

**Untersuchung zur Rolle Ras-vermittelter
Signaltransduktion in *Hydractinia echinata*
(Cnidarier)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Wido Tilmann
aus Köln

Copy-Star Druck&Werbung GmbH 50937, Köln

Köln, 2015

Berichtersteller:

Prof. Dr. Günter Plickert
PD. Dr. Michael Kroiher

Tag der mündlichen Prüfung:

16.01.2015

Für meine Frau Miriam und für meine Eltern.

Ihr wart mir immer eine große Stütze.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis.....	V
	Tabellenverzeichnis.....	IX
	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	XI
1	Einleitung	1
1.1	<i>Hydractinia echinata</i>	3
1.2	Ras-Proteine	5
1.2.1	Ras-Aktivierung	6
1.2.2	Ras-Protein gesteuerte Signalwege	8
1.2.2.1	RAF-MEK-ERK Kaskade.....	9
1.2.2.2	Die „phosphoinositid 3-kinase“ (PI3K)-Kaskade.....	9
1.2.2.3	Signalweiterleitung über Mitglieder der RALGDS-Proteinfamilie.....	10
1.2.2.4	Weitere Ras-Effektoren.....	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Laborgeräte	12
2.1.2	Verwendete Chemikalien	13
2.1.3	Gebrauchswaren.....	14
2.1.4	Nährmedien für Bakterien.....	14
2.1.5	Klonierungsvektoren	14
2.1.6	Kompetente Bakterien.....	15
2.1.7	Synthetische Oligonukleotide.....	15
2.1.8	Verwendete Enzyme, Enzym-Mixe und Antikörper	18
2.1.9	Verwendete Puffer und Lösungen.....	19
2.1.10	Gebrauchsfertige Kits.....	21
2.1.11	Verwendete Computer Software	21
2.2	Tierbezogene Methoden.....	22
2.2.1	Hälterung von <i>Hydractinia echinata</i>	22
2.2.2	Fixierung von <i>Hydractinia echinata</i> Stadien.....	23
2.2.3	Induktion der Metamorphose	23
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.3.2	RACE-PCR	25
2.3.3	Quantitative-PCR (qPCR)	27
2.3.4	RNA-Isolierung.....	28
2.3.5	cDNA-Synthese.....	29

2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.3.7	Extraktion von Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
2.3.8	Photometrische Konzentrationsmessung von DNA oder RNA.....	31
2.3.9	Sequenzierung	32
2.3.10	Klonierung von Fragmenten.....	32
2.3.10.1	Herstellung stumpfendiger Vektoren	33
2.3.10.2	Phosphorylierung stumpfendiger PCR-Produkte	33
2.3.10.3	Ligations-Ansatz.....	34
2.3.10.4	Transformation von Bakterien.....	35
2.3.11	Analyse der Transformation	36
2.3.11.1	Kombinatorisches Analyse-Verfahren	36
2.3.11.2	Analyse einzelner Kolonien	37
2.3.12	Herstellung von Bakterien-Übernachtskulturen.....	37
2.3.13	Plasmid-Isolierung aus Bakterien.....	38
2.3.14	Reinigungsfällung von Plasmid-DNA.....	38
2.3.15	Mikroinjektion.....	39
2.3.15.1	Amplifikation von Injektionsmaterial	39
2.3.15.2	Mikroinjektion in Ein- und Zweizell-Embryonalstadien.....	40
2.3.16	in-situ-Hybridisierung	40
2.3.16.1	Herstellung von in-situ-Sonden.....	40
2.3.16.2	Ligation von PCR-Fragmenten in pBSIISK- und Transformation.....	41
2.3.16.3	Amplifikation von Matrizen für in-situ-Sonden.....	42
2.3.16.4	„Run-off-Transkription“.....	42
2.3.16.5	in-situ-Hybridisierungs-Protokoll	43
2.3.17	Herstellung von <i>Hydractinia echinata</i> Semidünnschnitt-Präparaten	44
2.3.18	Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA).....	45
2.3.18.1	RNA Interferenz (RNAi).....	46
2.3.19	Detektion proliferierender Zellen.....	47
2.4	Mikroskopie	48
2.5	Bioinformatische Methoden	48
2.5.1	Identifikation an Ras-Signalwegen beteiligter Proteine in <i>Hydractinia echinata</i>	48
2.5.1.1	BLAST-Analyse.....	48
2.5.1.2	Phylogenetische Analyse.....	49
2.5.1.3	Vergleich von Protein-Domänen.....	50
2.5.2	Vergleichende Transkriptom-Analyse in transgenen GFPRas1-(Q67V)-, GFPRas2(Q67)- und in Wildtyp-Kolonien	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Identifikation von <i>Hydractinia echinata</i> Ras	52

3.1.1	Charakterisierung von <i>Hydractinia echinata</i> Ras1 und Ras2.....	53
3.1.2	Phylogenetische Einordnung von <i>Hydractinia echinata</i> Ras1 und Ras2	57
3.2	Konservierte Proteine Ras gesteuerter Signalwege in <i>Hydractinia echinata</i>	59
3.2.1	„extracellular signal regulated kinase 1 and 2“ (ERK1/2) Kinase-Kaskade in <i>Hydractinia echinata</i>	59
3.2.2	„phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3K)-Kaskade in <i>Hydractinia echinata</i>	67
3.2.3	TIAM1 und Rac1 in <i>Hydractinia echinata</i>	76
3.2.4	RALGDS, Ral und Phospholipase D (PLD) in <i>Hydractinia echinata</i>	79
3.2.5	„son of sevenless“ (SOS), „neurofibromatosis related protein1“ (NF1) und „Ras p21 protein activator (GTPase activating protein 1)“ (RASA1 oder auch GAP) in <i>Hydractinia echinata</i> ..	86
3.3	Expression von <i>Ras1</i> - und <i>Ras2</i> -mRNA in Entwicklungsstadien von <i>Hydractinia echinata</i> ...	92
3.4	„in vivo“ Analyse von <i>Hydractinia echinata</i> Ras1 und Ras2.....	98
3.4.1	dsRNAi.....	99
3.4.2	Überexpression/Missexpression von Wildtyp-Ras1 oder -Ras2 in <i>Hydractinia echinata</i>	100
3.4.3	Mutagenisiertes Ras1 oder Ras2 in <i>Hydractinia echinata</i>	103
3.4.3.1	Expression von mutagenisiertem Ras1 in <i>Hydractinia echinata</i>	105
3.4.3.2	Expression von <i>Ras1</i> in Transgenen und Wildtyp-Kolonien auf Transkriptions-Ebene	109
3.4.3.3	Morphologie transgener GFPRas1(G18V) undGFPRas1-(Q67V) <i>Hydractinia echinata</i> Gastrozoide.....	110
3.4.3.4	Charakterisierung morphologischer Veränderungen in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden.....	112
3.4.3.5	Expression von mutagenisiertem Ras1 und Proliferation in <i>Hydractinia echinata</i>	118
3.4.3.6	Expression von mutagenisiertem Ras2 in <i>Hydractinia echinata</i>	121
3.4.3.7	Expression von <i>Ras2</i> in Transgenen und Wildtyp-Kolonien auf Transkriptions-Ebene	123
3.4.3.8	Morphologie transgener GFPRas2(G18V) und GFPRas2-(Q67V) <i>Hydractinia echinata</i> Gastrozoide.....	124
3.4.3.9	Phänotypische Veränderung transgener GFPRas2(Q67V) <i>Hydractinia echinata</i> Polypen.....	126
3.4.4	Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen Ras-Protein gesteuerten Signalwegen und dem kanonischen Wnt-Signalweg in <i>Hydractinia echinata</i>	130
3.4.5	Vergleichende Transkriptom-Analyse in einer transgenen GFPRas1(Q67V)-, GFPRas2(Q67V)- und in einer Wildtyp-Kolonie.....	133
4	Diskussion	139
4.1	Ras-Proteine in <i>Hydractinia echinata</i>	139
4.2	Expression von <i>Hydractinia echinata</i> Ras1 und Ras2	141
4.2.1	Behandlung von <i>Hydractinia echinata</i> mit <i>Ras1</i> - oder <i>Ras2</i> -dsRNA.....	143
4.3	Überexpression von mutagenisiertem <i>Hydractinia echinata</i> Ras1 und Ras2.....	144
4.3.1	Durch mutagenisiertes Ras1 erzeugter Phänotyp in <i>Hydractinia echinata</i>	146
4.3.2	Durch mutagenisiertes GFPRas2 erzeugter Phänotyp in <i>Hydractinia echinata</i>	149

4.4	mRNA-Expressionsprofile in Transgenen mit aktiviertem Ras1 und Ras2	153
4.5	Ras-Protein gesteuerte Signalwege in <i>Hydractinia echinata</i>	155
4.5.1	ERK-Kinase-Kaskade in <i>Hydractinia echinata</i>	155
4.5.2	„phosphoinositid-3-kinase“ (PI3K)-Kaskade in <i>Hydractinia echinata</i>	157
4.5.3	Ras-Signalweiterleitung über TIAM1 und Rac1 in <i>Hydractinia echinata</i>	159
4.5.4	RALGDS, Ral und PLD-Signalweg in <i>Hydractinia echinata</i>	161
4.5.5	Ras-Signalweiterleitung über „Phospholipase Cε“ (PLCε) und „Protein-kinase C“ (PKC)....	163
4.5.6	„son of sevenless“ (SOS), „neurofibromatosis related protein 1“ (NF1) und „Ras p21 protein activator (GTPase activating protein 1)“ (RASA1 oder auch GAP) in <i>Hydractinia echinata</i>	164
4.6	Ausblick	166
5	Zusammenfassung	169
6	Literaturverzeichnis	171
7	Anhang	183
8	Danksagung	210
9	Erklärung	211
10	Lebenslauf	212

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Der Lebenszyklus von <i>Hydractinia echinata</i>	4
Abb.2	Ras als molekularer Schalter	7
Abb.3	Ras-Effektor-Signalwege	8
Abb.4	Plasmid-Karte von HeAktIIIGFPAktIIterm	33
Abb.5	Kombinatorisches-Beladungsschema einer 36er Well-Platte.....	36
Abb.6	Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Ras-Proteinen unterschiedlicher Organismen.....	55
Abb.7	Vergleich Ras spezifischer Sequenzmotive.....	56
Abb.8	Phylogramm mit <i>Hydractinia</i> Ras1- und Ras2-Aminosäure-Sequenzen und Ras-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	58
Abb.9	Phylogramm mit <i>Hydractinia</i> RAF und RAF-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	61
Abb.10	Konservierte Domänen in <i>Hydractinia</i> und <i>Homo sapiens</i> RAF-Proteinen.....	62
Abb.11	Phylogramm mit <i>Hydractinia</i> MEK- und MEK-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	63
Abb.12	Konservierte Domänen in <i>Hydractinia</i> und <i>Homo sapiens</i> MEK-Proteinen.....	64
Abb.13	Phylogramm mit <i>Hydractinia</i> ERK- und ERK-Aminosäure Sequenzen anderer Organismen .	65
Abb.14	Konservierte Domänen in <i>Hydractinia</i> ERK und menschlichen ERK-Proteinen	66
Abb.15	Phylogramm mit <i>Hydractinia</i> p110-1- und p110-2-Aminosäure-Sequenzen und p110-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	69
Abb.16	Konservierte Domänen in <i>Hydractinia</i> p110- und <i>Homo sapiens</i> p110-Proteinen	70
Abb.17	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> PDK1-Aminosäure-Sequenz und PDK1-Sequenzen anderer Organismen	71
Abb.18	Konservierte Domänen in <i>Hydractinia</i> und <i>Homo sapiens</i> PDK1	72
Abb.19	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> AKT-Aminosäure-Sequenz und AKT-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	73
Abb.20	Konservierte Domänen in <i>Hydractinia</i> AKT und AKT-Proteinen anderer Organismen	75
Abb.21	Konservierte Domänen in dem potenziellen <i>Hydractinia</i> TIAM-Protein und in TIAM1- und TIAM2-Proteinen anderer Organismen.....	77
Abb.22	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> Rac1-Aminosäure-Sequenz und Rac1-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	78
Abb.23	Konservierte Domänen in dem potenziellen <i>Hydractinia</i> Rac1-Protein und in einem <i>Homo sapiens</i> Rac1-Protein.....	79
Abb.24	Konservierte Domänen in dem möglichen <i>Hydractinia</i> RGL1-Protein und in dem <i>Homo sapiens</i> RGL1-Protein	80
Abb.25	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> RAL-Aminosäure-Sequenz und RAL-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	82

Abb.26	Konservierte Domänen in dem möglichen <i>Hydractinia</i> RAL-Protein und in RAL-Proteinen anderer Organismen	83
Abb.27	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> PLD-Aminosäure-Sequenz und PLD-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	84
Abb.28	Konservierte Domänen in dem potenziellen <i>Hydractinia</i> PLD-Protein und in PLD-Proteinen anderer Organismen	85
Abb.29	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> SOS-Aminosäure-Sequenz und SOS-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	87
Abb.30	Konservierte Domänen in dem möglichen <i>Hydractinia</i> SOS und in SOS-Proteinen anderer Organismen	88
Abb.31	Konservierte Domänen in dem potenziellen <i>Hydractinia</i> NF1-Protein und in einem <i>Homo sapiens</i> NF1-Protein	89
Abb.32	Phylogramm mit der <i>Hydractinia</i> RASA1-Aminosäure-Sequenz und RASA1-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen	90
Abb.33	Konservierte Domänen in dem potenziellen <i>Hydractinia</i> RASA1- und in dem RASA1-Protein des Menschen.....	91
Abb.34	Lokalisation von <i>Hydractinia Ras1</i> - und <i>Ras2</i> -mRNA-Transkripten in 24 Stunden alten Embryonen und 72 Stunden alten Planula-Larven.	93
Abb.35	Lokalisation von <i>Hydractinia Ras1</i> - und <i>Ras2</i> -mRNA-Transkripten in Primär-Polypen.....	94
Abb.36	Lokalisation von <i>Hydractinia Ras1</i> - und <i>Ras2</i> -mRNA-Transkripten in Gastrozoiden.....	96
Abb.37	Lokalisation von <i>Hydractinia Ras1</i> - und <i>Ras2</i> -mRNA-Transkripten in Gonozoiden.....	97
Abb.38	Erzeugte Ras1- und Ras2-Konstrukte	101
Abb.39	Transgener GFPRas1-Gastrozoid.....	102
Abb.40	Transgener GFPRas2-Gastrozoid.....	102
Abb.41	Vergleich charakteristischer Aminosäuren in "klassischen" H-, K- und N-Ras- sowie RRas2(TC21)-Sequenzen des Menschen mit entsprechenden Sequenzabschnitten von Cnidarier Ras-Sequenzen	104
Abb.42	Durch Punktmutationen hervorgerufene Aminosäure-Austausche in <i>Hydractinia Ras1</i> oder <i>Ras2</i>	104
Abb.43	GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen <i>Hydractinia</i> Embryonen	106
Abb.44	GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen <i>Hydractinia</i> Planula-Larven	107
Abb.45	GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen <i>Hydractinia</i> Gastrozoiden	108
Abb.46	Expression von <i>Ras1</i> -Transkripten in einer transgenen <i>Hydractinia</i> GFPRas1(Q67V)-Kolonie im Vergleich zu einer Wildtyp-Kolonie	109

Abb.47	Veränderung der Tentakel-Morphologie in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden von <i>Hydractinia</i>	111
Abb.48	Histologische Untersuchung an Semi-Dünnschnittpräparaten eines transgenen, den Phänotyp zeigenden Gastrozoiden im Bereich der Körpersäule und im Bereich eines Tentakels im Vergleich mit dem Wildtyp	113
Abb.49	Tentakel-Morphologie transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoide und in einem Wildtyp-Gastrozoid	116
Abb.50	„life-imaging“ einer morphologischen Veränderung in einem transgenen GFPRas1(G18V)-Gastrozoid Tentakel	117
Abb.51	EdU markierte S-Phase-Kerne in Wildtyp- und Transgenen-Gastrozoiden	119
Abb.52	GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in <i>Hydractinia</i> Embryonen	121
Abb.53	GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in einer <i>Hydractinia</i> Planula-Larve	122
Abb.54	GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in <i>Hydractinia</i> Gastrozoiden	123
Abb.55	Vergleich der Expression von <i>Ras2</i> -Transkripten in transgener GFPRas2(Q67V)- und Wildtyp-cDNA	124
Abb.56	Tentakel eines transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden	125
Abb.57	Morphologische Veränderung im Bereich der Körpersäule transgener GFPRas2(Q67V)-Gastrozoide	126
Abb.58	Sekundäre Körperachse in einem transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden	127
Abb.59	Bildung eines atypischen Stolons, basal an einem GFPRas2(Q67V)-Gastrozoid	128
Abb.60	Sekundäre Körperachsen in transgenen, weiblichen GFPRas2(Q67V)-Gonozoiden	129
Abb.61	Vergleich der relativen Expression von Transkripten, am Wnt-Signalweg beteiligter Gene in cDNA einer transgenen GFPRas1(Q67V)-Kolonie und im Wildtyp	132
Abb.62	Vergleich der relativen Expression von Transkripten, am Wnt-Signalweg beteiligter Gene in cDNA aus einer transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonie und im Wildtyp	133
Abb.63	"heatmap" der Illumina-HighSeq-Reads	134
Abb.64	Relative Expression der gleichen Gene in GFPRas1(Q67V)-, GFPRas2(Q67V)- und in einer Wildtyp-cDNA („cluster 3“)	135
Abb.65	Relative Expression der gleichen Gene in einer GFPRas1(Q67V)-, einer GFPRas2(Q67V)- und in einer Wildtyp-cDNA („cluster“ 10)	136

Abbildungen Anhang

Abb.1	<i>Hydractinia</i> Ras1	183
Abb.2	<i>Hydractinia</i> Ras2	183
Abb.3	Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> RAF-Proteins	183
Abb.4	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> RAF mit RAF-Sequenzen des Menschen	185
Abb.5	Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> MEK-Proteins	185

Abb.6	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> MEK mit MEK-Sequenzen des Menschen	186
Abb.7	Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> ERK-Proteins.....	186
Abb.8	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> ERK mit ERK1 und ERK2 des Menschen.....	187
Abb.9	Sequenzen von zwei möglichen <i>Hydractinia</i> p110-Proteinen.....	187
Abb.10	Sequenzvergleich der möglichen <i>Hydractinia</i> p110-Proteine mit p110 alpha und beta des Menschen	189
Abb.11	Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> PDK1-Proteins.....	190
Abb.12	Sequenzvergleich der möglichen <i>Hydractinia</i> PDK1 mit PDK1-Sequenzen anderer Organismen	191
Abb.13	Aminosäure-Sequenzen möglicher <i>Hydractinia</i> AKT-Proteine.....	191
Abb.14	Sequenzvergleich der möglichen <i>Hydractinia</i> AKT-Proteine mit AKT-Sequenzen anderer Organismen	192
Abb.15	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> TIAM-Proteins.....	193
Abb.16	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> TIAM mit Sequenzen anderer Organismen ...	196
Abb.17	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> Rac1-Proteins.....	196
Abb.18	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> Rac1-Proteins mit Rac1-Sequenzen anderer Organismen	197
Abb.19	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> RALGDSlike-1 (RGL1)-Proteins	197
Abb.20	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> RALGDSlike-1(RGL1) mit RALGDSlike1-Sequenzen anderer Organismen	199
Abb.21	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> RAL-Proteins	199
Abb.22	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> RAL-Proteins mit RAL-Proteinen anderer Organismen	199
Abb.23	Aminosäure-Sequenz der möglichen <i>Hydractinia</i> PLD.....	200
Abb.24	Sequenzvergleich der möglichen <i>Hydractinia</i> PLD mit PLD1 und PLD2 des Menschen	201
Abb.25	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> SOS-Proteins.....	202
Abb.26	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> SOS-Proteins mit SOS1 und SOS2 des Menschen	203
Abb.27	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> NF1-Proteins.....	204
Abb.28	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> NF1 mit NF1-Proteinen anderer Organismen	205
Abb.29	Aminosäure-Sequenz des möglichen <i>Hydractinia</i> RASA1(GAP)-Proteins.....	206
Abb.30	Sequenzvergleich des möglichen <i>Hydractinia</i> RASA1(GAP)-Proteins mit RASA1(GAP)-Proteinen anderer Organismen.....	207
Abb.31	Sequenz der erzeugten HeAktIIGFPRas1 oder -Ras2 Konstrukte	209

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Genspezifische Oligonukleotide.....	16
Tab.2	RACE-PCR-Oligonukleotide	16
Tab.3	Plasmid spezifische Oligonukleotide	17
Tab.4	Oligonukleotide für qPCR-Versuche	18
Tab.5	2,5 fach „Master-Mix“	24
Tab.6	Parameter der PCR	24
Tab.7	5´ RACE-PCR	25
Tab.8	3´ RACE-PCR	26
Tab.9	Parameter der RACE-PCR	26
Tab.10	qPCR-Ansatz.....	27
Tab.11	Parameter der qPCR.....	27
Tab.12	cDNA-Synthese-Ansatz	30
Tab.13	Sequenzier-PCR-Ansatz.....	32
Tab.14	Parameter der Sequenzier-PCR	32
Tab.15	Phosphorylierungs-Ansatz.....	34
Tab.16	Ligations-Ansatz	34
Tab.17	Restriktions-Ansatz	41
Tab.18	Dephosphorylierung von Vektoren	41
Tab.19	Run-off Transkriptions-Ansatz.....	42
Tab.20	Template für dsRNA	46
Tab.21	<i>Hydractinia echinata</i> Trinity-Transkriptom-Datenbank	49
Tab.22	Probenmaterial aus dem Illumina-HighSeq-Reads erzeugt wurden.....	50
Tab.23	An der ERK1/2-Kinase-Kaskade beteiligte Proteine des Menschen und mögliche in <i>Hydractinia</i> identifizierte homologe Proteine	60
Tab.24	An der PI3K-Kinase-Kaskade beteiligte Proteine des Menschen und mögliche in <i>Hydractinia</i> identifizierte homologe Proteine	67
Tab.25	TIAM1 und Rac1 des Menschen und mögliche homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>	76
Tab.26	RALGDS-, Ral- und Phospholipase D-Proteine des Menschen und mögliche homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>	79
Tab.27	SOS1/2-, NF1- und RASA1 (GAP)-Proteine des Menschen und mögliche identifizierte homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>	86
Tab.28	Anteil überlebender <i>Hydractinia</i> Embryonen nach 24 Stunden Inkubation in 80 ng/µl dsRNA	99
Tab.29	Anteil überlebender <i>Hydractinia</i> Embryonen 24 Stunden nach Injektion von 80 ng/µl dsRNA	99

Tab.30	Konstrukte in denen <i>Hydractinia</i> Ras1 oder Ras2 an Aminosäure Position (G18V) oder (Q67V) verändert sind.....	105
Tab.31	Automatische Annotationen aus „cluster 3“.....	137
Tab.32	Automatische Annotationen aus „cluster 10“.....	138

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

As	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloroindolylphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	base pair
Bsp.	Beispiel
BSA	bovine serum albumin
cDNA	„copy“ Desoxyribonucleinsäure
c-Fos	cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
c-Jun	c Jun proto oncogene
Ct-Wert	Zyklus-Schwellenwert
DABCO	1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)octan
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylenether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELK1	ETS like gene 1
ERK	extracellular signal regulated kinase
EtBr	Ethidiumbromid
fwd.	forward
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
GEF	guanin nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
<i>H.e.</i>	<i>Hydractinia echinata</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure
H-Ras	Harvey Ratten-Sarkom-Virusonkogen
HS-DNA	Heringsperm DNA

ISH	in-situ-Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
kD	kiloDalton
K-Ras	Kirsten Ratten-Sarkom-Virusonkogen
LB	Lauria Bertani
M	Molar
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF1	Neurofibromin 1
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Ras	Neuroblastom-Ras-Virusonkogen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween
PBSX	PBS mit Triton X-100
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase1
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
PI	polyp inhibitor
p110	PI3K katalytische Untereinheit
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKB (AKT)	Protein-Kinase B
PKC	Protein-Kinase C
PLC ϵ	Phospholipase C ϵ
PLD	Phospholipase D
qPCR	quantitative-PCR
pmol	Picomol
Rac1	Ras relateted C3 botulinum toxin substrate 1
RACE-PCR	rapid amplification of cDNA-ends with PCR

RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAL	Ras like protein
RALGDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
Ras	Ratten Sarkom Onkogen
RASA1	Ras p21 protein activator (GTPase activating protein 1)
rev.	reverse
RGL1	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator like1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribnuklease
rpm	rolls per minute
RRas2(TC21)	related Ras viral (R-Ras) oncogene homolog 2
SH3	src-homology 3
SIF	stolon inducing factor
SOC	SOB Medium mit Glucose
SOS	son of sevenless
SSC	saline sodium citrat
Tab.	Tabelle
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCF	T-cell factor
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEA-AA	TEA mit Essigsäureanhydrid
TORC2	transducer of CREB protein 2
Triton X-100	Polyethylenglycol Tert-octylphenylethe
Tris-Cl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-chlorid
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat
U	Units
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

Eine zentrale Fragestellung in der Biologie ist, wie die Gestaltbildung bei Lebewesen kontrolliert wird und wie sich gestaltbildende Prozesse im Verlauf der Evolution entwickelt haben. Um morphogenetische Prozesse und deren evolutionären Hintergrund untersuchen zu können, wurden stellvertretend für einzelne Tierklassen Modellsysteme etabliert. Hierzu zählt bei den Insekten unter anderem die Taufliege (*Drosophila melanogaster*). Anhand der Taufliege konnte erstmals gezeigt werden, dass die Entwicklung vom Ei zum Imago über Genkaskaden gesteuert wird. Untersuchungen hierzu wurden 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (Nüsslein-Volhard et al., 1980). Stellvertretend für die Vertebraten wurden unter anderem die Maus (*Mus musculus*), der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und der Zebrafisch (*Danio rerio*) als Modellorganismus etabliert. Ein weiterer Invertebraten-Modellorganismus ist der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*). Anhand von *Caenorhabditis elegans* konnten beispielsweise wichtige Erkenntnisse zur zellulären Regulation und dem programmierten Zelltod gewonnen werden (Horvitz et al., 1997). Auch die heute etablierte RNA-Interferenz (RNAi) wurde erstmals in *Caenorhabditis elegans* beschrieben, wofür 2006 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde (Fire et al., 1998).

Anhand des Stammes der Cnidarier (Fleming 1828) konnte im Verlauf des 19. Jahrhunderts mehrere, für die Wissenschaft bahnbrechende, Entdeckungen gemacht werden. So wurden im Zusammenhang mit dem Stamm der Cnidarier zum ersten Mal die Begriffe „Stammzelle“, „Urkeimzellen“ und „Keimbahn“ beschrieben (Weismann 1883; Plickert et al., 2012). Neben dem bereits etablierten Modellorganismus *Hydra vulgaris*, der vor allem als Modellorganismus im Zusammenhang mit Regeneration steht (Lenhoff et al., 1986), bietet sich insbesondere der marine Cnidarier *Hydractinia echinata* (H.e.) als Modellorganismus an. Cnidarier wie *Hydractinia* verfügen über ein schnelles Regenerationsvermögen und unterliegen keiner Seneszenz, sind somit potenziell unsterblich (Martinez et al., 1998). Sie zeichnen sich durch einen einfachen Körperbauplan aus und verfügen bereits über ein Nervensystem (Watanabe et al., 2009; Künzel et al., 2010). Die Hydrozoen, denen *Hydractinia* zugeordnet wird, durchlaufen einen „komplexen, metagenetischen Lebenszyklus“ (Plickert et al., 2012). Der Lebenszyklus beinhaltet die Entwicklung vom Ei zur Planula-Larve, die Metamorphose der agilen Larve zu einem sessilen Primär-Polypen, das Wachstum von Sekundärpolypen sowie männlichen und weiblichen Geschlechtspolypen mit Gonophoren. Diese repräsentieren ein morphologisch reduziertes Medusenstadium und sorgen für die sexuelle Fortpflanzung. Einzelne Kolonien von *Hydractinia* sind vom Geschlecht her entweder männlich oder weiblich (Plickert et al., 2012). Im Zuge der

Entwicklungsstadien sorgen Musterbildungsprozesse dafür, dass die Festlegung der Körperachsen erfolgt und beibehalten wird. Es ist bekannt, dass der innerhalb der Gruppe der Eumetazoa ursprüngliche Stamm der Cnidaria vor etwa 560 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen Vorfahren der Eumetazoa hervorgegangen ist. Zudem ist nachgewiesen, dass sich gestaltbildende Prozesse innerhalb des Stammes der Cnidarier in einer originären Form darstellen (Frank et al., 2001, Guder et al., 2006). In diesem Zusammenhang muss jedoch bedacht werden, dass der Stamm der Cnidarier seit 560 Millionen Jahren einem stetigen Evolutionsdruck unterliegt und somit der heutige Zustand nicht unbedingt dem vor 560 Millionen Jahren gleichgesetzt werden kann.

Die räumliche und zeitliche Koordination von Entwicklungsprozessen gewährleistet, dass diese reproduzierbar verlaufen. In diesem Zusammenhang sind intrazelluläre Signalkaskaden mitentscheidend, die die Kontrolle und Regulation der Genexpression gewährleisten. Durch Signalkaskaden gesteuerte, differentielle Genexpression gewährleistet, dass Körperachsen und verschiedene Gewebetypen entstehen. Signalkaskaden, wie beispielsweise der Wnt-Signalweg sind für die Determinierung dorso-ventraler Körperachsen mit verantwortlich (Cadigan et al., 1997; Itoh und Sokol, 1999; Miller et al., 1999). Radiärsymmetrische Cnidarier wie *Hydractinia* haben eine oral-aborale, jedoch keine dorso-ventrale Körperachse. Es wurde gezeigt, dass der Wnt-Signalweg in *Hydractinia* an der Determinierung der oral-aboralen Körperachse beteiligt ist (Plickert et al., 2006, Guder et al., 2006). Basierend auf dieser Erkenntnis stellt sich die Frage, welche Rolle und Funktion andere Signalproteine und Signalwege, deren Funktion in Modellorganismen wie Taufliege oder Maus bereits bekannt sind, in einem entwicklungsgeschichtlich gesehen ursprünglichen Organismus wie *Hydractinia* einnehmen. Sind Signalwege in ihrer Funktion schon bei einem gemeinsamen Vorfahren vorhanden gewesen und ist deren Funktion konserviert oder haben sich Signalwege im Verlauf der Evolution verändert oder etabliert?

Ein Protein, von dem bekannt ist, dass es als zentrales Schalter-Protein für eine Vielzahl zellulärer Signalnetzwerke essentiell ist, ist das Proto-Onkogen Ras (Cox et al., 2010; Fernández-Medarde et al., 2011). Für Ras wurde gezeigt, dass Punktmutationen eine konstitutive Aktivierung des Proteins zur Folge haben können (Bos et al., 1989; Schubbert et al., 2007; Prior et al., 2012). Konstitutiv aktiviertes Ras bewirkt, dass nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert werden und aktiviert bleiben. Da Ras-Proteine vielfältige Signalkaskaden regulieren, die für die Proliferation und Differenzierung sowie das Überleben von Zellen verantwortlich sind, verwundert es nicht, dass mutiertes, konstitutiv aktiviertes Ras in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen wurde (Der et al., 1982; Colicelli et al., 2004; Fernández-Medarde et al., 2011). In *Hydractinia* sind in der Natur keine natürlich vorkommenden Tumore jeglicher Art bekannt.

Dies und die Tatsache, dass Ras-Proteine eine Vielzahl von Signalnetzwerken regulieren, machte eine Untersuchung von Ras-Proteinen in *Hydractinia* interessant. Es stellte sich die Frage, ob Ras-Proteine in *Hydractinia* im Vergleich zu höheren Organismen konserviert sind, welche Funktion sie in *Hydractinia* haben und ob vergleichbare Ras-Protein gesteuerte Signalkaskaden vorhanden sind.

1.1 *Hydractinia echinata*

Von *Hydractinia* sind weltweit über dreißig Arten bekannt (Frank et al., 2001). Die Hauptverbreitungsgebiete liegen im Nord Atlantik und in der Nordsee (Walther et al., 1996; Jackson et al., 1977; Weis et al., 1985). In der Natur wachsen Kolonien von *Hydractinia* ausschließlich auf von Einsiedlerkrebsen (Paguroiden) bewohnten Gastropoden-Schalen, wobei bei der Nahrungsaufnahme der Einsiedlerkrebse für *Hydractinia* Nahrungspartikel anfallen. Im Gegenzug schützt *Hydractinia* durch Nesselzellen die Krebse vor Feinden. „*Hydractinia echinata* Kolonien bestehen aus zwei Hauptkompartimenten, die sich in Morphologie, Verhalten und zellulärer Zusammensetzung unterscheiden: Stolone und Polypen“ (Plickert et al., 2012). Die Kolonien bilden, ausgehend von einem Primär-Polypen ein Gastrovascular-Netz, das sogenannte Stolonetzwerk aus (Abb.1). Stolone wachsen mit Kontakt zum Untergrund in alle Richtungen aus, wobei das Stolonwachstum durch inhibierende Signale aus den Stolospitzen und durch den sogenannten „stolon-inducing-factor“ (SIF) reguliert wird. Dies gewährleistet, dass neue Stolonverzweigungen in definiertem Abstand zu einander entstehen (Lange et al., 1989; Lange und Müller, 1991; Plickert et al., 2012). Das Stolonetzwerk ermöglicht die Versorgung der gesamten Kolonie mit Nahrung (Frank et al., 2001). In definierten Abständen zueinander wachsen Fresspolypen (Gastrozoide) aus, die die Kolonie mit Nahrung versorgen. Die Polypen wachsen durch asexuelle Knospung aus. Gastrozoide besitzen eine Körperachse, an deren oralen Ende sich ein Hypostom mit einem Kranz aus Tentakeln befindet. Über Nesselkapseln in der Epidermis der Tentakel kann Beute gefangen und mit den Tentakeln zur Mundöffnung transportiert werden. Die Nahrung wird über das Hypostom in den Gastralraum aufgenommen, dort vorverdaut und über das Stolonetzwerk der Kolonie zur Verfügung gestellt (Abb.1) (Walther et al., 1996; Weiss et al., 1985). Der Abstand zwischen auswachsenden Polypen ist durch laterale Inhibition geregelt (Plickert et al., 1987; Plickert et al., 2012). Im Verlauf der Größenzunahme einer Kolonie werden weitere Polypen-Formen ausgebildet. Aus der Stoloplatte heraus knospen Geschlechtspolypen (Gonozoide). Die Stoloplatte bildet sich in herranwachsenden Kolonien, wobei

Gastrodermkanäle von einem zweilagigen epidermalen Epithel umschlossen werden (Plickert et al., 2012). Gonozoide haben eine Körperachse, die im Gegensatz zu Gastrozoiden endständig in einem runden „Köpfchen“ mit reduziertem Tentakelkranz endet.

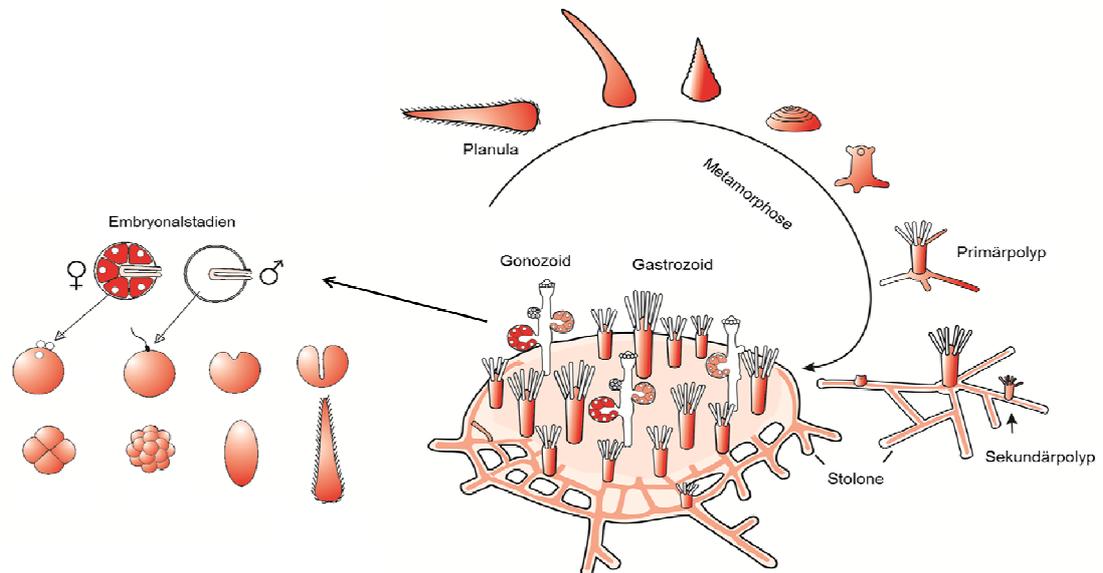


Abb.1 Der Lebenszyklus von *Hydractinia echinata*

Ins Seewasser abgegebene Spermien befruchten Eizellen. Über Zweizell-, 4-Zell-, Blastula- und ein Preplanula-Stadium entwickelt sich binnen 72 Stunden eine Planula-Larve. Frei bewegliche Planula-Larven heften im Verlauf der Metamorphose an Substrate an. Zunächst entwickelt sich ein Primär-Polyp. Ausgehend vom Primär-Polypen bildet sich ein Stolonetzwerk aus. In festgelegtem Abstand knospen asexuell Gastrozoide und im Verlauf des Wachstums getrenntgeschlechtlicher Kolonien entweder männliche oder weibliche Gonozoide aus. An männlichen und weiblichen Gonozoiden bilden sich Gonophoren in denen Spermien oder Eizellen heranwachsen. Abbildung Plickert et al., 2012; Die Grafik wurde durch Werner Müller erstellt und ist hier abgeändert worden.

Entlang der Körperachse wachsen Gonophorenknospen aus, in denen Eizellen oder Spermien heranwachsen (Abb.1). Kolonien von *Hydractinia* sind getrenntgeschlechtlich. Es entwickeln sich Kolonien mit entweder männlichen oder weiblichen Gonozoiden. Die Gonozoiden stellen ihrerseits eine reduzierte Form des Medusenstadiums anderer Cnidarier dar und gewährleisten neben der asexuellen auch eine geschlechtliche Fortpflanzung. Nur in freier Natur auf Schnecken- und Muschelschalen findet man weitere Polypen-Formen, die auf Objektträgerkolonien unter Laborbedingungen nicht gebildet werden. Diese werden als Dactylozooiden und Tentaculozooiden bezeichnet. Ihre Aufgabe besteht darin, die Kolonie zusätzlich zu den von der Stolonplatte gebildeten Kalkstacheln vor Feinden zu schützen (Müller 1964; Frank et al., 2001; Plickert et al., 2012). Der Aufbau von *Hydractinia* entspricht einem radiärsymmetrischen Körperbauplan. Die vorhandene Körperachse wird in Larvenstadien als anterior-posteriore und im Polypen als oral-aborale Achse bezeichnet. Der posteriore Pol der Planula-Larve bildet nach der Metamorphose den oralen Pol eines Primär-Polypen (Frank et al., 2001). Die Körperwand von *Hydractinia*

besteht aus einer epidermalen sowie einer gastrodermalen Zellschicht mit einer dazwischen liegenden, azellulären Mesogloea. Beide Zellschichten gehen aus dem embryonalen Ektoderm beziehungsweise Entoderm hervor. *Hydractinia* ist wie alle Cnidarier ein diploblastischer Organismus, wohingegen die bilateralsymmetrischen höheren Metazoen einen triploblastischen Aufbau zeigen (Walther et al., 1996; Weis et al., 1985). Lichtgesteuert werden durch Platzen der Gonophoren Oocyten und Spermien in das Seewasser abgegeben (Ballard, 1942). Die Oocyten weisen bereits eine Polarität auf. Die Seite, an der der Zellkern in der Oocyte lokalisiert ist, bezeichnet man als deren animalen Pol. Dort kann ein Spermium in die ungefähr 80-180 µm große Eizelle eindringen und diese befruchten (Freeman und Miller, 1982). Der animale Pol entwickelt sich zum posterioren Pol des Embryos und der Planula-Larve. Binnen 72 Stunden entwickeln sich aus befruchteten Embryonen, nach Durchlaufen mehrerer Embryonalstadien, Planula-Larven (Frank et al., 2001). Die Körperachse ist zum ersten Mal in der frühen Planula-Larve, dem sogenannten Prä-Planula Stadium erkennbar, wobei der verdickte Teil den anterioren Pol bildet (Plickert et al., 2006). Planula-Larven können bei 18°C mehrere Tage lang gehältert werden ohne ihre Metamorphosekompetenz zu verlieren (Frank et al., 2001). In der Natur wird die Metamorphose der Planula-Larve hin zu einem Primär-Polypen durch einen Biofilm aus Bakterien ausgelöst (Kroiher & Berking 1999). Unter Laborbedingungen kann die Metamorphose durch Zugabe verschiedener Verbindungen, vor allem monovalenter Kationen, ausgelöst werden. Die Metamorphose der Planula-Larve zu einem Primär-Polypen vollzieht sich innerhalb von 24 Stunden (Walther et al., 1996). Aus dem posterioren Teil der Planula-Larve entwickelt sich im Verlauf der Metamorphose die apikal orale Region des Polypen (Abb.1).

1.2 Ras-Proteine

Ras-Proteine, deren Name sich von „rat“ und „sarcoma“ ableitet, wurden in Vertebraten zum ersten Mal im Zuge einer Untersuchung zu transformierenden Eigenschaften viraler v-Ras-Proteine beschrieben (Harvey, 1964; Kirsten, 1967). Im Menschen, in dieser Arbeit stellvertretend für Vertebraten gewürdigt, sind drei unterschiedliche *Ras*-Gene H-, N- und K-*Ras* bekannt, die aufgrund zweier K-*Ras*-Splicevarianten für vier Proteine kodieren. Die im gesamten Tierreich stark konservierten *Ras*-Gene kodieren für 20-25 kDa große Proteine (Barbacid et al., 1987; Watzinger et al., 1998; Karnoub et al., 2008; Castellano et al., 2011). Basierend auf Sequenzhomologien zu den „klassischen“ Ras-Proteinen H-, N- und K-Ras wurden einer „Superfamilie“ von Ras ähnlichen Proteinen bis heute eine Vielzahl weiterer Proteine

zugeordnet. Alle dieser „Superfamilie“ zugehörigen Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie als GTPasen zentrale Kontrollelemente in fast allen biologischen Signalwegen in Zellen sind (Colicelli et al., 2004; Cox et al., 2010). Ras-Proteine, deren Funktion auf Aktivierung durch GTP-Bindung und Inaktivierung durch GTP-Hydrolyse beruht, verfügen über eine GTP-Bindedomäne (Schubbert et al., 2007). Im Bereich der GTP-Bindedomäne sind 5 charakteristische G-Box-Motive enthalten (Colicelli et al., 2004). Am C-Terminus von Ras-Proteinen, im Bereich der „hypervariablen“ Region, findet man ein CAAX-Motiv, das an der Lokalisation von Ras-Proteinen an Membranen beteiligt ist (Schubbert et al., 2007). C steht hierbei für ein Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und X für jede beliebige Aminosäure (Choy et al., 1999; Colicelli et al., 2004). Ist die Aminosäure X in Ras-Proteinen beispielsweise ein Leucin oder Phenylalanin, so werden Ras-Proteine durch eine Geranylgeranyl-Transferase modifiziert. Die Transferase bindet eine Prenyl-Gruppe an den C-terminalen Teil des Ras-Proteins, wodurch es aufgrund der hydrophoben Natur der Prenyl-Gruppe an Membranen angeheftet werden kann. Ist die Aminosäure X hingegen beispielsweise ein Methionin oder Serin, so werden Ras-Proteine durch Farnesyl-Transferase modifiziert, wodurch ebenfalls eine Membranlokalisation gewährleistet ist (Wright et al., 2006). Wie bereits erwähnt, ist von den „klassischen“ Ras-Proteinen H-, N- und K-Ras bekannt, dass sie in Zellen speziell an Signalwegen beteiligt sind, die Zell-Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen steuern (Schubbert et al., 2007). Auch von weiteren Vertretern der Ras-Familie, wie beispielsweise den RRas2(TC21)-Proteinen, die strukturell eng mit klassischen H-, K- und N-Ras-Proteinen verwandt sind, ist beschrieben, dass sie vergleichbare Signalwege steuern können (Drivas et al., 1990; Movilla et al., 1999; Colicelli et al., 2004; Larive et al., 2012; Alarcon et al., 2012).

1.2.1 Ras-Aktivierung

Ras-Proteine, die an der Innenseite von Membranen lokalisiert sind, können einen GDP-gebundenen inaktiven und einen GTP-gebundenen aktiven Zustand aufweisen. Der Wechsel ihres Zustandes ermöglicht es Ras-Proteinen ein Signal von Rezeptoren in der Plasmamembran weiterzuleiten (Schubbert et al., 2007; Karnoub et al., 2008). In der Vergangenheit wurde nachgewiesen, dass die Bindung von GTP an Ras durch Stimulierung von EGF-Rezeptoren induziert wird (Kamata et al., 1984). Neben EGF-Rezeptoren konnten in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* Rezeptor-Tyrosin-Kinasen identifiziert werden, deren Aktivierung eine Aktivierung von Ras induziert (Aroian et al., 1990; Fortini et al., 1992). Bindet EGF an

einen EGF-Rezeptor, so wird dessen intrinsische intrazelluläre Protein-Tyrosin-Kinaseaktivität stimuliert (Margolis et al., 1994). An die phosphorylierte intrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors binden die Adaptermoleküle „growth-factor-receptor bound protein 2“ (Grb2) und „SRC homology H2 domain containing protein“ (SHC). Zusammen mit dem „Grb2-associated binding protein“ (GAB) bilden sie einen Komplex mit dem Ras-Guaninnukleotid Austauschfaktor (GEF) „son of sevenless“ (SOS) (Schubbert et al., 2007). Das zyttoplasmatische Protein SOS bindet mit einer prolinreichen Region an die SH3-Domäne von Grb2 und wird so in die unmittelbare Nähe zu Ras an die Innenseite der Plasma-Membran gebracht. Die Bindung von SOS an Ras hat eine Konformationsänderung von Ras-Proteinen zur Folge. Diese Konformationsänderung bewirkt die Dissoziation von Ras gebundenem GDP. Ras-Proteine können dann GTP binden, wodurch sie wieder aktiviert werden (Adjei et al., 2001; Karnoub et al., 2008). Ras-Proteine selbst besitzen eine, wenn auch geringe GTPase-Aktivität. Die GTPase-Aktivität alleine reicht jedoch nicht aus, GTP gebundenes aktiviertes Ras in seine inaktive GDP gebundene Form zu überführen. GTPase aktivierende Proteine („GTPase activating protein“ (GAP)) wie „Neurofibromin1“ (NF1) binden an Ras-GTP und verstärken die natürliche GTPase-Aktivität von Ras. Hierdurch wird GTP zu GDP hydrolysiert (Abb.2) (Colicelli et al., 2004; Schubbert et al., 2007).

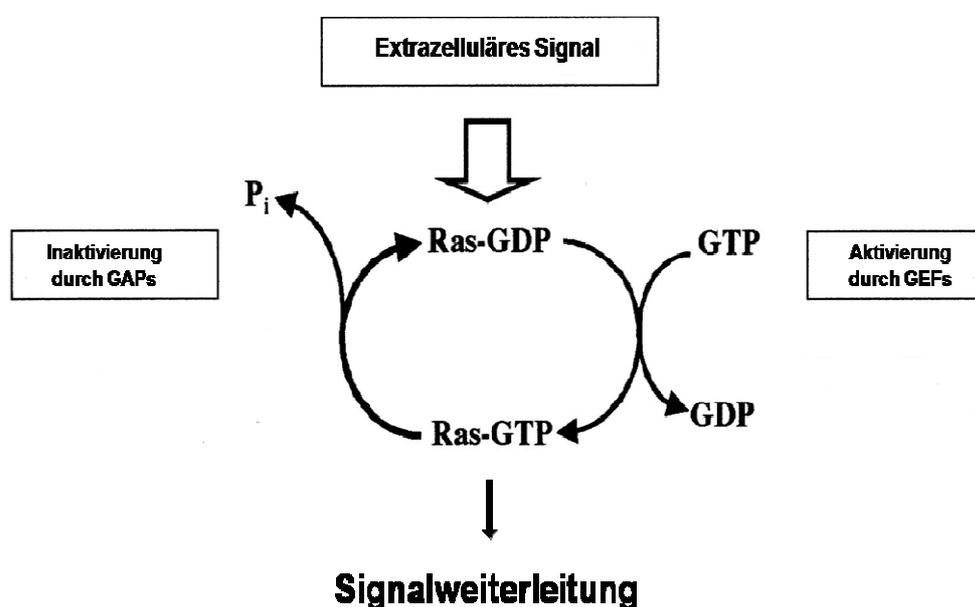


Abb.2 Ras als molekularer Schalter

Inaktives GDP gebundenes Ras wird durch „guaninnucleotid exchange factor“ (GEF) aktiviert. Gebundenes GDP wird durch GTP ersetzt. In seiner GTP gebundenen Form kann Ras mit nachgeschalteten Proteinen Ras gesteuerter Signalwege interagieren. GTPase aktivierende Proteine (GAP) stimulieren die natürliche GTPase-Aktivität von Ras und bewirken eine Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch Ras wieder inaktiviert wird. Die Abbildung ist nach Reuter et al., 2000 modifiziert worden.

1.2.2 Ras-Protein gesteuerte Signalwege

Von Ras-Proteinen ist bekannt, dass sie Effektoren unterschiedlicher Signalwege in Zellen sind (Abb.3).

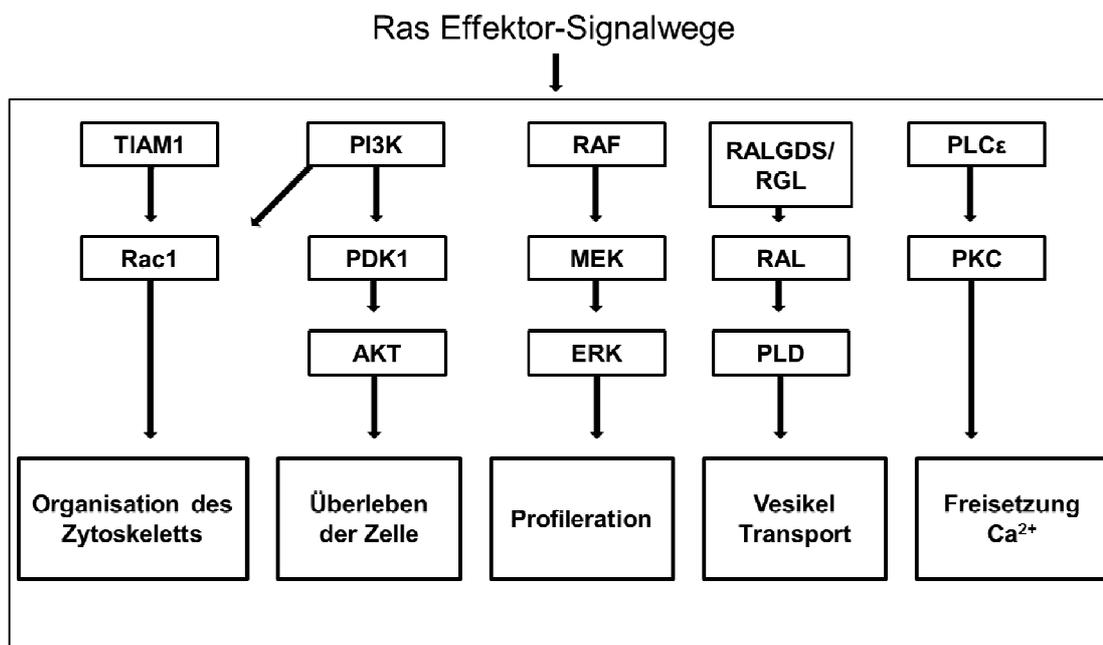


Abb.3. Ras-Effektor-Signalwege

Aktiviertes Ras-GTP kann an RAF, PI3K, TIAM1, Proteine der RALGDS Familie sowie PLCε binden und diese aktivieren. Nach Aktivierung leiten diese Proteine dann als Effektoren für nachgeschaltete Signalwege die Signale in der Zelle weiter. TIAM1 fungiert als GEF für das der „Superfamilie“ der Ras-Proteine zugehörige Rac. Eine Aktivierung des Signalwegs ist unter anderem wichtig für die Zytoskelett-Organisation. Die Aktivierung der PI3K durch Ras-GTP leitet Ras gesteuerte Signale über PDK1 und AKT weiter. Dieser Signalweg steuert unter anderem das Überleben von Zellen. Ein über RAF, die Kinasen MEK und ERK gesteuerter Signalweg ist an der Proliferation von Zellen beteiligt. Die Weiterleitung von Ras-gesteuerten Signalen über Proteine der RALGDS Familie, RAL und PLD reguliert unter anderem den Vesikel-Transport in Zellen. Die Weiterleitung von Ras-Signalen über PLCε und PKC führt in Zellen unter anderem zur Freisetzung von Ca²⁺. Die Abbildung wurde nach Schubbert et al., 2007 modifiziert. Dargestellt sind Signalwege, wie sie aus Untersuchungen in menschlichen Zellen bekannt sind.

Unter anderem fungieren Ras-Proteine als Effektoren für eine Kaskade über die Kinasen „rat fibrosarcoma“ (RAF), „mitogen-activated protein kinase kinase“ (MEK) und die „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK). Eine weitere Kaskade, die durch Ras gesteuert wird, verläuft über die Kinasen „phosphoinositide 3-kinase“ (PI3K), „phosphoinositid dependent kinase 1“ (PDK1) und Protein-Kinase B (PKB/AKT). Des Weiteren gibt es einen Signalweg über den „ral guanine nucleotide dissociation stimulator“ (RALGDS), das G-Protein Ral und die Phospho-Lipase D (PLD). Ras-Signale werden in der Zelle zudem über das „T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1“ TIAM1 und das G-Protein Rac1 weitergeleitet. Zudem ist bekannt, dass Signale in der Zelle über Ras an die Phospho-Lipase Cε (PLCε) und die

Protein-Kinase C (PKC) weitergegeben werden. Die durch aktiviertes Ras induzierten Signalwege steuern unter anderem die Proliferation und das Überleben von Zellen, den Transport von Vesikeln und die Organisation des Zytoskelletts, um nur einige der bekannten Ras induzierten Effekte in Zellen zu nennen (Schubbert et al., 2007).

1.2.2.1 RAF-MEK-ERK Kaskade

Die Kinase RAF1 wurde als erster Ras-Effektor in Säugetieren beschrieben (Moodie et al., 1993; Castellano et al., 2011). In Vertebraten kennt man bis heute drei verschiedene RAF-Proteine (A-, B- und C-RAF) von denen bekannt ist, dass sie Ras-Signale weiterleiten. Aktiviertes Ras-GTP phosphoryliert die RAF-Kinase und aktiviert diese. Aktivierte RAF-Kinase phosphoryliert und aktiviert dann ihrerseits die MEK1/2-Kinase durch Phosphorylierung spezifischer Serine im sogenannten „activation loop“ von MEK1/2. Die aktivierte MEK-Kinase kann dann die Kinase-ERK1/2 an einem spezifischen Threonin und Tyrosin phosphorylieren, wodurch die Kinasen ERK1/2 aktiviert werden (Wortzel et al., 2011). Durch aktivierte ERK-Kinase werden unterschiedlichste Zielproteine beeinflusst. Hierzu zählen unter anderem Transkriptionsfaktoren wie ELK1, c-Fos oder c-Jun, über die die Transkription einer Vielzahl von Genen reguliert ist (Steelman et al., 2011; Wortzel et al., 2011).

1.2.2.2 Die „phosphoinositid 3-kinase“ (PI3K)-Kaskade

Ein weiterer Signalweg wird über das Ras-Effektormolekül PI3K gesteuert (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Die heterodimere Kinase PI3K setzt sich aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Einheit zusammen. Ras-GTP ist in der Lage, die katalytische Einheit der PI3K (p110) unabhängig von der regulatorischen Einheit (p85) zu aktivieren (Castellano et al., 2011). Die aktivierte PI3K phosphoryliert dann Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) am 3`OH und generiert so Phosphatidylinositol-Triphosphat (PIP₃) an der Innenseite der Plasmamembran. PIP₃ bringt die beiden Kinasen „Protein-Kinase B“ (PKB, oder AKT) und „phosphoinositide dependent kinase 1“ (PDK1), die beide eine „pleckstrin-homology domain“ (PH) besitzen, in unmittelbare Nähe zueinander. Die Kinase AKT wird daraufhin durch PDK1 an der Aminosäure Threonin (T308) phosphoryliert und aktiviert (Coutney et al., 2010; Steelman et al., 2011; Castellano et al., 2011). Aktiviertes AKT sorgt unter anderem durch

Inhibition der proapoptischen Proteine BAD und BAX, die der Familie der Bcl-2-Proteine angehören, für das Überleben von Zellen (Cantley et al., 2002; Engelmann et al., 2006; Castellano et al., 2011). Des Weiteren wirkt sich die aktivierte AKT-Kinase positiv auf die Transkription von antiapoptischen und das Überleben von Zellen sichernden Genen aus (Duronio et al., 2008)

1.2.2.3 Signalweiterleitung über Mitglieder der RALGDS-Proteinfamilie

Einen weiteren Effektor von Ras-GTP stellen Mitglieder einer Proteinfamilie dar, die als „guanine nucleotide-exchange factor“ (GEF) für RALA und RALB fungieren (Karnoub et al., 2008). Die GTPase RAL wird ihrerseits der Superfamilie der Ras-Proteine zugeordnet (Colicelli et al., 2004). GEF-Proteine für Ral sind unter anderem das Protein „ral guanine nucleotide-dissociation stimulator“ (RALGDS) oder aber das „ral guanine nucleotide dissociation stimulator like“ (RGL)-Protein (Albright et al., 1993; Hofer et al., 1994; Karnoub et al., 2008). RAL-GEF-Proteine sorgen dafür, dass RAL in seine aktivierte RAL-GTP Form überführt wird (Hao et al., 2008). Aktiviertes RAL-GTP kann dann seinerseits mit nachgeschalteten Effektoren interagieren. Hierzu zählt die Phospho-Lipase D (PLD) (Luo et al., 1997). Aktivierte PLD ist unter anderem am Vesikeltransport und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts in der Zelle beteiligt (Wolthuis et al., 1998; Schubbert et al., 2007).

1.2.2.4 Weitere Ras-Effektoren

Neben den bereits beschriebenen Ras-Effektor gesteuerten Signalwegen gibt es weitere Ras-Effektoren, die an der Organisation des Zytoskeletts, aber auch an Calcium Signalwegen in der Zelle beteiligt sind. So ist die Phospho-Lipase C ϵ (PLC ϵ) als direkter Effektor von Ras-GTP beschrieben (Song et al., 2001). Die Aktivierung der PLC ϵ ermöglicht es, dass PLC ϵ Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (Ptdins(4,5)P₂) in Inositol-1,4,5-Triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Dies führt in Zellen zu einer Freisetzung von Ca²⁺ und der Aktivierung von „protein kinase C“ (PKC) (Karnoub et al., 2008).

Neben PLC ϵ als Ras-Effektor stellt das Protein „T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1“ (TIAM1) einen weiteren Effektor von Ras-GTP dar (Lambert et al., 2002). TIAM1 ist wiederum ein „guanine nucleotide-exchange factor“ (GEF) für die GTPase Rac, die

in der Superfamilie der Ras-Proteine der Subfamilie der RHO-Proteine zugeordnet wird (Colicelli et al., 2004; Cox et al., 2010). Die GTPase Rac wiederum steuert in der Zelle Prozesse, die an der Zytoskelett-Organisation beteiligt sind (Schubbert et al., 2007). Versuche mit TIAM1 negativen Mäusen haben zudem gezeigt, dass diese keine Ras induzierten Tumore der Haut ausbilden, was wiederum dafür spricht, dass TIAM1 an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist (Malliri et al., 2002; Karnoub et al., 2008).

Ein Ziel dieser Arbeit war es mögliche Ras-Proteine auch in *Hydractinia* zu identifizieren. Es stellte sich die Frage, ob es in einem entwicklungsgeschichtlich gesehen, ursprünglichen Organismus wie *Hydractinia*, der vor zirka 560 Millionen Jahren zusammen mit den Ctenophora aus einem Vorfahren der Eumetazoa hervorgegangen ist, bereits Ras-Proteine, beziehungsweise Vorläufer zu Ras-Proteinen höherer Organismen gibt.

Durch Transkriptom-Analysen sollte im Zuge dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit neben Ras-Proteinen auch Proteine Ras gesteuerter Signal-Kaskaden bereits in *Hydractinia* vorhanden sind. Eine genauere Analyse möglicher homologer Proteine sollte dazu beitragen, die Funktion von Ras-Proteinen in einem entwicklungsgeschichtlich gesehen ursprünglichen Organismus wie *Hydractinia* zu verstehen.

Durch knock-down, sowie durch Überexpression beziehungsweise Missexpression von Ras unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven *Hydractinia* AktinII-Promotors, sollte die Funktion von Ras-Proteinen in *Hydractinia* untersucht werden. Da die Funktion von Ras-Proteinen jedoch nicht alleine über deren Expression, sondern vielmehr durch deren Aktivierung und Inaktivierung reguliert wird sollten in *Hydractinia*-Ras Sequenzbereiche analysiert werden, deren Modulation in höheren Organismen eine konstitutive Aktivierung der Proteine zur Folge hat. Sinn der Strategie war es zu klären, ob auch *Hydractinia*-Ras-Proteine auf diese Weise konstitutiv aktiviert werden können und welche Folgen eine solche Aktivierung für *Hydractinia* mit sich bringt. Im Zuge einer derartigen Aktivierung könnten Rückschlüsse darauf gewonnen werden, welche Funktion Ras-Proteine in *Hydractinia* haben.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Heizblock HAT 130	HLC BioTech, Göttingen
Schüttelinkubator TH10	Bühler, Düsseldorf
Brutschrank WTB	Binder, Tuttlingen
Transilluminator	Alpha Innotech, Kasendorf
Vortexer Reax 1R	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Schermesserhomogenisator	Xenox, Föhren
PV Pneumatic PicoPump	WPI, Berlin
Zeiss Stemi 2000CS	Zeiss, Oberkochen
Nikon SMZ 1500	Nikon, Düsseldorf
Zeiss Imager.Z2	Zeiss, Oberkochen
Autoklav	Tuttenauer Systec, Münster
Wasserbad Julabo 20b	Julabo, Seelbach
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
PCR Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
AxioCam MRm	Zeiss, Oberkochen
AxioCam HRc	Zeiss, Oberkochen
AxioCam colorcamera (ICc1)	Zeiss, Oberkochen
Otima L70K Ultrazentrifuge	Beckman, Krefeld
NanoDrop1000	Thermo, Schwerte
CFX96 Real Time System	Bio-Rad, München
Mikrotom Ultracut	Reichert-Jung

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt werden, wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Ethylendiamintetraacetat	AppliChem, Darmstadt
Glykogen	Fermentas, Leon-Rot
Lithiumchlorid	Serva, Heidelberg
100% Ethanol	J.T.Baker, Deventer, NL
Phenol äquillibriert	AppliChem, Darmstadt
LB (Luria Bertani)	Sigma, München
Glucose	Fluka, St.Gallen
Tricin	Sigma, München
Ammoniumacetat	Amresco, Karlsfeld
Nitroblautetrazolium	BTS Biotech, St. Leon-Rot
Paraformaldehyde	Fluka, St.Gallen
HEPES	Fluka, St.Gallen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, St.Gallen
Bovine Serum Albumin	Sigma, München
Essigsäureanhydrid	Sigma, München
TRIS-Base	Sigma, München
N,N Dimethylformamid	Fluka, St.Gallen
Disodium Citrat	Fluka, St.Gallen
2-Mercaptoethanol	Acros Organics, Geel
LB Broth	Sigma, München
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, München

Araldit M (Epoxyd-Harz) CY212	Serva, Heidelberg
Propylenoxid	Serva, Heidelberg

2.1.3 Gebrauchswaren

Die während dieser Arbeit verwendeten Plastikmaterialien sowie Gebrauchswaren waren Standard-Laborprodukte.

2.1.4 Nährmedien für Bakterien

- LB-Medium pH 7,5: 4 g Bacto-Tryptone, 2g Hefe-Extrakt und 4g NaCl wurden mit 400µl bidest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 400 ml aufgefüllt. Der pH wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Im Anschluss wurde der Ansatz autoklaviert.
- LB-Carbenicillin-Medium: 1 ml LB-Medium wurde mit 4 µl Carbenicillin (Stammlösung: 100 mg/ml Carbenicillin Dinatriumsalz in bidest. H₂O) versetzt.
- LB-Agarplatten: 500 ml LB-Medium wurden mit 7,5 g Agar versetzt. Der Ansatz wurde autoklaviert. Im Anschluss wurde die Lösung in einem Wasserbad auf 60°C temperiert. Hiernach wurden 100 µg/ml Carbenicillin (Stammlösung 100 mg/ml Carbenicillin Dinatriumsalz in bidest. H₂O) unter Rühren zugegeben und der Ansatz in Petrischalen ausgegossen. Bei Raumtemperatur härtet der Agar aus, die Schalen konnten dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

2.1.5 Klonierungsvektoren

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden innerhalb der AG Prof. Dr. Plickert vorhandene Konstrukte modifiziert. Die Konstrukte werden im Verlauf dieser Arbeit detailliert im Einzelnen beschrieben.

2.1.6 Kompetente Bakterien

Für Klonierungsarbeiten (2.3.10.4 und 2.3.16.3) wurden kompetente Bakterien (NEB 10-beta competent E.coli (High Efficiency)) der Firma New England BioLabs verwendet.

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers GmbH synthetisiert. Alle Oligonukleotide wurden, sofern möglich, nach der 4+2 Regel (Itakura et al., 1984) mit einem Schmelzpunkt von 60°C erstellt. Die Oligonukleotide wurden mit 1/5 TE in einer Stammkonzentration von 100 pmol/µl gelöst und bei -20°C gelagert.

Genspezifische Oligonukleotide

Gen und /oder Einsatzbestimmung	Oligonukleotid, Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Ras1	HeRas1revStop	CGAAATTC AAGTGC ACTATTCTG
	HeRas1ATGstart	ATGTCTTCATCGTCAGAACCAACC
	HeRas1RNAirev	ACCCAACCATCGAGGACTCCT
Ras1 (Mutagenese Oligonukleotide)	Ras1mut18fwd	GGTGTGGAAAGAGCGCTTTAAC
	Ras1mut18rev	CAAAATGGTTGTAGTTGGAGCTGTA
	Ras1mut67fwd	GAGGAATACAGTGCCATGCGAG
	Ras1mut67rev	CTGGATATACTTGATACTGCAGGTGTG
Ras2	Rasstoprev	GAAAAAATCCAAGTGCACAATTCTG
	RasATGfwd	ATGGCTGGAGGCGAATTGG
	Rasfwdout	AGTGCCTTGACAATCCAGTTTATTCAATCACA TTTCG
	Rasfwdin	ACGATCGAAGATTCTATAGAAAACAATGTG TAATAG
	Rasrevout	GACGCAGCATTTCACGATTTAGTTCGAGCTAT
	Rasrevin	CTTACCTGGAGTCTAGTGCTAAACAACGAAT

Ras2	Ras2RNAirev	ATAGGAATCTTCGATCGTAGGAT
Ras2 (Mutagenese Oligonukleotide)	Ras2mutGLYzuVAL18rev	ACAAACTGGTTGTAGTTGGAGGGTT
	Ras2mutGLYzuVAL18fwd	GGTGTTGGAAAAAGTGCCTTGACA
	Ras2mutGLYzuVAL67rev	ACATTTTGGATACTGCTGGTGTA
	Ras2mutGLYzuVAL67fwd	GAGGAATTTAGTGCAATGAGAGAA
GFP	GFPfwd	GCCATGCCCCGAAGTTATGTACAGG
	GFPbeforeStoprev	GGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAA A
TCF	TCFrev neu	GCCACGGTCCATGTTTCATAG
	TCFATGstartfwd	ATGCCGCAACTTCCAACCTTCTACCCCTTCTGG

Tab.1 Genspezifische Oligonukleotide

RACE-PCR-Oligonukleotide

Einsatzbestimmung	Oligonukleotid, Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
cDNA-Synthese und RACE Oligonukleotide	DAP-TRSA	CGACGTGGACTATCCATGAACGCACGCAGTCG GTAC(t) ₁₃
	Trsa	CGCAGTCGGTAC(t) ₁₃
	Ts-PCR	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	DAP+DAP-TS	CGACGTGGACTATCCATGAACGCAAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT

Tab.2 RACE-PCR-Oligonukleotide

Matz RACE-PCR-Oligonukleotide wurden, wie in der Arbeit “Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes” (Matz, 2002) beschrieben, erstellt.

Plasmid spezifische Oligonukleotide

Einsatzbestimmung	Oligonukleotid, Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
M13-Oligonukleotide	M13pUC fwd	GTAAAACGACGGCCAGT
	M13pUC rev	CAGGAAACAGCTATGAC
KS-Oligonukleotide	KSEndApaIfwd.	TAGGGCCCGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC
	KSStartApaIrev.	GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGGGGCCCTA
HeAktIIIGFPAktIIterm spezifische Oligonukleotide	HeTermforX-baAct.Pr.withStopfwd	TAAGCTCCTTGAAGTAAAAGTCACATCCACAAAC
pUC-Plasmid -Oligonukleotide	pUCdsfwd	TCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
	BSF22rev	AACGCGCCTTTTTACGGTTCCT

Tab.3 Plasmid spezifische Oligonukleotide

Oligonukleotide für qPCR-Versuche

Sequenz, auf deren Basis die <i>Hydractinia</i> -qPCR-Oligonukleotide erzeugt wurden	Oligonukleotid Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Ras1 (siehe Anhang Abb.1)	Ras1RTfwd	CAACTTTAGAACGCAGGCAC
	Ras1RTrev	ACCATACGTTGAAACATCAGC
Ras2 (siehe Anhang Abb.2)	Ras2realtime rev	GCGAACTGTTTCAACTGCA
	Ras2realtime fwd	GTGACAGATAGTTCCAGC
EEF2 <i>Hydractinia</i> Genome 3 scaffold.4385	EEF2realtime fwd	GGTATCTACTCTTGTCTCAAC
	EEF2realtime rev	ACTGCAGATTTGCGATCAAAG
Wnt3 (NCBI GenBank: CAK50826.1)	WNT3fwdRT	AGCAATTCAGGTATCGGAAGT
	WNT3revRT	CGCAGAAGGAAGATCAATGC
β-Catenin (NCBI GenBank: ACZ51403.1)	β-CateninfwdRT	GGTGGTGATTTTGATGATGATG
	β-CateninrevRT	TTGCAGCTCTCACTCTATGG
Brachyury	BrachHeRTfwd	AGGAGAGAGAACGATTAGTAC

(NCBI GenBank: AAL26836.1)	BrachHeRTrev	CTGTACGAGAGGGATGCTTT
TCF (Duffy et al., 2010)	TCFGalRTfwd	GCGCCATTCACATGCAGTTA
	TCFGalRTrev	GTGACGTTACTGGTGATATCGATGT

Tab.4 Oligonukleotide für qPCR-Versuche

2.1.8 Verwendete Enzyme, Enzym-Mixe und Antikörper

Phusion high fidelity DNA-Polymerase	Termo Fisher, Schwerte
Reverse Transkriptase Superskript II RNaseH	Invitrogen, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Termo Fisher, Schwerte
iQ™SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, München.
Riboloc RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Sigma, München
Apal	Termo Fisher, Schwerte.
anti-digoxigenin-alkaline-phosphatase konjugierter Antikörper	Roche, Mannheim
RNaseA	Termo Fisher, Schwerte
RNaseT1	Termo Fisher, Schwerte
T7-RNA-Polymerase	Termo Fisher, Schwerte
T3-RNA-Polymerase	Termo Fisher, Schwerte
EcoRV	Fermentas, St. Leon-Rot
Polinukleotid-Kinase	Termo Fisher, Schwerte
RNaseH	Termo Fisher, Schwerte
DIG-RNA-labeling-mix	Roche, Mannheim
fast-AP-Alkalische-Phosphatase	Termo Fisher, Schwerte

2.1.9 Verwendete Puffer und Lösungen

5x HF-Phusion-Puffer (+7,5mM MgCl ₂)	Termo Fisher, Schwerte
5x Reverse-Transkriptase-Puffer	Invitrogen, Darmstadt
5x Sequenzier-Puffer	Applied Biosystems (Thermo Fisher, Schwerte)
5x T4-DNA-Ligase-Puffer mit 25% PEG	Thermo Fisher, Schwerte
10x PBST	PBS; 1% Tween 20
10x Tango-Puffer	Fermentas (Thermo Fisher, Schwerte)
AP-Puffer (10mM MgCl ₂)	0,1 M Tris pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,1% Tween 20; 10 mM MgCl ₂
AP-Puffer (40mM MgCl ₂)	0,1 M Tris pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,1% Tween 20; 40 mM MgCl ₂
BCIP Stammlösung	50 mg/ml BCIP in DEPC-H ₂ O, bei -20°C gelagert
EdU Reaktions Cocktail	Für 500 µl wurden in folgender Reihenfolge kurz vor Gebrauch zusammen pipettiert (bei reduzierter Beleuchtung): 379 µl bidest. H ₂ O; 50 µl Reaktionspuffer orange; 20 µl Catalyst Lösung; 50 µl 10 mM 5-TAMRA-PEG3-Azid, 1 µl Puffer Additiv
Guanidinium-Puffer	5 M Guanidinthiocyanat; 63 mM Tris-HCl pH 7,6; 13 mM EDTA; 0,5% Lauroylsarkosinat; Der Puffer Ansatz wurde über eine Nitrocellulosemembran (Sartorius, Porengröße 0,45 µm) mit Hilfe einer Vakuumpumpe in einer sterilen Nutsche in einen sterilen Kolben unter RNase freien Bedingungen filtriert. Vor Gebrauch wurden 1,25% 2-Mercaptoethanol zugegeben.
RNase Mix/TE	20 µg/ml RNaseA und 2 U/ml RNase T1 in TE
Ethidiumbromid Stammlösung 1%	10 mg/ml

Material und Methoden

Hybridisierungs-Mix	50% Formamid; 5x SSC; 1 mg/ml Heringsperm-DNA; 0,1 mg/ml Heparin; 0,1 % Tween (bei -20°C lagern)
ISH- Einbettung	PBS/Glycerin 1+9; 50 mM EGTA
NBT Stammlösung	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
10x TBE	0,9 M Tris, 0,9M Borsäure und 4,5 mM EDTA
1% BSA/PBST	0,1 g BSA auf 10 ml 1x PBST
Cäsium-Chlorid-Kissen	5,7 M CsCl wurden mit 100 mM EDTA versetzt. Die Lösung wurde dann über eine Nitrocellulosemembran (Sartorius, Porengröße 0,45 µm) mit Hilfe einer Vakuumpumpe, mittels einer sterilen Nutsche in einen sterilen Kolben, unter RNase freien Bedingungen filtriert.
1x SOC Medium	2% Pepton, 0,5% Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
SSC Puffer	0,3 M Natrium Citrat pH 7; 3 M NaCl
ISH-STOP-Mix	10 mM EGTA in 1x PBST
Tris EDTA (TE) Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
TEA Puffer pH 7,8	3,7 g Triethanolamin mit DEPC H ₂ O auf 200 ml auffüllen; mit 1 M NaOH pH auf 7,8 einstellen (RNase frei arbeiten)
TEA-AA Puffer	5 ml TEA; 12,5 µl 98% Essigsäureanhydrid (AA)
Tris-HCl pH 7,5	66,5 g Tris Base in 200 ml bidest. H ₂ O; pH mit 36 % HCl einstellen, auf 500 ml auffüllen, autoklavieren
Paraformaldehyd/Hepes	4% PFA in 0,1 M HEPES, pH 7,5; 0,42 M NaCl
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl pH 7,5

PBST/Heringsperm (HS) DNA	0,5 mg/ml HS in 1xPBST
wash I Lösung	50% Formamid; 2x SSC; 0,1% Tween 20
wash II Lösung	2 x SSC; 0,1% Tween 20
wash III Lösung	0,2 x SSC; 0,1 % Tween 20
0,2M Phosphatpuffer	Na ₂ HPO ₄ in bidest. H ₂ O, mit NaOH und HCl auf pH 7,2 eingestellt
Methylenblau Färbelösung	1% Methylenblau in 1% wässriger Boraxlösung
Toluidin Färbelösung	0,1% Toluidin in 0,1% wässriger Boraxlösung

2.1.10 Gebrauchsfertige Kits

“Super Script 2 Kit“ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Darmstadt
GenJet Gel extraction Kit	Thermo Fisher, Schwerte
GenJet PCR extraction Kit	Thermo Fisher, Schwerte
dNTP Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
mirPremier micro RNA isolation kit	Sigma, München
EdU-Click 555	Baseclick GmbH, Tutzing
T7 High Yield RNA Synthesis Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.11 Verwendete Computer Software

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Software und Computerprogramme verwendet:

- ClustalW2 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>
- Olico Calculator <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>
- Axio Vision Rel.4.8 (Carl Zeiss)
- Chromas Lite 2.1.1 <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml>

- CFX Manager™ Version 3.1 <http://www.bio-rad.com/de-de/product/cfx-manager-software>
- NCBI Datenbank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- MEGA v5.2 <http://www.megasoftware.net>(Tamura et al., 2011)
- gblocks http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html(Castresana. 2000)
- Pfam <http://www.pfam.xfam.org> (Punta et al., 2012)
- PROSITE <http://www.PROSITE.expasy.de> (Sigrist et al., 2002)
- FastQC (v0.10.1) www.bioinformatics.babraham.ac.uk
- Trinity-pipeline (Trinity r201440413p1) (Grabherr et al., 2011)
- Trimmomatic (v0.32) www.usadellab.org
- RSEM (Li et al., 2011)
- R-bioconductor-package edgeR www.bioconductor.org (Robinson et al., 2010)

2.2 Tierbezogene Methoden

2.2.1 Hälterung von *Hydractinia echinata*

Die verwendeten Stammkulturen waren Wildfänge und wurden aus Helgoland (Alfred-Wegener-Institut-Helgoland), aus Roscoff (Station Biologique de Roscoff) oder aus Sylt (Alfred-Wegener-Institut-Sylt) bezogen. Die Tiere wurden auf Schneckenschalen in Aquarien mit Seewasser (1080 mosmol, pH 8,2) bei 16-18 °C gehältert. Die Kolonien wurden einer künstlichen Strömung und einem strikten Hell/Dunkel-Rhythmus von 16 Stunden Helligkeit und 8 Stunden Dunkelheit ausgesetzt. Die Fütterung der Kolonien erfolgte fünfmal pro Woche mit lebenden Nauplien von *Artemia salina*. Eine Ei- bzw. Spermienablage erfolgte vor der Fütterung in separaten Schalen. Embryonen wurden gesammelt und über Siebe von Verschmutzungen befreit. Die sich aus Embryonen entwickelnden Planula-Larven konnten auf Objektträgern zur Metamorphose gebracht werden (2.2.3). Objektträgerkolonien wurden in Aquarien gehältert. Selbiges galt für transgene Kolonien. Transgene Kolonien auf Objektträgern wurden jedoch, getrennt von Wildtyp-Kolonien, in gesonderten Aquarien gehältert.

2.2.2 Fixierung von *Hydractinia echinata* Stadien

- Lebendmaterial (Polypen; Planula-Larven; Embryonalstadien) wurde in 0,2 M MgCl₂ für zwanzig Minuten bei 18°C anästhesiert.
- Das Material wurde in ein Blockschälchen überführt und in 1 ml 4% Paraformaldehyde/HEPES für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert.
- Hiernach wurde für jeweils zehn Minuten dreimal mit je 1 ml 1x PBST (RNase frei) gewaschen, bevor das fixierte Gewebe in 1 ml 1x PBST des letzten Waschschrittes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde.
- Abschließend wurde das Material wie folgt im Heizblock (2.1.1) bei 98°C Hitzebehandelt (Plickert et al., 1997):

Polypen	10 bis 14 Minuten
Larven	8 Minuten
Embryonen	6 Minuten

Im Verlauf der ersten zwei Minuten wurde alle zwanzig Sekunden, danach jede Minute kurz gemischt um ein Verklumpen des Materials zu verhindern.

- Das Material konnte bis zur weiteren Verwendung nach Abkühlen auf Eis im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.3 Induktion der Metamorphose

Die Metamorphose von *Hydractinia* Planula-Larven wurde durch Inkubation in 0,125 M CsCl über drei Stunden ausgelöst (Müller et al., 1973). Anschließend wurden die Larven dreimal mit Seewasser gewaschen. Auf Objektträgern, in mit Seewasser gefüllten Plexiglaskammern, entwickelten sich innerhalb der nächsten vierundzwanzig Stunden Primär-Polypen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen wurden, wenn nicht anders erwähnt, nach dem in Tab.5/6 dargestellten Schema angesetzt: In PCR-Reaktionsgefäßen wurden x µl Template und je 1 µl 10 pmol Primer vorwärts und 1 µl 10 pmol Primer rückwärts mit bidest. H₂O auf 14 µl aufgefüllt. In einem 1,5ml Reaktionsgefäß wurde dann folgender 2,5 fach „Master-Mix“ zusammengestellt (Tab.5).

Komponente	Menge
bidest. H ₂ O	3,5 µl
dNTP-Mix 10mM	1 µl
5x HF Phusion-Puffer	10 µl
Phusion high-fidelity DNA-Polymerase [2 U/µl]	0,5 µl
	—
	15 µl

Tab.5 2,5 fach „Master-Mix“

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden bei 80°C in den Eppendorf-MasterCycler (2.1.1) gestellt und für 15 Sekunden erhitzt. Hiernach wurden 6 µl aus dem 2,5 fach „Master“-Reaktionsansatz (Tab.5) zugegeben und die PCR-Reaktion (Tab.6) wurde gestartet.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
	80 ° C	
1. Initiale Denaturierung	98 ° C	2 Minuten
2. Denaturierung	98 ° C	15 Sekunden
3. Annealing	X ° C	30 Sekunden
4. Elongation	72 ° C	X Minuten


 25→30 x

Tab.6 Parameter der PCR

Die Annealing-Temperatur war abhängig von den jeweiligen Primern. Die Elongationszeit ergab sich aus der erwarteten Fragment-Länge.

2.3.2 RACE-PCR

Zunächst wurde aus Tieren isolierte RNA (2.3.4) in cDNA umgeschrieben (2.3.5). RACE-PCR wurde durchgeführt wie in "Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes" (Matz, 2002) beschrieben. Im Verlauf dieser Arbeit wurde hierzu Methode B („for cDNA synthesis using template-switch effect“) angewendet. Die so erzeugten cDNA Fragmente besaßen am 3´ bzw. 5´ Ende die Basenfolge des TRsa und Ts-oligo Oligonukleotids (2.1.7). In einer im Anschluss an eine primäre PCR durchgeführten Re-PCR wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung aus dem ersten PCR-Ansatz als Template verwendet. 5´ und 3´ RACE-PCR-Ansätze enthielten folgende Komponenten (Tab.7 und Tab.8):

Komponente	Oligonukleotid	Menge
bidest. H ₂ O		x µl
5x HF-Phusion-Puffer		4 µl
Primer fwd. [10 pmol/µl]	DAP+DAP-Ts Primer/in der Re-PCR	1 µl
	TS-PCR Primer	
Primer rev. [10 pmol/µl]	genspezifisches Oligonukleotid/ in der Re-PCR ggf. ein weiter innen liegendes genspezifisches Oligonukleotid	1 µl
dNTP-Mix		0,4 µl
Template		x µl
Phusion high fidelity DNA-Polymerase [2 U/µl] auf 0,4 U mit 1 x HF-Puffer vor Gebrauch verdünnen		1 µl
		—————
		20 µl

Tab.7 5´ RACE-PCR

Komponente	Oligonukleotid	Menge
bidest. H ₂ O		x µl
5x HF-Phusion-Puffer		4 µl
Primer fwd. [10 pmol/µl]	genspezifischer Primer/ in der Re-PCR ggf. ein weiter innen liegender genspezi- fischer Primer	1 µl
Primer rev. [10 pmol/µl]	DAP-Trsa Oligonukleotid /in der Re- PCR TRsa Oligonukleotid (2.1.7)	1 µl
dNTP-Mix		0,4 µl
Template		x µl
Phusion high fidelity DNA-Polymerase [2 U/µl] auf 0,4 U mit 1 x HF-Puffer vor Gebrauch verdünnen		1 µl
		20 µl

Tab.8 3' RACE-PCR

Im Eppendorf-MasterCycler (2.1.1) wurden folgende Parameter für die Amplifikation bei 3' oder 5' RACE verwendet (Tab.9).

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
	80 ° C	
1. Initiale Denaturierung	98 ° C	2 Minuten
2. Denaturierung	95 ° C	15 Sekunden
3. Annealing	X ° C	5 Sekunden
4. Elongation	72 ° C	X Minuten


30 x

Tab.9 Parameter der RACE-PCR

2.3.3 Quantitative-PCR (qPCR)

Im Verlauf dieser Arbeit wurden qPCR-Ansätze (Tab.10 und Tab.11) im ICycler® der Firma BioRad (2.1.11) durchgeführt.

Komponente	Menge
Primer fwd. [10 pmol/μl]	1,0 μl
Primer rev. [10 pmol/μl]	1,0 μl
2 x iQ™ SYBR® Green Supermix	10 μl
cDNA Template (2.3.5)	1 μl
bideest. H ₂ O	7 μl
	—
	20 μl

Tab.10 qPCR-Ansatz

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	95 ° C	3 Minuten	 40 x
2. Denaturierung	95 ° C	15 Sekunden	
3. Annealing/Elongation	65 ° C	20 Sekunden	

Tab.11 Parameter der qPCR

Alle Komponenten eines qPCR Ansatzes, bis auf das cDNA Template, wurden zunächst in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt, um dann in “Flat Cap Strips“ der Firma Biorad als Dreifachbestimmungen auf Eis verteilt zu werden. Für jedes untersuchte Gen wurde das Experiment dreimal als Triplikat durchgeführt. Für jedes der Experimente wurden unabhängige cDNA-Verdünnungen hergestellt und den Triplikaten zugesetzt. Die Verdünnung der cDNA-Templates erfolgte aus Gründen der Vermeidung von Kontamination durch Aerosol Bildung in einem anderen Raum. Um die Expression von Zielgenen in unterschiedlichen cDNAs vergleichen zu können, wurde als konstantes Referenzgen „eukaryotic elongation factor 2“ (EEF2) (Fedrigo et al., 2010) von *Hydractinia* verwendet. Die qPCR Oligonukleotide (Tab.4; 2.1.7) wurden so erstellt, das zu erwartende qPCR-Fragmente auf Basis von cDNA eine Länge von 200 bp wenn möglich nicht überschritten. Um Kontaminationen ausschließen zu können, wurden zusätzliche Negativ-Kontrollen ohne cDNA Template mitgeführt. Um zu verhindern, dass

auch genomische Fragmente amplifiziert werden, wurden qPCR-Oligonukleotide so gewählt, dass im Falle einer Kontamination durch genomische DNA mindestens ein Oligonukleotid eine Exon/Intron-Grenzen überlagert, wodurch das Oligonukleotid nicht mehr zu einer Hybridisierung auf genomischer DNA in der Lage war. Alternativ wurden die Primer so gewählt, dass durch die zwischen ihnen liegenden Intron-Sequenzen die PCR-Fragmente so groß wären, dass eine Amplifikation auf Grund der limitierten Elongationszeit nicht erfolgt. Routinemäßig wurden an qPCR-Reaktionen Gelkontrollen (2.3.6) oder Schmelzkurvenanalysen angeschlossen. Die Ergebnisse einer qPCR wurden mittels Biorad Software CFX Manager™ (2.1.11) analysiert. Die relative Häufigkeit eines untersuchten Transkripts in cDNA wurde relativ zur Wildtyp-Kontrolle in einem Balkendiagramm zusammen mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Als Berechnungsgrundlage diente die so genannte $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei vergleicht man die Expression eines Zielgens mit der Expression eines Referenzgens. Aus gemittelten C_t -Werten lässt sich zunächst ΔC_t berechnen. $\Delta C_t = C_t$ (Mittelwert) Zielgen – C_t (Mittelwert) Referenzgen. Hiernach berechnet man $\Delta\Delta C_t$ folgendermaßen. $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ aus Transgen-cDNA – ΔC_t Wildtyp-cDNA. Der Expressionsunterschied ergibt sich indem $\Delta\Delta C_t$ in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt wird.

2.3.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der in Chirgwin et al., 1979 beschriebenen Methode. Entwicklungsstadien von *Hydractinia* (Embryonen, Larven, Polypen oder anderes Lebendmaterial) wurden dreimal mit 0,5 M NaCl gewaschen. Nach Entfernen der NaCl-Lösung wurde das Frischmaterial in 300 μ l Guanidinium-Puffer (2.1.9) in einem 2 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Bei 20000 rpm wurde das Material dann umgehend mit einem Schermesserhomogenisator (2.1.1) zerkleinert. Alternativ wurde Frischmaterial nach dem Waschen in 0,5 M NaCl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt, um später verarbeitet zu werden.

- Das Homogenat wurde für fünf Minuten bei 13000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert, um unlösliche Komponenten durch Sedimentation abzutrennen.
- Der Überstand wurde in ein 13x51 mm Polyallomer-Zentrifugenröhrchen vorsichtig über ein 1,2 ml CsCl-Kissen (2.1.9) geschichtet.

- Ultrazentrifugation (Beckmann Ultrazentrifuge 2.1.1) über achtzehn Stunden bei 38000 rpm bei 22°C in einem SW55 Rotor führt zu einer Trennung von RNA-Sediment und DNA bzw. Proteinen, die das CsCl-Kissen nicht durchdringen können.
- Nach Absaugen des Überstands unter Invertieren des Polyallomer-Röhrchens, um eine Kontamination der RNA mit Resten des Homogenisats zu vermeiden, wurde das Röhrchen in Höhe der vormaligen CsCl-Kissen Grenze mit einer sterilen Skalpell-Klinge abgetrennt.
- Das RNA-Sediment wurde unter Staubschutz in 0,1% RNase freiem SDS für zwei Stunden gelöst.
- Anschließend wurde die RNA gefällt. Dem Ansatz wurden 1/20 Vol. 5 M NaCl sowie 2,5 Vol. 100% EtOH zugegeben. Hiernach wurde der Ansatz für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für zehn Minuten bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert.
- Die gefällte RNA wurde zweimal mit je 1 ml 70% EtOH gewaschen und bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert.
- Das angetrocknete Pellet wurde in 20 µl bidest. H₂O gelöst.
- Die Integrität der RNA wurde auf einem 0,8% Agarose-Gel (2.3.6) kontrolliert, die Mengenbestimmung erfolgte photometrisch (2.3.8).

Alternativ wurde das mirPremier micro RNA isolation kit (2.1.10) entsprechend der mitgelieferten Anleitung verwendet, um aus Kleinstmengen von *Hydractinia* Ausgangsmaterial RNA zu gewinnen.

