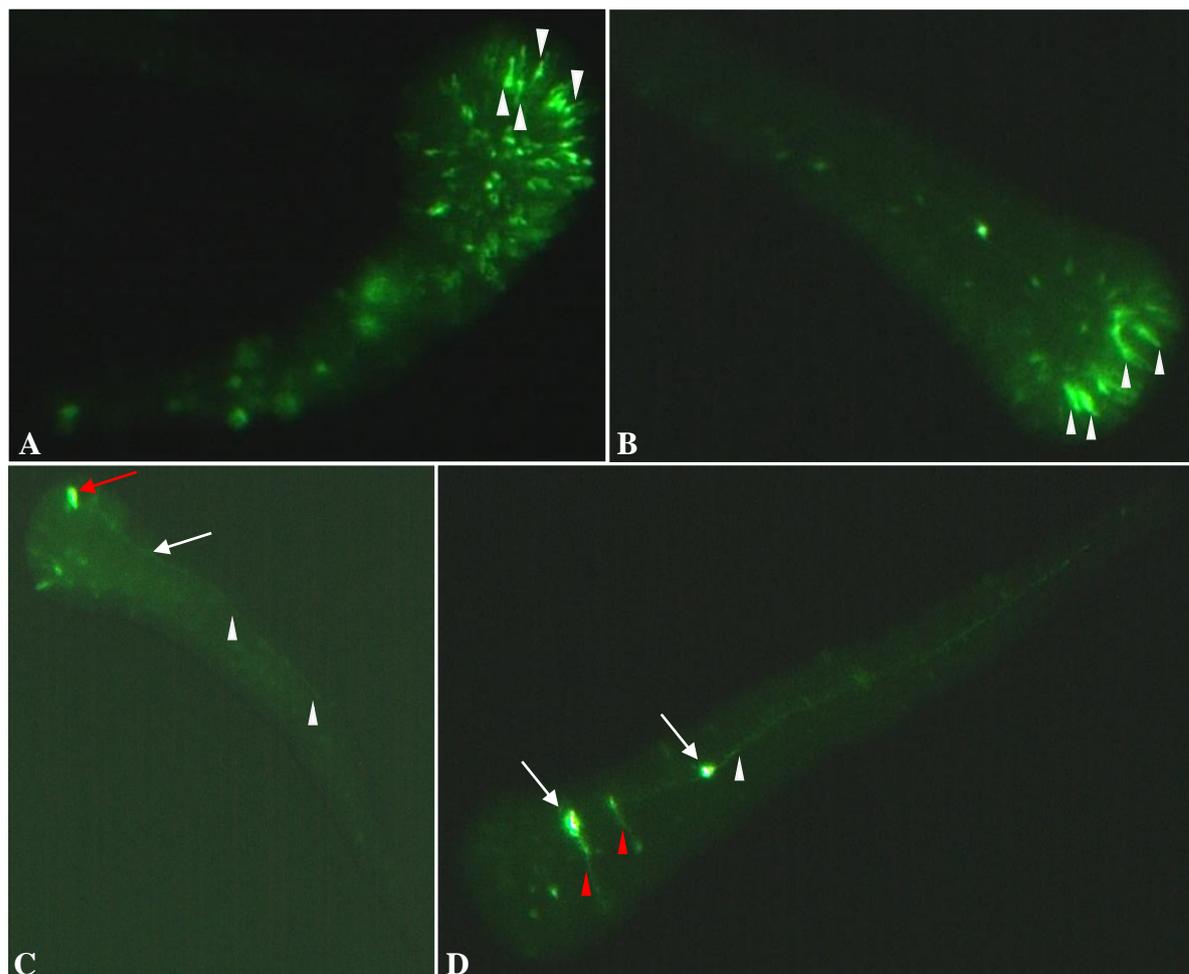


Abb. 57: *HeELAV:eGFP*-Expression in transgenen Planularlarven. (A, B) eGFP-markierte sensorische Nervenzellen (vier exemplarisch durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet) im anterioren Bereich (A) und in der Region der apikalen sensorischen Furche (B). (C) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. Apikal gelegene sensorische Nervenzelle (s. roter Pfeil) verschaltet mit dem Zellfortsatz (s. weißer Pfeil) einer ganglionischen Nervenzelle, die von apikal nach posterior verläuft (s. weiße Pfeilspitzen). (D) eGFP-markierte bipolare Nervenzelle (s. weiße Pfeilspitzen) aus dem anterioren Bereich posterior in den Schwanzbereich verlaufend. Zwei weitere *eGFP*-exprimierende Nervenzellen (s. rote Pfeilspitzen) sind transversal zur Körperachse angeordnet. Zwei Perikaryons (s. weiße Pfeile) sind durch die intensive eGFP-Fluoreszenz gut zu identifizieren.