2.3.5 cDNA-Synthese

Die im Verlauf dieser Arbeit aus RNA von *Hydractinia* (2.3.4) erzeugte cDNA wurde, wie in Methode B („for cDNA synthesis using template-switch effekt“) in der Arbeit von Matz et al., 2002 beschrieben, hergestellt.

- Zu 3 µg RNA in 3 µl wurde 1 µl 10 µM TRsa-Oligonukleotid zugegeben (Tab.2; 2.1.7).
- Das Gemisch wurde für drei Minuten bei 65°C in einem Heizblock (2.1.1) erhitzt, bevor es drei Minuten auf Eis gekühlt wurde.

Folgender cDNA Synthese-Ansatz (Tab.12) wurde auf Eis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengestellt:

Komponente	Menge
RNA Trsa Oligonukleotid-Gemisch	4 µl
Ts-oligo Oligonukleotid [5 µM]	1 µl
5x Reverse-Transkriptase-Puffer	2 µl
DTT [0,1 M]	1 µl
dNTP's [10 mM]	0,5 µl
Ribolock RNase-Inhibitor	0,5 µl
Reverse-Transkriptase [200 U/µl]	1 µl
	—
	10 µl

Tab.12 cDNA-Synthese-Ansatz

- Der cDNA-Synthese-Ansatz wurde eine Stunde lang bei 42°C in einem Heizblock (2.1.1) inkubiert.
- Es wurde 0,5 µl 20 mM MnCl₂ zugegeben, wonach der Ansatz für fünfzehn Minuten bei 42°C im Heizblock inkubiert wurde.
- Die Synthese wurde für zwei Minuten bei 100°C im Heizblock abgestoppt.
- Es wurden 5 µl 1x RNaseMix/TE zugegeben, wonach das Gemisch für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.
- Der Ansatz wurde erneut für fünf Minuten auf 100°C in einem Heizblock erhitzt, bevor EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben wurde. Die so erzeugte cDNA konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

Einzelsträngige cDNA, die als Template in qPCR Versuchen (2.3.3) verwendet wurde, wurde mit nur einem Oligo-dT-Primer (DAP-TRsa; Tab.2) entsprechend des oben gezeigten Ansatzes erzeugt.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Entsprechend der zu erwartenden Größe von DNA- oder RNA-Fragmenten wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Für Fragmente einer Größe von < 200 bp haben sich 2 % Agarosegele bewährt. Für RNA wurden die Gele unter RNase freien Bedingungen erzeugt. Hierzu wurden Laufkammer, Gel-Form und Kamm für zehn Minuten mit 10 % H₂O₂ behandelt.

- X g Agarose wurden in 50 ml 0,5 x TBE-Puffer (2.1.9) in der Mikrowelle aufgekocht. Der Wasserverlust wurde durch dest. H₂O ausgeglichen und das Gemisch erneut kurz aufgekocht.
- Der Lösung wurden 4 µl EtBr [10 mg/ml] zugeben.
- Das Gemisch wurde in Gelkammern ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Gele mit 0,5 x TBE-Puffer, der mit EtBr versehen wurde, bedeckt.

Durch Auftragen der Marker pBR 328 MixI (MBBL) oder 1kb-ladder (Fermentas) auf das Gel ließen sich die Banden hinsichtlich ihrer Größe definieren. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit einem 6 x Ladepuffer versehen (2.1.9). Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte digital (Alpha-Imager (2.1.1)).

2.3.7 Extraktion von Fragmenten aus Agarosegelen

Mit einem sterilen Skalpell wurden unter langwelligem UV-Licht niedriger Intensität banden-tragende Bereiche aus dem Agarosegel isoliert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die enthaltenen DNA-Fragmente wurden mit dem Fermentas GenJet Gel extraction Kit (2.1.10) entsprechend der Anleitung aufgereinigt.

2.3.8 Photometrische Konzentrationsmessung von DNA oder RNA

Konzentration und Qualität von DNA- oder RNA-Proben wurden am NanoDrop Photometer (2.1.1) ermittelt.

2.3.9 Sequenzierung

Reinigung und Analyse von Probenmaterial wurden am Cologne Center for Genomics durchgeführt. Entsprechend dessen Anleitung wurde die Sequenzier-Reaktion folgendermaßen durchgeführt (Tab.13/14):

Komponente	Menge
bidest. H ₂ O	x µl
5 x BigDye sequencing-Puffer	2,25 µl
Oligonukleotid [10 pmol]	0,25 µl
PCR-Template 2 → 10 ng pro 100bp	x µl
BigDye ® terminator v1.1/v3.1	0,25 µl
	—
	10 µl

Tab.13 Sequenzier-PCR-Ansatz

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	
1. Denaturierung	96 ° C	10 Sekunden	 40 x
2. Annealing	55 ° C	5 Sekunden	
3. Elongation	60 ° C	4 Minuten	

Tab.14 Parameter der Sequenzier-PCR

2.3.10 Klonierung von Fragmenten

Stumpfendige, phosphorylierte (2.3.1 und 2.3.10.2) PCR-Fragmente wurden in, im Labor, vorhandene Vektoren ligiert. Des Weiteren wurden vorhandene Konstrukte den Bedürfnissen entsprechend modifiziert. Es wurde von einem von Timo Künzel hergestellten Konstrukt ausgegangen (pActII:51Act-eGFP, in Künzel et. al., 2010). Das in dieser Arbeit verwendete, modifizierte Konstrukt besteht aus einem 2227 bp großen Vektor-Rückgrat, einer 1976 bp *Hydractinia* AktinII Promotor-Sequenz, einer 714 bp umfassenden Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins GFP, sowie einer 1569 bp umfassenden Terminatorregion von *Hydractinia* AktinII (Abb.4) (siehe Anhang Abb.31).

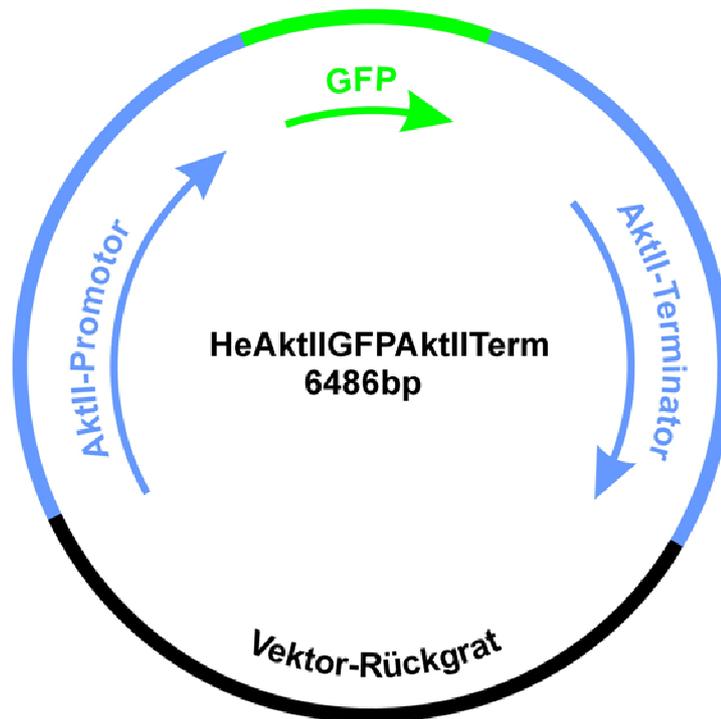


Abb.4 Plasmid-Karte von HeAktIIIGFPAktIIterm

In blau dargestellt sind die AktinII (AktII) Terminator-Region, sowie die AktinII Promotor-Region. In schwarz abgebildet ist das „Vektor-Rückgrat“ des Ursprungsvektors. In grün wurde GFP dargestellt.

2.3.10.1 Herstellung stumpfendiger Vektoren

Zur Herstellung von Vektoren konnten vorhandene Konstrukte an beliebigen Stellen mittels PCR (2.3.1) geöffnet und linearisiert werden. Nach Analyse auf einem Agarosegel (2.3.6), Isolierung der linearisierten Vektoren aus dem Gel (2.3.7) sowie einer Mengenbestimmung des Isolats (2.3.8) konnten die Vektoren für Ligationsansätze verwendet werden.

2.3.10.2 Phosphorylierung stumpfendiger PCR-Produkte

Gereinigte PCR-Fragmente, deren Menge und Qualität photometrisch bestimmt worden waren (2.3.8), wurden vor der Ligation in stumpfendige Vektoren zunächst nach folgendem Ansatz phosphoryliert (Tab.15).

Komponente	Menge
PCR-Template (x ng/μl)	15 μl
5 x T4-DNA-Ligase-Puffer + PEG	4 μl
PNK [10 U/μl]	1 μl
	—
	20 μl

Tab.15 Phosphorylierungs-Ansatz

- Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C in einem Brutschrank (2.1.1) inkubiert.
- Die Reaktion wurde bei 65°C in einem Heizblock (2.1.1) abgestoppt. Der Reaktionsansatz wurde dann mit 30 μl bidest. H₂O aufgefüllt.
- Der Ansatz wurde mittels GenJet PCR extraction Kit (2.1.10) nach der dem Kit beiliegenden Anleitung gereinigt.
- Das phosphorylierte Fragment wurde in 10 μl bidest. H₂O gelöst, bevor die Menge und Qualität der DNA bestimmt wurde (2.3.8).

2.3.10.3 Ligations-Ansatz

Stumpfendige, phosphorylierte PCR-Fragmente (2.3.10.2) wurden in stumpfendige Vektoren (2.3.10.1) ligiert (Tab.16).

Komponente	Menge
bidest. H ₂ O	x μl
Fragment (x ng)	x μl
Vektor (Menge~10-50 ng)	x μl
5 x T4-DNA-Ligase-Buffer + PEG	2 μl
T4-DNA-Ligase [3 U/μl]	0,3 μl
	—
	10 μl

Tab.16 Ligations-Ansatz

Das optimale Verhältnis von Vektor zu Fragment für die Ligationsreaktion wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{ng Vektor} * \text{Basenpaare Fragment}}{\text{Basenpaare Vektor}} * 3 = \text{Menge an benötigtem Fragment in ng}$$

- Der Ligationsansatz wurde für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Zugabe von 15 µl bidest. H₂O wurde die Ligation bei 70°C für zehn Minuten in einem Heizblock (2.1.1) abgestoppt.
- Der Ansatz wurde für einige Minuten auf Eis gekühlt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert.
- Als Kontrolle wurde Vektor ohne Fragment ligiert.

Der Ligationsansatz konnte bei -20°C gelagert werden.

2.3.10.4 Transformation von Bakterien

Ligationsansätze (2.3.10.3) wurden in NEB 10 beta competente E. coli Zellen entsprechend der den Bakterien beiliegenden Anleitung eingeschleust. LB-Platten, die mit 100 µg/ml Carbenicillin versehen wurden (2.1.4), wurden für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank (2.1.1) erwärmt.

- Auf den LB-Carbenicillin Platten wurden 100 µl der transformierten Bakterien direkt ausplattiert.
- Die restlichen 400 µl wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden verworfen. In den restlichen 100 µl wurden die sedimentierten Zellen resuspendiert. Die 100 µl wurden auf einer LB-Carbenicillin Platte mit einer sterilen Glaspipette ausgestrichen.
- Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank (siehe 2.1.1) inkubiert.

Parallel wurde als Kontrolle eine Ligation des Vektors ohne Fragment in Bakterien verbracht.

2.3.11 Analyse der Transformation

Transformierte Bakterienkolonien (2.3.10.4), die auf LB-Carbenicillin Platten über Nacht gewachsen waren, wurden mittels PCR (2.3.1) auf das Vorhandensein des Fragments in der gewünschten Orientierung analysiert.

2.3.11.1 Kombinatorisches Analyse-Verfahren

In einer 36er Well-Platte wurden Kammern mit 200 µl LB/Carbenicillin-Medium [400 µg Carbenicillin/ml] gefüllt. Einzelne Kolonien wurden dann mit einer Pipetten-Spitze von den LB-Carbenicillin-Platten in die einzelnen Wells überführt und resuspendiert.

- Die Platten wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Entsprechend dem in Abb.5 dargestellten Schema, wurden je 90 µl aus jedem Well einer Reihe bzw. Spalte vereinigt. Auf diese Weise konnten 36 Kolonien in nur 12 PCR-Reaktionen überprüft werden.

	1	2	3	4	5	6	
A	A1	A2	A3	Usw.			PoolA
B	B1	Usw.					PoolB
C	C1						usw.
D	D1						
E	E1						
F	F1						
	Pool1	Pool2	usw.				

Abb.5 Kombinatorisches-Beladungsschema einer 36er Well-Platte

Je 90 µl aus Reihen und Spalten wurden jeweils in einem Pool zusammengefasst. Zeigen beispielsweise Pool A sowie Pool 2 bei einer PCR ein positives Ergebnis so ist in Well A2 ein positiver Klon zu erwarten.

- Diese Ansätze wurden für fünf Minuten bei 13000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert.
- Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 µl bidest. H₂O resuspendiert.
- Die Suspension wurde bei 100°C in einem Heizblock (2.1.1) für fünf Minuten aufgekocht und anschließend für zwei Minuten auf Eis gekühlt.
- Die Proben wurden erneut bei 13000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand diente als Template für eine PCR (2.3.1) mit geeigneten Primer-Kombinationen.

Auch bei nur einem einzigen richtigen Klon in der gesamten Platte sind zwei positive Banden nach der PCR auf einem Gel, da jeder Klon immer in zwei Pools vertreten sein muss.

2.3.11.2 Analyse einzelner Kolonien

- Um einzelne Bakterienkolonien bezüglich der Integration von Fragmenten zu untersuchen, wurden Bakterienkolonien mit einer Pipetten-Spitze von einer LB-Carbenicillin-Platte gepickt und in 200 µl LB-Carbenicillin-Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert.
- Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurden 180 µl Bakteriensuspension in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- In einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) wurde für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 20 µl bidest. H₂O resuspendiert.
- Die Suspension wurde in einem Heizblock (2.1.1) für fünf Minuten auf 100°C erhitzt und im Anschluss zwei Minuten auf Eis gekühlt.
- Es wurde bei 13000 rpm für fünf Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert. Der wässrige Überstand diente als Template für eine PCR (2.3.1) mit geeigneten Primer-Kombinationen.

2.3.12 Herstellung von Bakterien-Übernachtkulturen

Wurde eine positive Bakterienkolonie identifiziert (2.3.11), so wurde aus dem entsprechenden Well/ 1,5 ml Reaktionsgefäß 20 µl Bakteriensuspension entnommen und in 2 ml

LB/Carbenicillin Medium in Glasröhrchen überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Inkubator (2.1.1) geschüttelt.

2.3.13 Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Im Verlauf der Arbeit wurde, leicht abgewandelt, das Verfahren der alkalischen Lyse angewendet, um Plasmid-DNA zu isolieren (Birnboim und Doley, 1979; Horowicz and Burke, 1981).

2 ml Bakteriensuspension (2.3.12) wurden aus den Glasröhrchen entnommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid extrahiert. Das Plasmid-Pellet wurde in 30 µl 1x RNase Mix/TE (2.1.9) aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank (2.1.1) inkubiert.

2.3.14 Reinigungsfällung von Plasmid-DNA

Nach der Isolierung (2.3.13) wurde die Plasmid-DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion vom RNase-Mix befreit und zur Entfernung der verdauten RNA in Gegenwart von Ammoniumacetat mit EtOH gefällt.

- Es wurden 30 µl Phenol und die gleiche Menge an Chloroform zugegeben, gemischt und für eine Minute bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert.
- Die wässrige Phase wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Chloroform versetzt, gemischt und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.
- Dem entnommenen wässrigen Plasmidüberstand wurde 1/5 Vol. 10 M Ammoniumacetat zugegeben und gut gemischt. Nach der Zugabe von 2,5 Vol. EtOH und Schwenken des 1,5 ml Reaktionsgefäßes wurde das Plasmid-DNA Knäul mit einer sterilen Pipetten-Spitze in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Die DNA wurde in 30 µl 1x TE gelöst, 15 Minuten inkubiert und mit 1/10 Vol. 10 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. EtOH gefällt.
- Plasmid-DNA wurde als Knäul in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und bei 13000 rpm für eine Minute in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert.

- Das Plasmid-DNA-Pellet wurde in 30 µl 1x TE gelöst.
- Es wurden 1/20 Vol. 5 M NaCl und 2,5 Volumina EtOH zugegeben und für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert.
- Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 70% EtOH gewaschen, bevor die gereinigte Plasmid-DNA in 10 µl 1x TE gelöst wurde.

2.3.15 Mikroinjektion

2.3.15.1 Amplifikation von Injektionsmaterial

Unter Zuhilfenahme der Oligonukleotide KSEndApaIfwd und KSStartApaIrev. (Tab.3) wurde mittels PCR ein linearisiertes Fragment, bestehend aus Promotor, proteinkodierender Sequenz und Terminator, aus dem Konstrukt amplifiziert. Um große Mengen Material erzeugen zu können wurden zehn PCR-Ansätze von je 100 µl Gesamtvolumen erzeugt. Die PCR-Ansätze (2.3.1) wurden entsprechend angepasst. Nach der PCR-Reaktion wurden von den zehn 100 µl PCR-Reaktionen je fünf zusammengefügt und gefällt.

- Den vereinigten PCR-Ansätzen wurden 1/20 5 M NaCl, 4 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und 2,5 Vol. 100% EtOH zugegeben. Das Gemisch wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für fünf Minuten bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert.
- Es wurde zweimal gewaschen, indem das Pellet in 1 ml 70% EtOH aufgenommen, gemischt und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert wurde.
- Das getrocknete Pellet wurde in 90 µl bidest. H₂O aufgenommen.

Anschließend wurde mit ApaI verdaut, da sich gezeigt hat, dass Fragmente mit überstehenden Enden die beste Effizienz bei der Erzeugung transgener Tiere erzielen.

- 88 µl Amplifikat wurden mit 10 µl Puffer blau sowie 2 µl Restriktions-Enzym ApaI [10 U/µl] über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank (2.1.1) inkubiert.

Das verdaute Injektionsmaterial wurde dann mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.14).

Abweichend von 2.3.14 wurde das Injektionsmaterial jedoch nicht mit 1/20 Vol. 5 M NaCl, sondern mit 1/10 Vol. 2 M KCl sowie 2,5 Vol. EtOH gefällt. Das Material wurde dann nach zweimaligem Waschen mit 70% EtOH in 9 µl 1/5 TE-Puffer gelöst.

2.3.15.2 Mikroinjektion in Ein- und Zweizell-Embryonalstadien

Mit Hilfe einer Stickstoff-betriebenen Druckinjektionseinrichtung (PV pneumatic PicoPump; 2.1.1) wurden die Amplifikate (2.3.15.1) in befruchtete Ein- und Zweizellstadien von *Hydractinia* injiziert. 4 µl des Injektionsmaterials mit einer Konzentration von 1 µg/µl wurden mit 1 µl 250 mM KCl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Injektions-Glaskappilare aufgezogen und injiziert. Während der Injektion befanden sich die Embryonen in Seewasser auf einer mit Gaze versehenen Maxwellplatte. Durch die Maschen der Gaze waren die Embryonen auf dem Untergrund weitgehend immobilisiert. Die injizierten Embryonen wurden in Blockschalen überführt und konnten sich innerhalb der nächsten 72 Stunden unter mehrmaligem Seewasserwechsel zu Planula-Larven entwickeln.

2.3.16 in-situ-Hybridisierung

in-situ-Hybridisierungen wurden nach etablierten Protokollen des Labors (Gajewski et al., 1996) durchgeführt.

2.3.16.1 Herstellung von in-situ-Sonden

Um Fragmente zu erzeugen, aus denen in-situ-Sonden erzeugt wurden, wurde zunächst der Vektor pBSIISK- nach folgendem Restriktionsansatz mit EcoRV stumpfendig linearisiert (Tab.17):

Komponente	Menge
bidest. H ₂ O	7,2 µl
Puffer-Rot	1 µl
Vektor	1 µl
EcoRV	0,3µl
	—
	10 µl

Tab.17 Restriktions-Ansatz

Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C für eine Stunde in einem Brutschrank (2.1.1) inkubiert. Die Restriktion wurde auf einem Agarosegel analysiert (2.3.6) und mit 15 mM EDTA abgestoppt. Der Vektor wurde im Anschluss dephosphoryliert (Tab.18) und über ein Agarosegel gereinigt (2.3.7).

Komponente	Menge
bidest. H ₂ O	4 µl
10 x AP Alkalische-Phosphatase Puffer	3 µl
fast-AP-Alkalische-Phosphatase	3 µl
Vektor	20 µl
	—
	30 µl

Tab.18 Dephosphorylierung von Vektoren

2.3.16.2 Ligation von PCR-Fragmenten in pBSIISK- und Transformation

Gereinigte und phosphorylierte PCR-Fragmente (2.3.10.2) wurden in den EcoRV verdauten, dephosphorylierten pBSIISK-Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte entsprechend 2.4.10.3, wonach diese in Bakterien eingeschleust wurden (2.3.10.4). Bakterienkolonien wurden analysiert (2.3.11) und Übernachtskulturen angelegt (2.3.12). Die Plasmide wurden isoliert und gereinigt (2.3.13 und 2.3.14).

2.3.16.3 Amplifikation von Matrizen für in-situ-Sonden

Aus Plasmid-DNA (2.3.16.2) konnten mittels PCR (2.3.1) Matrizen für ISH-Sonden amplifiziert werden. Für die PCR wurde hierzu ein pUC/M13fwd beziehungsweise ein pUC/M13rev Oligonukleotid (2.1.7) und ein genspezifisches vorwärts bzw. rückwärts Oligonukleotid verwendet. Auf diese Weise wurden Fragmente erzeugt, die entweder den T7- oder den T3-RNA-Polymerase-Promotor vor der Sequenz enthielten, die zur Herstellung von „sense“ und „antisense“ Sonden benutzt werden sollten. Die Amplifikate wurden über Agarosegele gereinigt (2.3.7), bevor die Konzentration bestimmt wurde (2.3.8).

2.3.16.4 „Run-off-Transkription“

Mit Hilfe der erzeugten Matrizen-Fragmente wurde durch „run-off“ Transkription mit T7- oder T3-RNA-Polymerase in Gegenwart von DIG-dUTP unter RNase freien Bedingungen DIG markierte „sense“ und „antisense“ RNA-Sonden erzeugt (Tab.19).

Komponente	Menge
bidest. H ₂ O	x µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
Template	x µl
RNase-Inhibitor [40 u/µl]	0,5 µl
DIG-RNA-labeling-Mix	2 µl
T7- oder T3-RNA-Polymerase [20 U/µl],	1,5 µl —
	20 µl

Tab.19 Run-off Transkriptions-Ansatz

- Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank (2.1.1) inkubiert.
- Die Reaktion wurde mit 2 µl 200 mM EDTA pH 8,0 abgestoppt. 2 µl des Ansatzes wurden mit einem geeigneten Größenmarker auf ein Agarosegel (2.3.6) aufgetragen, um die erzeugte RNA bezüglich ihrer Integrität zu analysieren.

Der Ansatz wurde dann wie folgt gefällt:

- Es wurden 7 µl 10 M Amonacetat zugegeben, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und für fünf Minuten bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.1.1) zentrifugiert.
- Das Pellet wurde zweimal mit RNase-freiem 70% EtOH gewaschen und dann in 10 µl bidest. H₂O gelöst.
- Die Lösung wurde mit 0,5 µl RNase-Inhibitor versetzt und zehn Minuten bei 37° C in einem Brutschrank (2.1.1) inkubiert.
- Die Sonden wurden auf Agarosegelen (2.3.6) hinsichtlich ihrer Qualität eingeschätzt.
- Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.3.7), bevor die Sonden in einer Konzentration von 500 ng/ml in Hybridisierungsmix aufgenommen und bei -20° C eingelagert wurden.

2.3.16.5 in-situ-Hybridisierungs-Protokoll

- Fixierte Stadien (2.2.2) wurden zweimal für je zehn Minuten in 150 µl 1x PBST gewaschen.
- Die fixierten Tiere wurden jeweils mit 150 µl TEA und dann mit 150 µl TEA-AA für fünf Minuten behandelt.
- Der TEA-AA Puffer wurde abgenommen, bevor zweimal für je zehn Minuten in 150 µl 1x PBST gewaschen wurde.
- Danach wurde das Tiermaterial in 150 µl 4% PBS/PFA 20 Minuten lang nachfixiert.
- Es wurden dreimal je zehn Minuten in 150 µl 1x PBST gewaschen.
- Um unspezifische Bindungen der Sonden weitgehend zu unterdrücken, wurde zehn Minuten lang mit 75 µl PBST/HS-DNA [0,5 mg/ml] abgesättigt, bevor 75 µl Hybridisierungsmix zugegeben und fünf Minuten lang inkubiert wurde.
- Das Versuchsmaterial wurde für zehn Minuten bei 47°C in einem Heizblock (2.1.1) in 150 µl Hybridisierungsmix inkubiert.
- Die Sonden mit einer Konzentration von [500 ng/ml] (2.3.16.5) wurden in Hybridisierungsmix auf eine Konzentration von 50 ng/ml verdünnt, zehn Minuten lang bei 70°C im Heizblock denaturiert und auf Eis gekühlt.
- 150 µl der Sonden wurden auf Objekte gegeben, wonach für 20 Stunden bei 47°C in einem Heizblock inkubiert wurde. Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten dann bei 47°C in einem Heizblock.

- Nach 20 Stunden wurden die Ansätze 60 Minuten lang in 150 µl wash I gewaschen, bevor sie 15 Minuten lang in 150 µl wash II und zweimal 15 Minuten lang in 150 µl wash III gewaschen wurden.
- Die nachfolgenden Schritte erfolgten wieder bei Raumtemperatur. Die Proben wurden für 20 Minuten in 150 µl 1x PBST gewaschen.
- Proben wurden für 60 Minuten in 150 µl PBST/BSA abgesättigt, bevor sie zwei Stunden lang in 150 µl anti-Digoxigenin-Alkaline-Phosphatase-konjugiertem Antikörper in 1x PBST in einer Verdünnung von 1:1500 inkubiert wurden.
- Danach wurden die Proben viermal in 150 µl 1x PBST für 20 Minuten gewaschen.
- Durch nachfolgende dreimalige Inkubation in 150 µl 10 mM MgCl₂ AP-Puffer für je zehn Minuten wurden die Proben auf einen alkalischen pH-Wert äquilibriert.
- Anschließend wurden die Proben fünf Minuten lang mit 150 µl 40 mM MgCl₂ AP-Puffer äquilibriert.
- Danach erfolgte die Substratreaktion mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP Stammlösung in 1 ml 40 mM MgCl₂ AP-Puffer für zehn Minuten bis 16 Stunden in 24er-Multi-Well Platten. Die Substratreaktion wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Binokular kontrolliert.
- Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils fünf Minuten mit 1 ml Stop-Mix abgestoppt, wenn ein gewünschter Färbegrad erreicht war.

Die so präparierten Objekte wurden auf Objektträger überführt, in ISH-Einbettungsmedium aufgenommen und mit einem Deckglas bedeckt. Um die fertigen Präparate vor Austrocknung zu bewahren, wurden sie an den Deckglasrändern mit Nagellack versiegelt und bei -20°C gelagert. Als Positiv-Kontrolle wurden zusätzlich Proben mit einer im Labor vorhandenen antisense-RF-Amid Sonde (Plickert et al., 2003) mit behandelt.

2.3.17 Herstellung von *Hydractinia echinata* Semidünnschnitt-Präparaten

Gastrozoide, die einen veränderten Phänotyp zeigten, sowie Wildtyp-Gastrozoide wurden vor der Futtergabe von Kolonien geschnitten, die auf Objektträgern gewachsen waren. Die Tiere wurden in 0,2 M MgCl₂ für 20 Minuten betäubt. Fixierung und Herstellung 1µ feiner Schnittpräparate wurden im Histologie-Labor des Instituts durchgeführt. Hierbei wurden die Gastrozoide wie folgt behandelt (Mitteilung der Histologie-Laborantin Frau Monika Hartmann):

- Gastrozoide wurden für eine Stunde in einem Gemisch aus 5% Glutaraldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,2 mit 0,14 M NaCl fixiert.
- Die Präparate wurden dreimal für fünf Minuten in 0,2 M Phosphatpuffer mit 0,3 M NaCl pH 7,2 gewaschen.
- Es folgte eine Alkoholreihe mit 30, 50 und 70 % EtOH für zweimal je fünf Minuten, wonach die Präparate in einem Gemisch aus 70% EtOH und alkoholischer Boraxcarminlösung nach Romais 1:1 gefärbt wurden. Danach wurde mehrfach mit 70% EtOH gewaschen.
- Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Behandlung mit 96% EtOH für je fünf Minuten, bevor zweimal mit Propylenoxid als Intermedium behandelt wurde.
- Danach erfolgte eine Überführung der Präparate in ein Gemisch aus Araldit und Propylenoxid im Verhältnis von 1:1, welches über Nacht unter einem Abzug abdampfen konnte.
- Präparate wurden in ein reines Aralditgemisch überführt, welches für zwei Tage bei 60°C polymerisieren konnte.
- Von den ausgehärteten Präparatblöcken wurden 1 μ feine Schnittpräparate mit einem Mikrotom (31.1) erzeugt.
- Getrocknete Schnittpräparate wurden auf Objektträger überführt und mit einer Methylenblau- oder mit Toluidin-Färbelösung gefärbt (2.1.9).

2.3.18 Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

DNA-Fragmente, die als Template für dsRNA dienen sollten, wurden durch PCR (2.3.1) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide (2.1.7) aus cDNA oder aus bereits vorhandenen Plasmiden amplifiziert (Tab.20). Amplifizierte PCR-Fragmente wurden auf Agarosegele aufgetragen und nach Gelelektrophorese mittels Gelextreaktions-Kit gereinigt (2.3.6; 2.3.7). Danach wurden sie mit EcoRV linearisierten pBSIISK-Vektoren ligiert (2.3.16.2). Mit Hilfe des M13pUC vorwärts Oligonukleotids (2.1.7), welches vor der Integrationsstelle des Inserts im Vektor liegt, sowie einem genspezifischen vorwärts oder dem rückwärts Oligonukleotid (Tab.20), wurden Matrizen für die Synthese von sense oder antisense RNA mittels PCR (2.3.1) amplifiziert. PCR-Fragmente wurden auf Agarosegele aufgetragen, und gereinigt. Je 400 ng der Fragmente dienten als Templategemisch für die dsRNA-Synthese des jeweiligen Gens beziehungsweise der pUC-Kontrolle.

Template für dsRNA	Amplifiziert aus	Länge des amplifizierten PCR Templates	Oligonukleotid vorwärts (2.1.7)	Oligonukleotid rückwärts (2.1.7)
<i>H.e.</i> TCF	<i>Hydractinia</i> cDNA	425bp	TCFATGStartfwd	TCFrevneu
pUC Plasmid	pUC Plasmid	157bp	pUCdsfwd	BSF22rev
<i>H.e.</i> Ras2	Plasmid HeAktIGFPRas2 (3.4.2)	138bp	RasATGstart	Ras2RNAirev
<i>H.e.</i> Ras1	Plasmid HeAktIGFPRas1 (3.4.2)	136bp	Ras1ATGstart	Ras1RNAirev

Tab.20 Template für dsRNA

Gezeigt sind Fragmente zur Herstellung von dsRNA, deren Länge in bp, die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sowie die jeweilige Amplifikationsgrundlage.

Die dsRNA-Synthese wurde mit dem “T7 High Yield RNA Synthesis Kit“ (2.1.10) entsprechend der Anleitung in einem 20 µl Ansatz durchgeführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden 16 µl 1x RNase-Mix in TE (2.1.9) und 4 µl 5 M NaCl zugesetzt und die nicht hybridisierte RNA für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die dsRNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.14). Danach wurde die dsRNA mit 1/:10 Vol. 10 M Ammoniumacetat und 3 Vol. EtOH gefällt. Es wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, bevor die dsRNA in bidest. H₂O gelöst wurde. Die dsRNA wurde dann mit 1/20 5M NaCl und 3 Vol. EtOH gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in bidest. H₂O gelöst. Die Menge wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.3.8).

2.3.18.1 RNA Interferenz (RNAi)

Ras1 oder *Ras2*-dsRNA mit einer Konzentration von 80 ng/µl wurde in befruchtete Ein- und Zweizell-Embryonalstadien von *Hydractinia* injiziert (2.3.15.2). Als Kontrolle wurde eine entsprechende Anzahl an Embryonen mit pUC-dsRNA injiziert. Als zusätzliche Kontrolle diente eine entsprechende Anzahl an nicht injizierten Embryonen in Seewasser.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden befruchtete Ein- und Zweizell-Stadien in 80 ng/µl *Ras1*- oder *Ras2*-dsRNA in einem Gesamtvolumen von 200 µl Seewasser in 96 Microwell-Platten für 24 Stunden inkubiert.

Als Kontrolle wurde eine vergleichbare Anzahl an Embryonen mit pUC-dsRNA behandelt. Als zusätzliche Kontrolle diente eine entsprechende Anzahl un behandelter Embryonen in Seewasser. Bei beiden Experimenten wurden die Embryonen in Blockschälchen mit frischem Seewasser überführt. Bei 72 Stunden alten Planula-Larven wurde die Metamorphose zu Primär-Polypen ausgelöst (2.2.3). Sich entwickelnde Primär-Polypen wurden auf Objektträgern in

Aquarien gehältert. Während der Entwicklung wurden Embryonen, Larven und Primär-Polypen laufend mit entsprechenden Wildtyp-Stadien unter dem Binokular verglichen.

Ein weiterer Versuchsansatz wurde als Kontrolle entsprechend einem in Duffy et al., 2010 beschriebenen Ansatz mit *TCF* dsRNA durchgeführt. 36 Stunden alte Embryonen wurden mit 80 ng/ μ l *TCF*-dsRNA in Seewasser für 15 Stunden behandelt. Auch hier wurde die gleiche Anzahl an Embryonen mit pUC-dsRNA behandelt oder unbehandelt in Seewasser belassen. Hiernach wurde in Blockschälchen die Metamorphose (2.2.3) ausgelöst, wonach erneut für 24 Stunden mit 80 ng/ μ l dsRNA in einem Gesamtvolumen von 200 μ l in Seewasser inkubiert wurde. Nach 24 Stunden wurden die Blockschälchen mit frischem Seewasser gefüllt.

Während der Entwicklung wurden Embryonen, Larven und Primär-Polypen in regelmäßigem Abstand mit entsprechenden Wildtyp-Stadien unter dem Binokular verglichen.

2.3.19 Detektion proliferierender Zellen

- Gastrozoide von *Hydractinia* wurden von Kolonien geschnitten und für 1,5 Stunden mit 10 μ l 10 mM EdU, einem Thymidin-Analog, in 1 ml Seewasser inkubiert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen Wildtyp- und Transgenen-Gastrozoiden gewährleisten zu können, wurde darauf geachtet, dass nur vergleichbar große Polypen verwendet wurden.
- Die Gastrozoide wurden dreimal mit je 1 ml Seewasser gewaschen und für 20 Minuten mit 0,2 M $MgCl_2$ betäubt.
- Danach wurden sie für zwei Stunden in 1 ml 4% PFA in PBS fixiert, wobei die Lösung zweimal gewechselt wurde.
- Die Gastrozoide wurden für je 15 Minuten in 1 ml 3% BSA in PBSX inkubiert, bevor sie für eine Stunde in 1 ml PBSX inkubiert wurden.
- Es folgte eine erneute Inkubation für dreimal je 15 Minuten mit 1 ml 3% BSA in PBSX.
- Hiernach erfolgte die Inkubation in 200 μ l eines kurz zuvor zusammengestellten EdU Reaktions Cocktails (2.1.9) für 30 Minuten.
- Die Gastrozoide wurden dreimal für je fünfzehn Minuten mit je 1 ml 3% BSA in PBS gewaschen, bevor sie über Nacht in 1 ml PBS bei 4°C gelagert wurden.
- Vor dem Aufbringen auf Objektträger in DABCO/Glycerin wurden Zellkerne mit DAPI, einem Fluoreszenz-Farbstoff, der an DNA bindet, markiert. Hierzu wurden die Proben in 1 μ l DAPI in 1 ml PBS für 15 Minuten inkubiert.

2.4 Mikroskopie

Mit dem Nikon SMZ 1500 Binokular (2.1.1) wurden Lebendpräparate von *Hydractinia* in Seewasser untersucht. Bilder wurden mit der AxioCam HRc (2.1.1) erzeugt. Quetsch- und Semidünnschnittpräparate wurden am Zeiss Imager Z.2 Mikroskop (2.1.1) untersucht. Zusätzlich konnten hier pseudokonfokale Bilder im Apotom-Modus erzeugt werden. Bilder wurden mit der AxioCam ICc1, oder mit der AxioCam MRm erzeugt. Grüne GFP-Fluoreszenz wurde mit Blaulicht bei 480 nm angeregt. DAPI markierte Zellkerne konnten mit ultraviolettem Licht bei 365 nm sichtbar gemacht werden. TAMRA wurde bei 549 nm angeregt.

2.5 Bioinformatische Methoden

2.5.1 Identifikation an Ras-Signalwegen beteiligter Proteine in *Hydractinia echinata*

2.5.1.1 BLAST-Analyse

Mit der Sequenz von Proteinen die in anderen Organismen bekannterweise an Ras-Signalwegen beteiligt sind, wurden in einer lokalen BLAST-Analyse (Altschul et al., 1990) die Transkriptomdaten von *Hydractinia* nach möglichen Homologen untersucht. Die Transkriptomdatenbanken verschiedener Entwicklungsstadien, sowie die Transkriptom-Datenbank einer Mischung aller Stadien (Tab.21), wurden von Phillip Schiffer nach der Trinity Methode assembliert. Mit möglichen homologen *Hydractinia*-Proteinen wurde ein BLAST in NCBI durchgeführt.

Stellte sich heraus, dass es sich bei dem *Hydractinia* Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein mögliches Homolog des gesuchten Proteins handelt, so wurden die Aminosäure-Sequenzen der unter NCBI angezeigten Proteine anderer Organismen zur Erzeugung eines Phylogramms ausgewählt. Als Kriterium für eine hohe Wahrscheinlichkeit wurden hierbei die Sequenzidentität und der E-value Wert angesehen. Je geringer der Wert für den E-value ist, desto signifikanter ist die Übereinstimmung des gesuchten Proteins mit bereits in den Datenbanken von NCBI gespeicherten Aminosäure-Sequenzen.

Name der Datenbank	RNA aus Entwicklungsstadium
Trinity N1	0-1 Stunde
Trinity N2	7 Stunden
Trinity N3	28 Stunden
Trinity N4	30 Stunden
Trinity N5	72 Stunden
Trinity N6	Gastrozoide
Trinity N7	Gonozoide männlich
Trinity N8	Gonozoide weiblich
Trinity N1-N8all	Mischung aus allen N1-N8 Stadien

Tab.21 *Hydractinia echinata* Trinity-Transkriptom-Datenbank

In der Tabelle sind die Namen der Transkriptom-Datenbank sowie das Entwicklungsstadium von *Hydractinia*, aus dem die RNA zur Erzeugung der jeweiligen Daten herrührt gelistet.

Zusätzlich zu den Transkriptom Datenbanken standen ein durch Phillip Schiffer assembliertes draft Genom-Assembly aus IlluminaHighSeq-Daten (*H.e.* Genome 3) sowie eine EST-Datenbank von *Hydractinia* zur Verfügung.

2.5.1.2 Phylogenetische Analyse

Die der phylogenetischen Analyse zugrunde liegenden Datensätze wurden durch BLAST in NCBI Datenbanken mit einer durch lokalen BLAST identifizierten Aminosäure-Sequenz (2.5.1.1) eines *Hydractinia* Proteins erzeugt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass möglichst keine „predicted“ oder „annotated“ Proteinsequenzen berücksichtigt wurden. Mussten dennoch „predicted“ Sequenzen verwendet werden, wurden diese mit einem „p“ gekennzeichnet. Wenn möglich wurden Cnidarier-Sequenzen und Sequenzen repräsentativer Vertreter des Tierreichs mit in den Vergleich einbezogen. Dazu zählten, wenn verfügbar, Porifera, Nematoda, Mollusca, Arthropoda, Echinodermata und (Uro) Chordata (Ascidacea, Vertebrata, wie Amphibien, Fische und Säugetiere). Als Outgroup diente, wenn bekannt, ein Protein-Homolog von Hefe. Die phylogenetische Analyse, sowie der vorrausgehende Sequenzvergleich mit dem Programm „Muscle-Alignment“, wurden mit dem Programm „MEGA v5.2“ durchgeführt (2.1.11).

Auf Grundlage der Sequenzvergleiche wurden unter Zuhilfenahme des Programms gblocks (2.1.11) unter den im Programm vorgegebenen Einstellungen Aminosäure-Sequenz-Blöcke isoliert. Das Programm eliminiert hierbei schlecht oder gar nicht homologe Sequenzabschnitte. Die mit gblocks bearbeiteten Sequenzvergleiche konnten dann als .fasta-Datei in das Programm „MEGA v5.2“ eingegeben werden. Stammbäume wurden dann auf Grundlage dieses Sequenzvergleiches mit folgenden Parametern (Van der Zee et al., 2008) erstellt: Maximum likelihood

Tree; Bootstrap values 1000 replicates, Aminoacid substitution model WAG +i+g (Whelan, 2001).

2.5.1.3 Vergleich von Protein-Domänen

Konservierte funktionelle Domänen der *Hydractinia*-Proteine wurden mit Pfam und PROSITE (2.1.11) identifiziert. Nach Eingabe der Aminosäure-Sequenzen in die Suchmasken der Programme identifizieren diese Protein-Domänen. Das Ergebnis wurde als Grafik in PROSITE dargestellt. Um Aussagen über die Funktionalität des in *Hydractinia* identifizierten Proteins treffen zu können, wurden zusätzlich die Sequenzbereiche der Protein-Domänen von *Hydractinia* mit denen anderer Organismen in einem Sequenzvergleich speziessübergreifend analysiert.

2.5.2 Vergleichende Transkriptom-Analyse in transgenen GFPRas1(Q67V)-, GFPRas2(Q67)- und in Wildtyp-Kolonien

Total-RNA wurde aus transgenen GFPRas1(Q67)-, GFPRas2(Q67)- und aus Wildtyp-Kolonien mit vergleichbarem Entwicklungsstand isoliert (2.3.4). Aus je 2 µg total RNA wurden im Cologne Center for Genomics aus der Total-RNA Illumina HighSeq-Reads erzeugt (Tab.22).

Name der RNA-Probe	Konzentration	Volumen
<i>H.e.</i> Wildtyp-Kolonie	200 ng/µl	10 µl
<i>H.e.</i> Ras1(Q67V) transgene Kolonie	200 ng/µl	10 µl
<i>H.e.</i> Ras1(Q67V) transgene Kolonie	200 ng/µl	10 µl
<i>H.e.</i> Ras2(Q67V) transgene Kolonie	200 ng/µl	10 µl

Tab.22 Probenmaterial aus dem Illumina-HighSeq-Reads erzeugt wurden

Die folgende bioinformatische Bearbeitung wurde in einem Kooperationsprojekt durch Phillip Schiffer durchgeführt:

1. Die Illumina HiSeq-Reads wurden mit der Software FastQC (v0.10.1) auf Qualität geprüft.
2. Die Reads wurden mit dem Programm Trimmomatic (v0.32) von übrig gebliebenen Adaptoren und qualitativ schlechten Sequenzen gesäubert.

3. Anschließend wurde ein de-novo-Assembly mit der Trinity-pipeline (Trinity r201440413p1) erzeugt. Dabei wurden zunächst alle Reads in einem „paired-end-assembly“ zusammengefasst und dann entsprechend der Trinity-Dokumentation ein Mapping der einzelnen Sets gegen das Gesamt-Assembly durchgeführt. Hiernach erfolgte eine digitale Abundanz-Abschätzung mit der RSEM-Software. Diese Abschätzung ist notwendig, um ohne Replikate oder ohne sequenzierte Massenstandards die Bibliotheken vergleichen zu können. Die RSEM-Werte und die mitgelieferten Trinity-Skripte wurden verwendet, um die differentielle Expression zu berechnen. Dafür benutzt Trinity das „R-bioconductor-package edgeR“. Hierdurch lassen sich einzelne Graphen erzeugen, in denen die relative Expression von Gengruppen dargestellt wird.
4. Die Annotationen der Trinity-Gene erfolgten mit der „Trinotate-Pipeline“.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von *Hydractinia echinata* Ras

Die Familie der Ras-Proteine umfasst mehrere Subfamilien. Proteine, die mit bekannten H-, K- und N-Ras-Proteinen anderer Organismen vergleichbar sind, werden der Subfamilie der klassischen Ras-Proteine zugeordnet (Rosário et al., 2001). In *Hydra vulgaris* wurden von Bosch und Kollegen zwei mögliche Ras-Proteine identifiziert, die als *Hydra vulgaris* Ras1 und Ras2 bezeichnet wurden (Bosch et al., 1995). Unter Berücksichtigung der Ras-Proteine von *Hydra vulgaris* und bekannten charakterisierten Ras-Proteinen anderer Organismen wurde durch BLAST-Analyse in *Hydractinia* Genom- und Transkriptom-Datenbanken nach möglichen Ras-Proteinen gesucht.

Zu Beginn dieser Arbeit stand noch kein *Hydractinia* Transkriptom zur Verfügung. Ein kurzer Sequenzbereich eines *Hydractinia* Proteins, das in der Folge als Ras2 (siehe Anhang Abb.2) bezeichnet wird, konnte durch BLAST mit *Hydra vulgaris* Ras2 (NCBI GenBank: CAA50187.1) in einer unvollständigen *Hydractinia* EST-Datenbank identifiziert werden. Auf Basis der identifizierten Teilsequenz wurden durch RACE-PCR die fehlenden 5'- und 3'-Enden der mRNA identifiziert. Basierend auf der Nukleotid-Sequenz der RACE-Fragmente wurden Oligonukleotide erzeugt, mit denen die codierende Region des *Hydractinia* Ras2-Proteins amplifiziert wurde.

Durch BLAST-Analyse im *Hydractinia* Transkriptom konnte zudem neben Ras2 ein weiteres Protein identifiziert werden, das im Folgenden als Ras1 (siehe Anhang Abb.1) bezeichnet wird, da es, basierend auf einer Analyse mit *Hydra vulgaris* Ras1 (UniProtKB/Swiss-Prot:P51539.2), identifiziert wurde und diesem sehr ähnlich ist. Um eine Homologisierung der Cnidarier Ras-Gene zu bekannten Ras-Varianten höherer Organismen zu versuchen und um eventuell vorhandene, weitere potenzielle, der Familie der klassischen Ras-Proteine zuzuordnende Proteine in *Hydractinia* identifizieren zu können, wurde eine BLAST-Analyse mit bekannten H-, N- und K-Ras-Aminosäure-Sequenzen des Menschen durchgeführt (H-Ras NCBI GenBank: CAG38816.1; K-RasA NCBI Reference Sequence: NP_203524.1; K-RasB NCBI Reference Sequence: NP_004976.2; N-Ras NCBI Reference Sequence: NP_002515.1). Für diese Analyse wurde auf menschliche Ras-Aminosäure-Sequenzen zurückgegriffen, da vor allem im Menschen *Ras*-Gene aufgrund ihres Onkogen-Charakters seit Jahrzehnten im Mittelpunkt der Forschung stehen und somit gut charakterisiert sind (Bar-Sagi et al., 2001; Malumbres et al., 2003; Colicelli et al., 2004; Schubbert et al., 2007; Fernandez-Medarde et al., 2011).

Nach diesem Grundsatz wurden auch die Analysen der Signalweg-Proteine (3.2) immer in Bezug zu den gut charakterisierten Proteinen des Menschen durchgeführt. Ein weiterer Grund, bei der Analyse auf Vertebraten Sequenzen und nicht etwa allein auf Ras-Sequenzen von näher mit *Hydractinia* verwandten Organismen zurückzugreifen, beruht auf dem Erfahrungswert, dass in der Vergangenheit durchgeführte BLAST-Analysen häufig eine beachtliche Sequenzhomologie zwischen Vertebraten und Cnidarier Sequenzen auf Aminosäure-Ebene gezeigt haben. Die BLAST-Analysen ergaben, dass in *Hydractinia* neben den zuvor beschriebenen Ras1- und Ras2-Aminosäure-Sequenzen keine weiteren Sequenzen identifiziert werden konnten, die mit den klassischen Ras-Proteinen der Vertebraten vergleichbar sind. Eine BLAST-Analyse mit *Hydractinia* Ras1 und Ras2 in stadienspezifischen Transkriptom-Datenbanken von *Hydractinia* zeigte, dass Ras1 und Ras2 in allen berücksichtigten Entwicklungsstadien von *Hydractinia* auf Transkriptions-Ebene exprimiert werden. Das trifft auf frühe Embryonalstadien, Planula-Larven, Gastrozoide und weibliche sowie männliche Gonozoide zu.

3.1.1 Charakterisierung von *Hydractinia echinata* Ras1 und Ras2

Zur genaueren Charakterisierung der in *Hydractinia* identifizierten Ras-Proteine bot sich der Vergleich mit menschlichen Ras-Proteinen an, da diese auch hinsichtlich funktioneller Sequenzabschnitte gut charakterisiert sind (Colicelli et al., 2004). In den Vergleich wurde zusätzlich *Homo sapiens* RRas2 (TC21) mit einbezogen. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das auch der Familie der Ras-Proteine zugeordnet wird und mit Proteinen der Subfamilie der klassischen Ras-Proteine funktionell eng verwandt ist. Von RRas2 (TC21) ist bekannt, dass es Signalwege steuern kann, an denen auch die klassischen Ras-Proteine H-, K- und N-Ras beteiligt sind (Drivas et al., 1990; Movilla et al., 1999, Colicelli et al., 2004, Larive et al., 2012). TC21 wurde in der Analyse berücksichtigt, weil ein BLAST der *Hydractinia* Ras2-Sequenz in NCBI eine Verwandtschaft zu RRas2(TC21)-Proteinen zeigte. Zusätzlich in den Vergleich einbezogen wurden *Hydra vulgaris* Ras1 und Ras2, da in diesen bereits funktionelle Sequenzbereiche näher beschrieben wurden (Bosch et al., 1995). Die klassischen Ras-Aminosäure-Sequenzen des Menschen unterscheiden sich nur unwesentlich in ihrer Länge von den Ras1- und Ras2-Sequenzen der Cnidarier (Abb.6; Abb.7). Die Ras1-Sequenzen der Cnidarier sowie *Hydractinia* Ras2 haben im Bereich vom Startmethionin bis zum G1-Motiv fünf Aminosäuren mehr als H-, K- und N-Ras des Menschen. In *Hydra vulgaris* Ras2 sind es vier Aminosäuren mehr. In menschlichem TC21 gibt es im Bereich zwischen Startmethionin und dem G1-Motiv zehn zusätzliche Amino-

säuren im Vergleich zu H-, K- und N-Ras des Menschen. Der Sequenzvergleich zeigte, dass Ras1 und Ras2 der Cnidarier, aber auch die TC21-Sequenz des Menschen, in den für Proteine der Ras-Familie typischen G-Box-Motiven (G1→G5) (Colicelli, 2004) in hohem Maße konserviert sind. Zudem wurde deutlich, dass einzelne, für die Funktion von Ras-Proteinen essentielle, Aminosäuren innerhalb der G-Motive speziessübergreifend konserviert sind (Abb.6). In beiden *Hydractinia* Ras-Sequenzen findet sich innerhalb des G1-Motivs ein Glycin(G18) an einer zu N-, H- und K-Ras vergleichbaren Position (Glycin(G12)). Auch in TC21 und den Ras-Sequenzen von *Hydra vulgaris* steht an vergleichbarer Position ein Glycin. Dieses Glycin übt offenbar eine zentrale Funktion aus, denn Punktmutationen, die zu einem Aminosäure-Austausch in dieser Position führen, wurden als charakteristische Tumormarker im Menschen identifiziert (Barbacid et al., 1987, Bos et al., 1989). Von Lysin(K16) und Serin(S17) aus Ras-Proteinen des Menschen ist bekannt, dass diese beiden Aminosäuren für die Funktionalität von Ras-Proteinen entscheidend sind (Farnsworth et al., 1991; John et al., 1993, Feig et al., 1999; Der et al., 2006). An einer zu Lysin(K16) aus N-, H- und K-Ras des Menschen vergleichbaren Position findet sich innerhalb der *Hydractinia* Ras-Sequenzen ein Lysin(K22). An einer zu Serin(S17) aus menschlichem Ras vergleichbaren Position befindet sich in den *Hydractinia* Ras1- und Ras2-Proteinen ein Serin(S23). Auch TC21 und die *Hydra vulgaris* Ras-Proteine enthalten an vergleichbarer Stelle im Protein ein Lysin und ein Serin. Im G2-Motiv der Cnidarier Ras-Proteine findet sich ein Threonin(T41) an einer zu Threonin(35) in H-, N- und K-Ras vergleichbaren Position. TC21 hat an vergleichbarer Stelle ebenfalls ein Threonin(46). Das beschriebene Threonin ist in menschlichen H-, K- und N-Ras-Proteinen essentiell für die Interaktion mit Effektor-Proteinen (Spoerner et al., 2001). Im G3-Motiv der untersuchten Proteine steht speziessübergreifend an einer zu Glutamin(Q61) in H-, K- und N-Ras des Menschen vergleichbaren Position ein Glutamin (Abb.6). Von Glutamin(Q61) in menschlichem H-, K-, und N-Ras ist bekannt, dass es entscheidend für die Hydrolyse von GTP ist (Schubbert et al., 2007). In *Hydractinia* Ras1, Ras2 und *Hydra vulgaris* Ras1 ist das vergleichbare Glutamin, Glutamin(Q67). In *Hydra vulgaris* Ras2 ist es Glutamin(Q66) und in TC21 des Menschen Glutamin(Q72). Auch Sequenzabschnitte zwischen den G-Motiven weisen in hohem Maße Übereinstimmungen auf Aminosäure-Ebene auf. Die speziessübergreifende Konservierung (Abb. 6 und Abb. 7) gerade innerhalb der G-Motive spricht für die Funktionalität von *Hydractinia* Ras1 und Ras2 als Ras-Proteine, da die G-Motive essentielle Sequenz-Bereiche für GTP-Bindung und GTP-Hydrolyse und somit für die bekannten Funktionen von Ras darstellen (Colicelli et al., 2004; Schubbert et al., 2007).

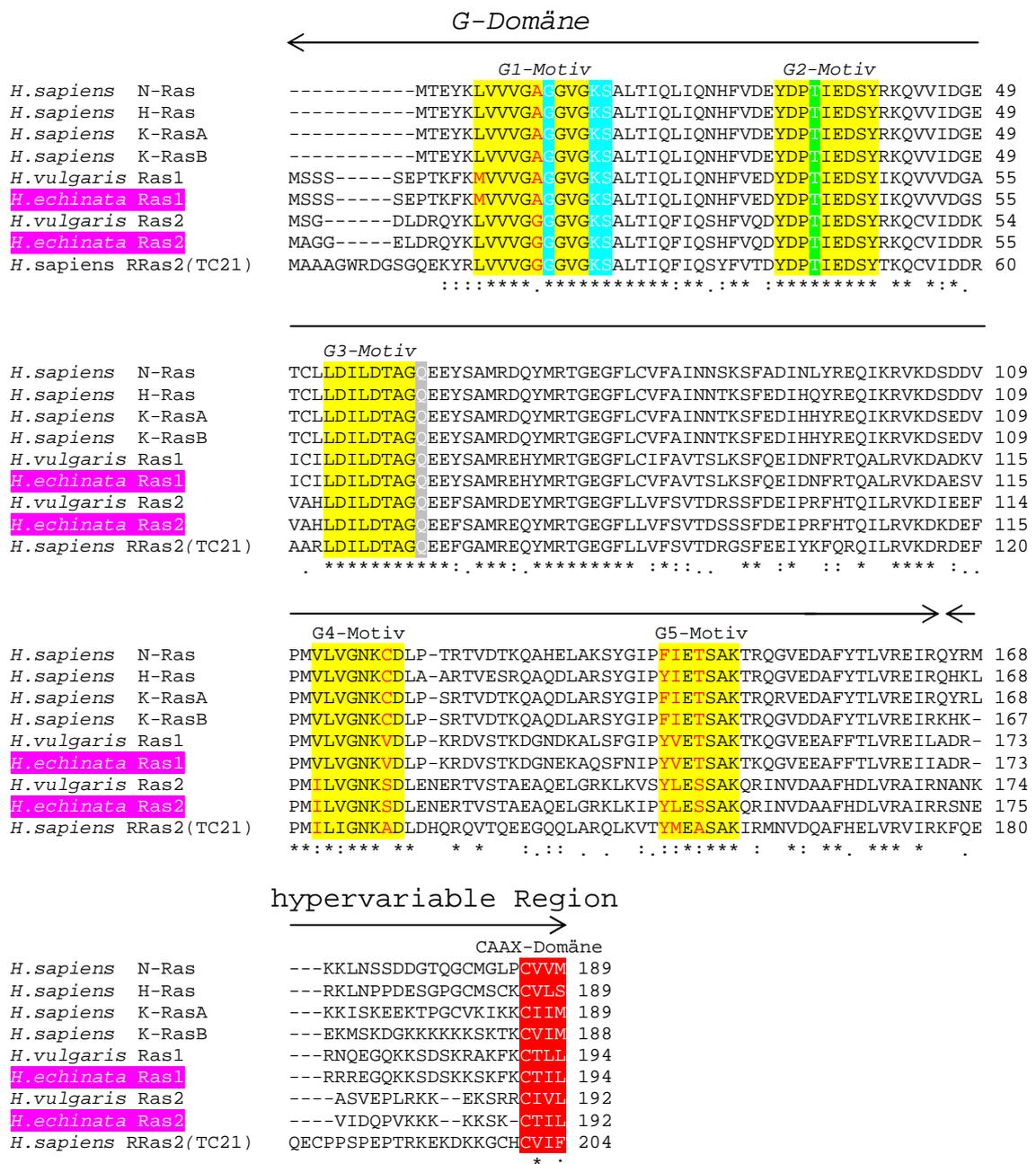


Abb.6 Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Ras-Proteinen unterschiedlicher Organismen
 In den Vergleich einbezogen wurden die Aminosäure-Sequenzen von *Hydractinia* Ras1 und Ras2, die **lila** hervorgehoben sind (siehe Anhang Abb.1 und Abb.2), H-Ras von *Homo sapiens* (NCBI GenBank: CAG38816.1), K-Ras A von *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP_203524.1), K-Ras B von *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP_004976.2), N-Ras von *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP_002515.1), *Hydra vulgaris* Ras2 (GenBank: CAA50187.1), *Hydra vulgaris* Ras1 (UniProtKB/Swiss-Prot: P51539.2) sowie RRas2 (TC21) von *Homo sapiens* (UniProtKB/Swiss-Prot:P62070.1). In **gelb** sind die fünf charakteristischen G-Box Motive (G1→G5) der Ras-Gen-Familie hervorgehoben (Colicelli et al., 2004). Mit Pfeilen abgegrenzt sind die „G-Domäne“ (As 1-165) sowie die „hypervariable Region“ (As 165-189) in H/N und K-Ras A in K-Ras B (As 165-199) in *Homo sapiens* (Schubbert et al., 2007). Innerhalb des G1-Motivs sind in **blau** drei für die Funktion von Ras-Proteinen wichtige Aminosäuren markiert (Der et al., 2006; Barbacid et al., 1987; Bos et al., 1989; John et al., 1993; Feig et al., 1999). In **grün** gekennzeichnet ist ein essentielles Threonin innerhalb des G2-Motivs (Spoerner et al., 2001). Im G3-Motiv ist in **grau** ein Glutamin markiert, von dem bekannt ist, dass Mutationen zu einer konstitutiv aktiven Form von Ras führen (Schubbert et al., 2007). In **rot** wurde das Ras-spezifische CAAX-Motiv markiert (Choy et al., 1999; Colicelli et al., 2004). **Rote** Buchstaben zeigen Sequenzunterschiede in den G-Binde-Domänen.

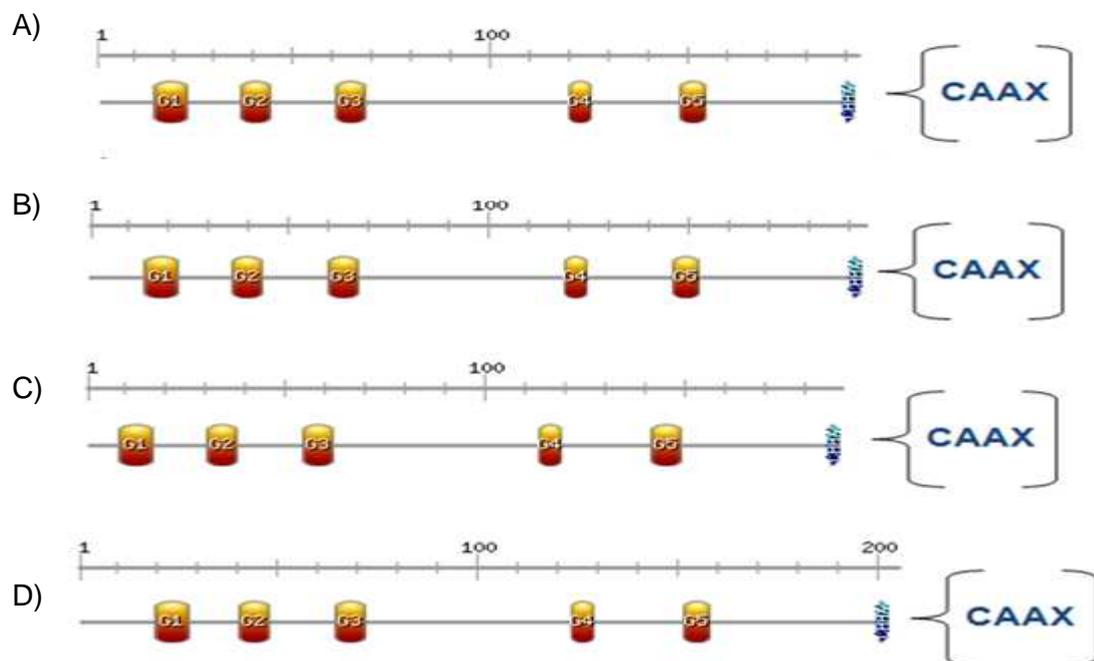


Abb.7 Vergleich Ras spezifischer Sequenzmotive

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In orange sind in A→D die Ras spezifische G-Motive (G1, G2, G3, G4 und G5) und in blau das CAAX-Motiv gezeigt. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domäne in Aminosäuren in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Grafik wurde mit PROSITE erstellt (2.1.11).

A: Sequenzmotive in dem 192 As langes *Hydractinia* Ras2-Protein (siehe Anhang Abb.1) (As 12-23, 37-46; 58-67, 117-125,147-153, 189-192).

B: Sequenzmotive in dem 194 As langes *Hydractinia* Ras1-Protein (siehe Anhang Abb.2) (As 12-23, 37-46, 58-67, 117-125,147-153,191-194).

C: Sequenzmotive in dem 189 As langes *Homo sapiens* H-, N- oder K-Ras A-Protein (GTPase N-Ras NCBI Reference Sequence: NP_002515.1; H-Ras GenBank: CAG38816.1; GTPase K-Ras Isoform a NCBI Reference Sequence: NP_203524.1) (As 6-17, 32-40, 53-61, 112-119, 141-147, 186-189).

D: Sequenzmotive in dem 203 As langes *Homo sapiens* RRas2(TC21)-Protein (UniProtKB/Swiss-Prot:P62070.1) (As 16-27, 42-50, 63-71, 122-129, 152-158, 200-204).

Der carboxyterminale Teil der Protein-Sequenzen zeigt speziesübergreifend große Sequenz- und Längen-Variabilität. In menschlichen Ras-Proteinen wird dieser Abschnitt deshalb auch als hypervariable-Region bezeichnet (Abb. 6 und Abb. 7) (Schubbert et al., 2007). Am C-Terminus der Aminosäure-Sequenzen findet sich speziesübergreifend ein für Ras-Proteine typisches CAAX-Motiv. C steht hierbei für ein Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und X für jede beliebige Aminosäure (Choy et al., 1999; Colicelli et al., 2004). Beide *Hydractinia* Ras-Proteine enden in dem Sequenzmotiv CTIL (Abb. 6). Das Leucin(L194) in *Hydractinia* Ras1 und Leucin(L192) in Ras2 spricht dafür, dass beide Ras-Proteine, genau wie die Ras-Proteine von *Hydra vulgaris*, die ebenfalls auf Leucin enden, durch eine Geranylgeranyl-Transferase modifiziert werden. Hierbei koppelt die Transferase eine Prenyl-Gruppe an den C-terminalen

Teil des Proteins an. Hierdurch können die Proteine aufgrund der hydrophoben Natur der Prenyl-Gruppe an Membranen angeheftet werden. Gleiches gilt für das TC21-Protein des Menschen, welches auf Phenylalanin(F204) endet. Auch Phenylalanin wird durch Geranylgeranyl-Transferase erkannt. Die Ras-Proteine des Menschen, die auf Methionin oder Serin enden, werden hingegen durch Farnesyl-Transferase modifiziert. Hierdurch ist ebenfalls eine Membranlokalisation gewährleistet (Wright et al., 2006).

3.1.2 Phylogenetische Einordnung von *Hydractinia echinata* Ras1 und Ras2

Durch phylogenetische Analyse wurden *Hydractinia* Ras1- und Ras2-Proteine bezüglich ihrer Stellung innerhalb der Familie der Ras-Proteine genauer charakterisiert. In die Analyse mit einbezogen wurden bekannte Ras-Proteine von Porifera, Nematoden, Mollusken und Arthropoden sowie von Chordaten wie Acrania, Amphibien, Fischen und von Säugetieren. Die dem Phylogramm zu Grunde liegenden Aminosäure-Sequenzen wurden entweder durch BLAST-Analyse mit *Hydractinia* Ras1 oder Ras2 in NCBI ermittelt oder es wurde gezielt nach Ras-Proteinen anderer Organismen in den Datenbanken von NCBI gesucht. Als Außengruppe wurde „roughened“ ein Rap1-Homolog und Vertreter der „Super-Familie“ der Ras-Proteine von *Drosophila* gewählt. Das Phylogramm (Abb.8) zeigt, dass sich die klassischen Ras-Proteine der Vertebraten in Ästen für H-, N- und K-Ras gruppieren. Auch Ras-Proteine anderer Organismen gruppieren entsprechend einzelner Tierstämme in Ästen. So gruppieren Ras-Proteine von Fischen, Chordaten wie Branchiostoma, Mollusken, Insekten und Nematoden in einzelnen Ästen. *Hydractinia* Ras1 bildet zusammen mit *Hydra vulgaris* Ras1 einen Seitenast in diesem Hauptast.

Eine vor der phylogenetischen Analyse durchgeführte BLAST-Analyse mit *Hydractinia* Ras1 in der NCBI Datenbank ergab für Ras1 höher qualitative „Hits“ für klassische Ras-Proteine. Eine BLAST-Analyse mit *Hydractinia* Ras2 ergab höher qualitative „Hits“ für TC21- oder aber Ras like-2-Proteine anderer Organismen. Auch das Phylogramm zeigt, dass *Hydractinia* Ras2, welches mit *Hydra vulgaris* Ras2 in einem gemeinsamen Seitenast gruppiert, eher den TC21- und den Ras like-2-Proteinen anderer Organismen zugeordnet werden kann. In diesem Hauptast bilden TC21-Proteine von Vertebraten und Ras like-2, Ras2- und Ras-Proteine von Insekten einzelne Äste. Auch ein Ras des Schwammes *Suberites dumuncula* gruppiert in diesem Hauptast (Abb.8).



Abb.8 Phylogramm mit *Hydractinia* Ras1- und Ras2 Aminosäure-Sequenzen und Ras-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia Ras1 und Ras2 (siehe Anhang Abb.1 und 2); Ras-like1 [*Drosophila melanogaster*] NCBI Reference Sequence: NP_476699.1; Ras-like2 [*Drosophila melanogaster*] NCBI Reference Sequence: NP_523917.2; Ras1 [*Hydra vulgaris*] UniProtKB/Swiss-Prot: P51539.2, Ras [*Mytilus galloprovincialis*] GenBank: DQ305041.1; Ras small G-protein [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: NP_001191472.1; Ras [*Mytilus edulis*] GenBank: AAT81171.1; KRas [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_113703.1; HRas [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001084278.1; NRas [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001084337.1; NRas [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_002515.1; NRas [*Cavia porcellus*] NCBI Reference Sequence: NP_001166369.1; Ras2 [*Hydra vulgaris*] GenBank: CAA50187.1; roughened (Rap1) [*Drosophila melanogaster*] GenBank: AAF15520.1 Ras-like protein 2 [*Bombyx mori*] NCBI Reference Sequence: NP_001036993.1; Ras [*Culex quinquefasciatus*] NCBI Reference Sequence: XP_001845948.1; Ras-like protein 1 [*Bombyx mori*] NCBI Reference Sequence: NP_001036973.1; KRas isoform A [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_203524.1; KRas isoform B [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_004976.2; [*Rattus norvegicus*] NRas NCBI Reference Sequence: NM_080766.2; HRas [*Rattus norvegicus*] GenBank: AAH99130.1; HRas [*Homo sapiens*] GenBank: CAG38816.1; Ras protein let-60 [*Caenorhabditis elegans*] UniProtKB/Swiss-Prot: P22981.1; LET-60 Ras [*Meloidogyne artiellia*] LET-60I GenBank: CAD56891.1; LET-60 Ras, short [*Meloidogyne artiellia*] LET-60s GenBank: CAD56890.1; KRas [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001081316.1; R-Ras2 (TC21) [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_001017815.1; Ras [*Suberites domuncula*] GenBank: CAA77070.1; R-Ras2 (TC21) [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_001013452.1; Ras [*Nassarius reticulatus*] GenBank: ABA82136.1; p21-Ras [*Platichthys flesus*] GenBank: CAA76679.1; Ras [*Aedes aegypti*] NCBI Reference Sequence: XP_001662234.1; Ras-like [*Cerapachys biroi*] GenBank: EZA54466.1; TC21 [*Homo sapiens*] UniProtKB/Swiss-Prot: P62070.1; N-Ras [*Kryptolebias marmoratus*] GenBank: ABX89902.1; Ras [*Branchiostoma lanceolatum*] GenBank: ABU49827.1; Ras [*Branchiostoma floridae*] GenBank: EEN44719.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment (2.1.11) wurden die Sequenzen mit gblocks (2.1.11) bearbeitet. Die erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 (2.1.11) mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

3.2 Konservierte Proteine Ras gesteuerter Signalwege in *Hydractinia echinata*

Im Transkriptom von *Hydractinia* wurden mögliche homologe Proteine zu den in der Einleitung beschriebenen, an Ras-Signalwegen beteiligten, Proteinen anderer Organismen gesucht. Zusätzlich wurde das Transkriptom auf Transkripte von Proteinen hin untersucht, von denen aus anderen Organismen bekannt ist, dass sie die Funktionen von Ras-Proteinen mittelbar und unmittelbar betreffen.

Es wurde auch nach einem potenziellen Homolog des Ras aktivierenden Proteins „son of sevenless 1“ (SOS1) (Rojas et al., 2011), sowie nach einem potenziellen Homolog für das Ras „GTPase activating protein 1“ RASA1 (oder auch GAP) und für den negativen Regulator „Neurofibromin1“ (NF1) gesucht. Von den beiden letzteren Proteinen ist aus anderen Organismen bekannt, dass sie die GTPase-Aktivität von Ras-Proteinen stimulieren (Corral et al., 2003; Rudack et al., 2012). Aufgrund der großen medizinischen Relevanz Ras-vermittelter zellulärer Kontrollfunktionen stehen umfangreiche Untersuchungen zur Rolle der Ras-Signalweiterleitung im Menschen zur Verfügung. Die beteiligten Proteine sind im Menschen gut untersucht und charakterisiert worden. Aus diesem Grund wurden hier mit bekannten und charakterisierten menschlichen Proteinen stellvertretend für Vertebraten BLAST-Analysen im Transkriptom von *Hydractinia* durchgeführt.

Identifizierte mögliche *Hydractinia*-Proteine wurden in einer phylogenetischen Analyse charakterisiert. Neben der phylogenetischen Analyse wurden in den möglichen, homologen Proteinen spezifische Domänen identifiziert. Die Domänen wurden auf Aminosäure Ebenen mit Domänen bereits charakterisierter Proteine anderer Organismen verglichen.

3.2.1 „extracellular signal regulated kinase 1 and 2“ (ERK1/2) Kinase-Kaskade in *Hydractinia echinata*

In *Hydractinia* gibt es ein potenzielles „rat fibrosarcoma“ (RAF), eine potenzielle „mitogen-activated protein kinase kinase“ (MEK) und eine potenzielle „extracellular signal regulated kinase“ (ERK) (Schubbert et al., 2007; Wortzel et al., 2011) (Tab. 23).

Proteine der „extracellular signal regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) Kinase-Kaskade im Menschen	Potenzielle homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>
A-RAF; B-RAF; C-RAF	RAF comp79693_c0_seq3
MEK 1/2	MEK comp72955_c0_seq2
ERK 1/2	ERK comp71978_c0_seq1

Tab.23 An der ERK1/2-Kinase-Kaskade beteiligte Proteine des Menschen und mögliche, in *Hydractinia* identifizierte homologe Proteine

In der Tabelle sind die aus dem Menschen bekannten Proteine RAF, MEK 1/2 und ERK1/2 aufgelistet (Schubbert et al., 2007). Im Vergleich werden hierzu potenzielle homologe Proteine in *Hydractinia* gelistet. Die *Hydractinia*-Proteine sind mit ihrer Trinity N1-N8-Transkriptom-Datenbank-Identifikationsnummer angegeben.

RAF

In Vertebraten sind drei verschiedene RAF-Proteine bekannt (A-, B- und C-RAF) die alle Ras-Signale weiterleiten können (Wortzel et al., 2011). Mit jedem der menschlichen RAF-Proteine wurden BLAST-Analysen im Transkriptom von *Hydractinia* durchgeführt, wobei mit allen dreien das gleiche, potenzielle *Hydractinia* RAF-Homolog identifiziert wurde (siehe Anhang Abb.3).

Im Phylogramm gruppiert das mögliche *Hydractinia* RAF-Protein in einen Zweig eines gemeinsamen Hauptastes, in dem auch RAF-Proteine der Vertebraten, entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu A-, B- und C-RAF-Proteinen, in eigenen Zweigen gruppieren. Auch RAF-Proteine von Insekten gruppieren zusammen und bilden einen eigenen Ast in diesem Hauptast. Lin45 RAF-Homologe aus Nematoden bilden einen eigenen Ast (Abb.9).

Eine BLAST-Analyse mit *Hydractinia* RAF in NCBI ergab eine qualitativ bessere Homologie zu B-RAF-Proteinen, als zu A-RAF oder C-RAF-Proteinen anderer Organismen.

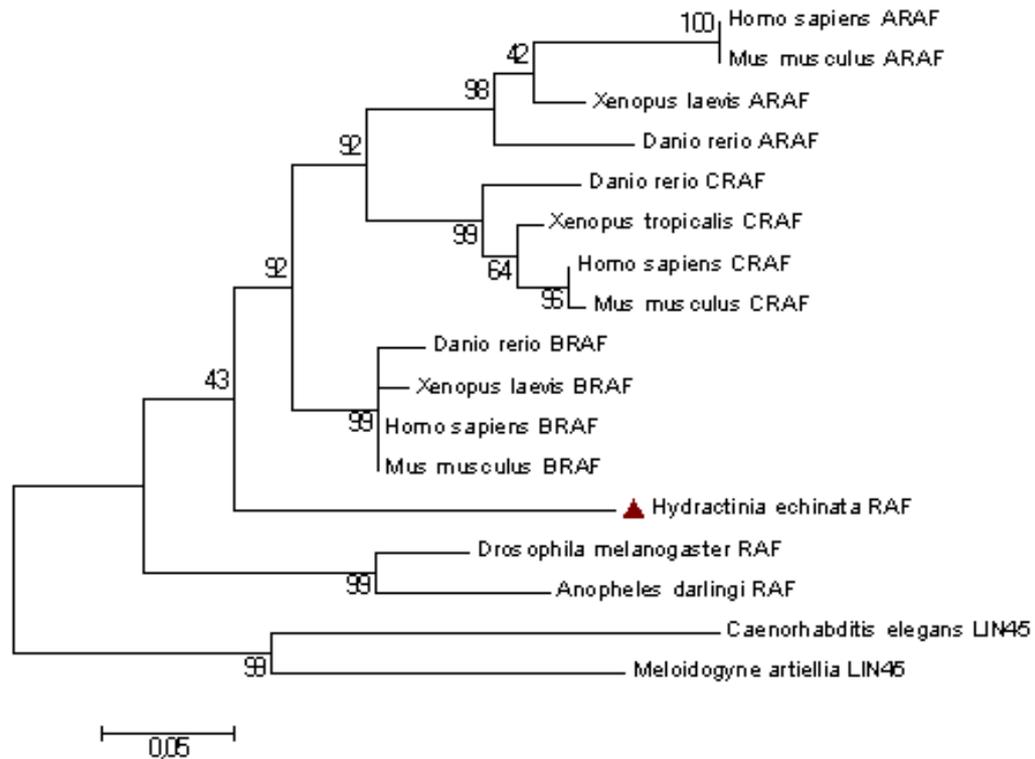


Abb.9 Phylogramm mit *Hydractinia* RAF und RAF-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Das Phylogramm wurde mit folgenden Sequenzen erzeugt: *Hydractinia* RAF (siehe Anhang Abb.3); C-RAF [*Homo sapiens*] UniProtKB/Swiss-Prot: P04049.1; B-RAF [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_004324.2; A-RAF [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_991306.1; A-RAF [*Homo sapiens*] GenBank: AAH07514.1; B-RAF [*Danio rerio*] GenBank: BAD01487.2; C-RAF [*Danio rerio*] GenBank: BAC55895.1; B-RAF [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001083526.1; C-RAF [*Xenopus tropicalis*] GenBank: AAI35312.1; A-RAF [*Xenopus laevis*] GenBank: AAH72170.1; A-RAF [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_033833.1; B-RAF [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_647455.3; CRAF [*Mus musculus*] GenBank: BAB39743.2; RAF [*Drosophila melanogaster*] GenBank: CAA30166.1; RAF [*Anopheles darlingi*] GenBank: ETN67416.1; LIN-45 [*Caenorhabditis elegans*] GenBank: AAR26307.1; LIN-45 RAF [*Meloidogyne artiellia*] GenBank: CAD56892.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Die Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Eine Analyse der im Vergleich zu B-RAF des Menschen um acht Aminosäuren längeren Aminosäure-Sequenzen von *Hydractinia* RAF mit der des Menschen in PROSITE ergab, dass beide Proteine vergleichbare Protein-Domänen besitzen (Abb.10). Beide Proteine haben eine „Ras binding“ (RBD)-Domäne, ein „zinkfinger phorbol-ester /DAG-type“ (ZF_DA)-Profil und eine „protein-kinase“ (PKDom)-Domäne (Abb.10). Auch C-RAF und A-RAF des Menschen haben vergleichbare Protein-Domänen (hier nicht gezeigt).

Im Bereich der Protein-Domänen sind die RAF-Proteine des Menschen und das mögliche *Hydractinia* RAF-Protein hoch konserviert (siehe Anhang Abb.4).

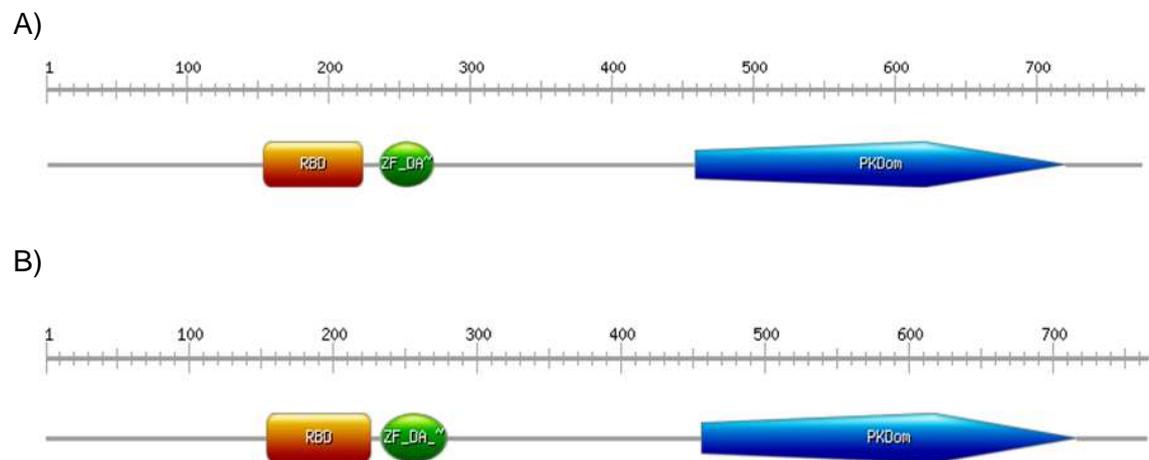


Abb.10 Konservierte Domänen in *Hydractinia* und *Homo sapiens* RAF-Proteinen

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A und B sind in orange die „Ras binding“ Domäne (RBD), in grün ist das „zinkfinger phorbol-ester /DAG-type“ Profil (ZF_DA) und in blau ist die „protein-kinase“ Domäne (PKDom) markiert. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domäne in Aminosäuren in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildung wurde mit PROSITE erzeugt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in dem 774 As langen *Hydractinia* RAF-Protein (siehe Anhang Abb.3) (As 154-224; 236-274; 459-720).

B: Identifizierte Protein-Domänen in dem 766 As langen *Homo sapiens* B RAF-Protein (NCBI Sequence: NP_004324.2) (As 155-227; 234-280; 457-717).

MEK

In *Hydractinia* wurde eine potenzielle „mitogen-activated protein kinase kinase“ (MEK) identifiziert (siehe Anhang Abb.5) (BLAST-Analyse im Transkriptom von *Hydractinia* mit *Homo sapiens* MEK 1 und MEK 2 (MEK 1 NCBI Reference Sequence: NP_002746.1; MEK 2 NCBI Reference Sequence: NP_109587.1)).

Im Phylogramm gruppiert *Hydractinia* MEK zusammen mit *Hydra vulgaris* MEK 1 miteinander in einem Zweig. In einem gemeinsamen Hauptast bilden auch MEK-Sequenzen von Arthropoden einen Zweig. In einem weiteren Hauptast gruppieren MEK 1- und MEK 2-Proteine der Vertebraten und eine mögliche MEK 1 eines Echinodermen in einzelnen Zweigen zusammen. *Caenorhabditis elegans* MEK 2 bildet einen eigenen Ast. Dieser befindet sich näher an den zuvor genannten Ästen als die MEK 1a- und MEK 1b-Isoformen von *Caenorhabditis elegans*, die in einem eigenen Ast gruppieren. Eine natürliche Außengruppe bildet ein aus der Hefe bekanntes MEK-Protein (Abb.11).

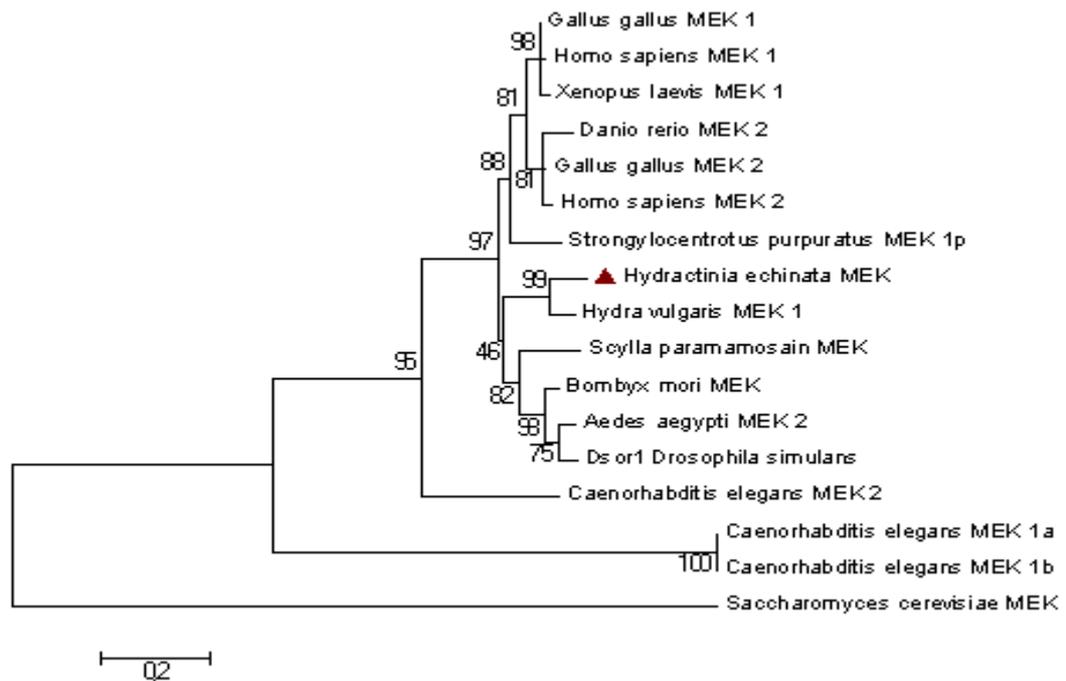


Abb.11 Phylogramm mit *Hydractinia* MEK- und MEK-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia MEK (siehe Anhang Abb.5); MEK 1 [*Gallus gallus*] NCBI Reference Sequence: NP_001005830.1; MEK 1 [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001080299.1; MEK 2 [*Gallus gallus*] GenBank: AAA75576.1; MEK 1 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_002746.1; MEK 2 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_109587.1; MEK-1, isoform a [*Caenorhabditis elegans*] GenBank: CCD62387.1; PREDICTED: MEK 1-like p [*Strongylocentrotus purpuratus*] NCBI Reference Sequence: XP_781505.3; Protein MEK-1, isoform b [*Caenorhabditis elegans*] GenBank: CCD62388.1; MEK 2 [*Caenorhabditis elegans*] GenBank: CCD73487.1; MEK 1 [*Hydra vulgaris*] uniprot T2ME67 (T2ME67_HYDVU); MEK2 [*Aedes aegypti*] MEK2 NCBI Reference Sequence: XP_001662837.1; Dsor1 [*Drosophila simulans*] NCBI Reference Sequence: XP_002106541.1; MEK [*Saccharomyces cerevisiae*] GenBank: EDN59268.1; MEK [*Scylla paramamosain*] GenBank: AHA93093.1; MEK 2 [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_001121753.1; MEK [*Bombyxmori*] NCBI Reference Sequence: NP_001036922.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle Alignment, wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltene Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Hydractinia MEK und die zum Vergleich herangezogenen Vertebraten MEK-Sequenzen des Menschen sind auf Aminosäure-Ebene in etwa gleich lang und verfügen über eine MEK spezifische Protein-Kinase-Domäne (Abb.12).

Ein Sequenzvergleich auf Aminosäure-Ebene (siehe Anhang Abb.6) zeigte ein hohes Maß an Konservierung innerhalb der MEK 1/2-Protein-Kinase-Domäne.

Spezifische, für die ATP- und Proton-Bindung wichtige Aminosäuren sind speziesübergreifend konserviert (Abb.12 A, B und D 1) und D 2)). Innerhalb der Protein-Kinase-Domäne konnte zusätzlich ein für die Funktion von MEK 1- und MEK 2-Proteinen des Menschen essentieller Sequenzbereich auch in dem *Hydractinia* MEK-Protein identifiziert werden. In dem im Menschen als „activation-loop“ bezeichneten Sequenzabschnitt wird Serin(S218) in MEK 1 und Serin(S222) in MEK 2 durch die Kinase RAF phosphoryliert (Wortzel et al., 2011). Eben dieser

Sequenzabschnitt ist an vergleichbarer Stelle in *Hydractinia* MEK ebenfalls vorhanden (Abb.12 D 3)).

Trotz der im Phylogramm gezeigten, näheren Verwandtschaft zu Arthropoden MEK zeigte sich auch im direkten Vergleich mit menschlichen MEK-Proteinen, dass funktionelle Sequenzbereiche hoch konserviert sind. Ein BLAST mit *Hydractinia* MEK in NCBI ergab qualitativ höhere „Hits“ zu MEK 1- als zu MEK 2-Proteinen der Vertebraten.

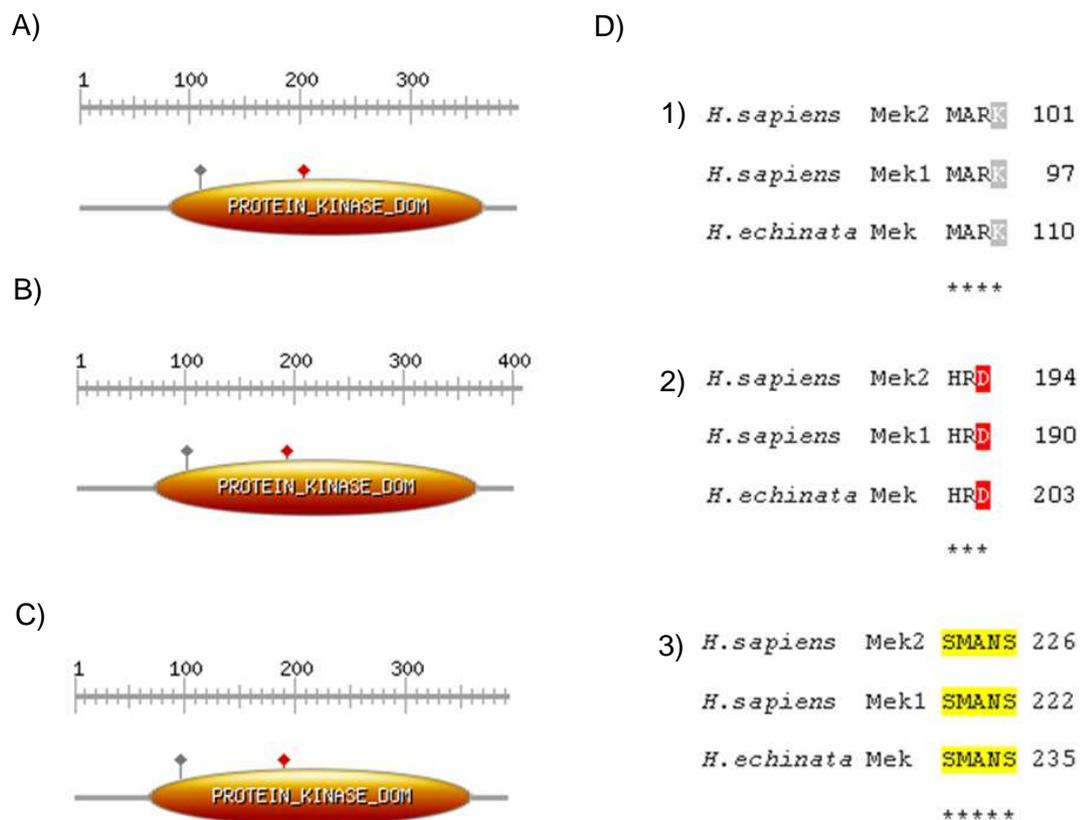


Abb.12 Konservierte Domänen in *Hydractinia* und *Homo sapiens* MEK-Proteinen

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A, B und C ist in orange die Protein-Kinase Domäne dargestellt. In grau ist eine für die ATP-Bindung wichtige Aminosäure, in rot ist eine für die Proton-Bindung wichtige Aminosäure markiert. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domäne in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen A, B und C wurden mit PROSITE erzeugt.

A: Identifizierte Protein-Domäne in dem 395 As langen *Hydractinia* MEK-Protein (siehe Anhang Abb.5) (As 81-367, As 110, As 203).

B: Identifizierte Protein-Domäne in dem 400 As langen *Homo sapiens* MEK 2-Protein (NCBI Reference Sequence: NP_109587.1) (As 72-369, As 101, As 194).

C: Identifizierte Protein-Domäne in dem 393 As langen *Homo sapiens* MEK 1-Protein (NCBI Reference Sequence: NP_109587.1) (As 68-361, As 97, As 190).

D: Ausschnitt aus einem Aminosäure-Sequenz Vergleich zwischen MEK 1 und MEK 2 des Menschen und *Hydractinia* MEK (siehe Anhang Abb.6).

1) Hoch konservierter Sequenzbereich in MEK um eine für die ATP-Bindung wichtige Aminosäure (in grau).

2) Hoch konservierter Sequenzbereich in MEK um eine für die Proton-Bindung wichtige Aminosäure (in rot).

3) In gelb dargestellt ist der auch in *Hydractinia* MEK konservierte, aus Vertebraten MEK 1/2 bekannte „activation-loop“ (Wortzel et al., 2011).

ERK

In *Hydractinia* konnte durch eine BLAST-Analyse mit ERK 1 und ERK 2 des Menschen (ERK1 NCBI Reference Sequence: NP_002737.2; ERK 2 NCBI Reference Sequence: NP_620407.1) ein mögliches ERK-Homolog identifiziert werden (siehe Anhang Abb.7).

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass die mögliche *Hydractinia* ERK-Kinase und eine potenzielle ERK-Kinase des Cnidarier *Nematostella vectensis* unabhängig voneinander einen Ast an der Basis des Phylogramms bilden. ERK-Kinasen anderer Organismen gruppieren sich entsprechend einzelner Tierstämme in Ästen. So gruppieren beispielsweise ERK 1- und ERK 2-Kinasen der Vertebraten jeweils in einem gemeinsamen Zweig. Auch ERK-Kinasen von Arthropoden, Nematoden Echinodermen, Ciona und von Mollusken und ein Hefe spk1 bilden eigene Äste (Abb.13).

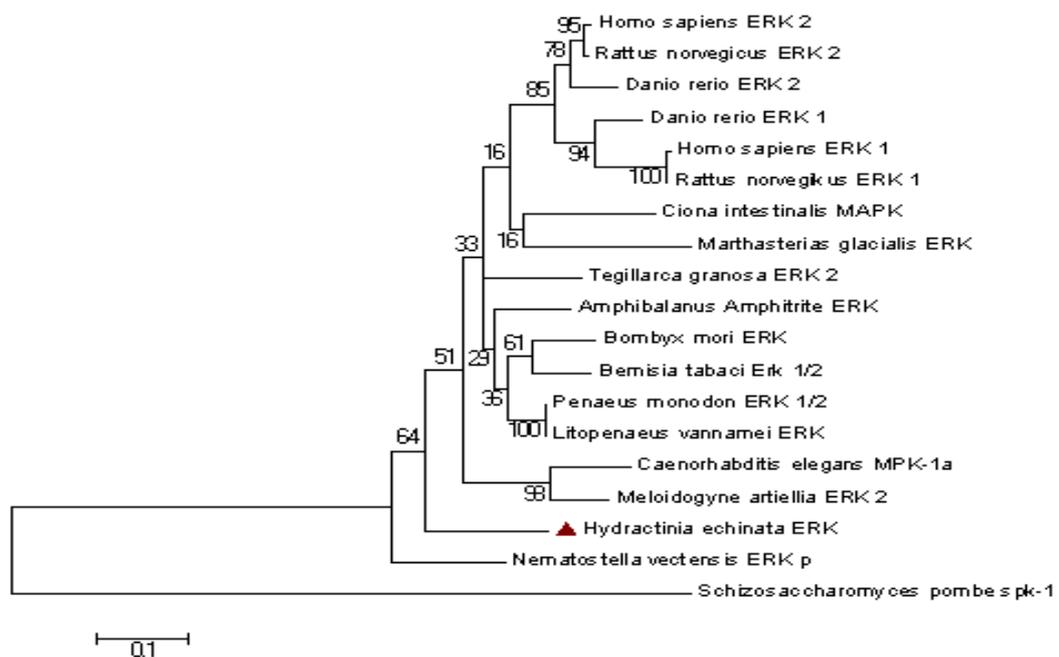


Abb.13 Phylogramm mit *Hydractinia* ERK- und ERK-Aminosäure Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia ERK (siehe Anhang Abb.7); ERK 1 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_002737.2; ERK 2 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_620407.1; ERK 2 [*Rattus norvegicus*] GenBank: EDL77868.1; ERK 2 [*Danio rerio*] GenBank: BAB11813.1; ERK1 [*Danio rerio*] GenBank: BAB11812.1; ERK1 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_059043.1; mitogen-activated protein kinase [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: NP_001071697.1; ERK 2 [*Tegillarca granosa*] GenBank: AFP57674.1; ERK [*Marthasterias glacialis*] GenBank: CAD60453.1; ERK [*Bombyx mori*] NCBI Reference Sequence: NP_001036921.1; ERK 1/2 [*Bemisia tabaci*] GenBank: AEE81046.1; ERK-MAPK [*Amphibalanus amphitrite*] GenBank: AGT02391.1; ERK 1/2 [*Penaeus monodon*] GenBank: ADT80930.1; predicted protein [*Nematostella vectensis*] Sequence ID: ref|XP_001629498.1; ERK [*Litopenaeus vannamei*] GenBank: AGS38337.1; ERK 2 [*Meloidogyne artiellia*] GenBank: CAD56894.1; P MPK-1, isoform a [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_001022583.1; Spk1 [*Schizosaccharomyces pombe*] NCBI Reference Sequence: NP_594009.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Die erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Sowohl in *Hydractinia* als auch in menschlichem ERK 1 und ERK 2 konnte eine für ERK-Kinasen typische Kinase-Domäne identifiziert werden (Abb.14). Auch spezifische für die ATP- und Proton-Bindung wichtige Aminosäuren sind speziessübergreifend konserviert (Abb.14 A, B, C und D 1. und 2.).

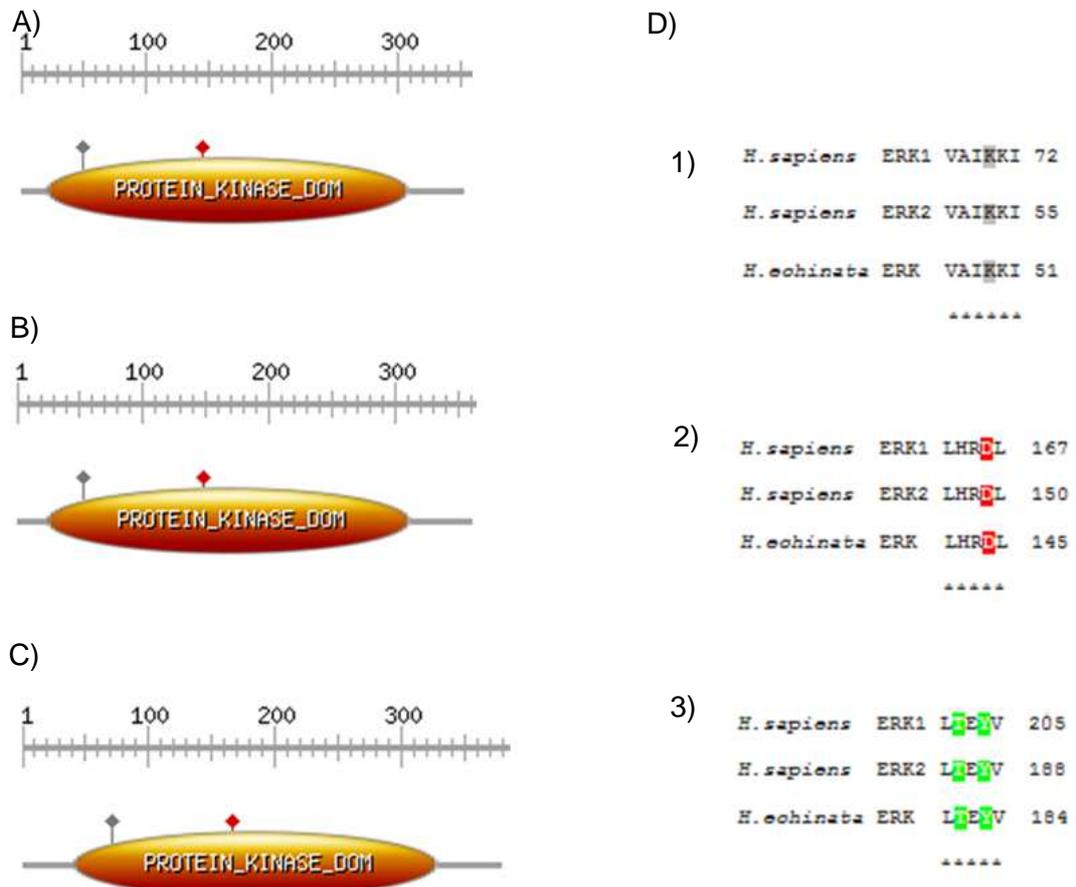


Abb.14 Konservierte Domänen in *Hydractinia* ERK und menschlichen ERK-Proteinen

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A, B und C ist in orange die Protein-Kinase Domäne dargestellt. In grau ist eine für die ATP-Bindung wichtige Aminosäure markiert und in rot ist eine für die Proton-Bindung wichtige Aminosäure markiert. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domäne in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen A, B und C wurden mit PROSITE erzeugt.

A: Identifizierte Protein-Domäne in einem 352 As langen *Hydractinia* ERK-Protein (siehe Anhang Abb.7) (As 21-309, As 49, As 95).

B: *Homo sapiens* ERK 2 360 As Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_620407.1 (As 25-313, As 53, As 149)

C: *Homo sapiens* ERK 1 379 As Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_002737.2) (As 42-330, As 70, As 166).

D: Ausschnitte aus dem Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von *Hydractinia* ERK (siehe Anhang Abb.8) mit *Homo sapiens* ERK 1 und ERK 2.

1) Konservierter Sequenzbereich in ERK-Proteinen um eine für die ATP-Bindung wichtige Aminosäure (in grau).

2) Konservierter Sequenzbereich in ERK-Proteinen um eine für die Proton-Bindung wichtige Aminosäure (in rot).

3) In grün dargestellt sind speziessübergreifend konservierte, aus Vertebraten bekannte Phosphorylierungsstellen in ERK 1 des Menschen Treonin(T202) und Thyrosin(204) (Wortzel et al., 2011) und vergleichbare konservierte Aminosäuren in ERK 2 des Menschen und in *Hydractinia* ERK.

Ein Vergleich der in etwa gleich langen Aminosäure-Sequenzen zeigte ein hohes Maß an speziesübergreifend konservierten Aminosäuren innerhalb der Kinase-Domäne (siehe Anhang Abb.8). In *Hydractinia* ERK sind für ERK charakteristische Aminosäuren in einem speziesübergreifend konservierten Sequenzbereich konserviert. Von diesen Aminosäuren ist aus menschlichem ERK 1 bekannt, dass es sich um Phosphorylierungsstellen der ERK-Kinase handelt. An diesen Aminosäuren wird ERK durch die MEK-Kinase phosphoryliert. Die durch MEK-Kinase in menschlichem ERK 1 phosphorylierten Aminosäuren sind Threonin(T202) und Tyrosin(Y204) (Wortzel et al., 2011). Beim ERK 2 des Menschen sind es Threonin(T185) und Tyrosin(Y187). In *Hydractinia* ERK entspricht diesen Aminosäuren Threonin(T181) und Tyrosin (Y183) (Abb.14 D 3))

Allein anhand des Sequenzvergleiches (siehe Anhang Abb.8) und des Phylogramms (Abb.13) lässt sich keine eindeutige Klassifizierung der *Hydractinia* ERK zu ERK 1- oder ERK 2-Proteinen anderer Organismen vornehmen. Ein BLAST mit der möglichen *Hydractinia* ERK-Kinase in NCBI ergab jedoch qualitativ höhere „Hits“ zu ERK 2- als zu ERK 1-Proteinen der Vertebraten.

3.2.2 „phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3K)-Kaskade in *Hydractinia echinata*

In *Hydractinia* wurden mögliche homologe Proteine für eine katalytische Untereinheit (p110) von PI3K, eine potenzielle „phosphoinositid dependent Kinase 1“ (PDK1) und eine potenzielle Protein-Kinase B (PKB oder AKT) identifiziert (Tab.24).

Proteine der „Phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3K)-Kaskade des Menschen	Potenzielle homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>
PI3K (p110-alpha);	p110-1 comp81966_c1_seq1 p110-2 comp81824_c0_seq1
PDK1	PDK1 comp78744_c0_seq1
AKT1	AKT A comp79577_c0_seq1
AKT2	AKT B comp86438_c0_seq1

Tab.24 An der PI3K-Kinase-Kaskade beteiligte Proteine des Menschen und mögliche in *Hydractinia* identifizierte homologe Proteine

In der Tabelle sind aus dem Menschen bekannte Proteine der Ras gesteuerten PI3K-Kaskade angegeben (Schubbert et al., 2007). Im Vergleich sind hierzu potenzielle homologe, in *Hydractinia* identifizierte Proteine mit ihrer TrinityN1-N8-Tanskriptom-Datenbank-Identifikationsnummer aufgelistet.

p110

In Vertebraten sind vier, für katalytische Untereinheiten der PI3K-Proteine kodierende Gene der Klasse I bekannt (p110-alpha, -beta, -gamma und -delta). Das heterodimere Protein PI3K setzt sich aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Einheit zusammen. Aus der Literatur ist bekannt, dass aktiviertes Ras in GTP-gebundenem Zustand die katalytische Einheit der PI3K unabhängig von der regulatorischen Einheit aktivieren kann (Castellano et al., 2011). Aus diesem Grund wurde hier nur nach einem möglichen Homolog für die katalytische Einheit gesucht.

Das Transkriptom von *Hydractinia* wurde mit menschlichen p110-alpha, -beta, -gamma und -delta Aminosäure-Sequenzen (p110-alpha NCBI Reference Sequence: NP_006209.2, p110-beta NCBI Reference Sequence: NP_006210.1, p110-gamma NCBI Reference Sequence: NP_001269356.1 und p110-delta NCBI Reference Sequence: NP_005017.3) auf das Vorhandensein potenzieller homologer Proteine hin untersucht. In *Hydractinia* konnten zwei potenzielle p110-Proteine identifiziert werden, die als *Hydractinia* p110-1 und p110-2 bezeichnet wurden (siehe Anhang Abb.9).

In einem Phylogramm mit p110 Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen gruppieren beide *Hydractinia*-Proteine miteinander in einem Zweig zusammen und bilden einen gemeinsamen Hauptast mit p110-alpha-Proteinen der Vertebraten und zwei, als p110-alpha „predicted“ charakterisierten Proteinen des Mollusken *Aplysia* und des Tunikaten *Ciona*.

Weitere Hauptäste bilden die Proteine der p110-beta, -gamma und -delta Form unterschiedlicher Organismen. Insekten p110-Proteine besetzen einen eigenen Ast, wobei ein potenzielles p110-beta-Protein des Mollusken *Aplysia* mit in diesem Ast gruppiert. p110-Proteine von Echinodermen und ein *Dictyostelium discoideum* PI3K bilden eigene Äste (Abb.15).

Ein BLAST in NCBI mit p110-1- und p110-2-Proteinen von *Hydractinia* ergab für beide Proteine eine hohe Homologie zu p110-alpha-, p110-beta- und p110-delta-Proteinen anderer Organismen.

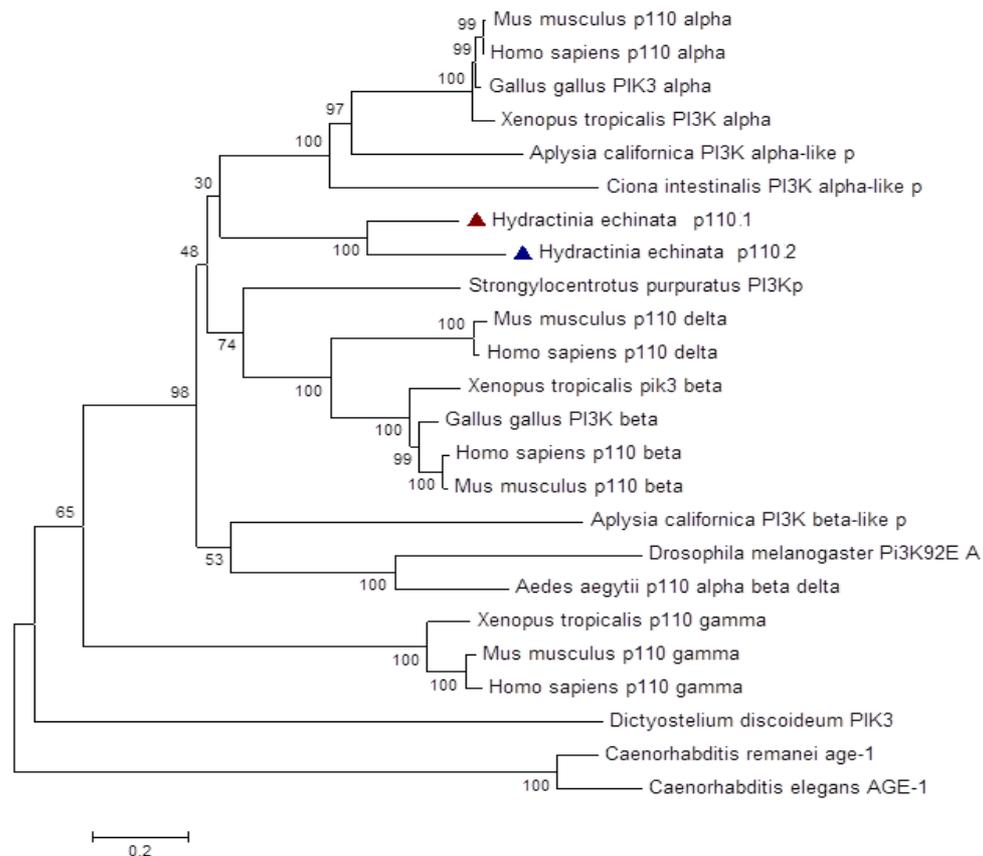


Abb.15 Phylogramm mit *Hydractinia* p110-1- und p110-2-Aminosäure-Sequenzen und p110-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia p110-1 und p110-2 (siehe Anhang Abb.9); p110-alpha [*Xenopus (Silurana) tropicalis*] NCBI Reference Sequence: NP_001119972.1; PREDICTED: p110-alpha isoform-like [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: XP_005106329.1; p110-alpha [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_006209.2; p110-beta [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_006210.1; p110-gamma [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_002640.2; PIK3 [*Dictyostelium discoideum*] NCBI Reference Sequence: XP_643820.1; p110-beta [*Gallus gallus*] NCBI Reference Sequence: NP_001026482.1; p110-alpha [*Gallus gallus*] NCBI Reference Sequence: NP_001004410.1; PREDICTED: p110-alpha isoform-like [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: XP_004227276.1; Pi3K92E, PIK92EA [*Drosophila melanogaster*] GenBank: AAF55792.1; p110-delta [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_005017.3; p110-delta [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_001157524.1; p110-gamma [*Mus musculus*] GenBank: AAG41122.1; p110-beta [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_083370.2; p110-alpha [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_032865.2; p110-beta [*Xenopus (Silurana) tropicalis*] Sequence ID:ref[NP_001072928.1]; AGE-1 [*Caenorhabditis remanei*] GenBank: AET63231.1; AGE-1 [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_496462.2, p110-gamma [*Xenopus (Silurana) tropicalis*] NCBI Reference Sequence: NP_001121428.1; p110-alpha [*Xenopus (Silurana) tropicalis*] Sequence ID:ref[NP_001119972.1]; PREDICTED: p110beta-like [*Strongylocentrotus purpuratus*] Sequence ID:ref[XP_792891.3]; p110 alpha, [*Aedes aegyptii*] NCBI Reference Sequence: XP_001662660.1; PREDICTED: p110-beta-like [*Aplysia californica*] Sequence ID:ref[XP_005109131.1]. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

In *Hydractinia* p110-1 und p110-2 identifizierte Protein-Domänen wurden mit Protein-Domänen in p110-alpha- und p110-beta-Proteinen des Menschen verglichen. In beiden *Hydractinia* p110-Proteinen konnten die gleichen funktionellen Domänen wie in p110-alpha- und p110-beta-Proteinen des Menschen identifiziert werden. *Hydractinia* p110-1- und p110-2-

Proteine haben eine „phosphatidylinositol 3-kinase adaptor-binding“ (PI3K ABD)-Domäne sowie eine „phosphatidylinositol 3-kinase Ras-binding“ (PI3K RBD)-Domäne. Des Weiteren gibt es eine „phosphatidylinositol 3-kinase C2“ (PI3K C2)-Domäne, eine „phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family“ (PI3_4_Kinsase_3)-Domäne sowie eine „PIK_helical“-Domäne (Abb.16). Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zeigte, dass der prozentuale Anteil an speziesübergreifend konservierten Aminosäuren innerhalb, aber auch außerhalb der gezeigten Domänen nicht sehr hoch ist (siehe Anhang Abb.10).

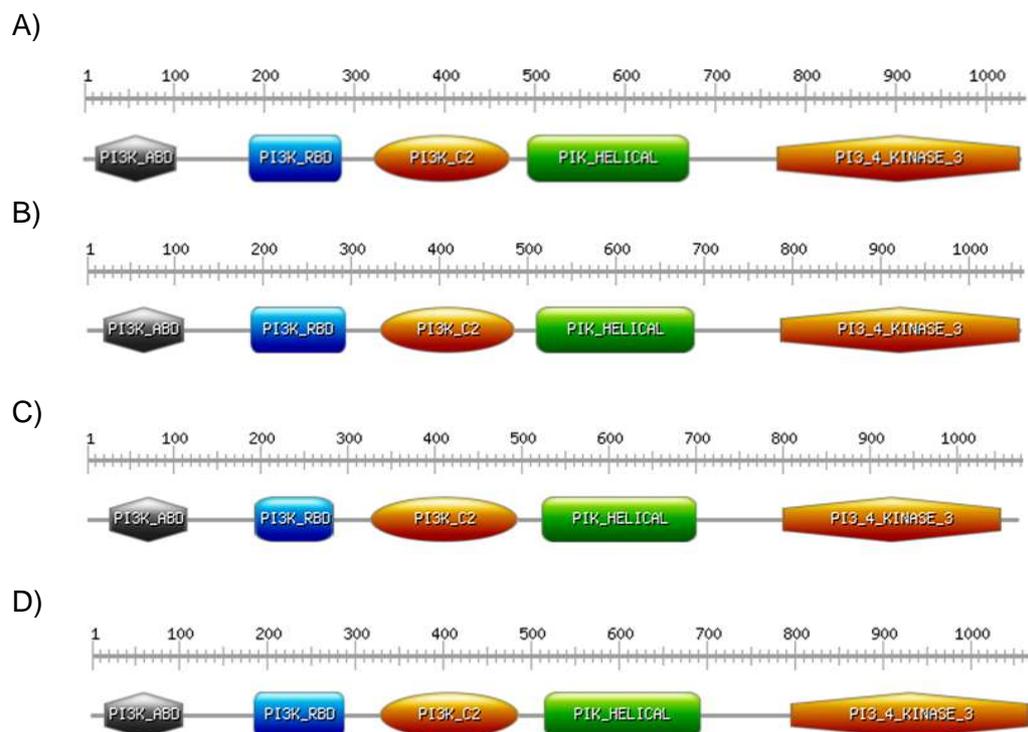


Abb.16 Konservierte Domänen in *Hydractinia* p110- und *Homo sapiens* p110-Proteinen

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A, B, C und D ist in grau die „phosphatidylinositol 3-kinase adaptor-binding“ (PI3K ABD)-Domäne, in blau die „phosphatidylinositol 3-kinase Ras-binding“ (PI3K RBD)-Domäne, orange (oval) die „phosphatidylinositol 3-kinase C2“ (PI3K C2)-Domäne, in orange (Raute) die „phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family“ (PI3_4_Kinsase_3)-Domäne und in grün die „PIK_helical“-Domäne markiert. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in dem 1059 As langen *Hydractinia* PI3K p110-1 Sequenz (siehe Anhang Abb.9) (As 20-110, 187-294, 333-485, 787-1057, 510-689).

B: Identifizierte Protein-Domänen in dem 1040 As langen *Hydractinia* PI3K p110-2 Sequenz (siehe Anhang Abb.9) (As 15-104, 185-287, 323-473, 770-1039, 494-673).

C: Identifizierte Protein-Domänen in einer 1068 As langen *Homo sapiens* PI3K p110-alpha Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_006209.2) (As 16-105, 187-289, 330-487, 797-1068, 517-694).

D: Identifizierte Protein-Domänen in einer 1070 As langen *Homo sapiens* PI3K p110-beta Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_006210.1) (As 26-115, 194-285, 327-496, 800-1050, 524-701).

PDK1

Durch eine mit menschlichem PDK1 (GenBank: AAC51825.1) durchgeführte BLAST-Analyse im Transkriptom von *Hydractinia* konnte ein mögliches *Hydractinia* PDK1-Protein identifiziert werden (siehe Anhang Abb.11).

Die phylogenetische Analyse ergab, dass *Hydractinia* PDK1 zusammen mit einem potenziellen PDK1 von *Hydra vulgaris* gruppiert. In einem Hauptast mit diesen bilden auch PDK1-Proteine der Vertebraten einen Seitenast. Weitere Seitenäste bilden PDK1-Proteine des Echinodermen *Patiria pectinifera*, des Mollusken *Aplysia californica* und Arthropoden PDK1-Proteine von *Cerapachys biroi* und *Drosophila melanogaster*, die beide gemeinsam einen Seitenast bilden. PDK1-Proteine des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und das PKH2 PDK1-Homolog aus Hefe bilden eigenständige Hauptäste (Abb.17).

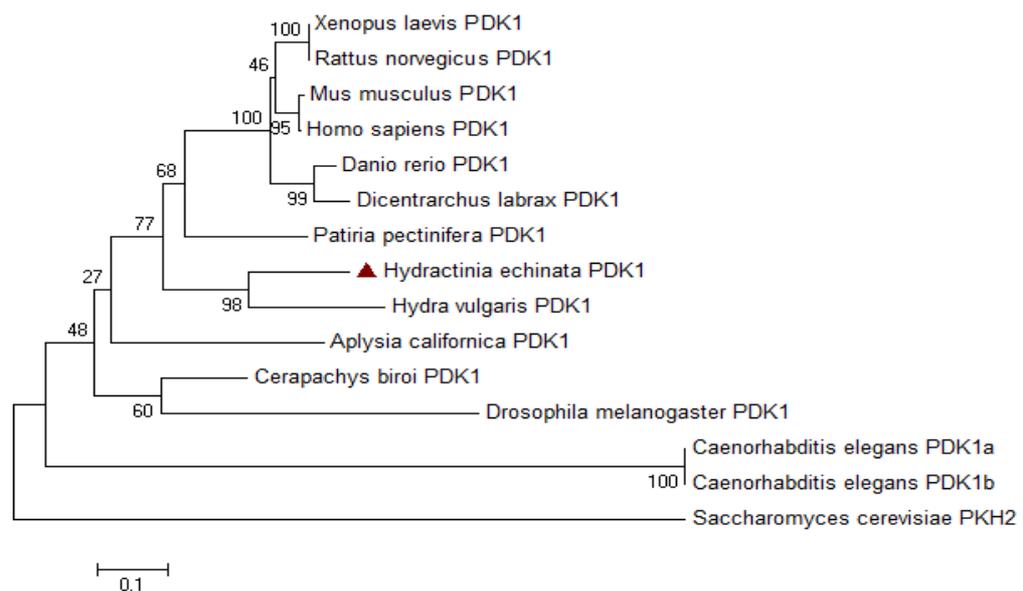


Abb.17 Phylogramm mit der *Hydractinia* PDK1-Aminosäure-Sequenz und PDK1-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia PDK1 (siehe Anhang Abb.11); PDK1 [*Hydra vulgaris*] NCBI Reference Sequence: NP_001267831.1; PDK1 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_112343.1; PDK1 isoform A [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_035192.2; PDK1 [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001086100.2; PDK1 [*Patiria pectinifera*] GenBank: BAD02370.1; PDK1 [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_991262.1; PDK1 [*Dicentrarchus labrax*] GenBank: CBN81295.1; PDK1 [*Homo sapiens*] GenBank: AAC51825.1; PKH2 [*Saccharomyces cerevisiae*] UniProtKB/Swiss-Prot: Q12236.1; PDK1 isoform a [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_001024742.1; PDK1 [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: NP_001191464.1; PDK [*Cerapachys biroi*] GenBank: EZA58954.1; PDK1 [*Drosophila melanogaster*] UniProtKB/Swiss-Prot: Q9W0V1.4; PDK1, isoform b [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_001024743.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltene Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Bei einem Vergleich der möglichen PDK1-Kinase von *Hydractinia* mit der des Menschen wurden die gleichen charakteristischen Domänen an ähnlicher Position in beiden Proteinen gefunden. Es konnte eine „protein-kinase“ (PKDom)-Domäne sowie eine „plekstrin homology“ (PH)-Domäne identifiziert werden (Abb.18).

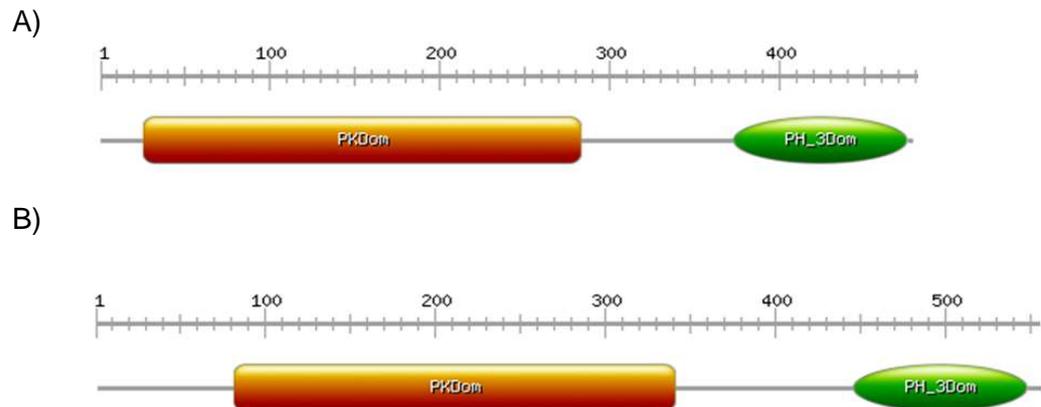


Abb.18 Konservierte Domänen in *Hydractinia* und *Homo sapiens* PDK1

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A und B sind in orange die „protein-kinase“ (PKDom)-Domäne und in grün ist die „plekstrin homology“ (PH)-Domäne dargestellt. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 479 As langen *Hydractinia* PDK1-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.11) (As 27-284, 374-476).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 556 As langen *Homo sapiens* PDK1-Aminosäure-Sequenz (GenBank: AAC51825.1) (As 82-341, 446-548).

Ein Vergleich der PDK1-Aminosäure-Sequenzen von *Hydractinia*, des Menschen, der Maus, und von *Hydra* zeigt speziesübergreifend konservierte Sequenzbereiche innerhalb der beschriebenen Domänen. Außerhalb der identifizierten Protein-Domänen gibt es nur wenige speziesübergreifend konservierte Sequenzbereiche (siehe Anhang Abb.12).

AKT

In Vertebraten sind drei AKT-Proteine beschrieben (Franke et al., 2003). In *Hydractinia* existieren zwei mögliche AKT-Proteine, die in dieser Arbeit als AKTA und AKTB bezeichnet werden (siehe Anhang Abb.13) (Die *Hydractinia* AKT-Proteine wurden durch BLAST-Analyse mit *Homo sapiens* AKT3 NCBI Reference Sequence: NP_005456.1, *Homo sapiens* AKT2 NCBI Reference Sequence: NP_001617.1 und *Homo sapiens* AKT1 GenBank: AAA36539.1 im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert).

Im Phylogramm (Abb.19) gruppieren AKT1-, AKT2- und AKT3-Proteine der Vertebraten in eigenen Zweigen in einem Hauptast. Im gleichen Hauptast gruppieren in weiteren Ästen AKT-Proteine von Insekten und einzelne AKT-Proteine eines Echinodermen und eines Schwammes. Einen basalen Ast nehmen die AKT-Proteine der Cnidarier ein. AKTA von *Hydractinia* gruppiert mit AKT/PKB aus *Hydra vulgaris*. AKTB von *Hydractinia* bildet einen eigenen Zweig. Einen von dem Hauptast unabhängigen Ast bilden AKT1- und AKT2-Proteine der Echinodermen. Auch Hefe SCH9, ein AKT-Homolog, bildet einen eigenen basalen Ast.

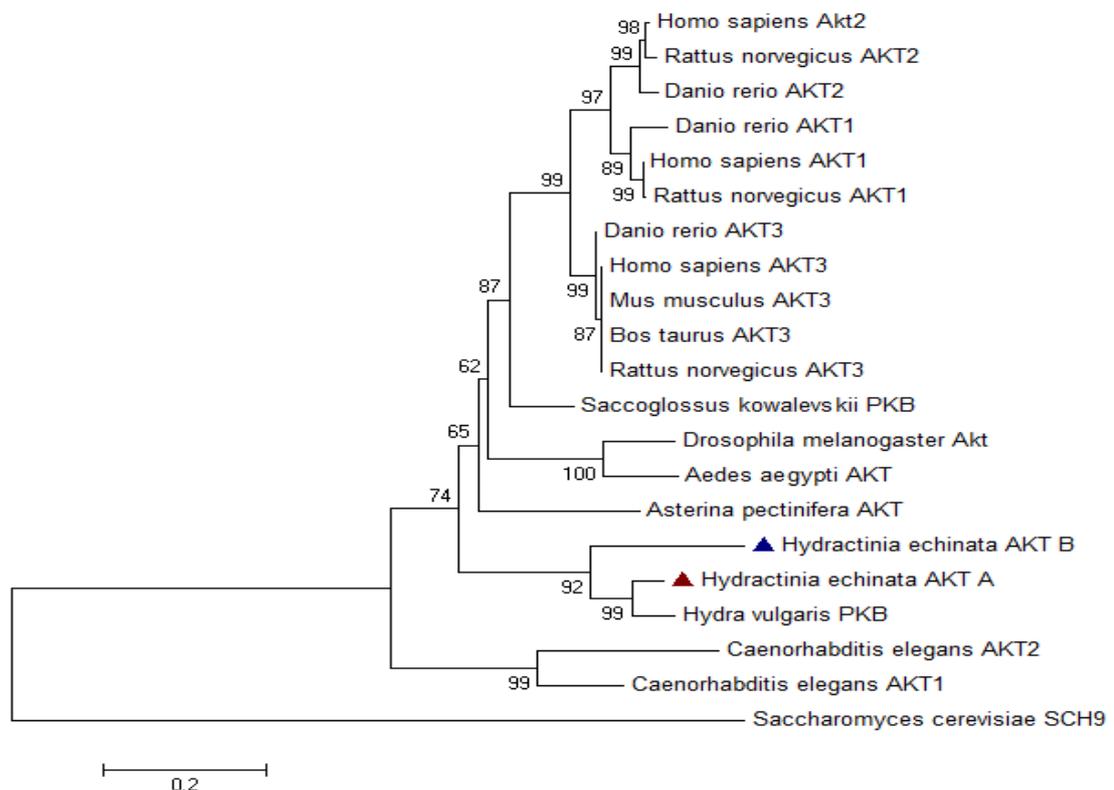


Abb.19 Phylogramm mit der *Hydractinia* AKT-Aminosäure-Sequenz und AKT-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia AKTA und AKTB (siehe Anhang Abb.13); PKB (AKT) [*Hydra vulgaris*] GenBank: AAM91027.1; AKT2 [*Danio rerio*] AKT-2 NCBI Reference Sequence: NP_937789.1; AKT3 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_005456.1; PKB [*Saccoglossus kowalevskii*] NCBI Reference Sequence: NP_001158433.1; AKT-3 [*Bos taurus*] NCBI Reference Sequence: NP_001178238.1; [*Mus musculus*] UniProtKB/Swiss-Prot: Q9WUA6.1; AKT2 [*Caenorhabditis elegans*] UniProtKB/Swiss-Prot: Q9XTG7.1; AKT3 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_113763.1; Akt1, isoform C [*Drosophila melanogaster*] NCBI Reference Sequence: NP_732113.3; AKT2 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_001617.1; Akt/PKB [*Asterina pectinifera*] GenBank: BAB69974.1; AKT [*Aedes aegypti*] GenBank: AAP37655.1; AKT1, isoform a [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_001023645.1; AKT1 [*Homo sapiens*] GenBank: AAA36539.1; AKT1 [*Danio rerio*] GenBank: AGG68959.1; AKT2 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_058789.1; AKT-1 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_150233.1; AKT3 [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_001184130.1; Sch9 [*Saccharomyces cerevisiae*] GenBank: CAA40853.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Die Sequenz des *Hydractinia* AKTB-Protein ist im Vergleich zu Sequenzen der menschlichen AKT1-, AKT2- und AKT3-Proteine länger (Abb.20). Die Sequenz des *Hydractinia* AKTA-Protein hingegen ist im Vergleich zu den Sequenzen menschlicher AKT-Proteine aber auch zu *Hydractinia* AKTB kürzer. Sowohl in *Hydractinia* AKTA- als auch in AKTB-Proteinen gibt es Protein-Domänen, die konserviert auch in menschlichem AKT1-, AKT2- und AKT3-Proteinen vorhanden sind. In *Hydractinia* AKTA und AKTB existiert eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne, eine Protein-Kinase-Domäne sowie eine „AGC-kinase-C-terminal“ (AGC_KI)-Domäne (Abb.20 A bis E). Ein Vergleich der Sequenzen von AKT1, AKT2 und AKT3-Proteinen des Menschen mit den Sequenzen von *Hydractinia* AKTA- und AKTB-Proteinen zeigte im Bereich der Domänen ein hohes Maß konservierter Aminosäuren. Lediglich im Bereich der „AGC-kinase-C-terminal“ (AGC_KI)-Domäne fanden sich deutliche Sequenzunterschiede (siehe Anhang Abb.14). Das Programm PROSITE erkannte in dem besagten Sequenzbereich jedoch speziesübergreifend in allen untersuchten Proteinen eine „AGC-kinase-C-terminal“ (AGC_KI)-Domäne.

In *Hydractinia* AKTA- und AKTB-Kinase sind Aminosäuren konserviert, die in charakterisierten AKT-Proteinen des Menschen als funktionelle Aminosäuren beschrieben wurden (Moore et al., 2011; Castellano et al., 2011). Von den Aminosäuren Threonin(T308) in menschlichem AKT1 und Threonin(T309) in menschlichem AKT2 sowie Serin(S473) in menschlichem AKT1 und Serin(S474) in menschlichem AKT2 ist bekannt, dass sie essentiell für die Funktion von AKT-Kinasen sind. AKT1- und AKT2-Proteine werden durch PDK1 an diesem Threonin phosphoryliert und somit aktiviert. An dem Serin wird AKT durch das Protein „transducer of CREB protein 2“ (TORC2) phosphoryliert (Castellano et al., 2011; Tsuchiya et al., 2013; Nag et al., 2013). Vergleichbare konservierte Aminosäuren sind in *Hydractinia* AKTA Threonin(T296) und Serin(S456). In *Hydractinia* AKTB sind es Threonin(T295) und Serin(S484) (Abb.20 F 1) und F 2)).

Allein anhand des Phylogramms (Abb.19) lässt sich keine eindeutige Klassifizierung der *Hydractinia* AKT-Proteine zu AKT1-, AKT2- oder AKT3-Proteinen anderer Organismen vornehmen. Ein BLAST in NCBI ergab jedoch für das *Hydractinia* AKTA-Protein eine höhere Homologie zu AKT2-Proteinen anderer Organismen und für das *Hydractinia* AKTB-Protein eine höhere Homologie zu AKT1-Proteinen anderer Organismen.

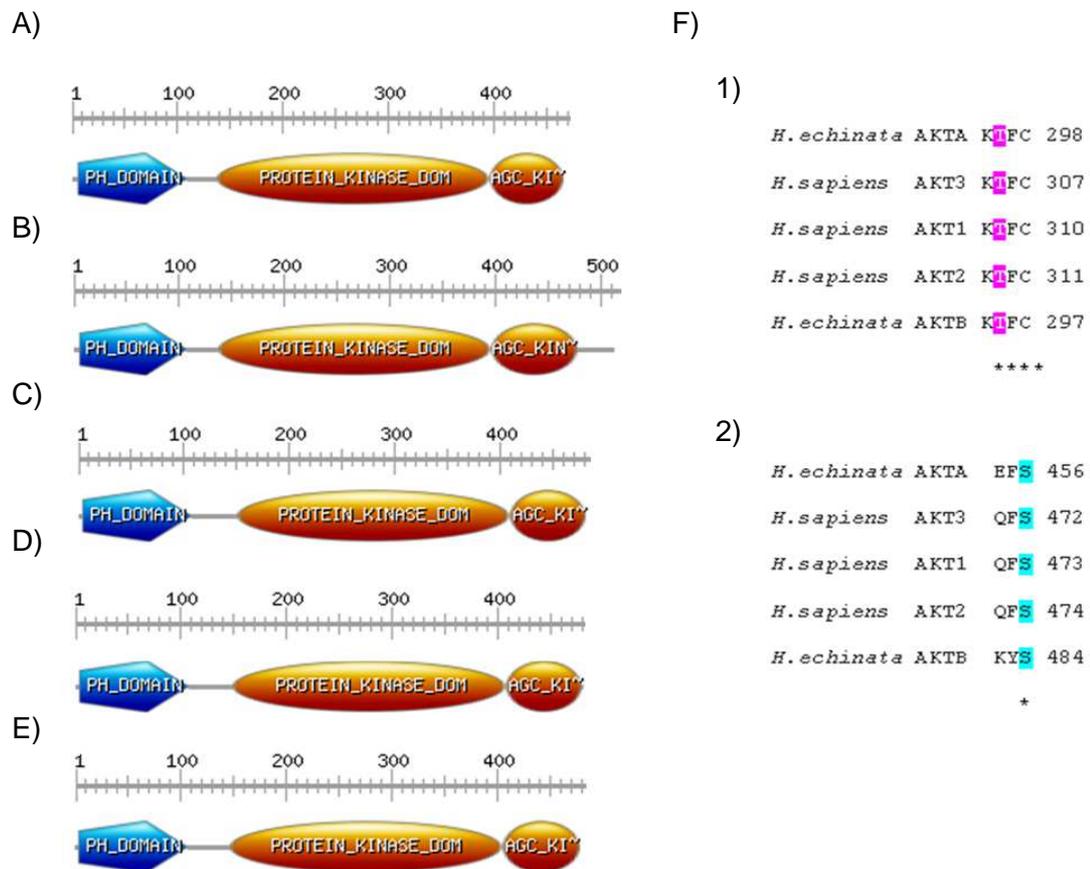


Abb.20 Konservierte Domänen in *Hydractinia* AKT und AKT-Proteinen anderer Organismen

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A bis E sind in blau die „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne markiert und in orange ist die „protein-kinase“-Domäne sowie die „AGC-kinase-C-terminal“-Domäne markiert. In Klammern ist jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 466 As langen *Hydractinia* AKTA-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.13) (As 6-109, 139-396, 397-466).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 513 As langen *Hydractinia* AKTB-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.13) (As 6-107, 138-395, 396-477).

C: Identifizierte Protein-Domänen in der 480 As langen *Homo sapiens* AKT1-Aminosäure-Sequenz (GenBank: AAA36539.1) (As 5-108, 150-408, 409-480).

D: Identifizierte Protein-Domänen in der 481 As langen *Homo sapiens* AKT2-Aminosäure-Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_001617.1) (As 5-108, 152-409, 410-481).

E: Identifizierte Protein-Domänen in der 479 As langen *Homo sapiens* AKT3-Aminosäure-Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_005456.1) (As 5-107, 148-405, 406-479).

F: Ausschnitt aus einem Sequenzvergleich (siehe Anhang Abb.14).

1) In lila ist die aus AKT1 des Menschen bekannte, charakteristische Phosphorylierungsstelle Threonin(T308) markiert (Castellano et al., 2011).

2) In blau ist die aus AKT1 des Menschen bekannte, charakteristische Phosphorylierungsstelle Serin(S473) markiert (Moore et al., 2011; Castellano et al., 2011). Vergleichbare, konservierte Aminosäuren wurden auch in den Sequenzen von *Hydractinia* markiert.

3.2.3 TIAM1 und Rac1 in *Hydractinia echinata*

Im Transkriptom von *Hydractinia* konnte ein mögliches Homolog für ein TIAM- und für ein Rac1-Protein identifiziert werden (Tab.25).

TIAM1 und Rac1 Proteine des Menschen	Potenzielle homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>
TIAM1	TIAM comp 82818_c0_seq1
Rac1	Rac1 comp 83403_c0_seq1

Tab.25 TIAM1 und Rac1 des Menschen und mögliche homologe Proteine in *Hydractinia*

In der Tabelle sind bekannte TIAM1- und Rac1-Proteine des Menschen aufgelistet. Im Vergleich werden hierzu potenzielle, homologe Proteine von *Hydractinia* mit ihrer Trinity-N1-N8-Transkriptomdatenbank-Identifikationsnummer angegeben.

TIAM

In *Hydractinia* gibt es ein mögliches, mit TIAM1- und TIAM2 (auch SIF)-Proteinen anderer Organismen verwandtes Protein (siehe Anhang Abb.15) (Tab.25). Das *Hydractinia* Protein wurde durch BLAST-Analyse mit menschlichem TIAM1 (GenBank: AAA98443.1) identifiziert.

Ein BLAST des identifizierten Proteins in NCBI ergab eine höhere Verwandtschaft zu SIF-Proteinen der Insekten und zu TIAM2-Proteinen anderer Organismen als zu TIAM1-Proteinen anderer Organismen.

In dem *Hydractinia* Protein, in TIAM1 und TIAM2 des Menschen sowie im SIF-Typ1- und im SIF-Typ2-Protein von *Drosophila melanogaster* existiert eine „Dbl homology“ (DH2)-Domäne, eine PDZ-Domäne und eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne. Sowohl SIF-Typ1 von *Drosophila* als auch das *Hydractinia* Protein haben eine „Wiskott-Aldrich homology 1“ (WH1)-Domäne. In SIF Typ2 von *Drosophila* fehlt diese Domäne. Sowohl SIF-Typ1- und SIF-Typ2-Proteine von *Drosophila* als auch die TIAM-Proteine des Menschen verfügen zudem über eine „Ras binding“ (RBD)-Domäne. Diese wurde sowohl von PROSITE als auch mit Pfam in dem möglichen TIAM von *Hydractinia* nicht identifiziert. Die TIAM1- und TIAM2-Proteine des Menschen, die SIF1- und SIF2-Proteine von *Drosophila* und das mögliche TIAM-Protein aus *Hydractinia* unterscheiden sich erheblich in ihrer Sequenz-Länge (Abb.21).

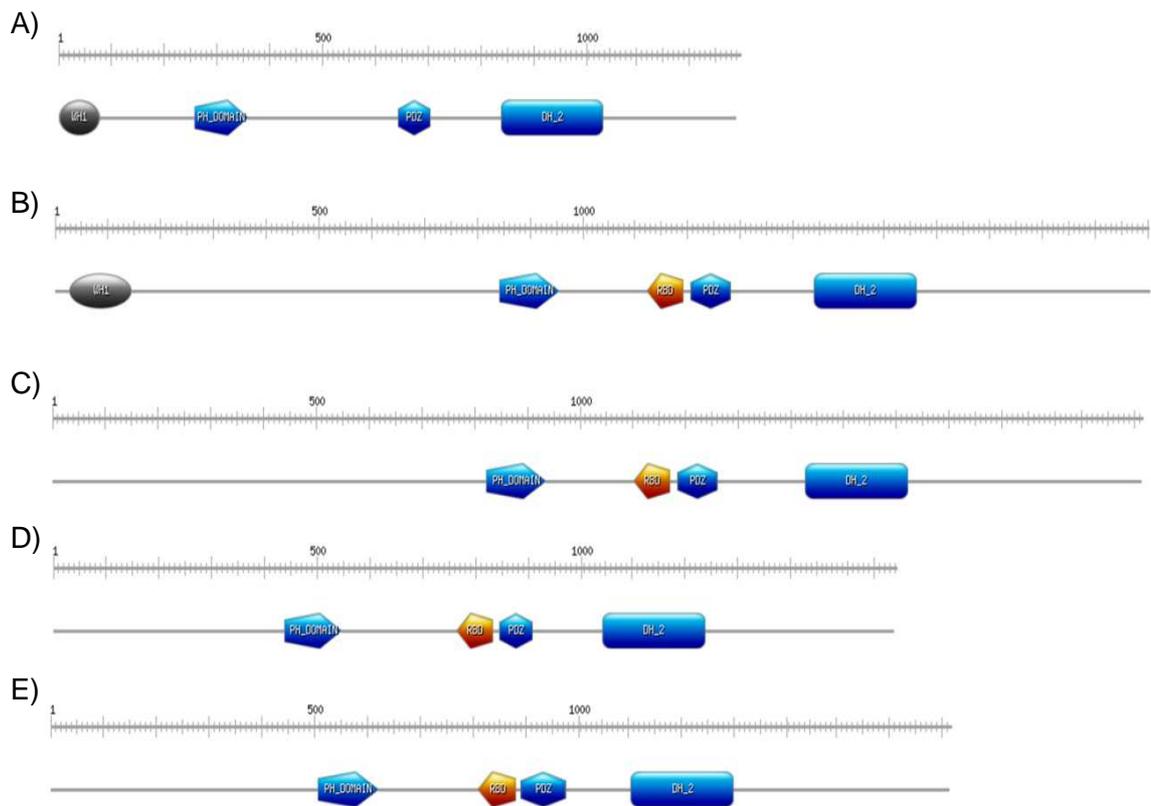


Abb.21 Konservierte Domänen in dem potenziellen *Hydractinia* TIAM-Protein und in TIAM1- und TIAM2-Proteinen anderer Organismen

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A und B gibt es in grau die „Wiskott-Aldrich homology 1“ (WH1)-Domäne. In B bis E gibt es in orange eine „Ras binging“ (RBD)-Domäne. In A bis E gibt es in blau dargestellt eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne, eine PDZ-Domäne und eine „Dbl homology“ (DH2)-Domäne. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der möglichen 1283 As langen *Hydractinia* TIAM-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.15) (As 1-79,258-359, 644-704, 838-1030).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 2072 As langen *Drosophila melanogaster* SIF Typ1-Aminosäure-Sequenz (UniProtKB/Swiss-Prot: P91621.2) (As29-147,842-935, 1121-1188, 1204-1280, 1436-1630).

C: Identifizierte Protein-Domänen in der 2061 As langen *Drosophila melanogaster* SIF Typ2-Aminosäure-Sequenz (NP_001261447.1) (As822-935, 1101-1168, 1184-1260,1425-1619).

D: Identifizierte Protein-Domänen in der 1591 As langen *Homo sapiens*. TIAM1-Aminosäure-Sequenz (GenBank: AAA98443.1) (As439-547,765-832, 845-903, 1040-1234).

E: Identifizierte Protein-Domänen in der 1701 As langen *Homo sapiens*. TIAM2-Aminosäure-Sequenz (UniProtKB/Swiss-Prot: Q81VF5.4) (As509-620, 810-881, 890-970, 1099-1293).

Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der in Abb.21 dargestellten Proteine zeigte, dass es lediglich im Bereich der „Dbl homology“ (DH2)-Domäne, der PDZ-Domäne und der „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne vereinzelt speziessübergreifend konservierte Aminosäuren gibt. Insgesamt überwiegen jedoch Bereiche mit geringer oder keiner Sequenz-Homologie (siehe Anhang Abb.16). Eine phylogenetische Analyse war aufgrund der sehr begrenzten Verfügbarkeit validierter TIAM1- und TIAM2-Sequenzen anderer Organismen nicht möglich.

Rac1

In *Hydractinia* existiert ein mögliches Rac1-Protein (siehe Anhang Abb.17) (Tab.25). Das potenzielle Rac1 wurde mit menschlichem Rac1-Protein (NCBI Sequence ID: gb|AF498964.1) im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert.

In einem Phylogramm mit Rac1-Proteinen anderer Organismen bildet *Hydractinia* Rac1 zusammen mit einem potenziellen Rac1 des Cnidarier *Hydra vulgaris* einen gemeinsamen Zweig. Weitere Zweige bilden Rac1-Proteine der Vertebraten, von Insekten, von *Ciona* und dem Schwamm *Ephydatia fluviatilis*. Eigene Äste im Phylogramm bilden das Rac-Protein eines Borstenwurms, einer Schnecke, des Nematoden *Caenorhabditis elegans* sowie ein Rac1-Homolog aus *Candida orthopsilosis* (Abb.22).

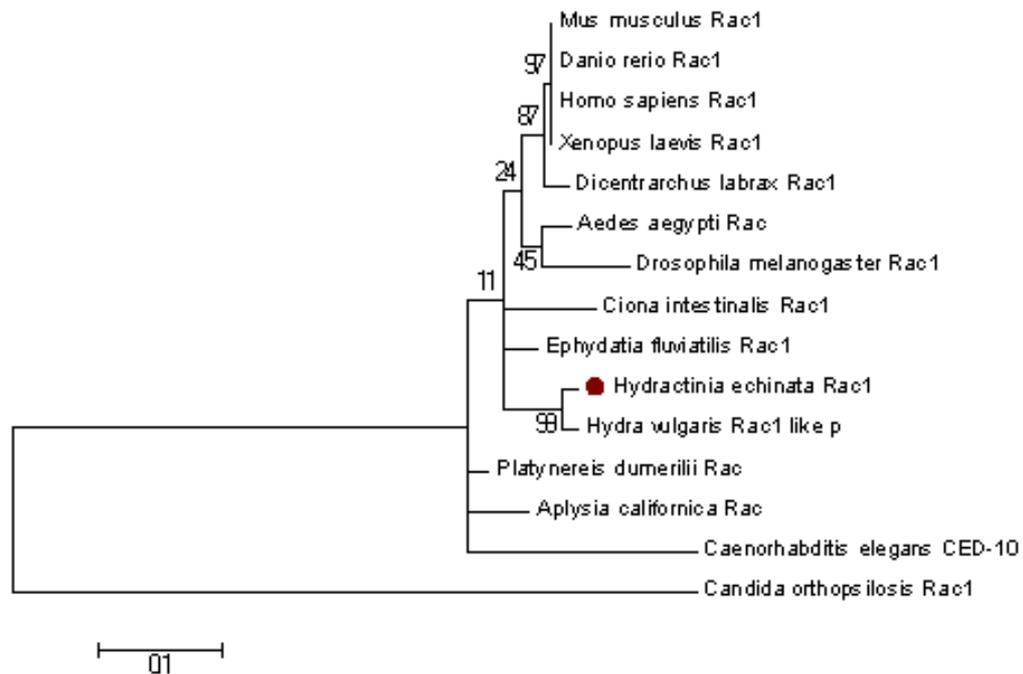


Abb.22 Phylogramm mit der *Hydractinia* Rac1-Aminosäure-Sequenz und Rac1-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia Rac1-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.17); Rac1 [*Ephydatia fluviatilis*] GenBank: BAI94591.1; Rac [*Platynereis dumerilii*] GenBank: CCI61367.1; Rac [*Aedes aegypti*] NCBI Reference Sequence: XP_001660307.1; PREDICTED Rac1-like [*Hydra vulgaris*] NCBI Reference Sequence: XP_002158815.1; Rac1 [*Mus musculus*] UniProtKB/Swiss-Prot: P63001.1; Rac1 [*Homo sapiens*] GenBank: CAB53579.5; RAC1 [*Xenopus laevis*] GenBank: AAI08885.1; Rac 1 [*Dicyentrarchus labrax*] GenBank: CBN81227.1; Rac1 [*Drosophila melanogaster*] GenBank: AAA67040.1; Rac1 [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_956065.1; Rac [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: NP_001191532.1; CED-10 [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_500363.1; Rac1 [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: NP_001027692.1; Rac1 [*Candida orthopsilosis* Co 90-125] NCBI Reference Sequence: XP_003866464.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Die erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Der Vergleich der gleichlangen Aminosäure-Sequenzen des potenziellen *Hydractinia* Rac1-Proteins mit menschlichem Rac1-Protein zeigt, dass beide Proteine über die Rac1-typische „RHO-GTPase“ (RHO)-Domäne verfügen (Abb.23).

Ein Vergleich beider Proteine mit Rac1-Proteinen anderer Organismen auf Aminosäure-Ebene zeigt, dass Rac-Proteine spezieübergreifend hoch konserviert sind. Lediglich in C-terminalen Sequenzbereichen gibt es größere Sequenzunterschiede (siehe Anhang Abb.18).



Abb.23 Konservierte Domänen in einem potenziellen *Hydractinia* Rac1 und in einem *Homo sapiens* Rac1-Protein

Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. In A und B gibt es in grün eine „RHO-GTPase“ (RHO)-Domäne. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domäne in dem jeweiligen Protein angegeben. Die Abbildungen wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domäne in dem 192 As langen *Hydractinia* Rac1-Protein (siehe Anhang Abb.17) (As 1-176)

B: Identifizierte Protein-Domäne in dem 192 As langen *Homo sapiens* Rac1-Protein (GenBank: CAB53579.5) (As 1-176).

3.2.4 RALGDS, Ral und Phospholipase D (PLD) in *Hydractinia echinata*

In *Hydractinia* wurden ein potenzielles „ral guanine nucleotide dissociation stimulator like 1 protein“ (RGL1), ein potenzielles „Ras related protein“ (RAL) und eine potenzielle Phospholipase D (PLD) identifiziert (Tab. 26).

RALGDS, Ral und Phospholipase D (PLD) des Menschen	Potenzielle homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>
RALGDS; RGL1;RGL2	RGL1 comp76892_c0_seq1
RAL-A und RAL-B	RAL comp73071_c0_seq1
PLD	PLD comp86898_c0_seq7

Tab.26 RALGDS-, Ral- und Phospholipase D-Proteine des Menschen und mögliche homologe Proteine in *Hydractinia*

In der Tabelle sind die aus dem Menschen bekannte Proteine RALGDS, RGL1, RGL2, RAL-A und RAL-B sowie PLD angegeben. Im Vergleich werden hierzu potenzielle, homologe Proteine von *Hydractinia* gelistet und mit ihrer Trinity-N1-N8-Transkriptomdatenbank-Identifikationsnummer angegeben.

RGL1

Im Transkriptom von *Hydractinia* wurde mit RALGDS-, RGL1- und RGL2-Aminosäure-Sequenzen des Menschen (RGL1 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_055964.3; RGL2 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_004752.1; RALGDS [*Homo sapiens*] UniProtKB/Swiss-Prot: Q12967.2) nach möglichen Homologen in *Hydractinia* gesucht. Von RALGDS-, RGL1- und RGL2-Proteinen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, RAL-A und RAL-B zu aktivieren (Castellano et al., 2011). In *Hydractinia* konnte nur ein mögliches „ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1“ (RGL1)-Protein identifiziert werden (siehe Anhang Abb.19).

Eine phylogenetische Analyse erwies sich für RGL1 als wenig praktikabel, da es so gut wie keine validierten RGL1-Sequenzen anderer Organismen gibt. Ein Vergleich von *Hydractinia* RGL1-Protein-Domänen mit Protein-Domänen in menschlichem RGL1 zeigte in beiden Proteinen die gleichen Domänen (Abb.24).

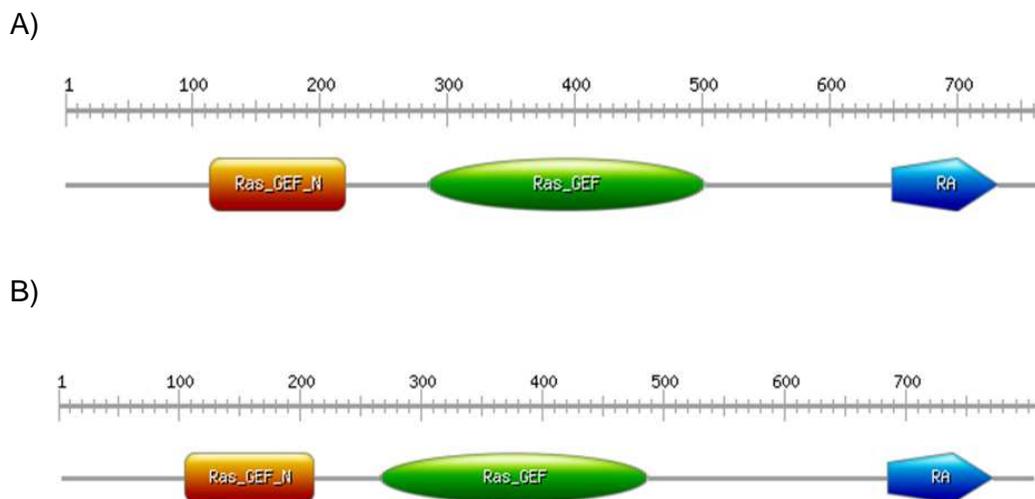


Abb.24 Konservierte Domänen in dem möglichen *Hydractinia* RGL1-Protein und in *Homo sapiens* RGL1

In A und B ist in orange die „Ras guanine exchange factor N-terminal“ (RAS_GEF_N)-Domäne dargestellt. In grün ist die „Ras guanine-nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF)-Domäne gezeigt. Blau dargestellt ist die „Ras-associating“ (RA)-Domäne. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. Sequenz spezifische Domänen wurden in A und B mit Pfam ermittelt. Die Abbildung wurde mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 786 As langen *Hydractinia* RGL1-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.19) (As 114-221, 288-554, 649-732).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 803 As langen *Homo sapiens* RGL1-Aminosäure-Sequenz (NCBI: Reference Sequence: NP_055964.3) (As 103-209, 264-485, 683-770).

Das Programm Pfam erkannte eine „Ras guanine exchange factor N-terminal“ (RAS_GEF_N)-Domäne, eine „Ras guanine-nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF)-Domäne sowie eine „Ras-associating“ (RA)-Domäne. In einer Analyse mit PROSITE wurde die „Ras-associating“-Domäne in *Hydractinia* RGL1 jedoch nicht erkannt (Abb.24).

Ein Vergleich von RGL1-Proteinen von *Hydractinia*, des Menschen und der Maus auf Aminosäure-Ebene zeigte innerhalb der Domänen speziessübergreifend konservierte Bereiche (siehe Anhang Abb.20). Für die C-terminale „Ras-associating“ (RA)-Domäne konnte Pfam in *Hydractinia* RGL1 im Vergleich zu menschlichem RGL1-Protein nur einen kürzeren Sequenzbereich zuordnen.

RAL

In *Hydractinia* gibt es ein mögliches, zu Vertebraten RAL-Proteinen homologes *Hydractinia* RAL (siehe Anhang Abb.21). RAL-A- und RAL-B-Proteine gehören wie auch Ras-Proteine zur „Superfamilie“ der Ras-Proteine. Das mögliche *Hydractinia* RAL-Protein wurde mit RAL-A (NCBI: GenBank: AAM12624) und RAL-B (NCBI: GenBank: AAA60250.1) des Menschen im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert.

Hydractinia RAL nimmt in einem Phylogramm einen eigenständigen basalen Ast mit einem potenziellen *Hydra vulgaris* RAL ein. Mit in diesem Ast gruppiert ein RAL-A des Schwammes *Suberites dumuncula* in einem Seitenast. Ein RAL-Protein des Nematoden *Caenorhabditis* und ein potenzielles RSR1 RAL-Homolog aus Hefe bilden ebenfalls jeweils eigenständige Äste. In einem Hauptast gruppieren in einzelnen Zweigen RAL-A- und RAL-B-Proteine der Vertebraten, von Insekten, von *Ciona* und ein potenzielles Mollusken RAL-A von *Aplysia californica* (Abb.25).

Ein BLAST mit *Hydractinia* RAL in NCBI ergab eine hohe Homologie zu RAL-Proteinen anderer Organismen, wobei die Homologie zu RAL-A-Proteinen anderer Organismen höher als zu RAL-B-Proteinen war.

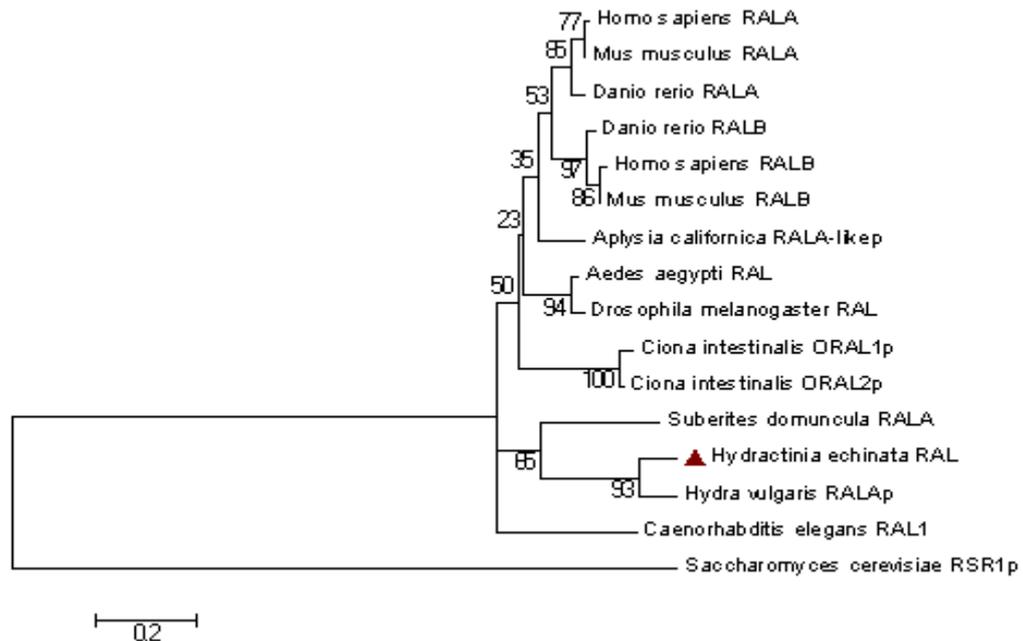


Abb.25 Phylogramm mit der *Hydractinia* RAL-Aminosäure-Sequenz und RAL-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia RAL (siehe Anhang Abb.21); RAL-A [*Homo sapiens*] GenBank: AAM12624.1; RAL-B [*Homo sapiens*] GenBank: AAA60250.1; PREDICTED: Ras-related protein Ral-A-like [*Hydra vulgaris*] NCBI Reference Sequence: XP_004208137.1; RAL [*Aedes aegypti*] NCBI Reference Sequence: XP_001649535.1; RAL-A [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_957312.1; RAL-B [*Danio rerio*] NCBI Reference Sequence: NP_001003649.1; PREDICTED: Ras-related protein Ral-A-like [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: XP_005088932.1; RAL [*Drosophila melanogaster*] GenBank: AAC34902.1; RAL-A [*Mus musculus*] UniProtKB/Swiss-Prot: P63321.1; RAL B [*Mus musculus*] GenBank: AAF89875.1; PREDICTED: Ras-related protein O-RAL isoform 1 [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: XP_002121711.1; PREDICTED: Ras-related protein O-RAL isoform 2 [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: XP_002121901.1; RAL-A [*Suberites domuncula*] GenBank: ABD65421.1; Protein RAL-1, isoform a [*Caenorhabditis elegans*] GenBank: CCD73808.1; RSR1p [*Saccharomyces cerevisiae* EC1118] GenBank: CAY79912.1; RAL-B [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001084379.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Sowohl in RAL-A- und RAL-B-Proteinen des Menschen als auch im *Hydractinia* RAL-Protein gibt es ein „small GTPase family profile“ (RAS) (Abb.26). Ein Vergleich von *Hydractinia* RAL mit den menschlichen RAL-Proteine und mit RAL-A der Maus auf Aminosäure-Ebene zeigte, dass der prozentuale Anteil konservierter Aminosäuren innerhalb des „small GTPase family profile“ spezieübergreifend hoch ist (siehe Anhang Abb.22). Zusätzlich konnten in *Hydractinia* RAL konservierte, aus Vertebraten RAL-Proteinen bekannte, RAL-spezifische Aminosäuren identifiziert werden. Von den in Abbildung 26 D1) und D3) markierten Aminosäuren ist in RAL-A der Maus bekannt, dass ihr Austausch (G23V und Q72L) zu einer Aktivierung von RAL-A führt (Lim et al., 2005). Die entsprechenden Aminosäuren sind auch in *Hydractinia* RAL an gleicher Stelle konserviert (Abb.26 D1) und D3)). In *Hydractinia* RAL ist zudem ein

aus Vertebraten RAL-Proteinen bekanntes, charakteristisches RAL-Protein-Sequenzmotiv (Colicelli et al., 2004) hoch konserviert (Abb.26 D2)).

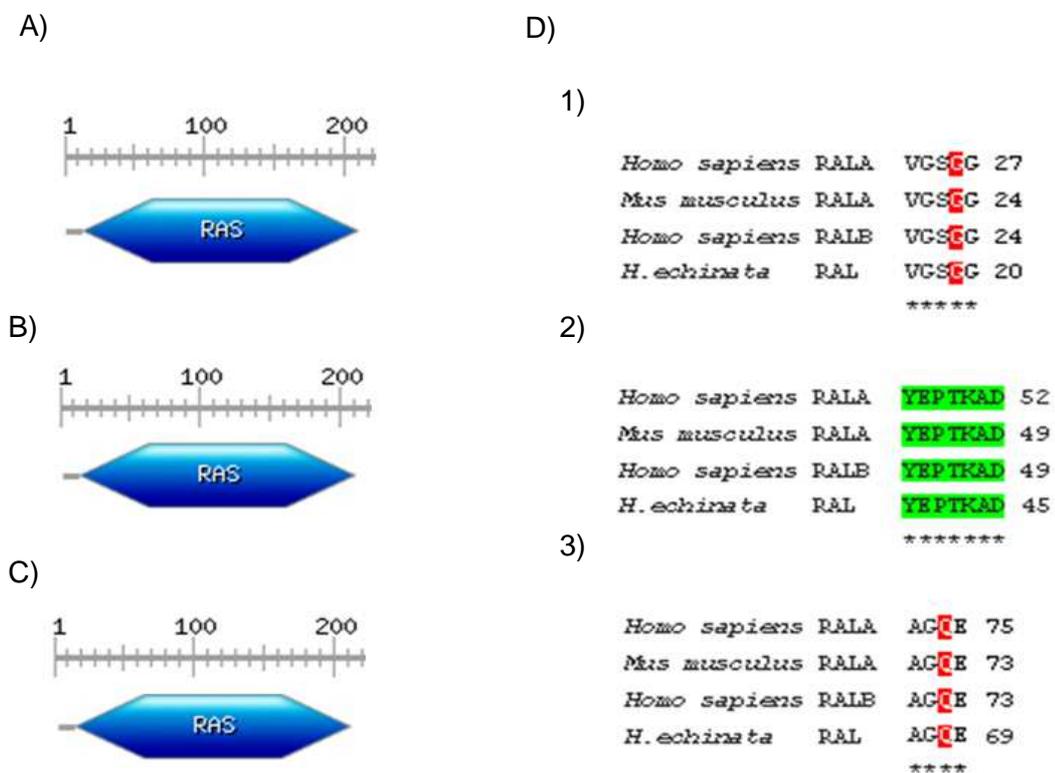


Abb.26 Konservierte Domänen in dem möglichen *Hydractinia* RAL-Protein und in RAL-Proteinen anderer Organismen

In A, B und C ist in blau das „small GTPase family profile“ (RAS) dargestellt. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domäne in dem jeweiligen Protein angegeben. Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. Die Abbildungen A, B und C wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domäne in der 201 Aa langen *Hydractinia* RAL-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.21) (Aa 5-201).

B: Identifizierte Protein-Domäne in der 209 Aa langen *Homo sapiens* RAL-A- Aminosäure-Sequenz (GenBank: AAM12624.1) (Aa 13-209).

C: Identifizierte Protein-Domäne in der 206 Aa langen *Homo sapiens* RAL-B-Aminosäure-Sequenz (GenBank: AAA60250.1) (Aa 10-206).

D: Ausschnitt aus einem Sequenzvergleich (siehe Anhang Abb.22). 1) und 3) zeigen in rot, bekannte RALA-Mutationsstellen (Lim et al., 2005). Die entsprechenden konservierten Aminosäuren wurden speziessübergreifend markiert. 2) zeigt in grün ein in RAL-Proteinen speziessübergreifend konserviertes Sequenzmotiv (Colicelli et al., 2004).

PLD

In *Hydractinia* gibt es eine mögliche PLD (siehe Anhang Abb.23). *Hydractinia* PLD wurde durch BLAST-Analyse mit der PLD1-Aminosäure-Sequenz des Menschen (UniProtKB/Swiss-Prot:Q13393.1) im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert. Ein BLAST in NCBI zeigte eine Homologie des *Hydractinia* Proteins sowohl zu PLD1- aber auch zu PLD2-Proteinen anderer

Organismen. Da die *Hydractinia* PLD auch mit PLD2 des Menschen im Transkriptom von *Hydractinia* gefunden wurde, wurden sowohl bekannte PLD1- als auch PLD2-Proteine in die phylogenetische Analyse mit einbezogen.

Im Phylogramm gruppiert *Hydractinia* PLD zusammen mit einer „predicted“ PLD des Cnidarier *Nematostella vectensis* in einem Zweig. Weitere Zweige in einem Hauptast bilden PLD-Proteine der Insekten sowie eine „predicted“ PLD des Mollusken *Aplysia californica*. Die PLD1- und PLD2-Proteine der Vertebraten gruppieren in eigenen Zweigen in einem gemeinsamen Hauptast zusammen. Basal in diesem Hauptast bildet PLD von *Caenorhabditis elegans* einen Zweig. SPO14, ein PLD-Homolog aus Hefe, bildet einen eigenständigen basalen Ast (Abb.27).

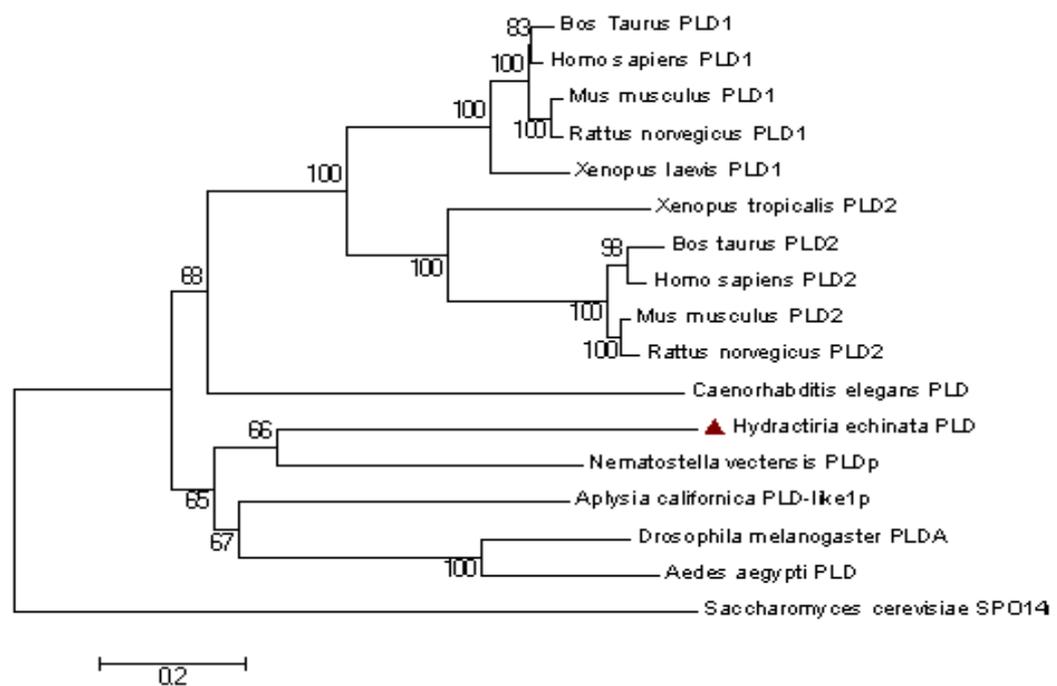


Abb.27 Phylogramm mit der *Hydractinia* PLD-Aminosäure-Sequenz und PLD-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen
Hydractinia PLD (siehe Anhang Abb. 23); PLD1 [*Xenopus laevis*] NCBI Reference Sequence: NP_001129642.1; PLD2 [*Xenopus (Silurana) tropicalis*] NCBI Reference Sequence: NP_001135641.1; PLD2 [*Bos taurus*] NCBI Reference Sequence: NP_001069295.1; PLD1 [*Bos taurus*] NCBI Reference Sequence: NP_001095471.1; PLD predicted protein [*Nematostella vectensis*] NCBI Reference Sequence: XP_001635813.1; PLD2 [*Homo sapiens*] GenBank: AAB96655.1; PLD2 [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_032902.1; PLD1 [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_032901.2; PLD1 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_112254.1; PLD2 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_150641.2; PLD1 [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_494939.1; PLD, isoform A [*Drosophila melanogaster*] GenBank: AAF57265.3; PLD1 [*Homo sapiens*] UniProtKB/Swiss-Prot:Q13393.1; PREDICTED: PLD1-like [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: XP_005109943.1; PLD [*Aedes aegypti*] NCBI Reference Sequence: XP_001654761.1; PLD [*Caenorhabditis elegans*] GenBank: BAA97571.1; SPO14 [*Saccharomyces cerevisiae*] GenBank: AAA74938.1 Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltene Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

In *Hydractinia* PLD und den menschlichen PLD-Proteinen existieren eine „phox homology“ (PX)-Domäne sowie zwei „phospholipase D active site“ (PLD)-Domänen (Abb.28).

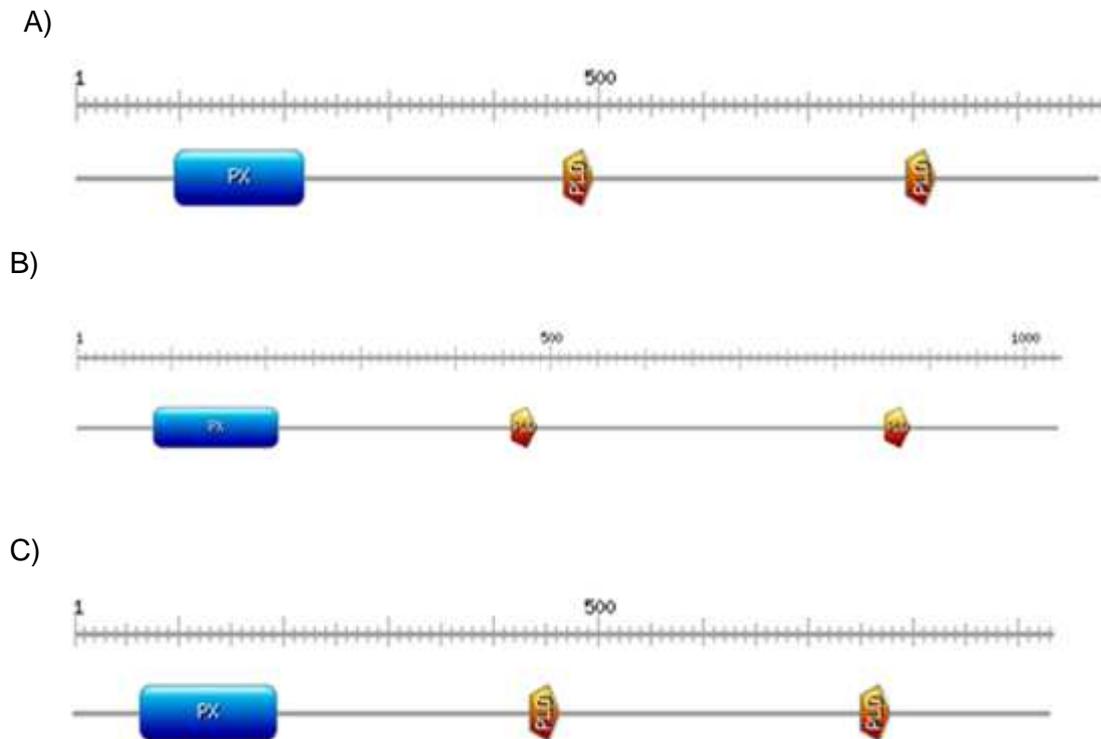


Abb.28 Konservierte Domänen in dem potenziellen *Hydractinia* PLD-Protein und in PLD-Proteinen anderer Organismen

In A, B und C ist in blau die „phox homology“ (PX)-Domäne dargestellt. In orange sind die beiden „phospholipase D active site“ (PLD)-Domänen dargestellt. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. Die Abbildungen A, B und C wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 977 As langen *Hydractinia* PLD-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.23) (As 95-219, As 466-495, 794-821).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 1036 As langen *Homo sapiens* PLD1-Aminosäure-Sequenz (NCBI: GenBank: BAD93144.1) (As 81-212, 459-486, 853-880C).

C: Identifizierte Protein-Domänen in der 933 As langen *Homo sapiens* PLD2-Aminosäure-Sequenz (NCBI: GenBank: AAB96655.1) (As 65-195, 437-464, 751-778).

Innerhalb und auch außerhalb der Domänen gibt es speziessübergreifend konservierte Sequenzbereiche (siehe Anhang Abb.24). Allein anhand des Sequenzvergleiches (siehe Anhang Abb.24) und des Phylogramms (Abb.27) lässt sich keine nähere Zuordnung des *Hydractinia* PLD zu PLD1- oder PLD2-Proteinen der Vertebraten vornehmen. Ein BLAST mit *Hydractinia* PLD in NCBI ergab jedoch qualitativ höhere „Hits“ vor allem zu PLD2-Proteinen der Vertebraten.

3.2.5 „son of sevenless“ (SOS), „neurofibromatosis related protein1“ (NF1) und „Ras p21 protein activator (GTPase activating protein 1)“ (RASA1 oder auch GAP) in *Hydractinia echinata*

In *Hydractinia* existiert ein mögliches „son of sevenless“ (SOS), ein potenzielles „neurofibromatosis related Protein1“ (NF1) und ein mögliches „GTPase activating protein“ (GAP) (Tab25).

SOS, NF1 und GAP Proteine des Menschen	Potenzielle homologe Proteine in <i>Hydractinia</i>
SOS1/SOS2	SOS comp 83354_c0_seq1
NF1	NF1 comp 83403_c0_seq1
RASA1 (GAP)	GAP comp 61996_c0_seq1

Tab.27 SOS1/2-, NF1- und RASA1 (GAP)-Proteine des Menschen und mögliche homologe Proteine in *Hydractinia*

In der Tabelle sind die aus dem Menschen bekannte Proteine SOS1 und SOS2, NF1 und GAP aufgeführt. Im Vergleich hierzu sind potenzielle, homologe Proteine von *Hydractinia* gelistet und mit ihrer Trinity-N1-N8-Transkriptomdatenbank-Identifikationsnummer angegeben.

SOS

In *Hydractinia* gibt es ein mögliches, zu Vertebraten SOS-Proteinen homologes Protein (siehe Anhang Abb.25). Das *Hydractinia* SOS-Protein wurde durch BLAST-Analyse mit SOS1- (NCBI Reference Sequence: NP_005624.2) und SOS2-Aminosäure-Sequenzen (NCBI Reference Sequence: NP_008870.2) des Menschen im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert.

In dem Phylogramm (Abb.29) gruppieren in einem Hauptast die SOS1- und SOS2-Proteine der Vertebraten in eigenen Zweigen. Weitere eigene Äste in diesem Hauptast bilden SOS-Proteine von Insekten, sowie potenzielle SOS-Proteine von Echinodermen und von *Ciona*. In dem Hauptast gruppieren auch das SOS-Protein von *Hydractinia* und ein mögliches SOS-Protein von *Hydra vulgaris* in einem gemeinsamen Zweig. Einen von dem Hauptast unabhängigen Ast bildet SOS1 von *Caenorhabditis elegans*. Auch SOS-Proteine der Plattwürmer *Echinococcus granulatus* und *Schistosoma mansoni* bilden zusammen einen gemeinsamen Ast. Cdc25 der Hefe bildet einen basalen eigenständigen Ast.

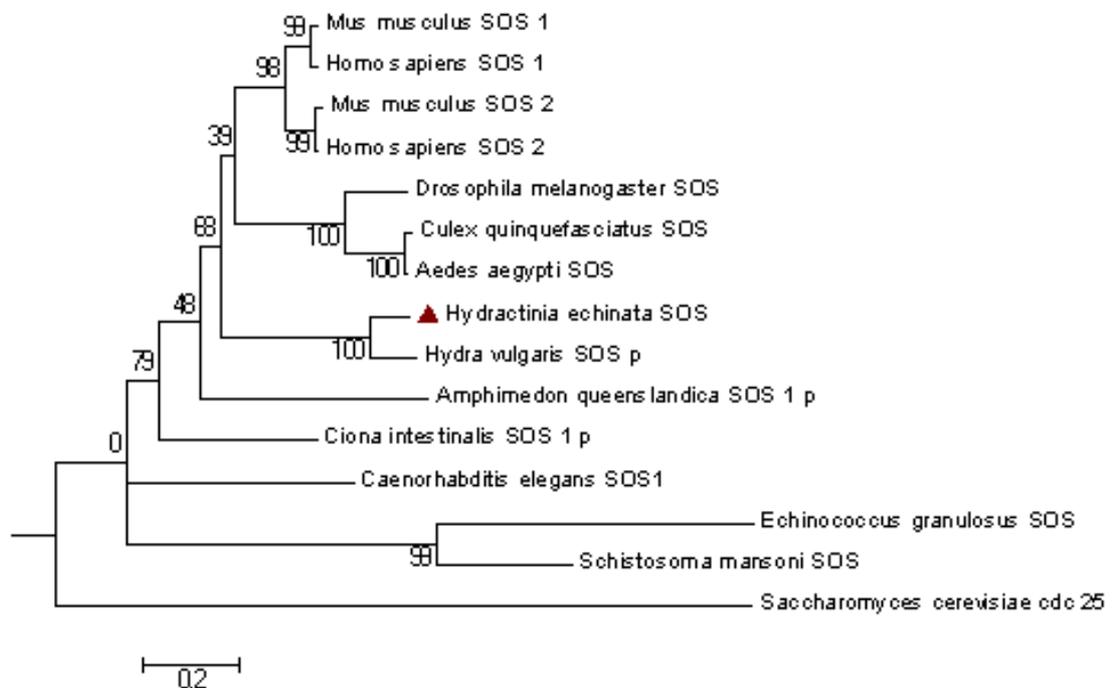


Abb.29 Phylogramm mit der *Hydractinia* SOS-Aminosäure-Sequenz und SOS-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen
Hydractinia SOS (siehe Anhang Abb.25); SOS predicted [*Hydra vulgaris*] NCBI Reference Sequence: XP_002161858.2; SOS1 [*Mus musculus*] GenBank: CAA77662.1; SOS2 [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_001129031.1; SOS1 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_005624.2; SOS2 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_008870.2; SOS [*Drosophila melanogaster*] NCBI Reference Sequence: NP_476597.2; SOS [*Culex quinquefasciatus*] NCBI Reference Sequence: XP_001847045.1; SOS [*Aedes aegypti*] NCBI Reference Sequence: XP_001658182.1; PREDICTED: SOS 1-like [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: XP_002122047.2; CDC25 [*Saccharomyces cerevisiae*] GenBank: AAA34478.1; SOS [*Echinococcus granulosus*] GenBank: EUB63558.1; predicted SOS1-like [*Amphimedon queenslandica*] NCBI Reference Sequence: XP_003385594.1; SOS1 [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_504235.2; SOS [*Schistosoma mansoni*] NCBI Reference Sequence: XP_002582114.1; Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle-Alignment wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltenen Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

Um *Hydractinia* SOS genauer zu charakterisieren, wurden in dem Protein identifizierte Domänen mit bekannten Domänen in menschlichem SOS1 und SOS2 verglichen (Abb.30). Innerhalb der mit 1016 As, im Vergleich zu SOS1 und SOS2 des Menschen ungefähr 300 As kürzeren Sequenz von *Hydractinia* SOS wurden die gleichen Domänen wie in menschlichem SOS1 und SOS2 erkannt. In SOS1- und SOS2-Proteinen des Menschen und in *Hydractinia* SOS existieren eine „Dbl-homology“ (DH₂)-Domäne, eine „pleckstrin-homology“ (PH)-Domäne, eine „Ras guanine-nucleotide exchange factor N-terminal“ (RASGEF_NTER)-Domäne und eine „Ras guanine nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF_CAT)-Domäne (Abb.30).

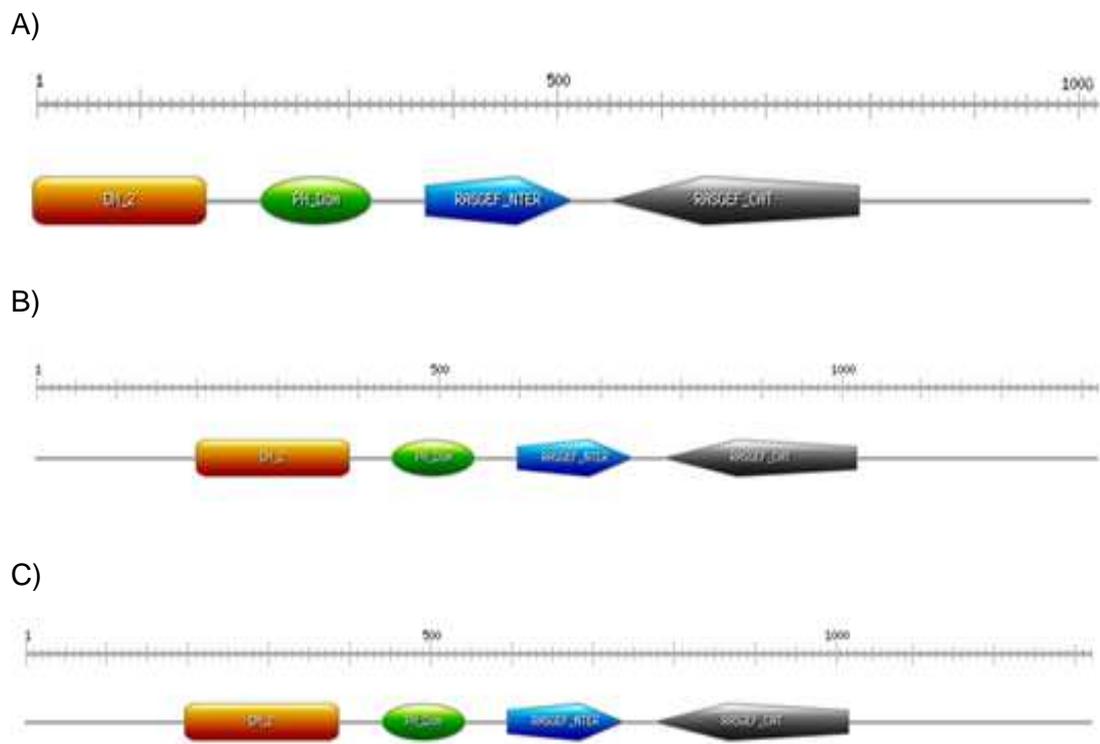


Abb.30 Konservierte Domänen in dem möglichen *Hydractinia* SOS-Protein und in SOS-Proteinen anderer Organismen

In A, B und C ist in orange die „Dbl homology“ (DH₂)-Domäne, in grün die „pleckstrin-homology“ (PH)-Domäne, in blau die „Ras guanine-nucleotide exchange factor N-terminal“ (RASGEF_NTER)-Domäne und in grau die „Ras guanine nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF_CAT)-Domäne dargestellt. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. Die Abbildungen wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 1016 As langen *Hydractinia* SOS-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.25) (As 1-168, 220-326, 377-518, 554-794).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 1333 As langen *Homo sapiens* SOS1 Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_005624.2) (As 200-390, 443-546, 597-741, 780-1019).