Es konnte neben Nervenzellen auch andere Zellen mit GFP Fluoreszenz beobachtet werden. Diese konnten nicht typisiert werden. Die *HeELAV:eGFP*-Expression war transient in den Larven. Die eGFP-Fluoreszenz konnte nach der Metamorphose nur in wenigen Versuchstieren im postmetamorphen Stadium von *Hydractinia* detektiert werden. Die *HeELAV:eGFP*-Expression wurde ausser in epidermalen Epithelzellen in Tentakeln und Stolonen auch in I-Zellen und deren Zellerivaten beobachtet.

In adulten Tieren zeigte eGFP-Fluoreszenz die Aktivität von ELAV in Nematocyten, sensorischen und ganglionischen Neuronen. Im apikalen Bereich des Polypens in Abb. 58 (A, B) ist eine *eGFP*-exprimierende ganglionische Nervenzelle in der Tentakelregion zu sehen.

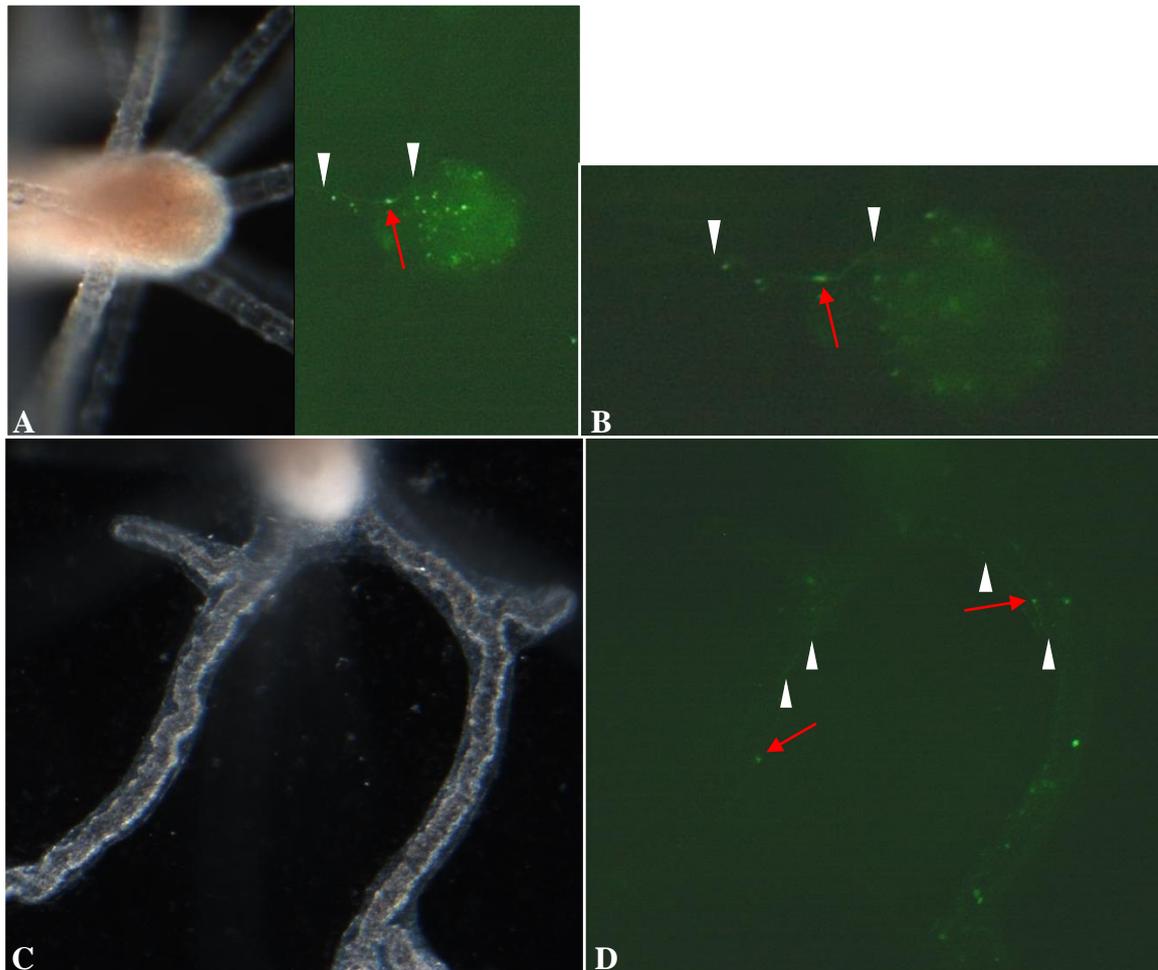


Abb. 58: Expressionsanalyse transgener *HeELAV:eGFP*-Gastrozoide. (A) Hellfeld-, eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme und (B) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme. *eGFP*-exprimierende bipolare Nervenzelle in der Tentakelregion des apikalen Bereichs. Das Perikaryon (s. roter Pfeil) liegt im Bereich des Hypostoms zwischen zwei Tentakeln, in diese die beiden Zellfortsätze (s. weiße Pfeilspitzen) innervieren. (C) Hellfeld-Aufnahme von Stolonen. (D) eGFP-Fluoreszenz-Aufnahme zu (C). Lokalisation von zwei eGFP-markierten bipolaren Nervenzellen in zwei Stolonen. Die Zellkörper (s. rote Pfeilspitze) sind gut sichtbar. Der Verlauf der Zellfortsätze (s. weiße Pfeilspitzen) im Stolon ist durch die schwächere eGFP-Fluoreszenz schwierig zu verfolgen.

Das Perikaryon (s. rote Pfeile) dieser bipolaren Nervenzellen liegt im Hypostombereich zwischen zwei Tentakeln. Die zwei Zellfortsätze (s. weiße Pfeilspitzen) der bipolaren Nerven-