C: Identifizierte Protein-Domänen in der 1332 As langen *Homo sapiens* SOS2 Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_008870.2) (As 198-388, 441-544, 595-739, 778-1017).

Innerhalb der beschriebenen Domänen gibt es speziessübergreifend Abschnitte mit konservierten Bereichen. Es fiel jedoch auf, dass die „Dbl homology“ (DH₂)-Domäne in *Hydractinia* N-terminal kürzer ist. Auch in den Bereichen zwischen den Domänen gibt es konservierte Sequenzabschnitte (siehe Anhang Abb.26). Allein das Phylogramm (Abb.29) und der Sequenzvergleich (siehe Anhang Abb.26) lassen keine Aussage darüber zu, ob es sich bei *Hydractinia* SOS eher um ein mögliches Homolog zu SOS1- oder SOS2-Proteinen anderer Organismen handelt. Auch ein BLAST mit *Hydractinia* SOS in NCBI zeigte Hits gleich hoher Qualität sowohl zu SOS1- als auch zu SOS2-Proteinen anderer Organismen.

NF1

In *Hydractinia* existiert ein mögliches NF1-Protein (siehe Anhang Abb.27). Das Protein wurde im Zuge einer BLAST-Analyse mit dem NF1 des Menschen (NCBI: GenBank: AAA59925) im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert. Eine phylogenetische Analyse erwies sich für NF1 als wenig praktikabel, da es so gut wie keine validierten NF1-Sequenzen anderer Organismen gibt.

In dem im Vergleich zu menschlichem NF1 um 191 Aminosäuren kürzeren *Hydractinia* NF1-Protein existieren die gleichen Domänen wie in menschlichem NF1-Protein. Es gibt eine „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPase_ACTIV2)-Domäne sowie eine „CRAL–TRIO lipid binding“ (CRAL_TRIO)-Domäne (Abb.31).

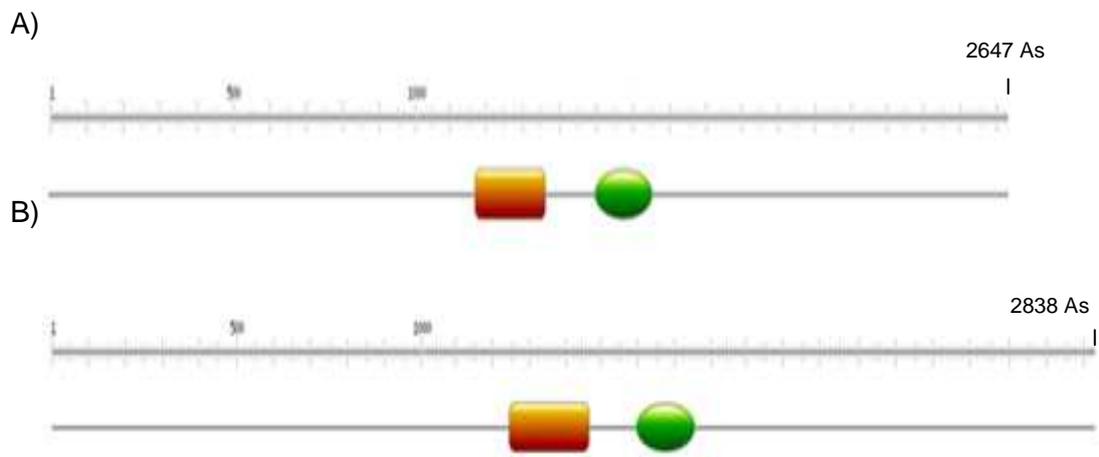


Abb.31 Konservierte Domänen in dem potenziellen *Hydractinia* NF1-Protein und in dem *Homo sapiens* NF1-Protein

In A und B ist in orange die „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPase_ACTIV2)-Domäne markiert. In grün ist die „CRAL–TRIO lipid binding“ (CRAL_TRIO)-Domäne markiert. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. A und B wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 2647 As langen *Hydractinia* NF1 Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.27) (As 1166-1358, 1494-1651).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 2838 As lange *Homo sapiens* NF1 Sequenz (NCBI: Gen Bank: AAA59925.1) (As1235-1451, 1580-1738).

Auf Aminosäure Ebene zeigte sich in einem Vergleich von *Hydractinia*, Maus, Mensch und einem möglichen *Hydra vulgaris* NF1-Protein, dass es innerhalb aber auch außerhalb der beschriebenen Domänen speziesübergreifend konservierte Sequenz-Bereiche gibt. Die „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPase_ACTIV2)-Domäne in Cnidarier NF1-Proteinen ist in

Hydractinia um 24 und in *Hydra vulgaris* um 23 Aminosäuren kürzer als in Vertebraten NF1 (siehe Anhang Abb.28).

RASA1 (GAP)

Ein *Hydractinia* RASA1 (oder auch GAP) (siehe Anhang Abb.29) konnte durch eine BLAST-Analyse mit dem RASA1 (GAP)-Protein des Menschen (NCBI Reference Sequence: NP_002881.1) im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert werden.

In einem Phylogramm bildet *Hydractinia* RASA1 zusammen mit einem „predicted“ RASA1 von *Hydra vulgaris* einen gemeinsamen Seitenast an der Basis eines Hauptastes (Abb.32).

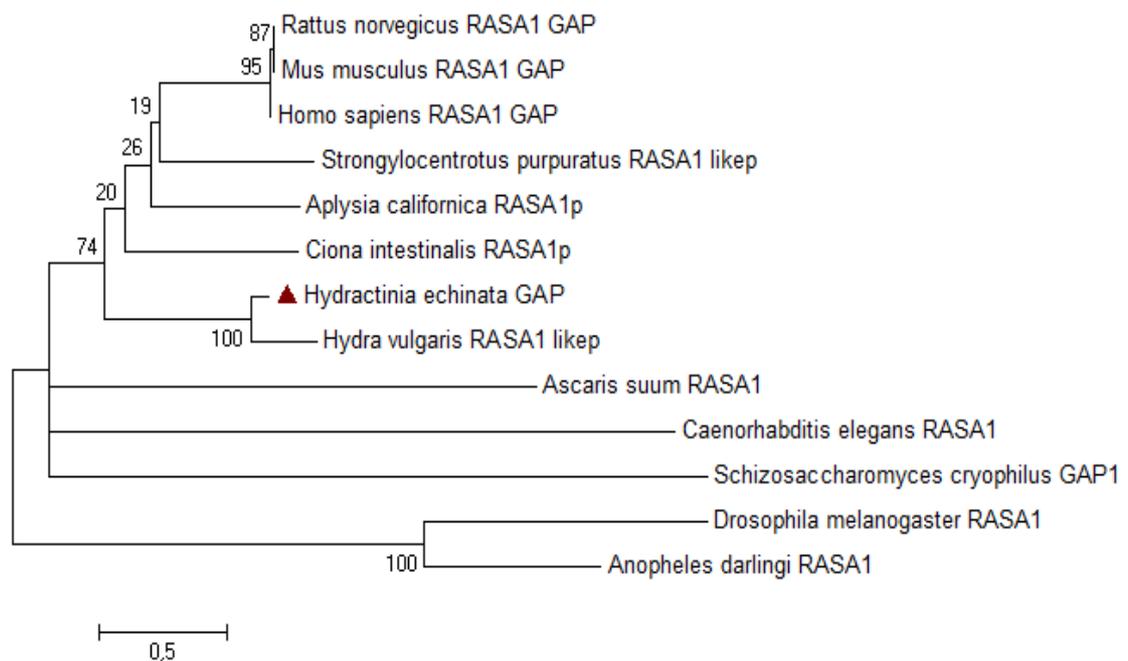


Abb.32 Phylogramm mit der *Hydractinia* RASA1-Aminosäure-Sequenz und RASA1-Aminosäure-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia RASA1 (GAP) (siehe Anhang Abb.29); *Homo sapiens* GAP (RASA1) NCBI Reference Sequence: NP_002881.1; RASA1 [*Rattus norvegicus*] NCBI Reference Sequence: NP_037267.1; RASA1 [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_663427.2; PREDICTED: RASA1 predicted [*Ciona intestinalis*] NCBI Reference Sequence: XP_002127238.1; RASA1-like predicted [*Strongylocentrotus purpuratus*] NCBI Reference Sequence: XP_781859.3; PREDICTED: RASA1 (GAP) [*Anopheles darlingi*] GenBank: ETN58852.1; RASA1 like, partial [*Hydra vulgaris*] NCBI Reference Sequence: XP_004211564.1; PREDICTED: RASA1-like [*Aplysia californica*] NCBI Reference Sequence: XP_005103165.1; GAP-1 [*Caenorhabditis elegans*] NCBI Reference Sequence: NP_508404.1; RASA 1 [*Ascaris suum*] GenBank: ERG84781.1; RASA1, isoform A [*Drosophila melanogaster*] GenBank: AAF50196.1; RASA1 GAP1 [*Schizosaccharomyces cryophilus*] GenBank: EPY54300.1. Nach einem Sequenzvergleich mit Muscle wurden die Sequenzen mit gblocks bearbeitet. Erhaltene Sequenzblöcke wurden in Mega5.2 mit folgenden Parametern phylogenetisch bearbeitet: Statistische Methode Maximum Likelihood; phylogenetischer Test Bootstrap method, bootstrap replications 1000; Model WAG (G+I).

In dem Hauptast gruppieren RASA1(GAP)-Proteine von Vertebraten, und „predicted“ Proteine des Urochordaten *Ciona intestinalis*, des Mollusken *Aplysia californica* und des Echinodermen *Strongylocentrotus purpuratus* in einzelnen Seitenästen. Einzelne Äste bilden RASA1(GAP) von *Ascaris suum*, GAP1 von *Caenorhabditis elegans*, GAP1 von Hefe und von Insekten (Abb.32).

In dem gegenüber menschlichem RASA1(GAP)-Protein um 127 Aminosäuren kürzeren *Hydractinia* RASA1(GAP) konnten die gleichen Protein-Domänen identifiziert werden. In *Hydractinia* RASA1(GAP) gibt es zwei „src homology 2“ (SH2)-Domänen, eine „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPASE_ACTIV_2)-Domäne, eine „src homology 3“ (SH3)-Domäne, eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne sowie eine „C2“ Domäne (Abb.33).

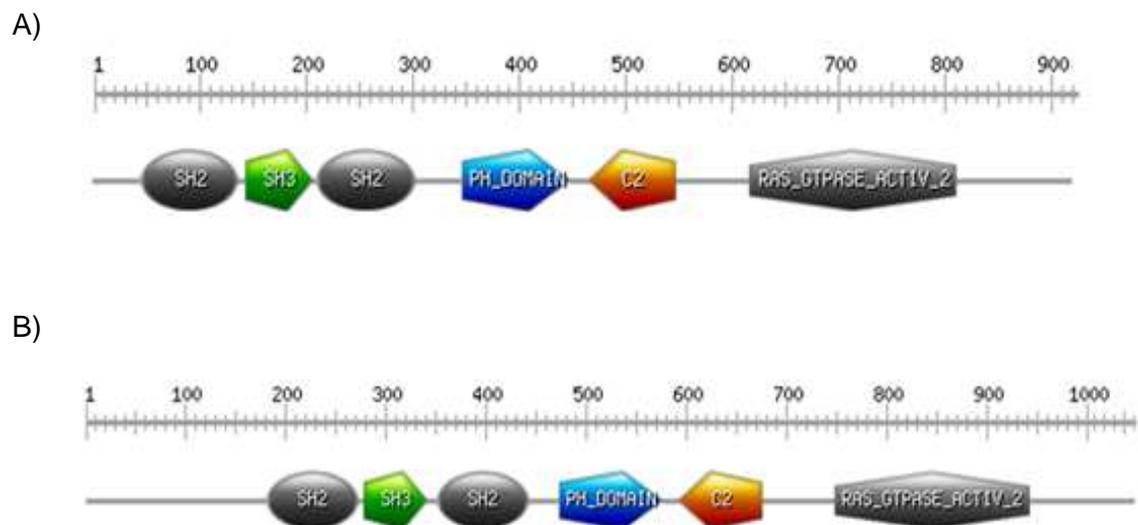


Abb.33 Konservierte Domänen in dem potenziellen *Hydractinia* RASA1-Protein und in dem RASA1-Protein des Menschen
 In A und B sind in grau sind die beiden „src homology 2“ (SH2)-Domänen sowie die „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPASE_ACTIV_2)-Domäne markiert. In grün ist die „src homology 3“ (SH3)-Domäne markiert. In blau ist die „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne gezeigt. In orange ist die „C2“-Domäne markiert. In Klammern ist im Folgenden jeweils die genaue Position der Domänen in dem jeweiligen Protein angegeben. Der obere Abschnitt der Grafik zeigt die Gesamtlänge der Proteine anhand der Positionszahlen in Aminosäuren. Die Abbildungen A und B wurden mit PROSITE erstellt.

A: Identifizierte Protein-Domänen in der 920 As langen *Hydractinia* Ras RASA1-Aminosäure-Sequenz (siehe Anhang Abb.29) (As 47-138, 145-207, 211-304, 349-450, 468-548, 619-813).

B: Identifizierte Protein-Domänen in der 1047 As langen *Homo sapiens* RASA1-Aminosäure-Sequenz (NCBI: NP_002881.1) (As 181-272, 279-341, 351-441, 474-577, 594-676, 748-942).

Ein Vergleich der *Hydractinia* RASA1(GAP)-Aminosäure-Sequenz mit RASA1 des Menschen und mit RASA1 der Maus zeigte sowohl innerhalb der beschriebenen Domänen, als auch in dazwischen liegenden Sequenzabschnitten zudem speziesübergreifend konservierte Sequenz-

Bereiche. Lediglich der N-terminale Bereich vor der ersten SH2-Domäne, der in *Hydractinia* wesentlich kürzer ausfällt, ist spezieübergreifend wenig konserviert (siehe Anhang Abb.30).

3.3 Expression von *Ras1*- und *Ras2*-mRNA in Entwicklungsstadien von *Hydractinia echinata*

Aus Vertebraten ist bekannt, dass alle vier Ras-Proteine nahezu ubiquitär exprimiert werden. Es wurden jedoch auch gewebespezifische und entwicklungsstadienspezifische qualitative und quantitative Unterschiede beschrieben (Karnoub et al., 2008). Nach in-situ-Analyse wird deutlich, dass *Hydractinia Ras1* und *Ras2* in allen untersuchten Lebensstadien auf mRNA-Ebene exprimiert werden.

In 24 Stunden alten Embryonen ist sowohl für die *Hydractinia Ras1* als auch die *Ras2*-mRNA neben einer ubiquitären Grundverteilung eine stärkere Expression im Ektoderm der Embryonen am anterioren Pol vorhanden (Abb.34 A und B). Die Expression ist am künftigen aboralen Pol des Embryos am stärksten und nimmt graduell zum oralen Pol ab. Die Expression von *Ras1*- und *Ras2*-mRNA ist in Embryonen in Zellen des Ektoderms weitaus stärker als eine schwache ubiquitäre Expression im Entoderm.

In 72 Stunden alten Planula-Larven sind sowohl *Ras1* als auch *Ras2* graduell exprimiert (Abb.34 C und D). Die Expression ist bei beiden *Ras* im Bereich des verdickten anterioren Endes der Planula-Larve stärker als im fast signalfreien posterioren Schwanz. Insgesamt wird aber auch in Larven eine ubiquitäre Expression beider *Ras*-mRNAs offensichtlich. Auch in Larven ist die Expression beider *Ras*-Gene in Zellen des Ektoderms stärker als im Entoderm. Der größte Teil der mRNA ist im Bereich der Basis der Ektoderm-Zellen detektierbar (Abb.34 E).

In Primär-Polypen (Abb.35) haben die Transkripte beider *Ras*-Gene ähnliche Verteilungsmuster. Es existiert eine ubiquitäre Grundexpression beider *Ras* im Bereich der gesamten Körpersäule in der Epidermis und schwach in der Gastrodermis. Im mittleren Bereich der Körpersäule und im Bereich der Basalscheibe eines Primär-Polypen gibt es Bereiche stärkerer Expression (Abb.35 A und B). Die Lokalisation beider *Ras*-Transkripte in der Epidermis wird in Tentakeln der Primär-Polypen besonders deutlich. Hier scheint die durch die Mesogloea von der Epidermis getrennte Gastrodermis weitgehend frei von *Ras1*- und *Ras2*-mRNA zu sein (Abb.35 C und D).



Abb.34 Lokalisation von *Hydractinia Ras1*- und *Ras2*-mRNA-Transkripten in 24 Stunden alten Embryonen und 72 Stunden alten Planula-Larven

A: *Ras1*-mRNA zeigt sich ubiquitär vor allem in Zellen des Ektoderms, mit einer polaren Komponente im Ektoderm am anterioren Pol eines 24 Stunden alten Embryo.

B: Das für A beschriebene Expressionsmuster für *Ras1*-mRNA zeigt sich vergleichbar auch für *Ras2* in einem 24 Stunden alten Embryo.

C: und **D:** Aus Einzelbildern zusammengefügtes Gesamtbild einer 72 Stunden alten Larve. Die Expression von *Ras1*-(**C**) und *Ras2*-(**D**) mRNA zeigt sich in der Larve ubiquitär verteilt vor allem im Ektoderm. Es gibt sowohl bei der Expression von *Ras1*- als auch *Ras2*-mRNA einen Gradienten, der vom anterioren verdickten Ende der Larve zum posterioren Ende hin abnimmt.

E: *Ras1*- und *Ras2*-mRNA ist in der Larve besonders in Zellen des Ektoderms an der Grenze zur Mesogloea (roter Pfeil) hin vorhanden (hier für *Ras1* gezeigt). Das räumliche Expressionsmuster ist mit *Ras2* vergleichbar.

Der Maßstab in A und B entspricht 50 µm, der von C und D 100 µm. Der Maßstab in E entspricht 20 µm. Für die Aufnahmen A, B, C und D wurde das 20x/0,8 Plan Achromat Objektiv verwendet. Für die Aufnahme E wurde das LD C-Apochromat 40x/1.1 WKorr UV VIS IR Objektiv benutzt.

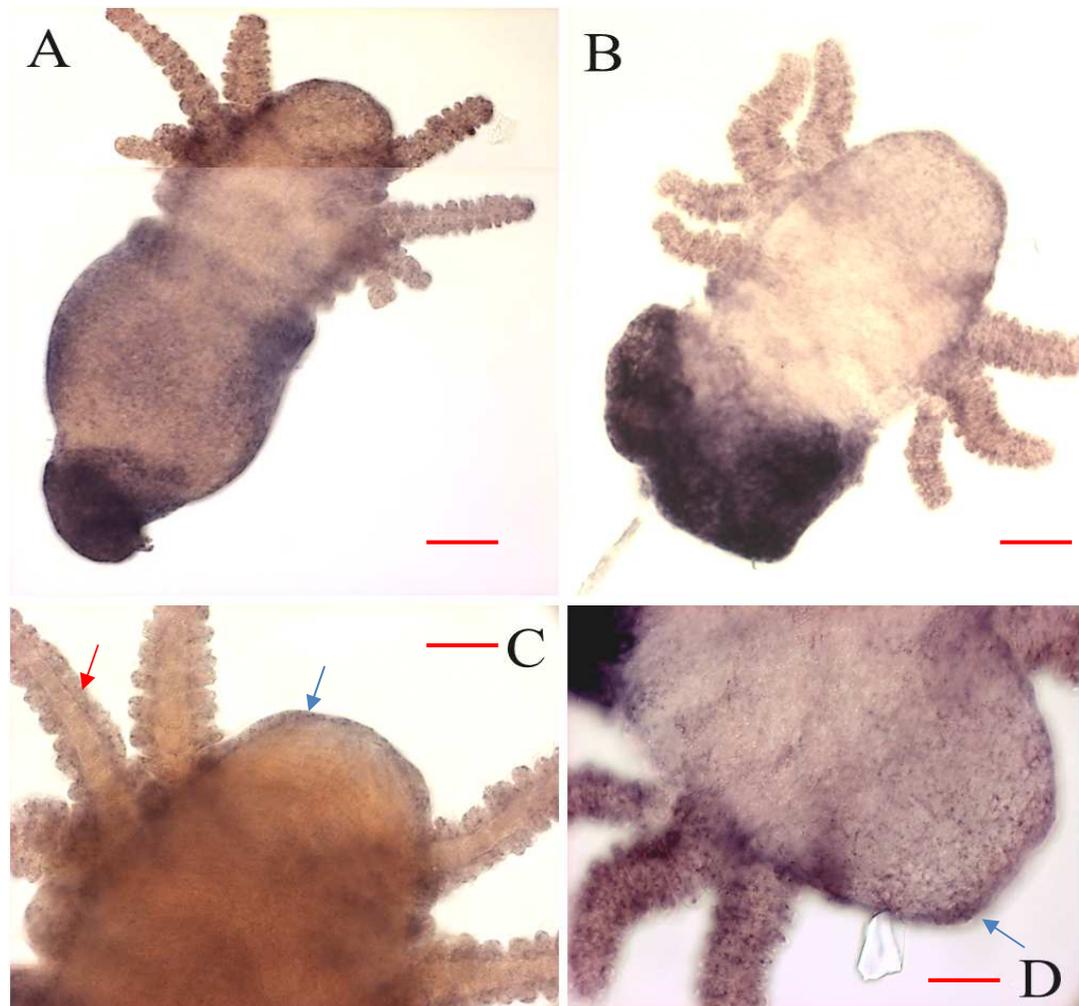


Abb.35 Lokalisation von *Hydractinia Ras1*- und *Ras2*-mRNA-Transkripten in Primär-Polypen

A: *Ras1*-mRNA Expressionsmuster in einem Primär-Polypen. Das Bild wurde aus zwei Einzelbildern zusammengefügt.

B: *Ras2*-mRNA Expressionsmuster in einem Primär-Polypen. In Primär-Polypen A und B zeigt sich ein vergleichbares, ubiquitäres Muster der Expression von *Ras1*- und *Ras2*-mRNA, mit starker Expression in der Epidermis und schwacher Expression in der Gastrodermis. Im Bereich der Basalscheibe der Primär-Polypen gibt es eine Zone starker mRNA-Expression. Allerdings gibt es in diesem Bereich auch unspezifische Signale an der Schnittfläche.

C und D: Im Bereich der Tentakel gibt es eine starke Expression von *Ras1*- (C) und *Ras2*- (D) mRNA in Zellen der Epidermis. Die durch die Mesogloea (roter Pfeil) von der Epidermis getrennte Gastrodermis zeigt wenig Expression von *Ras1* und *Ras2*. Diese Beobachtung gilt für beide *Ras*-Gene und ist hier am Beispiel von *Ras1* (C) gezeigt. Im Bereich der Epidermis gibt es am Hypostom sowohl *Ras1*(C) als auch *Ras2* (D) Expression (blauer Pfeil).

Der Maßstab in A und B entspricht 50 μm . Der Maßstab in C und D entspricht 20 μm . Für die Aufnahmen A und B wurde das 20x/0,8 Plan Apochromat Objektiv verwendet. Für die Aufnahmen C und D wurde das LD C-Apochromat 40x/1.1 WKorr UV VIS IR Objektiv verwendet.

Transkripte beider *Ras*-Gene sind in adulten Gastrozoiden ubiquitär im Bereich der Körpersäule exprimiert (Abb.36). Die Expressionsstärke ist in der Gastrodermis wesentlich geringer als in der Epidermis. Im Bereich der Körpersäule gibt es mittig unterhalb der Tentakelzone einen Gürtel epidermaler Zellen, in denen sowohl *Ras1*- als auch *Ras2*-mRNA besonders stark exprimiert sind. Oberhalb dieses Gürtels stark exprimierender epidermaler Zellen existiert ein Bereich schwächerer Expression. Auch unterhalb des Gürtels ist je nach Lage des apico-basalen Schnitts, mit dem der Gastrozoid von der Kolonie getrennt wurde, ein Bereich schwächerer Expression beider *Ras*-Gene zu erkennen. Vom Tentakelansatz bis zum Hypostom ist die *Ras1*- oder *Ras2*-Expression erneut stärker (Abb.36 A, B, E und F). In Tentakeln zeigt sich sowohl für *Ras1* als auch *Ras2* ein Verteilungsgradient in der Epidermis. Die Expression von *Ras1*- und *Ras2*-mRNA nimmt von der Basis der Tentakel zur Spitze hin ab (Abb.36 C und D).

In männlichen und weiblichen Gonozoiden existiert für beide *Hydractinia Ras* ein ähnliches mRNA-Expressionsmuster (Abb.37 A und B). Entlang der Körpersäule ist die Expression von mRNA ubiquitär, mit starker Expression in der Epidermis und schwacher Expression in der Gastrodermis (Abb.37 C und D). In der Körpersäule gibt es einen Bereich stärkerer Expression. Dieser ist als Gürtel stark exprimierender Epidermiszellen zu erkennen und ist bei beiden *Hydractinia Ras* und sowohl in weiblichen als auch in männlichen Gonozoiden im Bereich der Gonophorenknospen lokalisiert (Abb.37 A und B; roter Pfeil). Im Bereich der Gonophoren werden beide *Hydractinia Ras* sowohl in weiblichen als auch in männlichen Gonophorenknospen in epidermalen Zellen transkribiert (Abb.37 D). Auch im Kopfbereich der Gonozoiden zeigt sich in der Epidermis der stark verkürzten Gonozoid-Tentakel *Ras1*- und *Ras2*-mRNA Expression (Abb.37 A und B; blauer Pfeil).

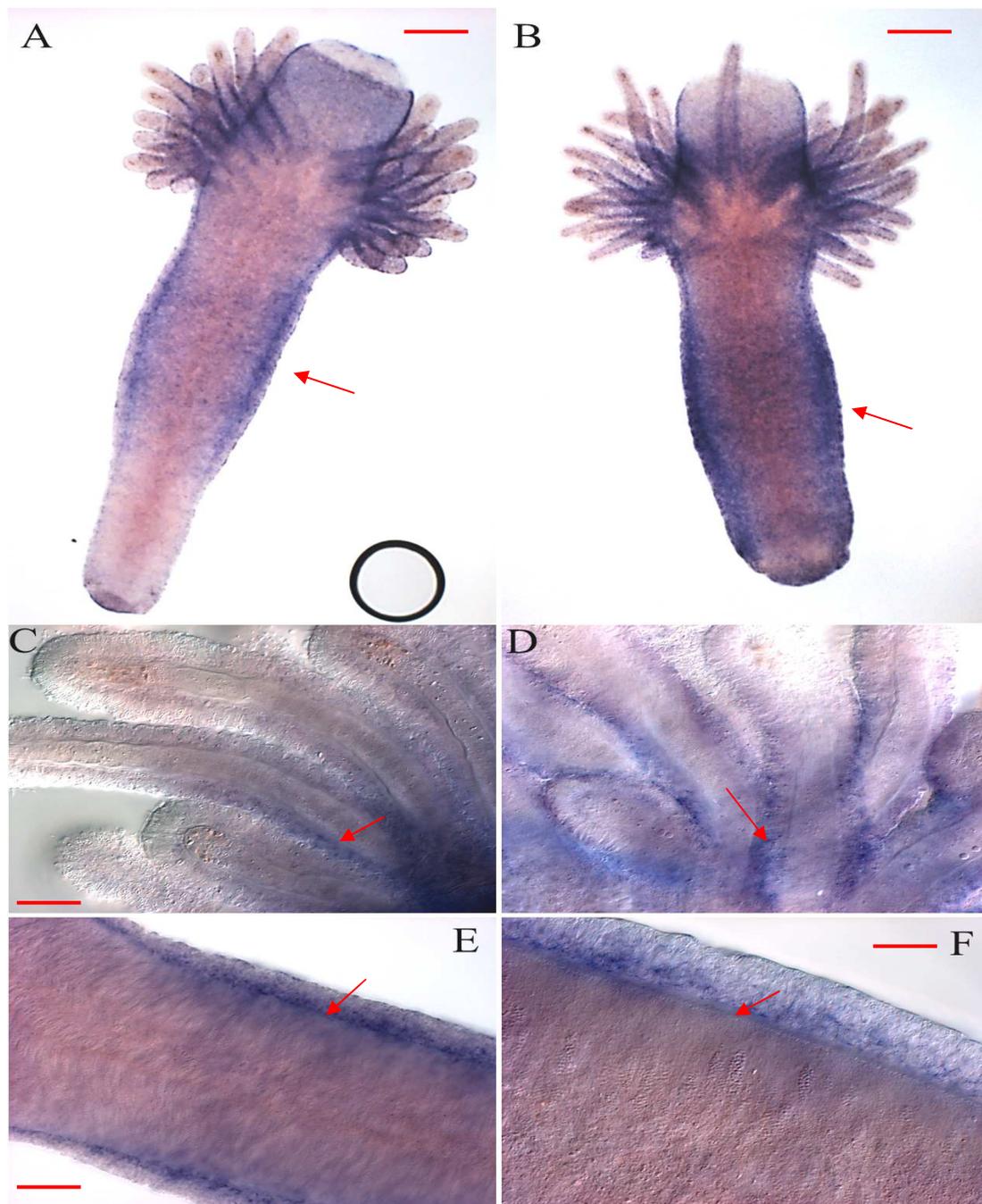


Abb.36 Lokalisation von *Hydractinia Ras1*- und *Ras2*-mRNA-Transkripten in Gastrozoiden

A und B: Das Expressionsmuster von *Ras1*- (A) und *Ras2* (B)-mRNA ist in Gastrozoiden vergleichbar. Beide sind ubiquitär entlang der Körpersäule epidermal stark und gastrodermal schwach exprimiert. Mittig im Bereich der Körpersäule gibt es einen Bereich starker Expression (roter Pfeil A und B).

C und D: Sowohl *Ras1*- (C) als auch *Ras2*-mRNA (D) kann in Tentakeln in der Epidermis gezeigt werden. Hierbei gibt es einen deutlich abnehmenden Gradienten von der Basis der Tentakel hin zur Spitze. Das gastrodermale Gewebe, das durch die Mesogloea (Roter Pfeil) von der Epidermis getrennt ist, scheint sowohl *Ras1*- als auch *Ras2*-mRNA frei zu sein.

E und F: Im Bereich der Körpersäule gibt es eine starke Expression von *Ras1*-(E)- und *Ras2*-(F)-mRNA in Zellen der Epidermis. Hier wird deutlich, dass die mRNA in Epidermiszellen an der Basis der Zellen zur Mesogloea (roter Pfeil) hin konzentriert vorliegt. Der Maßstab in A und B entspricht 50 μm . Der Maßstab in C gilt auch für D und entspricht 25 μm . Der Maßstab in E entspricht 20 μm , der in F 10 μm . Die Aufnahmen A und B wurden mit dem 10x Objektiv erzeugt. Für C, D und F wurde das LD C-Apochromat 40x/1.1 WKorr UV VIS IR Objektiv verwendet. Für E wurde das 20x/0,8 Plan Apochromat Objektiv verwendet.

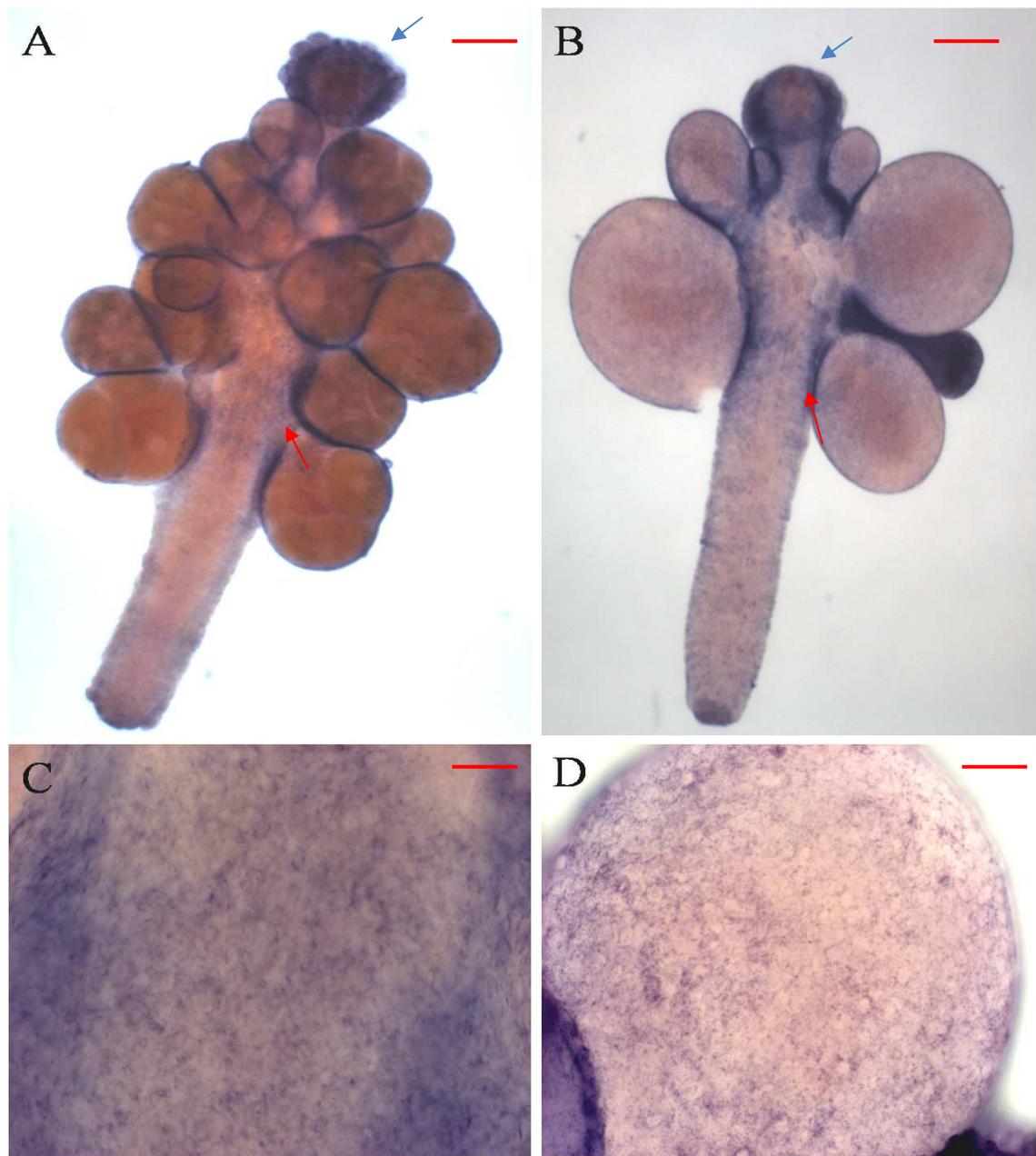


Abb.37 Lokalisation von *Hydractinia Ras1*- und *Ras2*-mRNA-Transkripten in Gonozoiden

A: *Hydractinia Ras1*-mRNA-Expression in einem weiblichen Gonozoid.

B: *Hydractinia Ras2*-mRNA-Expression in einem männlichen Gonozoid. Beide *Hydractinia Ras*-Transkripte sind in männlichen und weiblichen Gastrozoiden ubiquitär exprimiert. Im Bereich der Körpersäule am Ansatz der Gonophoren beginnt eine Zone starker Expression (roter Pfeil). Im Bereich des Kopfes in den verkürzten Tentakeln ist die Expression ebenfalls verstärkt.

C: Starke Expression von *Ras1*-mRNA in epidermalen Zellen und schwache Expression in gastrodermalen Zellen im Bereich der Körpersäule eines weiblichen Gonozoiden.

D: Die Expression von *Ras2*-mRNA in der Epidermis einer männlichen Gonophorenkapsel. Das Expressionsmuster ist sowohl in männlichen als auch weiblichen Gonozoiden für *Hydractinia Ras1* und *Ras2* vergleichbar. Aus diesem Grund ist hier nur jeweils das *Hydractinia Ras1*- und *Ras2*-mRNA-Expressionsmuster in einem weiblichen und ein männlichen Gonozoid gezeigt.

Der Maßstab in A und B entspricht 50 μm . Der Maßstab in C und D entspricht 20 μm . Für die Aufnahmen A und B wurde das 10x Objektiv verwendet. Für C, D wurde das LD C-Apochromat 40x/1.1 WKorr UV VIS IR Objektiv verwendet.

3.4 „in vivo“ Analyse von *Hydractinia echinata* Ras1 und Ras2

Die Funktion beider *Hydractinia* Ras-Proteine ist anhand der Expressions-Muster nicht zu erraten (3.3). Die Recherchen zu Ras gesteuerten Signalwegen in *Hydractinia* (3.2) legen jedoch nahe, dass aus höheren Organismen bekannte, charakterisierte Ras-Signalwege auch in *Hydractinia* vorhanden sind. Um die Funktion der identifizierten Ras-Proteine in *Hydractinia* verstehen zu können, wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Durch „knock down“ mittels RNAi wurde versucht, die Expression von Ras1- und Ras2 in *Hydractinia* zu unterdrücken.
2. Es wurde untersucht wie sich eine Überexpression oder eine Missexpression von Wildtyp-Ras1 oder -Ras2 in *Hydractinia* auswirkt. Mit einer Missexpression ist in diesem Zusammenhang eine vermehrte Expression von *Ras* im Gastroderm gemeint, da die in-situ-Hybridisierung eine relativ schwache Expression im Entoderm/Gastroderm gezeigt hat. Durch Injektion ApaI verdauter AktinII-Promotor-GFPRas1-AktinII-Terminator- oder AktinII-Promotor-GFPRas2-AktinII-Terminator-Fragmente, wurden Transgene erzeugt. Transgene wurden dann auf mögliche, durch die Expression der Fusionsproteine, hervorgerufene Effekte hin untersucht.
3. Da die Signalweiterleitung von Ras-Proteinen jedoch auf Proteinebene reguliert ist, bleibt eine reine Überexpression von Wildtyp-Ras in *Hydractinia* unter Umständen wirkungslos. Aus diesem Grund wurden *Hydractinia* Ras1 und Ras2, in den zuvor erzeugten Wildtyp-Ras-Konstrukten mutagenisiert. Aus anderen Organismen sind charakteristische Aminosäure-Austausche in Ras-Proteinen bekannt, die eine konstitutive Aktivierung der Proteine zur Folge haben (Der et al., 1982; Fernandez-Medarde et al., 2011). Eine Mutagenese in *Hydractinia* Ras sollte zeigen ob Austausch eben dieser Aminosäuren auch in *Hydractinia* Ras-Proteinen eine konstitutive Aktivierung zur Folge haben. Durch Injektion, ApaI verdauter, mutagenisierter AktinII-Promotor-GFPRas1-AktinII-Terminator- oder AktinII-Promotor-GFPRas2-AktinII-Terminator-Fragmente wurden transgene *Hydractinia* Kolonien erzeugt. Diese Transgene wurden auf phänotypische Veränderungen hin untersucht.
4. In Tieren mit modulierter Ras-Signalweiterleitung wurde die Zellproliferation untersucht. Zudem wurden in diesen Tieren Transkriptionsmuster untersucht, zum einen, was die Kopplung von Ras und Wnt-Signalweg betrifft und zum anderen welchen Einfluss die Modulation auf das Gesamt-Transkriptom nimmt.

3.4.1 dsRNAi

Befruchtete *Hydractinia* Embryonen wurden in unabhängigen Versuchsansätzen mit doppelsträngiger *Hydractinia Ras1*- beziehungsweise *Ras2*-RNA behandelt, wobei dsRNA mit einer Konzentration von 80 ng/μl injiziert wurde. In einem weiteren Versuchsansatz wurden befruchtete Ein- und Zweizellstadien in 80 ng/μl dsRNA für 24 Stunden inkubiert. Um alleine durch dsRNA-Inkubation beziehungsweise Injektion hervorgerufene *Hydractinia Ras1*-dsRNA und *Ras2*-dsRNA unabhängige Effekte ausschließen zu können, wurde als Kontrolle eine Plasmid-(pUC)dsRNA parallel injiziert oder inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Ansatz unbehandelt in Seewasser mitgeführt. Weder eine Inkubation noch eine Injektion von *Hydractinia Ras1*- oder *Ras2*-dsRNA hatte eine signifikante Auswirkung auf die Entwicklung von *Hydractinia* Embryonen, Planula-Larven oder Polypen (Tab.28 und 29). Im Vergleich zu pUC-dsRNA injizierten oder inkubierten Tieren gab es nach Injektion beziehungsweise Inkubation mit *Hydractinia Ras1*- oder *Ras2*-dsRNA keine Unterschiede in der Überlebensrate. Lediglich bei völlig unbehandelten Embryonen fiel diese höher aus. Offensichtlich haben hohe Konzentrationen von dsRNA eine toxische Wirkung auf *Hydractinia* Embryonen (Tab.28 und 29).

Befruchtete Einzellstadien inkubiert mit 80 ng/μl dsRNA	pUC-dsRNA	<i>Ras1</i> -dsRNA	<i>Ras2</i> -dsRNA	Seewasser Kontrolle
Anteil überlebender Embryonen nach 24 Stunden Inkubation	63% von 30 Embryonen	56% von 30 Embryonen	66% von 30 Embryonen	86% von 30 Embryonen

Tab.28 Anteil überlebender *Hydractinia* Embryonen nach 24 Stunden Inkubation in 80 ng/μl dsRNA

Dargestellt sind % Werte überlebender Embryonen 24 Stunden nach der Inkubation mit *Ras1*-, *Ras2*- oder pUC-dsRNA sowie die Seewasser Kontrolle.

Befruchtete Einzellstadien injiziert mit 80 ng/μl dsRNA	pUC-dsRNA	<i>Ras1</i> -dsRNA	<i>Ras2</i> -dsRNA	Seewasser Kontrolle
Anteil überlebender Embryonen 24 Stunden nach Injektion	14% von 88 Embryonen	19% von 57 Embryonen	25% von 51 Embryonen	86% von 30 Embryonen

Tab.29 Anteil überlebender *Hydractinia* Embryonen 24 Stunden nach Injektion von 80 ng/μl dsRNA

Dargestellt sind % Werte überlebender Embryonen 24 Stunden nach der Injektion von *Ras1*-, *Ras2*- oder pUC-dsRNA sowie die Seewasser-Kontrolle.

Bei überlebenden injizierten und inkubierten Embryonen konnten im Verlauf der Embryonalentwicklung, im Larvenstadium und auch nach ausgelöster Metamorphose keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren beobachtet werden. Duffy et al. beschreiben, dass die Inkubation von *Hydractinia* Embryonen mit *Hydractinia* TCF-dsRNA eine phänotypische Veränderung zur Folge hat (Duffy et al., 2010). Aus diesem Grund wurde die Wirksamkeit des experimentellen Vorgehens in Wiederholungsversuchen unter Einbeziehung einer Positivkontrolle überprüft. Dazu wurde nach Duffy et al. eine entsprechende dsRNA von TCF hergestellt und eingesetzt. Es wurden, wie von Duffy beschrieben, 36 Stunden alte Embryonen mit 80 ng/μl TCF-dsRNA in Seewasser für 15 Stunden behandelt. Nach Auslösen der Metamorphose wurde erneut für 24 Stunden in 80 ng/μl TCF-dsRNA inkubiert. Duffy hat beschrieben, dass eine solche Behandlung mit TCF-dsRNA phänotypisch zu fehlentwickelten Primär-Polypen führt. Er konnte zeigen, dass bei zirka 30% der behandelten Primär-Polypen entweder Stolone oder Tentakel nicht richtig ausgebildet waren. Das entsprechende Experiment wurde im Verlauf dieser Arbeit zweimal durchgeführt, wobei jedoch in keinem Fall die von Duffy beschriebenen Phänotypen beobachtet werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein funktioneller „knock down“ der *Ras*-Gene erzielt werden.

3.4.2 Überexpression/Missexpression von Wildtyp-Ras1 oder -Ras2 in *Hydractinia echinata*

Für die Überexpression beziehungsweise Missexpression unter dem ubiquitär aktiven AktinII-Promotor von *Hydractinia* wurde Ras1 oder Ras2 C-terminal an GFP fusioniert. Diese Positionierung von *Ras* innerhalb des modifizierten Ursprungs-Konstrukts (pAct-II:51Act-eGFP, Künzel et al., 2010) gewährleistet, dass das C-terminale Ras „CAAX“-Motiv nicht durch GFP blockiert ist. Erzeugte Ras1(HeAktIIGFPRas1)- und Ras2(HeAktIIGFPRas2)-Konstrukte (Abb.38) wurden durch Sequenzierungen verifiziert. Unter Einsatz der flankierenden Primer KSEndApaI fwd. und KSSStartApaI rev. (Tab.3) wurde das gesamte Transgen-Insert aus den in Abb.38 gezeigten Konstrukten, bestehend aus AktinII-Promotor, GFP-Ras-Fusionsprotein und AktinII-Terminatorregion, amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden mit ApaI restringiert, da sich gezeigt hat, dass Fragmente mit überstehenden Enden die beste Effizienz bei der Erzeugung transgener Tiere erzielen.

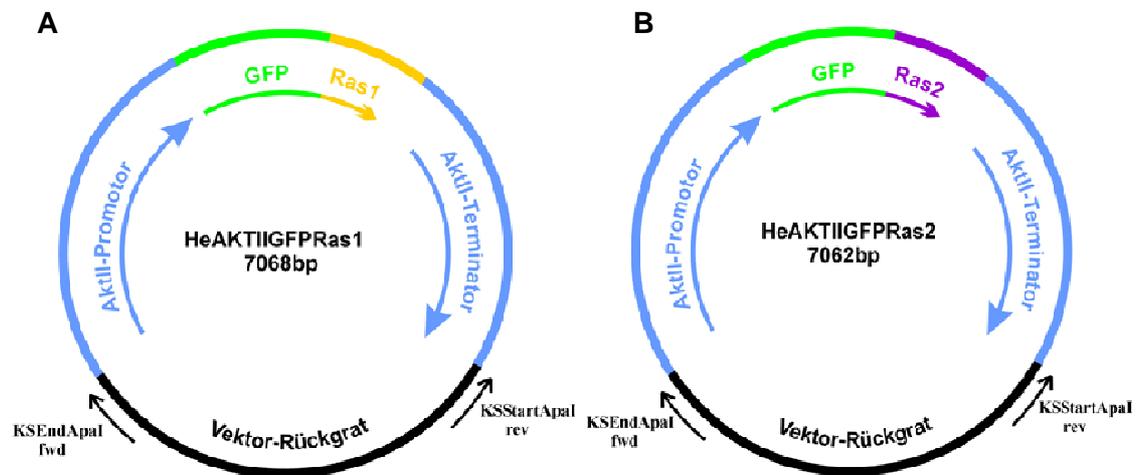


Abb.38 Erzeugte Ras1- und Ras2-Konstrukte

In blau dargestellt ist die AktinII(AktII)-Terminatorregion und die AktII-Promotorregion. In schwarz abgebildet ist das Vektor-Rückgrat des Ursprungsvektors. In grün dargestellt ist GFP. In gelb in A ist Ras1 und in lila in B ist Ras2 von *Hydractinia* markiert.

A: Plasmidkarte von HeAktIIGFPRas1.

B: Plasmidkarte von HeAktIIGFPRas2.

Um zu überprüfen, ob die Expression von einem GFPRas1- oder GFPRas2-Fusionsprotein unter einem AktinII Promotor in *Hydractinia* zu einer phänotypischen Veränderung führt, wurden Embryonen mit Fragmenten von HeAktIIGFPRas1- und HeAktIIGFPRas2-Konstrukten injiziert. Nach Injektion von HeAktIIGFPRas1-Fragmenten konnten sowohl in Embryonen als auch in Larven keine phänotypischen Veränderungen beobachtet werden (nicht gezeigt).

Auch einen Monat nach der Metamorphose entsprachen die derart erzeugten Kolonien von ihrem Aussehen und Verhalten her dem Wildtyp (Abb.39). GFPRas1-Fluoreszenz konnte in transgenen Zellen beobachtet werden, die mosaikartig mit nicht-transgenen Zellen in den Tieren auftraten.

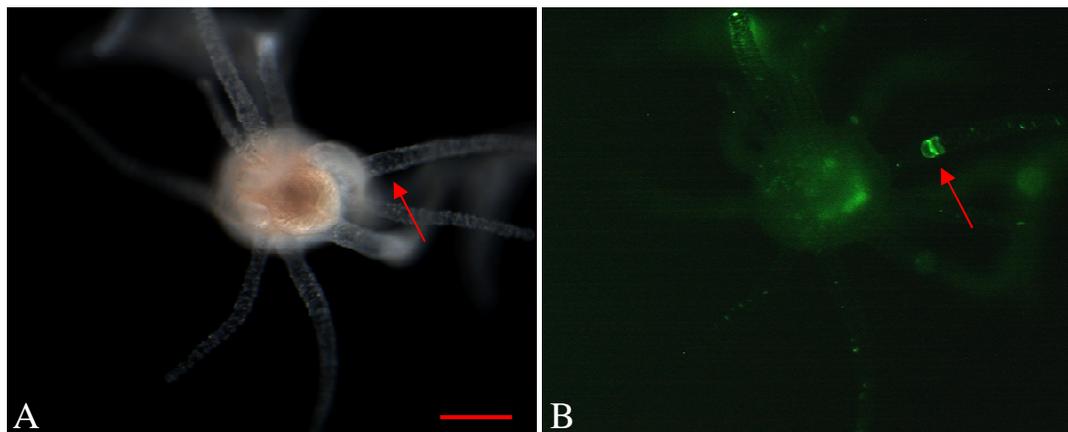


Abb.39 Transgener GFPRas1-Gastrozoid

A: Transgener GFPRas1-Gastrozoid im Hellfeld.

B: Fluoreszenz von GFPRas1 ist in dem in A abgebildeten Gastrozoiden vor allem in einem Tentakel erkennbar (roter Pfeil A und B). Der Maßstabbalken in A entspricht 75 μm .

Nachdem Embryonen mit HeAktIIGFPRas2-Fragmenten injiziert wurden, konnten auch hier analog zu der Injektion mit HeAktIIGFPRas1-Fragmenten sowohl in Embryonen, Larven (nicht gezeigt) sowie nach der Metamorphose keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb.40).

Auch in transgenen GFPRas2-Kolonien konnte GFPRas2-Fluoreszenz in transgenen Zellen beobachtet werden, die mosaikartig mit nicht-transgenen Zellen in den Tieren auftraten.

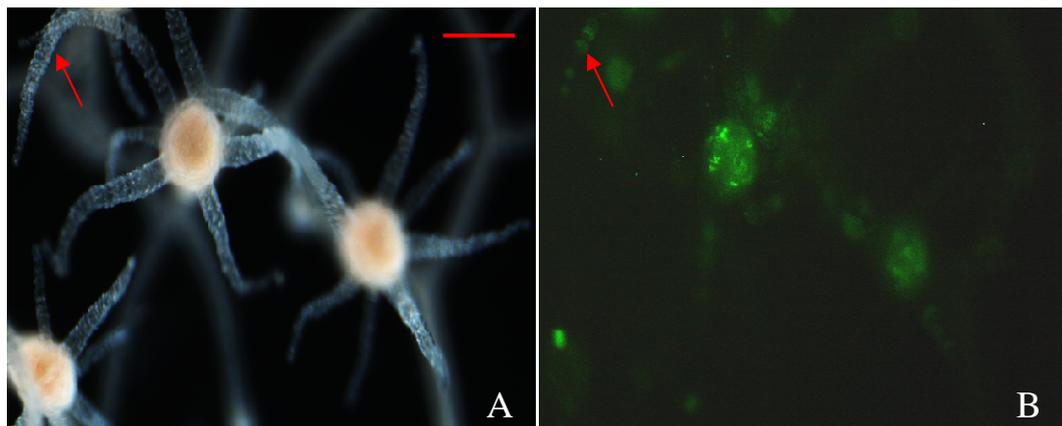


Abb.40 Transgener GFPRas2-Gastrozoid

A: Transgener GFPRas2-Gastrozoid im Hellfeld.

B: Fluoreszenz von GFPRas2 ist in dem in A abgebildeten Gastrozoiden vor allem in einem Tentakel erkennbar (roter Pfeil, A und B).

Der Maßstabbalken in A entspricht 100 μm

3.4.3 Mutagenisiertes Ras1 oder Ras2 in *Hydractinia echinata*

In der Literatur ist beschrieben, dass der Austausch von Aminosäuren in „klassischen“ N-, H- und K-Ras, aber auch in TC21(RRas2)-Proteinen, dazu führen kann, dass diese konstitutiv aktiviert werden (Bos 1989; Graham et al., 1994; Movilla et al., 1999; Prior et al., 2012; Larive et al., 2012). Konstitutiv aktivierende Mutationen betreffen insbesondere die Aminosäuren Glycin(G12) und Glutamin(Q61) in H-, N- und K-Ras, sowie vergleichbare Aminosäuren in RRas2(TC21) (Graham et al., 1994; Movilla et al., 1999; Schubbert et al., 2007) (Abb.41). Aminosäure-Austausche an dieser Position haben zur Folge, dass membranlokalisierte, durch GTP-Bindung aktivierte Ras- und RRas2(TC21)-Proteine nicht in ihre inaktive GDP-gebundene Form überführt werden können (Pai et al., 1989; Bos et al., 1989; Graham et al., 1994). Veränderungen dieser Aminosäuren führen dazu, dass die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras unterbunden wird oder bewirken, dass „GTPase aktivierende Proteine“ (GAP) die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras nicht stimulieren können (Schubbert et al., 2007). GTP-gebundene konstitutiv aktivierte Ras- oder RRas2(TC21)-Proteine stimulieren fortan nachgeschaltete Signalwege. Mutierte Formen von Ras-Proteinen konnten in unterschiedlichen menschlichen Tumoren identifiziert werden (Bos et al., 1989). Dies ist der Grund dafür, dass Ras-Mutationen im Menschen besonders gut untersucht sind. Punktmutationen in „klassischen“ *Ras*-Genen, die die Aminosäure Glycin(G12) oder Glutamin(Q61) (Abb.41) zu Valin ändern, resultieren in konstitutiv aktiviertem Ras. Ein Austausch entsprechender Aminosäuren in TC21-Proteinen führt auch hier zu einer konstitutiven Aktivierung (Graham et al., 1994). Ras(G12V) Aminosäure-Austausche konnten in unterschiedlichen menschlichen Tumoren identifiziert werden (Fernandez-Medarde et al., 2011). Von einem Ras(Q61V)-Austausch ist bekannt, dass dieser dazu führt, dass nach Transformation NIH 3T3 Zellen besonders effizient Zell-Foci bilden (Der et al., 1986). Die beschriebenen Aminosäuren existieren auch in beiden *Hydractinia* Ras in konservierter Form (Abb.41).

<i>H.sapiens</i>	NRas	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	NRas	DTAGQ	61
<i>H.sapiens</i>	HRas	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	HRas	DTAGQ	61
<i>H.sapiens</i>	KRasA	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	KRasA	DTAGQ	61
<i>H.sapiens</i>	KRasB	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	KRasB	DTAGQ	61
<i>H.vulgaris</i>	Ras1	VVVGAG	18	<i>H.vulgaris</i>	Ras1	DTAGQ	67
<i>H.echinata</i>	Ras1	VVVGAG	18	<i>H.echinata</i>	Ras1	DTAGQ	67
<i>H.vulgaris</i>	Ras2	VVVGGG	17	<i>H.vulgaris</i>	Ras2	DTAGQ	66
<i>H.echinata</i>	Ras2	VVVGGG	18	<i>H.echinata</i>	Ras2	DTAGQ	67
<i>H.sapiens</i>	TC21	VVVGGG	23	<i>H.sapiens</i>	TC21	DTAGQ	72

Abb.41 Vergleich charakteristischer Aminosäuren in "klassischen" H-, K- und N-Ras- sowie RRas2(TC21)-Sequenzen des Menschen mit entsprechenden Sequenzabschnitten von Cnidarier Ras-Sequenzen

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich (Abb.6) im Bereich der Domänen G1 und G3. In türkis und grau hinterlegt sind Aminosäuren, deren Mutation in menschlichen Ras-Proteinen eine konstitutive Aktivierung von Ras zur Folge hat (Schubbert et al., 2007). Speziesübergreifend wurden vergleichbare Aminosäuren in *Hydractinia* und *Hydra vulgaris* Ras1- und Ras2-Sequenzen gleichfarbig hinterlegt.

Zur Untersuchung einer möglichen funktionellen Konservierung der hier beschriebenen Cnidarier Ras-Proteine und insbesondere der essentiellen Sequenzpositionen wurden diese mutagenisiert. In *Hydractinia* Ras1 oder Ras2 wurden über Mutagenese-Oligonukleotide Punktmutationen eingeführt, die entweder das Glycin(G18) oder das Glutamin(Q67) jeweils gegen Valin austauschten (Abb.42).

<i>H.sapiens</i>	NRas	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	NRas	DTAGQ	61
<i>H.sapiens</i>	HRas	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	HRas	DTAGQ	61
<i>H.sapiens</i>	KRasA	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	KRasA	DTAGQ	61
<i>H.sapiens</i>	KRasB	VVVGAG	12	<i>H.sapiens</i>	KRasB	DTAGQ	61
<i>H.vulgaris</i>	Ras1	VVVGAG	18	<i>H.vulgaris</i>	Ras1	DTAGQ	67
<i>H.echinata</i>	Ras1	VVVGAV	18	<i>H.echinata</i>	Ras1	DTAGV	67
<i>H.vulgaris</i>	Ras2	VVVGGG	17	<i>H.vulgaris</i>	Ras2	DTAGQ	66
<i>H.echinata</i>	Ras2	VVVGGV	18	<i>H.echinata</i>	Ras2	DTAGV	67
<i>H.sapiens</i>	TC21	VVVGGG	23	<i>H.sapiens</i>	TC21	DTAGQ	72

Abb.42 Durch Punktmutationen hervorgerufene Aminosäure-Austausche in *Hydractinia* Ras1 oder Ras2

Die Abbildung ist an Abb.6 angelehnt. Rot markiert sind aus Punktmutationen resultierende Aminosäure-Austausche in *Hydractinia* Ras1 oder Ras2.

<i>Hydractinia echinata</i>	Ras1	Ras1	Ras2	Ras2
Erzeugtes Konstrukt (siehe Anhang Abb.31)	HeAktIIGFPRas1 (G18V)	HeAktIIGFPRas1 (Q67V)	HeAktIIGFPRas2 (G18V)	HeAktIIGFPRas2 (Q67V)
verwendete mutagenese Oligonukleotid-Kombination (Tab.1)	Ras1mut18fwd und Ras1mut18rev	Ras1mut67fwd und Ras1mut67rev	RasmutGLYzu- VAL18fwd und RasmutGlyzu- Val18rev	RasMutGLYzu- VAL67fwd und RasMutGLYzu- VAL67rev

Tab.30 Konstrukte in denen *Hydractinia* Ras1 oder Ras2 an Aminosäure Position (G18V) oder (Q67V) verändert sind
Dargestellt sind die Bezeichnung der *Hydractinia* Ras1- und Ras2-Konstrukte sowie die verwendeten mutagenisierenden Oligonukleotide.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Transgenen (3.4.2), die Wildtyp-Ras1 oder -Ras2 unter der Kontrolle eines AktinII-Promotors als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GFP exprimierten, zeigte sich nach Injektion von amplifizierten Fragmenten aus Konstrukten mit mutagenisiertem Ras1 oder Ras2 (Tab.30), dass eine Überexpression von mutagenisiertem Ras1 oder Ras2 als Fusionsprotein mit N-terminalem GFP zu phänotypischen Veränderungen in *Hydractinia* führt.

3.4.3.1 Expression von mutagenisiertem Ras1 in *Hydractinia echinata*

24 Stunden nach Injektion konnte bei 26% der mit dem HeAktIIGFPRas1(G18V)-Fragment und bei 18% der mit dem HeAktIIGFPRas1(Q67V)-Fragment injizierten Embryonen GFP-Fluoreszenz unter dem Binokular beobachtet werden (Abb.43). GFPRas1(G18V) oder GFPRas1(Q67V) ist unter dem AktinII-Promotor von *Hydractinia* in Embryonen nicht in jeder Zelle, sondern mosaikartig exprimiert (Abb.43, B und D, rote Pfeile).

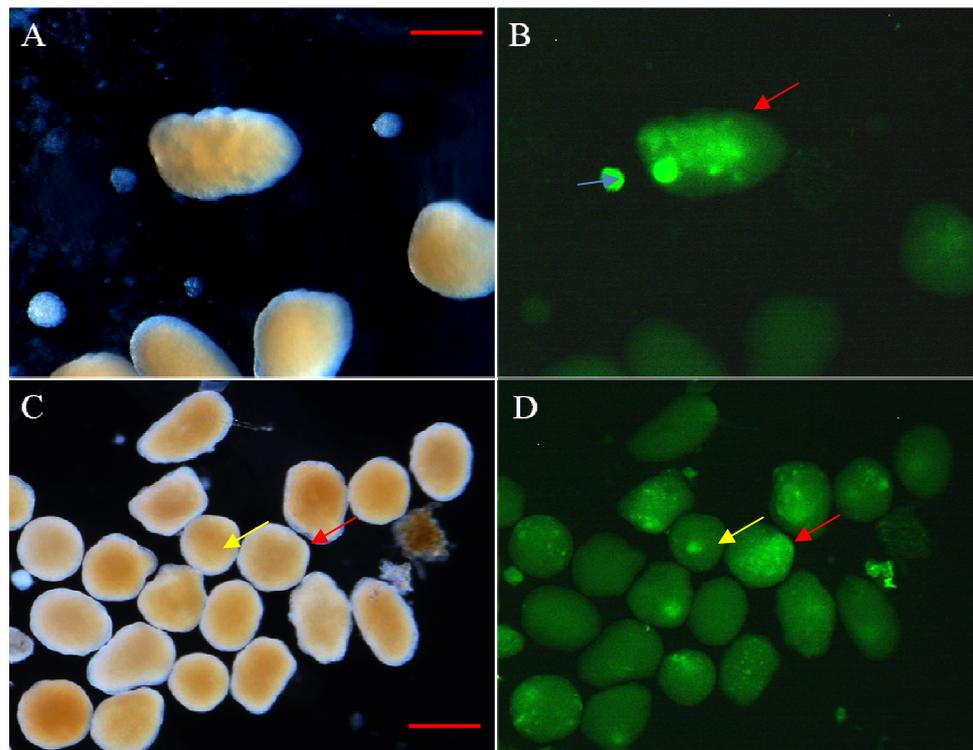


Abb.43 GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen *Hydractinia* Embryonen

A: 36 Stunden alte Embryonen von *Hydractinia* nach Injektion von HeAktIIGFPRas1(G18V)-Fragment im Hellfeld. Während der 36 Stunden Entwicklungszeit sind unbefruchtete Embryonen zerfallen.

B: Der rote Pfeil markiert einen in A gezeigten Embryo mit mosaikartiger GFPRas1(G18V)-Fluoreszenz. Die übrigen Embryonen zeigen keine Fluoreszenz.

C: 24 Stunden alte Embryonen von *Hydractinia* nach Injektion von HeAktIIGFPRas1(Q67V)-Fragment im Hellfeld.

D: Der rote Pfeil (in C und D) markiert einen Embryo mit mosaikartiger GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz.

Schmutzpartikel und Bestandteile zerfallener, unbefruchteter Embryonen zeigen in B und D unspezifische Fluoreszenz (B blauer Pfeil). In Embryonen entstehen nach der Injektion zum Teil nekrotische Zellbereiche, die Fluoreszenz zeigen (D gelber Pfeil). Der Maßstabalken in A entspricht 100 μm , der in C entspricht 150 μm .

72 Stunden nach Injektion der Fragmente konnte in beiden Fällen auch in Planula-Larven GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Die Expression von GFPRas1(Q67V) beziehungsweise GFPRas1(G18V) führte auch in Larven zu fluoreszierenden Zellen, die im Ento- und Ektoderm zusammen mit nicht transgenen Zellen mosaikartig auftraten (Abb.44). Transgene Larven wurden separiert und die Metamorphose durch Zugabe von CsCl induziert. Nach der Metamorphose war bei 75% der transgenen GFPRas1(G18V)- und bei 65% der transgenen GFPRas1(Q67V)-Kolonien Fluoreszenz sichtbar.

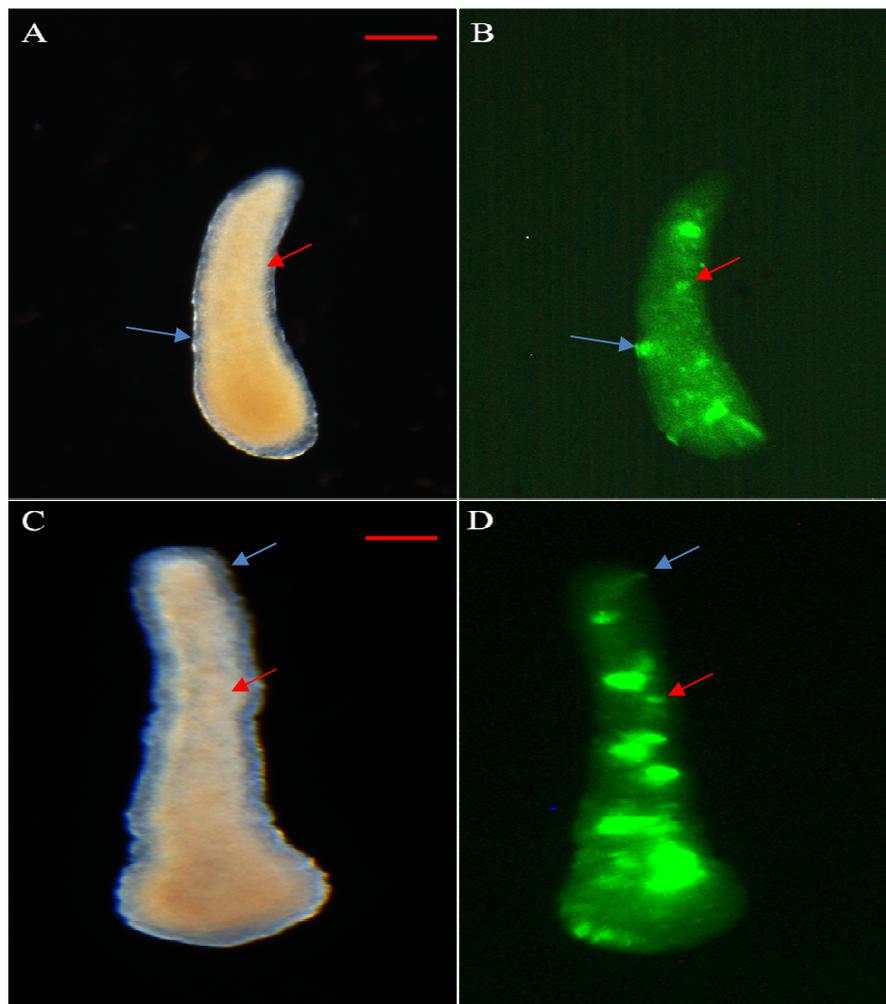


Abb.44 GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen *Hydractinia* Planula-Larven

A: 72 Stunden alte Larve nach Injektion von HeAktIIIGFPRas1(G18V)-Fragment im Hellfeld.

B: GFPRas1(G18V)-Fluoreszenz ist in der in A gezeigten Larve in entodermalen und ektodermalen Zellen erkennbar (in A und B: roter Pfeil entodermale Zelle; blauer Pfeil ektodermale Zelle).

C: 72 Stunden alte Larve nach der Injektion von HeAktIIIGFPRas1(Q67V)-Fragment.

D: GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz ist in der in C gezeigten Larve in ento- und ektodermalen Zellen erkennbar (in C und D: roter Pfeil entodermale Zelle; blauer Pfeil ektodermale Zelle)

Der Maßstabalken in A entspricht 200 μm , der in C entspricht 100 μm .

In Gastrozoiden zeigt sich die Fluoreszenz der Fusionsproteine GFPRas1(G18V) oder GFPRas1(Q67V) mosaikartig entlang der gesamten Körpersäule (Abb.45). Besonders anschaulich war die Fluoreszenz in gastrodermalen und epidermalen Zellen in den leicht transparenten Tentakeln erkennbar (Abb.45 B und D).

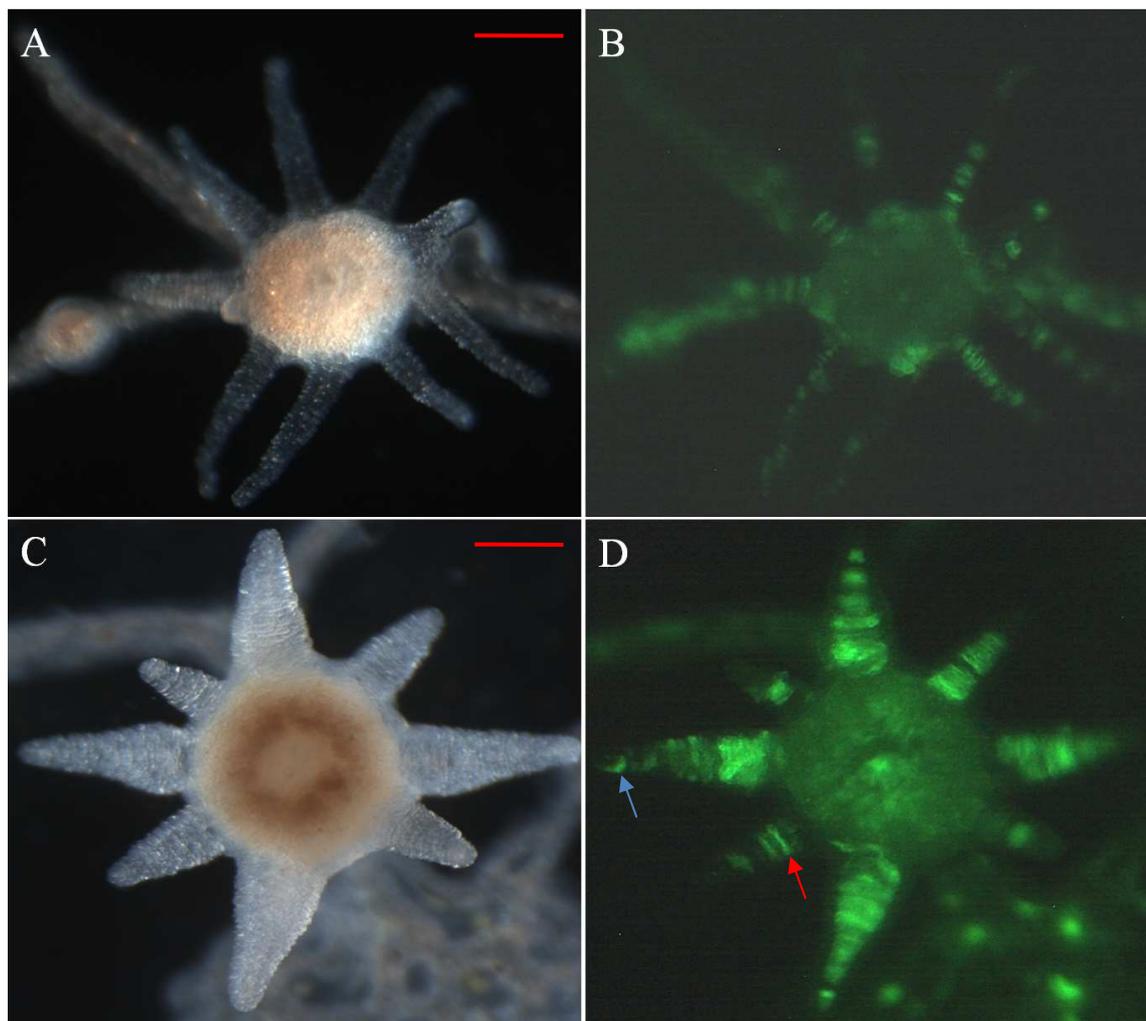


Abb.45 GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen *Hydractinia* Gastrozoiden

A: Transgener GFPRas1(G18V)-Gastrozoid im Hellfeld.

B: Fluoreszenz von GFPRas1(G18V) ist in dem in A abgebildeten Gastrozoiden im Bereich der Körpersäule und vor allem in Tentakeln erkennbar.

C: Transgener GFPRas1(Q67V)-Gastrozoid im Hellfeld.

D: Im Bereich der Körpersäule und vor allem in Tentakeln ist Fluoreszenz von GFPRas1(Q67V) in dem in C abgebildeten Gastrozoiden erkennbar. Der rote Pfeil zeigt Fluoreszenz von GFPRas1(Q67V) in einer gastrodermalen Tentakelzelle. Der blaue Pfeil weist auf Fluoreszenz von GFPRas1(Q67V) in einer epidermalen Tentakelzelle hin.

Der Maßstab Balken in A und C entspricht 50 μm .

3.4.3.2 Expression von *Ras1* in Transgenen und Wildtyp-Kolonien auf Transkriptions-Ebene

Aus einer transgenen GFPRas1(Q67V) sowie einer im Entwicklungsstand vergleichbaren Wildtyp-Kolonie wurde RNA gewonnen und cDNA synthetisiert. Kolonien wurden mitsamt der Stoloplatte von den Objektträgern geschabt. Unter Verwendung geeigneter Ras1-qPCR-Oligonukleotide (Tab.4) wurden quantitative PCR (qPCR) Versuche durchgeführt. Die Auswertung der Versuche ergab in cDNA aus einer transgenen Kolonie eine 6,5 fach höhere Expression von *Ras1*-Transkripten im Vergleich zu Wildtyp-cDNA (Abb.46). Die Injektion amplifizierter Fragmente führt somit auf Transkriptionsebene zu einer Überexpression von *Ras1* in transgenen Kolonien.

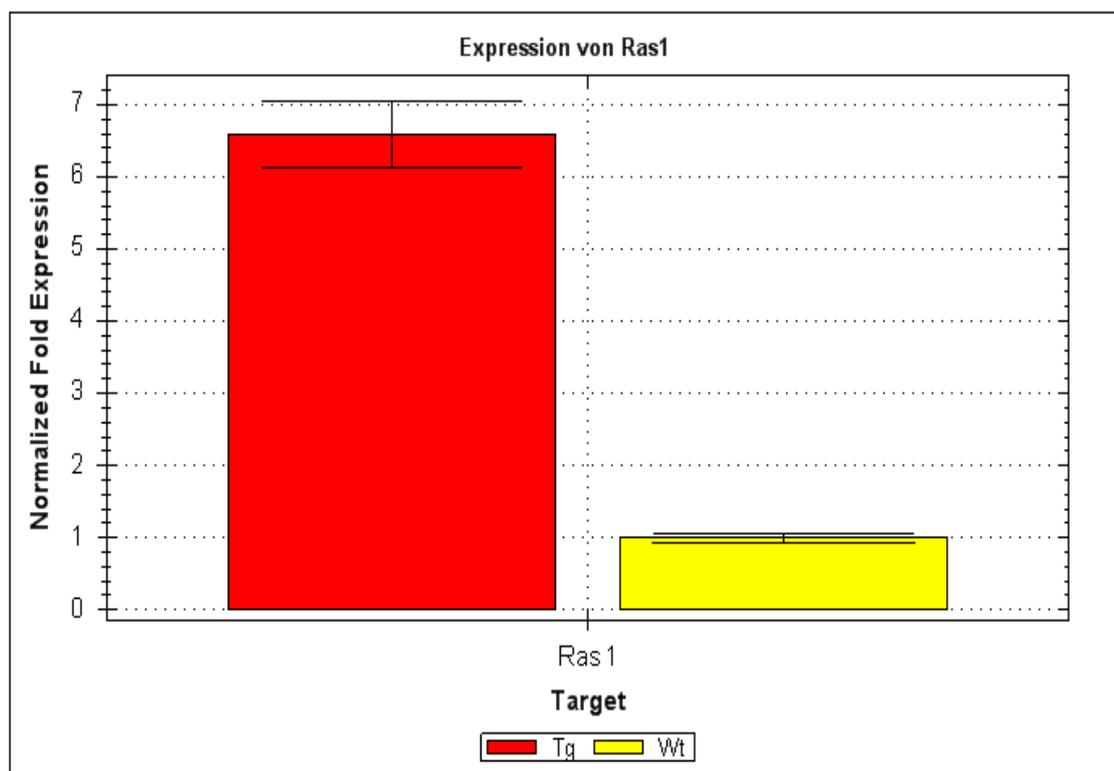


Abb.46 Expression von *Ras1*-Transkripten in einer transgenen *Hydractinia* GFPRas1(Q67V)-Kolonie im Vergleich zu einer Wildtyp-Kolonie

Die relative Häufigkeit von *Ras1*-Transkripten in, aus einer transgenen GFPRas1(Q67V)-Kolonie, gewonnenen cDNA wurde relativ zur mit „eukaryotic elongation factor 2“ (EEF2) (Fedrigo et al., 2010) normierten Wildtyp-Kontrolle in einem Balkendiagramm zusammen mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Grafik beruht auf aus Dreifachbestimmungen erzeugten Datensätzen. Die qPCR wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Zur Berechnung der dem Diagramm zugrunde liegenden Daten diente die $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Grafik wurde mit der „CFX Manager™“ Software erzeugt.

3.4.3.3 Morphologie transgener GFPRas1(G18V) und GFPRas1(Q67V)

Hydractinia echinata Gastrozoide

In frühen Embryonal- und Larvenstadien transgener Tiere sind nach Injektion von HeAktIIGFPRas1(G18V)- oder HeAktIIGFPRas1(Q67V)-Fragmenten keine Veränderungen der Morphologie erkennbar. Nach Metamorphose transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Larven zu Primärpolypen entwickelten sich diese zunächst dem Wildtyp entsprechend. In ihrer Vitalität unterschieden sich heranwachsende transgene GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Kolonien nicht von Wildtyp-Kolonien. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit und das Muster, mit dem Sekundärpolypen und Stolone gebildet wurden, entsprachen dem aus dem Wildtyp bekannten Muster. Sekundärpolypen wuchsen in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Kolonien in definiertem Abstand zu einander aus Stolonen aus. In ihrem Fressverhalten unterschieden sich transgene Kolonien ebenfalls nicht vom Wildtyp. GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz zeigte sich im Verlauf der Entwicklung einer Kolonie anfänglich in Primärpolypen. Eine Propagation von GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz konnte im Entwicklungsverlauf in gastrodermalen und epidermalen Zellen auch in Stolonen und neu gebildeten Sekundärpolypen beobachtet werden. Bei 50% der transgenen GFPRas1(G18V)- und bei 45% der transgenen GFPRas1(Q67V)-Kolonien entwickelte sich ca. drei Wochen nach der Metamorphose ein, dann erkennbarer, einheitlicher, die Tentakel betreffender, Phänotyp (Abb.47). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der prozentuale Anteil transgener Kolonien, die den beobachteten Phänotyp entwickeln, höher ist, da viele Kolonien durch einen Pilzbefall verloren gingen, bevor die Kolonien den Entwicklungsstand erreichten, bei dem die typischen morphologischen Veränderungen sichtbar wurden. Der Phänotyp der transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Kolonien, der ab drei Wochen nach der Metamorphoseauslösung erkennbar wurde, zeichnete sich im Vergleich zu Wildtyp-Kolonien durch eine Änderung der Tentakelmorphologie aus (Abb.47, durch Pfeile markiert).

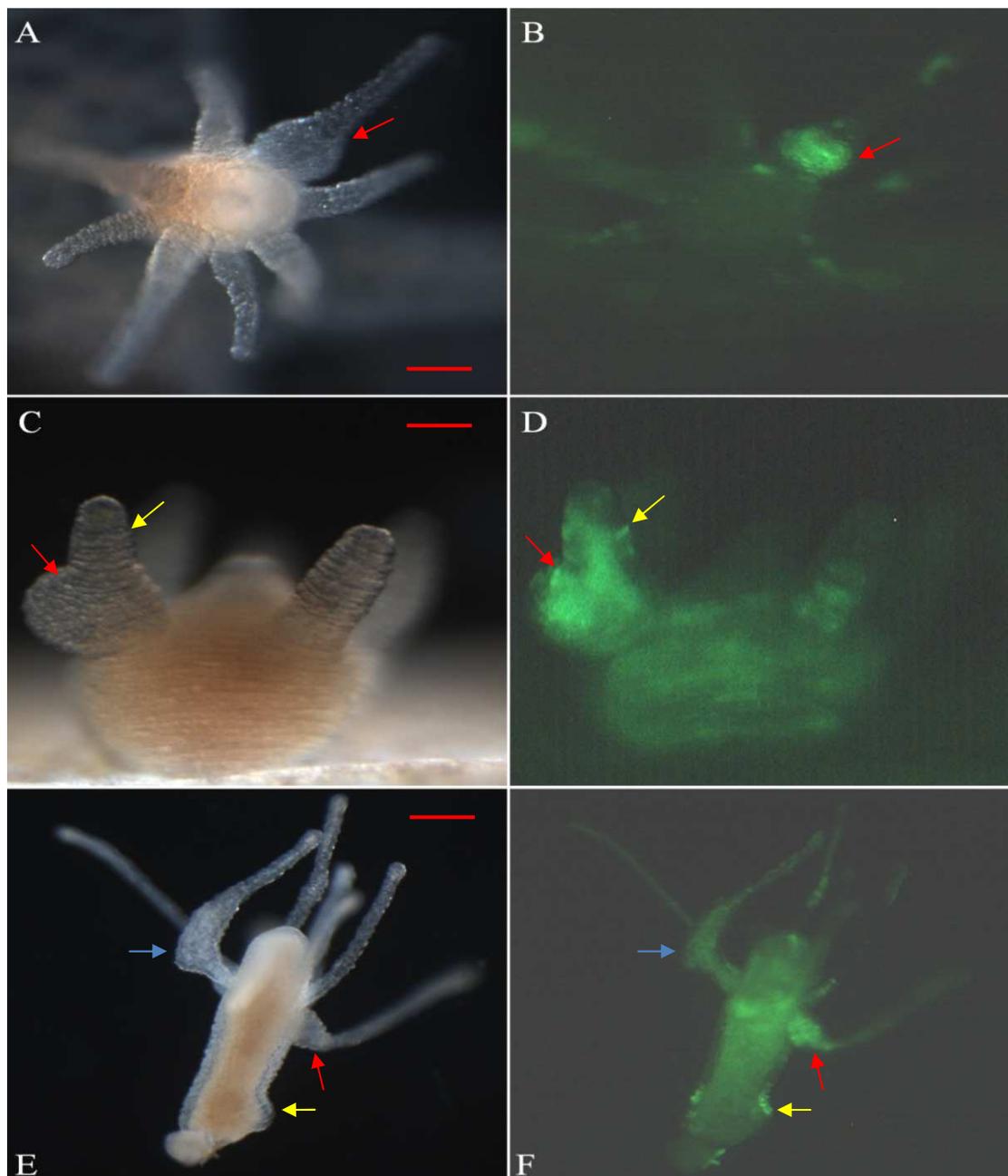


Abb.47 Veränderung der Tentakel-Morphologie in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden von *Hydractinia*

A: Aufsicht auf einen transgenen GFPRas1(G18V)-Gastrozoiden im Hellfeld.

B: In dem transgenen GFPRas1(G18V)-Gastrozoiden aus A gibt es morphologisch veränderte Tentakel (A und B, roter Pfeil). In der morphologischen Veränderung zeigt sich GFPRas1(G18V)-Fluoreszenz in gastrodermalen Zellen (B).

C: Transgener Ras1(Q67V)-Gastrozoid im Hellfeld.

D: Innerhalb einer morphologischen Veränderung im Tentakel des in C gezeigten Gastrozoiden ist GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in Zellen der Gastrodermis (C und D, roter Pfeil) und der Epidermis (C und D gelber Pfeil) erkennbar.

E: von einer Kolonie geschnittener, betäubter transgener GFPRas1(Q67V)-Gastrozoid im Hellfeld.

F: Im Bereich einer morphologischen Veränderung an der Basis eines Tentakels des in E abgebildeten Gastrozoiden (E und F, roter Pfeil) aber auch mittig in einem Tentakel (E und F blauer Pfeil) zeigt sich GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz vor allem im Bereich der Gastrodermis. Auch in der Körpersäule gibt es Fluoreszenz sowohl in der Gastrodermis als auch in der Epidermis (E und F, gelber Pfeil).

Der Maßstab in A entspricht 50 μm , der Maßstab in C entspricht 25 μm und der Maßstab in E entspricht 100 μm .

In transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Kolonien bildeten sich an Tentakeln von Gastrozoiden typische Verdickungen. Die Ausbildung solcher Beulen in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Kolonien konnte auf einen einzelnen Tentakel eines Gastrozoiden beschränkt sein, meistens bildeten sie sich jedoch nach und nach an mehreren Tentakeln der betroffenen Gastrozoide Auftreibungen. Die Position einer solchen Verdickung im Tentakel war nicht auf eine bestimmte Position festgelegt. So konnten die Neubildungen am Tentakel-Ansatz, aber auch mittig und endständig, beobachtet werden (Abb.47 E und F, roter und blauer Pfeil). Im Zuge des Weiteren Wachstums konnte eine kontinuierliche Größenzunahme der Auftreibungen beobachtet werden. Diese charakteristische phänotypische Abänderung ist in GFPRas1(G18V) und GFPRas1(Q67V) exprimierenden Gastrozoiden offensichtlich gleich ausgeprägt (Abb.47 B und D). Im Bereich der morphologischen Veränderung eines Tentakels zeigten sowohl gastrodermale als auch epidermale Zellen durch starke Fluoreszenz das Vorhandensein transgener Zellen an (Abb.47 B, D, und F). Auch in der Körpersäule transgener Gastrozoide konnten GFPRas1(Q67V) beziehungsweise GFPRas1(G18V) exprimierende epidermale sowie gastrodermale Zellen beobachtet werden (Abb.47 C, D, E und F). Die Körpersäule transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoide entsprach in ihrer Morphologie jedoch weiterhin dem aus Wildtyp-Gastrozoiden bekannten Muster. Zumindest ließen sich in makroskopischer Untersuchung mit dem Stereomikroskop keine offensichtlichen Veränderungen feststellen, weshalb auch eine histologische Untersuchung angeschlossen wurde.

3.4.3.4 Charakterisierung morphologischer Veränderungen in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden

In epidermalen Zellschichten transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoide zeigte sich sowohl unter dem Binokular als auch bei starker Vergrößerung keine im Vergleich zu Wildtyp-Gastrozoiden erkennbare, die Morphologie der Epidermis betreffende, Veränderung (Abb.48).

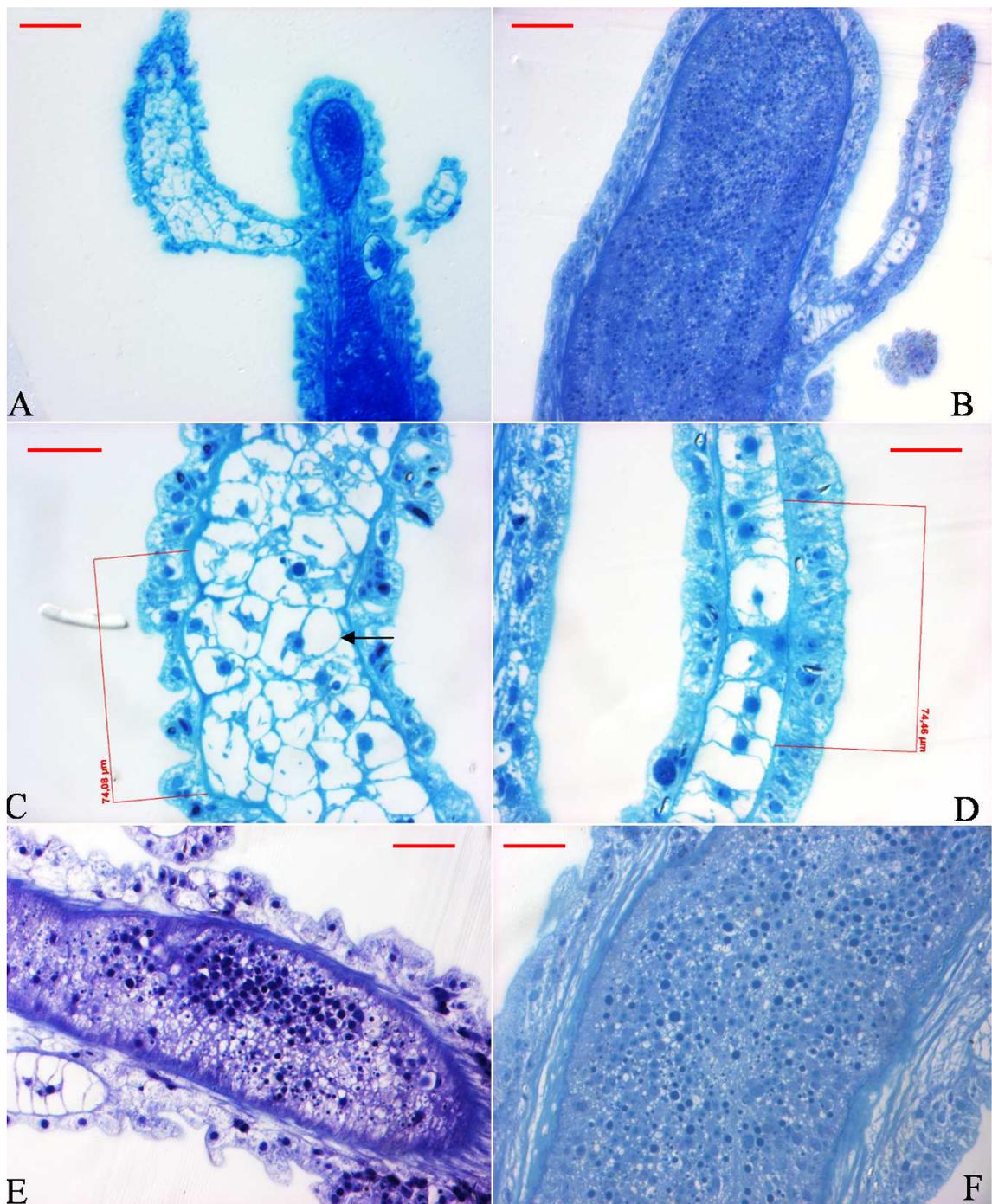


Abb.48 Histologische Untersuchung an Semi-Dünnschnittpräparaten eines transgenen, den Phänotyp zeigenden Gastrozoiden im Bereich der Körpersäule und im Bereich eines Tentakels im Vergleich mit dem Wildtyp

A: Semi-Dünnschnittpräparat eines transgenen GFP_{Ras1}(Q67V)-Gastrozoid. **B:** Semi-Dünnschnittpräparat eines Wildtyp-Gastrozoiden. **C:** Ausschnitt des in A gezeigten Gastrozoiden im Bereich der Tentakelverdickung. Der schwarze Pfeil markiert eine Stelle in dem abgebildeten Tentakel, wo mehrere Zellen in einer Fokusebene im Bereich der Gastrodermis nebeneinander liegen. **D:** Ausschnitt des in B gezeigten Wildtyp-Gastrozoiden im Bereich eines Tentakels. Zu **C** und **D:** Im Bereich der roten Klammer sind von der Länge her vergleichbare Bereiche (74 µm) markiert. Die durchschnittliche Breitenausdehnung der Gastrodermis im Bereich der roten Klammer von Mesogloea zu Mesogloea beträgt im Wildtyp-Tentakel (**D**) 23 µm und im transgenen Gastrozoiden (**C**) 46 µm. **E:** Schnitt durch die Körpersäule eines GFP_{Ras1}(Q67V) transgenen-Gastrozoiden. **F:** Ausschnitt im Bereich der Körpersäule des in B gezeigten Gastrozoiden. Der Maßstab in A und B entspricht 50 µm. Der Maßstab in C und D entspricht 25 µm, der Maßstab in E und F entspricht 30 µm. Die Aufnahmen in A und B wurden unter Verwendung des Plan-Apochromat 20x/0,8 Objektivs erzeugt. Für C und D wurde das 63x/1.40 Oil DIC Objektiv verwendet. Für E und F wurde das 40x/1,1 W Kor UV/VIS LD C Objektiv verwendet.

Die Epidermis zeigte sich sowohl im Wildtyp (Abb.48 B, D und F) als auch in transgenen Gastrozoiden (Abb.48 A, C und E), als ein einlagiges Epithel mit zahlreichen Zellen in den Zwischenräumen. Im Bereich der Körpersäule transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoide konnte unter dem Binokular (3.4.3.3), wie zuvor bereits erwähnt, keine morphologische Veränderung beobachtet werden (Abb.47). Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine morphologische Veränderung im Bereich der Körpersäule dazu führen könnte, dass es zu einer Wucherung von Zellen in den Gastralraum kommt. Ein besonderes Augenmerk lag während der Analyse der Schnittpräparate somit auf dem Gastralraum. Die Analyse zeigte, dass es in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden keine Wucherungen oder auffällige Neubildungen im Bereich des Gastralraums der Gastrozoide gibt (Abb.48 E und F).

Eine morphologische Veränderung im Vergleich zu Wildtyp-Gastrozoiden zeigt sich in Tentakeln transgener GFPRas1Q67V- und GFPRas1G18V-Gastrozoide nur in gastrodermalen Tentakelzellen. In derart veränderten Tentakeln weicht die epitheliale Organisation im gastrodermalen Gewebe in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden erheblich vom Wildtyp ab (Abb.48; Abb.49). Der Aufbau des Tentakels eines Wildtyp-Gastrozoiden entspricht am ehesten, zweidimensional dargestellt, dem Muster einer Strickleiter. Hierbei gibt es, strickleiterförmig angeordnet, große, vakuolisierte und einschichtig angeordnete gastrodermale Zellen. Diese haben an allen Oberflächen Kontakt zur Mesogloea. Die Mesogloea trennt in der Funktion einer Basalmembran gastrodermale Zellen von einer epidermalen Zellschicht (Abb.48 D; Abb.49 A und B). In der Gastrodermis transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoid-Tentakel zeigte sich, dass in zweidimensionaler Aufsicht im Bereich einer phänotypischen Verdickung im Vergleich zum Wildtyp mehrere gastrodermale Zellen nebeneinander liegen. In ihrer Größe und Form unterscheiden sich diese gastrodermalen Zellen (Abb.48 C) vom Wildtyp (Abb.48 D), sie sind insgesamt etwas kleiner und unförmiger. In einem im Vergleich zu einem Wildtyp-Tentakel im Bereich einer morphologischen Veränderung ungefähr doppelt so breiten Tentakel eines transgenen GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden liegen mehrere Gastrodermzellen nebeneinander (Abb.48 C), schwarzer Pfeil). Innerhalb

eines eingegrenzten Tentakelabschnittes konnten nach Auswertung mehrerer Schnitte in unterschiedlichen Schnittebenen mindestens 17 gastrodermale Zellen anhand ihrer Kerne und Zellgrenzen innerhalb der Verdickung zugeordnet werden (Abb.48 C). Im Vergleich dazu können in einem vergleichbar langen Tentakelabschnitt eines Wildtyp-Gastrozoiden nur 7 gastrodermale Zellen identifiziert werden (Abb.48 D).

Neben den Semi-Dünnschnitten wurden in Quetschpräparaten Zellkerne in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden mit DAPI gefärbt (Abb.49). Anhand der Quetschpräparate wurde deutlich, dass GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in Zellen membranlokalisiert auftritt. Kerne und das Zytoplasma der Zellen waren weitgehend frei von GFP-Fluoreszenz. Die Membranlokalisierung des Fusionsproteins ist zurückzuführen auf die Eigenschaft von Ras-Proteinen, an Membranen zu binden. Durch DAPI markierte Kerne und die Membranlokalisierung der Fusionsproteine konnten in morphologisch veränderten Tentakeln einzelne Strukturen anhand der Membranlokalisierung von GFPRas1(G18V) oder GFPRas1(Q67V) und anhand ihrer DAPI gefärbten Zellkerne zweifelsfrei als Zellen identifiziert werden (Abb.49 D und G). Gastrodermale Zellen waren hierbei anhand ihrer Form und Vakuolisierung eindeutig als solche erkennbar. Morphologisch veränderte gastrodermale Bereiche in Tentakeln transgener Gastrozoide können kausal mit membranassoziierter GFPRas1(G18V)- oder GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz in Verbindung gebracht werden. Gastrodermisbereiche, die einen aus dem Wildtyp bekannten Aufbau zeigten, wiesen nur vereinzelt Zellen auf, die GFPRas1(G18V)- oder GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz an Membranen zeigten (Abb.49 C, D, E, F und G).

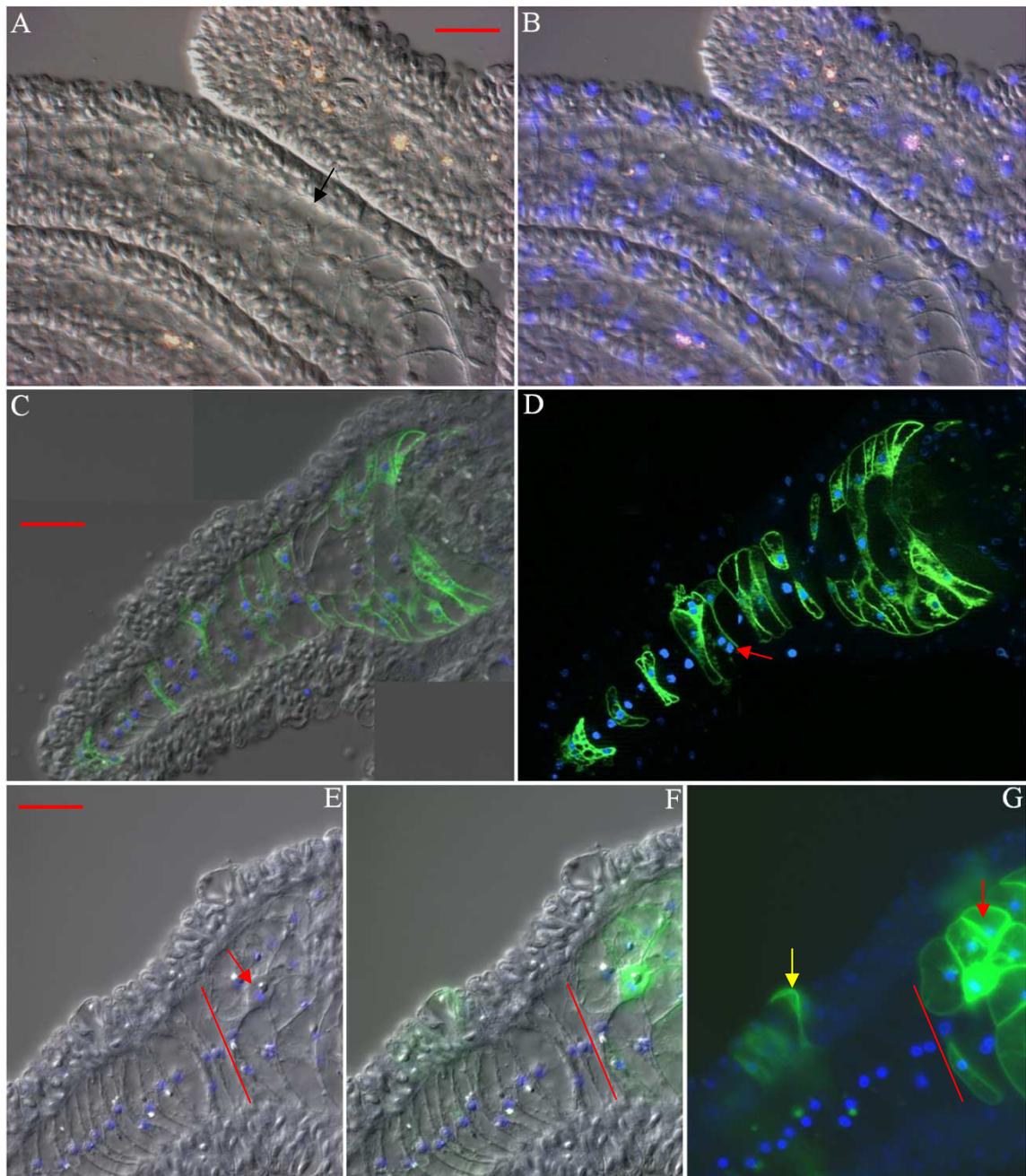


Abb.49 Tentakel-Morphologie transgener GFP Ras1(G18V)- und GFP Ras1(Q67V)-Gastrozoide und in einem Wildtyp-Gastrozoid

A: Aufbau eines Wildtyp-Gastrozoid Tentakels. Gastrodermales Gewebe wird durch eine Mesoglea (schwarzer Pfeil) von allen Seiten gegenüber epidermalem Gewebe begrenzt. **B:** Nach DAPI Markierung sind in dem unter A abgebildeten Tentakel sowohl in der Epidermis als auch in der Gastrodermis markierte Zellkerne sichtbar. **C:** Ein aus zwei Einzelbildern zusammengesetztes Bild eines transgenen GFP Ras1(Q67V)-Gastrozoid Tentakels. Das Bild zeigt eine Überlagerung UV-Licht- und Blaulicht angeregter Einzelaufnahmen, wobei DAPI markierte Kerne und das markierte Fusionsprotein an Membranen sichtbar wird. **D:** Zeigt C ohne Hellfeldkanal, wodurch die GFP Ras1(Q67V)-Fluoreszenz deutlicher wird. Der rote Pfeil markiert eine Gastrodermzelle mit zwei postmitotischen Zellkernen. **E:** Tentakel eines transgenen GFP Ras1(G18V)-Gastrozooids. Kerne sind DAPI markiert. Der rote Pfeil zeigt eine undifferenzierte Stammzelle. **F:** GFP Ras1(G18V)-Fluoreszenz ist in dem in E dargestellten Tentakelausschnitt an Membranen sichtbar. **G:** F ohne Hellfeldkanal. DAPI markierte Kerne sind in blau und GFP Ras1(G18V)-Fluoreszenz an Membranen in grün erkennbar. Der rote Pfeil zeigt GFP Ras1(G18V)-Fluoreszenz in einer Gastrodermizelle. Der gelbe Pfeil zeigt GFP Ras1(Q67V)-Fluoreszenz in einer Epidermizelle. In E, F und G trennt eine rote Linie einen Bereich mit einer morphologisch veränderten Gastrodermisordnung von einem Bereich, der das aus dem Wildtyp bekannte gastrodermale Muster zeigt. Der Maßstabbalken in A, C und E entspricht 25 µm. Alle Bilder wurden als pseudoconfokale Aufnahme im Apotom-Modus erzeugt. Alle Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung mit dem 40x/1.1 W Korr UV Objektiv.

In morphologisch veränderten Tentakeln existieren vereinzelt Zellen, die nicht der typischen Morphologie einer Gastrodermiszelle entsprechen. Bei diesen Zellen könnte es sich um undifferenzierte Stammzellen handeln, die einwandern und differenzieren (Abb.49 E). Des Weiteren konnten in morphologisch veränderten gastrodermalen Bereichen Zellen mit zwei Zellkernen beobachtet werden. Hieraus lässt sich auf eine kürzlich erfolgte Teilung der Kerne schließen (Abb.49 D). In Wildtyp-Tentakeln haben alle Zellen der Gastrodermis direkten Kontakt zur Mesogloea (Abb.49 A und B). Ob dies auch für gastrodermale Zellen innerhalb der morphologischen Veränderung gilt, konnte anhand der zuvor gezeigten, zweidimensionalen Bilder nicht geklärt werden.

Im Bereich eines morphologisch veränderten Tentakels einer transgenen Kolonie (GFPRas1(G18V)) wurde daher eine Serienaufnahme („Stack“) in mehreren Fokusebenen angefertigt (Abb.50).

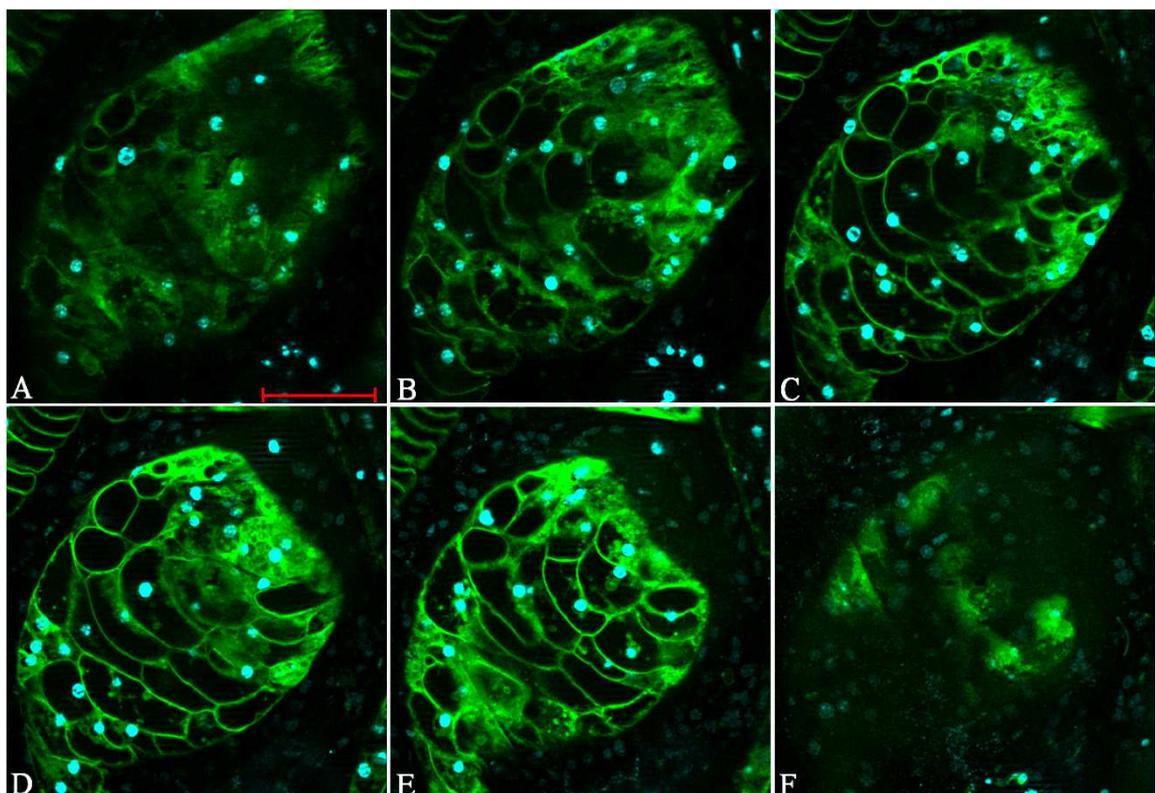


Abb.50 „life-imaging“ einer morphologischen Veränderung in einem transgenen GFPRas1(G18V)-Gastrozoid Tentakel

Die Aufnahmen zeigen eine morphologische Veränderung innerhalb der Gastrodermis eines Tentakels. GFPRas1(G18V)-Fluoreszenz ist membranlokalisiert sichtbar. In cyan sind DAPI markierte Zellkerne sichtbar.

A: Morphologisch veränderte Gastrodermis in der Ebene des Übergangs aus der Gastrodermis zur unteren Epidermis (Aufnahme 30 der Stack-Aufnahme).

B: Der Bereich der morphologisch veränderten Gastrodermis bei Aufnahme 27 des Stack. **C:** bei Aufnahme 23, **D:** bei Aufnahme 19, **E:** bei Aufnahme 15 und **F:** bei Aufnahme 9, wobei der Fokus nun auf der Ebene der oberen Epidermis liegt.

Der Maßstabbalken entspricht 50 µm. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x/1.1 W Korr UV VIS Objektiv gemacht. Alle Bilder der Abbildung wurden als pseudoconfokale Aufnahme im Apotom-Modus erzeugt.

Hierdurch konnte die morphologische Veränderung in der Gastrodermis innerhalb des Tentakels in verschiedenen Fokusebenen dargestellt werden. Anhand der membranlokalisierten Fluoreszenz von GFPRas1(G18V), sowie der DAPI markierten Zellkerne, wurde die Anordnung von gastrodermalen Zellen innerhalb der verdickten Gastrodermis verfolgt. Im Bereich der Auftreibungen in Tentakeln liegt eine aus mehreren Lagen bestehende Gastrodermis vor. Innerhalb der Verdickung in Abbildung 50 gibt es in der von allen Seiten durch eine epidermale Zellschicht begrenzten gastrodermalen Zellschicht mindestens drei Lagen von Zellen (Abb.50 B→E). Die Abbildungen 50 A und F zeigen den Grenzbereich zwischen Gastrodermis und Epidermis in der obersten und untersten Fokusebene durch den Tentakel. Zellen der zentralen, mittleren gastrodermalen Zellschicht grenzen zweifelsfrei an allen Seiten ausschließlich an andere Tentakel-Gastrodermis-Zellen. Sie haben somit keinerlei Kontakt zur Mesogloea.

3.4.3.5 Expression von mutagenisiertem Ras1 und Proliferation in *Hydractinia echinata*

Es ist bekannt, dass Ras-Proteine an der Proliferationskontrolle beteiligt sind (Schubbert et al., 2007). In gastrodermalen Tentakelzellen von transgenen *Hydractinia*-Kolonien, die den zuvor beschriebenen Phänotyp zeigen, fiel auf, dass vereinzelt Zellen zwei Zellkerne enthielten (Abb.48 C und D). Dies lässt auf eine kürzlich erfolgte Teilung der Kerne schließen und ist für Tentakel ungewöhnlich. Aus diesem Grund wurde in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden die Zellteilung durch S-Phasen-Markierung untersucht. Das Prinzip beruht hierbei auf dem Einbau von EdU (5-ethynyl-deoxyuridine), einem Nukleosid-Analog zu Thymidin, während der DNA Synthese. So erzeugte DNA wurde durch eine „Click“-Reaktion mit TAMRA markiert. S-Phasen markierte Zellkerne (rot) waren in transgenen, GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-, aber auch in Wildtyp-Gastrozoiden von *Hydractinia*, entlang der gesamten Körpersäule im Bereich der Gastrodermis und der Epidermis zu beobachten (Abb.51). Vereinzelt fielen in den Präparaten Gastrozoide auf, die eine Häufung von proliferierenden Zellen im Bereich der Körpersäule in Form eines Gürtels zeigten (Abb.51 A, gelber Pfeil). Dieser Gürtel an proliferierenden Zellen konnte sowohl in Transgenen als auch in Wildtyp-Gastrozoiden beobachtet werden.

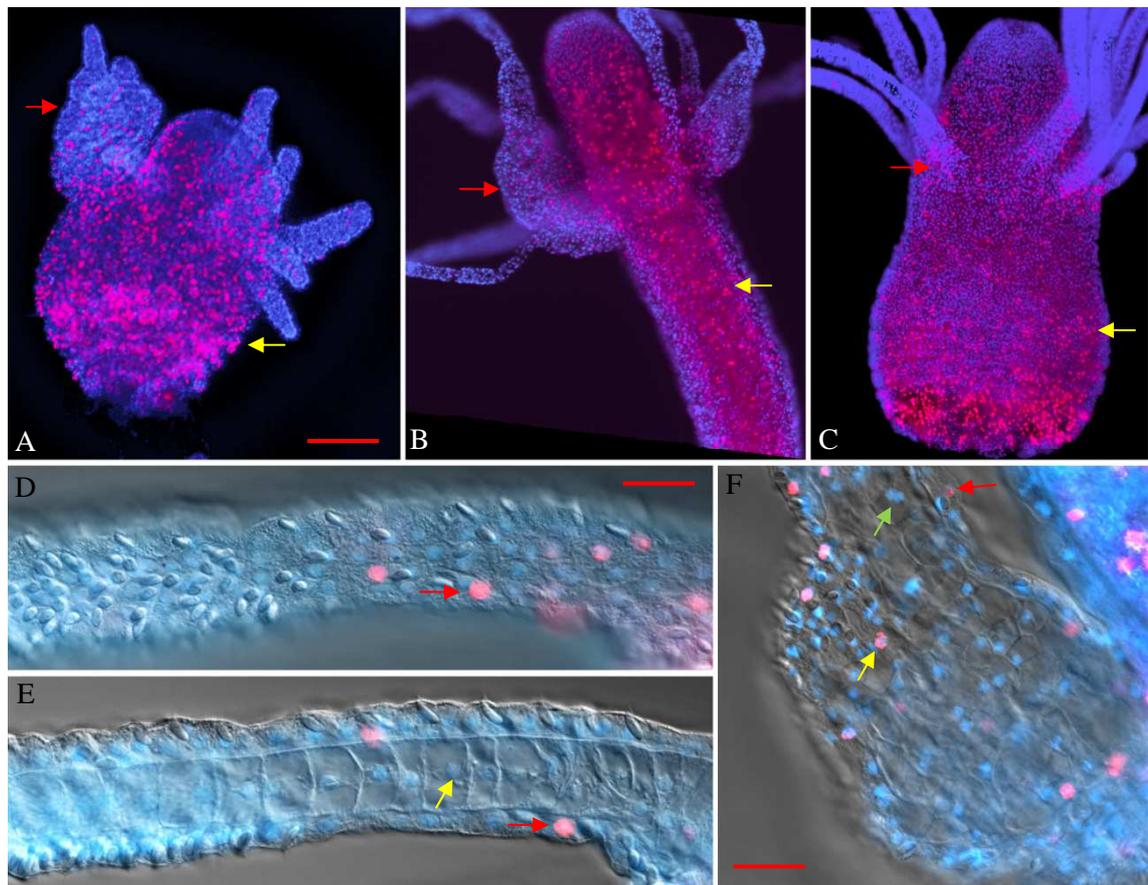


Abb.51 EdU markierte S-Phase-Kerne in Wildtyp- und Transgenen-Gastrozoiden

A: Transgener GFPRas1(Q67V)-Gastrozoid mit morphologisch veränderten Tentakeln.

B: Transgener GFPRas1(G18V)-Gastrozoid mit morphologisch veränderten Tentakeln. A und B) Im Bereich der Tentakelaufreibungen (rote Pfeile) sind zahlreiche EdU markierte Kerne vorhanden. Auch im Bereich der Körpersäule sind zahlreiche markierte Kerne vorhanden (gelbe Pfeile).

C: Wildtyp-Gastrozoid mit nur vereinzelt anzutreffenden S-Phase-Kernen im basalen Bereich der Tentakel (roter Pfeil) und zahlreichen markierten Kernen im Bereich der Körpersäule (gelber Pfeil).

D und E: Wildtyp-Gastrozoid Tentakel, basaler Bereich. EdU-markierte Kerne sind im Bereich der Epidermis erkennbar (roter Pfeil). D Fokusebene in der Epidermis des Tentakels und in E in der Fokusebene der Gastrodermis. Zellkerne in gastrodermalen Zellen zeigen keinen Einbau von EdU (gelber Pfeil E).

F: Ausschnitt aus B im Bereich des durch den roten Pfeil markierten Tentakels. Kerne sind in epidermalen Zellen (roter Pfeil) und in gastrodermalen Zellen (gelber Pfeil) im Bereich der morphologischen Veränderung EdU-markiert. Im Bereich der morphologischen Veränderung gibt es eine gastrodermale Zelle mit zwei Zellkernen (grüner Pfeil).

A, B und C zeigen Gastrozoide in einer überlagerten Darstellung unter Blaulicht- und bei Grünlichtanregung. In blau sind DAPI und in Rot EdU markierte Kerne im Bereich der Körpersäule sichtbar. Für A, B und C wurde das 10x/0,45 Plan-Apochromat Objektiv verwendet. Der Maßstab Balken in A entspricht 50 μ m und gilt auch für B und C. D, E und F zeigen das Bild in einer überlagerten Darstellung unter Blaulicht-, Grünlichtanregung und im Hellfeld. Für die Aufnahmen wurde das 40x /1.1 W Korr UV VIS IR LD C-Apochromat Objektiv verwendet. Der Maßstab Balken in D und F entspricht 25 μ m.

Im Bereich der Körpersäule transgener Gastrozoide ließ sich keine Zunahme proliferierender Zellen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. Eine quantitative Auswertung durch Auszählen von Kernen war nicht möglich. Es wurden breite Schwankungen in der Anzahl an markierten Kernen von Polyp zu Polyp (Wildtyp), aber auch bei transgenen Gastrozoiden beobachtet. Im Bereich der morphologischen Veränderungen der Tentakel hingegen gab es zweifelsfrei sowohl in der Gastrodermis als auch in der Epidermis in Zellen S-Phasen-Zellkerne in ungewöhnlich hoher Zahl (Abb.51, A, B und F). In Wildtyp-Gastrozoid-Tentakeln hingegen traten nur vereinzelt S-Phasen-Kerne in der Epidermis auf (Abb.51, C und D). In der Gastrodermis von Wildtyp-Tentakeln wurden in keinem von etwa 7 untersuchten Gastrozoiden Zellen in S-Phase beobachtet. Die Expression des mutierten Ras-Proteins bewirkt offenbar eine Re-Aktivierung des Zellzyklus in differenzierten gastrodermalen Zellen des Tentakels. Die Bereiche reaktivierter Proliferation waren auf die Auftreibungen der Tentakel begrenzt und deckten sich mit den Bezirken, in denen gastrodermale Zellen den Kontakt zur Mesogloea verloren haben. Eine Entsprechende Hyperplasie der Tentakelepidermis konnte nicht festgestellt werden, obwohl auch eine mögliche vermehrte Proliferation der Epidermis nicht ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von GFPRas1(G18V) oder GFPRas1(Q67V) in *Hydractinia* in Gastrozoiden zu morphologisch veränderten gastrodermalen Strukturen in Tentakeln führt. Hierbei bilden sich im Vergleich zum Wildtyp überzählige gastrodermale Zellen in Wucherungen. Innerhalb der wuchernden Beulen verlieren Zellen der Gastrodermis den Kontakt zur Mesogloea und es konnten in den gastrodermalen Wucherungen mehrfach Zellen mit zwei Zellkernen beobachtet werden (3.4.3.4). Die S-Phasen-Markierung durch EdU ergab markierte gastrodermale Zellen im Bereich der morphologischen Veränderung transgener Gastrozoid-Tentakel. Aus der Summe der Ergebnisse ergab sich das typische Bild einer „neoplastischen“ Wucherung. Die Auftreibungen in Tentakeln transgener GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Gastrozoide von *Hydractinia* werden hier aus diesem Grund im Folgenden als „Neoplasie“ bezeichnet.

3.4.3.6 Expression von mutagenisiertem Ras2 in *Hydractinia echinata*

24 Stunden nach Injektion von HeAktIIGFPRas2(G18V)- oder HeAktIIGFPRas2(Q67V)-Fragmenten konnte bei 10% der Embryonen GFPRas2(G18V)- und bei 25 % GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in den transgenen Zellen beobachtet werden. Wie im Fall von Ras1 waren auch GFPRas2(G18V) und GFPRas2(Q67V) unter der Kontrolle des AktinII-Promotors von *Hydractinia* in Embryonen in transgenen Zellen exprimiert, die zusammen mit nicht transgenen Zellen mosaikartig auftraten (Abb.52).

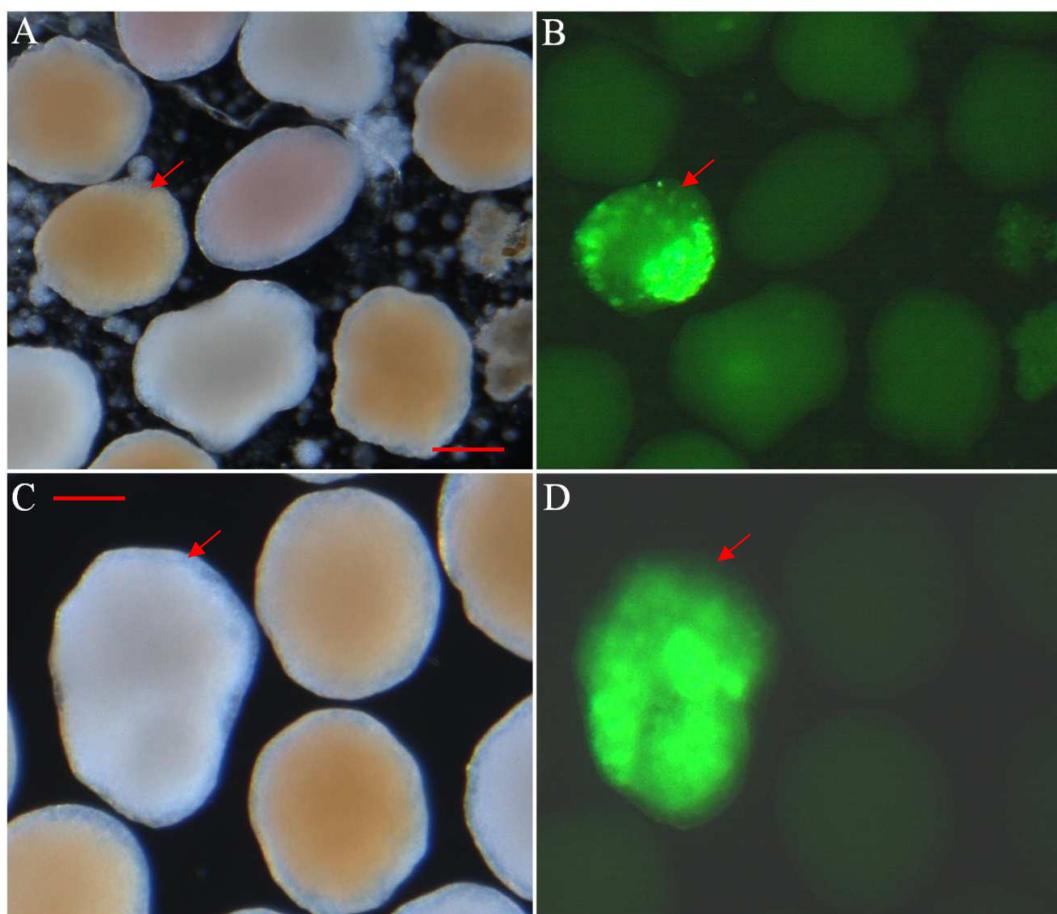


Abb.52 GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in *Hydractinia* Embryonen

A: Embryonen 24 Stunden nach Injektion von HeAktIIGFPRas2(G18V)-Fragmenten im Hellfeld.

B: GFPRas2(G18V)-Fluoreszenz in einem Embryo (Der rote Pfeil markiert in A und B den transgenen Embryo).

C: Embryonen 24 Stunden nach Injektion von HeAktIIGFPRas2(Q67V)-Fragmenten.

D: GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in einem Embryo (Der rote Pfeil markiert in C und D den transgenen Embryo).

Der Maßstab für A und B entspricht 100 μm . Der Maßstab für C und D entspricht 50 μm .

Auch in Planula-Larven war GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in transgenen Zellen zu beobachten, die mit nicht transgenen Zellen ein Mosaik in ento- und ektodermalen Zellen bildeten (Abb.53 B).

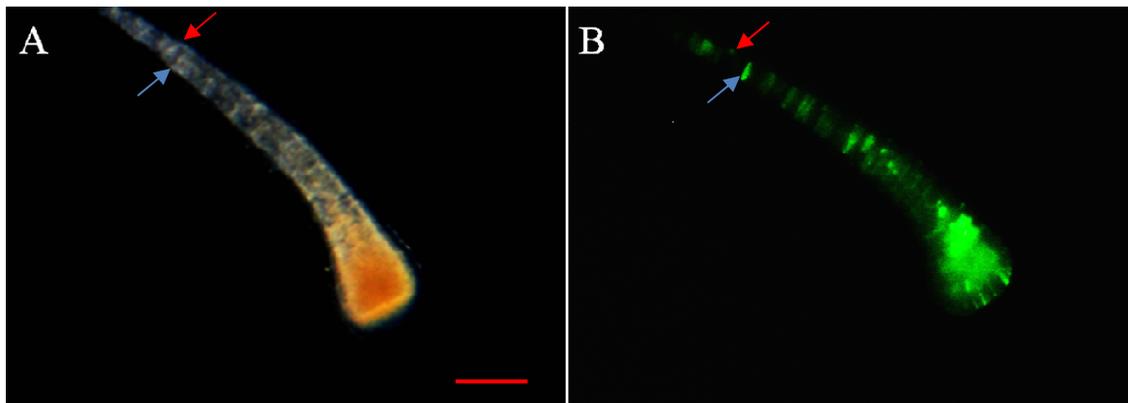


Abb.53 GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in einer *Hydractinia* Planula-Larve

A: Transgene Larve 72 Stunden nach Injektion von HeAktIIIGFPRas(Q67V)-Fragmenten im Hellfeld.

B: GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz ist im Ento- und Ektoderm zu erkennen. Der rote Pfeil in A und B zeigt in B GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in einer ektodermalen Zelle. Der blaue Pfeil in A und B zeigt in B GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in einer entodermalen Zelle.

Der Maßstab in A entspricht 100 μm .

Die transgenen GFPRas2(G18V)-Kolonien wurden von einem Pilz befallen. Daher stand hier für diese Kolonien nur beschränkt Material für weitere Analysen zur Verfügung. Während einer Beobachtungszeit von drei Wochen, bis es zum Pilzbefall kam, konnten jedoch keine morphologischen Abänderungen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Transgene Gastrozoide zeigten GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in gastrodermalen und in epidermalen Zellen. Wie schon für transgene Ras1-Gastrozoide beobachtet, war die Fluoreszenz besonders gut in den leicht transparenten Tentakeln in epidermalen und gastrodermalen Tentakelzellen erkennbar (Abb.54 B und D).

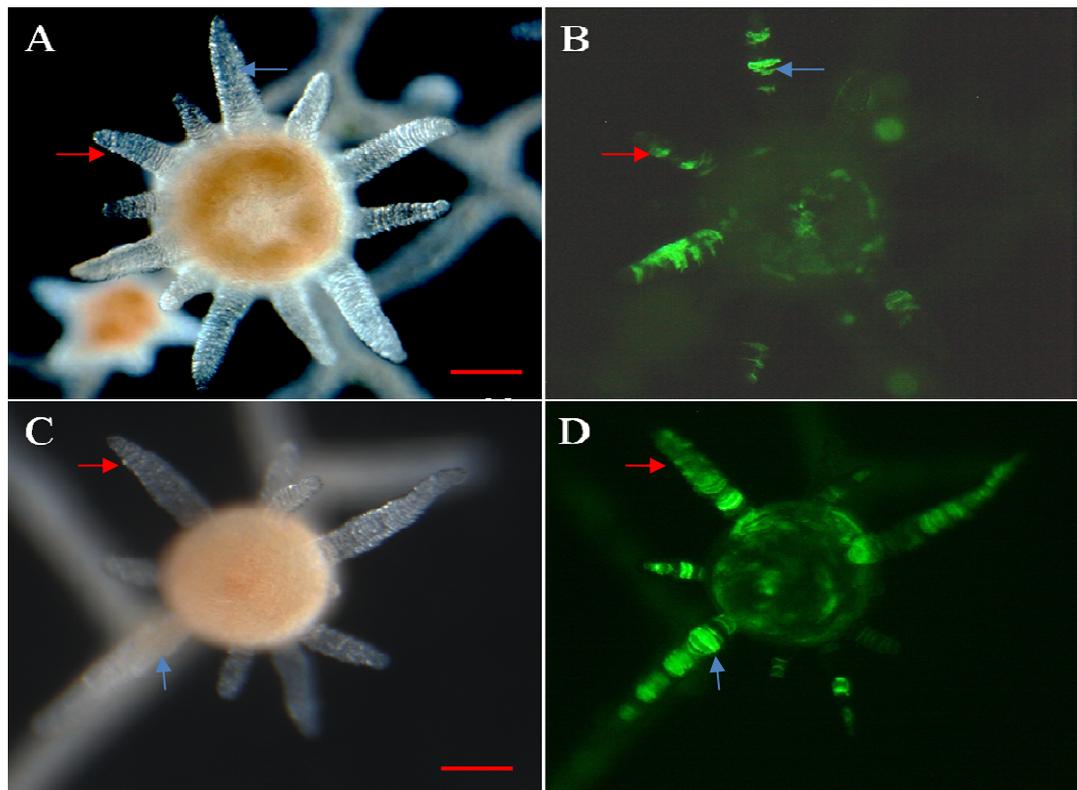


Abb.54 GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in *Hydractinia* Gastrozoiden

A: Transgener GFPRas2(G18V)-Gastrozoid im Hellfeld.

B: Im Bereich der Körpersäule und in Tentakel-Zellen erkennt man in dem in A abgebildeten Gastrozoiden GFPRas2(G18V)-Fluoreszenz. Der rote Pfeil (A und B) markiert GFPRas2(G18V)-Fluoreszenz in einer Epidermiszelle. Der blaue Pfeil (A und B) markiert GFPRas2(G18V)-Fluoreszenz in einer gastrodermalen Zelle.

C: Transgener GFPRas2(Q67V)-Gastrozoid im Hellfeld.

D: Im Bereich der Körpersäule und in Tentakel Zellen erkennt man in dem in C abgebildeten Gastrozoiden GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz. Der rote Pfeil (C und D) markiert GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz (D) in einer Epidermiszelle. Der blaue Pfeil (C und D) zeigt GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in einer gastrodermalen Zelle.

Der Maßstab in A und C entspricht 30 μm .

3.4.3.7 Expression von *Ras2* in Transgenen und Wildtyp-Kolonien auf Transkriptions-Ebene

Aus einer GFPRas2(Q67V)-Kolonie sowie einer im Entwicklungsstand der Kolonie vergleichbaren Wildtyp-Kolonie wurde RNA gewonnen und cDNA synthetisiert. Die Kolonien wurden mitsamt der Stoloplatte von Objektträgern geschabt. Unter Verwendung geeigneter qPCR-Oligonukleotide (Tab.4) wurden quantitative PCR(qPCR)-Versuche durchgeführt. In einer transgenen GFPRas2(Q67V) exprimierenden Kolonie gibt es auf Transkriptionsebene eine gesteigerte Expression von *Ras2*-Transkripten im Vergleich zur Wildtyp-Kolonie (Abb.55).

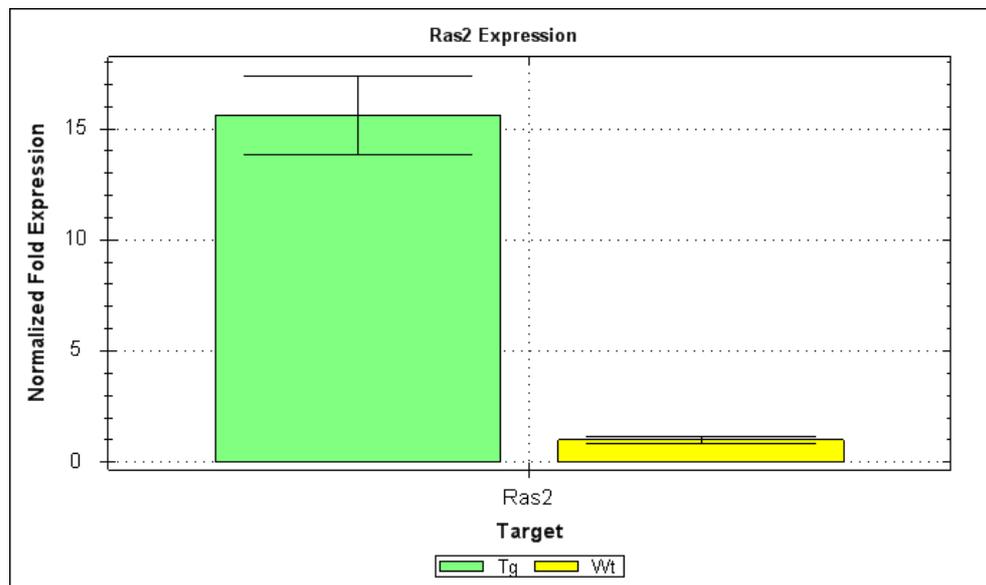


Abb.55 Vergleich der Expression von *Ras2*-Transkripten in transgener GFPRas2(Q67V)- und Wildtyp-cDNA

Die relative Häufigkeit von *Ras2*-Transkripten in einer aus einer transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonie gewonnenen cDNA wurde relativ zur mit „eukaryotic elongation factor 2“ (EEF2) (Fedrigo et al., 2010) normierten Wildtyp-Kontrolle in einem Balkendiagramm, zusammen mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Grafik beruht auf aus Dreifachbestimmungen erzeugten Datensätzen. Die qPCR wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Zur Berechnung der dem Diagramm zugrunde liegenden Daten diente die $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Grafik wurde mit der „CFX Manager™“ Software erzeugt.

In cDNA, die aus der transgenen GFPRas2(Q67V) exprimierenden Kolonien gewonnen wurde, war im Vergleich zu Wildtyp-cDNA eine fast sechzehnmal höhere Menge von *Ras2*-Transkripten nachweisbar. Somit wurde deutlich, dass es in transgenen Tieren zu einer dauerhaft anhaltenden Überexpression von *Ras2* kam.

3.4.3.8 Morphologie transgener GFPRas2(G18V) und GFPRas2(Q67V)

Hydractinia echinata Gastrozoide

In Embryonal- und Larvenstadien zeigten sich nach Injektion der Fragmente keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Stadien mit dem gleichen Entwicklungsstand. Nach Metamorphose transgener GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Larven zu Primärpolypen entwickelten sich auch diese zunächst dem Wildtyp entsprechend. In ihrer Vitalität unterschieden sich heranwachsende, transgene GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Kolonien nicht von Wildtyp-Kolonien. Auch in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und in dem Muster mit

dem Sekundärpolypen und Stolone gebildet wurden, entsprachen sie dem aus dem Wildtyp bekannten Muster. Neue Sekundärpolypen wuchsen in transgenen GFPRas2(G18V)- und GFPRas2-(Q67V)-Kolonien zunächst in definiertem Abstand zueinander aus Stolonen aus. In ihrem Fressverhalten unterschieden sich die transgenen Kolonien nicht vom Wildtyp. GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Fluoreszenz zeigte sich im Verlauf der Entwicklung einer Kolonie anfänglich in Primärpolypen. Hiernach konnte eine Propagation von GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz im weiteren Entwicklungsverlauf in gastrodermalen und epidermalen Zellen, in Stolonen und neu gebildeten Sekundärpolypen beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, konnten GFPRas2(G18V)-Kolonien im weiteren Verlauf nicht langfristig untersucht werden, da sie im Zuge einer Pilzinfektion verloren gegangen sind. In transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden fielen in Tentakeln keine Veränderungen auf, wie in transgenen GFPRas1(G18V)- oder GFPRas1(Q67V)-Tieren beschrieben (3.4.3.3 und 3.4.3.4). Zellen der Gastrodermis und der Epidermis zeigten die typische, aus Wildtyp-Tentakeln bekannte Anordnung (Abb.56).

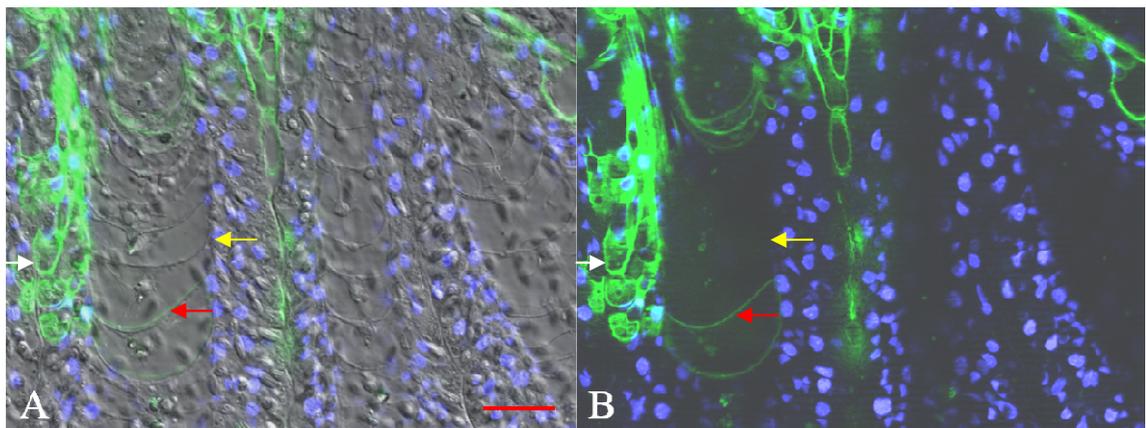


Abb.56 Tentakel eines transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden

A: Mehrere nebeneinander liegende Tentakel eines transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden im Hellfeld mit zusätzlicher Blaulicht und UV-Licht Anregung.

B: Zeigt A ohne Hellfeld. Deutlich wird die membranlokalierte Fluoreszenz von GFPRas2(Q67V). Der weiße Pfeil zeigt GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz an Membranen einer Epidermiszelle. Der rote Pfeil zeigt GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz an Membranen einer Gastrodermiszelle. Der gelbe Pfeil zeigt die Mesogloea.

Die Aufnahmen wurden mit dem 40x/1.1 W Korr UV VIS Objektiv erzeugt. Der Maßstabblock entspricht 25 µm.

Auch dieses Fusionsprotein lokalisierte, wie schon für Ras1 beobachtet (3.4.2.4), an Membranen. Kerne und das Zytoplasma der Zellen waren weitgehend frei von GFPRas2-Fusionsprotein (Abb.56).

3.4.3.9 Phänotypische Veränderung transgener GFPRas2(Q67V)

Hydractinia echinata Polypen

In transgenen GFPRas2(Q67V)-Tieren konnten innerhalb der ersten drei Wochen nach Metamorphoseauslösung keine sichtbaren Änderungen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Nach dieser Zeit wurden mehrfach Gastrozoide beobachtet, die im Vergleich zu Wildtyp-Kolonien zusätzliche Körperachsen ausgebildet hatten (Abb.57, 58 und 59). In der Natur haben Gastrozoide eine Körperachse, die vertikal zu den horizontalen Stolonen ausgerichtet ist und sich von der Polypenbasis zum Kopfbereich erstreckt. Bei Gastrozoiden ist unterhalb der apikalen Mundöffnung und oberhalb eines Kranzes filiformer Tentakel ein Hypostom vorhanden. Es wurde mehrfach in GFPRas2(Q67V)-Kolonien beobachtet, dass Gastrozoide basal in der Körpersäule eine Verdickung ausbildeten (Abb.57 A und C, roter und blauer Pfeil). Im Bereich der Verdickungen konnte GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in epidermalen und gastrodermalen Zellen beobachtet werden (Abb.57, B und D).

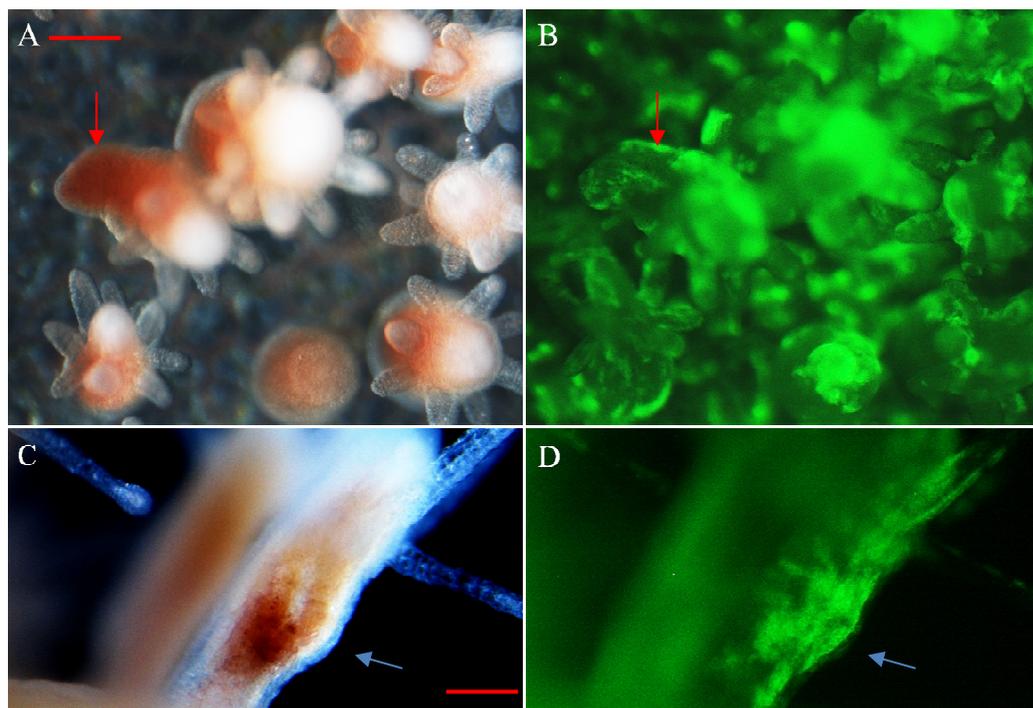


Abb.57 Morphologische Veränderung im Bereich der Körpersäule transgener GFPRas2(Q67V)-Gastrozoide

A: *Hydractinia* Kolonie im Hellfeld. Mit den roten Pfeilen in A und B ist ein Gastrozoid markiert, an dessen Körpersäule seitlich eine Verdickung entstanden ist.

B: Im Bereich der Verdickung (roter Pfeil, A und B) in dem Gastrozoiden und in der Kolonie wird ein hohes Maß an GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz deutlich.

C: Ein GFPRas2(Q67V)-Gastrozoid in seitlicher Ansicht. Der blaue Pfeil (C und D) markiert eine Verdickung im Bereich der Körpersäule.

D: Im Bereich der Verdickung (blauer Pfeil, C und D) ist GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in gastrodermalen und epidermalen Zellen sichtbar. Der Maßstabballen in A und C entspricht 100 µm.

Mehrfach kam es dazu, dass aus dem verdickten basalen Bereich des Gastrozoids sekundäre Strukturen mit Gastrozoid-Identität auswuchsen (Abb.58).

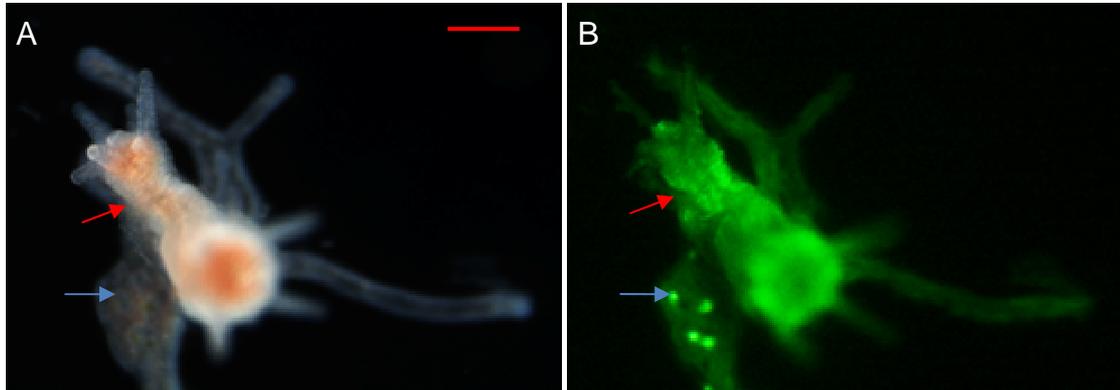


Abb.58 Sekundäre Körperachse in einem transgenen GFP-Ras2(Q67V)-Gastrozoiden

A: GFP-Ras2(Q67V)-Gastrozoid, der basal eine sekundäre Körperachse ausgebildet hat (roter Pfeil, A und B).

B: GFP-Ras2(Q67V)-Fluoreszenz ist im Bereich der gesamten Körpersäule zu erkennen. Auch Stolone zeigen GFP-Ras2(Q67V)-Fluoreszenz. Der blaue Pfeil (A und B) markiert eine Stelle im Stolo an der sich grün autofluoreszierende Periderm-Inseln befinden. Der Maßstabalken entspricht 100 μm .

Die Identität der auswachsenden Struktur war jedoch nicht immer die, eines Gastrozoiden. Es wurde auch beobachtet, dass es in Gastrozoiden im Bereich einer basalen Verdickung der Körpersäule zum Auswachsen einer stolonähnlichen Struktur kam. Vor allem in Zellen an der Spitze solch einer auswachsenden Struktur zeigte sich GFP-Ras2(Q67V)-Fluoreszenz (Abb.59). Innerhalb des über mehrere Tage laufenden Wachstumsprozesses, in dessen Verlauf die einem Stolon ähnelnde Struktur weiter auswuchs und am Untergrund anheftete, konnte weiterhin GFP-Ras2(Q67V)-Fluoreszenz im Bereich des auswachsenden Struktur beobachtet werden. Oberhalb der auswachsenden stolonartigen Struktur kam es zu einer Einschnürung der Körpersäule des Gastrozoiden. Der oberhalb der Einschnürung gelegene Teil des ursprünglichen Gastrozoiden wurde schließlich komplett abgeschnürt und fiel ab (Abb.59 A bis J).

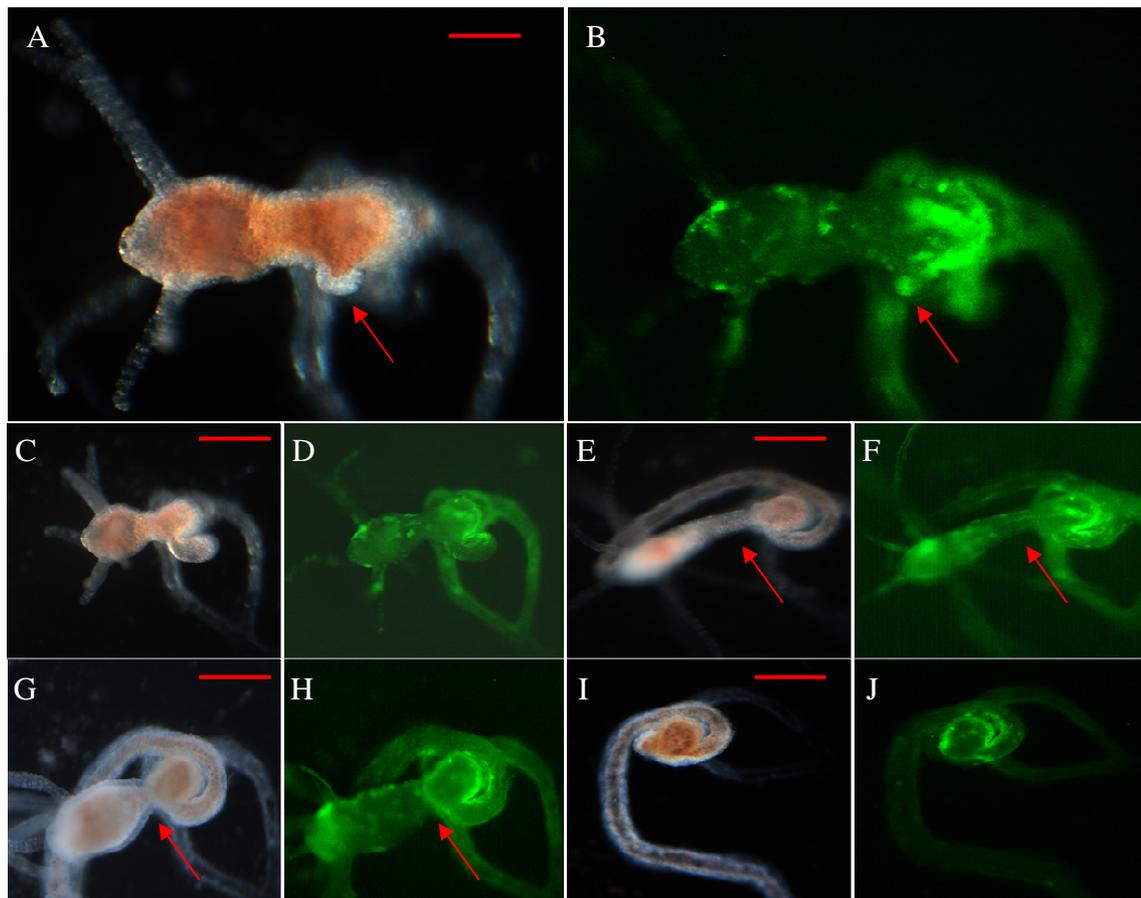


Abb.59 Bildung eines atypischen Stolons, basal an einem GFP-Ras2(Q67V)-Gastrozoid

A: Transgener GFP-Ras2(Q67V)-Polyp fünf Tage nach der Metamorphose-Auslösung. **B:** Basal an der Körperachse wächst in dem in A gezeigten Gastrozoiden eine sekundäre Struktur aus. Fluoreszenz von GFP-Ras2(Q67V) ist im Bereich der Spitze der auswachsenden Struktur zu erkennen (A und B, roter Pfeil). Die Struktur wächst im Verlauf der nächsten Tage weiter aus (C und D 24 Stunden, E und F 48 Stunden, G und H eine Woche, und I und J zwei Wochen nach A und B). Die Struktur, die dem Aussehen nach ein Stolon ist, setzt sich am Untergrund fest. Oberhalb des Stolons kommt es zu einer Einschnürung in der Körpersäule (E und F, roter Pfeil). Die Einschnürung nimmt im Verlauf zu (G und H, roter Pfeil), bevor der Primär-Polyp abgeschnürt wird (I und J). Der Maßstabalken für A und B entspricht 50 µm, für C, D, E, F, I und J 100 µm und für G und H 80 µm.

Nachdem transgene GFP-Ras2(Q67V)-Kolonien die Geschlechtsreife erreicht hatten, konnte in weiblichen Gonozoiden mehrmals beobachtet werden, dass zusätzliche Körperachsen gebildet wurden (Abb.60 B, C und D). Für männliche Kolonien können hier keine Aussagen getroffen werden, was einem erneuten Pilzbefall geschuldet war.

Weibliche und männliche Wildtyp-Gonozoiden besitzen eine Körperachse die vertikal von horizontalen Stolonen ausgerichtet ist. Gonozoiden tragen apikal ein dichtes Büschel kurzer kapitarter-Tentakel, die den Kopfbereich lückenlos bedecken. Während Wildtyp-Gastrozoide frei von Verzweigungen ihrer Hauptachse sind, tragen Gonozoiden zu Gonophoren reduzierte Medusoide und besitzen demnach sekundäre Körperachsen (Abb.60 A). Zellen im Bereich der auswachsenden, sekundären Achsen und in auswachsenden Gonophoren-Knospen zeigten eine besonders intensive GFP-Ras2(Q67V)-Fluoreszenz (Abb.60 D). Die Identität der sekundär gebildeten

Achsen war nicht einheitlich (Abb.60, B und C). So gab es transgene Gonozoiden, die zusätzliche Körperachsen mit Gonozoid-Identität ausbildeten, sowie Gonozoiden, bei denen es zu einem Auswachsen einer oder mehrerer Achsen mit Gastrozoid-Identität kam (Abb.60 C). Nachdem die erste zusätzliche Körperachse basal unterhalb der Gonophoren-Knospen entstanden ist, bildete sich an dem zweiten neu entstandenen Polypen unterhalb dessen Knospungszone eine weitere Achse. So wurden zum Teil Polypen mit bis zu fünf Körperachsen beobachtet.

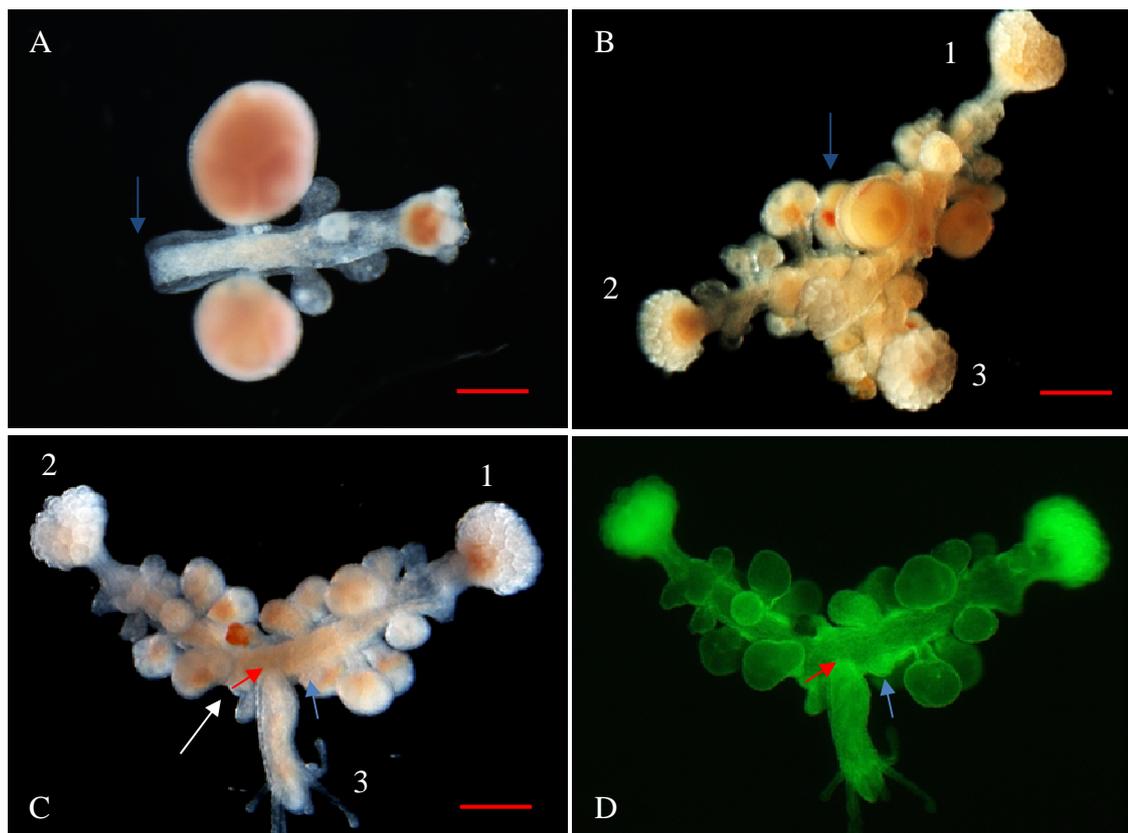


Abb.60 Sekundäre Körperachsen in transgenen, weiblichen GFP-Ras2(Q67V)-Gonozoiden

A: Weiblicher Wildtyp-Gonozoid von *Hydractinia*. Der Gonozoid hat eine Körperachse mit seitlich abgehenden Gonophoren. Der blaue Pfeil markiert die Trennstelle, an der der Gonozoid ehemals Kontakt zur Stoloplatte hatte.

B: Weiblicher Gonozoid einer transgenen, GFP-Ras2(Q67V)-Kolonie von *Hydractinia*. Der Gonozoid hat zwei zusätzliche Körperachsen mit Gonozoid-Identität (primäre Körperachse 1, sekundäre 2 und tertiäre Körperachse 3). Der blaue Pfeil markiert die ungefähre Position der Trennstelle an der der Gonozoid ehemals Kontakt zur Stoloplatte hatte. Der basale Stumpf ist verdeckt.

C: Weiblicher transgener GFP-Ras2(Q67V)-Gonozoid. Anders als in B) gibt es eine tertiäre Achse mit Gastrozoid-Charakter (3) (primäre Achse 1, sekundäre 2 und tertiäre Körperachse 3). Der weiße Pfeil markiert die ungefähre Position der Trennstelle, an der der Gonozoid ehemals Kontakt zur Stoloplatte hatte.

D: GFP-Ras2(Q67V)-Fluoreszenz ist vor allem im Bereich der Basis zusätzlicher Körperachsen (roter Pfeil, C und D) und im Bereich auswachsender Gonophoren-Knospen des in C gezeigten Gonozoiden sichtbar (blauer Pfeil, C und D).

Der Größenstandard in A entspricht 150 μm , in B und C 200 μm .

Die zusätzlich gebildeten Gastrozoide waren in der Lage, mit ihren endständigen Tentakeln Nahrung zu fangen und in ihrem Gastralraum zu verdauen. Dies spricht dafür, dass die zusätzlich gebildeten Körperachsen sich nicht nur im Aussehen, sondern auch in der Funktion zu

Gastrozoiden entwickelten. Inwieweit verdaute Nahrung, die in Wildtyp-Gastrozoiden über das Stolon-Netzwerk der gesamten Kolonie zur Verfügung gestellt wird, auch in diesem Fall der gesamten Kolonie zur Verfügung gestellt wurde, konnte hier nicht geklärt werden. Ob der beschriebene Phänotyp mehrachsiger Gonozoiden auf weibliche Gonozoiden beschränkt war oder ob es vergleichbare Phänotypen in männlichen Gonozoiden gab, konnte hier ebenfalls nicht geklärt werden, da es nicht gelang, männliche Kolonien zu erzeugen, was, wie bereits erwähnt, dem erneuten Verlust heranwachsender Kolonien durch Pilzinfektionen geschuldet war.

3.4.4 Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen Ras-Protein gesteuerten Signalwegen und dem kanonischen Wnt-Signalweg in *Hydractinia echinata*

Plickert und Kollegen haben gezeigt, dass Wnt-Signale in *Hydractinia* an der Festlegung von Körperachsen beteiligt sind (Plickert et al., 2006). Einen pharmakologischen Ansatz, den Wnt-Signalweg zu aktivieren, bietet die Behandlung von *Hydractinia* mit Paullonen oder Lithium. Paullone und Lithium fungieren dabei als Inhibitoren für die „glycogen synthase kinase 3 β “ (GSK3 β) (Kunick et al., 2004; Müller et al., 2007). In *Hydractinia* führt die Behandlung mit Paullonen oder Lithium zur Ausbildung zusätzlicher Körperachsen sowohl in Gastro- als auch Gonozoiden (Müller et al., 2007). Die Kinase GSK3 β phosphoryliert β -Catenin wonach dieses im Proteasom abgebaut wird. β -Catenin ist ein Protein das, wenn es im Zytoplasma der Zelle nicht phosphoryliert vorliegt, für die Weiterleitung von Wnt-Signalen verantwortlich ist (Espada et al., 1999). Wenn die Kinase GSK3 β durch Paullone oder Lithium inhibiert wird, wird der Wnt-Signalweg somit aktiviert.

Zwischen Ras-Protein gesteuerten Signalwegen und Wnt-Signalwegen konnte in der Vergangenheit eine Verbindung gezeigt werden. Bei einer Aktivierung des Ras-Signalwegs über PI3K kommt es zu einer Lokalisation und Stabilisierung von β -Catenin im Zytoplasma der Zelle (Espada et al., 1999; Li et al., 2005). Eine konstitutive Aktivierung von K-Ras zeigte in HeLa und Caco-2 Zelllinien, dass es im Zuge dieser Aktivierung von Ras PI3K-abhängig zu einer Inhibierung der GSK3 β -Kinaseaktivität kommt (Li et al., 2005; Steelman et al., 2011).

Auch für TC21-Proteine ist bekannt, dass diese PI3K-gesteuerte Signalkaskaden induzieren können (Rosario et al., 2001). Ob und in wieweit TC21-Proteine einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg ausüben, ist jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die gezeigten mehrachsigen Phänotypen (3.4.3.9), die in transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonien

beobachtet wurden, im Zusammenhang mit einer GFPRas2(Q67V) induzierten Aktivierung des Wnt-Signalwegs stehen. Untersucht wurden die Expressionsprofile der am Wnt-Signalweg beteiligten Gene *Wnt3*, *Brachyury*, β -*Catenin* und *TCF* (Arnold et al., 2000; MacDonald et al., 2009). Im Vergleich zu cDNA aus einer Wildtyp-Kolonie wurden entsprechend präparierte cDNAs aus je einer GFPRas1(Q67V)- und einer GFPRas2(Q67V)-Kolonie für die quantitative PCR eingesetzt.

Abb.61 A zeigte, dass in einer aus einer GFPRas1(Q67V) transgenen Kolonie gewonnenen cDNA, die relative Expression von *Wnt3*-Transkripten im Vergleich zu einer Wildtyp-Kolonie zirka 2,7 fach erhöht war. Die relative Expression von *Brachyury* Transkripten war hingegen um 25% reduziert (Abb.61 B). Für β -*Catenin* zeigte sich eine 60% ige Reduzierung der relativen Expression (Abb.61 C). Auch die relative Expression von *TCF* war verringert (Abb.61 D). Die Analyse zeigte eine 55% ige Reduzierung der relativen Expression im Vergleich zum Wildtyp.

Im Vergleich dazu ließ sich feststellen, dass auch in der Ras2(Q67V)-Kolonie die relative Expression von *Wnt3* zirka um das 2,4 fache erhöht war (Abb.62 A). Im Gegensatz zur transgenen Ras1-Kolonie war hier auch die Expression von *Brachyury* 1,5 fach erhöht (Abb.64 B). Die relative Expression von β -*Catenin* (Abb.62 C) und *TCF* (Abb.62 D) änderte sich im Vergleich zum Wildtyp nicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in GFPRas1(Q67V)-cDNA gezeigt werden konnte, dass es zu einer gesteigerten Expression von *Wnt3* und einer gleichzeitig verringerten Expression von *Brachyury*, β -*Catenin* und *TCF* auf Transkriptionsebene im Vergleich zum Wildtyp kommt. In GFPRas2(Q67V)-cDNA, die aus einer Kolonie gewonnen wurde die den mehrachsigen Phänotyp in Gonozoiden zeigte, gab es im Vergleich zum Wildtyp eine Hochregulierung von *Wnt3* und *Brachyury* auf Transkriptionsebene. Die relative Expression von β -*Catenin* und *TCF* blieb hier im Vergleich zum Wildtyp konstant.

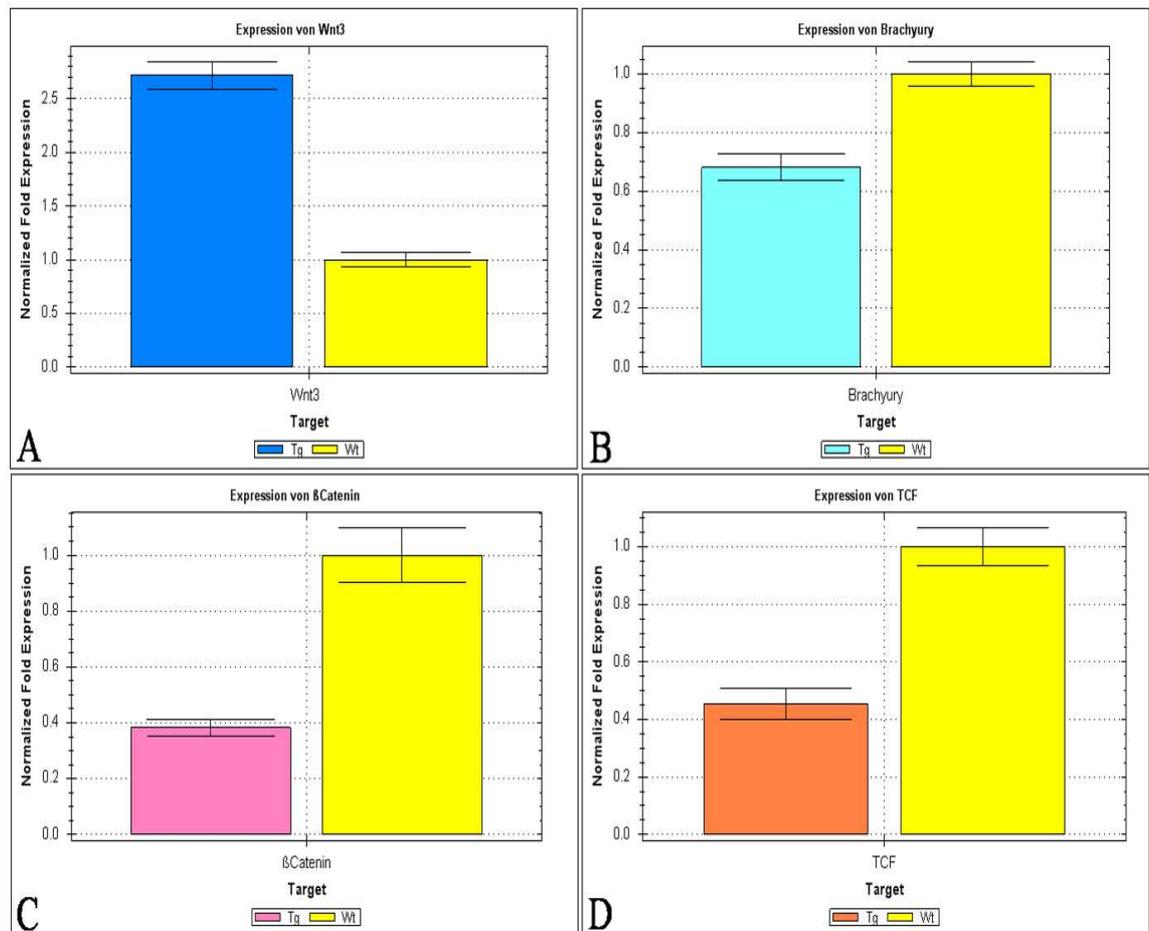


Abb.61 Vergleich der relativen Expression von Transkripten am Wnt-Signalweg beteiligter Gene in cDNA einer transgenen GFPRas1(Q67V)-Kolonie und im Wildtyp.

Die relative Häufigkeit eines untersuchten Transkripts in cDNA wurde relativ zur, mit „eukaryotic elongation factor 2“ (EEF2) (Fedrigo et al., 2010), normierten Wildtyp-Kontrolle in einem Balkendiagramm zusammen mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Grafik beruht auf aus Dreifachbestimmungen erzeugten Daten, wobei die qPCR dreimal unabhängig voneinander durchgeführt wurde. Als Berechnungsgrundlage der dem Diagramm zugrunde liegenden Daten diente die so genannte $\Delta\Delta C_t$ -Methode; die gezeigte Grafik wurde mit der „CFX Manager™“ Software erzeugt.

A: In blau ist die Expression von *Wnt3*-Transkripten in einer GFPRas1(Q67V)-cDNA dargestellt.

B: In hellblau dargestellt ist die Expression von *Brachyury*-Transkripten in einer transgenen GFPRas1(Q67V)-cDNA.

C: In pink ist die Expression von β -*Catenin*-Transkripten in einer GFPRas1(Q67V)-cDNA dargestellt.

D: In orange ist die Expression von *TCF*-Transkripten in GFPRas1(Q67V)-cDNA dargestellt.

In gelb ist jeweils im Vergleich die Expression der entsprechenden Transkripte im Wildtyp dargestellt. Deren Expression ist auf den Wert 1 normiert.

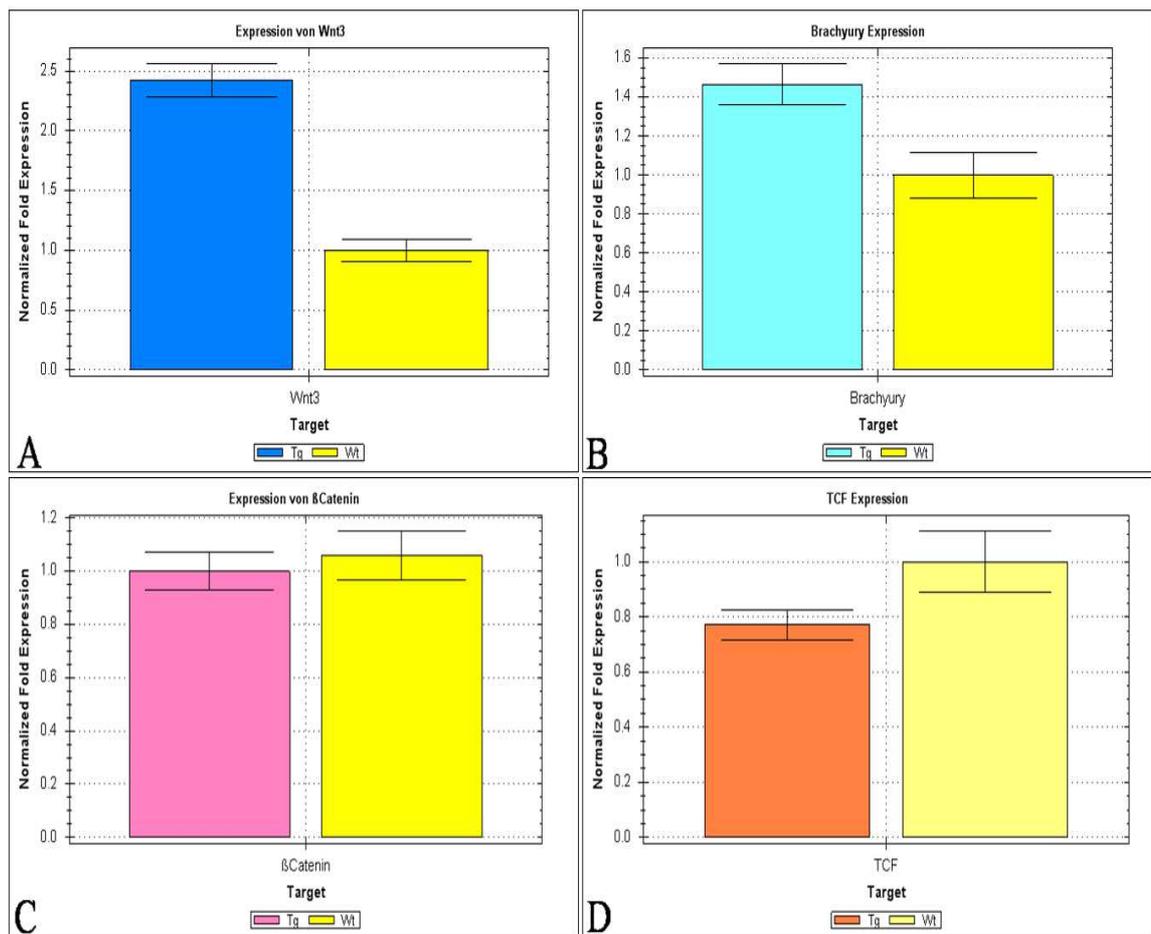


Abb.62 Vergleich der relativen Expression von Transkripten am Wnt-Signalweg beteiligter Gene in cDNA aus einer transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonie und im Wildtyp

Die relative Häufigkeit eines untersuchten Transkripts in cDNA wurde relativ zur, mit „eukaryotic elongation factor 2“ (EEF2) (Fedrigo et al., 2010), normierten Wildtyp-Kontrolle in einem Balkendiagramm zusammen mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Grafik beruht auf aus Dreifachbestimmungen erzeugten Daten, wobei die qPCR dreimal unabhängig voneinander durchgeführt wurde. Als Berechnungsgrundlage der dem Diagramm zugrunde liegenden Daten diente die so genannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode; die gezeigte Grafik wurde mit der „CFX Manager™“ Software erzeugt.

A: In blau ist die Expression von *Wnt3*-Transkripten in einer GFPRas2(Q67V)-cDNA dargestellt.

B: In hellblau dargestellt ist die Expression von *Brachyury*-Transkripten in einer transgenen GFPRas2(Q67V)-cDNA.

C: In pink ist die Expression von β -*Catenin*-Transkripten in einer GFPRas2(Q67V)-cDNA dargestellt.

D: In orange ist die Expression von *TCF*-Transkripten in GFPRas2(Q67V)-cDNA dargestellt.

In gelb ist jeweils im Vergleich die Expression der entsprechenden Transkripte im Wildtyp dargestellt. Deren Expression ist auf den Wert 1 normiert.

3.4.5 Vergleichende Transkriptom-Analyse in einer transgenen GFPRas1-(Q67V)-, GFPRas2(Q67V)- und in einer Wildtyp-Kolonie

Aus einer transgenen GFPRas1(Q67V), einer transgenen GFPRas2(Q67V) und aus einer in ihrem Entwicklungsstand mit den beiden anderen Kolonien vergleichbaren Kolonie wurde total RNA gewonnen (Tab.22). Im „cologne center for genomics“ wurden Illumina-HighSeq-Reads

erzeugt. In Kooperation mit Phillip Schiffer wurden die Daten bioinformatisch weiterverarbeitet (3.5.2). Eine „heatmap“ zeigte deutliche Unterschiede in der relativen Gen-Expression in transgenen GFPRas1(Q67V)- und GFPRas2(Q67V)-Kolonien im Vergleich zum Wildtyp (Abb.63).

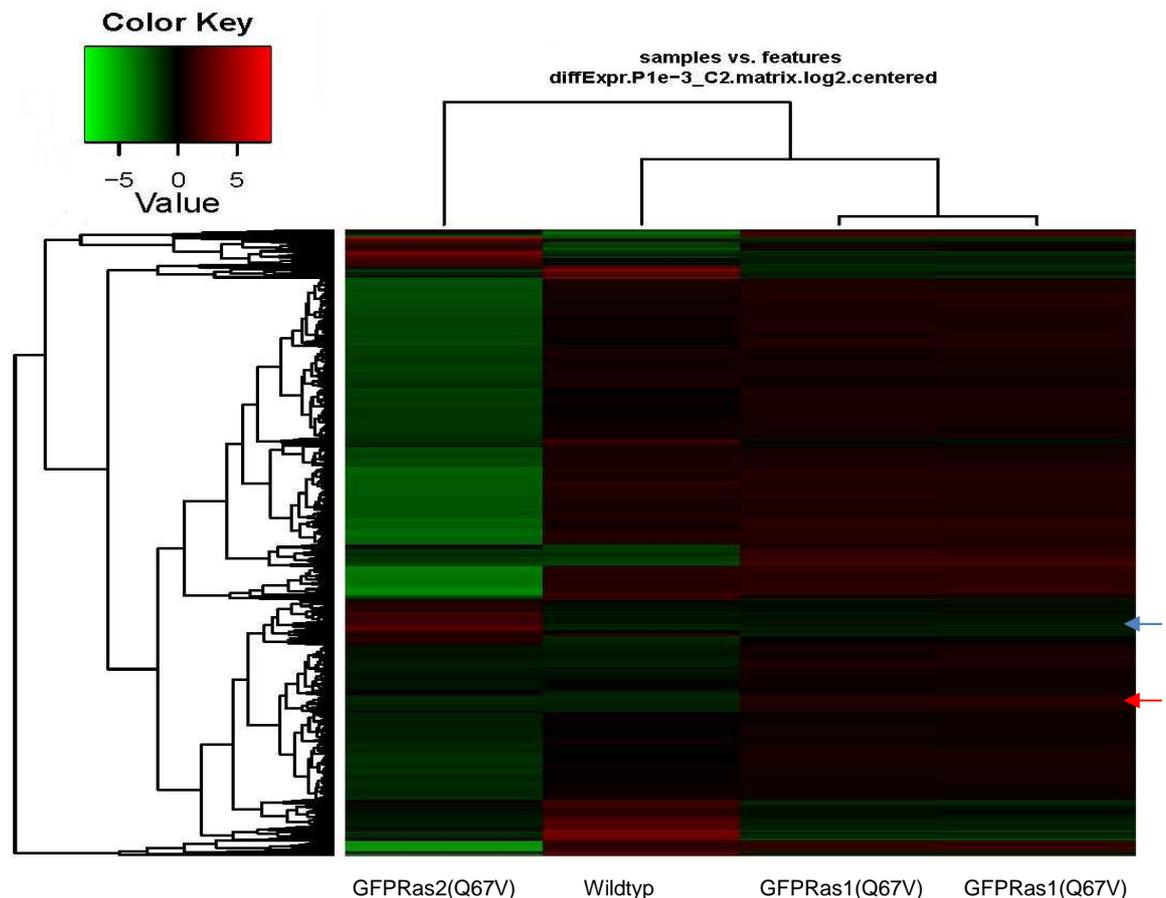


Abb.63 "heatmap" der Illumina-HighSeq-Reads

Dargestellt ist die relative Expression von Genen in einer transgenen GFPRas1(Q67V)-, einer GFPRas2(Q67V)-Kolonie und in einer Wildtyp-Kolonie. RNA von GFPRas1(Q67V) wurde als Duplikat ausgewertet. In der „heatmap“ ist in grün eine verminderte, in rot eine erhöhte und in schwarz eine unveränderte Expression dargestellt. In den einzelnen „clustern“ sind Gene entsprechend ihrer Expressionsstärke zusammengruppiert. Der rote Pfeil markiert ein „cluster“ in dem die Expression von Genen in der GFPRas1(Q67V)-Kolonie im Vergleich zur Wildtyp- und zu einer GFPRas2(Q67V)-Kolonie stärker ist. Der blaue Pfeil markiert ein „cluster“ in dem die Expression von Genen in GFPRas2(Q67V)-RNA im Vergleich zur Wildtyp- und zu GFPRas1(Q67V)-RNA stärker ist. Die Abbildung wurde mit der Trinity-pipeline (Trinity r201440413p1) erzeugt.

In der transgenen Ras2-Kolonie waren im Vergleich zum Wildtyp und zu der transgenen Ras1-Kolonie viel mehr Gene runter reguliert (grüne Bereiche). Es existierten jedoch auch „Genclustern“, die eine Hochregulierung zeigten (roter Bereich). Die GFPRas1(Q67V)-Kolonie wurde hier als Duplikat ausgewertet. Bei den Duplikaten zeigte sich ein konsistentes Muster, was einen Beleg für eine gute Reproduzierbarkeit der Sequenzierung und Bioinformatik darstellte. Im Expressionsmuster unterschied sich die GFPRas1(Q67V)-Kolonie jedoch nicht so stark vom

Wildtyp wie es für die Ras2-Kolonie der Fall war. Jedoch gab es auch hier „cluster“, die gegenüber dem Wildtyp eine Hoch- und Abregulation von Genen zeigten.

Um zu analysieren welche Gene in den farbigen Markierungen der „heatmap“ dereguliert sind, wurden diese Gene mit der „triannotate-pipeline“ annotiert. Einzelne „cluster“ aus der „heatmap“ wurden hier im Folgenden exemplarisch genauer untersucht. Hierzu wurde ein „cluster“ (cluster 3) gewählt in dem Gene gruppiert sind, deren Expression in der transgenen Ras1-Kolonie im Vergleich zur Wildtyp- und zu der transgenen Ras2-Kolonie verstärkt ist (Abb.63; roter Pfeil). Zudem wurde ein „cluster“ (cluster 10) gewählt, in dem Gene gruppiert sind; deren Expression in der transgenen Ras2-Kolonie im Vergleich zur Wildtyp- und zu der transgenen Ras1-Kolonie verstärkt ist (Abb.63; blauer Pfeil). Beide untersuchte „cluster“ konnten zusätzlich in Graphenform dargestellt werden (Abb.64; Abb.65).

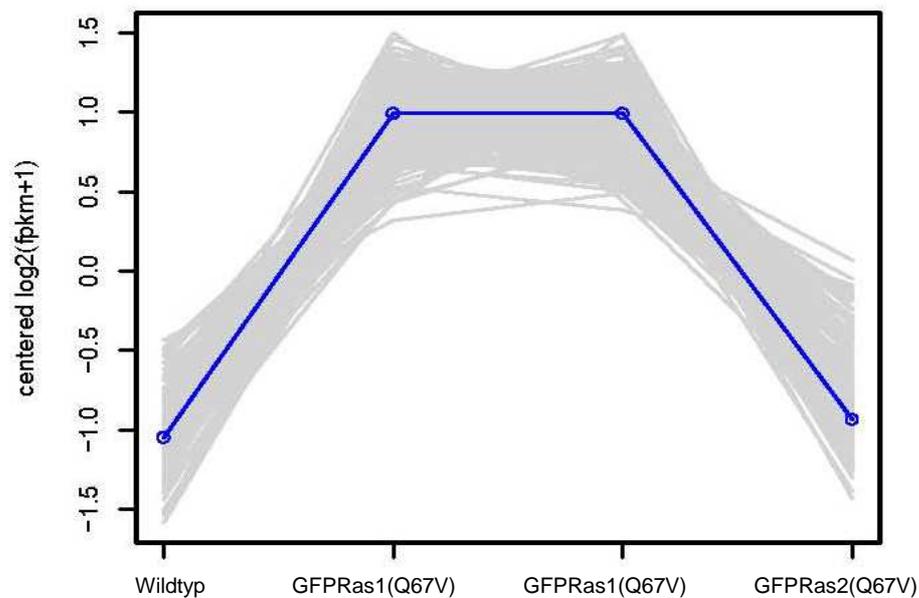


Abb.64 Relative Expression der gleichen Gene in einer GFPRas1(Q67V)-, GFPRas2(Q67V)- und in einer Wildtyp-cDNA („cluster 3“)

Die Abbildung wurde mit der Trinity-pipeline (Trinity r201440413p1) erzeugt.

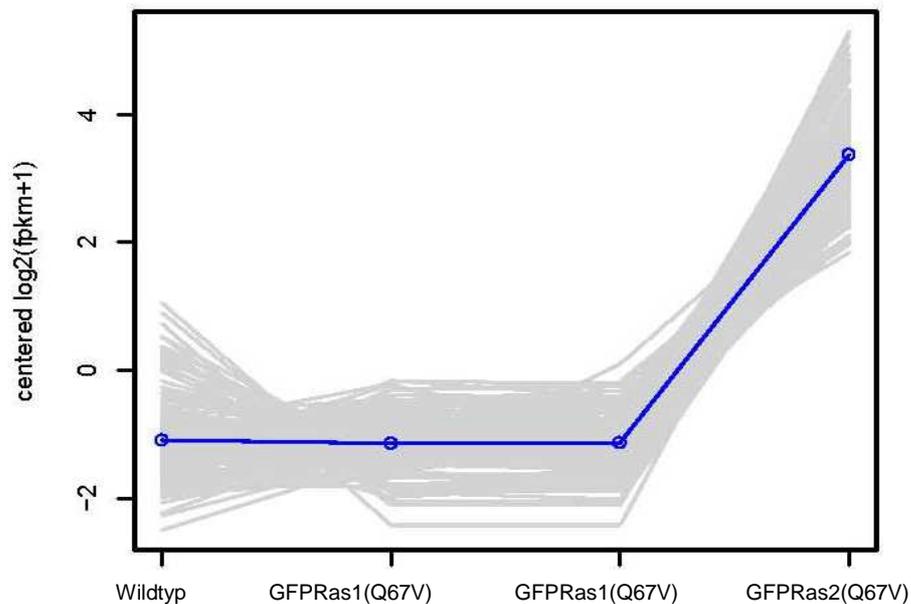


Abb.65 Relative Expression der gleichen Gene in einer GFPRas1(Q67V)-, einer GFPRas2(Q67V)- und in einer Wildtyp-cDNA („cluster“ 10)

Die Abbildung wurde mit der Trinity-pipeline (Trinity r201440413p1) erzeugt:

In den Tabellen 31 und 32 sind hier exemplarisch einige der automatisch annotierten Gene aus den „cluster“ 3 und 10 dargestellt.