zelle innervieren in die beiden nebeneinanderliegenden Tentakel. In den zwei Stolonen dieses Polypens in Abb. 58B sind zwei eGFP-markierte ganglionische Nervenzellen zu sehen. Das Perikaryon (s. rote Pfeilspitze) dieser bipolaren Nervenzellen ist gut sichtbar, während deren Fortsätze (s. weiße Pfeilspitzen) und dessen weiterer Verlauf im Stolon durch die schwächere eGFP-Fluoreszenz schwierig zu verfolgen ist.

Das Transgen *HeELAV:eGFP* ermöglichte *in vivo* den Nachweis von allen in den Cnidariern existierenden Nervenzelltypen auch in *Hydractinia*. Neben den Nematocyten und den sensorischen Neuronen konnten in den *HeELAV:eGFP*-exprimierenden Transgenen auch der ganglionische Nervenzelltyp mit unter anderem sehr langen bipolaren Nervenzellen sowohl in der Larve als auch im Stolon beobachtet werden. Diese sogenannten Riesenbipolaren-Nervenzellen (*giant bipolar neuron*) mit einer Länge von mindestens 250µm konnten zuvor mithilfe der Expressionskonstrukte *HeActII51ASActeGFP* und *HeEF1alpha51ASActeGFP* im Nervensystem von *Hydractinia* nachgewiesen werden (Künzel et al., 2010). Diese beiden Expressionskonstrukte hatten erstmals *in vivo* eine Markierung des Nervensystems von *Hydractinia* erlaubt. Im Unterschied zu diesen beiden ubiquitär exprimierten Genen, war mithilfe von *HeELAV*, mit Ausnahme von einigen wenigen nicht-nervenzellspezifischen Zellen, erstmalig *in vivo* der nahezu freie Anblick der drei Nervenzelltypen von *Hydractinia* als auch die Vernetzung des Nervensystems transversal und longitudinal zur Körperachse der Larve gewährt.

Das Gen *HeELAV* bzw. das Transgen *HeELAV:eGFP* ermöglicht als neuralspezifischer Marker *in vivo* Studien der Entstehung und des komplexen Aufbaus des Nervensystems in *Hydractinia*.