Automatisch annotierte Gene aus „cluster 3“ (Gene sind in der GFPRas1(Q67V)-Kolonie im Vergleich zum Wildtyp und zu der GFPRas2(Q67V)-Kolonie hochreguliert)

Identifikationsnummer in Trinity „cluster 3“	„trinotate-pipeline“ Annotierung	„accession“ Nummer bei NCBI
c159_g1_i1	Ras-like GTP-binding protein Rho1; Drosophila	sp P48148
c1968_g1	transport protein Sec61 subunit beta; Pongo	sp Q5RB31
c1988_g1	complement component 1 Q subcomponent-binding protein; Bos	sp Q3T0B6
c2827_g1	phosphoglycerate mutase 1; Gallus	sp Q5ZLN1
c6592_g1	thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain-containing protein 3; Mus	sp Q9D0B5
c8992_g1	nucleoplasmin-like protein ANO39 Patiria	sp Q9NLA3
c13419_g1	caveolin-1; Rhinolophus	sp Q2IBC1
c14451_g1	elongation factor 1-beta; Artemia	sp P12262

c13268_g1	apolipoprotein D; Mus	sp P51910
c17546_g1	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin; Drosophila	sp Q9W1V3
c17746_g1	CCHC-type zinc finger protein CG3800; Drosophila	sp Q8T8R1
c20640_g1	Serine/arginine-rich splicing factor 7; Mus	sp Q8BL97
c22351_g1	translationally-controlled tumor protein homolog; Plutella	sp Q60FS1
c22432_g1	CCAAT/enhancer-binding protein alpha; Homo	sp P49715
c26482_g1	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa; Bos	sp Q1RMR2
c27952_g1	probable NADH dehydrogenase [ubiqui- none] 1 alpha subcomplex subunit 12; Caenorhabditis	sp Q9N2W7
c30680_g1	myosin light chain kinase 3; Homo	sp Q32MK0
c30956_g1	T-complex protein 1 subunit epsilon; Homo	sp Q68FQ0
c31741_g1	histone H2A.v; Drosophila	sp P08985
c32592_g1	GTP-binding nuclear protein Ran; Dro- sophila	sp Q9VZ23
c33051_g1	prohibitin-2; Mus	sp Q35129
c35222_g1	SUMO-activating enzyme subunit 1; Danio	sp Q6IQS6
c35994_g1	glutathione S-transferase 1, Anopheles	sp Q93112
c36121_g2	PDZ and LIM domain protein Zasp; Drosophila	sp A1ZA47
c36649_g1	Acyl-CoA-binding protein homolog; Drosophila;	sp P42281
c39042_g1	transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3; Mus	sp P82198
c39524_g1	Nidogen-2; Mus	sp O88322
c41740_g1	ELAV-like protein 1; Mus;	sp P70372
c42624_g3	von Willebrand factor A domain- containing protein 7; Homo	sp Q9Y334
c43223_g1	cytochrome c oxidase subunit 5A, Oto- lemur	sp B0VYY3

Tab.31 Automatische Annotationen aus „cluster 3“

In der Tabelle sind automatisch annotierte Gene mit ihrer Transkriptom-Identifikationsnummer in der linken Spalte angegeben. In der mittleren Spalte ist im Rahmen der automatischen Annotation der Name eines möglichen Homolog und der Namen des Organismus, aus dem das Homolog stammt, gezeigt. In der rechten Spalte ist die NCBI Accession Nr. des möglichen homologen Proteins angegeben.

Automatisch annotierte Gene aus „cluster 10“ (Gene sind in der GFPRas2(Q67V)-Kolonie im Vergleich zum Wildtyp und zu der GFPRas1(Q67V)-Kolonie hochreguliert)

Identifikationsnummer in Trinity „cluster 10“	„Trinnotate-Pipeline“ Annotierung	„accession „Nummer bei NCBI
c180_g1	tubulin alpha-1C chain; Mus	sp P68373
c8345_g1	cytochrome c oxidase subunit 2; Artemia	sp Q37706
c18357_g1	dickkopf-related protein 3; Gallus	sp Q90839
c22384_g1	kelch-like protein diablo; Aedes	sp Q16RL8
c23167_g1	homeobox protein Hox-A3; Heterodontus	sp Q9IA21
c36173_g1	cytochrome b; Artemia	sp Q37713
c40266_g1	serine/threonine-protein kinase mos; Patiria	sp Q9GRC0
c43351_g1	dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1; Danio	sp O57460
c51593_g1	dual specificity protein kinase Ttk; Danio	sp Q8AYG3
c84079_g1	protein max; Rattus	sp P52164

Tab.32 Automatische Annotationen aus „cluster 10“

In der Tabelle sind automatisch annotierte Gene mit ihrer Transkriptom-Identifikationsnummer in der linken Spalte angegeben. In der mittleren Spalte ist im Rahmen der automatischen Annotation der Name eines möglichen Homologs und der Namen des Organismus, aus dem das Homolog stammt, gezeigt. In der rechten Spalte ist die NCBI Accession Nr. des möglichen homologen Proteins angegeben.

In Tabelle 31 sind hierbei *Hydractinia* Gene mit ihrer Transkriptom-Identifikationsnummer angegeben, die in einer GFPRas1(Q67V)-Kolonie im Vergleich zum Wildtyp und zu einer GFPRas2(Q67V)-Kolonie auf Transkriptionsebene hochreguliert sind. In Tabelle 32 sind hingegen mögliche *Hydractinia* Gene angegeben, die in einer GFPRas2(Q67V)-Kolonie im Vergleich zum Wildtyp und zu einer GFPRas1(Q67V)-Kolonie auf Transkriptionsebene hochreguliert sind.

4 Diskussion

4.1 Ras-Proteine in *Hydractinia echinata*

In *Hydractinia* wurden im Zuge dieser Arbeit zwei Proteine charakterisiert, die der Familie der Ras-Proteine zugeordnet wurden (3.1). Die *Hydractinia* Ras-Sequenzen wurden auf Basis von *Hydra vulgaris* Ras (Bosch et al. 1995) sowie genau charakterisierter Ras-Sequenzen des Menschen identifiziert. Bosch und Kollegen haben in *Hydra vulgaris* zwei mögliche Ras-Proteine beschrieben, wobei sie diese keiner Subfamilie der Ras-Proteine näher zugeordnet haben. Aus Vertebraten sind drei klassische Ras-Gene bekannt, die für vier unterschiedliche Ras-Proteine kodieren (Barbacid et al., 1987; Colicelli et al., 2004, Karnoub et al., 2008). Im Transkriptom von *Hydractinia* wurde nicht nur mit *Hydra vulgaris* Ras-Sequenzen, sondern auch mit H-, K- und N-Ras-Sequenzen des Menschen nach möglichen *Hydractinia* Ras-Proteinen gesucht. Die Entscheidung, menschliche Sequenzen mit einzubeziehen, beruhte darauf, dass Ras-Proteine und Ras gesteuerte Signalwege aufgrund der Beteiligung von Ras an der Entstehung von Tumoren in Vertebraten umfassend untersucht wurden. Da Ras-Onkogene im Menschen in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wurden, wurden ihre Funktionsweise und ihre Charakteristiken zudem gerade im Menschen eingehend analysiert (Bos et al., 1989; Fernandez-Medarde et al., 2011). Für den Stamm der Cnidarier, die den ältesten Stamm der Eumetazoa repräsentieren, wurde zudem häufig beobachtet, dass deren Gene eine größere Ähnlichkeit zu Vertebraten-Genen als beispielsweise zu den Genen von Nematoden oder Arthropoden aufweisen (Kortschak et al., 2004; Plickert et al., 2012). Dies war ein weiterer Beweggrund bei der Analyse auch auf Vertebraten-Sequenzen und nicht auf Ras-Sequenzen anderer niederer Organismen zurückzugreifen.

Eine BLAST-Analyse mit den identifizierten *Hydractinia* Ras-Sequenzen in NCBI zeigte für *Hydractinia* Ras1 eine qualitativ höhere Homologie zu bekannten klassischen Ras-Proteinen anderer Organismen. Für *Hydractinia* Ras2 hingegen ergab sich eine qualitativ höhere Homologie zu RRas2(TC21)-Proteinen anderer Organismen. Sowohl die klassischen Ras-Proteine als auch RRas2(TC21)-Proteine werden der Familie der Ras-Proteine zugeordnet, wobei RRas2(TC21) einer anderen Subfamilie zugeordnet wird. RRas2(TC21)-Proteine sind sowohl funktionell als auch in ihrer Sequenz-Charakteristik eng mit klassischen Ras-Proteinen verwandt (Colicelli et al., 2004).

Der Vergleich der *Hydractinia* Ras-Sequenzen mit *Hydra vulgaris* Ras1 und Ras2, H-, K- und N-Ras sowie mit RRas2(TC21) des Menschen machte deutlich, dass für die Funktion von Ras-Proteinen wichtige Sequenzbereiche auch in den beiden *Hydractinia* Ras-Proteinen konserviert

vorhanden sind (3.1.1, Abb.6). In *Hydractinia* Ras1 und Ras2 sind G-Box-Motive in hohem Maße im Vergleich zu klassischen Ras-Proteinen der Vertebraten, aber auch zu RRas2(TC21)-Proteinen, konserviert. Von den G-Motiven ist bekannt, dass sie essentiell für die Funktion von Ras-Proteinen als molekulare Schalter sind. Als solche wechseln Ras-Proteine zwischen einem GTP-gebundenen, aktiven und GDP-gebundenen, inaktiven Zustand (Bourne et al., 1991; Colicelli, 2004). Neben den G-Motiven konnte in beiden *Hydractinia* Ras-Sequenzen zudem ein CAAX-Motiv identifiziert werden. Dieses Motiv ist essentiell für die Membranlokalisierung von Ras-Proteinen (Karnoub et al., 2008). Auch in RRas2(TC21)-Proteinen sind die beschriebenen Sequenzmotive hoch konserviert (Reid et al., 2004; Alarcon et al., 2012). Aufgrund in hohem Maße konservierter Aminosäuren in Sequenzbereichen, die aus klassischen Ras-Proteinen und RRas2(TC21)-Proteinen anderer Organismen als funktionelle Bereiche charakterisiert sind, ist es mehr als wahrscheinlich, dass auch *Hydractinia* Ras1- und Ras2-Proteine vergleichbare Eigenschaften besitzen. Ohne biochemische Untersuchungen, die die Bindung von GTP an Ras (Rojas et al., 2003), die Hydrolyse von GTP zu GDP (Shutes et al., 2006) oder aber die Bindung von Effektormolekülen an *Hydractinia* Ras-Proteine zeigen (Lee et al., 2013), kann ein endgültiger Beweis an dieser Stelle jedoch nicht erbracht werden. Der hohe Grad an Sequenzhomologie zwischen den klassischen Ras-Proteinen und RRas2(TC21) des Menschen machte es unmöglich, alleine anhand eines Sequenzvergleiches *Hydractinia* Ras1 oder Ras2 der Subfamilie der klassischen Ras-Proteine oder aber RRas2(TC21) zu zuordnen.

Aus diesem Grund wurde eine phylogenetische Analyse (3.1.2, Abb.8) der *Hydractinia* Ras-Proteine durchgeführt. In die Analyse wurden sowohl charakterisierte klassische Ras-Proteine anderer Organismen, sowie RRas2(TC21)-Proteine mit einbezogen. Die Gruppierung der *Hydractinia* Ras-Proteine innerhalb des Phylogramms bestätigte die Eindrücke der BLAST-Analyse mit *Hydractinia* Ras-Proteinen in NCBI. Diese hatte, wie bereits erwähnt, für *Hydractinia* Ras1 eine qualitativ höhere Homologie zu bekannten klassischen Ras-Proteinen und für *Hydractinia* Ras2 eine qualitativ höhere Homologie zu RRas2(TC21)-Proteinen anderer Organismen ergeben. *Hydractinia* Ras1 und auch Ras1 von *Hydra vulgaris* gruppieren in einem Hauptast, in dem klassische Ras-Proteine der Vertebraten eigene Zweige bilden. Auch Ras1-Proteine von Insekten gruppieren in diesem Hauptast. In Insekten wie *Drosophila melanogaster* sind zwei Ras-Gene bekannt, die als Ras1 und Ras2 bezeichnet wurden. Auch Ras1 von *Drosophila* wird eher den klassischen Ras-Proteinen der Vertebraten zugeordnet, wo hingegen Ras2 von *Drosophila* eher den RRas2(TC21)-Proteinen der Vertebraten zugeordnet wird (Salzberg et al., 1993; Alarcon et al., 2012). Diese Zuordnung zu RRas2(TC21)-Proteinen trifft, in Bezug auf die phylogenetische Analyse, auch am ehesten auf *Hydractinia* Ras2 zu. *Hydractinia* Ras2

gruppiert zusammen mit *Hydra vulgaris* Ras2 in einem Zweig eines Hauptastes, in dem auch RRas2(TC21)-Sequenzen der Vertebraten und Ras2-Sequenzen von Insekten Äste bilden.

Diese Zuordnung von *Hydractinia* Ras1 und Ras2 zeigt, dass es bereits in dem entwicklungs-geschichtlich gesehen alten Stamm der Cnidarier zwei eng miteinander verwandte GTPasen der Ras-Familie gibt. Der Gedanke liegt somit nahe, dass sich im Verlauf der Evolution aus einem eher zu dem Ras1-Protein von *Hydractinia* verwandten Protein, die klassischen H-, K- und N-Ras-Proteine der Vertebraten entwickelt haben.

4.2 Expression von *Hydractinia echinata* Ras1 und Ras2

Durch in situ-Hybridisierung wurde mit *Hydractinia* Ras1- und Ras2-Sonden das mRNA-Expressionsmuster in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Hydractinia* untersucht. Das Expressionsmuster wurde in 24 Stunden alten Embryonen, 72 Stunden alten Planula-Larven, Primär-Polypen, adulten Gastrozoiden, sowie weiblichen und männlichen Gonozoiden untersucht. mRNAs beider Ras-Varianten wurden in 24 Stunden alten Embryonen ubiquitär sowohl im Entoderm als auch im Ektoderm exprimiert. Die Stärke der Expression zeigte jedoch eine graduelle Zunahme bei beiden Ras-Varianten, hin zu einem Expressionsmaximum in ektodermalen Zellen im Bereich des späteren aboralen Pols (3.3; Abb.34). Auch in 72 Stunden alten Larven gab es neben der ubiquitären Verteilung beider Ras-mRNAs im Ekto- und Entoderm einen Verteilungsgradienten mit abnehmender Expressionsstärke zum Schwanzende der Planula-Larve hin. Expressionsunterschiede wurden auch hier besonders in ektodermalen Zellen erkennbar (3.3; Abb.34). In Primär-Polypen und adulten Gastrozoiden wurde ebenso eine ubiquitäre Verteilung der mRNAs beider Ras-Varianten beobachtet (3.3; Abb.35). In adulten Gastrozoiden zeigte sich neben der ubiquitären Verteilung vor allem im Bereich der Epidermis in der Mitte des Gastrozoiden ein Gürtel starker Expression. Dieses Muster ist wiederum für beide Ras-Varianten gleich (3.3; Abb.36).

Ein Expressionsmuster in Form eines proximalen Gürtels in Gastrozoiden, konnte auch am Beispiel von *Vasa* in *Hydractinia* gezeigt werden (Rebscher et al., 2008). Für *Vasa* wurde beschrieben, dass die Expression hauptsächlich im Bereich des Gürtels auf interstitielle Zellen (i-Zellen) beschränkt ist. i-Zellen, bei denen es sich um eine Form von Stammzellen handelt, die nur bei Hydrozoen bekannt sind (Frank et al., 2009), „residieren in interstitiellen Lücken an der Basis von Geweben“ (Weismann 1883; Plickert et al., 2012). Vom Aussehen her sind i-Zellen spindelförmige Zellen mit einem großen Kern. Ob es sich bei den Ras1 und Ras2 exprimierenden

Zellen in *Hydractinia* im Bereich des Gürtels auch zum Teil um i-Zellen handelt, konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Auch bei starker Vergrößerung konnten keine Zellen wahrgenommen werden, die eindeutig als i-Zellen zu identifizieren sind und in denen *Ras1*- oder *Ras2*-mRNA gezeigt werden konnte.

Vielmehr konnte mRNA beider *Ras*-Gene im Bereich des Gürtels nur in epidermalen Zellen an der Basis zur Mesogloea beobachtet werden. (3.3; Abb.36 E und F). Insgesamt ist die Expression beider *Ras*-mRNAs in Gastrozoiden in epidermalen Zellen deutlicher als in gastrodermalen Zellen. Dies zeigte sich besonders in Tentakeln der Gastrozoide, in denen so gut wie keine Expression sowohl von *Ras1*- als auch *Ras2*-mRNA in gastrodermalen Zellen detektierbar war. Interessanterweise konnte jedoch auch in Tentakeln für beide *Ras* eine graduelle Verteilung beobachtet werden (3.3; Abb.36 C und D). Von der Basis der Tentakel bis zur Spitze nimmt vor allem in der Epidermis die sichtbare Expression beider mRNAs ab. Für Gonozoiden beiderlei Geschlechts gibt es im Expressionsmuster beider *Ras*-mRNAs keine Unterschiede. Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Gonozoiden werden *Ras1* und *Ras2*-mRNA ubiquitär exprimiert (3.3; Abb.37). Es gibt jedoch auch hier, wie in Gastrozoiden, einen Gürtel stärker exprimierender Zellen, die in der Epidermis residieren. Der Bereich in dem die Zellen vorhanden sind findet sich in Gonozoiden in der Zone der Gonophoren-Knospung (Abb.37, A und B).

Die Analyse der Expressionsmuster von *Hydractinia Ras1* und *Ras2* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigte zusammengefasst, dass beide *Ras*-Varianten ubiquitär verteilt exprimiert werden. Zudem konnten in allen untersuchten Stadien von *Hydractinia* für beide *Ras* die gleichen Bereiche mit starkem mRNA-Niveau und Bereiche mit einem graduellen mRNA-Niveau gezeigt werden. Auch wurde deutlich, dass das mRNA-Niveau für beide *Ras* in Zellen der Epidermis stärker ist als in Zellen der Gastrodermis. Die Expression von *Ras1*- und *Ras2*-mRNA in einigen Zellen, Körperregionen und Gewebetypen könnte eine gesteigerte Ras-Aktivität zur Folge haben, was allerdings eine nicht naheliegende Interpretation der beobachteten Muster wäre.

Das mRNA-Niveau der *Ras*-Gene in Zellen gibt auch nicht unbedingt das Niveau translatierter Genprodukte wieder (Bar-Sagi et al., 2001). Die Translation der mRNA könnte beispielsweise im Zuge einer Translationskontrolle reguliert werden. Immunohistochemische Untersuchungen in menschlichen Geweben haben eine vergleichbare Heterogenität im Niveau von Ras-Proteinen in unterschiedlichen Geweben gezeigt (Furth et al., 1987, Bar-Sagi et al., 2001). Gleiches könnte hier auch für *Hydractinia Ras1* und *Ras2* gelten. Allerdings müssen Ergebnisse bezüglich der heterogenen Expression von *Ras1* und *Ras2* kritisch betrachtet werden. So konnte am Beispiel der Maus für H-Ras- und TC21-Proteine gezeigt werden, dass diese in Gewebeproben aus der

Niere, die während der Embryonalentwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, in einem unterschiedlichen Niveau immunohistochemisch mit Antikörpern detektiert werden konnten (Pozzi et al. 2006).

4.2.1 Behandlung von *Hydractinia echinata* mit *Ras1*- oder *Ras2*-dsRNA

Nach Inkubation mit oder Injektion von *Hydractinia Ras1*- oder *Ras2*-dsRNA konnte keine signifikante Auswirkung auf die Entwicklung von Embryonen, Planula-Larven oder Polypen beobachtet werden (3.4.1, Tab.28 und 29). Im Vergleich mit unbehandelten Tieren fiel lediglich auf, dass hohe Konzentrationen von dsRNA offenbar eine toxische Wirkung auf *Hydractinia* Embryonen haben (Tab.28 und 29).

In *Hydractinia* konnte durch Plickert et al. gezeigt werden, dass eine Injektion von *LWamid* dsRNA in Embryonen einen knock-down von *LWamid* zur Folge hat. Erst 60 Stunden nach Injektion konnte wieder eine schwache Expression von *LWamid* beobachtet werden (Plickert et al., 2003). Die Injektion von *Ras1*- oder *Ras2*-dsRNA in Embryonen zeigte keinen phänotypischen Effekt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass *Ras1* oder aber *Ras2* nach knock-down die Funktion des jeweils anderen Proteins übernimmt und somit keine Effekte beobachtet werden konnten. Für *H-Ras*^{-/-} knock out Mutanten in der Maus ist bekannt, dass diese keinen Phänotyp zeigen (Esteban et al., 2001). Dort übernimmt offenbar ein anderes Protein die Funktion von H-Ras. Die Frage ob *Ras1* oder *Ras2* die Funktion des jeweils anderen bei knock down übernimmt könnte durch einen double knock down von *Ras1* und *Ras2* in *Hydractinia* geklärt werden.

Als Kontrolle für die Inkubation mit dsRNA wurde zudem ein Experiment wiederholt, in dem durch Duffy et al. die Anwendbarkeit der Inkubation mit dsRNA als Methode zum Gen knock-down in *Hydractinia* gezeigt wurde (Duffy et al., 2010). Duffy beschreibt, dass die Inkubation von Embryonen mit *Hydractinia-TCF*-dsRNA eine phänotypische Veränderung zur Folge hat (Duffy et al., 2010). Das Experiment wurde mehrmals wie von Duffy beschrieben durchgeführt. Die beschriebenen phänotypischen Veränderungen nach einer *TCF*-dsRNA-Behandlung konnten jedoch nie beobachtet werden. Aufgrund dieser Kontrollexperimente kann in dieser Arbeit nicht davon ausgegangen werden, dass ein knock-down von *Ras* durch Inkubation gelang.

4.3 Überexpression von mutagenisiertem *Hydractinia echinata* Ras1 und Ras2

Klassische Ras-Proteine und RRas2(TC21)-Proteine können als molekulare Schalter für die gleichen Effektoren fungieren (Movilla et al., 1999; Rosario et al., 1999; Lopez-Barahona et al., 1996; Rosario et al., 2001; Rong et al., 2002; Murphy et al., 2002; Larive et al., 2012). Dabei ist die Signalweiterleitung durch RRas2(TC21)-Proteine in der Zelle bei weitem nicht so gut charakterisiert wie für die klassischen Ras-Proteine. Auch gibt es kontroverse Versuchsergebnisse, die auf der einen Seite beispielsweise eine Signalweiterleitung durch RRas2(TC21) über die RAF-MEK-ERK-Kinase-Kaskade zeigen (Rosario et al., 1999), auf der anderen Seite gibt es jedoch Versuche, die diese Signalweiterleitung verneinen (Graham et al., 1996). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die klassischen Ras-Proteine und RRas2(TC21)-Proteine zwar die gleichen Signalwege aktivieren, in der Zelle beziehungsweise im Organismus jedoch unterschiedliche Effekte hervorrufen können. So konnte in Maus-Zellkulturen gezeigt werden, dass die Expression von aktivierten RRas2(TC21)- und H-Ras-Proteinen unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum von Zellen hat (Pozzi et al., 2006). Aus Tumorgewebe unterschiedlicher Organismen und aufgrund der transformierenden Eigenschaften mutierter Ras- und auch RRas2(TC21)-Proteine in Zellkulturen sind im hohen Maße spezieübergreifend konservierte charakteristische Aminosäuren bekannt, deren Austausch zu einer konstitutiven Aktivierung von Ras-Proteinen führt (Bos 1989; Prior et al., 2012; Larive et al., 2012; Graham et al., 1994). Austausche der Aminosäuren Glycin(G12) oder Glutamin(Q61) zu Valin führen in H-, N- und K-Ras dazu, dass die Proteine in ihrem aktivierten, GTP-gebundenen Zustand verbleiben und nicht in ihren inaktiven, GDP-gebundenen Zustand überführt werden können (Pai et al., 1989; Bos et al., 1989; Graham et al., 1994; Schubbert et al., 2007). Diese charakteristischen Aminosäuren sind auch in *Hydractinia* Ras1- und Ras2-Proteinen konserviert (3.4.3; Abb.41). Mögliche aktivierende Aminosäure-Austausche wurden in *Hydractinia* Ras1 oder Ras2 (Glycin(G18V) oder Glutamin(Q67V)) eingeführt (3.4.3; Abb.42).

Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von GFP unter der Kontrolle des *Hydractinia* AktinII-Promotors (nach Mikroinjektion) in *Hydractinia* in einem breitgefächerten Spektrum bezüglich des Zelltyps mosaikartig erfolgt (Künzel et al. 2010). Durch Mikroinjektion von HeAktIIGFPRas1- und HeAktIIGFPRas2-Fragmenten sowie mutierten HeAktIIGFPRas1(G18V)-, HeAktIIGFPRas1(Q67V)-, HeAktIIGFPRas2(G18V)- und HeAktIIGFPRas2(Q67V)-Fragmenten in Embryonen wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit transgene erzeugt (3.4.3.1; 3.4.3.6). Im Zuge der Expression von aktivierten GFPRas1- oder GFPRas2-Fusionsproteinen in *Hydractinia* war eine Lokalisation der Fusionsproteine nur an Membranen,

nicht jedoch in Zellkernen zu beobachten (3.4.3.4, Abb.49 und Abb.50; 3.4.3.8 Abb.56). Frühere Versuche mit einem Fusionsprotein aus 51 N-terminalen Aktin-Aminosäuren und GFP unter der Kontrolle des AktinII (AktII)-Promotor von *Hydractinia* haben gezeigt, dass Aktin-GFP-Fusionsproteine in Zellen neben einer zytoplasmatischen Lokalisation auch in Zellkernen detektiert werden. Die Membranlokalisierung der Fusionsproteine spricht dafür, dass das CAAX-Motiv in *Hydractinia* Ras1 und Ras2 (3.1.1; Abb.6), ebenso wie CAAX-Motive aus funktionell untersuchten Ras-Proteinen anderer Organismen (Choy et al. 1999; Colicelli et al. 2004; Schubert et al. 2007), eine Membranlokalisierung von *Hydractinia* GFPRas-Fusionsproteinen hervorruft.

Dass eine N-terminale Fusion von GFP an Ras-Proteine eine Membranlokalisierung erlaubt, wurde auch schon für GFPRas-Fusionsproteine von *Bombyx mori* gezeigt (Ogura et al., 2009). Zellkerne waren dabei GFPRas frei. Die alleinige Expression von GFP zeigte hingegen eine hohe Präferenz für eine Lokalisation des Proteins in Zellkernen. Vergleichbare Beobachtungen konnten auch für Ras-Fusionsproteine in anderen Organismen gemacht werden (Eisenberg et al., 2008).

Sowohl nach Injektion von HeAktIIGFPRas1-(G18V)- oder HeAktIIGFPRas1(Q67V)- als auch von HeAktIIGFPRas2(G18V)- oder HeAktIIGFPRas2(Q67V)-Fragmenten konnte Fluoreszenz in transgenen Zellen beobachtet werden, die zusammen mit nicht transgenen Zellen mosaikartig in Gastrodermis und Epidermis auftraten (Abb.43, 44, 45, 47, 49 und 50; Abb.52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60). Der Befund einer mosaikartigen Expression deckte sich, wie bereits erwähnt, mit Expressionsmustern, die bei der Expression von AktinGFP unter dem AktinII(AktII)-Promotor von *Hydractinia* beobachtet wurden. Neue GFP exprimierende Zellen konnten nach einem Zeitraum von einer Woche auch in auswachsenden Stolonen und in Sekundär-Polypen beobachtet werden (Abb.57 und Abb.58).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass das injizierte Fragment stabil in das Genom von *Hydractinia* integriert wurde. Hierfür spricht auch, dass aus Oozyten einer transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonie nach Befruchtung mit Wildtyp-Spermien eine transgene F1-Kolonie hervorgegangen ist. In der F1-Kolonie konnte ebenfalls GFPRas2(Q67V)-Fluoreszenz in gastro- und epidermalen transgenen Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Während der Embryonalentwicklung von *Hydractinia* konnten in Transgenen keine Effekte beobachtet werden, die mit der Expression von GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)- oder von GFPRas2(G18V)- und GFPRas2(Q67V)-Fusionsproteinen in Verbindung stehen. Dies bedeutet entweder, dass *Hydractinia* Ras1 und Ras2 keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung haben, dass mögliche durch Ras1- oder Ras2-Überexpression bedingte Effekte während

der Embryonalentwicklung nicht sichtbar werden, oder aber dass das Expressions-Niveau nicht hoch genug ist.

Aus *Danio rerio* ist bekannt, dass eine starke Expression des konstitutiv aktiven Onkogens K-Ras(G12V) unter einem „hepatocyte-specific“-Promotor eine frühe Tumorgenese in der Leber und eine frühe Sterblichkeit hervorruft. Transgene Zebrafisch-Linien mit moderatem K-Ras(G12V)-Expressions-Niveau hingegen entwickeln erst relativ spät Tumore (Nguyen et al., 2012). Dieses Beispiel macht deutlich, dass auch in *Hydractinia* die Möglichkeit besteht, dass aufgrund der mosaikartigen Expression von konstitutiv aktivierten GFPRas1- oder GFPRas2-Fusionsproteinen, das Expressions-Niveau nicht ausreicht, um während der relativ kurzen Embryonalentwicklung von 72 Stunden bis zur Metamorphose-kompetenten Planula-Larve Effekte hervorzurufen.

Nach der Metamorphose dauerte es in transgenen GFPRas1(G18V)- und GFPRas1(Q67V)-Kolonien mindestens drei Wochen, bis phänotypische Effekte beobachtet werden konnten (3.4.3.3; 3.4.3.9). Bei GFPRas2(Q67V) exprimierenden Kolonien konnten Effekte bereits etwas früher beobachtet werden. Für GFPRas2(G18V) kann hier keine weitere Aussage getroffen werden, da aufgrund eines mehrmaligen Pilzbefalls keine transgenen Kolonien analysiert werden konnten.

4.3.1 Durch mutagenisiertes Ras1 erzeugter Phänotyp in *Hydractinia echinata*

Die morphologische Veränderung, die im Zuge einer Expression von mutagenisiertem *Hydractinia* Ras1(G18V) oder Ras1(Q67V) in transgenen Kolonien beobachtet wurde, war identisch (3.4.3.3, Abb.47; 3.4.3.4, Abb.49). Der gleiche Phänotyp wurde in mehreren transgenen Linien, die mit diesen zwei Konstrukten unabhängig voneinander hergestellt worden waren, beobachtet. Das lässt sich ausschließlich damit erklären, dass:

- 1) Beide durch Punktmutationen eingeführten Aminosäure-Austausche ((G18V) oder (Q67V)) *Hydractinia* GFPRas1-Fusionsproteine aktivieren können.
- 2) Die hervorgerufenen, sehr spezifisch verursachten Neoplasien durch die konstitutive Ras-Aktivität hervorgerufen wurden.

In ihrem Verhalten und ihrem morphologischen Gesamterscheinungsbild (Plickert et al., 2012) unterschieden sich transgene Ras1(G18V)- oder Ras1(Q67V)-Kolonien nicht voneinander. Die Transgene unterscheiden sich zudem, bis auf morphologisch veränderte Tentakel, auch nicht

von transgenen Kolonien, in denen Wildtyp-Ras1 überexprimiert wurde (3.4.2), oder von Wildtyp-Kolonien mit einem vergleichbaren Entwicklungsstand (3.4.3.3). Die Expression von aktiviertem Ras1 hat somit zumindest auf die Gesamtmorphologie, aber auch auf das allgemeine Wachstums- und Freß-Verhalten von *Hydractinia*, keinen erkennbaren Effekt. Morphologische Veränderungen konnten in transgenen GFPRas1(G18V)- oder GFPRas1(Q67V)-Gastrozoiden nur im Bereich der Gastrodermis von Tentakeln beobachtet werden. In Kolonien, in denen Wildtyp-Ras1 überexprimiert wurde oder in Wildtyp-Kolonien, wurde der beschriebene Phänotyp nie beobachtet. Im Bereich der Körpersäule und auch im Gastralraum transgener GFPRas1(G18V)- oder GFPRas1(Q67V)-Gastrozoide gab es sowohl in gastrodermalen als auch epidermalen Gewebeschichten keine morphologischen Veränderungen (3.4.3.4, Abb.48).

Dieses Phänomen könnte dadurch zu erklären sein, dass womöglich nur in gastrodermalen Tentakelzellen Kontrollmechanismen inaktiv sind, die in anderen Zellen von *Hydractinia* eine Ras1 bedingte Signalweiterleitung, die den beschriebenen Phänotyp zur Folge hat, verhindert. Auch könnte es sein, dass ein spezifischer Ras1 gesteuerter Signalweg in *Hydractinia* nur in gastrodermalen Tentakelzellen aktiv ist. Die Veränderungen wurden in Tentakeln sowohl an der Basis der Tentakel als auch in mittleren oder endständigen Tentakelabschnitten beobachtet (Abb.47). Deren Bildung scheint somit offenbar auf Tentakel, aber nicht auf die Position in Tentakeln beschränkt zu sein. Durch die Membranlokalisierung der Ras-Proteine und durch DAPI-Markierung von Zellkernen war es möglich, die zelluläre Identität von Zellen im Bereich einer morphologischen Veränderung näher zu untersuchen (3.4.3.4; Abb.49 und Abb.50). Anhand von Semidünnschnitten durch einen Tentakel konnte gezeigt werden, dass im Bereich eines morphologisch veränderten Tentakels die epitheliale Anordnung der Gastrodermis, aber nicht die der Epidermis, erheblich vom Wildtyp abweicht (Abb.48). In Lebendpräparaten (Abb.49) und in den Dünnschnitten konnten Zellen im Bereich der morphologischen Veränderung anhand ihrer Form als Gastrodermiszellen identifiziert werden. Es waren somit eindeutig gastrodermale Zellen, die für die Bildung der morphologischen Veränderung verantwortlich sind. Es wurde deutlich, dass in einem, von den Abmessungen her vergleichbaren morphologisch veränderten Tentakelabschnitt (Abb.48, C und D), im Vergleich zu einem Wildtyp-Tentakel mehr gastrodermale Zellen vorhanden sind. Das Muster der Anordnung dieser Zellen entsprach zudem nicht mehr dem aus dem Wildtyp bekannten Muster. Ein Großteil der Zellen im Bereich einer morphologischen Veränderung zeigte in transgenen (GFPRas1(G18V)- oder GFPRas1(Q67V)-Kolonien) Fluoreszenz an den Zellmembranen (Abb.49 und Abb.50). Neoplasien in der Gastrodermis von Tentakeln sind immer dort entstanden, wo besonders viel Fusionsprotein lokalisiert war. Es muss jedoch erwähnt werden, dass auch in der Gastrodermis der

Tentakel nicht überall, wo Fluoreszenz des Fusionsproteins beobachtet werden konnte, auch Neoplasien entstanden sind.

In morphologisch veränderten Tentakeln wurden mehrfach Zellen beobachtet, in denen zwei Zellkerne auf eine kürzlich erfolgte Mitose hindeuten (Abb.49, C und D). Die morphologisch veränderten Tentakelbereiche wurden zudem kontinuierlich größer. Beide Beobachtungen deuteten darauf hin, dass es zu Zellteilungsereignissen im Bereich der morphologischen Veränderungen in der Gastrodermis kommt. Bestätigt wurden diese Annahmen im Zuge einer S-Phase-Markierung mit EdU, einem Nucleosid-Analog zu Thymidin. Dass eine S-Phase-Markierung von Kernen mit EdU und der nachfolgende Nachweis auch in *Hydractinia* als Methode anwendbar ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal für *Hydractinia* gezeigt werden (3.4.3.5). Mit der EdU-Markierungs-Methode bietet sich neben der in *Hydractinia* etablierten BrdU/anti-BrdU-Methode (Plickert und Kroihner, 1988) eine weitere Möglichkeit, ohne großen Zeitaufwand Zellen in S-Phase zu markieren. In morphologisch veränderten Tentakeln transgener Gastrozoide konnten sowohl in der Epidermis als auch in der Gastrodermis Zellkerne in S-Phase markiert dargestellt werden (Abb.51, A, B und F). In Wildtyp-Tentakeln wurden nur vereinzelt S-Phase markierte Kerne in der Epidermis beobachtet. In gastrodermalen Zellen hingegen konnten keine S-Phase markierten Kerne detektiert werden (Abb.51, C, D und E). Die Überexpression von Ras1(G18V) oder Ras1(Q67V) in Tentakeln von Gastrozoiden hat offenbar zur Folge, dass gastrodermale Zellen in Teilung gehen. Ob es im Bereich der Körpersäule der transgenen Ras1-Gastrozoide zu erhöhter Zellteilung im Vergleich zum Wildtyp kommt, war nicht zu klären. Es war aufgrund von Schwankungen in der Anzahl S-Phase markierter Kerne von Wildtyp- zu Wildtyp-, aber auch von transgenen zu transgenen Gastrozoiden nicht möglich bezüglich der Zellzahlen exakte quantitative Daten zu ermitteln. Für die Analyse war es notwendig Gastrozoide zur selben Uhrzeit nicht gefüttert von Kolonien abzutrennen, da in *Hydractinia* bereits beobachtet wurde, dass die Proliferationsrate je nach Tageszeit und Fütterungszustand unterschiedlich ist (persönliche Mitteilung Prof. Plickert; BrdU anti-BrdU Versuche haben dies gezeigt). Dennoch gab es, wie bereits erwähnt, kein direkt vergleichbares Muster S-Phase markierter Kerne im Bereich der Körpersäule. Diese Beobachtung kann unter Umständen damit zusammenhängen, dass die mit einander verglichenen Gastrozoide nicht zu 100% den gleichen Entwicklungsstand widerspiegeln. Auch haben sie nicht zu 100% die gleiche Größe und exakt dieselbe Schnittstelle und Schnitthöhe, an der sie von einer Kolonie abgeschnitten wurden.

Die histologische sowie die Bioimaging-Analyse der Neoplasien (3.4.3.4, Abb.48, Abb.49) ergaben als typische Struktur ein spumöses Arrangement von gastrodermalen Zellen im Bereich der Anschwellung. Die dort nachgewiesene Proliferationsaktivität zwingt zu der

Schlussfolgerung, dass in diesem Bereich der üblicherweise veranlasste Zellzyklusarrest der gastrodermalen Epithelzellen aufgehoben wurde. Während diese Zellen im Wildtyp-Tentakel alle direkten Kontakt zur Mesogloea (Abb.48 D und Abb.49, A und B) haben, gab es im Bereich der morphologischen Veränderung Zellen, die den Kontakt zur Mesogloea verloren haben (Abb.50).

Zusammenfassend konnte die morphologische Veränderung in transgenen Tentakeln aufgrund der proliferierenden Zellen und des stark veränderten Musters in der Gastrodermis, welches mit dem Verlust Gastrodermis-typischer Zellkontakte einhergeht, als Neoplasie bezeichnet werden. Eine Neoplasie beziehungsweise ein Tumor ist per Definition eine Ansammlung zusätzlicher Zellen, die eine Zellmasse oder ein Gewebe bilden (Quelle: National Cancer Institute). Neoplasien oder Tumore werden hierbei in zwei Unterkategorien aufgeteilt. Man unterscheidet „Benigne“ und „Maligne“ Tumore. Benigne Tumore zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht metastasieren und auch umliegendes Gewebe und Zellen nicht zerstören (Quelle: National Institute of Health). Maligne Tumore hingegen bilden Metastasen und zerstören invasiv umliegendes Gewebe (Quelle: National Cancer Institute). Per Definition kann die durch konstitutiv aktiviertes Ras1 in *Hydractinia* induzierte Neoplasie in Tentakeln somit als Benigne Neoplasie bezeichnet werden, da keine Metastasierung und auch keine Invasion von gastrodermalen Zellen in epidermales Gewebe beobachtet werden konnte. In *Hydractinia* ist eine, im Zusammenhang mit konstitutiv aktiviertem Ras1 beobachtete, Bildung von Neoplasien besonders interessant, da aus dem Stamm der Cnidarier in der Natur keine Tumorbildungen bekannt ist. Die Ausbildung von Neoplasien durch Überexpression von aktiviertem Ras1 deutet darauf hin, dass *Hydractinia* möglicherweise einen Mechanismus besitzt, der unter natürlichen Bedingungen das Auftreten solcher Neoplasien verhindert. Eine weitere mögliche Erklärung besteht darin, dass Ras1 in der Natur in gastrodermalen Tentakelzellen nicht aktiviert wird.

4.3.2 Durch mutagenisiertes GFPRas2 erzeugter Phänotyp in *Hydractinia echinata*

Nach Überexpression von aktiviertem Ras2(Q67) in *Hydractinia* konnten keine Veränderungen beobachtet werden, die dem für aktiviertes Ras1 beschriebenen Phänotyp ähneln. Trotz der in hohem Maße konservierten Aminosäuresequenz gerade im Bereich möglicher funktioneller Domänen und Aminosäuren der Ras1- und Ras2-Proteine zeigt sich offenbar, dass die konstitutive Aktivierung beider Ras-Proteine deutlich unterschiedliche Effekte zur Folge hat.

Im Zuge einer phylogenetischen Analyse wurde Ras2 von *Hydractinia* eher den RRas2 (TC21)-Proteinen anderer Organismen zugeordnet (3.1.2). Auch ein BLAST in NCBI zeigte eine größere Sequenzhomologie zu RRas2 (TC21)-Proteinen anderer Organismen.

Von RRas2(TC21)-Proteinen ist bekannt, wie bereits mehrfach erwähnt wurde, dass auch sie Signalwege steuern können, die durch klassische Ras-Proteine gesteuert werden. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass Untersuchungen zu RRas2(TC21)-Proteinen zeigen, dass durch eine Aktivierung dieser Proteine im Vergleich zu klassischen Ras-Proteinen unterschiedliche Effekte hervorgerufen werden (Pozzi et al., 2006).

Sollte die in dieser Arbeit erwogene Zuordnung von *Hydractinia* Ras2 zu RRas2(TC21)-Proteinen anderer Organismen nicht zutreffend sein und Ras2 würde doch der Subfamilie der klassischen Ras-Proteine zugeordnet, so würden unterschiedliche Effekte nach konstitutiver Aktivierung beider *Hydractinia* Ras-Proteine auch dann nicht verwundern. Denn auch von den klassischen Ras-Proteinen ist bekannt, dass diese zwar identische Signalwege steuern können, dies aber nicht in allen Geweben in gleichem Maße geschieht. Ihre konstitutiv aktivierten Formen wurden zudem beispielsweise im Menschen in unterschiedlichen Tumoren in unterschiedlichen Geweben gefunden (Castellano et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass die klassischen Ras-Proteine K-, H- und N-Ras zwar die gleichen Signalwege steuern können, dies jedoch je nach Gewebe in unterschiedlichem Maße geschieht.

Transgene *Hydractinia* Ras2(Q67V)-Kolonien unterscheiden sich in ihrem Verhalten und ihrem morphologischen Gesamterscheinungsbild (Plickert et al., 2012) zunächst nicht von Kolonien, in denen Wildtyp-Ras2 überexprimiert wird (3.4.2) oder von Wildtyp-Kolonien mit einem vergleichbaren Entwicklungsstand (3.4.3.8). Morphologische Veränderungen nach Injektion von HeAktIIIGFPRas2(Q67V)-Fragmenten wurden einige Tage bis Wochen nach der Metamorphose beobachtet. In Wildtyp-Kolonien oder aber in Kolonien, in denen Wildtyp-Ras2 überexprimiert ist, wurden entsprechende Phänotypen niemals beobachtet. Die Effekte in transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonien waren jedoch nicht so einheitlich wie in transgenen Ras1-Kolonien (3.4.3.3). In Gastrozoiden wurde mehrmals beobachtet, dass es im Bereich der Körpersäule zur Ausbildung einer sekundären Körperachse kam (3.4.3.9, Abb.57, Abb.58, Abb.59). In mehreren Fällen wurden hierbei sekundär auswachsende Körperachsen mit Gastrozoid-Identität beobachtet (Abb.58). Dies ist absolut untypisch für *Hydractinia*. Mehrachsige Gastrozoide kommen abgesehen von Fusionen bei Primär-Polypen, die gelegentlich während der Metamorphose auftreten können, nicht vor. Bei den in dieser Arbeit beobachteten Phänotypen kann eine solche Fusion jedoch ausgeschlossen werden. In Wildtyp-Kolonien wachsen Gastrozoide unter normalen Bedingungen in definiertem Abstand zueinander aus den Stolonen aus.

Ein Modell, das dieses Phänomen erklärt, sieht ein Signalmolekül PI vor, welches von Gastrozoiden gebildet wird und im Bereich der Köpfe der Gastrozoide die höchste Konzentration besitzt. Dieses Signalmolekül verhindert, dass in unmittelbarer Nähe zu einem Gastrozoid ein weiteres Gastrozoid gebildet wird (Plickert et al., 1987). Hierdurch wird auch verhindert, dass sich entlang der Körpersäule eines Gastrozoiden sekundäre Gastrozoide bilden. Der Gedanke liegt nahe, dass durch Überexpression von GFPRas2(Q67V) in Gastrozoiden die Ausprägung des Gradienten mit dem PI entlang der Körpersäule exprimiert wird, gestört wird. Wäre zu wenig PI-Signalmolekül vorhanden oder würde dessen Signalwirkung behindert, so könnte es womöglich zur Ausbildung von Gastrozoiden in unmittelbarer Nähe bestehender Gastrozoide, beziehungsweise am Gastrozoid selber kommen.

Auch bei Gonozoiden konnte regelmäßig ein Auswachsen sekundärer Körperachsen beobachtet werden. Hierbei hatte die sekundäre Körperachse jedoch nicht immer die Identität eines Gonozoiden. Es wurden auch sekundäre Körperachsen mit Gastrozoid-Identität beobachtet. Zudem wurden an Gonozoiden oft mehrere sekundäre Achsen gebildet (Abb.60). Somit scheint die Überexpression von GFPRas2(Q67V) auch in Gonozoiden einen Einfluss auf die Bildung sekundärer Achsen zu haben. Die Festlegung der Identität der Achsen wird durch Überexpression von GFPRas2(Q67V) jedoch nicht beeinflusst. Es muss in Bezug auf Gonozoiden jedoch bedacht werden, dass in der Natur, seitlich im Bereich der Körpersäule, Gonophoren-Knospen gebildet werden. Es gibt in Gonozoiden somit eine Anlage zur Bildung sekundärer Achsen. Da die zusätzlichen Körperachsen in transgenen Gonozoiden jedoch immer in Körperabschnitten unterhalb der Knospungszone für Gonophoren auswachsen, kann auch für Gonozoiden das bereits für Gastrozoide beschriebene Modell zutreffen. Gonozoiden mit mehreren Körperachsen kommen unter Umständen auch in der Natur vor (Müller, 1964). Sie werden gebildet, wenn Kolonien einem massiven Überangebot von Nahrung ausgesetzt sind. Dies war für die hier beschriebenen Kolonien, die den Phänotyp entwickelten, jedoch definitiv nicht der Fall.

In seltenen Fällen kam es in transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden dazu, dass im Bereich der Körpersäule eine sekundäre Achse gebildet wurde, die ihrer Identität nach einem Stolon ähnelte (3.4.3.9; Abb.59). Im Laufe einiger Tage kam es neben dem Auswachsen und Festsetzen des Stolons am Untergrund zu einer Abschnürung des Gastrozoiden oberhalb des auswachsenden Stolons. Auch das seitliche Auswachsen eines Stolons in transgenen GFPRas2(Q67V)-Gastrozoiden kann durch eine Beeinflussung des oben beschriebenen Modells erklärt werden. Das Modell sieht vor dass ein PI Gradient durch laterale Inhibition auch die Bildung von Stolonen verhindert. Erst wenn der Gradient einen Schwellenwert unterschreitet können Stolone gebildet werden. Neben der modellhaften Vorstellung, dass für die Ausbildung sekundärer

Körperachsen mit der Identität eines Gastrozoiden oder Gonozoiden in transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonien eine verminderte Ausschüttung eines PI-Signalmoleküls, beziehungsweise eine verminderte Signalweiterleitung verantwortlich sind, bestand der Verdacht, dass der Wnt-Signalweg involviert sein könnte.

Die Bildung mehrachsiger Gastrozoide konnte von Müller und Kollegen durch eine Behandlung mit Paullonen induziert werden (Müller, 2004). Paullone blockieren die Kinase GSK3 β . Die Blockade von GSK3 β verhindert wiederum die Ubiquitinierung und den Abbau von zytoplasmatischem β -Catenin im Proteasom. β -Catenin ist in Zellen für die Weiterleitung von Wnt-Signalen verantwortlich. Eine Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und einer Ras-Protein gesteuerten Signalweitergabe in Zellen konnte bereits gezeigt werden (Espada et al., 1999; Li et al., 2005; Steelman et al., 2011; Nguyen et al., 2011). Li und Kollegen konnten durch Expression von K-Ras(G12V) in menschlichen Zellen zeigen, dass im Zuge der Ras-Signalweiterleitung über die Kinase PI3K die Kinase GSK3 β gehemmt wurde, wodurch β -Catenin in der Zelle akkumulieren konnte (Li et al., 2005). Eine Verbindung zwischen einer RRas2(TC21) gesteuerten Signalweiterleitung und dem Wnt-Signalweg ist nicht bekannt. Da RRas2(TC21) jedoch auch wie die klassischen Ras-Proteine über die PI3K-Kinase-Kaskade Signale weiterleiten können (Murphy et al., 2002; Rong et al., 2002), ist eine direkte Verbindung zwischen der RRas2(TC21)-Signalweiterleitung über PI3K und dem Wnt-Signalweg zumindest denkbar.

Durch qPCR konnte in *Hydractinia* nach Überexpression von konstitutiv aktiviertem Ras1 und Ras2 ein Einfluss auf die relative Expression von Genen gezeigt werden, die am Wnt-Signalweg beteiligt sind (3.4.4). Sowohl in cDNA aus transgenen GFPRas1(Q67V)- als auch GFPRas2(Q67V)-Kolonien konnte eine gesteigerte Expression von *Wnt3*-Transkripten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Abb.61; Abb.62). *Hydractinia* *Wnt3* kann als Ligand an Wnt-Rezeptoren binden, woraufhin der Wnt-Signalweg angeschaltet wird (Duffy et al., 2010). β -Catenin, *TCF* und auch *Brachyury* sind in transgenen Ras1(Q67V)-Kolonien im Vergleich zum Wildtyp herunter reguliert (Abb.61). In einer transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonie hingegen ist *Brachyury* überexprimiert, wohingegen die relative Expression von *TCF* und β -Catenin im Vergleich zum Wildtyp konstant bleibt (Abb.62). Die Überexpression beider aktivierter *Hydractinia* Ras-Fusionsproteine hat wohl einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg, da in beiden transgenen die relative Expression von *Wnt3* erhöht ist. Es konnte jedoch nur in transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonien gezeigt werden, dass mit *Brachyury* die Expression eines direkten Zielgens des Wnt-Signalweg (Arnold et al., 2000) auf Transkriptionsebene in *Hydractinia* erhöht ist. Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Paullone zeigte in *Hydractinia* auf Transkriptionsebene ähnliche Ergebnisse für die relative Expression von *Wnt3*- und *Brachyury*-

Transkripten (Duffy et al., 2010). Duffy und Kollegen haben jedoch auch für *TCF* eine Überexpression beobachtet. In transgenen Ras2 Kolonien konnte jedoch keine Überexpression von *TCF* gezeigt werden.

Die qPCR-Analyse zeigt, dass es in transgenen GFPRas2(Q67V)-Kolonien auf Transkriptionsebene mit *Wnt3* und *Brachyury* zu einer Überexpression von Genen kommt, die am Wnt-Signalweg beteiligt sind. In GFPRas1(Q67V)-Tieren gibt es lediglich eine Überexpression von *Wnt3* auf Transkriptionsebene. Basierend auf diesem Ergebnis ist ein Modell denkbar, bei dem in GFPRas2(Q67V)-Kolonien die Bildung mehrachsiger Gastrozoide und Gonozoiden auf einer Verbindung zwischen der Ras-Protein-gesteuerten Signalweiterleitung und dem Wnt-Signalweg in *Hydractinia* beruhen kann. Dass es in GFPRas1(Q67V)-Kolonien eine transkriptionelle Überexpression von *Wnt3* gibt, β -*Catenin*, *TCF* und *Brachyury* jedoch herunter reguliert sind, könnte ein Grund dafür sein, dass in transgenen Ras1-Kolonien keine mehrachsigen Phänotypen beobachtet werden konnten.

4.4 mRNA Expressionsprofile in Transgenen mit aktiviertem Ras1 und Ras2

Wenngleich die von Ras ausgehenden Signale weit in die diversen Signalwege hinein stets über Protein-Protein-Wechselwirkungen weitergegeben werden, war zu erwarten, dass letztendlich Transgene mit veränderten Phänotypen auch veränderte Transkriptome aufweisen. Ein erster orientierender Versuch zeigte, dass die Unterschiede sehr groß sind. Das betraf einmal die deutlichen Unterschiede von jeweils Ras1-Transgen oder Ras2-Transgen zur Wildtyp-Kontrolle, zum anderen die erheblichen Unterschiede der Profile beim Vergleich von Ras1- und Ras2-Transgenen untereinander (3.4.5, Abb.63). Dass in transgenen GFPRas1(Q67V)- und GFPRas2(Q67V)-Kolonien in hohem Maße unterschiedliche Gene auf Transkriptionsebene aktiviert sind, spricht dafür, dass durch die konstitutive Aktivierung von Ras1 und Ras2 in *Hydractinia* die Expression unterschiedlicher Gene reguliert wird. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass nach konstitutiver Aktivierung der beiden Ras-Varianten in den transgenen Kolonien unterschiedliche phänotypische Veränderungen beobachtet wurden (3.4.3.3 und 3.4.3.9). Das RNA-Material, auf dem die Analyse beruht, stammte aus Kolonien, die in etwa demselben Entwicklungsstand entsprachen. Die hier analysierten Kolonien hatten alle bereits einige wenige Gonozoiden gebildet und hatten insgesamt in etwa die gleiche Anzahl an Stolonen und Polypen. In allen Präparationen wurde die RNA aus der gesamten Kolonie gewonnen. Daher könnte das Ergebnis dieser Vergleichsanalyse durchaus signifikant sein. Bemerkenswert

ist in diesem Zusammenhang die große Übereinstimmung der Differenzdaten aus der doppelt durchgeführten Sequenzierung der RNA aus Ras1 Transgenen. Die Herstellung der cDNA, die Gewinnung der Illumina HighSeq-Daten und die bioinformatische Prozessierung weisen offenbar ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit auf. Allerdings verwundert der extrem hohe Anteil abregulierter Gene in Ras2 Transgenen. Es muss daher an dieser Stelle erwähnt werden, dass systeminhärente Ungenauigkeiten nicht ausgeschlossen werden können. So kann der Entwicklungsstand der Kolonien nur subjektiv bestimmt werden. Auch wenn *Hydractinia*-Kolonien auf den Tag das gleiche Alter haben, entwickeln sich Kolonien dennoch individuell verschieden. Auch äußere Parameter lassen sich trotz kontrollierter Hälterung nicht absolut konstant halten und könnten einen Einfluss auf die Genexpression in *Hydractinia* haben.

Im Rahmen einer ersten Analyse der Daten wurden hier exemplarisch Gene annotiert. Ziel dieses orientierenden Experiments war es, Funktionsstudien mit RNA-Sequenzierungsdaten zu kombinieren, um am Ende der biologischen Untersuchungen die grundsätzliche Eignung dieses Zugangs zur Ras-vermittelten molekularen Kontrolle zu prüfen. Ähnliche Untersuchungen bezogen auf andere Gene wurden auch beispielsweise in Mäusen (Dorval et al., 2014) oder auch in Cnidariern (Lapebie et al., 2014) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden Cluster aufregulierter Gene auf seine Zusammensetzung überprüft, indem die enthaltenen Gene über eine Abfolge von Annotationsroutinen („Trinotate pipeline“) charakterisiert wurden. Unter den Genen, deren Expression in einer GFP Ras1(Q67V)-Kolonie im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert wurden, fanden sich in der überwiegenden Mehrzahl solche, die nicht in einem bekannten Kontext zu Ras-Signalwegen einzuordnen sind, wie etwa ein mögliches Homolog für ein *Nidogen-2*. Es fanden sich aber auch Gene wie beispielsweise *Caveolin-1*, die funktionell mit Ras in Verbindung stehen (Basu et al., 2013) (Tab.31). Ähnliches konnte für die Transkripte aus Ras2-Transgenen beobachtet werden (Tab.32). Die hier durchgeführten Pilotversuche zeigen, dass die Zusammensetzung eines Transkriptoms verschiedener Versuchskolonien dramatisch deutlich voneinander abweicht. Die Methode ist somit nicht geeignet schnell und einfach Schlüsselgene zu identifizieren, die als Ziele von konstitutiv aktiviertem Ras zur Entstehung der beobachteten Phänotypen dienen. Dennoch können automatische Annotationen möglicher deregulierter Gene Hinweise darauf geben, welche Folgen eine Miss- oder Überexpression oder gar eine konstitutive Aktivierung eines zentralen Signalproteins nach sich zieht. Eine vergleichende Transkriptom-Analyse kann somit in Zukunft auch in *Hydractinia* Anwendung finden, um Genexpressionsmuster in Transgen- und Wildtyp-Kolonien von *Hydractinia* zu vergleichen. Sie muss aber dann, der Vielzahl der differentiell

exprimierten Gene geschuldet, auf einer umfangreichen Analyse beruhen, die über den Rahmen dieser Arbeit hinaus geht.

4.5 Ras-Protein gesteuerte Signalwege in *Hydractinia echinata*

Es konnte gezeigt werden, dass funktionelle Sequenzmotive in *Hydractinia* Ras-Proteinen hoch konserviert sind (3.1.1, 3.1.2). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Ras-Protein gesteuerte Signalweiterleitung womöglich auch in *Hydractinia* über Signalwege verläuft, die in anderen Organismen gut charakterisiert sind. Aus diesem Grund wurde in *Hydractinia* nach möglichen Homologen zu charakterisierten, aus Ras-gesteuerten Signalwegen anderer Organismen bekannten Proteinen, gesucht. Für eine BLAST-Analyse im Transkriptom von *Hydractinia* wurden, analog zu der Suche nach *Hydractinia* Ras-Proteinen, Sequenzen des Menschen verwendet. Diese wurden wie bereits mehrfach erwähnt, stellvertretend für Vertebraten verwendet, da gerade in Vertebraten und besonders im Menschen Ras-Protein gesteuerte Signalwege gut charakterisiert sind. Eine phylogenetische Einordnung, einhergehend mit einer BLAST-Analyse in NCBI, die Identifikation von charakteristischen Protein-Domänen mit PROSITE und Pfam sowie Aminosäure-Sequenzvergleiche (siehe Anhang) konnten dazu beitragen die, in *Hydractinia* identifizierten Proteine einem Vergleich zu funktionell bereits besser verstandenen homologen Proteinen zu unterziehen (3.2).

4.5.1 ERK-Kinase-Kaskade in *Hydractinia echinata*

Dass klassische Ras-Proteine über einen RAF-MEK-ERK-Signalweg in Zellen Signale weiterleiten können, ist hinlänglich bekannt (Kolch et al., 2000, Colicelli et al., 2004). Inwieweit diese Signalweiterleitung auch durch RRas2(TC21)-Proteine erfolgt, wird hingegen, wie bereits erwähnt (4.4), kontrovers diskutiert.

RAF

In *Hydractinia* konnte eine mögliche „rat fibrosarcoma“ (RAF)-Kinase identifiziert werden (3.2.1). Aus Vertebraten sind drei verschiedene RAF-Proteine bekannt (A-, B- und C-RAF), die alle in der Lage sind, Ras-Signale weiterzuleiten (Wortzel et al., 2011). Mit allen drei menschlichen RAF-Proteinen als Suchprotein konnte nur ein einzelnes Homolog in *Hydractinia*

identifiziert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass dieses Protein eine ursprüngliche Form von RAF darstellt, aus der sich im Laufe der Evolution unterschiedliche RAF-Isformen entwickelt haben. Diese RAF-Isoformen der Vertebraten gruppieren in dem Phylogramm (Abb.9) in eigenen Zweigen. Dass es sich bei dem identifizierten *Hydractinia* Protein um ein RAF-Homolog handelt, zeigt die phylogenetische Analyse in der dieses Protein mit den RAF-Proteinen der Vertebraten gruppiert. Ein BLAST in NCBI zeigte für *Hydractinia* RAF eine qualitativ höhere Homologie zu B-RAF-Proteinen anderer Organismen. In *Hydractinia* RAF konnten die gleichen Protein-Domänen identifiziert werden, die auch in *Homo sapiens* RAF-Proteinen existieren (Abb.10). Dies betrifft eine „Ras binding“ (RBD)-Domäne mit der RAF an RAS Proteine bindet (Vojtek et al., 1993). Zudem enthält *Hydractinia* RAF wie das B-RAF des Menschen eine Domäne vom sogenannten Phorbol-ester /DAG (ZF_DA) Typ sowie eine Protein-kinase (PK)-Domäne (Abb.10). Ein Vergleich auf Aminosäure-Ebene zeigte im Bereich der beschriebenen Domänen spezieübergreifend ein hohes Maß an Homologie (siehe Anhang, Abb.4).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass es sich bei dem in *Hydractinia* identifizierten Protein mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Homolog zu RAF-Kinasen der Vertebraten handelt.

MEK

Die in *Hydractinia* identifizierte MEK-Kinase (3.2.1) gruppierte zusammen mit *Hydra vulgaris* MEK1 in einem gemeinsamen Zweig (Abb.11). In einem gemeinsamen Hauptast bildeten MEK-Sequenzen von Arthropoden einen weiteren Zweig. In Vertebraten sind zwei MEK-Kinasen bekannt, die beide durch die Kinase RAF phosphoryliert werden können (Wortzel et al., 2011). Eine BLAST-Analyse mit *Hydractinia* MEK zeigte, dass die Homologie zu MEK1-Proteinen der Vertebraten höher war als zu MEK2-Proteinen. *Hydractinia* MEK zeigte auf Aminosäure-Ebene ein hohes Maß an Homologie zu sowohl MEK1- als auch MEK2-Proteine des Menschen. In *Hydractinia* MEK und in den menschlichen MEK-Kinasen konnte die gleiche Protein-Kinase-Domäne identifiziert werden (Abb.12). Vor allem im Bereich dieser Domäne sind die Proteine auf Aminosäure-Ebene hoch konserviert (siehe Anhang, Abb.6). Hier finden sich einige aus anderen Organismen bekannte, für MEK charakteristische Aminosäuren, auch in *Hydractinia* MEK konserviert an entsprechender Position im Protein (Abb.12 D1 und D2). Unter anderem ist ein im Menschen als „activation-loop“ bezeichneter Sequenzabschnitt hoch konserviert (Abb.12 D3). In diesem Sequenzabschnitt wird Serin(S218) in MEK 1 und Serin(S222) in MEK 2 durch das Protein RAF phosphoryliert (Wortzel et al., 2011).

ERK

Neben RAF und MEK-Proteinen konnte in *Hydractinia* auch ein ERK-Protein identifiziert werden (3.2.1). In Vertebraten sind zwei verschiedene ERK-Proteine (ERK1 und ERK2) bekannt. Beide Vertebraten-Proteine können durch MEK-Kinasen aktiviert werden (Wortzel et al., 2011). Ein BLAST in NCBI zeigte für *Hydractinia* ERK eine höhere Homologie zu ERK2-Proteinen als zu ERK1-Proteinen anderer Organismen. PROSITE erkannte in *Hydractinia* ERK die gleiche Protein-Kinase-Domäne wie in beiden menschlichen ERK-Proteinen (Abb.14). Über die gesamte Sequenz waren sich die Proteine des Menschen und von *Hydractinia* sehr ähnlich. Dies gilt vor allem im Bereich der Kinase-Domäne (siehe Anhang Abb.8). Aminosäuren, die in funktionellen Studien als unabdingbar für die katalytische Funktion des Proteins beschrieben wurden, sind auch in *Hydractinia* ERK vorhanden (Abb.14 D1 und D2). Dies trifft insbesondere auf Aminosäuren zu, von denen in menschlicher ERK1-Kinase bekannt ist, dass sie durch die MEK-Kinase phosphoryliert werden (Wortzel et al., 2011). Auch diese Aminosäuren sind in *Hydractinia* ERK konserviert (Abb.14, D3). Auch die phylogenetische Analyse (Abb.13) unterstützte, dass es sich um eine ERK-Kinase handelt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Ras-Proteine auch in *Hydractinia* über die Kinasen RAF, MEK und ERK Signale in der Zelle weiterleiten.

4.5.2 Phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3K)-Kaskade in *Hydractinia echinata*

Sowohl von klassischen Ras-Proteinen als auch von RRas2(TC21)-Proteinen ist bekannt, dass sie Ras-Signale über PI3K, PDK1 und AKT weiterleiten (Rodriguez-Vicinia et al., 1994; Murphy et al., 2002; Rong et al., 2002; Castellano et al., 2011).

p110

In *Hydractinia* konnten zwei mögliche Homologe zu der katalytischen Untereinheit einer PI3K-Kinase identifiziert werden (3.2.2). Beide gruppieren im Phylogramm in einem gemeinsamen Zweig und bilden einen gemeinsamen Hauptast mit p110-alpha-Proteinen der Vertebraten und mit zwei, als p110-alpha „predicted“ charakterisierten Proteinen, des Mollusken *Aplysia* und des Tunikaten *Ciona*. Aufgrund des niedrigen „Bootstrep-value“ ist die Gruppierung der *Hydractinia*-Proteine in einem Zweig eines gemeinsamen Hauptastes mit Vertebraten p110-alpha und predicted p110-alpha von *Ciona* und *Aplysia* jedoch fragwürdig (Abb.15). Ein BLAST in NCBI mit p110-1- und p110-2-Proteinen von *Hydractinia* ergab dennoch sowohl zu

p110-alpha, p110-beta und p110-delta-Proteinen anderer Organismen hohe Homologien. Dass es sich bei den in *Hydractinia* identifizierten Proteinen mit hoher Wahrscheinlichkeit um p110-Proteine handelt, steht somit fest. Eine genauere Zuordnung war hier jedoch nicht möglich. Im Zuge einer Vergleichsanalyse charakteristischer Domänen in den *Hydractinia* p110-Proteinen und in p110-Proteinen des Menschen konnten in allen Proteinen die gleichen Domänen identifiziert werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der Vergleich über die Gesamtsequenz wenig speziesübergreifende Homologien der Proteine untereinander zeigte (3.2.2; Abb.16; siehe Anhang Abb.10). p110-Proteine enthalten eine „phosphatidylinositol 3-kinase adaptor-binding“ (PI3K ABD)-Domäne, eine „phosphatidylinositol 3-kinase C2“ (PI3K C2)-, eine „phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family“ (PI3_4_kinase_3)-Domäne und eine „phosphatidylinositol 3-kinase Ras-binding“ (PI3K RBD)-Domäne (Abb.16). Über die PI3K RBD-Domäne interagieren p110-Proteine direkt mit aktiviertem Ras (Castellano et al., 2011). Da auch in den *Hydractinia* p110-Proteinen eine solche PI3K RBD-Domäne identifiziert wurde, dürften auch diese Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Ras interagieren.

PDK1

Im PDK1-Homolog von *Hydractinia* zeigt PROSITE die gleichen Domänen an wie sie in PDK1 von *Homo sapiens* bekannt sind (Abb.18). So konnte neben einer „protein kinase“ (PKDom)-Domäne eine „plekstrin homology“ (PH)-Domäne identifiziert werden. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von *Hydractinia*-PDK1 mit PDK1-Proteinen des Menschen, der Maus und eines möglichen *Hydra vulgaris* PDK1 zeigte vor allem im Bereich der Domänen eine speziesübergreifend hohe Homologie. Außerhalb der Domänen ist jedoch der N-terminale Sequenzbereich in *Hydractinia* PDK1 kürzer als in Vertebraten PDK1-Proteinen. Über die PH-Domäne bindet Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) an PDK1. Durch diese Bindung wird PDK1 an Membranen gebracht (Castellano et al., 2011). Somit weist das Vorhandensein dieser Domäne in *Hydractinia* PDK1 auf konservierte funktionelle Kompartimentierung des Proteins hin. Im bekannten Reaktionsweg kinasiert membrangebundene PDK1 die Protein-Kinase B (PKB, auch AKT) (Courtney et al., 2010; Castellano et al., 2011).

AKT

Im Transkriptom von *Hydractinia* konnten auch zwei Homologe der Zielproteine von PDK1 gefunden werden, *Hydractinia*-AKTA und AKTB (3.2.2). Die phylogenetische Analyse (Abb.19) zeigte, dass die AKT-Proteine von *Hydractinia* zusammen mit AKT (PKB) von *Hydra vulgaris* in einem gemeinsamen Zweig in einem Hauptast mit AKT-Proteinen anderer

Organismen gruppieren. Vertebraten AKT gruppierten in dem Hauptast entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu AKT1-, AKT2- und AKT3-Proteinen in eigenen Zweigen. Ein BLAST der *Hydractinia*-Proteine in NCBI zeigte für *Hydractinia* AKTA eine höhere Homologie zu AKT2- und für *Hydractinia* AKTB- zu AKT1-Proteinen anderer Organismen. In den *Hydractinia* AKT-Proteinen und in den AKT-Proteinen des Menschen existieren die gleichen Domänen (Abb.20). So gibt es auch in den *Hydractinia* Proteinen eine „pleckstrin homology“(PH)-Domäne, eine „protein kinase“(PK)-Domäne sowie eine „AGC-kinase-C-terminal“ (AGC_KI)-Domäne (Abb.20 A bis E). Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zeigte im Bereich der Domänen spezieübergreifend konservierte Sequenzbereiche. Nur im Bereich der „AGC-kinase-C-terminal“(AGC_KI)-Domäne fanden sich deutliche Sequenzunterschiede (siehe Anhang Abb.14). Im Bereich der Domänen konnten zusätzlich auch in beiden *Hydractinia* AKT-Kinasen konservierte Aminosäuren identifiziert werden, von denen aus menschlichem AKT bekannt ist, dass die Kinase an diesen Aminosäuren phosphoryliert und aktiviert wird (Abb.20 F1) und F2)) (Moore et al., 2011; Castellano et al., 2011; Tsuchiya et al., 2013; Nag et al., 2013).

Da in *Hydractinia* mit p110 die katalytische Untereinheit von PI3K, desweiteren ein PDK1-Homolog sowie Homologe für eine AKT(PKB)-Kinase vorhanden sind, ist somit zu folgern, dass Ras in *Hydractinia* auch über diese Kaskade Signale weiterleiten können.

4.5.3 Ras-Signalweiterleitung über TIAM1 und Rac1 in *Hydractinia echinata*

Von TIAM1 ist bekannt, dass es aktiviertes Ras-Protein binden und dann die GTPase Rac1 aktivieren kann. Das führt zur Weiterleitung von Ras-Signalen in der Zelle (Lambert et al., 2002). Von RRas2(TC21) ist dagegen keine Signalweiterleitung über TIAM1 oder Rac1 bekannt.

TIAM

Eine phylogenetische Analyse zur Einordnung von *Hydractinia* TIAM war aufgrund zu weniger und zumeist nicht validierter TIAM1-Sequenzen anderer Organismen nicht möglich. Nachdem das *Hydractinia* Protein mit menschlichem TIAM1 im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert wurde, zeigte ein BLAST des *Hydractinia* Proteins in NCBI eine hohe Homologie zu charakterisierten TIAM2 (SIF)-Proteinen anderer Organismen. In PROSITE wurden deshalb bekannte TIAM1- und TIAM2-Proteine des Menschen sowie SIF1- und SIF2-Proteine von *Drosophila* mit dem möglichen *Hydractinia* TIAM-Protein verglichen. In dem wesentlich

kürzeren Protein von *Hydractinia* fehlt im Vergleich zu allen anderen untersuchten Proteinen eine „Ras binding“(RBD)-Domäne (Abb.21). Ob die Domäne nur nicht erkannt wurde oder ob sie nicht vorhanden ist, lässt sich an dieser Stelle nicht klären. Ohne eine RBD-Domäne könnte das in *Hydractinia* identifizierte Protein jedoch nicht mit aktiviertem Ras interagieren, weshalb eine Signalweiterleitung über das potenzielle *Hydractinia* TIAM1 unwahrscheinlich ist. Alle anderen für TIAM-Proteine typischen Domänen wurden jedoch auch in dem möglichen Homolog identifiziert.

Dass sowohl in dem *Hydractinia*-Protein als auch in *Drosophila* SIF1, jedoch nicht in SIF2, zusätzlich eine „wiskott-aldrich homology 1“(WH1)-Domäne erkannt wurde, könnte darauf hindeuten, dass das *Hydractinia*-Protein zumindest näher mit dem SIF1-Protein als mit dem SIF2-Protein von *Drosophila* verwandt ist. Es bleiben aber Zweifel, ob es sich bei dem in *Hydractinia* identifizierten Protein um ein Homolog zu charakterisierten TIAM1-Proteinen anderer Organismen handelt.

Rac1

Da die GTPase Rac1 jedoch nicht nur über TIAM1 durch Ras-Signalweiterleitung aktiviert werden kann, sondern möglicherweise auch über Ras aktivierte PI3K (Hu et al., 1995; Roriguez-Viciano et al., 1997; Der, 2006) wurde hier auch nach einem möglichen Rac1-Homolog in *Hydractinia* gesucht. Im Transkriptom konnte ein mögliches „Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“(Rac1)-Protein identifiziert werden (3.2.3). Die phylogenetische Analyse zeigte, dass es sich bei dem identifizierten Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Homolog zu Rac1-Proteinen anderer Organismen handelt (Abb.22). Sowohl das potenzielle *Hydractinia* Rac1-Protein als auch das in etwa gleich lange menschliche Rac1-Protein besitzen beide eine Rac1-typische „RHO-GTPase“(RHO)-Domäne (Abb.23). Ein Vergleich des möglichen Rac1-Proteins von *Hydractinia* mit Rac1-Proteinen anderer Organismen auf Aminosäure-Ebene zeigt, dass die Rac1-Proteine speziessübergreifend sehr hoch konserviert sind. Nur die C-terminalen Sequenzbereiche wiesen größere Sequenzunterschiede auf (siehe Anhang Abb.18). Die Analysen zeigten, dass es sich bei dem in *Hydractinia* identifizierten Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein, zu Rac1-Proteinen anderer Organismen homologes Protein handelt.

4.5.4 RALGDS, Ral und PLD-Signalweg in *Hydractinia echinata*

In einem weiteren Ras-Protein gesteuerten Signalweg werden Signale unter anderem über die Proteine RALGDS, RGL1 oder RGL2, sowie über die Proteine RAL-A und RAL-B und über das Protein PLD weitergeleitet (Schubbert et al., 2007). Auch eine RRas2(TC21) induzierte Signalweiterleitung über diesen Signalweg ist bekannt (Rosario et al., 2001).

RGL1

Aus Vertebraten ist bekannt, dass die Proteine RALGDS, RGL1 und RGL2, die durch Ras aktiviert werden können, in aktivierter Form als Austauschfaktor für RAL-GTPasen fungieren (Castellano et al., 2011). Im Transkriptom von *Hydractinia* wurde mit charakterisierten RALGDS-, RGL1- und RGL2-Proteinen des Menschen nach homologen Proteinen in *Hydractinia* gesucht. In *Hydractinia* konnte ein mögliches „Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1“ (RGL1)-Protein identifiziert werden (3.2.4). Eine phylogenetische Analyse machte wenig Sinn, da es so gut wie keine validierten RGL1-Sequenzen anderer Organismen gibt. Sowohl in *Hydractinia* RGL1 als auch in menschlichem RGL1 existiert eine „Ras guanine exchange factor N-terminal“ (RAS_GEF_N)-Domäne, eine „Ras guanine-nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF)-Domäne sowie eine „Ras-associating“ (RA)-Domäne (Abb.24). Mit Pfam wurde die „Ras-associating“-Domäne in *Hydractinia* RGL1 erkannt. PROSITE erkannte diese jedoch nicht. Inwiefern es sich bei der (RA)-Domäne in *Hydractinia* wirklich um eine Ras-Bindedomäne handelt, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Hierzu wären, wie auch in allen anderen Proteinen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, umfangreiche biochemische Untersuchungen notwendig. Innerhalb der Domänen zeigte ein Vergleich von RGL1-Proteinen des Menschen, der Maus und von *Hydractinia* auf Aminosäure-Ebene speziesübergreifend konservierte Bereiche (siehe Anhang Abb.20). Für die C-terminale „Ras-associating“ (RA)-Domäne konnte jedoch auch Pfam in *Hydractinia* RGL1 im Vergleich zu dem menschlichem RGL1-Protein nur einen kürzeren Sequenzbereich zuordnen. Obwohl ein BLAST des möglichen *Hydractinia* RGL1-Proteins in NCBI eine Homologie zu möglichen, aber auch zu den wenigen charakterisierten RGL1-Proteinen anderer Organismen zeigte, kann RGL1 von *Hydractinia* anhand der Analyse der Protein-Domänen und der Sequenz nur unter Vorbehalt als ein potenzielles Homolog zu RGL1-Proteinen anderer Organismen gesehen werden.

RAL

Neben dem potenziellen RGL1-Protein wurde in *Hydractinia* ein mögliches RAL-Protein identifiziert (3.2.4). RAL-Proteine gehören zur „Superfamilie“ der Ras-Proteine (Colicelli et al., 2004). Ras aber auch RRas2(TC21) können RGL1 aktivieren. Die Aktivierung von RGL1 bewirkt eine Rekrutierung von RAL an Membranen. An den Membranen wird RAL dann durch GTP-Bindung aktiviert (Rosario et al., 2001; Neel et al., 2011). In Vertebraten sind zwei verschiedene RAL-Proteine RAL-A und RAL-B bekannt, die beide mit den gleichen Effektoren interagieren können (Kidd et al., 2010). Im Transkriptom wurde mit beiden menschlichen RAL-Proteinen jedoch nur ein mögliches *Hydractinia* RAL-Protein identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass sich im Verlauf der Evolution aus einem gemeinsamen Vorgänger hin zu den Vertebraten zwei RAL-Varianten entwickelt haben. In einem Phylogramm nimmt *Hydractinia* RAL einen eigenständigen basalen Ast mit einem potenziellen *Hydra vulgaris* RAL ein. Mit in diesem Ast gruppiert ein RAL-A des Schwammes *Suberites dumuncula* in einem Zweig. *Caenorhabditis* RAL und ein potenzielles RSR1 RAL-Homolog aus Hefe bilden ebenfalls jeweils eigenständige Äste. In einzelnen Zweigen in einem gemeinsamen Hauptast gruppieren RAL-A- und RAL-B-Proteine der Vertebraten, von Insekten, von Ciona und ein potenzielles Mollusken RAL-A von *Aplysia californica* (Abb.25). Ein BLAST in NCBI ergab für *Hydractinia* RAL eine hohe Homologie zu RAL Proteinen anderer Organismen. Hierbei war die Homologie zu RAL-A-Proteinen höher als zu RAL-B-Proteinen. PROSITE und Pfam erkannten sowohl in RAL-A- und RAL-B-Proteinen des Menschen als auch in dem *Hydractinia* RAL-Protein ein „small GTPase family profile“ (RAS) (Abb.26). Auf Aminosäure-Ebene zeigte sich in einem Vergleich der menschlichen RAL-Proteine mit RAL-A der Maus und mit *Hydractinia* RAL dass vor allem das „small GTPase family profile“ speziessübergreifend hoch konserviert ist (siehe Anhang Abb.22). In *Hydractinia* RAL konnten zudem für die Funktion von RAL konservierte, charakteristische Aminosäuren identifiziert werden (Abb.26 1, 2 und 3).

PLD

Neben einem möglichen *Hydractinia* RGL1-Protein und einem RAL-Protein konnte auch eine mögliche „Phospho-Lipase D“ (PLD) identifiziert werden (3.2.4). Ein BLAST der möglichen PLD in NCBI zeigte eine Homologie des Proteins sowohl zu PLD1- aber auch zu PLD2-Proteinen anderer Organismen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass es sich bei den Homologen PLD1-Proteinen zumeist um „predicted“ Proteine gehandelt hat. Da die *Hydractinia*-PLD zuvor mit menschlicher PLD1 im Transkriptom von *Hydractinia* identifiziert wurde, wurde die Suche mit menschlicher PLD2 wiederholt. Die Analyse zeigte jedoch, dass

auch mit menschlicher PLD2 die gleiche *Hydractinia*-PLD identifiziert wurde. PLD1-Proteine sind in Säugern als Komponente in einem durch Ras-Proteine gesteuerten Signalweg bekannt (Buchanan et al., 2005). Für PLD2-Proteine hingegen ist beschrieben, dass sie wichtig für die Membranbindung von SOS-Proteinen sind (Zhao et al., 2007). Eine phylogenetische Analyse mit PLD1- und PLD2-Proteinen anderer Organismen zeigte, dass die mögliche *Hydractinia* PLD zusammen mit einer „predicted“ PLD des Cnidarier *Nematostella vectensis* einen Zweig in einem Hauptast bildet, in dem PLD-Proteine der Insekten und eine „predicted“ PLD des Mollusken *Aplysia californica* ebenfalls eigene Zweige bilden. In einem weiteren Hauptast gruppieren PLD1- und PLD2-Proteine der Vertebraten in eigenen Zweigen. Eine genauere Zuordnung der möglichen *Hydractinia* PLD zu PLD1- oder PLD2-Proteinen der Vertebraten war anhand des Phylogramms nicht möglich (Abb.27). In dem im Vergleich zu menschlichem PLD1 etwas kürzeren und im Vergleich zu menschlichem PLD2 etwas längeren *Hydractinia* Protein, konnten mit PROSITE die gleichen Domänen identifiziert werden (Abb.28). Neben einer „phox homology“(PX)-Domäne wurden auch zwei charakteristische „phospho-lipase D active site“ (PLD)-Domänen identifiziert. Ein Vergleich der Proteine auf Aminosäure-Ebene zeigte jedoch sowohl in den identifizierten Domänen als auch im Bereich der gesamten Sequenz wenig speziesübergreifend homologe Sequenzbereiche. In Bezug auf die mögliche *Hydractinia* PLD kann hier nur gesagt werden, dass es sich wahrscheinlich um ein PLD-Protein handelt.

Zumindest bei den in *Hydractinia* identifizierten RGL1- und PLD-Proteinen bestehen somit Zweifel, dass es sich um mögliche Homologe zu charakterisierten, an einem Ras-gesteuerten Signalweg beteiligten Proteinen handelt. Es muss also zumindest bezweifelt werden, dass Ras-Signale in *Hydractinia* über die identifizierten Proteine weitergeleitet werden.

4.5.5 Ras-Signalweiterleitung über „Phospholipase C ϵ “ (PLC ϵ) und „Protein-kinase C“ (PKC)

Ein PLC ϵ -Homolog konnte bei einer Suche sowohl mit menschlichem PLC ϵ als auch mit PLC ϵ von *Caenorhabditis elegans* im Transkriptom von *Hydractinia echinata* nicht identifiziert werden. Von Ras aktivierter PLC ϵ ist bekannt, dass sie Ptdins(4,5)P₂ in inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Dies führt in Zellen zu einer Freisetzung von Ca²⁺ und der Aktivierung von Protein-Kinase C (PKC) (Karnoub et al., 2008). Eine Protein-Kinase C (PKC) wurde bereits in der Vergangenheit im Stamm der Cnidarier beschrieben und charakterisiert (Schneider et al., 1994). In wie fern eine Signalweiterleitung

ohne ein PLC ϵ -Homolog in *Hydractinia* gegebenenfalls durch andere Proteine erfolgt oder ob dieser, aus höheren Organismen bekannte Signalweg in *Hydractinia* noch nicht vorhanden ist, kann nur vermutet werden.

4.5.6 „son of sevenless“ (SOS), „neurofibromatosis related protein 1“ (NF1) und „Ras p21 protein activator (GTPase activating protein 1)“ (RASA1 oder auch GAP) in *Hydractinia echinata*

Neben möglicherweise an Ras-Protein gesteuerten Signalwegen beteiligten Proteinen, wurde in *Hydractinia* zusätzlich nach Proteinen gesucht, von denen bekannt ist, dass sie die Funktion von Ras als molekularem Schalter in der Zelle steuern. Hierzu zählen neben dem Protein SOS unter anderem auch die Proteine NF1 und RASA1 (oder auch GAP) (Graham et al., 1996; Colicelli et al., 2004). Auch für RRas2(TC21)-Proteine konnte *in vivo* gezeigt werden, dass ihre Aktivität durch SOS1 gesteigert wird. Für NF1 und GAP wurde *in vitro* gezeigt, dass sie die GTPase-Aktivität von RRas2(TC21) stimulieren können (Graham et al., 1996).

SOS

In *Hydractinia* existiert ein mögliches „son of sevenless“ (SOS) Homolog (3.2.5). In Vertebraten sind zwei SOS-Proteine, SOS1 und SOS2 bekannt. Beide Vertebraten Proteine sind in der Lage an Ras-GDP zu binden, wodurch Ras zur GDP Dissoziation angeregt wird. Nach Abspaltung von GDP kann dann GTP an Ras binden, wodurch Ras wieder aktiviert wird (Qian et al., 2000; Esteban et al., 2000; Pierre et al., 2011). Mit beiden Vertebraten SOS-Proteinen wurde im Transkriptom von *Hydractinia* jedoch nur ein und jeweils das gleiche *Hydractinia* Protein identifiziert. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich im Verlauf der Evolution aus dem eher ursprünglichen *Hydractinia*-Protein bis hin zu den Vertebraten zwei SOS-Varianten entwickelt haben. Die phylogenetische Analyse (Abb.29) zeigte, dass es sich bei dem in *Hydractinia* identifizierten Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein SOS-Homolog handelt. Eine genauere Zuordnung des *Hydractinia* Proteins zu SOS1- oder SOS2-Proteinen der Vertebraten war anhand des Phylogramms und auch anhand eines BLAST mit *Hydractinia* SOS in NCBI nicht möglich. Der BLAST ergab eine hohe Homologie zu beiden SOS-Proteinen der Vertebraten. Ein Vergleich zwischen dem *Hydractinia* Protein und SOS1- und SOS2-Proteinen des Menschen auf Aminosäure-Ebene (siehe Anhang Abb.26) sowie mit PROSITE zeigte, dass alle drei Proteine über die gleichen Proteindomänen verfügen (Abb.30). Alle drei untersuchten

Proteine haben eine „Dbl homology“(DH_2)-Domäne, eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne, eine „Ras guanine-nucleotide exchange factor N-terminal“ (RASGEF_NTER)-Domäne und eine „Ras guanine nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF_CAT)-Domäne. Sowohl innerhalb als auch außerhalb der Domänen gibt es hierbei speziesübergreifend homologe Sequenzbereiche. Sieht man davon ab, dass die durch PROSITE identifizierte N-terminale DH_2-Domäne in *Hydractinia* kürzer ist als in den menschlichen SOS-Proteinen, so zeigten die Analysen, dass es sich bei dem in *Hydractinia* identifizierten Protein wahrscheinlich um ein *Hydractinia* SOS-Homolog handelt

Neben SOS-Protein konnten auch zwei mögliche GAP-Proteine (GTPase activating protein, NF1 und RASA1) in *Hydractinia* identifiziert werden (3.2.5).

NF1

So gibt es auch in *Hydractinia* ein mögliches NF1-Protein. Nachdem das Protein mit menschlichem NF1 im *Hydractinia* Transkriptom identifiziert wurde, zeigte ein BLAST in NCBI hohe Homologie zu NF1-Proteinen anderer Organismen. Von NF1-Proteinen ist bekannt, dass sie die GTPase-Aktivität von Ras stimulieren. So helfen sie dabei Ras in seine GDP-gebundene inaktive Form zu überführen (Corral et al., 2003). Eine phylogenetische Analyse war allerdings aufgrund sehr weniger validierter NF1-Sequenzen in NCBI nicht möglich. In dem im Vergleich zu menschlichem NF1 ungefähr 200 Aminosäuren kürzeren *Hydractinia* Protein sowie in menschlichem NF1 gibt es eine „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPase_ACTIV2)-Domäne und eine „CRAL –TRIO lipid binding“ (CRAL_TRIO)-Domäne (Abb.31). Auf Aminosäure Ebene zeigte der Vergleich von *Hydractinia*, *Maus*, *Mensch*, und einem möglichen *Hydra vulgaris* NF1-Protein, dass es innerhalb, aber auch außerhalb der beschriebenen Domänen speziesübergreifend konservierte Sequenz-Bereiche gibt (siehe Anhang Abb.28). Die „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPase_ACTIV2)-Domäne, die in Cnidarier NF1-Proteinen identifiziert wurde, ist in *Hydractinia* im Vergleich zu Vertebraten NF1 jedoch um 24 und in *Hydra vulgaris* um 23 Aminosäuren kürzer. Ein BLAST mit *Hydractinia* NF1 in NCBI zeigte eine hohe Homologie zu NF1-Proteinen anderer Organismen. Obwohl die in *Hydractinia* NF1 identifizierte „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPase_ACTIV2)-Domäne kürzer ist, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich bei *Hydractinia* NF1 um ein NF1-Homolog handelt.

RASA1 (GAP)

In *Hydractinia* gibt es neben NF1 auch ein mögliches RASA1 (oder auch GAP)-Protein (3.2.5). Von GAP-Proteinen ist bekannt, dass sie wie auch NF1-Proteine die GTPase-Aktivität von Ras beeinflussen (Eerola et al., 2003). Das mit menschlichem RASA1 im Transkriptom von *Hydractinia* identifizierte Protein gruppiert in einem Phylogramm (Abb.32) zusammen mit einem „predicted“ RASA1 von *Hydra vulgaris* und bildet einen gemeinsamen Zweig an der Basis eines Hauptastes. In diesem Hauptast gruppieren unter anderem auch RASA1 (GAP)-Proteine von Vertebraten. Das Phylogramm zeigte, dass es sich bei dem in *Hydractinia* identifizierten Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein RASA1 (GAP)-Protein handelt. In dem gegenüber menschlichem RASA1(GAP)-Protein um 127 Aminosäuren kürzeren *Hydractinia* RASA1 wurden durch PROSITE die gleichen Domänen erkannt (Abb.33). So gibt es auch in *Hydractinia* RASA1 zwei „src homology 2“ (SH2)-Domänen, eine „Ras GTPase activating profile“ (RAS_GTPASE_ACTIV_2)-Domäne, eine „src homology 3“ (SH3)-Domäne, sowie eine „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne und eine „C2“ Domäne. Sowohl innerhalb der beschriebenen Domänen, als auch in dazwischen liegenden Sequenzabschnitten, zeigt ein Vergleich der *Hydractinia* RASA1-Aminosäure-Sequenz mit RASA1 des Menschen und mit RASA1 der Maus speziesübergreifend konservierte Sequenz-Bereiche. Lediglich der N-terminale Bereich vor der ersten SH2-Domäne, der in *Hydractinia* zudem wesentlich kürzer ausfällt, ist speziesübergreifend wenig konserviert (siehe Anhang Abb.30).

In *Hydractinia* gibt es mit hoher Wahrscheinlichkeit ein SOS und ein RASA1(GAP)-Protein. Bei dem möglichen NF1-Protein von *Hydractinia* könnte es sich zumindest um ein Homolog handeln. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die in *Hydractinia* charakterisierten Ras-Proteine in ihrer Wildtyp-Form unter anderem von den hier beschriebenen Proteinen reguliert werden.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten zwei Ras-Proteine identifiziert werden, deren konstitutive Aktivierung zu unterschiedlichen Phänotypen in *Hydractinia* führte (3.4.3.4 und 3.4.3.9). Aus diesem Grund kann hier angenommen werden, dass unterschiedliche Signalwege beteiligt sind. In *Hydractinia* konnten einige mögliche Proteine identifiziert werden, von deren potenziellen Homologen bekannt ist, dass sie in anderen Organismen an einer Ras-Signalweiterleitung in Zellen beteiligt sind (3.2). Dass im Zuge einer Ras-Signalweiterleitung in *Hydractinia* eben diese Proteine

beteiligt sind, lässt sich nur durch Analyseverfahren bestätigen die Protein-Protein-Interaktionen nachweisen.

Zur Analyse einer Protein-Protein-Interaktion von beispielsweise Ras und RAF würde sich hier durchaus ein Nachweis mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System anbieten (Van Aelst, 1998). Der Großteil der Signalweiterleitung in Ras-gesteuerten Signalwegen verläuft jedoch über Phosphorylierungen. Neben einem Nachweis mittels Western-Blot und phospho-spezifischem Antikörper (Mandell, 2003) könnten phosphorylierte, aktivierte Proteine in unterschiedlichen Ras gesteuerten Signalwegen auch mittels ELISA-Verfahren nachgewiesen werden.

Nach Überexpression der konstitutiv aktivierten *Hydractinia* Ras-Proteine konnten phänotypische Veränderungen in *Hydractinia* beobachtet werden, die bei einer Überexpression von Wildtyp-Ras niemals auftraten. Auch im Wildtyp konnten derartige Phänotypen nie beobachtet werden. Der Gedanke liegt somit nahe, dass bei konstitutiver Aktivierung der *Hydractinia* Ras-Proteine Signale über die zuvor erwähnten Signalwege weitergeleitet werden. Aus der Natur kennt man in *Hydractinia* keine natürlich vorkommenden Tumore jeglicher Art. Somit ist es wahrscheinlich, dass bei Überexpression von beispielsweise konstitutiv aktiviertem Ras1 in *Hydractinia* Kontrollmechanismen überwunden werden, die im Wildtyp die Ausbildung einer Neoplasie verhindern. Für die Zukunft wäre es interessant mehr über diesen Kontrollmechanismus in Erfahrung zu bringen. Die für konstitutiv aktiviertes Ras1 beobachteten Neoplasien zeigten keine Tendenz einer invasiven Ausbreitung in umliegendes Gewebe. Damit lässt sich der Phänotyp durch das Vorhandensein einer benignen, langsam wachsenden Neoplasie vom differenzierten Typ charakterisieren. Konstitutiv aktiviertes Ras konnte in unterschiedlichen malignen Tumoren vor allem im Menschen nachgewiesen werden (Fernandez-Medarde and Santos, 2011). In diesem Zusammenhang wäre es interessant mehr darüber in Erfahrung zu bringen, weshalb in *Hydractinia* lediglich benigne Neoplasien ausgebildet werden. Zudem wäre es hier auch interessant, das Wirken bekannter Tumorsuppressoren wie beispielsweise p53 im Zusammenhang mit Ras in *Hydractinia* zu untersuchen. In dem Cnidarier *Nematostella vectensis* ist bereits ein p63-Protein bekannt, das Eigenschaften bekannter p53-Proteine aufweist (Pankow et al., 2007). Im Zuge einer Analyse vorläufiger genomischer Assemblierungen wurde auch in *Hydractinia* ein sehr ähnliches Protein identifiziert (Analyse durch Reinhard Heiermann, Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Fokus einer weiterführenden Arbeit sollte auf der Analyse von Transkriptom-Daten liegen. Dass die konstitutive Aktivierung von Ras1 oder Ras2 in *Hydractinia* eine veränderte Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene zur Folge hatte, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (3.4.4 und 3.4.5). Im Rahmen einer vergleichenden Transkriptom-Analyse bietet

sich in Zukunft die Möglichkeit, die durch aktiviertes *Hydractinia* Ras1 und Ras2 induzierte Genexpression in transgenen Kolonien genauer zu untersuchen und zu verstehen. Um die Aussagekraft der vergleichenden Transkriptom-Analyse zu verbessern, sollten hier in Zukunft jedoch mindestens drei Replikate analysiert werden. Durch Replikate wird ein Hintergrundrauschen durch Einflüsse von außen stark vermindert, wodurch die Aussagekraft der Analyse steigt. Auch könnte man gezielt versuchen nur phänotypisch auffälliges Gewebe im Rahmen einer Transkriptomanalyse zu analysieren.

5 Zusammenfassung

Hydractinia echinata besitzt zwei Ras-Proteine. *Hydractinia* Ras1 ist den klassischen Ras-Proteinen H-, K- und N-Ras höher Organismen ähnlicher als *Hydractinia* Ras2. Letzteres konnte dagegen RRas2(TC21)-Proteinen anderer Organismen zugeordnet werden. Es konnten mögliche Homologe zu Proteinen identifiziert werden, die in anderen Tieren an Ras gesteuerten Signalwegen beteiligt sind.

In-situ-Hybridisierung zeigte für beide *Ras*-RNAs eine ubiquitäre Grundverteilung im Ekto- und Entoderm von *Hydractinia*. Die Expression von *Ras* ist im Entoderm grundsätzlich geringer als im Ektoderm. In verschiedenen Entwicklungsstadien von *Hydractinia* gibt es unterschiedliche Verteilungsmuster der *Ras*-RNAs, wobei die Muster in den einzelnen Entwicklungsstadien für beide *Hydractinia* *Ras* die gleichen sind.

Mögliche Funktionen der Ras-Proteine in *Hydractinia echinata* wurden über Missexpressionsstudien untersucht. Überexpression von nativem *Hydractinia* Ras1 oder Ras2 führte zu keiner offensichtlichen Veränderung der Körpergestalt. In beiden *Hydractinia* Ras-Proteinen existieren offenbar konservierte Aminosäuren, die in anderen Tieren für die Funktionsregulation von Ras essentiell sind. Die Modulation der Ras-Proteine durch Austausch dieser Aminosäuren führt offenbar auch in *Hydractinia* Ras zu einer Aktivierung der Ras-Proteine. Die Überexpression von aktiviertem Ras1, das unabhängig von einander an zwei unterschiedlichen Aminosäurepositionen moduliert wurde, resultierte in beiden Fällen in dem gleichen Phänotyp in Gastrozoiden. Beide Male konnten ortstreu und reproduzierbar benigne Neoplasien im Gastroderm beobachtet werden. Ras1 hat in *Hydractinia* einen Einfluss auf die Proliferation. Nach Überexpression von aktiviertem Ras2 konnte keine Ausbildung von Neoplasien wie bei Überexpression von aktiviertem Ras1 beobachtet werden. In transgenen Ras2-Kolonien wurden jedoch zusätzliche Körperachsen in Gastro- und Gonozoiden beobachtet. qPCR-Daten zur Expression von *Hydractinia* *Wnt*, *brachyury*, *β-catenin* und *TCF* in transgenen Ras2-Tieren zeigten eine Modulation des Wnt-Signalwegs durch Ras.

Eine erste orientierende Transkriptom Analyse von Transgenen und einer Wildtyp-Kolonie von *Hydractinia* zeigte, dass Transgene mit veränderten Phänotypen veränderte Transkriptome aufwiesen. Die Analyse ergab, dass zahlreiche Gene, sowohl im Vergleich von Ras1 und Ras2 Transgenen zueinander, als auch im Vergleich der Transgene zum Wildtyp unterschiedlich aktiv sind.

5 abstract

Hydractinia echinata owns two Ras proteins. *Hydractinia* Ras1 shows similarity to classical H-, K-, and N-Ras proteins of higher organisms. Ras2 was dedicated to RRas2(TC21) proteins of other organisms. Possible homologous of proteins known to be involved in Ras signaling in other animals were identified in *Hydractinia*.

In-situ-hybridisation for both *Ras*-RNAs showed a ubiquitous distribution in the ectoderm and the endoderm. There is basically weaker *Ras* expression in the endoderm than in the ectoderm. Different *Ras*-RNA expression patterns exist in different developmental stages of *Hydractinia*, whereupon the pattern is the same for both *Ras* in the single developmental stages.

Miss expression studies were carried out to study the possible function of the *Hydractinia echinata* Ras proteins. Over expression of native *Hydractinia* Ras1 or Ras2 forms had no obvious effect on the body shape. Conserved amino acid residues that are known to be essential for the functional regulation of Ras proteins in other organism do also exist in both *Hydractinia* Ras proteins. Modulation of the Ras proteins by replacement of these amino acids results also in *Hydractinia* in the activation of the Ras proteins. Over expression of activated Ras1, that was independent from each other modulated at two different amino acid positions, resulted in both cases in the same phenotype in gastrozooids. In both cases benign neoplasia were observed at stable, absolutely reproducible positions in the gastroderm. In *Hydractinia* Ras1 has an influence on the proliferation. Over expression of activated Ras2 never resulted in the formation of neoplasia. Instead over expression of activated Ras2 resulted in the formation of secondary body axis in gastro- and gonozooids. qPCR data considering the expression of *Hydractinia* *Wnt*, *brachyury*, *β-catenin* and *TCF* in transgenic Ras2 animals revealed a modulation of the Wnt signaling pathway by Ras.

A first orientating transcriptome analysis of *Hydractinia* transgenic colonies and a wildtype colony pointed out, that transgenic colonies with altered phenotype exhibit altered transcriptomes. The analysis displayed that numerous Genes showed distinct activity comparing transgenic Ras1 and Ras2 as well as comparing the transgenes with the wildtype.

6 Literaturverzeichnis

- Adjei A.A. (2001)** “*Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy*”, JNCI J Natl Cancer Inst (2001) 93 (14): 1062-1074.
- Albright C.F., Giddings B.W., Liu J., Vito M., Weinberg R.A. (1993)** “*Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase*”, The EMBO Journal, 12 (1): S. 339-347.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipmann D. (1990)** “*Basic local alignment search tool*”, Journal of Molecular Biology, 215 (3): S. 403–410.
- Alarcón B., Martínez-Martín N. (2012)** “*RRas2, RhoG and T-cell phagocytosis*”, Small GTPases. 3 (2): S. 97-101.
- Arnold, S.J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B.G., Kemler, R., (2000)** “*Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway*”, Mech. Dev. 91 (1–2), 249–258.
- Aroian R.V., Koga M., Mendel J.E., Ohshima Y., Sternberg P.W. (1990)** “*The let-23 gene necessary for Caenorhabditis elegans vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily*”, Nature 1990 Dec 20; 348(6303):693–699
- Bar-Sagi D. (2001)** “*A Ras by Any Other Name*”, Molecular and Cellular Biologie, 21 (5): S. 1441–1443.
- Ballard W.W. (1942)** “*The mechanism for synchronous spawning in Hydractinia and Pennaria*”, The Biological Bulletin, Vol. 82, No. 3: S. 329-339.
- Barbacid M. (1987)** “*Ras Genes*”, Annual Review of Biochemistry; Vol. 56: S. 779-827.
- Basu R. UK, Henkhaus R.S., Loupakis F., Cremolini C., Gerner E.W., Ignatenko N.A. (2013)** “*Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis*”, Int J Cancer. 2013 Jul; 133(1):43-57.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979)** “*A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*”, Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24; 7(6):1513-23.
- Bos J.L. (1989)** “*Ras oncogenes in human cancer: a review*”, Cancer Research, 49 (17): S. 4682-4689.
- Bosch TC, Benitez E, Gellner K, Praetzel G, Salgado LM (1995)** “*Cloning of a ras-related gene from Hydra which responds to head-specific signals*”, Gene, 167 (1-2): S. 191-195.
- Bourne H, Sanders D, McCormick F (1991)** “*The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*” Nature 349: S. 117-127.
- Buchanan FG, McReynolds M, Couvillon A, Kam Y, Holla VR, Dubois RN, Exton JH (2005)** “*Requirement of phospholipase D1 activity in H-Ras^{V12} – induced transformation*”, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 102 (No. 5): S. 1638-1642.

- Cadigan K.M., Nusse R. (1997)** “*Wnt signaling: a common theme in animal development*”, *Genes Dev.* 1997 Dec 15; 11(24):3286-305.
- Cantley L.C. (2002)** “*The phosphoinositide 3-kinase pathway*”, *Science* 2002; 296:1655-7
- Castellano E., Downward J. (2011)** “*RAS Interaction with PI3K: More than just another Effector Pathway*”, *Genes & Cancer*, 2 (3): S. 261-274, doi: 10.1177/1947601911408079.
- Castresana J. (2000)** “*Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis*”, *Molecular Biology and Evolution*, 17 (4): S. 540-552.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. (1979)** “*Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*”, *Biochemistry* 1979 Nov 27; 18(24): 5294-9.
- Choy E., Chiu V.K., Silletti J., Feoktistov M., Morimoto T., Michaelson D., Ivanov I.E., Philips M.R. (1999)** “*Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi*”, *Cell* (Jul 1999), 98 (1): S. 69-80.
- Colicelli J. (2004)** “*Human RAS superfamily proteins and related GTPases*”, *Science’s STKE*, 2004 (250): RE13.
- Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelmann J.A. (2010)** “*The PI3K pathway as drug target in human cancer*”, *Journal of clinical oncology*, 28 (6): S. 1075-1083.
- Corral T., Jiménez M., Hernández-Muñoz I., Pérez de Castro I., Pellicer A.J. (2003)** “*NF1 modulates the effects of Ras oncogenes: evidence of other NF1 function besides its GAP activity*”, *Cell Physiol.* 197 (2): S. 214-224.
- Cox AD, Der CJ (2010)** „*Ras history: The saga continues*”, *Small GTPases*, 1 (1): S. 2-27.
- Der CJ (2006)** “*RAS Family GTPases (Proteins and Cell Regulation)*”, Springer; Auflage: 2006 (13. September 2006)
- Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM (1982)** “*Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses*”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 (11): S. 3637-3640.
- Der C.J., Finkel T., Cooper G.M. (1986)** “*Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61*”, *Cell*. 44:S. 167–176.
- Dorval V., Mandemakers W., Jolivet F., Coudert L., Mazroui R., De Strooper B., Hébert S. (2014)** “*Gene and MicroRNA Transcriptome Analysis of Parkinson's Related LRRK2 Mouse Models*”, *PLoSone* Published: January 10, 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.0085510
- Drivas G.T., Shih A., Coutavas E., Rush M.G., D’Eustachio P. (1990)** “*Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line*”, *Molecular and Cellular Biologie*, 10 (4): S. 1793-1798.

- Duffy D.J., Plickert G., Kuenzel T., Tilmann W., Frank U. (2010)** “*Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in Hydractinia metamorphosis and regeneration*”, *Development*, 137 (18): S. 3057-3066.
- Duronio V. (2008)** “*The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway*”, *Biochem J.* 2008; 415:333–344.
- Eisenberg S., Henis Y.I. (2008)** “*Interactions of Ras proteins with the plasma membrane and their roles in signaling*”, *Cell Signal* 20: S. 31-39.
- Engelmann J.A, Luo J., Cantley L.C. (2006)** “*The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*”, *Nat Rev Genet.* 2006; 7:606-19
- Eerola I., Boon L.M., Mulliken J.B., Burrows P.E., Domp Martin A., Watanabe S., Vanwijck R., Vikkula M. (2003)** “*Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations*”, *Am J Hum Genet.* 2003 Dec; 73(6):1240-9.
- Espada J, Perez-Moreno M, Braga VM, Rodriguez-Viciano P, Cano A (1999)** “*H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of beta-catenin in epidermal keratinocytes*”, *The Journal of cell biology*, 146 (5): S. 967–980.
- Esteban L.M., Fernández-Medarde A., López E., Yienger K., Guerrero C., Ward J.M., Tessarollo L., Santos E. (2000)** “*Ras-Guanine Nucleotide Exchange Factor Sos2 Is Dispensable for Mouse Growth and Development*”, *Mol. Cell. Biol.* vol. 20 no. 17: S. 6410-6413.
- Esteban L.M., Vicario Abejon C., Fernandez-Salguero F., Fernandez-Medarde A., Swaminathan N., Yienger K., Lopez E., Malumbres M., McKay R., Ward J.M., Pellicer A., Santos E. (2001)** “*Targeted genomic disruption of H-Ras and N-Ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development*”, *Mol. Cell. Biol.* 21, 1444-1452
- Farnsworth C.L. and Feig L.A. (1991)** “*Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP*”, *Mol Cell Biol.* Oct 1991; 11(10): 4822–4829. PMID: PMC361448
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998)** “*Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*”, *Nature*, 391: S.806–881.
- Fedrigo O (2010)** “*A Pipeline to Determine RT-QPCR Control Genes for Evolutionary Studies: Application to Primate Gene Expression across Multiple Tissues*”, *PLoS One.* 2010 Sep 2;5(9). pii: e12545. doi: 10.1371/journal.pone.0012545.
- Fernández-Medarde A., Santos E. (2011)** “*Ras in cancer and developmental diseases*”, *Genes Cancer*, 2 (3): S. 344-358.
- Feig L.A. (1999)** “*Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases*”, *Nat Cell Biol.* 1 (2): S. E25-7.

- Fleming J. (1828)** “*A History of British Animals, Exhibiting the Descriptive Characters and Systematical Arrangement of the Genera and Species of Quadrupeds, Birds, Reptiles, Fishes, Mollusca, and Radiata of the United Kingdom; including the Indigenous, Extirpated, and Extinct Kinds, together with Periodical and Occasional Visitants*”, Bell and Bradfute, (Edinburgh), i-xxiii: S. 1-565.
- Fortini M.E., Simon M.A., Rubin G.M. (1992)** “*Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation*”, *Nature*. 1992; 355:559–561
- Franke T., Hornik C. P., Segev L., Shostak G.A., and Sugimoto C. (2003)** “*PI3K/Akt and apoptosis: size matters*”, *Oncogene* (2003) 22, 8983–8998
- Frank U., Leitz T., Müller W.A. (2001)** “*The hydroid Hydractinia: a versatile, informative cnidarian representative*, *Bioessays*, 23(10): S. 963-971.
- Frank U., Plickert G., Müller W.A. (2009)** “*Cnidarian interstitial cells: the dawn of stem cell research*”, in Rinkevich B, Matrangola V (Eds.); *Stem Cells in Marine Organisms*, Springer. ISBN: 978-90-481-2766-5
- Freeman, G. & Miller, R.G. (1982)** “*Hydrozoan eggs can only be fertilized at the site of polar body formation*”, *Dev. Biol.* 94,142-152.
- Furth ME, Aldrich TH, Cordon-Cardo C (1987)** “*Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues*”, *Oncogene*. 1: S. 47–58.
- Gajewski M., Leitz T., Schloessherr J., Plickert G. (1996)** „*LWamides from Cnidaria constitute a novel family of neuropeptides with morphogenetic activity*”, *Roux's Arch. Dev. Biol.* Vol. 205, Issue 5-6: S. 232-242.
- Guder C., Philipp I., Lengfeld T., Watanabe H., Hobmayer B., Holstein T.W. (2006)** “*The Wnt code: cnidarians signal the way*”, *Oncogene*. 2006 Dec 4;25(57):7450-60.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. (2011)** „*Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome*“ *Nat Biotechnol.* 2011; 29(7):644-52.
- Graham S.M., Cox A.D., Drivas G., Rush M.G., D'Eustachio P., Der C.J. (1994)** “*Aberrant function of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 triggers malignant transformation*”, *Mol Cell Biol.* 14 (6): S. 4108-4115.
- Graham S.M., Vojtek A.B., Huff S.Y., Cox A.D., Clark G.J., Cooper J.A., Der C.J. (1996)** “*TC21 causes transformation by Raf-independent signaling pathways*”, *Mol Cell Biol.* 16 (11): S. 6132-6140.
- Harvey JJ (Dec 1964)** “*An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice*” *Nature*, 204 (4963): 1104–1105. PMID 14243400.

- Hao Y, Wong R., Feig L.A. (2008)** „*RalGDS couples growth factor signaling to Akt activation*”, Mol Cell Biol. 2008 May;28(9):2851-9. doi: 10.1128/MCB.01917-07. Epub 2008 Feb 19.
- Horowitz D. and Burke J.F. (1981)** “*Rapid and efficient cosmid cloning Nucleic Acids*”, Res. Jul 10, 1981; 9(13): 2989–2998. PMCID: PMC327326
- Horvitz H.R. (1997)** “*A nematode as a model organism: the genetics of programmed death*”, Cogito Learning Media, Inc. Available: <http://www.cogitomedia.com>.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., Martin, G. S. (1994)** “*Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*”, Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 11089-11093, 1994
- Hu Q., Klippel A., Muslin A.J., Fantl W.J., Williams L.T. (1995)** “*Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase*”, Science 268: S. 100-102.
- Itakura K., Rossi J.J., Wallace R.B. (1984)** “*Synthesis and use of synthetic oligonucleotides*”, Annual review of biochemistry, 53: S. 323-356.
- Itoh K., Sokol S.Y. (1999)** “*Axis determination by inhibition of Wnt signaling in Xenopus*”, Genes Dev. 1999 Sep 1;13 (17):2328-36.
- Jackson J.B.C. (1977)** “*Competition on marine hard substrata: the adaptive significance of solitary and colonial strategies*”, Am. Nat. 111: S. 743–767.
- John J., Rensland H., Schlichting I., Vetter I., BoRasio G.D., Goody R.S., Wittinghofer A. (1993)** “*Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-Ras*”, The Journal of biological chemistry, 268 (2): S. 923-929.
- Joyce PL, Cox AD (2003)** “*Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase - inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling*”, Cancer Res. 63 (22): S. 7959-7967.
- Kamata T., Feramisco J.R. (1984)** “*Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins*”, Nature. 1984; 310:147–150.
- Karnoub A.E., Weinberg R.A. (2008)** “*Ras oncogenes: split personalities*”, Nat Rev Mol Cell Biol., 9 (7): S. 517-531
- Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. (1967).** “*Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus*”, J. Natl. Cancer Inst. 39, S.311-335
- Kidd A.R., Snider J.L., Martin T.D., Graboski S.F., Der C.J., Cox A.D. (2010)** “*Ras-related small GTPases RalA and RalB regulate cellular survival after ionizing radiation*”, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 78 (1): S. 205-212.
- Kolch W. (2000)** “*Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*”, Biochem. J. 351: S. 289–305.

- Kortschack R.D., Samuel G., Sait R., Miller D.J. (2004)** “*EST analysis of the cnidarians Acropora millepora reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates*”, *Curr. Biol.* 13: S. 2190-2195.
- Kunick, C., Lauenroth, K., Leost, M., Meijer, L. and Lemcke, T. (2004)** “*Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3beta*”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 413-416
- Künzel T., Heiermann R., Frank U. Müller W., Tilmann W., Bause M. , Nonn A., Helling M. Schwarz R., Plickert G. (2010)** “*Migration and differentiation potential of stem cells in the cnidarian Hydractinia analysed in eGFP-transgenic animals and chimeRas*”, *Developmental Biology* 348: S. 120–129
- Kroiher M., Berking S. (1999)** “*On natural metamorphosis inducers of the cnidarians Hydractinia echinata (Hydrozoa) and Aurelia aurita (Scyphozoa)*”, *Helgoland Marine Research*, Volume 53, Issue 2, S. 118-121
- Lange R., Plickert G. , Müller W.A., (1989)** “*Histo incompatibility in a low invertebrate. Hydractinia echinata. Analysis of the mechanism of rejection*”, *J. Exp. Zool.* 249, 284–292
- Lange R.G., and Müller W.A. (1991).** “*SIF, a novel morphogenetic inducer in Hydrozoa*”, *Dev. Biol.* 147: 121-132.
- Lambert J.M. (2002)** “*Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism*”, *Nature Cell Biol.*, 4: S. 621–625.
- Lapébie P., Ruggiero A., Barreau C., Chevalier S., Chang P., Dru P., Houliston E., Mommose T. (2014)** “*Differential Responses to Wnt and PCP Disruption Predict Expression and Developmental Function of Conserved and Novel Genes in a Cnidarian*”, *PLoS Genet.* 2014 Sep 18;10(9):e1004590.
- Larive R.M., Abad A., Cardaba C.M., Hernández T., Cañamero M., de Álava E., Santos E., Alarcón B., Bustelo X.R. (2012)** “*The Ras-like protein R-Ras2/TC21 is important for proper mammary gland development*”, *Mol Biol Cell*, 23 (12): S. 2373-2387
- Lee H.W., Kyung T, Yoo J, Kim T, Chung C., Ryu J.Y., Lee H., Park K., Lee S, Jones WD, Lim DS, Hyeon C, Heo W.D., Yoon T.Y. (2013)** “*Real-time single-molecule co-immunoprecipitation analyses reveal cancer-specific Ras signalling dynamics*”, *Nat Commun.* 4: S. 1505.
- Leung KF, Baron R, Ali BR, Magee AI, Seabra MC (2007)** „*Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation*“ *J Biol Chem.* 2007 Jan 12;282(2):1487-97. Epub 2006 Nov 18.
- Lenhoff S.G., Lenhoff H.M. (1986)** „*Hydra and the Birth of Experimental Biology: Abraham Trembley’s Memoirs Concerning the Natural History of a Type of Freshwater Polyp with Arms Shaped like Horns*”, The Boxwood Press, Pacific Grove, CA.S. 192 ff.
- Li J., Mizukami Y., Zhang X., Jo W.S., Chung D.C. (2005)** “*Oncogenic K-Ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta*”, *Gastroenterology*, 128 (7): S. 1907-1918.

- Li B., Dewey C.N. (2011)** “*RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome*”, BMC Bioinformatics, Volume 12: S. 323
- Lim K.H., Baines A.T., Fiordalisi J.J., Shipitsin M., Feig L.A., Cox A.D., Der C.J., Counter C.M. (2005)** “*Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells*”, Cancer Cell. 7 (6): S. 533-545.
- Lopez I., Mak E.C., Ding J., Hamm H.E., Lomasney J.W. (2001)** “*A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by $G\alpha_{12}$ and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway*”, J Biol Chem., 276: S. 2758–2765.
- López-Barahona M., Bustelo X.R., Barbacid M. (1996)** “*The TC21 oncoprotein interacts with the Ral guanosine nucleotide dissociation factor*”, Oncogene. 12 (3): S. 463-70.
- Luo J.Q., Liu X., Hammond S.M. (1997)** “*RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP2-dependent phospholipase D1*”, Biochem Biophys Res Commun, 235: S. 854-859
- MacDonald B., Tamai K., He X. (2009)** “*Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*”, Cell Volume 17, Issue 1: S. 9–26.
- Malliri A. (2002)** “*Mice deficient in the Rac activator Tiam are resistant to Ras-induced skin tumours*”, Nature, 417: S. 867–871.
- Malumbres M., Barbacid M. (2003)** “*RAS oncogenes: the first 30 years*”, Nat. Rev. Cancer, 3 (6): S. 459–465.
- Mandell J.W. (2003)** “*Phosphorylation state-specific antibodies: Applications in investigative and diagnostic pathology*”, Am J Pathol, 163: S.1687–1698.
- Martínez D.E. (1998)** “*Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra*”, Exp Gerontol. 1998 May;33(3):217-25.
- Margolis B., Skolnik E.Y. (1994)** “*Activation of Ras by receptor tyrosine kinases*”, J Am Soc Nephrol. 1994 Dec; 5(6):1288-99.
- Matz M.V. (2002)** “*Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes*”, Methods Mol Biol., 183: S. 3-18.
- Miller J.R., Hocking A.M., Brown J.D., Moon (1999)** “*Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways*”, Oncogene, 18 (55): S. 7860-7872.
- Moore S.F., Hunter R.W., Hers I. (2011)** “*mTORC2 protein complex-mediated Akt (Protein Kinase B) Serine 473 Phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets [corrected]*”, J Biol Chem., 286 (28): S. 24553-25560.
- Moodie S.A., Willumsen B.M., Weber M.J., Wolfman A. (1993)** “*Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase*”, Science. 1993; 260:1658–1661.
- Movilla N., Crespo P., Bustelo X.R. (1999)** “*Signaltransduction elements of TC21, an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins*”, Oncogene, Volume 18, no 43: S. 5860-5869.

- Murphy G.A., Graham S.M., Morita S., Reks S.E., Rogers-Graham K., Vojtek A., Kelley G.G., Der C.J. (2002)** “*Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation*”, *Biol Chem.* 2002 Mar 22; 277(12): 9966-75
- Müller W. A. (1964)** „*Experimentelle Untersuchungen über Stockentwicklung, Polypendifferenzierung und Sexualchimären bei Hydractinia echinata*“, *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik* 155: 181-268
- Müller W. A. (1973)** “*Metamorphose Induktion bei Planularlarven; Development Genes and Evolution*”, *Development Genes and Evolution* 05/ 1973; 173(2):122-135. DOI:10.1007/BF00575138
- Müller W.A., Regina T., Möhle F. (2004)** “*Patterning a multi-headed mutant in Hydractinia: enhancement of head formation and its phenotypic normalization*”, *Int. J. Dev. Biol.*, 48: S. 9-15.
- Müller W.A., Uri F., Regina T., Mokady O., Guette C., Plickert G. (2007)** “*Wnt signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3inhibitors*”, *Int. J. Dev. Biol.* 51: S. 211-220.
- Nag A., Das S., Yu M., Deyle K., Millward S.W., Heath J.R., (2013)** “*A Chemical Epitope-Targeting Strategy for Protein Capture Agents: The Serine 474 Epitope of the Kinase Akt2*” *Wiley Online Library*, Volume 52, Issue 52, DOI: 10.1002/anie.201305882
- Neel N., Martin T., Stratford J., Zand T., Reiner D., Der C.J. (2011)** “*The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery*”, *Genes Cancer* 2 (3): S. 275-287.
- Nguyen A., Emelyanov A., Gong Z. (2011)** “*A high level of liver-specific expression of oncogenic Kras^{V12} drives robust liver tumorigenesis in transgenic zebrafish*”, *Dis Model Mech.* 4 (6): S. 801-813.
- Nguyen A.T., Emelyanov A., Koh C.H., Spitsbergen J.M., Parinov S., Gong Z. (2012)** “*An inducible kras(V12) transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening*”, *Dis Model Mech.* 2012 Jan;5(1):63-72.
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. (1980)** “*Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*”, *Nature* 287: S. 795-801.
- Ogura T., Tan A., Tsubota T., Nakakura T., Shiotsuki T. (2009)** “*Identification and Expression Analysis of Ras Gene in Silkworm Bombyx mori*”, *PLoS ONE* 4 (11): S. e8030.
- Pankow and Bamberger (2007)** “*The p53 Tumor Suppressor-like Protein nvp63 mediates selective Germ Cell Death in sea anemone Nematostella vectensis*” *plos one* 2(9): e782.doi: 10.1371/journal.pone.0000782
- Pai E., Kabsch W., Krenzel U., Holmes K.C., John J., Wittinghofer A. (1989)** “*Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-Ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation*”, *Nature* 341: S. 209 – 214.

- Pierre S., Bats A.S., Coumoul X. (2011)** “*Understanding SOS (Son of Sevenless)*”, *Biochem Pharmacol.* 82 (9): S. 1049-1056
- Plickert G., Heringer A., Hiller B. (1987)** “*Analysis of spacing in a periodic pattern*”, *Dev.Biol.* 120: S. 399-411.
- Plickert G., Kroihner M. (1988)** “*Proliferation kinetics and cell lineages can be studied in whole mounts and macerates by means of BrdU/anti-BrdU technique*”, *Development* 103: S. 791-794.
- Plickert G., Gajewski M., Gehrke G., Gausepohl H., Schlossherr J., Ibrahim H., (1997)** “*Automated in situ detection (AISD) of biomolecules*”, *Development Genes and Evolution* November 1997, Volume 207, Issue 5, pp 362-367
- Plicker G., Schetter E., Verhey-Van-Wijk N., Schlossherr J., Steinbüchel M., Gajewski M. (2003)** “*The role of α -amidated neuropeptides in hydroid development-LWamides and metamorphosis in Hydractinia echinata*“ *Int. J. Dev. Biol.* 47: 439-450
- Plickert G., Jacoby V., Frank U., Muller W., Mokady O. (2006)** “*Wnt signaling in hydroid development: formation of the primary body axis in embryogenesis and its subsequent Patterning*”, *DevBiol* 298: S. 368–378.
- Plickert G., Frank U., Müller W. (2012)** “*Hydractinia, a pioneering model for stem cell biology and reprogramming somatic cells to pluripotency*”, *Int.Dev.Biol.*, 56: S. 519-534
- Pozzi A., Coffa S., Bulus N., Zhu W., Chen D., Chen X, Mernaugh G, Su Y, Cai S., Singh A., Brissova M., Zent R. (2006)** “*H-Ras, R-Ras, and TC21 differentially regulate ureteric bud cell branching morphogenesis*”, *Mol Biol Cell.* 17 (4): S. 2046-2056.
- Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. (2012)** “*A comprehensive survey of Ras mutations in cancer*”, *Cancer Res.* 2012 May 15; 72(10):2457-67.
- Punta M., Coggill E., Mistry J., Tate, Bournsnel C., Pang N., Forslund C., Clements H., Holm, Sonnhammer E., Bateman (2014)** “*The Pfam protein families database*”, *Nucleic Acids Research, Database Issue* 42: D222-D230.
- Qian X., Esteban L., Vass W.C., Upadhyaya C., Papageorge A.G., Yienger K., Ward J.M., Lowy D.R., Santos E. (2000)** “*The Sos1 and Sos2 Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties*”, *EMBO J.* 2000 Feb 15;19(4):642-54.
- Rebscher N., Volk C., Teo R., Plickert G. (2008)** “*The germ plasm component Vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian Hydractinia echinata*”, *Dev Dyn.* 237 (6): S. 1736-45.
- Reid T. S., Terry K. L., Casey P. J., Beese L. S. (2004)** “*Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity*”, *J. Mol. Biol.* 2004;343:417–433.

- Reuter C.W., Morgan M.A., Bergmann L. (2000)** “*Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?*”, *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1655-69.
- Rudack T., Xia F., Schlitter J., Kötting C., Gerwert K. (2012)** “*Ras and GTPase-activating protein (GAP) drive GTP into a precatalytic state as revealed by combining FTIR and biomolecular simulations*”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (38): 15295-15300.
- Robinson M.D., McCarthy DJ, Smyth G.K. (2010)** “*edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*”, 2010 Jan 1; 26(1):139-40.
- Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., Downward J. (1994)** “*Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*”, *Nature*. 370 (6490): S. 527-532.
- Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Khwaja A., Marte BM, Pappin D., Das P., Waterfield M.D., Ridley A., Downward J. (1997)** “*Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras*”, *Cell*. 1997; 89:457–467.
- Rojas R., Kimple R., Rossman K., Siderovski D., Sondek J. (2003)** “*Established and Emerging Fluorescence-Based Assays for G-Protein Function: Ras-Superfamily GTPases*”, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 6: S. 79-99
- Rojas J.M., Oliva J.L., Santos E. (2011)** “*Mammalian Son of Sevenless Guanine Nucleotide Exchange Factors - Old Concepts and New Perspectives*”, *Genes Cancer* 2 (3): S. 298-305. doi: 10.1177/1947601911408078
- Rong R., He Q., Liu Y., Sheikh M. S., Huang Y. (2002)** “*TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway*”, *Oncogene*. 21 (7): S. 1062-1070.
- Rosário M., Paterson H., Marshall C. (2001)** “*Activation of the Ral and Phosphatidylinositol 3' Kinase Signaling Pathways by the Ras-Related Protein TC21*”, *Mol.Cell. Biol.*, Vol. 21 No. 11: S. 3750-3762.
- Rosario M., Paterson H. F., and Marshall C. J. (1999)** “*Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells*”, *EMBO J*. 18: S. 1270-1279.
- Salzberg A., Cohen N., Halachmi N., Kimchie Z., Lev Z. (1993)** “*The Drosophila Ras2 and Rop gene pair: a dual homology with a yeast Ras-like gene and a suppressor of its loss-of-function phenotype*”, *Development*. 117 (4): S. 1309-19.
- Schneider T., Leitz T. (1994)** “*Protein kinase C in hydrozoans: involvement in metamorphosis of Hydractinia and pattern formation of Hydra*”, *Roux Arch. Dev.* 203; 422-428
- Schubbert S., Shannon K., Bollag G. (2007)** “*Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*”, *Nat Rev Cancer*, 7 (4): S. 295-308.
- Shutes A., Der C. J. (2006)** “*Real-time in vitro measurement of intrinsic and Ras GAP-mediated GTP hydrolysis*”, *Methods Enzymol.* 407: S. 9-22.

- Sigrist C.J.A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. (2002)** “*Prosite: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors*”, *Brief Bioinform.* 3: S. 265-274.
- Song C. (2001)** “*Regulation of a novel human phospholipase, C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras*”, *J Biol Chem*, 276: S. 2752–2757.
- Spoerner M., Herrmann C., Vetter I.R., Kalbitzer H.R., Wittinghofer A. (2001)** “*Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors*”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (9): S. 4944-4949.
- Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf C.R., Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D., Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti .F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L., Evangelisti C., Martelli A.M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J.A. (2011)** “*Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging*”, *Aging (Albany NY)*, 3 (3): S. 192–222.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011)** “*MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*”, *Mol. Biol. Evol.*, 28: S. 2731-2739.
- Tsuchiya A., Kanno T., Nishizaki T. (2013)** “*PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway*”, *J Endocrinol.* 2013 Nov 28; 220(1):49-59.
- Van Aelst L. (1998)** “*Two-Hybrid Analysis of Ras–Raf Interactions Transmembrane Signaling Protocols*”, *Methods in Molecular Biology*TM, Volume 84, S. 201-222.
- Van der Zee M., da Fonseca R.N., Roth S. (2008)** “*TGF β signaling in Tribolium: vertebrate-like components in a beetle*”, *Dev Genes Evol.*, 218 (3-4): S. 203-213.
- Vojtek A.B., Hollenberg S.M., Cooper J.A. (1993)** “*Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf*”, *Cell.* 1993 Jul 16; 74(1):205-14.
- Watzinger F., Mayr B., Haring E., Lion T. (1998)** “*High sequence similarity within Ras exons 1 and 2 in different mammalian species and phylogenetic divergence of the Ras gene family*”, *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 9 (3): S. 214-219.
- Walther M., Ulrich R., Kroiher M., Berking S. (1996)** “*Metamorphosis and pattern formation in Hydractinia echinata, a colonial hydroid*”, *Int J Dev Biol.*, 40 (1): S. 313-322.
- Watanabe H., Fujisawa T., Holstein T.W. (2009)** “*Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system Development*”, *Growth & Differentiation*, Volume 51, Issue 3: S. 167–183.
- Weis V. M., Kenne D.R., Buss L. W. (1985)** “*Biology of Hydractiniid hydroids. 4. Ultrastructure of the planula of Hydractinia echinata*”, *Biol. Bull.* 168: S. 403 -418.

- Weismann, A. (1883)** “*The origin of the sexual cells in hydromedusae (Foreign title: Die Entstehung der Sexualzellen bei Hydromedusen)*“, Jena, Gustav Fischer
- Whelan S., Goldman N. (2001)** “*A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach*”, Mol Biol Evol., 18 (5): S. 691-699.
- Wolthuis, Franke, van Triest, Bauer, Cool, Camonis, Akkerman, Bos (1998)** “*Activation of the Small GTPaseRal in Platelets*”, Mol. Cell. Biol., vol. 18, no. 5: S. 2486-2491
- Wortzel I., Seger R. (2011)** “*The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles*”, Genes Cancer, 2 (3): S. 195-209. doi: 10.1177/1947601911407328.
- Wright L. P., Philips M. R. (2006)** “*Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras*”, J Lipid Res. 2006 May;47(5):883-91.
- Zhao-C., Skowronek-K., Frohman-M., Bar-Sagi D. (2007)** “*Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos*”, Nature Cell Biology 9: S. 707-712

7 Anhang

A.)

```

ATGCTTCATCGTCAGAACCAACCAAGTCAAAATGGTTGTAGTTGGAGCTGGAGGTGTTGGAAAAGAGCGCTTTAACAATACAGCTAA
TTCAAACCATTTTCGTGGAAGACTACGACCAACCATCGAGGACTCCTATATCAAGCAAGTTGTAGTGGATGGCTCTATTTGTATACT
GGATATACTTGATACTGCAGGTCAGGAGGAATACAGTGCATGCGAGAACACTACATGCGAACTGGAGAAGGTTTCCTTTGTGTCTTC
GCTGTTACTAGTTTAAATCTTTCCAAGAAATAGACAACCTTTAGAACGCAGGCACTGAGGGTGAAGATGCAGAATCAGTACCAATGG
TTTTGGTAGGAAATAAAGTCGATTTACCGAAGCGTGACGTGTCGACGAAAGACGAAACGAGAAAGCACAGAGTTTCAATATACCATA
CGTTGAAACATCAGCGAAAACCAAGCAAGGCGTGAAGAAGCATTTTTACCCTCGTGCAGAGAAATAATTGCTGATCGTCGACGGAGA
GAGGGTCAAAGAAAAGTGATTGAAGAAAATCGAAATCAAGTGCACACTATTCTGTAA

```

B.)

```

MSSSSEPTKFKMVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVEDYDPTIEDSYIKQVVVDGSI CILDILDITAGQEEYSAMREHYMRTGEGFLCVF
AVTSLKSFQEIDNFRQTALRVKDAESVPMVLVGNKVDLPRKDVSTKDGNEKAQSFNIPYVETSAKTKQGVVEEAFITLVREI IADRERRR
EGQKKS DSKKSKFKCTIL

```

Abb.1 *Hydractinia echinata* Ras1

A: *Hydractinia* Ras1 kodierende Region. Rot das Start Codon und in grün mit angefügt das Stop Codon. B: Aminosäure-Sequenz von *Hydractinia* Ras1. Das Startmethionin ist rot markiert. (NCBI accession Nr. JQ696857)

A.)

```

ATGCTGGAGGCGAATTGGATAGACAATACAAACCTGGTTGTAGTTGGAGGGGTGGTGTGGAAAAAGTGCCTTGACAATCCAGTTTA
TTCAATCACATTTTCGTTCAAGATTATGATCCTACGATCGAAGATTCCTATAGAAAAAATGTGTAATAGATGATCGAGTTGCACATTT
AGACATTTTGGATACTGCTGGTCAAGAGGAATTTAGTGCATGAGAGAACAGTATATGAGAACTGGGGAAGGATTTTTATTAGTGTTC
TCAGTGACAGATAGTTCCAGCTTCGATGAAATCCCGAGATTTACACACAAAATCCTACGAGTAAAGGATAAAGATGAATCCCAGTGA
TTCTAGTGGGTAACAAGTCAGATTTAGAGAATGAGCGAACTGTTTCAACTGCAGAAGCACAGAATTAGGTAGAAAACTAAAGATTCC
TTACCTGGAGTCTAGTGTAAACAACGAATTAATGTGACGCGAGCATTTCAGATTAGTTCGAGCTATTAGGCGTTCTAATGAAGTT
ATTGATCAGCCAGTTAAGAAAAAGAAAAAATCCAAGTGCACAATTCGTAA

```

B.)

```

MAGELDRQYKLVVVGGGGVGKSALTIQFIQSHFVQDYDPTIEDSYRKQCVIDDRVAHLDILDITAGQEEFSAMREQYMRTGEGFLLVF
SVTDSSSFDEIPRFHTQILRVKDKDEFPMILVGNKSDLENERTVSTAEAQELGRKLIKIPYLESSAQQRINVDAAAFHDLVRAIRRSNEV
IDQPVK KKKKSKCTIL

```

Abb.2 *Hydractinia echinata* Ras2

A: *Hydractinia* Ras2 kodierende Region. Rot das Start Codon und in grün mit angefügt das Stop Codon. B: Aminosäure -Sequenz von *Hydractinia* Ras2. Das Startmethionin ist rot markiert. (NCBI accession Nr. JQ696858)

```

MAATSENNLVDIGRDLTREQRSLTVTDLDKEVLESGHFKSDQIKESQLYREVQNVQVIRL TEDELKNL KKLHKTGF SHPPSIYFEE
VEDLTVKLDALRNKEKTLHKKPVQNGTIHNDSSDSDAPSSPSPLRSGATSTSSYGDVIPSPLRAHFRAYLPNNQRTMIKYKHGQTV
RDALYKAMTLRALTADSYVYLYKSTRERVDWDADVASLDGAEVSVELFDDNYSQTQSLSHNFVRKTFFTLAFCDACRKLFLQGFRCF
TCGYRFHQKCGAPSLCQQAHLNIYKRLASNPAAATLPMPTTPRPLGPRERSISAPNVNMIQPPGPPESIIVEVLEKNYQHSRTR
HEPATISGGLIRQLSGQSSQRGHLSDIFTPDRDQGNVFNFSAAANSVPLSNVPTSQPYQPI SGIPGSL LHPAKVRHRSKSHSDNDNVKK
TRNSRRDSDNDWEINDGEVQVQQRIGSGSYGTVYKGFHWHTVAVKMLNVKDPNPQQLQAFKNEVAVLRKTRHVNILLFMGCMSKPNS
IVTQWCEGSSLYRHLHVMENKFTMVQLLEIARQSAQGVLYLHAKSI IHRDLKSNNIFLQEDLTVKVGDFGLATVTRWSDHGCEQPS
GSILWMAPEVIKMQDPNPYTFMSDVYAFGIC IYELITSTLPYSNIGNKQQLIYMVGRGYLRPDQSKIRSDCPKALRRLYIDCIKYNRE
ERPLFIQLASIESILRALPKITRSTSEPLLHRAKPTDVIDSYPCPTPHTPIRSGVFNFYSAQQQPVY

```

Abb.3 Sequenz des möglichen *Hydractinia* RAF-Proteins

Die Sequenz wurde durch eine BLAST-Analyse (3.5.1.11) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt

```

H.sapiens ARAF -----
H.sapiens CRAF -----
H.sapiens BRAF -----MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAASSAADPAIPE 45
H.echinata RAF MAATSENNLVDIGRDLTREQRSLTVTDLDKEVLESGHFKSDQIKESQLYR 50

H.sapiens ARAF -----
H.sapiens CRAF -----M 1
H.sapiens BRAF EVWNIKQMIKLTQEHIEALLDKFG--GEHNPPSIYLEAYEYTSKLDALQ 93
H.echinata RAF EVQNVQQVIRLQTEDELKLNKELHKRTGFSHPPSIYFEVEEDLTVKLDALR 100

H.sapiens ARAF -----MEP-----PRGPPA 9
H.sapiens CRAF EHIQGAWKTIISNGFGF-----KDAVFDGSSCISPTIVQQFGYQRRASD 44
H.sapiens BRAF QREQQLLESLSNGTDFSVSSSASMDTVTSSSSSSLSVLPSSLSVFNQPTD 143
H.echinata RAF NKEKTLHKKPVQNGT-----IHNDSSDDSA P S P S P L R S G ---ATSTSS 142

H.sapiens ARAF NG--AEPsRAVGVTVKVVLPNKQRTVVTVVRDGMsvyDslDKALKVrGLNqD 57
H.sapiens CRAF DGKLTDPskTStNtIRVfELPNKQRTVVNVrNGMSLHDCLMKALKVrGLQfE 94
H.sapiens BRAF VARSNPKSPQKPIVrVfELPNKQRTVVpARCgVTVrDslKkALMmrGLTfE 193
H.echinata RAF YGDVIPSSPLRAHFRAVLPNNQRTMIKykHGQTVrDALYkAMTLRALtAD 192
. * . . . : * * * * * : : * : : * * * * * : * * * * * :
H.sapiens ARAF CCVVYRLI--KGRKTVTAWDTAIAPLDGEELIVEVLEED----VPLTMH 99
H.sapiens CRAF CCAVFRLLHEHKGKKARLDWNTDAASLIGEELQVDFLDH----VPLTTH 139
H.sapiens BRAF CCAVYRIQ--DGEKKPIGWDTDISWLTGEELHVEVLEEN----VPLTTH 235
H.echinata RAF SYVVYLKS----TRERVDWDADVASLDGAEVSVLEEDDNYNsQTQSLSH 237
. * : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
H.sapiens ARAF NFVRKTFfSLAFCDfCLKfLfhGfRCQTCgyKfHQHCsSKVPTVCvDMsT 149
H.sapiens CRAF NFARKTfLKLAFCDICQKfLLNGfRCQTCgyKfHEHCsTKVPTMCvDWSQ 189
H.sapiens BRAF NFVRKTFfTLAFCDfCRKLLfQGfRCQTCgyKfHQRCsTEVPLMCvNYDQ 285
H.echinata RAF NFVRKTFfTLAFCDACRKLlLlQGfRCfTCgyRfHQKCGAPSLQQAeHLN 287
* * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :
H.sapiens ARAF NRQQPS--RFYHSVQDLsGGsRQHEAPs----NRPLNELLTPQGP-SPR 191
H.sapiens CRAF IRQLLL--FPNSTIGDS--GVPALPSLT---MRRMRESVSRMPV-SSQ 229
H.sapiens BRAF LDLLFVSKFFEHHPiPQEEASLAETALTSgSSpSAPASDSIGQILTSps 335
H.echinata RAF IYKRMLASNPpAATLpNMpTTPRPLGPRERSISAPNVNMIGQPGGPESII 337
. : : *
H.sapiens ARAF TQHCdPEHfPF---PAPANAPLQRIRSTSTPNVHMVSTTAP-MDSNLIQ 236
H.sapiens CRAF HRYSTPHAFtNTSSpSSEGSLsQRQRSTSTPNVHMVSTTLp-VDSRMIE 278
H.sapiens BRAF PSKSIPIpQPFRPAEDHRNqFGQRDRSSAPNVHINTIEpVNIDDLIRD 385
H.echinata RAF VEvvLEKNYQHsRTRHEPATISGGLIRQLsGQSSQRGHLSDIFTPDRDQg 387
. * * . : .
H.sapiens ARAF LTGQSFSTDAAGSRGGSDGTPRGSPSPASVSSGRKSPHsKSPAE-QERK 285
H.sapiens CRAF DAIRSHSESASpSALSS-----SPNNLSP-TGWSQPKTPVPAQRERAPV 321
H.sapiens BRAF QGFRGDGGSTTGLSATP-----PASLPGSLTNVKALQKSPGPQRERKSS 429
H.echinata RAF NVFNfSAANSVPLSNVP-----TSQPYQPIsGIPGSLLLHPAKVrHRsKS 431
. . . : . . . : . *
H.sapiens ARAF SLADDKKKVKNLGYRDSGYyWVPPSEVQLLKRIGTGSFGTVfRGRWHD 335
H.sapiens CRAF SGTQEKNKIRPRGQRDSsYyWEIEASEVMLSTRIGSGSFGTVyKGKWHGD 371
H.sapiens BRAF SSEDNRNRMKTLGRRDSsDDWEIPDQGITVQQRIGSGSFGTVyKGKWHGD 479
H.echinata RAF HSDNDNVKkTRNSRRDSNDdWEINDGEVQVQQRIGSGSYGTVyKGFWHGT 481
: : : * * * * * : : : : * * * * * : * * * * * :
H.sapiens ARAF VAVKVLKVSQPTAEQAQAFKNEMQVLRKTRHVNIllFMGFMTRpGFAIT 385
H.sapiens CRAF VAVKILKVVDPtPEQfQAFRNEVAVLRKTRHVNIllFMGYMTKDNLAIVT 421
H.sapiens BRAF VAVKMLNVTAPtPQQLQAFKNEVGLRkTRHVNIllFMGYSTKpQLAIVT 529
H.echinata RAF VAVKMLNVKDPNPQQLQAFKNEVAVLRKTRHVNIllFMGCMsKPNLSIVT 531
* * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :
H.sapiens ARAF QWCEGSSLYHHLHVADTRFDMVQLIDVARQTAQGMDYLHAKNI IHRDLKS 435
H.sapiens CRAF QWCEGSSLYKHLHVQETKfQMFQLIDiARQTAQGMDYLHAKNI IHRDMKS 471
H.sapiens BRAF QWCEGSSLYHHLHIIEtKFEMIKLIDiARQTAQGMDYLHAKSI IHRDLKS 579
H.echinata RAF QWCEGSSLYRHLHVmenKfTMVQLLEiARQsAQGVdYLHAKSI IHRDLKS 581
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

```

```

H.sapiens ARAF      NNIIFLHEGLTVKIGDFGLATVKTRWSGAQPLEQPSGVLWMAAEVIRMQD 485
H.sapiens CRAF      NNIIFLHEGLTVKIGDFGLATVKSRWSGSQQVEQPTGSVLWMAPEVIRMQD 521
H.sapiens BRAF      NNIIFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQD 629
H.echinata RAF      NNIIFLQEDLTVKVGDFGLATVKTRWSGDHGCEQPSPGSIWMAPEVIRMQD 631
                    *****:*.****:*****:**** : ** :*:****:****:***
H.sapiens ARAF      PNPYSFQSDVYAYGVVLYELMTGSLPYSHIGCRDQIIFMVGRGYLSPDLS 535
H.sapiens CRAF      NNPFSFQSDVYSYGVVLYELMTGELPYSHINNRDQIIFMVGRGYASPDLS 571
H.sapiens BRAF      KNPYSFQSDVYAFGVVLYELMTGQLPYSNINNRDQIIFMVGRGYLSPDLS 679
H.echinata RAF      PNPYTFMSDVYAFGICIELITSTLPYSNIGNKDQLIYMVGRGYLRPDQS 681
                    **:.* ****:*. :****.* ****:*. :*:**** ** *
H.sapiens ARAF      KISSNCPKAMRRLSDCLKFQREERPLFPQILATIELLQSLPKIERSAS 585
H.sapiens CRAF      KLYKNCPKAMKRLVADCVKVKKEERPLFPQILSSIPELLQSLPKINRSAS 621
H.sapiens BRAF      KVRSNCPKAMKRLMAECLKKRDERPLFPQILASIELLARSLPKIHSAS 729
H.echinata RAF      KIRSDCPKALRRLYIDCIKYNREERPLFIQILASIESILRALPKITRSTS 731
                    *: .:****:*. :*: :**** ****:*. : :**** **:*
H.sapiens ARAF      EPSLHR-TQADELPACLLSAARLVP----- 609
H.sapiens CRAF      EPSLHRAAHTEDINACTLTTSRPLPVF----- 648
H.sapiens BRAF      EPSLNRAGFQTEDFSLYACASPKTPIQAGGYGAFPVH----- 766
H.echinata RAF      EPLLHRAKPSDVIDISYPCPTPHTPIRSGVFNFYSAQQQPVY 774
                    ** *:* : .: *

```

Abb.4 Sequenzvergleich des möglichen *Hydractinia* RAF mit RAF-Sequenzen des Menschen

Hydractinia echinata RAF (siehe Anhang Abb. 3); *Homo sapiens* B-RAF Sequenz (NCBI Reference Sequence: NP_004324.2), C-RAF [*Homo sapiens*] (UniProtKB/Swiss-Prot: P04049.1), A-RAF [*Homo sapiens*] (GenBank: AAH07514.1). Die spezifischen Domänen wurden in PROSITE ermittelt. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt. In **rot** ist die „Ras binding domain“, in **grün** das „zinkfinger phorbol-ester /DAG-type profile“, in **blau** die „Protein-kinase“ Domäne markiert.

```

MASGRKNKLNGLIINPAQPSLDPVQENSVSSEPSYKPKDIDELKLGDLLENLSQDQKSRLEEFRLDKHKIKGELRDEDFERILELG
AGNGGVVLQVNHKPTNLVMARKLIRLEIKPAIRNQIMRELKVLHECNCPYIVGFYGFYNDGEIISICMEYMDGGSLDLILKKAQRAPE
NILGVITYSVLKGSLYLRKHSIHRDVKPSNILINSRGEIKLDFGVSGQLIDSMANSFVGTSTRYSMPERLQGTHTYSIRSDLWSLGL
SLVELALGRYPICLTTEDLIKIFVDPSSQGVLPFGAKAPAGSAEVKSLAIFELLDYIVNEEPPKLPSSQYFSTFCDFINQCLKKNP
NDRADLKELLVHPWIKRAEADKNSIDLAGVWTRIMGIDVQTNV

```

Abb.5 Sequenz des möglichen *Hydractinia* MEK-Proteins

Die Sequenz wurde durch eine BLAST-Analyse mit menschlichem MEK1- (NCBI Reference Sequence: NP_109587.1) und MEK2-Protein (NCBI Reference Sequence: NP_109587.1) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt

```

H.sapiens Mek2      MLARRKPVLPAL-TINPTIAEGPSPTSEGASEANLVDL---QKKLEELE 45
H.sapiens Mek1      -MPKKKPTP---IQLNP-APDGSVAVNGTSSAETNLEAL---QKKLEELE 41
H.echinata Mek      MASGRKNKLNGLIINPAQPSLDPVQENSVSSEPSYKPKDIDELKLGDL 50
                    .:* :** .. . :*.. :**.*
H.sapiens Mek2      LD---EQQKRLEAFLTQKAKVG-ELKDDD FERI SELGAGNGGVVTKVQH 91
H.sapiens Mek1      LD---EQQKRLEAFLTQKQKVG-ELKDDD FEKI SELGAGNGGVVFKVSH 87
H.echinata Mek      LENLSQDQKSRLEEFRLDKHKIKGELRDED FERILELGAGNGGVVLQVNH 100
                    *: .:*.*** ** :* *: **:*:***:***** :*.*
H.sapiens Mek2      RPSGLIMAR KLIHLEIKPAIRNQI IRELQVLHECNCPYIVGFYGFYSDG 141
H.sapiens Mek1      KPSGLVMAR KLIHLEIKPAIRNQI IRELQVLHECNCPYIVGFYGFYSDG 137
H.echinata Mek      KPTNLVMAR KLRLEIKPAIRNQIMRELKVLHECNCPYIVGFYGFYNDG 150
                    .*:.*:*****:*****:***:*****:*****:*****.*
H.sapiens Mek2      EISICMEHMDGGSLDQVLKEAKRIPEEILGKVSIAVLRGLAYLREKHQIM 191
H.sapiens Mek1      EISICMEHMDGGSLDQVLKAGRIPEQILGKVSIAVIRGLTYLREKHKIM 187
H.echinata Mek      EISICMEYMDGGSLDLILKKAQRAPENILGVITYSVLKGSLYLRKHSII 200
                    *****:***** :*: * **:* ** : :*:****:*****.*
H.sapiens Mek2      HDVVKPSNILVNSRGEIKLDFGVSGQLIDSMANS FVGTSTRYSMPERLQG 241
H.sapiens Mek1      HDVVKPSNILVNSRGEIKLDFGVSGQLIDSMANS FVGTSTRYSMPERLQG 237
H.echinata Mek      HDVVKPSNILINSRGEIKLDFGVSGQLIDSMANS FVGTSTRYSMPERLQG 250
                    *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
H.sapiens Mek2      THYSVQSDIWSMGLSLVELAVGRYPISPPDAKELEAIFGRPVVDGEEGEP 291
H.sapiens Mek1      THYSVQSDIWSMGLSLVEMAVGRYPISPPDAKELELMFG-CQVEGDAEET 286
H.echinata Mek      THYSIRSDLWSLGLSLVELALGRYPICLTTEDLIKIFVDPSSQG----- 295
                    *****:***:***:*****:***:***** :*: * :*

```

```

H.sapiens Mek2 HSI SPRPRPPGRPVSGHGMSRPAMAFELLDYIVNEPPPPLNGVFTPD 341
H.sapiens Mek1 P-- -PRRTPGRPLSSYGMSRPPMAIFELLDYIVNEPPPPLPSGVFSLE 333
H.echinata Mek - - - -VVLPPG- AKAPAGSAEVKSLAIFELLDYIVNEEPPKLP SQYFSTE 339
      .** . : * . . :***** ***** . * : :
H.sapiens Mek2 FQEFVNKCLIKNPAERADLKMLTNHTF I KRSEVEE--VDFAGWLCKTLRL 389
H.sapiens Mek1 FQDFVNKCLIKNPAERADLKQLMVHAF I KRSDAEE--VDFAGWLCSTIGL 381
H.echinata Mek FCDF INQCLKKNPNDRADLKELLVHPWI I KRAEADKNSIDLAWGVTIMGI 389
      * :*:*:** *** :***** * *.:***:..: :*:***: : :
H.sapiens Mek2 NQPGTPTRTAV- 400
H.sapiens Mek1 NQPSTPTHAAGV 393
H.echinata Mek DVQTNV----- 395
      : .

```

Abb.6 Sequenzvergleich des möglichen *Hydractinia* MEK mit MEK-Sequenzen des Menschen

Hydractinia echinata MEK (siehe Anhang Abb.5); *Homo sapiens* MEK2 (NCBI Reference Sequence: NP_109587.1) und *Homo sapiens* MEK1 (NCBI Reference Sequence: NP_109587.1). In grün ist nach PROSITE die „protein-kinase domain“, in grau die „ATP binding site“, in rot die „proton acceptor site“ und in gelb der MEK1/1 „activation –loop“ eingefärbt. Hier wird Serin 218 in *Homo sapiens* MEK1 und Serin 222 in MEK2 werden durch RAF phosphoryliert (Wortzel et al., 2011). Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt.

```

MAAVNPPE TVRGQVFDVAPRYKGLNYIGEGAYGMVCSATDTVHGSKVAIKKISPFEHQTYCQRTLREIKILARFNHENIINIMDIKRT
IDEMKDVYIVQTLMETDLYKLLKSQKLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHRLDKPSNLLNTTCDLKICDFGLARVADPEHDHTG
ILTEYVATRWRAP EIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPLFPKGHYLDQLNLILNVLGSPDQEQALQFIRNEKARSYLIGLPKK
RTPWAQLFPPSASAKALDLLDKLLTFNPEKRVTVVEALAHAYLEQYYPQDEPVAEPEPFTFNTELDDLPEKELKELIFESTKMYGD

```

Abb.7 Sequenz des möglichen *Hydractinia* ERK-Proteins

Die Sequenz wurden durch eine BLAST-Analyse mit menschlichem ERK1 (NCBI Reference Sequence: NP_002737.2) und menschlichem ERK2 (NCBI Reference Sequence: NP_620407.1) (3.5.1.11) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt

```

H.sapiens ERK1 MAAAAAQGGGGEP RRTGEGVGPVGEVEMVKGQPFVDPGRYTQLQYIGE 50
H.sapiens ERK2 MAAAAAAG-----AGP-----EMVRGQVFDVGPRTYTNLSYIGE 33
H.echinata ERK MAAVNPPE-----TVRGQVFDVAPRYKGLNYIGE 29
      ***. . * :** ***.***. *.****
H.sapiens ERK1 GAYGMVCSAYDHRVKTRVAIKKISPFEHQTYCQRTLREIQILLRFRHENV 100
H.sapiens ERK2 GAYGMVCSAYDNVKNVVAIKKISPFEHQTYCQRTLREIKILLRSRHENI 83
H.echinata ERK GAYGMVCSATDTVHGSKVAIKKISPFEHQTYCQRTLREIKILARFNHENI 79
      *****.* * * . :*****
H.sapiens ERK1 IGIRDILRASTLEAMRDVYIVQDLMETDLYKLLKSQQLSNDHICYFLYQI 150
H.sapiens ERK2 IGINDIIRAPTIEQMKDVYIVQDLMETDLYKLLKTQHLSNDHICYFLYQI 133
H.echinata ERK INIMDIKRSPTIDEMKDVYIVQTLMETDLYKLLKSQKLSNDHICYFLYQI 129
      * . * * * : . : * :***** ***** :*:*****
H.sapiens ERK1 LRGLKYIHSANVLHRLDKPSNLLINTTCDLKICDFGLARIADPEHDHTGF 200
H.sapiens ERK2 LRGLKYIHSANVLHRLDKPSNLLLNTTCDLEICDFGLARVADPDHDTGFI 183
H.echinata ERK LRGLKYIHSANVLHRLDKPSNLLLNTTCDLKICDFGLARVADPEHDHTGI 179
      *****:*****:*****:***:****:
H.sapiens ERK1 LTEYVATRWRAP EIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFPKGHY 250
H.sapiens ERK2 LTEYVATRWRAP EIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFPKGHY 233
H.echinata ERK LTEYVATRWRAP EIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPLFPKGHY 229
      *****
H.sapiens ERK1 LDQLNHLILGILGSPSQEDLNCIINMKARNYLQSLPSKTKVAKLFPKSD 300
H.sapiens ERK2 LDQLNHLILGILGSPSQEDLNCIINLKARNYLLSLPHKNKVPWNR LFPNAD 283
H.echinata ERK LDQLNHLILNVLGSPDQEQALQFIRNEKARSYLIGLVPVKRTRTPWAQLFPPSAS 279
      ***** * . :***** * * : * * * * . * * . * : * * * . :
H.sapiens ERK1 SKALDLLDRMLTFNPNKRITVEEALAHAYLEQYYPDEPVAEPEPFTFAM 350
H.sapiens ERK2 SKALDLLDKMLTFNPKRIVEEALAHAYLEQYYPDPEPIAEAPFKFDM 333
H.echinata ERK AKALDLLDKLLTFNPEKRVTVVEALAHAYLEQYYPQDEPVAEPEPFTFNT 329
      :*****:*****.* * : * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

H.sapiens  RK1          ELDDLPKERLKEKELIFQETARFQPGVLEAP 379
H.sapiens  ERK2        ELDDLPEKELKELIFEETARFQPGYRS-- 360
H.echinata ERK         ELDDLPEKELKELIFESTKMYGD----- 352
*****:*****:.* :
    
```

Abb.8 Sequenzvergleich des möglichen *Hydractinia* ERK mit ERK1 und ERK2 des Menschen

Hydractinia echinata ERK (siehe Anhang Abb.7); *Homo sapiens* ERK1 (NCBI Reference Sequence: NP_002737.2) und *Homo sapiens* ERK2 (NCBI Reference Sequence: NP_620407.1). In **türkis** die „Protein-Kinase“ Domäne, in **grau** die ATP binding site und in **rot** die „proton acceptor site“ nach PROSITE dargestellt. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt. In **grün** sind die durch die Kinase MEK1 in ERK von *Homo sapiens* phosphorylierten Threonin 202 und Tyrosin 204 markiert (Wortzel et al., 2011).

A)

```

MAPSLEFSLDKHYFWHGKPESTKIDVHCMLPNGILISFPLIRADTLDDKIKKELWKEASRYSLFHLLRPKDEYVFGVSSKGGTEELI
DEEQSLFDVKPVRPYLKVQKQGDAAEKATQSI SMLIGRSITSTKNEEVDFRKRVSICETIAYQRGRSSWSNRAIYSYPPEFEED
ESLPTTITEKPKATSNRIHLSVSVMKNSNTFEVPCYTFPKDLIDMALRKAQTLKQNVVENSDDYILKVHGRSLFFLGHIVQDEYGE
ELYLEKHLIQYKYIRECLLWDKKPKLVII PKSEMVGVRVAPTTIQNPPPLPRRRHGNYNEICLWDISPSTMLRIKVVCCALNVNAGQM
WKEVQCGLFHGGEEVCEKQTTTRQKGIHPCWNEFLEFPLSVSVLPRMARLCFYIIGYQQKDTRKKKVPVIAWVNI PVFNYKGMNLSGS
CRLYCWQSGVKMASNSQNFNLNPLGTVASSGNENGPICVIEFMNFVHTVVYPSDDFI FEIAAKSVASRDNHPFLVKGKQHRQKIEEII
KRDSLAMFEEDKELLWKLRAECHDYPNSLPKLLQCVKWHSHEDVAQIRFLLHNWRREPLEVEIALDLLDYKFPDNKVRSLAVEVLD
NLSDGELEMYLLQLVQALKFESYLDSPLAGYLLRRALNNRRIGHYLFWHLKAEVSNPECSLQFGLLLEMYCRGAVDHIPIILLRQVEAI
GKMKTVTEILQSYKDQDNVKKLQLMRECFNGSSYIKAFSNIISPLDPSIKLKCLRVEKCKYMSKKKPLWL VFNADEGAEDVLIIFK
NGDDLQDMLTLLSLRLMDNVWKKAGYDYGII PYRCLSTGSMVGLIEVVPDSETLGRIQASRGSIRGVWKEADNLYQWLQEHCKNGGDK
LDTFMGNFMRSVVGYSVATYVLGVDRHNDNIMKYDTGQLFHIDFGHFLGNFKSKFGIKRERVKFLVTS DILYIFRQLKNQGSSEELG
DRFKEMCIDAFKTLRSKGNLFITVFAMLLSTGIPELEQPNLDLYLDRDSLAMLKDEADAVRHFESSYREAHANRSLTTVNWMFHNLNHY
WIG
    
```

B)

```

MTFLSKYNFWHGKEPTSKINVECFLPNGICVSLPLIKADTVLARIKAVLWQEAERYALFHLLKSPDHYVFEVVS KGGTEELIDENVS L
FDIKPVRPYLKIIVPRLGDDLEKVLNSKISMLVGGTKGTAKNEEVNDFRNRYSEFCNKISSQRRSTTWERRAIYTYPP EYDEEDQPSET
LKKRLVFTNWHLKVSVSVATKTSFTFNVPYKTYPKELLKMLTKKDNSSRASVETYNDYVLRVFGCLNFFLG YVVQVDGQEIYGEKS
LFQYKYIQCLLWNKPIKQLVLRKTDMAVEFFAIGRTPVRPVPVIPPKKQRSISLWNLSPSTKLIKIKIICALNVNSPAMMKEVVCGIYH
GTEEMCEQRKTSIQSGVNPQWKEFLEFDIPVSELPRMAKLCFSIVGRKRQAKKTI IAWVNV TAMDFKSCLRSGMARLYCWFNYGKLD
SEIGLLNPLGTVASSENEGGPCIVINCMKFSNQVAYPMEEEIIELAQCAAARASVQNPTASRQQLSHIEEIIKKDILASLFD EEEKELL
WQFRNVCRSDYPELPLKLLQSVKWRKKEVAQLYVLLQNKIQALQVETALDLLDY SFPDDKVR ELAVRVLENLS DGELEMYLLQLVQ
ALKYESYLHSPGRFLLGRALNNKRIGHYLFWHLKAELRNHDCSLLFGIILEFYCIGAVSHIDTLRQMEAINKLTIT EILQANKDD
AQQRDNQLRNLNLFNQPAYVKAFSGVISPLDPSMHLKKLKVEKCKHMSAKKPLWL VFNEMDEGAEDIYIIFKNGDDLQDMLTLLSLRL
MENVWRKSNLDYGLIPYKCLSTGYQIGMIEVVTQSETLARIQARHGRFVLSNS SLYTWISNCKNNEETLADCVSNFTRSLIGYSIAT
YALGIGDRHNDNVMMKYDTGQLFHIDFGHFLGNFKTKFVRRERVKFLLPDEFIYI IERTNKNISRR ENFDNFRMKCIEAFKTLRSHG
NLIITV FAMLLSTGIPELQPEDLDYIRD SLALQKDEADAIEHFSAAFKEAYDRRGSTSVMMWMIHSMRHHWI
    
```

Abb.9 Sequenzen von zwei möglichen *Hydractinia* p110-Proteinen

Die Sequenzen wurden durch eine BLAST- Analyse (3.5.1.11) mit menschlichem p110-alpha [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_006209.2; p110-beta [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_006210.1; p110-gamma [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_001269356.1; p110-delta [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_005017.3) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt.

```

H.sapiens  PI3Kp110beta  MCFSFIMPPAMADILDIWAVDSQIASDGSIPVDVFLPTGIYIQLEVPREA 50
H.sapiens  PI3Kp110alpha  -----MPPRPSS-GELWGIHLMPPR---ILVECLLPNGMIVTLECLREA 40
H.echinata PI3Kp1101    -----MAPSLEFSLDKHYFWHGKPESTKIDVHCMLPNGILISFPLIRAD 44
H.echinata PI3Kp1102    -----MTF-LSKYNFWHGKPEPTSKINVECFLPNGICVSLPLIKAD 39
                                     .                : * . : * * . : : :
H.sapiens  PI3Kp110beta    TISY- IKQMLWQVHNYPMFNLLMDIDSYMFACVNTAVYEELEDETRRL 99
H.sapiens  PI3Kp110alpha    TLIT- IKHELFKEARYPHLHQLQDESSYIFVSVTQEAEREFFDETRRL 89
H.echinata PI3Kp1101    TLLDKIKKELWKEASRYSLFHLLRPKDEYVFGVSSKGGTEELIDEEQSI 94
H.echinata PI3Kp1102    TVLARIKAVLWQEAERYALFHLLKSPDHYVFEVVS-KGGTEELIDENVSL 88
*: ** *::: . *:::* . *:* * . ** : ** *
    
```

<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	CDVRPFLPVLKLVTRSCDPGEEK-LDSKIGVLIGKGLHEFDSLKDPEVNEF	148
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	CDLRLFQPFLLKVIKLVGNREEKILNREIGFAIGMPVCEFDKMDKPEVQDF	139
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	FDVKPVRPFLKVVQVKQGDAAEKATQSISSMLIGR---SITSTKNEEVSDF	141
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	FDIKPVRPFLKIVPRI GDDLEKVLNSKISMLVGG---TKGTAKNEEVNDF	135
		*: : . * *: : : : * * . * . : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	RRKMRKFSEKILSLVGLSWMDWLKQTYPPPEHEFS--IPENLEDKLYGG-	195
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	RRNILNVCKEAVDLRLDLSNPHSRAMYVYPPNVESSEPELPHKIYNKLDKG-	188
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	RKKRVSICETIAYQGRSSWSNRAIYSYPPEFEDESLPPTITEKLKATS	191
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	RNRYSEFCNKISSQRRSTTWERRAIYTYPPYDEEDQPSSETLKKRLVFTN	185
		*. . . : : * * : : . . . : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	-KLIVAVHFEN----CQDVFSFQVSPNMNPIKVNELAIQKRLTTHGKDE	240
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	-QIIVVIWVIVSPNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIRKKTRSMMLLSE	237
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	NRHLSVSVMK-----NSSNTFVPCYTFPKDLIDMALRKAQTLKQNVV	236
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	WHLKVSVSAT-----KTSFTFNVPYKYTPKELKMLTKKDNSTSSRASV	230
		: : : . : : : : * . : . : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	-----VSPYDYLQVSGRVEYVFG-----DHPLIQFOYIR	270
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	QLKLCVLEYQGYILKVCGCDEYFLE-----KYPLSQYKYIR	274
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	-----ENSDDYILKVGRLSFFLGHIVQDEYGEELYLEKHLIQYKYIR	279
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	-----ETYNDYVLRVFGCLNFFLGVVQVD-GQEIYGEKSLFQYKYIQ	272
		. *: : * . : : . * : : * *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	NCVMNRALPHFIIIVCECKIKKMYEQEMIAIEAAINRNSNLPLPLPKKT	320
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	SCIMLGRMPNMLMAKESLSYQLPMDCFMPSYSRRIS--TATPYMNGE	321
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	ECLLWDKPKPLVIIPKSEMV---VGRVRAPTITQNP--PLPRRRHGN	322
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	QCLLWNKPIKLQVLRKTDMA---VEPFAIGRTPVRRP--VIPPKQ--	313
		. * : : : : :	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	RIISHVWENNNPFQIVLVKGN--KLNTEETVKVHVRAGLFHGTELLCKTI	368
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	TSTKSLWVINSALRIILCATYV-NVNIRDIDKIYVRTGIYHGGEPLCDNV	371
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	YNEICLWDISPSTMLRIKVVICALNVNAGQMWK-EVQCGLFHGGEEVCEKQ	371
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	-RSISLWNLSPSTKLKIKICALNVNSPAMMK-EVVCGIYHGTEEMCEQR	361
		: * . . : : : * . : : * * : : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	VSSEVSGKNDHIWNEPLEFDINICDLPRMARLCFAVYAVLDKVKTKKSTK	418
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	NTQRVPC-SNPRWNEWLNLDIYIPDLPRARLCLCSVKGKRAKEE--	418
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	TTTRQKG-IHPCWNEFLFPLSVVLPRLMARLCFYIIGYQKQDTRKKK--	418
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	KTSIQSG-VNPQWKEFLFEDIPVSELPRMAKLCFSIVGRKRQAKKT---	407
		: . * : * : : : * * * : : . :	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	TINPSKYQTIKAGKVVPAVWNTMVDFKQQLRTGDIILHSWSS---F	465
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	-----HCLPLAWGNINLFDYTDTLVSGKMLNLWP---V	448
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	-----VPIAVVNIPIVFNKGMNLNSGSCRLYCWQSGVKM	452
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	-----IIAVVNTAMDFKSCLSRSGMARLYCWFNYGKL	439
		: * * : : . * * : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	PDELEEMLNPMGTVQTNPYTENATALHVKFPENKKQPYPPFDKIIIEKA	515
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	PHGLEDLLNPIGVGTGSNPKE-TPCLELEFDWFSV-VKFPDMSVIEHA	496
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	ASNSQNFNLNPLGTVAASGNEN-GPCIVIEFMNFVHT-VVYPSDDFIFEIA	500
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	DSEIG-LLNPLGTVAASENEG-GPCIVINCCKFSNQ-VAYPMEEIEIELA	486
		: * * : * : : : * . * : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	AEIASSDSANVSSRGG-----KKFLPVLKEILDRDPLSQLCEN	553
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	NWSVSREAGFSYSHAGLSNRLARDNELRENDKEQLKAISTRDPLSEITEQ	546
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	AKSVASRDNHFPFLVKG-----GKQHRQKIEEIIKRDLSLASFEE	539
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	QCAARASVQNPTAS-----RQQLSHIEEIIKDIILASLFDE	523
		. : : : : * : : : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	EMDLIWTLRQDCEIFPQSLPKLLLSIKWNKLEDVAQLQALLQIWP--KL	601
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	EKDFLWSHRHYC-VTIPEILPKLLLSVKWNSRDEVAQMYCLVKDWP--PI	593
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	DKELLWKLRAECCHDYPSNLPKLLQCVKWHSHEDVAQIRFLLHNWREPL	589
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	EKELLWQFRNVCSDYPESLPKLLQSVKWNKKEVAQLYVLLQNWKIQAL	573
		: : : * * * . * * : * * . : * * : * * : * * : *	
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110beta	PPREALLELDNFYPDQVYREYAVGCLRQ-MSDEELSQYLLQLVQVLKYEP	650
<i>H. sapiens</i>	PI3Kp110alpha	KPEQAMELLDCNYPDPMVRGFAVRCLKYLTDKLSQYLIQLVQVLKYEQ	643
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1101	EVEIALDLLDYKFPDNKVRSLAVEVLDN-LSDGELEMYLLQLVQALKFES	638
<i>H. echinata</i>	PI3Kp1102	QVETALDLLDYSFPDDKVRRELAVRVLEN-LSDGELEMYLLQLVQALKFES	622
		. * : * * . : * * * * : : : * . * * : * * * * * *	

<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	FLDCALSRFLLERALGNRRIGQFLFWHLRSEVHIPAVSVQFGVILEAYCR	700
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	YLDNLLVRFLLKALTNQRIGHFFFFWHLKSEMHNKTVSQRFGLLLESYCR	693
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	YLDSPLAGYLLRRALNNRRIGHYLFWHLKAEVSNPECSLQFGLLLEMYCR	688
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	YLHSPLGRFLLGRALNNKRIGHYLFWHLKAEELRNHDCSLLFGILLLEFYCI	672
		:* . * : ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	GSVGHMKVLKQVEALNKLKTLNLSLIKLNVAKLNRAKGEAMHTCLKQSA	750
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	ACGMYLKHLNRQVEAMEKLIINLTDILKQEKDETQKVQMKFLVEQMRRPD	743
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	GAVDHIPILLRQVEAIGKMKTVTEILQSYKDQDNVKKL-QLMRECFNGSS	737
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	GAVSHIDTLRQMEAINKLKTTITTEILQANKD-DAKQRD-NQLRNLFNQPA	720
		. . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	YREALSDLQSPINPCVILSELYVEKCKYMSDKMKPLWLVDYNNKVFGEDES	800
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	FMDALQGFSLPILNPAHQGNLRLEECRIMSSAKRPLWLNWENPDIMSELL	793
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	YKAFSNIISPLDPSIKLKCLRVEKCKYMSKKKPLWLVFENADEGAED	787
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	YVKAFSGVISPLDPSMHLKLLKVEKCKHMSAKKPLWLVFENADEGAED	770
		: . * : . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	G----VIFKNGDDLQDMLTLQMLRLMDLLWKEAGLDLRMLPYGCLATGD	846
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	FQNNIEIFKNGDDLQDMLTLQITRIMENIWQNGLDLRMLPYGCLSIGD	843
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	L----LIFKNGDDLQDMLTLLSLRLMDNVWVKAGYDYGIIIPYRCLSTGS	833
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	Y----LIFKNGDDLQDMLTLLSLRLMENVWRKSNLDYGLIPYKCLSTGY	816
		: * * * * . *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	RSGLIEVVSSETIADIQLNSNVAAAAFNKDALLNWLKEYN--SGDDL	894
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	CVGLIEVVRNSHTIMQIQCKGGL--KQALQFNSHTLHQWLKDKN--KGEIY	890
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	MVGLIEVVPDSEITLGRIQASRGSIRGVWVEDN--LYQWLQEHCKGNGDKL	881
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	QIGMIEVVTQSETLARIQARHGRF--GVLNSNS--LYTWISNKCEN-NEETL	862
		* : * * * * * : * : * * . . . : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	DRAIEEFTLSCAGYCVASYVLGIGDRHSDNIMVK--KTGQLFHIDFGHILG	943
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	DAADLFLTRSCAGYCVATFILGIGDRHNSNIMVK--DDGQLFHIDFGHFLD	939
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	DTFMGNFMRSVVGYSVATYVLGVGDRHNDNIMMKYDTGQLFHIDFGHFLG	931
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	ADCVSNFTRSLIGYSIATYALGIGDRHNDNVMMKYDTGQLFHIDFGHFLG	912
		* * * * * : * : * * * * . . . : * * * * * * * * * * *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	NFKSKFGIKRERVPFILTYDFIHVIQQGKTG--NTEKFRFRQCCEDAYL	991
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	HKKKKFGYKRVVFLVTDQFLVIVISKGAQECTKTREPERFQEMCYKAYL	989
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	NFKSKFGIKRERVKFLVTSIDILYIFR--QLKNQGSSEELGDRFKEMCIDAFK	980
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	NFKTKFGVRRERVKFLLPDEFIYIERTNKNISRRNFDFNFRKMCIEAFK	962
		: * . * * * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	TLRRHGNLFITLFLALMLTAGLPELTSVKDIQYLKDSLALGKSEEEALKQF	1041
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	ATRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIAYIRKTLALDKTQEQALEYF	1039
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	TLRSKGNLFITVFAMLLSTGIPPELEQPNLDYLRDSLAMLKDEADAVRHF	1030
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	TLRSHGNLIITVFAMLLSTGIPPELQPEDLDYIRDSLALQKDEADAEHF	1012
		: * . . . * : * : * : * : * * * * . . . : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110beta	KQKFDEALRESWTTKVNWMAHTVRKDYRS	1070
<i>H.sapiens</i>	PI3Kp110alpha	MKQMNDAHHGGWTTKMDWIFHTIKQHALN	1068
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1101	ESSYREAHANRSLTTVNWMFHNLNHYW	1059
<i>H.echinata</i>	PI3Kp1102	SAAFKEAYDRRGSTSVMMMIHSMRHHW	1040
		: * . . . * : * : * : * : * * * * . . . : * : * : * : * : *	

Abb.10 Sequenzvergleich der möglichen *Hydractinia* p110-Proteine mit p110 alpha und beta des Menschen

Hydractinia p110 1 und 2 (siehe Anhang Abb.9), *Homo sapiens* (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_006209.2; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform isoform 1 [*Homo sapiens*] NCBI Reference Sequence: NP_006210.1). Farblich markiert wurden die nach PROSITE erkannten Domänen. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt. In grün markiert ist die „phosphatidylinositol 3-kinase adaptor-binding (PI3K ABD) domain“, in hellblau markiert ist die „phosphatidylinositol 3-kinase Ras-binding domain (PI3K RBD)“, in gelb markiert ist die „phosphatidylinositol 3-kinase CE (PI3K C2) domain“ und in türkis markiert ist das „phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family profile (PI3_4_Kinase_3)“. In grau markiert ist die „PIK helical domain“.


```

M.musculus PDK1 KGEIPWSQELRPEAKNFKTFFVHTPNRYYLMDPSGNAHKWCRKIQEVWR 547
H.sapiens PDK1 KGEIPWSQELRPEAKNFKTFFVHTPNRYYLMDPSGNAHKWCRKIQEVWR 544
H.echinata PDK1 KGKIPWTKELRPEVKNFRIFVHTPHRTYYLEDPASRATEWVKMIEEVHK 472
H.vulgaris PDK1 KGKIPWTKDLRPEAKNFKIFFIHTPRRYYLEDPESNAMAWVKEIEKVHE 444
*:***:****.***: **:*:***.***** ** ..* * : *:*: .

M.musculus PDK1 QQYQSNPDAAVQ- 559
H.sapiens PDK1 QRYQSHPDAAVQ- 556
H.echinata PDK1 RYFGTK----- 479
H.vulgaris PDK1 RYFTSINNSFMV 457
: : :

```

Abb.12 Sequenzvergleich der möglichen *Hydractinia* PDK1 mit PDK1-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia PDK1 (siehe Anhang Abb.11), PDK1 [*Homo sapiens*] GenBank: AAC51825.1), *Hydra vulgaris* PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 [*Hydra vulgaris*] NCBI Reference Sequence: NP_001267831.1) und der *Mus musculus* (PDK1 isoform A [*Mus musculus*] NCBI Reference Sequence: NP_035192.2). In grün ist die Protein-Kinase Domäne und in blau die P13K „plekstrin homology“ Domäne nach Pfam markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt.

A)

```

MSTELYTVKEGWLKRGGEYIKNWRPRYFVLRSDGSFLGFKDKPKGEINSVDPLNNSVERCQIMKQNKPKPNGFVIRCFQLTTLVERT
FAVDSSSDREDWISAIEDVSNRMKKEEKARDGAISSSTHSDASSKMTLEDFFEMLVKLGKGTFGKVMVGKEKKTGNVFAIKLLRDKDVL
AKDEVEHTLTENRVLQSAKHPFLETKYSFQTTDRLIFVMEYVNGGELFFHLSRDKVFSEARSRYGAEITLALKYLHEKKIVYRDLK
LENLLIDS DGHIKITDFGLCKQEISFADTTKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGHAVDWWGFGVVLYEMLCGRLPFYNRDHEVLFELILSE
PVRFP SRLTPQSKSILNGLLEKSPKRLGGTSRDAEQVMAHEFFELINWINDIFHKKIPPPFKPSIDNKEDVKYFDEDFTRTPRLTTP
EGTLEDYAKTNPFPEFSFVNGEELNK

```

B)

```

MVDDPHLIKEGWLKRGGEYIKTWRPRYFRLFS DGSFLGYREKLDYINVEPENDFSVKRCQIMKTGKQKTF SFVIRCFQLSVVIERTFA
VDTSEVERELWLTSIENVSANVIARTKLRQGSNKTHTKYSLYKPTMTVEDPELLKVLGKGTFGKVMVKEKKTGKIFAMKLLRDKDVI
KGEVEHTLTENRVLQSAKHPFLETKYSFQTTDRLVFMVMEYVKGELFFHLSKEKRF SVARSRYGAEITLALKYLHENKIIYRDMKL
ENLLDDEHGHIKITDFGLCKEISFSDTTKTFCGTPEYLAPEVLEDHDYGLAVDWWGFGVVLYEMLCGRLPFFSRNHEGLFEMILTKP
VQYPPNIDLDAKSIIDG LLEKNPKRLLGGSIRDAEEVMEHAFFTLISWINDIFQKKIPPPFKPLISSETDSQNFSCFEFTDLDPKLSISR
DSTPEKKVEQEPPAVTQERKKFSTDAISVDSTSTKSRQGSKKYSITPSGSSKSLSGSKKEKKAKQVKVLVSTV

```

Abb.13 Aminosäure-Sequenzen möglicher *Hydractinia* AKT-Proteine

Die Sequenzen wurden durch eine BLAST-Analyse (3.5.1.11) mit menschlichem AKT ([*Homo sapiens*] AKT 3 NCBI Reference Sequence: NP_005456.1; [*Homo sapiens*] AKT2 NCBI Reference Sequence: NP_001617.1; [*Homo sapiens*] AKT1 GenBank: AAA36539.1). im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt.

```

H.sapiens AKT3 -MSDV TIVKEGWVQKRGEYIKNWRPRYFLLKTDGSFIGYKEKPDVDLP- 48
H.sapiens AKT1 -MSDV AIVKEGWLHKRGEYIKTWRPRYFLLKNDGTFIGYKERPDVDQRE 49
H.sapiens AKT2 -MNEV SVIKEGWLHKRGEYIKTWRPRYFLLKSDGSFIGYKERPEAPDQTL 49
H.echinata AKTA MSTEL YTVKEGWLKRGGEYIKNWRPRYFVLRSDGSFLGFKDKPKGEINSV 50
H.echinata AKTB MVDDP HLIKEGWLKRGGEYIKTWRPRYFRLFS DGSFLGYREKLD- -YNV 48
: :****: *****.***** * **:*:***: : : .

H.sapiens AKT3 YPLNNSVAKCQLMKTERPKPNTFIIIRCLQWTTVIERTFHVDTPERE EW 98
H.sapiens AKT1 APLNNSV AQCQLMKTERPRPNTFIIIRCLQWTTVIERTFHVETPERE EW 99
H.sapiens AKT2 PPLNNSV AECQLMKTERPRPNTFVIRCLQWTTVIERTFHVDSPDERE EW 99
H.echinata AKTA DPLNNSV VERCQIMKQNKPKPNGFVIRCFQLTTLVERTFAVDSSSDREDW 100
H.echinata AKTB EPENDFSVKRCQIMKTGKQKTF SFVIRCFQLSVVIERTFAVDTSVERELW 98
* **:*:*** **:*:*** : :. *:*:***: * : : : : : : : : : : : : : : * *

H.sapiens AKT3 TEAIQAVADRLQRQE--EERMNCSPTSQIDNIGEEEMDASTTHHK-RKTM 145
H.sapiens AKT1 TTAIQTVADGLKKQE--EEEMDFRSGSPSDNSGAEEMEVS LAKPKHRVTM 147
H.sapiens AKT2 MRAIQMVANSLKQRAPGEDPMDYKCGSPSDSSTTEEMEVAVSKARAKVTM 149
H.echinata AKTA ISAIEDVSNRMKKEE-----KARDG-AISSSTHSDASSKMTL 136
H.echinata AKTB LTSIENVSANVIART-----KLRQGSNKTHTKYSLYKPTMTV 135
*: * : : . : : * :

```

<i>H.sapiens</i>	AKT3	NDFDYLLKLLGKGTFGKVLVREKASGKYAMKILKKEVI IAKDEVAHTLT	195
<i>H.sapiens</i>	AKT1	NEFEYLKLLGKGTFGKVLVKEKATGRYYAMKILKKEVI IAKDEVAHTLT	197
<i>H.sapiens</i>	AKT2	NDFDYLLKLLGKGTFGKVLVREKATGRYYAMKILRKEVI IAKDEVAHTVT	199
<i>H.echinata</i>	AKTA	EDFEMLVKLVGKGTFGKVMVGKEKKTGNVFAIKLLRKKDVI IAKDEVEHTLT	186
<i>H.echinata</i>	AKTB	EDFELLKVLGKGTFGKVMVMVKEKKTGKIFAMKLLRKKDVI ILEKGEVEHTLT	185
		::*: **:*:*****: : ** :* . :*:**:*:***: * ** **:	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	ESRVLKNTRHPFLTSLKYSFQTKDRLCFVMEYVNGGELFFHLSRERVFSE	245
<i>H.sapiens</i>	AKT1	ENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFSE	247
<i>H.sapiens</i>	AKT2	ESRVLQNRHPFLTALKYAFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRERVFTE	249
<i>H.echinata</i>	AKTA	ENRVLQSAKHPFLTTELKYSFQTTDRLIFVMEYVNGGELFFHLSRDKVFSE	236
<i>H.echinata</i>	AKTB	ENRVLQSAKHPFLTTELKYSFQTTDRLVFVMEYVKGGEELFYHLSKEKRFVS	235
		*.***:..:***** **:*:*** ** * ** * ** * :*****:***: : : *	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	DRTRFYGAEIVSALDYLHSGK-IVYRDLKLENMLDKDGHK IITDFGLCK	294
<i>H.sapiens</i>	AKT1	DRARFYGAEIVSALDYLHSEKNVYRDLKLENMLDKDGHK IITDFGLCK	297
<i>H.sapiens</i>	AKT2	ERARFYGAEIVSALEYLHSDR-VVYRDLKLENMLDKDGHK IITDFGLCK	298
<i>H.echinata</i>	AKTA	ARSRFYGAETLALKYLHEKK-IVYRDLKLENLLIDS DGHK IITDFGLCK	285
<i>H.echinata</i>	AKTB	ARSRFYAAEMTLALKYLHENK-IYRDMKLENLLLDEHGHK IITDFGLCK	284
		*:***:**: **:*:*** . . :*:***:*****: :*..*****	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	EGITDAATMKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWVWGLGVVMEYEMMCGRL	344
<i>H.sapiens</i>	AKT1	EGIKDGAATMKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWVWGLGVVMEYEMMCGRL	347
<i>H.sapiens</i>	AKT2	EGISDGAATMKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWVWGLGVVMEYEMMCGRL	348
<i>H.echinata</i>	AKTA	QEISFADTTKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGHAVDWVWGFVVLVEMLCGRL	335
<i>H.echinata</i>	AKTB	EEISFSDTTKTFCGTPPEYLAPEVLEDHDYGLAVDWVWGFVVLVEMLLGR	334
		: * . * *****:*** *****:***:***: **	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	PFYNQDHEKLFELILMEDIKFPRTLSSDAKSLLSGLLIKDPNKRLLGGGPD	394
<i>H.sapiens</i>	AKT1	PFYNQDHEKLFELILMEEIFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSE	397
<i>H.sapiens</i>	AKT2	PFYNQDHERLFEILMEEIFPRTLSPPEAKSLLAGLLKKDPKQRLGGGPS	398
<i>H.echinata</i>	AKTA	PFYNRDHEVLFELILSEPVRFPSRLTPQSKSILNGLLEKSPKRLGGTSR	385
<i>H.echinata</i>	AKTB	PFFSRNHEGLFEMILTKPVQYPPNIDLDAKSIIDGLLEKNPKRLLGGGSR	384
		:::* **:*:* : :*: * : :*:***: ** *:*:***	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	DAKEIMRHSFFSGVNWQDVYDKKLVPPFPKQVTS ETDTRYFDEEFTAQTI	444
<i>H.sapiens</i>	AKT1	DAKEIMQHRFFAGIVWQHVVYEKLSPPFPKQVTS ETDTRYFDEEFTAQMI	447
<i>H.sapiens</i>	AKT2	DAKEVMEHRFFLSINWQDVVQKLLPPFPKQVTS EVDTRYFDEEFTAQSI	448
<i>H.echinata</i>	AKTA	DAEQVMAHEFFELINWDFIFHKKIPPPFKPSIDNKEDVKYFDEEFTRETP	435
<i>H.echinata</i>	AKTB	DAEVEVMAHFFTLISWDFIQKIPPPFKPLISSETDSQNFSCFTDLDP	434
		:::* * ** : *::: **:*: *** : : * : * : **	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	TITPPEKYDEDGMDMDNE-----RRPHFPQ	470
<i>H.sapiens</i>	AKT1	TITPPD--QDDSMCEVDSE-----RRPHFPQ	471
<i>H.sapiens</i>	AKT2	TITPPD--RYDSLGLLELD-----QRTHFPPQ	472
<i>H.echinata</i>	AKTA	RLTP-----PEGTLED-----YAKTNFPE	454
<i>H.echinata</i>	AKTB	KLISIR--DSTPEKKVEQEPVAVTQERKKFSTDAISVDSTSTRQGSKK	482
		:: : : : :	
<i>H.sapiens</i>	AKT3	FYSYASGRE-----479	
<i>H.sapiens</i>	AKT1	FYSYASSTA-----480	
<i>H.sapiens</i>	AKT2	FYSYASIRE-----481	
<i>H.echinata</i>	AKTA	FYSFVNG-----EELNK-----466	
<i>H.echinata</i>	AKTB	YFITPSGSSKSLSGSKKAKKQKVKLVSTV	513
		:* .	

Abb.14 Sequenzvergleich der möglichen *Hydractinia* AKT-Proteine mit AKT-Sequenzen anderer Organismen

Hydractinia AKTA und AKTB (siehe Anhang Abb.13), [*Homo sapiens*] AKT3 NCBI Reference Sequence: NP_005456.1; [*Homo sapiens*] AKT2 NCBI Reference Sequence: NP_001617.1; [*Homo sapiens*] AKT1 GenBank: AAA36539.1; protein kinase B [*Hydra vulgaris*] GenBank: AAM91027.1. Die Sequenzen wurden in PROSITE analysiert. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt. In rot markiert ist die „PH“ (pleckstrin-homology) Domäne, in grün ist die „Protein-Kinase“ Domäne und in gelb die „AGC-Kinase-C-terminale“ Domäne markiert. In lila markiert sind aus Säugern bekannte Phosphorylierungsstellen Threonin 308 und Serin 473 in AKT1. Deren Phosphorylierung führt zu einer Aktivierung von AKT (Moore et al., 2011; Castellano et al., 2011).

```

MTISKQNAEGYFIRVSATKDQEVYGIIEIKLPISRMKTSDCFLQWRDKEYGGAWLNFVSEKDIKKFLKMCVIPSEDRRRKSSSLTN
ISSVADSSKFSSVTDLSSSAGSSNFPPPKIFISSDQLGDSGIERDKKPTLRKPLIPKRSDSHDSGNSNSFSVTDDLVPDGFDATEYEY
LTKQESLDENDNIDDLNLSGLSASGRTPSNASLYVPLSCDDSSQSVSEDFQDTRPPSAIVYNRQIMTTRKAAWLIVKNVLIHSSKKGK
VEVASHRKWKYVWALKGIEMLFYHADEKTVTTDDLDEPSYRLDVCDSIVQAVPEYTRLENVFLSLSKHGNAYYLQATSQTEVDNWIH
CIHSAAAMAMARKKGLENITVMLKQEIIDLNEALLSDERLKMAILQLKMEKETQMKHSITEQILSWEHSLEFQHATLFRLRCYLSAV
EGSSNPNPQDLLMHISRATKHALSKIGIFSVTSFHSFVNARNAILPPTTEKPKRGRARRSSGLKARLFSSSLKIADDNVVSAIRSRHSPK
IRHKKASNDSSDVESNSSSSRSQGQLHGRIGNKLHVQLPSGNTTVIPYESNLKISDLMERVCMKEKLDSSDFFIMLMVDNNHHGLL
DYTIPKEKAVLELFQYSSIKLCAKFVFDVTLSDPADYEHGAFGLELQQLDERIVVTFVEEGSPARKLGLVDDVEIEINGQLRDMDS
NSFNDIKEVLNLTSSSIAMKLRSKRVDDPKKTFQTTDNMISFLVCPPPPMTQPDLSDDILSSSILVPAPTDFDEDDGGSIVTTRSYDHNK
STREAKVGDIDNFLQOTEKVNMMTREMNAVSEKPAVPAKMKPGVKLKKAIIELETEKTYVKNLKILLERYLIPLKEENFLSKDEAE
LLVTNVREIYDFQMTFFDLRKEIVRSEGFDFKFSNANEFQNVLYLIGETFLEYVHKFKLYSTFCSCHSRAVKLLELNTNEDLKAFLIA
RNPQQTHTGTLESYLITPIQRILRYPLLMKSMMLMVTDSDEYQCLHGALKSVEKVADYINEMQRISSETYPIFQEMCEEYIWMKAD
MGVDNLLHYGRVQWLNQVESLCKRNSYTGKQDDAENLTIFFIKKAVVLLSYDPKLRKKMSPNSSMNLKTSAEIKFHVLIPLSNLLLRD
HAWSENDTDQVWEIVDASMENEESSQTVYKFVNRTGEEKVFNVAIKEAKKINKFSNSFPVLASNKHPKNRKLKLSSTSHSSKLSSTSN
DSTEDIKSGANCGTVGKRLSFSKDKPSRHSSGIPSPKPFKLSHRILGK
    
```

Abb.15 Aminosäure-Sequenz des möglichen *Hydractinia* TIAM-Proteins
 Die Sequenzen wurden durch eine BLAST-Analyse (3.5.1.11) mit menschlichem TIAM1 (*Homo sapiens* TIAM1 protein GenBank: AAA98443.1) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt

<i>D. melanogaster</i> SIF2	MEQKCIIRKGSVRLTEPTGHAHVRIEQRQQLP	RRQKSAEEVATMPKSALRQPPEQLEWF	60
<i>D. melanogaster</i> SIF1	MGNKLSCS-----CAPLMRKAYRYEDSPWQSSRRD-----	-----GHLLSSF	38
<i>H. sapiens</i> TIAM1	-----	-----	
<i>H. sapiens</i> TIAM2	-----	-----	
<i>H. echinata</i> TIAM	-----	-----	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	DRRAQQRHSARSAEGGQVREETMEWLKIQKTASPIQPVRTSSGPSEITVLKDELFDWLLD		120
<i>D. melanogaster</i> SIF1	RLWAEVVFHVSASGAGTVKQWQVSEDLVNVNITCIQDSPECIFHITAYNSQVDKILDVRLV		98
<i>H. sapiens</i> TIAM1	-----	-----	
<i>H. sapiens</i> TIAM2	-----	-----	
<i>H. echinata</i> TIAM	-----	-----	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	HLPRKKERERDRLPSDADKAVGSAYAKALADLLKPLSRQSGPCEFSLLKTDIVEWLTK		180
<i>D. melanogaster</i> SIF1	QPGTRIGQASECFVYWKDPMTNDTWGLNFTSPIDAKQFRECCSPSFKFSRKASSSYSKLL		158
<i>H. sapiens</i> TIAM1	-----MGNAESQVHEHEFYGEKHAS-LGRNDTSRSLRSLSHKTRRTR		40
<i>H. sapiens</i> TIAM2	-----NQPYASRLGGPTCKVSRGVAYSTHRTN		27
<i>H. echinata</i> TIAM	-----	-----	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	MQSSSGTDRGKSRSHRRRNGSGGDAQPRSNSQEDAQ-DQSKTSHRKRHSLGHSGAVSEE		239
<i>D. melanogaster</i> SIF1	DPPGKGKVKAKRKLPLSTPASPSRVRQEPQCTCMSAEQYARLRTDPRVRGSSITLPRNVGSH		218
<i>H. sapiens</i> TIAM1	HASSGKVIHRNSEVSTRSSSTPSIPQSLAENGLEPFSQDGTLEDFG-----SPIWVD		92
<i>H. sapiens</i> TIAM2	--APGKDFQGISAAAFSTENGPHSVGHELADNHITSRDCNGHLLNLCYGRNESIASTPPGED		85
<i>H. echinata</i> TIAM	-----	-----	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	EQQQLTADWIAIYPLHLKQLSLGKQPPPAQPPERMSIPSGYAVPSALSHTPLCQRREERSRE		299
<i>D. melanogaster</i> SIF1	RITDVGQQQVGSVKVSAVSSLSLYDNVAVSGGPGTNQGADTLPRQMKGGQDRQDVANS		278
<i>H. sapiens</i> TIAM1	RVDMGLRPVSYTDSVTPSVDSIVLTAASVQSMPTDEESRLYGDDATYLAEGG---RR		148
<i>H. sapiens</i> TIAM2	RKSPRVLIKTGLKLDGCLRVEFHNGGNP SKVPAEDCSEPVQLLRYSPTLASETSPVPEAR		145
<i>H. echinata</i> TIAM	-----MTISKQNAEGYFIRVSATKDQEVYGI-----		26
<i>D. melanogaster</i> SIF2	RRLRHSASEVVGSGGAGAASNTAHLERLYAKPHKERYQYVPKTKESSGRKERSRRHQ		359
<i>D. melanogaster</i> SIF1	GVNTNTPGVIIVTGVGNVGSMDCGQNHVGSQVGNDDPAACQMDMDLSKSEGTQAGGGLHQ		338
<i>H. sapiens</i> TIAM1	QHSYTSNGPTFMETASFKKRKSADIWREDSLEFSLSDLSQEHLSNEEILGSAEEKDC		208
<i>H. sapiens</i> TIAM2	RGSSADSLPSHRPSPTDSRLRSKSGSLSLSESSWYDSPWGNAGELSEAEGSFLAPGMPDP		205
<i>H. echinata</i> TIAM	-----LEIKLPISRMKTSDCFLQWRDKEYGGAWLNFVSEKDIKKFLKMCVIPSE		77
<i>D. melanogaster</i> SIF2	QRSATVSDMSAQRSGGHRKSSSAERAPRSPSPGPCDTPDCPLLPICDPHCRYQECQAR		419
<i>D. melanogaster</i> SIF1	VGTCTSSSKGTGRNKDFGDDMTRDAHSHDMHQNHNINNNTRRKTSTEDMN-VDTSTLK		397
<i>H. sapiens</i> TIAM1	EEARGMETRASPRQLSTCQRANSLGDLYAQKNSGV TANMGP--GSKFAGYCRNLVSDIPN		266
<i>H. sapiens</i> TIAM2	SLHASFPPGDAKKPFNQSSSLSSRLRELYKDANLGSLSFSGIRLSDEYMGTHASLSNRVFS		265
<i>H. echinata</i> TIAM	DRRRKSSSLTNISSVADSSKFSSVTDLSSSAGSSNFPPPKIFISSDQLGDSGIERDKKPT		137

<i>D.melanogaster</i> SIF2	QCITSSVSSVNLARHQQLAQVQLHAVPAHLVGMAGSDVPTTPTTATPPPPTGGG----	474
<i>D.melanogaster</i> SIF1	RMLKMPSTESPVTSPEMGRRRYNYNANAAQTLGHPPHMHQHGMMAMGGGGGGGHM	457
<i>H.sapiens</i> TIAM1	LANHKMPAAAAEETPPYSNYNTLPCR-----	292
<i>H.sapiens</i> TIAM2	ASDIDVPSRVAHGDPIDQYSSFTLPCR-----	291
<i>H.echinata</i> TIAM	LRKPLIP-----	144
<i>D.melanogaster</i> SIF2	---TMGVGATGAGAGATSERRLVICHDCRSCAPLLSC--RNRKCLNAAKCNS----	LPRCA 526
<i>D.melanogaster</i> SIF1	NNNTMGRASSQSSRFSGSRSSHEIGRGPYPPRNLYLELERERSCTIEGSPSDNVMFDNQCY	517
<i>H.sapiens</i> TIAM1	-----KSHCL	297
<i>H.sapiens</i> TIAM2	-----KPKAF	296
<i>H.echinata</i> TIAM	-----	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	ADFNLRLTQLSQPPTTLDDIEAPLDDLEMQPLPSPPHPHHHYRSNSQPNTLQRGDSA	586
<i>D.melanogaster</i> SIF1	ATTPSSSNGNSDQDQSYGQQQSSGQHPQQQGFPPQRSRHHQHHHQAPNVTPFGSPTSR	577
<i>H.sapiens</i> TIAM1	SEGATN-----PQISHSNMQGRRAKTTQDVNAGEGSEFADSGIEGATTTDLLSRR	349
<i>H.sapiens</i> TIAM2	VEDTAKKDSLKARMRI SDWTGSLSRKKRKLQEPKRSKESDYFDSRSLNTDVQGSQA	356
<i>H.echinata</i> TIAM	-----KRSDSHDSGNSNSFSVTDLVPFGFDATEYEYLTQKQESLDENDNI	189
<i>D.melanogaster</i> SIF2	SSAGMGAGVGGAGHGLGGPGSGLAWLEPTTTLVQPLPAYVHHSNGKLMKSASAAASLNSR	646
<i>D.melanogaster</i> SIF1	LLLEYEMHLRNTLAKGMDAESYSLHTFEALLSQSMENLANAKSSTLPLPPHRPLSTIRDK	637
<i>H.sapiens</i> TIAM1	SNATNSYSPTTGRAVFGSDSGSSSTGDAARQGVYENFRRELEMS-----	394
<i>H.sapiens</i> TIAM2	SAFLWSGGS--TQILSQRSESTHAIGSDPLRQNIYENFMRELEMS-----	399
<i>H.echinata</i> TIAM	DDLNLGLSGLSASGRTPSNASLYVPLSCDDSDQSGVSEDFQDTRPPS-----	234
<i>D.melanogaster</i> SIF2	RR-RHKTVHFGEN--LLEVCQNRK---LIKTEAQVPS--GSAPMKANIQMLYNFVEGV	697
<i>D.melanogaster</i> SIF1	ERDRDRDGYSDRNELIRERERERDRGYSLSDHNSFSNSRCSASCIGESARAQWFRHSDGW	697
<i>H.sapiens</i> TIAM1	-----	
<i>H.sapiens</i> TIAM2	-----	
<i>H.echinata</i> TIAM	-----	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	LSAWVDDDEDQVR-----SGAESEPEHGVPMPQPIHRCNRLRYQCIRR--VVEEAAD	747
<i>D.melanogaster</i> SIF1	RSGSSTIGSGSGHGMMTQQIPGSGHKKRSPWDSLPSLRQDSSLNDSGYKSARADSLEQRAE	757
<i>H.sapiens</i> TIAM1	-----	
<i>H.sapiens</i> TIAM2	-----	
<i>H.echinata</i> TIAM	-----	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	LQGTLLKLGNSRYRHRHWR-----STAKQCNEMLFRKISDDDRMSLTTAVSDEDDG	797
<i>D.melanogaster</i> SIF1	FIRQDSLRSSEYLSDRSRYGIVQQAISSTDSRMCYLTSSSEISDDDRMSLTTAVSDEDDG	817
<i>H.sapiens</i> TIAM1	-----TTNSESLLEEAGSAHSDEQS	413
<i>H.sapiens</i> TIAM2	-----RTNTEIETS--TETAES	416
<i>H.echinata</i> TIAM	-----AIVYN	239
<i>D.melanogaster</i> SIF2	ESVMASPYKAKATGTAASSFNCTGAVRKAGFLSVKKWLLR-KKHQIELARKRGWKGYVVC	856
<i>D.melanogaster</i> SIF1	ESVMASPYKAKATGTAASSFNCTGAVRKAGFLSVKKWLLR-KKHQIELARKRGWKGYVVC	876
<i>H.sapiens</i> TIAM1	SGTLSSPGQSDILLTAAQ-----GTVRKAGALAVKNFLVHKKNKVESATRRKWKHYVWS	468
<i>H.sapiens</i> TIAM2	SESLSSLEQLDLLFEKEQ----GTVRKAGWLFKPLVTVQKERKLELVARRKWKQYVWT	471
<i>H.echinata</i> TIAM	RQIMTT-----RKAAWLIVKNVLHSHKKGKVEVASHRKKWKYVVA	279
	::: * * * * * : * : * * * * * : * * * * *	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	LKGTLLFYPCDSREGRSVEA-APKHLIIVDGAIMQPIPEHPKRDYIFCLSTAFGDAYLF	915
<i>D.melanogaster</i> SIF1	LKGTLLFYPCDSREGRSVEA-APKHLIIVDGAIMQPIPEHPKRDYIFCLSTAFGDAYLF	935
<i>H.sapiens</i> TIAM1	LKGCTLFFYESDGRSGIDHNS-IPKHAVVWENSIVQAVPEHPKDFVFCLSNSLGDALFLF	527
<i>H.sapiens</i> TIAM2	LKGCTLLFYETYGKNSMDQSS-APRCALFAEDSIVQSVPEHPKKNVFCLSNSFGDVYLF	530
<i>H.echinata</i> TIAM	LKGIEMLFYHADEKTVTDDLDDEPSYRLDVEDSIVQAVPEYTRLENVFLSLSKHGNAYYL	339
	*** : ** : * : : * * * * * : : * * * * * : * * * * *	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	QAPCQVELENWVNSIHSACA AAFARHRGKTGTLHLLQEEIFRLEKAIESDHKLKHMALQ	975
<i>D.melanogaster</i> SIF1	QAPCQVELENWVNSIHSACA AAFARHRGKTGTLHLLQEEIFRLEKAIESDHKLKHMALQ	995
<i>H.sapiens</i> TIAM1	QTTSTQTELENWITAIHSACA TAVARHHKEDTLRLKSEIKLEQKIDMDEKMKMGEMQ	587
<i>H.sapiens</i> TIAM2	QATSQTDLENWVTAVHSACA SLFAKHKGEDTLRLKQTKNLLQKIDMDSKMKMAELQ	590
<i>H.echinata</i> TIAM	QATSQTEVDNWIHCISAAAMAMARKGLENITVMLKQEIIDLNEALLSDERLKKMAILQ	399
	* * * * * : * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : *	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	QSVVTDQETRHIQTQILQWEENLERLHCEQFRLRCYMASLQSGELPNPKSLTHVSRPT	1035
<i>D.melanogaster</i> SIF1	QSVVTDQETRHIQTQILQWEENLERLHCEQFRLRCYMASLQSGELPNPKSLTHVSRPT	1055
<i>H.sapiens</i> TIAM1	LSSVTDKSKKKTILDQIFVWEQNLQFQMDLFRFRCYLASLQSGELPNPKRLAFASRPT	647
<i>H.sapiens</i> TIAM2	LSSVTDKSKKKTILDQIFVWEQNLQFQMDLFRFRCYLASLQSGELPNPKSLAAASRPS	650
<i>H.echinata</i> TIAM	LKMEKETQMKHSITEQILSWEHSLEFQHATLFRRLCYLSAVEGSSNPNPQDLMLHSRAT	459
	. . : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
<i>D.melanogaster</i> SIF2	KNTLNKLGVTVSSFHAFICARS---PSLLNNLLAGRGATK--RRPMLSRNSNGSSRRS	1090
<i>D.melanogaster</i> SIF1	KNTLNKLGVTVSSFHAFICARS---PSLLNNLLAGRGATK--RRPMLSRNSNGSSRRS	1110
<i>H.sapiens</i> TIAM1	KVAMGRLGIFSVSSFHALVAARTGETGVRRTQAMRSASK--RRSRFSSLGLDITTSKK	705
<i>H.sapiens</i> TIAM2	KLALGRLGILSVSSFHALVCSR--DSALRKRKTLSTQGRN--KKGIFSSLKGLDITLARK	707
<i>H.echinata</i> TIAM	KHALSKIGIFSVSSFHFNARNAILPPTTEKPKRGRARSSGLKARLFSSSLKIAADNVVS	519
	* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	

<i>D. melanogaster</i> SIF2	MQMNSR-----DEPE	1100
<i>D. melanogaster</i> SIF1	MQMNSR-----DEPE	1120
<i>H. sapiens</i> TIAM1	-KQGRPSINQVFGEGTEAVKKSLEGIFDDIVPDGKREKEVLPNVHQHNPDCDIWVHEYF	764
<i>H. sapiens</i> TIAM2	GKEKRPSITQVD-----ELLHIYGSTVDGVPRD-----NAWE	739
<i>H. echinata</i> TIAM	AIRSRHSPKIRHKASSNDSSDVESNSSSSRSQKLG-----RIG	560
<i>D. melanogaster</i> SIF2	KTFKVAMPDNAYSTVYLRDAMSVEEFLASACARRNLPMEHFVRVKKRRDMEDHNYFVPH	1160
<i>D. melanogaster</i> SIF1	KTFKVAMPDNAYSTVYLRDAMSVEEFLASACARRNLPMEHFVRVKKRRDMEDHNYFVPH	1180
<i>H. sapiens</i> TIAM1	TPSWFCLPNNQPALTVVRPGDTARDTLELICKTHQLDHAHYLRKFLIENKMQLYVPPQ	824
<i>H. sapiens</i> TIAM2	IQTYVHFQDNHGVTGVIKPEHRVEDILTACKMRQLEPSHYGLQLRKLVDNVEYCI PAP	799
<i>H. echinata</i> TIAM	NKLVHQLPSGNTTPIPYESNLKISDLMERVCMKEKLDSSDFIIMLVDDNNHGLDLYTI	620
<i>D. melanogaster</i> SIF2	RNDLIENYLHNHEFVEVCMKILYQVELQRT--TLEQMWGFSVEAELIENAERQDELCCYV	1218
<i>D. melanogaster</i> SIF1	RNDLIENYLHNHEFVEVCMKILYQVELQRT--TLEQMWGFSVEAELIENAERQDELCCYV	1238
<i>H. sapiens</i> TIAM1	EEDIYELLYK---EIEICPKVTHSIHIEKSD-TAADTYGFSLSVVEEDG----IRRLYI	875
<i>H. sapiens</i> TIAM2	YEYMQQQVYD---EIEVFPLNVYDVQLTKTG-SVCD-FGFVAQVDERQH---LSRIFI	851
<i>H. echinata</i> TIAM	PKEKAVLELFQYSIKLCAKVFVDVTLSDPADYEHGAFGLELQQLDER-----IVV	672
<i>D. melanogaster</i> SIF2	SRVEDKSVAMHNGIIGDEIMVINGAIVSDLDMMYLESVLQEEQSLSMMMRSRTEPPDL	1278
<i>D. melanogaster</i> SIF1	SRVEDKSVAMHNGIIGDEIMVINGAIVSDLDMMYLESVLQEEQSLSMMMRSRTEPPDL	1298
<i>H. sapiens</i> TIAM1	NSVKETGLASKKGLKAGDEIILEINNRAADALNSMLKDFLSQPSLGLLVRTYPELEEG--	933
<i>H. sapiens</i> TIAM2	SDVLPDGLAYGELRKGNEIMTLNGEAVSDLDLQMEALFSEKSVGLTLIARPPDTKATL	911
<i>H. echinata</i> TIAM	TFVEEGSPARKLGILVDDEVTEINGQNLRDMSNSFNDIKEVLTNTSSSIAMKLRSKRVDDP	732
<i>D. melanogaster</i> SIF2	VGIMRVTDMDISLVC-PPPTDPPVMSEEMITGLIVPAPGWNGTSKDLYSPEAESSPAT	1337
<i>D. melanogaster</i> SIF1	VGIMRVTDMDISLVC-PPPTDPPVMSEEMITGLIVPAPGWNGTSKDLYSPEAESSPAT	1357
<i>H. sapiens</i> TIAM1	-----VELLESPPHR-VDGP---ADLDESPLAFLTS-----NPGH	964
<i>H. sapiens</i> TIAM2	CTSWSDSDFSRDQKS-LLPPNQSQLEEFLDNFKK-----NTAN	951
<i>H. echinata</i> TIAM	KKTFQTTDNMISFLVCPPPPMTQPDLSDDLSSLIVP-----770	770
<i>D. melanogaster</i> SIF2	SFVDPAAAMAQAVLAVGGVGGVVGGLGVAKPTSRTSSFEIENLLKTAEQVTGFCRSPQETR	1397
<i>D. melanogaster</i> SIF1	SFVDPAAAMAQAVLAVGGVGGVVGGLGVAKPTSRTSSFEIENLLKTAEQET-----R	1408
<i>H. sapiens</i> TIAM1	SLCSEQGSSAETAPEETEG--PDLESSDETDSKSTEQVAAFCSRSLHEM-----1012	1012
<i>H. sapiens</i> TIAM2	DFSNPDIITGLKRSQTDGTLQDVSHREKMEQTFRSAEQITALCRSFNDS-----1001	1001
<i>H. echinata</i> TIAM	-----APTDFDEDGGSIVTTRSVDHNSKSTREAKVGDIDNFLQOTEKVN-----813	813
<i>D. melanogaster</i> SIF2	KSSPTGSVTSVSTTALTTPSRQLTDAEKLKRVVMEVDTERTYVKHLNLLHYLEPMKR	1457
<i>D. melanogaster</i> SIF1	KSSPTGSVTSVSTTALTTPSRQLTDAEKLKRVVMEVDTERTYVKHLNLLHYLEPMKR	1468
<i>H. sapiens</i> TIAM1	NPSDQNPSPQDSTGQPLATMRQLSDADNVRKVICELLETERTYVKDLNCLMERYLKPLOK	1072
<i>H. sapiens</i> TIAM2	QANGMEGPRENQDPPRSLARHLSADRLRKKVIOELVDTEKSYVKDLSCLFELLYLEPLQ	1061
<i>H. echinata</i> TIAM	---MMTREMNAVSEKPAVAPKMKPGVKKLKKAIIELETEKTYVKNLKILLEYLIPLKE	870
<i>D. melanogaster</i> SIF2	ETFLSNAEINALFGNIHEIVTFQRQFLQNLLESLDLEPDFNKFHEHCGQFRNVLFAIGSAF	1517
<i>D. melanogaster</i> SIF1	ETFLSNAEINALFGNIHEIVTFQRQFLQNLLESLDLEPDFNKFHEHCGQFRNVLFAIGSAF	1528
<i>H. sapiens</i> TIAM1	ETFLTQDELVDLFGNLTMEVEFVFLKTLLEDGVRLVPDLKLEKVLQFKKVLFLSGLGSF	1132
<i>H. sapiens</i> TIAM2	ETFLTQDEMESLFGSLPEMFEQKVFLETLEDGISASSDFNTLETSPQFRKLLFLSGLGSF	1121
<i>H. echinata</i> TIAM	ENFLSKDEAELLVNTVREIYDFQMTFFDRLKEIVRSEGRGDFKFSNANEFQNVLYLIGETF	930
<i>D. melanogaster</i> SIF2	LYYVNHFKLYSSFCASHSKAQKVLHPNEGNHALQEFLAARNPKQOHSSTLESYLKPIQR	1577
<i>D. melanogaster</i> SIF1	LYYVNHFKLYSSFCASHSKAQKVLHPNEGNHALQEFLAARNPKQOHSSTLESYLKPIQR	1588
<i>H. sapiens</i> TIAM1	LYYADRFKLYSAFCAIHTKVPKVLVAKTDTAFKAFDAQNPKQOHSSTLESYLKPIQR	1192
<i>H. sapiens</i> TIAM2	LYYADHFKLYSGFCANHIKQVLERAKTDKAFKAFDARNPKQOHSSTLESYLKPIQR	1181
<i>H. echinata</i> TIAM	LEYVHKFKLYSTFCSHSRVAKLLELN-TNEDLKAFLIARNPKQOHTGTLESYLITPIQR	989
<i>D. melanogaster</i> SIF2	ILKYPLLLQQMRNLTDTRADEHVHLCEALKGMEKVAEHINEMQRIHEEYGAIFDHLFRQH	1637
<i>D. melanogaster</i> SIF1	ILKYPLLLQQMRNLTDTRADEHVHLCEALKGMEKVAEHINEMQRIHEEYGAIFDHLFRQH	1648
<i>H. sapiens</i> TIAM1	ILKYPLLLRELFAITDAESEEHYHLDAIKTMNKVASHINEMQKIHEEFGAVFDQLIAEQ	1252
<i>H. sapiens</i> TIAM2	VLKYPLLLKELVSLTDQSEEHYHLTEALKAMEKVAESHINEMQKIYEDYGTVFDQLVAEQ	1241
<i>H. echinata</i> TIAM	ILRYPLLMKSMMLMVTDSDEYQCLHGALKSVEKVADYINEMQRISETYTPIFQEMCEEY	1049
<i>D. melanogaster</i> SIF2	QKSCQPIDLSPGDLLYYGGVEWLNISDFLG----KIKKGLLEHAMCFVFKSAVVFLCK	1692
<i>D. melanogaster</i> SIF1	QKSCQPIDLSPGDLLYYGGVEWLNISDFLG----KIKKGLLEHAMCFVFKSAVVFLCK	1703
<i>H. sapiens</i> TIAM1	TGEKKEVADLSMGDLLLHTTVIWLNPASLG----KWKK--EPELAAFVFKTAVVLVYK	1305
<i>H. sapiens</i> TIAM2	SGTEKEVTELSMGELLMHSTVSWLNPFSLG----KARK--DLELTVFVFKRAVILVYK	1294
<i>H. echinata</i> TIAM	IWMEK--ADMGVNDNLLHYGRVQWLNAGESLCKRNSYTGKQDDAENLTIFFKKAVALLSY	1107
<i>D. melanogaster</i> SIF2	ERLRQKKKLMGVSS-KNATNEVEIIRYQVLIPIVTEVQVRASSAKDMSHFLWELIHLRSQ	1751
<i>D. melanogaster</i> SIF1	ERLRQKKKLMGVSS-KNATNEVEIIRYQVLIPIVTEVQVRASSAKDMSHFLWELIHLRSQ	1762
<i>H. sapiens</i> TIAM1	DGSKQKKKLVGSHR-LSIYEDWDPFRFRHMIPTEALQVRALASADAANAVCEIVHVKSE	1364
<i>H. sapiens</i> TIAM2	ENCKLKKKLPNSRPAHNSTDLDPFKFRWLIPISALQVRLGNPAGTENNSIWELIHTKSE	1354
<i>H. echinata</i> TIAM	DPKLRKMSPNSS---MNLKTSAEIKFHVLIPLSNLLLRDHAWSENDTQVWEIVDASME	1164

<i>D. melanogaster</i> SIF2	LQRRSEKVVYVLSNSTADFRNAFLKTIHQI IRESVNRMSIPMKNFGGSSGVSVGHSSQGMG	1811
<i>D. melanogaster</i> SIF1	LQRRSEKVVYVLSNSTADFRNAFLKTIHQI IRESVNRMSIPMKNFGGSSGVSVGHSSQGMG	1822
<i>H. sapiens</i> TIAM1	SEGRPERVFLHCCSSPESRKDFLKAVHSILRDKHRRQLKTESLPSSQQ-----	1413
<i>H. sapiens</i> TIAM2	I EGRPETIFQLCCSDSESKTNIVKVIKRSILRENFRRHKCELPLEKTCK-----	1403
<i>H. echinata</i> TIAM	NE-ESQTVYKFNVRTGEEKKVFVNAIKEAKKINKFNSFPVLAS-----	1207
	: . . . : : : : : . : . : . : . : .	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	SMGYPGNSQTLERPKQQITIVHGSHTLGKPKKSGSQRHSAGNIDYDNLGSGQEADDLPP	1871
<i>D. melanogaster</i> SIF1	SMGYPGNSQTLERPKQQITIVHGSHTLGKPKKSGSQRHSAGNIDYDNLGSGQEADDLPP	1882
<i>H. sapiens</i> TIAM1	YVFPFGKRLCALKGARPAMRAVSAPSKSLGRRRRRLARNRFTIDSDAVSASSPEKESQQ	1473
<i>H. sapiens</i> TIAM2	DRLVPLKNRVPVS-AKLASSRSLKVLKNSSSNEWTGETGKGTLLDSEGLSLSGTSQSGC	1462
<i>H. echinata</i> TIAM	-----NKHPNKNRLKLTSTSHSSKLSSTSNNDSTEDIKSGANCGTVKRLSFSKK---	1257
 :	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	SVGVVHYASGHTHGQQMQPAGFRGRSKTVDVTEITCSSPEPHQQQQQQQQQQQLMQG	1931
<i>D. melanogaster</i> SIF1	SVGVVHYASGHTHGQQMQPAGFRGRSKTVDVTEITCSSPEPHQQQQQQQQQQQLMQG	1942
<i>H. sapiens</i> TIAM1	PPGGG--DTRWVVEEQFDLAQYEEQDD--IKETDILSD-DDEFCEVKGASVDRDLQERL	1528
<i>H. sapiens</i> TIAM2	PTAEGRQDSKSTSPGKYPHGLADFADNLIKESDILSDEDDHRQTVKQGSPTKDIETQF	1522
<i>H. echinata</i> TIAM	-----DKPSRHSSGIPSPKPFKLSHRI	1280
 :	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	HAHAHPHPHPHPREPPPPPIRQPHLHHSSDIERIDPGTKSEGEEDSQGGTIRPKATLGR	1991
<i>D. melanogaster</i> SIF1	HAHAHPHPHPHPREPPPPPIRQPHLHHSSDIERIDPGTKSEGEEDSQGGTIRPKATLGR	2002
<i>H. sapiens</i> TIAM1	QATSISQR-----ERG-----RKTLDASHASRMAQLKK	1555
<i>H. sapiens</i> TIAM2	QRLRISEDPDVHPEAEQQPGPESGEGQKGEQPKLVRGHFCPIKRKANSTKRDRGTLLKA	1582
<i>H. echinata</i> TIAM	L GK-----	1283
 :	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	TPNHLTLSTTSTLSVSGTGSQARLIQSSHPASYQPVLKMDLGSVWVWVWVWVWVWVWVWVW	2051
<i>D. melanogaster</i> SIF1	TPNHLTLSTTSTLSVSGTGSQARLIQSSHPASYQPVLKMDLGSVWVWVWVWVWVWVWVWVW	2062
<i>H. sapiens</i> TIAM1	QAALSGING-----GLESASEEVIWVRREDFAPSRLNTEI-----	1591
<i>H. sapiens</i> TIAM2	QIRHQSLDS-----QENATIDLNSVLEREFV-QSLTSTVSEECFYETESHGKS---	1631
<i>H. echinata</i> TIAM	-----	
<i>D. melanogaster</i> SIF2	STTRKDDVKN	2061
<i>D. melanogaster</i> SIF1	STTRKDDVKN	2072
<i>H. sapiens</i> TIAM1	-----	
<i>H. sapiens</i> TIAM2	-----	
<i>H. echinata</i> TIAM	-----	

Abb.16 Sequenzvergleich des möglichen *Hydractinia* TIAM mit Sequenzen anderer Organismen
Hydractinia TIAM (siehe Anhang Abb.15), SIF1 [*Drosophila melanogaster*] UniProtKB/Swiss-Prot: P91621.2; SIF2 [*Drosophila melanogaster*] NCBI Reference Sequence: NP_001261447.1; TIAM2 [*Homo sapiens*] UniProtKB/Swiss-Prot: Q81VF5.4; [*Homo sapiens*] TIAM1 protein GenBank: AAA98443.1. In grün eingezeichnet ist das „WH1 domain profile“ (Wh1), in hellblau ist die „PH DOMAIN“ (PH) markiert. In rot ist die „Ras-binding Domäne“ (RBD) markiert, in gelb ist das „PDZ domain profile“ (PDZ) markiert. In lila wurde das „Dbl homology (DH) domain profile“ (DH_2) markiert. Alle markierten Domänen wurden mit PROSITE ermittelt. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW erstellt.

```
MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPINLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLTSPA
SYENVRAKWYPEVSHHCNPTPIVLVGTKLDLDRDDKETIEKLEKELKAPITTAQGLQMGKEIGSVKYLECSALTQKGLKQVFEAIRAV
LCPKPKPVKKKNCALL
```

Abb.17 Aminosäure-Sequenz des möglichen *Hydractinia* Rac1-Proteins
Die Sequenzen wurden durch BLAST-Analyse mit menschlichem Rac1 (GenBank: CAB53579.5) im Transkriptom-Datenbank von *Hydractinia* ermittelt.

<i>H. echinata</i> RAC	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>H. vulgaris</i> Rac1likep	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>N. vectensis</i> Rac1likep	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>E. fluviatilis</i> RAC1	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>D. melanogaster</i> Rac1	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>A. aegypti</i> Rac	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>H. sapiens</i> Rac1	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>D. rerio</i> Rac1	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>A. californica</i> Rac	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>C. intestinalis</i> Rac1	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
<i>C. elegans</i> CED-10	MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPF	50
	***** : *	

<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	--MEVKPVGEPTQEVSKFKLSTKVESTGHWLVEDHVRIWEVLKTEESSIQ	48
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	-----MKLLWQAKMSSIQ	13
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	MSSSHRHVMGGDGTVRSKLWVKGNSSMTRKTLSSKSLSDPTKRLVSSSST	50
		: **	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	DWGEEVEEGAVYHVTLKRVQIQQAAN-----KGARWLGVEGDQLPPG	90
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	DWGEEVEEGAVYHVTLKRVQIQQAAN-----KGARWLGVEGDQLPPG	55
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	NLSTKAKHDSACPSPQALPWIEEMEENGALYNTILKKVRYRSHTELDDEG	100
		: : * : * * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	-HTVSQYETCKIRTIKAGTLEKLVENLLTAFGD---NDFTYISIFLSTYR	136
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	-HTVSQYETCKIRTIKAGTLEKLVENLLTAFGD---NDFTYISIFLSTYR	101
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	DLSFKQWETIKVKQIKAAASLEKLVHELTPTSEEETQSDPGFLLAFLCTYK	150
		..*:* * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	GFASTKEVLELLLDRYGNLTPNCEEDGSQSSSESVMIRNAIASILRAW	186
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	GFASTKEVLELLLDRYGNLTPNCEEDGSQSSSESVMIRNAIASILRAW	151
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	SFSTTGTVIDHMLNRFECEN---YQLTSLHQDEANGIVR-RICSVLSIW	196
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	LDQCAEDFREPPHFPCLQKLLDYLTR---MMPGSDPERRAQNLEQFQKQ	233
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	LDQCAEDFREPPHFPCLQKLLDYLTR---MMPGSDPERRAQNLEQFQKQ	198
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	IDQYPRDFDEPPSYNNLNLIRFMEKRSHISSVKDLYTRCDHKLTLTVS	246
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	EVETDN-----GLPNTISFSLSEEELEEGE-SAEFTCFSEDLVAEQL	275
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	DVDSDN-----GLLNTSSFSLSEEELEEGE-SAEFTNFSEDLVAEQL	240
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	PFDDERPLKFKFCSCISVIGCNCKKNSFGEDKSFELKTFSAALIAEQL	296
		: : : : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	TYMDAQLFKKVVPHHCLGCIWSRRDKENKHLAPTIRATISQFNTLTCKV	325
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	TYMDAQLFKKVVPHHCLGCIWSQRDKENKHLAPTIRATISQFNTLTCKV	290
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	TVVDSSELFLRVVPRECLAYFWSKRDPKSG-SKAQSIKLTVEQFNFVTLKV	345
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	VSTILGGKE----LKTQQRARVIEKWINIAHECRILKNFSSLRAIVSALQ	371
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	VSTVLGSKE----LKTQQRARVIEKWINIAHECRILKNFSSLRAIVSALQ	336
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	TSTILNAKDKTNTYTSSARAKVISKVIDVALELRDLKNFSSLKAILSSLQ	395
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	SNSIYRLKKTWAAVPRDRMLMFEELSDIFSDHNNHLTSRELLMKEGTSKF	421
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	SNSIYRLKKTWAAVPRDRMLMFEELSDIFSDHNNHLTSRELLMKEGTSKF	386
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	VTAVYRLSCLSWELVSKYSMELEELSEIFSNDSNQKASRDLLVQEGTAKY	445
		: : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	ANLDSVVKENQKRTQRRLLQKQDMGMVQGTVPYLGTFLLDMLDALTALQD	471
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	ANLDSVVKENQKRTQRRLLQKQDMGMVQGTVPYLGTFLLDMLDALTALQD	436
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	S-----TNSLRKSKSRQSWMKEGVTQGTVPYLGTFLLDMLDALSALPD	489
		: : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	YIEGGLINFKEKRRREFEVIQIKLLQSACNSYCMTPDQKFIQWFQRQQLL	521
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	YIEGGLINFKEKRRREFEVIQIKLLQSACNSYCMGPDQKFIQWFQRQQLL	486
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	NIKENLINFKEKRRREFEIVVQIKLLQQAQNYTFTPVDFFTWFNLIETY	539
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	TEESYALSCEIEAAADASTSPKPRKSMVKRSLLLFLGSDMITSPTPTK	571
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	SEESYALSCEIEAAADANTSPKPRKSMVKRSLLLFLGSDIIPGSTPTK	536
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	TDKESYEKSLVEPPPPK-----DGRKPTT	564
		: : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	EQPKSTAGSSGESMDSVSVSSCESNHSEAEESITPMDTP-DEPQKKS	620
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	EQPKSAAGSSGESMDSVSVSSCESNHSEAEESITPMDTP-DEPQKKS	585
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	PQPQRKSVSIKRYLSEDLHKMDNVHKSLSFSLVQLKLARHNSNPTMT	614
		** : : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	ESSSSCSSIHSMDTNSGMSLINPLSPPCNNPKIHKRSVSVTSITS	670
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	ESSSSCSSIHSMDTNSGMSLINPLSPPTCNNPKIHKRSVSVTSITS	635
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	DSLQSLVSRNLLKPELSLSCRLLDPSDASP-----	644
		* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>H.sapiens</i>	RALGDSlike-1	TVLPPVYNQONEDTICIRISVEDNNGNMYKSIMLTSQDKTPAVIQRAMLK	720
<i>M.musculus</i>	RALGDSlike-1	TVLPPVYNQONEDTICIRISVEDNNGNMYKSIMLTSQDKTPAVIQRAMSK	685
<i>H.echinata</i>	RALGSlike1	-----LDSTGVVGRVHLEDTANIQYKAIKILPNHRAVEVISTTLIK	685
		: : * : * : * : * : *	


```

MAEDVHDNWSIKVEIRNGTGKAVESKPLDEKEPIKRNSTASSHSTSSSSSESQEIDEELNQDAEDYKDVVVPFGTIFSTQEHKQE
YFLPCVPVRITITERIHQPASHRLNPVLYVINITHGIYKWKIKRRYNHFRELYSHLELYRAKAIQVHPTMATRLDKVPKFPARPDITI
LTTKKKDKQMRKLQRFLQNVVNCDFRFRNNRHTLEFLEVSFLSFVHGLGDKGKEGEVAKRAGGHTFSKGLFGAFKINIAWHRWLIKAS
SFVAYIDAENLIRDVLLLDKGFTVSCDKSVTGIHNGLLISNISRNLLVKCASGRHAREWMREIVNMSETGVDFIREHRYNSFAPVR
RNSWIKWFDGEDYFSKVADAITSAKEEIFITDWWLSPELILKRPTEHVDEYRLDMLLKERAENGVRIYVILYKEIEMTSLINSAYSK
RTLMLQHPNIKVLRRHPDHVAGSNATVLWAHHEKIVCVDQTCFFGGLDLCYGRWDDNTHRLTDFGSATPNFFGKTESAVVGLSALMLN
PDAIDSAYHREQLRKLPPQGVTKMFIGKDYTNPYVQDVTEVDKPFDFLFRNLI PRMPWHDIACVAYGNAARDLARHFIQRWNFTKHQK
AKEDIAIPFLVPKVKVDSKKIPEGFDFNFTECDIQILRSASTWSVGENSTENSIYEAYQEHIRNSKYVYIENQFFITSLPDHYVLNKI
GDALVERILLAYNNNETFRVYVVMPLPCFPGEIGAASATATCFVFEWNLQSSRNIINKLKEGGVEDPSAYINFYGLRNYADLRGKMV
SEIVYVHSLMIVDDNVVIMGSANINDRSMGLSRDSELAVCVQDTSTIHGMNGKQVKVGGFAAKLRKLFQEHGLLGEPIYANVIDP
ISDDFYKNAWMATARNNTTVYEQVFRCLPTQEVKSFVELEQYKINGLNI TDPVQARSMLKNIRGFLVEKPLDFLLHQNLWPAAGTNE
SLVPTKVFT
    
```

Abb.23 Aminosäure-Sequenz der möglichen *Hydractinia* PLD

Die Sequenz wurde durch eine BLAST-Analyse mit Homo sapiens PLD1 (NCBI:GenBank: BAD93144.1) und PLD2 (NCBI:GenBank: AAB96655.1) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt.

<i>H.sapiens</i> PLD1	-----MSLKNEPRVNTSALQKIAADM-----SNIENLDTREL	33
<i>H.sapiens</i> PLD2	-----MTATPESLFPTG-----DELDSSQL	20
<i>H.echinata</i> PLD	MAEDVHDNWSIKVEIRNGTGKAVESKPLDEKEPIKRNSTASSHSTSSS	50
	: . * *	
<i>H.sapiens</i> PLD1	HFEGE-EVDYDVSPSPDKIQEVYIPFSAIYNTQGFKEPNIQTYLSGCP	82
<i>H.sapiens</i> PLD2	QMESD-EVDTLKEGEDP--ADMHPFLAIYELQSLK-VHPLVFAPGV	66
<i>H.echinata</i> PLD	SSESQEIDEELNQDAEDYKDVVVPFGTIFSTQEHK--QYFPLCVP	97
	*.: *:* . . . : ** :* . * : . *	
<i>H.sapiens</i> PLD1	AQVLEVERFTSTTRVPSINLYTIELTHGEFKWQVRRKFKHFQEFHRELLK	132
<i>H.sapiens</i> PLD2	AQVVGTERYTSQSKVGTCTLYSVRLTHGDFSWTTKKKYRHFQELHRDLLR	116
<i>H.echinata</i> PLD	ITITERIHQPASHRLNPV-LYVINITHGIYKWKIKRRYNHFRELYSHLEL	146
	: ** :.*** :.* *:::***:*. *	
<i>H.sapiens</i> PLD1	YKAFIRIPIPTRRHTFRQNVREE-PRMPSLPRS-SENMIREEQFLGR	180
<i>H.sapiens</i> PLD2	HKVLMSL-LPLARFAVAYS PARDAGNREMPSPRAGPEGSTR--HAASKQ	163
<i>H.echinata</i> PLD	YRAKAIQVHPTMATRLD-----KVPKFPARPDITILTITTKKKDKQM	186
	::. : * . :*:* :	
<i>H.sapiens</i> PLD1	KQLEDYLTKILKMPMYRNYHATTEFLDISQLSFIHDLGPKGIEGMIMKRS	230
<i>H.sapiens</i> PLD2	KYLENYLNRLLTMSFYRNYHAMTEFLEVSQLSFIPDLGRKGLEGMIRKRS	213
<i>H.echinata</i> PLD	RKLQRFLQNVVNCDFRFRNNRHTLEFLEVSFLSFVHGLGDKGKEGEVAKRA	236
	: * : * :. . :** : ***:* *** :.* ** * : ** :	
<i>H.sapiens</i> PLD1	GGHRIPGLNCCGQGRACYRWSKRWLIVKDSFLLYMKPDSGAIQVLLVVDK	280
<i>H.sapiens</i> PLD2	GGHRVPGTCCGRDQVCYRWSKRWLIVKDSFLLYMCLETGAIQVLLVVDK	263
<i>H.echinata</i> PLD	GGHTFS-KGLFGAFKINIAWHRWLIKASSFVAYIDAENLIRDVLLLDK	285
	*** . . * : * .***:*.***: * : . . * * * .*	
<i>H.sapiens</i> PLD1	EFKIKVGGKETETKYGIRIDNLSRTLILKCNYSYRHRWGGAIIEFIQKH	330
<i>H.sapiens</i> PLD2	GFEVVRGKRSTEARHGVRIDTSHRSLILKCSYRQARWVAQEITELAQGP	313
<i>H.echinata</i> PLD	GFTVSCDKSVTGIHNGLLISNISRNLLVKCASGRHAREWMREIVNMSET	335
	* : . * * : * : * . * . * : * * * * * * * : . .	
<i>H.sapiens</i> PLD1	GTNFKDHRFGSYAAIQENALAKWVNAKGYFEDVANAMEEANEEIFITD	380
<i>H.sapiens</i> PLD2	GRDFLQLHRHDSYAPPRPGTLARWVNGAGYFAAVADAILRAQEEIFITD	363
<i>H.echinata</i> PLD	GVDFIREHRYNSFAPVRRNSWIKWFDGEDYFSKVADAITSAKEEIFITD	385
	* :*:* **.*:* . : . : * :* . ** * :* : * :*****	
<i>H.sapiens</i> PLD1	WWLSPEIFLKRVPVEGNRWRLDCILKRKAQGVRFIMLYKEVELALGIN	430
<i>H.sapiens</i> PLD2	WWLSPEVYLKRPVHSD--DWRLDMLKRAEAGVRSILLFKEVELALGIN	412
<i>H.echinata</i> PLD	WWLSPELILKRPTEHVDEYRLDMLLKERAENGVRIYVILYKEIEMTSLIN	435
	*****: **** . : *** *:*:*:***: :*:***:*.***	
<i>H.sapiens</i> PLD1	SEYTKRTRLMLRHPNIKVMRHPDHVSS--TVYLVWAHHEKLVIIDQSVAFVG	478
<i>H.sapiens</i> PLD2	SGYSKRALMLLHPNIKVMRHPDQVT-----LWAHHEKLLVVDQVVAFLG	456
<i>H.echinata</i> PLD	SAYSKRTRLMLRHPNIKVMRHPDHVAGSNATVLWAHHEKIVCVDQTCFFG	485
	* * :*:* ** *****:***:* : *****: : * * :.* *	
<i>H.sapiens</i> PLD1	GIDLAYGRWDDNEHRLTDVGSVKRVTSGPSLGLSPPAAMESMESLRLKDK	528
<i>H.sapiens</i> PLD2	GLDLAYGRWDDLHYRLTDLG-----DSESAASQPP-----	487
<i>H.echinata</i> PLD	GLDLCYGRWDDNTHRLTDFGSATPNFFGKTESAVVG-----	521
	:.****** :****.* . : . :	

<i>H.sapiens</i> SOS1	RFEIPEPEPTADRIAIENGDQPLS-AELKRFRKEYIQPVQLRVLNVCRHWVEHHFYDFE	705
<i>H.sapiens</i> SOS2	RFEIPEPEPTDADKLAIEKGEQPIS-ADLKRFRKEYVQPVQLRILNVFRHWVEHHFYDFE	703
<i>H.echinata</i> SOS	RYDIPEP-----TTIANGSDKPVVVTREELKRFRKEYSHPIQLRVLNVLRHWVDQHFYDFQ	481
	*:***** :* ... :: :***** *:***:*** *****:*****:	
<i>H.sapiens</i> SOS1	RDAYLLQRMEEFIG-TVRGKAMKKWVESITKIIQRKKIARDNGPGHNITFQSSPPTVEWH	764
<i>H.sapiens</i> SOS2	RDLELLERLESFIS-SVRGKAMKKWVESIAKIIRRKQQAQANGVSHNITFESPPPPIEWH	762
<i>H.echinata</i> SOS	REETLLSTLQKFLSRVRSKTRARKWVETIEKIVNRRLETASVGP-EVYTFSTPAPAFEW	540
	*: ** . :.:* . **.*: *****: * **.:* : * . **.:...***	
<i>H.sapiens</i> SOS1	ISRPGHIETFDLLTLHPIEAIARQLTLESYRAVQPSSELVGSVWTKEDKEINSPNLLKM	824
<i>H.sapiens</i> SOS2	ISKPGQFETFDLMTLHPIEAIARQLTLESYRKYVQPSSELVGSVWTKEDKEINSPNLLKM	822
<i>H.echinata</i> SOS	LTN--NIEKFSLLTLHPLEIIGRQLTIMQSEIFRSIKPSELVGTVWVKDKKELSPNALKM	598
	::. :.*.*:*****:*.*****:.*:.*: * :*****:*.:*:* * * * *	
<i>H.sapiens</i> SOS1	IRHTTNLTLWFEKCIIVETENLEERVAVVSRIEILQVQELNNGVLEVVSAMNSSPVY	884
<i>H.sapiens</i> SOS2	IRHTTNLTLWFEKCIIVAEENFEERVAVLSRIEILQVQELNNGVLEIVSAMSVPVY	882
<i>H.echinata</i> SOS	IHLSTFLTWFYELSCETHNFEEERVAVYTRIIDLIMVFIELNNGMMEILGAINSAVH	658
	: . **:*.* * * :.:***** :****:* * * :*****:.*:.*:* * .*	
<i>H.sapiens</i> SOS1	RLDHTFEQIPSRQKKILEEAHELSED-HYKKYLAKLRSINPPCVPFYIYLTNLIKTEEG	943
<i>H.sapiens</i> SOS2	RLDHTFEALQERKRKILDEAVELSQD-HFKKYLKLSINPPCVPFYIYLTNLIKTEEG	941
<i>H.echinata</i> SOS	RLRFTTGELSPKRMQALQYVKELTDDGHNVKYTEKLSINPPCVPFYVYLSNLIKAEEG	718
	** .* : : : * : * . * * : *	
<i>H.sapiens</i> SOS1	NPEVLKRHGKELINFSKRRKVAEITGEIQYQNPQYCLRVESDIKRFENLNPMSMEK	1003
<i>H.sapiens</i> SOS2	NPDFLKKKGKDLINFSKRRKVAEITGEIQYQNPQYCLRIEPMRFFENLNPMSASEK	1001
<i>H.echinata</i> SOS	NPDFLNPDPGIINFSKRRMVAITGEIQKYQNPYLNQIQPQIKKFIELDPFAGRTDQ	778
	* :.* . . :***** **:******:*** * * :.:.:.:.:.:.:.:.:.:. .:	
<i>H.sapiens</i> SOS1	EFTDYLFNKSLIEIPRNPKPLPRFPKYSYPLKSPGVRPSNPRP---GTMR-HPTPLQQ	1058
<i>H.sapiens</i> SOS2	EFTDYLFNKSLIEIPRNCKQPFRPKSTFSLKSPGIRPNTGRHGSTSGTLRGHPTPLER	1061
<i>H.echinata</i> SOS	ELKDHLYESSLMIEPRQAKQPTKFRKSDIHLKSPGIKAGSRTQ-----	822
	:.:.*:.* ** * * : *	
<i>H.sapiens</i> SOS1	EPRKISYSRIPESETESTASAPNSPRTPLTPPPASGASSTTDVCSVFDSDHSSPFHSSND	1118
<i>H.sapiens</i> SOS2	EPCKISFSRIAETELESTVSAPTSPNTPSTPP---VSASSDLVFLDVLNNSCGS--N	1115
<i>H.echinata</i> SOS	-----SMGRKPSSSSQMTDVEPTPILERRRP--SPTPSTMSSFSTFTINEDEPDGG--	872
	* . * . . . : * * . . * * : :	
<i>H.sapiens</i> SOS1	TVFIQVTLPHGPRASVSSISLTKGTDEVPVPPVPPRRRRESAPAESSPSKIMSKHLDS	1178
<i>H.sapiens</i> SOS2	SIFAPVLLPHS-KSFFSSCGSLHLKLEEPLIPPLPRLPKK---FDHDASNSKGNMKSDDD	1171
<i>H.echinata</i> SOS	-----EKEEDEVIEEPPPLLLPR-----APKSEGRLELPS	903
	* : * * * * : . * :	
<i>H.sapiens</i> SOS1	PPAIPPRQPTS KAYS PRYSISDRSISDPPESPLLPPRE-----PVRTPDVFS	1229
<i>H.sapiens</i> SOS2	PPAIPPRQPPPKVKPRVPVPTG-AFDGPHSPPPPPRDPLDTPPVPLRPPEHFINC	1230
<i>H.echinata</i> SOS	KPVGYKKQFSLPARP--ETISRSFSLEDAQVEPPLPRTTP-----AALRTNQETAF	953
	* . : * : * * * * . . . :	
<i>H.sapiens</i> SOS1	PLHLQPPPLGKSDHGNAFFPNSPSPFTP-PPPQTPSPHGTRRHLPSPLTQEVLDLHSA	1288
<i>H.sapiens</i> SOS2	PFNLQPPPLGHLHRSDWLDRDSTCPNSPSTPSTPSRVRRCYVLS--SSQNLAHPP	1288
<i>H.echinata</i> SOS	ALPANTPPVPHREGE-----RQRAQSDIGPPSLPSRRSKPKLLHRS---SEPSIEVVP	1003
	.: :.*:* : * * * * : : . : . : .	
<i>H.sapiens</i> SOS1	GPPVPPRQSTSQHPIPKLPKTYKREHHPMSMRDGPPLLENAHSS	1333
<i>H.sapiens</i> SOS2	APPVPPRQNSSPHLPKLPKTYKRELSHPPLYR--LPLENAET-	1330
<i>H.echinata</i> SOS	EVTAPP-----EIPPRKV-----	1016
	.** : * * * :	

Abb.26 Sequenzvergleich des möglichen *Hydractinia* SOS-Proteins mit SOS1 und SOS2 des Menschen

Hydractinia SOS (siehe Anhang Abb.25). *Homo sapiens* SOS1 (NCBI Reference Sequence: NP_005624.2) und SOS2 (NCBI Reference Sequence: NP_008870.2). Domänen wurden nach PROSITE markiert. Erstellt wurde der Vergleich mit ClustalW. In gelb markiert die „Dbl homology“ (DH_2)-Domäne. In grün markiert die „pleckstrin-homology“ (PH)-Domäne, in blau markiert ist die „Ras guanine-nucleotide exchange factor N-terminal“ (RASGEF_NTER)-Domäne. In lila markiert wurde die „Ras guanine nucleotide exchange factor catalytic“ (RASGEF_CAT)-Domäne


```

MINTDLEHFNYEVREDFDIDDGNDGDDEFEKLNQYIHEHAPPSERWYHGRLGRKDGEERLLAHGKSCCYLVRESDRKQGVSLSYLS
LAGHISHFRITAICGDYIIGGRQFHSLQHLIGYISTYGLMKDERLKEPVAPSEPVHLGYRLIAKFPYKATADTDELSFNIGDVSFVQ
NVLDEDWLWVVSQKDNKSGLVPKALTEEVDSADPFEGRSWFCSVSKTDAQITILMNYGDVGNFLIRPSDMPGDYSISLRDQTGVSFRF
IQRQGRFIIIGRPFDSIEAIIKRYNKEQLAEGVSLRSPDRSKYEAFYRNLKGSIRRPDPDQMDGTVPRIKPLRINSRIANSNITK
SGYLIKRGRNRWKKLYMVLRGEEQQLLYFDNEKRTKPKGLFDLTYAVVYHVHESLFGPNCFQIVVRLNEMQTYFLCAETSDSAQE
WLDVVTQYCGNMRNSNNASGQNVKELKSELSICHAQKIPTNKVPHYPYCVVSLNDVKTCTKTSQEAPEPVDFEDFKFNDLPNDITSFT
VAIYNRQSRSPYKDKEMGRVTVYLNLEPGKVLQWVFLGSLQHKSEIGSIRLTAKFVHEIIMPDEEYKLELVLLSRDYHMVQYLGEV
SKDLNSLAYTLRLFRKDNNELNLIKTIITRELHTKEKKTFRGNTLS TKLLDQYMKMIAIPYLQDTIGSVILKIMESKQCCELNPS
KVEKGSNVAENLQQLIKFLEEITSNVFNSAQSCPPLRYLFLCHLQLEAAKKWPEEQYIQSRVVS AFLFLRLIVPAVLNPKMHNLVHES
PSQMSRRTLTLVAMCLQLANLVEFGAEPYLVAVNPFQKYRKKMVDLDEIANQSETPKNTEILKHDLARDLAAIHETCIKHEHQL
VKLSSTQPNVKILLAIVEGIKQKQYMKQGESVCEFAV

```

Abb.29 Aminosäure-Sequenz des möglichen *Hydractinia* RASA1(GAP)-Proteins

Die Sequenz wurde durch eine BLAST-Analyse mit menschlichem RASA1(GAP) (NCBI Reference Sequence: NP_002881.1) im Transkriptom von *Hydractinia* ermittelt.

<i>M.musculus</i> RASA1GAP	MMAAEAGSEEGPATAGPGGG-AATGSSAYSAAACRVKLPALPVAAPCP	49
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	MMAAEAGSEEGPVTAGAGGGAAAGSSAYPAVCRVKIPALPVAAPYP	50
<i>H.echinata</i> GAP	-----	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	GLADADLVAALGGGAASGSGFLGTGPVAGVLGGAALTG-----SAAA	91
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	GLVETGVAGTLGGGAALGSEFLGAGSVAGALGGAGLTGGGTAAGVAGAAA	100
<i>H.echinata</i> GAP	-----	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	GVAGAAAAGPAGDVAFKTGTLSPAETLPGGGFPPLPPPQLPPLGSSL	141
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	GVAGAAVAGPSGDMALTKLPTSLLAETLPGGGFPPLPPPYPPLGAGL	150
<i>H.echinata</i> GAP	-----MINTDLEHFNYEVREDFD-----	18
	. * . *	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	GTVDEGDSLDPGEYEEEEVAIPLTAPPNTQWYHGKLDRTIAEERLRQAGK	191
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	GTVDEGDSLDPGEYEEEEVAIPLTAPPNTQWYHGKLDRTIAEERLRQAGK	200
<i>H.echinata</i> GAP	--IDDGNDGDDEFEKLNQYIHEHAPPSERWYHGRLGRKDGEERLLAHGK	66
	:. . . *:*. : * **:::****:*.*. **** **	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	SGSYLIRESDRRPGSFVLSFSLQTNVNVNHFRIIAMCGDYIIGRRFSSLS	241
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	SGSYLIRESDRRPGSFVLSFSLQNMVNVNHFRIIAMCGDYIIGRRFSSLS	250
<i>H.echinata</i> GAP	SCCYLVRESDRKQGVSLSYLSLAGHISHFRITAICGDYIIGRQFHSLQ	116
	* .*:*.****: * : **:* . :.**** *:*****:* **.	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	DLIGYYSHVSCLLKGEKLLYPVAPPEPVEDRRRVRAILPYTKVPDTDEIS	291
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	DLIGYYSHVSCLLKGEKLLYPVAPPEPVEDRRRVRAILPYTKVPDTDEIS	300
<i>H.echinata</i> GAP	HLIGYYSTYGLMKDERLKEPVAPSEPVHLGYRLIAKFPYKATADTDELS	166
	.***** ..*:*.** * **.*** . * :.*.**:	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	FLKGDMPFIVHNELEDGMWVNTLRTDEQGLIVEDLVEEVGREEDPHEGKI	341
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	FLKGDMPFIVHNELEDGMWVNTLRTDEQGLIVEDLVEEVGREEDPHEGKI	350
<i>H.echinata</i> GAP	FNIGDVSFVQNVLDEDWLWVVSQKDNKSGLVPKALTEEVDSADPFEGRS	216
	* **:* **:* *:*.**.. : :.***: : *.*. . **.*:	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	WFHGKISKQEAYNLLMTVGQVCSFLVVRPSDNTPGDYSLYFRNTENIQRFK	391
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	WFHGKISKQEAYNLLMTVGQVCSFLVVRPSDNTPGDYSLYFRNTENIQRFK	400
<i>H.echinata</i> GAP	WFCS-VSKTDAQITILMNYGDVGNFLIRPSD-MPGDYSISLRDQTGVSFRF	264
	** . :.* * * .:***. **: .**:* ** * : * . :.***:	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	ICPTPNQFMMGGRYYNSIGDIIDHYRKEQIVEGYLKEPVPMDQEQVL	441
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	ICPTPNQFMMGGRYYNSIGDIIDHYRKEQIVEGYLKEPVPMDQEQVL	450
<i>H.echinata</i> GAP	IQ-RQGRFIIIGRPFDSIEAIIKRYNKEQLAEGVSLRSPDRSKYEAFY	313
	* .:***:*** :** **:*.*.***:* * :.*: . . .	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	N-----DTVDGKE-IYNTIRRKTDAFYKNIVKKGYYLLKKGK	479
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	N-----DTVDGKE-IYNTIRRKTDAFYKNIVKKGYYLLKKGK	488
<i>H.echinata</i> GAP	RNLKGSIRRPDPDQMDGTVPRIKPLRINSRIANSNITKSGYLKRGHRN	363
	. . :.*. :.***:*** :** **:*.*.***:* * :.*: . . .	
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	RWKNLYFILEGSDAQLIYFSEKRATKPKGLIDLVSVCVYVVDLDFGRP	529
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	RWKNLYFILEGSDAQLIYFSEKRATKPKGLIDLVSVCVYVVDLDFGRP	538
<i>H.echinata</i> GAP	RWKKLYMVLRGEEQQLLYFDNEKR-TKPKGLFDLTYAVVYHVHESLFGRP	412
	::*. . : **:*.*.*** *****:* : . ** *:*.*.***	

<i>M.musculus</i> RASA1GAP	NCFQIVVQHFSEEHYIFYFAGETPEQAEDWMKGLQAFCS	LRKSSPGTSNK	579
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	NCFQIVVQHFSEEHYIFYFAGETPEQAEDWMKGLQAFCS	LRKSSPGTSNK	588
<i>H.echinata</i> GAP	NCFQIVVRALNEMQTYFLCA-ETSDSAQEWLDVVTQYCG	NMRNSNNASGQ	461
	*****: :.* : * * **.:*::*.: : :*. :.* :*.: :		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	RLRQVSSLVLHIEEAHKLPVKHFTNPYCNLYLNSVQVAKTHAREGONPVW		629
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	RLRQVSSLVLHIEEAHKLPVKHFTNPYCNLYLNSVQVAKTHAREGONPVW		638
<i>H.echinata</i> GAP	NVKELKLELSICHAQKIPITNKVPHPYCVVSLNDVKTCTRTKSQEAPEPVF		511
	.:*:*.* * * .*:*:*.:*.:*:* : **.*.:*.:*.:*.:* : **:		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	SEEFVFDLPPDINRFEITLSNKTTR-SKDPDILFMRCC	LSRLQKGHATD	678
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	SEEFVFDLPPDINRFEITLSNKTTR-SKDPDILFMRCC	LSRLQKGHATD	687
<i>H.echinata</i> GAP	DEDFKFNLDLPNDITSTVAIYNRQRSPYKDKEMGRVT	VYLNLTLEPGKVL	561
	.*:* *:*.* * . * :*: :* :. * * :*: : * . * :* :. * *		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	EWFLLSHIPKLGIEPGLRVRARYSMEKIMPEEYSEFKELILQKELHV		728
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	EWFLLSHIPKLGIEPGLRVRARYSMEKIMPEEYSEFKELILQKELHV		737
<i>H.echinata</i> GAP	QWFVLSLQHKSS--EIGSIRLTAKFVHEIIMPDEEYGLLEVLRSRYHM		609
	:**:*.* * . * **:*:* :*: * **:*.*.:* :*:*.:* :* :		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	VYALSHVCGQDRILLASILLKIFLHEKLESLLCTLNDREISMEDEATTL		778
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	VYALSHVCGQDRILLASILLRIFLHEKLESLLCTLNDREISMEDEATTL		787
<i>H.echinata</i> GAP	VQYLGEVS-KDLNSLAYTLRLIFRKNLNLIKTITRELHTKEKKETL		658
	* *..* . * * **:*.* :*: * * :* . * :* :* :* :* :* **		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	FRATTLASTLMEQYMKATATQFVHALKDSILKIMESKQSCELSPSKLEK		828
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	FRATTLASTLMEQYMKATATQFVHALKDSILKIMESKQSCELSPSKLEK		837
<i>H.echinata</i> GAP	FRGNTLSTKLLDQYMKMIAIPYLQDTIGSVILKIMESKQCCELNPSKVEK		708
	..*:*.:*:*:*.* * :*:*:* . ***.*.*.*.*:*.*		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	NEDVNTNLAHLLSILSELVEKIFMASEILPPTLRYIYGCLQKSVQHKWPT		878
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	NEDVNTNLTHLLNLSSELVEKIFMASEILPPTLRYIYGCLQKSVQHKWPT		887
<i>H.echinata</i> GAP	GSNVAENLQQLIKFLEEITSNVFNASQSCPPLRYLHFLQLEAAKKWPE		758
	..* * * :*:*:*.*.:*.:* :* :* *:*:* :* * . * :* * *		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	NNTMRTRVVSQFVFLRLICPAILNPRMFNIISDPSPIAARTLTLVAKSV		928
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	NNTMRTRVVSQFVFLRLICPAILNPRMFNIISDPSPIAARTLTLVAKSV		937
<i>H.echinata</i> GAP	EQYIQSRVVSQFVFLRLIPAVLNPKMHNLVHESPSQMSRRTLTLVAMCL		808
	: :*:*.*.*:*.*.* * :*:*:*.*.:* :* * :* :* * * . :		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	QNLANLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPELPTTHEHS		978
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	QNLANLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPELPTTHEHS		987
<i>H.echinata</i> GAP	QKLANLVEFGAKEPYLAVNPFQKYRKKMVDLDEIANQSETPKNTEIL		858
	..*.*.*.*.*.* :*:*:*.*.:* :* :* :* * * . * * . * *		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	RTDLSRDLAALHEICVAHSDDELRTLSNERGVQHVLLKLLAITELLQKQK		1028
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	RTDLSRDLAALHEICVAHSDDELRTLSNERGAQHVLLKLLAITELLQKQK		1037
<i>H.echinata</i> GAP	KHDLARDLAAIHETCIKHEHQLVKLSS---TQPNVKILLAIIVEGIKRQK		904
	: **:*.*.* * * :*..* * . * * * * * * * * * * * :* * * * * :		
<i>M.musculus</i> RASA1GAP	NQYTKTNDIR-----	1038	
<i>H.sapiens</i> RASA1GAP	NQYTKTNDVR-----	1047	
<i>H.echinata</i> GAP	EQYMKQGESVCDEFV	920	
	:* * * . :		

Abb.30 Sequenzvergleich des möglichen *Hydractinia* RASA1(GAP)-Proteins mit RASA1(GAP)-Proteinen anderer Organismen

Hydractinia RASA1(GAP) (siehe Anhang Abb.29), *Homo sapiens* GAP (RASA1) (NCBI Reference Sequence: NP_002881.1) GAP RASA1 von *Mus musculus* (NCBI Reference Sequence: NP_035027.1). Spezifische Domänen wurden nach PROSITE markiert. Erstellt wurde der Sequenzvergleich mit ClustalW. In grau die beiden "SH2" Domänen sowie die „RAS_GTPASE_ACTIV_2“ Domäne markiert. In grün ist die „SH3“ Domäne und in blau die „PH“ Domäne markiert. In rot wurde die „C2“ Domäne markiert.

Vektor-Rückgrat →

```
GGGCCCGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
ACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCCGTGTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTT
ACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT
GCTATGTGGCGGTTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAG
TACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGA
TCTGTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGGTGACACCAGCATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAA
CTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGC
GCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
```

AGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTA
AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTG
GTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAG
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC
CAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCG
TGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAATGAGAAAAGCGCCAGCTTCCCGAAG
GGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTGGTATCT
TTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAACCGCC
AGCAACGCGCCCTTTTACGGTCTCTGGCCTTTTGTCTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACGCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAAGCGGAAGA
GCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATAAGCAGCTGGCAGCACAGGTTTCCGACTGAAAGCGGGC
AGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG
GAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGTGTAACAGCAGGCCAGTGAATTC
GAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGT

Hydractinia AktinII (AktII) Promotorregion→

GAATGTTCACTTCGATATTTAGCAAGCGGTTAAAGTCGCGAGGATGTAAGTGTCAATATTGCGCATCAGGAGCAATTTGCCCGC
ACTGATTGTTTCAAAGTCAAGCCAAACATGAGTTAATTTTACTTGCCTTAAATACGCAAAATGTTTTTTTTTCCGTTGAGCGAAGCG
CCATCGTGGCGGCAAACTTTAATCCCATGGCTGTGTCTCTTGTAGATCTGACGCGCAACAGACAAAAGCTCTGGGAACGAG
GTTGTGTGAGGAGTCTGAGTCTGTTAGGCAATATACCCACATAAAAAATAGATCGCAGTAGGAAATTTGCTAATTTCTAGTCTTCTC
TAATTCAAATGCTAATCTACCTATGGGAACGAGGATGGCTTGTGTTTTGAAACTAATGGGTGTGAGTTTTCCAGGCTGTTT
TTATTTAATTTTTAATTTTTTAAATGTTAAATCATGATTCGTGTTCTTTATGTTGGCTATTACTGCAATTTTCCAAATCTCGTGTG
TTTAGTAGCTTCTCTTAGTACTAGAAAGAGTGCATATATTGGCCTTTTTTCTTCTGCGTCAACAACTCTGAGATTGTTTTGAA
GTTATTTTTTAAACTGTCAGCTGTTTACAGCTTGATGTTCAAGTAATCTAATCCGTTTGTGCTAAAAATAAACTGTTAAGGG
GGTGGATTAGTGTTCATACTTTCAATTTGTTATATAATTTGTTATAAAAGCTAGACACACTGTACTTTCAAAACATAAGAAAAATGT
CTGTTAGCGTCTTTGAACTTTAACCATTTAAATTAGTCAAAACGAGAGTTTATATAGAGTTTACTCATTGAAAACACGTTTCAA
CTAAACTTCTTTCATGCTACAGTATTGAGGTTTTATTCGTACGTTGTAAGTTGCCCCCGTGTGATTTTTGTTTAGAAACGTGAA
CAACAAACAGTGTGTACAGGATGGTGTGAGGCAATCAAATTTACATAAAAAACATAACGGTTGCGTCTATAATGCCATAAAT
AGTTTTGCTGAACCTCTCCTTTCATCGTGTCTGTGTTTTCAATGAAAAACTTAAAAATGACTGCGAAGGAGTCAACTTTCCGTTGGAT
ACATGGTTTTCTATTACGCTTTAATAACAATAGGCTTGTGTTTTGTACATTGTTGAAACTAAATGACGTTTTCTTCTGTTCTGGTAA
AAATGATATATTTAGACAAAAAATGCAAAGCATTGTAACCTATGCTGCAACTAAACTTTTCCAATAAATTTGATCTTCCAAAT
GTATGATCTGTTGAGAAATGTGCAACCATGAGTTAGGAAAAATTACTTGTACGTATGAGAAAAAAGAAAGAAATAGCCCGGCAGG
GATTAGCTTAAAAACTTAAAAAGAAAAAAGAAACAGCAGGAAAGAAATTTTTATGGTCTTCGGAACATGTTTCAATTTATATGATG
CTCGTAGAAACCACCTTAAATCGCTATCTCATAAAAATCAACATTTCTGCATGTTTGTATGAGCTTTGAGGGTTGTTGTCCATAT
TCAGGGGTATATAAAAAAATTTTGTGTTGAAATTTAAACAAAGTCAATAAATAAAATGGTCTTTTATTCGAATATTTTAAATG
CAGTTAGAACTACTGCTAGAAAAATATAGAAAAATTAAGAACACTTAAATCTCGACATAATTTCTTGTTTTTCAAACCCCGT
ACAATCAAAGCGTCTATTGTTTTGAGTCAAACAATGGAATGCACTGAGAAAGTCTTTTTTCCGACATATGTTGAGAAACTGCT
TATCGTGTATGAGCTTAAATTCGAGCCCGGAGACAAAACGCCCTCACCAGGTTTACGAACTTAAAGTAAACATGACAAGACGTT
CATTTTTTCTCTTACACTTCGTAATAAACTAACTCAA

„green fluorescent protein“(GFP) kodierende Region→

ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTCACTGGAGTTGTCCTAATCTTGTGTAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCA
GTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACTTACCCTTAAATTTATTGCACTACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAAAC
ACTTGTCACTACTTCTGTTATGGTGTTCATATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATG
CCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACACAAAGACAGTGTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATA
CCCTTGTAAATAGAAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAAGATGGAACATCTTGGACACAAATGGAAATACAACATAACTC
ACAAATGTATACATCATGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATAGACACAACATTAAGATGGAAGCGCT
CAACTAGCAGACCATTAACAACAAATCTCCAATTTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTTCACACAATCTG
CCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCATGGTCTTCTTGTGTTGTAACAGCTGTGGGATTACACATGGCATGGATGA
ACTATACAA

Ras1 (beziehungsweise Ras1(G18V) oder Ras1(Q67V))

ATGTCTTCACTGTCAGAACCAACCAAGTTCAAATGGTTGTAGTTGGAGCTGAGGTTGTTGAAAGAGCGCTTTAACAATACAGCTAA
TTCAAACCATTTTCGTGGAAGACTACGACCCAAACATCGAGGACTCCTATATCAAGCAAGTTGTAGTGGATGGCTCTATTTGTATACT
GGATATACTTGATACTGCAGGTCAAGGAGAAATACAGTGCATGCGAGAACACTACATGCGAACTGGAGAAGGTTTCTTTGTGTCTTC
GCCTGTTACTAGTTTAAATCTTTTCAAAGAAATAGACAACCTTTAGAACGCAAGGCACTGAGGGTGAAGATGCAAGATCAGTACCAATGG
TTTTGGTAGGAAATAAAGTCGATTTACCGAAGCGTGACGTGTGCGAAGGACGAAACGAGAAAGCACAGAGTTTCAATATACCATA
CGTTGAAACATACGCGAAACCAAGCAAGCGTGGAAGCAATTTTCCCTCGTGGAGAAATAATGCTGTGCTGCAGCGGAGA
GAGGTTCAAAGAAAGTGAATCGAAGAAATCGAAATTCAGTGCATATCTG

oder

Ras2 (beziehungsweise Ras2(G18V) oder Ras2(Q67V))

(Ras2G18V)

ATGGCTGGAGGCGAATTGGATAGACAATACAACTGGTTGTAGTTGGAGGGGGTGGTGTGGAAAAAGTGCCTTGACAATCCAGTTTA
 TTCAATCACATTTTCGTTCAAGATTATGATCCTACGATCGAAGATTCCCTATAGAAAACAATGTGTAATAGATGATCGAGTTGCACATTT

(Ras2Q67V)

AGACATTTTGGATACTGCTGGTCAAGAGGAATTTAGTGCATGAGAGAACAGTATATGAGAACTGGGAAGGATTTTATTAGTGT
 TCAGTGACAGATAGTTCCAGCTTCGATGAAATCCCGAGATTTACACACAAAATCCTACGAGTAAAGGATAAAGATGAATCCCGATGA
 TTCTAGTGGGTAACAAGTCAGATTTAGAGAATGAGCGAACTGTTCAACTGCAGAAGCACAAGAATTAGGTAGAAAACTAAAGATTC
 TTACCTGGAGTCTAGTGTAAACAACGAATTAATGTCGACGCGAGCATTTACGATTTAGTTCGAGCTATTAGGCGTTCTAATGAAGTT
 ATTGATCAGCCAGTTAAGAAAAAGAAAAAATCCAAGTGCACAAATCTG

Hydractinia AktinII (AKTII) Terminatorregion→

TAAGCTCCTTGAAGTAAAAGTCACATCCACAAAACAACAGGGTGGTAGACTAGAACTAACTTGTCAATTTTGTCAATTTTGACATT
 TTCAAAAAATCCATCTTGGGCTTTTGTGCACAACTTGAAGCCTTATAAATTTTGTAAATACAGATATCCACAAAATGTAATAAAT
 TAATAACGGGGTGTATACAATAACGAATCTCTCATAATAATTTATTTATTTCCCGGTTGGTGTGTCTGCTGCGAGACATCAT
 CAGAGGCAAACCTACTTTTTTTAGACTACACGCCTTTCAAATGTGTGATCTATCCTTTAAGAAATCGCTGGCGCCCTTGGTTAATCCC
 TGCTATCAATTTTGCGAATCTCTTCAGATGTGCACGAAAGATATCCCGGAGATGTCAAATCGCCTCTAAATGGAGTAAAGCTTTTTCTG
 CCAGACATTTACTTCCCGCATAAGTTTGTAGGTGCAAATCCCGCACTCGAAAAAGACTGCTGCTGGTAAATATGGTTTCGTTTCGTT
 ACGCTCGATGGAATAAATCCTACCTCAACTGTACTGACGCCCTATTGTTTTTTTATTGCGGAGGCCGTCAAAAAGAAAGTTACGATA
 ACTAACAAAGTATCGACCAGCACATTTGCGTCAATGCTTTATTGACGAGTCGTCTATTGAAAAATCCCGGTATAAATAGTGGGA
 AAAATGCCGAAATGTGATCTTTCTCCCTCTCTCCCCCTTTTCAATGTTGTGGGTTGCTATGCTGGTTGAGCGGAAAAATTTGTAT
 GTGTCGCGTCAAAATCGAATTAAGGGGAAGGGGAATATAACGTGTGTTTTGTTTAAATCCACAAATATTATGTTAGAGGGTTGTAG
 GATAAACTTGTGTACATGTAATTTGTCCAGAGCAGAACTTTGGGTGGCAAATTCCTTATTGCTACTATTTGCGCTTATTAATTTTCA
 CGCAATCGCCTCCAAAATGTTCTCCAGTGCAGGAAATTTGGTGCAGAAATAAATATCGTTAAAAAATGCGCTAAAAATTAATACTAC
 GCTTATAGGTTTATACCATATGCAAATCTTCCGTTTTGCTTAGTACTACTAAAAATAGAACTTTTCCGGATAACGTTTACACA
 TTTTTTAAAAAATCTCCGTTTTTGGGATCAAATTTGTGCGAAGACGGAAGAATTTGAAAACGGAATGTACAGTCGACTCTCTAAT
 TCGATTTTCCAGGGGAGGAAATTTATATCGAATTAGAGAGAGAATCGAATTAGGAAGTGTCTCTAATTCGAATTTTTTTTTTTTT
 TGGGGGGGGGACTAGAAAAATCGAATTACAGAGTGAATTTATATTGAACTCGCAAAAAAGGAATAAGACATGCATTTTTTGGAA
 CAGTGCAGCACGAATATTAAGACTTTTTTCAAGGATCTTTAAGATCTCTGAAAGTAGTCATCAATTTGACTGTTTTTTATTATAG
 CATATTTTATAAATCAACGGCCCATTTACATCTTTAATGCAACCACTACATCGTTTCCAAAGTTGAAAAA

Abb.31 Sequenz der erzeugten HeAktIIGFPRas1 oder -Ras2 Konstrukte

Blau markiert ist die *Hydractinia* Aktin II (AktII) Terminatorregion. Grün markiert ist die kodierende Region des grün fluoreszierenden Proteins. Blau ist die Promotorregion von *Hydractinia* Aktin II (AktII) markiert. Ohne Markierung ist die Sequenz des Vektor-Rückgrats. Gelb und umrahmt ist *Hydractinia* Ras1 und in lila und umrahmt ist *Hydractinia* Ras2 dargestellt. In der Ras1- oder Ras2-Sequenz sind in rot Basen markiert, deren Austausch zu einer konstitutiven Aktivierung der veränderten Proteine führt. Oberhalb der markierten Basen sind in rot die Basen gezeigt, die mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide eingeführt wurden.

8 Danksagung

Ich möchte allen danken die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Günter Plickert dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit zu erstellen. Ich konnte während dieser Zeit viel von ihm lernen. Er hat viel gefordert aber auch gefördert, was letztlich diese Arbeit ermöglicht hat.

Ein Dank gilt PD. Dr. Michael Kroiher, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Reinhard Heiermann, der sich viel Zeit für mich genommen hat und mir in intensiven Gesprächen immer mit einem guten Rat zur Seite gestanden hat.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch Dr. Klaus Herrmann der immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Auch Timo Künzel möchte ich herzlich danken. Er hat mich gerade zu Beginn dieser Arbeit sehr unterstützt.

Phillip Schiffer danke ich herzlichst für seine Unterstützung im bioinformatischen Bereich.

Desweiteren möchte ich hier Anja Nonn, Monika Hartmann und Gerald Firmenich für ihre Unterstützung danken.

Ein Dank gilt auch allen Diplomanden, Bachelor und Master Studenten die im Verlauf dieser Arbeit in der AG Prof. Dr. Plickert tätig waren.

Danken möchte ich meinen Eltern die mir diesen Weg ermöglicht und mich stets ermutigt haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Miriam. Sie hat mich immer unterstützt und mich in schweren Zeiten aufgefangen.

9 Erklärung

Ich versichere, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit- einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie –abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Günter Plickert betreut worden

Wido Tilmann

Bergheim, den

10 Lebenslauf

Wido Adolf Tilmann

Geboren am 12.07.1980 in Köln

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand verheiratet

Anschrift Kirchstraße 116
50126 Bergheim

Anstellung bei: AG Prof. Dr. Plickert Abteilung für experimentelle
Morphologie/Zoologie Universität zu Köln Biozentrum
Köln, Gebäude 304, Zülpicher Straße 47b, 50674 Köln

Schule

04/1995-06/2000 Silverberg Gymnasium Bedburg

06/1993-04/1995 Dörpfeld Gymnasium Deutsche Schule Athen

09/1991-06/1993 Silverberg Gymnasium Bedburg

Zivildienst

08/2000-06/2001 Alten- und Pflegeheim St.Martinus in 50189 Elsdorf

Universität

2001-2009 Universität zu Köln
Diplom in Biologie 11.03.2009

seit 06/2009 Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Univer-
sität zu Köln/ Institut für Zoologie/ Abteilung experimentelle
Morphologie/ AG Prof. Dr. Plickert
Seit 07/2010 Beginn des Promotionsvorhabens

Nebentätigkeit

10/2003-07/2006 Werksstudent J.P. Görgens GmbH

Publikationen:

Duffy D.J., Plickert G., Kuenzel T., Tilmann W., Frank U. (2010) “*Wnt signaling promotes oral but suppresses aboral structures in Hydractinia metamorphosis and regeneration*”, *Development*, 137 (18): S. 3057-3066.

Künzel T., Heiermann R., Frank U. Müller W., Tilmann W., Bause M. , Nonn A., Helling M. Schwarz R., Plickert G. (2010) “*Migration and differentiation potential of stem cells in the cnidarian Hydractinia analysed in eGFP-transgenic animals and chimeRas*”, *Developmental Biology* 348: S. 120–129
